

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

**METASTATİK MEME KANSERİNDE CXC KEMOKİN
RESEPTÖR 2 ANTAGONİSTLERİNİN ANTI-TÜMÖRAL
ETKİLERİNE KARŞI DİRENÇTE PI3K VE PKC ALT
TİPLERİNİN ETKİLERİ**

Esra NİZAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018-ANTALYA

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

**METASTATİK MEME KANSERİNDE CXC KEMOKİN
RESEPTÖR 2 ANTAGONİSTLERİNİN ANTI-TÜMÖRAL
ETKİLERİNE KARŞI DİRENÇTE PI3K VE PKC ALT
TIPLERİNİN ETKİLERİ**

Esra NİZAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nuray ERİN

Bu tez Tübitak (1001 Proje no: 115Z286) ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje no: TYL-2017-2580) ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

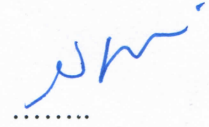
2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İmmünofarmakoloji Programında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 14 / 12 / 2018

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuray ERİN
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Coşkun USTA
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Banu ÖZTÜRK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



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

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Öğrencinin

Esra NİZAM

İmza

Tez Danışmanı

Nuray ERİN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benimle tecrübelerini, bilgilerini ve fikirlerini paylaşan, çalışmam için bana fırsat üreten değerli danışmam hocam sayın Prof.Dr. Nuray ERİN'e

Tüm manevi destekleri için, pozitif enerjileri ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Şule KALE, Müslime TANRISEVEN ve Özlem AKDENİZ'e

Desteklerini her zaman hissettiğim sayın hocalarım Prof.Dr. Azmi YERLİKAYA, Prof.Dr. Sadi ÖZDEM ve Prof.Dr. Coşkun USTA'ya

Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Hayatımın her aşamasında sevgi, güven, emek, anlayış ve destekleri için ilk öğretmenlerim sevgili annem Gülnaz TAVŞAN ve sevgili babam Durali TAVŞAN'a, bir kardeşten çok daha fazlası olan kardeşim Samet TAVŞAN'a

En iyi arkadaşım, anne yarım, canım teyzem Nurcan ŞEN'e

Karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmem konusunda beni güçlendiren, sevgi ve desteğiyle her adımında yanımda yürüyen sevgili eşim Cihan NİZAM'a,

Benimle her zaman gurur duyan aileme ve tüm dostlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: CXC kemokin reseptör 2 (CXCR2), birçok kanser hücresinde eksprese edilir ve aktivasyonu metastaz gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle CXCR2 antagonistlerinin kanser tedavisinde kullanımı umut vadetmektedir. CXCR2 ligandlarından MIP-2 ve KC nötrofil başta olmak üzere immünespresif hücrelerin infiltrasyonuna neden olarak anjiyogenez ve tümör progresyonunda rol oynamaktadır. Yayınlanan çalışmamızda CXCR2 antagonisti SB225002 ile anti-proliferatif etki sağlanmış ancak salınan MIP-2 miktarında artış tespit edilmiştir. Bu durum CXCR2'nin MIP-2 için otoresepör olduğunu ve kronik antagonist tedavisi ile direnç gelişebileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda da dirence neden olan olası mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: PI3K β ve α alttiplerine spesifik inhibitörlerin (TGX221, GSK2636771 ve BYL719) ve PKC ϵ aktivatörünün (FR236924) tek başına ve CXCR2 antagonisti ile birlikte kullanımının beyin (4TBM) ve kalp (4THM) metastatik meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında üzerine etkileri WST-1 yöntemi ile belirlendi. MIP-2 ve KC salınımlarındaki değişiklikler ELİSA yöntemi ile AKT, ERK ve P38 proteinlerin fosforilasyonlarındaki etkiler western blot yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: PI3K α inhibitörü konsantrasyona bağımlı olarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskıladı ve CXCR2 antagonistine bağımlı MIP-2 ve KC artışını belirgin şekilde azalttı. AKT fosforilasyonu PI3K α inhibisyonu ile tamamen baskılandı. PI3K β inhibisyonunun belirgin etkisi gözlenmedi. PKC ϵ aktivatörü 10 μ M'da proliferasyonu baskıladığı gibi SB225002'nin anti-proliferatif etkisini de arttırdı. PKC ϵ aktivatörü, MIP-2 ve KC salınımlarındaki artışı 4TBM'de kısmen baskıladı. Ayrıca SB225002'nin pAKT ve pP38 üzerindeki baskılayıcı etkisini PKC ϵ aktivatörü kısmen geri çevirdi.

Sonuç: Bu sonuçlar metastatik meme kanserinde CXCR2 inhibisyonuna bağımlı MIP-2 artışında PI3K α /AKT yolağının rol oynayabileceğini ve spesifik inhibitör ile birlikte kullanımının anti-ümörojenik etkiyi arttırabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: CXCR2, MIP2, KC, PI3K α , metastatik meme kanseri

ABSTRACT

Objective: CXC chemokines and its receptors play an important role in the development of cancer. CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) is expressed by many cancer cells and its activation plays a role in metastasis. Therefore, CXCR2 antagonists in treatment of cancer is promising. MIP-2 (CXCL2) and KC (CXCL1), two important ligands of CXCR2 play a role in angiogenesis and tumor progression by causing infiltration of immunosuppressive cells, especially neutrophils. In our previous study we found that, CXCR2 antagonist SB225002 inhibits proliferation of breast cancer cells but also increases MIP-2 was detected. This suggested that CXCR2 is an autoreceptor for its ligands and that resistance can develop with chronic antagonist treatment. The aim of this study was to investigate the possible mechanisms of increased chemokine secretion which may lead resistance to treatment.

Method: The effects of PI3K β and α subtypes-specific inhibitors (TGX221, GSK2636771 and BYL719) and PKC ϵ activator (FR236924) alone and in combination with the CXCR2 antagonist were determined on the proliferation of brain (4TBM) and heart (4THM) metastatic breast cancer cells using the WST-1 method. Changes in MIP-2 and KC secretions were determined by ELISA method. The effects on phosphorylation of AKT, ERK and P38 proteins were investigated by western blot method.

Results: PI3K α inhibitor showed strong antitumorogenic effect. It significantly reduced the increase in MIP-2 and KC release due to CXCR2 antagonist. AKT phosphorylation was completely suppressed by PI3K α inhibition. No significant effect of PI3K β inhibition was observed. The relatively high concentration of PKC ϵ activator (10 μ M) suppressed the proliferation of cancer cells and partially inhibited the increase in MIP-2 and KC release in 4TBM.

Conclusion: These results demonstrated for the first time that the PI3K α / AKT pathway may play a role in the possible resistance to the use of chronic CXCR2 antagonist in metastatic breast cancer. Hence the combination of CXCR2 inhibitors with specific PI3K α inhibitor may increase the anti-tumorogenic effects of CXCR2 antagonists.

Key words: CXCR2, MIP2, KC, PI3K α , metastatic breast cancer

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemokinler	3
2.1.1. CXC Kemokinler	4
2.1.2. Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP-2)	6
2.1.3. Keratinosit Kaynaklı Kemokin (KC)	7
2.1.4. Kemokin Reseptörleri	8
2.1.5. CXC Kemokin Reseptör 2	10
2.1.6. CXCR2, MIP-2, KC ve Kanser	11
2.1.7. CXCR2 Antagonistleri	13
2.1.8. CXCR2 Antagonistlerine Direnç	14
2.2. Fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) Yolağı ve Kanser	17
2.2.1. PI3K İnhibitörleri	19
2.2.2. PI3K α İnhibitörü BYL719	19
2.2.3. PI3K β İnhibitörleri GSK2636771 ve TGX221	21
2.3. Protein Kinaz C (PKC)	23
2.3.1. PKC Epsilon (PKC ϵ)	24
2.3.2. PKC ϵ Aktivatörü (FR236924)	24
2.4. Kanser	26
2.4.1. Metastaz	27
2.4.2. Meme Kanseri	29

3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Hücre Kültürü	30
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Takibi	30
3.1.2. Hücrelerin Sayımı	30
3.1.3. Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi)	31
3.1.4. Hücre sayısını Belirlemek için Standart Hazırlanması	31
3.2. Kullanılan Ajanların Stok Solüsyonlarının ve Tedavi Konsatrasyonlarının Hazırlanması	32
3.3. Elisa	33
3.3.1. Örneklerin Hazırlanması	33
3.3.2. Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffer saline, Pbs)	33
3.3.3. Elisa Yöntem Protokolleri	33
3.4. Western Blot	37
3.4.1. Hücre Lizatının Hazırlanması	37
3.4.2. Western Blot Protokolü	38
3.5. Genel İstatiksel Analizler	42
3.6. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler, kimyasallar, kitler ve cihazlar	42
3.6.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	42
3.6.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	43
3.6.3. Kullanılan aletler ve gereçler	44
4. BULGULAR	46
4.1. PI3K α inhibitörü BYL719'un Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	46
4.2. PI3K α İnhibitörü BYL719'un MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi	47
4.3. PI3K α İnhibitörü BYL719'un KC Salımı Üzerine Etkisi	48

4.4.	PI3K β İnhibitörü GSK2636771'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	49
4.5.	PI3K β İnhibitörü GSK2636771'in MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi	50
4.6.	PI3K β İnhibitörü GSK2636771'in KC Salımı Üzerine Etkisi	51
4.7.	PI3K β İnhibitörü TGX221'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	52
4.8.	PI3K β İnhibitörü TGX221'in MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi	53
4.9.	PI3K β İnhibitörü TGX221'in KC Salımı Üzerine Etkileri	54
4.10.	PI3K α İnhibitörü BYL719'un CXCR2 Antagonisti ile Birlikte Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	55
4.11.	PI3K α İnhibitörü BYL719'un CXCR2 Antagonisti ile Birlikte MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi	56
4.12.	PI3K α İnhibitörü BYL719'un CXCR2 Antagonisti ile Birlikte KC (CXCL1) Salımı Üzerine Etkisi	57
4.13.	Hücre İçi Sinyal Proteinleri Üzerine SB225002 ve BYL719'un Etkileri	58
4.13.1.	PI3K α inhibitörü BYL719 ve CXCR2 antagonisti SB225002'nin tek ve birlikte kullanımının AKT fosforilasyonu üzerine etkileri	58
4.13.2.	PI3K α İnhibitörü BYL719 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	59
4.13.3.	PI3K α İnhibitörü BYL719 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının P38 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	60

4.14.	PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	61
4.15.	PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının MIP-2 Salımı Üzerine Etkileri	62
4.16.	PKC ϵ aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının KC Salımı Üzerine Etkileri	63
4.17.	Hücre İçi Sinyal Proteinleri Üzerine SB225002 ve FR236924'ün Etkileri	64
4.17.1.	PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	64
4.17.2.	PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	65
4.17.3.	PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının P38 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri	66
5. TARTIŞMA		67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER		72
KAYNAKLAR		75
ÖZGEÇMİŞ		91

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	CXC kemokinler	6
Tablo 3.1.	Poliakrilamid jelin hazırlanması	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kemokin ailesi ve yapıları	4
Şekil 2.2.	Kemokin reseptörünün yapısı	10
Şekil 2.3.	SB225002'nin kimyasal yapısı	14
Şekil 2.4.	CXCL/CXCR2 aksı ile kemoterapiye direncin bir mekanizması	15
Şekil 2.5.	MIP-2 salımında rol oynayan mekanizmalar	16
Şekil 2.6.	PI3K/AKT yolunun işlevleri	18
Şekil 2.7.	BYL719'un yapısı	21
Şekil 2.8.	GSK2636771'in yapısı	22
Şekil 2.9.	TGX221'in yapısı	22
Şekil 2.10.	FR236924'ün yapısı	25
Şekil 2.11.	Kanser tedavisinde hedeflenen malin hücrelerin temel özellikleri	27
Şekil 2.12.	Metastaz aşamaları	28
Şekil 2.13.	Tümör gelişiminde kemokinler ve reseptörleri	29
Şekil 3.1.	Fare MIP-2 ELISA standart hazırlama yöntemi	34
Şekil 3.2.	Fare KC ELISA standart hazırlama yöntemi	35
Şekil 3.3.	Protein assay standart hazırlama yöntemi	38

Şekil 4.1.	BYL719'un farklı konsantrasyonlarda, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM 'nin proliferasyonları üzerine etkilerini gösteren grafikler	46
Şekil 4.2.	PI3K α inhibitörünün (10 ve 1 μ M konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	47
Şekil 4.3.	PI3K α inhibitörünün (10 ve 1 μ M konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	48
Şekil 4.4.	GSK2636771'in farklı konsantrasyonlarda, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM 'nin proliferasyonları üzerine etkilerini gösteren grafikler	49
Şekil 4.5.	PI3K β inhibitörü GSK2636771 (10 ve 1 μ M konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	50
Şekil 4.6.	PI3K β inhibitörü GSK2636771 (10 ve 1 μ M konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	51
Şekil 4.7.	TGX2211'in farklı konsantrasyonlarda, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM 'nin proliferasyonları üzerine etkilerini gösteren grafikler	52
Şekil 4.8.	PI3K β inhibitörü TGX2211'in 10 ve 1 μ M konsantrasyonda 4TBM ve 4THM hücre hatlarının MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	53

Şekil 4.9.	PI3K β inhibitörü TGX221'in 10 ve 1 μ M konsantrasyonda 4TBM ve 4THM hücre hatlarının KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	54
Şekil 4.10.	PI3K α inhibitörü BYL719' un CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte hücre proliferasyonu üzerine etkilerini gösteren grafikler	55
Şekil 4.11.	PI3K α inhibitörü BYL719' un CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	56
Şekil 4.12.	PI3K α inhibitörü BYL719' un CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler	57
Şekil 4.13.	Akt/PKB fosforilasyonu üzerine, SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (1 ve 10 μ M) tek başına ve birlikte etkileri	58
Şekil 4.14.	ERK1/2 fosforilasyonu üzerine, SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) tek başına ve birlikte etkileri	59
Şekil 4.15.	P38 fosforilasyonu üzerine, SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) tek başına ve birlikte etkileri	60
Şekil 4.16.	PKC ϵ aktivatörü FR236924 hücre çoğalması üzerine tek başına ve SB225002 (1 ve 10 μ M) ile birlikte etkiler	61
Şekil 4.17.	PKC ϵ aktivatörü FR236924 tek başına ve SB225002 (1 ve 10 μ M) ile birlikte MIP-2 salımına etkileri	62

- Şekil 4.18.** PKCE aktivatörü FR236924 tek başına ve SB225002 (1 ve 10 μ M) ile birlikte KC salımına etkileri 63
- Şekil 4.19.** SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M), AKT fosforilasyonu üzerine tek başına ve birlikte etkileri 64
- Şekil 4.20.** SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M), ERK1/2 fosforilasyonu üzerine tek başına ve birlikte etkileri 65
- Şekil 4.21.** SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M), P38 fosforilasyonu üzerine tek başına ve birlikte etkileri 66

SİMGELER ve KISALTMALAR

Akt/PKB	:	Protein Kinaz B (Protein Kinase B)
ATP	:	Adenozin trifosfat
APS	:	Amonyum Persülfat
BSA	:	Sığır Serum Albumin (
BYL	:	BYL719, PI3K α inhibitörü
CXC	:	CXC dizilimli kemokin
CXCL1	:	CXC kemokin ligand 1
CXCL2	:	CXC kemokin ligand 2
CXCR2	:	CXC kemokin reseptör 2
DMEM	:	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
ECL	:	Kemoluminesan
ELİSA	:	Enzimle ilişkili immuno sorbent assay
ERK1/2	:	Ekstrasellüler sinyalle ilişkili kinaz 1/2
FBS	:	Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
FR	:	FR236924, PKC epsilon aktivatörü
GAPDH	:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GDP	:	Guanidin di fosfat
GPCR	:	G proteini kenetli reseptörler
GRO	:	Büyüme ile ilişkili onkogen
GSK	:	GSK2636771, PI3K- beta inhibitörü
GTPaz	:	Guanidiin tri fosfataz
GTP	:	Guanidin tri fosfat
IL	:	İnterlökin
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
PKCϵ	:	Protein kinaz C epsilon
PTEN	:	Fosfataz ve tensin homologu
PVDF	:	Poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride)
SB	:	SB225002 CXCR2 antagonisti
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	:	N,N,N,N-tetrametiletildiamin
TGX	:	TGX221 , PI3K beta inhibitörü
dk	:	Dakika
sn	:	Saniye
MAPK	:	Mitojen aktif protein kinaz
MIP-2	:	Makrofaj İnflamatuar protein -2
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
ng	:	Nanogram
rpm	:	Dakikadaki dönüş sayısı
μl	:	Mikrolitre
μM	:	Mikromolar

1. GİRİŞ

Metastaz ve terapi direnci, meme kanserine bağılı ölümlerin iki ana nedenidir. Bu yüzden metastaz ve terapi direncinde rol oynayan mekanizmaların belirlenmesi oldukça önemlidir.

Kemokinler, immün hücrelerin migrasyonundan sorumlu olan kemotaktik sitokinlerdir. Yapılarına göre çok çeşitli tipleri vardır, bunlardan CXC kemokinler ve reseptörleri kanser gelişimi ve metastazda önemli rol oynamaktadır. CXC kemokin reseptör 2 (CXCR2)'nin, meme, pankreas, ovaryum ve melonama gibi metastatik indeksi yüksek birçok kanser hücresi tarafından eksprese edildiği ve aktivasyonunun metastaz gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark., 2007; Richmond ve ark., 2009; Hu ve ark., 2013). Bu nedenle CXCR2 antagonistlerinin kanser tedavisinde kullanımı gündemdedir.

CXCR2'nin önemli ligandlarından MIP-2, (insandaki CXCL2'nin fare homoloğu) CXCR2 aktivasyonu ile nötrofil infiltrasyonuna neden olarak anjiyogenez ve tumor progresyonunda rol oynamaktadır. CXCR2'nin diğer önemli bir ligandı KC (insandaki CXCL1'in fare homoloğu)'nin tumorogenez, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve inflamasyonda önemli rol oynadığı saptanmıştır. Bu kemokinlerin mürin metastatik meme kanseri hücre hatlarında non-metastatik hücre hatlarına kıyasla yüksek seviyede besiyerine salındığı tespit edilmiş ve metastazda da rol aldıkları ortaya konmuştur.

Daha önceki çalışmamızda CXCR2 antagonisti SB225002 ile 4TBM ve 4THM hücrelerinin çoğalmasının baskılandığı fakat aynı zamanda CXCR2'yi aktifleştiren MIP-2 salınımının arttığını tespit ettik. Bu durum CXCR2'nin MIP-2 için otoreseptör olduğunu ve kronik antagonist tedavisi ile direnç gelişebileceğini düşündürmüştür. Çalışmanın devamında MIP-2 salınımının, PAN-PI3K inhibitörü ile nerdeyse %50 düzeyinde baskılandığını gözlemledik (Erin ve ark., 2015). Aynı zamanda çalışmada MIP-2'nin artışında PKC inhibisyonun rol oynayabileceği bulundu.

Çeşitli kanserlerde aşırı aktifleştigi bildirilen ve terapi direnci ile ilişkilendirildiği için çalışmamızın bir bölümünde PI3K alt tiplerine spesifik inhibitörler ile direnç mekanizmasında hangi PI3K alt tipinin rol oynadığının belirlenmesi ve MIP-2 artışına bağlı direncin kırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın devamında, PKC inhibisyonunun MIP-2'deki artışta rol oynayabileceğinin öngörülmesi üzerine PKC epsilon spesifik aktivatör ile MIP-2 artışının baskılanması ve SB225002 'nin anti-tümörojenik etkilerinin artırılması hedeflenmiştir.

Metastatik meme kanseri dünya genelinde kadınlarda kansere bağlı ölümlerin sebepleri arasında önde yer almaktadır. Lokalize kanserlerde etkin tedaviler uygulanabiliyor olsa da metastatik kanserler için henüz etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Meme kanserine bağlı ölümlerin sebebi de uzak metastazlara bağlı yaşamsal fonksiyonların bozulmasıdır. Meme kanseri genellikle kemiğe, karaciğere, akciğere ve beyine metastaz yapmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda farklı organlara metastaz yapmış fare metastatik meme kanseri hücre hatlarında (4TBM ; beyine metastaz yapan hücreler, 4THM; kalbe metastaz yapan hücreler) PI3K izoform spesifik inhibitörler (α ; BYL719, β ; TGX221 ve GSK2636771) tek başına ve CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte etkileri in vitro koşullarda araştırıldı. Daha sonra PKC epsilon spesifik aktivatörü (FR236924) tek başına ve SB225002 ile birlikte in vitro etkileri araştırıldı. Öncelikle 4TBM ve 4THM hücre hatlarında proliferasyon üzerine etkiler incelendi. Hücre çoğalması üzerine etkili olan konsantrasyonlarda MIP-2 (makrofaj inflamatuvar protein-2) ve KC (keratinosit kaynaklı kemokin) salınımlarındaki değişiklikler araştırıldı. Daha sonra hücre içi sinyal yollarında rol oynayan AKT/PKB, ERK1/2 ve P38 gibi önemli proteinlerin fosforilasyonları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

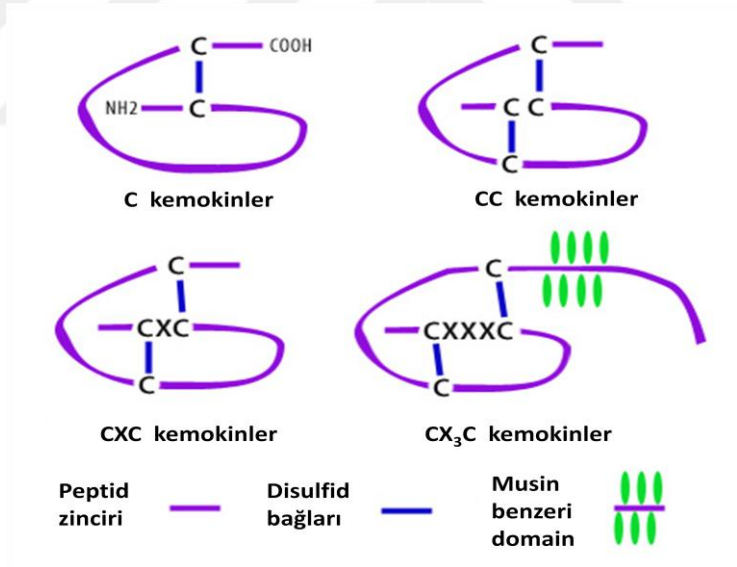
2.1. Kemokinler

Kemokinler veya kemotaktik sitokinler, inflamasyon alanlarına ve sekonder lenfoid organlara lökositlerin kemotaksisinde ve aktivasyonunda rol oynayan önemli mediyatörlerdir (Driscoll, 1994). Organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte etkin olan kemokinler immün sistemdeki fonksiyonlarının yanısıra anjiyogenez, embriyogenez, hematopoez, tümör büyümesi ve metastazında da önemli rol oynarlar (Baggiolini ve Loetscher 2000; Luster, 1998). Kemotaktik sitokinler fonksiyonlarına göre ve ekspresyon motiflerine göre homeostatik ve inflamatuvar kemokinler olmak üzere 2 sınıfa ayrılırlar. Homeostatik kemokinler, belirli hücre tiplerinde ve dokularda yapısal olarak salgılanırlar ve homeostazın gelişmesinde ve korunmasında hayati bir rol oynarlar. İnflamatuvar kemokinler ise yapısal olarak eksprese edilmezler ancak IL-1 β , TNF, lipopolisakkarit ve viral enfeksiyonlar gibi inflamatuvar uyaranlar tarafından kontrol edilirler (Vandercappellen ve ark., 2008).

1977'de ilk kemokinin tanımından bu yana 40'ın üzerinde ilgili molekül tanımlanmıştır. Sitokin benzeri ve lökosit kemoatraktan aktivitelerinden dolayı 'kemo-kin' olarak adlandırılmıştır (Baggiolini ve ark., 1997; Luster, 1998). 8-12 kD moleküler ağırlığında, multiple domainleri bulunan protein yapısında küçük moleküllerdir. Ancak dimerler ya da daha büyük oligomerler oluşturabilirler. %20-70 oranında aminoasit dizilimlerinde benzerlik göstermektedirler (Oppenheim ve ark., 1991; Proudfoot ve ark., 2003; Rollins, 1997). Sistein aminoasitlerinin pozisyonlarına göre 4 alt gruba ayrılırlar (C, CC, CXC, CX₃C) (şekil 2.1). Günümüze kadar bunlardan 2 tanesi (CXC ve CC) çok iyi tanımlanmıştır. İlk kemokin grubu CC (β) alt grubunda iki sistein amino asiti yan yana bulunur ve 28 üyeden oluşur. Kemokinlerin en geniş grubu olan CC ailesi, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreleri, bazofiller, eozinofiller ve mast hücreleri de dahil olmak üzere çok fazla lökositik hücre tipleri için kemoatraktandır. CXC (α) kemokinler ise 2 sistein arasında farklı bir amino asitin bulunmasıyla karakterize edilirler ve tanımlanan 17 üyesi vardır. C (γ) kemokin ailesi, NH₂ terminalinde bir tane sistein kalıntısına sahiptir ve sadece

XCL/lenfotaktin ile temsil edilir. CX₃C (δ) kemokin ailesinde iki sistein arasında 3 amino asit bulunur ve CX₃CL1/ fraktalkin ya da nörotaktin ile temsil edilirler (Rot ve von Andrian, 2004; Thelen, 2001; Vandercappellen ve ark., 2008).

Kemokinler ve reseptörleri kronik inflamasyonun ana mediyatörleridir. Uzun süreli inflamasyon ise karsinogeneze elverişli ortam koşullarını sağlar. Salınan tümör kaynaklı kemokinler, bu kemokin ligandlarıyla ilişkili reseptörleri yüzeyinde bulunduran hücreleri ortama çekerler (Balkwill, 2004). Sonuçta ortamda kemokin gradiyenti ile pro-tümöral veya anti-tümöral aktiviteleri olan hücreler birikerek tümör gelişimini destekleyici ya da baskılayıcı rol oynarlar. Kemokinler sadece tümöre hücrelerin infiltrasyonunu sağlamakla kalmaz aynı zamanda doğrudan tümör hücrelerinin transformasyonuna ve büyümesine de neden olurlar (Dhawan ve Richmond, 2002).



Şekil 2.1. Kemokin ailesi ve yapıları

2.1.1. CXC Kemokinler

CXC kemokinleri C-terminallerinde heparin bağlayıcı bir alana sahiptir ve anjiyogenez sürecini düzenlemede rol oynarlar (Belperio ve ark., 2000) Bu kemokin ailesini diğerlerinden ayıran CXC motifinin yanı sıra, CXC kemokinlerin fonksiyonel aktivitesini belirleyen ikinci bir yapısal motife sahip olmasıdır. Çoğu CXC kemokinlerinin N-terminalinde, birincil yapılarında ilk sistein amino asit kalıntısından

(residue) önce üç amino asit dizilimi (Glu-Leu-Arg: ELR motifi) bulunur (Strieter ve ark., 1995a, 1995b). CXCL8 gibi bu ELR motifi (ELR +) içeren üyelerin hem güçlü anjiyogenik faktörler, hem de nötrofil kemoatraktanlar da olduğu bulunmuştur (Keeley ve ark., 2008). Öte yandan, ELR motifi (ELR-) olmayan CXC kemokinler, CXCL4, CXCL9 ve CXCL10 gibi güçlü anjiyojenik inhibitörlerdir (Arenberg et al. 1997, Strieter et al. 1995b) (tablo 2.1). CXCL12, anjiyogenik bir ELR- CXC kemokin olduğu için bunun bir istisnasıdır. ELR+ CXC kemokinleri CXCR1 ve CXCR2'ye bağlanır ve ELR- CXC kemokinler ise CXCR3-7'ye bağlanır (Angiolillo ve ark., 1995; Luster ve ark., 1995; Sgadari ve ark., 1997).

Bu kemokinlerin (ELR+ ve ELR-) inflamatuvar dokudaki dengeleri, kronik inflamasyonun organizasyonunda ve doku iyileşmesinde yeni kan damarlarının gelişmesi ve inflamasyon alanına penetrasyonunda yani anjiyogenezde oldukça önemlidir. Nötrofillerin aktifleşmesinde rol oynayan CXC kemokin ailesinin tüm üyelerinde ELR motif yüksek oranda korunmuştur (Clark-Lewis ve ark., 1993; Strieter ve ark., 1995a).

ELR+ kemokinlerin büyüme ile ilişkili onkogen alt grubu (GRO) ilk kez melanoma hücrelerinin kültür süpernatantlarında tanımlanmıştır (Richmond ve Thomas, 1988). CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β ve CXCL3/GRO- γ kemokinleri bu gruba girer ve CXC kemokin reseptörü 2 (CXCR2) 'ye bağlanarak biyolojik etkilerini gösterirler (Addison ve ark., 2000; Jaffer ve Ma, 2016). Bu tez çalışmasının da araştırma konusu olan CXCR2'nin ligandlarından MIP-2 (makrofaj inflamatuvar protein 2), insandaki CXCL2'nin, KC (keratinosit kaynaklı kemokin) insandaki CXCL1'in murin homologlarıdır (Scapini ve ark., 2004). Bununla birlikte MIP-2 ve KC, tümör gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen insandaki CXCL8 (IL-8)'in fonksiyonel karşılığıdır.

Tablo 2.1. CXC kemokinler (Jaffer ve Ma, 2016)

Kemokin	Alternatif isimler	Reseptör
ELR⁺		
CXCL1	Büyüme ile ilişkili onkogen α (GRO- α)	CXCR2
CXCL2	GRO- β	CXCR2
CXCL3	GRO- γ	CXCR2
CXCL5	ENA-78 (endotel nötrofil aktiveleştirici peptid-78)	CXCR2
CXCL6	GCP-2 (Granulosit kemotaktik protein-2)	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2 (Nötrofil aktiveleştirici peptid-2)	Bilinmiyor
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL15	Lunkin	Unknown
CXCL17*	Dentritik hücre ve monosit atraktan kemokin benzeri protein (DMC)	CXCR8
ELR⁻		
CXCL4	Platelet faktör-4 (PF-4)	CXCR3
CXCL9	IFN γ ile indüklenen kemokin (MIG)	CXCR3
CXCL10	IFN γ ile indüklenen protein (IP)-10	CXCR3
CXCL11	IFN γ ile indüklenen T hücre kemotraktan (I-TAC)	CXCR3, CXCR7
CXCL12	Stromal hücre kaynaklı faktör 1- α (SDF1- α)	CXCR4, CXCR7
CXCL13	B hücre atraktan kemokin (BCA)-1	CXCR5
CXCL14	Meme ve böbrekte eksprese edilen kemokin (BRAK)	Bilinmiyor
CXCL16	Küçük indüklenebilir kemokin-16	CXCR6

2.1.2. Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP-2)

Makrofaj inflammatuar protein 2 (MIP-2) insandaki CXCL2'nin fare homologudur. Nötrofiller için güçlü bir kemoatraktan olan bir CXC kemokindir. İlk olarak MIP-2, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarıldıktan sonra fare makrofaj hücre dizisi RAW 264.7 tarafından salgılanan 6 kDa moleküler ağırlığında heparin bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır (Tekamp-Olson ve ark., 1990; Wolpe ve ark., 1989). Daha sonra ise nötrofil, fibroblast ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücrelerden de salgılandığı tespit edilmiştir (Driscoll ve ark., 1993; Ohtsuka ve ark., 2001). MIP-2 hematopoezin düzenlenmesinde ve çeşitli inflammatuar mediyatörlerin (IL-1, TNF- α ve histamin) üretiminin uyarılmasında önemli rol oynar (Driscoll, 1994). Nötrofiller, enfekte dokulara ilk göç eden immün hücrelerdir. İmmün yanıtın başlamasında ilk adım olan nötrofillerin kemotaksisi ve aktivasyonunda MIP-2 önemli rol oynar (Kobayashi, 2008).

Çeşitli immünregülatör ve inflamatuvar etkiler gösteren MIP-2, biyolojik etkilerini CXCR2 olarak adlandırılan G protein bağlı hücre yüzey reseptörü ile etkileşerek gösterir. Major proinflamatuvar bir sitokin IL-8 (CXCL8), MIP-2'nin insandaki fonksiyonel karşılığıdır ve MIP-2 ile benzer etkilere sahiptir. Monositler, eozinofiller ve T lenfositler için kemotaktik rol oynamaktadır. IL-8'in biyolojik etkileri ise hem CXCR1 hem de CXCR2 olarak adlandırılan G protein bağlı reseptörler aracılığı ile ortaya çıkar. Literatürde IL-8, anjiyogenez ve inflamasyonla ilişkilendirilmektedir. IL-8, stromal hücreler ve tümör hücrelerinden salgılanır. Ayrıca IL-8, inflamatuvar mediyatörlerin de ekspresyonunu tetikleyerek inflamasyonu şiddetlendirir. Böylece tümörün büyümesi ve gelişimi için ihtiyacı olan ortama hem otokrin hem de parakrin yolla katkıda bulunur. Dolayısıyla IL-8 karsinogeneze aracılık eder (De Larco ve ark., 2004; Todorovic-Rakovic ve Milovanovic, 2013). MIP-2 ve ilgili kemokinler de CXCR2'nin aktivasyonu yoluyla tümör hücresi transformasyonuna ve büyümesine doğrudan katkıda bulunurlar (Dhawan ve Richmond, 2002). Yakın zamanda yapılan çalışmalar ile CXCL2'nin metastatik meme tümörlerinde (%19.9), primer meme tümörlerine göre (%7.5) çok daha fazla salgılandığı bilinmektedir (Acharyya ve ark., 2012). Bununla birlikte MIP-2, CXCR2 aracılı nötrofil kemotaksisi ile tümör büyümesi ve metastaz için hayati olan anjiyogenezi uyarır (Scapini ve ark., 2004).

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, metastatik kanserlerin tedavisinde CXCR2 antagonistleri ile tedavi umut vaatmektedir. Klinik çalışmalar da günümüzde bu fikri incelemeye devam ediyor (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02001974).

2.1.3. Keratinosit Kaynaklı Kemokin (KC)

CXCL1 (Keratinosit kaynaklı kemokin, farede KC), nötrofilleri enfekte-hasarlı ortama çekerek ve aktifleştirerek konağın savunmasında önemli rol oynar. CXCL1 glikozaminoglikanlara (GAG) ve CXCR2'e bağlanarak aktivite gösterirler (Cummings ve ark., 1999; Kolaczowska ve Kubes, 2013; Sawant ve ark., 2016). Klinik çalışmalar ve hayvan modelleri, CXCL1'in, enfeksiyonla mücadelede nötrofilleri ortama çağırarak ve aktive ederek konakçı immün yanıtında çift rol oynadığını göstermiştir. Birincisi, periferel nötrofillerin enfeksiyon bölgesine yönlendirilmesinde bir yönlü işaret olarak görev yapar. İkincisi, dokudaki mikrobiyal savunma için proteazların ve reaktif oksijen

türlerinin (ROS) salınmasını aktive eder (De Filippo ve ark., 2013; Jin ve ark., 2014). CXCL1 MIP-2 gibi, insanda interlökin-8 (IL-8, CXCL8)'in kemirgenlerde fonksiyonel karşılığı olan yani benzer etki gösteren diğer bir kemokindir. CXCL1 ile CXCL2 arasındaki aminoasit sekansları %90 oranında benzerlik göstermektedir ve her ikisi de proinflamatuvar etkilidir. Çeşitli inflamatuvar hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Hol ve ark., 2010; Semple ve ark., 2010).

Makrofajlar tümöral bölgelerde konağın immün sistemiyle ilişkili en çok bulunan stromal hücrelerdir ve farklı fenotipleri vardır. Özellikle tümörle ilişkili makrofajlar olarak bilinen M2'ler, tümör büyümesi, anjiyogenez ve adaptif immünitinin baskılanması yönünde tümör lehine rol oynarlar. CXCL1 salgılayan makrofajlar tümör hücreleri ile birlikte uygulandığında nude farelerde tümör büyümesini belirgin olarak arttırmıştır. Ayrıca mesane ürotelyal kanser hücrelerinde yüksek miktarda CXCL1 ekspresyonu, hastalık progresyonu ve ilaç direncine neden olmasının yanı sıra tümöre invazyon yeteneği kazandırmaktadır (Miyake ve ark., 2016). Ayrıca tümör kaynaklı CXCL1, tümörle ilişkili nötrofil infiltrasyonu ile çeşitli kanserlerde tümör büyümesine neden olmaktadır (Yuan ve ark., 2016).

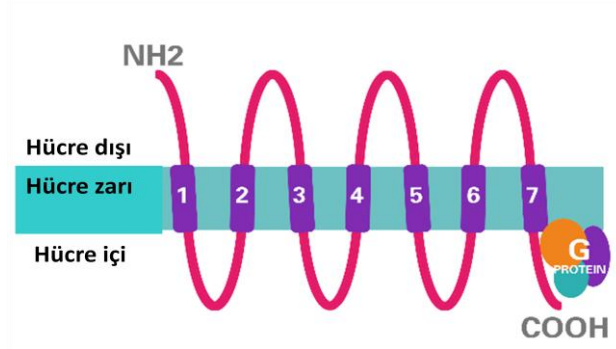
CXCL1/2'nin meme tümörünün büyümesine ve akciğer metastazına aracılık ettiği, meme tümörlerine miyeloid hücreleri çektiği, miyeloid hücre kaynaklı S110A8/9 aracılığıyla metastaz oluşumunu teşvik ettiği ve S100A8/9 ile meme tümöründe kemoterapi direncinin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bunlarla birlikte CXCL1 sinyali bloke edilerek kemoterapi etkinliğinin artırıldığı ortaya konmuştur (Acharyya ve ark., 2012). Dolayısıyla metastatik hastalıkların tedavisinde CXCL1 antagonistlerinin kullanımı umut vaatmektedir.

2.1.4. Kemokin Reseptörleri

Kemokinler biyolojik etkilerini hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Bilinen tüm kemokin reseptörleri G protein bağlı 7 transmembran domainden oluşurlar. Bu reseptörler 350 amino asit uzunluğundadır ve diğer 7 transmembran reseptör aileleri ile karşılaştırıldığında nispeten küçüktür. Tüm kemokin reseptörleri arasında %20 benzerlik (homoloji) vardır. Hücre dışında sülfatlanmış tirozin rezidüleri ve N-bağlı glikosilasyon alanları içeren bir amino (N) terminalden oluşurken, hücre içinde

fosforilasyon yoluyla reseptör aktivitesini düzenleyen serin ve treonin rezidülerinin bulunduğu bir karboksi (C) terminalden oluşurlar (Şekil 2.2). Transmembran bölgesi α sarmal yapıdadır ve hücre içi ve hücre dışı halkalar hidrofilik amino asitler içerir. İlk iki halka, bir disülfid bağı ile bağlanan yüksek ölçüde korunmuş sistein kalıntılarına sahiptir (Murdoch ve Finn, 2000). Her bir reseptör 4 kemokin ailesinden sadece birinin ligandlarına özgüdür bu yüzden reseptörler de 4 gruba ayrılırlar. Bu gruplar içerisinde çok çeşitli biyolojik sonuçlara neden olan çoklu reseptör/ligand kombinasyonları vardır (Vicari ve Caux, 2002; Zhu ve ark., 2012). Kemokin reseptörleri heterotrimerik G proteinleri aracılığıyla kemotaksiste rol alan PI3K, MAPK, RAS, fosfolipaz-C β ve Rho GTPaz gibi çok çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarını düzenler (Thelen ve Stein, 2008).

Kemokin reseptörleri nötrofiller, monositler, lenfositler, miyeloid progenitör hücreler, eozinofiller ve bazofiller olmak üzere çok çeşitli hücrelerde eksprese edilirler. Ancak immün hücre alttipleri her çevrenin koşullarına göre (seçici kemotaksi için) kemokin reseptörlerini farklı şekillerde eksprese ederler. Tümör mikroçevresinde de, kemokin ligand sekresyonu sağlıklı dokulardakinden daha farklıdır. Bu değişiklikler genellikle çeşitli malignitelerde kötü prognoza neden olan hücrelerin ortama çağırılmasına yol açar. Tümör gelişimi ve metastaz oluşumunu destekleyen bu hücreler miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), tümörle ilişkili nötrofiller (TAN), tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve düzenleyici T hücreleri (Treg) gibi pro-tümörojenik bağışıklık hücreleridir. Bu hücreler tümör gelişimi esnasında efektör lenfositleri baskırlar, anjiyogenezi tetiklerler ve tümör progresyonu için gerekli olan inflamasyon ortamını sağlarlar (Balkwill ve ark., 2005; Mantovani, 2009; Templeton ve ark., 2014; Varn ve ark., 2017; Zhang S. ve ark., 2016b).



Şekil 2.2. Kemokin reseptörünün yapısı

2.1.5. CXC Kemokin Reseptör 2

CXCR2, insan promyelositik lösemi HL60 hücrelerinden 1991 yılında ilk kez klonlanmıştır ve kemokin interlökin (IL)-8/CXCL8 için heptahelik G protein-bağlı reseptör (GPCR) olarak tanımlanmıştır (Murphy ve Tiffany, 1991). Günümüzde çeşitli immün hücrelerle birlikte endotel hücreleri ve fibroblastlar gibi immün olmayan hücrelerde de eksprese edildiği bilinmektedir.

CXCR2 aktivasyonu, guanin nükleotid bağlayıcı proteinlerin G_i ailesi ile reseptör bağlanmasını uyarır (Hall ve ark., 1999; Wuyts ve ark., 1997). Bu da intraselüler inositol fosfatların salınımını, hücre içi kalsiyum artışını, ERK1/2' ye bağımlı mekanizmaları p38 MAPK ve PI3K aktivasyonunu uyarır. Böylece hücre migrasyonu ve kemokin gradienti ile ilişkili olan hücre içi proteinlerin fosforilasyonu tetiklenir. Aktive edildikten sonra, CXCR2 fosforile olur ve reseptör desentisizasyon (duyarsızlaştırma) ile sonuçlanan, arrestin/dinamin bağımlı mekanizmalar aracılığıyla hızlı bir şekilde internalize olur (Hall ve ark., 1999; Richardson ve ark., 1998).

CXCR2 birden fazla ligandla aktive olmaktadır. ELR+ büyüme ile ilişkili (GRO) kemokinlerle (CXCL1-3) güçlü bir şekilde etkileşirler. Bunlardan başka epitel kaynaklı nötrofil atraktan-78 (ENA-78, CXCL5), granulosit kemotaktik protein-2 (GCP-2, CXCL6), nötrofil aktifleştirici peptid-2 (NAP-2; CXCL7) ve IL-8 (CXCL8) ile aktifleşir (Murphy ve ark., 2000).

CXCR2'nin primer immün fonksiyonu nötrofil migrasyonunun düzenlenmesidir, kemik iliğinden inflamasyon bölgelerine bu hücrelerin çıkışını kontrol eder (Cacalano ve ark., 1994; Eash ve ark., 2010). CXCR2 nötrofillerden başka tümör gelişiminde rol oynayan miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin (MDSC) migrasyonunu da düzenler (Highfill ve ark., 2014). Ayrıca CXCR2 endotel hücre kemotaksisine aracılık eden primer fonksiyonel kemokin reseptörüdür (Addison ve ark., 2000; Salcedo ve ark., 2000) ve inflamasyonun ana mediyatörleri ELR+ CXC kemokinlerle aktifleşerek anjiyogeneze neden olduğu bilinir.

2.1.6. CXCR2, MIP-2, KC ve Kanser

Tümör büyümesi ve yayılması, tümör hücrelerinin birbirleriyle ve tümör ortamının bileşenleri ile dinamik etkileşimlerin bir sonucudur. Neoplastik transformasyon, büyüme, sağkalım, invazyon ve metastaz için pro-anjiyojenik ortam gereklidir. Lokal anjiyogenez, pro-anjiyojenik faktörler ile anjiogenez inhibitörlerinin ekspresyonundaki dengesizlik sonucu oluşur. CXC kemokin ailesinin üyeleri, anjiyogenezin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Tüm ELR+ CXC kemokin ligandları CXCR2'ye bağlanırlar ve anjiyojenik aktivite gösterirler. CXCL8 ve CXCL6 spesifik olarak CXCR1'i de aktifleştirir. Hem CXCR1 hem de CXCR2 endotel hücrelerde eksprese edilmesine rağmen, CXCR2 endotel hücre kemotaksisine aracılık eden primer fonksiyonel kemokin reseptörüdür (Addison ve ark., 2000; Salcedo ve ark., 2000).

Kemokin üretimi ve reseptör ekspresyon profilleri ortam koşullarına göre değişiklik gösterir. Çoğu kanserlerde kemokin ve reseptörleri normal dokulara göre çok daha fazla üretilir. CXCR2 ve ligandlarının ekspresyonu da çeşitli kanserlerde artmıştır. Ayrıca CXCR2'nin aktivasyonu metastatik fenotipin gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (Hu ve ark., 2013; Richmond ve ark., 2009; Singh ve ark., 2007). Özellikle CXCR2 metastatik indeksi yüksek olan meme, pankreas, over kanserleri ile melanomada yüksek düzeyde eksprese edilmektedir (Miller ve ark., 1998; Norgauer ve ark., 1996; Takamori ve ark., 2000; Venkatakrisnan ve ark., 2000). CXCR2 ekspresyonunun malign meme kanseri hücre hatlarında benign hücre hatlarına göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Freund ve ark., 2003). Benzer şekilde estrogen reseptör (ER) negatif meme kanserinde CXCR2 1208C/T polimorfiziminin yüksek olduğu ve hastalığın seyrini etkilediği bildirilmiştir

(Kamali-Sarvestani ve ark., 2007). CXCR2'nin mutasyonlara bağılı yapısal aktivasyonunun neoplastik değişimlere neden olduğu bilinmektedir (Burger ve ark., 1999). CXCR2 fonksiyonu antikorlar ile bloke edilerek ya da PI3K veya ERK1/2 sinyali inhibe edilerek CXCL8 indüklü endotel tüp oluşumu ve endotel hücre kemotaksisi düzeltilmektedir (Heidemann ve ark., 2003). MIP-2, CXCR2 aktivasyonu yaparak nötrofil infiltrasyonuna ve anjiogeneze neden olmaktadır (Scapini ve ark., 2004). MIP-2'nin CXCR2 ekspresyonunu arttırdığı ve kolorektal kanserde hücre çoğalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Kollmar ve ark., 2007).

ELR+ kemokin-CXCR2 aksı sadece anjiyogenez ile kanser hücrelerinin metastatik bölgelere yerleştirilmesinde değil, aynı zamanda tümör mikro ortamına bir dizi farklı hücre tipinin de alınmasında da önemli rol oynarlar. Bu hücreler tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), tümörle ilişkili nötrofiller (TAN) ve lenfositler, kanser ile ilişkili fibroblastlar (CAF'ler), mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) ve endotelyal hücreler gibi infiltre hücrelerdir. M2 makrofajlar, miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler, nötrofiller, tümör çevresini immünsüpresif yaparak tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasına neden olurlar. Degrade edici enzimler (MMP9, nötrofil kollojenaz) salgılayarak matriks yapısını bozarlar ve tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını kolaylaştırırlar. Ayrıca salgıladıkları büyüme faktörleri ile de tümör gelişimini doğrudan desteklerler (Mantovani ve ark., 2004; Opdenakker ve Van Damme, 2004).

Yapılan çalımlarda meme kanseri modelinde CXCR2 sinyalinin invazyon ve metastaza neden olan Gr-1+CD11b+ MDSC'lerin tümör mikroçevresinde toplanması için gerekli olduğu (Yang L. ve ark., 2008), meme kanseri hücrelerinin metastatik kolonizasyonunda nötrofillerin önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Wculek ve Malanchi, 2015). Ovaryum kanser hücrelerinde yapılan bir çalımda, transkripsiyon faktörü Snail'in aşırı ekspresyonu CXCL1, CXCL2 ve CXCL5'i upregüle ederek, tümör progresyonuna neden olan myeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin (MDSC) toplanmasını teşvik etmiştir. Aynı çalımda transkripsiyon faktörünün silinmesi ya da antikör aracılı CXCR2 hedeflemesi ile tümör ortamında MDSC'ler kaybolmuş, T hücre ve NK hücrelerinin sayısı artmıştır (Taki ve ark., 2018).

Benzer şekilde başka bir çalışmada pankreas adenokarsinoma modelinde CXCR2'nin silinmesi nötrofil infiltrasyonunu azaltmış ve efektör T hücrelerinin oranını arttırmıştır (Chao ve ark., 2016)

CXCL1 ve CXCL2 ayrıca kemoterapiye dirençte de rol oynamaktadır. Kemoterapötik ajanlar kanser hücrelerini öldürmelerine rağmen endotel ve stromal hücrelerden salınan TNF üretiminin indüklenmesi kanser hücrelerinde CXCL1 ve CXCL2 'yi upregüle eder. Bunun gibi kemoterapi ile indüklenen bazı kemokinler kanser hücrelerinin kemoterapiye direncini etkileyerek sağkalımını arttırmaktadır (Palacios-Arreola ve ark., 2014). CXCL1 ve CXCL2'nin sekresyonu pro-tümörojenik myeloid hücrelerinin infiltrasyonunda artışa neden olur ve dahası kemoterapi direnci ortaya çıkar (şekil 2.4) (Acharyya ve ark., 2012).

2.1.7. CXCR2 Antagonistleri

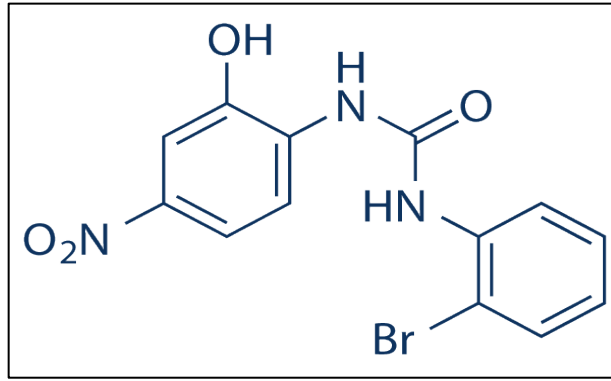
CXC kemokin reseptör 2 (CXCR2)'nin aşırı ekspresyonunun ve aktivasyonunun özellikle metastatik fenotipin gelişimine neden olduğunun anlaşılmasından bu yana CXCR2 antagonistlerinin kanser tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Çeşitli kanserlerin tedavisi için prelinik ve klinik çalışmalarda CXCR2 antagonistleri (AZD5069, Danirixin, Reparixin, Navarixin, SB225002,) araştırılmaktadır.

SB225002

SB225002 (N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N'-(2-bromophenyl)urea) güçlü, seçici ve kompetitif bir CXCR2 antagonistidir (şekil 2.3). CXCL8'e ve CXCL1'e bağlı kalsiyum mobilizasyonunu doza bağımlı olarak inhibe etmektedir (IC50: 40 ve 20 nM sırasıyla). İlk kez *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda IL-8 aracılı nötrofil kemotaksisi ve inflamatuvar yanıtın önlenmesinde etkili olan peptid olmayan CXCR2 antagonisti olarak tanımlanmıştır (White ve ark., 1998). Fare kolit modelinde yapılan bir çalışmada SB225002'nin 1mg/kg kadar düşük dozlarda bile kolon dokusuna nötrofil infiltrasyonu gibi çeşitli inflamatuvar parametreleri önleyebildiği gösterilmiştir (Bento ve ark., 2008).

İnflamasyon üzerindeki etkilerinden başka SB225002, β -tubulin alt birimi üzerinde vinblastin bağlama bölgesine iyi bir afiniteye sahiptir ve mikrotübül inhibisyonu ile antitümör etki de göstermektedir (Goda ve ark., 2013). Akut lenfoblastik lösemide

SB225002, G2-M fazında hücre döngüsünü durdurarak hücre ölümüne neden olmuştur Ovaryum kanser hücrelerinde de apoptozu indüklemiştir (de Vasconcellos ve ark.,2015; Du ve ark., 2013). Prostat kanserinde yapılan bir çalışmada ise AKT/mTOR inhibisyonu ile prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Xu M. ve ark.,2018b). Ratlarda yapılan bir çalışmada IL-8 aracılı anjiyogenez, SB225002 ile inhibe edilmiştir (Qu ve ark., 2009). Sorafenib ile SB225002 kombinasyonunun anjiyogenezi inhibe ederek ovaryum kanserinde güçlü antitümör etki sağladığı bildirilmiştir (Devapatla ve ark., 2015).

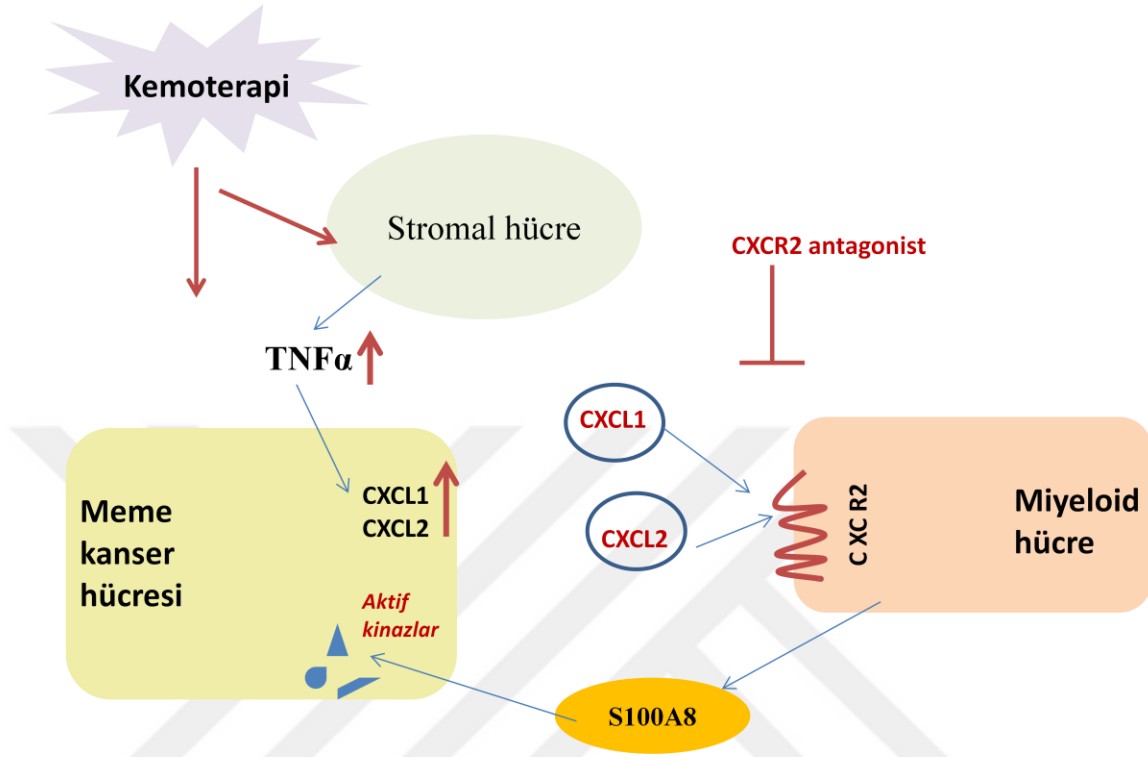


Şekil 2.3. SB225002'nin kimyasal yapısı

2.1.8. CXCR2 Antagonistlerine Direnc

Kanserlerde terapi direnci ve metastaz oluşumu tedavilerin başarısını kısıtlayıcı önemli etkenlerdir ve çoğunlukla ölümle sonuçlanır. Bu yüzden terapi direncine neden olan mekanizmaların bilinmesi kanser tedavilerinin başarısında oldukça önemlidir.

CXCR2 ve ligandlarının aşırı ekspresyonu da metastaz oluşumu ve terapi direnci ile ilişkilendirilmektedir. CXCR2 ekspresyonunun AKT1'in baskılanmasına ve COX2'nin aktivasyonuna yol açarak meme kanseri hücrelerinin metastazına ve kemoterapi direncine yol açtığı bilinmektedir (Xu H. ve ark., 2018a). 2005'te yapılan başka bir çalışmada meme kanseri hücreleri üzerinde CXCL1 ve CXCL2'nin (KC ve MIP-2) ekspresyonu akciğere metastaz ve nüks ile ilişkili bulunmuştur (Minn ve ark., 2005a). Çalışmanın devamında ksenograft meme kanseri modelinde kemoterapotik doksurobisin ile CXCR2 antagonistinin birlikte kullanımı tümör ve metastazı yalnız doksurobisin kullanılan gruba göre önemli oranda azaltmıştır.

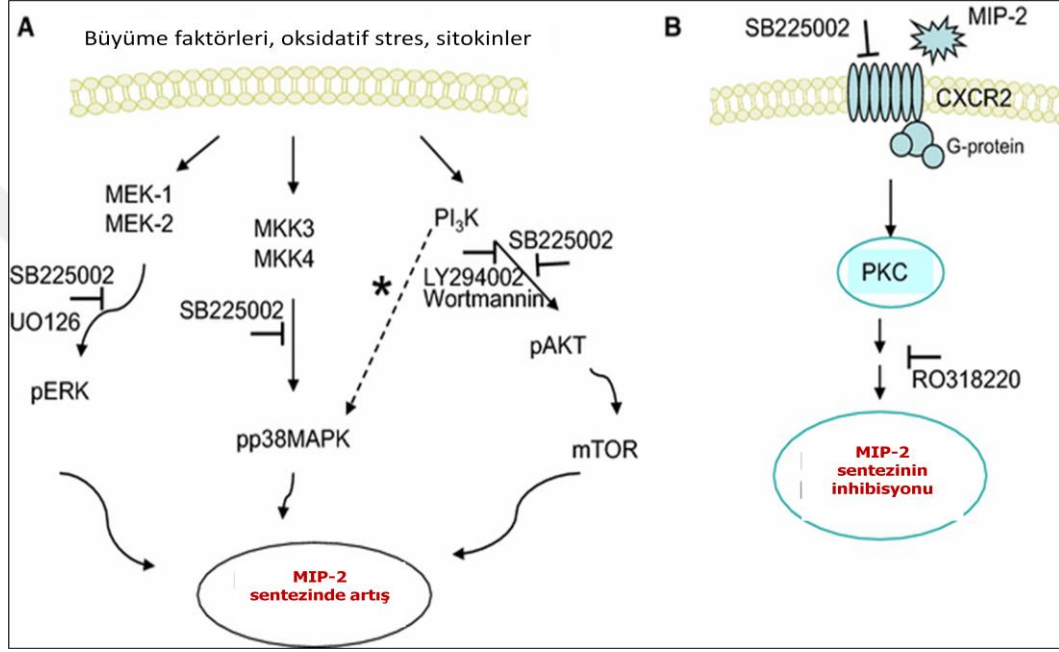


Şekil 2.4. CXCL/CXCR2 aksı ile kemoterapiye direncin bir mekanizması (Minn et al. 2005a).

Yapılan çalışmalarda CXCR2 antagonistlerinin önemli antitümör etkileri olmasına rağmen, bir süre kullanımda CXCR2 antagonistlerine karşı da direnç gelişebileceği bildirilmiştir. Daha önce yayınlanan çalışmamızda biz de CXCR2 antagonisti ile anti-tümörojenik etki sağlandığını ancak aynı zamanda besiyerine salınan anjiyojenik kemokinlerin (MIP2 ve KC (CXCR2'nin ligandları)) arttığını tespit ettik. Bu durum CXCR2'nin bu ligandlar için otoresptör olduğunu ve kronik antagonist tedavisi ile direnç gelişebileceğini düşündürmüştür. Çalışmanın devamında MIP-2 salınımının, PAN-PI3K inhibitörü LY294002 ile nerdeyse %50 düzeyinde baskılandığını gözlemledik.

Bu projede spesifik PI3K inhibitörleri ile PI3K yolağının MIP-2 üzerindeki etkisinin hangi PI3K alt tiplerine bağlı olarak ortaya çıktığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca önceki çalışmamızda, Protein Kinaz C inhibisyonu ile de kanser hücrelerinden MIP-2 salınımının arttığını tespit etmiştik. CXCR2'nin PKC'yi aktive ettiği bilinmekte ve bu sonuçlar CXCR2 antagonistlerinin PKC'yi inhibe ederek MIP-2 salınımını

arttırabileceğini göstermektedir (Erin ve ark., 2015) (şekil 2.5). Bu yüzden bu tez projesi kapsamında PKC epsilon alt tipine spesifik aktivatörün CXCR2 antagonisinin neden olduğu MIP-2'deki artışa ve KC salınımı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 2.5. MIP-2 salınımında rol oynayan mekanizmalar (Erin ve ark., 2015).

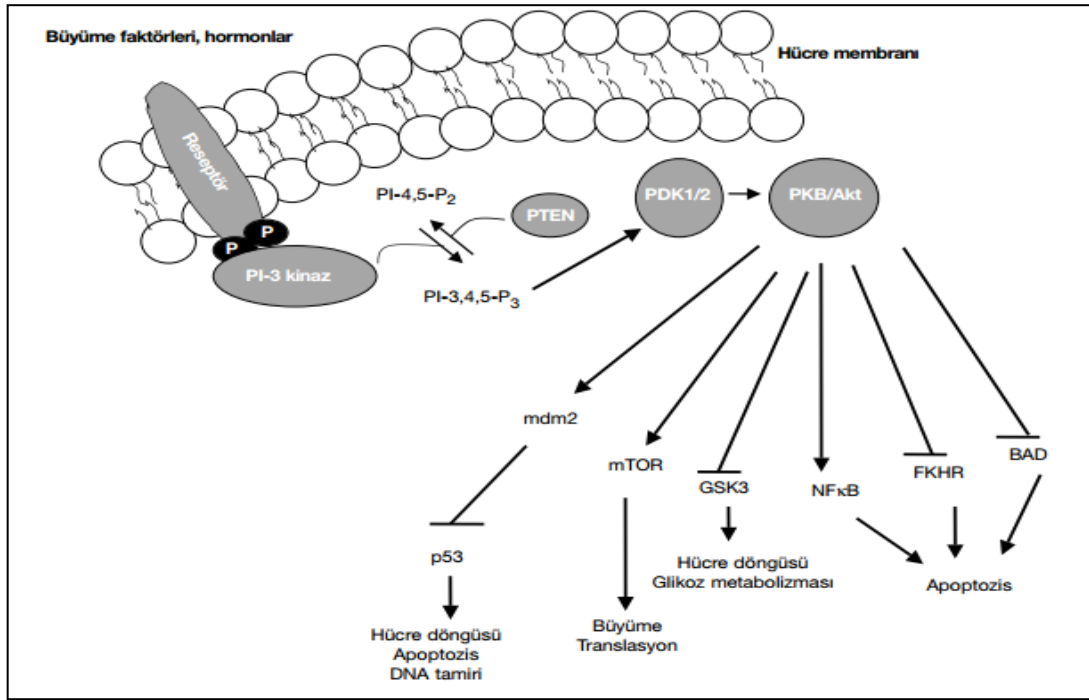
2.2. Fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) Yolağı ve Kanser

Fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) ailesi, reseptör tirozin kinazlar (RTK), G proteini kenetli reseptörler (GPCR) ve GTP bağlı adaptor proteinlere bağlanabilen ve onlar aracılığı ile alınan mesajların iletiminden sorumlu olan proteinlerdir. PI3K yolağının hücre proliferasyonu, sağkalımı, hücre büyümesini, motilitesini ve metabolizmasını kontrol eden çok çeşitli hedef proteinleri düzenlediği bilinmektedir (şekil 2.6) (Courtney ve ark., 2010; Engelman, 2009; Vanhaesebroeck ve ark., 2012).

Yapısal özellikleri, substrat özgülüklerinin farklı olması ve aktivasyon mekanizmalarının ve fonksiyonlarının birbirinden farklı olması sebebiyle üç sınıfa ayrılırlar. Sınıf 1 (1a ve 1b), sınıf 2 ve sınıf 3 olarak gruplanmıştır. Proliferasyon, sağ kalım ve hücre büyümesi gibi olaylarda rolü en iyi araştıran sınıf 1 PI3K ailesi olup 1a ve 1b olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılırlar. Çalışmalarda sınıf 1A PI3K kanserle yaygın olarak ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2009; Samuels ve Waldman, 2010). Sınıf 1A PI3K'lar, katalitik alt birim p110 (α , β ve δ sırasıyla PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genleri tarafından sırasıyla kodlanmaktadır) ve p85 regülatör alt birimden oluşan heterodimerik lipid kinazlardır (Vanhaesebroeck ve ark., 2012). p110 alt ünite, ekstraselüler mitojenik uyarılar ile aktifleşir ve membran faktörü PI(4,5)P₂'ı fosforile ederek PI(3,4,5)P₃'ün (fosfotidilinositol 3,4,5 trifosfatı) oluşmasına aracılık eder. Oluşan lipid yapıdaki sekonder mesajcı serin/treonin protein kinaz AKT/protein kinaz B (PKB) ve diğer efektörleri aktifleştirerek birçok önemli hücrenel faaliyetlere aracılık eder (Luo ve ark., 2003). PI3K yolağının negatif regülatörü PTEN (fosfataz ve tensin homoluğu) PIP₃'ı defosforile ederek PIP₂'nin oluşumunu uyarır yolakta rol oynayan önemli downstream moleküllerin aktivitesini dengeler (Chalhoub ve Baker 2009; Liu ve ark., 2009) (şekil 2.6).

İnsan kanserlerinde PI3K/AKT yolağını düzenleyen genlerde birçok mutasyon saptanmıştır (Osaki ve ark., 2004; Weigelt ve Downward 2012; Wong K. K. ve ark., 2010). Meme kanserinin çeşitli alt tiplerinde de en yaygın genomik anomaliler arasında PI3K yolağındaki sapmaların olduğu rapor edilmiştir (Baselga, 2011; Vanhaesebroeck ve ark., 2012). Özellikle p110 α 'yı kodlayan genin (PIK3CA) meme, prostat, kolon, endometriyum ve baş-boyun gibi yaygın kanserlerde sıklıkla mutasyona uğradığı rapor

edilmiştir (Stemke-Hale ve ark., 2008; Thomas ve ark., 2007; Wong K. K. ve ark., 2010). PI3K/Akt yolağının negatif regülatörü olan tümör baskılayıcı PTEN aktivitesinin birçok kanser tipinde kaybolduğu bilinmektedir (Mithal ve ark., 2014.; Vivanco ve Sawyers, 2002). Reseptör tirozin kinazların aşırı ekspresyonu ile birlikte bu genomik anomaliler pek çok kanser türünde, sinyal yolağı enzimlerinin ve downstream moleküllerinin sürekli aktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalması ortaya çıkar. Bununla birlikte tümör progresyonunda ve metastatik fenotipin gelişiminde oldukça önemli olan anjiyogeneziste endotelial hücre migrasyonu için özellikle PI3K p110 α alt tipinin gerekliliği bilinmektedir (Graupera ve ark., 2008). Ayrıca kanserde bu yolağın (özellikle p110 α) aşırı aktivasyonunun meme, glioblastoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde hormon terapisi, radyoterapi, kemoterapi ve reseptör tirozin kinaz inhibitörleri gibi konvensiyonel tedavilere karşı dirence de yol açtığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Burris, 2013; Ebbesen ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016; Zhang C. ve ark., 2016a). Bu yüzden PI3K/AKT yolağı kanserin önemli terapotik hedeflerinden biridir (Massacesi ve ark., 2016).



Şekil 2.6. PI3K/AKT yolunun işlevleri (Blume-Jensen ve Hunter, 2001)

2.2.1. PI3K İnhibitörleri

PI3K yolağının birçok kanser türünde proliferasyon, sağkalım, metastaz ve anjiyogenez gibi mekanizmalar ile kanser gelişimi ve tedavi direnci ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Reseptör tirozin kinazların ekspresyonundaki artış, PI3K'ın katalitik ve regülatör alt birimini kodlayan genlerin mutasyonları veya amplifikasyonları, PTEN'in fonksiyonel kaybı, Akt ve mTOR ekspresyonundaki ve/veya aktivitesindeki artış, bu sinyal yolağının onkojenik aktivasyonuna yol açan değişikliklerdir. Pek çok kanser türünde yolağın aşırı çalışması bu yolağın bileşenlerine ait inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Günümüzde prelinik ve klinik çalışmalarda özellikle kanser tedavisinde bu konuda araştırmalar devam ediyor.

İlk çıkan PI3K inhibitörleri tüm sınıf I izoformlarını hedef alan ATP kompetitif ajanlardır. Bunlar Pan-PI3K inhibitörleri, dual pan PI3K ve mTOR inhibitörleridir. Klinik öncesi çalışmalarda güçlü anti-tümör etkinlik göstermesine rağmen, klinikteki başarısı daha geride kalmıştır. Çünkü spesifite eksikliği, feedback loop sinyalinin sürdürülmesi, genetik ve epigenetik değişikliklerin birlikte bulunması etkinliklerini kısıtlamaktadır. Ayrıca pan-PI3K inhibitörlerinin tüm sınıf I PI3K izoformlarını inhibe etmesi birçok yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur ve bu yüzden izoform selektif inhibitörler geliştirilmiştir. İzofom spesifik inhibitörler daha az toksik etki ve daha fazla etkinlik ile klinikte ön plandadır (Polivka ve Janku 2014; Zhao ve ark., 2017). günümüzde PI3Kδ inhibitörü İdelalisib kronik lenfositik lösemi ve indolent lenfomalı hastalarda başarıya ulaşmıştır ve bu hastaların tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır.

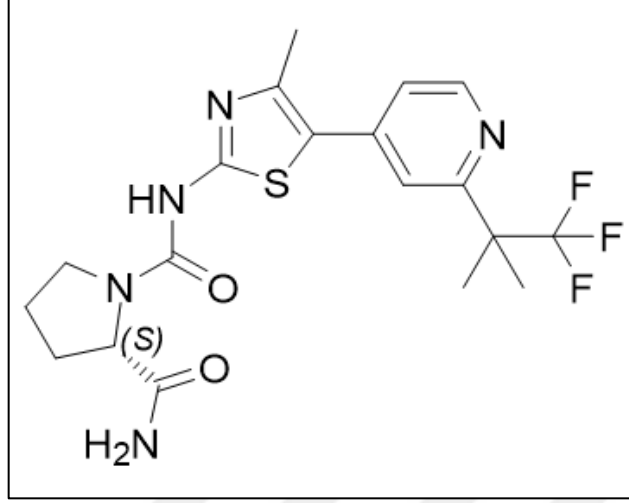
(www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm406387.htm)

2.2.2. PI3Kα İnhibitörü BYL719

BYL719, PI3K p110α için selektif bir inhibitördür ve özellikle somatik PI3Kα mutasyonları ve PTEN kaybı ile karakterize olan kanserlere karşı potent olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2016; Zhang C. ve ark., 2016a) (şekil 2.7). Hücre döngüsünün G0/G1 fazını bloke ederek hücre proliferasyonunu yavaşlatır. PI3K p110α inhibitörü BYL719 meme kanseri, baş boyun, myeloma ve osteosarkoma gibi çeşitli kanser hücre hatlarında, çeşitli çalışmalarda denenmiş apoptozu indükleyerek

antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Azab ve ark., 2014; Garrett ve ark., 2013; Gobin ve ark., 2015; Keam ve ark., 2015). Aşırı HER2 eksprese eden meme kanseri hücre modelinde anti-MEK ya da anti-HER2 ile birlikte etkili antitümör tedavi için PI3K inhibisyonunun da gerekli olduğu önerilmiştir (Serra ve ark., 2011). Hem in vitro hem in vivo çalışmalar ile HER2+ PTEN- meme kanserinde BYL719 ile HER2 antikoru ile tedaviye karşı direncin geriye döndüğü gösterilmiştir (Zhang C. ve ark., 2016a). Bununla birlikte başka bir çalışmada mantle hücreli lenfomada BYL719 ile p110 α inhibe edilerek stromal hücre aracılı ibrutinib direnci aşılmıştır (Guan ve ark., 2018).

Ksenograft modellerde yapılan çalışmalarda ; küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunun MEK inhibitörlerine karşı duyarlılığın artırılması ve Akt/PKB aracılı direncin kırılması için BYL719 ile birlikte kullanılması önerilmiştir (Ku ve ark., 2015). İki farklı mürin prelinik osteosarkoma modelinde BYL719 ile Ki67+ hücrelerin ve tümör vaskularizasyonun azalmasına bağlı tümör progresyonunda ve tümör ektopik kemik formasyonunda önemli oranda gerileme olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmanın devamında kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapotik ifosfamide ile PI3K inhibitörünün (BYL719) birlikte kullanımının osteoklast ve osteoblast farklılaşması üzerine dual aktivite gösterdiği bildirilmiş ve birlikte kullanımının altı çizilmiştir (Gobin ve ark., 2015). PI3K α mutant inhibitörü GDC0032 ile aromataz eksprese eden meme kanseri modelinde letrozol gibi endokrin terapiye duyarlılığın arttığı ortaya konmuştur (Hoeflich ve ark., 2016). Günümüzde de çeşitli kanserlerin tedavisi için klinikte faz 1 ve 2'de araştırılmaya devam ediyor Ayrıca isoform spesifik inhibitör BYL719, Pan PI3K inhibitörleri ile karşılaştırıldığında, hayvan modellerinde glukoz metabolizması açısından daha güvenli bir profil çizmiştir (Fritsch ve ark., 2014). Ancak p110 α selektif inhibitörlerin önemli dezavantajı insülin sinyali ve glukoz metabolizmasına aracılık eden ana isoform olduğu için yan etkilerinin çok fazla olmasıdır. Glukoz homeostazisi üzerine p110 α selektif inhibitörlerin etkisi göz önünde bulundurularak tedavi yaklaşımları geliştirilmelidir.



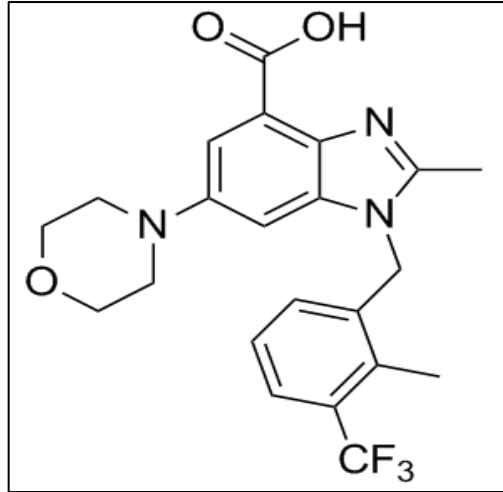
Şekil 2.7. BYL719'un yapısı

2.2.3. PI3Kβ İnhibitörleri GSK2636771 ve TGX221

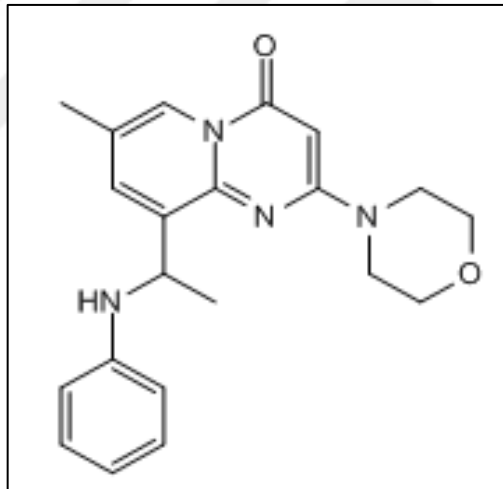
Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile PI3K p110β alt tipinin ovaryum meme kolon ve mesane gibi kanser dokuları ve hücre dizilerinde yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir (Benistant ve ark., 2000). Özellikle PI3K'in negatif regülatörü tümör süpresör protein PTEN'in kaybı ile karakterize olan kanserlerde p110β alt ünite aşırı aktifleşir ve bu yüzden terapotik hedeflerden biridir (Liu ve ark.,2009).

GSK2636771, PI3K p110β spesifik inhibitördür. PI3Kβ eksprese eden ya da PTEN kaybı ile karakterize olan tümörlerde, tümör büyümesini inhibe eder. Günümüzde çeşitli kanserlerde klinikte faz 2 çalışmalarında araştırılmaya devam ediyor (şekil 2.8).

TGX221 de PI3Kβ spesifik bir inhibitördür (şekil 2.9). Preklinik çalışmalarda özellikle prostat glioblastoma kanserlerinde tümör gelişimini önemli oranda yavaşlatmaktadır (Chen ve ark., 2015; Yang X. ve ark., 2017).



Şekil 2.8. GSK2636771'in yapısı



Şekil 2.9. TGX221'in yapısı

2.3. Protein Kinaz C (PKC)

Bir serin-treonin kinazlar ailesi olan protein kinaz C (PKC) izozimleri, hücre proliferasyonunda ve malin transformasyonda önemli düzenleyicileridir. 1970'lerde tümöre aracılık eden forbol esterler için bir hücresele reseptör olarak tanımlanmıştır (Kikkawa ve ark., 1983). Memeli PKC'leri farklı kromozomlarda yer alan 9 farklı genin ürünleridir ve 10 farklı alt tipten oluşurlar. Altıtip yapılarına ve fonksiyonlarına göre klasik (α , β , γ) novel (δ , ϵ , η , θ) ve atipik olarak 3 grupta (cPKC, nPKC ve aPKC) sınıflandırılmıştır. Sadece cPKC ve nPKC sınıflarının üyeleri diaçilgliserol (DAG; membran reseptörlerinin uyarılması ile geçici olarak üretilen lipid yapıda bir ikincil mesajcı) tarafından aktive edilir. DAG regülatör bölgede C1 domaine bağlanarak forbol esterlerin etkisini taklit eder. Sadece cPKC'ler kalsiyum duyarlıdır, çünkü kalsiyum bağlayıcı bir C2 alanı vardır (nPKC'lerde C2 alanı kalsiyuma duyarsızdır). aPKC'ler çeşitli düzenleyici özellikler gösterirler, DAG veya kalsiyumu bağlayamazlar ve aktivasyonları için protein-protein etkileşimleri ve fosforilasyon gerekir. Tüm bu farklılıklardan dolayı PKC ailesi çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık eder. PKC izozimlerinin ekspresyon düzeyi neoplastik hastalıklarda çok değişkendir. Ekspresyondaki değişikliklerin hastalık progresyonu ile ilişkisinin olup olmadığı da net olarak bilinmemektedir (Garg ve ark., 2014). Ekspresyondan başka tümörlerde PKC'lerin aşırı aktivasyonu ya da düşük aktivasyonu ile ilgili henüz çok az deneysel çalışma yapılmıştır.

PKC α , bazı çalışmalarda pro-tümörojenik etki gösterirken, bazı çalışmalarda çeşitli hücre tiplerinde büyümeyi inhibe etmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) PKC α aktivasyonunun, hücre büyümesinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. NSCLC hastalarında ise PKC α inhibitörü aprinocarsenin kemoterapötiklerle birlikte ya da tek başına uygulamasının belirgin bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur. PKC β izoformlarının ise lenfoma, glioblastoma, meme, prostat gibi birçok kanser türünün ilerlemesinde rol oynadığı bilinir. PKC δ , yaygın olarak pro-apoptotik ve anti-proliferatif kinaz olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca PKC δ , kemoterapötik ajanların ve radyoterapinin ölüm mediyatörü olduğu hem DNA hasarı hem de reseptör aracılı hücre ölümünde rol oynadığı bildirilmiştir (Garg ve ark., 2014). Meme kanseri hücrelerinin invazyonunda ise PKC δ 'nin etkileri çift yönlü olarak ortaya konmuştur. Migrasyon

kapasitesi yüksek olan BT-549 meme kanseri hücrelerinde PKC δ 'nın aşırı ekspresyonu migrasyonu azaltırken MCF-7 hücrelerinde PKC δ 'nın down-regülasyonu MMP-9 sekresyonunu ve motiliteyi artırıcı etki göstermiştir. Başka bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde migrasyonun uyarılması için PKC δ 'nın gerekli olduğu bildirilmiştir.

2.3.1. PKC Epsilon (PKC ϵ)

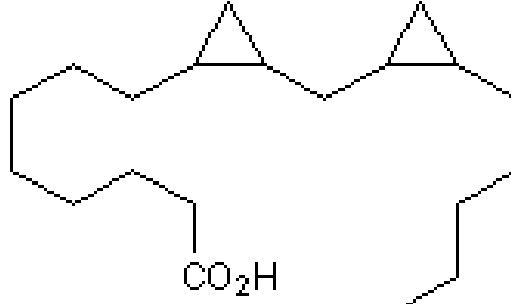
PKC ϵ ilk olarak, cDNA klonlamasıyla yeni PKC izotipleri arasında tanımlanmıştır ve kalsiyumdan bağımsız, bir phorbol ester/diaçilgliserol duyarlı serin/treonin kinaz olarak karakterize edilmiştir (Newton ve Messing, 2010).

Sistemik düzeyde PKC ϵ aktivasyonunun birçok hastalıkta koruyucu etkileri gösterilirken kontrolsüz aktivasyonu kanser gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Akita, 2002). PKC ϵ çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edilir ve hücre çoğalması, sağkalımı, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), hücreler arası matriksin yeniden düzenlenmesi ve terapi direnci gibi durumlarda rol oynar (Gorin ve Pan, 2009). İlk önce sıçan fibroblast hücrelerinde aşırı ekspresyonu hücre kültüründe büyüme oranındaki artış ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonra PKC ϵ 'nin çeşitli tümör hücrelerinde TRAIL aracılı (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) apoptozdan hücreleri koruduğu bulundu (Gillespie ve ark., 2005; Shinohara ve ark., 2001; Sivaprasad ve ark., 2007). Ayrıca meme kanserinde PKC ϵ 'nin agresif ve invazif fenotipin ortaya çıkmasında rol oynadığı ortaya konmuştur (Pan ve ark., 2005). PI3K/AKT ya da MAPK/ERK1/2 sinyal yolları PKC ϵ indüklü transformasyonun araçlarıdır (Sand ve ark., 2010).

2.3.2. PKC ϵ Aktivatörü (FR236924)

FR236924, selektif PKC ϵ aktivatörüdür. Linoleik asit türevidir (şekil 2.10). İn vitro çalışmalarda glutamaterjik terminaller üzerinde presinaptik $\alpha 7$ nikotinik reseptörler ile glutamat salınımını uyardığı ve in vivo çalışmalarda kognisyonu arttırdığı gösterilmiştir (Tanaka ve Nishizaki, 2003; Yamamoto ve ark., 2005). Henüz kanser üzerinde etkilerini gösteren bir çalışma yoktur. Deneysel inflamatuvar hastalık modellerinde vagal sinir uyarımı ile proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaldığı ve inflamasyon sürecinin inhibe olduğu bilinmektedir. Vagal sinirin temel nörotransmitteri olan asetilkolin, $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörü yoluyla immün hücre fonksiyonlarını kontrol etmektedir. Farmakolojik olarak nikotinik agonistlerin inflamatuvar sinyali ve

proinflatuar sitokinlerin üretimini inhibe etmede asetilkolinden daha etkili olduğu bilinmektedir (de Jonge ve Ulloa, 2007).



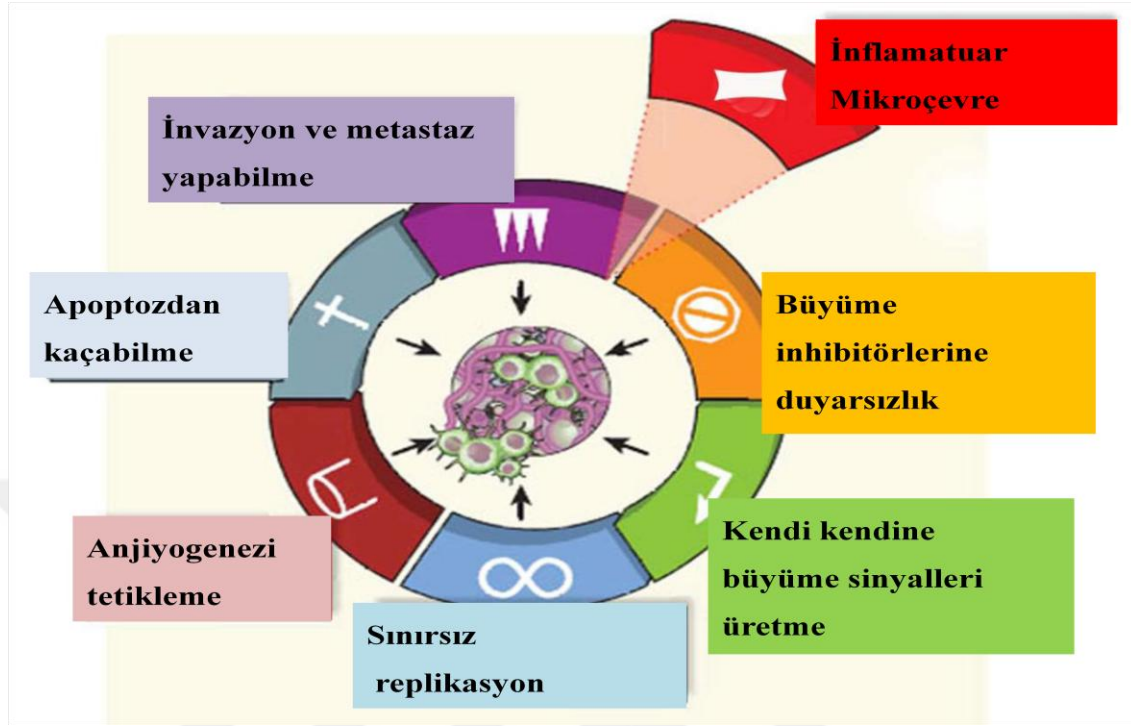
Şekil 2.10. FR236924'ün yapısı

2.4. Kanser

Kanser, bir hücre ya da hücre grubunun, organizmanın sahip olduğu kontrol mekanizmalarının etkisinden çıkıp kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Organizmada bu kontrol mekanizmalarının doğru çalışmaması durumunda normal hücreler yapı ve fonksiyon değiştirerek tümör karakteri kazanabilirler (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu nedenle kanser, hücrede meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu oluşan bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (Ponder, 2001).

Yıllardır devam eden çalışmalar ile kanser tipine bağlı olmaksızın, tüm malignant hücrelerde var olan ve kanser tedavisinde hedeflenen altı temel özellik tanımlandı (Hanahan ve Weinberg, 2011) (şekil 2.11). Bu özellikler;

- 1-Dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama,
- 2-Büyüme durdurucu sinyallere karşı duyarsız olma,
- 3-Programlı hücre ölümünden kaçabilme,
- 4-Yaşlanmaya direnç gösterme ve sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olma,
- 5-Yeni kan damarları oluşturabilme,
- 6-Farklı dokuları istila edebilme ve göç edebilme (metastaz)



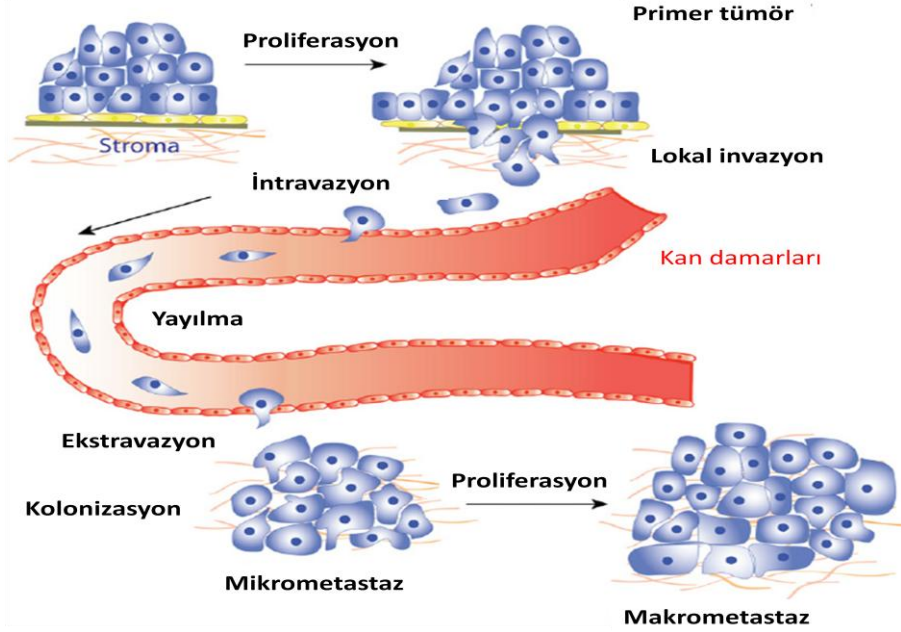
Şekil 2.11. Kanser tedavisinde hedeflenen malin hücrelerin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2000)

2.4.1. Metastaz

Metastaz, bir kanser hücresinin köken aldığı bölgeden ayrılarak farklı doku ve organlara taşınıp orada kontrolsüz bir şekilde büyümesidir. Lokal invazyon, intravazyon, hematojenik ve lenfojenik yayılma, ekstravazyon ve kolonizasyon gibi birbirileri ile ilişkili çok basamaklı olaylar zinciri ile gerçekleşir (şekil 2.12). İlk olarak, büyümekte olan tümör kitlesi ihtiyacı olan besin ve oksijen kaynağını sağlayabilmek için besin kaynaklarına doğru ilerlemek zorundadır. Belirli bir büyüklüğe ulaşan tümör kitlesi, birtakım anjiyogenik faktörleri sentezleyerek yeni damarların oluşumunu uyarırlar ve sonra komşu hücrelerle olan bağlarını koparıp primer tümör dokusundan ayrılırlar. Tümör hücreleri daha sonra ekstraselüler matrikse geçerek burada ilerlerler ve çevre dokulara ulaşırlar ya da dolaşım sistemine geçip uzak dokuları işgal ederler. Bu sayede yaşamlarını ve çoğalmalarını sürdürürler (Steeg, 2006).

Kanser ölümlerinin büyük bir kısmı tedaviye direnç gösteren metastazlardan dolayı olmaktadır. Tümör mikroçevresi ile ilişkili birçok faktör ve kanser hücrelerinin biyolojik çeşitliliği metastaz tedavisinde ciddi bir engel oluşturmaktadır (Weigelt ve ark., 2005).

Tümör mikroçevresinde tümör dahil çok çeşitli hücreler tarafından salınan kemokinlerin ve reseptörlerinin rollerinin anlaşılması metastatik sürecin aydınlatılmasına ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarla kemokinlerin tümör mikroçevresi ve metastatik süreçteki etkilerini açıklayan birkaç basamak ortaya konmuştur. Bunlar özetle; ELR+ CXC kemokinler nötrofil infiltrasyonuna neden olarak ve endotel hücrelerini ortama çekerek anjiyogenezi uyarırlar. Böylece tümör gelişimi için ihtiyacı olan ortam inşa edilir. Öte yandan tümör mikroçevresindeki kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF), endotelial hücreler ve lökositler de ayrıca kemokin kaynaklarıdır ve parakrin olarak tümör gelişimini desteklerler. Çeşitli kemokinler hücre içi sinyaller aracılığı ile tümör hücrelerinin proliferasyonunu uyarırlar. Tümör çevresinde oluşan inflamatuvar kemokin ağı (IL-8) makrofajlar ve myeloid kökenli baskılayıcı hücreleri ortama toplayarak sitotoksik immünitenin baskılanmasına neden olur. Ayrıca bu hücrelerin salgıladığı degrade edici enzimler de hücreler arası matriksin yapısını bozar ve metastaza elverişli çevre tetiklenir (şekil 2.13).

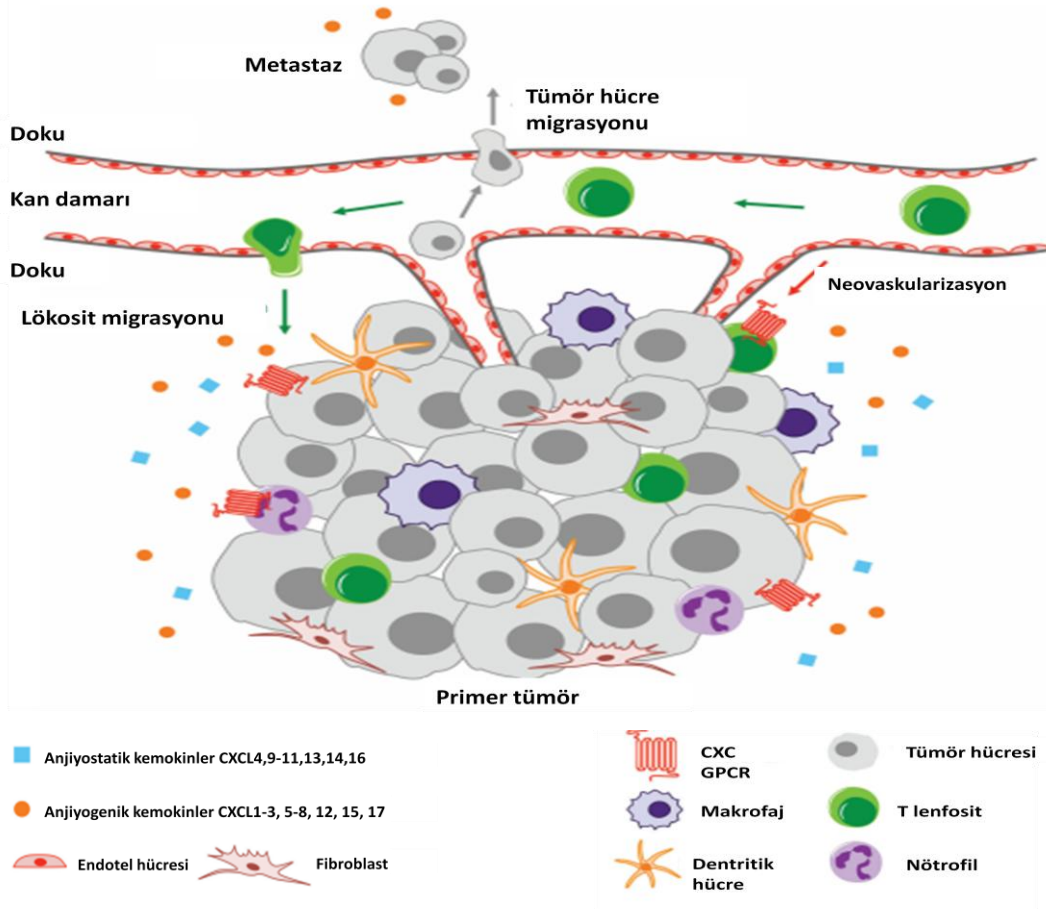


Şekil 2.12. Metastaz aşamaları (Saxena ve Christofori, 2013)

2.4.2. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (Jemal ve ark., 2011). Dünya çapında akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir. Amerika'da her yıl 220.000'den fazla kadın meme kanseri teşhisi almakta ve 40.000'den fazla kadın ise meme kanserinden hayatını kaybetmektedir.

Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2016'da yayınladığı Türkiye Kanser İstatistikleri bilgilerine göre de Türkiye'de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45'inin 50- 69 yaş arasında olduğu, %40'ının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir. Meme kanseri evreleri incelendiğinde veri tabanında yer alan invaziv vakaların %10'u ileri evrededir. Meme kanseri genellikle lenf nodu, kemik ve akciğer başta olmak üzere karaciğer ve beyin gibi organlara metastaz yapmaktadır (Minn ve ark., 2005b).



Şekil 2.13. Tümör gelişiminde kemokinler ve reseptörleri (Jaffer ve Ma, 2016)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Takibi

Çalışmada fare meme kanseri hücre hattı 4T1'in farklı organlara metastaz yapmış alt tipleri kullanılmıştır. 4T1 hücreleri, Balb-c farelerde kendiliğinden oluşan oldukça agresif metastatik meme kanseri hücre hattıdır. 4THM hücreleri, 4T1 tümör hücreleri enjekte edilen farelerin kalp metastazlarından elde edilmiş hücrelerdir. 4TBM ise 4THM hücreleriyle oluşturulan tümör modelinde beyine metastaz yapan hücrelerdir.

Hücre kültür çalışmaları steril laminar hava akımlı çalışma kabininde yapıldı. Sıvı nitrojende saklanan hücreler, 37°C su banyosunda çözüldü ve 10 mm'lik hücre kültür petrilere ekildi.

Metastatik meme kanseri hücreleri 4THM ve 4TBM'nin, normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan ortamda; DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine % 5 fetal sığır serumu (fbs), 1 mM sodyum piruvat, 0.02 mM non-essential amino asit ve 40 mg/ml gentamisin eklenerek çoğaltıldı. Hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve kontaminasyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak takip edildi. Petrilere %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

3.1.2. Hücrelerin Sayımı

Metastatik meme kanseri hücre hatları (4TBM ve 4THM) petri zeminine tutunma özelliği gösterdiği için sayım için öncelikle petri zemininden ayrılmaları sağlandı. Bu işlem için, hücrelerin içinde bulunduğu petrilere besiyerleri çekilip atıldı. Üzerine 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek 1-2 dk içerisinde zeminden ayrılınca, 1:3 oranında besiyeri eklenerek, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Tripsin-EDTA'lı besiyeri uzaklaştırmak için 700 rpm'de 3 dk. santrifüjlenen 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. Hemisitometre (Thoma lamı) ile sayım yapıldı. Belirlenen hücre sayısını elde

etmek için seyreltme miktarı hesaplanarak, belirlenen oranlarda hücre süspansiyonu elde edildi ve 200 µl'de 500 ve 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekim yapıldı.

3.1.3. Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi)

Ajanların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için WST-1 kiti (Cell Proliferation Reagent WST-1, Abcam) kullanıldı. WST-1 solüsyonu %5 FBS içeren besiyeri ile 1:10 oranında karıştırılarak hazırlandı. Kuyucuklardan supernatantlar çekildi ve her bir kuyucuğa 100 µl %10 WST-1 içeren besiyeri eklendi. Daha sonra 96 kuyucuklu hücre kültür petripleri 37 °C'de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonunda 440 nm dalga boyu aralığında spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Bu işlem 4000 hücreli tedavi gruplarına 48 saat sonra, 500 hücreli tedavi gruplarına 72 saat sonra uygulandı. KCjunior (BIO-TEK) programı kullanılarak hücre sayıları çıkan değerlere göre hesaplandı. Excel programında her grubun ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplandı ve grafikleri oluşturuldu.

3.1.4. Hücre sayısını Belirlemek için Standart Hazırlanması

Hücre kültür petrisinden besiyeri uzaklaştırılarak 1 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi, Hücrelerin tamamının petri yüzeyinden ayrılması sağlandı ve Tripsin-EDTA'nın etkisini nötralize etmek için taze besiyeri eklendi. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra ilk standart 120.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu petriye ekildi. Her bir kuyucukta bir öncekinin yarısı kadar hücre olacak şekilde hücreler seyreltilerek ekildi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda her bir kuyucuğa %5 FBS'li besiyeri ile hazırlanan %10'luk WST-1 100µl eklendi. 3 saat inkübasyon sonrasında spektrofotometrede 440 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen değerler KCjunior programı kullanılarak hesaplandı. Kullanılan her bir hücre hattı için bu işlem yapıldı.

3.2. Kullanılan Ajanların Stok Solüsyonlarının ve Tedavi Konsatrasyonlarının Hazırlanması

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

BYL719 (MedChem, HY-15244-2) 10 mg 2,267 ml DMSO içinde çözüldü. Deneylerde kullanılmak üzere 10 mM'lık stok solüsyonlar halinde hazırlandı. 50 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

GSK2636771 (Adooq, A11784-10), 10 mg, 2,309 ml DMSO içinde çözüldü. Deneylerde kullanılmak üzere 10 mM'lık stok solüsyonlar halinde steril koşullarda (laminar flow) hazırlandı ve 50 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

TGX221 (Tocris, 5832) 10 mg, 2,74 ml DMSO içinde çözüldü. Deneylerde kullanılmak üzere 10 mM'lık stok solüsyonlar halinde steril koşullarda hazırlandı ve 50 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

FR236924 (Tocris, 3091) 10 mg, 3,24 ml çözüldü. Deneylerde kullanılmak üzere 10 mM'lık stok solüsyonlar halinde steril koşullarda hazırlandı ve 50 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

4TBM ve 4THM hücre hatları her kuyucukta 500 ve 4000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekildikten sonra etüvde 24 sa inkubasyona bırakıldı. 24 saat sonra tedaviye başlangıç anındaki hücre sayısını belirleyebilmek için 96 kuyucuklu petrinin bir sırasındaki kuyucuklara 100 µl %10 WST-1 koyuldu. 3 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 420-600 nm dalga boyunda okuma yapıldı ve bu grup time zero (T0) olarak adlandırıldı. Her bir hücre dizisi kulanacağımız ajanların belirlediğimiz konsantrasyonları (PI3K inhibitörleri BYL719, TGX221 ve GSK2636771 için 0,01-10µM, PKC aktivatörü FR236924 için 0,01-10 µM, SB225002 için 1 µM) (SP 10-0,001 ile muamele edildi Tedaviler 500 hücreli gruplar için %5 ve 4000 hücreli gruplar için %0,2 FBS içeren besiyeri ortamında kuyucuk başına 200 µl hacminde uygulandı.

3.3. ELISA

Metastaz oluşumunda önemli rolünün olduğu bilinen CXCR2 ligandlarından makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) ve KC sekresyonu üzerine ajanların etkisini araştırmak için Elisa yöntemi kullanıldı.

3.3.1. Örneklerin Hazırlanması

4TBM ve 4THM hücre hatları 96 kuyucuklu petrilere 500 ve 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde %5 FBS içeren ortamda ekildi, 24 saat sonra tedaviler 500 hücre için % 5 ve 4000 hücre için % 0,2 FBS içeren besiyeri ortamında uygulandı. Tedavi başlangıcındaki hücre sayısını belirlemek için bir sıraya %10 WST-1 kiti koyuldu. 48 ve 72 saat sonra sırasıyla 4000 ve 500 hücreli tedavilerin **supernatantları toplandı** ve bu supernatantlar **MIP-2** ve **KC** düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlemek üzere -80°C dolaba kaldırıldı. Eş zamanlı olarak tedavi sonundaki hücre sayısındaki değişiklikler WST-1 kiti ile belirlendi. ELISA sonuçları hücre sayılarına eşlenerek grafikler oluşturuldu.

3.3.2. Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate buffer saline, Pbs)

8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak, 800 ml distile su içinde çözüldü. pH 7.4' e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon otoklavda steril edilerek kullanıldı.

3.3.3. ELISA Yöntem Protokolleri

Fare MIP-2 ELISA (Antigenix America, RMF431CK)

Solüsyonların hazırlanması

Capture Ab: Kit içindeki 50µg capture antikor içine 500µl ddH₂O eklendi (0,1µg/ml).

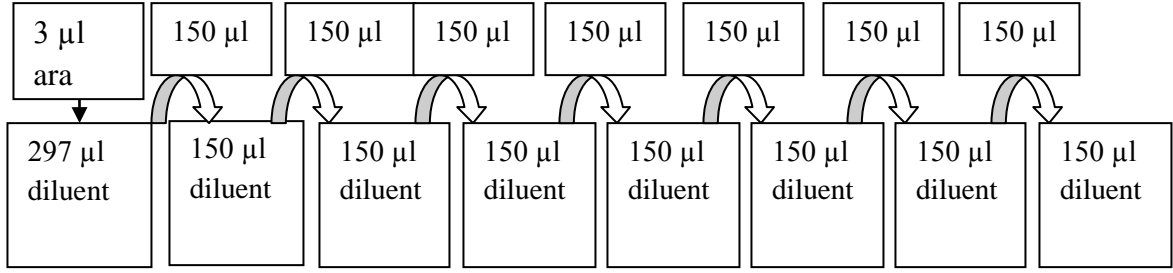
Alikotlandı, -20°C'de saklandı. (1ml PBS + 1µl capture Ab)

Tracer Ab: Kit içindeki 25µg tracer antikor içine 500µl ddH₂O eklendi. Alikotlandı,

-20°C'de saklandı. (1ml diluent + 1µl tracer Ab)

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

1. standart : 2000 pg/ml ile başlar.



Şekil 3.1. Fare MIP-2 ELISA standart hazırlama yöntemi

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

Bloklama solüsyonu: PBS içinde %5 FBS

Yıkama solüsyonu: PBS içinde %0,05 Tween20

HRP: Diluent ile 1:1000 oranında hazırlandı.

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

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄

Protokolün uygulanması

Yukarıda belirtildiği şekilde (0,625 µg/ml) Capture antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, 96 kuyucuklu high binding petrinin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- 0,3 µg/ml oranında hazırlanan detection (tracer)100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.

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

Fare KC ELISA (Antigenix America, RMF428CK)

Solüsyonların Hazırlanması

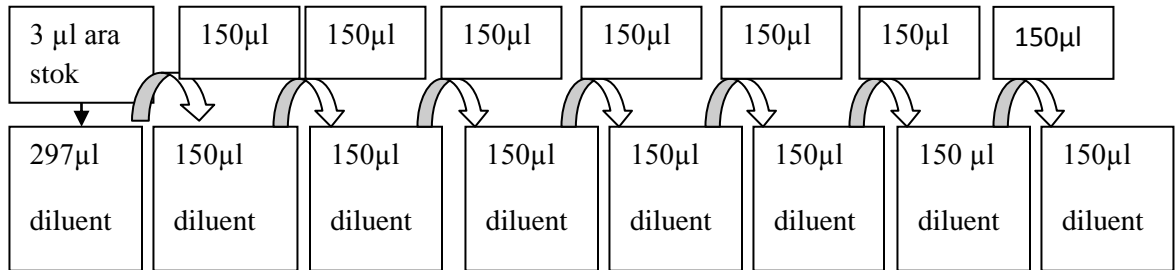
Coating buffer: Pbs

Capture Ab: Kit içindeki 50µg capture Ab içine 1000µl %1 BSA PBS eklenir. Alikotlanır, - 80 dolapta saklanır. 1:750 oranında hazırlanır.

Tracer Ab: Kit içindeki 25µg tracer direk alikotlanıp -80dolapta saklanır. 1:1500 oranında diluent ile hazırlanır.

Standart: Kit içindeki standart içine 50µl %1BSA PBS eklenir. 5µl ana stok+500µl %1BSA PBS ile ara stok hazırlanıp 100kez sulandırılarak kullanılır.

1. standart : 4000 pg/ml ile başlar



Şekil 3.2. Fare KC ELISA standart hazırlama yöntemi

Diluent: %5 FBS in PBS

Blocking buffer: %5 FBS in PBS

Wash Buffer: %0,05 Tween20 in PBS

HRP: 1:15000 oranında dilüent ile hazırlanır.

Substrat: TMB A ve B 1:1 oranında karıştırılır. Işıktan korunur.

Stabilizer (5X): 4 ml ddH₂O + 1 ml stabilizer

Protokolün uygulanması

Yukarıda belirtildiği şekilde capture antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, 96 kuyucuklu high binding petrinin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu oda ısısında inkübe edildi.
- 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300µl dağıtıldı.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- 0,3 µg/ml oranında hazırlanan detection (tracer)100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 30 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 100 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.

- 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCJunior programında hesaplandı.

3.4. Western Blot

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.

3.4.1. Hücre Lizatının Hazırlanması

Triton-X Lizis Tamponu

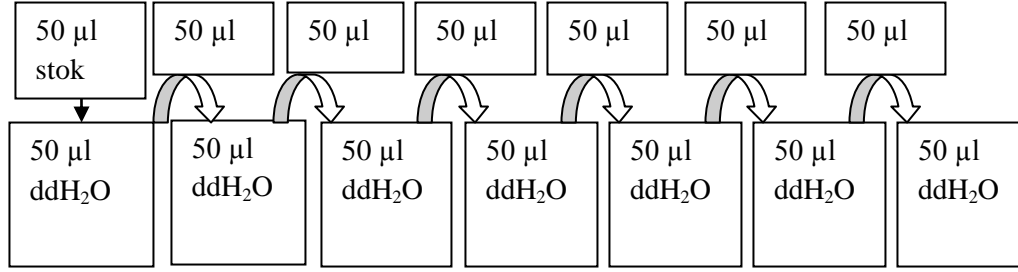
100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl₂-Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadat (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche). Solusyon pH: 7,4 (pH metre:Hanna Instruments pH 211)' e ayarlandı.

Uygulama

4THM ve 4TBM hücreleri kuyucuk başına 300.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere %5 fbs içeren besiyeri ortamında ekildi. 24 sa. inkubasyonun ardından, belirlenen tedaviler (PI3K α inhibitörü BYL719 10 μ M, PKC ϵ aktivatörü FR236924 25 μ M, tek başına ve CXCR2 antagonisti SB225002 (1 μ M, 10 μ M) ile birlikte % 0,2 fbs içeren besiyeri ortamda uygulandı. Tedaviden 40 saat sonra besiyeri uzaklaştırılarak hücreler soğuk 1xPBS ile yıkandıktan sonra 6 kuyucuklu petrinin her bir kuyucuğuna 250 μ l Triton-X Lizis tamponu eklendi. Hücreler pipetajla kaldırıldı ve steril 1,5 ml'lik deney tüpüne toplandı. Buz içinde 30 dk tutulan örnekler 1 dk. vortekslendikten sonra 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant lizat olarak steril bir 1,5 ml'lik deney tüpüne transfer edildi. Örnekler kullanılana kadar -80 °C'de saklandı.

Örneklerdeki Protein Miktarının Belirlenmesi

Her bir lizatın eşit miktarda protein içermesi için protein miktar tayini yapılmıştır.



Şekil 3.3. Protein assay standart hazırlama yöntemi

-Stok Standart 2,66mg/ml

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

-Örneklerden 5µl alınarak 95µl ddH₂O ile dilue edilir. 1,5 ml'lik deney tüpünde hazırlanan bu dilüsyonlardan 5µl ve 10 µl alınarak 96 kuyucuklu petriye koyulur ve 1X Dye ile 170 µl' ye tamamlanır.

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

-Yarım saat karanlıkta oda ısısında bekletilir.

-Spektrofotometre cihazında 595 nm'de okunur.

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

3.4.2. Western Blot Protokolü

Western Blot yönteminde kullandığımız solüsyonlar:

Resolving Buffer:

1,5 M TrisBase pH: 8.8

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

Stacking Buffer:

0,5 M TrisBase pH:6,8

1 lt için 60,5 gr trisbase tartılır ve distile suda çözülür.

10x Running Buffer:

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

4. 10x TBS:

Tris base 24.2 gr + NaCl 80gr + 800 ml ddH2O çözülür. pH : 7.6'ya ayarlanır. 1lt'ye kadar ddH2O koyulur.

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

5. 2x SDS Loading Dye:

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

6. %10 APS:

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

7. Transfer Buffer:

3,75gr glisin + 7,25gr TrisBase 1 lt distile suda çözülür. Karışıma 250 ml metanol eklenir. Solüsyon+4'de saklanmalıdır. Kullandığımız transfer tankı için 2.5 lt hazırlanmalıdır.

8. Akrilamid/Bisakrilamid:

29:08 oranında karıştırılarak hazırlanır.

9. Commasive Blue :

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

Tablo 3.1. Poliakrilamid jelin hazırlanması

Jelin Hazırlanması

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

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

Büyük jel Dökülüyorsa

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

Örneklerin hazırlanması

Örneklerden belirlenen miktarda alındı, örnek miktarının yarısı kadar 2x SDS-β-merkaptolanol (loading dye) eklendi. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 95°C'de 4 dk kaynatıldıktan sonra kısa bir santrifüj yapıldı ve örnekleri jele yükleme basamağına geçildi.

Örneklerin Jele Yüklmesi

%10 poliakrilamid jel hazırlandı ve jelin ilk kuyusuna 8 µl, eğer boş kalıyorsa son kuyusuna örneklerin düzgün yürümesi ve bantların kaymaması için 20 µl loading dye yüklendi. İlk aşamada 120V akım verildi örnekler üst jeli geçince akım örnekler jelin

sonuna kadar 150 V'da yürütüldü ve böylece proteinler elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmış oldu.

Transfer Aşaması

Jel kullanılacağı kısımlardan kesildi ve transfer buffer içinde 1-2 dak bırakıldı. Sandviç hazırlanırken, süngerler ve whatman kağıtları transfer bufferda ıslatıldı. PVDF membran methanolde 1dk ıslatıldı. Ve sırasıyla; Siyah yüzey -sünger- whatman kağıdı (2 kat) –Jel –Membran-whatman kağıdı (2 kat) -sünger-beyaz yüzey şeklinde sandviç hazırlandı.

Tabakalar arasında hava kabarcığı kalmaması için her aşamada cam tüp tabakaların üzerinde gezdirildi. Sandviç kapatıldı ve sandviçin siyah yüzeyi tankın siyah tarafına gelecek şekilde cihaza yerleştirildi. Transfer buffer eklendi ve tankın kapağı kırmızı kutup kırmızıya siyah kutup siyaha gelecek şekilde kapatıldı. Buz içerisinde gece boyu 40 V'da transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer sonucunda sandviç siyah tarafından açıldı. Kurutma kâğıdıyla beraber jel membran üzerinden alındı. Membranın transfer yapılan kısmı işaretlendi (membranın jele bakan yüzeyi). Membran methanolde 1 dk kadar fikse edildi (membran kesinlikle kurutulmamalıdır).

Transfer kontrol işlemi için membran pons ile (3 dk), jel ise commasive boyası (10 dk) ile boyandı ve protein bantları görünür hale geldi. Boyalar solunmamalıdır, bu yüzden bu işlem kapaklı kaplarda yapılır. Boyama işlemi sonrasında membran 1x TBS-T ile , jel ise destain ile yıkandı.

Bloklama

TBS-tween20'de %5 süt tozu hazırlandı. Bloklama solüsyonu olarak kullanıldı. Membran bu solüsyonda oda ısısında 2 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

Blotlama (Antikorlar ile işaretleme)

Bloklama basamağından sonra işaretleme basamağına geçildi. İlk önce antikorların hazırlanacağı çözelti %1 BSA içeren TBS-T hazırlandı. Antikorla işaretleme işlemi için işaretlenecek kısımlarından kesilen membran pAkt için 1/1000 dilüsyonda gece boyu, pP38 için 1/1500 ve pErk1/2 için 1/2000 dilüsyonunda 2 saat primer antikor ile inkübe edildi (pAkt ; Cell Signaling, 4060, Ser473, p-ERK1/2 ; p-p44/42, Cell Signaling, 9106, Thr202/Tyr204, p-p38 MAPK Cell Signaling, 4511, Thr180/Tyr182). 1x Tbs-Tween20

ile yıkama işleminden sonra (4x10 dak) 1/3000 sekonder antikor (pAKT ve pP38 için antirabbit Sc-2004 , pERK1/2 için antimouse Sc-2005) ile 2sa oda ısısında inkube edildi ve daha önce yapılan yıkama işlemi tekrarlanarak işaretleme basamağı tamamlandı. Proteinlerin eşit oranda yüklendiğini ve transfer edildiğini göstermek için Gapdh housekeeping protein olarak kullanıldı (1:100000 x 2sa, Meridian Life Science, H86504M). Son olarak görüntüleme işlemi için membranlar, ECL (Electrochemiluminescence) (Biorad, 170,5061) ile oda ısısında 4 dk. inkube edildi ve kaset içine yerleştirildi.

Görüntüleme

Eski bir film üzerine membran, jele bakan yüzeyi yukarıda olacak şekilde yerleştirildi. Membran kasetteki şeffaf dosya arasına alındı, karanlık ortamda membrandaki ışımaya film üzerine aktarıldı ve yıkama banyosu yapılarak membrandaki bantlar film üzerinde görünür hale getirildi (Kodak, AI0241 0322).

3.5. Genel İstatiksel 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.

3.6. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler, kimyasallar, kitler ve cihazlar

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

3.6.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

- Hücre kültür petrisi, 100 mm (Corning)
- 6 kuyucuklu hücre kültür petrisi (Corning)
- 96 kuyucuklu hücre kültür petrisi (Corning)
- Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml) (BD)
- Hücre dondurma tüpleri (TRP)

- Steril serolojik pipet (BD)
- Pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Thermo scientific)
- 1,5 ml'lik deney tüpü (Axygen)
- PVDF-Plus, Transfer Membranı, (0.45 µM, 30cmx3m), (Milipore Kat No, ISEQ00010)
- Enjektör
- Thoma lamı (Marienfeld- C964730)

3.6.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

- Tris Base : Applichem Cat No: 77-86-1
- Glisin : Sigma Cat No: 85H07821
- Metanol : Merck: 106007 Tween20 : Cayman Cat No : 400035
- Temed : Applichem Cat No : 110-18-9
- Akrilamid : Biorad Cat No : 161-0156
- Amonyum Persülfat: Applichem Cat No : 7727-54-0
- Sodyum Dodesilsülfat : Sigma Cat No : 114H0311
- Merkaptotanol (%98, 100 ml): Sigma Cat No: M3148
- Bromofenol Mavisi (25 gr): Sigma Cat No: B0126
- Bovine Serum Albumin (100 gr): Sigma Kat No: A7906
- ECL Clarity Western Blotting Substrate 500 ml: BIO-RAD Kat No : 170-5061
- Marker (Protein Ladder (100 µl): Thermo scientific Kat. No : 26619
- Primer Antikor Rabbit pAKT (Cell signaling, 4060L)
- Primer Antikor Rabbit pERK, (Cell signaling, 9106L)
- Primer Antikor Rabbit pP38, (Cell signaling, 4511L)
- Sekonder Antikor Anti-Rabbit, (Santacruz, sc-2004)
- Sekonder Antikor Anti-Mouse, (Santacruz, sc-2005)
- Primer Antikor GAPDH, (Meridian, H86504M)
- Cell Proliferation Reagent WST-1, (Abcam, ab155902)
- Fare MIP-2 ELISA, (Antigenix America, RMF431CK)
- Fare KC ELISA, (Antigenix America, RMF428CK)

- FBS (Fetal Dana Serumu), (Gibco, 10270106)
- Tween 20, (Applichem,)
- Gentamisin, (nzytech MB16601)
- Sodyum klorür (Carlo Erba)
- Proteaz inhibitör kokteyli (Roche diagnostic)
- Süt Tozu (yağsız) (Pınar)
- Dimetil sülfoksit(DMSO) (Ambresco)
- Bradford Dye reagent 1X (Biorad-ABD)
- B-Merkaptoetanol (Merck)
- Gliserol (Biotech)
- Tripsin % 0.05 (1X) (Thermo scientific)
- Etanol (Merck)
- Methanol (Merck)
- DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biochrom, F4815)
- Non-essential amino asid (Biochrom - K 0293)
- Tyrpsin-EDTA (%0.25) (Sigma-T4049)
- Sodyum pirüvat 100 mM (Santa Cruz)
- 2-Betamerkaptoetanol 1000X (Merck, 8.05740.0250 250)
- BYL719 (MedChem, HY-15244-2)
- GSK2636771 (Adooq, A11784-10)
- TGX221 (Tocris, 5832)
- FR236924 (Tocris, 3091)
- SB225002 (Cayman,182498-32-4)

3.6.3. Kullanılan aletler ve gereçler

- Inverted mikroskop (Olympos)
- Class II Lamin Air (Esco)
- CO₂ inkübatörü (%5 CO₂) (Thermo)
- Buzdolabı (+4 ve -20) (Beko)
- Santrifüj (Eppendorf)

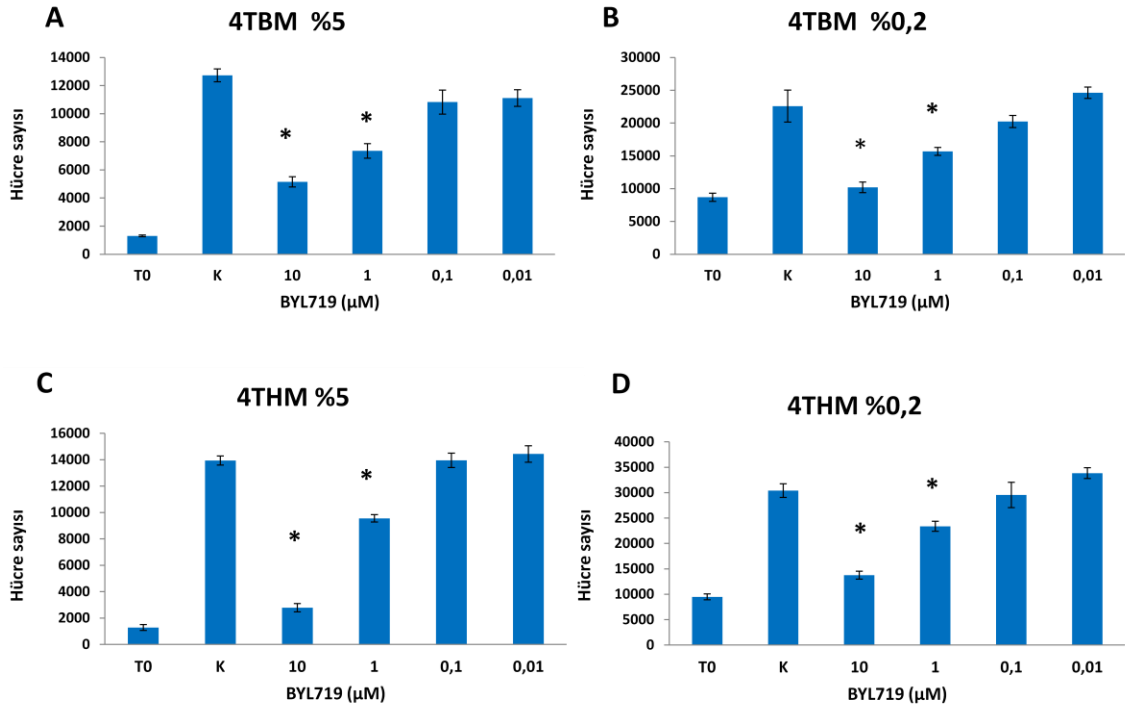
- Mikro santrifüj (Eppendorf)
- Derin dondurucu (-80 °C) (Thermo)
- Sıvı azot tankı
- Vorteks (Velp)
- Su banyosu (Memmert)
- Otoklav (Nüve)
- Transfer cihazı (Amersham)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Thermo)
- Elektroforez güç kaynağı (Amersham)
- Spektrofotometre (Thermo)
- Hassas Terazı (Denver instrument)
- Isıtılmalý Manyetik Karıştırıcı (Ika RH Basic)
- Distile su cihazı (GFL)
- Buz makinası (Uğur)
- Jel yürütme tankı (Biorad)
- Çeker ocak
- pH metre
- otomatik pipetler
- Laboratuar tipi derin dondurucu(-80) (Termo)

4. BULGULAR

4.1. PI3K α inhibitörü BYL719'un Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PI3K p110 α alt tipine spesifik inhibitör BYL719'un 0,01-10 μ M konsantrasyonları ile metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücre dizileri muamele edildi ve proliferasyonları üzerine olası etkiler araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi %5 FBS içeren besiyeri ortamında uygulanan tedavinin etkileri 72 saat sonra, %0,2 FBS içeren ortamdaki tedavinin etkileri 48 saat sonra belirlendi.

Sonuç olarak şekil 4.1'de görüldüğü gibi PI3K α inhibitörü hem serumlu hem de serumsuz ortamda konsantrasyon bağımlı olarak her iki hücrenin proliferasyonunu yavaşlattı. Özellikle 1 ve 10 μ M konsantrasyonun proliferasyonu belirgin olarak inhibe ettiği belirlendi.

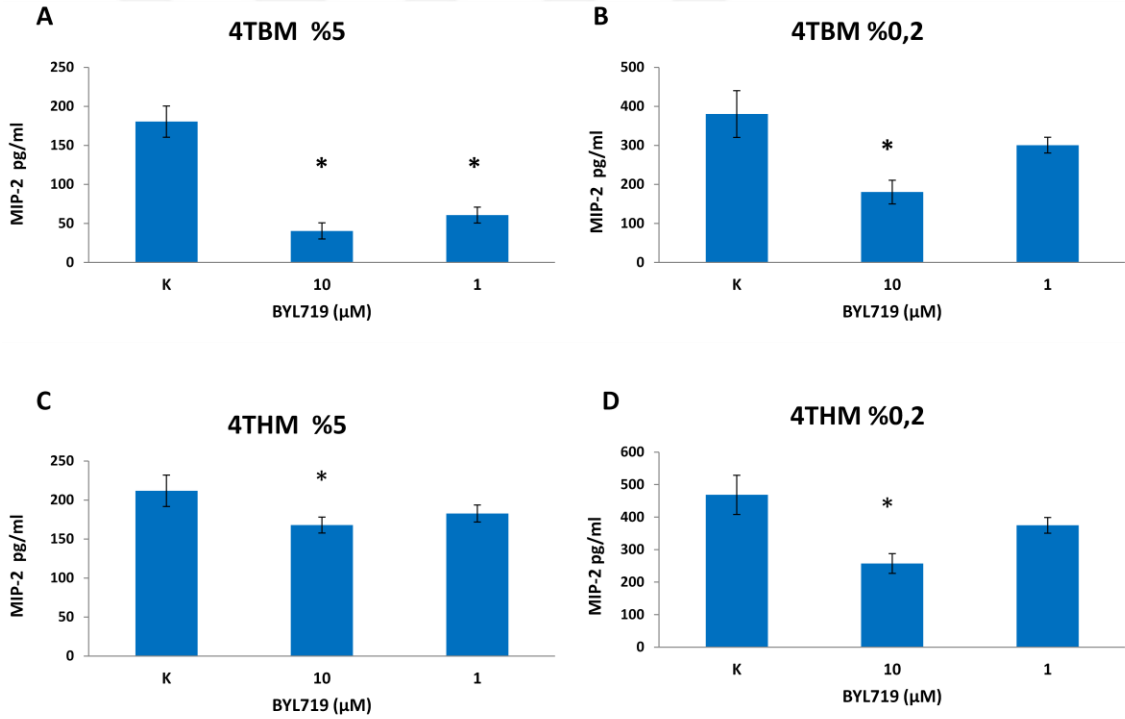


Şekil 4.1. BYL719'un farklı konsantrasyonlarda, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM 'nin proliferasyonları üzerine etkilerini gösteren grafikler. A) 4TBM hücre proliferasyonu üzerine serumlu ortamdaki tedavilerin etkileri. B) 4TBM serumsuz ortam tedavilerinin etkileri. C) 4THM hücre proliferasyonu üzerine serumlu ortamdaki tedavilerin etkileri. D) 4THM serumsuz ortam tedavilerinin etkileri. T0: Tedavi esnasındaki (başlangıçtaki) hücre sayısını göstermektedir. (* $p < 0.05$). Deneysel en az 4 tekrarlı yapılmıştır.

4.2. PI3K α İnhibitörü BYL719'un MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi

PI3K α spesifik inhibitör BYL719'un 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği konsantrasyonlarda (10 ve 1 μ M) MIP-2 salımındaki etkiler de araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi MIP-2 ölçümü %5 FBS'lu grupta tedavinin 72. saatinde toplanan besiyerlerinden, %0,2 FBS'lu grupta tedavinin 48. saatinde toplanan besiyerlerinden ELISA yöntemi ile yapıldı.

Sonuç olarak şekil 4.2'de görüldüğü gibi PI3K α inhibitörü hem serumlu hem de serumsuz ortamda her iki hücrede MIP-2 salımını azalttı. Özellikle serumlu ortamda 4TBM hücre dizisinin MIP-2 salımındaki azalma, 4THM ile kıyaslandığında daha belirgin düzeyde ölçüldü.

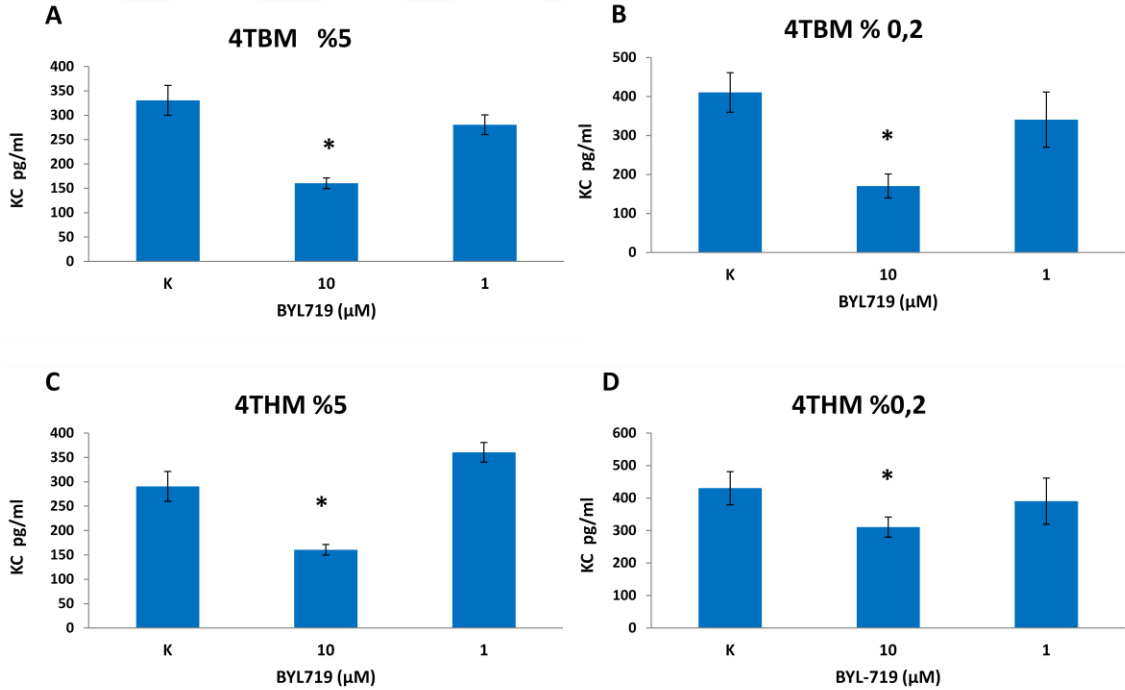


Şekil 4.2. PI3K α inhibitörünün (10 ve 1 μ M konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda MIP-2 salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda MIP-2 salımı üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak grafiğe uyarlanmıştır.

4.3. PI3K α İnhibitörü BYL719'un KC Salımı Üzerine Etkisi

PI3K α spesifik inhibitör BYL719'un 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği konsantrasyonlarda (10 ve 1 μ M) KC salımındaki etkiler de araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi KC sekresyonundaki olası değişiklikler %5 FBS'lu grupta tedavinin 72. saatinde toplanan besiyerlerinden, %0,2 FBS'lu grupta tedavinin 48. saatinde toplanan besiyerlerinden ELISA yöntemi ile belirlendi.

Sonuç olarak şekil 4.3'te görüldüğü gibi PI3K α inhibitörü 10 μ M'da hem serumlu (%5) hem de serumsuz (%0,2) ortamda her iki hücrede KC salımını azalttı. Özellikle %5 FBS'lu ortamdaki etkiler her iki hücre dizisinde de benzer iken, KC salımındaki azalma %0,2 FBS'lu ortamda 4TBM hücre dizisinde daha belirgin gözlemlendi.

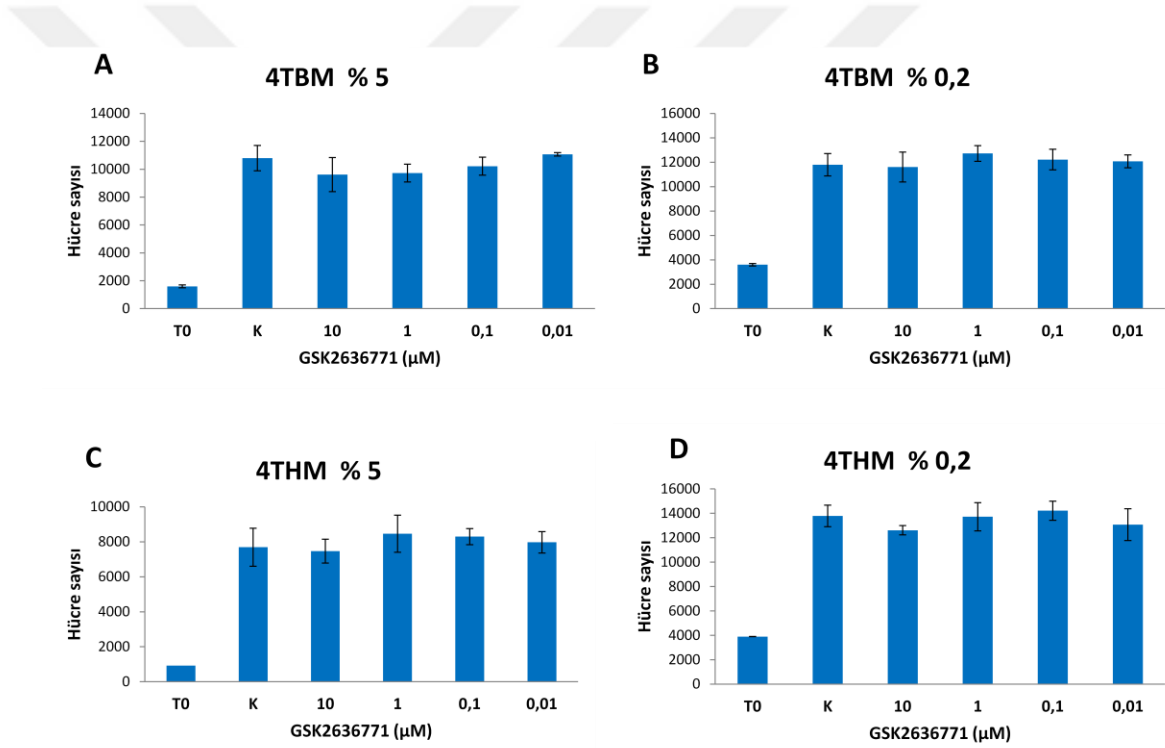


Şekil 4.3. PI3K α inhibitörünün (10 ve 1 μ M konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (* $p < 0.05$). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak grafiğe uyarlanmıştır, KC salımındaki azalma proliferasyondaki inhibisyonla bağımsız olarak grafikleştirilmiştir.

4.4. PI3Kβ İnhibitörü GSK2636771'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PI3Kβ inhibitörü GSK2636771'in 0,01-10µM konsantrasyonları ile metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücre dizileri muamele edildi ve proliferasyon üzerine olası etkileri araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi %5 FBS içeren besiyeri ortamında uygulanan tedavinin etkileri 72 saat sonra, %0,2 FBS içeren ortamdaki tedavinin etkileri 48 saat sonra belirlendi.

Sonuç olarak şekil 4.4'te görüldüğü gibi PI3Kβ inhibitörü hücrelerin proliferasyonunu etkilememektedir.

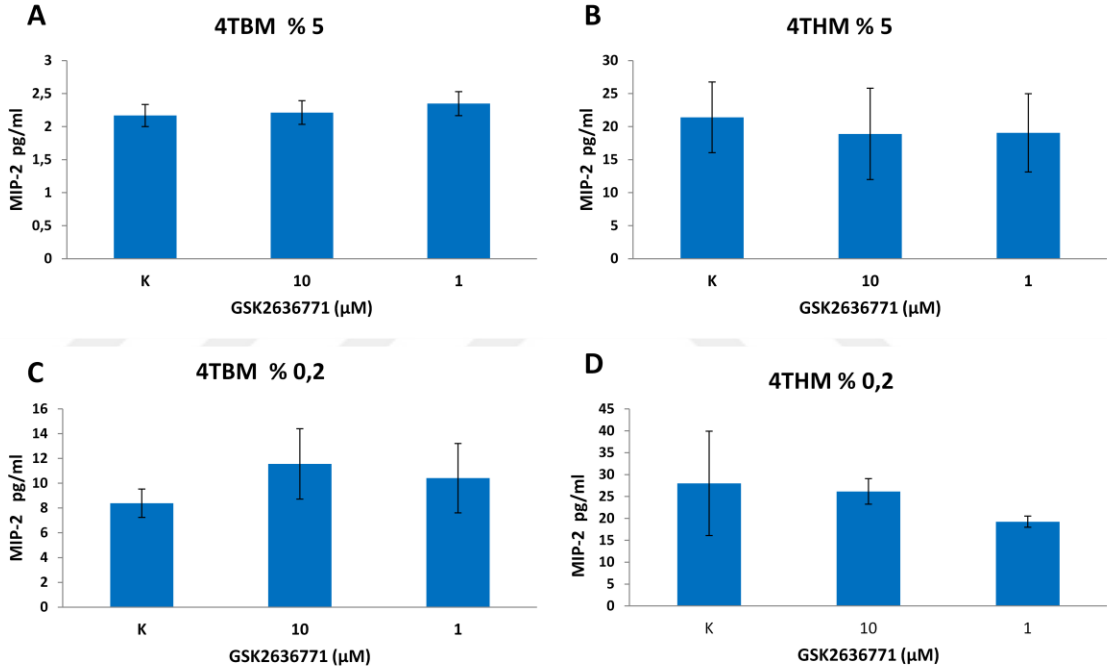


Şekil 4.4. GSK2636771'in farklı konsantrasyonlarda, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM'nin proliferasyonları üzerine etkilerini gösteren grafikler. A) 4TBM hücre proliferasyonu üzerine serumlu ortamdaki tedavilerin etkileri. B) 4TBM serumsuz ortam tedavilerinin etkileri. C) 4THM hücre proliferasyonu üzerine serumlu ortamdaki tedavilerin etkileri. D) 4THM serumsuz ortam tedavilerinin etkileri. TO: Tedavi esnasındaki (başlangıçtaki) hücre sayısını göstermektedir. Deneysel sonuçlar en az 4 tekrarlı yapılmıştır.

4.5. PI3Kβ İnhibitörü GSK2636771'in MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi

PI3Kβ inhibitörü GSK2636771'in 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda 4TBM ve 4THM hücrelerinin MIP-2 salımı üzerine etkileri araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi MIP-2 ölçümü %5 FBS'lu grupta tedavinin 72. saatinde toplanan besiyerlerinden, %0,2 FBS'lu grupta tedavinin 48. saatinde toplanan besiyerlerinden ELISA yöntemi ile yapıldı.

Sonuç olarak şekil 4.5'te görüldüğü gibi PI3Kβ inhibitörü GSK2636771, MIP-2 salımını proliferasyon da olduğu belirgin olarak etkilememektedir.

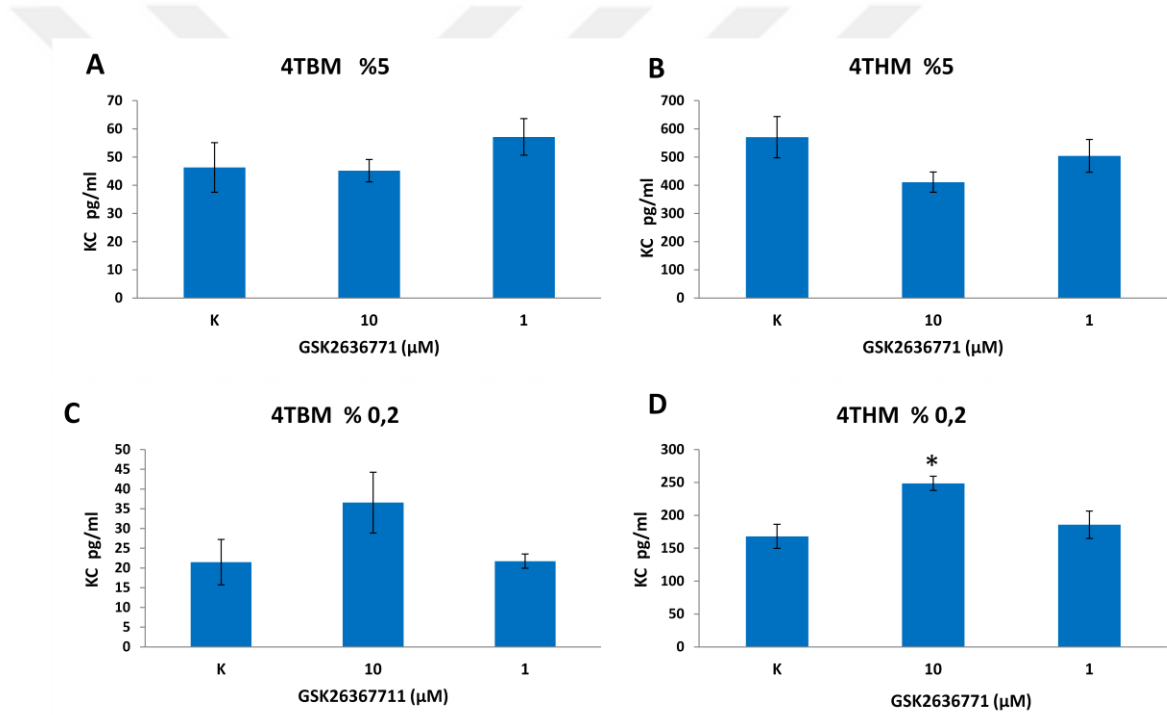


Şekil 4.5. PI3Kβ inhibitörü GSK2636771 (10 ve 1µM konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda MIP-2 salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda MIP-2 salımı üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneysel 4 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak grafiğe uyarlanmıştır.

4.6. PI3Kβ İnhibitörü GSK2636771'in KC Salımı Üzerine Etkisi

PI3Kβ inhibitörü GSK2636771'in 10 ve 1µM konsantrasyonlarda 4TBM ve 4THM hücrelerinin KC salımı üzerine etkileri araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi MIP-2 ölçümü %5 FBS'lu grupta tedavinin 72. saatinde toplanan besiyerlerinden, %0,2 FBS'lu grupta tedavinin 48. saatinde toplanan besiyerlerinden ELISA yöntemi ile yapıldı.

Sonuç olarak şekil 4.6'da görüldüğü gibi PI3Kβ inhibitörü GSK2636771'in KC salımını belirgin olarak etkilememektedir. Ancak yüksek konsantrasyonda düşük serum varlığında 4THM hücrelerinde belirgin düzeyde arttırmaktadır.

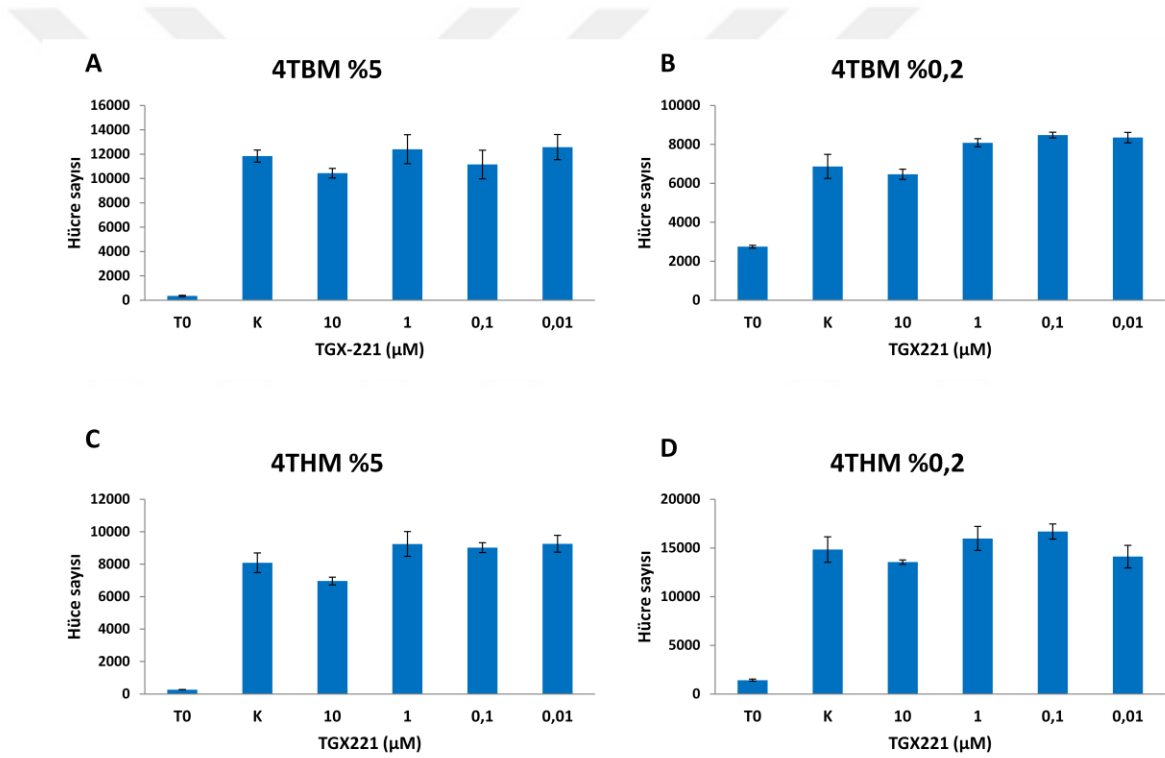


Şekil 4.6. PI3Kβ inhibitörü GSK2636771 (10 ve 1µM konsantrasyonda) 4TBM ve 4THM hücre hatlarının KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve B'de, %0,2 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler panel C ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak grafiğe uyarlanmıştır.

4.7. PI3K β İnhibitörü TGX221'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PI3K β inhibitörü TGX221'in 0,01-10 μ M konsantrasyonları ile metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücre dizileri muamele edildi ve proliferasyon üzerine olası etkileri araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi %5 FBS içeren besiyeri ortamında uygulanan tedavinin etkileri 72 saat sonra, %0,2 FBS içeren ortamdaki tedavinin etkileri 48 saat sonra belirlendi.

Sonuç olarak şekil 4.7'de görüldüğü gibi PI3K β inhibitörü TGX221 hücrelerin proliferasyonunu değiştirmemektedir.

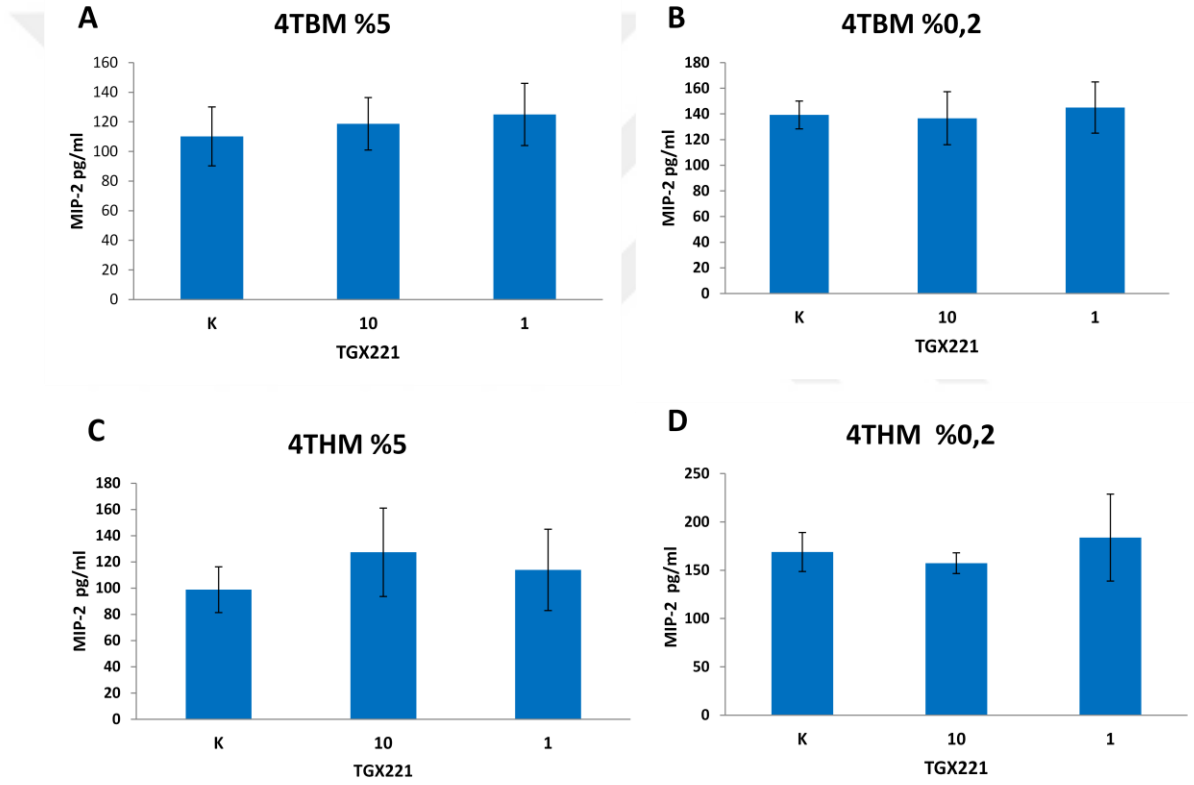


Şekil 4.7. TGX221'in farklı konsantrasyonlarda, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM'nin proliferasyonları üzerine etkilerini gösteren grafikler. A) 4TBM hücre proliferasyonu üzerine serumlu ortamdaki tedavilerin etkileri. B) 4TBM serumsuz ortam tedavilerinin etkileri. C) 4THM hücre proliferasyonu üzerine serumlu ortamdaki tedavilerin etkileri. D) 4THM serumsuz ortam tedavilerinin etkileri. T0: Tedavi esnasındaki (başlangıçtaki) hücre sayısını göstermektedir. Deneysel en az 4 tekrarlı yapılmıştır.

4.8. PI3Kβ İnhibitörü TGX221'in MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi

PI3Kβ inhibitörü TGX221'in 10 ve 1μM konsantrasyonlarda 4TBM ve 4THM hücrelerinin MIP-2 salımı üzerine etkileri araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi MIP-2 ölçümü %5 FBS'lu grupta tedavinin 72. saatinde toplanan besiyerlerinden, %0,2 FBS'lu grupta tedavinin 48. saatinde toplanan besiyerlerinden ELISA yöntemi ile yapıldı.

Sonuç olarak şekil 4.8'de görüldüğü gibi PI3Kβ inhibitörü TGX221, MIP-2 salımını proliferasyon da olduğu belirgin olarak etkilememektedir.

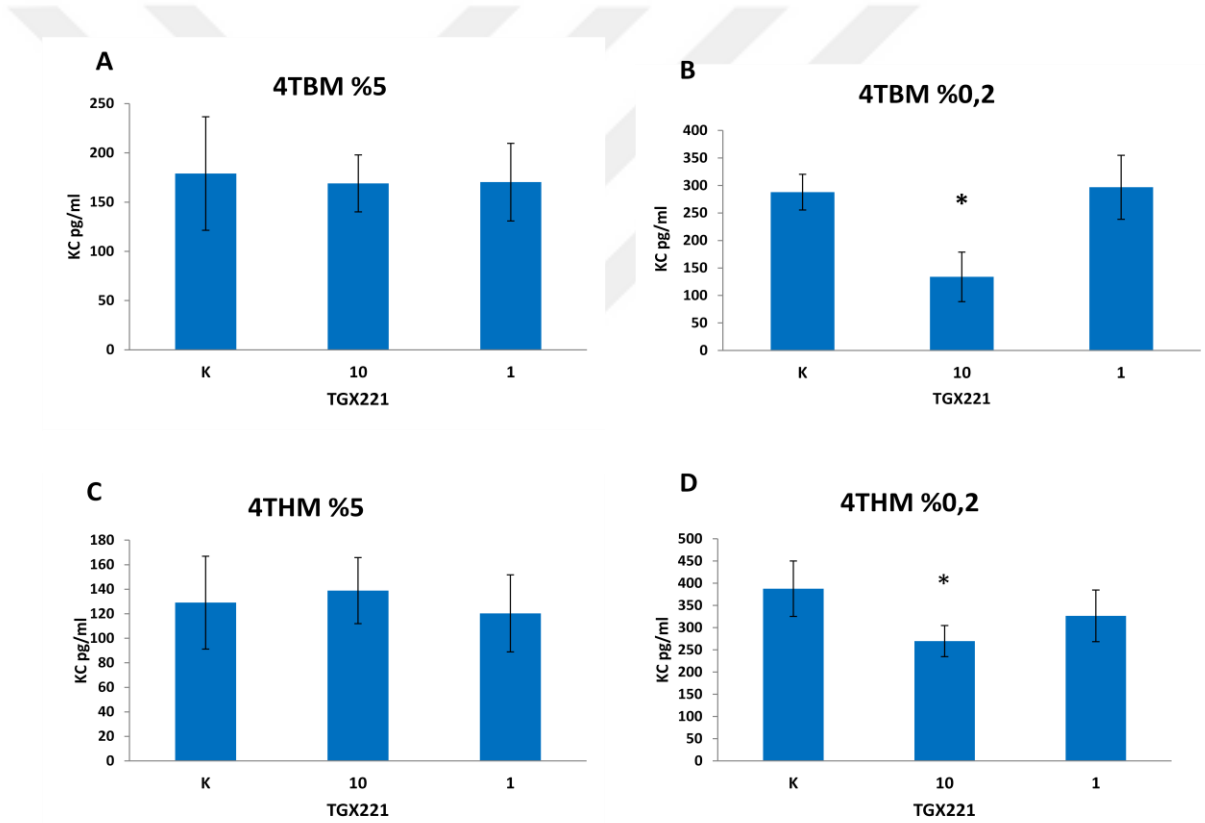


Şekil 4.8. PI3Kβ inhibitörü TGX221'in 10 ve 1μM konsantrasyonda 4TBM ve 4THM hücre hatlarının MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda MIP-2 salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda MIP-2 salımı üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak grafiğe uyarlanmıştır.

4.9. PI3Kβ İnhibitörü TGX221'in Salımı Üzerine Etkileri

PI3Kβ inhibitörü TGX221'in 10 ve 1μM konsantrasyonlarda 4TBM ve 4THM hücrelerinin KC salımı üzerine etkileri araştırıldı. Yöntemde anlatıldığı gibi MIP-2 ölçümü %5 FBS'lu grupta tedavinin 72. saatinde toplanan besiyerlerinden, %0,2 FBS'lu grupta tedavinin 48. saatinde toplanan besiyerlerinden ELISA yöntemi ile yapıldı.

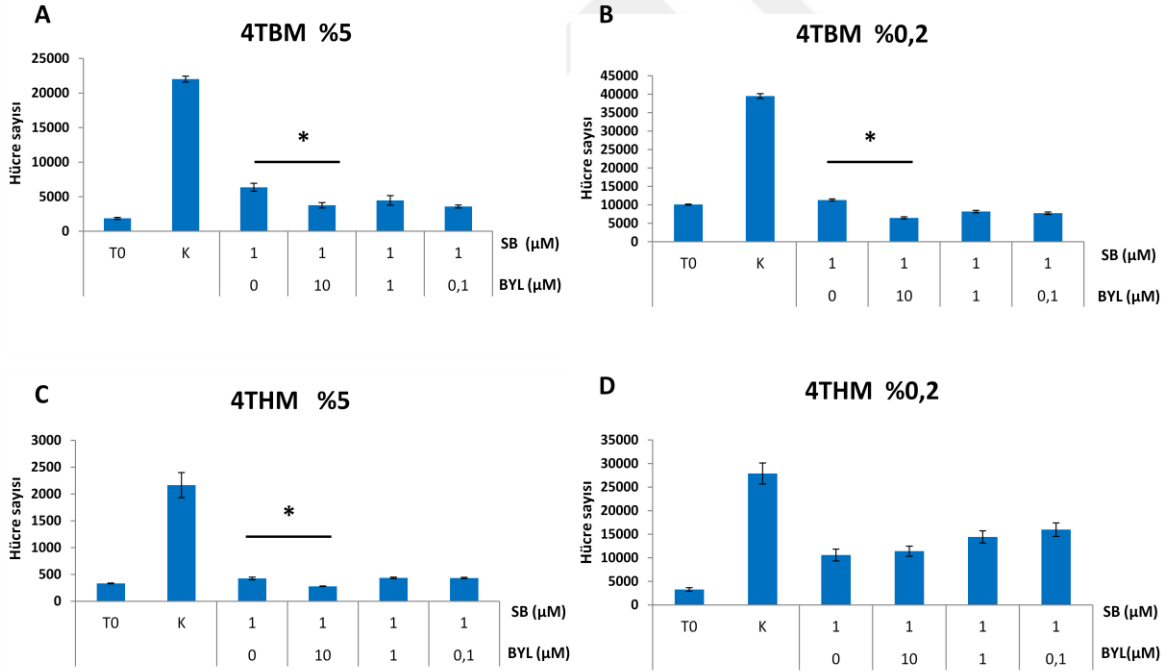
Sonuç olarak şekil 4.9'da görüldüğü gibi PI3Kβ inhibitörü TGX221'in KC salımını yüksek konsantrasyonda düşük serum varlığında her iki hücre dizisinde belirgin düzeyde azaltmaktadır.



Şekil 4.9. PI3Kβ inhibitörü TGX221'in 10 ve 1μM konsantrasyonda 4TBM ve 4THM hücre hatlarının KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak grafiğe yarılanmıştır.

4.10. PI3K α İnhibitörü BYL719'un CXCR2 Antagonisti ile Birlikte Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

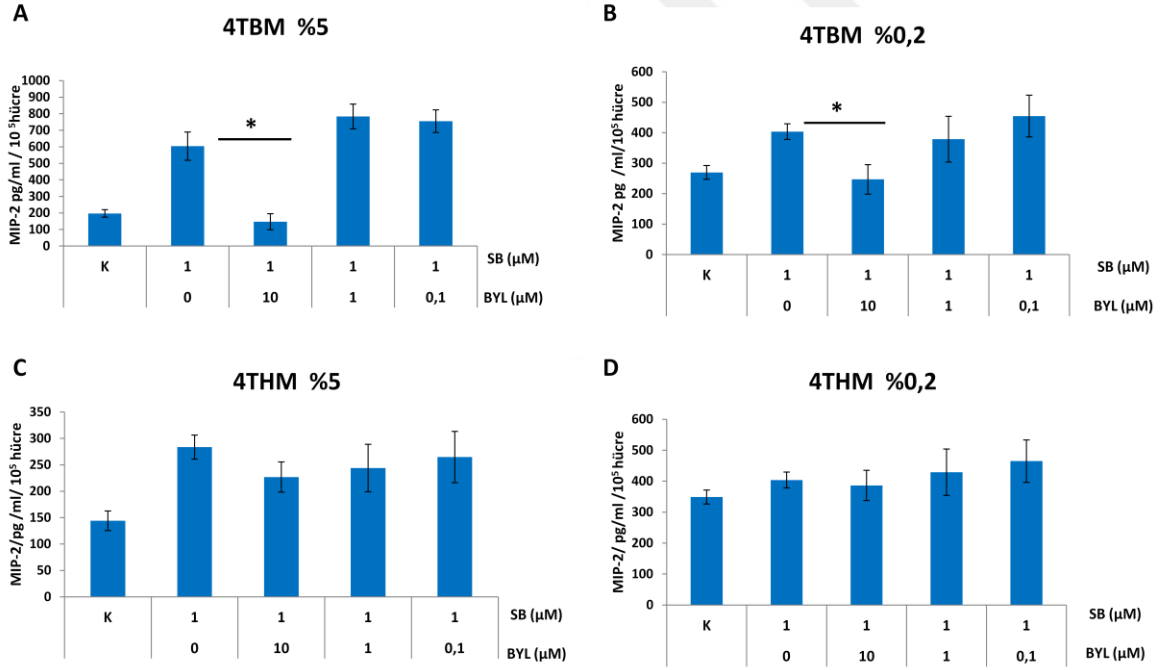
PI3K α inhibitörü olarak seçilen BYL719, β inhibitörlerinden farklı olarak Şekil 1'de görüldüğü gibi 4TBM ve 4THM hücrelerinde konsantrasyon bağımlı hücre proliferasyonunu yavaşlattı. Benzer şekilde BYL719 özellikle 4TBM hücrelerinde MIP-2 salımını belirgin düzeyde azalttı. KC salımı üzerinde de azaltıcı etkisi gözlemlendi (Şekil 2 ve 3). PI3K inhibitörleri arasında p110 α alt tipine spesifik olan inhibitör BYL719 belirgin şekilde daha etkili olduğu için CXCR2 antagonisti ile birlikte kullanımının olası etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, SB225002, 4TBM ve 4THM hücre hatlarının proliferasyonunu belirgin olarak azaltmaktadır. 10 μ M BYL719 ile özellikle 4TBM hücre hattında her iki ortamda (%5 ve %0,2 FBS'li) SB225002'nin proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkisi daha da artmaktadır (şekil 4.10).



Şekil 4.10. PI3K α inhibitörü BYL719' un CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte hücre proliferasyonu üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda proliferasyon üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda proliferasyon üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler en az 4 tekrarlı yapılmıştır.

4.11. PI3K α İnhibitörü BYL719'un CXCR2 Antagonisti ile Birlikte MIP-2 Salımı Üzerine Etkisi

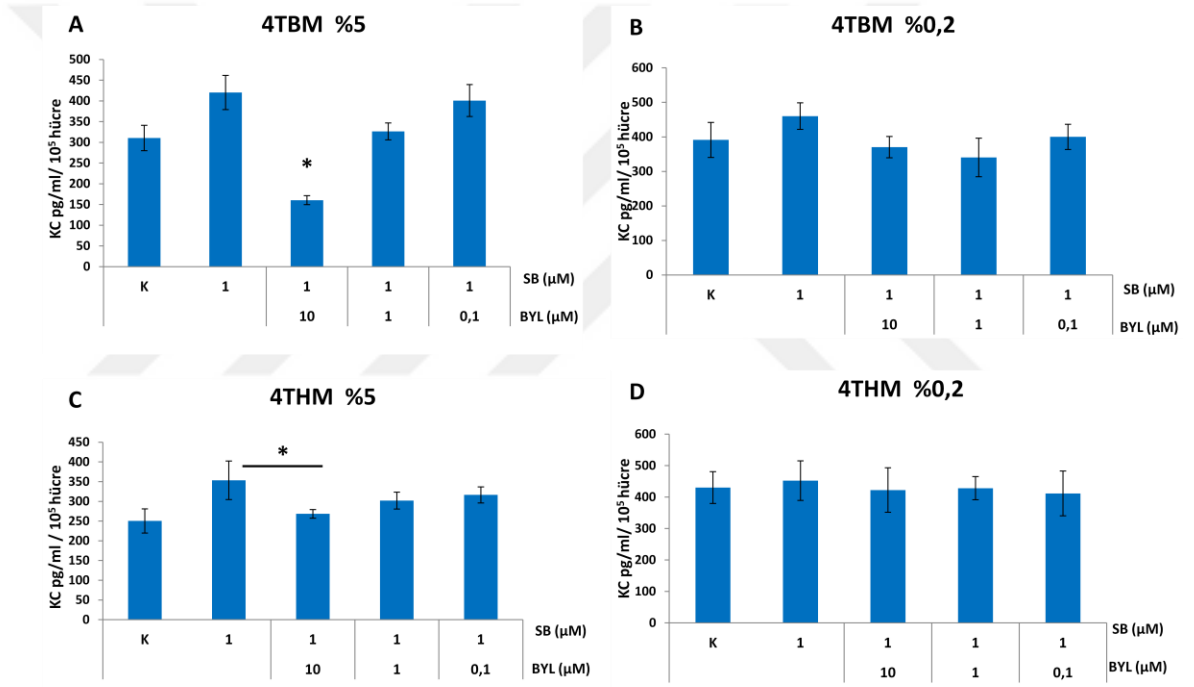
Metastatik meme kanseri hücrelerinde, CXCR2 antagonisti SB225002 ile tedavinin, anjiyojenik bir kemokin olan MIP-2'nin sekresyonunu arttırdığı ve bu durumda kronik antagonist tedavisinde direnç gelişimine yol açabileceği önceki çalışmamızda tespit edilmişti (Erin et al. 2015). Çalışmamızın devamı niteliğinde, hücre proliferasyonu, MIP-2 ve KC salımı üzerine tek başına önemli etkilerini gördüğümüz PI3K α inhibitörünün CXCR2 inhibisyonuna bağlı MIP-2 artışını geri çevirip çeviremeyeceği araştırıldı. Bunun için SB225002 (1 μ M), BYL719 (0,1-10 μ M) ile birlikte uygulandı. Sonuç olarak, SB225002'nin MIP-2 salımını arttırıcı etkisi 10 μ M BYL719 ile beyine metastaz yapan hücrelerde belirgin olarak geri dönmektedir. 4THM hücre hattında %5 FBS varlığında etki kısmen gözlenirken %0,2 FBS'lu ortamda belirgin bir etki gözlenmemektedir (şekil 4.11).



Şekil 4.11. PI3K α inhibitörü BYL719' un CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte MIP-2 salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda MIP-2 üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda MIP-2 üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler en az 4 tekrarlı yapılmıştır.

4.12. PI3K α İnhibitörü BYL719'un CXCR2 Antagonisti ile Birlikte KC Salımı Üzerine Etkisi

Hücre proliferasyonu, MIP-2 ve KC salımı üzerine tek başına önemli etkilerini gördüğümüz PI3K α inhibitörünün, CXCR2 inhibisyonuna bağlı KC salımındaki artışı geri çevirip çeviremeyeceği araştırıldı. Sonuç olarak şekil 4.12'de görüldüğü gibi serumlu ortamda SB225002'nin KC salımını arttırıcı etkisi, 10 μ M BYL719 ile beyin ve kalp metastatik meme kanseri hücrelerde belirgin olarak geri dönmektedir. %0,2 FBS'lu ortamda her iki hücre hattında da belirgin bir etki gözlenmemektedir.



Şekil 4.12. PI3K α inhibitörü BYL719' un CXCR2 antagonisti SB225002 ile birlikte KC salımı üzerine etkilerini gösteren grafikler. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler sırasıyla panel A ve C'de, %0,2 FBS içeren ortamda KC salımı üzerine etkiler panel B ve D'de gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler en az 4 tekrarlı yapılmıştır.

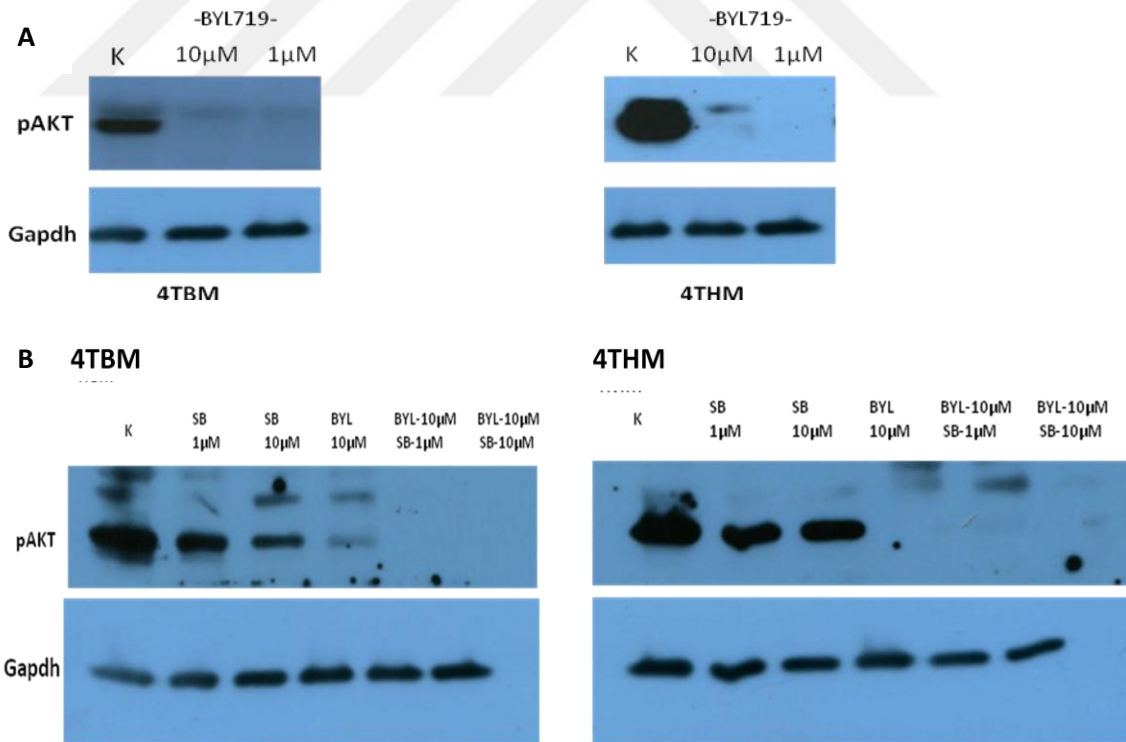
Bu sonuçlar PI3K inhibitörleri arasında BYL719'un CXCR2 antagonisti ile birlikte kullanımının özellikle beyine metastaz yapmış meme kanseri hücreleri üzerinde etkin anti-tümöral yanıt oluşturabileceğini göstermektedir.

4.13. Hücre İçi Sinyal Proteinleri Üzerine SB225002 ve BYL719'un Etkileri

4TBM ve 4THM hücre dizilerinde önemli antitümör etkileri belirlenen BYL719'un ve SB225002'nin sinyal yollarında rol oynayan proteinlerin fosforilasyonları üzerine olası etkileri araştırıldı. Bunun için çalışmamızda, proliferasyon, MIP-2 ve KC salımı üzerine etkili görülen konsantrasyonlar yüksek sayıda hücelere (300.000) uygulandı ve 40 saat sonra lizatlar elde edildi. Elde edilen lizatlarda Akt/PKB, ERK1/2 ve P38 fosforilasyonlarındaki değişiklikler western blot yöntemi ile belirlendi.

4.13.1. PI3K α inhibitörü BYL719 ve CXCR2 antagonisti SB225002'nin tek ve birlikte kullanımının AKT fosforilasyonu üzerine etkileri

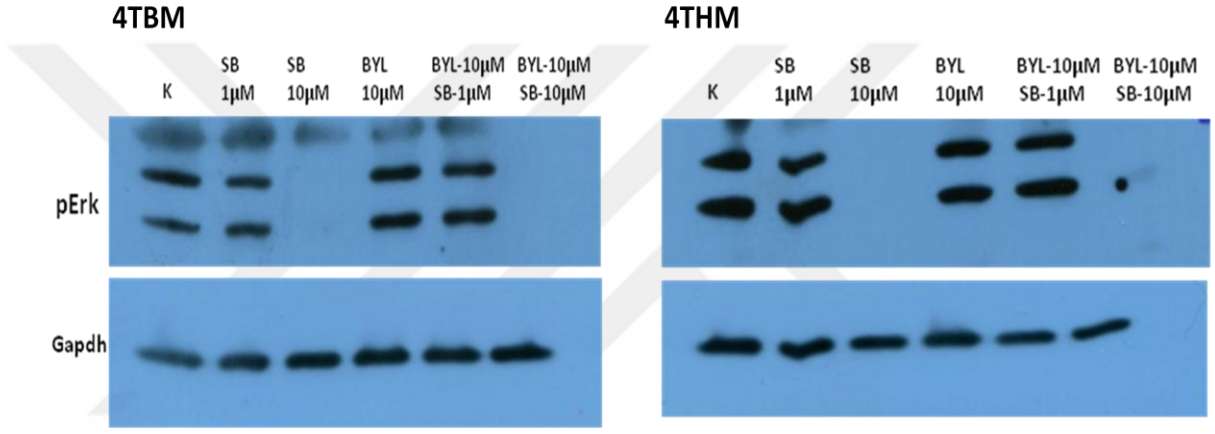
4TBM ve 4THM hücre dizilerinde SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan AKT fosforilasyonu üzerine etkisi belirlendi. Buna göre BYL719 1 ve 10 μ M'da her iki hücre dizisinde Akt fosforilasyonunu inhibe etmektedir ve etki SB225002 ile birlikte geriye dönmemiştir.



Şekil 4.13. Akt/PKB fosforilasyonu üzerine, SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (1 ve 10 μ M) tek başına ve birlikte etkileri. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir. Gapdh kontrol amacıyla kullanılmıştır (house keeping). (SB; SB225002, BYL; BYL719)

4.13.2. PI3K α İnhibitorü BYL719 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

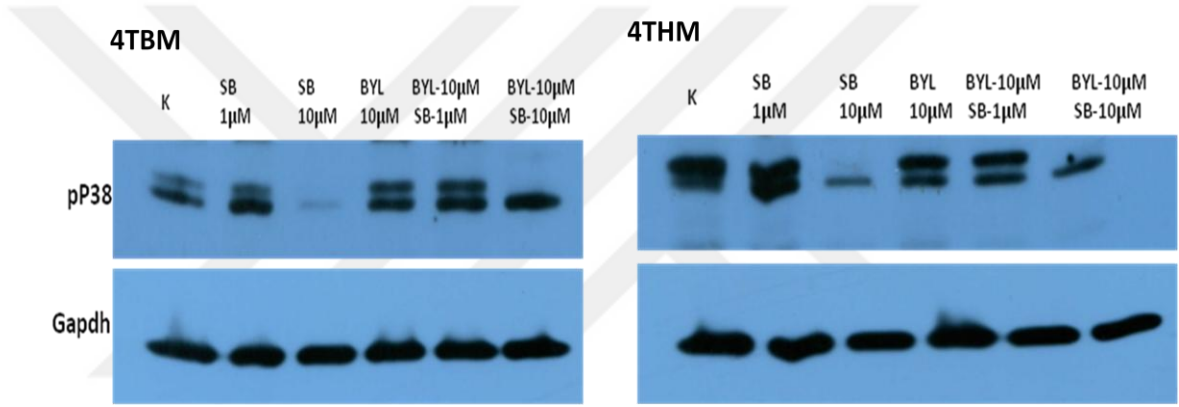
4TBM ve 4THM hücre dizilerinde SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan pERK1/2'nin ekspresyonları üzerine etkiler belirlendi. Sonuç olarak, SB225002 10 μ M'da ERK1/2 fosforilasyonunu her iki hücre dizisinde de tamamen inhibe ederken; BYL719'un tek başına etki etmediği ve birlikte kullanıldığında SB225002'nin inhibe edici etkisinin devam ettiği belirlendi (şekil 4.14).



Şekil 4.14. ERK1/2 fosforilasyonu üzerine, SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) tek başına ve birlikte etkileri. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir. BYL; BYL719, SB; SB225002. Gapdh kontrol amacıyla kullanılmıştır (house keeping).

4.13.3. PI3K α İnhibitörü BYL719 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının P38 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

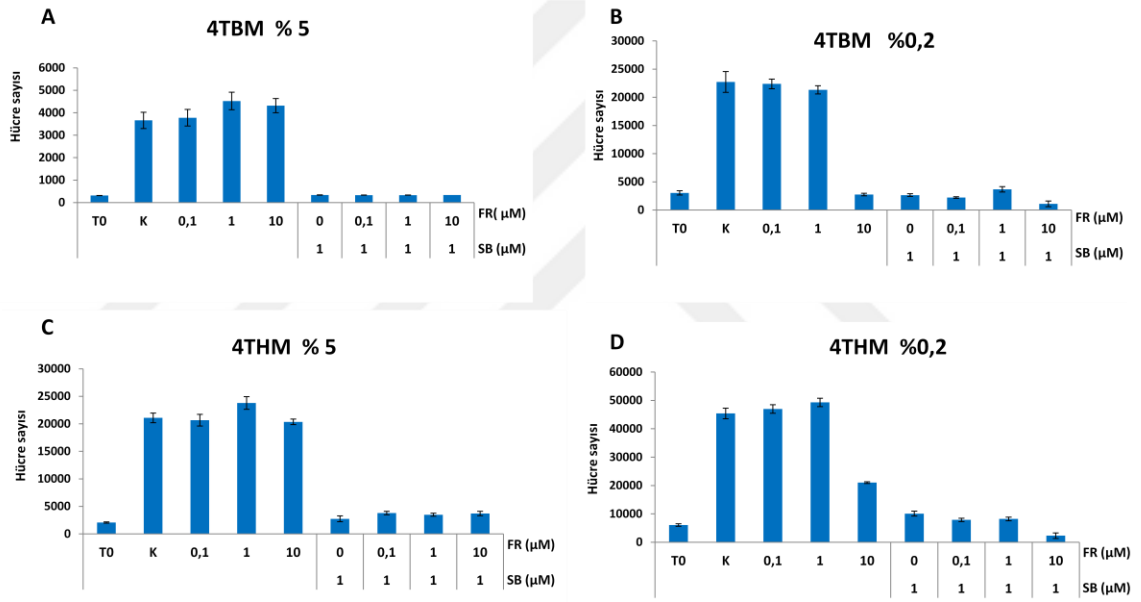
4TBM ve 4THM hücre dizilerinde SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) hücre proliferasyonu ve sitokin/kemokin salımında önemli rol oynadığı bilinen pP38 ekspresyonları üzerine etkiler belirlendi. Sonuç olarak, 10 μ M SB225002 ile P38 fosforilasyonu her iki hücre dizisinde de belirgin şekilde inhibe olurken; BYL719'un etki etmediği ancak SB225002 ile birlikte kullanıldığında inhibisyonun azaldığı tespit edildi (şekil 4.15).



Şekil 4.15. P38 fosforilasyonu üzerine, SB225002 (1 ve 10 μ M) ve BYL719'un (10 μ M) tek başına ve birlikte etkileri. Olası etki %0,2 FBS varlığında uygulanan tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarında western blot tayini ile gösterilmiştir. BYL; BYL719, SB; SB225002. Gapdh kontrol amacıyla kullanılmıştır (house keeping).

4.14. PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

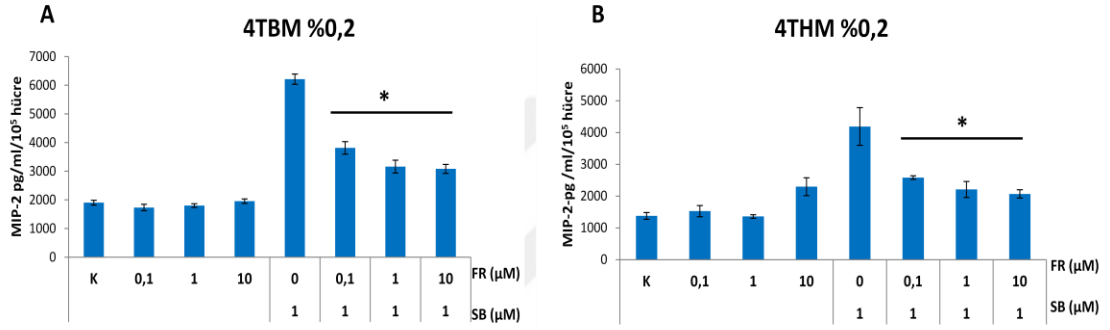
FR236924 tek başına ve CXCR2 antagonisti ile birlikte 4TBM ve 4THM hücrelerine uygulandı. Şekil 16'da görüldüğü gibi FR236924 otokrin faktörlere bağlı hücre çoğalmasını 10 μ M konsantrasyonda belirgin derecede her iki hücre hattında da baskılamaktadır. Ayrıca bu grupta CXCR2 antagonisti SB225002'nin antiproliferatif etkisini geriye çevirmediği gibi daha da arttırmaktadır. %5 FBS varlığında ise 10 μ M'da hücre proliferasyonunu önemli düzeyde etkilemediği belirlenmiştir (şekil 4.16).



Şekil 4.16. PKC ϵ aktivatörü FR236924 hücre çoğalmasında tek başına ve SB225002 (1 ve 10 μ M) ile birlikte etkileri. 4TBM ve 4THM'de %5 FBS içeren ortamda proliferasyon üzerine etkiler sırasıyla **panel A ve C'de**, %0,2 FBS içeren ortamda proliferasyon üzerine etkiler **panel B ve D'de** gösterilmektedir. (*p<0.05). Deneyler en az 4 tekrarlı yapılmıştır. FR; FR236924, SB; SB225002.

4.15. PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının MIP-2 Salımı Üzerine Etkileri

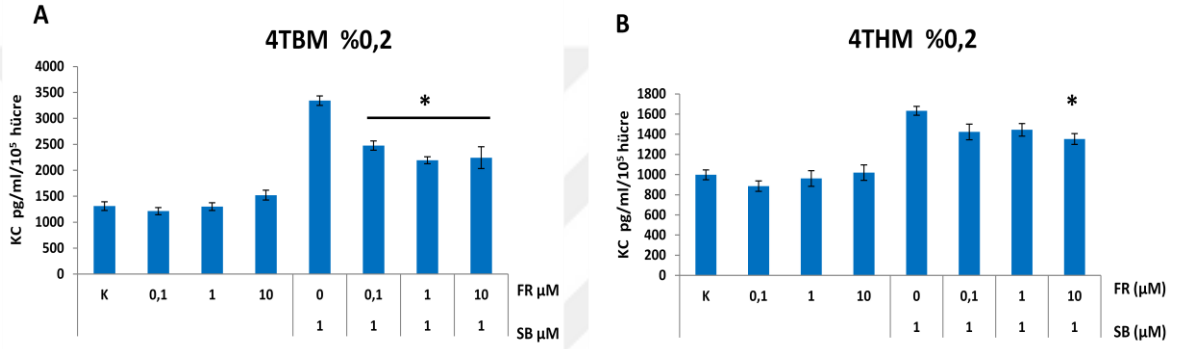
FR236924 hipotezde planlandığı gibi CXCR2 inhibisyonuna bağlı kemokin salımındaki artışı engelleyip engellemediği araştırıldı. Şekil 17'de görüldüğü gibi 0,1-10 μ M konsantrasyonlarında FR236924, her iki hücre dizisinde CXCR2 inhibisyonuna bağlı MIP-2 deki artışı kısmen engellemektedir (şekil 4.17).



Şekil 4.17. PKC ϵ aktivatörü FR236924 tek başına ve SB225002 (1 ve 10 μ M) ile birlikte MIP-2 salımına etkileri. (SB; SB225002, FR; FR236924) 4TBM hücre dizisinin MIP-2 salımındaki etkileri gösteren grafikler **panel A**, 4THM hücre dizisinin MIP-2 salımındaki etkileri gösteren grafikler **panel B**. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak hesaplanmıştır. (* p <0.05). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır. FR; FR236924 SB; SB225002.

4.16. PKC ϵ aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının KC Salımı Üzerine Etkileri

MIP-2 salımı ile benzer etkiler KC salımında da gözlemlendi. Sonuç olarak, şekil 4.18'de görüldüğü gibi 0,1-10 μ M konsantrasyonlarında FR236924, özellikle 4TBM hücre dizisinde CXCR2 inhibisyonuna bağlı KC' deki artışı kısmen baskılamaktadır. 4TBM ile kıyaslandığında etki 4THM'de daha azdır sadece yüksek konsantrasyonda kısmen görülmektedir.

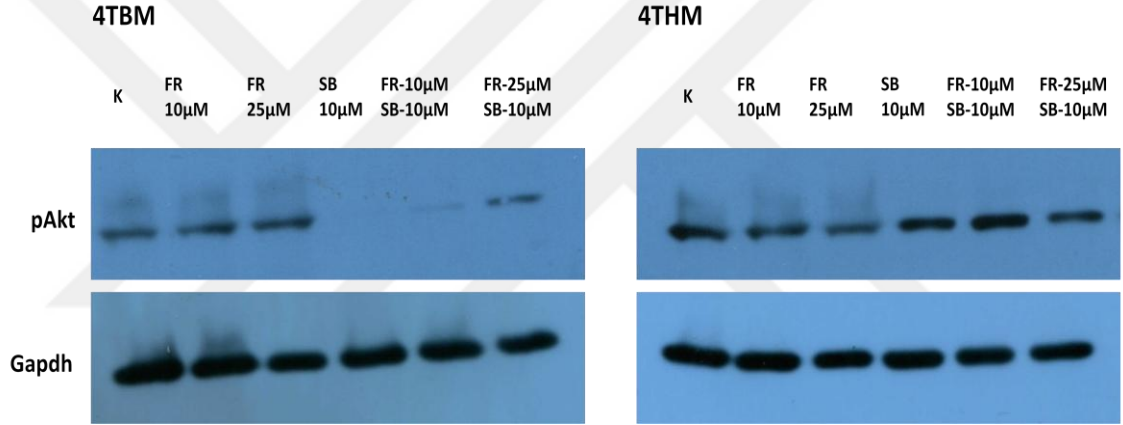


Şekil 4.18. PKC ϵ aktivatörü FR236924 tek başına ve SB225002 (1 ve 10 μ M) ile birlikte KC salımına etkileri. (SB; SB225002, FR; FR236924) 4TBM hücre dizisinin KC salımındaki etkileri gösteren grafikler **panel A**, 4THM hücre dizisinin KC salımındaki etkileri gösteren grafikler **panel B**. Sonuçlar 100.000 hücreye oranlanarak hesaplanmıştır. (* p <0.05). Deneyler 4 tekrarlı yapılmıştır.(FR; FR236924 SB; SB225002)

4.17. Hücre İçi Sinyal Proteinleri Üzerine SB225002 ve FR236924'ün Etkileri

4.17.1. PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının Akt Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

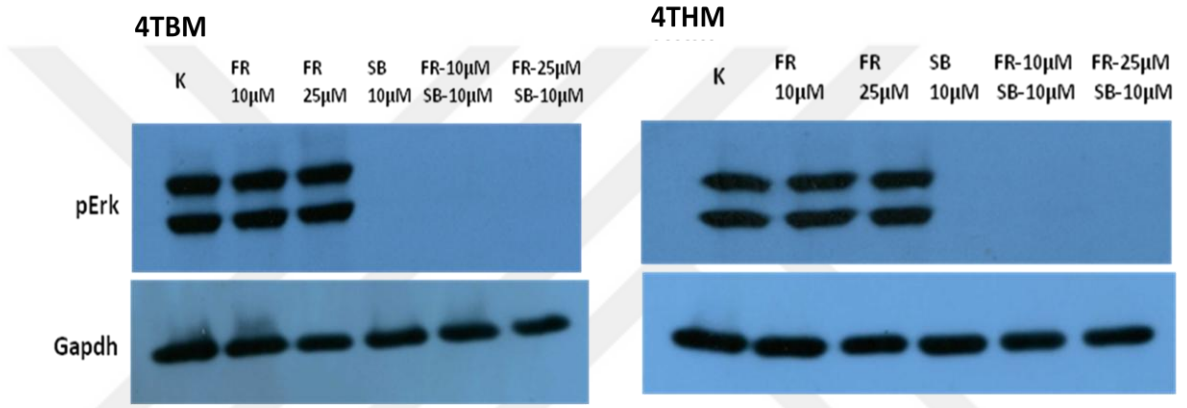
4TBM ve 4THM hücre dizilerinde SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M) hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan pAKT' nin ekspresyonları üzerine olası etkileri araştırıldı. Sonuç olarak, SB225002, 10 μ M'da AKT fosforilasyonunu 4TBM hücre dizisinde baskımlarken; FR236924'ün etki etmediği ancak 25 μ M'da SB225002'nin inhibe edici etkisini kısmen azalttığı belirlendi. 4THM'de ise belirgin bir etki gözlenmedi (şekil 4.19).



Şekil 4.19. SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M), AKT fosforilasyonu üzerine tek başına ve birlikte etkileri. Olası etki %0,2 FBS ortamında 40 saatlik tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarından western blot tayini ile gösterilmiştir. FR; FR236924, SB; SB225002. Gapdh kontrol amacıyla kullanılmıştır (house keeping).

4.17.2. PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının ERK1/2 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

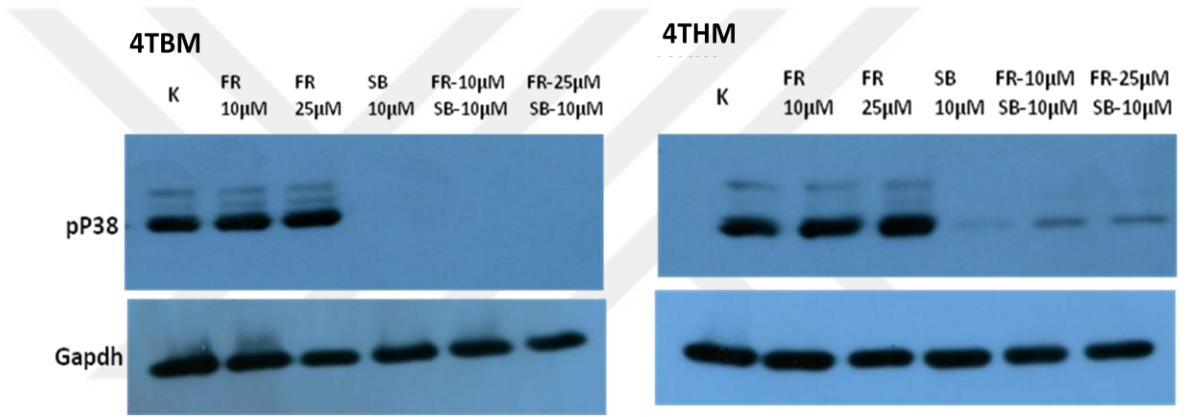
4TBM ve 4THM hücre dizilerinde SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M) hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan pERK1/2'nin ekspresyonları üzerine olası etkileri araştırıldı. Sonuç olarak, SB225002, 10 μ M'da ERK1/2 fosforilasyonunu her iki hücre dizisinde de tamamen inhibe ederken; FR236924'ün etki etmediği ve SB225002'nin de etkisini değiştirmedeği belirlendi (şekil 4.20).



Şekil 4.20. SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M), ERK1/2 fosforilasyonu üzerine tek başına ve birlikte etkileri. Olası etki %0,2 FBS ortamında 40 saatlik tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarından western blot tayini ile gösterilmiştir. FR; FR236924, SB; SB225002. Gapdh kontrol amacıyla kullanılmıştır (house keeping).

4.17.3. PKC ϵ Aktivatörü FR236924 ve CXCR2 Antagonisti SB225002'nin Tek ve Birlikte Kullanımının P38 Fosforilasyonu Üzerine Etkileri

4TBM ve 4THM hücre dizilerinde SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M) hücre proliferasyonunda ve kemokin salımında önemli rol oynayan pP38'in ekspresyonları üzerine olası etkileri araştırıldı. Sonuç olarak, 10 μ M SB225002 ile P38 fosforilasyonu her iki hücre dizisinde de belirgin şekilde inhibe olurken; FR236924'ün etki etmediği ancak birlikte kullanıldığında SB225002'nin etkisini 4THM'de kısmen geri çevirdiği tespit edildi (şekil 4.21).



Şekil 4.21. SB225002 (10 μ M) ve FR236924'ün (10 ve 25 μ M), P38 fosforilasyonu üzerine tek başına ve birlikte etkileri. Olası etki %0,2 FBS ortamında 40 saatlik tedaviler sonrasında elde edilen hücre lizatlarından western blot tayini ile gösterilmiştir. FR; FR236924, SB; SB225002. Gapdh kontrol amacıyla kullanılmıştır (house keeping).

5. TARTIŞMA

Kadınlarda meme kanserine bağlı ölümlerin en önemli sebebi uzak metastazlara bağlı hayati fonksiyonların bozulmasıdır ve ne yazıkki metastazı önleyebilecek ya da tedavi edebilecek bir yöntem henüz bulunamamıştır. Meme kanseri sıklıkla kemik, karaciğer, akciğer ve beyine metastaz yapmaktadır. Etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için metastaz yapan hücrelerin özellikleri, tümör mikroçevresi ve metastatik süreçte rol oynayan mekanizmaların iyi tanımlanması gerekmektedir.

CXCR2, meme, pankreas, ve melanoma gibi metastatik indeksi yüksek olan kanser hücreleri üzerinde eksprese edilir ve aktivasyonu metastatik gelişimle ilişkilendirilmiştir (Miller ve ark., 1998; Norgauer ve ark., 1996; Takamori ve ark., 2000). CXCR2 ligandlarından MIP-2, CXCR2 aracılı sinyal yolları ile doğrudan tümör hücre büyümesine ve transformasyonuna neden olurken, nötrofil infiltrasyonu ile anjiyogenezi indüklemektedir. Ayrıca metastatik meme tümörlerinde, primer tümör dokularına göre 2 kattan daha fazla MIP-2 amplifiye edilmiştir. Dolayısıyla CXCR2 ve MIP-2 meme kanseri dahil çeşitli kanserlerin progresyonu ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bu yüzden metastatik kanserlerin tedavisinde CXCR2 antagonistlerinin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda CXCR2 antagonistleri ile belirgin şekilde anti-tümörojenik etki sağlanmıştır. Biz de önceki çalışmamızda metastatik meme kanseri hücrelerinde CXCR2 antagonisti (SB225002) ile güçlü antitümörojenik etki sağlandığını ancak MIP-2 salınımının arttığını tespit ettik ve bu durumun dirence neden olabileceğini düşündük (Erin ve ark., 2015). Bu nedenle MIP-2 artışına yol açan mekanizmaların tespit edilmesi antagonistlerin etkinliğinin artırılması ve gelişecek olası direncin önüne geçilmesi için oldukça önemlidir. Bu konuda bildiğimiz kadarıyla yapılan bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada da CXCR2 antagonisti SB225002'nin olası anti-tümöral etkilerine gelişebilecek direnç mekanizmaları meme kanserinde sık görülen metastaz modelleri üzerinde ayrıntılı olarak *in-vitro* deneylerde ilk kez araştırılmıştır.

Önceki çalışmamızda kanserde genellikle aktifleşen ve çeşitli tedavilere dirençte rol oynadığı bilinen sinyal yollarından PI3K'ın inhibisyonu (Pan-PI3K inhibitörü

LY294002) ile yaklaşık %50 oranında MIP-2 artışında azalma tespit edilmişti (Erin ve ark., 2015). Ancak Pan-PI3K inhibitörlerinin, tüm izoformları hedef aldığı için birçok yan etkiye yol açtığı bilinmektedir (Thorpe ve ark., 2015). Bu yüzden bu çalışmada MIP-2'deki azalmanın hangi PI3K alttipi ile ortaya çıktığını anlamak için ve daha az yan etkiye neden olduğu için izoform spesifik inhibitörler (α ; BYL719 ve β ; GSK2636771, TGX221) kullanılmıştır. Hücre çoğalması, MIP-2 ve KC salınımlarındaki değişiklikler belirlenmiştir. Ayrıca proliferasyon ve kemokin salınımlarında rol oynayan hücre içi sinyal yolları proteinlerinden pAKT, pERK1/2 ve pP38 ekspresyonu üzerine etkiler belirlenmiştir.

Bulgularımıza göre PI3K β alttipinin hücre proliferasyonu ve kemokin sekresyonu üzerinde belirgin bir etkisi görülmemiştir. Ancak PI3K α spesifik inhibitör BYL719 konsantrasyon bağımlı olarak 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunu yavaşlattı ve MIP-2 sekresyonunu belirgin düzeyde azalttı. Benzer etkiler CXCR2'nin diğer önemli ligandı KC salınımlarında da gözlemlendi. Dolayısıyla kullandığımız agresif metastatik hücre dizileri (4TBM ve 4THM) p110 α inhibitörüne duyarlıdır. 2-aminotiyazol türevi olan BYL719'un (alpelisib) etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Sonuçlarımızla uyumlu olarak klinik öncesi çalışmalarda da, nazofaringal, baş-boyun, kolorektal ve osteosarkom hücreleri gibi birçok kanser hücrelerinde BYL719 anti-tümöral aktivite göstermiştir. Özellikle PIK3CA mutant hücrelerin BYL719'a daha duyarlı olduğu ortaya konmuştur (Fernandes ve ark., 2016; Fritsch ve ark., 2014; Nolting ve ark., 2017; Wong C. H. ve ark., 2015). Ayrıca BYL719 meme kanseri dahil birçok kanser türü için klinik değerlendirme aşamasındadır (NCT01791478). Bizim kullandığımız meme kanseri modelinde bildiğimiz kadarıyla bu konuda yapılan bir çalışma yoktur.

Çalışmamızda ayrıca p110 α inhibisyonu ile CXCR2 antagonisti SB225002'nin birlikte uygulamasının etkileri de araştırıldı. Buna göre BYL719, SB225002'nin antiproliferatif etkisini daha da arttırmıştır ve MIP-2 ve KC salınımlarındaki artışı da belirgin olarak baskılamıştır. 4TBM'deki etkiler 4THM ile kıyaslandığında daha belirgindir bu da hücrelerin heterojenitesine bağlı olabilir.

MAPK yolağı, hücre proliferasyonu ve sitokinlere yanıtta önemli rol oynamaktadır ve çeşitli kanserlerde önemli etkilere sahiptir (Burotto ve ark., 2014; Koul ve ark., 2013; Munoz ve ark., 2016; Zhang W. ve Liu, 2002). Ayrıca PI3K/AKT yolağıyla etkileştiği bilinmektedir (Zhang W. ve Liu, 2002). MAPK yolağının önemli proteinlerinden ERK1/2'nin PI3K inhibisyonuna karşı dirence neden olduğu yakın zamanda baş boyun tümörlerinde gösterilmiştir (Ruicci ve ark., 2018). Ayrıca 2 farklı nöroendokrin tümör hücre dizisinde (NET) BYL719, yalnız yüksek konsantrasyonda (20 ve 40 µM, 24 sa. tedavi) ERK1/2 fosforilasyonunu kısmen inhibe etmiştir, başka bir NET hücre dizinde ise etkilememiştir (Nolting ve ark., 2017). Bizim sonuçlarımızda da 10µM BYL719 ERK1/2 fosforilasyonunu 40sa. tedavi ile değiştirmedi. Öte yandan CXCR2 antagonisti, pERK1/2'yi belirgin şekilde inhibe etmiştir ve sonucumuz literatürle benzerdir (Ning ve ark., 2012). Ayrıca 10µM SB225002'nin pERK1/2 üzerindeki inhibe edici etkisi BYL719 ile değişmedi.

SB225002 pP38'i de belirgin olarak baskılamıştır ve bildiğimiz kadarıyla literatürde bu konuda bilgi bulunmamaktadır. İlginç olarak pP38 üzerine tek başına bir etkisini görmediğimiz BYL719, 10µM SB225002'nin inhibe edici etkisini kısmen azaltmıştır ancak kemokin (MIP-2 ve KC) sekresyonunu arttıracak kadar bir etki söz konusu değildir.

PI3K yolağının ana mediyatörü olan AKT'nin çeşitli kanserlerde sıklıkla aktifleştiiği, proliferasyon ve sitokin salınımı dahil çok çeşitli hücre fonksiyonlarda rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmamızda fare metastatik meme kanseri hücrelerinde BYL719 ve SB225002'nin tek başına ve birlikte uygulamasının AKT fosforilasyonu üzerine etkilerini değerlendirdik. SB225002 10µM'da, AKT fosforilasyonunu, 4TBM'de azaltırken 4THM'de değiştirmemiştir. Kolon ve prostat kanserlerinde yapılan çalışmada CXCR2 antagonisti, (SCH-527123 ve SB225002) ile AKT fosforilasyonunun azalmasına bağlı anti-tümöral etkiler bildirilmiştir (Ning ve ark., 2012; Xu M. ve ark., 2018b) Kritik olarak önceki çalışmamızda biz de SB225002 (1 ve 10 µM) ile 24sa tedavi sonrasında AKT fosforilasyonunun her iki hücre dizisinde baskılandığını gözlemlemiştirik (Erin ve ark., 2015). Ancak bu çalışmanın bulgularına göre uzun süreli tedavide (40sa) AKT üzerindeki inhibisyon 4THM'de tamamen 4TBM'de ise kısmen geri döndü.

Dahası literatürle uyumlu olarak 1 ve 10 μ M BYL719 ile AKT fosforilasyonu tamamen baskılanmıştır (Nolting ve ark., 2017) ve bu etki SB225002 ile geri dönmemiştir. Sonuçlarımız fare metastatik meme kanseri hücrelerinde CXCR2 inhibisyonu ile MIP-2 artışına ve bu etkinin BYL719 ile azalmasına AKT fosforilasyonunun aracılık ettiğini düşündürmektedir.

Dolayısıyla çalışmamızda CXCR2 antagonisti SB225002'nin antiproliferatif etkileri PI3K α inhibisyonu ile daha da artmıştır ve birlikte kullanımının olası direnci önlemesi hakkında fikir vermektedir. Daha ileri araştırmalar ile özellikle *in vivo* agresif meme tümörü modelinde bu kombinasyonun araştırılması daha iyi bir değerlendirme sağlayacaktır.

Önceki sonuçlarımızda PKC inhibitörü (RO318220) hücre proliferasyonunu baskılamış ancak MIP-2'yi arttırmıştır. Bundan yola çıkarak yaptığımız çalışmalarda PKC aktivatörünün (Bryostatin-1) MIP-2 sekresyonunu azalttığı tespit edildi. α 7 nikotinik asetilkolin reseptörünün immün hücre fonksiyonlarında önemli olduğu ve nikotinik agonistlerin, inflamatuvar sinyali ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe etmede asetilkolinden daha etkili olduğu bilinmektedir (de Jonge ve Ulloa, 2007). Dolayısıyla bu çalışmada α 7 nikotinik reseptörlerinin aktivitesini arttırdığı buna bağlı olarak anti-inflamatuvar etki gösterebileceği öngörüldüğü için epsilon alt tipine spesifik aktivatör FR236924 seçildi ve PKC ϵ aktivasyonunun pro-inflamatuvar bir kemokin olan MIP-2 azalmasındaki etkileri araştırıldı.

Bulgularımıza göre fare metastatik meme kanseri hücrelerinde, PKC ϵ aktivatörü FR236924 özellikle otokrin faktörlere bağlı hücre çoğalmasını 10 μ M konsantrasyonda belirgin derecede hem 4TBM hem de 4THM'de baskıladı. Ayrıca bu grupta CXCR2 antagonisti SB225002'nin antiproliferatif etkisini geriye çevirmediği gibi daha da arttırdı. CXCR2 inhibisyonuna bağlı MIP-2 ve KC salınımındaki artışı FR236924 4TBM'de kısmen baskılarken 4THM'de özellikle KC artışındaki inhibisyon kısıtlı kaldı. Literatürde, yakın zamanda sentezlenen ve linoleik asit türevi olan FR236924 ile kanser modelleri üzerinde bildiğimiz kadarıyla yapılan bir çalışma yoktur.

Proliferasyon ve sitokin salımı gibi çeşitli hücrel fonksiyonlarda önemli etkileri olan sinyal proteinlerinden pAKT, pERK ve pP38'in ekspresyonlarındaki değişiklikler belirlendi. Sonuçlarımıza göre fare metastatik meme kanseri hücrelerinde, FR236924, 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarda pAKT, pERK1/2 ve pP38 ekspresyonlarını değiştirmemişti. İlginç olarak FR236924, 4TBM'de SB225002'nin pAKT üzerindeki inhibe edici etkisini kısmen geri çevirmiştir. Ayrıca SB225002'nin pP38 üzerindeki inhibe edici etkisini de 4THM'de azaltmıştır, 4TBM'de değiştirmemiştir. Bu, 4THM'de KC salınımı üzerindeki etkilerin kısıtlı kalmasının nedeni olabilir. Bu konuda ileri çalışmalar daha detaylı bilgi sağlayacaktır.

Her ne kadar literatürde birden fazla derlemede CXCR2 antagonistlerinin kanser tedavisinde kullanılabileceklerine dair bilgiler bulunsa da, uzun süreli kullanımda ortaya MIP-2 artışına bağlı olası direncin mekanizmalarına yönelik bir çalışma bildiğimiz kadarıyla yoktur. Çalışmamız CXCR2 antagonistinin, PI3K α inhibisyonu ve PKC ϵ aktivasyonu ile anti-tümöral etkilerini arttırıcı kombine tedavi yaklaşımlarının araştırıldığı ilk çalışmadır. Ancak hangi koşullarda, hangi süre ve konsantrasyonlarda kullanılacağının belirlenmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. PI3K α inhibitörü BYL719 konsantrasyon bağımlı olarak 4TBM ve 4THM metastatik meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu azaltmıştır. Özellikle **1** ve **10 μ M** konsantrasyonu proliferasyonu belirgin olarak inhibe etmiştir.
2. PI3K α inhibitörü BYL719 hem yüksek serumlu hem de düşük serumlu ortamda 4TBM ve 4THM'de MIP-2 salımını azaltmıştır. Özellikle serumlu ortamda 4TBM hücre dizisinin MIP-2 salımındaki azalma, 4THM ile kıyaslandığında daha belirgindir.
3. PI3K α inhibitörü BYL719 hem yüksek serumlu hem de düşük serumlu ortamda 4TBM ve 4THM'de KC salımını azaltmıştır. Özellikle %5 FBS'lu ortamdaki etkiler her iki hücre dizisinde de benzer iken, KC salımındaki azalma %0,2 FBS'lu ortamda 4TBM hücre dizisinde daha belirgin gözlenmiştir.
4. PI3K β inhibitörü GSK2636771 fare metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunu değiştirmemiştir.
5. PI3K β inhibitörü GSK2636771 metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücrelerinin MIP-2 salımını etkilememiştir.
6. PI3K β inhibitörü GSK2636771 KC salımını 4TBM'de etkilememiştir ancak 4THM hücrelerinde yüksek konsantrasyonda düşük serum varlığında belirgin düzeyde arttırmıştır.
7. PI3K β inhibitörü TGX221 fare metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücrelerinin proliferasyonunu değiştirmemiştir.
8. PI3K β inhibitörü TGX221 fare metastatik meme kanseri 4TBM ve 4THM hücrelerinin MIP-2 salımını etkilememiştir.
9. PI3K β inhibitörü TGX221, KC salımını yüksek konsantrasyonda düşük serum varlığında hem 4TBM hem de 4THM'de belirgin düzeyde azaltmıştır.

10. CXCR2 antagonisti SB225002 1µM'da, fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM ve 4THM'nin proliferasyonunu belirgin olarak azaltmıştır.

11. BYL719 ile SB225002 birlikte uygulandığında özellikle 4TBM hücre hattında SB225002'nin proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkisi daha da artmıştır. 4THM'de ise aynı etki yalnızca yüksek serumlu ortamda görülmüştür.

12. SB225002 1 µM'da 4TBM ve 4THM'nin MIP-2 salımını arttırmıştır.

13. SB225002 1 µM'da 4TBM ve 4THM'nin KC salımını arttırmıştır.

14. Fare metastatik meme kanseri hücre dizileri 4TBM ve 4THM'de SB225002'nin MIP-2'yi arttırıcı etkisi, 10 µM BYL719 ile 4TBM'de belirgin olarak azalmıştır. 4THM hücre hattında ise %5 FBS varlığında etki kısmen gözlenirken %0,2 FBS'lu ortamda belirgin bir etki gözlenmemiştir

15. Fare metastatik meme kanseri hücre dizileri 4TBM ve 4THM'de SB225002'nin KC'yi arttırıcı etkisi 10 µM BYL719 ile yüksek serumlu ortamda belirgin olarak azalmıştır. Düşük serumlu ortamda her iki hücre hattında da belirgin bir etki gözlenmemiştir.

16. BYL719, 4TBM ve 4THM'de AKT fosforilasyonunu inhibe etmiştir ve bu etki SB225002 ile birlikte uygulandığında geriye dönmemiştir. SB225002, 4TBM'de AKT fosforilasyonunu 10µM'da azaltmıştır 4THM'de değiştirmemiştir.

17. SB225002 10 µM'da ERK1/2 fosforilasyonunu 4TBM ve 4THM'de tamamen inhibe etmiştir; BYL719 etki etmemiştir ve SB225002'in etkisini değiştirmemiştir.

18. 10µM SB225002 ile P38 fosforilasyonu hem 4TBM hem de 4THM'de belirgin şekilde inhibe olmuştur; BYL719 tek başına etki etmemiştir ancak SB225002'nin etkisini kısmen geri çevirmiştir.

19. FR236924 10µM konsantrasyonda düşük serumlu ortamda hem 4TBM hem de 4THM'nin proliferasyonunu belirgin şekilde baskılamıştır. Ayrıca SB225002'nin

antiproliferatif etkisini geriye çevirmediği gibi daha da arttırmıştır. %5 FBS ortamında ise 10 μ M'da hücre proliferasyonunu önemli düzeyde etkilememiştir.

20. FR236924 0,1-10 μ M konsantrasyonlarda, her iki hücre dizisinde CXCR2 inhibisyonuna bağlı MIP-2 deki artışı kısmen engellemiştir.

21. FR236924 0,1-10 μ M konsantrasyonlarda, özellikle 4TBM hücre dizisinde CXCR2 inhibisyonuna bağlı KC deki artışı kısmen baskılamıştır. 4THM'de ise sadece yüksek konsantrasyonda kısmen azalma görülmüştür.

22. SB225002, 10 μ M'da AKT fosforilasyonunu 4TBM hücre dizisinde baskılamıştır. FR236924 etkilememiştir ancak 25 μ M'da SB225002'nin inhibe edici etkisini kısmen azaltmıştır. 4THM'de ise belirgin bir etki gözlenmemiştir.

23. FR236924, ERK1/2 fosforilasyonunu 4TBM ve 4THM hücrelerinde etkilemediği gibi SB225002'nin ERK1/2 fosforilasyonu üzerindeki inhibe edici etkisini değiştirmemiştir.

24. FR236924, P38 fosforilasyonu 4TBM ve 4THM hücrelerinde etkilememiştir. Ancak SB225002'nin P38 fosforilasyonu üzerindeki inhibe edici etkisini 4THM'de kısmen geri çevirmiştir.

CXCR2 antagonistleri ve PI3K α inhibitörlerinin tek başına kullanımlarına dair literatürde bizim çalışmamızda olduğu gibi umut vadeden sonuçlar vardır. Ancak CXCR2 antagonisti SB225002 ile PI3K α inhibitörü BYL719'un birlikte kullanımına dair bildiğimiz kadarıyla bir çalışma yoktur. Ayrıca FR236924 ile PKC ϵ aktivasyonunun agresif fare metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde etkileri daha önce araştırılmamıştır. Sonuçlarımızın daha detaylı değerlendirilebilmesi için yapılacak daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, Manova-Todorova K, Leversha M, Hogg N, Seshan VE, Norton L, Brogi E, Massagué J. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*. 2012;150: 165-178.

Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*. 2000;165: 5269-5277.

Akita Y. Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *J Biochem*. 2002;132: 847-852.

Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med*. 1995;182: 155-162.

Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Hesselgesser J, Horuk R, Strieter RM. The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc Biol*. 1997;62: 554-562.

Azab F, Vali S, Abraham J, Potter N, Muz B, de la Puente P, Fiala M, Paasch J, Sultana Z, Tyagi A, Abbasi T, Vij R, Azab AK. PI3KCA plays a major role in multiple myeloma and its inhibition with BYL719 decreases proliferation, synergizes with other therapies and overcomes stroma-induced resistance. *Br J Haematol*. 2014;165: 89-101.

Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today*. 2000;21: 418-420.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*. 1997;15: 675-705.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4: 540-550.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005;7: 211-217.

Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* 16 Suppl. 2011;1: 12-19.

Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68: 1-8.

Benistant C, Chapuis H, Roche S. A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells. *Oncogene*. 2000;19: 5083-5090.

Bento AF, Leite DF, Claudino RF, Hara DB, Leal PC, Calixto JB. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *J Leukoc Biol*. 2008;84: 1213-1221.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001;411: 355-365.

Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H, Schraufstatter IU. 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: 2017-2022.

Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 2014;120: 3446-3456.

Burriss HA, 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71: 829-842.

Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, Wood WI, Moore MW. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science*. 1994;265: 682-684.

Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4: 127-150.

Chao T, Furth EE, Vonderheide RH. CXCR2-Dependent Accumulation of Tumor-Associated Neutrophils Regulates T-cell Immunity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4: 968-982.

Chen R, Zhao Y, Huang Y, Yang Q, Zeng X, Jiang W, Liu J, Thrasher JB, Forrest ML, Li B. Nanomicellar TGX221 blocks xenograft tumor growth of prostate cancer in nude mice. *Prostate*. 2015;75: 593-602.

Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90: 3574-3577.

Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28: 1075-1083.

Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, Hagen TR, Steinberg KP, Goodman RB. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol*. 1999;162: 2341-2346.

De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, Gunzer M, Roers A, Hogg N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*. 2013;121: 4930-4937.

De Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*. 2007;151: 915-929.

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

De Vasconcellos JF, et al. SB225002 Induces Cell Death and Cell Cycle Arrest in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells through the Activation of GLIPR1. *PLoS One.* 2015; 10: e0134783.

Devapatla B, Sharma A, Woo S. CXCR2 Inhibition Combined with Sorafenib Improved Antitumor and Antiangiogenic Response in Preclinical Models of Ovarian Cancer. *PLoS One.* 2015;10: e0139237.

Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol.* 2002; 72: 9-18.

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

Driscoll KE, Hassenbein DG, Carter J, Poynter J, Asquith TN, Grant RA, Whitten J, Purdon MP, Takigiku R. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;8: 311-318.

Du M, Qiu Q, Gruslin A, Gordon J, He M, Chan CC, Li D, Tsang BK. SB225002 promotes mitotic catastrophe in chemo-sensitive and -resistant ovarian cancer cells independent of p53 status in vitro. *PLoS One.* 2013;8: e54572.

Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120: 2423-2431.

Ebbesen SH, Scaltriti M, Bialucha CU, Morse N, Kasthuber ER, Wen HY, Dow LE, Baselga J, Lowe SW. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113: 3030-3035.

Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009;9: 550-562.

Erin N, Nizam E, Tanriover G, Koksoy S. 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: 57-69.

Fernandes MS, Melo S, Velho S, Carneiro P, Carneiro F, Seruca R. Specific inhibition of p110alpha subunit of PI3K: putative therapeutic strategy for KRAS mutant colorectal cancers. *Oncotarget*. 2016;7: 68546-68558.

Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, Vignon F, Lazennec G. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene*. 2003;22: 256-265.

Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, Kauffmann A, Guthy D, Erdmann D, De Pover A, Furet P, Gao H, Ferretti S, Wang Y, Trappe J, Brachmann SM, Maira SM, Wilson C, Boehm M, Garcia-Echeverria C, Chene P, Wiesmann M, Cozens R, Lehar J, Schlegel R, Caravatti G, Hofmann F, Sellers WR. Characterization of the novel and specific PI3Kalpha inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther*. 2014;13: 1117-1129.

Garg R, Benedetti LG, Abera MB, Wang H, Abba M, Kazanietz MG.. Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene*. 2014;33: 5225-5237.

Garrett JT, Sutton CR, Kurupi R, Bialucha CU, Ettenberg SA, Collins SD, Sheng Q, Wallweber J, Defazio-Eli L, Arteaga CL. Combination of antibody that inhibits ligand-independent HER3 dimerization and a p110alpha inhibitor potently blocks PI3K signaling and growth of HER2+ breast cancers. *Cancer Res*. 2013;73: 6013-6023.

Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. Variable expression of protein kinase C epsilon in human melanoma cells regulates sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*. 2005;4: 668-676.

Gobin B, Huin MB, Lamoureux F, Ory B, Charrier C, Lanel R, Battaglia S, Redini F, Lezot F, Blanchard F, Heymann D. BYL719, a new alpha-specific PI3K inhibitor: single administration and in combination with conventional chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Int J Cancer*. 2015;136: 784-796.

Goda AE, Koyama M, Sowa Y, Elokely KM, Yoshida T, Kim BY, Sakai T. Molecular mechanisms of the antitumor activity of SB225002: a novel microtubule inhibitor. *Biochem Pharmacol*. 2013;85: 1741-1752.

Gorin MA, Pan Q. Protein kinase C epsilon: an oncogene and emerging tumor biomarker. *Mol Cancer*. 2009;8: 9

Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas LC, Phng LK, Cain RJ, Salpekar A, Pearce W, Meek S, Millan J, Cutillas PR, Smith AJ, Ridley AJ, Ruhrberg C, Gerhardt H, Vanhaesebroeck B. Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature*. 2008;453: 662-666.

Guan J, Huang D, Yakimchuk K, Okret S. p110alpha inhibition overcomes stromal cell-mediated ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2018;17: 1090-1100.

Hall DA, Beresford IJ, Browning C, Giles H. Signalling by CXC-chemokine receptors 1 and 2 expressed in CHO cells: a comparison of calcium mobilization, inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of GTPgammaS binding induced by IL-8 and GROalpha. *Br J Pharmacol*. 1999;126: 810-818.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144: 646-674.

Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Lugering N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*. 2003;278: 8508-8515.

Highfill SL, Cui Y, Giles AJ, Smith JP, Zhang H, Morse E, Kaplan RN, Mackall CL. Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD1 efficacy. *Sci Transl Med.* 2014;6: 237ra267.

Hoeflich KP, Guan J, Edgar KA, O'Brien C, Savage H, Wilson TR, Neve RM, Friedman LS, Wallin JJ. The PI3K inhibitor taselisib overcomes letrozole resistance in a breast cancer model expressing aromatase. *Genes Cancer.* 2016;7: 73-85.

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

Hu D, Du C, Xue W, Dou F, Yao Y, Gu J. 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: 167-173.

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

Jin L, Batra S, Doua DN, Palaniyar N, Jeyaseelan S. CXCL1 contributes to host defense in polymicrobial sepsis via modulating T cell and neutrophil functions. *J Immunol.* 2014;193: 3549-3558.

Kamali-Sarvestani E, Aliparasti MR, Atefi S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. *Neoplasma.* 2007;54: 484-489.

Keam B, Kim S, Ahn YO, Kim TM, Lee SH, Kim DW, Heo DS. In vitro anticancer activity of PI3K alpha selective inhibitor BYL719 in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 2015;35: 175-182.

Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28: 1928-1936.

Kikkawa U, Takai Y, Tanaka Y, Miyake R, Nishizuka Y. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1983;258: 11442-11445.

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

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13: 159-175.

Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Menger MD, Schilling MK. Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33: 803-811.

Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer.* 2013;4: 342-359.

Ku BM, Jho EH, Bae YH, Sun JM, Ahn JS, Park K, Ahn MJ. BYL719, a selective inhibitor of phosphoinositide 3-Kinase alpha, enhances the effect of selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs.* 2015;33: 12-21.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8: 627-644.

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell.* 2003;4: 257-262.

Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338: 436-445.

Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med.* 1995;182: 219-231.

Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*. 2009; 457: 36-37.

Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Bio*. 2004;14: 155-160.

Massacesi C, Di Tomaso E, Urban P, Germa C, Quadt C, Trandafir L, Aimone P, Fretault N, Dharan B, Tavorath R, Hirawat S. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *Onco Targets Ther*. 2016;9: 203-210.

Miller LJ, Kurtzman SH, Wang Y, Anderson KH, Lindquist RR, Kreutzer DL. Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res*. 1998;18: 77-81.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005a; 436: 518-524.

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

Mithal P, Allott E, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, Younus A, Sangale Z, Lanchbury JS, Stone S, Freedland SJ. PTEN loss in biopsy tissue predicts poor clinical outcomes in prostate cancer. *Int J Urol*. 2014;21:1209-1214.

Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Nakai Y, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Shimada K, Konishi N, Toritsuka M, Kishimoto T, Rosser CJ, Fujimoto K. CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia*. 2016;18: 636-646.

Munoz L, Yeung YT, Grewal T. Oncogenic Ras modulates p38 MAPK-mediated inflammatory cytokine production in glioblastoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2016;17: 355-363.

Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95: 3032-3043.

Murphy PM, Tiffany HL. 1991. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253: 1280-1283.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52: 145-176.

Newton PM, Messing RO. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *Biochem J*. 2010; 427: 189-196.

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: 1353-1364.

Nolting S, et al. 2017. The selective PI3Kalpha inhibitor BYL719 as a novel therapeutic option for neuroendocrine tumors: Results from multiple cell line models. *PLoS One* 12: e0182852.

Norgauer J, Metzner B, Schraufstatter I. 1996. Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells. *J Immunol* 156: 1132-1137.

Ohtsuka Y, Lee J, Stamm DS, Sanderson IR. MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut*. 2001;49: 526-533.

Opdenakker G, Van Damme J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int J Dev Biol*. 2004;48: 519-527.

Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 1991;9: 617-648.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004; 9: 667-676.

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

Pan Q, Bao LW, Kleer CG, Sabel MS, Griffith KA, Teknos TN, Merajver SD. Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Res*. 2005;65: 8366-8371.

Polivka J, Jr., Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther*. 2014;142: 164-175.

Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*. 2001;411: 336-341.

Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 1885-1890.

Qu Y, Zhou F, Xu XY. Selective non-peptide CXCR2 antagonist SB225002 inhibits choroidal neovascularization in rat model. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2009; 45: 742-745.

Richardson RM, Pridgen BC, Haribabu B, Ali H, Snyderman R. Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. *J Biol Chem*. 1998;273: 23830-23836.

Richmond A, Thomas HG. Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J Cell Biochem*. 1988;36: 185-198.

Richmond A, Yang J, Su Y.. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22: 175-186.

Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90: 909-928.

Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22: 891-928.

Ruicci KM, Pinto N, Khan MI, Yoo J, Fung K, MacNeil D, Mymryk JS, Barrett JW, Nichols AC. ERK-TSC2 signalling in constitutively-active HRAS mutant HNSCC cells promotes resistance to PI3K inhibition. *Oral Oncol*. 2018; 84: 95-103.

Salcedo R, Resau JH, Halverson D, Hudson EA, Dambach M, Powell D, Wasserman K, Oppenheim JJ. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*. 2000;14: 2055-2064.

Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;347: 21-41.

Sand JM, Aziz MH, Dreckschmidt NE, Havighurst TC, Kim K, Oberley TD, Verma AK. PKCepsilon overexpression, irrespective of genetic background, sensitizes skin to UVR-induced development of squamous-cell carcinomas. *J Invest Dermatol*. 2010;130: 270-277.

Sawant KV, Poluri KM, Dutta AK, Sepuru KM, Troshkina A, Garofalo RP, Rajarathnam K. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep*. 2016;6: 33123.

Saxena M, Christofori G. Rebuilding cancer metastasis in the mouse. *Mol Oncol*. 2013;7: 283-296.

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: 5034-5040.

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

Serra V, et al. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene.* 2011; 30: 2547-2557.

Sgadari C, Farber JM, Angiolillo AL, Liao F, Teruya-Feldstein J, Burd PR, Yao L, Gupta G, Kanegane C, Tosato G. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood.* 1997;89: 2635-2643.

Shinohara H, Kayagaki N, Yagita H, Oyaizu N, Ohba M, Kuroki T, Ikawa Y. A protective role of PKCepsilon against TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284: 1162-1167.

Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26: 453-467.

Sivaprasad U, Shankar E, Basu A. Downregulation of Bid is associated with PKCepsilon-mediated TRAIL resistance. *Cell Death Differ.* 2007;14: 851-860.

Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006;12: 895-904.

Stemke-Hale K, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68: 6084-6091.

Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol.* 1995a.;57: 752-762.

Strieter RM, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995b;270: 27348-27357.

Takamori H, Oades ZG, Hoch OC, Burger M, Schraufstatter IU. Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas*. 2000;21: 52-56.

Taki M, et al. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun*. 2018; 9: 1685.

Tanaka A, Nishizaki T. The newly synthesized linoleic acid derivative FR236924 induces a long-lasting facilitation of hippocampal neurotransmission by targeting nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13: 1037-1040.

Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, McClain J, Sherry B, Fabre M, van Deventer S, Cerami A. Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med*. 1990;172: 911-919.

Templeton AJ, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106: dju124.

Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2001; 2: 129-134.

Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol*. 2008; 9: 953-959.

Thomas RK, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet*. 2007;39: 347-351.

Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. 2015;15: 7-24.

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

Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 2008;267: 226-244.

Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13: 195-203.

Varn FS, Wang Y, Mullins DW, Fiering S, Cheng C. Systematic Pan-Cancer Analysis Reveals Immune Cell Interactions in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 2017;77: 1271-1282.

Venkatakrishnan G, Salgia R, Groopman JE. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 2000;275: 6868-6875.

Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13: 143-154.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2: 489-501.

Wang Q, Liu P, Spangle JM, Von T, Roberts TM, Lin NU, Krop IE, Winer EP, Zhao JJ. PI3K-p110alpha mediates resistance to HER2-targeted therapy in HER2+, PTEN-deficient breast cancers. *Oncogene.* 2016; 35: 3607-3612.

Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature.* 2015; 528: 413-417.

Weigelt B, Downward J. Genomic Determinants of PI3K Pathway Inhibitor Response in Cancer. *Front Oncol.* 2012; 2: 109.

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

White JR, et al. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem.* 1998;273: 10095-10098.

Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 612-616.

Wong CH, Ma BB, Cheong HT, Hui CW, Hui EP, Chan AT. Preclinical evaluation of PI3K inhibitor BYL719 as a single agent and its synergism in combination with cisplatin or MEK inhibitor in nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Am J Cancer Res*. 2015;5: 1496-1506.

Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20: 87-90.

Wuyts A, Van Osselaer N, Haelens A, Samson I, Herdewijn P, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ, Proost P, Van Damme J. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. *Biochemistry*. 1997;36: 2716-2723.

Xu H, Lin F, Wang Z, Yang L, Meng J, Ou Z, Shao Z, Di G, Yang G. CXCR2 promotes breast cancer metastasis and chemoresistance via suppression of AKT1 and activation of COX2. *Cancer Lett*. 2018a;412: 69-80.

Xu M, Jiang H, Wang H, Liu J, Liu B, Guo Z. SB225002 inhibits prostate cancer invasion and attenuates the expression of BSP, OPN and MMP2. *Oncol Rep*. 2018b;40: 726-736.

Yamamoto S, Kanno T, Nagata T, Yaguchi T, Tanaka A, Nishizaki T. The linoleic acid derivative FR236924 facilitates hippocampal synaptic transmission by enhancing activity of presynaptic alpha7 acetylcholine receptors on the glutamatergic terminals. *Neuroscience*. 2005;130: 207-213.

Yang L, et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*. 2008;13: 23-35.

Yang X, Yang JA, Liu BH, Liao JM, Yuan FE, Tan YQ, Chen QX. TGX-221 inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Oncol Rep.* 2017;38: 2836-2842.

Yuan M, Zhu H, Xu J, Zheng Y, Cao X, Liu Q. Tumor-Derived CXCL1 Promotes Lung Cancer Growth via Recruitment of Tumor-Associated Neutrophils. *J Immunol Res* 2016. 2016; 65: 30410.

Zhang C, Xu B, Liu P. Addition of the p110alpha inhibitor BYL719 overcomes targeted therapy resistance in cells from Her2-positive-PTEN-loss breast cancer. *Tumour Biol.* 2016a; 37: 14831-14839.

Zhang S, Ma X, Zhu C, Liu L, Wang G, Yuan X. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Solid Tumors: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016b;11: e0164514.

Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002; 12: 9-18.

Zhao W, Qiu Y, Kong D. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7: 27-37.

Zhu Q, Han X, Peng J, Qin H, Wang Y. The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. *J Mol Histol.* 2012; 43: 699-713.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Uyruğu	TC
Soyadı	NİZAM	Tel no	5452158625
Doğum tarihi	17.08.1989	e-posta	esranizam@akdeniz.edu.tr esrahifa@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Kepez Lisesi	2006
Lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi- Fen fakültesi	2011
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Farmakoloji ABD	2016
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Farmakoloji ABD	2016-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	58,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
NK1 ve NK2 Reseptör Antagonistlerinin metastatik meme kanseri üzerine etkilerinin ortotopik fare modelinde araştırılması, Bursiyer	TÜBİTAK-1002	2015-2016
Meme kanserinde CXC kemokinlerinin regülasyonunda rol oynayan moleküler	TÜBİTAK-1001	2015-2018

mekanizmaların araştırılması: CXC Kemokin Reseptör 2 antagonistlerinin anti-tümöral etkilerine karşı olası direnç mekanizmaları, Bursiyer		
Metastatik Meme Kanserinde CXC Kemokin Reseptör 2 Antagonistlerinin Anti-tümöral Etkilerine Karşı Dirençte PI3K ve PKC Alt Tiplerinin Etkileri, Araştırmacı	Akdeniz Üniversitesi BAP	2017-2018
Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinde Fluoksetinin etkilerinin ve etki mekanizmasının in vitro modellerde araştırılması, Araştırmacı	Akdeniz Üniversitesi BAP	2014-2016
Substance P antagonistlerinin fare meme kanseri metastazı üzerine etkilerinin araştırılması, Bursiyer	Akdeniz Üniversitesi BAP	2015-2016
Metastatik Meme Kanserinde PI3K p110 alfa İnhibisyonunun (BYL719), Peg Doksorubisin İle Birlikte Olası Antitümöral Etkilerinin Araştırılması, Araştırmacı	Akdeniz Üniversitesi BAP	2018- devam ediyor

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Erin N., **Nizam E.**, Tanriöver G., Köksoy S., "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., vol.150, pp.57-69, 2015

2. **Nizam, E.**, Erin, N., " Differential consequences of neurokinin receptor 1 and 2 antagonists in metastatic breast carcinoma cells; Effects independent of Substance P " Biomedicine and Pharmacotherapy., vol 108, pp.263-270, 2018

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde sunulan ve kongre kitapçığında yayınlanan bildiriler:

1. **Esra Tavşan**, Nuray Erin. Phosphatidylinositol 3-kinases are involved in MIP-2 secretion from heart and brain metastatic breast carcinoma. EACR- Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress & 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress. 23rd-27th of April 2014 BODRUM page; .
2. **Esra Nizam**, Nuray Erin. Effects of neurokinin-1 receptor antagonist (RP67580) and neurokinin-2 receptor antagonist (GR159897) on metastatic breast cancer cells. International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine. 2-3 April 2015, İstanbul page ; .
3. **Esra Nizam**, Nuray Erin. Effects of neurokinin-1 receptor antagonist (RP67580) on metastatic breast cancer cells EACR- Sponsored 3rd Anticancer Agents Congress 18rd-19th of May 2015 İzmir, page ; 93.
4. **Esra Nizam**, Mustafa Gökhan Ertosun, Nuray Erin. Effects of neurokinin-2receptor antagonist (GR159897) on metastatic breast cancer cells EACR- Sponsored 3rd Anticancer Agents Congress 18rd-19th of May 2015 İzmir page ;

5. **Esra Nizam**, Nuray Erin. NK2 receptor but not NK1 receptor antagonist (GR159897, RP67580) increases release of angiogenic chemokine from breast carcinoma. 7th European Congress of Pharmacology 26rd-30th June 2016, İstanbul page;446
6. **Esra Nizam**, Gamze Tanrıöver Nuray Erin. In-vivo effects of NK1 and NK2 receptor antagonists on metastatic breast carcinoma. 7th European Congress of Pharmacology 26rd-30th June 2016, İstanbul page; 447
7. Nuray Erin, Özlem Duymuş, **Esra Nizam**. Inhibition of PKC activity with Byrostatin alters secretion of inflammatory chemokines. 14th CIMT Annual Meeting, mechanisms of efficacy in cancer immunotherapy. 10rd-12th May 2016, Mainz, Germany page; 265
8. **Esra Nizam**, Nuray Erin. The effects of PI3-K α and PI3K- β inhibitors on MIP-2 and KC secretion from metastatic breast carcinoma. 6th Multidisciplinary Cancer Research Congress , 27rd-30th October 2016, Konya page ;141
9. **Esra Nizam**, Nuray Erin; Protein Kinaz C (PKC ϵ) Aktivatörü FR236924, Meme Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonunu Azaltırken Kemokin Sekresyonunu Değiştirmemektedir. 24.Ulusal Farmakoloji Kongresi-2017 sayf;129 Trabzon
10. **Esra Nizam**, Gamze Tanrioever, Nuray Erin, Substance P antagonistlerinin karaciğere metastaz yapmış meme kanseri üzerine *İn vivo* etkilerinin Araştırılması. 1.Temel Onkoloji Sempozyumu, 2018 sayf; 39 İzmir