



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

METASTATİK MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDAN SALINAN OTOKRİN
FAKTÖRLERDEN C3a, uPA VE TSLP’NİN MIP2
VE KC SALIMI ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nur OĞAN

Antalya, 2021





T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ
ANABİLİM DALI

METASTATİK MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDAN SALINAN OTOKRİN
FAKTÖRLERDEN C3a, uPA VE TSLP’NİN MIP2
VE KC SALIMI ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nur OĞAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuray ERİN

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Fonu (Proje Kodu: TTU-2017-2541) ve Tübitak (1001 Proje no: 115Z286) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. Nuray ERİN'e,

Sohbetlerinden büyük keyif aldığım, hayatın her alanıyla ilgili samimi paylaşımlarından beni esirgemeyen ve desteğini hep hissettiğim sevgili hocam Prof. Dr. Coşkun USTA'ya,

Bilgi ve deneyimleriyle alanım hakkında ufkumu açan sevgili Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM'e ve bölümümdeki tüm saygıdeğer hocalarıma,

Sevgisini ve samimiyetini hep hissettiğim canım hocam Doç. Dr. Edibe MİNARECİ'ye,

Uzmanlık eğitimimin en zor zamanlarında ve hayatımın bir çok alanında yanımda olan, tez deneylerime büyük oranda katkı sağlayan, hep mutlu olmasını istediğim, güzel kaplı, iyi niyetli arkadaşım Ayşe Sevgi YILDIZ'a,

Bir çok açıdan benim için çok zor olan bir süreçte daha iyi tanıdığım ve bağlandığım, hakkını ödeyemeyeceğim, sevgisine doyamayacağım, kızımın biricik teyzesi ve benim kardeşim Arş. Gör. Esra TAVŞAN'a,

Tanıdığım en zeki kadın olan, bulunduğu çok daha iyi yerlerde olması gerektiğini düşündüğüm ve olacağına tüm kalbimle inandığım ve anneliği en az akademisyenliği kadar mükemmel olan canım dostum Arş. Gör. Fatma Zehra Hapil ZEVLİLER'e,

Bana “laboratuvar”ı öğreten, çalışma deneylerimde yoğun yardım ve desteği bulunan ve ablalığımı hep hissettiğim sevgili Özlem AKDENİZ'e,

Bölümümdeki ve laboratuvardaki, üzerimde emeği, hakkı olan tüm araştırma görevlisi ve çalışma arkadaşlarıma,

Uzmanlık sürecimin iki güzel yoldaşı, arkadaşlıklarıyla huzur bulduğum sevgili meslektaşlarım Uzm. Dr. Ayça Arçay ÖZTÜRK ve Uzm. Dr. Özlem Karpuz ÇAMCI'ya,

Kendisiyle hayatım, önce babam için bana umut olan ve güven veren mesleki başarısı ve güzel kalbiyle, sonra da tez jürim olarak bana verdiği manevi destek ve sunduğu bilimsel katkısıyla kesiştiği için mutluluk duyduğum saygıdeğer hocam Doç. Dr. Derya Salim KIVRAK'a,

Dürüstlüğün, adaletin, insan olmanın, fedakarlığın ve pes etmemenin ne demek olduğunu öğrendiğim, kızı olmaktan gurur duyduğum, başarabildiğim herşeyin yegane sebebi ve desteği olan, beni ben yapan canımdan öte annem Ecz. Zennur YİTİZ'e,

Hayatımın en zor döneminde tanıdığım ve sayesinde zorlukları atlatabildiğim, bana uzmanlık eğitimim başta olmak üzere bir çok süreçte sabır gösteren ve destek olan, insanlığını çok sevdiğim, cerrahlığıyla ayrı babalığıyla ayrı gurur duyduğum sevgili eşim Op. Dr. Onur OĞAN'a,

Bu süreçte benimle birlikte çalışıp benimle birlikte uykusuz kalan, benim en büyük huzur, mutluluk ve güç kaynağım, sabırlı, azimli, akıllı, sevgi dolu ve güzel kalpli biricik kızım Derin OĞAN'a,

Ben çalışırken kızıma bakmak için ailemize katılıp bir anda benim bakım verenim olan, karşıma çıktığı için şükrettiğim, canımız Ümmüşümüz, Ümmü TURAN'a,

Ve sahip olduğum tüm güzel duyguların, etik ve ahlaki değerlerin mimarı olan, benimle hep gurur duyan, bana koşulsuz ve sonsuz sevgiyi tattıran, tertemiz kalpli canım babam Hüseyin YİTİZ'e,

Tüm içtenliğimle minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	9
Şekiller Dizini.....	10
1. GİRİŞ	4
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Meme Kanseri	6
2.2. Kemokinler	7
2.3. C-X-C Motif Kemokin Reseptör 2 (CXCR2) ve Kanser	8
2.4. CXCR2 ve Meme Kanseri	9
2.5. CXCR2 Ligandları	10
2.6. Fare CXCR2 Ligandları Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP2) ve Keratinosit-kökenli Kemokin (KC)	10
2.7. CXCR2 Antagonizmasının Antikanser Etkinliği	11
2.8. CXCR2 İnhibitörlerinin Klinik Çalışmalardaki Konumu	13
2.9. Bizim Modelimizde CXCR2 Antagonizması	13
2.10. CXCR2 Antagonisti SB225002	14
2.11. CXCR2 Reseptör Yapısı ve “Downstream” Yolakları	14
2.11.1. Fosfatidil İnositol 3 Kinaz (PI3K) / Akt Yolağı	16
2.11.2. Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB)	17
2.11.3. Akt Sinyali	17
2.11.4. Fosfolipaz C (PLC) / Protein kinaz C (PKC) Yolağı	18
2.11.5. Ekstrasellüler Sinyal İlişkili Kinaz 1/2 (Erk1/2)	18
2.11.6. Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı	18
2.11.7. p38	19
2.11.8. G α - Adenilat Siklaz Aktivitesinin İnhibisyonu	19
2.11.9. G Protein Kenetli Reseptör Kinaz (GRK)	19
2.12. Otokrin Faktörler	21
2.12.1. Plazminojen Aktivatör, Ürokinaz (uPA)	
2.12.2. Kompleman Komponent 3a (C3a)	26

2.12.3. Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP)	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Hücre Kültürü	29
3.1.1. Hücre Dizileri	30
3.1.2. Hücre Sayımı	30
3.1.3. Hücre Sayısını Belirlemek İçin Standart Hazırlanması	31
3.1.4. Hücrelerin Spesifik Antagonistlerle Tedavi Edilmesi	31
3.1.5. Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi (WST-1 Testi)	32
3.2. ELISA Yöntemi	33
3.2.1. MIP2 ve KC Düzeylerinin ELISA ile Ölçümü	33
3.2.2. uPA ve C3a'nın ELISA ile Ölçülmesi	34
3.2.3. TSLP'nin ELISA ile Ölçülmesi	34
3.3. Western Blot Tekniği	34
3.3.1. Antagonistlerin p38, Erk ve Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkilerinin İmmunoblot ile Değerlendirilmesi	35
3.4. Kullanılan İnhibitörler ile İlgili Literatür Bilgisi	36
3.5. Genel İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Seçilen Otokrin Faktörlerin Fare Meme Karsinom Hücre Dizileri Tarafından Salımının Ölçülmesi ve Karşılaştırılması	38
4.1.1. Plazminojen Aktivatör, Ürokinaz (uPA) Seviyeleri	38
4.1.2. Kompleman Komponent 3a (C3a) Seviyeleri	39
4.1.3. Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP) Seviyeleri	
4.2. Proteinlerin İnhibitörlerin Fare Kalp (4THM) ve Beyin (4TBM) Metastatik Meme Karsinom Hücrelerinin Proliferasyonu ve Kemokin Salımı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	41
4.2.1. uPA Resepör Antagonisti IPR-803'ün Etkileri	41
4.2.1.1. IPR-803'ün Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	41
4.2.1.2. IPR-803'ün MIP2 Salımı Üzerine Etkisi	42
4.2.1.3. IPR-803'ün KC Salımı Üzerine Etkisi	43
4.2.2. C3a Reseptör Antagonisti SB290157'nin Etkileri	44
4.2.2.1. SB290157'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	44
4.2.2.2. SB290157'nin MIP2 ve KC salımı üzerine etkisi	45
4.2.3. TSLPR Antagonisti TSLPR-Ig'nin Etkileri	46

4.2.3.1. TSLPR-Ig'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	46
4.2.3.2. TSLPR-Ig'nin MIP2 Salımı Üzerine Etkisi	46
4.2.3.3. TSLPR-Ig'nin KC Salımı Üzerine Etkisi	47
4.3. Proteinlerin İnhibitörlerin 4THM ve 4TBM Hücrelerinde Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	48
4.3.1. IPR-803'ün Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	48
4.3.2. SB290157'nin Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	49
4.3.3. TSLPR-Ig'nin Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi	50
4.4. uPAR Antagonisti IPR-803'ün CXCR2 Antagonisti SB225002 İle Kombinasyonunun 4THM ve 4TBM Hücrelerinde Proliferasyon ve Kemokin Salımı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	51
4.4.1. IPR-803'ün SB225002 ile Kombinasyonunun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	52
4.4.2. IPR-803'ün SB225002 ile Kombinasyonunun MIP2 Salımı Üzerine Etkisi	54
4.4.3. IPR-803'ün SB225002 ile Kombinasyonunun KC Salımı Üzerine Etkisi	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	
7. ÖZET	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
8. ABSTRACT	69
9. KAYNAKLAR	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
10. EK 1	

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Akt/PKB	:	Protein Kinaz B
ATP	:	Adenozin trifosfat
APS	:	Amonyum Persülfat
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CXC	:	CXC dizilimli kemokin
CXCL1	:	CXC kemokin ligand 1
CXCL2	:	CXC kemokin ligand 2
CXCR2	:	CXC kemokin reseptör 2
C3a	:	Kompleman komponent 3a
C3aR	:	Kompleman komponent 3a reseptörü
DMEM	:	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
ECL	:	Kemoluminesan
ELISA	:	Enzimle ilişkili immuno sorbent assay
ERK1/2	:	Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz 1/2
FBS	:	Fetal Bovine Serum
GAPDH	:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GDP	:	Guanidin di fosfat
GPCR	:	G proteini kenetli reseptörler
GRO	:	Büyüme ile ilişkili onkogen
GTP	:	Guanidin tri fosfat
GTPaz	:	Guanidiin tri fosfataz
IL	:	İnterlökin
IPR	:	IPR-803, uPA antagonisti
K	:	Kontrol grubu
KC	:	Keratinosit kaynaklı kemokin
kD	:	Kilodalton
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	:	Fosfat tampon solüsyonu
PI3K	:	Fosfotidilinositol 3-kinaz
PKC	:	Protein kinaz C
PTEN	:	Fosfataz ve tensin homoloğu
PVDF	:	Poliviniliden diflorid
SB	:	SB225002, CXCR2 antagonisti
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	:	N,N,N,N-tetrametiletildiamin
TSLP	:	Timik stromal lenfopoietin

MAPK	:	Mitojen aktif protein kinaz
MIP2	:	Makrofaj İnflamatuvar protein 2
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
ng	:	Nanogram
rpm	:	Dakikadaki dönüş sayısı
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
uPA	:	Plazminojen aktivatör, ürokinaz
uPAR	:	uPA reseptör



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemokinlerin yapısı.

Şekil 2.2. CXCR2'nin kanserde pleotropik etkileri.

Şekil 2.3. Heterotrimerik G protein kenetli reseptör yapısı.

Şekil 2.4. CXCR2 aracılı hücre içi sinyal yolları ve karsinojenik süreçler üzerine etkileri.

Şekil 2.5. G proteini kenetli reseptör sinyalinin sonlandırılması.

Şekil 2.6. uPA'nın yapısı.

Şekil 2.7. uPA reseptörünün yapısı.

Şekil 2.8. uPA-uPAR etkileşiminin “downstream” etkileri.

Şekil 2.9. uPA'nın plazminojenin degradasyonu ile plazmin oluşumu ve ECM proteinleri ile etkileşimi.

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının orjininin şematizasyonu ve hücre hatlarının köken aldığı metastatik doku ve hücrelerin in vitro görüntüleri .

Şekil 4.1. uPA'nın farklı sayılarda ekilen hücrelerdeki seviyelerinin ELISA ile ölçülmesi.

Şekil 4.2. C3a'nın farklı sayılarda ekilen hücrelerdeki seviyelerinin ELISA ile değerlendirilmesi.

Şekil 4.3. TSLP'nin 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücrelerden 8 saat sonunda ortama salınan seviyelerinin ELISA ile değerlendirilmesi.

Şekil 4.4. uPA inhibitörü IPR-803'ün serumlu ve serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

Şekil 4.5. uPA inhibitörü IPR-803'ün serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 salımı üzerine etkisi.

Şekil 4.6. uPA inhibitörü IPR-803'ün serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin KC salımı üzerine etkisi.

Şekil 4.7. C3aR antagonisti SB290157'nin serumlu ve serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

Şekil 4.8. C3a inhibitörü SB290157'nin serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 ve KC salımı üzerine etkileri.

Şekil 4.9. TSLPR antagonisti TSLPR-Ig'nin serumlu ve serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. T0 tedavi başlangıcındaki hücre sayısını göstermektedir.

Şekil 4.10. TSLP inhibitörü TSLPR-Ig'nin serumlu ve serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 salımı üzerine etkisi.

Şekil 4.11. TSLP inhibitörü TSLPR-Ig'nin serumlu ve serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin KC salımı üzerine etkisi.

Şekil 4.12. 4THM ve 4TBM hücrelerinde uPAR antagonisti IPR-803'ün Akt, Erk ve p38 fosforilasyonları üzerine etkisi.

Şekil 4.13. 4THM ve 4TBM hücrelerinde C3a antagonisti SB290157'nin Akt, Erk ve p38 fosforilasyonları üzerine etkisi.

Şekil 4.14. 4THM ve 4TBM hücrelerinde TSLPR antagonisti TSLPR-Ig'nin Akt, Erk ve p38 fosforilasyonları üzerine etkisi.

Şekil 4.15. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

Şekil 4.16. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun serumsuz ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

Şekil 4.17. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 salımı üzerine etkisi.

Şekil 4.18. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun 4THM ve 4TBM hücrelerinin KC salımı üzerine etkisi.



1. GİRİŞ

Meme kanseri, 2020 yılında ilk defa dünya genelinde her iki cinsiyette görülen en sık kanser haline gelmiştir ve güncel veriler günümüzde her dört kadından birinin (%24,5) meme kanseri tanısı aldığını belirtmektedir [1]. Diğer taraftan meme kanseri kadında kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir ve mortalitesinden büyük çoğunlukla primer tümörden ziyade uzak organ metastazlarının sorumlu olduğu bilinmektedir [2,3]. Günümüzde, moleküler tiplendirmeye dayalı çeşitli integratif tedavi rejimleri ile prognozda iyileşme sağlansa da [4, 5], metastatik hastalığın yanı sıra ilaç direnci ve rekürrens önemli sorunlar olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir [2, 6].

Son yıllarda, sistein-x-sistein (C-X-C) motif kemokin reseptör 2 (CXCR2)'nin meme kanserinin tümör progresyonunda önemli rol aldığı [7] ve kötü prognozla ilişkili bulunması ile kritik bir öneme sahip olduğu ortaya konmuştur [8]. Bununla birlikte CXCR2 antagonistleri kanser tedavisinde kullanım açısından umut vaad etmekte olup klinik çalışmaları devam etmektedir [9, 10].

CXCR2'nin farede, Makrofaj inflamatuvar protein 2 (MIP2, insanda CXCL2) ve Keratinosit-kökenli kemokin (KC, keratinosit kemoatraktant, insanda CXCL1) ile aktive olduğu bilinmektedir [11-13]. İnsandaki interleokin-8 (IL-8, CXCL-8)'in fare homologları olan bu kemokinlerin ise çeşitli kanser tiplerinde karsinogenez ile ilişkisi açıkça gösterilmiştir.

Daha önce laboratuvarımızda fare meme kanseri hücre dizilerinde yapılan bir seri çalışmada CXCR2 antagonisti SB225002'nin, kalbe ve beyne metastaz yapmış hücrelerin (sırasıyla, 4THM ve 4TBM) proliferasyonunu baskılayarak anti-tümörojenik etki gösterirken, eş zamanlı olarak kanser hücrelerince ortama salınan MIP2 ve KC miktarında artış tespit edildi. Bu durum CXCR2'nin bu ligandlar için otoreseptör olduğuna işaret etmekle birlikte uzun süreli tedaviye karşı direnç gelişebileceğini düşündürdü [14-17].

Diğer yandan kanser hücrelerinde MIP2 salımı zamana bağlı artan bir kinetik gösterdi ve buna kanser hücreleri tarafından salınan otokrin faktörlerin neden olabileceği öngörüldü [18]. Dahası bu sonuçlar, metastatik hücreler tarafından ortama salınan çeşitli otokrin faktörlerin KC ve MIP2 salımını indükleyerek bu

dirence katkıda bulunabileceğine işaret etti. Bunun üzerine bir önceki çalışmamızda kanser hücresi kaynaklı otokrin faktörlerin tanımlanabilmesi için fare meme karsinomu metastatik 4THM, 4TBM ve karaciğer metastatik (4TLM) hücreleri ile metastatik olmayan 67NR hücrelerin eksozomlarındaki proteinler LC-MS/MS proteomik tekniği kullanılarak belirlendi. Çalışmanın sonucunda 85 proteinin metastatik hücrelerden ortama salımının metastatik olmayanlara kıyasla anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi [19].

Çalışmamız, metastatik hücreler tarafından metastatik olmayan hücelere kıyasla daha fazla ortama salındığı tespit edilen bu proteinlerin, MIP2 ve/veya KC salımını arttırarak CXCR2 antagonistleri ile uzun süreli tedavide otokrin mekanizma ile dirence neden olabileceği ve inhibisyonları ile bu direncin üstesinden gelinebileceği hipotezine dayanmaktadır. Bu amaçla, bu otokrin faktörlerden, literatür bilgisine dayanarak MIP2 ve/veya KC salımını arttırdığı yada bu kemokinlerin salımında kritik rolü olan PI3K/Akt, Erk1/2, p38-MAPK ve NF-KB gibi survival yollarını aktive ettiği bilinen ancak meme kanseri hücre dizilerinde daha önce çalışılmamış olan Plasminojen Aktivatörü Ürokinaz (uPA), Kompleman Komponenti 3a (C3a) ve Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP) çalışmamızda değerlendirmek üzere seçilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu proteinlerin meme kanseri hücrelerinden KC ve MIP2 salımı üzerine etkisi daha önce araştırılmamış ve ilk defa bu çalışmada değerlendirilmiştir.

CXCR2 antagonistleri ile tedavide gelişebilecek bu tür bir direnç mekanizmasının aydınlatılması, aynı zamanda CXCR2 antagonistlerinin anti-tümöral etkilerini arttırabilecek yaklaşımların da önünü açabilir. Böylece metastatik kanserlerin tedavisine yönelik yüksek potansiyele sahip olan CXCR2 antagonistleri, klinikte etkin bir şekilde uygulanabilirliği açısından daha fazla ön plana çıkarılabilir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde bildiğimiz kadarıyla bu muhtemel mekanizma hakkında çalışma bulunmamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün Global Cancer Observatory 2020 (GLOBOCAN 2020) verilerine göre meme kanserinin, her iki cinsiyette %11.7, kadınlarda ise %24.5'lik oran ile ilk defa en fazla tanı alan kanser olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, kansere bağlı ölümlerde her iki cinsiyette akciğer kanseri, kolorektal kanser, hepatosellüler kanser ve mide kanserinden sonra %6.9 ile 5. sırada, kadınlarda ise %15.5 ile ilk sırada yer almaktadır [1]. Diğer yandan, meme kanserinden kaynaklanan ölümlerin büyük çoğunluğu primer tümörden ziyade kanserin akciğer, beyin, karaciğer gibi uzak organlara metastaz yapması sonucu meydana gelmektedir [2]. Erken evre meme kanserinde cerrahi ve sonrasında standart kemoterapi ile sağkalımda iyileşme olsa da, uzak metastaz ve ilaç direnci meme kanserine bağlı ölümlerin sayısında artışa neden olmaktadır [20]. Dolayısıyla metastatik meme kanseri, mortalitesinin yanında günümüzdeki insidans artışını da göz önünde bulundurduğumuzda, eskisinden çok daha önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

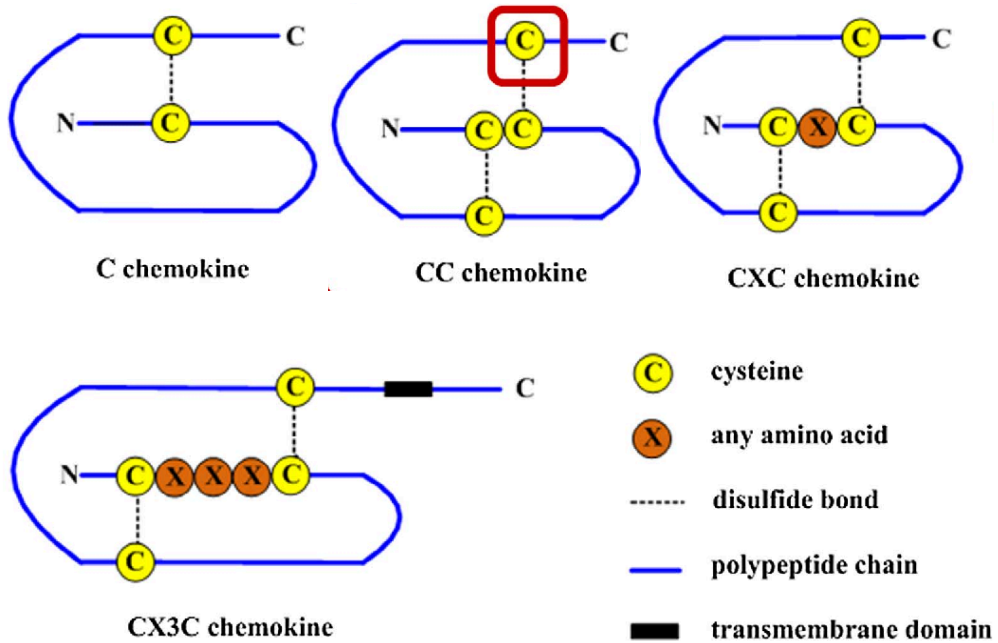
Meme kanserinin östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü (PR) olan hormon reseptörleri (HR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Her2) ve Ki-67 (hücre proliferasyonu belirteci olarak kullanılan nükleer protein) ekspresyonuna göre; Luminal-A [ER ve/veya PR(+), Her2(-), Ki-67↓], Luminal-B [ER ve/veya PR(+), Her2(+)/(-), Ki-67↑], triple negatif/bazal benzeri [HR(-), Her2(-)], Her-2'den zengin [HR(-), Her2(+)] ve normal benzeri [ER ve/veya PR(+), Her2(-), Ki-67↓] olmak üzere 5 moleküler subtipi tanımlanmıştır [15, 21].

Günümüzde, moleküler tiplendirmeye dayalı cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endokrin tedavi ve hedeflenmiş tedavi gibi integratif tedavi rejimleri ile genel sağkalım (Overall survival, OS) ve progresyonsuz sağkalım (Progression Free Survival, PFS)'ı kapsayan tedavi etkinliği artmış olsa da [4, 5], çoğu kanser hastasında ilaç direnci, rekürrens ve metastaz görülmeye devam etmektedir [6].

2.2. Kemokinler

Kemokinler, 6 ila 14 kilodalton (kDa) moleküler ağırlığa sahip küçük, salınan peptidler olup lökositlerin inflamasyon alanına ve sekonder lenfoid organlara göçüne aracılık etmektedirler. Bununla birlikte infeksiyöz hastalıklar, astım ve ateroskleroz başta olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçler için esansiyel oldukları bilinmektedir [22].

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi bu sitokinlerin, N-terminal ucundaki sistein rezidülerinin pozisyonuna göre 4 subgrubu tanımlanmıştır: CXC- α , CC- β , XC- δ ve CX3C- λ [23]. Bununla birlikte, bugüne kadar 50 kemokin ve 20 kemokin reseptörü tanımlanmış olup bunların büyük çoğunluğunu CC ve CXC subgrupları oluşturmaktadır [24]. Güncel kemokin ve kemokin reseptörleri listesi EK 1’de verilmiştir.



Şekil 2.1.. Kemokinlerin yapısı [197].

CXC kemokinler ise N-terminal ucundaki ilk sistein (Cys) aminoasitinden önceki glutamat-lösin-anjinin (Glu-Leu-Arg) sekansı (ELR motifi)’ne bağlı olarak, bu motifi bulunduran (ELR⁺) ve bulundurmayan (ELR⁻) CXC kemokinler olarak sınıflandırılmaktadırlar [25]. CXCL8 (IL-8, interlökin-8) gibi ELR⁺ kemokinler nötrofiller için kemoatraktan olup anjiogenezi kuvvetli bir biçimde uyarmaktadır

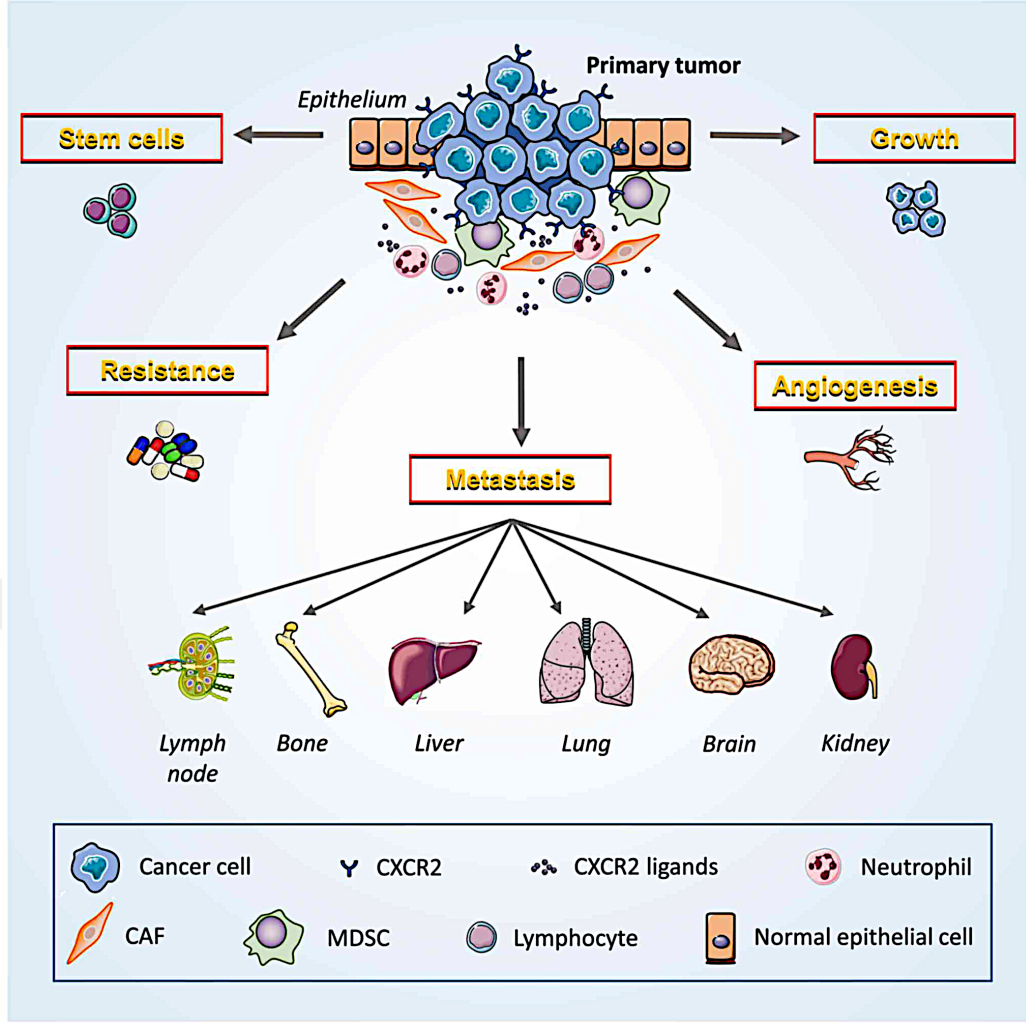
[26]. Öte yandan, CXCL4, CXCL9 ve CXCL10 gibi ELR⁻ kemokinler, güçlü anjiyogenik inhibitörlerdir [27, 28]. CXCL12 ise anjiyogenik bir ELR⁻ CXC kemokin olarak bu durumun istisnasıdır. Bununla birlikte, ELR⁺ CXC kemokinler CXCR1 ve 2'ye bağlanırken ELR⁻ CXC kemokinler CXCR3-7'ye bağlanır [29].

2.3. C-X-C Motif Kemokin Reseptör 2 (CXCR2) ve Kanser

CXC kemokinler ve reseptörleri kanser gelişim ve progresyonunda önemli role sahiptir. Bununla birlikte CXCR2'nin metastatik indeksi yüksek olan meme, pankreas, over kanserleri ve melanomu da içeren bir çok kanser hücresi tarafından yüksek düzeyde eksprese edildiği ve mutasyonlarının neoplastik değişimlere neden olduğu gösterilmiştir [30-33]. Primer fonksiyonu inflamasyon alanına nötrofil migrasyonunu düzenlemek olan bu reseptörün sinyali aynı zamanda, tümör mikroçevresine ve metastatik alana myeloid hücreleri çağırarak tümörögenizde ve metastatik fenotip gelişiminde de kritik role sahiptir [34-36].

Preklinik çalışmalar CXCR1/CXCR2 aktivasyonunun hücre proliferasyonunu, hücre göçünü, invazyonu ve anjiogenezi uyardığı ve apoptozdan kaçışta rol oynadığını göstermiştir. [33, 37-44] Diğer yandan CXCR2 ligandlarından CXCL7'nin meme kanserinde kanser kök hücre sayılarında artışa neden olduğu gösterilmiştir [45, 46] .

Pek çok preklinik ve klinik çalışmaların sonuçları göstermektedir ki, CXCR2 metastatik sürecin tümörögeniz, tümör büyümesi, invazyon, metastaz, anjiogenez ve ilaç direncini içeren kritik aşamalarında rol almaktadır. Dahası, CXCR2 ekspresyonu yüksek solid tümörü olan hastalar sağkalım açısından (OS, PFS ve DFS, hastalıksız sağkalım) kötü prognoza sahiptir [8].



Şekil 2.2. CXCR2'nin Kanserde Pleotropik Etkileri (55).

2.4. CXCR2 ve Meme Kanseri

CXCR2'nin meme kanseri hücre dizilerinde benign hücre dizilerine göre daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır [47]. CXCR2'nin özellikle meme kanserinde kök hücre fenotipinin korunmasında, epitelyal mezankimal geçişte (EMT) ve invaziv fenotip ediniminde önemli olduğu bilinmektedir [48]. Bununla beraber meme kanseri kök hücrelerinde CXCR2'nin yüksek seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir [49]. İki memeli meme kanseri hücre hattının CXCR2^{-/-} balb-c farelere ortotopik implantasyonu ile yürütülen bir çalışmada ise, CXCR2'nin pro-inflamatuar yanıtı ve angiogenezi destekleyerek tümör gelişimini düzenlediği açıkça

ortaya konmuştur [50].

Dolayısıyla, son yıllarda CXCR2 ekspresyonunun meme kanserinde tümör progresyonu ile ilişkili patolojik süreçlerde önemli rol alması ile fonksiyonel olarak kritik bir reseptör olduğu ortaya konmuştur [7]. Benzer şekilde ER(-) meme kanserinde CXCR2 1208C/T polimorfiziminin yüksek olduğu ve bu durumun hastalığın seyrini etkilediği bildirilmiştir [51].

2.5. İnsan CXCR2 Ligandı IL-8 ve Meme Kanseri

CXCR2, ELR⁺ CXC kemokinler olan ve anjiogeneze aracılık eden interlökin-8 (IL-8/CXCL-8), GRO- α /CXCL1, GRO- β /CXCL2, GRO- δ /CXCL3, ENA-78/CXCL5, GCP-2/CXCL6, NAP-2/CXCL7 ligandlarına yüksek afinite ile bağlanarak aktive olmaktadır [52].

IL-8, insan monositlerinde ilk saptanan CXCR2 ligandıdır.[53] Bunun yanında, çalışmalar IL-8'in meme kanseri progresyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. İnsan triple negatif meme karsinom (TNBC) hücreleri olan MDA-MB-231 hücrelerinin, stromal fibroblast ve makrofajlarla etkileşerek oto- ve parakrin bir döngü ile IL-8 salgısına sebep oldukları ve bu şekilde tümör gelişimi ve metastazını destekledikleri gösterilmiştir. Dahası bu etkiler, CXCR1/2 inhibitörü olan repariksin ile geri çevrilebilmiştir [54]. Bugün ise IL-8'in meme kanseri metastazı ve ilaç direncinden sorumlu ana molekül olduğu bilinmektedir [55].

2.6. Fare CXCR2 Ligandları Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP2) ve Keratinosit-kökenli Kemokin (KC)

CXCR2'nin farelerde insandaki IL-8'in homologları olan Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP2, insanda CXCL2, m/CXCL2) ve Keratinosit-kökenli Kemokin (KC, Keratinocyte Chemoattractant, insanda CXCL1, m/CXCL1) ile aktive olduğu bilinmektedir [11-13]. Bununla birlikte, CXCR2'nin KC ve MIP2 ile etkileşimi de, insanlarda IL-8 ile etkileşiminde olduğu gibi inflamasyon sırasında nötrofil infiltrasyonunun yanı sıra karsinogenez, tümörogenez ve anjiogeneze neden olmaktadır [14, 15].

İnsan tümörlerinde CXCL2 miktarının primer meme tümörlerinde %7,5 ve

metastatik lezyonlarda ise %19.9 arttığı saptanmıştır [34]. Başka bir çalışmada ise MIP2'nin, CXCR2 ekspresyonunu arttırarak kolorektal kanserde hücre çoğalmasına neden olduğu gösterilmiştir [56].

MIP2'nin fare metastatik meme kanseri hücre hatlarında metastatik olmayan hücrelere kıyasla hücre dışı ortama yüksek seviyede salındığı tespit edilmiş ve metastazda rol aldığı ortaya konmuştur [18].

MIP2'nin yanısıra, KC'nin de fare metastatik meme kanseri 4T1 hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir ve CXCR2 aktivasyonu ile karsinogenezde rol oynadığı ortaya konmuştur [16, 17, 57]. Bununla birlikte laboratuvarımızda yapılan deneyler sonucunda KC için de MIP2'ye benzer sonuçlar elde edilmiş olup bu sonuçlar yayın aşamasındadır. Bu bilgiler ışığında CXCR2'nin tümörojenik etkisinin MIP2 ve KC ligandları üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir.

2.7. CXCR2 Antagonizmasının Antikanser Etkinliği

CXCR2'nin tümörojenik süreçle olan bu kuvvetli ilişkisi ile ilgili bilgi birikimi, CXCR2 antagonizmasını anti-kanser tedavi yaklaşımı açısından ilgi çekici hale getirmiştir. Nitekim, CXCR2 antagonistlerinin, meme kanseri [58], kolorektal kanser [59] ve melanom [60] ksenograft modellerinde anti-tümör özellikler sergilediği gösterilmiştir. Pankreas duktal adenokarsinomlarında yapılan yakın tarihli bir çalışma, CXCR2'nin özellikle nötrofiller/myeloid kökenli kök hücreler (MDSCs)'de inhibisyonunun, tümör bölgesine T hücre girişini sağladığını gösterdi [61]. Paklitaksel ile CXCR2 inhibisyonunun kombinasyonu meme kanseri tümör gelişimini yavaşlatır, anjiogenezi ve akciğer metastazlarını azaltır ve kanser kök hücreleri (CSCs)'nin sayısını azaltır.

Diğer yandan preklinik ve klinik çalışmaların sonuçları, kanser hücrelerinde CXCR2 bağımlı düzenleyici yolların ilaç direnci gelişimi için kritik olduğunu göstermekte olup, ilaç direncinin önüne geçebilmek için adjuvan tedavi olarak CXCR2 aksının hedeflenmesini destekleyen kanıtlar sağlamaktadır [62, 63, 64]. Bu nedenle CXCR2 antagonistleri kanser tedavisinde kullanım açısından umut vaat etmektedir ve bu konuda klinik çalışmalar devam etmektedir [9, 10].

CXCL8, meme kanseri kök hücre (BCSC) aktivitesinin önemli bir

düzenleyicisi olduğundan, CXCR2 inhibitörlerinin mevcut HER2 hedefli tedavilerle kombinasyonu, HER2 pozitif meme kanseri olan hastalarda CSC aktivitesini azaltmak ve sağkalımı artırmak için etkili bir rejim olacağı tahmin edilmektedir , dahası, Uddin ve arkadaşları proteazom inhibisyonunun CXCL8 ve reseptörleri olan CXCR1/2 seviyelerini IKK aracılığıyla önemli ölçüde artırdığını gösterdi [65, 66]. CXCL8 ekspresyonunun uyarılması veya IKK aktivitesinin baskılanması, TNBC’de proteazom inhibitörlerinin etkinliğini arttırabilir. Dolayısıyla, CXCR2 ve ligandları potansiyel terapötik hedeflerdir [62].

İmmün sistemi çöktürülmüş farelerde CXCR2 antikorları ile CXCR2 antagonizmasının sağlandığı bir çalışmada, pankreas kanserinin büyümesini ve anjiyogenezi yavaşlattığı tespit edilmiştir [67]. CXCR2'nin inhibisyonu, aynı zamanda, endojen anti-tümör immün yanıtı güçlendiren anti-programlı ölüm 1 terapisine duyarlılığı da artırır [61]. İki insan intrahepatik kolanjiosellüler karsinom (ICC) hücre hattında (RBE ve SSP25) yapılan bir çalışmada ise, bu hücrelerde CXCR2 ekspresyonu olduğu tespit edilmiş ve reseptörün kompetitif inhibisyonu ile ICC proliferasyon, migrasyon ve invazyonunun anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir [68]. Daha sonra, anti-anjiogenik tedaviye dirençli olduğu bilinen insan over karsinom hücre hatları ile yapılan prelinik in vivo bir çalışmanın sonuçları, anjiogenez inhibitörlerinin CXCR2 inhibitörü ile beraber kullanımının anti-anjiogenik etkiyi arttırdığını bildirmiştir [69].

Fare ve insan meme kanser hücre dizileri kullanılarak yapılan çalışmalarda ise paklitakselin CXCR2 inhibisyonu ile kombinasyonunun, CSC'lerin sayısını azalttığı, tümör büyümesini yavaşlattığı, anjiyogenezi ve akciğer metastazlarını azalttığı ve bunların yanı sıra ilaç direncini kırmada da etkili olduğu gösterilmiş ve reseptör antagonistlerinin adjuvan tedavide uygulanabilirliğinin altı çizilmiştir [63, 64].

Çeşitli malign neoplazilerde yapılan tüm bu prelinik çalışmalar, CXCR2 aksının hedeflenmesinin tek başına yada başka bir tedavi rejimiyle kombine olarak kullanılmasının metastatik kanserlerin tedavisinde etkili ve özgün bir fırsat sağlayabileceğini ortaya çıkarmıştır [59, 60, 70, 71]. Bunun yanında diğer tümörler ile karşılaştırıldığında özellikle meme kanserinde avantaj sağlayabileceği öngörülmektedir [62] ve bu konuda klinik çalışmalar devam etmektedir.

2.8. CXCR2 İnhibitörlerinin Klinik Çalışmalardaki Konumu

Repertaxin, SCH479833, SCH527123 ve SCH563705 dahil olmak üzere CXCR2'nin çeşitli oral olarak aktif, non-kompetitif küçük molekül olan antagonistleri mevcuttur. Repertaksin, ilk olarak CXCL8 ile indüklenen reperfüzyon hasarının önlenmesi için kullanılmış olup klinik olarak test edilen tek CXCR2 inhibitörüdür.[72] Faz I klinik deneyler, CXCR1/2 inhibitörü olan Repertaksin'in Her2 negatif metastatik meme kanserinde paklitaksel ile kombinasyonunun güvenli olduğunu ve tolere edilebilir olduğunu göstermiştir [9] ve TNBC'de bu kombinasyon için Faz II klinik araştırmalar devam etmektedir (NCT02370238). Her2 negatif meme kanseri olan 20 hastada yapılmış ve yakın zamanda tamamlanmış olan diğer bir Faz II klinik araştırmada Repertaksin'in CSC'lerde %20 azalmaya sebep olduğu ve bunun yanında güvenli ve iyi tolere edilebilir olduğu gösterilmiştir [73].

2.9. Bizim Modelimizde CXCR2 Antagonizması

Erin ve arkadaşlarının fare metastatik meme karsinom hücrelesi olan 4T1'den köken almış, beyin (4TBM), kalp (4THM) ve karaciğere (4TLM) metastaz yapan ve metastatik olmayan 67NR fare meme kanser hücrelerini kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada 4THM ve 4TBM hücrelerinde daha yüksek miktarda olmak üzere tüm hücrelerde değişken seviyelerde CXCR2 ekspresyonu ve zamana bağlı artan bir kinetikte MIP2 salımı olduğunu saptamıştır. Diğer yandan SB225002, 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonunu baskımlarken MIP2 seviyelerini korele bir şekilde arttırmıştır. Bu bulgular CXCR2'nin MIP2 için otoreseptör olduğunu ve kronik antagonist kullanımına bağlı MIP2 artışının tedaviye direnç gelişimine neden olacağını düşündürmüştür [18]. Ayrıca henüz yayın aşamasında olan sonuçlarımız, CXCR2'nin diğer bir ligandı olan KC için de otoreseptör olduğunu göstermektedir. Dahası önceki bulgularımız, klinik çalışmalarla da desteklenmektedir [15].

CXCR2 inhibitörleri SB656933 ve AZD5069'un inflamasyonla birlikte olan solunum yolu hastalıklarında etkilerinin değerlendirildiği iki randomize kontrollü

çift kör faz II çalışmada CXCR2 inhibisyonunun dolaşımdaki nötrofil sayısını azaltırken IL-8 (CXCL8) başta olmak üzere CXCR2 agonistlerini pozitif feedback mekanizmayla arttırdığı yönünde paralel sonuçlar elde edilmiştir.

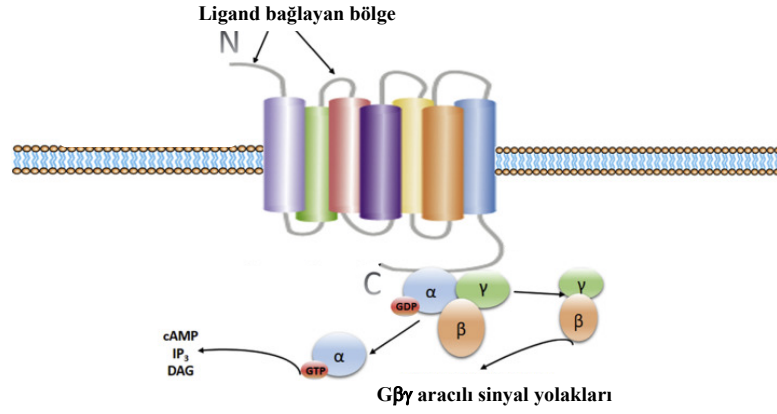
Bu durumu açıklamak için yürütülen hipotezler şuaandır: CXCL8 reseptörü uyarıldığında mevcut kemokin havuzunu sınırlandırıyor olabilir. Fizyolojik olarak diğer kemokin reseptörlerinde gözleendiği gibi CXCR2, serbest CXCL8'i temizliyor/süpürüyor ve reseptör bloke edildiğinde bu etki ortadan kalkıyor olabilir. CXCR2 ligandlarının azalan nötrofil sayısını kompanse etmek için yada reseptöre bağlanma bölgeleri bloke olduğu için artıyor olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

2.10. CXCR2 Antagonisti SB225002

SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl) urea), potent ve selektif non-peptid bir CXCR2 antagonisti olup CXCL8'e ve CXCL1'e bağlı kalsiyum mobilizasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği bilinmektedir (IC50: 40 ve 20nM, sırasıyla) [74]. İlaça duyarlı ve dirençli insan over kanser hücrelerinde CXCR2 antagonisti olan SB225002'un apoptozu destekleyici etkisi olduğu gösterilmiştir [75]. Bu ajan kanser tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabilirliği açısından oldukça umut vaad etmektedir [61].

2.11. CXCR2 Reseptör Yapısı ve “Downstream” Yolakları

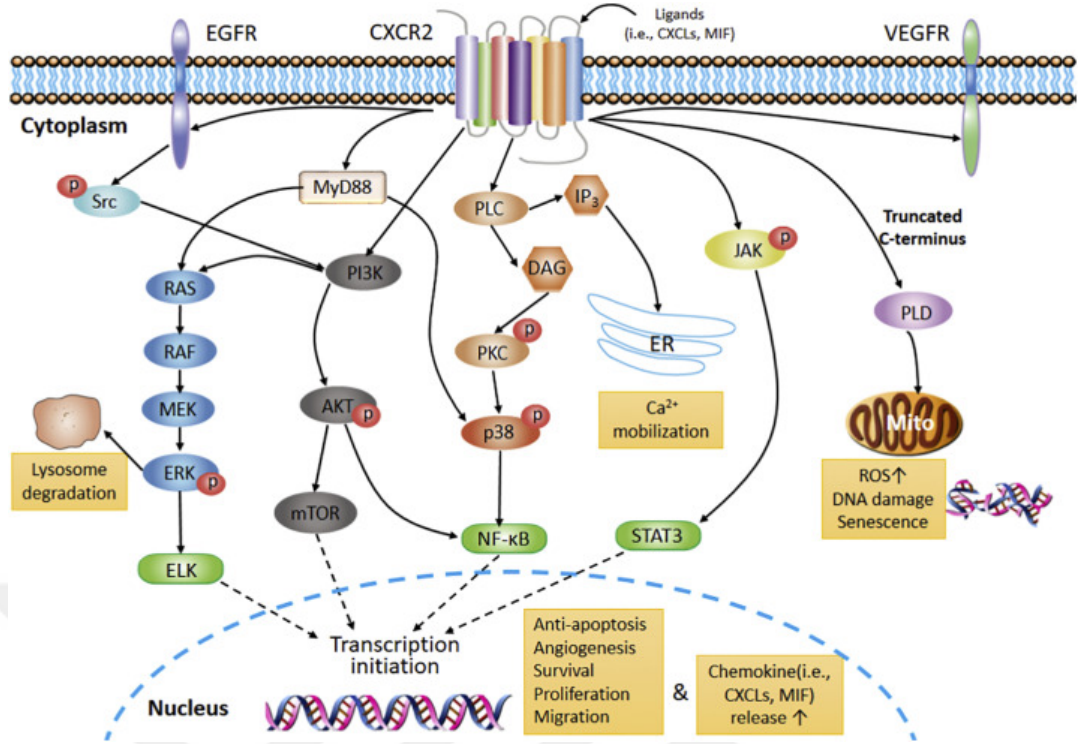
CXCR2, 7 transmembran domain, bir hücre dışı N-terminal, bir hücre içi C terminal, 3 hücre dışı loop ve 3 de sitoplazmik looptan oluşan G protein kenetli reseptör (GPCR) ailesinin bir üyesidir. G proteinleri, dinlenme halinde inaktif olan α , β ve δ subunitlerinden oluşan heterotrimerik bir protein kompleksidir [76, 77].



Şekil 2.3. Heterotrimerik G protein kenetli reseptör yapısı [50].

CXCR2, G proteinleri ile kenetli olmasına ek olarak, G-protein kenetli reseptör kinaz (GRK) 2/6, β -arrestin1/2, adaptör protein-2 (AP-2), protein fosfataz 2A ve vazodilatör ile stimüle fosfoprotein (VASP)'e bağlandığı ve böylece meme kanserinde çeşitli sinyal yollarına modüle ettiği bilinmektedir [72].

Ligand bağlanmasını takiben CXCR2, G protein ile eşleşerek aktive olur ve G protein kompleksinin $G\alpha$ subünitine bağlı olan guanazin difosfat (GDP), guanazin trifosfat (GTP)'ye dönüşür. Hücre membranının iç yüzüne bağlı olan $G\alpha$ subünitinin CXCR2 ve $G\beta\delta$ subünitlerinden ayrılması sonucu üç ana sinyal yolağı yolağı indüklenir; fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3K)/serin-treonin kinaz (Akt), fosfolipaz C (PLC)/protein kinaz C (PKC) ve Ras/Raf/ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz 1/2 (Erk1/2). Bunun yanında mitojenle aktive protein kinaz (MAPK)/p38 yolağı, Janus kinaz 2 (JAK2)/sinyal transforme edici transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) sinyal yolağı, fokal adhezyon kinazları (FAK), Rho, Rac yolakları ve fosfolipaz D (PLD) yolağı CXCR2 aktivasyonu sonucu indüklenen diğer hücre içi sinyal yolaklarıdır (Şekil 2.4.) [53, 55, 78, 79].



Şekil 2.4. CXCR2 aracılı hücre içi sinyal yolları ve karsinojenik süreçler üzerine etkileri [50].

2.11.1. Fosfatidil İnositol 3 Kinaz (PI3K) / Akt Yolağı

Bu yolak, fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3K) tarafından modüle edilen ana “downstream” sinyal yolağıdır ve protein kinaz B (PKB, serin-treonin kinaz, Akt) bu yolakta önemli rol alır. PKB, retrovirus Akt- δ 'sının (Akt olarak da bilinir) onkogen ürünüdür ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'nin nükleer lokalizasyon sinyalini açığa çıkarması için NF- κ B inhibitörü (I κ B)'yi fosforile edecek olan I κ B kinaz (IKK)'ı aktive eder. Bu da NF- κ B subunitinin nükleusa transloke olmasına ve transkripsiyonel aktivitesinin artmasına neden olur [80].

Bununla birlikte, PI3K yolağının düzenlenmesindeki bozuklukların kanser gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir ve PI3K yolak inhibitörlerinin kanser ilaçlarına karşı gelişen direnci kırabileceği düşünülmektedir. Dahası, PI3K yolağının aktivasyonunun MIP2 salımında çok önemli olduğunu ve PI3K inhibitörü

LY294002'nin MIP2 salımını nerdeyse %50 düzeyinde baskıladığı gösterilmiştir [80].

2.11.2. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)

Melanom, meme kanseri, baş-boyun kanserleri ve T hücreli lenfoma hücrelerinin artmış NF-κB aktivasyonu ile birlikte olduğu bilinmektedir [81-83]. NF-κB, CXCL 1, 2, 3 ve 8'i içeren çeşitli sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu düzenleyen ve hem hücre içi hem hücre dışı düzenleyici olayları başlatan transkripsiyon faktörüdür.[84] Bununla birlikte NF-κB upregulasyonu mitojenle aktive protein (MAP) kinaz (MAPK) kinaz 1 (MEK1, MEK2K1) ve p38 yollarına bağımlıdır [85]. CXCL1 sinyali ile artan NF-κB aktivitesinin aynı zamanda melanom hücrelerinden doğrudan MIP2 ve KC salımı ile korele olduğu gösterilmiştir [85]. Diğer taraftan kanserde CXCR2 aktivasyonunun Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile transaktive edilmiş Akt sinyali ve NF-κB aktivasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.[86]

2.11.3. Akt Sinyali

Nötrofil migrasyonunun modülasyonunda hayati rol alan PI3K yolağının hedefi normal hücreler ve kanser hücrelerinde eksprese edilen Akt'dir [87]. PI3K/Akt yolağı, hücre sağkalımı, motilitesi ve anjiogenez modülasyonunda görev alması ile insan malignensi süreçlerindeki en yaygın yollardan biridir [88].

Akt'nin, meme kanseri hayvan modellerinde yapılan çok sayıda araştırmada tümör oluşumu ve metastazı desteklerken [89], Akt-1 aşırı aktivasyonunun meme kanserinde hücre migrasyonu, invazyon metastazı inhibe ettiği ve kanser hücrelerinin senesensini desteklediği gösterilmiştir [90]. Bununla birlikte Akt-1'in, p-Akt (Ser473)'ye atfedilen metastaz ve ilaç direnci gelişimini destekleyen etkileri bloke ettiğini ve CXCR2'nin, Akt-1'i baskılayarak meme kanserinde progresyona neden olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [20]. Dolayısıyla Akt-1 ve p-Akt arasındaki dengeyi sağlamak, meme kanserinde metastaz ve ilaç direncinin önlenmesi için elzem görünmektedir [20].

2.11.4. Fosfolipaz C (PLC) / Protein kinaz C (PKC) Yolağı

Diğer “downstream” hedef non-reseptör tirozin kinaz olan proto-onkogen tirozin-protein kinaz (src) ailesi bağımlı PLC’nin fosforilasyonudur. Aktive PLC fosfoinositid hidrolizi ile iki ikinci mesajcı üretir; inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG), bu da PKC fosforilasyonuna ve hücre metabolizması ve fonksiyonunu etkileyen sitozolik kalsiyum konsantrasyon artışına neden olarak PKC’yi aktive eder. Ardından c-Jun N-terminal kinaz p53 ve B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) aktivasyonuna aracılık ederek apoptozu indükler [38, 91].

2.11.5. Ekstrasellüler Sinyal İlişkili Kinaz 1/2 (Erk1/2)

Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz 1/2 (Erk1/2) yolaklarının bir çok kanser tipinde aşırı aktive olarak hücre proliferasyonunu ve metastazı arttırdığı bilinmektedir [92]. MDA-MB-232 insan meme kanseri hücrelerinde anti-uPA antikoru ile uPA/uPAR blokajının fosforile ERK (p-ERK) seviyelerini düşürerek apoptozu indüklediği gösterilmiştir [93].

2.11.6. Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı

CXCR2’nin fosforilasyonu aynı zamanda Erk ve p38’in fosforilasyonunu da içeren mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyalinin aktivasyonuna neden olur ve bu süreç “myeloid differentiation primary response 88” (MyD88) bağımlıdır [87, 94]. Ras, Raf ve MEK aracılığıyla Erk’ü aktive eder ve fosforile Erk sitoplazmadan nükleusa geçer. Bu da hücre proliferasyonu ve diferansiasyonu, morfolojisinin sürdürülmesi, hücre iskeleti inşası, apoptoz ve tümörögenez gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda rol alan c-Jun, c-Fos, Elk-1, AP-1 ve ATF’nin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık eder [95, 96]. Dolayısıyla MAPK sinyalinin aktivasyonu hücre proliferasyonu ve survival ile ilişkili olup CXCR2 için dominant sinyal yolaklarından biridir [97, 98].

2.11.7. p38

p38, tümör baskılayıcı ve apoptozu regule edici rolleri bulunan, stresle aktive olan bir MAPK'dır [99]. uPAR'nın uPA ve integrine bağlanarak Erk/MAPK aktivasyonu ve MAPK'ın aktif formu olan fosfo-p38 (p-p38)'i baskılaması ile tümör hücre proliferasyonunu regule ettiği ortaya konmuştur [100]. Diğer yandan Erk1/2 ile birlikte p38 fosforilasyonun meme kanserinde uPA ve uPAR ekspresyon seviyelerini artırarak invazyon ve metastazı desteklediği gösterilmiştir [101].

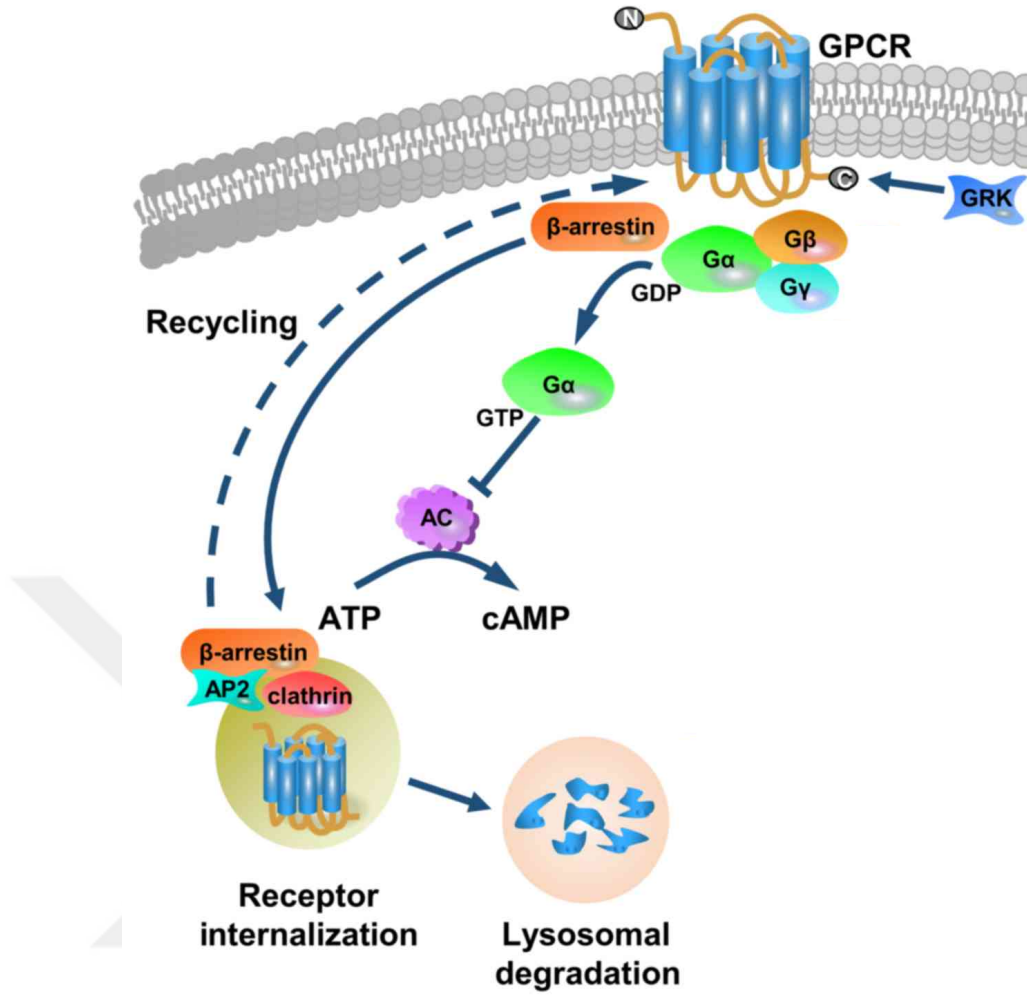
Tüm bunların yanında CXCR2 sinyali fokal adhezyon kinazları (FAK), Rho, Rac, JAK2 / STAT3 ve PLD yollarını da tetiklemektedir [55, 78, 79].

2.11.8. Gα - Adenilat Siklaz Aktivitesinin İnhibisyonu

Diğer yandan G protein trimerinden Gα subünün ayrılması, adenosin trifosfat (ATP)'nin adenilat siklaz aracılığıyla siklik adenosin monofosfat (cAMP)'ye dönüşümünü inhibe eder ve bu durum cAMP'nin hücre içi seviyelerinde azalmaya neden olur [72].

2.11.9. G Protein Kenetli Reseptör Kinaz (GRK)

GRK ise, reseptörün C-terminalini fosforile ederek desensitizasyonuna ve β-arrestin aracılı endositozuna aracılık eder [18].



Şekil 2.5. G proteini kenetli reseptör sinyalinin sonlandırılması [18].

Tüm bu yollar hücre metabolizması, sağkalım, proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, transdüksiyon ve hücre motilitesini modüle eder [67, 94, 103-107]. Önemli bir şekilde, bu yolların aktivasyonu aynı zamanda CXCL8 gibi sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu upregüle eder ve böylece CXCR2 fonksiyonunu arttıran bir döngü oluşturur [53]. Bu da gerek önceki çalışmamızdaki in vitro modelde [18] gerekse klinik çalışmalarda, CXCR2 ve agonistleri için ortaya konan “feedback” mekanizmayı açıklamaktadır.

Erin ve arkadaşları tarafından, daha önce literatürle örtüşecek şekilde çalışmamızdaki hücre hatlarında CXCR2 inhibisyonunun Akt, Erk1/2 ve p38-MAPK fosforilasyonunu baskıladığı, bununla birlikte ERK1/2 fosforilasyonun baskılanması ile sonuçlanan MEK1/2 inhibisyonunun MIP2 salımını azalttığı ve

PI3K yolağının MIP2 salımı için kritik olduğu gösterilmiştir [18]. Diğer yandan laboratuvarımızda yapılan çalışmalar PI3K- α subunit antagonisti BYL-719'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinde KC salımını da sınırlı seviyede azalttığını göstermiştir.

2.12. Otokrin Faktörler

Yine bu çalışmada MIP2 salımında zamana bağlı olarak hücre sayısı değişmeksizin görülen artış kanser hücrelerinden hücre dışı ortama salınan otokrin faktörlerin MIP2 salımını uyarıyor olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte MIP2 ile benzer şekilde KC salımı da kanser hücresi kökenli otokrin faktörlerce arttırılıyor olabilir [18]. Dolayısıyla bu faktörlerin belirlenmesi direnç mekanizmalarının aydınlatılması için gereklidir. Bu nedenle önceki çalışmamızda metastatik 4THM, 4TBM ve 4TLM hücreleri ile metastatik olmayan 67NR hücrelerinin eksozomlarında bulunan proteinleri kütle spektrometri ile değerlendirdik ve karşılaştırdık. Bunun sonucunda metastatik hücrelerden metastatik olmayan hücrelere kıyasla, çoğunlukla daha fazla olmak üzere, anlamlı bir şekilde farklı oranda hücre dışı ortama salınan 85 otokrin faktör saptadık [19].

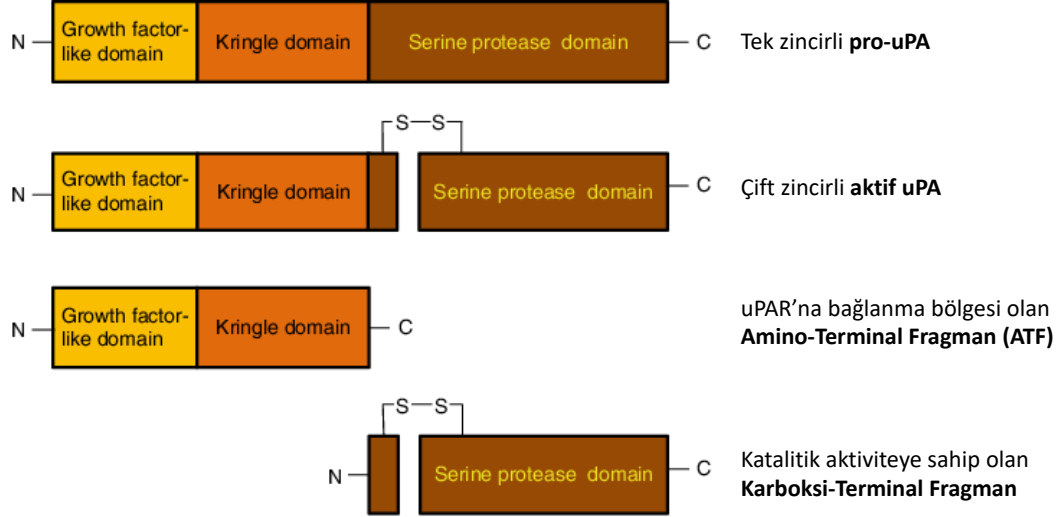
Bu çalışmada ise bu otokrin faktörler içinden KC ve MIP2 salımı üzerine etkisi araştırılmak üzere, literatür bilgisine dayanarak, metastatik hücrelerin metastatik olmayan 67NR hücrelerine göre hücre dışı ortama anlamlı ölçüde daha fazla saldıgı 3 tanesi seçildi; uPA, C3a ve TSLP. Seçilen bu proteinlerle ilgili genel bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.12.1. Plazminojen Aktivatör, Ürokinaz (uPA)

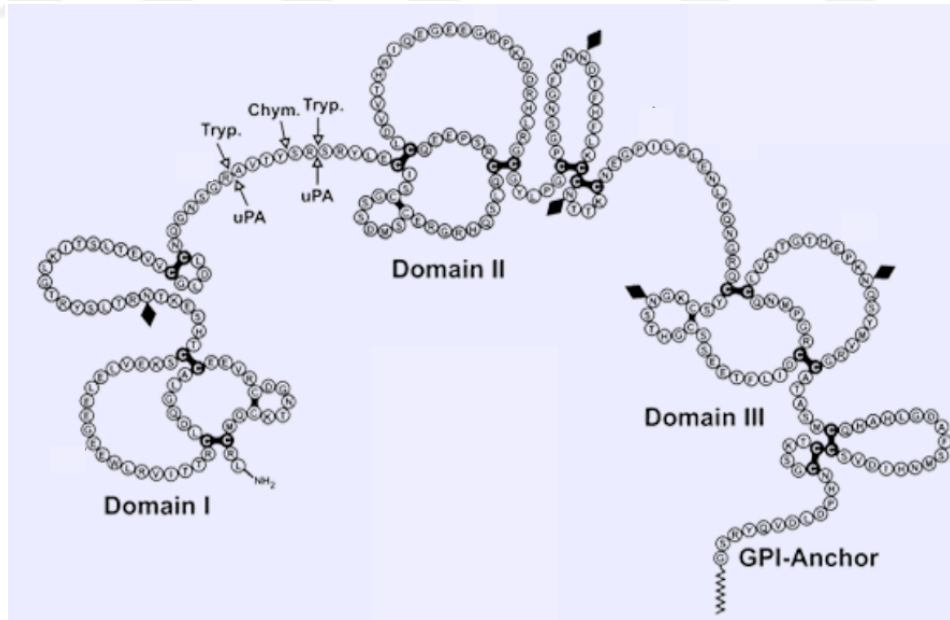
Fibrinolitik sistem, etkileşimde olduğu ekstrasellüler matriks (ECM) metalloproteazları ile birlikte, doku remodelizasyonu ve yenilenmesine aracılık eden önemli bir proteaz sistemidir [108].

Plazminojen aktivatörü, ürokinaz (uPA), tek zincirli polipeptid şeklinde katalitik olarak inaktif zimojen (pro-UPA) olarak sentezlenip salınan bir 53-kDa'luk serin proteazdır. Pro-uPA, çeşitli proteazlarca proteolitik olarak parçalanarak aktive olur. Aktif matür formu; N-terminal sekansında uPA reseptörü

(uPAR, CD87) için bağlanma bölgesi içeren “Growth factor-like domain”, C-terminal sekansında serin proteaz aktivitesi olan “katalitik domain” ve henüz fonsiyonu bilinmeyen “kringle domain” (KD)’i içerecek şekilde modüler bir yapıya sahiptir [109, 110].

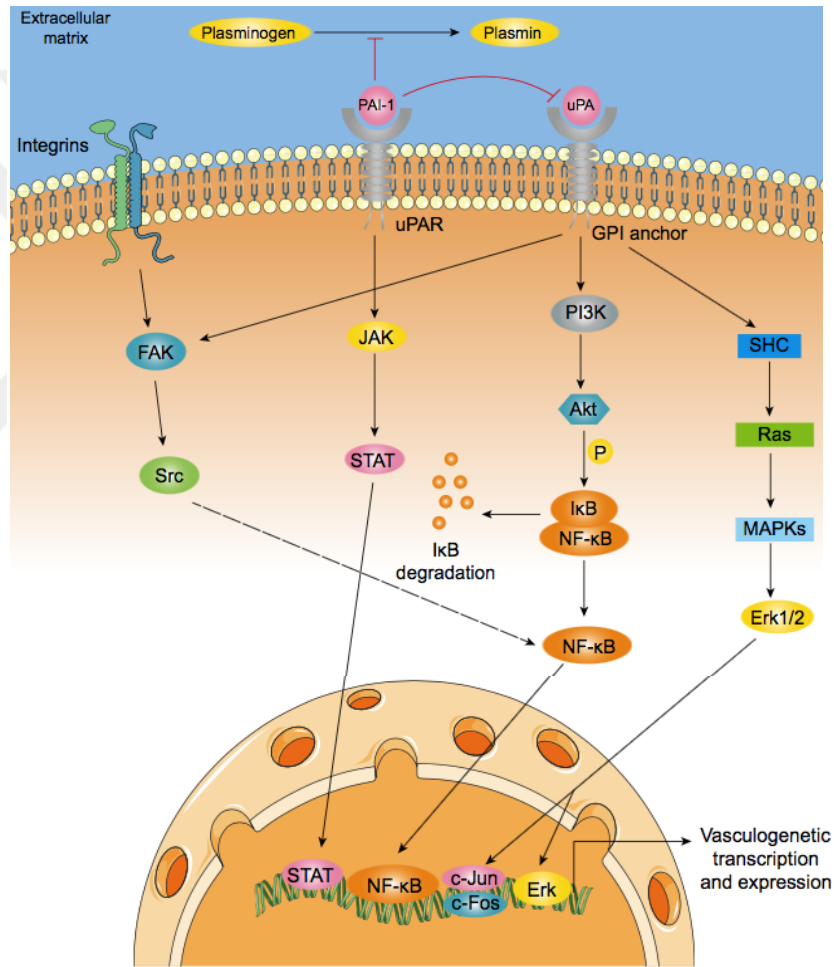


Şekil 2.6. uPA'nın yapısı



Şekil 2.7. uPA reseptörünün yapısı [111].

Hem pro-uPA hem de uPA kendi spesifik reseptörleri olan uPAR'a yüksek afinite ile bağlanırlar [112]. Bu reseptör üç glikoprotein domaininden oluşur ve membrana glikozil fosfatidil inozitol kancası ile bağlanır [113]. EGFR, platelet kökenli büyüme faktör reseptörü (PDGFR), spesifik integrinler yada düşük dansiteli lipoprotein resptörü (LDLR) gibi spesifik moleküllerle etkileşerek aktive olan uPAR, uPA'nın N-terminal "growth factor-like domain"i ile etkileşerek aktif uPA-uPAR kompleksi yapar ve Erk/MAPK, p38 MAPK, tirozin ve serin protein kinazlar, fokal adhezyon kinaz (FAK), JAK/STAT ve küçük G proteini Rac'ı içeren hücre içi sinyal yolaklarını başlatır [114-117].



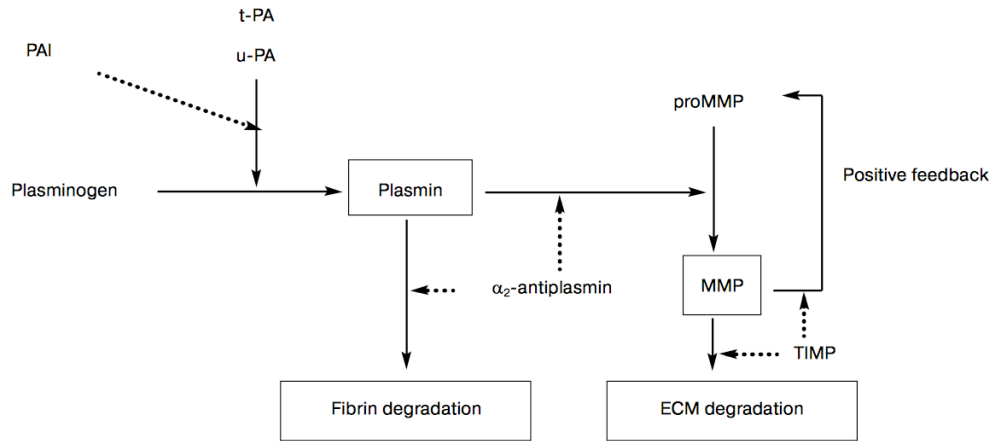
Şekil 2.8. uPA-uPAR etkileşiminin "downstream" etkileri

Tüm bu sinyal sistemleri hücre proliferasyonunu stimüle eder, migrasyonunu artırır ve adhezyonunu modüle eder [100, 109, 118-122].

uPAR, uPA ve integrine bağlanarak ERK/MAPK aktivasyonu ve fosfo-p38

(p-p38) downregulasyonu ile tümör hücre proliferasyonunu arttırmaktadır.[100] MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde anti-uPA antikoruna ile uPA/uPAR blokajının fosforile ERK (p-ERK) seviyelerini düşürerek apoptozu indüklediği gösterilmiştir [93]. Aynı hücrelerin kullanıldığı farklı bir çalışmada uPAR antagonisti bir decapeptid ile uPA antagonizmasının, p-ERK ile birlikte apoptozu regule eden Bcl-2 düzeylerinde azalma ve p-p38 düzeylerinde artış sonucu kanser hücresi apoptozunu desteklediğini ortaya koymuştu [123].

uPA'nın hücre sinyalizasyonu ve trafiğini tetiklemesi için diğer yol ise indirekt olarak plazmin aktivasyonu aracılığıyla olur. uPA, plazminojeni plazmine çevirerek matriks metalloproteazlarının parçalanıp aktifleşmesine neden olur ve böylece ekstrasellüler matriks (ECM) proteolizini sağlar. Bununla birlikte plazmin, anjiogenez, invazyon ve metastaz, hücre proliferasyonu, hücre adhezyon ve migrasyonu ve EMT'de fonksiyonel öneme sahiptir ve bu özellikleriyle tümör progresyonu ile yakından ilişkilidir [124]. Bunun yanı sıra plazmin bazı büyüme faktörlerini aktive ederek agresif kanserlere öncülük etmektedir [125].



Şekil 2.9. uPA'nın plazminojenin degradasyonu ile plazmin oluşumu ve ECM proteinleri ile etkileşimi [108].

In vitro çalışmalar epidermal tümör hücre hatları ve melanom hücreleri gibi hücre tiplerinde uPA'nın mitojenik etkisi olduğunu ortaya koymuştur [126, 127]. uPA, apoptozu önleyerek malign hücrelerin metastatik süreç boyunca sağkalım potansiyellerini arttırmakta ve tedavi ile oluşan stres durumunda tümör hücrelerinin

dirençli fenotip kazanmalarına katkıda bulunmaktadır [120].

MCF-7 meme kanser hücre hattında uPA tarafından desteklenen hücre göçünün Ras-Erk ve Rho-Rho kinaz yollarının işbirliğini gerektirdiği gösterilmiştir [128]. uPA ve endojen inhibitörü olan plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) seviyelerinin meme kanseri olan hastalarda sağkalıma ve tedaviye yanıtı etkisini değerlendiren çok sayıda çalışma sonucunda yüksek uPA/PAI-1 seviyeleri relapsta artış, hastalıksız sağkalımda azalma ve kemoterapiye yanıtta artış ile birlikte olan yüksek risk ile ilişkilendirilmiştir. Dahası, randomize prospektif klinik araştırmalarca, hem uPA hem de PAI-1'in, Her-2 tümörü olan lenf nodu negatif hastaların tanımlanması ve böylece gereksiz yere adjuvan kemoterapinin toksisitesinden korunmaları için kuvvetli bir prognostik biomarker olduğu ortaya konmuştur [129]. Bu verilere dayanarak uPA'nın, meme kanseri hastalarının klasifiye edilerek gereksiz adjuvan tedaviden kaçınılabilecek kişiselleştirilmiş tedavi rejimlerinin belirlenmesi için kullanılabilecek güçlü bir prediktif marker olabileceği öngörülmüştür [130, 131].

Bunun yanında, hayvan modelleri ile yapılan çok sayıda çalışmanın verileri doğrultusunda uPA'nın kanser tedavisi için iyi bir hedef olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalarda uPA blokajı, uPA'nın katalitik aktivitesini hedefleyen selektif düşük moleküler ağırlıklı inhibitörler ve uPAR'a bağlanmasını önleyen antagonistik peptid yada antikorlar ile olmak üzere iki ayrı yaklaşımla test edilmiş ve iki yaklaşım da etkinlik için umut verici sonuçlar sağlamıştır [110, 124, 132]. Bunun üzerine, serin proteazları hedefleyen iki düşük moleküler ağırlıklı sentetik inhibitör, WX-UK1 (Mesupron) ve WX-671 (Upamostat), klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Ön-ilaç olarak oral yolla uygulanabilen ve hızla aktif hale geçebilen Upamostat, metastatik meme kanseri olan 132 hasta ile randomize çift kör faz 2 klinik çalışmada kapesitabinle kombine edilerek değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, tek başına kapesitabine kıyasla Upamostat ile kombinasyon tedavisi, beklenmedik ciddi bir yan etkiye neden olmaksızın PFS'de anlamlı artış ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte Upamostat "non-resectable" lokal ileri pankreas kanseri olan hastalarda faz 2 randomize "proof of concept" çalışmada gemesitabin ile kombine edilerek değerlendirilmiş ve benzer olumlu sonuçlar elde edilmiştir [133]. Tüm bu bilgi birikimi doğrultusunda uPA, meme kanserinde anti-kanser

strateji olarak antagonizmasından yararlanmak üzere araştırmaya değer bir protein olarak gözükmetedir.

Çeşitli çalışmalarda uPA'nın MIP2 salımını arttırdığı ve inflamatuvar yanıtı yol açtığı gösterilmiş olsa da , uPA'nın kanserde MIP2 üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Öte yandan doğrudan uPA'nın KC salımı üzerine etkisini değerlendiren bir çalışma bulunmasa da, doku plazminojen aktivatörü olan tPA'nın astrosilerde MIP2 ve KC salımını arttırdığı gösterilmiştir [134].

2.12.2. Kompleman Komponent 3a (C3a)

Kompleman komponent C3 (C3), kompleman aktivasyonunun merkezi komponentidir ve kompleman komponent C3a (C3a), C3'ün kompleman aktivasyonu sırasında parçalanması sonucu oluşan bir üründür [135]. Bu protein, makrofaj, eozinofil, monosit ve T hücreleri için potent kemoatraktan olarak bilinen bir anafilatoksinidir. Primer olarak sitokin, eikozanoid ve reaktif oksijen ürünlerinin salımı yoluyla kompleman aracılı inflamasyonu modüle etmektedir. Bununla birlikte C3a'nın yüksek seviyeleri tümör gelişimi ile ilişkili bulunmuştur.[136] Dahası, C3a'nın serviks [137, 138] ve over [139, 140] kanserlerinde, küçük hücreli akciğer kanserinde [141] glioblastome multiformede [142] ve melanomda [102] tümör gelişimi ve anjiogenezi desteklediği ve progresyonla korele olduğu saptanmıştır.

C3a, etkisini G-protein kenetli yedi transmembran domain reseptörü olan C3a reseptörü (C3aR) ile etkileşimi üzerinden göstermektedir [143]. Monosit, makrofaj ve dentritik hücreler gibi myeloid hücreler ve T hücreleri C3aR eksprese etmektedir [144, 145]. ve C3aR sinyalinin immün inhibisyonu destekleyerek EMT'de ve tümör gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir [102, 146-148]. Öte yandan KC ve MIP2 salımını indüklediği bilinen [149, 150] bu proteinin kanser hücre dizilerinde KC ve MIP2 salımı üzerine etkisi daha önce tanımlanmamış ve ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir.

2.12.3. Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP)

Esas olarak epitelyal hücrelerden salınan, IL-2 sitokin ailesi üyesi olan ve IL-7'nin paroloğu olarak tanımlanan tip 1 inflamasyon sitokinidir. Timik stromal lenfopoietin (TSLP)'in yardımcı T hücresi (Th2, "T helper 2") yanıtını başlattığı ve desteklediği bilinmektedir [151]. Esas olarak atopik dermatit ve alerjik bronşial astım gibi alerjik hastalıklarda esansiyel rol almaktadır [152].

Bununla birlikte TSLP, CD4+ T hücreleri aktive ederek, dendritik hücrelerde OX40L ekspresyonunu indükleyerek, Th2 seviyelerini arttırarak ve Th2 tip sitokinleri ile B hücre büyüme faktörünün üretimini destekleyerek tümör progresyonunda rol alır [151]. Th2 sitokinleri ise, kanser hücrelerinin sağkalımını, M2 makrofaj diferansiasyonunu ve fibrozisi arttırarak hastalık progresyonunu tetiklemektedir [153, 154].

TSLP reseptörü (TSLPR) ise, TSLPR zinciri ve IL-7 reseptör α zincirinden (IL-7R α) oluşmaktadır ve B hücreleri, mast hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler (DCs), bazofiller, CD4+, CD8+ ve düzenleyici T hücreleri içeren çeşitli immün hücrelerde eksprese edilmektedir [155, 156]. Bununla birlikte havayolu ve kolon epitelini içeren non-hematopoietik hücrelerde lokal inflamasyon tarafından ekspresyonu düzenlenecek şekilde TSLPR ekspresyonu görülmüştür [157-159].

Son zamanlarda yapılan bir seri çalışma TSLP'nin, özellikle tümör mikroçevresinde Th2 hücrelerinin artmış infiltrasyonu ile beraber olan meme ve pankreas kanserlerinde tümör gelişimi ve metastazla ilişkisi olduğunu göstermiştir [153, 154, 160, 161].

Kanser hücresi kökenli TSLP salımının fare meme ve over kanser modellerinde dolaşımdaki kemik iliği kökenli B hücre prekürsörlerini arttırarak metastazı desteklediği ortaya konmuştur [162]. Diğer yandan TSLP'nin farklı allellerinin kadınlarda artmış meme kanser riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [163]. Kore'li kadınlarda TSLP'deki genetik polimorfizmlerin kötü prognozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir [164].

TSLP'nin konsantrasyon bağımlı bir şekilde ve TSLP'ye spesifik olarak insan eozinofillerinden CXCL1 salımını indüklediği gösterilmiş olsa da [165], kanser hücrelerinde KC salımına etkisini değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Diğer yandan TSLP'nin MIP2 salımına etkisini değerlendiren bir yayına rastlanmamamış olsa da fare plateletlerinde PI3K/Akt sinyali aracılığıyla aktivasyona neden olduğunu gösteren bir çalışma [166], bu sinyalizasyonun bizim modelimizde de CXCR2 için ligand olan kemokinlerin salımına yol açabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte TSLP'nin MIP2 salımına etkisini değerlendiren bir yayına rastlanmamamıştır.

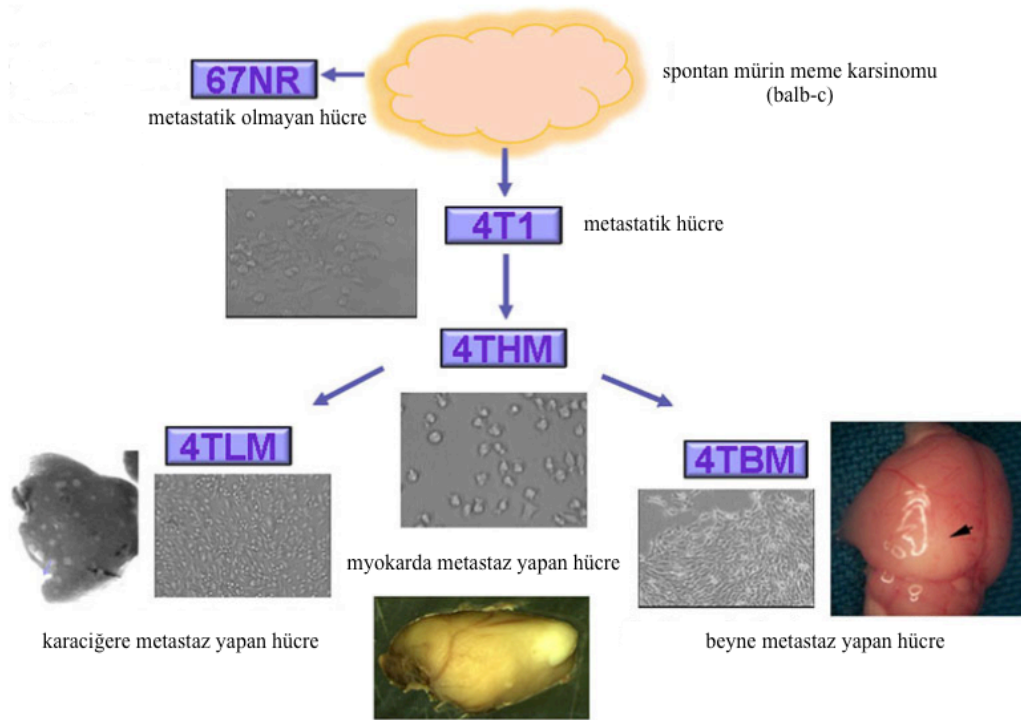
Çalışmamızda, öncelikle seçilen bu 3 otokrin tümörojenik proteinin metastatik olmayan (67NR) ve metastatik (4T1, 4THM, 4TLM ve 4TBM) fare meme kanseri hücre hatlarında varlığı uygun yöntemlerle doğrulandı. Sonrasında bu proteinlerin MIP2 ve KC salımını üzerine etkileri bu kemokinlerin yoğun olarak bulunduğu 4TBM ve 4THM hücrelerinde araştırıldı.

Diğer yandan PI3K yolağının düzenlenmesindeki bozuklukların kanser gelişiminde önemli olduğu bilinmektedir [167]. PI3K yolak inhibitörlerinin kanser ilaçlarına karşı gelişen direnci kırabileceği düşünülmektedir [168]. Bununla birlikte PI3K yolağının aktivasyonunun MIP2 salımında çok önemli olduğunu ve PI3K inhibitörü LY294002'nin MIP2 salımını nerdeyse %50 düzeyinde baskıladığı gösterilmiştir [18]. Dahası, laboratuvarımızda yapılan çalışmalar PI3K- α subunit antagonisti BYL-719'un 4THM ve 4TBM hücrelerinde hem serumsuz hem serumlu ortamda, 10 μ M düzeyindeki yüksek konsantrasyonda KC salımını sınırlı seviyede azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, çalışmanın son kısmında yine 4THM ve 4TBM hücrelerinde proteinlerin antagonistlerinin hücre içi sinyal yolları üzerine etkisi değerlendirilmek üzere Akt, Erk ve p38 fosforilasyonunu değiştirip değiştirmediği test edildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan metastatik olmayan 67NR ve metastatik 4T1 hücreleri daha önce balb/c farelerde kendiliğinden oluşan meme kansinomundan elde edilmiştir [169]. 4THM hücreleri ise 4T1 hücrelerinin kalbe metastaz yapan hücrelerinin kültürlenmesi ile oluşturulmuştur.[170] 4THM hücrelerinin ortotopik (meme dokusu içine) enjeksiyonu makroskopik karaciğer metastazı oluşturmuş ve bu metastazlardan 4TLM hücre dizisi elde edilmiştir [171]. Daha sonra 4THM hücrelerinin makroskopik beyin metastazı oluşturduğu 2 fareden beyine giden hücreler izole edilmiş ve 4TBM olarak isimlendirilmiştir. Hücrelerin elde edilişi Şekil 3.1’de şematize edilmiştir [172].



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının orjininin şematizasyonu ve hücre hatlarının köken aldığı metastatik doku ve hücrelerin in vitro görüntüleri [172].

3.1.1. Hücre Dizileri

Hücre kültür çalışmaları steril laminar hava akımlı çalışma kabini içinde yapıldı. Sıvı nitrojen de saklanan hücreler, 37°C su banyosunda çözöldü ve 10 mM'lik hücre kültür petrilere ekildi. Hücreler normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan, DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine %5 CO₂ fetal sığır serumu (FBS), 1 mM sodyum piruvat, 0.02 mM non-essential amino asit ve 40 mg/ml gentamisin eklenmesi ile oluşturulan ortamda çoğaltıldı. 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından "inverted" mikroskopta günlük olarak takip edildi. Petrilere %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözleendiğinde pasajlanarak çoğaltılmaya devam edildi.

3.1.2. Hücre Sayımı

Tüm hücreler petri zeminine tutunma özelliği gösterdiği için sayım için öncelikle petri zemininden ayrılması sağlandı. Bu işlem için, hücrelerin içinde bulunduğı petrilere besiyerleri çekilip atıldı. Üzerine 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek 1-2 dakika (dk) içerisinde zeminden ayrılınca, 1:3 oranında besiyeri eklenerek, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Tripsin-EDTA'lı besiyerini uzaklaştırmak için 700 rpm'de 3 dk. santrifüj edilen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre peleti 5 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Sayım için bu süspansiyondan besiyeri ile 1:10 oranında seyreltilerek yeni bir hücre süspansiyonu elde edildi. Thoma lamı (Hemasitometre) ile sayım yapıldı. Belirlenen hücre sayısını elde etmek için seyreltme miktarı hesaplanarak, belirlenen oranlarda hücre süspansiyonu elde edildi ve 200 µl'de belirlenen sayılarda hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür petrilere hücre ekimi yapıldı.

3.1.3. Hücre Sayısını Belirlemek İçin Standart Hazırlanması

Canlı hücre sayısını belirlemek için WST-1 kiti (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Applied Sciences) kullanıldı. Thoma lamında sayılan 4THM ve 4TBM hücreleri ilk standart 120.000 hücre/kuyucuk ve her bir kuyucukta bir öncekinin yarısı kadar hücre olacak şekilde seyreltilerek 96 kuyucuklu petrilere ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda kuyucuklardaki besiyerleri toplanıp atıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl %10 WST-1 içeren %5 FBS içeren besiyeri eklendi. Petriler 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde, karanlık ortamda 3 saat inkübe edildi. 3 saatin sonunda spektrofotometrede 440 nanometre dalga boyunda okuma yapıldı [29]. Bu işlem, kullanılan her bir hücre hattı için ayrı ayrı uygulandı.

3.1.4. Hücrelerin Spesifik Antagonistlerle Tedavi Edilmesi

3.1.2.’de anlatıldığı gibi sayılan 4THM ve 4TBM hücreleri, deneyde hedeflenen amaca göre belirlenen sayılarda (çoğunlukla 2000 ve 6000 hücre/kuyucuk), 8’er tekrarlı olacak şekilde, 200’er µl %5 FBS içeren besiyeri ile 96 kuyucuklu kültür petrilere ekildi. Ekimden 24 saat sonra tüm hücrelerin besiyerleri toplandı [15].

Az sayıda ekilen hücreler otokrin faktörlere bağlı büyümenin etkili olduğu düşük serum (%0,2 FBS) içeren*, çok sayıda ekilen hücreler ise hızlı hücre proliferasyonuna olanak sağlayan yüksek serum (%5 FBS)** içeren besiyeri ortamında hazırlanan antagonistlerin belirlenen konsantrasyonları ile 200 µl/kuyucuk olacak şekilde ile tedavi edildi.

Tedaviler aşağıda belirtilen konsantrasyonlarında hazırlandı. Kontrol grubu için tedavinin hazırlandığı besiyeri ortamı kullanıldı.

- uPAR antagonisti IPR-803 (Glaxo, Cat No: GLCX-03142): 1, 10 ve 30µl
- C3aR antagonisti SB290157 (SB290157 trifluoroacetate salt, Sigma-Aldrich, Cat No: SML1192-5MG): 10 ve 30µl
- TSLP antagonisti TSLPR nötralizan antikoru TSLPR-Ig (Purified anti-mouse TSLP-R antibody, Biolegend, Cat No:151802): 10 ve 100ng/ml

Antagonistlerin CXCR2 antagonistinin etkinliğini artırıp artırmadığını değerlendirmek amacıyla ise aynı tedavi düzeneğinde CXCR2 antagonisti SB225002'in 0,1 ve 1µl konsantrasyonları diğer antagonistlerin aşağıda belirtilen konsantrasyon kombinasyonları ile uygulandı.

- SB290157: 10 ve 30µl
- IPR-803: 1 ve 10µl
- TSLPR-Ig: 100 ve 500ng/ml

* %0,2 FBS varlığı bu deney koşulu için ihmal edilebilir kabul edilip sonraki bölümlerde kısaca “serumsuz ortam” olarak adlandırılacaktır.

** %5 FBS varlığı sonraki bölümlerde kısaca “serumlu ortam” olarak adlandırılacaktır.

3.1.5. Hücre Proliferasyonun Değerlendirilmesi (WST-1 Testi)

Hücrelerin çoğalma hızı ve antagonistlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek üzere, tedaviye başlangıç anındaki hücre sayısını belirleyebilmek için kullanılan “time zero” (T0) grubunda tedavi uygulanmasının hemen ardından, tedavi gruplarında ise 3.1.4.’te belirtilen sürelerin sonunda koşullandırılmış ortamlar toplandı ve 3.1.3’teki WST uygulaması işlemleri gerçekleştirildi. T0 grubu ise tedavi başlangıcındaki hücre sayısını değerlendirmek için kullanıldı.

Spektrofotometreden farklı zamanlarda elde edilen değerler Excel programında “standartlar, T0 grubu ve tedavi grupları” sıralaması ile birleştirildi. Hücre sayıları Elde edilen değerler “KC junior software” (BIO-TEK) programı kullanılarak analiz edildi ve “Excel” programında her grubun ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplandı.

Yüksek sayıda ekilen hücreler için 48 saat, düşük sayıda ekilen hücreler için 72 saat sonra tedavi gruplarının mediumları MIP2 ve KC düzeylerini ELISA ile

değerlendirmek (3.2.) üzere depopleytlere toplandı ve hücre sayımları (3.1.5.) yapıldı.

3.2. ELISA Yöntemi

3.2.1. MIP2 ve KC Düzeylerinin ELISA ile Ölçümü

Antagonistlerin metastatik hücrelerde CXCR2 ligandlarından MIP2 ve KC salımı üzerine etkisini araştırmak için 3.1.4.'te anlatıldığı gibi, 96 kuyucuklu petrilere ekilen 4THM ve 4TBM hücrelerinin tedavi ve kontrol gruplarından toplanan koşullandırılmış ortam (CM) örneklerindeki kemokin seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Eş zamanlı olarak tedavi sonunda hücre sayısındaki değişiklikler ELISA sonuçları eşlenerek grafikler oluşturuldu. Üreticinin önerdiği protokole uygun olarak çalışılacak şekilde MIP2 ve KC ELISA “construction” kitleri (Antigenix America, sırasıyla Cat No:OMN-RMF431CKC ve RMF428CK) üreticinin protokolü takip edilerek kullanıldı. Özetle; 96 kuyucuklu “High Binding” ELISA petrilere çalışılacak protein için spesifik “capture antibody” eklenmiş “coating buffer” ile kaplandı. Daha sonra “blocking buffer” ile bloklandı ve sonrasında hazırlanan standart ve örnekler ile inkübe edildi. İnkübasyonun ardından önce çalışılacak protein için spesifik “detection antibody” ile, sonrasında avidin-HRP ile muamele edildi. Bu aşamaya kadar gerçekleştirilen her basamak sonrasında %0,5 Tween20 in fosfat tampon solüsyonu (PBS, Phosphate buffer saline)* ile protokolde belirtilen sayılarda yıkama yapıldı. En son substrat solüsyonu eklendi ve belirlenen süre sonunda 2N H₂SO₄ eklenerek protokolde belirtilen dalga boyunda spektrofotometre ile okutuldu.

Elde edilen ham data değerleri “KC Junior Software” programı ile standardize edilerek değerlendirildi. “Excel” programında her grubun ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplandı.

*Fosfat Tampon Solüsyonu (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 otoklavda steril edilerek kullanıldı.

3.2.2. uPA ve C3a'nın ELISA ile Ölçülmesi

Tüm hücrelerdeki (67NR, 4T1, 4THM, 4TBM ve 4TLM hücreleri) bazal uPA ve C3a miktarlarını değerlendirmek ve karşılaştırmak için hücreler 3.1.2.'de anlatıldığı gibi sayıldı ve 48 kuyucuklu petrilere 25, 50 ve 100.000 hücre/kuyucuk ve 4'er tekrarlı olacak şekilde, 1'er ml %5 FBS içeren besiyeri ile ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri atılarak yerlerine 500'er µl %1 FBS içeren besiyeri konuldu ve 24 saatlik inkübasyonun ardından CM'ler toplandı. Elde edilen örnekler üreticinin protokolünde tanımladığı şekilde C3a ve uPA ELISA kitlerinde (Elabscience, Cat No: E-EL-M0337; Elabscience, Cat No: E-EL-M1226, sırasıyla) çalışıldı.

Elde edilen ham data değerleri "KC Junior Softwar"e programı ile standardize edilerek değerlendirildi. "Excel" programında 100.000 hücreye uyarlanarak her grubun ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplandı.

3.2.3. TSLP'nin ELISA ile Ölçülmesi

Tüm hücrelerdeki (67NR, 4T1, 4THM, 4TBM ve 4TLM hücreleri) bazal TSLP miktarlarını değerlendirmek ve karşılaştırmak için hücreler 3.1.2.'de anlatıldığı gibi sayıldı ve 24 kuyucuklu pleytlere 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 1'er ml %5 FBS içeren besiyeri ile ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri atılarak yerlerine 500'er µl serumsuz besiyeri konuldu ve 8 saatlik inkübasyonun ardından CM'ler toplandı. Elde edilen örnekler üreticinin protokolünde tanımladığı şekilde TSLP ELISA kitinde (Biolegend, Cat No: 434104) çalışıldı.

3.3. Western Blot Tekniği

Hücre proliferasyonu ve kemokin salımı üzerine etkisini gördüğümüz ajanların, hücre içi sinyal yollarında rol oynayan önemli proteinlerden ERK1/2, P38 ve Akt'nin fosforilasyonuna etkilerini belirlemek ve semikantitatif olarak protein seviyelerini karşılaştırmak için western blot yöntemi uygulandı.

İmmunoblot tekniği laboratuvarımızda otuştulan protokol takip edilerek gerçekleştirildi. Tüm örnekler 2 birim örnek için 1 birim boya olacak şekilde yükleme boyası ile karıştırıldı, 30 saniye (sn) 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve 4 dk 95°C'de kaynatıldı, tekrar kısa bir santrifüjün ardından hazırladığımız %12 poliakrilamid jele yüklendi ve 120-150 Volt (V)'da örnekler elektroforez yöntemi ile ayrıştırıldı. Gece boyu 40 V'da jelden nitroselüloz membrana proteinler transfer edildi. Membrana transferden alındıktan sonra kontrol için ponceau boyası ile boyandı ve ardından yıkama tamponu ile yıkandı. Sonrasında %5 süt tozu içeren yıkama tamponu ile 2 saat oda ısısında inkübe edilerek bloklama yapıldı ve ardından tekrar yıkama tamponu ile yıkandı. Bloklama basamağından sonra işaretleme basamağına geçildi. Değerlendirilmek istenen proteinlerin moleküler ağırlığına göre membran kesildi ve bu proteinlere özgü primer antikolar ile uygun dilüsyonlarda belirlenen sürelerde inkübe edildi.

Yıkama tamponu ile membranların yıkanmasının ardından primer antikolara uygun sekonder antikoların (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz, Cat No:Sc-2004 ve goat anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz, Cat No:Sc-2005) uygun dilüsyonları ile 2'şer saat inkübasyon yapıldı ve daha önce yapılan yıkama işlemi tekrarlanarak işaretleme basamağı tamamlandı. Proteinlerin eşit oranda yüklendiğini ve transfer edildiğini göstermek için GAPDH kullanıldı; bunun için membran 1/20.000 dilüsyonda 2 saat GAPDH-ab (Meridian Life Science, H86504M) ile ve ardından 1/15.000 dilüsyonda 2 saat anti-mouse-ab ile inkübasyon yapıldı. Son olarak görüntüleme işlemi için membranlar, kemoluminisant ajan ile oda ısısında 4 dakika inkübe edildi ve kaset içine yerleştirildi. Karanlık ortamda membrandaki ışımaya film üzerine aktarıldı ve yıkama banyosu yapılarak membrandaki bantlar film üzerinde görünür hale getirildi.

3.3.1. Antagonistlerin p38, Erk ve Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkilerinin İmmunoblot ile Değerlendirilmesi

Antagonistlerin hücre içi sinyal yollarında rol oynayan önemli proteinlerin fosforilasyonları üzerine etkilerini değerlendirmek için kemokin salımlarının yüksek seviyelerde olduğu bilinen 4THM ve 4TBM hücreleri kullanıldı. Bunun için

hücreler 150.000 hücre/kuyucuk ve 4'er tekrarlı olacak şekilde %5 FBS içeren besiyeri ile 12 kuyucuklu petrilere ekildi ve 48 saat inkübe edildi. Ardından besiyerleri atılarak yerlerine %0.2 FBS içeren besiyeri içerisinde 3.1.4.'te belirtilen antagonist konsantrasyonlarında hazırlanan tedavi süspansiyonları. 40 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri atıldı ve hücrelerin petrilere 7 ml lizis buffer içinde 1 tablet proteaz inhibitor kokteyli eritilerek hazırlanmış solüsyondan 500'er µl eklenerek kaldırılması ile western blotta çalışılacak örnekler hazır hale getirildi.

Akt için p-Akt-ab (pAkt Ser473, Cell Signaling, Cat No:4060) ile gece boyu 1/2000 dilüsyonda ve anti-rabbit-ab ile 2 saat 1/50.000 dilüsyonda; p38 için p-p38-ab (p-p38 MAPK Thr180/Tyr182, Cell Signaling, Cat No:4511) ile gece boyu 1/2000 ve anti-rabbit-ab ile 2 saat 1/50.000 dilüsyonda; Erk için p-ERK1/2-ab (p-ERK1/2 p-p44/42 Thr202/Tyr204, Cell Signaling, Cat No:9106) ile 2 saat 1/2000 dilüsyonda ve anti-mouse-ab ile 2 saat 1/10.000 dilüsyonda inkübasyon yapıldı.

3.4. Kullanılan İnhibitörler ile İlgili Literatür Bilgisi

Ürokinaz tipi plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR) ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) protein-protein etkileşiminin (uPAR-uPA PPI) blokajı için, küçük molekül IPR-456'ın en yüksek afiniteye sahip derivativesi olan IPR-803 seçilmiştir. Bu molekülün hücre adhezyonunu $IC_{50}=30\mu M$ değeri ile, migrasyonu $IC_{50}=50\mu M$ değeri ile [173] ve protein etkileşimini $IC_{50}=10\mu M$ değeri ile [174] bloke ettiği bilinmektedir. Ek olarak bu molekülün $IC_{50}=58\mu M$ değerine kadar sitotoksik olmadığı bildirilmiştir [173]. Bu verilere göre hücre dizilerinde $1\mu M$ ile $30\mu M$ konsantrasyon aralığında IPR-803 kullanılmıştır.

Complement component 3a reseptör (C3aR)'ünün antagonisti olarak non-peptid bir antagonist olan SB290157'in kullanılması planlanmıştır. C3aR için selektif ve yüksek afiniteli olan bu molekül 200 nM IC_{50} değeri ile C3aR'yi kompetitif bloke etmektedir [175]. Bu verilere göre hücre dizilerinde $10\mu M$ ile $30\mu M$ konsantrasyon aralığında SB290157 kullanılmıştır.

TSLPR'ye karşı geliştirilmiş bir inhibitör/antagonist olmadığı için TSLPR antagonisti olarak reseptör aktivitesini bloke edecek antikör kullanıldı. mouse-TSLPR-Ig seçilmiştir. Bu antikörün bloke edici dozu literatürde 10 ng/ml olarak

bildirilmiştir [176]. Bu veriye göre hücre dizilerinde TSLPR-ab 10-500 ng/ml konsantrasyon aralığında kullanılmıştır.

SB225002 (Cayman,182498-32-4) 10 mg, 568 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü. Deneylerde kullanılmak üzere 50 mM'lük stok solüsyonlar halinde hazırlandı. 20 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

3.5. Genel İstatistiksel Analizler

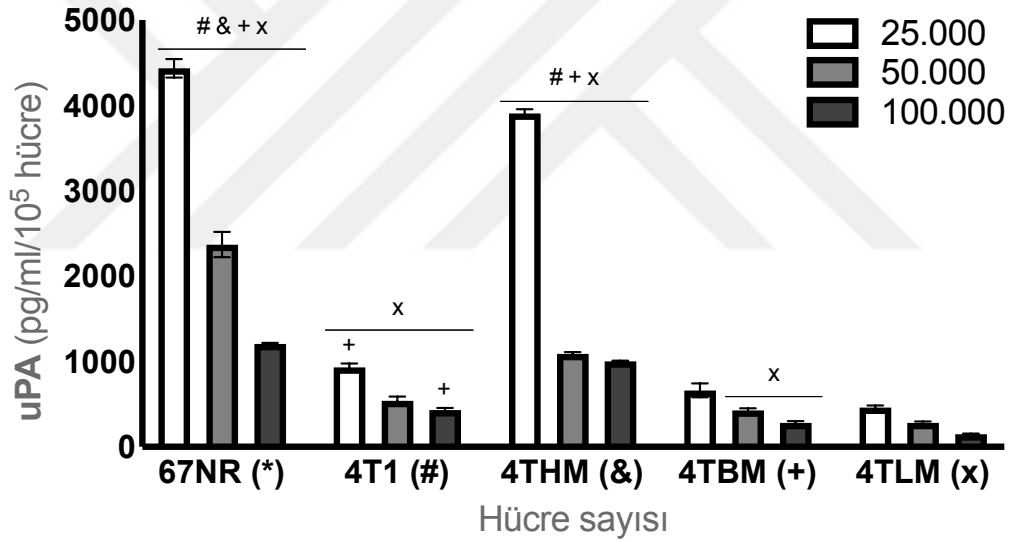
Deney gruplarına göre “Student's t”-testi, ANOVA ve takibinde “Dunnett” karşılaştırma testi, non-parametrik “Mann–Whitney” testi ve “Welch t”-testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Analizler “GraphPad InStat 3 software” kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Seçilen Otokrin Faktörlerin Fare Meme Karsinom Hücre Dizileri Tarafından Salımının Ölçülmesi ve Karşılaştırılması

4.1.1. Plazminojen Aktivatör, Ürokinaz (uPA) Seviyeleri

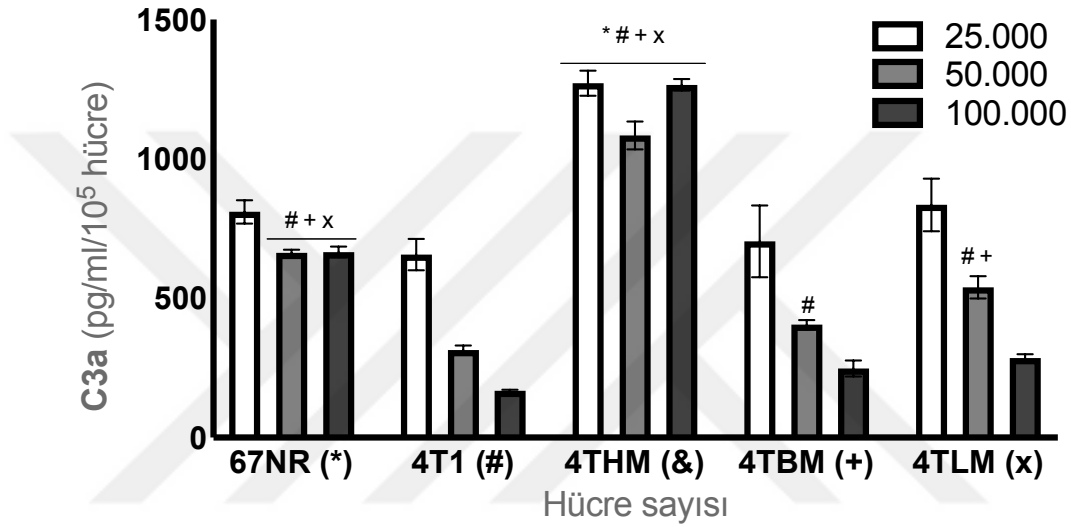
ELISA sonuçları değerlendirildiğinde uPA düzeylerinin hücre sayısı artışı ile azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte uPA seviyeleri, 67NR ve 4THM hücrelerinde en fazla, 4T1 hücrelerinde ise 4TLM hücrelerine kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek saptandı. Diğer yandan 4TBM ve 4TLM hücrelerinde, 4TLM hücrelerinde en düşük seviyede olmak üzere, benzer şekilde düşük seviyelerde ölçüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. uPA'nın metastatik olan ve olmayan hücrelerdeki seviyelerinin ELISA ile değerlendirilmesi. 25, 50 ve 100.000 hücre/kuyucuk olarak ekilen hücrelerden ortama salınan uPA seviyeleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar standardizasyon için 100.000 hücreye uyarlanarak grafiklendirilmiştir. “*”: 67NR'ye, “#”: 4T1'e, “&”: 4THM'ye, “+”: 4TBM'ye, “x”: 4TLM'ye kıyasla anlamlılığı ifade etmektedir.

4.1.2. Kompleman Komponent 3a (C3a) Seviyeleri

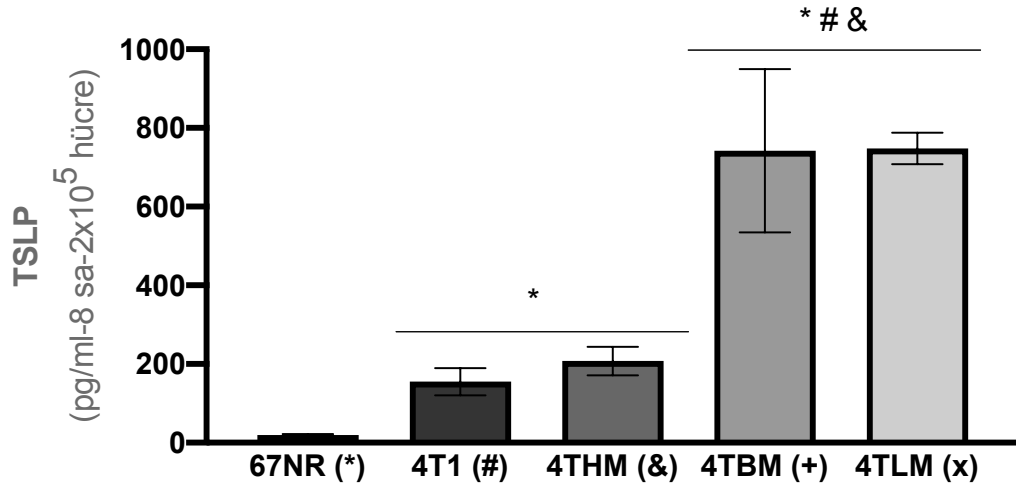
ELISA ile tespit edilen C3a miktarları uPA'ya benzer şekilde hücre sayısı artışı ile azalmaktadır. Bununla birlikte 4THM hücrelerinde diğer tüm hücrelere kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek seviyelerde, 67NR hücrelerinde 50.000 ve 100.000 hücre olarak ekilen koşullarda 4THM'den sonra en yüksek düzeyde, 4T1 ve 4TBM hücrelerinde ise benzer düzeyde olmak üzere en düşük seviyelerde saptandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. C3a'nın metastatik olan ve olmayan hücrelerdeki seviyelerinin ELISA ile değerlendirilmesi. 25, 50 ve 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücrelerden ortama salınan C3a seviyeleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar standardizasyon için 100.000 hücreye uyarlanarak grafiklendirilmiştir. “*”: 67NR'ye, “#”: 4T1'e, “&”: 4THM'ye, “+”: 4TBM'ye, “x”: 4TLM'ye kıyasla anlamlılığı ifade etmektedir.

4.1.3. Timik Stromal Lenfopoietin (TSLP) Seviyeleri

TSLP'nin 67NR hücrelerindeki ELISA ile ölçülen seviyeleri çok düşük miktarda tespit edildi. Diğer yandan metastatik 4T1 ve 4THM hücrelerinde yakın seviyelerde olacak şekilde anlamlı düzeyde daha yüksek, metastatik 4TBM ve 4TLM hücrelerinde ise en yüksek seviyelerde bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. TSLP'nin metastatik olan ve olmayan hücrelerdeki seviyelerinin ELISA ile değerlendirilmesi. 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücrelerden 8 saat sonunda ortama salınan TSLP seviyeleri ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar grafiklendirilmiştir. “*”: 67NR'ye, “#”: 4T1'e, “&”: 4THM'ye, “+”: 4TBM'ye, “x”: 4TLM'ye kıyasla anlamlılığı ifade etmektedir.

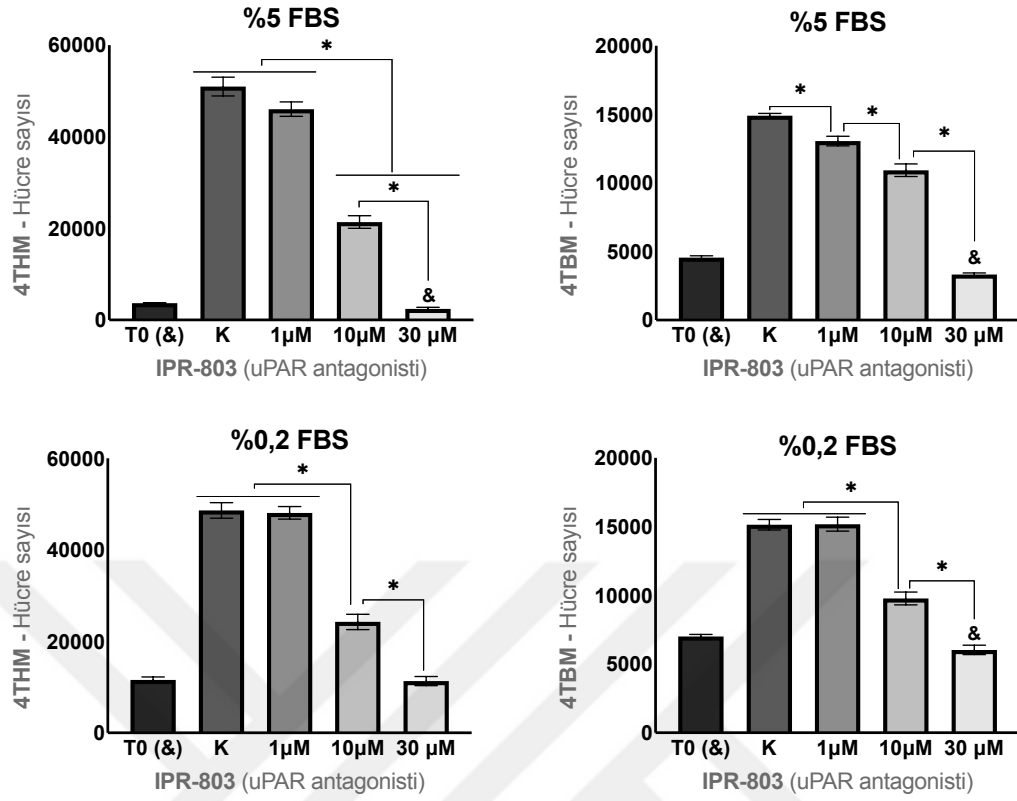
4.2. Proteinlerin İnhibitörlerin Fare Kalp (4THM) ve Beyin (4TBM) Metastatik Meme Karsinom Hücrelerinin Proliferasyonu ve Kemokin Salımı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

İnhibitörlerin etkilerini değerlendirmek için her bir deney 6-8 tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve aynı deney en az 3 kere tekrarlandı. Aşağıda en anlamlı sonucu bulduğumuz veriler açıklanmıştır.

4.2.1. uPA Resepör Antagonisti IPR-803'ün Etkileri

4.2.1.1. IPR-803'ün Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

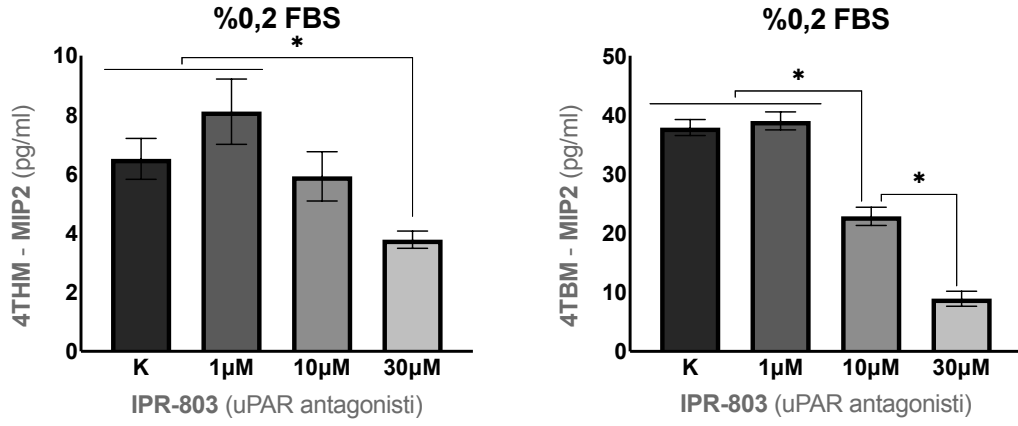
Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi IPR-803 her iki hücre dizisinde de hem serumlu hem serumsuz ortamda 10 μ M konsantrasyonda hücre çoğalmasını engelledi. Dahası, serumlu ortamda 4TBM hücrelerinde 1 μ M konsantrasyon bu etki için yeterli oldu ve antagonistin hücre proliferasyonunu baskılama üzerine olan etkisi konsantrasyon bağımlı idi (Şekil 4.4., sağ üst panel). Bununla beraber 30 μ M antagonist konsantrasyonu serumlu ortamda her iki hücre dizisinin de ölümüne neden oldu (Şekil 4.4., üst panel). Serumsuz ortamda ise bu antagonist konsantrasyonu 4TBM hücrelerini öldürürken, 4THM hücrelerinin proliferasyonunu tamamen durdurdu (Şekil 4.4 alt panel).



Şekil 4.4. uPA inhibitörü IPR-803'ün 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumlu ve serumsuz ortamda değerlendirilmiştir ve T0 tedavi başlangıcındaki hücre sayısını göstermektedir. “&”: T0'ya kıyasla anlamlılığı ifade etmektedir.

4.2.1.2. IPR-803'ün MIP2 Salımı Üzerine Etkisi

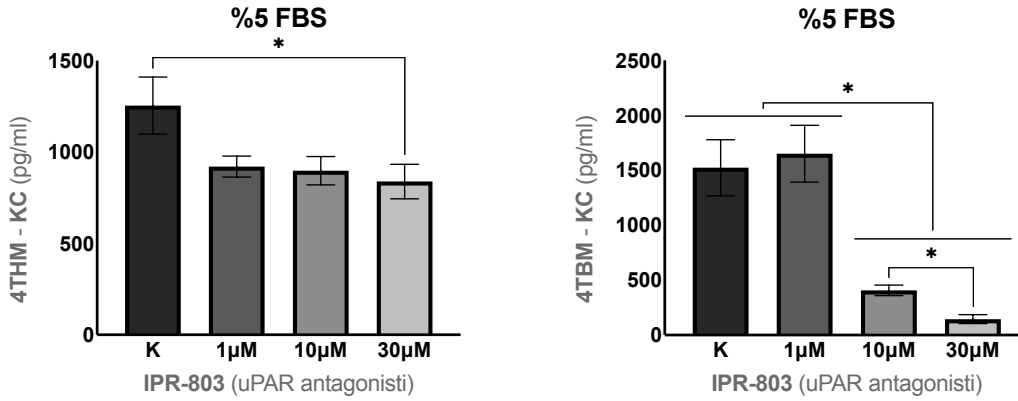
4THM hücrelerinde, IPR-803'ün sitotoksikite göstermediği konsantrasyonlarında (1 ve 10µM) MIP2 salımı üzerine, serumsuz ortamda anlamlı etkisi gözlenmedi (Şekil 4.5., sol panel). 4TBM hücrelerinde ise serumsuz ortamda yüksek antagonist konsantrasyonlarında (10 ve 30µM) MIP2 salımı konsantrasyon bağımlı bir şekilde baskılandı (Şekil 4.5., sağ panel).



Şekil 4.5. uPA inhibitörü IPR-803'ün 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 salımı üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumsuz ortamda değerlendirilmiştir.

4.2.1.3. IPR-803'ün KC Salımı Üzerine Etkisi

Antagonist, serumlu ortamda 4TBM hücrelerinde, hücreleri öldürmediği 1□□M konsantrasyonda KC salımını anlamlı ölçüde baskıladı (Şekil 4.6., sağ panel). Öte yandan KC miktarı her iki hücrede de hücre ölümünün gözlemlendiği 30µM konsantrasyonunda düşük saptandı (Şekil 4.6).

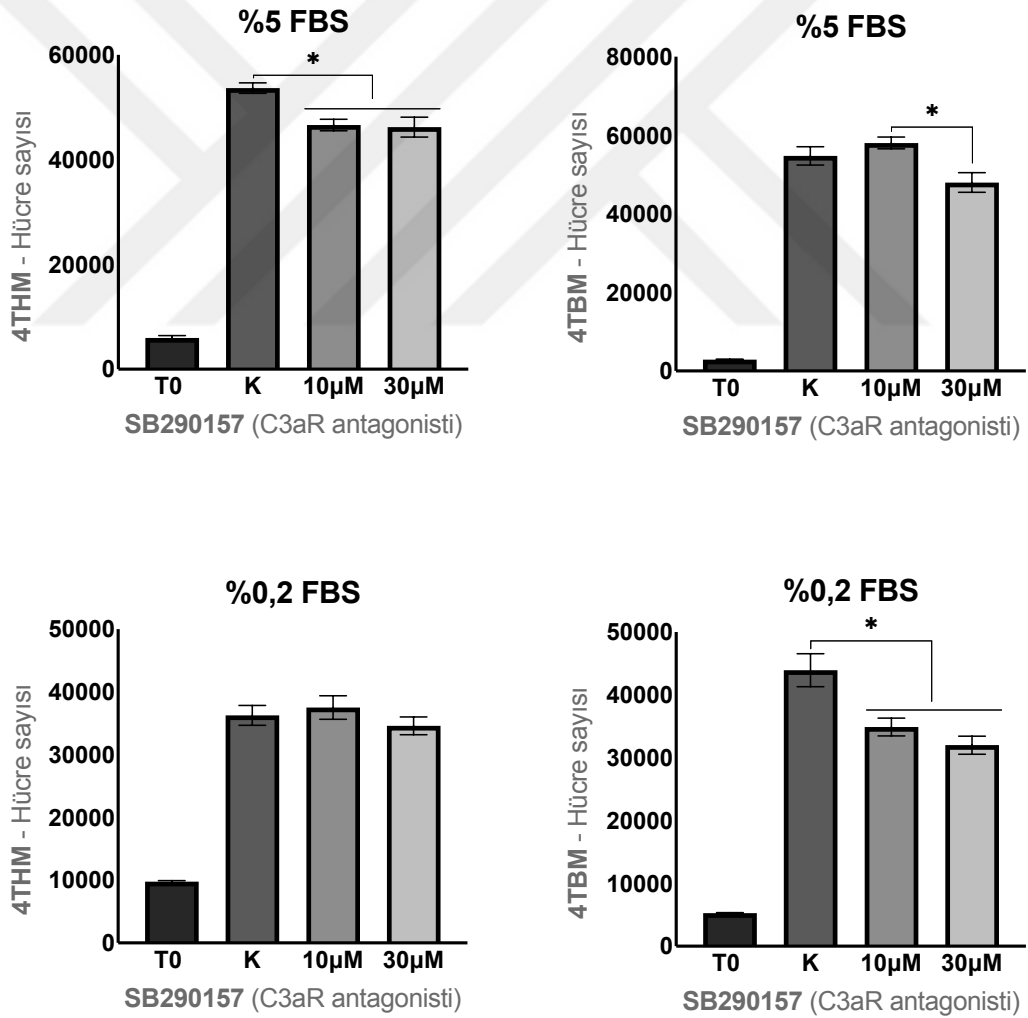


Şekil 4.6. uPA inhibitörü IPR-803'ün 4THM ve 4TBM hücrelerinin KC salımı üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumlu ortamda değerlendirilmiştir.

4.2.2. C3a Reseptör Antagonisti SB290157'nin Etkileri

4.2.2.1.SB290157'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

C3aR antagonisti SB290157'nin 4THM hücrelerinde 10 ve 30 μ M gibi yüksek konsantrasyonları, serumlu ortamda hücre proliferasyonu üzerine sınırlı ancak anlamlı baskılayıcı etki gösterirken (Şekil 4.7., sol üst panel), serumsuz ortamda hücre çoğalmasını etkilemedi (Şekil 4.7., sol alt panel). 4TBM hücrelerinde ise serumsuz ortamda 10 ve 30 μ M antagonist konsantrasyonları ile proliferasyon baskılanırken (Şekil 4.7., sağ alt panel) serumlu ortamda sadece 30 μ M konsantrasyonda anlamlı etki gözlemlendi (Şekil 4.7., sağ üst panel).

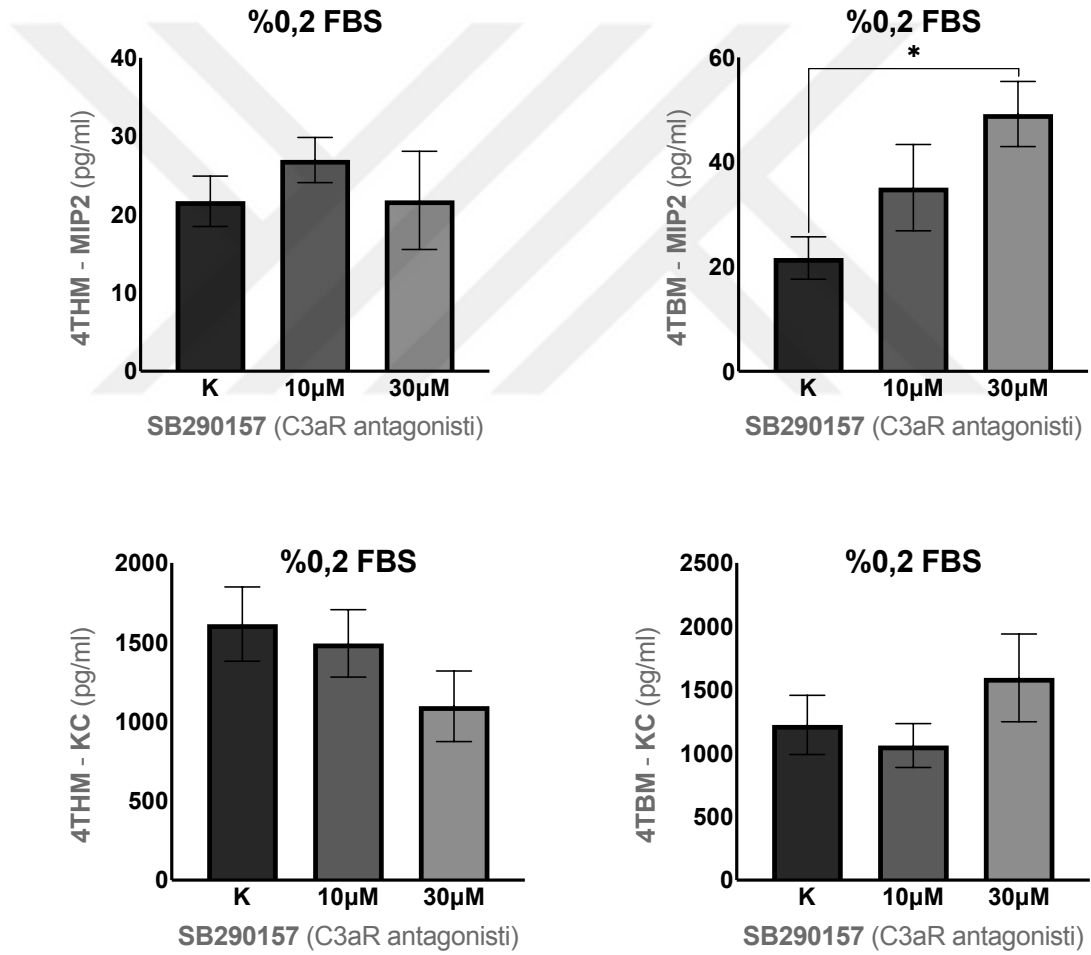


Şekil 4.7. C3aR antagonisti SB290157'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinin

proliferasyonu üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumlu ve serumsuz ortamda değerlendirilmiştir ve T0 tedavi başlangıcındaki hücre sayısını göstermektedir.

4.2.2.2. SB290157'nin MIP2 ve KC salımı üzerine etkisi

SB290157, 4THM ve 4TBM hücrelerinden MIP2 ve/veya KC salımını baskılamadı (Şekil 4.8.). Dahası, serumsuz ortamda 30µM antagonist konsantrasyonunun 4TBM hücrelerinin MIP2 salımında artış gözlemlendi (Şekil 4.8., sağ üst panel).

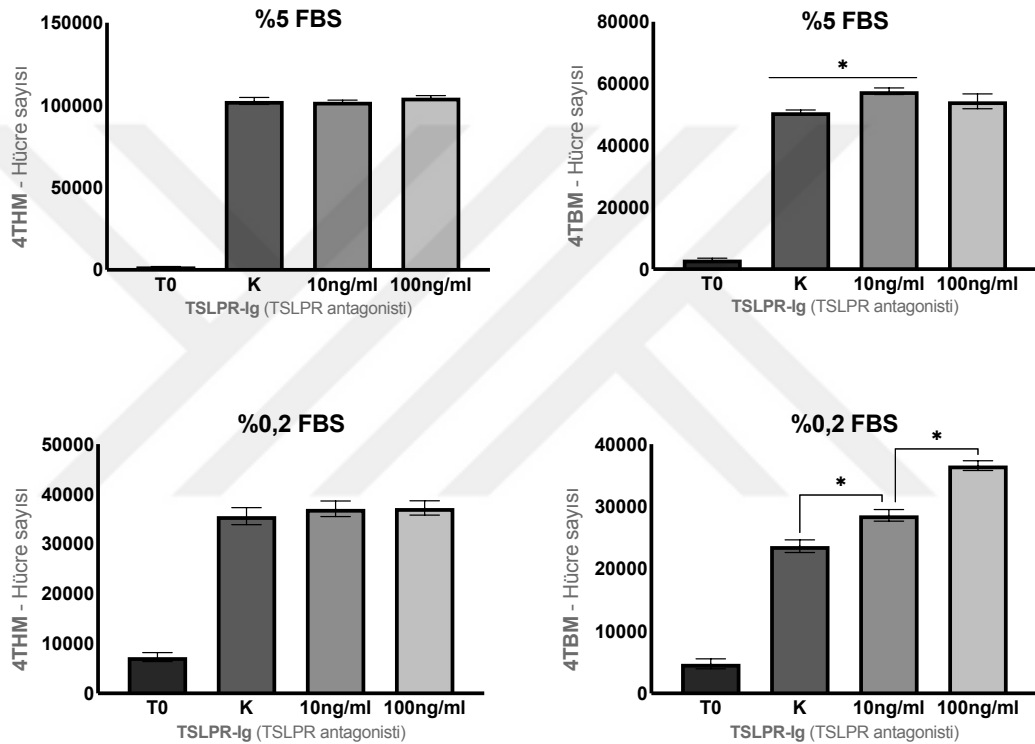


Şekil 4.8. C3a inhibitörü SB290157'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 ve KC salımı üzerine etkileri. Antagonist etkileri serumsuz ortamda değerlendirilmiştir.

4.2.3. TSLPR Antagonisti TSLPR-Ig'nin Etkileri

4.2.3.1. TSLPR-Ig'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

TSLPR antikoru hücre proliferasyonunu 4TBM hücrelerinde serumsuz ortamda konsantrasyona bağımlı olarak, (Şekil 4.9., sağ alt panel) serumlu ortamda ise 10 ng/ml konsantrasyonda (Şekil 4.9., sağ üst panel) arttırdı. Diğer yandan 4THM hücrelerinde proliferasyon üzerine belirgin etki gözlenmedi (Şekil 4.9., sol panel).

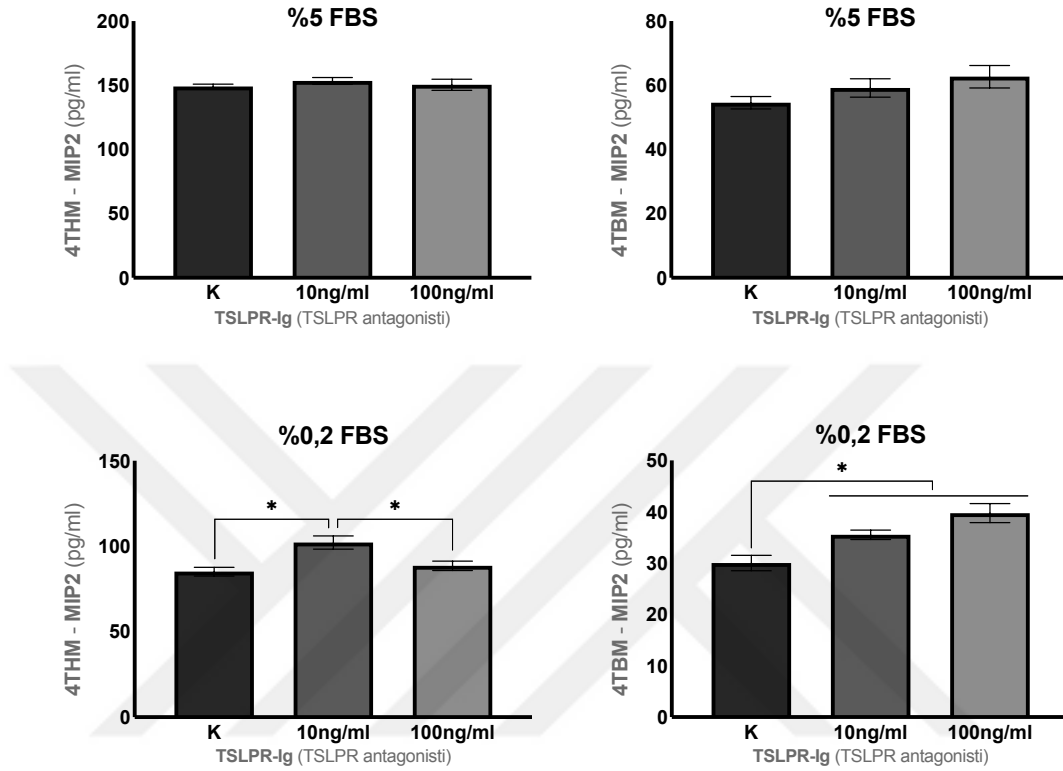


Şekil 4.9. TSLPR antagonisti TSLPR-Ig'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumlu ve serumsuz ortamda değerlendirilmiştir ve T0 tedavi başlangıcındaki hücre sayısını göstermektedir.

4.2.3.2. TSLPR-Ig'nin MIP2 Salımı Üzerine Etkisi

TSLPR-Ig, serumlu ortamda her iki hücrede de MIP2 salımını etkilemedi (Şekil 4.10., üst panel). Serumsuz ortamda ise 4THM hücrelerinde 10 ng/ml konsantrasyonu MIP2 salımını belirgin şekilde artırırken, bu etki 100 ng/ml konsantrasyonunda tamamen nötralize oldu (Şekil 4.10., sol alt panel). 4TBM

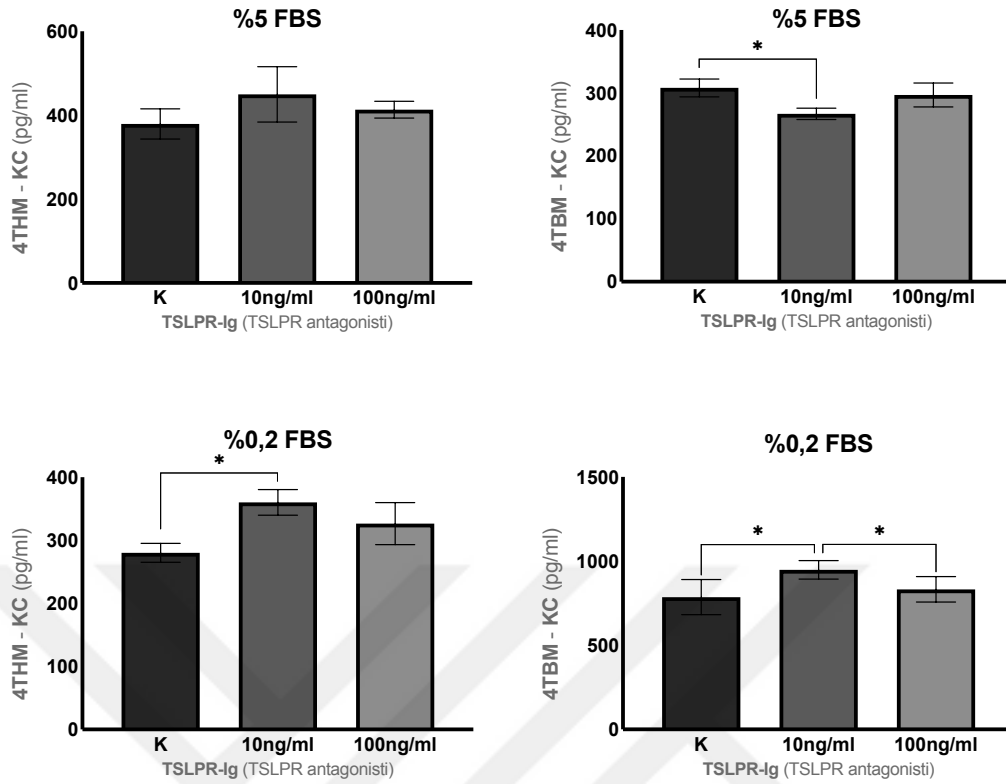
hücrelerinde ise her iki konsantrasyonda da MIP2 salımında benzer seviyelerde artış gözlemlendi (Şekil 4.10., sağ alt panel).



Şekil 4.10. TSLP inhibitörü TSLPR-Ig'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 salımı üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumlu ve serumsuz ortamda değerlendirilmiştir.

4.2.3.3. TSLPR-Ig'nin KC Salımı Üzerine Etkisi

Serumsuz ortamda 10 ng/ml TSLPR-Ig her iki hücrede de KC salımını arttırdı (Şekil 4.11., alt panel). Bununla birlikte 4TBM hücrelerinde 100 ng/ml konsantrasyonu ile bu etki geri döndü (Şekil 4.11., sağ alt panel). Serumlu ortamda ise antagonistenin 4THM hücreleri üzerine etkisi gözlenmezken (Şekil 4.11., sol üst panel), 4TBM hücrelerinde 10 ng/ml antagonist ile KC salımı baskılandı (Şekil 4.11., sağ üst panel).

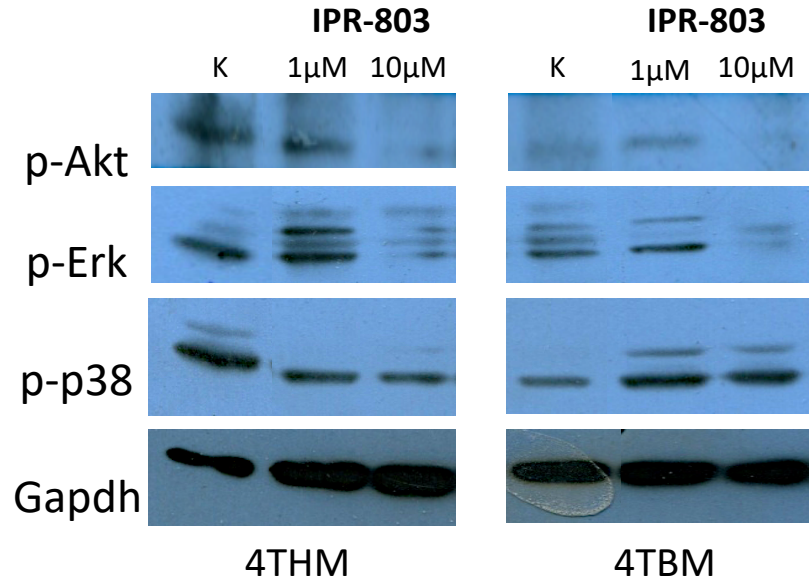


Şekil 4.11. TSLP inhibitörü TSLPR-Ig'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinin KC salımı üzerine etkisi. Antagonist etkileri serumlu ve serumsuz ortamda değerlendirilmiştir.

4.3. Proteinlerin İnhibitörlerin 4THM ve 4TBM Hücrelerinde Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

4.3.1. IPR-803'ün Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

4THM hücre dizisinde uPAR antagonisti IPR-803, kontrole kıyasla p-Akt düzeyini konsantrasyon bağımlı bir şekilde, p-Erk düzeyini ise belirgin olarak 10 μ M konsantrasyonda azalttı. Diğer yandan fosforile p38 düzeyleri her iki ilaç konsantrasyonunda belirgin seviyede baskılandı (Şekil 4.12., sol panel). 4TBM hücrelerinde ise 10 μ M antagonist konsantrasyonu ile p-Akt ve p-Erk düzeylerinde azalma gözlenirken, p-p38 seviyelerinde 4THM hücrelerinde görülen baskılayıcı etki elde edilemedi (Şekil 4.12., sağ panel).

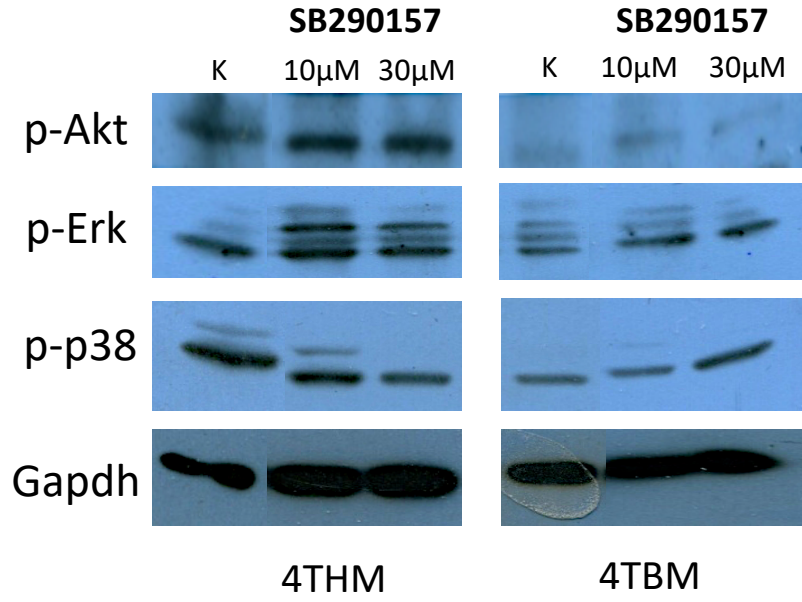


Şekil 4.12. 4THM ve 4TBM hücrelerinde uPAR antagonisti IPR-803'ün Akt, Erk ve p38 fosforilasyonları üzerine etkisi. Yüklenen protein miktarının eşitliğini göstermek için Gapdh kullanılmıştır.

4.3.2. SB290157'nin Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu

Üzerine Etkisi

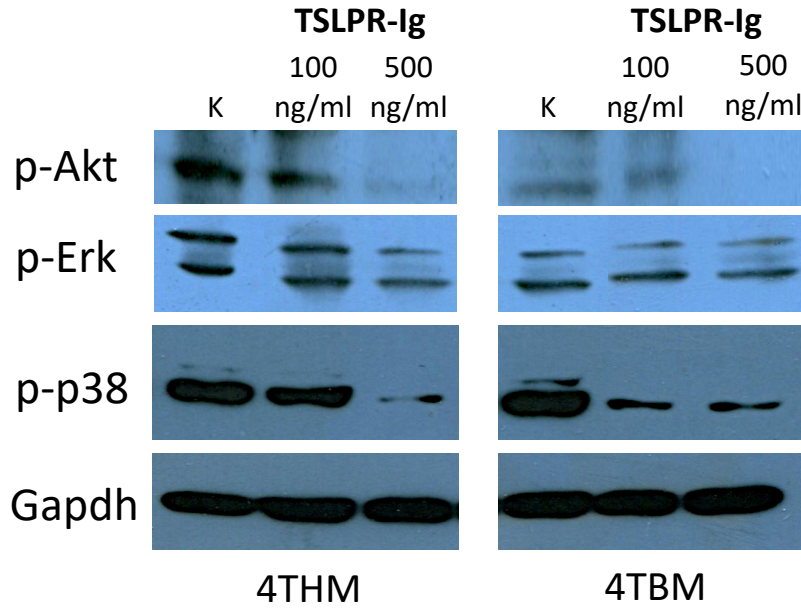
4TBM ve 4THM hücrelerinde SB290157'nin hücre içi sinyal yolları proteinlerinden Akt, Erk ve p-38 fosforilasyonu üzerine belirgin bir etkisi görülmedi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. 4THM ve 4TBM hücrelerinde C3a antagonisti SB290157'nin Akt, Erk ve p38 fosforilasyonları üzerine etkisi. Yüklenen protein miktarının eşitliğini göstermek için Gapdh kullanılmıştır.

4.3.3. TSLPR-Ig'nin Akt, Erk ve p38 Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

TSLPR antagonisti TSLPR-Ig, Akt fosforilasyonunu her iki hücrede de 500 ng/ml konsantrasyonda baskıladı (Şekil 4.14., üst panel). Bununla birlikte 4THM hücrelerinde 100 ng/ml konsantrasyonda da daha az belirgin olmak üzere benzer etki görüldü (Şekil 4.14., sol üst panel). Erk fosforilasyonu üzerine etkiye bakıldığında 4THM hücrelerinde 500 ng/ml konsantrasyonda antagonistin kısmi baskılayıcı etkisi görüldü (Şekil 4.14., sol orta panel) ancak bu etki 4TBM hücrelerinde gözlenmedi (Şekil 4.14., sağ orta panel). p-p38 düzeyleri ise kontrole kıyasla 4THM hücrelerinde 500 ng/ml konsantrasyonda (Şekil 4.14., sol alt panel), 4TBM hücrelerinde ise hem 100 hem 500 ng/ml konsantrasyonda (Şekil 4.14., sağ alt panel) antagonist ile belirgin düzeyde azaldı.



Şekil 4.14. 4THM ve 4TBM hücrelerinde TSLPR antagonisti TSLPR-Ig'nin Akt, Erk ve p38 fosforilasyonları üzerine etkisi. Yüklenen protein miktarının eşitliğini göstermek için Gapdh kullanılmıştır.

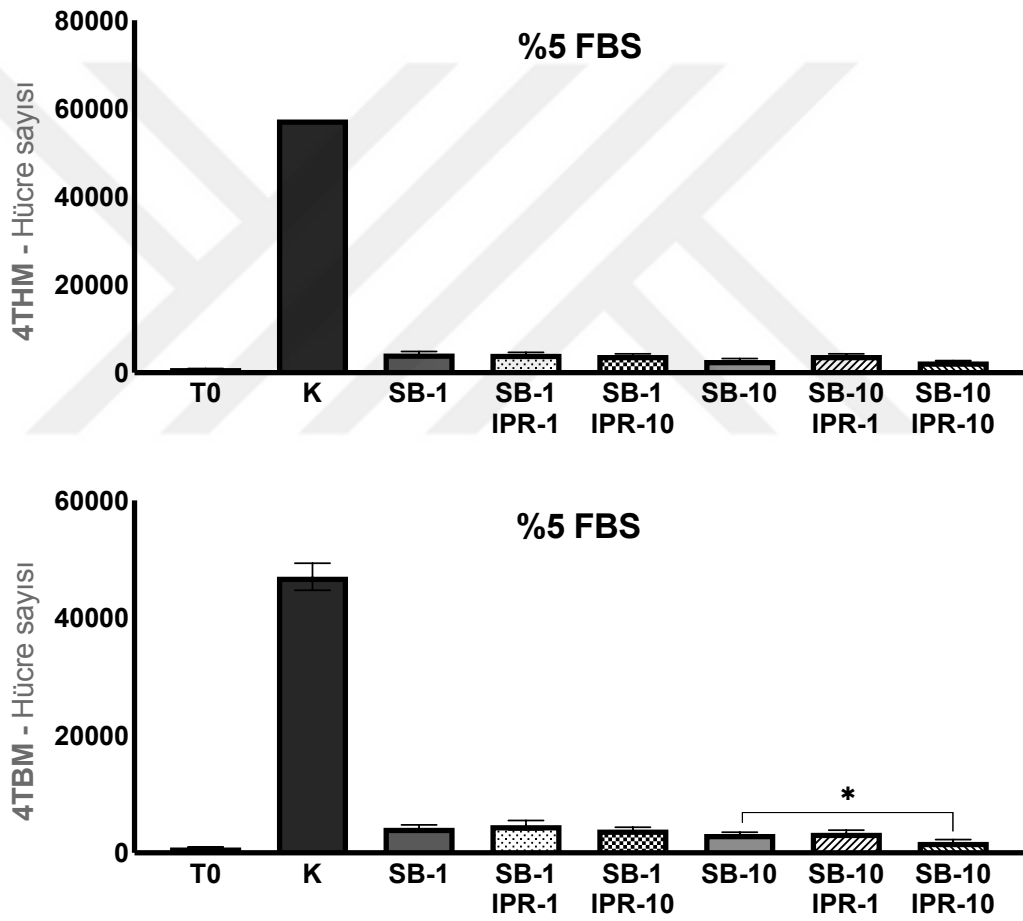
4.4. uPAR Antagonisti IPR-803'ün CXCR2 Antagonisti SB225002 İle Kombinasyonunun 4THM ve 4TBM Hücrelerinde Proliferasyon ve Kemokin Salımı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

SB225002'nin 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine baskılayıcı etkisinin gösterildiği 1 ve 10µM konsantrasyonları ile IPR-803'ün hücreleri öldürmeden çoğalmalarını engellediği en belirgin konsantrasyonu olan 10µM ve beraberinde 1µM konsantrasyonları kombine edildi. Tedaviler, yine serumlu ve serumsuz ortamda olmak üzere iki farklı deney koşulunda gerçekleştirildi ve öncelikle antagonistlerin hücre proliferasyonları üzerine olan etkileri değerlendirildi. Daha sonra SB225002'nin 1µM konsantrasyonu ile neden olduğu 4THM ve 4TBM hücrelerinden MIP2 ve KC salımındaki artışın IPR-803 ile geri döndürüp döndüremeyeceği değerlendirildi.

4.4.1. IPR-803'ün SB225002 ile Kombinasyonunun

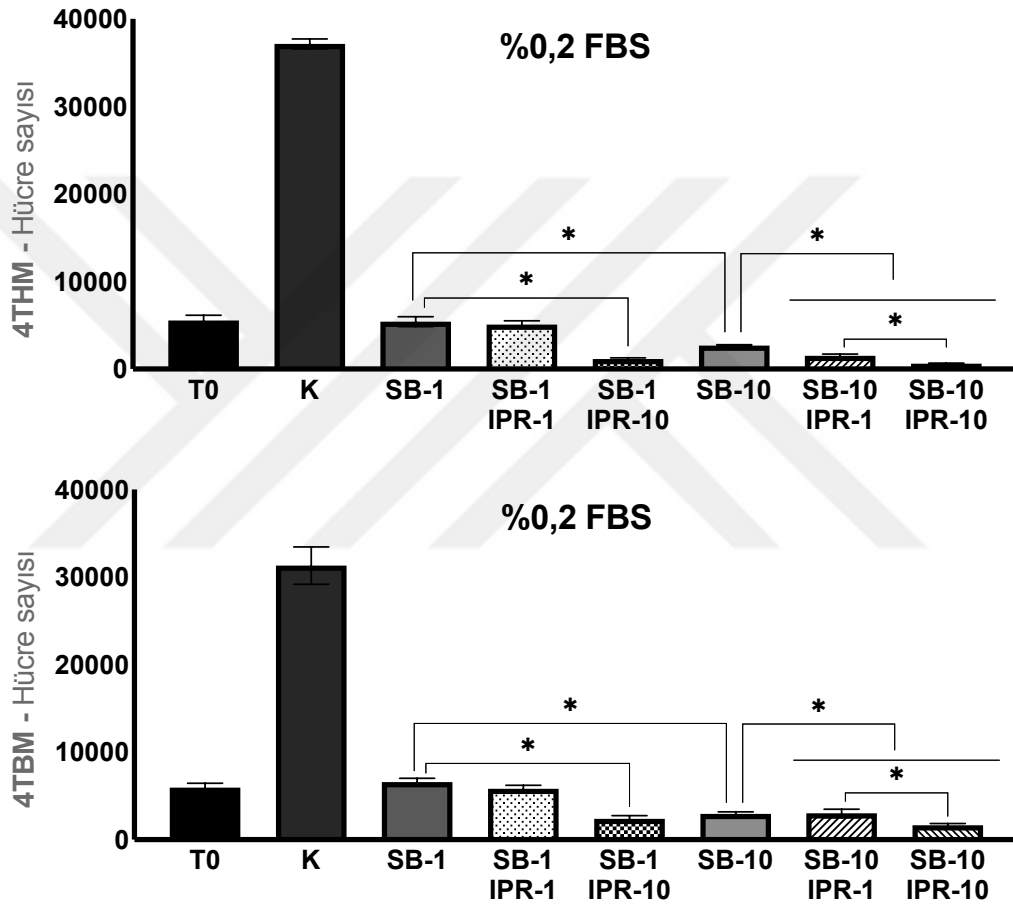
Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

IPR-803, serumlu ortamda 4THM hücrelerinde SB225002'nin hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerini değiştirmezken (şekil 4.15., üst panel), 4TBM hücrelerinde 10µM konsantrasyonunda, 10µM SB225002'nin proliferasyonu baskılayıcı etkisini belirgin şekilde arttırdı (şekil 4.15., alt panel).



şekil 4.15. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun serumlu ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

Serumsuz ortamda ise Şekil 4.16'da görüldüğü gibi, IPR-803'ün 1µM konsantrasyonu, her iki hücrede de 10µM SB225002 ile elde edilen anti-proliferatif etkiyi kuvvetlendirdi. Bununla birlikte 10µM konsantrasyonu, hem 1µM hem 10µM SB225002'nin hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkisini arttırdı. Diğer yandan, otokrin faktörlere bağlı hücre proliferasyonun hakim olduğu serumsuz ortam ile sağlanan bu deney koşulunda, her iki antagonistin de anti-proliferatif etkisi belirgin şekilde konsantrasyonla artan bir kinetik sergiledi (Şekil 4.16.).

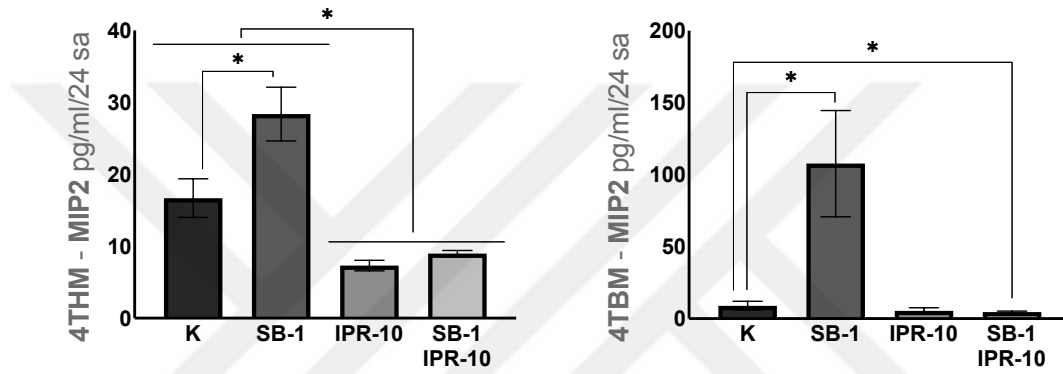


Şekil 4.16. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun serumsuz ortamda 4THM ve 4TBM hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi.

4.4.2. IPR-803'ün SB225002 ile Kombinasyonunun

MIP2 Salımı Üzerine Etkisi

Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi, serumsuz ortamda 1 μ M SB225002, literatür bilgisi ile paralel şekilde [18], 4THM ve 4TBM hücrelerinden MIP2 salımını arttırdı. 10 μ M IPR-803'ün eş zamanlı tedavisi ise bu artışı geri çevirmekle kalmayıp kemokin seviyelerini bazal (kontrol grubunda görülen) seviyenin de altına indirdi (Şekil 4.17).

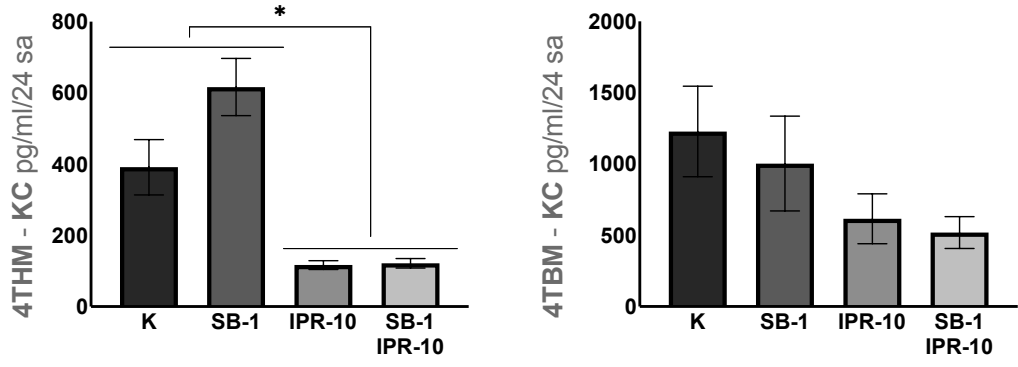


Şekil 4.17. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun 4THM ve 4TBM hücrelerinin MIP2 salımı üzerine etkisi.

4.4.3. IPR-803'ün SB225002 ile Kombinasyonunun KC

Salımı Üzerine Etkisi

4THM hücrelerinde MIP2'ye benzer şekilde, KC seviyeleri 1 μ M SB225002 ile tedavi sonucu artarken, 10 μ M IPR-803 ile kombine edildiğinde bu etki geri döndü (Şekil 4.18, sol panel). 4TBM hücrelerinde ise 1 μ M SB225002'nin KC salımı üzerine etkisi görülmediği gibi IPR-803 ile kombinasyonu da anlamlı farklılık yaratmadı (Şekil 4.18, sağ panel).



Şekil 4.18. IPR-803'ün SB225002 ile kombinasyonunun 4THM ve 4TBM hücrelerinin KC salımı üzerine etkisi.

5. TARTIŞMA

Bugün dünya genelinde meme kanseri, hem kadın hem de erkek kanserlerinde ilk sırada yer almaktadır ve kansere bağlı en sık ölüm nedenlerinden biridir [1]. Diğer taraftan meme kanserine bağlı ölümlerin büyük çoğunluğu metastatik hastalık nedeni ile olmakla birlikte, ilaç direnci tedavide önemli bir kısıtlılık olarak karşımıza çıkmaktadır [20]. Dolayısıyla meme kanserinde tedavi yaklaşımlarının kapsamının arttırılmasına ve bunun için de tümör gelişiminden metastaz ve hatta ilaç direncine kadar karsinogenezde yer alan çeşitli süreçlerin moleküler açılardan aydınlatılmasına daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

CXC kemokinler ve reseptörlerinin kanser gelişimi ve progresyonunda önemli rolü olduğu bilinmektedir. Yapılan çok sayıda çalışma CXCR2'nin çeşitli tümör hücrelerinde eksprese edildiğini göstermiştir [35, 36, 177] ve bu reseptörün antagonizmasının anti-tümörojenik etki sağladığı bilinmektedir [67].

Diğer yandan CXCL8, meme kanserinde en fazla çalışılan CXCR2 ligandı olsa da, GRO- α , GRO- β , GRO- δ CXCL5 gibi diğer CXCR2 agonistleri, CXCL8 ile birlikte düzenlenmektedir. CXCR2 ligandlarının bu birlikte düzenlenmesi, CXCR2 ve 'downstream' sinyal yollarını baskılayarak, CXCL8'in tek başına hedeflenmesinin etkinliğini azaltabilir [178]. Dolayısı ile ligand bağlanmasının veya sonrasındaki yolların aktivasyonunun tek bir tedavi ile engellenmesi, CXCR2 fonksiyonunun baskılanması, çoklu ELR⁺ CXC kemokinlerin biyolojik etkilerini önler. Bu müdahale, sitokinlerin direkt inhibisyonundan daha tümör spesifik olabilir ve yan etkileri azaltabilir [62].

Laboratuvarımızda fare meme karsinom hücre hatları ile daha önce yapılan çalışmalarda, spesifik bir CXCR2 antagonisti olan SB225002 ile anti-tümörojenik etki sağlanmış fakat beraberinde bu reseptörün ligandı olan ve yüksek tümörojenitesinin olduğu bilinen MIP2'nin salımında artış gözlenmiştir. Bu durum da CXCR2'nin MIP2 için otoresptör olduğu şeklinde yorumlanmış ve CXCR2 antagonistlerine karşı gelişebilecek muhtemel direnç ile ilişkilendirilmiştir [18]. CXCR2 reseptörünün karsinogenezle ilişkisi olduğu bilinen bir diğer ligandı ise KC olup henüz yayın aşamasında olan sonuçlarımız CXCR2'nin KC için de otoresptör olduğunu göstermiştir [16].

CXCR2 antagonistleri, meme kanseri tedavisinde adjuvan ajan olarak kullanım açısından oldukça umut vaad etmektedir [63, 64] ve klinik çalışmaları devam etmektedir [9, 10]. Öte yandan, fare metastatik meme kanseri hücrelerinde CXCR2 antagonistleri ile uzun dönem tedavi sonucu otokrin mekanizmayla CXCR2 ligandlarının artışının ilaç direnci edinimine sebep olacağını ve bu durumun tedavinin ilerleyen dönemlerinde aşılması gereken bir sorun olarak karşımıza çıkabileceğini ortaya konmuş [18] ancak muhtemel direnç mekanizmaları belirsiz kalmıştır. Yine bu çalışmada MIP2 salımının zamana bağlı artan bir kinetik göstermesi, bu duruma kanser hücreleri tarafından ortama salınan otokrin faktörlerin neden olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim metastatik ve metastatik olmayan meme kanser hücrelerinin proteomları, anlamlı şekilde değişkenlik gösteren ve kanser ile ilişkisi olduğu bilinen proteinleri ve enzimleri içermektedir [19].

Biz de bu çalışmada, önceki çalışmamızda belirlenen kanser hücre sekrotomları kaynaklı proteinlerden, bilinen moleküler mekanizmaları ile hipotezini kurduğumuz direnç gelişim mekanizmasına sebep olabilecek olan üç tanesini inceledik.

Tümörögenizde rolü çokça çalışılmış olan uPA, mitojenik etkileri bilinen plazminin aktivasyonu, apoptozun inhibisyonu ile malign hücrelerin dirençli fenotip edinimi ve ECM proteolizine öncülük ederek metastazın desteklenmesinin yanı sıra, reseptör downstream etkileri ile hücre proliferasyonu, migrasyonu ve adhezyonuna sebep olarak karsinogenezin birçok erken ve geç basamağında rol alır [109, 179]. uPA defektif farelerde oluşturulan meme kanser modelinde tümör gelişimi etkilenmeksizin akciğer ve lenf nodu metastazının güçlü ve selektif bir şekilde düşük olduğu gösterilmiş ve böylece uPA hedefli anti-metastatik tedavinin efektif olacağı öngörülmüştür [180]. Metastazı olan ve olmayan duktal meme karsinomu olan hastalarla yapılan bir çalışmada, primer metastatik tümörlerdeki uPA ekspresyon seviyelerinin non-metastatik tümörlerdekine göre daha yüksek olduğu, uPAR inhibitörü PAI-1'in ise ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir [108].

Diğer taraftan uPA'nın bilinen tümör destekleyici etkisi ve agresif tümör fenotipi ile ilişkisinin[181-183] aksine, singenik ve immünkompetent meme kanser

modelinde uPA aşırı ekspresyonunun paradoksal olarak tümör gelişimi ve metastazını azaltarak sağkalımı uzattığı gösterilmiştir [184].

Sugioka ve arkadaşları, yabani tip farelerde uPA(-/-) farelere kıyasla lipopolisakkarid (LPS) ile indüklenmiş korneal inflamasyona cevaben korneal fibroblastlarda MIP2 mRNA ekspresyonunun anlamlı ölçüde artış olduğunu göstermişlerdir [185]. Diğer bir çalışmada, fare akciğerlerinde LPS maruziyeti ile pulmoner inflamasyonun indüklenmesi sonucu uPA'nın ve "kringle domain"i olan uPA-KD'nin artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Anri-kringle antikorların uygulanması ile LPS ile indüklenen inflamasyon geri döndürülürken MIP2 seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir [186]. Rat kortikal astrosit hücre kültür modeliyle yürütülen bir diğer çalışmada ise, uPA maruziyetinin astrositlerin koşullandırılmış ortamında konsantrasyon bağımlı bir şekilde MIP2'nin yanısıra MMP2, MMP9 ve önemli pro-inflamatuar siokinlerin salımın da artışa neden olduğu, diğer yandan uPA'nın değil ancak tPA'nın ise MIP2 ile birlikte KC salımını da arttırdığı gösterilmiştir [134].

Diğer yandan, uPA'nın literatürdeki proinflamatuvar kemokin/sitokin salımını arttırdığına ve tümör destekleyici özelliklere sahip olduğuna yönelik bilgi birikimi ile çelişen sonuçlar açıklayan çalışma da mevcuttur. Bu çalışmada, uPA'yı aşırı eksprese eden 4T1 fare meme tümörlerinde tümör gelişimi ve metastazında in vivo anlamlı azalma gözlenirken bu etkinin CXCL1'i de içeren tümör destekleyici genlerde downregülasyon ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [187].

Çalışmamızda meme karsinom fare modelinin agresif metastatik ve metastatik olmayan hücrelerinde uPA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. İlginç bir şekilde en yüksek seviyede metastatik olmayan 67NR hücrelerinde saptandı ve bunu metastatik 4THM hücreleri izledi. En agresif fenotipe sahip olan 4TLM hücrelerinde ise en düşük seviyede ölçüldü. Her ne kadar uPA'nın metastatik potansiyeli olduğunu gösteren çalışmalar mevcutsa da literatürde bildiğimiz kadarıyla bizim kullandığımız hücre dizilerinde yapılan bir araştırma yoktur.

uPA reseptör antagonizması ise hem serumlu hem serumsuz ortamda 10µM konsantrasyonda 4THM ve 4TBM hücrelerinde proliferasyonun belirgin inhibisyonu ile sonuçlandı. Bununla birlikte 4TBM hücre çoğalması, serumlu

ortamda 1µM antagonistle dahi baskılandı. Konsantrasyon 30µM'e çıkarıldığında ise her iki hücrede de hücre ölümü gözlenirken 4THM hücreleri serumsuz ortamda bu yüksek antagonist konsantrasyonun hücre ölümüne olan etkisine daha fazla direnç gösterdi. Dahası, bu etkiler konsantrasyon bağımlı bir kinetik sergiledi.

4TBM hücrelerinde 10µM antagonist, hızlı hücre proliferasyonunun olduğu serumlu ortamda KC salımını, otokrin faktörlere bağlı büyümenin etkili olduğu serumsuz ortamda ise MIP2 salımını anlamlı düzeyde azalttı. Aynı koşullarda ekspresyonunun yüksek seviyede olduğunu bildiğimiz 4THM hücrelerinde ise antagonistin hücreleri öldürmediği konsantrasyonlarda kemokin salımı üzerine etki gözlenmedi.

CXCR2 antagonistinin sebep olduğu kemokin artışına bağlı muhtemel direnç üzerine etkilerini araştırmak için IPR-803 ile CXCR2 reseptör antagonisti SB225002 kombine edilerek öncelikle hücre proliferasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. Serumlu ortamda sadece 4TBM hücrelerinde 10µM konsantrasyonunda SB225002'nin anti-proliferatif etkisini arttırdı. Bununla birlikte serumsuz ortamda hem 4THM hem 4TBM hücrelerinde 1µM konsantrasyonu ile 10µM SB225002'nin, 10µM konsantrasyonda ise SB225002'nin 1µM konsantrasyonunun etkisini belirgin şekilde arttırdı. Dolayısıyla uPA ekspresyonu, hücre fenotipinden bağımsız olarak otokrin bir mekanizma ile olsun yada olmasın, metastazı destekliyor görülmektedir.

10µM IPR-803'ün serumsuz ortamda düşük konsantrasyonda (1µM) SB225002 ile kombine edilerek hücrelerin kemokin salımları üzerine etkisi değerlendirilse SB225002'nin 4THM hücrelerinde hem MIP2 hem de KC salımı üzerine, 4TBM'ninse MIP2 salımı üzerine arttırıcı etkisini geri döndürdüğü ve hatta bazal seviyelerin de altına indirdiği görüldü.

Dolayısıyla, 4TBM hücrelerinde en belirgin şekilde 10µM antagonist ile sağlanan uPAR antagonizması anti-mitotik etkilerin yanı sıra karsinojenik kemokinlerin baskılanmasına sebep olmuştur. Dahası, SB225002'nin proliferasyonu baskılarken otokrin bir mekanizma ile sebep olduğu kemokin salımının ve dolayısıyla muhtemel gelişebilecek ilaç direncinin uPA reseptörünün inhibisyonu ile geri çevrilebileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlar da 4TBM

hücrelerinde uPA'nın otokrin bir etki ile büyümeyi desteklediğini göstermektedir ve bu durum hücrelerin heterojenitesine bağlı olabilir. Diğer yandan bu çalışmanın sonuçlarıyla uPA'nın kanserde, farklı fenotipteki hücrelerden farklı ortamlarda MIP2 salımını çift yönlü etkileyebileceği, KC salımını ise azalttığı ilk kez ortaya konmuştur.

uPAR'ın uPA ve integrine bağlanarak Erk/MAPK aktivasyonu ve MAPK'ın aktif formu olan p-p38 downregulasyonu ile tümör hücre proliferasyonunu regule ettiği bilinmektedir [100]. Daha önce in vivo olarak uPA'nın uPAR aracılığıyla sinyalizasyonunun aktive ERK' n bazal seviyelerindeki artışı sürdürdüğü ve böylece apoptozu inhibe ettiği ve meme kanser progresyonuna neden olduğu gösterilmiştir [93, 188]. Dahası, MDA-MB-231 hücreleri ve fare ksenograft hayvan modelinde, tirozin kinaz inhibitörü olarak antineoplastik etkiye sahip bir antrakinon olan emodin p38 ve Erk1/2 aktivitesini ve uPA ve uPAR ekspresyon seviyelerini inhibe ederek migrasyon, invazyon ve metastazı baskıladığı ortaya konmuştur [101].

Bizim  alışmamızda da paralel olarak 4TBM hücrelerinde ve 10 M antagonist konsantrasyonunda daha belirgin olmak üzere, uPA reseptör blokajının Akt, Erk ve p-38 fosforilasyonlarını baskılanması ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma ile, kanser hücrelerinde uPA reseptörünün downstream molekülleri olarak PI3K/Akt sinyal yolağının kemokin salımında artışa neden olduğu ve bu şekilde otokrin bir faktör olarak kanser hücre sağkalım ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir.

Çeşitli tümörlerde yüksek seviyeleri ile tümör gelişimi ve anjiogenezi desteklediği bilinen C3a [102, 137, 141, 142, 164] için sonuçlarımız, 4THM hücrelerinde en fazla olacak şekilde tüm hücrelerden salındığını gösterdi. Çalışmamızda kullanılan fare metastatik meme kanser hücrelerinden biri olan 4T1 hücreleri ile yakın dönemde yapılan bir çalışmada C3a-C3aR etkileşiminin PI3K/Akt sinyal aktivasyonu aracılığı ile tümör ilişkili fibroblastlar (CAFs)'ı aktive ederek meme kanserinin akciğer metastazını desteklediği gösterilmiştir [189].

İlginç olan ise kanser progresyonu ile ilişkili olduğu bilinen bu proteinin çalışmamızda metastatik olmayan 67NR hücrelerinde metastatik 4T1 ve 4TLM

hücrelerinden daha yüksek seviyede saptanmış olmasıdır. Metastatik hücreler için çelişkili görünen bu durum uPA'da olduğu gibi C3a için de paradoksal bir etkinin sonucu olabilir. Bunun yanı sıra metastatik 4THM hücrelerinde diğer hücelere kıyasla belirgin bir farkla daha fazla bulunduğunun saptanması, C3a'nın literatürce gösterilen metastatik rolü ile örtüşmektedir.

Thurman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı oluşturulan farelerin proksimal tübüler epitelyal hücrelerinde (PTECs) alternatif kompleman yolağı aktivasyonu sonucu KC ve MIP2 üretiminde artış olduğu tespit edilmiş olup bu artış selektif C3aR antagonizması ve NF-KB inhibisyonu ile geri döndürülmüştür [150]. Benzer şekilde fare lupus modelinde C3aR inhibisyonu MIP2 ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini azaltmıştır Akt ve Erk fosforilasyonunda artışa sebep olmuştur [190]. Yakın zamanda C3a geni silinmiş farelerde oluşturulan akut pankreatit modelinde de benzer şekilde MIP2 salımı için C3a uyarısının gerekli olduğu ortaya çıkmıştır [149].

Sonuçlarımız, C3a reseptör antagonizmasının her iki deney koşulunda da he 4THM hücrelerinde hem 4TBM hücrelerinde hücre çoğalmasını sınırlı düzeyde baskıladığını gösterdi. Diğer yandan 4TBM hücrelerinde proliferasyonun baskılandığı antagonist konsantrasyonda MIP2 salımında artış tespit edildi.

Daha önce C3aR antagonizması ile MIP2 salımı azalıyorken Akt ve Erk fosforilasyonunda artış olduğu bildirilmiş olsa da, bu durum C3a'nın Akt ve Erk sinyali aracılığıyla apoptozu regule ettiği şeklinde yorumlanmıştır [190]. Çalışmamızda ise C3aR antagonizmasının değerlendirdiğimiz hücre içi sinyal yolları üzerine belirgin etkisi görülmedi.

Bu bulgular C3a'nın diğer kanserler gibi meme kanserinde de tümör metastazında rol alan bir faktör olduğunu desteklemekte olup bu etkiyi hipotez edildiği gibi MIP2 ve KC gibi otokrin faktörler aracılığıyla yaptığını doğrulayamamıştır. Bununla birlikte MIP2 ve KC salımı üzerine C3a'nın etkisi ilk defa bu çalışmada değerlendirilmiş olup literatürdeki veriler ile çelişecek şekilde kanser hücrelerinde MIP2 salımında artışa neden olduğu gözlenmiştir.

TSLP'nin çeşitli kanserlerde tümör gelişimi ve metastazla olan ilişkisi açıkça bildirilmiştir [153, 154, 160, 161]. Meme kanserinde ise TSLP'nin apoptoz

düzenleyici molekül Bcl-2'nin ekspresyonunu indükleyerek tümör hücrelerinin sağkalımını desteklediği ve aynı zamanda akciğer metastazı için gerekli sinyalizasyonu sağladığı gösterilmiştir [191]. Dahası bu sitokinin, gastrik ve servikal kanser, B hücreli lenfoma ve myelomayı içeren çeşitli insan kanserlerinin progresyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır [192-195]. Dolayısıyla literatürün bu kısmına göre TSLP meme kanserini de içeren çeşitli agresif kanserlerde progresyonla ilişkili önemli bir faktör olarak gözükmemektedir.

Diğer taraftan farklı insan meme kanseri hücre hatlarında ve primer insan meme tümöründe TSLP mRNA ve protein seviyeleri çok düşük seviyelerde saptanmıştır. Buunla birlikte, primer tümör mikroçevresinde ne hematopoietik ne de stromal hücrelerde TSLPR ekspresyonu tespit edilememiştir [196]. Bu da meme kanserinde TSLP'nin alternatif kaynakları olabileceğini düşündürmektedir. Dahası, TSLP'nin normal meme dokusunda inflamasyona neden olmaksızın meme kanser gelişiminin erken evrelerine karşı direk immüniteyi kuvvetli bir şekilde indüklediğini gösteren bir çalışma da bulunmaktadır [197]. Meme kanseri hastalarında yapılan retrospektif bir çalışmada ise TSLP pozitifliği DFS, OS ve adjuvan kemoterapi alan hastalardaki OS ile anlamlı bir şekilde iyi prognozla ilişkili bulunmuştur [198]. TSLP'nin fare epidermal keratinositlerinde aşırı ekspresyonunun tümörögenез için dirence neden olduğu, insan kolon kanseri hücrelerini spesifik bir şekilde apoptoza yönlendirdiği ve erken evre meme kanseri fare modelinde normal meme dokusunda inflamasyona yol açmaksızın Th2 aracılı anti-tümör etki gösterdiği tespit edilmiştir [159, 199, 200]. Dolayısı ile literatür, TSLP'nin kanserdeki rolü ile ilgili birbiri ile zıt bilgiler içermektedir.

Çalışmamızda tüm metastatik hücrelerde saptanan yüksek TSLP değerleri ile literatürün, TSLP'nin metastaz gelişimini destekleyici yönü örtüşmüştür. Diğer taraftan antikör ile reseptörünün blokajının, ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu 4TBM hücrelerinin proliferasyonu arttırması TSLP'nin literatürdeki anti-tümöral rolü ile paralellik göstermektedir.

Daha önce TSLP'nin Erk, p38 ve NF-KB siyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla insan eozinofillerinden CXCL1 salımını indüklediği gösterilmiştir [165]. Bunun yanında, fare plateletlerinde TSLP ile stimülasyon sonucu Akt

fosforilasyonunun arttığı ve bu etkinin PI3K inhibitörleri ile bloke edildiği gösterilmiş ve TSLP'nin PI3K/Akt sinyalizasyonu aracılığıyla platelet aktivasyonu yaptığı öne sürülmüştür [166]. Benzer şekilde, TSLPR blokajı, her iki metastatik meme kanser hücresinde de Akt, Erk ve p38 fosforilasyonunu baskıladı. Diğer yandan TSLP'nin kanser hücrelerinden kemokin salımı üzerine etkisi ise ilk defa bu çalışmada değerlendirilmiş olup MIP2 veya KC salımı üzerine de anlamlı ve tutarlı etkisi elde edilememiştir.

Diğer yandan CXCR2'nin kanser hücrelerinde p53 bağımlı senesensi indüklediği ve dolayısıyla potansiyel tümör baskılayıcı etkisinin bulunduğu gösterilmiştir [201, 202]. uPA ve IL-8'in ise, tümör mikroçevresinde kanser progresyonunu destekliyorken aynı zamanda “senescent” (senesense uğramış) hücrelerden salınan ve tersine tümör baskılayıcı etki gösteren faktörler olduğu belirtilmektedir [203-205]. Benzer şekilde IL-8'in, kolon adenomlarının non-proliferatif kriptlerinde upregule olması, CXCR2 için ligand olan proinflamatuvar sitokinlerin in vivo olarak senesensi desteklediği yada sürdürdüğüne işaret etmektedir [204]. Diğer yandan PAI-1'in de “senescent” hücelerden salınan ve uPA aracılı Akt aktivasyonunu inhibe ederek senesensi destekleyen diğer bir faktör olduğu saptanmıştır [206].

Dolayısıyla her ne kadar kanser tedavisinde kemoterapotik etkiliği arttırmak için CXCR2 mükemmel bir moleküler hedef gibi gözükse de, karsinogenezin ve tümör mikroçevresinin karmaşık yapısından dolayı CXCR2'nin tek başına hedeflenmesi küratif olmayabilir. Öte yandan PI3K/Akt sinyal yolağını hedefleyen konvansiyonel kemoterapi stratejileri meme kanserinde ilaç direnci ve metastaz gelişimini destekleyecek gibi gözükmemektedir [20].

Bununla birlikte, CXCL8'in homeostatik süreçlerdeki çeşitli fonksiyonları nedeniyle, CXCR2 inhibitörlerinin muhtemel yan etkileri göz ardı edilmemelidir. Farklılaşmış hücreleri izleyen ve yok eden nötrofillerin tümör mikroçevresine alımının CXCR2 inhibitörlerince engellenmesi, tümör gelişimini destekleyebilir [207]. İlaveten, CXCR2 antagonistlerinin dolaşımdaki nötrofillerin sayısında belirgin azalmaya neden olması, kemateropotiklerin etkisi ile birleştiğinde myelotoksisitede sinerjistik bir artış görülmesi muhtemeldir [208]. Yine de hedeflenmiş ilaç tedavilerinin yeni teknolojilerle geliştirilmesi bu handikapın

üstesinden gelmeyi mümkün kılabilir.

Özetle, CXCR2 ve liganlarının tümör progresyonu boyunca ortaya çıkardığı etkiler prosenesens etkilerden protümörojenik etkilere uzanacak kadar karmaşık gözükmemektedir. Etki skalasında görülen bu genişliğinse tümörojenik sürecin evresine, orjinine ve hatta genetik “background”ına bağlı olduğu düşünülmektedir [202].

Bununla birlikte bu çalışma ile, kanser hücreleri tarafından tümör mikroçevresine salınan otokrin faktörlerin, regüle ettikleri moleküler mekanizmalarla progresyonun akıbetini belirleyebileceğinin altı çizilmiştir. Sonuç olarak, bazen sadece bir aminoasitin yer değiştirmesi ile başlayan “kanser”in bu muazzam hayatta kalma çabasının üstesinden gelebilmek, kompleks moleküler mekanizmaların ayrı ayrı ve yapılacak müdahalenin sebep olacağı değişikliklerle kombine olarak çok yönlü olarak titizlikle aydınlatılmadığı sürece mümkün gözükmemektedir.

Bu noktada uPA-uPAR aksı, antagonizmasının direkt olarak sağlayacağı anti-tümör etkinin yanısıra, kanser tedavisinde adjuvan ajan olarak umut vaad eden CXCR2 antagonistleri ile uzun süreli tedavide otokrin bir mekanizmayla sebep olabileceği “otoresistans”ın engellenebilmesi için meme kanserinde uygun bir hedef olarak gözükmemektedir. Yine de kanserin moleküler tiplendirilmesi gözardı edilmeden, heterojen tümör mikroçevresindeki etkiler de değerlendirilerek ve farklı sinyal yollarının da etkilenip etkilenmediği kapsamlı bir şekilde araştırılarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

6.1. uPA ekspresyonu, hücre fenotipinden bağımsız olarak, otokrin bir mekanizma ile olsun yada olmasın, metastazı destekliyor gözükmektedir.

6.2. uPA'nın kanserde, farklı fenotipteki hücrelerden farklı ortamlarda MIP2 salımını çift yönlü etkileyebileceği, KC salımını ise azalttığı ilk kez ortaya konmuştur.

6.3. Kanser hücrelerinde uPA reseptörü, downstream yolaklarından biri olan PI3K/Akt aracılığıyla kemokin salımında artışa neden olmaktadır ve bu şekilde otokrin bir mekanizma ile kanser hücre sağkalım ve proliferasyonunu desteklemektedir.

6.4. Dolayısıyla uPA-uPAR aksı, antagonizmasının direkt olarak sağlayacağı anti-tümör etkinin yanısıra, kanser tedavisinde adjuvan ajan olarak umut vaad eden CXCR2 antagonistleri ile uzun süreli tedavide otokrin bir mekanizmayla sebep olabileceği “otoresistans”ın engellenebilmesi için meme kanserinde uygun bir hedef olarak gözükmektedir.

6.5. Kanser progresyonu ile ilişkili olduğu bilinen C3a'nın çelişkili bir şekilde metastatik hücrelerde metastatik olmayan hücrelere göre daha düşük seviyede saptanmış olması, uPA'da olduğu gibi C3a için de paradoksal bir etkinin sonucu olabilir.

6.6. C3a, diğer kanserler gibi meme kanserinde de tümör metastazında rol alan bir faktör olarak değerlendirilmiş olup, kanserde MIP2 ve KC salımı üzerine etkisinin ilk defa değerlendirildiği bu çalışmada, bu etkiyi otokrin faktörlerden bağımsız, farklı bir mekanizma ile yapıyor gözükmektedir.

6.7. Çalışmamızda tüm metastatik hücrelerde saptanan yüksek TSLP değerleri ile literatürün, TSLP'nin metastaz gelişimini destekleyici yönü örtüşürken, antikor ile reseptörünün blokajının, ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu 4TBM hücrelerinin proliferasyonu arttırması, literatürdeki anti-tümöral rolü ile paralellik göstermektedir.

6.8. Dolayısıyla, kanser hücreleri tarafından tümör mikroçevresine salınan otokrin faktörler, regüle ettikleri moleküler mekanizmalarla progresyonun akıbetini

etkiliyor olabilir.

6.9. Sonuç olarak, bazen sadece bir aminoasitin yer değiştirmesi ile başlayan “kanser”in bu muazzam hayatta kalma çabasının üstesinden gelebilmek, kompleks moleküler mekanizmaların ayrı ayrı ve yapılacak müdahalenin sebep olacağı değişikliklerle kombine olarak çok yönlü bir şekilde titizlikle aydınlatılmadığı sürece mümkün gözükmemektedir.

Yine de kanserin moleküler tiplendirilmesi gözardı edilmeden, heterojen tümör mikroçevresindeki etkiler de değerlendirilerek ve farklı sinyal yolaklarının da etkilenip etkilenmediği kapsamlı bir şekilde araştırılarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



7. ÖZET

Amaç: Meme kanseri bugün en sık karşılaştığımız ve azımsanmayacak derecede mortalitesi olan bir malignite olup, henüz mortalitesinden büyük ölçüde sorumlu tutulan metastatik yayılımını önleyecek yada geriletecek bir yaklaşım bulunmamaktadır. Diğer yandan “kanseri”nin ileri düzeyde karmaşık yapısı, moleküler mekanizmaların entegre bir şekilde hedefleneceği yaklaşımlara ihtiyaç doğurmaktadır. CXCR2 kemokinler ve reseptörleri ise kanser gelişim ve progresyonunda önemli rolü olan bir moleküler sistemi temsil etmektedir. Bununla birlikte, özellikle CXCR2’nin, çeşitli kanser hücreleri tarafından eksprese edildiği ve aktivasyonunun metastaz gelişiminde kritik olduğu ortaya konmuştur. Dolayısıyla, CXCR2 antagonistleri anti-kanser tedavide kullanım açısından umut vaat etmektedir ve bu konuda klinik çalışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte, farede CXCR2 ligandları olan KC ve MIP2’nin, CXCR2 aktivasyonuna neden olarak tümörögeneziste etkili oldukları saptanmıştır. Bu kemokinlerin, metastatik fare meme kanseri hücre dizilerinden, metastatik olmayanlara kıyasla daha yüksek seviyede ortama salınması ile metastazda da rol aldıkları tespit edilmiştir.

Arkaplan: Önceki çalışmalarımız, CXCR2 antagonisti SB225002 ile anti-tümörojenik etki sağlanırken ortama salınan MIP2 ve KC miktarında artış olduğunu göstermiştir. Bu durum CXCR2’nin bu ligandlar için otoresseptör olduğunu göstermiş ve kronik antagonist tedavi ile direnç gelişebileceğine işaret etmiştir. Dahası, MIP2 salımında görülen bu artış, zamanla artan bir kinetik göstermiştir. Bu durum, metastatik hücreler tarafından salınan çeşitli otokrin faktörlerin CXCR2 ligandlarının salımını arttırarak muhtemel dirençten sorumlu mekanizlardan biri olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte bir ön çalışmamızda, metastatik hücrelerin metastatik olmayanlara kıyasla, kültür ortamına anlamlı düzeyde farklılık gösteren 85 otokrin faktör saldıgı tespit edildi. Çalışmamızda, bu proteinlerden, KC ve/veya MIP2 salımını arttırdığı yada bu kemokinlerin salımında kritik rolü olan PI3K/Akt yolağı gibi hücre içi survival yollarını aktive ettiği bilinen ancak kanser hücrelerinde daha önce çalışılmamış olan üç tanesini,

antagonizmalarının etkilerini değerlendirerek inceledik. Bu proteinler; Plazminojen aktivatör,ürokinaz (uPA), Kompleman komponenti 3a (C3a) ve Timik stromal-lenfopoietin (TSLP)'dir.

Gereç ve Yöntem: Proteinlerin, fare meme karsinomu metastatik 4T1, 4THM, 4TBM ve 4TLM ve metastatik olmayan 67NR hücrelerinden salınma düzeyleri ELISA ile değerlendirildi. MIP2 salımının daha yüksek ve tutarlı olduğunu bildiğimiz 4THM ve 4TBM hücrelerinin spesifik antagonistlerle tedavisinin hücre proliferasyonu üzerine etkileri WST-1 kitiyle değerlendirildi. MIP2 ve KC düzeylerindeki değişiklikler ise ELISA ile ölçüldü. Antagonistlerin sebep olduğu kemokin salımındaki değişikliklerin, PI3K/Akt, Erk1/2 ve p38-MAPK yolları üzerine etkileri ile tutarlı olup olmadığını değerlendirmek için fosforile Akt, Erk ve p38 düzeyleri immunoblot tekniği ile belirlendi.

Bulgular: uPA, C3a ve TSLP hücre tipine göre değişkenlik gösteren düzeylerde tüm hücrelerde ölçülebildi. uPA antagonisti IPR-803, metastatik hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederken kemokin salımını azalttı ve bu etki Akt, Erk ve p38 fosforilasyondaki inhibisyonu ile paralellik gösterdi. Dahası, CXCR2 antagonisti SB225002 ile kombine edildiğinde, uPA reseptör blokajı ile SB225002'nin anti-proliferatif etkinliği artarken sebep olduğu kemokin artışı kompanse edebildi. C3a antagonisti SB290157 ise hücre çoğalmasını sınırlı düzeyde baskıladı. Bununla birlikte C3a'nın, ilk defa çalışıldığı kanser hücrelerinde MIP2 salımını arttırdığı gösterildi. TSLP ise, tüm metastatik hücrelerde yüksek seviyede saptandı. Diğer yandan TSLPR-Ig Akt, Erk ve p38 fosforilasyonunu baskımlarken 4TBM hücrelerin proliferasyonu arttırdı. Kemokin salımı üzerine ise tutarsız etki gösterdi.

Sonuç: uPA-uPAR aksı, antagonizmasının direkt olarak sağlayacağı anti-tümör etkinin yanı sıra, kanser tedavisinde adjuvan ajan olarak umut vaad eden CXCR2 antagonistleri ile uzun süreli tedavide otokrin bir mekanizmayla sebep olabileceği "otoresistans"ın engellenebilmesi için meme kanserinde uygun bir hedef olarak gözükmeaktadır.

Anahtar kelimeler: CXCR2, MIP2, KC, uPA, C3a, TSLP

8. ABSTRACT

Purpose: Today, breast cancer is the most common malignancy with its substantial mortality. Nevertheless, there is no approach that prevents or reverses the metastatic spread, which is held responsible for its mortality. On the other hand, the advanced complexity of "cancer" causes necessity for the approaches in the field of molecular mechanisms in targeted and integrated manners. CXC chemokines and their receptors represent a molecular system that has been proven to play an important role in cancer development and progression. In addition, it has been demonstrated that particularly CXCR2 is expressed by various cancer cells and its activation is crucial for development of metastasis. Therefore, CXCR2 antagonists seem to be promising as anti-cancer therapy and clinical trials are ongoing in that field. It has been demonstrated that KC and MIP2, which are ligands for CXCR2, play substantial roles in tumorigenesis by causing CXCR2 activation. These chemokines have also been found to be involved in metastasis, with released by metastatic mouse breast cancer cell lines in higher levels compared to nonmetastatic ones.

Background: Our previous studies have shown that the CXCR2 antagonist SB225002 provides anti-tumorigenic effect while increases the levels of MIP2 and KC released into the tumor microenvironment. That condition revealed that CXCR2 is an autoreceptor for these ligands and indicated that long term use of antagonist may be cause chemoristance . Moreover, MIP2 release had an increasing kinetics time dependently. This suggests that various autocrine factors released by metastatic cells may be one of the mechanisms responsible for possible chemoresistance by increasing the release of CXCR2 ligands. Additionally, in our preliminary study, it is found that 85 released autocrine factors into the conditioned medium by metastatic cells, which significantly differ compared to nonmetastatic cells. In our study, we evaluated three of these proteins which is known with increasing the release of KC and/or MIP2 or activate the intracellular survival pathways, such as the PI3K /Akt that have substantial roles in release of that chemokines, but have not been examined in cancer cells before, by evaluating the

effects of their antagonists. These proteins are; Plasminogen Activator, Urokinase (uPA), Complement Component 3a (C3a) and Thymic Stromal-Lymphopoietin (TSLP).

Material and Methods: Levels of these proteins released by 4T1, 4THM, 4TBM and 4TLM metastatic murine mammary carcinoma and nonmetastatic 67NR cells were determined by ELISA. The effects of these proteins' specific antagonists on cell proliferation were evaluated with WST-1 kit, on 4THM and 4TBM cells, whose MIP2 release are known as higher and consistent,. Changes in MIP2 and KC levels were measured by ELISA. To evaluate whether the changes in the chemokine release caused by antagonists are consistent with their effects on the PI3K/Akt, Erk1/2 and p38-MAPK pathways, phosphorylated Akt, Erk and p38 levels were determined by immunoblot technique.

Results: uPA, C3a and TSLP were measured in all cells at different levels according to cell type. uPa antagonist IPR-803 decreased chemokine release while suppressing the proliferation of metastatic cells, and this effect was correlated with the inhibition of Akt, Erk and p38 phosphorylation. Moreover, when it was combined with CXCR2 antagonist SB225002, uPA receptor blockade increased the antiproliferative effect of SB225002 and reversed its increasing effect on chemokine levels. C3a antagonist SB290157 exhibited restricted suppression on cell proliferation. Moreover, it is demonstrated that C3a increases MIP2 levels in the cancer cells on that was examined of MIP2 release caused by C3a for the first time. TSLP was determined at a high levels in all metastatic cells. On the other hand, while TSLPR-Ig suppressed Akt, Erk and p38 phosphorylation, increased the proliferation of 4TBM cells. Also it showed an inconsistent effect on chemokine release.

Conclusion: The uPA-uPAR axis appears to be a suitable target in breast cancer in order to prevent "autoresistance", which can be caused by autocrine mechanism in long-term treatment with CXCR2 antagonists, which are promising as adjuvant agents in cancer treatment, in addition to the antitumor effect directly provided by its antagonism.

Keywords: CXCR2, MIP2, KC, uPA, C3a, TSLP

9. KAYNAKLAR

1. Sung, H., et al., *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2021.
2. Scully, O.J., et al., *Breast cancer metastasis*. Cancer Genomics Proteomics, 2012. **9**(5): p. 311-20.
3. Lu, X. and Y. Kang, *Organotropism of breast cancer metastasis*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2007. **12**(2-3): p. 153-62.
4. Edenfield, J., et al., *Metaplastic Breast Cancer: Molecular Typing and Identification of Potential Targeted Therapies at a Single Institution*. Clin Breast Cancer, 2017. **17**(1): p. e1-e10.
5. Ma, F., et al., *Assessing tumor heterogeneity using ctDNA to predict and monitor therapeutic response in metastatic breast cancer*. Int J Cancer, 2020. **146**(5): p. 1359-1368.
6. Lee, K.L., et al., *Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness*. Cancers (Basel), 2019. **11**(9).
7. Sharma, B., et al., *Induction of CXCR2 ligands, stem cell-like phenotype, and metastasis in chemotherapy-resistant breast cancer cells*. Cancer Lett, 2016. **372**(2): p. 192-200.
8. Yang, Y., et al., *Systematic review and meta-analysis of the prognostic value of CXCR2 in solid tumor patients*. Oncotarget, 2017. **8**(65): p. 109740-109751.
9. Schott, A.F., et al., *Phase Ib Pilot Study to Evaluate Reparixin in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with HER-2-Negative Metastatic Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(18): p. 5358-5365.
10. Goldstein, L.J., et al., *A window-of-opportunity trial of the CXCR1/2 inhibitor reparixin in operable HER-2-negative breast cancer*. Breast Cancer Res, 2020. **22**(1): p. 4.

11. Tekamp-Olson, P., et al., *Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 911-9.
12. Bozic, C.R., et al., *Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 6048-57.
13. Bozic, C.R., et al., *The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29355-8.
14. Cacalano, G., et al., *Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog*. Science, 1994. **265**(5172): p. 682-4.
15. Scapini, P., et al., *CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 5034-40.
16. Wei, Z.W., et al., *CXCL1 promotes tumor growth through VEGF pathway activation and is associated with inferior survival in gastric cancer*. Cancer Lett, 2015. **359**(2): p. 335-43.
17. Zou, W. and T.H. Hu, *[Effect of chemokine interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 on the angiogenesis of non-small cell lung cancer]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2007. **32**(4): p. 665-70.
18. Erin, N., et al., *Autocrine control of MIP-2 secretion from metastatic breast cancer cells is mediated by CXCR2: a mechanism for possible resistance to CXCR2 antagonists*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **150**(1): p. 57-69.
19. Erin, N., N. Ogan, and A. Yerlikaya, *Secretomes reveal several novel proteins as well as TGF-beta1 as the top upstream regulator of metastatic process in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **170**(2): p. 235-250.
20. Xu, H., et al., *CXCR2 promotes breast cancer metastasis and chemoresistance via suppression of AKT1 and activation of COX2*. Cancer Lett, 2018. **412**: p. 69-80.

21. Harbeck, N., C. Thomssen, and M. Gnant, *St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion*. Breast Care (Basel), 2013. **8**(2): p. 102-9.
22. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
23. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
24. Debnath, B., et al., *Small molecule inhibitors of CXCR4*. Theranostics, 2013. **3**(1): p. 47-75.
25. O'Hayer, K.M., D.C. Brady, and C.M. Counter, *ELR+ CXC chemokines and oncogenic Ras-mediated tumorigenesis*. Carcinogenesis, 2009. **30**(11): p. 1841-7.
26. Keeley, E.C., B. Mehrad, and R.M. Strieter, *Chemokines as mediators of neovascularization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 1928-36.
27. Arenberg, D.A., et al., *The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(5): p. 554-62.
28. Strieter, R.M., et al., *The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis*. Shock, 1995. **4**(3): p. 155-60.
29. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 155-62.
30. Burger, M., et al., *Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2017-22.
31. Miller, L.J., et al., *Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue*. Anticancer Res, 1998. **18**(1A): p. 77-81.
32. Norgauer, J., B. Metzner, and I. Schraufstatter, *Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells*. J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1132-37.

33. Takamori, H., et al., *Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1*. *Pancreas*, 2000. **21**(1): p. 52-6.
34. Acharyya, S., et al., *A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis*. *Cell*, 2012. **150**(1): p. 165-78.
35. Hu, D., et al., *The expression of chemokine receptors CCR6, CXCR2 and CXCR4 is not organ-specific for distant metastasis in colorectal cancer: a comparative study*. *Histopathology*, 2013. **63**(2): p. 167-73.
36. Richmond, A., J. Yang, and Y. Su, *The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009. **22**(2): p. 175-86.
37. Addison, C.L., et al., *The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 5269-77.
38. Lang, K., et al., *Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(5): p. 673-80.
39. Mestas, J., et al., *The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma*. *J Immunol*, 2005. **175**(8): p. 5351-7.
40. Araki, S., et al., *Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6854-62.
41. Brew, R., et al., *Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro*. *Cytokine*, 2000. **12**(1): p. 78-85.
42. Kamohara, H., et al., *Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor*. *Int J Oncol*, 2007. **31**(3): p. 627-32.
43. Maxwell, P.J., et al., *HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(52): p. 7333-45.

44. Petreaca, M.L., et al., *Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 5014-23.
45. Liu, S., et al., *Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks*. Cancer Res, 2011. **71**(2): p. 614-24.
46. Shen, H., et al., *Critical and opposing roles of the chemokine receptors CXCR2 and CXCR3 in prostate tumor growth*. Prostate, 2006. **66**(16): p. 1721-8.
47. Freund, A., et al., *IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells*. Oncogene, 2003. **22**(2): p. 256-65.
48. Fernando, R.I., et al., *IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5296-306.
49. Charafe-Jauffret, E., et al., *Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1302-13.
50. Sharma, B., et al., *Host Cxcr2-dependent regulation of mammary tumor growth and metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2015. **32**(1): p. 65-72.
51. Kamali-Sarvestani, E., M.R. Aliparasti, and S. Atefi, *Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer*. Neoplasma, 2007. **54**(6): p. 484-9.
52. Ahuja, S.K. and P.M. Murphy, *The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20545-50.
53. Cheng, Y., et al., *Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019. **1871**(2): p. 289-312.

54. Jin, K., N.B. Pandey, and A.S. Popel, *Crosstalk between stromal components and tumor cells of TNBC via secreted factors enhances tumor growth and metastasis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(36): p. 60210-60222.
55. Britschgi, A., et al., *JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(6): p. 796-811.
56. Kollmar, O., et al., *Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis*. *Eur J Surg Oncol*, 2007. **33**(6): p. 803-11.
57. DuPre, S.A., D. Redelman, and K.W. Hunter, Jr., *The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci*. *Int J Exp Pathol*, 2007. **88**(5): p. 351-60.
58. Ginestier, C., et al., *CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(2): p. 485-97.
59. Ning, Y., et al., *The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(6): p. 1353-64.
60. Singh, S., et al., *Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(7): p. 2380-6.
61. Steele, C.W., et al., *CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *Cancer Cell*, 2016. **29**(6): p. 832-845.
62. Guo, F., et al., *Insights on CXC chemokine receptor 2 in breast cancer: An emerging target for oncotherapy*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(6): p. 5699-5708.
63. Sharma, B., et al., *Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(5): p. 799-808.

64. Brandolini, L., et al., *Targeting CXCR1 on breast cancer stem cells: signaling pathways and clinical application modelling*. Oncotarget, 2015. **6**(41): p. 43375-94.
65. Singh, J.K., et al., *Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(3): p. 643-56.
66. Uddin, M.M., et al., *Proteasome inhibition induces IKK-dependent interleukin-8 expression in triple negative breast cancer cells: Opportunity for combination therapy*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0201858.
67. Matsuo, Y., et al., *CXC-chemokine/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2009. **125**(5): p. 1027-37.
68. Sueoka, H., et al., *Blockage of CXCR2 suppresses tumor growth of intrahepatic cholangiocellular carcinoma*. Surgery, 2014. **155**(4): p. 640-9.
69. Devapatla, B., A. Sharma, and S. Woo, *CXCR2 Inhibition Combined with Sorafenib Improved Antitumor and Antiangiogenic Response in Preclinical Models of Ovarian Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0139237.
70. Kufareva, I., C.L. Salanga, and T.M. Handel, *Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies*. Immunol Cell Biol, 2015. **93**(4): p. 372-83.
71. Liu, X., et al., *G31P, an antagonist against CXC chemokine receptors 1 and 2, inhibits growth of human prostate cancer cells in nude mice*. Tohoku J Exp Med, 2012. **228**(2): p. 147-56.
72. Ha, H., B. Debnath, and N. Neamati, *Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases*. Theranostics, 2017. **7**(6): p. 1543-1588.
73. Goldstein, L.J., et al., *Correction to: A window-of-opportunity trial of the CXCR1/2 inhibitor reparixin in operable HER-2-negative breast cancer*. Breast Cancer Res, 2020. **22**(1): p. 52.

74. White, J.R., et al., *Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10095-8.
75. Du, M., et al., *SB225002 promotes mitotic catastrophe in chemo-sensitive and -resistant ovarian cancer cells independent of p53 status in vitro*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54572.
76. Damaj, B.B., et al., *Physical association of Gi2alpha with interleukin-8 receptors*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12783-9.
77. Kobilka, B.K., *G protein coupled receptor structure and activation*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 794-807.
78. Cohen-Hillel, E., et al., *CXCL8-induced FAK phosphorylation via CXCR1 and CXCR2: cytoskeleton- and integrin-related mechanisms converge with FAK regulatory pathways in a receptor-specific manner*. Cytokine, 2006. **33**(1): p. 1-16.
79. Schraufstatter, I.U., J. Chung, and M. Burger, *IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. L1094-103.
80. Oeckinghaus, A. and S. Ghosh, *The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(4): p. a000034.
81. Dong, G., et al., *The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(14): p. 3495-504.
82. Giri, D.K. and B.B. Aggarwal, *Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 14008-14.
83. Ondrey, F.G., et al., *Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines*. Mol Carcinog, 1999. **26**(2): p. 119-29.

84. Blackwell, T.S. and J.W. Christman, *The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(1): p. 3-9.
85. Wang, D. and A. Richmond, *Nuclear factor-kappa B activation by the CXCL chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3650-9.
86. Dong, Y.L., et al., *CXCR2-driven ovarian cancer progression involves upregulation of proinflammatory chemokines by potentiating NF-kappaB activation via EGFR-transactivated Akt signaling*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83789.
87. Knall, C., G.S. Worthen, and G.L. Johnson, *Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3052-7.
88. Cheng, G.Z., et al., *Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery*. Curr Cancer Drug Targets, 2008. **8**(1): p. 2-6.
89. Maroulakou, I.G., et al., *Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 167-77.
90. Liu, H., et al., *Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4134-9.
91. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 259-68.
92. Cho, S.Y. and R.L. Klemke, *Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix*. J Cell Biol, 2000. **149**(1): p. 223-36.
93. Ma, Z., et al., *Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase*

and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 18): p. 3387-96.

94. Zhang, H., et al., *CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer.* Oncogene, 2017. **36**(15): p. 2095-2104.

95. Hoffmann, E., et al., *Multiple control of interleukin-8 gene expression.* J Leukoc Biol, 2002. **72**(5): p. 847-55.

96. Tang, H., et al., *YKL-40 induces IL-8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF-kappaB pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration.* J Immunol, 2013. **190**(1): p. 438-46.

97. Dunn, K.L., et al., *The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling.* Biochem Cell Biol, 2005. **83**(1): p. 1-14.

98. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.* Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.

99. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer.* Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-90.

100. Liu, D., et al., *EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma.* Cancer Cell, 2002. **1**(5): p. 445-57.

101. Sun, Y., et al., *Inhibitory effect of emodin on migration, invasion and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro and in vivo.* Oncol Rep, 2015. **33**(1): p. 338-46.

102. Wang, Y., et al., *Autocrine Complement Inhibits IL10-Dependent T-cell-Mediated Antitumor Immunity to Promote Tumor Progression.* Cancer Discov, 2016. **6**(9): p. 1022-35.

103. Burger, M., et al., *KSHV-GPCR and CXCR2 transforming capacity and angiogenic responses are mediated through a JAK2-STAT3-dependent pathway.* Oncogene, 2005. **24**(12): p. 2067-75.

104. Juffermans, N.P., et al., *Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 888-94.
105. Long, X., et al., *IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review)*. Int J Oncol, 2016. **48**(1): p. 5-12.
106. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6735-41.
107. Xia, M. and B.T. Hyman, *GROalpha/KC, a chemokine receptor CXCR2 ligand, can be a potent trigger for neuronal ERK1/2 and PI-3 kinase pathways and for tau hyperphosphorylation-a role in Alzheimer's disease?* J Neuroimmunol, 2002. **122**(1-2): p. 55-64.
108. Lijnen, H.R., *Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(1): p. 92-8.
109. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 564259.
110. Duffy, M.J., *The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(1): p. 39-49.
111. Ploug, M. and V. Ellis, *Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins*. FEBS Lett, 1994. **349**(2): p. 163-8.
112. Blasi, F. and P. Carmeliet, *uPAR: a versatile signalling orchestrator*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 932-43.
113. Jo, M., et al., *Dynamic assembly of the urokinase-type plasminogen activator signaling receptor complex determines the mitogenic activity of urokinase-type plasminogen activator*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17449-57.
114. D'Alessio, S. and F. Blasi, *The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 4575-87.

115. Kiyan, J., et al., *Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta*. EMBO J, 2005. **24**(10): p. 1787-97.
116. Nykjaer, A., et al., *Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase.plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14543-6.
117. Sidenius, N., et al., *Urokinase regulates vitronectin binding by controlling urokinase receptor oligomerization*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27982-90.
118. Aguirre Ghiso, J.A., *Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo*. Oncogene, 2002. **21**(16): p. 2513-24.
119. Aguirre-Ghiso, J.A., et al., *Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 863-79.
120. Gouri, A., et al., *Plasminogen Activator System and Breast Cancer: Potential Role in Therapy Decision Making and Precision Medicine*. Biomark Insights, 2016. **11**: p. 105-11.
121. Kjoller, L. and A. Hall, *Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin*. J Cell Biol, 2001. **152**(6): p. 1145-57.
122. Vial, E., E. Sahai, and C.J. Marshall, *ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility*. Cancer Cell, 2003. **4**(1): p. 67-79.
123. Tarighi, P., et al., *uPAR peptide antagonist alters regulation of MAP kinases and Bcl-2 family members in favor of apoptosis in MDA-MB-231 cell line*. Res Pharm Sci, 2015. **10**(3): p. 200-5.
124. Schmitt, M., et al., *Cancer therapy trials employing level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1*. Expert Rev Mol Diagn, 2011. **11**(6): p. 617-34.
125. Rifkin, D.B., et al., *Plasminogen/plasminogen activator and growth factor activation*. Ciba Found Symp, 1997. **212**: p. 105-15; discussion 116-8.

126. Kirchheimer, J.C., et al., *Proliferation of a human epidermal tumor cell line stimulated by urokinase*. FASEB J, 1987. **1**(2): p. 125-8.
127. Whitelock, J.M., et al., *The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10079-86.
128. Deng, G., et al., *Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?* J Cell Biol, 1996. **134**(6): p. 1563-71.
129. Duffy, M.J., et al., *uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(4): p. 428.
130. Ciccolini, J., *Editorial: targeted therapy, targeted dosing and targeted delivery in oncology: where do we stand?* Curr Top Med Chem, 2012. **12**(15): p. 1638.
131. Harbeck, N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer*. Thromb Haemost, 2004. **91**(3): p. 450-6.
132. Schmitt, M., et al., *Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1*. Expert Rev Mol Diagn, 2010. **10**(8): p. 1051-67.
133. Heinemann, V., et al., *Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(4): p. 766-70.
134. Lee, S.R., et al., *Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators*. Neurosci Lett, 2007. **417**(1): p. 1-5.
135. Verschoor, A., et al., *Old dogs-new tricks: immunoregulatory properties of C3 and C5 cleavage fragments*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 112-126.

136. Khan, M.A., A.M. Assiri, and D.C. Broering, *Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression*. J Biomed Sci, 2015. **22**: p. 58.
137. Canales, N.A., et al., *A1BG and C3 are overexpressed in patients with cervical intraepithelial neoplasia III*. Oncol Lett, 2014. **8**(2): p. 939-947.
138. Markiewski, M.M., et al., *Modulation of the antitumor immune response by complement*. Nat Immunol, 2008. **9**(11): p. 1225-35.
139. Cho, M.S., et al., *Autocrine effects of tumor-derived complement*. Cell Rep, 2014. **6**(6): p. 1085-1095.
140. Nunez-Cruz, S., et al., *Genetic and pharmacologic inhibition of complement impairs endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization*. Neoplasia, 2012. **14**(11): p. 994-1004.
141. Lin, K., et al., *Complement component 3 is a prognostic factor of nonsmall cell lung cancer*. Mol Med Rep, 2014. **10**(2): p. 811-7.
142. Bouwens, T.A., et al., *Complement activation in Glioblastoma multiforme pathophysiology: evidence from serum levels and presence of complement activation products in tumor tissue*. J Neuroimmunol, 2015. **278**: p. 271-6.
143. Lee, D.K., et al., *Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **86**(1-2): p. 13-22.
144. Kwak, J.W., et al., *Complement Activation via a C3a Receptor Pathway Alters CD4(+) T Lymphocytes and Mediates Lung Cancer Progression*. Cancer Res, 2018. **78**(1): p. 143-156.
145. Strainic, M.G., et al., *Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(2): p. 162-71.
146. Cho, M.S., et al., *Complement Component 3 Is Regulated by TWIST1 and Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition*. J Immunol, 2016. **196**(3): p. 1412-8.

147. Nabizadeh, J.A., et al., *The Complement C3a Receptor Contributes to Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Neutrophil and CD4⁺ T Cell Responses*. J Immunol, 2016. **196**(11): p. 4783-92.
148. Zha, H., et al., *Intracellular Activation of Complement C3 Leads to PD-L1 Antibody Treatment Resistance by Modulating Tumor-Associated Macrophages*. Cancer Immunol Res, 2019. **7**(2): p. 193-207.
149. Linders, J., et al., *Complement Component 3 Is Required for Tissue Damage, Neutrophil Infiltration, and Ensuring NET Formation in Acute Pancreatitis*. Eur Surg Res, 2021: p. 1-14.
150. Thurman, J.M., et al., *C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1819-28.
151. Ziegler, S.F., et al., *The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP)*. Adv Pharmacol, 2013. **66**: p. 129-55.
152. Sebastian, K., et al., *Signal transduction around thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in atopic asthma*. Cell Commun Signal, 2008. **6**: p. 5.
153. Olkhanud, P.B., et al., *Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5656-62.
154. Pedroza-Gonzalez, A., et al., *Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 479-90.
155. Kashiwagi, M., et al., *Direct control of regulatory T cells by keratinocytes*. Nat Immunol, 2017. **18**(3): p. 334-343.
156. Roan, F., et al., *The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(6): p. 877-86.
157. Liao, B., et al., *Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. Allergy, 2015. **70**(9): p. 1169-80.

158. Miazgowicz, M.M., et al., *Respiratory syncytial virus induces functional thymic stromal lymphopoietin receptor in airway epithelial cells*. J Inflamm Res, 2013. **6**: p. 53-61.
159. Yue, W., et al., *Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) inhibits human colon tumor growth by promoting apoptosis of tumor cells*. Oncotarget, 2016. **7**(13): p. 16840-54.
160. De Monte, L., et al., *Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 469-78.
161. Erdmann, R.B., et al., *Lack of functional TSLP receptors mitigates Th2 polarization and the establishment and growth of 4T1 primary breast tumours but has different effects on tumour quantities in the lung and brain*. Scand J Immunol, 2013. **78**(5): p. 408-18.
162. Ragonnaud, E., et al., *Tumor-Derived Thymic Stromal Lymphopoietin Expands Bone Marrow B-cell Precursors in Circulation to Support Metastasis*. Cancer Res, 2019. **79**(22): p. 5826-5838.
163. Semlali, A., et al., *Expression and allele frequencies of Thymic stromal lymphopoietin are a key factor of breast cancer risk*. Mol Genet Genomic Med, 2019. **7**(8): p. e813.
164. Choi, J., et al., *The associations between immunity-related genes and breast cancer prognosis in Korean women*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e103593.
165. Wong, C.K., et al., *Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **43**(3): p. 305-15.
166. Dong, J., et al., *Inflammatory cytokine TSLP stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via a TSLPR-dependent PI3K/Akt signaling pathway*. Cell Physiol Biochem, 2015. **35**(1): p. 160-74.
167. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.

168. Shi, Y., et al., *Prognostic and predictive values of pERK1/2 and pAkt-1 expression in non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant chemotherapy*. Tumour Biol, 2011. **32**(2): p. 381-90.
169. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. Cancer Res, 1992. **52**(6): p. 1399-405.
170. Erin, N., et al., *Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart*. Anticancer Res, 2004. **24**(2B): p. 1003-9.
171. Erin, N., et al., *Altered gene expression in breast cancer liver metastases*. Int J Cancer, 2009. **124**(7): p. 1503-16.
172. Erin, N., et al., *Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **139**(3): p. 677-89.
173. Mani, T., et al., *Small-molecule inhibition of the uPAR.uPA interaction: synthesis, biochemical, cellular, in vivo pharmacokinetics and efficacy studies in breast cancer metastasis*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(7): p. 2145-55.
174. Khanna, M., et al., *Targeting multiple conformations leads to small molecule inhibitors of the uPAR.uPA protein-protein interaction that block cancer cell invasion*. ACS Chem Biol, 2011. **6**(11): p. 1232-43.
175. Ames, R.S., et al., *Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6341-8.
176. Smith, S.G., et al., *Thymic stromal lymphopoietin and IL-33 modulate migration of hematopoietic progenitor cells in patients with allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(6): p. 1594-602.
177. Singh, S., A. Sadanandam, and R.K. Singh, *Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 453-67.
178. Bieche, I., et al., *CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(4): p. 1039-52.

179. Su, S.C., et al., *The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(5): p. 551-66.
180. Almholt, K., et al., *Reduced metastasis of transgenic mammary cancer in urokinase-deficient mice*. Int J Cancer, 2005. **113**(4): p. 525-32.
181. Andreasen, P.A., et al., *The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review*. Int J Cancer, 1997. **72**(1): p. 1-22.
182. Choong, P.F. and A.P. Nadesapillai, *Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis*. Clin Orthop Relat Res, 2003(415 Suppl): p. S46-58.
183. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 9-34.
184. Merchan, J.R., et al., *Protease activity of urokinase and tumor progression in a syngeneic mammary cancer model*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(11): p. 756-64.
185. Sugioka, K., et al., *The roles of urokinase-type plasminogen activator in leukocyte infiltration and inflammatory responses in mice corneas treated with lipopolysaccharide*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(8): p. 5338-50.
186. Wang, X.Q., et al., *Involvement of the urokinase kringle domain in lipopolysaccharide-induced acute lung injury*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5550-7.
187. Jing, Y., et al., *Role of plasminogen activator inhibitor-1 in urokinase's paradoxical in vivo tumor suppressing or promoting effects*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(10): p. 1271-81.
188. Stephens, R.W., et al., *The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52**(1-3): p. 99-111.
189. Shu, C., et al., *C3a-C3aR signaling promotes breast cancer lung metastasis via modulating carcinoma associated fibroblasts*. J Exp Clin Cancer Res, 2020. **39**(1): p. 11.

190. Jacob, A., et al., *C3aR inhibition reduces neurodegeneration in experimental lupus*. *Lupus*, 2010. **19**(1): p. 73-82.
191. Kuan, E.L. and S.F. Ziegler, *A tumor-myeloid cell axis, mediated via the cytokines IL-1alpha and TSLP, promotes the progression of breast cancer*. *Nat Immunol*, 2018. **19**(4): p. 366-374.
192. Barooei, R., et al., *Evaluation of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and its correlation with lymphatic metastasis in human gastric cancer*. *Med Oncol*, 2015. **32**(8): p. 217.
193. Nakajima, S., et al., *Induction of thymic stromal lymphopoietin in mesenchymal stem cells by interaction with myeloma cells*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(11): p. 2605-13.
194. Vetter, T., et al., *Blockade of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor inhibits TSLP-driven proliferation and signalling in lymphoblasts from a subset of B-precursor ALL patients*. *Leuk Res*, 2016. **40**: p. 38-43.
195. Xie, F., et al., *Cervical carcinoma cells stimulate the angiogenesis through TSLP promoting growth and activation of vascular endothelial cells*. *Am J Reprod Immunol*, 2013. **70**(1): p. 69-79.
196. Ghirelli, C., et al., *No evidence for TSLP pathway activity in human breast cancer*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(8): p. e1178438.
197. Demehri, S., et al., *Thymic stromal lymphopoietin blocks early stages of breast carcinogenesis*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(4): p. 1458-70.
198. Yu, H., et al., *[The expression of thymic stromal lymphopoietin in primary tumors of breast cancer is associated with prognosis]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2015. **31**(2): p. 239-43, 247.
199. Demehri, S., et al., *Elevated epidermal thymic stromal lymphopoietin levels establish an antitumor environment in the skin*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(4): p. 494-505.
200. Di Piazza, M., et al., *Loss of cutaneous TSLP-dependent immune responses skews the balance of inflammation from tumor protective to tumor promoting*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(4): p. 479-93.

201. Acosta, J.C. and J. Gil, *A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer?* Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2167-70.
202. Acosta, J.C., et al., *Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence.* Cell, 2008. **133**(6): p. 1006-18.
203. Collado, M., et al., *Tumour biology: senescence in premalignant tumours.* Nature, 2005. **436**(7051): p. 642.
204. Kuilman, T., et al., *Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network.* Cell, 2008. **133**(6): p. 1019-31.
205. Shelton, D.N., et al., *Microarray analysis of replicative senescence.* Curr Biol, 1999. **9**(17): p. 939-45.
206. Kortlever, R.M., P.J. Higgins, and R. Bernards, *Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 877-84.
207. Hirose, K., et al., *Chemokine gene transfection into tumour cells reduced tumorigenicity in nude mice in association with neutrophilic infiltration.* Br J Cancer, 1995. **72**(3): p. 708-14.
208. Nair, P., et al., *Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial.* Clin Exp Allergy, 2012. **42**(7): p. 1097-103.

10. EK 1

CXC kemokinlerin ELR (glutamat-lösin-anjinin sekansı) motiflerine göre sınıflandırılması.

Ligand	Also known as	Receptor	Function
CXC (α subfamily) chemokines			
ELR⁺ CXC chemokines			
CXCL1	Growth-regulated protein- α (GRO α), Gro-oncogene 1 (GRO1), neutrophil-activating protein-3, and keratinocyte-derived chemokine	CXCR1, CXCR2, and <i>DARC</i>	I
CXCL2	Macrophage inflammatory protein-2 α (MIP-2 α), Gro- β , and Gro2	CXCR2	I
CXCL3	MIP-2 β , Gro3, and GRO γ	CXCR2	I
CXCL5	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78	CXCR2 and <i>DARC</i>	I
CXCL6	Granulocyte chemotactic protein-2	CXCR1, CXCR2 and <i>DARC</i>	I
CXCL7		CXCR2	I
CXCL8	Interleukin-8 (IL-8)	CXCR1, CXCR2 and <i>DARC</i>	I
CXCL15a	Lungkine	CXCR2	U

Non-ELR-CXC chemokines			
CXCL4	Platelet factor 4 (PF4)	CXCR3Bb	U
CXCL9	Monokine induced by interferon- γ	CXCR3 and CXCR3B	I
CXCL10	Interferon (IFN)- γ -induced protein 10 (IP-10) and small inducible cytokine B10	CXCR3 and CXCR3B	I
CXCL11	IP-9, interferon-inducible T-cell α -chemoattractant	CXCR3, CXCR3B, CXCR7, and DARC	I
CXCL12	Stromal cell-derived factor-1 (SDF1)	CXCR4 and CXCR7	H
CXCL13	B-lymphocyte chemoattractant	CXCR5 and CCXCKR	H
CXCL14	Breast- and kidney-expressed chemokine		I
CXCL16		CXCR6	I
CXCL17	Dendritic and monocyte chemokine-like protein, vascular endothelial growth factor (VEGF)-coregulated chemokine-1	Not known	U

Ligand	Also known as	Receptor	Function
CC (β subfamily)			
CCL1	Inflammatory cytokine I-309, TCA3, and P500	CCR8	I
CCL2	Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and small inducible cytokine A2	CCR2, <i>DARC</i> , and <i>D6</i>	I
CCL3	MIP-1 α	CCR1 and CCR5	I
CCL3L1c		CCR5 and <i>D6</i>	I
CCL3L3c			I
CCL4	MIP-1 β	CCR5 and <i>D6</i>	I
CCL4L1d		CCR5	I
CCL4L2d			I
CCL5	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)	CCR1, CCR3, CCR5, <i>DARC</i> , and <i>D6</i>	I
CCL6a	Macrophage inflammatory protein-related protein-1 (MRP-1)	CCR1	I
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3, <i>DARC</i> , and <i>D6</i>	I
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, <i>D6</i>	I

CCL9/ CCL10a	MIP-1 γ , MRP-2	CCR1	I
Ligand	Also known as	Receptor	Function
CC (β subfamily) - continuation			
CCL12a	MCP-5	CCR2	
CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, <i>DARC</i> , and <i>D6</i>	I
CCL14e	Hemofiltrate CC chemokine-1 (HCC-1)	CCR1, CCR5, <i>DARC</i> , and <i>D6</i>	H
CCL15e	Leukotactin-1, MIP-5, and HCC-2	CCR1 and CCR3	H
CCL16	Monotactin-1, liver-expressed chemokine, and HCC-4	CCR1, CCR2, CCR5, and CCR8	H
CCL17	Thymus- and activation-regulated chemokine	CCR4, <i>DARC</i> , and <i>D6</i>	D

CCL18e	Pulmonary- and activation-regulated chemokine, MIP-4, alternative macrophage activation-associated CC chemokine	Not known	H
CCL19	MIP-3 β and EB11 ligand chemokine	CCR7 and <i>CCXCKR</i>	H
CCL20	MIP-3 α and liver activation-regulated chemokine	CCR6	D
CCL21	Secondary lymphoid tissue chemokine	CCR7 and <i>CCXCKR</i>	D
CCL22	Macrophage-derived chemokine	CCR4 and <i>D6</i>	D
CCL23e	MIP-3 and myeloid progenitor inhibitory factor-1 (MPIF-1)	CCR1	I
CCL24	Eotaxin-2 and MPIF-2	CCR3	I
CCL25	Thymus-expressed chemokine	CCR9 and <i>CCXCKR</i>	H
CCL26	Eotaxin3 and thymic stroma chemokine1	CCR3	I
CCL27	Cutaneous T-cell-attracting chemokine, IL-11 receptor α -locus chemokine, and embryonic stem cell chemokine	CCR10	H
CCL28	Mucosae-associated epithelial chemokine	CCR10 and CCR3	U

XC (γ subfamily)			
XCL1	Lymphotactin- α	XCR1	D
XCL2	Lymphotactin- β	XCR1	D
CX3C (δ subfamily)			
CX3CL1	Fractalkine and neurotactin	CX3CR1	I

D, dual fonksiyon (homeostatik ve inflamatuvar); **H**, homeostatik; **I**, inflamatuvar; **U**, bilinmiyor. Atipik kemokin reseptörleri italik olarak verilmiştir.

a, sadece farede tanımlanmış; **b**, CXCR3'nin alternatif 'splice'ı; **c**, CCL3 paraloğu; **d**, CCL4 paraloğu; **e**, sadece insanda tanımlanmış (17201934; Zlotnik, 2006 #238).