



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE  
HSP70 İNHİBİSYONUNUN ANTIKANSER ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Mustafa ERGÜL**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Fügen AKTAN**

**ANKARA  
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE  
HSP70 İNHİBİSYONUNUN ANTIKANSER ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Mustafa ERGÜL**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Fügen AKTAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN  
Prof. Dr. Yusuf TUTAR**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün  
15L0237006 proje numarası ve TÜBİTAK'ın 114Z365 proje numarası ile  
desteklenmiştir.**

**ANKARA  
2017**

## ET K BEYAN

### Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Meme Kanseri Hücrelerinde Hsp70 inhibitörünün Anti Kanser Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve deşerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tezdanimanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmaları/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

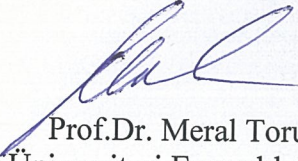
Öğrencinin Adı Soyadı: Mustafa Ergül

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalında  
MUSTAFA ERGÜL tarafından hazırlanan  
“ Meme Kanseri Hücrelerinde Hsp70 İnhibisyonunun Antikanser Etkilerinin  
Araştırılması” adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul  
edilmiştir.

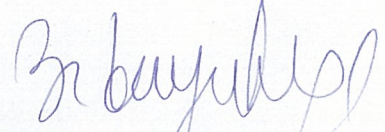
Tez Savunma Tarihi: 04/04/2017



Prof.Dr. Meral Torun  
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof.Dr. Fügen Aktan  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof.Dr. Zeliha Büyükbingöl  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof.Dr. Asuman Sunguroğlu  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Prof.Dr. Sevgi Akaydın  
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. K. Zafer Karaer  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## Ç İNDEK İLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
çindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
ekiller	x
Çizelgeler	xiii
<b>1.G R</b>	<b>1</b>
1.1. Isı ok Proteinleri	5
1.1.1. Isı ok Proteinlerinin Yapı ve Fonksiyonları	5
1.1.2. Isı ok Protein Sentezinin Regülasyonu	9
1.1.3. Önemli Hsp Aileleri	11
1.1.3.1. Hsp100 Ailesi	12
1.1.3.2. Hsp90 Ailesi	13
1.1.3.3. Hsp60 Ailesi	17
1.1.3.4. Hsp40 Ailesi	19
1.1.3.5. Küçük Hsp Ailesi	21
1.1.3.6. Hsp70 Ailesi	24
1.1.3.6.1. Hsp70 Üyesi Proteinler	25
1.1.3.6.2. Hsp70'in Yapısı	27
1.1.3.6.3. Hsp70'in Ko- aperonları	30
1.1.3.6.4. Hsp70'in Çalı ma Mekanizması	33
1.1.4. Kanser ve Apoptozda Hsp70	35
1.1.5. Hsp70'in Farmasötik Olarak Hedeflenmesi ve Sentetik Hsp70 nhibitörleri	39
1.1.5.1. Hsp70 NBD'nin Hedeflenmesi	41
1.1.5.2. Hsp70 SBD'nin Hedeflenmesi	43
1.1.5.3. Hsp70 Ko- aperonlarının Hedeflenmesi	44

<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>45</b>
2.1. Kullanılan Cihazlar	45
2.2. Kullanılan Kitler ve Malzemeler	45
2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları ve Veri Tabanları	46
2.4. Kullanılan Hücre Serisi	46
2.5. Kullanılan Yöntemler	46
2.5.1. İnsan Hsp70/inhibitör Etkileşimlerinin in silico Olarak Belirlenmesi	46
2.5.2. Hsp70 NBD Üzerinde Nokta Mutasyonları Yapılması ve Mutant Hsp70/inhibitör Etkileşimlerinin in silico Olarak Belirlenmesi	48
2.5.3. Hücre Kültürü	50
2.5.4. İnhibitör Konsantrasyonlarının Hazırlanması	50
2.5.5. XTT Hücre Canlılık Testi	51
2.5.6. Hsp70i Protein Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	51
2.5.7. Hsp70 Proteininin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	54
2.5.7.1. LB Besiyeri Hazırlanması	54
2.5.7.2. Ekspresyon Vektörünün Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerine Aktarımı	54
2.5.7.3. Küçük ve Büyük Hacimde Kültür Hazırlanarak Hsp70 Proteinin Üretilmesi	56
2.5.7.4. Bakterilerin parçalanması ve Hsp70 proteinin saflaştırılması	56
2.5.8. SDS PAGE Analizi	57
2.5.8.1. Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi	58
2.5.9. Hsp70 NBD'de Nokta Mutasyonu Gerçekleştirilmesi ve Mutant Proteinlerin Saflaştırılması	59
2.5.10. ATP hidroliz deneyleri	62
2.5.11. Lüisiferaz agregasyon deneyleri	63
2.5.12. MCF-7 Hücrelerinden RNA İzolasyonu	64
2.5.13. cDNA Sentezi	64
2.5.14. PCR Array Deneyleri	66
2.5.15. Statiksel Analiz	67

<b>3. BULGULAR</b>	<b>68</b>
3.1. Hsp70 ve Mutant Hsp70 Proteinlerinin inhibitörler ile Moleküler Doking Çalışmaları	68
3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	72
3.3. VER-155008, MKT-077, PES ve Paklitaksel'in MCF-7 Hücrelerinde Hsp70i Protein Düzeylerine Etkisi	76
3.4. PCR Array Deney Sonuçları	77
3.5. ATP Hidroliz Deneyleri	85
3.6. Lüsiferaz Katlama Deneyleri	87
<b>4. TARTI MA</b>	<b>89</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNER LER</b>	<b>107</b>
<b>ÖZET</b>	<b>109</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>110</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>111</b>
<b>ÖZGEÇM</b>	<b>127</b>

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli rolleri olduğu bilinen Hsp70 proteini inhibisyonunun meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkileri protein ve gen düzeyinde araştırılmıştır. Çalışma Hsp70 inhibisyonu konusunda araştırmacılara yeni kapılar aralamakla birlikte literatüre de önemli katkılar sağlayacaktır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın planlanması ve hazırlanması sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fügen AKTAN'a ve tez çalışmalarım sırasında emeğini, deneyimlerini ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. Yusuf TUTAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim sırasında her zaman desteklerini hissettiğim ve üzerimde büyük emekleri olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Serpil NEBOLU, Prof. Dr. Zeliha BÜYÜKBİNGÖL, Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU, Prof. Dr. Nefise EVCİMEN, Yrd. Doç. Dr. Arzu KARABAY, Yrd. Doç. Dr. Filiz BAKAR ve sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Ecem KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tez olum süresince her aşamada maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sevgili eğitimcim Yrd. Doç. Dr. Merve ERGÜL'e ve hayatımın her alanına anlam katan sevgili öğretmenim Ahmet Yusuf ERGÜL'e çok teşekkür ederim.

Son olarak varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.



## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>µl</b>	:	Mikrolitre
<b>g</b>	:	Gram
<b>M</b>	:	Molar
<b>mg</b>	:	Miligram
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>mM</b>	:	Mili molar
<b>ng</b>	:	Nanogram
<b>ATPaz</b>	:	Adenozin tri fosfataz
<b>ADP</b>	:	Adenozin di fosfat
<b>ATP</b>	:	Adenozin tri fosfat
<b>DP</b>	:	Denatüre Protein
<b>DnaK</b>	:	<i>Escherichia coli</i> Hsp70 analo u
<b>DnaJ</b>	:	<i>Escherichia coli</i> Hsp40 analo u
<b><i>E.Coli</i></b>	:	<i>Escherichia coli</i>
<b>Hsp</b>	:	Isı ok Protein
<b>Hsp100</b>	:	Isı ok protein 100
<b>Hsp90</b>	:	Isı ok protein 90
<b>Hsp70</b>	:	Isı ok protein 70
<b>Hsc70</b>	:	Konstitütif Hsp70 izoformu
<b>Hsp70i</b>	:	ndüklenen Hsp70 izoformu
<b>Hsp60</b>	:	Isı ok protein 60
<b>Hsp40</b>	:	Isı ok protein 40
<b>HSF</b>	:	Isı ok transkripsiyon faktörü
<b>HSE</b>	:	Isı ok elementi
<b>LB</b>	:	Luria Broth
<b>NTD</b>	:	N- Terminal Domain
<b>TRAP1</b>	:	TNF reseptör-ili kili protein 1
<b>TEMED</b>	:	Tetraetilmetilendiamin
<b>NBD</b>	:	Nükleotid Ba lanma Domaini

<b>SBD</b>	:	Substrat Ba lanma Domaini
<b>NDF</b>	:	Nükleotid De i tirici Faktör
<b>PBD</b>	:	Peptid Ba lanma Domaini
<b>PES</b>	:	Pifitrin- $\mu$
<b>MCF-7</b>	:	nsan meme adenokarsinom hücre hattı



## EK LLER

<b>ekil 1.1.</b> Hsplerin normal ve stres ko ulları altındaki fonksiyonları	9
<b>ekil 1.2.</b> Hsp aktivasyonu ve denatüre proteinlerin (DP) tamir mekanizması	11
<b>ekil 1.3.</b> Sınıf I ve sınıf II Hsp100 aperonlarının domain organizasyonları	13
<b>ekil 1.4.</b> Hsp90'ın kristal yapısı	14
<b>ekil 1.5.</b> Hsp90-aracılı süper- aperon mekanizmasının nükleotid ba ımlı döngüsü	15
<b>ekil 1.6.</b> Geldanamisin (GA)'nın Hsp90'ı inhibe etmesi sonucu hedef proteinin ubiquitin-proteozomal sistem yoluyla yıkılması	17
<b>ekil 1.7.</b> Hsp40 Ailesi üyelerinin domain yapıları	20
<b>ekil 1.8.</b> Hsp40'ın Hsp70'e J proteini aracılı ıyla katlanacak polipeptidi (substrat) sunması	21
<b>ekil 1.9.</b> nsan Hsp27 domain yapısının ematik olarak gösterilmesi	22
<b>ekil 1.10.</b> Isı okuna ba lı olarak do al proteinlerin stabilizesinin bozulması ve agregasyonu önlemek için küçük Hsplerin (bordo renk ile gösterilmi tir) oligomer olu turarak denatüre proteinlere ba lanması	23
<b>ekil 1.11.</b> <i>E. coli</i> Hsp70'inin domain (A) ve kristal (B) yapısı	27
<b>ekil 1.12.</b> Hsp70'in nükleotid ba lanma domaini	28
<b>ekil 1.13.</b> Hsp70 substrat ba lanma domaini	29
<b>ekil 1.14.</b> Hsp70'in önemli ko- aperonlar ile etkile ti i bölgeler	30
<b>ekil 1.15.</b> ATP hidrolizinin ematik olarak gösterimi ve ko- aperonların rolü	32
<b>ekil 1.16.</b> HSPA1A'nın fonksiyon gösterirken etkile ti i di er proteinler	33
<b>ekil 1.17.</b> Nükleotid hidrolizi, allosteri ve Hsp70 kompleksine substrat ba lanması	34
<b>ekil 1.18.</b> Hsp70'in antiapopototik rollerinin ematik olarak gösterilmesi	37
<b>ekil 1.19.</b> Bazı Hsp70 inhibitörlerinin kimyasal yapıları	40
<b>ekil 1.20.</b> Hsp70'in domain yapısı ve çe itli Hsp70 inhibitörlerinin ba lanma bölgeleri	41
<b>ekil 2.1.</b> Protein data bank ana sayfası	47
<b>ekil 2.2.</b> Docking server ana sayfası	48
<b>ekil 2.3.</b> nsan Hsp70 NBD de nokta mutasyonu yapılan amino asitler	49

<b>ekil 2.4.</b> Hsp70 NBD kristal yapısı ve amino asit sekansı	50
<b>ekil 2.5.</b> Bradford standart grafi i	52
<b>ekil 2.6.</b> Hsp70i Proteininin Standart E risi	53
<b>ekil 2.7.</b> nsan Hsp70 plazmitinin vektör eması	55
<b>ekil 2.8.</b> QuickChange nokta mutasyonu metoduna genel bakı	62
<b>ekil 3.1.</b> Hsp70 NBD ile AMP-PNP, ATP, MKT-077 ve VER-155008 etkile imleri ve etkile imlere ait serbest ba lanma enerjisi ( G) ve minimum inhibitör konsantrasyon (Ki) de erleri	69
<b>ekil 3.2.</b> Mutant Hsp70 ve inhibitörlerin doking sonuçlarının görselle tirilmi hali71	
<b>ekil 3.3.</b> Paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	72
<b>ekil 3.4.</b> VER-155008'in MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	73
<b>ekil 3.5.</b> MKT-077'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	73
<b>ekil 3.6.</b> PES'in MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi	74
<b>ekil 3.7.</b> Kontrol grubu, paklitaksel ve inhibitör gruplarına ait hücre görüntüleri	75
<b>ekil 3.8.</b> MCF-7 hücrelerinde VER-155008, Paklitaksel, MKT-077 ve PES'in Hsp70i protein düzeylerine etkisi	77
<b>ekil 3.9.</b> Human Cancer Drug Targets PCR array için sırası ile kontrol ve PES grubuna ait amplifikasyon e risi grafikleri	78
<b>ekil 3.10.</b> Human Heat Shock Proteins & Chaperones PCR Array için Sırası ile Kontrol ve PES grubuna ait amplifikasyon e risi grafikleri	79
<b>ekil 3.11.</b> PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki kanser ile ili kili gen ekspresyonu üzerindeki etkisi	82
<b>ekil 3.12.</b> PES ve kontrol grubu için "Human cancer drug targets PCR Array" de bulunan genlerin kümeleme analizi	83
<b>ekil 3.13.</b> PES ve kontrol grubu için "Human heat shock proteins & chaperones PCR Array" de bulunan genlerin kümeleme analizi	84
<b>ekil 3.14.</b> Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda ATP hidroliz grafi i	85

**ekil 3.15.** Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda denatüre olmu lüsiferazı katlama grafi i

87



## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Hsplerin artı na neden olan çe itli faktörler	5
<b>Çizelge 1.2.</b> Önemli Hsp ailelerinin isimlendirilmesi, hücre içi lokalizasyonları ve fonksiyonları	7
<b>Çizelge 1.3.</b> Hsp70 ailesine ait proteinler	26
<b>Çizelge 1.4.</b> Çe itli kanser türlerinde Hsp70 ili kisi	36
<b>Çizelge 2.1.</b> SOC besi yeri içeri i	56
<b>Çizelge 2.2.</b> Lizis, yıkama ve elüsyon çözeltilerinin içerikleri	57
<b>Çizelge 2.3.</b> Ayırma jeli (alt jel) ve deri im jeli (üst jel)'nin bile enleri ve miktarları	57
<b>Çizelge 2.4.</b> 1X Yürütme tamponu çözeltilsinin içeri i	58
<b>Çizelge 2.5.</b> Örnek yükleme tamponu, boyama çözeltilsi ve arıtma çözeltilsi içeri i	59
<b>Çizelge 2.6.</b> Mutant genlere ait ileri ve geri primerler	60
<b>Çizelge 2.7.</b> Genomik DNA eliminasyon karı ımı	65
<b>Çizelge 2.8.</b> Revers transkripsiyon karı ımı	65
<b>Çizelge 2.9.</b> PCR array için gerekli bile enler ve artlar	66
<b>Çizelge 3.1.</b> Hsp70 NBD ile ligandların etkile imine ba lı serbest ba lanma enerjisi ( G) de erleri	68
<b>Çizelge 3.2.</b> Mutant Hsp70 proteinleri ile inhibitörlerin etkile imine ba lı serbest ba lanma enerjisi ( G) de erleri	70
<b>Çizelge 3.3.</b> Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinleri ile ligandların etkile imine ba lı minimum inhibitor konsantrasyonu (Ki) de erleri	70
<b>Çizelge 3.4.</b> laç ve inhibitörlere ait IC50 de erleri	76
<b>Çizelge 3.5.</b> Human Cancer Drug Targets PCR array deneyleri sonucunda analizleri yapılan genler ve bu genlerin PES grubunda kontrol grubuna göre kat de i imleri	80
<b>Çizelge 3.6.</b> Human heat shock proteins & chaperones PCR array deneyleri sonucunda analizleri yapılan genler ve bu genlerin PES grubunda kontrol grubuna göre kat de i imleri	81

# 1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyada insanları etkileyen oldukça önemli bir sağlık sorunudur. Her yıl dünya genelinde milyonlarca insana kanser teşhisi konulmakta ve bu hastaların yarısı kansere bağlı sebeplerden hayatlarını kaybetmektedir. Ayrıca kanser, birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıradaki ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (Ma ve Yu, 2006). Son 20 yılda, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşam tarzının, çeşitli alışkanlıkların, coğrafik ve çevresel faktörlerin çeşitliliğine bağlı olarak kanser vakalarında ve kansere bağlı ölümlerde artış eğilimi görülmüştür (Adeloye ve ark., 2016). Yalnızca 2012'de yaklaşık 14,1 milyon insana kanser teşhisi konulmuş ve dünya genelinde yaklaşık 8,2 milyon kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir (Ferlay ve ark., 2015). 2030 yılına kadar da yaklaşık 17 milyon kişinin kanser ve kansere bağlı nedenlerle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Adeloye ve ark., 2016). İnsan sağlığını ve hayatını bu denli tehdit eden bir sağlık sorunu olan kanserin tedavisi için kanser hücrelerindeki çeşitli biyomolekülleri hedef alan tedavi stratejilerinde özellikle son yıllarda büyük gelişmeler yaşanmıştır. Proteinlerin de, hücresel fonksiyonları göz önüne alındığında kanser tedavisinde çok önemli bir hedef oldukları bilinmekte ve bu amaçla kanserle ilişkili çeşitli proteinlerin hedeflendiği birçok yeni kimyasal ajan geliştirilmektedir (Rodina ve ark., 2013; Kang ve ark., 2014).

Proteinler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde büyüme, çoğalma ve farklılaşma gibi hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde hayati öneme sahip olan organik moleküllerdir. Proteinlerin bu hayati fonksiyonları yerine getirebilmeleri için öncelikli olarak üç boyutlu yapılarına uygun bir şekilde katlanmaları, katlanmış hallerini korumaları ve hücre içerisindeki konumlarını almaları gerekmektedir (Nykanen, 2001; Valastyan ve Lindquist, 2014). Bazı küçük proteinler kendi kendine katlanabilse de daha büyük proteinler (örn: çoklu domain yapısına sahip proteinler) katlanabilmek için şaperonlar olarak adlandırılan yardımcı diğer proteinlere ihtiyaç duymaktadırlar. Ayrıca hücreler çeşitli stres durumlarına maruz kaldıklarında protein katlanmalarının uygun bir şekilde yapılabilmesi ve

denatüre olan proteinlerin tekrar katlanabilmesi için birçok şaperon sisteme ihtiyaç vardır. Şaperonlar, hem fizyolojik koşullarda hem de stres koşullarında proteinlerin katlanmalarına yardımcı olan protein molekülleridir (Bukau ve ark., 2006; Sharma ve Masison, 2009).

Özellikle ısı şokuna maruz kalmış hücrelerde ekspresyonunda artış gözlenen ısı şok proteinleri (*heat shock proteins*; Hspler) şaperonların en önemli alt grubu proteinlerdir. Birçok organizma yapısal olarak benzer ancak fonksiyon bakımından farklı Hsplere sahiptir. Hspler fizyolojik koşullarda yeni sentezlenen proteinlerin uygun konformasyonlara katlanmasına yardım etmektedirler. Bunun yanı sıra hücreler yüksek sıcaklık, susuzluk, kemoterapi gibi stres durumlarına maruz kaldıklarında proteinlerin katlanmalarında kısmen bozulmalar meydana gelmektedir. Böyle durumlarda Hspler, özellikle de Hsp70 ailesi proteinler, hasar görmüş proteinlerin tekrar doğru bir biçimde katlanmalarını sağlayarak protein agregasyonunu önlemektedirler (Sharma ve Masison, 2009; Tutar ve Tutar, 2010).

Hspler bahsedilen görevlerinin yanı sıra hücrel sinyalizasyondan ve hücre içi protein trafiğinin kontrolünden de sorumlu yapılardır. Özellikle Hsp90, Hsp70 ve Hsp27'nin apoptotik süreçleri farklı seviyelerde engelleyen apoptotik faktörlerle önemli ilişkilerinin olması ve apoptozun regülasyonundaki/inhibisyonundaki rolleri Hsplerin kanserle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre metabolik gereksinimleri oldukça fazla olduğu için Hsplere normal hücrelerden çok daha fazla ihtiyaç duymaktadırlar ve birçok kanser hücresinde normal hücrelere göre yüksek seviyelerde Hsp ekspresyonu görülmektedir. Tümör hücrelerindeki bu yüksek Hsp ekspresyonu, metastaza, invazyona, tümör boyutunda artışa, antikanser tedaviye karşı yüksek dirence ve sonuç olarak tedavide kötü prognoza neden olmaktadır. Örneğin yüksek seviyelerdeki Hsp70 ekspresyonunun hepatosellüler ve prostat kanserinin erken evreleri için bir belirteç olduğu; yine bu proteinin yüksek seviyedeki ekspresyonunun kolorektal karsinoma ve meme kanserinde lenf bezlerine metastazı gözlemlemek için belirteç olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde Hsp70 aşırı ekspresyonu akciğer kanserinde Ki67 pozitifliği ile ilişkili, servikal kanserde ise tümör boyutu ve hücre



proliferasyonu ile bağlantılıdır. Hsp70 seviyelerinin melanoma ve ağız kanseri ile ilişkili olabileceği, akut myeloid lösemili hastalarda hayatta kalma süresini kısalttığı ve kötü prognoza yol açtığı da bilinmektedir. Bu yüzden Hsplerin inhibisyonuna yönelik antikanser tedavi stratejileri son zamanlarda büyük ilgi görmekte ve bu alandaki çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Powers ve ark., 2010; Goloudina ve ark., 2012; Murphy, 2013).

Son zamanlarda birçok Hsp inhibitörü özellikle kanser tedavisi için klinik çalışma altındadır. Bunlardan Hsp90 inhibitörleri meme kanseri, akciğer kanseri ve kan kanserlerinin de dâhil olduğu birçok kanser türünün tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Jego ve ark., 2013). Ancak Hsp90 inhibitörlerinin önemli bir yan etkisi hücre ölümünün negatif bir düzenleyicisi olan Hsp70 ekspresyonunu uyarmasıdır. Hsp90 inhibisyonu ile uyarılan Hsp70'in yüksek seviyelerdeki ekspresyonu hücre ölümünü (özellikle de apoptozu) engellemekte, dolayısıyla Hsp90 inhibitörlerinin antitümör etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır (Guo ve ark., 2005).

Yukarıda bahsedildiği üzere Hsp90'ın tek başına inhibisyonu, Hsp70 ekspresyonunda artışa neden olduğu ve bu Hsp70, Hsp90'ın yerini aldığı için kanser tedavisinde yeterli olmamaktadır. Bu durum Hsp70 inhibisyonunun antikanser tedavi stratejilerindeki önemini ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasının amacı çeşitli Hsp70 inhibitörleri kullanılarak gerçekleştirilen Hsp70 inhibisyonunun meme kanseri hücrelerindeki antikanser etkinliğini gen seviyesinde ve protein seviyesinde incelemektir. Ayrıca Hsp70 proteininin nükleotid bağlama bölgesinin kritik noktalarında yapılacak nokta mutasyonlarının Hsp70 fonksiyonlarını nasıl etkilediği ve mutant Hsp70 proteinlerinin fonksiyonlarında inhibitörler varlığında nasıl değişiklikler oluşabileceğini araştırmaktır.

Genel olarak Hsp70 inhibitörlerinin antikanser etkileri biliniyor olsa da, bu inhibitörlerin kanser hücrelerindeki gen ekspresyon profillerini ne şekilde etkilediği açık bir şekilde bilinmemektedir. Ayrıca bu inhibitörlerin Hsp70 inhibisyonunu gen

seviyesinde mi, protein seviyesinde mi yoksa protein fonksiyonunu etkilemek suretiyle mi yaptıkları da net bir şekilde ortaya konulmamıştır.

Son yıllarda Hsp70 inhibisyonu üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmış olmakla birlikte, bu çalışma Hsp70 inhibisyonunun kanserle ve Hsplerle ilişkili gen ekspresyon profilini ne şekilde etkilediğini araştıran tek çalışmadır. Özellikle PCR array deneyleri sayesinde Hsp70 inhibitörlerinin kanserle ve Hsplerle ilişkili gen ekspresyon profilini ne şekilde değiştirdiğini anlamak ve olası yeni kanser yollarının keşfi, ileri çalışmalar için öncül olacaktır.



## 1.1. Isı Şok Proteinleri

### 1.1.1. Isı Şok Proteinlerinin Yapı ve Fonksiyonları







İlk olarak 1962 yılında İtalyan bilim adamı Ferruccio Ritossa tarafından *Drosophila melanogaster* larvalarının yüksek sıcaklığa maruz kalmış tükürük bezi hücrelerinde, şişkinleşerek kabarık hale gelmiş kromozomlarının tespit edilmesiyle keşfedilen Hspler, bakterilerden insanlara kadar hemen hemen bütün canlı organizmalarda bulunan ve evrimsel olarak çok iyi korunmuş proteinlerdir (Ritossa, 1962; De Maio, 1999). Isı stresi, bu proteinlerin sentezini önemli ölçüde artırdığından bu özel proteinler “ısı şok proteinleri” olarak adlandırılmıştır. Bütün Hspler moleküler şaperon olmalarına rağmen bütün moleküler şaperonlar ısı şok proteini kategorisine girmemektedir (Erlejman ve ark, 2014). İlk keşfedildiği sıralar sadece sıcaklık artışı ile sentezlendiği düşünülen Hsplerin daha sonraları besin yetersizliği, radyasyon, hipoksi, pH’daki değişiklikler, enfeksiyonlar, ağır metaller, oksidatif ve toksik stres gibi çevresel ve metabolik stres koşullarında da ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiş ve Hspler “stres proteinleri” olarak da adlandırılmışlardır (Çizelge 1.1) (Mansilla ve ark., 2012).

**Çizelge 1.1.** Hsplerin artışına neden olan çeşitli faktörler (Schlesinger, 1990; Gehrman ve ark., 2008; Tutar ve Tutar, 2010).

Çevresel	Hastalık	Normal Koşullar
Isı şoku	Ateş	Gelişme
Kimyasallara maruziyet	İskemi	Normal hücre döngüsü
UV ışınlarına maruziyet	Hipoksi	Hücre farklılaşması
Besin yetersizliği	İnflamasyon	Hormonal stimülasyon
pH değişikliği	Viral stres	Embriyonik gelişim
Oksidatif stres	Kanser	Büyüme faktörleri
Kanser ilaçları	Doku Travmaları	
Nikotin	Depresyon	
Ağır metaller	Genetik lezyonlar	
Alkol		

Memeli Hspleri genellikle molekül ağırlıkları ve fonksiyonlarına göre Hsp100 (100-104 kDa), Hsp90 (82-90 kDa), Hsp70 (68-75 kDa), Hsp60 (58-65 kDa), Hsp40 (40 kDa), ve küçük Hspler (15-30 kDa), olmak üzere 6 ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bu proteinlerin molekül ağırlıkları 15 kDa-110 kDa arasında değişmekle birlikte her bir Hsp ailesi farklı hücre içi lokalizasyonlarda bulunan çeşitli izoformlardan oluşmaktadır. Hsplerin hücre içi lokalizasyonları fonksiyonlarına göre değişmekle birlikte sitozolde ve nükleusta (Hsp27, Hsc70, Hsp70 ve Hsp90), endoplazmik redikulum lümeninde (Grp78 ve Grp 94) ve mitokondriyal boşlukta [Grp75, Hsp60 ve Hsp90 homoloğu TRAP1 (TNF reseptör-ilişkili protein 1)] bulunabilmektedirler. Ayrıca, hücre içi lokalizasyonlarından farklı olarak plazma membranında ve hücre dışı alanda da bulunabilmektedirler. Özellikle tümörlü hücrelerde Hsp70 proteinleri, Hsp90 ve Hsp90 ailesine bağlı GP96 proteinleri hücre dışı ortamda bulunmaktadır. (Kampinga, 2006; Sherman ve Multhoff, 2007; Kampinga ve ark., 2009). Hücre içi Hspler den farklı olarak hücre dışında ya da plazma membranı üzerinde bulunan bu Hsplerin özellikle de bağışıklık sistemini uyarıcı ve düzenleyici fonksiyonları bulunmaktadır (Multhoff ve Hightower, 2011). Çizelge 1.2 de önemli Hsplerin hücrel lokalizasyonları ve fonksiyonları özetlenmiştir.

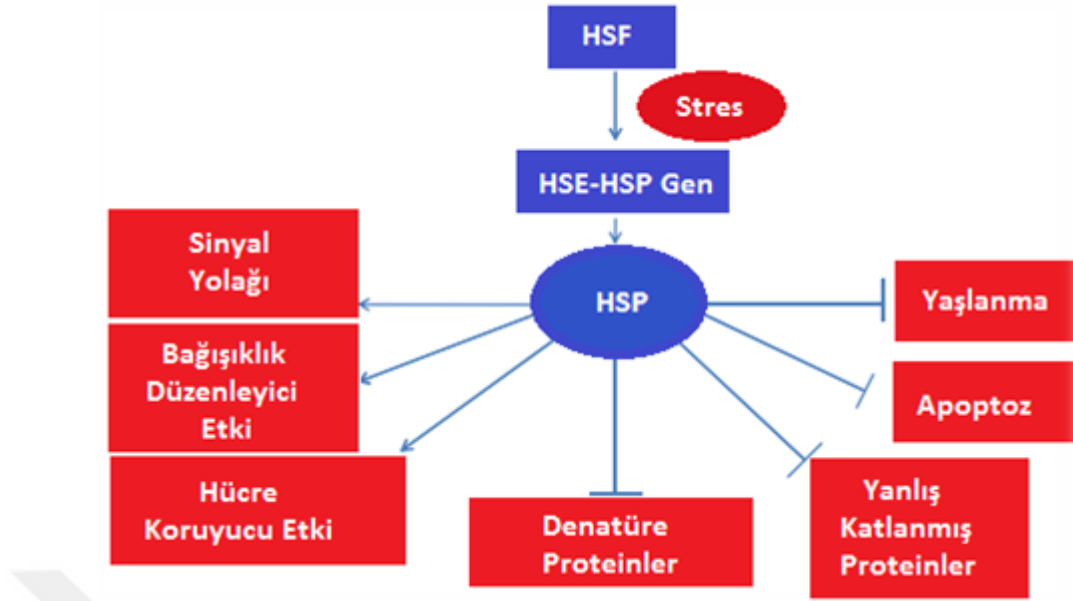
**Çizelge 1.2.** Önemli Hsp ailelerinin isimlendirilmesi, hücre içi lokalizasyonları ve fonksiyonları (Zorzi ve Bonvini, 2011).

Aile	Organizma	Şaperonlar	Lokalizasyon		Fonksiyon
<b>Hsp100</b>	<i>E.coli</i> <i>S.cervisiae</i>	ClpA, B, C Hsp104	Sitoplazma Sitoplazma	 6-7 mer	Agregatlardan denatüre proteinlerin alınarak yeniden katlanması
<b>Hsp90</b>	<i>E.coli</i> <i>S.cervisiae</i> İnsan	HtpG Hsp83 Hsp90 GRP94 TRAP1	Sitoplazma Sitoplazma Sitoplazma Nükleus ER Mitokondri	 Dimer	Sinyal transdüksiyonu (steroid hormon reseptörleri, tirozin kinazlar, serin/tireonin kinazlar v.b ile etkileşim), ısı şok yanıtının regülasyonu, hücre döngüsü ve çoğalması, mitokondri bütünlüğünün korunması
<b>Hsc/Hsp70</b>	<i>E.coli</i> <i>S.cervisiae</i> İnsan	DnaK Ssa1-4, Ssb1,2 Kar2, Ssc1  Hsc70, Hsp70 BIP, mHsp70	Sitoplazma Sitoplazma ER Mitokondri  Sitoplazma Nükleus, ER Mitokondri	 Monomer	Isı şok yanıtının regülasyonu, hedef zincir polipeptidler ile etkileşim, organeller arası transport, sinyal transdüksiyonu, denatüre proteinlerin yeniden katlanması, hücre döngüsü ve çoğalması, anti-apoptotik aktivite, tümörlü hücrelerde antijen özellik gösterme
<b>Hsp60</b>	<i>E.coli</i> <i>S.cervisiae</i> Bitki İnsan	GroEL/ES Hsp60 Cpn60 Hsp60	Sitoplazma Mitokondri Kloroplast Mitokondri	 14- mer	Katlanma ve denatüre proteinlerin stabilizasyonu, çeşitli proteolitik sistemler için ko-faktör olma, bakteriofajların ve bitkisel proteinlerin birleştirilmesi
<b>Hsp40</b>	<i>E.coli</i> <i>S.cervisiae</i> İnsan	dnaJ Ydj1 Hdj1, Hdj2	Sitoplazma Sitoplazma Nükleus	 Monomer	Hsp70'in ATPaz aktivitesi, substrat bağlanması ve salınması için gerekli ko-şaperon
<b>Küçük Hspler</b>	<i>E.coli</i> İnsan	IbpA, IpbB Hsp27 crystallin	Sitoplazma Sitoplazma Sitoplazma	 8-24 mer	Protein agregasyonunun önlenmesi, aktin mikrofilyamentlerinin stabilizasyonu sayesinde termotolerans, anti-apoptotik aktivite

Genel olarak Hspler, bir N-terminal adenin nükleotid bağlanma domain (NBD), peptid/substrat bağlanma domainini (PBD/SBD) içeren bir C-terminal domain ve ATPaz aktivitesine olanak sağlayan ve hedef proteinin tanınmasında rol alan domainler arası bir esnek bağlayıcıdan oluşan benzer moleküler yapı göstermektedirler (Zorzi ve Bonvini, 2011). Büyük molekül ağırlıklı Hspler ATP-bağımlı şaperonlar (Hsp90, Hsp70 ve Hsp60) olarak tanımlanırken, küçük molekül ağırlıklı Hspler (Hsp27 gibi) ATP-bağımsız aktivite göstermektedirler. Her bir Hsp ailesi sürekli sentezlenen (konstitütif) veya strese bağlı olarak uyarılabilen (indüklenebilen) protein üyelerinden oluşmaktadır. Hücrede çevresel veya fizyolojik herhangi bir stres olmadığında sürekli sentezlenen Hspler proteinlerin uygun şekilde katlanması ve görev yerlerine taşınması görevlerini yerine getirmektedirler. Örneğin stres faktörlerinin etkili olmadığı bir hücrede Hsp90 proteinlerinin toplam hücre proteinlerinin %1'ini oluşturması bu proteinlerin normal hücre koşullarında da sentezlendiğini ve protein katlanmalarında rol aldıklarını göstermektedir. Hücre stres koşullarında ise hücrenin ölümcül olabilecek hasara karşı korunması amacıyla strese bağlı olarak uyarılabilen Hsplerin ekspresyonunda büyük bir artış gözlenmektedir (Didelot ve ark., 2007; Schmitt ve ark., 2007). Hem sürekli sentezlenen hem de strese bağlı olarak uyarılabilen Hsplerin;

- ❖ Yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ve protein homeostazisinin sağlanması,
- ❖ Protein agregatlarının önlenmesi,
- ❖ Denatüre proteinlerin yeniden katlanması ya da hasar sonucu onarılması mümkün olmayan proteinlerin yıkımının kolaylaştırılması,
- ❖ Protein komplekslerinin birleştirilmesi veya ayrıştırılması,
- ❖ Membranlar arası protein translokasyonuna yardım edilmesi,

gibi çok çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır. Ayrıca bazı Hspler güçlü hücre koruyucu özelliklere sahiptir. Örneğin Hsp70 gerek içsel, gerekse dışsal apoptotik yolları inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002; Young ve ark., 2004, Calderwood ve ark., 2006). Şekil 1.1 de Hsplerin hücrelerde normal koşullardaki ve stres durumundaki fonksiyonları özetlenmiştir.



**Şekil 1.1.** Hsplerin normal ve stres koşulları altındaki fonksiyonları (Khalil ve ark., 2011).

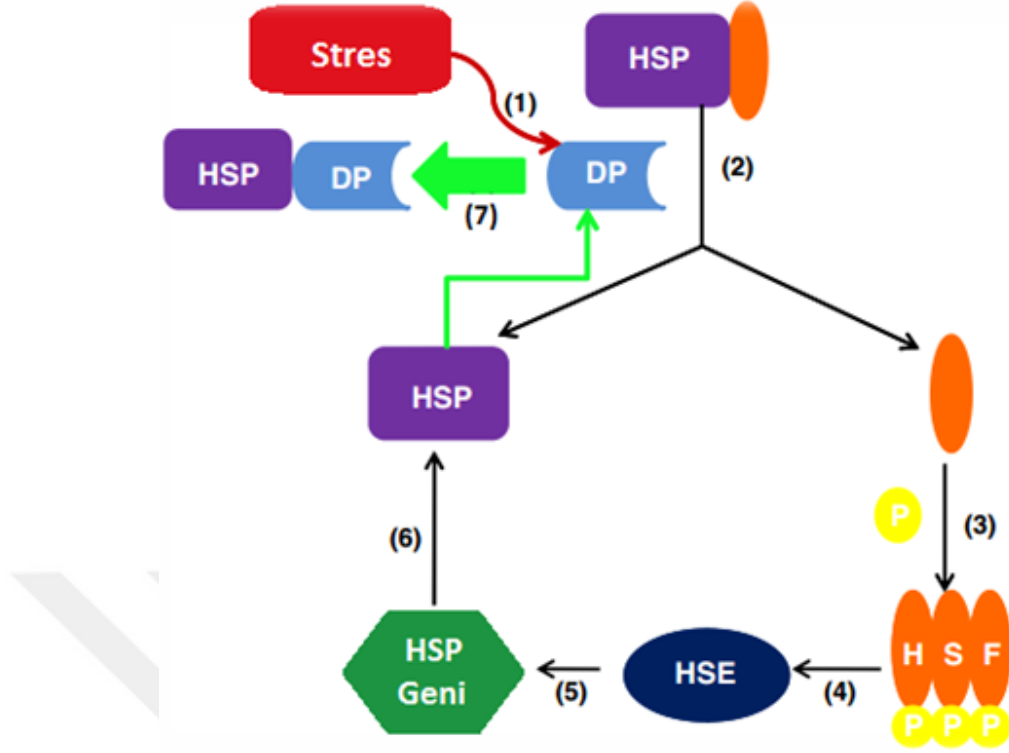
Hücresel stres, proteinlerin hidrofobik bölgelerinin açığa çıkmasını sağlamaktadır ve bu durum proteinlerin yüzey alanlarında artışa neden olmaktadır. Proteinlerin yüzey alanlarındaki bu artış ve hidrofobik bölgeler, protein-protein etkileşimini artırarak agregatların oluşmasına; bu agregasyon ise total protein konsantrasyonunda azalmaya ve proteinlerin fonksiyonlarında bozulmalara neden olmaktadır. Özellikle de hayati fonksiyona sahip proteinlerde meydana gelen agregasyon, organizma için çok önemli sorunlara neden olabilmektedir. Hspler özellikle de Hsp70 ailesi proteinleri bu hidrofobik bölgelere bağlanarak protein etkileşimlerini ve agregasyonları önlemektedirler. Bu durum hücrelerdeki şaperonların organizmanın yaşamını sürdürmesi için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Tutar, 2006a; Tutar, 2006b; Sharma ve Masison, 2009).

### 1.1.2. Isı Şok Protein Sentezinin Regülasyonu

Isı şoku veya çeşitli etkenlere bağlı olarak oluşan stres koşullarında, Hspler transkripsiyon ve translasyon mekanizmaları yoluyla hızlı bir şekilde sentezlenmeye başlamaktadırlar. Hücresel stres, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır (Sarto ve ark., 2000). Hsp genlerinin transkripsiyonu, ısı şok

transkripsiyon faktörleri (HSFler) ailesinin kontrolü altındadır ve HSF ailesinin farklı üyeleri kendilerine özgü farklı stres durumlarında aktive edilmektedirler (Whitley ve ark., 1999). HSFler ısı şok geninin promotor bölgesi olan ısı şok element (HSE)'ye spesifik olarak bağlanan transkripsiyon faktörleridir. İnsanda HSF-1, HSF-2 ve HSF-4 olmak üzere üç tane HSF karakterize edilmiş olsa da HSF-1, kısa süreli Hsp indüksiyonunda esas regülatör olarak gösterilmiştir. HSF-3, insan hücrelerinde “yalancı gen” olarak inaktif halde bulunurken, HSF-2 ve HSF-4 bağışıklık ve farklılaşma süreçlerinde rol almaktadırlar. Normal koşullar altında dinlenme halindeki bir hücrede HSF-1 inaktif monomer halde sitoplazmada bulunmaktadır. Stres durumunda ise stres protein geninin 5' promotor bölgesine (HSE) bağlanarak transkripsiyon ve translasyonu başlatmak için trimerizasyon ve fosforilasyon ile aktif hale dönüşerek çekirdeğe geçmektedir. Sonuç olarak Hsp transkripsiyonunu sağlayarak Hsp27, Hsp70 ve Hsp90 gibi uyarılabilir Hsp sentezini önemli ölçüde artırmaktadır. Hsp sentezinin regülasyonu ise yine Hsplerin kendileri tarafından sağlanmaktadır. Hspler gen transkripsiyonu regülasyonunda önemli rol almaktadırlar. Stres olmadığı durumlarda aşırı eksprese olan Hspler, HSF-1'in trans-aktivasyon bölgesine bağlanarak Hsp üretimini sonlandırmaktadırlar. Böylece daha fazla Hsp üretimi önlenmiş olmaktadır. Hsp üretim mekanizması ve aktivasyonu Şekil 1.2 de gösterilmiştir (Khalil ve ark., 2011; Zorzi ve Bonvini, 2011).





**Şekil 1.2.** Hsp aktivasyonu ve denatüre proteinlerin (DP) tamir mekanizması: (1) Stres koşulları protein denatürasyonuna neden olur. (2) DP'lerin varlığı Hsp-HSF kompleksinin ayrılmasını uyarır. Bu kompleks DP yokluğunda transkripsiyon sürecini sınırlar. (3) HSF, daha fazla Hsp üretebilmek için fosforilasyon ve trimerizasyon yoluyla aktifleşir. (4) Aktive olan HSF, DNA dizisi üzerindeki HSE'ye bağlanır. (5) HSE, Hsp geninin promotor bölgesinin bir parçasıdır. (6) Bol miktarda Hsp üretilir. (7) Yeni üretilmiş Hspler daha fazla DP'lere bağlanmak için hazırdır (Khalil ve ark., 2011).

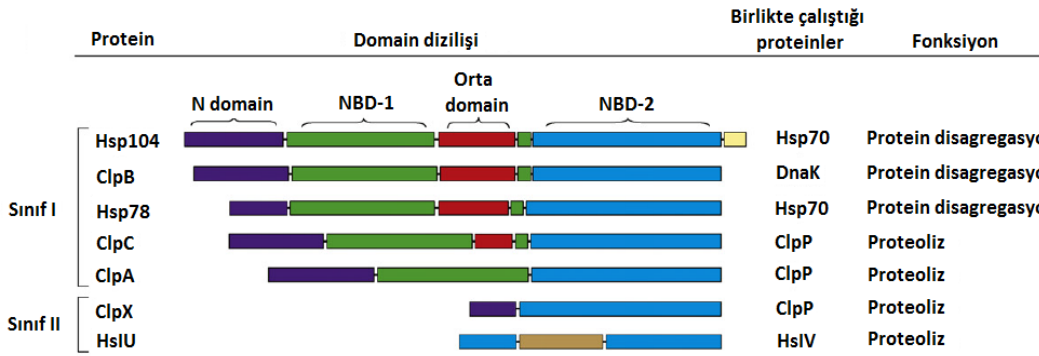
### 1.1.3. Önemli Hsp Aileleri

Hspler genel olarak yüksek molekül ağırlıklı Hspler ve küçük Hsp aileleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Hsp100, Hsp90, Hsp70 ve Hsp60 ailesi ilk gruba ait önemli şaperonları oluştururken, Hsp27 ve  $\alpha$ B-kristallin küçük Hsp ailesinin en önemli temsilcilerindedir (Lanneau ve ark., 2010). Bu araştırmada Hsp70 proteininin antikanser özellikleri incelendiği için diğer Hsplere göre Hsp70 ile ilgili daha ayrıntılı bilgi verilmiştir.

### 1.1.3.1. Hsp100 Ailesi

Yüksek molekül ağırlıklı Hsplerden olan Hsp100, mayada (Hsp104), bakterilerde (ClpB), bitkilerde (Hsp101) ve ökaryotik mitokondrilerde bulunan ve çeşitli stres durumlarına karşı hücreyi korumakla görevli şaperondur (Lee ve ark., 2013). Memelilerde Hsp100 homologunun bulunmaması sebebiyle bu protein bakteri ve mayada karakterize edilmiştir (Guttmann ve Koumenis, 2011). Hsp100'ün asıl görevi diğer şaperonlardan farklı olarak çeşitli hücrel streslere maruziyet sonucu denatüre olmuş proteinlerin oluşturduğu protein kümelerini (agregatları) daha küçük parçalara ayırarak çözmektir (Doyle ve Wickner, 2009). Ayrıca Hsp100, proteoliziste, gen regülasyonunda, membranlar arası protein trafiğinde ve mayalarda yüksek sıcaklıklara karşı tolerans gelişmesinde görev almaktadır (Schirmer ve ark., 1998; Bukau ve ark, 2006).

Hsp100, yüksek seviyede korunmuş olan bir N-terminal domain (NTD), bir orta (M-) domain ve iki ATP-bağlanma domaininden (D1 ve D2) oluşmaktadır. M-domain, 85 A° uzunluğunda, çift kıvrımlı ve protein agregatlarının çözülmesinde kritik rol oynayan birimdir. Hsp100 şaperonları sınıf I ve sınıf II olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Hsp104, ClpB, Hsp78, ClpC ve ClpA proteinlerinden oluşan sınıf I, iki adet nükleotid bağlanma bölgesi içerirken, ClpX ve HsIU'den oluşan sınıf II proteinler ise bir adet nükleotid bağlanma bölgesinden oluşmaktadırlar (Şekil 1.3) (Doyle ve Wickner, 2009; Lee ve ark., 2013).



**Şekil 1.3.** Sınıf I ve sınıf II Hsp100 şaperonlarının domain organizasyonları. Şekilde ayrıca sınıf I ve sınıf II proteinlerin fonksiyonları ve birlikte çalıştıkları proteinler de gösterilmiştir (Doyle ve Wickner, 2009).

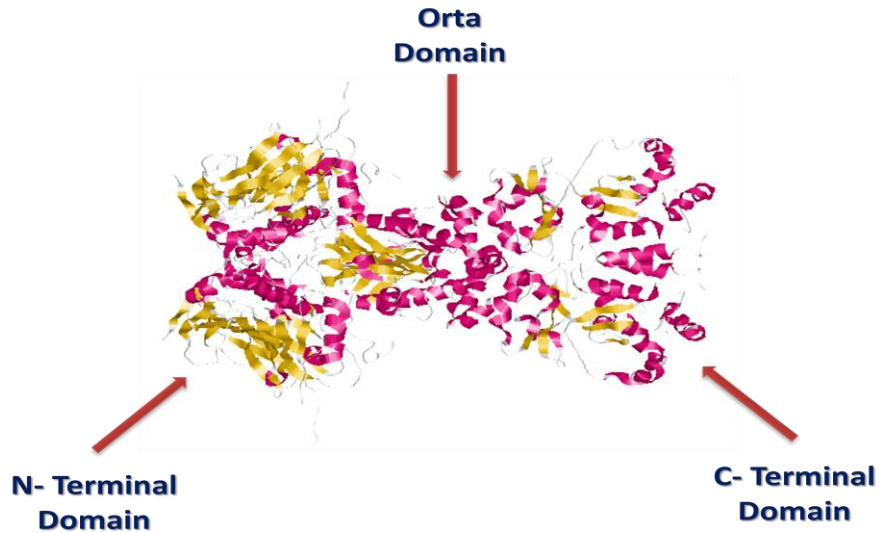
Hsp100, AAA+ üst familyasının bir üyesidir. Bu şaperonlar hegzamerik halkalar ve substrat proteinin işlendiği merkezi bir kanal olarak düzenlenmiş bir veya iki adet AAA+ domainden oluşmaktadırlar. Birçok Hsp100 proteini denatüre proteinleri açmak/çözmek ve bu proteinleri proteolitik boşlukta tutan halkasal peptidazlar ile ilişkilidir (Mayer, 2010). Hsp100'ün substratları nasıl katladığı ile ilgili teorilerden biri şu şekildedir: agregatlardan oluşan substratlar Hsp100'de bulunan merkezi kanaldan aşağı doğru inerler. Kanalin sonunda ise Hsp70-Hsp40 kompleksi beklemektedir ve bu kompleks, proteinlerin tekrar doğru bir biçimde katlanmasını sağlamaktadır (Tutar ve Tutar, 2010). Yani fonksiyonel proteinlerin agregat halden kurtularak yeniden üç boyutlu yapılarını kazanabilmeleri için Hsp100 şaperonlarının Hsp70-Hsp40 kompleksi ile koordineli olarak çalışarak güçlü bir şaperon sistem oluşturmaları gerekmektedir (Lee ve ark., 2013).

### 1.1.3.2. Hsp90 Ailesi

Evrim boyunca yüksek seviyede korunmuş olan Hsp90, bütün ökaryotik hücrelerde eksprese edilmekte ve total hücresel protein ağırlığının %1-2 sini oluşturmaktadır. Hücresel stres durumunda ise bu miktar %4-6'lara kadar çıkabilmektedir (Taipale ve ark., 2010). Nükleusta az miktarda bulunmalarının yanı sıra büyük bir kısmı sitoplazmada lokalizedir. Moleküler şaperon olarak Hsp90, proteinlerin katlanması, hücresel kompartımanlar arasında protein translokasyonu,

yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması, protein yıkımı, agregasyon önleme ve hormon/sinyal iletimi gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol oynamaktadır. İleri ökaryotik organizmalarda stresle uyarılan (Hsp90 $\alpha$ ) ve konstitütif olarak eksprese edilen (Hsp90 $\beta$ ) kristal yapıları oldukça benzer (yaklaşık %85) iki sitozolik Hsp90 izoformu bulunmaktadır. Bunlara ilaveten GRP94 (glukoz regüle edici protein 94) ve TRAP1 proteinleri de sırasıyla endoplazmik retikulum ve mitokondri yerleşimli Hsp90 izoformu proteinlerdir (Sreedhar ve ark., 2004; Erlejman ve ark., 2014).

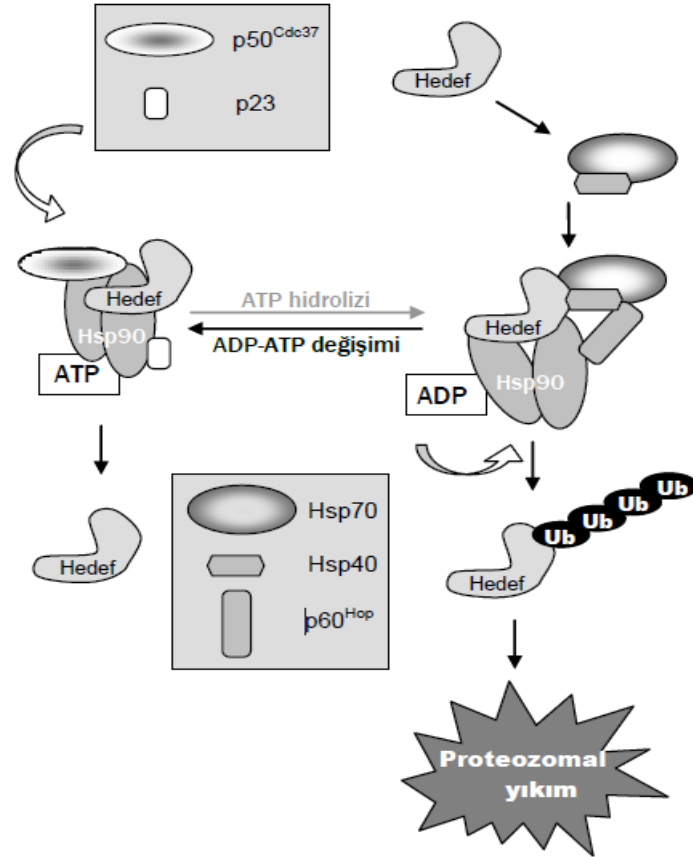
Hsp90'ın moleküler yapısı üç fonksiyonel bölgeden oluşmaktadır: (1) ATP'nin bağlandığı ve hidroliz olduğu cep bölgesi olan amino (N)-terminal domain; bu bölgenin ATPaz aktivitesi vardır ve hedef proteinlerin katlanmasını regüle etmektedir (2) Orta domain, hedef proteinlerin ve ko-şaperonların tanınmasından/bağlanmasından ve ATP hidrolizinin regülasyonundan sorumludur. (3) Karboksil (C) -terminal domain Hsp90 dimerizasyonundan sorumlu bölgedir (Şekil 1.4). Bu bölgenin son kısmında ayrıca Hop, FKBP52 ve PP5 gibi ko-şaperonların bağlanmasından sorumlu MEEVD motifi bulunmaktadır (Mahalingam ve ark., 2009; Taipale ve ark., 2010; Hartl ve ark., 2011).



**Şekil 1.4.** Hsp90'ın kristal yapısı (PDB kodu: 2CG9).

Hsp90 aktivitesi için ATP gereklidir. ATP, Hsp90'a bağlanınca Hsp90 "kapalı" konformasyona geçerek hedef proteinin bağlanmasını sağlamaktadır. Daha

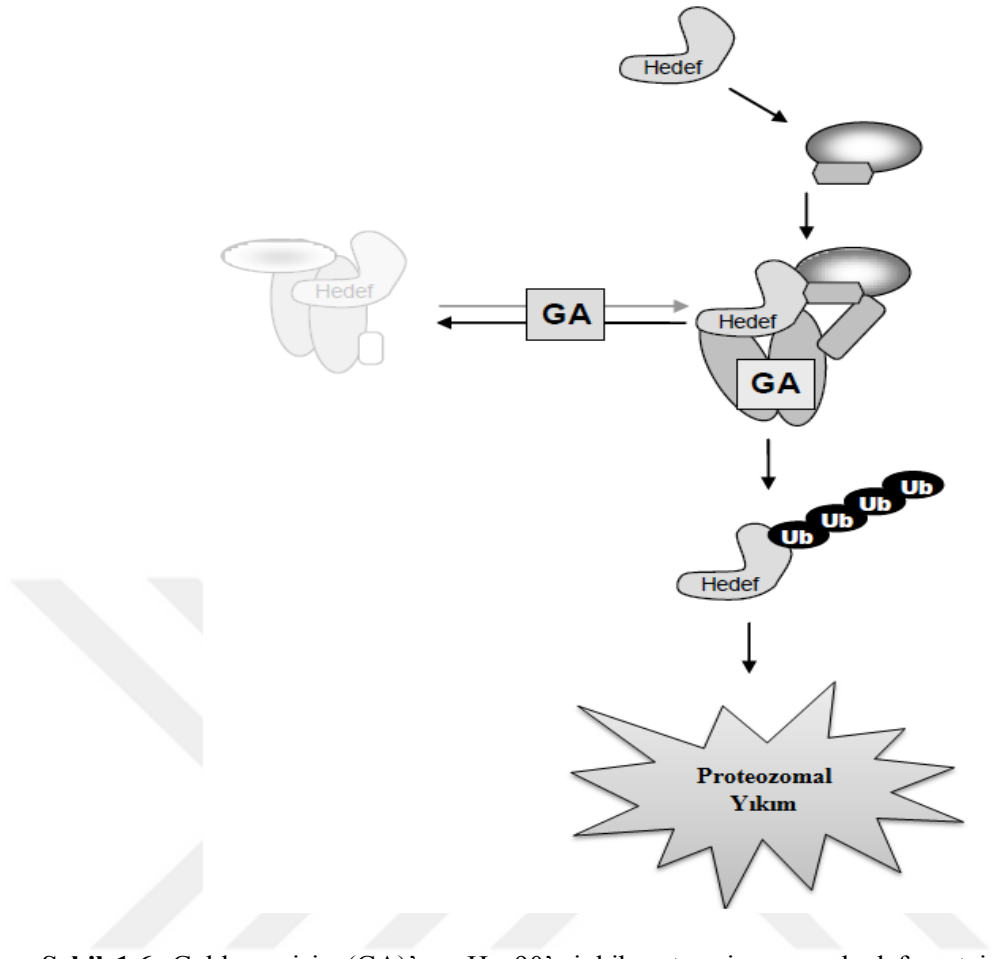
sonra Hsp90'a bağlı ATP hidroliz olur ve bu ATP hidrolizinden açığa çıkan enerji hedef proteinin katlanmasını sağlamaktadır. ATP hidrolizi ayrıca Hsp90 dimerinin "açık" konformasyona dönüşümü ve hedef proteinin serbestleşmesiyle sonuçlanmaktadır (Hong ve ark., 2013). Şekil 1.5 de, Hsp90-aracılı süper-şaperon mekanizmasının nükleotid-bağımlı döngüsü gösterilmektedir. İlk olarak yeni sentezlenmiş Hsp90 hedef proteini, Hsp70/Hsp40 şaperon kompleksi ile birleşmektedir. Oluşan bu kompleks Hsp90/Hsp70-bağlayıcı protein olan p60<sup>Hop</sup> yardımıyla Hsp90'a bağlanır. Bu sırada Hsp90, ADP-bağlı konformasyondadır. Nükleotid bağlanma bölgesinde ADP'nin ATP'ye değişimi sonucu Hsp90 konformasyon değiştirir ve P60<sup>Hop</sup> ve Hsp70/Hsp40 kompleksi serbest kalır. Ayrıca P50<sup>Cdc37</sup> ve p23'ü içeren diğer yardımcı ko-şaperonlar eklenir. Bu ATP-bağlı şaperon kompleksi hedef proteinlerin katlanmasını ve stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bununla birlikte eğer ATP-bağımlı basamak gerçekleşmezse hedef proteinler ubiquitinizasyona ve proteozomal yıkıma uğramaktadırlar (Koga ve ark., 2009).



**Şekil. 1.5.** Hsp90-aracılı süper-şaperon mekanizmasının nükleotid bağımlı döngüsü. Ub, ubiquitin (Koga ve ark., 2009).

Hsp90 aktivitesi 20 den fazla ko-şaperon tarafından düzenlenmektedir. Bu ko-şaperonlardan bazıları [Hsp70/Hsp90 organize edici protein (HOP), CDC37 proteini ve p23] Hsp90 ATPaz aktivitesini inhibe ederken bazıları ise (AHA1 ve CPR6 ) ATPaz aktivitesini artırmaktadır (Hong ve ark., 2013).

Hsp90, steroid hormon reseptörleri, kinazlar (ErbB2, C-RAF, CDK4, AKT), mutasyona uğramış p53, hTERT ve HIF-1 $\alpha$  gibi birçok onkogenik proteinin stabilizasyonu, aktivasyonu ve biyolojik fonksiyonlarından sorumludur. Hsp90 hedef proteinleri ayrıca anjiyogenezin indüklenmesi, hücre ölümüne direnç (anti-apoptotik etki) ve metastaz gelişimi gibi kanser süreçlerinin gelişiminde direkt olarak da rol oynamaktadırlar. Kanser hücrelerinin hayatta kalabilmesi bu proteinlerin varlığına önemli ölçüde bağlıdır ve bu durum kanser tedavisinde Hsp90'ı potansiyel hedef haline getirmektedir (Maloney ve Workman, 2002; Brown ve ark., 2007; Hanahan ve Weinberg, 2011). Ayrıca günümüze kadar tanımlanmış 200 den fazla Hsp90 hedef proteini, birçoğu kanser gelişimi ile alakalı olan hücre büyümesi, hücre çoğalması ve hücrenin hayatta kalması gibi süreçleri desteklemektedir (Jego ve ark., 2013). Hsp90, aktivitesi için ATP'ye bağımlı olduğundan Hsp90 inhibitörlerinin birçoğu (N)-terminal ATPaz cep bölgesine bağlanacak; dolayısıyla şaperon döngüsünü bozarak Hsp90 substratlarının yıkımına yol açacak şekilde dizayn edilmişlerdir (Şekil 1.6) (Haupt ve ark., 2012).



**Şekil 1.6.** Geldanamisin (GA)'nın Hsp90'ı inhibe etmesi sonucu hedef proteinin ubiquitin-proteozomal sistem yoluyla yıkılması Ub, ubiquitin (Koga ve ark., 2009).

Birçoğu geldanamisin türevi olan Hsp90 inhibitörleri BCR/ABL- pozitif lösemi, HER2/NEU+ meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi birçok kanser türünün tedavisinde olumlu sonuçlar vermektedir (Hong ve ark., 2013). Ayrıca son zamanlarda birçok seçici Hsp90 inhibitörü özellikle kanser tedavisi için klinik değerlendirme altındadır (Koga ve ark., 2009).

### 1.1.3.3. Hsp60 Ailesi

Hsplerin önemli bir grubu olan Hsp60 ailesi, stres ile uyarılabilen ve konstitütif olarak eksprese edilen üyelerden meydana gelmektedir. Aynı zamanda şaperoninler olarak da adlandırılan ve şaperonin kompleksinin önemli bir bileşeni olan Hsp60, arka arkaya sıralanmış iki halkadan oluşan fiçi şeklinde geniş silindirik

oligomerlerdir (Arya ve Lakhotia, 2008; Tsai ve ark., 2009; Mayer, 2010). Her bir halka, merkezi bir oyuk içermektedir ve katlanmamış proteinler katlanma sürecinde bu oyuga hapsedilmektedirler. Daha sonra bu proteinlerin katlanması ATP-bağımlı bir şekilde oyuk içerisinde gerçekleşmektedir. Şaperonin alt birimleri, nükleotid bağlanma bölgesini içeren ekvatorial domain (ATP bu bölgeye bağlanır), orta domain ve substratla etkileşen uç (apikal) domain olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır (Mayer, 2010). Normal hücrelerde Hsp60 üyeleri çoğunlukla mitokondrial matrikste ve dış mitokondri membranında bulunsa da bazı üyeler sitoplazmada ve hücre dışı bölümlerde de bulunabilmektedirler (Arya ve Lakhotia, 2008; Hwang ve ark., 2009).

Moleküler şaperon olarak Hsp60, yeni oluşan polipeptidlerin (özellikle mitokondrial proteinlerin) katlanmasına, proteinlerin sitoplazmadan organelere (genellikle sitoplazmadan mitokondri matriksine) taşınmasına ve yanlış katlanmış ya da denatüre olmuş proteinlerin proteolitik yıkımına yardımcı olmaktadır. Tipik şaperon fonksiyonlarına ilave olarak bu proteinler amino asit transportu, sinyal iletimi, peptid tanınması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve apoptoz gibi çok çeşitli süreçlerde de görev almaktadırlar. Ayrıca Hsp60'ın fonksiyon gösterebilmesi Hsp10 (GroES) proteinine bağlıdır. Hsp60'ın şaperon fonksiyonu Hsp10 tarafından regüle edilmektedir. Hsp10, Hsp60 proteininin katlama bölgesi olan oyugun üzerini bir kapak gibi kapatarak katlanma olayına yardımcı olmaktadır. Bununla beraber Hsp60'a bağlanarak Hsp60'ın substrat bağlama ve ATPaz aktivitesini regüle etmektedir (Samali ve ark., 1999; Arya ve Lakhotia, 2008; Mayer, 2010).

Memeli Hsp60 proteininin kanser ile ilgili moleküler rolleri de bildirilmiştir. Örneğin insan Hsp60'ı kaspaz yolağını aktive ederek apoptozu tetiklemektedir. (Hwang ve ark., 2009). Yüksek seviyedeki Hsp60 ekspresyonu prostat kanseri, yumurtalık kanseri, pankreas kanseri ve kalın bağırsak kanseri gibi farklı tiplerdeki insan kanserlerinde gözlemlenmiştir (Tsai ve ark., 2009). Bundan farklı olarak bronşiyal kanserlerde ve baş boyun kanserinde düşük Hsp60 seviyeleri görülmektedir (Ciocca ve ark., 2013). Dolayısıyla Hsp60'ın hem proapoptotik hem de anti-apoptotik rollerinin olması hücrenin ölümüne mi yoksa hayatta kalmasına mı hizmet ettiği yönünde tartışmalara neden olmuştur. Ayrıca Hsp60, birçok biyolojik süreçte



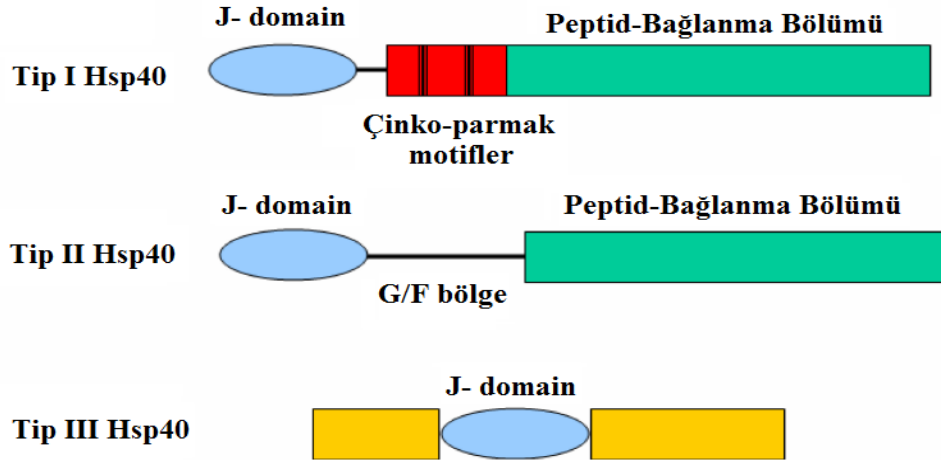
rol olsa da diğer Hsplere göre daha az karakterize edilmiş ve bu proteinin kesin rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır (Ghosh ve ark., 2008; Hwang ve ark., 2009).

#### **1.1.3.4. Hsp40 Ailesi**

J-proteinler olarak da adlandırılan Hsp40 ailesine ait proteinler, yeni sentezlenmiş polipeptidlerin katlanması, membranlar arası protein translokasyonu, agregasyon baskılama, sinyal iletimi, DNA onarımı ve protein yıkımı gibi önemli hücresel süreçlerin gerçekleşmesinde Hsp70'e yardım etmektedirler. Bu proteinler bir ko-şaperon olarak Hsp70'in polipeptid bağlanma bölgesine hedef polipeptidlerin taşınmasında ve bağlanmasında rol almaktadırlar (Fan ve ark., 2004; Ramos ve ark., 2008). Hsp70 proteinleri tek başına etkin fonksiyon gösterememektedir. Fonksiyon gösterebilmek için Hsp40'ın yardımına ihtiyaç duymaktadırlar. Hsp40'ın esas fonksiyonu yeni sentezlenmiş polipeptidleri tanımak ve bu polipeptidleri Hsp70'e taşımaktır. Daha sonra Hsp70'in ATPaz aktivitesini uyararak/artırarak polipeptidlerin katlanmasına yardımcı olmaktadır (Qian v ark., 2002; Fan ve ark., 2003).

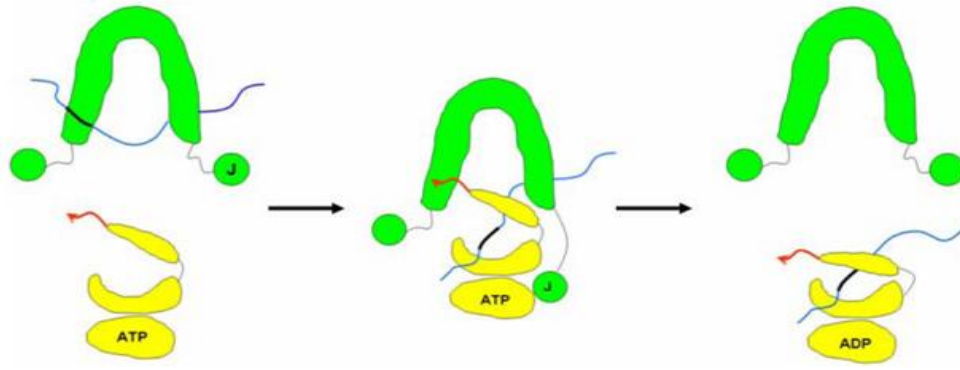
Hücrede birbirinden farklı birçok Hsp40 proteini bulunmaktadır. Hsp40 ailesi üyeleri fonksiyon bakımından ve yapısal olarak birbirinden farklı tip I, tip II ve tip III olarak adlandırılan 3 grupta kategorize edilmektedirler. Bu proteinlerin bütün tipleri yapısal olarak dört tane  $\alpha$ - heliks içeren ve 70 amino asit rezidüsünden oluşan J-domain içermektedir. J-domaini tip I ve tip II Hsp40 proteinlerinde, N-terminal de bulunurken; tip III Hsp40 ailesi üyelerinde protein sekansının herhangi bir bölgesinde bulunabilmektedir. Tip I ve tip II Hsp40'da peptid-bağlama bölgesi, proteinin C-terminal bölgesinde bulunmaktadır. Ayrıca tip I Hsp40, J-domain ile C-terminal bölge arasında iki çinko-parmak motifi içerirken tip II Hsp40'da böyle bir motif bulunmamaktadır. Yine bu iki sınıf Hsp40 proteinlerinde glisin/fenilalanin (G/F) zengin bölgeler bulunmaktadır. Tip III Hsp40 ise tip I ve tip II Hsp40'tan farklı olarak hiçbir korunmuş bölge içermez ve sadece J-domain den oluşmaktadır (Şekil 1.7). Hsp40 J-domaini, Hsp70'in ATPaz domaini ile bağlantı kurma, Hsp70 ATPaz

aktivitesini uyarma ve Hsp70 polipeptid kompleksini stabilize etmekle görevlidir. C-terminal peptid-bağlama bölgesi ise doğal olmayan polipeptidler ile etkileşerek protein agregasyonlarının oluşumunu baskılamaktadır (Ramos ve ark., 2008; Li ve ark., 2009).



Şekil 1.7. Hsp40 Ailesi üyelerinin domain yapıları (Li ve ark., 2009).

Hsp40 proteinleri, Hsp70 ve yeni sentezlenmiş polipeptidler arasındaki kompleks oluşumunu 3 mekanizma ile düzenlemektedir. İlk olarak Hsp40, Hsp70 hedef polipeptidini substrat bağlanma bölgesine bağlayarak Hsp70'e taşımaktadır. Daha sonra Hsp40, Hsp70'e bağlı ATP'yi ADP formuna dönüştürerek Hsp70-polipeptid kompleksini stabilize eder. Son olarak ise Hsp40 bu kompleksden ayrılır ve Hsp70, polipeptidi uygun şekilde katlar. Kısacası Hsp40 şaperonları Hsp70'e katlanacak polipeptid substratlarını sunmakta ve bu polipeptidlerin Hsp70 tarafından katlanmasını kolaylaştırmaktadırlar. Şekil 1.8 de Hsp40'ın Hsp70'e polipeptid substratını sunması ve bu substratın Hsp70 tarafından işlenmesi özetlenmiştir (Fan ve ark., 2003; Li ve ark., 2009).



**Şekil 1.8.** Hsp40'ın Hsp70'e J proteini aracılığıyla katlanacak polipeptidi (substratı) sunması. Şekilde Hsp40 yeşil, Hsp70 sarı, katlanacak protein ise ince mavi çizgi olarak gösterilmiştir. Katlanacak protein üzerindeki kalın siyah bölge polipeptidin Hsp40 substrat-bağlama bölgesi tarafından tanınmasını sağlayan hidrofobik bölgeleri göstermektedir. Bu bölge aynı zaman da Hsp70'in peptid bağlanma bölgesi tarafından tanınır (Li ve ark., 2009).

#### 1.1.3.5. Küçük Hsp Ailesi

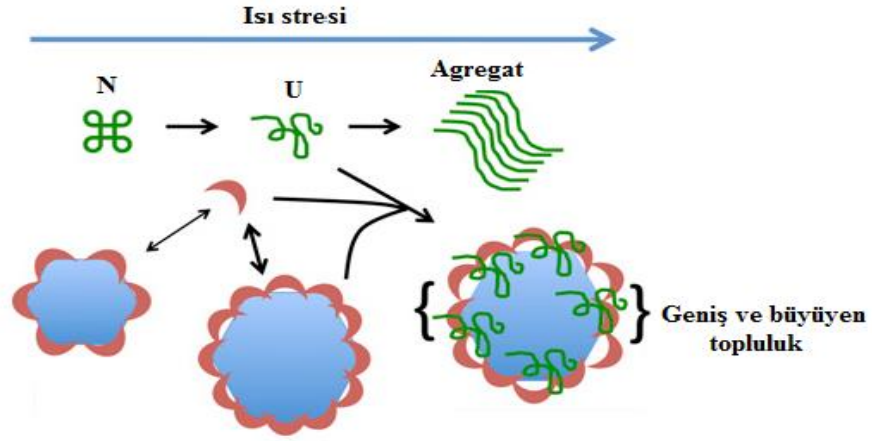
Küçük Hspler, moleküler ağırlıkları 12-43 kDa aralığında değişen ve Hsp27 (Hsp25 ve HspB1 olarak da bilinir), MKBP, HspB3,  $\alpha$ A-kristalin,  $\alpha$ B-kristalin, Hsp20, cyHsp, Hsp22, HspB9 ve HspB10 olarak adlandırılan on üyeden oluşmaktadırlar. Ana fonksiyonu protein agregasyonunu önlemek olan Hsp27, bu ailenin en çok çalışılan üyesidir. Bu protein ayrıca hücrel iskelet proteinleri ve RNA stabilizasyonunda da görev almaktadır (Lanneau ve ark., 2008; Khalil, 2011; Guttmann ve Koumenis, 2011).

Hsp27, göz lensinde bulunan  $\alpha$ -kristalin proteinlerine yapı olarak benzer C-terminal domainden oluşmaktadır. Ayrıca oligomerizasyon için gerekli olan hidrofobik WDPF motifini içeren N-terminal bölgesini de içermektedir (Şekil 1.9) (Guttmann ve Koumenis, 2011). Diğer Hsplerden farklı olarak küçük Hspler, organizmalar arasında yüksek korunumlu değildir ve türler arası oldukça çeşitlilik göstermektedirler (Tutar ve Tutar, 2010).



**Şekil 1.9.** İnsan Hsp27 domain yapısının şematik olarak gösterilmesi (Garrido ve ark., 2003).

Hsp27 ekspresyonu ısı şoku, iskemi, oksidatif stres ve diğer hücrel stres oluşturan etkenler tarafından HSF yoluyla uyarılmaktadır. Küçük Hspler yüksek molekül ağırlıklı Hsplerden farklı olarak ATP'den bağımsız olarak aktivite göstermektedirler (Sharp ve ark., 2013). Hücrede herhangi bir stres durumu olmadığında çoğunlukla sitozolde bulunan küçük Hspler, yaklaşık 32 alt birimden oluşan 800 kDa ağırlıklı büyük oligomerik yapılar oluşturabilmektedirler. Isı şoku altında ise bu proteinlerin miktarında artış görülmekte ve total hücrel proteinlerin %1' inden fazlasını oluşturarak hücrelerin ısıya karşı toleransını (termotolerans) artırmaktadırlar (Jakob ve ark., 1993). Oligomerizasyon proteinin fosforilasyon durumuna bağımlı olan oldukça dinamik bir süreçtir. İnsan Hsp27'si Ser-15, Ser-78 ve Ser-82 olmak üzere üç serin rezidüsünden fosforillenmektedir. Bu fosforillenme tersinir bir süreçtir ve reaksiyon MAPKAP kinaz 2 ve 3 enzimi tarafından katalizlenmektedir. Hsp27'nin defosforilizasyonu ise büyük oligomerlerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu oligomer yapı katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlere büyük bir ilgiyle bağlanmaktadır. Oligomerlerin bu fonksiyonu Hsp27'nin şaperon aktivitesi olarak kabul edilmektedir. Bu büyük oligomerler katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlere bağlansalar da aslında tam bir protein katlama fonksiyonu göstermemektedirler. Bunun yerine, Hsp27 hatalı katlanmış proteinlerin agregatlar oluşturmalarına engel olarak hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Şekil 1.10) (Schmitt ve ark., 2007; Lanneau ve ark., 2010; Sharp ve ark., 2013).



**Şekil 1.10.** Isı şokuna bağlı olarak doğal proteinlerin stabilizesinin bozulması ve agregasyonu önlemek için küçük Hsplerin (bordo renk ile gösterilmiştir) oligomer oluşturarak denatüre proteinlere bağlanması. N; doğal proteinleri, U; denatüre proteinleri göstermektedir (Eyles ve Gierasch, 2010).

Yukarıda bahsedilen fonksiyonlarının yanı sıra Hsp27 apoptoz ile dolayısıyla kanserle yakından ilişkilidir. Diğer Hsplere benzer şekilde güçlü anti-apoptotik etkilere sahiptir ve yüksek seviyede eksprese edilen Hsp27 apoptotik hücre ölümüne karşı hücreyi korumaktadır (Garrido ve ark., 2003). Hsp27, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımını inhibe ederek ve pro-kaspaz 9 aktivitesini azaltarak bu iki bileşenin etkileşmesini önlemekte ve sonuç olarak apoptozom oluşumunu inhibe etmektedir. Ayrıca direkt olarak pro-kaspaz 3 ile etkileşerek aktivitesini azaltmakta ve indirekt olarak stres-uyarımlı Bax oligomerizasyonunu ve Bax'ın mitokondri membranına bağlanmasını baskılamaktadır. Bunun yanı sıra ön-ölüm yolağı olan JNK yolağını inaktive, ön-hayatta kalma yolağı olan Akt/PKB yolağını ise aktive etmektedir (Sharp ve ark., 2013). Bu durumla bağlantılı olarak meme kanseri, yumurtalık kanseri, lösemiler, osteosarkom, endometriyal kanser gibi birçok kanser türünde normal hücrelere göre yüksek seviyelerde Hsp27 ekspresyonu görülmektedir (Jego ve ark., 2013).

### 1.1.3.6. Hsp70 Ailesi

Yaklaşık olarak 70 kDa (66-78 kDa) ağırlığında olan Hsp70 ailesi Hspler, moleküler şaperonlardan oluşmakta ve protein homeostazisi/kalite kontrolünde çok önemli roller üstlenmektedirler. Hücrelerde bol miktarda bulunmaları ve yüksek derecede korunmuş olmaları dolayısıyla muhtemelen en iyi bilinen ve en çok çalışılan şaperon sınıfıdır (Shaner ve Morano, 2007; Assimon ve ark., 2013; Murphy, 2013). Hsp70 ilk kez yüksek sıcaklık, besin yetersizliği, ağır metaller, oksidatif stres ve viral enfeksiyonlar gibi hücrel stres kaynaklarına cevap olarak yüksek seviyede eksprese edilmiş bakterilerde tanımlanmıştır. Bütün organizmalarda bulunan Hsp70, evrim boyunca türler arası yüksek seviyede korunmuş bir proteindir. Örneğin, insan Hsp70 proteini ve DnaK olarak da bilinen *Escherichia coli* (*E. coli*) Hsp70'i %50 amino asit benzerliği göstermektedir. Stres koşullarının bulunmadığı insan hücrelerinde, 13 adet Hsp70 izoformu toplam hücrel protein ağırlığının %2'sini oluşturmaktadır. Ökaryotlarda sitoplazma, nükleus, mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi bölgelerde bulunmalarının yanı sıra hücre dışı ortamda da bulunabilmektedirler. Arkelerde ve öbakterilerde DnaK, mayalarda SSA, insanların dahil olduğu memelilerde ise HSPA olarak adlandırılmaktadırlar (Zylicz ve Wawrzynow, 2001; Zuiderweg ve ark., 2013; Murphy, 2013).

Hsp70'in hücrel stres koşullarındaki görevi, protein substratlarına bağlanarak onları denatürasyon ya da agregasyona karşı hücrel şartlar düzelinceye kadar stabilize etmektir. Normal hücrel koşullarda ise, yeni sentezlenmiş proteinlerin (hidrofobik polipeptid sekanslarına bağlanarak) katlanması, proteinlerin hücre içi taşınması, yanlış katlanmış veya agregat olmuş (çökmüş) proteinlerin yeniden katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı için hedeflenmesi, protein komplekslerinin birleştirilmesi ve ayrıştırılması, düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrol edilmesi, gen ekspresyonunun inhibe edilmesi, hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi çok çeşitli fonksiyonları vardır. Hsp70'in ayrıca protein kinazların ve transkripsiyon faktörlerinin stabilizesinin ve aktivitelerinin kontrol edilmesinde ve sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde de rolleri bulunmaktadır (Erbse ve ark., 2004; Mayer ve Bukau, 2005; Evans ve ark., 2010; Heck ve ark., 2011).

Sitoplazmadaki koruyucu rollerinin yanı sıra, özellikle kanser hücrelerinin hücre membranında ya da hücre dışı alanda bulunan Hsp70 proteinleri, immün sistemin uyarılmasında önemli rol oynamaktadırlar (Multhoff, 2007).

#### 1.1.3.6.1. Hsp70 Üyesi Proteinler

İnsan genomu Hsp70 ailesinin 13 üyesini kodlamaktadır (Brocchieri ve ark., 2008). Birbirinden farklı bu Hsp70 üyelerinin amino asit sekansları, ekspresyon seviyeleri ve hücresel lokalizasyonları farklılık göstermektedir. Ökaryotlarda sitoplazmik izoformlardan konstitütif olarak eksprese edilen izoform Hsc70, stresle uyarılabilen izoform ise Hsp72 (tezde Hsp70i olarak adlandırılacaktır) olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan Hsc70 normal hücresel koşullarda birçok hücrede eksprese edilen ana izoform olarak bilinmekte ve Hsp70 ailesi ile bağlantılı olarak temel şaperon fonksiyonlarını yerine getirmektedir (Daugaard ve ark., 2007). Hsc70'in aksine, Hsp72 ise hücresel stres olmadığı durumlarda çok küçük miktarlarda sentezlenirken, hücrede herhangi bir stres oluştuğunda *HSF1* geni sayesinde ekspresyonunda çok hızlı bir artış görülmektedir (Whitesell ve Lindquist, 2009; de Billy ve ark., 2009).

Hsp70 ailesi üyelerinden en çok çalışılan *HSPA1A* ve *HSPA1B* genleridir. Bu iki genin ürünü olan proteinler sadece iki amino asit bakımından farklılık göstermekte ve bu iki protein birbirinin yerine geçebilmektedir. *HSPA6*, ekspresyonu sıcaklıkla-indüklenen Hsp70 ailesine ait proteindir (Brocchieri ve ark., 2008). Çeşitli stres koşullarına cevap olarak eksprese edilen *HSPA7*'nin başlarda “yalancı gen” olduğu düşünülse de sonraki analizlerde *HSPA6* ile yüksek seviyede benzerlik gösterdiği görülmüştür. Özellikle spermatogenez ve mayoz bölünmede önemli rolleri olan *HSPA1L* ve *HSPA2* proteinleri iki sitozolik üyedir ve testislerde yüksek seviyede eksprese edilmektedirler. *HSPA9* (mortalin/mtHsp70/GRP75/PBP74 olarak da bilinir) proteini mitokondrial izoformdur. *HSPA5* (Bip) proteini ise endoplazmik retikulumda lokalizedir ve katlanan proteinlerin endoplazmik retikulum lümenine taşınmasına yardımcı olmaktadır. Mikrozoamlarla ilişkili üye olarak bilinen stch

bütün hücrelerde konstitütif olarak eksprese edilmektedir. HSPA12A, HSPA12B ve HSPA14 ise birbirlerine oldukça uzak üyelerdir ve bu proteinlerle ilgili bilgi oldukça sınırlıdır (Çizelge 1.3) (Dragovic ve ark., 2006; Raviol ve ark., 2006).

**Çizelge 1.3.** Hsp70 ailesine ait proteinler (Kampinga ve ark., 2009).

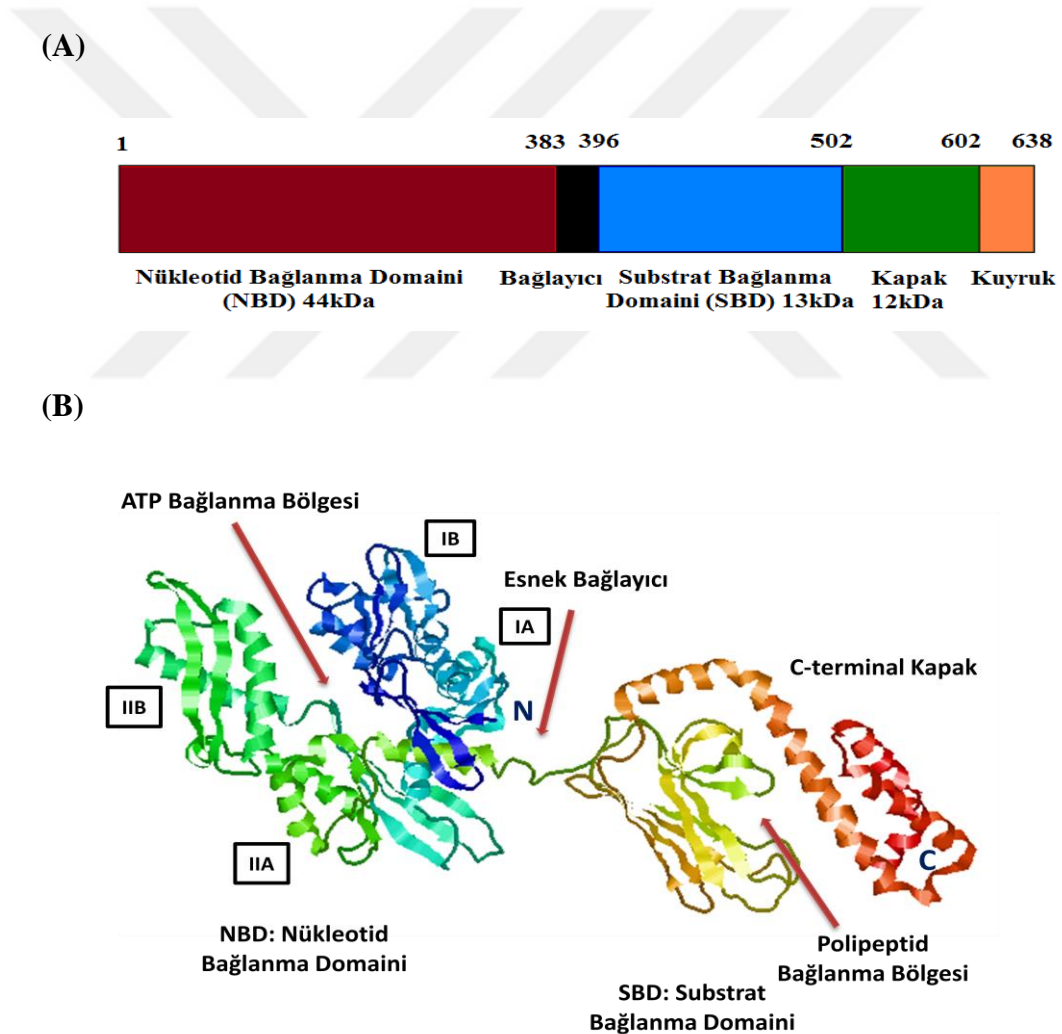
Gen Adı	Protein Adı	Eski Adı	İnsan Gen ID	Fare Ortolog ID
<i>HSPA1A</i>	HSPA1A	HSP70-1; HSP72; HSPA1	3303	193740
<i>HSPA1B</i>	HSPA1B	HSP70-2	3304	15511
<i>HSPA1L</i>	HSPA1L	hum70t; hum70t; Hsp-hom	3305	15482
<i>HSPA2</i>	HSPA2	Isı şok 70kD protein-2	3306	15512
<i>HSPA5</i>	HSPA5	BIP; GRP78; MIF2	3309	14828
<i>HSPA6</i>	HSPA6	Isı şok 70kD protein 6 (HSP70B)	3310	X
<i>HSPA7</i>	HSPA7	Isı şok70kD protein 7	3311	X
<i>HSPA8</i>	HSPA8	HSC70; HSC71; HSP71; HSP73	3312	15481
<i>HSPA9</i>	HSPA9	GRP75; HSPA9B; MOT; MOT2; PBP74; mot-2	3313	15526
<i>HSPA12A</i>	HSPA12A	FLJ13874; KIAA0417	259217	73442
<i>HSPA12B</i>	HSPA12B	RP23-32L15.1; 2700081N06Rik	116835	72630
<i>HSPA13</i>	HSPA13	Stch	6782	110920
<i>HSPA14</i>	HSPA14	HSP70-4; HSP70L1; MGC131990	51182	50497

İnsan dışında mayada iki adet organellere özgü, altı adet sitozolik olmak üzere sekiz adet Hsp70 izoformu bulunmaktadır. Sitozolik Hsp70, Ssa (Ssa1, Ssa2, Ssa3 ve Ssa4) ve Ssb (Ssb1 ve Ssb2) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Ssa ve Ssb proteinleri yaklaşık olarak %60 oranında benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde prokaryotik bir organizma olan *E. coli*, DnaK, HscA ve HscC olarak bilinen üç Hsp70 üyesini kodlamaktadır (Tutar, 2007; Sharma ve Masison, 2009).



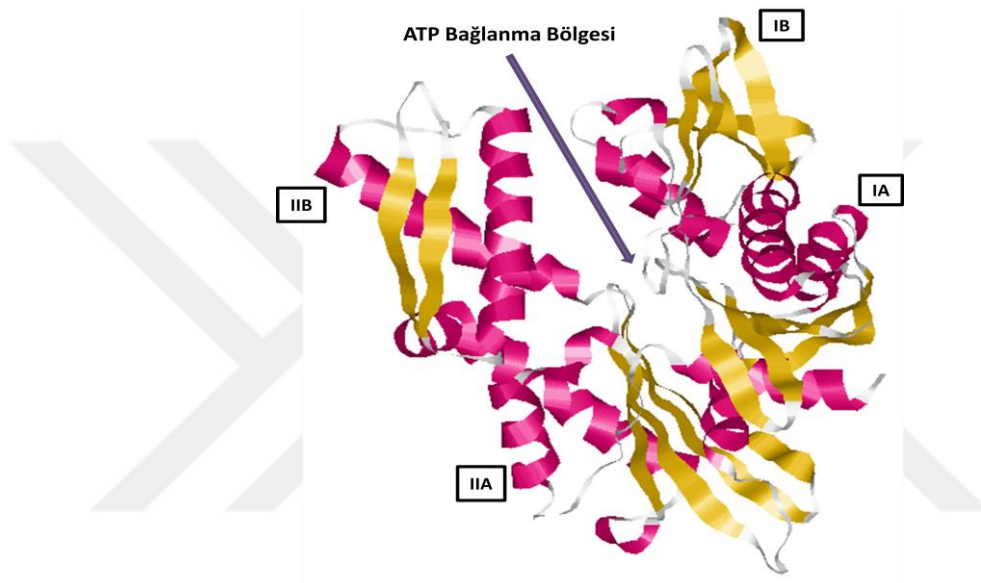
### 1.1.3.6.2. Hsp70'in Yapısı

Hsp70, yüksek seviyede korunmuş üç ana domain yapısından oluşmaktadır: (1) yaklaşık 44 kDa'lık N-terminal nükleotid bağlanma domaini (NBD), bu domainin ayrıca ATPaz aktivitesi vardır. (2) Yaklaşık 15 kDa'lık substrat bağlanma domaini (SBD), peptid bağlanma domaini olarak da bilinir. (3) Son olarak ise yaklaşık 10 kDa'lık C-terminal alfa helikal "kapak" domaini. NBD ile SBD arasında ayrıca bu iki domaini birbirine bağlayan esnek ve oldukça hidrofobik "bağlayıcı bölge" bulunmaktadır. Şekil 1.11 de Hsp70'in domain yapısı ve kristal yapısı gösterilmiştir (Schuermann ve ark., 2008; Bertelsen ve ark., 2009).



**Şekil 1.11.** *E. coli* Hsp70'inin domain (A) ve kristal (B) yapısı. Şekilde DnaK proteinine ait ATP bağlanma bölgesi, NBD, SBD, polipeptid bağlanma bölgesi, C-terminal kapak ve esnek bağlayıcı gösterilmiştir. Domainleri göstermek için rasmol programı kullanılmıştır (PDB kodu: 2KHO) (Zuiderweg ve ark., 2013; Murphy, 2013).

NBD, iki loblu bir yapıya sahiptir ve her bir lob (I ve II), iki alt-domaine (A ve B) ayrılarak IA, IB, IIA ve IIB alt-domainlerini oluşturmaktadır (Kabani ve Martineau, 2008). IA ve IB birbirleriyle güçlü bir şekilde etkileşerek lob I'yi oluştururken, IIA ve IIB, lob II'yi meydana getirmektedir. IA ve IIA alt-domainleri nükleotid paketinin dip kısmını oluşturmaktadır ve bu nükleotid bağlanma kutusu sayesinde ATP ile etkileşmektedirler (Şekil 1.12). Alt-domainler arasındaki esneklik ATP'den ADP'ye konformasyon değişikliğine olanak sağlamaktadır (Young, 2010).

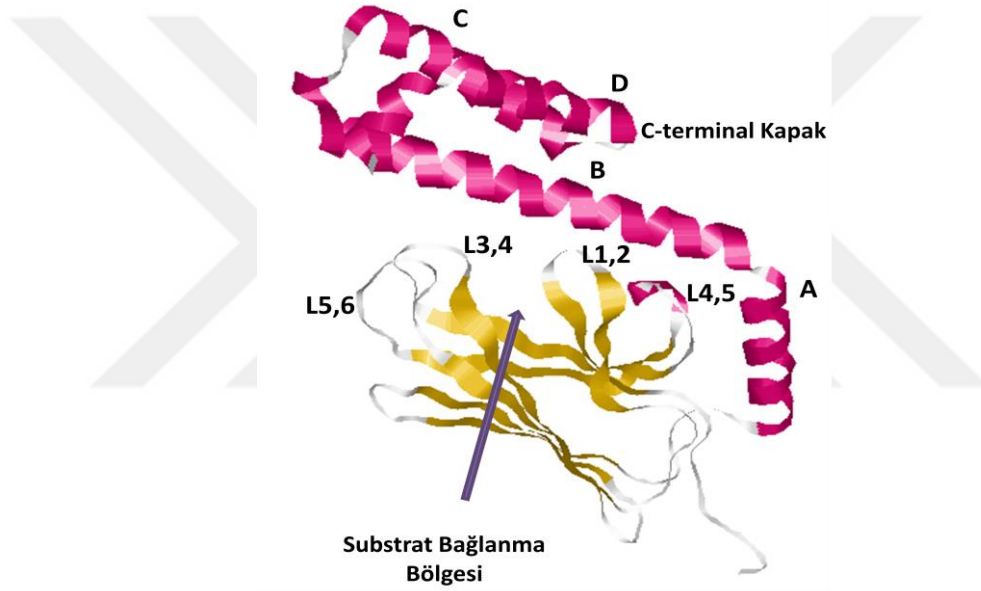


**Şekil. 1.12.** Hsp70'in nükleotid bağlanma domaini (PDB Kodu: 1HPM).

NBD ile SBD'yi birbirine bağlayan esnek bağlayıcı bölge yüksek seviyede korunmuş on rezidüden oluşmaktadır ve NBD ile SBD arasında allosterik sinyal iletiminde çok önemli roller üstlenmektedir (Şekil 1.11 B) (Vogel ve ark., 2006a; Kabani ve Martineau, 2008). Ligand bağlanması ile indüklenen konformasyonel değişiklikler sayesinde iletimin gerçekleştiğine dair güçlü kanıtlar bulunsa da, ligand Hsp70 domainlerinden birine bağlandıktan sonra allosterik sinyalin diğer domaine nasıl iletildiği konusu hala tam olarak anlaşılammıştır (Swain ve ark., 2007).

Substrat bağlanma bölgesi, 10 kDa  $\alpha$ -heliks alt-domain ve 15 kDa çift katlı  $\beta$ -tabaka alt-domainden oluşmaktadır (Evans ve ark., 2010).  $\alpha$ -helikal yapı, substrat bağlanma bölgesinin üzerinde "kapak" şeklinde esnek bir yapı meydana getirmektedir. Bu "kapak" dıştaki loblarla (L3, 4 ve L5, 6) iki hidrojen bağı ile bağlı

bir tuz köprüsü oluşturmaktadır ve substrat, SBD'ye bağlanınca kapanarak Hsp70'in substrata olan afinitesini artırmaktadır. Kapağın kapanması ve tekrar açılması NBD'deki ATP hidrolizi ile regüle edilmektedir (Mayer ve Bukau, 2005; Goloubinoff ve De Los Rios, 2007; Young, 2010). SBD, her biri dört  $\beta$ - zincirden oluşan iki anti-paralel  $\beta$ -tabakadan meydana gelen sandviç benzeri bir yapıya sahiptir. İlk tabaka  $\beta$ 3,  $\beta$ 6,  $\beta$ 7,  $\beta$ 8 den ikincisi ise  $\beta$ 5,  $\beta$ 4,  $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2 tabakalarından oluşmaktadır. Ayrıca ikisi içte ikisi dışta olmak üzere yukarı doğru çıkıntı yapmış dört adet lob bulunmaktadır (L1, 2 ve L3, 4).  $\beta$ -tabaka 1-2 ve loblardan oluşan substrat bağlanma boşluğu oldukça hidrofobiktir (Şekil 1.13) (Sharma ve Masison, 2009).

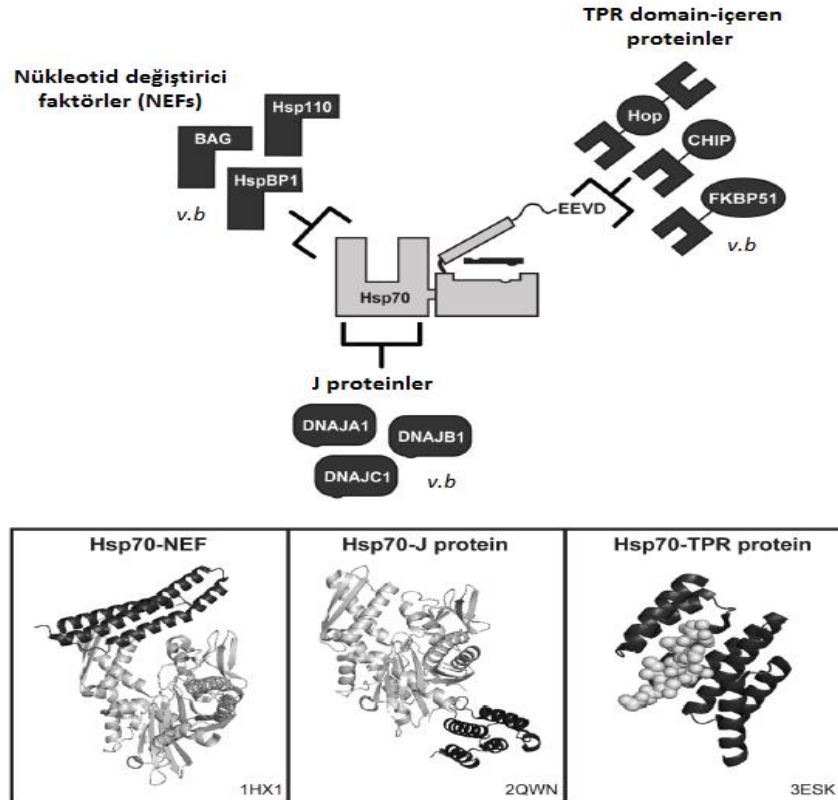


**Şekil 1.13.** Hsp70 substrat bağlanma domaini (PDB Kodu: 1DKZ).

SBD, ayrıca substratın bağlanarak katlanmasından sorumlu korunmuş bir EEVD motifi içermektedir. Bu motif Hsp40, Hop, CHIP gibi çeşitli ko-şaperonların ve TPR domain-içeren proteinlerin Hsp70'e bağlanmasında önemlidir (Louw ve ark., 2010). Diğer domainlerden farklı olarak C-terminal domaini daha az korunmuştur. Bu durumun farklı Hsp70 ailesi üyelerinin farklı ko-şaperonlarla etkileşmesine olanak sağladığı düşünülmektedir (Murphy, 2013).

### 1.1.3.6.3. Hsp70'in Ko-şaperonları

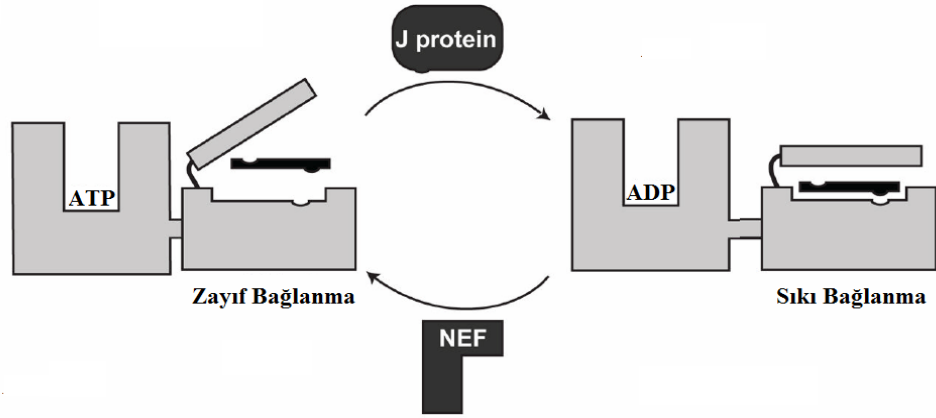
Genel olarak Hsp70 proteinleri yalnız başlarına çalışmamaktadırlar ve fonksiyon gösterebilmek için ko-şaperon takımına ihtiyaç duymaktadırlar. Birçok protein Hsp70 ko-şaperonu olarak tanımlanmıştır. J-domain proteinler (Hsp40), nükleotid değiştirici faktörlerin (NDF) çeşitli aileleri ve TPR domain-içeren proteinler bu ko-şaperonların başında gelmektedir (Mayer, 2013). Hsp70 ko-şaperonlarının bu önemli aileleri, Hsp70'in farklı etkileşim yüzeylerine bağlanarak bu şaperonun aktivitesini regüle etmektedirler. J-proteinler NBD'deki lob IA ve lob IIA'ya, NDF'ler benzer şekilde NBD'deki lob IB ve IIB'ye bağlanmaktadır. TPR domain-içeren protein ko-şaperonlar ise Hsp70 proteininin C-terminal kısmına bulunan EEVD sekansına bağlanmaktadır (Şekil 1.14) (Liu ve ark., 1999; Sonderrmann ve ark., 2001; Ahmad ve ark., 2011).



**Şekil 1.14.** Hsp70'in önemli ko-şaperonlar ile etkileştiği bölgeler. Ko-şaperonların üç farklı sınıfı olan NDF, J-proteinler ve TPR domain-içeren proteinler Hsp70 ile etkileşerek bu proteinin aktivitesini düzenlerler. J-proteinler ve NDF, NBD ile etkileşirken TPR domain-içeren proteinler C-terminal bölgeye bağlanırlar (Assimon ve ark., 2013).

Ko-şaperon ailesinin önemli bir ailesi, Hsp70 ile hedef proteinlerin etkileşiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan Hsp40 proteindir. İnsan genomu 50 adet J-proteinini kodlamaktadır ve J-proteinleri DnaJA, DnaJB ve DnaJC olmak üzere üç alt sınıfa ayrılmaktadır (Zuiderweg ve ark., 2013). Hsp40 ko-şaperonun J-domaini, Hsp70'in NBD ile direk olarak etkileşerek ATP hidrolizini 1000 kat artırmaktadır (Şekil 1.15). Bir ko-şaperon olaraksa Hsp40, Hsp70'in NBD ve C-terminal domaini ile ve Hsp70 hedef proteinleriyle etkileşerek Hsp70'in SBD'sine katlanacak substratları transfer etmektedir (bkz Şekil 1.8) (Sharma ve Masison, 2009).

Diğer bir Hsp70 ko-şaperon ailesi NDF'dir. ATP-bağlı durumda Hsp70, substrata zayıf bir şekilde bağlanmakta iken, ADP-bağlı durumda çok daha güçlü bağlanmaktadır. Bu yüzden ADP-ATP değişimi Hsp70 reaksiyon döngüsünün regülasyonunda önemli bir adımdır (Şekil 1.15) (Kabani ve ark., 2002). İşte bu döngünün devamını sağlamak için NDF, Hsp70'in NBD'e bağlanarak ADP salınımını hızlandırmaktadır ve ADP-ATP değişimine yardım etmektedir. NDF'ler ayrıca J-proteinleri ile birlikte hareket ederek ATP döngüsü ve buna bağlı olarak da substrat bağlanmasını/salınmasını regüle etmektedirler. Önemli NDF ailesi proteinler: GrpE, Bag ailesi proteinler, Hsp110 ve HspBP1'dir (Harrison, 2003; Patury ve ark., 2009; Evans ve ark., 2010). Bütün bu NDF'ler Hsp70'in NBD'sine bağlanarak ADP salınımını artırmaktadırlar. Ancak her bir sınıfın üyeleri birbirinden farklı mekanizmalar kullanmaktadır. Ayrıca bu farklı proteinlerin yapıları da birbirinden farklı olup dizi homolojileri çok az ya da hiç yoktur. Farklı yapılarından dolayı Hsp70'e bağlanmaları ve Hsp70 fonksiyonlarına etkileri de birbirinden farklıdır. Örneğin Bag2, Hsp70 substratlarından tau proteininin proteozomal parçalanması ile ilişkili iken, Bag1-Hsp70, tau kararlılığını artırmaktadır. Dolayısıyla spesifik NDF-Hsp70 komplekslerin oluşumu Hsp70'e bağlı substrat proteinlerin kaderini belirlemektedir (Bukau ve ark., 2006; Elliott ve ark., 2007; Carrettiero ve ark., 2009).

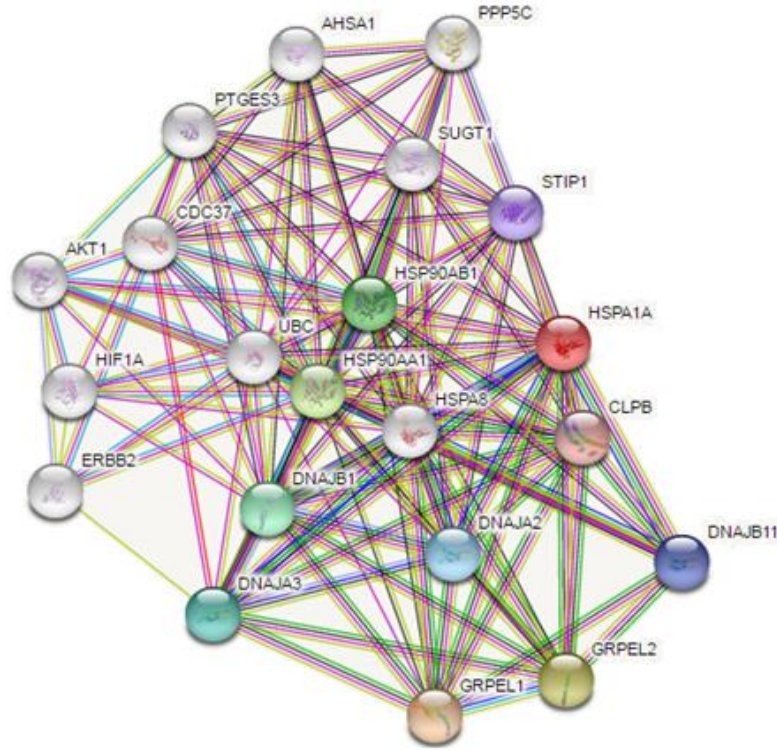


**Şekil 1.15.** ATP hidrolizinin şematik olarak gösterimi ve ko-şaperonların rolü. Substrat bağlanınca J-domain ko-şaperonlar ATP hidrolizini uyarır. ATP-ADP dönüşümüne bağlı olarak “kapak” kapanır ve substrata olan afinite artar. NDF, NBD ile etkileşime girerek ADP salınımına yardımcı olduğunda ise döngü tamamlanır (Assimon ve ark., 2013).

Ko-şaperonların son grubu ise Hsp70’in C-terminal bölgesinin ucunda bulunan EEVD sekansına bağlanan TPR domain-içeren proteinlerdir (Hop ve CHIP). TPR domaini dejenere 34 amino asitten oluşan antiparalel bir R-helikol “saç tokası” motifidir. TPR ko-şaperon ailesi üyeleri TPR domainleri dışında çok az homoloji göstermektedirler ve bu yüzden şaperonların farklı bölgelerine bağlanabilmektedirler. Örneğin Hop’un TPR1, TPR2A ve TPR2B olmak üzere üç TPR motifi bulunmaktadır. Hop, TPR1 ve TPR2B yoluyla öncelikli olarak Hsp70’in ATP-bağlı formuna bağlanırken, TPR2A spesifik bir şekilde Hsp90’a bağlanmaktadır. Bu yolla Hsp70 ile Hsp90 arasındaki Hop köprüleri bu şaperonlar arasındaki substrat transferine yardımcı olarak substrat katlanmalarına yardımcı olmaktadır. Diğer bir TPR-domain protein olan CHIP, Hop’a benzer şekilde TPR domaini sayesinde Hsp70’e bağlanmaktadır ancak bu iki ko-şaperonun Hsp70 üzerindeki etkileri tamamen zıttır. Hop, substratın katlanmasını desteklemektedirken, CHIP parçalanmasını desteklemektedir. CHIP’in C-terminalinin son kısmı E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösteren U-box domainden oluşmaktadır ve bu domain ubiquitin-bağımlı protein yıkımında rol almaktadır (Evans ve ark., 2010; Assimon ve ark., 2013; Sun ve ark., 2014).

Hsp70i (HSPA1A)’in ko-şaperonlarla ve farklı proteinlerle etkileşimini gösteren protein-protein etkileşim ağı Şekil 1.16 da gösterilmiştir.



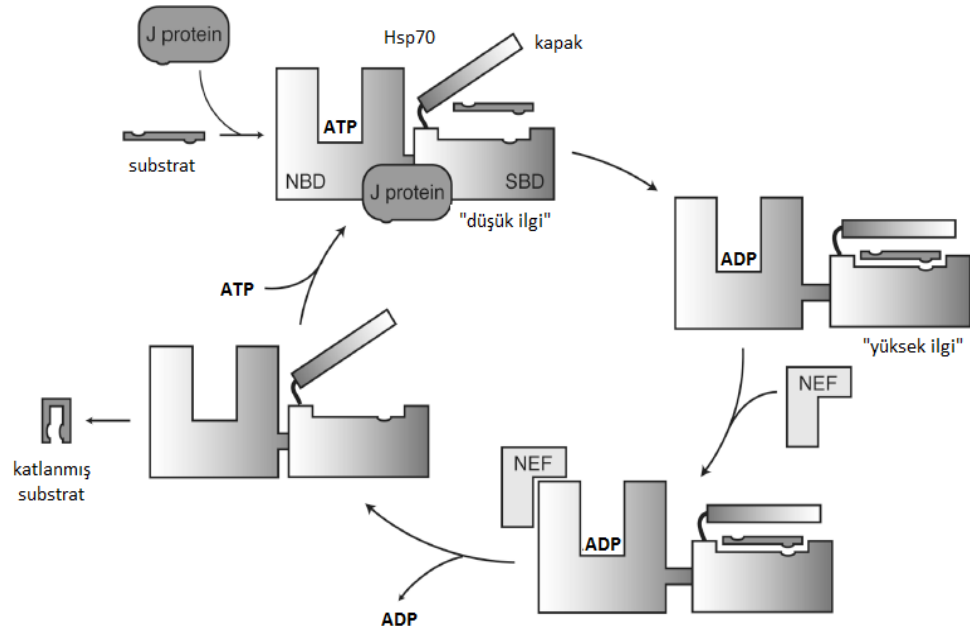


**Şekil 1.16.** HSPA1A'nın fonksiyon gösterirken etkileştiği diğer proteinler. Proteinlere ait etkileşim ağı STRING veri tabanından elde edilmiştir (<http://string-db.org/>).

#### 1.1.3.6.4. Hsp70'in Çalışma Mekanizması

Polipeptidlerin Hsp70-bağımlı olarak katlanması, ATP harcanarak substratların bağlanması ve salınmasının tekrarlanması yoluyla gerçekleşmektedir. Hsp70'in çalışma mekanizması ile ilgili bilgiler *E.coli* Hsp70'i DnaK üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir. Bununla beraber bakteriyel ve memeli Hsp70'leri %50 benzerlik gösterdiği için Hsp70 şaperonlarının türler arasında benzer mekanizma ile çalıştığına inanılmaktadır. Hsp70'in fonksiyonu üç domainin koordineli bir şekilde hareket etmesiyle olmaktadır. SBD'deki hidrofobik yarık bölgeye substratın bağlanması NBD'deki nükleotid durumuna bağlıdır. Hsp70'in ATP-bağlı formu düşük substrat bağlama afinitesi gösterirken, ADP-bağlı formu ise substrata karşı yüksek afinite göstermektedir. ATP hidrolizi sonucu NBD'de meydana gelen yapısal değişiklikler SBD'de ve CTD'de konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır ve bu durum substratın yakalanmasıyla

sonuçlanmaktadır. Buna bağlı olarak, substrat SBD'ye bağlanmaktadır ve SBD, NBD'ye sinyaller göndererek ATP hidrolizini uyarmaktadır; böylelikle “kapak” kapanmakta, Hsp70 in substrata olan ilgisi yaklaşık 10 kat artmış olmakta ve substrat SBD'ye çok daha sıkı bağlanmaktadır. Daha sonra NDF'ler bir yandan ADP salınımını sağlarken diğer yandan ATP'nin Hsp70'e yeniden bağlanmasını kolaylaştırmaktadırlar. Bunun sonucunda Hsp70'in substrata olan afinitesi düşmekte “kapak” açılmakta ve substrat Hsp70'den ayrılarak süreç tamamlanmaktadır. Reaksiyon döngüsünde ATP hidrolizi hız kısıtlayıcı basamaktır ve ATP hidrolizine bağlı meydana gelen konformasyonel değişiklikler NBD ile SBD arasındaki hidrofobik bağlayıcı tarafından sağlanmaktadır (Şekil 1.17) (Han ve Christen, 2003; Tutar ve ark., 2005; Sharma ve Masison, 2009; Patury ve ark., 2009).



**Şekil 1.17.** Nükleotid hidrolizi, allosteri ve Hsp70 kompleksine substrat bağlanması. Substrat, SBD'ye bağlanınca, J-domain ko-şaperonu NBD'ye bağlanarak ATP hidrolizini artırır. ATP-ADP dönüşümüne bağlı konformasyon değişiklikleri “kapağın” kapanmasını ve substrata olan ilginin artmasını sağlar. NDF'lerin NBD ile etkileşerek ADP salınımına yardımcı olması sonucu substrat salınır ve döngü tamamlanır (Patury ve ark., 2009).



#### 1.1.4. Kanser ve Apoptozda Hsp70

Hspler, hücresel stres durumunda fonksiyon göstermelerinin yanı sıra normal fizyolojik koşullarda da fonksiyon göstererek hücresel homeostazinin devamlılığı için önemli roller üstlenmektedir. Hspler, hücresel sinyalizasyonda ve hücresel protein trafiğinin doğru bir şekilde yapılmasında görev almaktadır. Bu proteinlerin birçok hastalık durumu ile ilişkili olan hücre döngüsünde ve programlı hücre ölümünde (apoptoz) rolleri vardır ve anormal seviyeleri kanserinde dâhil olduğu birçok hastalıkta görülmektedir (Whitley ve ark., 1999). Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre metabolik hızları ve metabolik ihtiyaçları çok daha fazladır. Bunun sonucu olarak şaperonlara normal hücrelerden daha fazla ihtiyaç duymaktadırlar ve daha fazla şaperon sentezlemektedirler. Tümörlü hücrelerdeki bu yüksek Hsp ekspresyonu metastaz, antikanser tedaviye karşı direnç (ilaç direnci gibi) ve sonuç olarak kötü prognoza neden olmaktadır (Yaglom ve ark., 2007; Goloudina ve ark., 2012).

Hsp70, tümör hücrelerinin hayatta kalabilmesi ve büyüebilmesi için gerekli bir faktördür. Tümör hücreleri hipoksi, besin yetersizliği ve kemoterapötik ajanlara maruziyet gibi birçok mikro-çevresel strese maruz kalmaktadırlar. Bununla beraber mutasyona uğramış ve yanlış katlanmış proteinlerin hücre içerisinde birikmesi ve sinyal yollarının uygun olmayan aktivitesi gibi hayatta kalmalarını tehdit eden içsel streslere de maruz kalmaktadırlar. Protein denatürasyonu ve agregasyonu apoptozu tetiklemektedir ve Hsp70 apoptoz tamir mekanizmalarını engellemektedir. Bu yüzden, tümör hücreleri hayatta kalabilmek için fazla miktarda Hsp70 proteinine gereksinim duymaktadırlar (Tutar, 2007; Powers ve ark., 2010). Hsp70 üzerinde yapılan çalışma sonuçlarına göre bu şaperonun kanser başlangıcında rol alabileceği iddia edilmiştir. Yüksek Hsp70 ekspresyonu birçok kanser türünde kötü prognoz ile ilişkilidir. Örneğin yüksek seviyelerdeki Hsp70 ekspresyonu meme, endometrial, ağız, kolorektal, prostat kanserlerinde ve lösemilerde istenmeyen sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Evans ve ark., 2010). Çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyedeki Hsp70 ekspresyonlarının etkileri Çizelge 1.4 de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.4.** Çeşitli kanser türlerinde Hsp70 ilişkisi (Kumar ve ark., 2016).

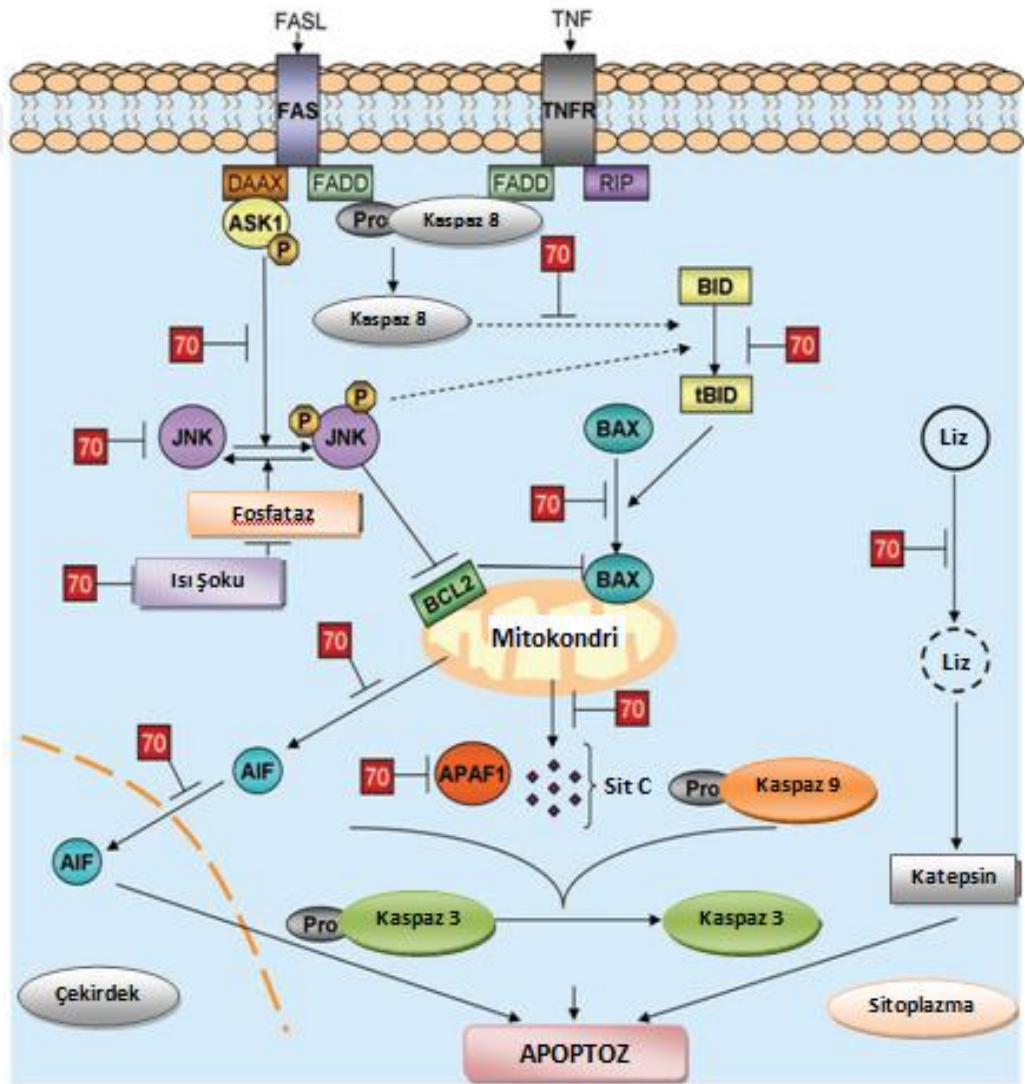
Kanser Türü	Hsp70 Ekspresyonunun Etkileri
Lösemi, MCF-7 Meme Kanseri	Yüksek seviyelerdeki Hsp70 ekspresyonu kanser hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını kolaylaştırmaktadır.
Gastrik, Endometrial Kanseri	Hsp70 inhibisyonu gastrik kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmekte ve hücreleri apoptoza sürüklemektedir.
Gastrik Kanseri	Yüksek seviyelerdeki Hsp70 ekspresyonu kanser hücrelerinin hayatta kalmasını kolaylaştırmaktadır.
Kolon ve Akciğer Kanseri	Yüksek seviyelerdeki Hsp70 ekspresyonu kanser hücrelerinin hayatta kalmasını kolaylaştırmakta ve kanser hücrelerini koruyucu etki göstermektedir.
Meme ve Gastrik Kanseri	Hsp70 antikanser etki göstermektedir.
Prostat Kanseri	Yüksek seviyelerdeki Hsp70 ekspresyonu prostat kanseri gelişimine katkı sağlamaktadır.

Kanserdeki kötü prognoz ile Hsp70 seviyeleri arasındaki ilişkiye benzer şekilde, ilaç direnci ile Hsp70 seviyeleri arasında da ilişki bulunmaktadır. Yüksek Hsp70 ekspresyonu, prostat kanserinde cisplatin, kronik myeloid lösemide ise imatinib direncine neden olmaktadır (Pocaly ve ark., 2007; Ren ve ark., 2008). Benzer şekilde aşırı Hsp70 ekspresyonu insan yumurtalık kanserinde cisplatin direncine neden olmakta, Hsp70 down-regülasyonu ise kanser hücrelerindeki ilaç direncini önemli ölçüde azaltmaktadır (Yang ve ark., 2012).

Antisens Hsp72 kullanılarak yapılan Hsp72 inhibisyon çalışmalarının sonuçları, Hsp72 inhibisyonuna bağlı olarak tümörlü hücrelerin hızlı bir şekilde öldüğünü göstermiştir. Hsp72 inhibisyonu yapılmayan hücrelerde ise hücreler hayatta kalmakta ve antikanser tedaviye karşı yüksek direnç devam etmektedir (Yaglom ve ark., 2007).

Hsp70 ayrıca önemli bir antikanser mekanizma olan hücrel yaşlanma yolaklarını da baskılamaktadır (Min ve ark., 2008). Son yapılan çalışmalar yüksek Hsp70 ekspresyonunun insan meme kanserinin yüksek seviyede agresif ve invaziv olan alt türündeki metastazla yakın ilişkisinin olduğunu göstermiştir (Powers ve ark., 2009). Ayrıca Hsp70, kanser hücrelerini immün-aracılı yıkıma karşı korumaktadır. Yüksek Hsp70 ekspresyonunun kanser hücrelerini monosit bağımlı sitotoksiteden koruduğu bildirilmiştir (Jäättelä ve Wissing, 1993).

Kanser hücrelerinde Hsp70'in yüksek seviyedeki ekspresyonu hücre ölümünü çeşitli yollarda inhibe etmekte ve kanser hücresine hayatta kalma olanağı sağlamaktadır. Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz bu hücre ölüm yollarının en önemlilerinden birisidir ve birçok çalışmada Hsp70 şaperonunun apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. Anti-apoptotik bir protein olarak Hsp70, apoptozu hem içsel hem de dışsal yollardan farklı seviyelerde inhibe etmektedir (Şekil 1.18) (Lanneau ve ark., 2007; Zorzi ve Bonvini, 2011).



Şekil 1.18. Hsp70'in anti-apoptotik rollerinin şematik olarak gösterilmesi (Powers ve ark., 2009).

Dışsal yolak, ölüm reseptörleri olarak bilinen tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesine ait plazma membran proteinleri sayesinde tetiklenmektedir ve bu tetiklenme direkt olarak “kaspazlar” olarak adlandırılan proteazların aktifleşmesine neden olmaktadır. İçsel yolakta ise hücre içi stres sinyalleri tarafından mitokondri dış membranı geçirgenliğinde bozulma meydana gelmekte ve normalde membranlar arası boşlukta bulunan pro-apoptotik moleküller sitoplazmaya salınarak apoptoz indüklenmektedir (Garrido ve ark., 2006).

Pre-mitokondrial seviyede Hsp70, c-Jun N terminal kinaz (JNK1)'e bağlanarak aktivitesini ATP-bağımsız şekilde bloke etmektedir (Gabai ve ark., 2000; Park ve ark., 2001). Hsp70 baskılanması ise JNK aktivitesini artırmakta ve buna bağlı olarak apoptozu indüklemesiyle bilinen kaspaz-3 aktivitesinde artış gözlenmektedir (Lee ve ark., 2005). Hsp70 ayrıca fosforile olmayan protein kinaz C (PKC) ve Akt proteinlerine de bağlanarak bu proteinlerin stabilitesini artırmaktadır (Gao ve Newton, 2002).

Mitokondriyal seviyede ise Hsp70, Bcl2 ailesinden olan Bax'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonunu ve mitokondri dış membranına bağlanmasını inhibe etmektedir. Sonuç olarak Hsp70, mitokondri membran geçirgenliğinin korunmasını sağlamak suretiyle sitokrom-c ve AIF'in mitokondriden sitoplazmaya salınımını önlemekte ve apoptozu baskılamaktadır (Stankiewicz ve ark., 2005).

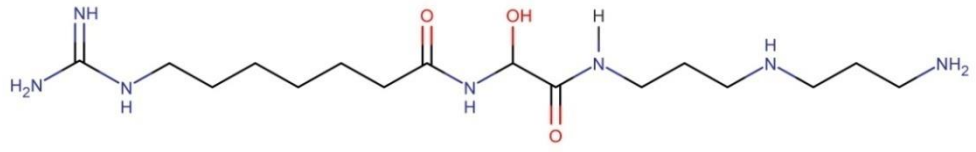
Post-mitokondriyal seviyede ise Hsp70, direkt olarak Apaf-1'e bağlanmak suretiyle sitokrom-c, Apaf-1 ve prokaspaz-9'un birleşmesiyle oluşan apoptozom oluşumunu önlemektedir (Beere ve ark., 2000). Apoptozun final fazı sırasında ise kromozomal DNA, kaspaz-3 aktive olduktan sonra DNaz CAD (kaspaz ile aktive olmuş DNaz) ile kesilmektedir. CAD'in enzimatik aktivitesi ve doğru bir şekilde katlanmasında Hsp70'in rolünün olduğu, dolayısıyla bu süreçte de Hsp70'in dolaylı yoldan apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Lanneau ve ark., 2007).

Kaspaz bağımlı hücre ölümünü engellemesinin yanı sıra Hsp70, kaspaz aktivasyonu olmadan da hücre ölümünü engellemektedir. Hsp70 mitokondri membranlar arası protein olan AIF'ye bağlanmakta ve AIF'nin nükleusa translokasyonunu ve buna bağlı olarak kromatin kondansasyonunu (yoğunlaşma) inhibe etmek suretiyle hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Creagh ve ark., 2000; Ruchalski ve ark., 2006).

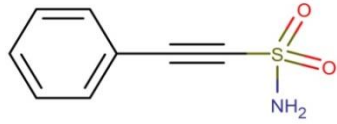
Son olarak lizozomlar da apoptoz gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. TNF-a, p53 aktivasyonu, oksidatif stres ve büyüme faktörü yoksunluğu gibi çeşitli apoptotik uyarıcılar lizozomal proteazların (özellikle katepsin) lizozom lümeninden sitoplazmaya geçişine neden olmaktadır (Yuan ve ark., 2002; Jäättelä ve Tschopp, 2003). Sitoplazmaya geçen katepsin, mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak hücrenin apoptoza gitmesine neden olmaktadır (Boya ve ark., 2003). Hsp70, spesifik olarak kanser hücrelerinin lizozomal membranında bulunurken, normal hücrelerin lizozom membranında bulunmamaktadır. Kanser hücrelerinin lizozom membranında bulunan Hsp70, lizozomal membranları stabilize eder/sağlamlaştırır ve katepsinlerin ve diğer hücre ölümünü indükleyebilecek enzimlerin sitoplazmaya salınımını önleyerek hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur (Powers ve ark., 2009; Murphy, 2013).

#### **1.1.5. Hsp70'in Farmasötik Olarak Hedeflenmesi ve Sentetik Hsp70 İnhibitörleri**

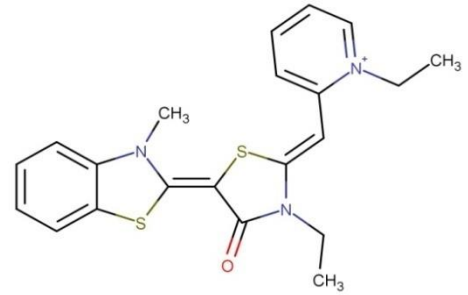
Hsp70, antikanser tedavide önemli bir hedef proteindir ve son zamanlarda birçok araştırmacı yeni Hsp70 inhibitörü geliştirme üzerine odaklanmış durumdadır. Şekil 1.19 da bazı Hsp70 inhibitörlerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir (Kang ve ark 2014).



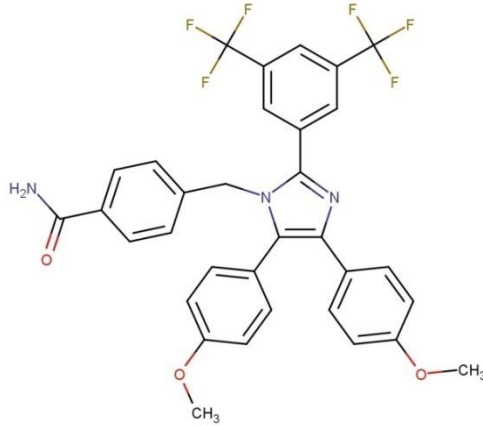
**15-DSG**



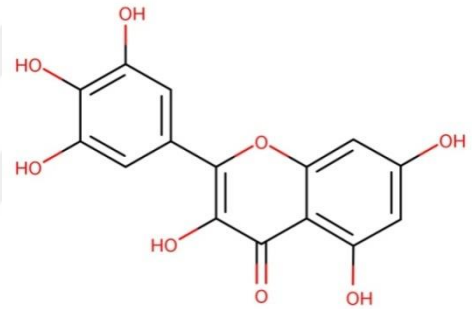
**PES**



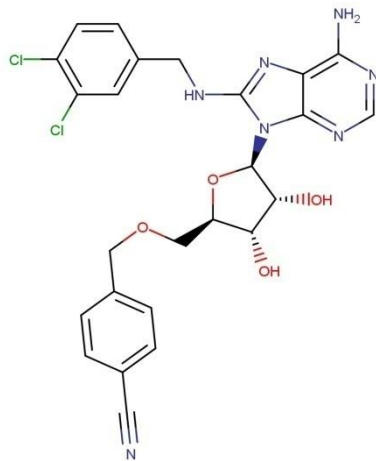
**MKT-077**



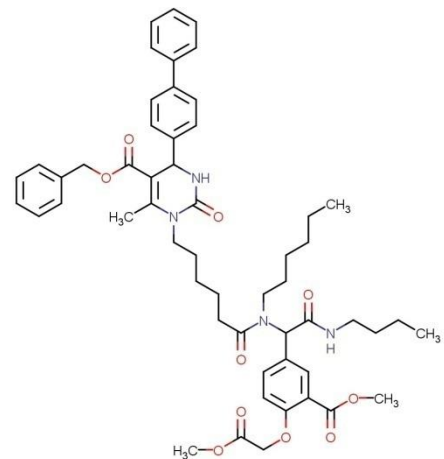
**Apoptozole**



**Myricetin**



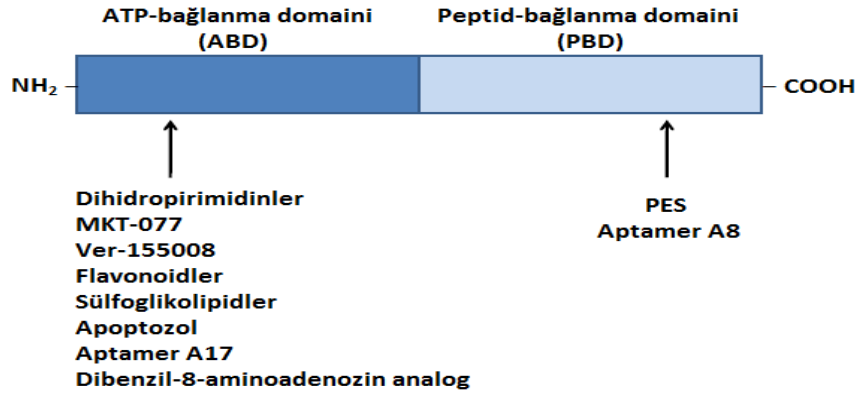
**VER-155008**



**MAL3-101**

**Şekil 1.19.** Bazı Hsp70 inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Kang ve ark 2014).

Hsp70'in farmasötik olarak inhibisyonu, Hsp70'in domain yapısı düşünüldüğünde üç grupta sınıflandırılabilir: NBD'nin hedeflenmesi, SBD'nin hedeflenmesi ve Hsp70 ko-şaperonlarının hedeflenmesi (Şekil 1.20) (Goloudina ve ark 2012; Murphy, 2013).



**Şekil 1.20.** Hsp70'in domain yapısı ve çeşitli Hsp70 inhibitörlerinin bağlanma bölgeleri (Goloudina ve ark., 2012).

### 1.1.5.1. Hsp70 NBD'nin Hedeflenmesi

ATP hidrolizi ve ADP/ATP değişimi Hsp70 şaperon aktivitesinde merkezi rol oynamaktadır. Bu yüzden Hsp70-ATP etkileşimini bozmak, Hsp70 fonksiyonunu engellemeye yönelik önemli bir stratejidir. Bu amaç için kullanılan ATP analogu kimyasallar Hsp70 inhibisyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Williamson ve ark., 2009).

İlk inhibitör ajan 1994 yılında tanımlanmış olan 15-deoxyspergualin (15-DSG)'dir. Doğal immün baskılayıcı olan bu ajanın sığır Hsc70'ine bağlanarak ATPaz aktivitesini uyardığı bildirilmiştir (Nadeau ve ark., 1994). Daha sonraki çalışmalar bu ajanın mayalardaki protein translokasyonunu etkili bir şekilde bloke ettiğini göstermiştir (Fewell ve ark., 2001). Deoxyspergualin ile ilişkili olan ikinci kuşak diğer bir Hsp70 inhibitörü MAL3-101 dir. Dihidropirimidinler sınıfından olan bu bileşik, Hsp70 ATPaz aktivitesini bloke ederek birçok kanser hücresinde proliferasyonu inhibe etmektedir. Multiple myeloma ksenograft modelde bu bileşiğin

etkili olduğu bildirilmiştir ancak umut vadeden bu bileşiğin ileri pre-klinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir (Fewell ve ark., 2001; Braunstein ve ark., 2011).

Diğer bir Hsp70 inhibitörü olan ve NBD'ye bağlanan VER-155008, adenozin-türevli bir ATP-analoğudur ve Hsp70 ve diğer aile üyelerinin ATPaz domainine bağlanarak bu proteinlerin şaperon aktivitelerini inhibe etmektedir. Bu bileşik Hsp70 izoformlarına yüksek seçicilikle bağlanmaktadır (IC<sub>50</sub> değeri 0,5 M). VER-155008, BT474 meme kanseri hücrelerinde kaspaz bağımlı olarak, HCT116 kolon kanseri hücrelerinde ise kaspaz bağımsız olarak apoptozu indüklemektedir. Ayrıca VER-155008'in kolon kanseri hücrelerinde Hsp90 inhibitörlerinden 17-AAG'nin apoptotik potansiyelini artırdığı, yine kolon ve BT474 meme kanseri hücrelerinde Hsp90 hedef proteinlerinin yıkımını indüklediği bildirilmiştir. Ancak bu bileşik henüz in vivo olarak çok fazla test edilmemiştir (Massey ve ark., 2010).

Katyonic rodasiyanin boyası olan MKT-077, kanser hücrelerine karşı yüksek seviyede seçicilik gösteren ve NBD'ye bağlanan farklı bir Hsp70 inhibitörüdür (Britten ve ark., 2000). Bu inhibitörün tümör hücreleri için IC<sub>50</sub> değeri, sağlıklı hücreler için olan IC<sub>50</sub> değerinden 100 kat daha düşüktür. Bu yüzden MKT-077 tümör hücrelerine karşı yüksek antikanser etki gösterirken sağlıklı hücrelere zarar vermemektedir (Koya ve ark., 1996). Birçok insan kanser hücre serisi için bu kimyasalın IC<sub>50</sub> değeri 0,35 ile 1,2 µM arasında değişmektedir (Rousaki ve ark., 2011). Fare ksenograft çalışmaları bu ajanın oldukça umut vaad ettiğini göstermiştir (Chiba ve ark., 1998). MKT-077, mitokondride lokalize olmaktadır ve mitokondriyal Hsp70 ile etkileşmektedir (Britten ve ark., 2000). Bununla birlikte sonraki çalışmalar Hsc70 ile de etkileştiğini göstermiştir (Rousaki ve ark., 2011). Bu ajan üzerinde yapılan Faz-I klinik çalışmalar, klinik dozlarının böbrek fonksiyonlarında ciddi bozulmalara neden olduğunu bildirmiş, dolayısıyla klinik kullanımı kısıtlanmıştır (Britten ve ark., 2000). Bu nedenle araştırmacılar aynı seçicilikle Hsp70'e bağlanan ancak böbrekler için daha az yan etki gösteren yeni inhibitörler keşfetmişlerdir. Örneğin yakın tarihte MKT-077 türevi olarak keşfedilen YM-1'in birçok kanser hücresine karşı antikanser etki gösterdiği, sağlıklı hücreler üzerinde ise toksik



etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bu yüzden YM-1 gelecek için umut vaat eden Hsp70 inhibitörlerinden birisidir (Koren ve ark., 2012).

İnsan embriyonik kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen ve imidazol bileşik sınıfından olan apoptozol, Hsc70 ATPaz domainine bağlanarak bu şaperonun ATPaz aktivitesini inhibe etmektedir (Williams ve ark., 2008; Cho ve ark., 2011). Sifingolipidlerde Hsp70 NBD'ye bağlanan diğer bir Hsp70 inhibitörü ajanlardır. Bunlardan 3'sülfogalaktolipid bileşiği, adamantil sülfogalaktozil seramid, Hsp70'e seçici olarak bağlanarak ATPaz aktivitesini inhibe etmektedir (Whetstone ve Lingwood, 2003).

#### **1.1.5.2. Hsp70 SBD'nin Hedeflenmesi**

Hsp70 şaperon fonksiyonunu inhibe etmek için ikinci hedef SBD'dir. 2-feniletinsülfonamid ya da pifitrin- $\mu$  (PES) önemli bir Hsp70 inhibitörüdür ve Hsp70'in SBD'sine bağlanmaktadır. İlk olarak p53'ün BclxL ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlere ilgisini azaltarak, p53'ün mitokondriyal proapoptotik aktivitesini inhibe etmek için tanımlanmıştır (Strom ve ark., 2006). Daha sonraki çalışmalar ise PES'in p53 DNA-bağlanma domaini ile etkileştiğini ve p53-Bcl-XI kompleksinin oluşumunu engellediğini ileri sürmüştür (Hagn ve ark., 2010). Ancak son zamanlarda yapılan bir çalışma sürpriz bir şekilde PES'in ne p53 ile ne de Bcl-2 ailesi proteinlerle etkileşmediğini, Hsp70 proteininin C-terminal SBD'si ile etkileştiğini göstermiştir. Hsp70'in SBD'si ile etkileşen PES, HSP70 ile Hsp40 ve APAF-1, p53 gibi proapoptotik hedef proteinler gibi çeşitli ko-şaperonlar arasındaki ilişkiyi kesmektedir. PES'in Hsp70 ile etkileşmesi katlanmamış proteinlerin çökmesine ve lizozom membranlarının stabilizasyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Bu durum hücrede otofajik hücre ölümünü indüklemektedir. PES, MKT-077'ye benzer şekilde birçok tümör hücrelerini kaspaz-bağımsız şekilde seçici olarak öldürürken, sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisi yoktur (Galluzzi ve ark., 2009; Leu ve ark., 2009). Ayrıca PES, Hsp70/Hsp90 şaperon sistemini bozarak Hsp70/Hsp90 substratlarının katlanmasını engellemekte ve bu proteinlerin agrege olmalarına ve fonksiyonlarını kaybetmelerine neden olmaktadır (Leu JI, 2011).

PES ve modifiye versiyonu olan PES-CI üzerinde yapılan bir çalışma B-hücreli lenfoma modelinde farelere 20 hafta boyunca 40 mg/kg PES ve 20 mg/kg PES-CI uygulamasının fareleri lenfomadan önemli ölçüde koruduğunu ve bu ajanın karaciğer, böbrek ve diğer organlara toksik etkisinin olmadığını göstermiştir (Leu ve ark., 2009; Balaburski ve ark., 2013). Diğer çalışmalar PES'in lösemi hücrelerine karşı önemli toksik etkisinin olduğunu, ancak normal hematopoietik hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığını göstermiştir (Kaiser ve ark., 2011). Bu ve benzeri diğer çalışmalar PES'in ve PES türevi ajanların kanser tedavisi için önemli bir Hsp70 inhibitörü olduğunu göstermektedir.

### **1.1.5.3. Hsp70 Ko-şaperonlarının Hedeflenmesi**

Hsp70 aktivitesini engellemek için diğer bir yol Hsp70 ko-şaperonlarının aktivitesini inhibe etmektir. Hsp70 ve farklı ko-şaperonlarının etkileşimi hücre homeostazisi ve hücrenin hayatta kalması için önemli olduğundan Hsp70 ko-şaperonlarının spesifik olarak inhibe edilmesi önemli bir antikanser stratejidir. Örneğin bakteriyel Hsp70 ko-şaperonu olan DnaJ'nin D-peptid ile hedeflenmesi, şaperon-bağımlı protein yeniden katlanmasını ve DnaJ'nin Hsp70 ATPaz aktivitesini inhibe etmektedir (Bischofberger ve ark., 2003). Memeli hücrelerinde Hsp40 ko-şaperonunu hedefleyen ve MAL2-11B olarak adlandırılan bileşiğin, Hsp40'ın Hsp70 ATPaz aktivitesini uyarmasını inhibe ederek Hsp70'in hücre fonksiyonlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (Wright ve ark., 2009). Ayrıca son zamanlarda yapılan bir çalışmada Hsp70 NDF Hsp110'un inhibe edilmesinin, Hsp70 şaperon aktivitesini bozarak kanser hücrelerini kemoterapiye karşı daha hassas bir hale getirdiği in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir (Dorard ve ark., 2011). Başka bir çalışmada pirimidotriazindionların Hop/Hsp70 etkileşimini engellediği ve bu bileşiklerin WST-1 hücrelerine karşı toksik olduğu bildirilmiştir (Yi ve Regan,2008). Ancak yakın zamandaki çalışmalar bu inhibisyonun nörodejenerasyona neden olduğunu bildirmişlerdir (Roodveldt ve ark., 2009).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Santrifüj Cihazı (Sigma), Mikrosantrifüj Cihazı (Beckman Coulter), -20°C'lik Derin Dondurucu (Vestel), -80°C'lik Derin Dondurucu (Sanyo, Heto), Laminar Flow Kabin (Nüve), CO<sub>2</sub>'li Etüv (Nüve), PCR Cihazı (Thermo Scientific), Real Time PCR Cihazı (Roche LightCycler 480), Çalkalamalı İnkübatör (New Brunswick), Poliakrilamid Jel Elektroforezi (EC 120), Su Banyosu (Nüve), Çift Distile Su Cihazı (Millipore), Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica), pH Metre (Sesa 1400), Vorteks Cihazı (Heidolph), Buzdolabı (Vestel), Elektronik Terazı (Mettler Toledo), İnvrted Mikroskop (Leica), Elisa Reader (Thermo Scientific), Otomatik Pipetler (Gilson).

### 2.2. Kullanılan Kitler ve Malzemeler

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent), RNA İzolasyon Kiti (Qiagen), cDNA Sentez Kiti (Qiagen), Hsp70i ELISA Kit (Enzo Life Sciences), Heath Shock Proteins PCR Array (Qiagen), Human Cancer Drug Targets PCR Array (Qiagen), SYBR Green Master Mix (Qiagen), XTT Cell Proliferation Assav Kit (Roche), VER-155008 (Sigma), Pifitrin- $\mu$  (Sigma), MKT-077 (Sigma), Paklitaksel (Sigma), ATP, NADH, Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma), Hsp70 Plazmidi (abmgood), BL21DE Kompedan Hücresi (invitrogen), DH5 $\alpha$  Kompedan Hücresi (invitrogen), Maya, Agar, Pepton, NaCl, Ni Reçine (GE Healthcare Life Sciences), Kanamisin, İmidazol, IPTG, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Agaroz, Akrilamid, Bisakrilamid, Sodyum Dedosil Sülfat (SDS), Amonyum Persülfat (APS),  $\beta$ -mercaptoetanol, Temed, Etanol, Metanol, Asetik Asit, Bromphenol Blue, Tris, Gliserol, Sığır serum albümini (BSA), Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri (DMEM), Şeffaf RPMI 1640 (Sigma), Fetal Sığır Serumı (FBS), Tripsin, Penicilin-Streptomisin, L-glutamin (Sigma).

### 2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları ve Veri Tabanları

Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), BIOVA Discovery Studio 4.5 Client, Docking Server (<http://www.dockingserver.com/web>), RasMol, Marvin Sketch, Qiagen data analysis center (<http://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>), SPSS Statistics 17.0, GraphPad Prism 7, Curve Expert.

### 2.4. Kullanılan Hücre Serisi

Çalışmalarımızda *American Type Culture Collection* (ATCC)'den temin edilen insan meme kanseri hücresi MCF-7 kullanıldı.

### 2.5. Kullanılan Yöntemler

#### 2.5.1. İnsan Hsp70/inhibitör Etkileşimlerinin *in silico* Olarak Belirlenmesi

*In silico* çalışmalara geçmeden önce Hsp70 proteinine ait NBD kristal yapısı ve MKT-077 ve VER-155008 inhibitörlerinin kimyasal yapılarının çizilip PDB formatında kaydedilmesi gerekmektedir. Bu amaçla insan Hsp70 proteininin NBD kristal yapısı protein data bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) veri tabanı sitesinden “3JXU” PDB kodu ile bulunarak kaydedildi (Şekil 2.1). İnhibitörlerin kimyasal yapılarının çizilmesi ve PDB formatına dönüştürülerek kaydedilmesinde Marvin Sketch (ChemAxon®), proteinlerin, kimyasalların ve doking sonuçlarının üç boyutlu yapılarının görüntülenmesinde ise BIOVA Discovery Studio 4.5 Client ve Rasmol programları kullanıldı. Proteinler, ligandlar ile etkileştirilmeden önce BIOVA Discovery Studio 4.5 Client programında bulunan “*clean geometry*” aracı ile minimize edildi.

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB Login

RCSB PDB An Information Portal to 118928 Biological Macromolecular Structures

Search by PDB ID, author, macromolecule, sequence, or ligands Go

Advanced Search | Browse by Annotations | Search History (1) | Previous Results (1)

Structure Summary 3D View Annotations Sequence Sequence Similarity Structure Similarity Experiment Literature

Biological Assembly 1

3JXU

Crystal structure of the human 70kDa heat shock protein 1A (Hsp70-1) ATPase domain in complex with ADP and inorganic phosphate

DOI: 10.2210/pdb3jxu/pdb

Classification: CHAPERONE

Deposited: 2009-09-21 Released: 2009-10-20

Deposition author(s): [Wisniewska, M.M.](#), [Karlberg, T.](#), [Arrowsmith, C.H.](#), [Berghlund, H.](#), [Bountra, C.](#), [Collins, R.](#), [Edwards, A.M.](#), [Flodin, S.](#), [Flores, A.](#), [Graslund, S.](#), [Hammarstrom, M.](#), [Johansson, A.](#), [Johansson, I.](#), [Kallas, A.](#), [Kraulis, P.](#), [Kotenyova, T.](#), [Kotzsch, A.](#), [Markova, N.](#), [Moche, M.](#), [Nielsen, T.K.](#), [Nordlund, P.](#), [Olsson, T.](#), [Petersen, C.](#), [Rees, A.K.](#), [Sierano, M.](#), [Sobott, D.](#), [Suzman, J.](#), [Thornell, A.C.](#), [Toscani, M.](#)

Şekil. 2.1. Protein data bank ana sayfası.

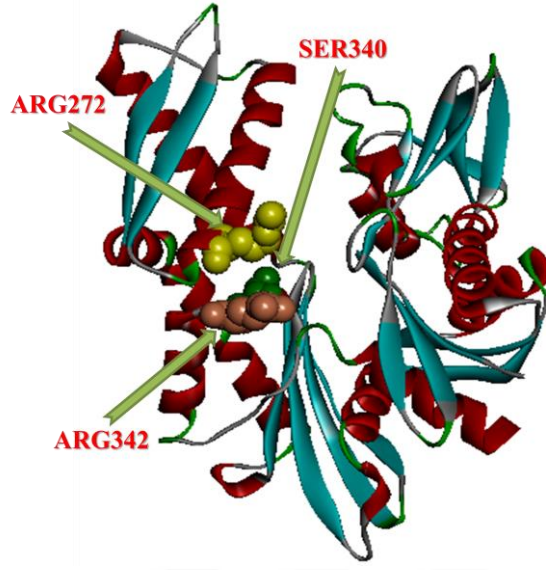
İnhibitörler ve Hsp70/mutant Hsp70 arasındaki etkileşimlerin belirlenmesinde moleküler doking yöntemi kullanıldı. Moleküler doking, özellikle proteinleri hedef alan ilaçların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir yöntemdir. Yöntemin başlıca amacı protein ve ligand etkileştirilmesi ve protein/ligand kompleksine ait yapı, bağlanma enerjisi ve minimum inhibisyon konsantrasyonu gibi parametrelerin tahmin edilmesidir (Meng ve ark., 2011). Program ayrıca ligand ile etkileşen amino asitleride göstermektedir. Bu amaç için geliştirilen çeşitli birçok doking programları mevcut olmakla birlikte çalışmamızdaki Hsp70/inhibitor etkileşimleri dockingserver (<http://www.dockingserver.com/web>) veri tabanı ile belirlendi (Şekil 2.2).



Şekil. 2.2. Docking server ana sayfası.

### 2.5.2. Hsp70 NBD Üzerinde Nokta Mutasyonları Yapılması ve Mutant Hsp70/inhibitor Etkileşimlerinin in silico Olarak Belirlenmesi

Hsp70 NBD üzerindeki mutasyonların belirlenmesinde Hsp70 NBD ile ATP, AMP-PNP, MKT-077 ve VER-155008'in moleküler doking sonuçları yol gösterici olmuştur. Hsp70 NBD ile belirtilen bu ligandlar ayrı ayrı etkileştirilerek protein/ligand etkileşim profilleri belirlendi ve en kararlı etkileşimlerin olduğu dokinglerle çalışmalara devam edildi. Doking sonuçları toplu olarak değerlendirildi ve Hsp70 NBD üzerindeki amino asitlerden bütün ligandlarla etkileşen ortak amino asitler ARG272, SER340 ve ARG342 olarak belirlendi (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** İnsan Hsp70 NBD de nokta mutasyonu yapılan amino asitler. Moleküler doking sonuçları ile bu amino asitlerin bütün ligandlar ile (ATP, AMP-PNP, MKT-077 ve VER-155008) etkileşime girdiği tespit edilmiştir.

Bu kritik amino asitlerde “BIOVA Discovery Studio 4.5 Client” programı yardımıyla nokta mutasyonları yapılarak (ARG272LYS, SER340GLU ve ARG342HIS) protein/ligand etkileşiminin ve etkileşime ait parametrelerin (bağlanma katsayısı ve minimum inhibitör konsantrasyonu) ne şekilde değiştiği doking programı ile yeniden belirlendi. Şekil 2.4 de Hsp70 NBD’ e ait kristal yapı ve alt kısımda amino asit sekansı gösterilmektedir. Ok ile gösterilen alanda istenilen nokta mutasyonları insilico olarak gerçekleştirilebilmektedir.



**Şekil 2.4.** Hsp70 NBD kristal yapısı ve amino asit sekansı, görüntü Discovery Studio 4.5 Client programından alınmıştır.

Sonuçta yapılan nokta mutasyonlarının protein/ligand etkileşimini ne şekilde değiştirdiği moleküler doking yöntemi sayesinde bilgisayar ortamında görüldü. Biyokimyasal deneylere geçmeden önce yapılan bu in silico çalışmalar araştırmacılar için ön deneme niteliği taşımaktadır.

### 2.5.3. Hücre Kültürü

MCF-7 meme kanseri hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, 25cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10fetal sığır serumu içeren DMEM hücre kültür besiyerinde çoğaltıldı. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapıldı ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlandı.

### 2.5.4. İnhibitör Konsantrasyonlarının Hazırlanması

İnhibitörler hazırlanırken öncelikle inhibitörlerin DMSO içerisinde stok çözeltileri hazırlandı ve her bir stok çözelti 0,2 µm şırınga uçlu filtreden geçirilerek steril edildi (en yüksek konsantrasyondaki DMSO oranı %0,1). Daha sonra bu stoklardan seri dilüsyonlar yapılarakinhibitörlerin hücrelere uygulanacak farklı



konsantrasyonları hazırlandı. Hücrelere yüksekte düşüğe doğru değişen konsantrasyonlarda uygulama yapılarak ELISA deneyleri ve RNA izolasyonu için her bir inhibitörün uygun konsantrasyonu ve IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.

#### **2.5.5. XTT Hücre Canlılık Testi**

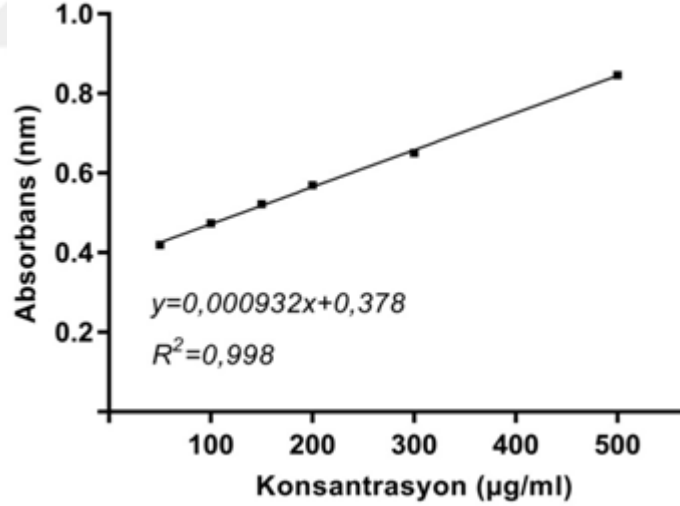
İnhibitörlerin ve meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan paklitakselin hücre canlılığı üzerine etkisi ve çalışmalarda kullanılacak uygun konsantrasyonlar XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) testi ile araştırıldı.

Öncelikle her kuyuda  $10 \times 10^3$  hücre olacak şekilde hücre alınıp steril 96 kuyucuklu mikro plakaya ekildi ve hücrelerin yapışması için bir gece beklendi. Ertesi gün hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı, kuyucuklar PBS ile yıkandı ve inhibitörler ve paklitaksel değişik konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulanıp 24 ve 48 saat inkübasyon gerçekleştirildi. 24 ve 48 saatin sonunda inhibitörleri ve ilacı içeren besi yerleri uzaklaştırıldı ve hücreler üç defa PBS ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl şeffaf (renksiz) RPMI 1640 ve bununda üzerine 50 µl XTT solüsyonu eklenerek CO<sub>2</sub>'li etüvde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda optik dansite değeri mikroparka okuyucuda 450 nm'de okundu. Kontrol grubunun hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilip % Hücre canlılık= (Konsantrasyon O.D. / Kontrol O.D.) X 100 formülünden yararlanarak hesaplandı. Konsantrasyona bağımlı hücre canlılık grafikleri GraphPad Prism 7 programı yardımıyla çizildi ve inhibitörler ve ilaca ait IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

#### **2.5.6. Hsp70i Protein Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi**

MCF-7 hücre lizatındaki Hsp70i düzeyleri kit prosedürüne uygun olarak Hsp70 ELISA kiti ile belirlendi. ELISA deneylerine geçmeden önce hücre lizatları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

1. Öncelikle hücreler üzerindeki inhibitör ve paklitaksel içeren besi yerleri uzaklaştırıldı ve hücreler üç defa PBS ile yıkandı. Tripsin ile hücreler kaldırıldı üzerine tripsin miktarının dört katı kadar DMEM ilave edildi ve santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
2. Hücrelerin oluşturduğu dipte kalan pellet PBS ile üç defa yıkandı.
3. Hücre pelleti “ekstraksiyon rejanı” ile resüspande edildi ve buz üzerinde ara sıra karıştırmak suretiyle 30 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi sonunda ekstrakt 21,000 g, 4 °C’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant hücre lizatıdır, ELISA deneylerine geçilmeden önce lizatlardaki total protein miktarı bradford yöntemi ile belirlendi. 96’lık elisa plağına 10 µl örnek ve 50, 100, 150, 200, 300, 500 µg/ml’lik BSA standartları koyuldu ve üzerilerine 200 µl bradford çözeltisi eklenerek karanlıkta 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 595 nm’de absorbans ölçüldü ve standartlara ait konsantrasyon/absorbans grafiği çizildi (Şekil 2.5). Elde edilen denklem yardımıyla örneklerdeki total protein miktarları µg/ml olarak hesaplandı.

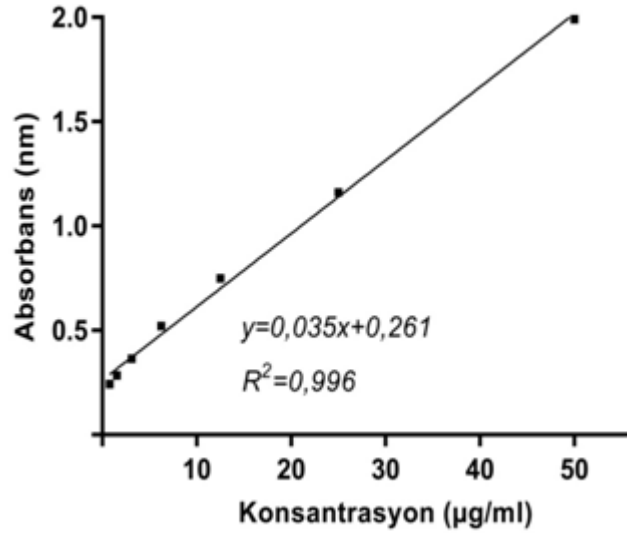


Şekil 2.5. Bradford standart grafiği.

Lizatlardaki Hsp70i düzeylerinin ölçümünde ise aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı:

1. İlk olarak Hsp70i standartlar ve örnekler “örnek seyreltme çözeltisi 2” kullanılarak hazırlandı.

2. Hazırlanan standartlar ve örneklerden her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde mikroplakaya koyuldu ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar 4 defa 1X yıkama solüsyonu ile yıkandı.
4. Her bir kuyucuğa 100 µl Hsp70 antikor koyularak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar 4 defa 1X yıkama solüsyonu ile yıkandı.
6. Her bir kuyucuğa 100 µl “Hsp70 konjugat” koyularak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
7. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar 4 defa 1X yıkama solüsyonu ile yıkandı.
8. Her bir kuyucuğa 100 µl “TMB Substrat” koyuldu ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
9. 30 dk sonunda kuyucuklara 100 µl “durdurma solüsyonu 2” koyularak hemen 450 nm de absorbans ölçüldü.
10. Son olarak standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak Hsp70i standart eğrisi çizildi ve örneklerdeki Hsp70i miktarları bu eğri denkleminde faydalanılarak hesaplandı (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hsp70i Proteininin Standart Eğrisi.

## 2.5.7. Hsp70 Proteininin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

### 2.5.7.1. LB Besiyeri Hazırlanması

Gerekli malzemeler (1 L için):

- ❖ 10 gr tripton
- ❖ 10 gr NaCl
- ❖ 5 gr maya ekstraktı
- ❖ 15 gr agar
- ❖ 50µg/ml kanamisin

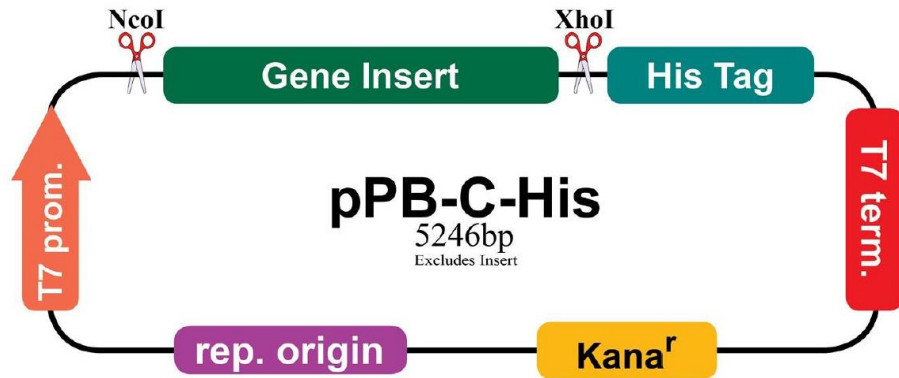
1. Yukarıdaki maddeler tartılarak hacmi saf su ile 950 ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırıldı.
2. Karışımın pH'ı NaOH ile 7'ye ayarlandı ve hacmi su ile 1 lt'ye tamamlandı.
3. 121 °C'de 20 dk otoklavlandı. Otoklavlandıktan sonra yaklaşık 55 °C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 50 µg/ml kanamisin eklenip karıştırıldıktan sonra bek alevinin etrafına dizilmiş petri kaplarına yaklaşık 20 ml olacak şekilde döküldü.
4. Agar katılaştıktan sonra petrilerin etrafı parafilmle sarıldı ve ters çevrilerek +4 °C'ye kaldırıldı.

LB besi yeri hazırlanırken yukarıdaki karışım aynı şekilde hazırlandı tek fark olarak karışım içerisine agar koyulmadı.

### 2.5.7.2. Ekspresyon Vektörünün Kompetan *E.coli* Hücrelerine Aktarımı

1. Öncelikle kompetan hücreler -80 °C'lik soğutucudan alınarak buz üzerinde eritildi (yaklaşık 20-30 dk).
2. 1 ng ticari olarak satın alınan insan Hsp70 plazmiti ile 50 µl BL21(DE3) kompetant hücre küçük bir ependorf tüpünde pipetleme yapılmadan hafif bir şekilde karıştırıldı.

3. Kompetan hücre/plazmid DNA karışımı öncelikle buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi sonunda karışım buzdan alındı ve 42 °C'lik su banyosunda 30 sn bekletildi (bu işlem hücre membranındaki porların açılarak plazmidlerin hücre içerisine girmesi amacıyla yapılır).
5. Daha sonra hızlı bir şekilde buza gömülerek yeniden 2 dk buz üzerinde bekletildi.
6. Bu son inkübasyon sürecinden sonra tüpün üzerine önceden 37 °C'ye dereceye getirilmiş 500 µl steril SOC besi yeri eklendi, karışım 15 ml lik steril falkon tüpe alınarak sallamalı inkübatörde 150 rpm, 37 °C de 45 dk büyütüldü (bulanıklığın olması hücrelerin çoğaldığını gösterir).
7. 45 dk'nın sonunda transforme bakterilerden 100 µl alınıp önceden 37 °C'ye getirilmiş ve 50 µg/ml kanamisin içeren LB-agar petrilere yayıldı ve ters çevrilerek 37°C de 1 gece inkübe edildi. Ayrıca kontaminasyon olup olmadığının anlaşılması için bir tane petriye de transforme edilmemiş *E.coli* yayıldı.



**Şekil 2.7.** İnsan Hsp70 plazmitinin vektör şeması.

Transformasyon işleminin ardından kanamisin içeren besi yerine ekilen bakterilerden plazmidi içerisine alan bakteriler kanamisine dirençli gen bölgesi içermeleri sebebiyle ortamda çoğalmaktadırlar; ancak plazmidi hücre içerisine almayan hücreler kanamisin direnç genleri bulunmadığı için ölmektedirler.

**Çizelge 2.1.** SOC besi yeri içeriği.

SOC Çözeltisi (1L)
20 g Tripton
5 g Maya Ekstresi
0,5 g NaCl
10 mL 2M MgCl <sub>2</sub>

### 2.5.7.3. Küçük ve Büyük Hacimde Kültür Hazırlanarak Hsp70 Proteinin Üretilmesi

Küçük hacimdeki kültür için yaklaşık 15 ml LB hazırlandı ve otoklavlandı. Sıcaklık yaklaşık 55 °C'ye düşünce içerisine 15 µl kanamisin ilave edildi. Daha sonra steril kürdan yardımıyla daha önce LB-agar petrilere ekilen transformant hücreler karışıma koyularak 150 rpm ve 37 °C'de bir gece çalkalandı. Ertesi gün şişede gözlemlenen bulanıklık hücrelerin uygun şekilde çoğaldığını gösterdi.

Büyük hacimdeki kültür için 1L LB hazırlanarak otoklavlandı ve sıcaklık uygun seviyeye düşünce 1 ml kanamisin ilave edildi. Küçük kültürde bir gece boyunca büyüyen hücreler eklenerek 37°C, 220 rpm de optik dansite (O.D.) 0,6-0,7 olana kadar çalkalayıcıda çalkalandı. Bu değere ulaşıncaya protein ekspresyonunun indüklenmesi amacıyla final konsantrasyon 0,1 M olacak şekilde IPTG ilave edilip 4-5 saat daha 37°C, 220 rpm de çalkalandı. Süre sonunda karışım 4°C, 10000 rpm de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü, dipte kalan pelet ise (plazmiti taşıyan hücreler) daha sonra çalışılmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

### 2.5.7.4. Bakterilerin parçalanması ve Hsp70 proteinin saflaştırılması

Bir önceki aşamada -20 °C'ye kaldırılan hücreler lizis solüsyonunda çözülerek *bead-beater* (mekanik parçalayıcı) ile parçalandı ve 4°C, 9600 rpm'de bir saat santrifüj edildi. Hsp70 proteinini de içeren süpernatant iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmak üzere Ni reçine ile 1 saat sallanarak 4°C'de inkübe edildi. Ardından bu karışım kolona aktarıldı. Örnek kolondan geçtikten sonra,

öncelikle 3 kolon hacmi yıkama çözelti kolondan geçirildi, ardından sırasıyla 3 kolon hacmi 200 mM, 250 mM ve 300 mM imidazol içeren elüsyon çözeltileri geçirilip fraksiyonlar SDS-PAGE yapılmak üzere toplandı.

**Çizelge 2.2.** Lizis, yıkama ve elüsyon çözeltilerinin içerikleri.

Lizis Çözeltisi	Yıkama Çözeltisi	Elüsyon Çözeltisi
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl
10 mM İmidazol	20 mM İmidazol	200-250-300 mM imidazol (gradyan)
% 10 Gliserol	% 10 Gliserol	
% 10 Tween	% 10 Tween	

### 2.5.8. SDS PAGE Analizi

SDS-PAGE jeli, ayırma jeli (alt jel) ve derişim jeli (üst jel) olmak üzere iki farklı özellikteki jelden oluşmaktadır (Çizelge 2.3). Deneylerimizde hücre lizatlarında bulunan Hsp70 protein seviyeleri %10'luk SDS page jel kullanılarak değerlendirildi.

**Çizelge 2.3.** Ayırma jeli (alt jel) ve derişim jeli (üst jel)'nin bileşenleri ve miktarları.

Ayırma jeli (alt jel)	Derişim jeli (üst jel)
dH <sub>2</sub> O (4 ml)	dH <sub>2</sub> O (3 ml)
%30'luk Akrilamid (3,34 ml)	%30'luk Akrilamid (650 µl)
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8 (2,5 ml)	0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8 (1,25 ml)
%10'luk SDS (100 µl)	%10'luk SDS (50 µl)
%10'luk APS (50 µl)	%10'luk APS (25 µl)
TEMED (10 µl)	TEMED (12 µl)

SDS-PAGE jeli hazırlanmadan önce, camlar su ve deterjan yardımıyla iyice temizlendi ve yüzeylerinde herhangi bir kalıntı kalmaması için %70'lik alkol çözeltisi ile silindi. Daha sonra BIORAD miniprotein dikey elektroforez sistemi kuruldu ve sızdırma olup olmadığı su ile test edildi. Ayırma jeli (%10'luk *separating*

gel) bir falkon tüpü içerisinde hazırlanarak camların arasına 10 ml'lik pipet yardımıyla döküldü. Jel üzerinde kabarcık oluşumunun önlenmesi, jelin havayla temasının önlenmesi ve düz bir zemin elde edilebilmesi için jelin üzeri suya doymuş bütanol ile kapatıldı. Ayırma jelinin polimerize olması için yaklaşık yarım saat beklendikten sonra jelin üzerindeki bütanol kurutma kâğıdı yardımıyla uzaklaştırıldı. Jel saf su ile yıkandıktan sonra distile suyun fazlası da kurutma kâğıdı ile uzaklaştırıldı. Daha sonra üst jel (%4'lük stacking jel) hazırlanarak alt jelin üzerine döküldü ve zaman kaybetmeden taraklar yerleştirildi. Yaklaşık yarım saatin sonunda üst jel polimerleşti ve taraklar jele zarar vermeyecek şekilde dikkatlice çıkarıldı.

Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine yerleştirildi ve tank yaklaşık 3 cm yüksekliğe kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu.

**Çizelge 2.4.** 1X Yürütme tamponu çözeltisinin içeriği.

Yürütme Tamponu
3,03 g tris
14.4 g glisin
1 g SDS
1L H <sub>2</sub> O

### 2.5.8.1. Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklmesi

Jel hazırlandıktan sonra; protein örnekleri 1:1 oranında 2X SDS yükleme tamponu ile karıştırılarak 95 °C'de 10 dk kaynatılarak denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra örnekler oda sıcaklığında soğutularak yükleme işlemine geçildi. Örnekler için; 20µl protein çözeltisi + 20 µl 2X yükleme tamponu olacak şekilde hazırlanan örnekler otomatik pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. Yükleme işleminden sonra proteinler 120 V'da yaklaşık 1 buçuk saat yürütüldü. Elektroforez işleminin ardından camlar açılarak jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı, sağ üst köşesi işaretlendi ve boyama işlemine geçildi. Jel boyama çözeltisi içerisinde iyice boyanana kadar bekletildikten sonra boyanın fazlasının giderilmesi amacıyla arıtma



çözeltisine alındı ve bantlar belirginleştikten sonra görüntü alındı. Boyama çözeltisi, artıma çözeltisi ve yükleme tamponunun bileşenleri Çizelge 2.5 de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Örnek yükleme tamponu, boyama çözeltisi ve arıtma çözeltisi içeriği.

Yükleme Tamponu (10 ml )	Boyama Çözeltisi	Arıtma Çözeltisi
2.5 ml 1M Tris-HCl pH 6,8	0,5 g Coomassie brilliant blue R-250	200 ml metanol
4 ml %100 gliserol	200 ml metanol	50 ml asetik asit
0.8 ml %0,1 bromfenol blue	50 ml asetik asit	250 ml H <sub>2</sub> O
1 g SDS	250 ml H <sub>2</sub> O	
2 ml 14,3 M β-merkaptoetanol		
Son hacim 10 ml olacak şekilde H <sub>2</sub> O		

### 2.5.9. Hsp70 NBD’de Nokta Mutasyonu Gerçekleştirilmesi ve Mutant Proteinlerin Saflaştırılması

Hsp70 NBD’deki nokta mutasyonları “quickcChange Site-Directed Mutagenesis Kit” kullanılarak gerçekleştirildi. İşlem basamakları şu şekildedir:

1-) İlk olarak mutasyon bölgesini içeren primerler kit prosedüründe yazan 25-45 arası bazdan oluşacak şekilde 33 bazlık, istenilen mutasyonu içerecek şekilde ve mutasyon bölgesi primerin tam ortasına denk gelecek şekilde dizayn edildi (Çizelge 2.6).

**Çizelge 2.6.** Mutant genlere ait ileri ve geri primerler. İşaretli nükleotidler mutasyon yapılan bölgeyi göstermektedir.

Mutant Gen	İleri Primer	Geri Primer
ARG272LYS	5' TCGGAGAGGGCCAAGAAA ACCCTG CGTCCAGC 3'	5' GCTGGACGACAGGGTAAA CTTGGCCCTCTCGCA 3'
SER340GLU	5' GTCCTGGTCGGGGGCGAAACC CGCATCCCCAAG 3'	5' CTTGGGGATGCGGGTGAA GCCCCGACCAGGAC 3'
ARG342HIS	5' GTCGGGGGCTCCACCCAUAATC CCCAAGGTGCAG 3'	5' CTGCACCTTGGGGATCAUG GT GGAGCCCCCGAC 5'

2-) İkinci aşamada kontrol ve örnek reaksiyonları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- ❖ 5 µl 10x reaksiyon tamponu
- ❖ 2 µl (10 ng) whitescript 4.5- kb kontrol plazmit (5 ng/µl)
- ❖ 1,25 µl oligonükleotid kontrol primer 1
- ❖ 1,25 µl oligonükleotid kontrol primer 2
- ❖ 1 µl dNTP mix
- ❖ 39,5 µl (ddH<sub>2</sub>O) final hacim 50 µl olacak şekilde
- ❖ En son 1 µl *PfuTurbo* DNA polimeraz eklendi.

Kontrol reaksiyonuna benzer şekilde örnek reaksiyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı:

- ❖ 5 µl 10x reaksiyon tamponu
- ❖ 5-50 ng dsDNA template
- ❖ 125 ng oligonükleotid primer 1
- ❖ 125 ng oligonükleotid primer 2
- ❖ 1 µl dNTP mix
- ❖ Final hacim 50 µl olacak şekilde ddH<sub>2</sub>O eklendi
- ❖ Son olarak 1 µl *PfuTurbo* DNA polimeraz eklendi.

3-) Mutajenik plazmitlerin amplifikasyonu edilmesi aşaması gerçekleştirildi.

4-) Amplifikasyonu plazmitler *Dpn I* enzimi yardımıyla kesildi:

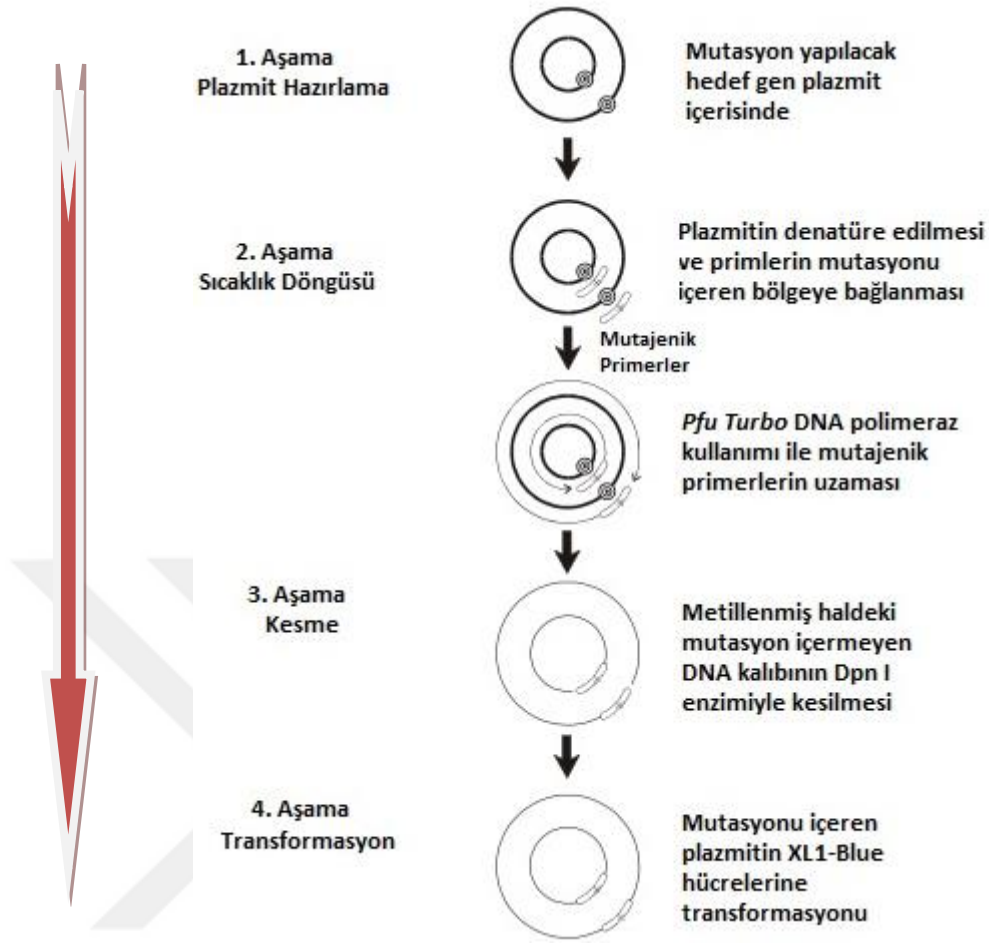
- ❖ Her bir amplifikasyon reaksiyon tüpü üzerine 1 µl *Dpn* I enzimi (10 U/µl) ilave edildi.
- ❖ Reaksiyon tüpleri pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası karışım parental DNA'nın kesimi için 37°C de 1 saat inkübe edildi.

5-) Beşinci aşamada mutasyon içeren plazmitler XL1-blue hücrelerine transforme edildi.

- ❖ Önce XL1-blue hücreleri buz üzerinde yavaşça çözüldü ve her bir tüpte 50 µl hücre olacak şekilde ependorf tüplerine paylaştırıldı.
- ❖ Daha sonra her bir bölünen XL1-blue hücreleri üzerine 1 µl *Dpn* I ile muamele edilen DNA'dan koyuldu ve karışım dikkatli bir şekilde karıştırılarak buz üzerinde 30 sn inkübe edildi.
- ❖ Buz üzerinden alınan karışım 42°C'de 5 dk bekletildi ve tekrar buz üzerine alınarak 2 dk inkübe edildi.

Transformasyon işleminin ardından daha önce açıklandığı şekilde küçük ve büyük hacimde kültürler yapılarak istenilen mutasyonu içeren bakteriler çoğaltıldı ve bölüm 2.5.7.3' de anlatıldığı şekilde mutant proteinler bu bakterilerden saflaştırılarak biyokimyasal deneyler gerçekleştirildi.

Mutasyon işleminin aşamaları özet halinde Şekil 2.8 de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. QuickChange nokta mutasyonu metoduna genel bakış.

### 2.5.10. ATP hidroliz deneyleri

Hsp70/mutant Hsp70 proteinlerine ait ATPaz aktivitesi, NADH oksidasyonu ile ATP hidrolizinin oranının belirlenmesine dayanan standart ikili enzim (piruvat kinaz/laktat dehidrogenaz) yöntemi ile spektroskopik olarak 340 nm’de belirlendi. Hsp70/mutant Hsp70 proteinlerinin ATPaz aktiviteleri miligram proteinin dakikada hidrolizlediği mmol ATP olarak hesaplandı.

Reaksiyon 10 µg/µl Hsp70/mutant Hsp70 proteinlerinin, 500 µl’lik reaksiyon karışımına (50 mM Hapes, pH:7,4, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NADH, 0,5 mM fosfoenol piruvat, 18 ünite laktat dehidrogenaz, 24 ünite piruvat kinaz/1 ml)

ilavesiyle başlatıldı ve karışım 37°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışıma 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM ve 3,125 µM konsantrasyonlarında MKT-077 ve VER-155008 ilave edildi. Son hacimde 100 µM olacak şekilde ATP ilave edildi ve reaksiyon başlatılarak ATP'nin ADP'ye hidrolizi spektrofotometrik olarak 340 nm'de analiz edildi. İnhibitörlerin yokluğunda ve mutant olmayan Hsp70 için hesaplanan ATPaz aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve inhibitörlerin ve mutant proteinlerin varlığında belirlenen ATPaz aktivitesi bu değer ile karşılaştırıldı. Deneyler normal Hsp70, normal Hsp70 + inhibitörler (ayrı ayrı), mutant proteinler, mutant proteinler + inhibitörler (ayrı ayrı) olacak şekilde farklı kombinasyonlar şeklinde çalışıldı.

#### **2.5.11. Lüsiferaz agregasyon deneyleri**

Lüsiferazın vermiş olduğu lüminasans sinyal yoğunluğunun, doğru katlanmış korformasyonda ve agrege olmuş formundaki değişimlerini esas alan bir tekniktir. Çalışmamızda lüsiferaz üre ile denatüre edildi ve denatüre olmuş lüsiferaz pH:7,4 olan tampon çözeltide (25 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 2mM ATP, 5 mM DTT) dilüe edildi. Reaksiyon ortamına Hsp70/mutant Hsp70 proteinleri ilave edilerek yapısı bozulan lüsiferazın tekrar doğru üç boyutlu yapısını kazanması amaçlandı. Daha sonra reaksiyona 10 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında MKT-077 ve VER-155008 eklendi. İnhibitörlerin eklenmesi ile lüsiferazın tekrar katlanma aktivitesindeki düşüş spektrofotometrik olarak 320 nm dalga boyunda ölçüldü. Deney hidrolize olmayan ATP (AMP-PNP) ile tekrarlandı. İnhibitörlerin yokluğunda ve normal Hsp70 varlığında hesaplanan lüsiferaz katlama aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve inhibitörlerin ve mutant proteinlerin varlığında belirlenen ATPaz aktivitesi bu değer ile karşılaştırıldı. Deneyler normal Hsp70, normal Hsp70 + inhibitörler (ayrı ayrı), mutant proteinler, mutant proteinler + inhibitörler (ayrı ayrı) olacak şekilde farklı kombinasyonlar şeklinde çalışıldı.

### 2.5.12. MCF-7 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Qiagen firmasına ait “RNeasy Plus Mini Kit” kullanılmış olup sırasıyla aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir:

1. MCF-7 hücreleri tripsin ile kaldırıldı ve üzerine DMEM ilave edilerek 9000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti 3 defa PBS ile yıkandı ve üzerine 350 µl RLT Plus tamponu ilave edilerek 30 sn vortekslendi.
2. Homojonize lizat gDNA eliminasyon kolonuna aktarıldı ve kolonun altına 2 ml’lik toplama tüpü yerleştirilerek 8000 g’de 30 sn santrifüj edildi.
3. Kolon atıldı ve çalışmaya süzüntü ile devam edildi. Süzüntüye 350 µl %70’lik etanol ilave edilerek pipetaj yapılarak karıştırıldı.
4. Karışım altında 2 ml’lik toplama tüpü takılı olan RNeasy spin kolonuna aktarıldı ve 8000 g’de 15 sn santrifüj edildi. Süzüntü atıldı.
5. Kolona 700 µl RW1 tamponu ilave edilerek 8000 g’de 15 sn santrifüj edildi. Süzüntü atıldı.
6. Yıkama işlemi için kolona 500 µl RPE tamponu ilave edilerek 8000 g’de 15 sn santrifüj edildi. Süzüntü atıldı.
7. Yıkama işlemi için kolona 500 µl RPE tamponu ilave edilerek 8000 g’de 2 dk santrifüj edildi
8. Kolona 1,5 ml’lik yeni bir toplama tüpü takıldı ve 30 µl RNAaz içermeyen su kolona ilave edilerek 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
9. Bu son işlem sonrası toplama tüpü saf RNA içermektedir. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonu ( $A_{260}$ ) ve saflığı ( $A_{260/280}$ ) spektrofotometrik yöntemle (nanodrop) belirlendi.

### 2.5.13. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Qiagen firmasına ait “RT<sup>2</sup> First Strand Kit” kullanılmış olup sırasıyla aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir:

1. İlk olarak kit içerisindeki kimyasallar çözüldü ve 10-15 s santrifüj edildi.

- Her bir örnek için genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandı. Karışım Çizelge 2.7 de belirtildiği şekilde hazırlandı ve hazırlandıktan sonra pipetaj yapılarak kısa bir süre santrifüj edildi.

**Çizelge 2.7.** Genomik DNA eliminasyon karışımı.

Bileşen	Miktar
RNA	500 ng
GE Tamponu	2 µl
Nükleaz İçermeyen Su	Değişken
Toplam Hacim	10 µl

- Karışım 42 °C’de 5 dk bekletildi ve süre sonunda hemen buz üzerine alındı.
- Buz üzerinde ayrı bir tüpte revers-transkripsiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 2.8).

**Çizelge 2.8.** Revers transkripsiyon karışımı.

Bileşen	1 Reaksiyonluk Hacim
5x BC3 Tamponu	4 µl
Kontrol P2	1 µl
RE3 Revers Transkriptaz Karışımı	2 µl
Nükleaz İçermeyen Su	3 µl
Toplam Hacim	10 µl

- Hazırlanan revers-transkripsiyon karışımından 10 µl hacimde alınarak birinci aşamada hazırlanan 10 µl’lik genomik DNA eliminasyon karışımı üzerine ilave edildi ve pipetaj ile karıştırıldı.
- Son karışım 42 °C’de 15 dk, ardından 95 °C’de 5 dk bekletilerek reaksiyon durduruldu.
- Her bir reaksiyon tüpü üzerine 91 µl RNAaz içermeyen su ilave edilerek karıştırıldı. Böylece cDNA sentezi tamamlanmış oldu. Uzun süre saklanacak cDNA’lar -80 °C’ ye kaldırıldı.

#### 2.5.14. PCR Array Deneyleri

PES'in MCF-7 hücre hattında kanser yolaklarındaki ve Hspler ile ilgili gen ekspresyon profilini ne şekilde değiştirdiğini araştırmak amacıyla PCR array deneyleri yapıldı. PCR array deneyleri Qiagen marka "Heath Shock Proteins PCR Array" ve "Human Cancer Drug Targets" kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. PES, MCF-7 hücrelerine daha önce belirlenen optimum konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde uygulandı ve hücrelerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilerek PCR array deneylerine geçildi. PCR array kitleri kanser yolaklarındaki ve Hsp70 ile ilişkili önemli genlerin primerlerini içeren 96 kuyucuklu pleytten oluşmaktadır ve her bir kuyucukta ilgili genin primeri liyofilize halde mevcuttur. Steril bir tüpte Çizelge 2.9 da miktarları belirtilmiş olan sybergreen master mix, cDNA ve RNAaz içermeyen su karıştırıldı bu karışım her bir kuyucuğa 25 µl olacak şekilde pipetlendi. Daha sonra liyofilize haldeki primerlerin karışım içerisinde homojen dağılmasını sağlamak amacıyla bütün kuyucuklar pipetaj yapmak suretiyle karıştırıldı ve en son aşamada kuyucuklarda oluşan baloncukları gidermek amacıyla pleytler 2500 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Üzeri film ile kapatılan pleytlerdeki gen ekspresyon seviyeleri Çizelge 2.9 da belirtilen şartlarda PCR array kitlere uyumlu "Roche 480 lightcycler" cihazı ile belirlendi. Deney sonuçları kontrol gurubuna göre ekspresyon düzeyi artan ve azalan genler şeklinde analiz edilerek gen ekspresyon düzeyi 2 kattan fazla değişim gösteren genler önemli kabul edildi.

**Çizelge 2.9.** PCR array için gerekli bileşenler ve şartlar.

PCR Array İçin Gerekli Bileşenler	PCR Array Protokolü
102 µl cDNA	90 °C 10 dk
1350 µl SYBR Green Master Mix	90 °C 15 sn
1248 µl H <sub>2</sub> O	60 °C 1 dk
Bu karışımdan her bir kuyucuğa 25 µl	} 45 Döngü



### 2.5.15. İstatiksel Analiz

Deneysel verilerin istatiksel değerlendirilmesi ‘‘IBM SPSS statistics 24’’ programı ile yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler yapılırken birbirinden bağımsız en az üç denemeden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farkların karşılaştırılmasında Oneway ANOVA (posthoc Tukey) testi, iki grup arasındaki farkın karşılaştırılmasında ise student t testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hsp70 ve Mutant Hsp70 Proteinlerinin İnhibitörler ile Moleküler Doking Çalışmaları

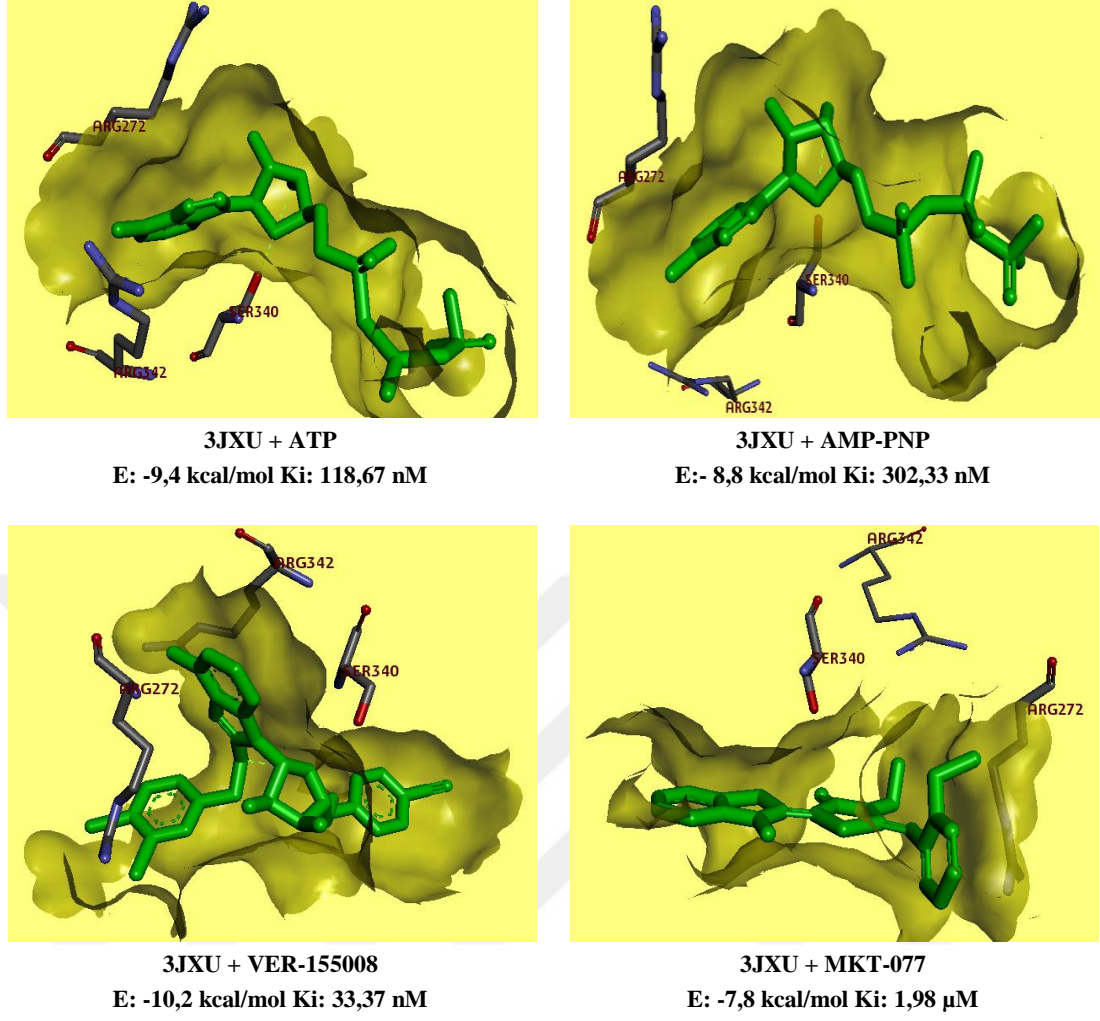
Hsp70 NBD ile ATP, AMP-PNP ve NBD' ye bağlanan VER-155008 ve MKT-077 ayrı ayrı etkileştirildi ve protein/inhibitör etkileşimine ait serbest bağlanma enerjileri ( $\Delta G$ ) ve minimum inhibitör konsantrasyonları ( $K_i$ ) doking programı yardımıyla hesaplandı.

Doking sonuçlarına göre, ATP+3JXU etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -9,4 kcal/mol, AMP-PNP+3JXU etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -8,8 kcal/mol, VER-155008+3JXU etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -10,2 kcal/mol ve MKT-077+3JXU etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -7,8 kcal/mol olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Hsp70 NBD ile ligandların etkileşimine bağlı serbest bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ) değerleri.

Ligand	Serbest Bağlanma Enerjisi ( $\Delta G$ ) (kcal/mol)
ATP	-9,4
AMP-PNP	-8,8
VER-155008	-10,2
MKT-077	-7,8

Hsp70 NBD ile ATP, AMP-PNP, MKT-077 ve VER-155008'in etkileşimlerinin doking sonucu görsel olarak Şekil 3.1 de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Hsp70 NBD ile AMP-PNP, ATP, MKT-077 ve VER-155008 etkileşimleri ve etkileşimlere ait serbest bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ) ve minimum inhibitör konsantrasyon (Ki) değerleri. Şekilde ARG272, SER340 ve ARG342 aminoasitlerinin dört ligandla da etkileştiği görülmektedir. Diğer aminoasit/ligand etkileşimleri şekilde gösterilmemiştir.

Normal Hsp70' e benzer şekilde mutant Hsp70 proteinlerinin de NBD'leri ATP, AMP-PNP ve NBD ile etkileşen VER-155008 ve MKT-077 ile de ayrı ayrı etkileştirilerek serbest bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ) değerleri ve minimum inhibitör konsantrasyonu (Ki) değerleri doking programı yardımıyla hesaplanmıştır.

Doking sonuçlarına göre, MKT-077 + R272K etkileşimine ait bağlanma enerjisi E:-8,0 kcal/mol, S340E + MKT-077 etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: - 7,7 kcal/mol, R342H + MKT-077 etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -6,9 kcal/mol, R272K + VER-155008 etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -8,7 kcal/mol, S340E + VER-155008 etkileşimine ait bağlanma enerjisi E: -9,5 kcal/mol, R342H + VER-

155008 etkileşimine ait bağlanma enerjisi ise E: -9,7 kcal/mol olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Mutant Hsp70 proteinleri ile inhibitörlerin etkileşimine bağlı serbest bağlanma enerjisi ( $\Delta G$ ) değerleri.

Serbest Bağlanma Enerjisi ( $\Delta G$ ) (kcal/mol)			
	<b>R272K Mutant</b>	<b>R342H Mutant</b>	<b>S340E Mutant</b>
<b>ATP</b>	-10,6	-10,3	-10,3
<b>AMP-PNP</b>	-8,8	-9,1	-9,4
<b>VER-155008</b>	-8,7	-9,7	-9,5
<b>MKT-077</b>	-8,0	-6,9	-7,7

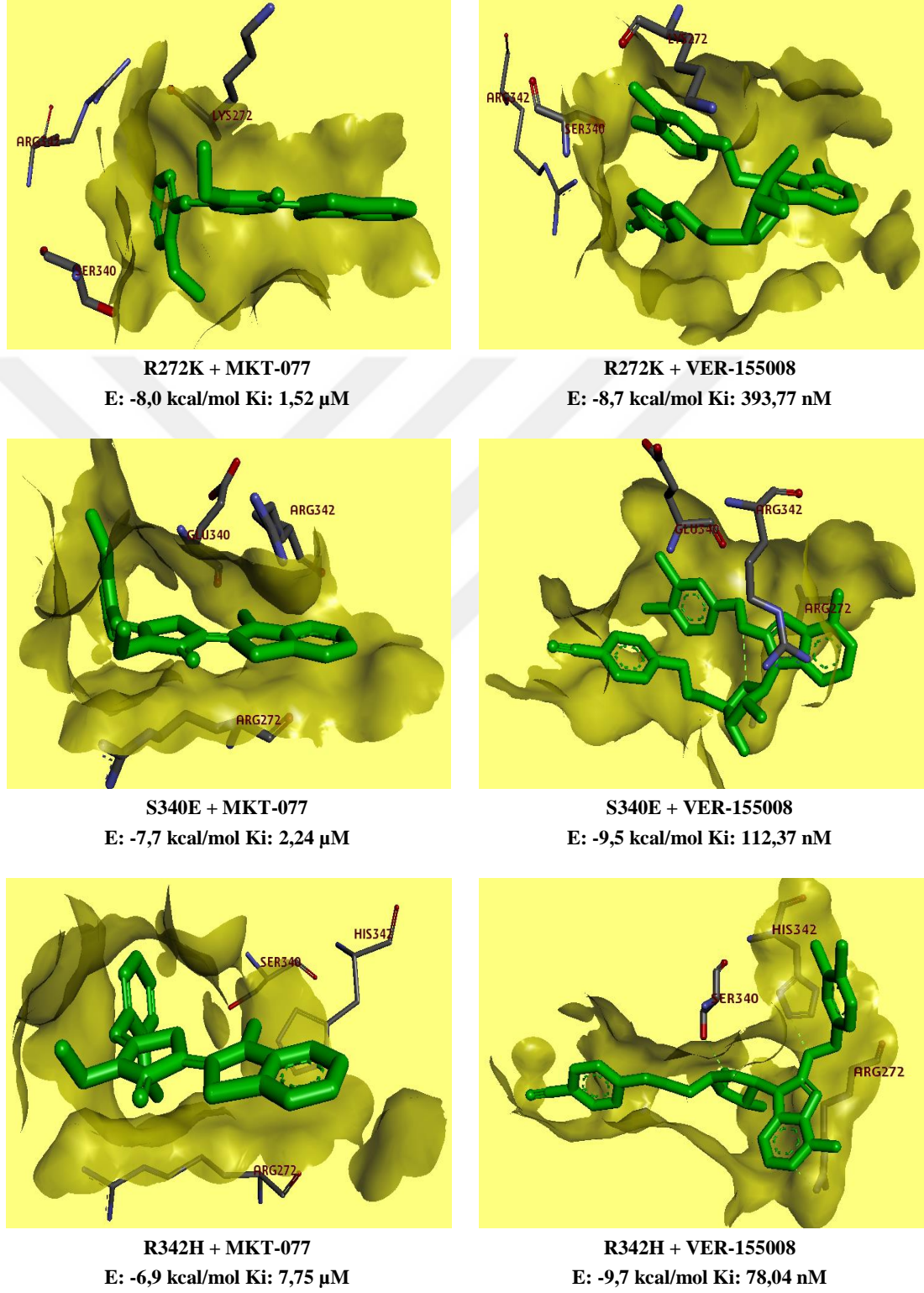
Doking sonuçlarından elde edilen minimum inhibitör konsantrasyonları; ATP+ 3JXU etkileşimi için Ki: 118,67 nM, AMP-PNP+ 3JXU etkileşimi için Ki: 302,33 nM, VER-155008+ 3JXU etkileşimi için Ki: 33,37 nM ve MKT-077+ 3JXU etkileşimi için Ki: 1,98  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3).

Mutant proteinlerdeki minimum inhibitör konsantrasyonları ise; MKT-077 + R272K etkileşimi için Ki:1,52  $\mu$ M, MKT-077 + S340E etkileşimi için Ki: 2,24  $\mu$ M, MKT-077 + R342H etkileşimi için Ki: 7,75  $\mu$ M, VER-155008 + R272K etkileşimi için Ki: 393,77 nM, VER-155008 + S340E etkileşimi için Ki: 112,37 nM ve VER-155008 + R342H etkileşimi için Ki:78,04 nM olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinleri ile ligandların etkileşimine bağlı minimum inhibitor konsantrasyonu(Ki) değerleri.

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (Ki)				
	<b>Hsp70</b>	<b>R272K Mutant</b>	<b>R342H Mutant</b>	<b>S340E Mutant</b>
<b>ATP</b>	118,67 nM	15,27 nM	26,73 nM	26,71 nM
<b>AMP-PNP</b>	302,33 nM	302,31 nM	222,1 nM	118,61 nM
<b>VER-155008</b>	33,37 nM	393,77 nM	78,04 nM	112,37 nM
<b>MKT-077</b>	1,98 $\mu$ M	1,52 $\mu$ M	7,75 $\mu$ M	2,24 $\mu$ M

Mutant proteinlerin inhibitörlerle etkileşimine ait doking sonuçlarının görselleştirilmiş hali ise Şekil 3.2 de gösterilmiştir.

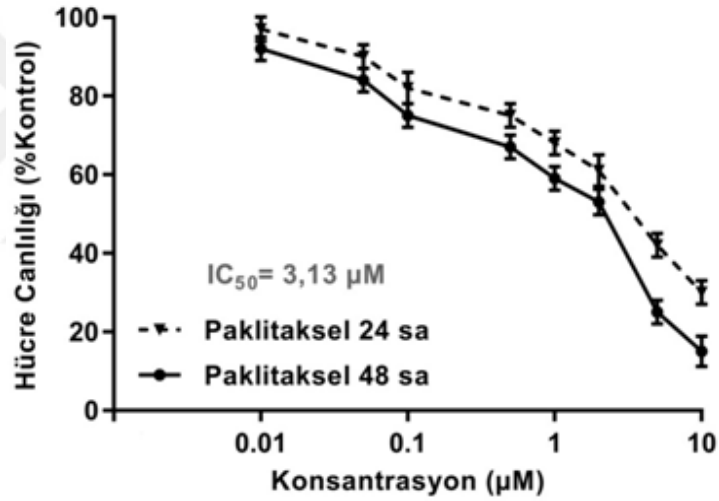


Şekil 3.2. Mutant Hsp70 ve inhibitörlerin doking sonuçlarının görselleştirilmiş hali. E: Serbest bağlanma enerjisi. Ki: minimum inhibitör konsantrasyonu.

### 3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

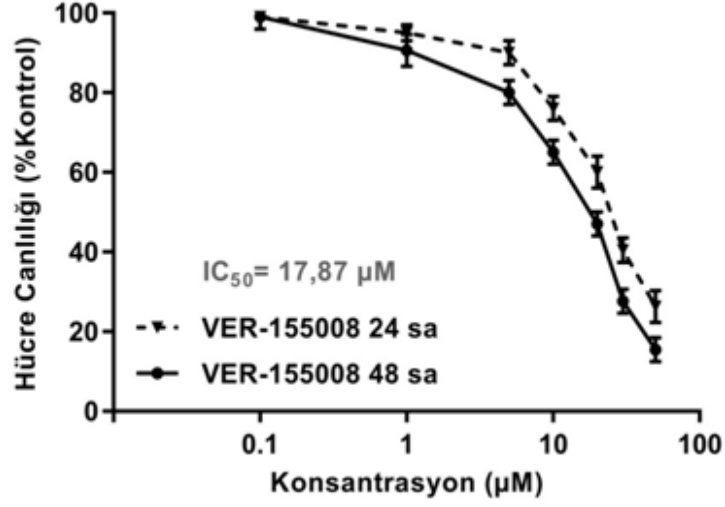
İnhibitörlerin ve paklitakselin farklı dozları MCF-7 hücrelerine uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edildi; inkübasyon süreleri sonunda inhibitörler ve paklitaksele ait  $IC_{50}$  değerleri ve ELISA ve RNA izolasyon çalışmaları için hücrelere uygulanacak uygun doz belirlendi.

Paklitaksel, MCF-7 hücreleri üzerine 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M ve 0,01  $\mu$ M olmak üzere artan konsantrasyonlarda uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon süreleri sonunda paklitaksel'e ait  $IC_{50}$  değeri 3,13  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.3).



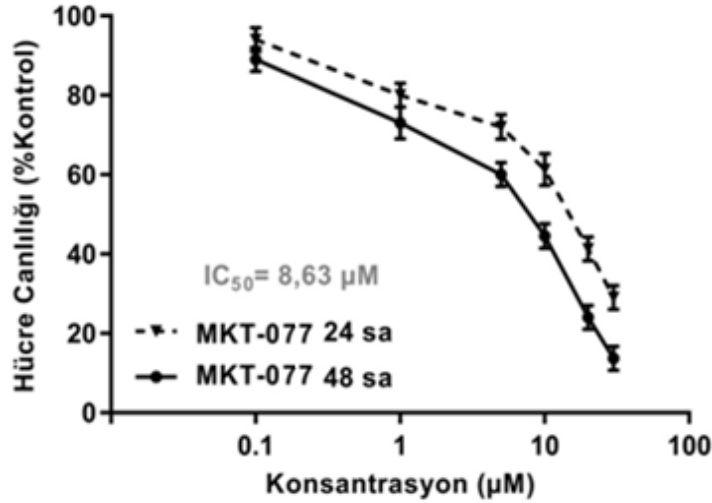
Şekil 3.3. Paklitakselin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.

VER-155008, MCF-7 hücreleri üzerine 50  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 0,1  $\mu$ M konsantrasyonlarda uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon süresi sonunda VER-155008'e ait  $IC_{50}$  değeri 17,87  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. VER-155008'in MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.

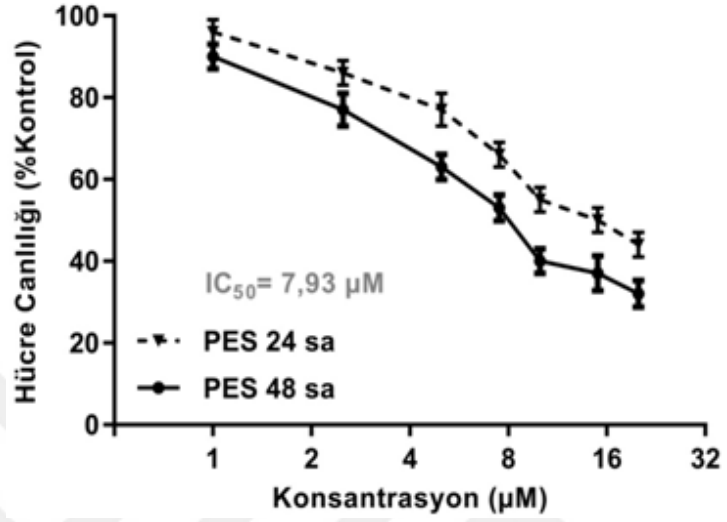
MKT-077, MCF-7 hücreleri üzerine 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM ve 0,1 µM konsantrasyonlarda uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon süresi sonunda MKT-077'ye ait IC<sub>50</sub> değeri 8,63 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. MKT-077'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.

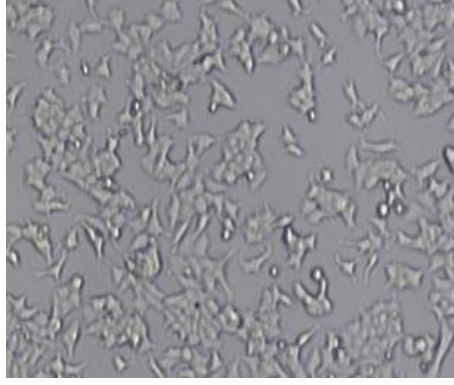


PES, MCF-7 hücreleri üzerine 20  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon süresi sonunda PES'e ait  $\text{IC}_{50}$  değeri 7,93  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6).

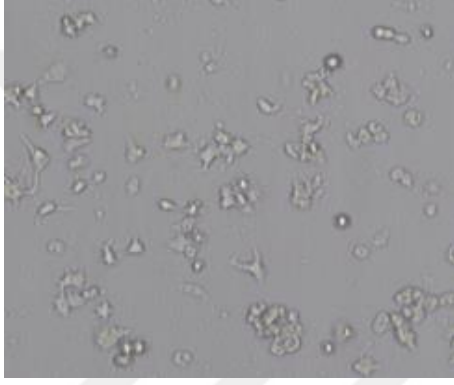


Şekil 3.6. PES'in MCF-7 hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.

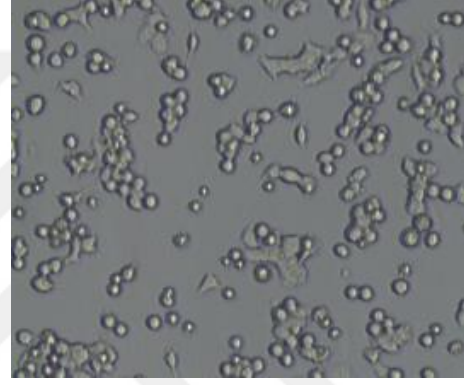




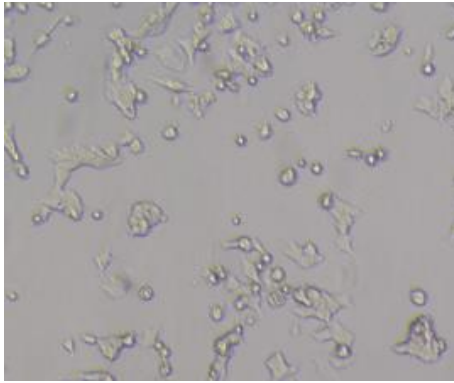
**Kontrol**



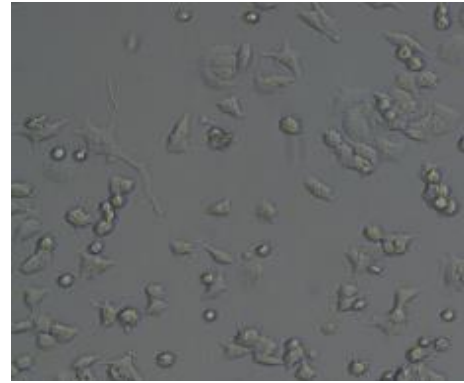
**VER-155008**



**Paklitaksel**



**MKT-077**



**PES**

**Şekil 3.7.** Kontrol grubu, paklitaksel ve inhibitör gruplarına ait hücre görüntüleri. Görüntülerde MCF-7 hücrelerine 5  $\mu$ M paklitaksel, 5  $\mu$ M PES, 5  $\mu$ M MKT-077 ve 15  $\mu$ M VER-155008 uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir.

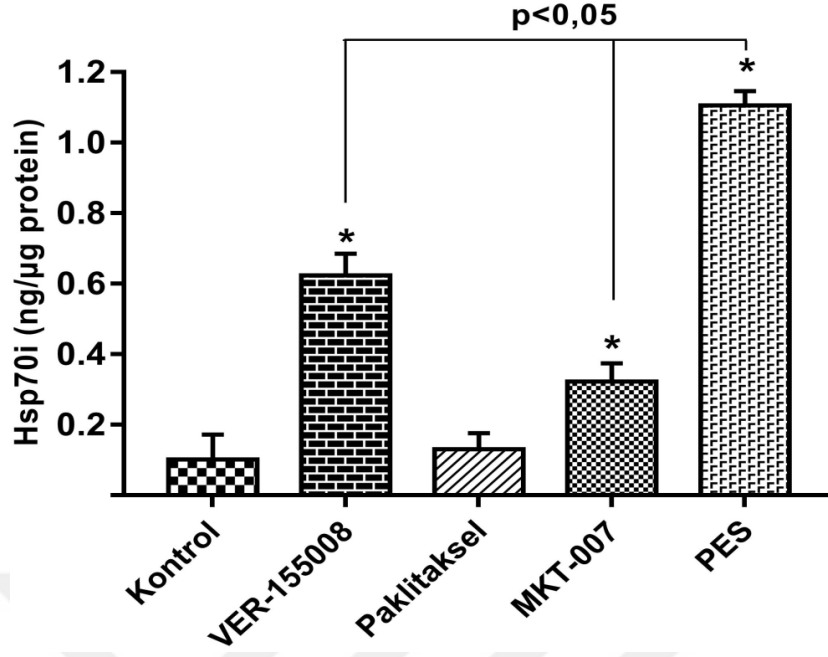
İnkübasyon süreleri sonunda MCF-7 hücreleri için IC<sub>50</sub> değerleri toplu halde Çizelge 3.4 de gösterilmiştir. Bulunan IC<sub>50</sub>değerleri ELISA ve RNA izolasyon çalışmaları içinde uygun doz olarak kullanılmıştır.

**Çizelge 3.4.** İlaç ve inhibitörlere ait IC<sub>50</sub> değerleri.

İlaç ve İnhibitörler	IC <sub>50</sub> Değerleri
Paklitaksel	3,13 µM
VER-155008	17,87 µM
MKT-077	8,63 µM
PES	7,93 µM

### **3.3. VER-155008, MKT-077, PES ve Paklitaksel'in MCF-7 Hücrelerinde Hsp70i Protein Düzeylerine Etkisi**

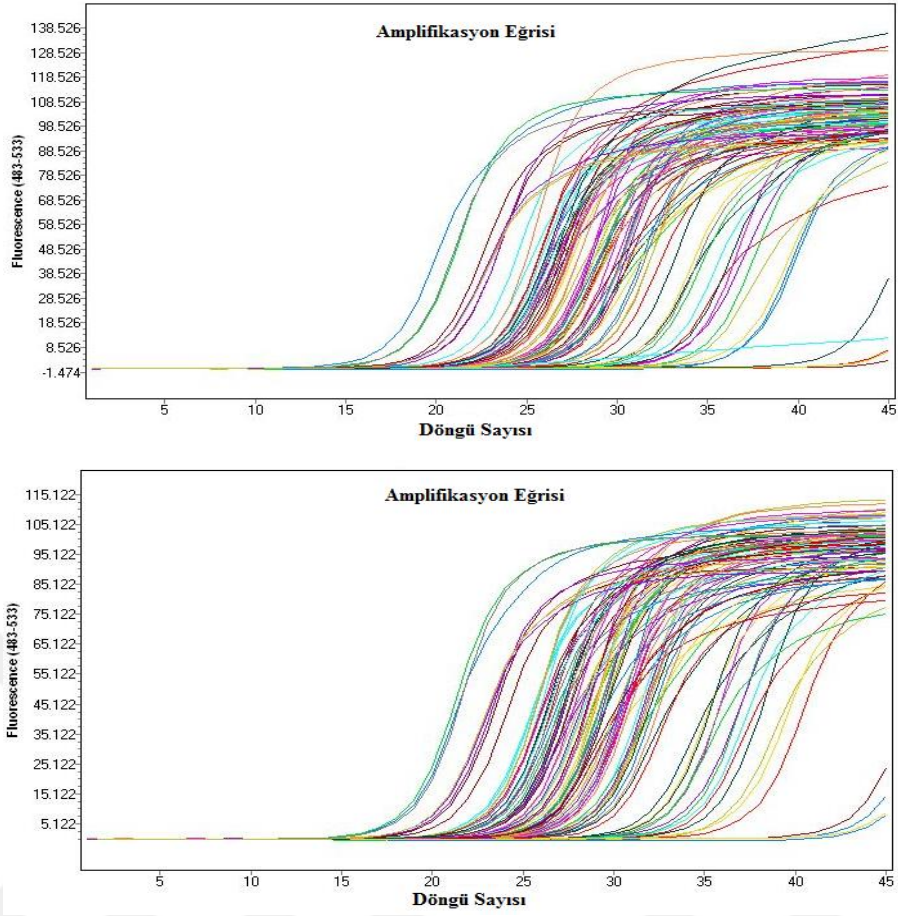
ELISA deneyleri sonucunda özellikle de PES olmak üzere her üç inhibitörün ve paklitaksel'in MCF-7 hücrelerinde Hsp70i miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.8). Kontrol grubundaki Hsp70i miktarı 0,101 ng/µg protein, VER-155008, MKT-077 ve PES gruplarındaki Hsp70i miktarları ise sırasıyla 0,623ng/µg protein, 0,322 ng/µg protein ve 1,105 ng/µg protein olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında VER-155008, MKT-077 ve PES gruplarındaki Hsp70i artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p<0,05), paklitaksel grubundaki artışın ise anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0,05).



**Şekil 3.8.** MCF-7 hücrelerinde VER-155008, Paklitaksel, MKT-077 ve PES'in Hsp70i protein düzeylerine etkisi.  
(\* )  $p < 0,05$  (Kontrol grubuna göre anlamlı,  $n=3$ ).

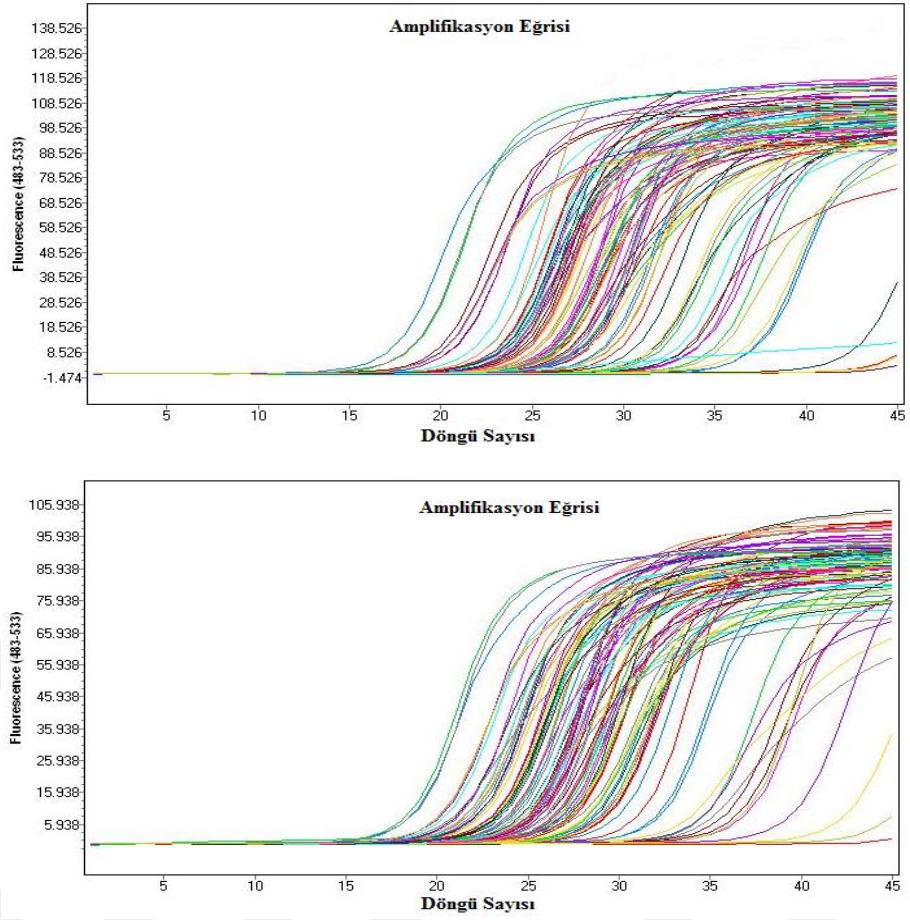
### 3.4. PCR Array Deneş Sonuçları

Kontrol ve PES uygulanmış MCF-7 hücrelerine ait Human Cancer Drug Targets PCR array deneyleri sonucunda genlere ait amplifikasyon eğrisi grafikleri Şekil 3.9 da gösterilmiştir.



**Şekil 3.9.** Human Cancer Drug Targets PCR array için sırası ile kontrol ve PES grubuna ait amplifikasyon eğrisi grafikleri.

Kontrol ve PES uygulanmış MCF-7 hücrelerine ait Human Heat Shock Proteins & Chaperones PCR Array deneyleri sonucunda genlere ait amplifikasyon eğrisi grafikleri ise Şekil 3.10 da gösterilmiştir.



**Şekil 3.10.** Human Heat Shock Proteins & Chaperones PCR Array için Sırası ile Kontrol ve PES grubuna ait amplifikasyon eğrisi grafikleri.

Human Cancer Drug Targets PCR array analizi sonucunda PES grubunda kanser yolları ile ilgili genlerin kontrol grubuna göre ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri ve p-değerleri Çizelge 3.5 de gösterilmiştir. Ekspresyon seviyeleri 2 kattan daha fazla değişim gösteren genler koyu renk ile gösterilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Human Cancer Drug Targets PCR array deneyleri sonucunda analizleri yapılan genler ve bu genlerin PES grubunda kontrol grubuna göre kat değişimleri. Kat değişimleri 2 kat ve üzeri olan genler koyu renk ile belirtilmiştir.

Gen Adı	p-değeri	Kat değişimindeki artış/azalış	Gen Adı	p-değeri	Kat değişimindeki artış/azalış	Gen Adı	p-değeri	Kat değişimindeki artış/azalış
PES/Kontrol			PES/Kontrol			PES/Kontrol		
ABCC1	0.000511	1.12	GRB2	0.000332	-1.21	PDGFRA	0.841986	-1.00
AKT1	0.000003	-1.83	<b>GSTP1</b>	<b>0.000000</b>	<b>-3.68</b>	PDGFRB	0.841986	-1.00
AKT2	0.000027	-1.23	HDAC1	0.000001	-1.42	<b>PGR</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.34</b>
ATF2	0.000003	-1.35	HDAC11	0.098580	-1.03	PIK3C2A	0.452347	1.01
<b>AURKA</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.46</b>	HDAC2	0.000001	-1.59	PIK3C3	0.583555	-1.01
<b>AURKB</b>	<b>0.000000</b>	<b>-3.65</b>	HDAC3	0.000085	-1.32	PIK3CA	0.000052	-1.26
AURKC	0.841986	-1.00	HDAC4	0.000058	-1.18	<b>PLK1</b>	<b>0.000001</b>	<b>-3.05</b>
BCL2	0.000000	-1.95	HDAC6	0.041615	-1.07	<b>PLK2</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.51</b>
<b>BIRC5</b>	<b>0.000000</b>	<b>-4.60</b>	HDAC7	0.000060	-1.21	<b>PLK3</b>	<b>0.000000</b>	<b>2.56</b>
<b>CDC25A</b>	<b>0.000001</b>	<b>-2.61</b>	HDAC8	0.000001	-1.59	<b>PLK4</b>	<b>0.000000</b>	<b>-3.36</b>
<b>CDK1</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.51</b>	HIF1A	0.236287	1.02	PRKCA	0.000000	-1.92
<b>CDK2</b>	<b>0.000003</b>	<b>-2.42</b>	HRAS	0.000000	-1.75	PRKCB	0.000004	-1.35
CDK4	0.000043	-1.40	HSP90AA1	0.000000	-1.70	PRKCD	0.000003	-1.22
CDK5	0.000000	-1.34	HSP90B1	0.000007	-1.23	PRKCE	0.000002	-1.38
CDK7	0.000062	1.18	IGF1	0.841986	-1.00	PTGS2	0.000005	-1.63
CDK8	0.000001	-1.83	IGF1R	0.000148	-1.20	RHOA	0.000000	-1.96
CDK9	0.000400	-1.23	IGF2	0.416893	-1.01	RHOB	0.000002	-1.74
CTSB	0.000610	-1.18	IRF5	0.018951	-1.05	TERT	0.841986	-1.00
CTSD	0.000012	-1.42	KDR	0.841986	-1.00	TNKS	0.000050	1.11
CTSL	0.000002	1.56	<b>KIT</b>	<b>0.000000</b>	<b>-3.81</b>	<b>TOP2A</b>	<b>0.000000</b>	<b>-4.01</b>
CTSS	0.000023	-1.32	KRAS	0.000028	-1.26	TOP2B	0.000001	-1.39
EGFR	0.000078	-1.27	MDM2	0.000168	1.25	TP53	0.000164	-1.20
ERBB2	0.000007	1.32	MDM4	0.000026	-1.18	TXN	0.000009	1.31
ERBB3	0.025648	1.02	MTOR	0.000001	-1.96	TXNRD1	0.000002	1.56
ERBB4	0.000003	-1.52	NFKB1	0.000004	-1.47	ACTB	0.000001	-1.57
<b>ESR1</b>	<b>0.000001</b>	<b>-2.79</b>	NRAS	0.000002	-1.22	B2M	0.727466	1.00
ESR2	0.000014	1.54	NTN3	0.000002	1.77	GAPDH	0.399043	-1.01
FIGF	0.000006	1.86	<b>PARP1</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.38</b>	HPRT1	0.000000	-1.55
<b>FLT1</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.53</b>	PARP2	0.000012	-1.85	RPLP0	0.000000	-1.52
FLT4	0.000000	-1.94	<b>PARP4</b>	<b>0.000001</b>	<b>-2.03</b>			

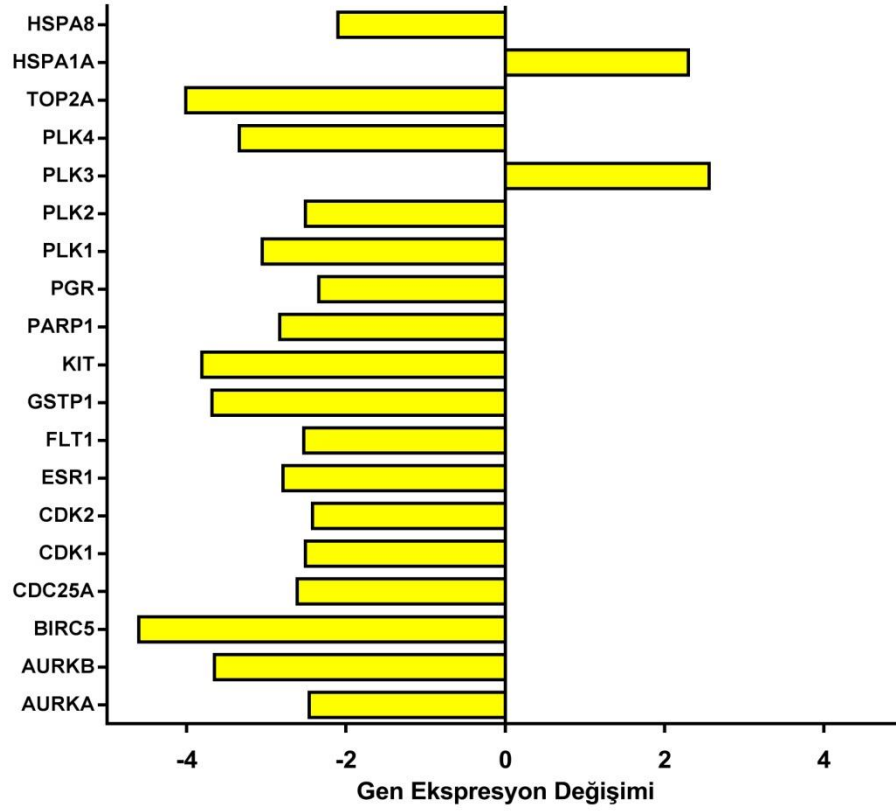
Human heat shock proteins & chaperones PCR array analizi sonucunda PES grubunda Hsp'ler ile ilgili genlerin kontrol grubuna göre ekspresyon seviyelerindeki kat değişimleri ve p-değerleri ise Çizelge 3.6 da gösterilmiştir. Ekspresyon seviyeleri 2 kattan daha fazla değişim gösteren genler koyu renk ile gösterilmiştir.



**Çizelge 3.6.** Human heat shock proteins & chaperones PCR array deneyleri sonucunda analizleri yapılan genler ve bu genlerin PES grubunda kontrol grubuna göre kat değişimleri. Kat değişimleri 2 kat ve üzeri olan genler koyu renk ile belirtilmiştir.

Gen Adı	p-değeri	Kat	Gen Adı	p-değeri	Kat	Gen Adı	p-değeri	Kat
		değişimindeki artış/azalış			değişimindeki artış/azalış			değişimindeki artış/azalış
PES/Kontrol			PES/Kontrol			PES/Kontrol		
ADCK3	0.000019	-1.20	DNAJB8	0.000047	-1.09	HSPA1B	0.000047	1.34
ATF6	0.002368	-1.07	DNAJB9	0.000001	1.99	HSPA1L	0.000069	1.16
BAG1	0.009503	-1.11	DNAJC1	0.000854	-1.16	HSPA2	0.000002	-1.60
BAG2	0.000011	-1.55	DNAJC10	0.000016	-1.47	HSPA4	0.001644	-1.09
BAG3	0.015752	-1.05	DNAJC11	0.000007	-1.41	HSPA4L	0.270693	-1.98
BAG4	0.000014	-1.45	DNAJC12	0.012979	1.09	HSPA5	0.000032	1.37
BAG5	0.000227	-1.16	DNAJC13	0.000082	-1.08	HSPA6	0.061940	-1.01
CCS	0.000007	-1.61	DNAJC14	0.000032	-1.29	<b>HSPA8</b>	<b>0.000000</b>	<b>-2.10</b>
CCT2	0.000000	-1.43	DNAJC15	0.000111	-1.29	HSPA9	0.001169	1.07
CCT3	0.000053	-1.24	DNAJC16	0.000048	1.26	HSPB1	0.000001	-1.92
CCT4	0.000084	-1.52	DNAJC17	0.000054	-1.20	HSPB2	0.061940	-1.01
CCT5	0.000030	-1.77	DNAJC18	0.000036	1.32	HSPB3	0.061940	-1.01
CCT6A	0.000000	-1.78	DNAJC21	0.000039	-1.23	HSPB6	0.000494	1.09
CCT6B	0.000021	-1.21	DNAJC3	0.000803	1.16	HSPB7	0.061940	-1.01
CCT7	0.000171	-1.26	DNAJC4	0.001584	-1.13	HSPB8	0.000001	1.99
CRYAA	0.061940	-1.01	DNAJC5	0.001620	1.08	HSPD1	0.001127	-1.15
CRYAB	0.000000	1.84	DNAJC5B	0.000000	1.99	HSPE1	0.000995	1.08
DNAJA1	0.000031	-1.25	DNAJC5G	0.061940	-1.01	HSPH1	0.000249	-1.06
DNAJA2	0.000036	-1.42	DNAJC6	0.000004	-1.42	PFDN1	0.447092	1.01
DNAJA3	0.030105	1.05	DNAJC7	0.000211	-1.16	PFDN2	0.000024	1.32
DNAJA4	0.000357	1.11	DNAJC8	0.003753	-1.09	SERPINH1	0.000003	-1.22
DNAJB1	0.052085	1.04	DNAJC9	0.000002	-1.99	SIL1	0.000953	-1.10
DNAJB11	0.000089	-1.20	HSF1	0.000001	1.92	TCP1	0.000461	-1.18
DNAJB12	0.001243	-1.06	HSF2	0.000005	-1.32	TOR1A	0.000265	-1.19
DNAJB13	0.199468	1.03	HSF4	0.008357	1.07	ACTB	0.000002	-1.21
DNAJB14	0.000283	-1.14	HSP90AA1	0.000010	-1.73	B2M	0.036383	1.03
DNAJB2	0.000003	1.60	HSP90AB1	0.000000	-1.47	GAPDH	0.000124	1.15
DNAJB5	0.000001	-1.63	HSP90B1	0.643451	1.01	HPRT1	0.000042	-1.42
DNAJB6	0.388748	-1.26	HSPA14	0.000001	-1.33	RPLP0	0.022256	-1.04
DNAJB7	0.000001	1.92	<b>HSPA1A</b>	<b>0.000006</b>	<b>2.3</b>			

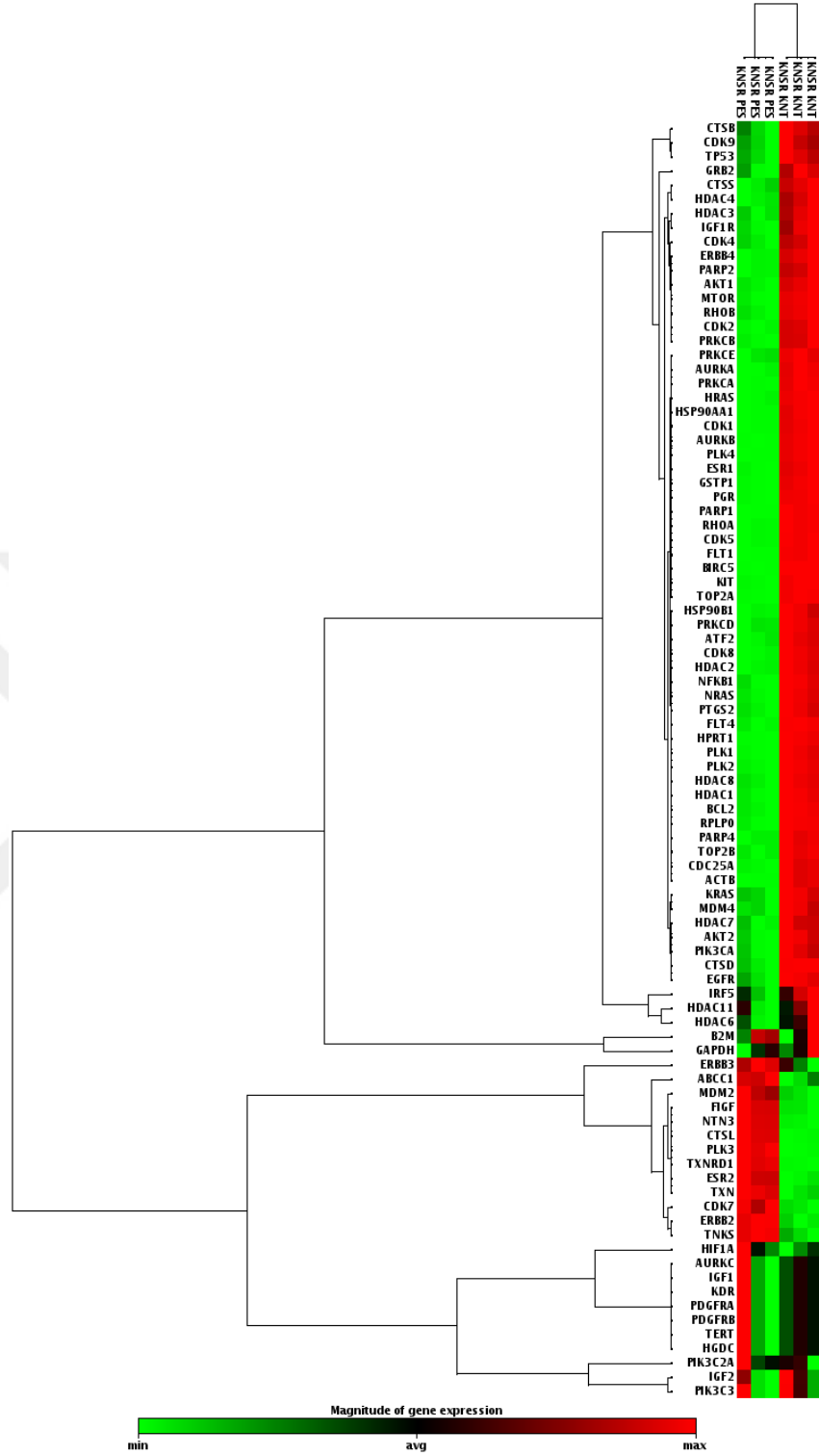
MCF-7 hücrelerine PES uygulaması sonucunda kanser yollarında etkili genlerin kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerindeki değişim ise Şekil 3.11 de gösterilmiştir. Grafikte PES grubunda kontrol grubuna göre ekspresyon seviyeleri azalan genler negatif, artan genler ise pozitif olarak gösterilmiştir. Grafikte sadece ekspresyon seviyelerini 2 kat ve üzeri değişim gösteren genler listelenmiştir.



**Şekil 3.11.** PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki kanser ile ilişkili gen ekspresyonu üzerindeki etkisi.

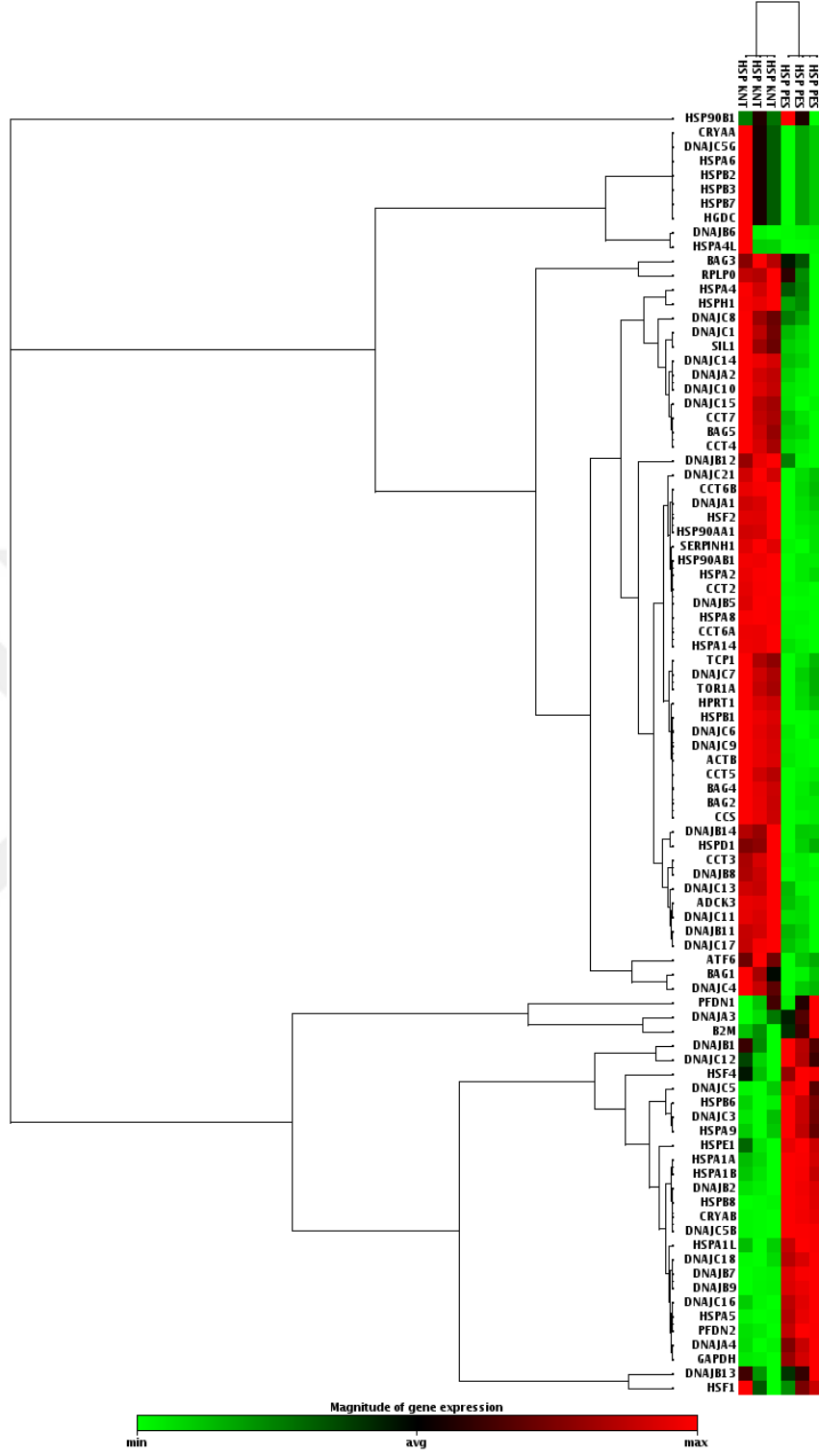
PES ve kontrol grubu arasında kümeleme analizi yapılmak suretiyle, farklı seviyelerde eksprese edilen gen paternleri karşılaştırılmıştır. Human cancer drug targets PCR Array sonuçlarına ait kümeleme analiz grafiği Şekil 3.12 de gösterilmiştir.





Şekil 3.12. PES ve kontrol grubu için “Human cancer drug targets PCR Array” de bulunan genlerin kümeleme analizi (Kırmızı: ekspresyonu yüksek olan genler, Yeşil: ekspresyonu düşük olan genler).

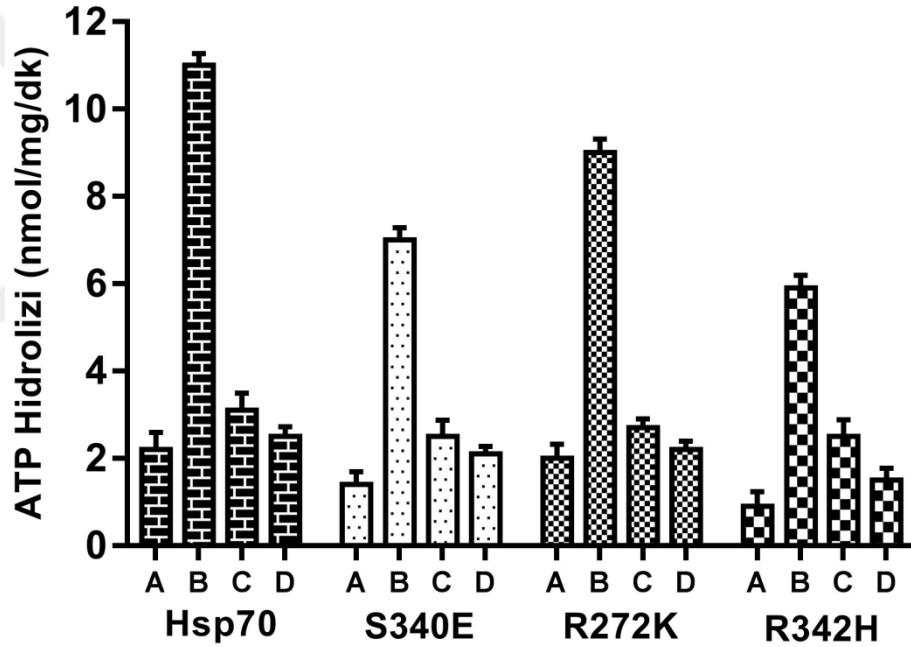
Human heat shock proteins & chaperones PCR array sonuçlarına ait kümeleme analiz grafiği ise Şekil 3.13 de gösterilmiştir.



**Şekil 3.13.** PES ve kontrol grubu için “Human heat shock proteins & chaperones PCR Array” de bulunan genlerin kümeleme analizi (Kırmızı: ekspresyonu yüksek olan genler, Yeşil: ekspresyonu düşük olan genler).

### 3.5. ATP Hidroliz Deneyleri

Hsp70 proteini fonksiyon gösterirken NBD'de ATP hidrolizi gerçekleşir ve açığa çıkan enerjiyle SBD'de hedef peptit ve proteinlerin katlanması gerçekleşir. Hsp70'in fonksiyon gösterebilmek için ATP hidrolizini gerçekleştirmesi gerekli olduğundan NBD'e bağlanmak için ATP ile yarışan ve proteinin ATP hidrolizini engelleyerek proteinin fonksiyonunu engelleyen inhibitörler kullanılmaktadır. Çalışmamızda inhibitörlere ilave olarak NBD'de nokta mutasyonları yapılmış ve gerek inhibitörlü gerekse inhibitörsüz ortamlarda proteinin ATP hidroliz değerlerinde azalma gözlenmiştir.



**Şekil 3.14.** Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda ATP hidroliz grafiği. Grafikte **A:** 100  $\mu$ M AMP-PNP, **B:** 100  $\mu$ M ATP, **C:** 100  $\mu$ M MKT-077, **D:** 100  $\mu$ M VER-155008'i temsil etmektedir.

ATP hidroliz deneylerinin sonucu toplu halde Şekil 3.14 de gösterilmiştir. Grafiğe göre Hsp70'e ait ATP hidroliz değeri 11 nmol/mg/dk, S340F mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 7,1 nmol/mg/dk, R272K mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 9 nmol/mg/dk ve R342H mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 5,9 nmol/mg/dk olarak hesaplanmıştır. Mutant proteinlere ait ATP hidroliz değerleri kontrol ile (normal Hsp70) ve birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç

mutant proteine ait ATP hidroliz değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

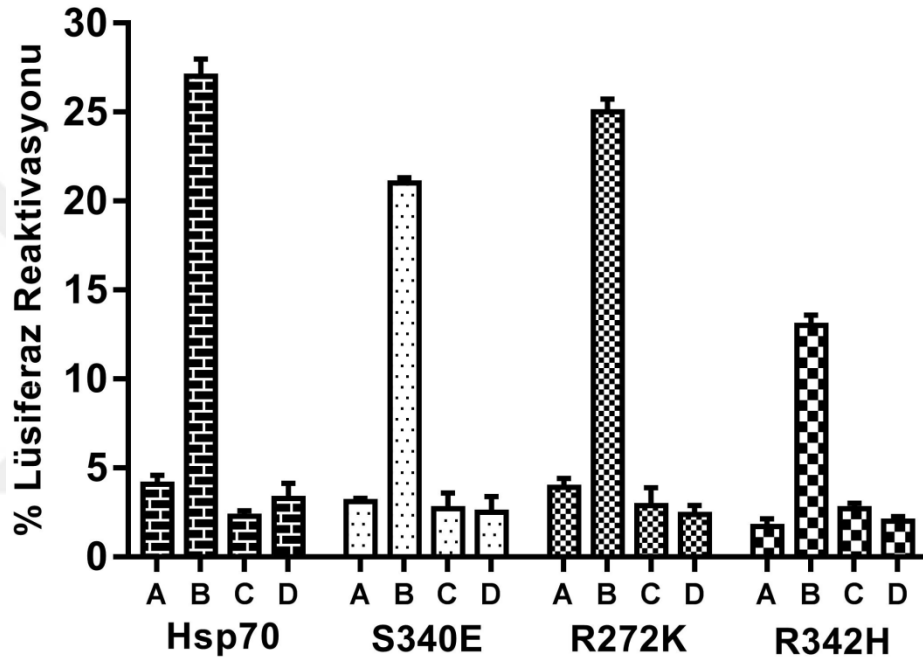
Ortama AMP-PNP (hidroliz olmayan ATP) ilave edildiğinde Hsp70'e ait ATP hidroliz değeri 2,2 nmol/mg/dk, S340F mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 1,4 nmol/mg/dk, R272K mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 2 nmol/mg/dk ve R342H mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 0,9 nmol/mg/dk olarak hesaplanmıştır. AMP-PNP'li ortamda mutant proteinlere ait ATP hidroliz değerleri kontrol ile (normal Hsp70) ve birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç mutant proteine ait ATP hidroliz değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Ortama MKT-077 ilave edildiğinde Hsp70'e ait ATP hidroliz değeri 3,1 nmol/mg/dk, S340F mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 2,5 nmol/mg/dk, R272K mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 2,7 nmol/mg/dk ve R342H mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 2,5 nmol/mg/dk olarak hesaplanmıştır. MKT-077'li ortamda mutant proteinlere ait ATP hidroliz değerleri kontrol ile (normal Hsp70) ve birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç mutant proteine ait ATP hidroliz değerleri arasındaki farkın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ), S340F ve R342H mutant proteinlerinin ATP hidroliz değerleri arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p > 0,05$ ).

Ortama VER-155008 ilave edildiğinde ise Hsp70'e ait ATP hidroliz değeri 2,5 nmol/mg/dk, S340F mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 2,1 nmol/mg/dk, R272K mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 2,2 nmol/mg/dk ve R342H mutant proteinine ait ATP hidroliz değeri 1,5 nmol/mg/dk olarak hesaplanmıştır. VER-155008'li ortamda mutant proteinlere ait ATP hidroliz değerleri kontrol ile (normal Hsp70) ve birbirleriyle karşılaştırıldığında her üç mutant proteine ait ATP hidroliz değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ), S340F ve R272K mutant proteinlerindeki arasındaki ATP hidroliz değerleri arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p > 0,05$ ).

### 3.6. Lüsiferaz Katlama Deneyleri

Hsp70'in protein katlama aktivitesinin ölçülmesinde lüsiferaz katlama deneyleri sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmada ateş böceği proteini olan lüsiferaz üre ile denatüre edilerek tekrar katlanmasındaki Hsp70 aktivitesi araştırıldı. Lüsiferaz ATP hidrolizi ile ışımaya verir ve bu özellik sayesinde Hsp70'in protein katlama aktivitesi dolaylı yoldan ölçülebilmektedir.



**Şekil 3.15.** Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda denatüre olmuş lüsiferazı katlama grafiği. Grafikte **A:** 100  $\mu$ M AMP-PNP, **B:** 100  $\mu$ M ATP, **C:** 100  $\mu$ M MKT-077, **D:** 100  $\mu$ M VER-155008'i temsil etmektedir.

Lüsiferaz reaktivasyonu deneylerinin sonucu toplu halde Şekil 3.15 de gösterilmiştir. Deneysel verilere göre Hsp70 proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %27, S340F mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %21, R272K mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %25 ve R342H mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %13 olarak ölçülmüştür. Gruplar arasındaki fark hem kendi aralarında hem de kontrol (normal Hsp70) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Ortama AMP-PNP ilave edildiğinde Hsp70 proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %4,1, S340F mutant proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %3,1, R272K mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %3,9 ve R342H mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %1,7 olarak ölçülmüştür. Gruplar arasındaki farkın hem kendi aralarında hem de kontrol (normal Hsp70) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

Ortama MKT-077 ilave edildiğinde Hsp70 proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %2,3, S340F mutant proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %2,7, R272K mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %2,9 ve R342H mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %2,7 olarak ölçülmüştür. Gruplar arasındaki fark kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ), S340F mutant proteini ve R342H mutant proteini lüsiferaz reaktivasyonu arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p>0,05$ ).

Ortama VER-155008 ilave edildiğinde ise Hsp70 proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %3,3, S340F mutant proteininin lüsiferaz reaktivasyonu %2,5, R272K mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %2,4 ve R342H mutant proteininde lüsiferaz reaktivasyonu %2 olarak ölçülmüştür. Gruplar arasındaki fark hem kendi aralarında hem de kontrol (normal Hsp70) grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

## 4. TARTIŞMA

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda görülen en sık kanser türlerinden bir tanesidir ve kansere bağlı ölüm nedenlerinde ilk sıralarda yer almaktadır. Son yıllarda meme kanserinin tarama, teşhis ve tedavisinde büyük gelişmeler yaşanmış olmasına rağmen, kanser hücrelerinin çeşitli direnç mekanizmalarına sahip olmaları, kemoterapi ilaçlarının etkinliğini azaltmakta, bu nedenle tedavide yeni ve daha etkili stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Horibe ve ark., 2014; Mawatari ve ark., 2015).

Kanser hücreleri normal hücrelere göre çok daha hızlı çoğalırlar; bunun sonucu olarak da metabolik gereksinimleri normal hücrelere göre oldukça fazladır. Hızlı çoğalmaları fonksiyonel proteinlerinin hızlı bir şekilde katlanmasını gerektirmektedir. Ancak kanser hücrelerindeki mutant ve yanlış katlanmış proteinlerin hücre içerisindeki aşırı birikimi içsel bir stres ve sinyal yollarının uygunsuz işlenmesine neden olmakta bu da kanser hücrelerinin hayatta kalmasını tehdit etmektedir (Goloudina ve ark., 2012). Ayrıca tümör hücreleri hipoksi, kemoterapi ajanlarına maruziyet, besin yokluğu ve düşük pH gibi çeşitli stres koşulları altında yaşamak zorunda oldukları için, Hspler kanser hücrelerinin bu zorlu şartlar altında hayatta kalması için büyük öneme sahiptirler (Sherman ve Gabai, 2015).

Hspler, literatürde geniş kapsamlı araştırılmış, evrimsel olarak oldukça korunmuş ve ekspresyon seviyeleri sıcaklık artışı, hipoksi, kanser ve kemoterapi gibi sebeplere bağlı olarak artış gösteren şaperonlardır (Mckeon ve ark., 2016). Hsplerin, özellikle de Hsp70'in yüksek seviyedeki ekspresyonu, meme kanserinin de dahil olduğu kolon, karaciğer, prostat, özefagus, serviks ve gastrik kanser gibi birçok kanser türünde kanser gelişimi, metastaz, invazyon ve kemoterapi/radyoterapiye karşı direnç geliştirme gibi süreçlere katılarak kanser tedavisinde kötü prognoza neden olmaktadır (Garrido ve ark., 2003; Sherman ve Gabai, 2015).

Yüksek Hsp70 seviyeleri, kanser hücrelerinde apoptozu baskılayarak ve kanser ile ilişkili çeşitli sinyal yollarının inhibisyonunu/aktivasyonunu sağlayarak antikanser etki göstermekte ve tümör hücrelerinin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır. Stres ile indüklenen Hsp70 (Hsp70i); sinyal iletimi, transkripsiyon, hücre döngüsünün kontrolü gibi birçok hücreyel yolda kilit rol üstlenmektedir (Leu ve ark., 2009). Hsp70; JNK, p38 ve ERK gibi birçok kinaz kaskadını baskılayıcı etki göstermektedir (Gabai ve ark. 1997; Mosser ve ark., 1997; Yaglom ve ark., 2003). Kanser gelişimi ve metastazla ilgili olarak Hif1 $\alpha$  ve NF-kB transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunda da rol almaktadır (Colvin ve ark., 2014). FoxM1 üzerindeki etkisi de benzer şekilde kanser ve metastaz gelişimine katkıda bulunmaktadır (Colvin ve ark., 2014). Yapılan mikroarray çalışmaları da bu proteinin kanser yollarında çok önemli roller oynadığını göstermektedir. Hsp70'in HER2, Raf-1 ve Akt gibi onko proteinlerin katlanmalarında rol alması da kanserle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Rodina ve ark., 2013; Sherman ve Gabai, 2015).

Hsp70 üzerinde yapılan çalışmalar Hsp70'in kanser hücrelerinin hayatta kalmasına yardımcı olmasının yanı sıra kanser gelişiminde de önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Çalışmalar meme epitelyum hücrelerinde bir onkogen olan ve invaziv meme kanserini tetikleyen *Her2* geninin Hsp70 ekspresyon seviyesi normal farelerin %100 ünde meme kanseri gelişimine neden olduğunu, Hsp70 geni susturulmuş farelerde ise meme kanseri gelişiminin önemli derecede önlendiğini göstermiştir (Meng ve ark., 2011). Meme kanserinin yanı sıra yüksek Hsp70 seviyelerinin prostat kanseri gelişimine de katkı sağladığı bildirilmiştir (Sherman ve Gabai, 2015; Kumar ve ark., 2016). Hsp70 ekspresyon seviyesi kanser gelişiminde rol almakla birlikte meme kanseri hastalarında doğrudan sağ kalım ile de ilgilidir. Düşük seviyede Hsp70 ekspresyonu olan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı %70 iken, yüksek seviyede Hsp70 ekspresyonu olan hastalarda bu oranın %30 seviyelerinde olduğu gösterilmiştir (Ciocca ve ark., 1993).

Hsp70 inhibisyonu, tümör hücrelerinin ölümünü artırmakla kalmayıp seçici olarak kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlara karşı daha hassas hale getirmektedir. Yumurtalık kanserinde cisplatin direncinin yüksek Hsp70 seviyeleri



ile ilişkili olduğu, Hsp70'in özellikle mitokondrial apoptoz yollarını inhibe ederek antikanser etki gösterdiği bildirilmektedir (Goloudina ve ark., 2012).

Hsp70'in kanserdeki belirtilen rolleri göz önüne alındığında çeşitli inhibitörler kullanılarak Hsp70'in inhibisyonunun sağlanması ve Hsp70 NBD üzerinde nokta mutasyonları yapılarak protein fonksiyonlarının ne şekilde değiştiğinin araştırılması, antikanser etki açısından alternatif bir yol olarak düşünülmektedir. Literatürde mevcut ve yeni nesil Hsp70 inhibitörlerinin gerek kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkilerinin, gerekse saflaştırılmış Hsp70 proteinleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (Li ve ark., 2013; Kang ve ark., 2014). Nokta mutasyonunun proteinin fonksiyonunu ne şekilde etkilediği konusunda ise sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca Hsp70 proteininin amino asit uzunluğu düşünüldüğünde yapılabilecek çok fazla nokta mutasyonunun olması yapılacak çalışmaların özgün olmasını sağlamaktadır. Çalışmamızda insan Hsp70 NBD üzerinde literatürde daha önce yer almayan nokta mutasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca inhibitörlerin varlığında mutant proteinlerin fonksiyonlarının ne şekilde etkilendiği bu çalışma ile netlik kazanmıştır.

Mutasyon çalışmalarının yanı sıra Hsp70 inhibisyonunun meme kanseri hücrelerindeki gen ekspresyon profillerini ne şekilde değiştirdiğini belirlemekte kanser hücresiyle başa çıkmakta önemli bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kemoterapi ajanlarından farklı olarak Hsp70 inhibitörlerinin sadece kanser hücrelerine karşı toksik olup sağlıklı hücrelerde herhangi bir toksik etki göstermiyor olmaları Hsp70 inhibitörlerinin önemini daha da artırmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda Hsp70 inhibisyonunun antikanser etkileri ve bu inhibisyonun gen seviyesinde ne gibi değişikliklere neden olduğu araştırılmıştır. Hsp70 inhibisyonuna bağlı olarak özellikle de kanser oluşumu ve gelişimi ile ilgili onko ve proto-onkogenlerde meydana gelecek baskılanmaların, kanser tedavisinde başarı şansını artıracığı düşünülmektedir.

İlk olarak Hsp70 NBD üzerinde inhibitörlerle etkileşen kritik bazı amino asitlerde nokta mutasyonu yapılarak protein/inhibitör etkileşiminin ne şekilde

değiştirdiği araştırılmıştır. Hsp70 NBD ve inhibitörlere ait (inhibitörlerden farklı olarak ATP ve AMP-PNP) protein/ligand etkileşimlerine ait bağlanma enerjisi (E) ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (Ki) parametreleri ilaç yapı etki ilişkileri hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan doking programı ile belirlenmiştir. Bağlanma enerjisi protein/ligand etkileşiminin ne kadar kararlı olduğu hakkında bilgi veren bir parametredir. Bu enerji değeri sayısal olarak ne kadar küçükse protein/ligand etkileşimi o kadar kararlı, diğer bir ifadeyle ligandın proteine afinitesi (ilgisi) o kadar yüksektir. Çizelge 3.1 de gösterilmiş olan doking sonuçlarından elde edilen bağlanma enerjisi değerlerine bakıldığında VER-155008+3JXU etkileşimine ait bağlanma enerjisinin sayısal olarak en düşük olduğu görülmekte, dolayısıyla bu etkileşimin en kararlı etkileşim olduğu başka bir deyişle VER-155008'in Hsp70'e afinitesinin diğer ligandlardan daha fazla olduğu sonucuna varılmaktadır. ATP+3JXU etkileşiminin ikinci, AMP-PNP+3JXU etkileşiminin üçüncü ve MKT-077+3JXU etkileşiminin kararlılık bakımından dördüncü sırada olduğu görülmektedir. Ayrıca bu dört ligandla da etkileşen ortak amino asitlerin 272. Amino asit olan arjinin, 340. amino asit olan serin ve 342. amino asit olan arjinin olduğu görülmektedir. Bu amino asitler dört ligandla da ayrı ayrı etkileştiği için bu amino asitlerde yapılacak nokta mutasyonlarının proteinin fonksiyonunu etkilemede önemli olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda protein/inhibitör etkileşimine ait bağlanma enerjisi değerleri Hsp70 NBD üzerinde yapılan nokta mutasyonları sonucu yeniden değerlendirilmiş, gerçekleştirilen nokta mutasyonlarının protein/inhibitör etkileşimini ne şekilde etkilediği araştırılmıştır. Mutant proteinler ve inhibitörler ile tekrar yapılan doking sonuçlarına göre R272K mutasyonu ile inhibitörlerin etkileşimine ait enerjiler: MKT-077+R272K etkileşimi için E:-8,0 kcal/mol, VER-155008+R272K etkileşimi için ise E:-8,7 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu iki sonuca göre R272K nokta mutasyonunun MKT-077+3JXU etkileşimini küçüğe olsa daha kararlı hale getirdiği, aksine VER-155008+3JXU etkileşiminin kararlılığını ise düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde S340E mutasyonu ve inhibitörlere ait bağlanma enerjileri: MKT-077+S340E etkileşimi için E:-7,7 kcal/mol, VER-155008+S340E etkileşimi için ise E:-9,5 kcal/mol olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre yapılan bu nokta mutasyonu MKT-

077+3JXU etkileşiminin kararlılığını çok fazla etkilememekle beraber, VER-155008+3JXU etkileşiminin kararlılığında azalma meydana getirmiştir. Üçüncü ve son mutasyon olan R342H mutasyonunda ise MKT-077+R342H etkileşimi için E:-6,9 kcal/mol, VER-155008+R342H etkileşimi için E:-9,7 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar MKT-077+3JXU ve VER-155008+3JXU etkileşimlerinin kararlılığının azaldığını göstermektedir.

Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde mutant olmayan Hsp70 ve inhibitör etkileşiminin kararlılığı ile karşılaştırıldığında yapılan üç mutasyonunda VER-155008 inhibitörü ile mutant proteinler arasındaki etkileşimin kararlılığını azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Benzer şekilde mutant olmayan Hsp70 ile inhibitör etkileşiminin kararlılığı karşılaştırıldığında R272K mutant proteini ile MKT-077 arasındaki etkileşimin kararlılığı artarken, S340E ve R342H mutant proteinleri ile MKT-077 inhibitörü arasındaki etkileşimin kararlılığının azaldığı sonucuna varılmıştır.

Docking sonuçlarından elde edilen diğer parametre minimum inhibitör konsantrasyonu ( $K_i$ )'dur. Bu parametrenin küçük olması sistemik toksisiteyi azaltacağından dolayı kanser tedavisinde kullanılacak kimyasallar için bu değer düşük olması istenilen bir durumdur. Çizelge 3.3 de Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinlerine ait minimum inhibitör konsantrasyonları toplu halde gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde R272K mutasyonunun MKT-077 inhibitörünün minimum inhibitör konsantrasyonunu azalttığı, VER-155008 inhibitörünün ise artırdığı görülmektedir. S340E mutasyonunun MKT-077 inhibitörünün minimum inhibitör konsantrasyonunu yine azalttığı, VER-155008 inhibitörünün ise artırdığı görülmektedir. R342H mutasyonunun ise her iki inhibitöründe minimum inhibitör konsantrasyonunu artırdığı belirlenmiştir. In silico sonuçlar serbest bağlanma enerjileri ile minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin birbirleriyle korelasyon içerisinde olduğunu göstermektedir.

Mutasyon çalışmalarımızın ikinci bölümünde mutasyon yapılmamış Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinlerinin ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktiviteleri

inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda biyokimyasal deneylerle araştırılmıştır. İnhibitörler Hsp70'in NBD'sine bağlanarak ATP'nin bu bölgeye bağlanmasına engel olmakta ve ATP bağımlı olarak fonksiyon gösteren Hsp70'in fonksiyon göstermesini engellemektedirler. Dolayısıyla inhibitör konsantrasyonunun artışı ATP bağlanma ihtimalini azaltacağı için ATP hidroliz seviyeleri inhibitör konsantrasyonu ile ters orantılı olarak düşüş gösterir. Benzer şekilde inhibitör ilavesi protein fonksiyonunu bozacağı için, proteinin lüsiferaz katlama aktivitesi de inhibitör konsantrasyonu ile ters orantılı olarak azalma gösterir. Çalışmamızda Hsp70 ile yapılan ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama deneylerinde ATP hidroliz değeri inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamda Şekil 3.14 de gösterilmiştir. İnhibitörlerin Hsp70 ATP hidroliz aktivitesinde önemli düşüşe neden olduğu görülmektedir. Benzer şekilde lüsiferaz katlama deneylerinde de inhibitör ilavesinin Hsp70 fonksiyonunun bir göstergesi olan lüsiferaz katlama aktivitesinde belirgin düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.15). Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde inhibitör ilavesinin ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Daha önce tartışılan doking sonuçları VER-155008'in Hsp70'e MKT-077'den daha büyük bir ilgiyle bağlandığını göstermektedir. Dolayısıyla elde edilen bulguların doking sonuçları ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir.

Literatürde gerek NBD gerekse SBD inhibitörleri kullanılarak Hsp70 ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesi inhibisyonunun araştırıldığı ve bulgularımıza paralel sonuçların elde edildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Massey ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada VER-155008'in Hsp70 ATPaz paketine bağlanarak proteinin ATPaz aktivitesinde  $30 \mu\text{M}$ 'lık VER-155008 konsantrasyonlarında %24,5,  $50 \mu\text{M}$ 'lık VER-155008 konsantrasyonlarında ise %48,7 lik düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde  $50 \mu\text{M}$ 'lık VER-155008 konsantrasyonlarında Hsp70 lüsiferaz katlama aktivitesinin %37,8,  $100 \mu\text{M}$ 'lık VER-155008 konsantrasyonları ise %47,5 oranında azaldığı bildirilmiştir. Schlecht ve ark. (2013) VER-155008 inhibitörünün Hsp70 ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesini araştırmışlar,  $20 \mu\text{M}$ 'lık VER-155008 konsantrasyonunun özellikle düşük ATP konsantrasyonlarında proteinin ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesinde azalmaya neden olduğunu

bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada 200 µM VER-155008 ve 200 µM apoptozol'un (AZ), Hsp70 ATPaz aktivitesini sırasıyla %43,03 ve %53,04 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (Zeng ve ark., 2016). Çalışmamızda kullanılan diğer bir Hsp70 NBD inhibitörü MKT-077'dir. MKT-077 analogu olarak sentezlenen ve YM-08 olarak isimlendirilen Hsp70 inhibitörünün kullanıldığı diğer bir çalışmada Miyata ve ark. (2013) 50 µM YM-08 inhibitörünün Hsp70 ATPaz aktivitesini yaklaşık %60 oranında azalttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde YK5 olarak adlandırılan Hsp70 inhibitörünün kullanıldığı farklı bir çalışmada YK5 inhibitörünün doz bağımlı bir biçimde Hsp70 lüsiferaz geri katlama aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Rodina ve ark., 2013). Çalışmamızda Hsp70'e ait ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesi deneysel verileri bahsedilen literatürlerle karşılaştırıldığında uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında mutant proteinlerde ATP hidroliz ve lüsiferaz aktivitelerinin nasıl değiştiği araştırılmıştır. İlave olarak mutant proteinlerin inhibitör varlığında ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktiviteleri araştırılmış; S340F, R272K ve R342H mutant proteinler MKT-077 ve VER-155008 inhibitörleri ile ayrı ayrı etkileştirilerek ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesi deneyleri yapılmıştır. Özellikle R342H mutasyonu olmak üzere bütün mutasyonlar, mutant proteinlerin ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Her üç mutant proteininde ATP hidroliz ve lüsiferaz aktivitesindeki azalma kontrol ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Mutant proteinlerin inhibitörlü ortamda ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitelerinin daha da azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Mutant proteinlerin inhibitörlü ortamda ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hepsinde de aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Mutasyon deneyleri toplu olarak değerlendirildiğinde yapılan nokta mutasyonlarının farklı seviyelerde de olsa proteinin fonksiyonunu negatif yönde etkilediği sonucu çıkarılabilmektedir. Hsp70 inhibisyonunun

antikanser etkileri göz önüne alındığında çalışmanın bu bölümünün amacına ulaştığı görülmektedir.

Vogel ve ark. (2006b) *E. coli* Hsp70'i olarak bilinen DnaK üzerinde P143A, P143G, R151A, R151K, E171D ve E171Q nokta mutasyonlarını gerçekleştirmiş, çalışmalarının bir bölümünde mutant proteinlerde ve mutasyon yapılmamış Hsp70'de ATP hidroliz ve lüsiferaz deneyleri yapmışlardır. Deneysel sonuçlar bütün mutant proteinlerde lüsiferaz katlama aktivitesinin belirgin bir şekilde düştüğünü göstermiştir. Normal Hsp70'in lüsiferaz katlama aktivitesi %50 seviyelerinde iken mutant proteinlere ait lüsiferaz katlama aktiviteleri yaklaşık olarak %1'e düşmüştür. Benzer şekilde bütün mutant proteinlerin ATP hidroliz aktivitesi normal Hsp70'e göre belirgin şekilde azalmıştır. Özellikle P143G, E171D ve E171Q nokta mutasyonlarının bulunduğu proteinlerde ATP hidroliz aktivitesi sıfır seviyelerinde ölçülmüştür. ATP hidroliz aktivitesinin bizim çalışmamıza göre daha fazla azalış göstermesi nokta mutasyonları yapılan amino asitlerin bizim çalışmamızdaki nokta mutasyonu yapılan amino asitlere göre protein fonksiyonları için daha önemli olabileceğini düşündürmektedir. DnaK, SBD üzerinde F146A, D481A, D481K, V440A, L484A ve D148A nokta mutasyonlarının gerçekleştirildiği farklı bir çalışmada, özellikle D481K, D148A ve F146A nokta mutasyonlarının proteinin lüsiferaz katlama aktivitesinde önemli ölçüde azalmalara neden olduğu bildirilmiştir (Kityk ve ark., 2015). Tutar ve ark. (2008) maya Hsp70 NBD üzerinde A17V ve E540K nokta mutasyonlarını gerçekleştirerek proteinin ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitelerinin ne şekilde değiştiğini araştırmışlardır. Deneysel sonuçlar E540K nokta mutasyonunun proteinin ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitesinde birbirlerine paralel olarak belirgin bir düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda belirtilen çalışmalardaki nokta mutasyonları gerçekleştirilmemiş, diğer bir farklılık olarakta insan Hsp70 NBD kullanılmış ancak protein fonksiyonunun bozulduğunun göstergesi olan ATP hidroliz ve lüsiferaz katlama aktivitelerinin belirtilen literatürlerle uyumlu olarak azaldığı görülmüştür.

Hsp70 inhibitörlerinin ve paklitaksel'in MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri XTT testi ile araştırılmıştır. Paklitaksel'in ve inhibitörlerin çeşitli kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri bilinmekle birlikte çalışmada ELISA

ve RNA izolasyon deneylerinde kullanılacak uygun dozların tespit edilmesi (IC<sub>50</sub> değeri) amacıyla sitotoksosite testi yapılmıştır. Uygulanacak inhibitör/paklitaksel dozlarının ve uygulama süresinin hücrelerin tamamını etkileyecek ancak hücreleri tamamen öldürmeyecek şekilde seçilmesi gerekmektedir. Sonrasında protein ve RNA elde edilecek olan hücrelerin ilaç ve inhibitörlerle yeterli konsantrasyon ve sürede etkileşmiş ancak ölmemiş olması gerekmektedir. Literatürde inhibitörler ve paklitakselin çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri yaklaşık olarak PES için 7,5 µM, MKT-077 için 2,5 µM, paklitaksel için 2,3 µM ve VER-155008 için 14,5 µM olarak belirtilmiştir (Leu ve ark.,2009; Massey ve ark., 2010; Li ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016). Literatürde yer alan IC<sub>50</sub> değerleri doğrultusunda çalışmamızda bu değerleri de kapsayacak şekilde hücreler üzerine farklı dozlarda inhibitör/paklitaksel uygulanarak en uygun IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 15 µM VER-155008, 2,5 µM MKT-077, 7,5 µM PES ve 2,3 µM paklitaksel konsantrasyonlarının ELISA ve RNA izolasyon çalışmaları için en uygun değerler olduğu belirlenmiş ve çalışmalarda bu konsantrasyonlar kullanılmıştır. Ayrıca hücrelerin bölünme süreleri, ilaca/inhibitörlere verecekleri cevap ve ilacın/inhibitörlerin etki gösterme süreleri göz önünde bulundurularak 48 saatlik inkübasyon süresinin uygun olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda VER-155008, MKT-077, PES ve paklitakselin MCF-7 hücrelerindeki Hsp70i protein miktarları ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hsp70'in 13 tane izoformu vardır ve bu çalışmada Hsp70 inhibitörlerinin bu izoformlardan Hsp70i ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre özellikle PES olmak üzere her üç inhibitöründe Hsp70i miktarını artırdığını göstermektedir (Şekil 3.8). Paklitaksel grubunda ise inhibitörler kadar olmasa da kontrol grubuna göre Hsp70i miktarında artış görülmektedir (p>0,05). Hücrelerde bulunan önemli sitozolik izoformlardan biri olan Hsp70i normal şartlarda hücrelerde çok az miktarda sentezlenirken hücre içsel veya dışsal herhangi bir strese maruz kaldığında ekspresyonu önemli derecede artar (Whitesell ve Lindquist, 2009; de Billy ve ark., 2009). Kemoterapinin kanser hücreleri için önemli bir stres kaynağı olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla

kemoterapötik bir ajan olduğu bilinen paklitakselin MCF-7 hücrelerinde Hsp70i miktarlarında artışa neden olmasının beklenen bir durum olduğu düşünülmektedir. Çalışmada da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında paklitaksel uygulanan gruptaki Hsp70i protein düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. PES uygulamasının kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olduğu bildirilmektedir (Zeng ve ark., 2014). Bu durumda ROS'un da kanser hücresi için dışsal bir stres kaynağı olduğu düşünüldüğünde, Hsp70i miktarında artışa neden olması beklenmektedir. Literatürde PES uygulamasının kanser hücrelerindeki Hsp70i miktarını artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Balaburski ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada PES'e alternatif olarak sentezledikleri PES-CI inhibitörünün A375 ve 1205Lu hücrelerinde Hsp70 ekspresyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Leu ve ark. (2009) biyotin-PES'in BX-U2OS ve H1299 hücrelerinde Hsp70i protein miktarlarını kontrol grubuna göre artırdığını bildirilmişlerdir. Aynı çalışmada MCF-7 ve A875 hücrelerinde de PES uygulamasının kontrol grubuna göre Hsp70i miktarlarında artışa neden olduğu gösterilmiştir. İnhibitör olarak PES'in kullanıldığı farklı bir çalışmada Leu ve ark. (2011) PES'in artan konsantrasyonlarının H1299, MCF-7 ve IMR890 hücrelerinde kontrole göre Hsp70i miktarını artırdığını göstermişlerdir. Farklı bir çalışmada Zeng ve ark. (2014) PES uygulamasının RTgill-W1 hücrelerindeki Hsp70 ekspresyonunu kontrol grubuna göre artırdığını bildirmişlerdir. Kang ve ark. (2014) Hsp70 NBD'e bağlanan kendi geliştirdikleri Hsp70 inhibitörünün SKBR3 hücrelerindeki Hsp70 protein miktarını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağımlı olarak artırdığını göstermişlerdir. Özellikle 200 µM'lık inhibitör konsantrasyonlarında Hsp70 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Benzer bir çalışmada Rodina ve ark. (2013) Hsp70 NBD'ye spesifik olarak bağlanan ve YK5B olarak adlandırdıkları inhibitörün SKBR3 hücrelerindeki Hsp70 protein miktarlarını artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da bahsedilen çalışmalarla uyumlu olarak inhibitörlerin MCF-7 hücrelerinde Hsp70i miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Özellikle Hsp70i'ye spesifik olan PES inhibitörünün MCF-7 hücrelerindeki Hsp70i miktarlarını önemli ölçüde artırdığı sonucuna ulaşılmıştır. İnhibitör gruplarında Hsp70i ekspresyonunda artış görülmesinin sebebi,



inhibitörlerin etkisi ile MCF-7 hücrelerinin azalan Hsp70i fonksiyonlarının etkisini önlemek için daha fazla Hsp70 sentezleme gerekliliği duyduğu düşünülmektedir (hücrel up-regülasyon). Ancak, ortamda bulunan Hsp70i inhibitörünün mevcut ve yeni sentezlenecek Hsp70i proteinlerinin SBD'sine bağlanmak suretiyle proteinlerin fonksiyon göstermesini engellediği, dolayısıyla ortamda inhibitör varlığında Hsp70i seviyelerinde artış olsa da protein fonksiyon gösteremeyeceği içinkanser hücrelerinin apoptoza gittiği düşünülmektedir. Ayrıca daha önce belirtildiği gibi PES tarafından üretilen ROS'larında kanser hücresindeki Hsp70i ekspresyonunu artırmış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki kanser gelişimi ve Hspler ile ilgili gen ekspresyon seviyelerini ne şekilde etkilediği PCR array yöntemi ile belirlenmiştir. PCR array deneyleri sonucunda PES uygulanan MCF-7 hücrelerinde, kanser ile ilişkili oldukları bilinen, *BIRC5*, *TOP2A*, *KIT*, *GSTP1*, *AURKA*, *AURKB*, *PLK1*, *PLK2*, *PLK4*, *ESR1*, *CDC25A*, *FLT1*, *CDK1*, *CDK2*, *PARP1*, *PARP4* ve *PGR* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre 2 kattan fazla azalma; *PLK3* geninin ekspresyon seviyelerinde ise kontrol grubuna göre 2 kattan fazla artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Hspler ile ilgili genlerde ise PES grubunda kontrol grubuna göre *HSPA8* gen ekspresyonunda 2 kattan fazla azalma, *HSPA1A* gen ekspresyonunda ise 2 kattan fazla artış gözlenmiştir. Genlerin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artma veya azalma görülüş olmasına rağmen 2 kattan daha az değişim gösteren genler tartışma bölümüne dahil edilmemiştir; ancak ilgili genlere ait kat değişimleri Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6 da gösterilmiştir.

*BIRC5* geni "Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing 5" ya da "survivin" olarak adlandırılan proteinin kodlanmasından sorumlu bir onkogendir. Survivin, apoptoz inhibitörleri ailesine ait anti-apoptotik bir proteindir. Kaspaz aktivasyonunu, BAX'ı ve Fas ile uyarılan apoptozu inhibe ederek apoptozun negatif düzenleyicisi olarak işlev görmekte ve insan tümörlerinin birçok türünde yüksek seviyede survivin ekspresyonu gözlenmektedir (Tamm ve ark., 1998; Sah ve ark., 2006). En fazla meme ve akciğer kanseri olmak üzere 60'dan fazla farklı insan

kanser hücrehattında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Tamm ve ark.,1998). Anti-apoptotik rolünün yanı sıra mitoz bölünmenin düzenlenmesinde ve hücre döngüsünde de survivin proteinin önemli rol oynaması bu proteini antikanser tedavi için hedef haline getirmektedir (Olie ve ark., 2000). Çalışmamızda PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki anti-apoptotik etkili bir onkogen olan *BIRC5* gen ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. *BIRC5* gen ekspresyon seviyelerindeki ve buna bağlı olarak survivin protein ekspresyon seviyelerindeki azalmanın, MCF-7 hücrelerindeki apoptozun uyarılmasına ve kanser hücrelerinin ölüme gidişine neden olabileceği düşünülmektedir.

*TOP2A* geni insanlardaki nükleer bir enzim olan DNA topoizomeraz 2-alfa'yı kodlayan bir onkogendir. DNA topoizomeraz enzimi transkripsiyon sırasında DNA'nın topolojik yapısını, kromozomların ayrılmasını ve hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol etmekle görevlidir. Ayrıca DNA transkripsiyonu ve replikasyonu sırasında oluşan döngüsel stresi rahatlatma görevi de üstlenmektedir (Champoux, 2001). Bu enzimin inhibisyonu doğrudan hücre döngüsünü ve çoğalmasını etkileyeceği için antikanser bir strateji olarak görülmekte ve doksorubisin, epirubisin, etoposid ve teniposid gibi kemoterapötik ilaçlar ile *TOP2A* enzimi hedeflenmektedir (Panvichian ve ark., 2015). Çalışmamızda PES uygulaması ile MCF-7 hücrelerindeki *TOP2A* gen ekspresyonunda azalma meydana geldiği görülmüştür. Hücresel proliferasyonda önemli roller üstlendiği bilinen *TOP2A* gen ekspresyonundaki azalmanın *TOP2A* enzim seviyelerinde de azalmaya yol açarak kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebileceği düşünülmektedir.

*KIT* geni proto-onkogen sınıfına ait bir gendir ve proto-onkogen c-Kit, tirozin protein kinaz kit ya da CD117 olarak da bilinen bir reseptör protein kinazı kodlamaktadır. Bir sitokin reseptörü olan CD117, hematopoietik kök hücrelerin ve diğer hücre tiplerinin yüzeyinde eksprese edilmekte ve mutasyonlar CD117 reseptörünün güçlü proto-onkogen özelliğini açığa çıkarmaktadır. Bununla birlikte *KIT* tirozin kinaz reseptörlerinin; hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşması ile ilgili süreçlerde rol oynaması kanser gelişim mekanizması ile de yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Andre ve ark., 1997). *KIT* geninde meydana gelen

mutasyonların gastrointestinal tümörler, melanoma ve akut miyeloid lösemi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Andre ve ark., 1997; Edling ve ark., 2007). Çalışmamızda da PES uygulamasının bir proto-onkogen olan *KIT* geninin ekspresyonunu baskılamasının, PES'in olası antikanser mekanizmalarından birini daha ortaya koyduğu düşünülmektedir.

*GSTP1* geni tarafından kodlanan glutatyon S-transferaz P, endojen ve ekzojen kaynaklı zararlı maddelerin detoksifikasyonundan sorumlu ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir enzimdir (Laborde, 2010). *GSTP1*'in regülasyonunda meydana gelen bir düzensizlik özellikle prostat kanseri olmak üzere birçok kanser gelişimi ile yakından ilişkilendirilmektedir. Bu enzim, çeşitli faktörlerle (düzenleyici kinazlar gibi) etkileşime girerek hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz ile ilgili sinyal yollarını modüle etmektedir (Martignano ve ark., 2016). Bu nedenle *GSTP1*, hücre koruyucu ve düzenleyici fonksiyonları sayesinde kanserli hücrelerin çoğalması ve ölümünde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca *GSTP1*'in kanser ilaçlarına karşı direnç gelişimindeki rolü son zamanlarda bu enzimi kanser tedavisinde bir hedef haline getirmektedir (Singh, 2015). Çalışmamızda *GSTP1* geni ekspresyon seviyesinin PES uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde önemli rolleri olan; ayrıca hücre koruyucu etkisinin varlığı bilinen *GSTP1* geninin ekspresyon seviyelerindeki bu azalmanın MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda azalma ve hücrelerin apoptoza gitmesi ile sonuçlanmış olabileceği düşünülmektedir.

Aurora kinazlar, antikanser terapötiklerin potansiyel hedefi olan mitotik regülatörlerin bir ailesidir (Andrews PD, 2005). Aurora-A birçok kanser türünde oldukça yüksek seviyelerde eksprese edilen onkogenik bir proteindir. Benzer şekilde Aurora-B de kanser gelişiminde önemli rolleri olan bir onko-proteindir. Aurora ailesi proteinlerin mitoz bölünme, genom stabilitesi ve tümör gelişimindeki rolleri çeşitli araştırmalarla kapsamlı bir şekilde açıklanmaya çalışılmıştır. Son çalışmalar Aurora-B'nin prostat kanseri, kolon kanseri ve baş boyun kanserinde yüksek seviyede eksprese edildiğini ve bu yüksek ekspresyon seviyelerinin kanser hücrelerinin

agresifliğini artırdığını göstermektedir (Chieffi ve ark., 2006; Erpolat ve ark., 2012; Tuncel ve ark., 2012). Aurora kinaz ailesine ait genlerin proto-onkogen özellik taşıması, bu genlerin aşırı ekspresyonunun ve genlerde meydana gelecek mutasyonların kanser gelişim mekanizmaları ile yakından ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki proto-onkogen olan *AURKA* ve *AURKB* gen ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde azaltmış olması PES'in antikanser etkisine aracılık eden olası bir mekanizmanın varlığını düşündürmektedir.

*PLK1*, *PLK2*, *PLK3* ve *PLK4* genleri ökaryotlarda yaygın olan serin/treonin protein kinazların polo ailesinin üyelerini kodlamaktadır. PLK ailesine ait proteinlerin hücre bölünmesindeki rolleri göz önüne alındığında, kanser oluşumuna ve kanserin ilerlemesine katkıda buldukları görülmektedir. *PLK1*, PLK ailesi içerisinde üzerinde en fazla araştırma yapılan proto-onkogendir ve mitozun başlangıcı, G2/M evresinin kontrolü, sentrozom ve hücre döngüsünün kontrolü, iğ ipliklerinin organizasyonu, kromozomların ayrılması gibi hücre döngüsünün kontrolünde birçok rolü bulunmaktadır (van de Weertdt ve ark., 2006; Liu ve ark., 2017). *PLK1*'in artmış ekspresyonu çoğunlukla yüksek düzeyde çoğalan dokularda ve kanser hücrelerinde görülmektedir ve kanser hastalarında yüksek seviyelerde eksprese olan *PLK1*, kötü prognoza neden olmaktadır (Golsteyn ve ark., 1994; Liu ve ark., 2017). Sıçanlarda *PLK1*'in aşırı ekspresyonunun onkogenik transformasyona neden olduğu, bu duruma bağlı olarak da *PLK1*'in hücre bölünmesinde belirgin bir rol oynadığı sonucu çıkarılmıştır (Smith ve ark., 1997). *PLK2*, *PLK1* ile homoloji göstermesinin yanı sıra, doku dağılımı ve fonksiyon bakımından bazı farklılıklar göstermektedir (Holtrich ve ark., 2000). *PLK2*, *PLK1*'e benzer şekilde hücre döngüsünde ve DNA hasar kontrolünde roller üstlenmekle birlikte yapılan çalışmalar *PLK2* ekspresyonunun baskılanmasının kanser hücrelerini apoptoza sürüklediğini göstermektedir (Burns ve ark., 2003). *PLK4*'de *PLK1* ve *PLK2*'ye benzer şekilde hücre döngüsünde önemli roller üstlenir ve hücre canlılığı için gereklidir. *PLK4* siRNA'larının kullanılarak *PLK4* protein seviyelerinin azaltılmasının HeLa hücrelerinde apoptozu aktive ettiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2005). Çalışmamızda PES uygulanan MCF-7 hücrelerinde *PLK1*, *PLK2* ve *PLK4* genlerinin

ekspresyonunda baskılanma görülmüştür. PLK ailesi proteinlerinin kanser gelişimi ve ilerlemedeki rolleri göz önüne alındığında PES'in bu genleri baskılayarak antikanser etki göstermiş olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca çalışmamızda *PLK3* gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna 2 kattan fazla artış tespit edilmiştir. Genel olarak *PLK1* ile *PLK3*'ün biyolojik fonksiyonları zıtlık göstermektedir. Örneğin *PLK1*'in aşırı ekspresyonu onkogenik etki gösterirken *PLK3*'ün aşırı ekspresyonu apoptozu indükleyerek hücre büyümesini inhibe etmektedir (van de Weertdt ve ark., 2006). *PLK3*'ün belirtilen rolü düşünüldüğünde PES uygulaması ile ekspresyon seviyelerindeki artışın beklenen bir durum olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerindeki *HSPA1A* gen ekspresyonunun PES uygulaması ile kontrol grubuna göre arttığı, *HSPA8* gen ekspresyonunun ise azaldığı tespit edilmiştir. *HSPA1A* geni giriş bölümünde de belirtildiği üzere Hsp70i proteinini kodlarken, *HSPA8* geni ise hücrelerde konstitütif olarak sentezlenen Hsc70'i kodlamaktadır (Daugaard ve ark., 2007). Çalışmamızın ELISA deneyleri sonucuna göre PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki Hsp70i seviyelerini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.8). PCR array deney sonucunda da protein seviyesinde artış görülen Hsp70i geninin ekspresyon seviyelerinde artış görülmesinin gerekli ve beklenen bir durum olduğu düşünülmektedir. Literatürde *HSPA8* geninin ürünü olan Hsc70 proteininin PES uygulaması sonucunda azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Granato ve ark., 2013). Çalışmamızda da PES uygulamasına bağlı olarak *HSPA8* geninin ekspresyonundaki azalma, Hsc70 proteininin seviyelerinde de azalmaya neden olarak Hsc70 inhibisyonu yapmış ve hücrelerin apoptoza gidişine neden olmuş olabilir. Hsp70i protein ve *HSPA1A* gen ekspresyonundaki artışlar PES'in Hsp70i inhibisyonunu protein veya gen ekspresyonu seviyesinde değil, direkt olarak proteinin SBD bölgesine bağlanıp fonksiyonunu engelleyerek yaptığını düşündürmektedir. Ayrıca PES, Hsp70 ile koşaperonları arasındaki etkileşimi engelleyerek proteinin fonksiyon görmesini engellemiş olabilir. *HSPA8* gen seviyelerindeki azalma ise PES'in hem gen ekspresyon seviyesinde hem Hsc70 protein seviyesinde hem de protein fonksiyonunu engelleyerek etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Meme kanserinde endokrin tedavilerin uygulanma yolu östrojen yoksunluğundan geçmektedir. Tedavinin farmakolojik hedefleri, dolaşımdaki östrojenin seviyelerini düşürmek ve/veya hormon reseptör blokajı yoluyla reseptör ekspresyonunu azaltarak östrojenin tümör dokusu üzerindeki etkilerini önlemeyi içermektedir. Östrojen sentezinin terapötik olarak hedeflenmesi östrojen reseptörü ekspresyonuna sahip meme kanserlerinin %70'inden fazlasının tedavisinde temel dayanaktır. Östrojen ve progesteron reseptörleri nükleer DNA'ya bağlanan ve transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösteren sitoplazmik proteinlerdir. *ESR1* geni insanlarda östrojen reseptör- $\alpha$  (ER  $\alpha$ )'yı, *PGR* geni ise progesteron reseptörünü kodlamaktadır ve her iki gen de meme kanseri gelişim ve tedavi mekanizmasında çok önemli role sahiptir (Skiris ve ark., 2006; Papoutsis ve ark., 2009; Toy ve ark., 2017). PES uygulaması meme kanseri gelişiminde bu kadar önemli rol oynayan her iki genin ekspresyon seviyelerinde de azalmaya neden olarak meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını baskılamış olabileceği düşünülmektedir.

*PARP1* geni tarafından kodlanan PARP1 proteini DNA hasarını onarmakta önemli görevler üstlenmektedir. Antikanser bir strateji olarak hücre içi PARP1 seviyelerinin gerek siRNA'larla gerekse PARP1 inhibitörleri ile düşürülmesi DNA kırıklarının onarımının azalması ile sonuçlanmaktadır (Schultz ve ark., 2003; Godon ve ark.; 2008). *PARP1* ekspresyonu meme kanseri, nöroblastom ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde artış gösterir (Rojo ve ark., 2012; Dziaman ve ark., 2014; Newman ve ark., 2015). Kanser hücrelerindeki DNA onarımını sağlayan ve kanser hücrelerinin hayatta kalması için bu kadar önemli olan bir genin ekspresyonunu baskılamak kanser hücrelerinin çoğalmasını negatif yönde etkileyebileceği için önemli bir antikanser strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda PES'in meme kanseri hücrelerindeki *PARP1* ve *PARP4* ekspresyon seviyelerini azaltması diğer bir antikanser etkisini ortaya koymuş olabileceğini düşündürmektedir.

*FLT1* geni vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) proteinini kodlayan bir onkogendir. VEGFR1 ekspresyonu, lenfoma, lösemi, melanoma, kolon kanseri, pankreas kanseri ve meme kanserinde yüksek seviyede görülmektedir (Tsourlakis ve ark., 2015). FLT1'in karaciğer yenilenmesi ve inflamasyon gibi

fizyolojik rollerinin yanı sıra metastazda da rol oynaması kanser ile yakın ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir (Al-Maghrabi ve ark., 2014). Anjiyogenez, kanser hücrelerinin metastaz yapmasında kilit rol oynamaktadır ve VEGFR1 anjiyogenezde rolü olduğu bilinen en önemli proteinlerdendir (Lee ve ark., 2011). Çalışmamızda kanser hücrelerinin metastaz yapmasında bu kadar önemli rol oynayan bir genin PES uygulaması ile ekspresyonunun baskılandığı görülmektedir. PES'in *FLT1* genini baskılaması özellikle metastaz yapma eğilimli kanser hücrelerinin metastaz yapma yeteneğini kısıtlayarak kanserin yayılmasını engelleyeceği öngörülmektedir.

*CDC25A* geni insanda birçok kanser türünde yüksek seviyede eksprese olan bir onkogendir. Bu gene ait protein normal ökaryotik hücre bölünmesinde, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve DNA hasarının kontrol edilmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir. Birçok kanser türünde yüksek seviyede *CDC25A* ekspresyonunun görülmesi ve *CDC25A*'nın hücre döngüsündeki merkezi rolleri, bu proteini antikanser tedavide önemli bir hedef haline getirmektedir (Kristjánssdóttir ve Rudolph, 2004). PCR array sonuçlarımız PES uygulamasının MCF-7 hücrelerindeki *CDC25A* ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığını göstermektedir. Hücre döngüsü ve DNA hasarının kontrol edilmesi dolayısıyla kanser hücresinin çoğalması için bu kadar önemli bir onkogenin PES uygulaması ile baskılanması PES'in diğer bir antikanser yönünü vurgulamaktadır.

*CDK1* genine ait protein olan siklin bağımlı kinaz 1, hücre döngüsünde kilit roller üstlenmektedir. *CDK1* proteini, nükleusun yeniden düzenlenmesinde, kromozom yoğunlaşmasında ve çeşitli mitotik substratların fosforillenmesi sonucu mitotik iğ iplikçiklerinin oluşumunda görev almaktadır. Dolayısıyla *CDK1* aktivasyonu mitoz bölünmede vazgeçilemez bir adım olarak karşımıza çıkmaktadır (Lee ve ark., 2016). *CDK2* geni siklin bağımlı kinaz 2 (*CDK2*) proteinini kodlamaktadır. *CDK2* proteini de *CDK1*'e benzer şekilde hücre döngüsünde görev almaktadır ve *CDK2* aktivasyonu malign hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar *CDK2*'nin anormal aktivitesinin çeşitli kanser türlerinde kanser hücrelerinin invazyonunu artırdığını ortaya koymuştur (Liu ve ark., 2016). *CDK1* ve

CDK2 geninin kanser mekanizmaları üzerinde belirtilen rolleri değerlendirildiğinde bu genlerin ekspresyonunun baskılanmasının önemli antikanser etkiler ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir. PES'in bu iki gene ait ekspresyon seviyelerini baskılaması MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri sayesinde proliferasyonunu engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

PES uygulaması sonucunda genlerin ekspresyon profilleri toplu olarak değerlendirildiğinde PES'in çoğunlukla hücre döngüsünü düzenleyici fonksiyon gösteren proteinlere ait genlerin ekspresyonunu ve DNA tamir mekanizmalarında görev alan genleri baskılayarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı görülmektedir. Aynı zamanda *HSPA8*, *BCL-2* ve *BIRC5* gibi antiapoptotik genlerin ekspresyonunu da azaltarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği görülmektedir.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, kanserde önemli roller oynadığı bilinen Hsp70 proteininin antikanser etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamızın sonuçları Hsp70 NBD üzerinde yapılan nokta mutasyonlarının proteinin fonksiyonlarını inhibitörsüz ve inhibitörlü koşullarda önemli derecede etkilediğini göstermiştir. Yapılan bu çalışmalara ilave olarak Hsp70 NBD veya SBD üzerindeki farklı aminoasitlerde de nokta mutasyonu yapılarak ve farklı HSP70 NBD inhibitörleri kullanılarak protein fonksiyonunun ne şekilde etkilendiği araştırılabilir.

Çalışmamızda kullanılan Hsp70 inhibitörlerinin ve paklitaksel'in MCF-7 hücrelerindeki Hsp70i protein seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiş ve inhibitör ve paklitaksel uygulamasının Hsp70i protein ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna göre artırdığı tespit edilmiştir. Paklitaksel grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değilken ( $p>0,05$ ), özellikle PES grubunda Hsp70i seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).

PES'in MCF-7 hücrelerindeki Hspler ve kanser ile ilgili yolaklardaki gen ekspresyon profillerini ne şekilde etkilediği PCR array yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler PES'in kanser yolaklarında önemli rol oynayan özellikle proto-onkogenlerin ve onkogenlerin ekspresyon seviyelerinde baskılama yaparak antikanser özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca PES'in Hsp70i protein seviyelerini artırdığı gibi *HSPA1A* (Hsp70i proteinini kodlayan gen) gen ekspresyon seviyelerinde de artışa neden olduğu, *HSPA8* gen ekspresyon seviyelerinde ise azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalara ilave olarak ekspresyonu değişiklik gösteren genlere ait protein ekspresyon seviyeleri ELISA ve western blot gibi yöntemlerle araştırılarak genler ile proteinler arasındaki korelasyon belirlenebilir. Ayrıca bu çalışma sayesinde PES'in kanser hücrelerinde sadece Hsp70 inhibisyonu yapmakla kalmayıp, kanser ile ilgili yolaklardaki genlerin ekspresyon

seviyelerinde de önemli derecede değişiklik (genellikle baskılama) sağladığı ortaya konulmuştur.

Klasik antikanser tedavi profillerinde sıklıkla karşılaşılan sistemik toksisiteyi en aza indirmeyi amaçlayan hedefe yönelik tedavi için yeni nesil antikanser ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hsp70 inhibitörlerinden özellikle PES inhibitörü ve yapıca benzer türevlerinin sentezlenmesi ile hedefe yönelik meme kanseri tedavisindeki başarının önemli derecede artabileceği çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde öngörülmektedir. Bununla birlikte in vitro yürütmüş olduğumuz çalışmamıza ilave olarak kanser modeli oluşturulmuş in vivo hayvan modeli çalışmalarına ve ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak bu çalışma ile literatüre, Hsp70 inhibisyonunun antikanser etkisine aracılık eden mekanizmalar ile ilgili önemli veriler sunulmuştur.

## ÖZET

### **Meme Kanseri Hücrelerinde Hsp70 İnhibisyonunun Antikanser Etkilerinin Araştırılması**

Hsp70, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması, protein agregasyonunun önlenmesi, hücre içi protein taşıması gibi fizyolojik rollere sahip bir proteindir. Sağlıklı hücrelerde makul düzeylerde sentezlenen bu protein tümörlü hücrelerde aşırı miktarda sentezlenerek tümör hücrelerinin zorlu şartlarda hayatta kalmasına yardımcı olur. Hsp70, tümörlü hücrelerde apoptozun engellenmesi, kemoterapiye karşı direnç, metastaz, invazyon gibi kötü prognozla ilişkili birçok süreçte rol oynar. Dolayısıyla tümörlü hücrelerde Hsp70'in spesifik olarak inhibe edilmesi kanser tedavisinde önemli bir stratejidir. Ayrıca Hsp70'in inhibe edilmesi tümör hücreleri için toksik etki gösterirken, normal hücrelerde bu etki görülmez, dolayısıyla kanser tedavisindeki sistemik toksisitenin önlenmesinde Hsp70 inhibisyonu büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı Hsp70 inhibisyonunun antikanser etkilerinin araştırılması ve Hsp70 üzerinde yapılan nokta mutasyonlarının protein fonksiyonunu ne şekilde etkilediğini araştırmaktır. Çalışmada öncelikle Hsp70 NBD üzerindeki inhibitörlerle etkileşim kritik bazı amino asitlerde nokta mutasyonu yapılarak inhibitör/protein etkileşimine ait bazı katsayılarının ve minimum inhibitör konsantrasyonlarının ne şekilde değiştiği moleküler simülasyon çalışmaları (docking) ile belirlenmiştir. Ayrıca saflaştırılan Hsp70 ve mutant Hsp70 proteinleri inhibitörlerle ayrı ayrı etkileştirilerek ATP hidroliz ve lüsisiferaz katlama deneyleri yapılmıştır. Veriler, yapılan nokta mutasyonları sonucunda mutant proteinlerin ATP hidroliz ve lüsisiferaz katlama aktivitelerinde kontrol grubuna göre belirgin bir azalma olduğunu göstermiştir ( $p<0.05$ ). İkinci olarak inhibitörlerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki antikanser etkileri ve kullanılacak dozlar XTT yöntemi ile belirlenmiştir. İnhibitörlerin Hsp70i protein miktarları üzerindeki etkileri ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. ELISA sonuçları inhibitörlerin MCF-7 hücrelerindeki Hsp70i miktarını kontrol grubuna göre artırdığını göstermiştir ( $p<0.05$ ). Son olarak PES'in MCF-7 hücrelerinin gen ekspresyon profilini ne şekilde değiştirdiği PCR array yöntemleri ile araştırılmış ve PES'in kanserle ilişkili yollardaki birçok genin ekspresyonunda değişmeye neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Bütün deneysel veriler göz önüne alındığında bu çalışmanın kanser tedavisi için inhibisyon alanında bilimsel bilgi birikimi ve daha ileri çalışmalar için alt yapı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Gen ekspresyonu, Hsp70, inhibitör, Kanser, Mutasyon.

## SUMMARY

### Investigation of Anticancer Hsp70 Inhibition Effects on Breast Cancer Cells

Hsp70 is a chaperone has physiological roles such as folding of newly synthesized proteins, refolding of misfolded proteins, inhibition of protein aggregation, intracellular protein transport. This protein which is expressed at marginally levels in healthy cells, is greatly overexpressed in tumor cells, helping tumor cells to survive in hard conditions. Hsp70 plays role in many processes related to poor prognosis such as inhibition of apoptosis in tumor cells, resistance to chemotherapy, metastasis, invasion. Thus, specific inhibition of Hsp70 in tumor cells is an important strategy in the treatment of cancer. In addition, while inhibition of Hsp70 has toxic effects on tumor but not normal cells; therefore, Hsp70 inhibition is of great importance in the prevention of systemic toxicity in the treatment of cancer.

The aim of this study was to investigate the anticancer effects of Hsp70 inhibition and to investigate how point mutations on Hsp70 affect protein function. Firstly, point mutations were made in some crucial amino acids interacting with the inhibitors on Hsp70 NBD, and the binding coefficient of the inhibitor/protein interaction and the changes of the minimum inhibitor concentrations were determined by molecular simulation studies (docking). In addition, ATP hydrolysis and luciferase folding experiments were carried out purified Hsp70 and mutant Hsp70 proteins with inhibitors. The datas showed that mutant proteins resulted in a marked reduction in ATP hydrolysis and luciferase folding activities compared to the control group as a result of point mutations ( $p < 0,05$ ). Secondly, the anticancer effects and the doses to be used on the MCF-7 cell line of the inhibitors were determined by the XTT method. The effects of inhibitors on Hsp70i protein amounts were determined by ELISA. ELISA results showed that inhibitors increased the amount of Hsp70i in MCF-7 cells compare to the control group. Finally, the way in which PES alter the gene expression profile of MCF-7 cells was investigated by PCR array methods, resulting in the PES being altered in the expression of many genes in the cancer related pathways.

Taking into account all experimental data, it is thought that this study will provide an infrastructure for scientific knowledge and further studies in the field of inhibition for cancer treatment.

**Key Words:**Cancer , Gene Expression, Hsp70, Inhibitor, Mutation.

## KAYNAKLAR

- ADELOYE, D., DAVID, R. A., ADEREMI, A. V., ISEOLORUNKANMI, A., OYEDOKUN, A., IWEALA, E. E., OMOREGBE, N., AYO, C. K. (2016). An Estimate of the Incidence of Prostate Cancer in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.*, **11**: e0153496.
- AHMAD, A., BHATTACHARYA, A., MCDONALD, R. A., CORDES, M., ELLINGTON, B., BERTELSEN, E. B., ZUIDERWEG, E. R. (2011). Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**: 18966-18971.
- AL-MAGHRABI, J., GOMAA, W., BUHME DA, A., QARI, Y., AL-QAHTANI, M., AL-AHWAL, M. (2014). Prognostic significance of VEGFR1/Flt-1 immunoeexpression in colorectal carcinoma. *Tumour Biol.*, **35**: 9045-9051.
- ANDRE, C., HAMPE, A., LACHAUME, P., MARTIN, E., WANG, X. P., MANUS, V., HU, W. X., GALIBERT, F. (1997). Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes. *Genomics.*, **39**: 216-226.
- ANDREWS, P. D. (2005). Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene.*, **24**: 5005-5015.
- ARYA, R., LAKHOTIA, S. C. (2008). Hsp60D is essential for caspase-mediated induced apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*, **13**: 509–526.
- ASSIMON, V. A., GILLIES, A. T., RAUCH, J. N., GESTWICKI, J. E. (2013). Hsp70 protein complexes as drug targets. *Curr Pharm Des.*, **19**: 404-417.
- BALABURSKI, G. M., LEU, J. I., BEEHARRY, N., HAYIK, S., ANDRAKE, M. D., ZHANG, G., HERLYN, M., VILLANUEVA, J., DUNBRACK, R. L. JR., YEN, T., GEORGE, D. L., MURPHY, M. E. (2013). A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent. *Mol Cancer Res.*, **11**: 219-229.
- BEERE, H. M., WOLF, B. B., CAIN, K., MOSSER, D. D., MAHBOUBI, A., KUWANA, T., TAILOR, P., MORIMOTO, R. I., COHEN, G. M., GREEN, D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.*, **2**: 469-475.
- BERTELSEN, E. B., CHANG, L., GESTWICKI, J. E., ZUIDERWEG, E. R. (2009). Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 8471-8476.
- BISCHOFBERGER, P., HAN, W., FEIFEL, B., SCHÖNFELD, H. J., CHRISTEN, P. (2003). D-Peptides as inhibitors of the DnaK/DnaJ/GrpE chaperone system. *J Biol Chem.*, **278**: 19044-19047.
- BOYA, P., GONZALEZ-POLO, R. A., PONCET, D., ANDREAU, K., VIEIRA, H. L., ROUMIER, T., PERFETTINI, J. L., KROEMER, G. (2003). Mitochondrial membrane

permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, **22**: 3927-3936.

- BRAUNSTEIN, M. J., SCOTT, S. S., SCOTT, C. M., BEHRMAN, S., WALTER, P., W PF, P., COPLAN, J. D., CHRICO, W., JOSEPH, D., BRODSKY, J. L., BATUMAN, O. (2011). Antimyeloma Effects of the Heat Shock Protein 70 Molecular Chaperone Inhibitor MAL3-101. *Journal of Oncology*, **2011**: 1-11.
- BRITTEN, C. D., ROWINSKY, E. K., BAKER, S. D., WEISS, G. R., SMITH, L., STEPHENSON, J., ROTHENBERG, M., SMETZER, L., CRAMER, J., COLLINS, W., VON HOFF, D. D., ECKHARDT, S. G. (2000). A phase I and pharmacokinetic study of the mitochondrial-specific rhodacyanine dye analog MKT 077. *Clin Cancer Res.*, **6**: 42-49.
- BROCCHIERI, L., DE MACARIO, E. C., MACARIO, A. J. L. (2008). Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol*, **8**: 1-20.
- BROWN, M. A., ZHU, L., SCHMIDT, C., TUCKER, P. W. (2007). Hsp90—from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **363**: 241–246.
- BUKAU, B., WEISSMAN, J., HORWICH, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, **125**: 443-451.
- BURNS, T. F., FEI, P., SCATA, K. A., DICKER, D. T., EL-DEIRY, W. S. (2003). Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol Cell Biol.*, **23**: 5556-5571.
- CALDERWOOD, S. K., KHALEQUE, M. A., SAWYER, D. B., CIOCCA, D. R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.*, **31**: 164-172.
- CARRETTIERO, D. C., HERNANDEZ, I., NEVEU, P., PAPAGIANNAKOPOULOS, T., KOSIK, K. S. (2009). The cochaperone BAG2 sweeps paired helical filament- insoluble tau from the microtubule. *J Neurosci.*, **29**: 2151-2161.
- CHAMPOUX, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.*, **70**: 369-413.
- CHIEFFI, P., COZZOLINO, L., KISSLINGER, A., LIBERTINI, S., STAIBANO, S., MANSUETO, G., DE ROSA, G., VILLACCI, A., VITALE, M., LINARDOPOULOS, S., PORTELLA, G., TRAMONTANO, D. (2006). Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate.*, **66**: 326-333.
- CHIBA, Y., KUBOTA, T., WATANABE, M., MATSUZAKI, S. W., OTANI, Y., TERAMOTO, T., MATSUMOTO, Y., KOYA, K., KITAJIMA, M. (1998). MKT-077, localized lipophilic cation: antitumor activity against human tumor xenografts serially transplanted into nude mice. *Anticancer Res.*, **18**: 1047-1052.
- CHO, H. J., GEEI H. Y., BAEK, K. H., KO, S. K., PARK, J. M., LEE, H., KIM, N. D., LEE, M. G., SHIN, I. (2011). A small molecule that binds to an ATPase domain of Hsc70 promotes membrane trafficking of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Am Chem Soc.*, **50**: 20267-20276.

- CIOCCA, D. R., CLARK, G. M., TANDON, A. K., FUQUA, S. A., WELCH, W. J., MCGUIRE, W. L. (1993). Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst.*, **85**: 570-574.
- CIOCCA, D. R., ARRIGO, A. P., CALDERWOOD, S. K. (2013). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol.*, **87**: 19-48.
- COLVIN, T.A., GABAI, V. L., GONG, J., CALDERWOOD, S. K., LI, H., GUMMULURU, S., MATCHUK, O. N., SMIRNOVA, S. G., ORLOVA, N. V., ZAMULAEVA, I. A., GARCIA-MARCOS, M., LI, X., YOUNG, Z. T., RAUCH, J. N., GESTWICKI, J. E., TAKAYAMA, S., SHERMAN, M. Y. (2014). Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res.*, **74**: 4731-4740.
- CREAGH, E. M., CARMODY, R. J., COTTER, T. G. (2000). Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res.*, **257**: 58-66.
- DAUGAARD, M., ROHDE, M., JÄÄTTELÄ, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.*, **581**: 3702-3710.
- DE BILLY, E., POWERS, M. V., SMITH, J. R., WORKMAN, P. (2009). Drugging the heat shock factor 1 pathway: exploitation of the critical cancer cell dependence on the guardian of the proteome. *Cell Cycle*, **8**: 3806-3808.
- DE MAIO, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, **11**: 1-12.
- DIDELOT, C., LANNEAU, D., BRUNET, M., JOLY, A. L., DE THONEL, A., CHIOSIS, G., GARRIDO, C. (2007). Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr Med Chem.*, **14**: 2839-2847.
- DORARD, C., DE THONEL, A., COLLURA, A., MARISA, L., SVRCEK, M., LAGRANGE, A., JEGO, G., WANHERDRICK, K., JOLY, A. L., BUHARD, O., GOBBO, J., PENARD-LACRONIQUE, V., ZOUALI, H., TUBACHER, E., KIRZIN, S., SELVES, J., MILANO, G., ETIENNE-GRIMALDI, M. C., BENGRINE-LEFÈVRE, L., LOUVET, C., TOURNIGAND, C., LEFÈVRE, J. H., PARC, Y., TIRET, E., FLÉJOU, J. F., GAUB, M. P., GARRIDO, C., DUVAL, A. (2011). Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med.*, **17**: 1283-9.
- DOYLE, S. M., WICKNER, S. (2009). Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci.*, **34**: 40-48.
- DRAGOVIC, Z., BROADLEY, S. A., SHOMURA, Y., BRACHER, A., HARTL, F. U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.*, **25**: 2519-28.
- DZIAMAN, T., LUDWICZAK, H., CIESLA, J. M., BANASZKIEWICZ, Z., WINCZURA, A., CHMIELARCZYK, M., WISNIEWSKA, E., MARSZALEK, A., TUDEK, B., OLINSKI, R. (2014). PARP-1 expression is increased in colon adenoma and carcinoma and correlates with OGG1. *PLoS One.*, **9**: 1-19.
- EDLING, C. E., HALLBERG, B. (2007). c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol.*, **39**: 1995-1998.

- ELLIOTT, E., TSVETKOV, P., GINZBURG, I. (2007). BAG-1 associates with Hsc70.Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. *J Biol Chem.*, **282**: 37276-37284.
- ERBSE, A., MAYER, M. P., BUKAU, B. (2004). Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem Soc Trans.*, **32**: 617-21.
- ERLEJMAN, A. G., LAGADARI, M., TONEATTO, J., PIWIEN-PILIPUK, G., GALIGNIANA, M. D. (2014). Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim Biophys Acta.* **1839**: 71-87.
- ERPOLAT, O. P., GOCUN, P. U., AKMANSU, M., KARAKUS, E., AKYOL, G. (2012). High expression of nuclear survivin and Aurora B predicts poor overall survival in patients with head and neck squamous cell cancer. *Strahlenther Onkol.*, **188**: 248-254.
- EVANS, C. G., CHANG, L., GESTWICKI, J. E. (2010). Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem.*, **53**: 4585-4602.
- EYLES, S. J., GIERASCH, L. M. (2010). Nature's molecular sponges: Small heat shock proteins grow into their chaperone roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 2727–2728.
- FAN, C. Y., LEE, S., M. CYR. D. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones.* **4**: 309–316.
- FAN, C. Y., LEE, S., REN, H. Y., M. CYR. D. (2004). Exchangeable Chaperone Modules Contribute to Specification of Type I and Type II Hsp40 Cellular Function. *Mol Biol Cell.*, **15**: 761–773.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D., BRAY, F. (2015). *Int J Cancer.*, **136**: E359-86.
- FEWELL, S. W., DAY, B. W., BRODSKY, J. L. (2001). Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis. *J Biol Chem.*, **276**: 910-4.
- GABAI, V. L., MERIIN, A. B., MOSSER, D. D., CARON, A. W., RITS, S., SHIFRIN, V. I., SHERMAN, M. Y. (1997). Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem.*, **272**: 18033-18037.
- GABAI, V. L., YAGLOM, J. A., VOLLOCH, V., MERIIN, A. B., FORCE, T., KOUTROUMANIS, M., MASSIE, B., MOSSER, D. D., SHERMAN, M. Y. (2000). Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Mol Cell Biol.*, **20**: 6826-6836.
- GALLUZZI, L., GIORDANETTO, F., KROEMER, G. (2009). Targeting HSP70 for Cancer Therapy. *Molecular cell*, **36**: 176–177.
- GAO, T., NEWTON, A. C. (2002). The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J Biol Chem.*, **277**: 31585-31592.
- GARRIDO, C., GALLUZZI, L., BRUNET, M., PUIG, P. E., DIDELOT, C., KROEMER, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.*, **13**: 1423-1433.



- GARRIDO, C., SCHMITT, E., CANDÉ, C., VAHSEN, N., PARCELLIER, A., KROEMER, G. (2003). HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*. **2**: 579-584.
- GEHRMANN, M., RADONS, J., MOLLS, M., MULTHOFF, G. (2008). The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. *Cell Stress Chaperones*, **13**: 1–10.
- GHOSH, J. C., DOHI, T., KANG, B. H., ALTIERI, D. C. (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem.*, **283**: 5188-5194.
- GODON, C., CORDELIÈRES, F. P., BIARD, D., GIOCANTI, N., MÉGNIN-CHANET, F., HALL, J., FAVAUDON, V. (2008). PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.*, **36**: 4454-4464.
- GOLOUBINOFF, P., DE LOS RIOS, P. (2007). The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends Biochem Sci.*, **32**: 372-380.
- GOLOUDINA, A. R., DEMIDOV, O. N., GARRIDO, C. (2012). Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett.* **325**: 117-124.
- GOLSTEYN, R. M., SCHULTZ, S. J., BARTEK, J., ZIEMIECKI, A., RIED, T., NIGG, E. A. (1994). Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila polo* and *Saccharomyces cerevisiae Cdc5*. *J Cell Sci.*, **107**: 1509-1517.
- GRANATO, M., LACCONI, V., PEDDIS, M., LOTTI, L. V., DI RENZO, L., GONNELLA, R., SANTARELLI, R., TRIVEDI, P., FRATI, L., D'ORAZI, G., FAGGIONI, A., CIRONE, M. (2013). HSP70 inhibition by 2-phenylethanesulfonamide induces lysosomal cathepsin D release and immunogenic cell death in primary effusion lymphoma. *Cell Death Dis.*, **4**: e730.
- GUO, F., ROCHA, K., BALI, P., PRANPAT, M., FISKUS, W., BOYAPALLE, S., KUMARASWAMY, S., BALASIS, M., GREEDY, B., ARMITAGE, E. S., LAWRENCE, N., BHALLA, K. (2005). Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res.*, **65**: 10536–10544.
- GUTTMANN, D. M., KOUMENIS, C. (2011). The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer. *Cancer Biol Ther.*, **12**: 1023–1031.
- HAGN, F., KLEIN, C., DEMMER, O., MARCHENKO, N., VASEVA, A., MOLL, U. M., KESSLER, H. (2010). BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J Biol Chem.*, **285**: 3439-3450.
- HAN, W., CHRISTEN, P. (2003). Interdomain communication in the molecular chaperone DnaK. *Biochem J.*, **369**: 627-634.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**: 646-674.
- HARRISON, C. (2003). GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress Chaperones*, **8**: 218-224.

- HARTL, F. U., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**: 324–332.
- HARTL, F. U., HAYER-HARTL, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**: 1852-1858.
- HAUPT, A., JOBERTY, G., BANTSCHJEFF, M., FRÖHLICH, H., STEHR, H., SCHWEIGER, M. R., FISCHER, A., KERICK, M., BOERNO, S. T., DAHL, A., LAPPE, M., LEHRACH, H., GONZALEZ, C., DREWES, G., LANGE, B. M. H. (2012). Hsp90 inhibition differentially destabilises MAP kinase and TGF-beta signalling components in cancer cells revealed by kinase-targeted chemoproteomics. *BMC Cancer*, **12**: 1-12.
- HECK, T. G., SCHÖLER, C. M., DE BITTENCOURT, P. I. (2011). HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochem Funct.*, **29**: 215-226.
- HOLTRICH, U., WOLF, G., YUAN, J., BEREITER-HAHN, J., KARN, T., WEILER, M., KAUSELMANN, G., REHLI, M., ANDREESSEN, R., KAUFMANN, M., KUHL, D., STREBHARDT, K. (2000). Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene.*, **19**: 4832-4839.
- HONG, D. S., BANERJI, U., TAVANA, B., GEORGE, G. C., AARON, J., KURZROCK, R. (2013). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer Treat Rev.*, **39**: 375-387.
- HORIBE, T., TORISAWA, A., KOHNO, M., KAWAKAMI, K. (2014). Synergetic cytotoxic activity toward breast cancer cells enhanced by the combination of Antp-TPR hybrid peptide targeting Hsp90 and Hsp70-targeted peptide. *BMC Cancer.*, **14**: 615.
- HWANG, Y. J., LEE, S. P., KIM, S. Y., CHOI, Y. H., KIM, M. J., LEE, C. H., LEE, J. Y., KIM, D. Y. (2009). Expression of Heat Shock Protein 60 kDa Is Upregulated in Cervical Cancer. *Yonsei Med J.*, **50**: 399–406.
- JÄÄTTELÄ, M., TSCHOPP, J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol.*, **4**: 416-423.
- JÄÄTTELÄ, M., WISSING, D. (1993). Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med.*, **177**: 231-236.
- JAKOB, U., GAESTEL, M., ENGEL, K., BUCHNER, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.*, **268**: 1517-1520.
- JEGO, G., HAZOUMÉ, A., SEIGNEURIC, R., GARRIDO, C. (2013). Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.*, **332**: 275-285.
- KABANI, M., BECKERICH, J. M., BRODSKY, J. L. (2002). Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p. *Mol Cell Biol.*, **22**: 4677-4689.
- KABANI, M., MARTINEAU C. N. (2008). Multiple Hsp70 Isoforms in the Eukaryotic Cytosol: Mere Redundancy or Functional Specificity? *Curr Genomics*, **9**: 338–348.
- KAISER, M., KÜHNL, A., REINS, J., FISCHER, S., ORTIZ-TANCHEZ, J., SCHLEE, C., MOCHMANN, L. H., HEESCH, S., BENLASFER, O., HOFMANN, W-K., THIEL, E.,

- BALDUS, C. D. (2011). Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- $\mu$  in acute leukemia. *Blood Cancer J*, **1**: e28.
- KAMPINGA, H. H. (2006). Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **172**: 1-42.
- KAMPINGA, H. H., HAGEMAN, J., VOS, M. J., KUBOTA, H., TANGUAY, R. M., BRUFORD, E. A., CHEETHAM, M. E., CHEN, B., HIGHTOWER, L. E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, **14**: 105-111.
- KANG Y, TALDONE T, PATEL HJ, PATEL PD, RODINA A, GOZMAN A, MAHARAJ R, CLEMENT CC, PATEL MR, BRODSKY JL, YOUNG JC, CHIOSIS G. (2014). Heat shock protein 70 inhibitors. 1. 2,5'-thiodipyrimidine and 5-(phenylthio)pyrimidine acrylamides as irreversible binders to an allosteric site on heat shock protein 70. *J Med Chem*, **57**: 1188-207.
- KHALIL, A. A., KABAPY, N. F., DERAZ, S. F., SMITH, C. (2011). Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta.*, **1816**: 89-104.
- KITYK, R., VOGEL, M., SCHLECHT, R., BUKAU, B., MAYER, M. P. (2015). Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. *Nat Commun.*, **6**: 8308.
- KOGA, F., KIHARA, K., NECKERS, L. (2009). Inhibition of cancer invasion and metastasis by targeting the molecular chaperone heat-shock protein 90. *Anticancer Res.*, **29**: 797-807.
- KOREN, J 3RD., MIYATA, Y., KIRAY, J., O'LEARY, J. C. 3RD, NGUYEN, L., GUO, J., BLAIR, L. J., LI, X., JINWAL, U. K., CHENG, J. Q., GESTWICKI, J. E., DICKEY, C. A. (2012). Rhodocyanine derivative selectively targets cancer cells and overcomes tamoxifen resistance. *PLoS One*, **7**: e35566.
- KOYA, K., LI, Y., WANG, H., UKAI, T., TATSUTA, N., KAWAKAMI, M., SHISHIDO, CHEN, L. B. (1996). MKT-077, a novel rhodocyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res.*, **56**: 538-543.
- KRISTJÁNSDÓTTIR, K., RUDOLPH, J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol.*, **11**: 1043-1051.
- KUHN, D. J., ZEGER, E. L., ORLOWSKI, R. Z. (2006). Proteasome inhibitors and modulators of heat shock protein function. *Update Cancer Ther.*, **1**: 91-116.
- KUMAR, S., STOKES, J., P. SINGH, U., GUNN, K. S., ACHARYA, A., MANNE, U., MISHRA, M. (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Letters.*, **374**: 156-166.
- LABORDE, E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.*, **17**: 1373-1380.
- LANNEAU, D., BRUNET, M., FRISAN, E., SOLARY, E., FONTENAY, M., GARRIDO, C. (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.*, **12**: 743-761.

- LANNEAU, D., THONEL, A., MAUREL, S., DIDELOT, C., GARRIDO, C. (2007). Apoptosis Versus Cell Differentiation Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, **1**: 53–60.
- LANNEAU, D., WETTSTEIN, G., BONNIAUD, P., GARRIDO, C. (2010). Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal*, **10**: 1543-1552.
- LEE, J. S., LEE, J. J., SEO, J. S. (2005). HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J Biol Chem*. **280**: 6634-6641.
- LEE, H. K., CHAUHAN, S. K., KAY, E., DANA, R. (2011). Flt-1 regulates vascular endothelial cell migration via a protein tyrosine kinase-7-dependent pathway. *Blood.*, **117**: 5762-5771.
- LEE, J., KIM, J. H., BITER, A. B., SIELAFF, B., LEE, S., TSAI, F. T. (2013). Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 8513-8518.
- LEE, M. H., CHO, Y., KIM, D. H., WOO, H. J., YANG, J. Y., KWON, H. J., YEON, M. J., PARK, M., KIM, S. H., MOON, C., THARMALINGAM, N., KIM, T. U., KIM, J. B. (2016). Menadione induces G2/M arrest in gastric cancer cells by down-regulation of CDC25C and proteasome mediated degradation of CDK1 and cyclin B1. *Am J Transl Res.*, **8**: 5246-5255.
- LEU, J. I., PIMKINA, J., FRANK, A., MURPHY, M. E., GEORGE, D. L. (2009). A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell.*, **36**: 15-27.
- LEU, J. I., PIMKINA, J., PANDEY, P., MURPHY, M. E., GEORGE, D. L. (2011). HSP70 inhibition by the small-molecule 2-phenylethynylsulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells. *Mol Cancer Res.*, **9**: 936-947.
- LI, J., TAN, M., LI, L., PAMARTHY, D., LAWRENCE, T. S., SUN, Y. (2005). SAK, a new polo-like kinase, is transcriptionally repressed by p53 and induces apoptosis upon RNAi silencing. *Neoplasia.*, **7**: 312-323.
- LI, J., QIAN, X., SHA, B. (2009). Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. *Protein Pept Lett.*, **16**: 606-612.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E. S., WANG, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**: 479-489.
- LI, X., SRINIVASAN, S.R., CONNARN, J., AHMAD, A., YOUNG, Z.T., KABZA, A.M., ZUIDERWEG, E.R., SUN, D., GESTWICKI, J.E. (2013). Analogs of the Allosteric Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Inhibitor, MKT-077, as Anti-Cancer Agents. *ACS Med Chem Lett.*, **11**: 1042-1047.
- LIU, F. H., WU, S. J., HU, S. M., HSIAO, C. D., WANG, C. (1999). Specific interaction of the 70-kDa heat shock cognate protein with the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.*, **274**: 34425-34432.
- LIU, F. Y., WANG, L. P., WANG, Q., HAN, P., ZHUANG, W. P., LI, M. J., YUAN, H. (2016). miR-302b regulates cell cycles by targeting CDK2 via ERK signaling pathway in gastric cancer. *Cancer Med.*, **5**: 2302-2313.

- LIU, Z., SUN, Q., WANG, X. (2017). PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. *Transl Oncol.*, **10**: 22-32.
- LOUW, C. A., LUDEWIG, M. H., MAYER, J., BLATCH, G. L. (2010). The Hsp70 chaperones of the Tritryps are characterized by unusual features and novel members. *Parasitol Int.*, **59**: 497-505.
- MA, X., YU, H. (2006). Global burden of cancer. *Yale J Biol Med.*, **79**: 85-94.
- MAHALINGAM, D., SWORDS, R., CAREW, J. S., NAWROCKI, S. T., BHALLA, K., GILES, F. J. (2009). Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer*, **100**: 1523-1529.
- MALONEY, A., WORKMAN, P. (2002). HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther.*, **2**: 3-24.
- MANSILLA, M. J., MONTALBAN, X., ESPEJO, C. (2012). Heat shock protein 70: roles in multiple sclerosis. *Mol Med.*, **18**: 1018-1028.
- MARTIGNANO, F., GURIOLI, G., SALVI, S., CALISTRI, D., COSTANTINI, M., GUNELLI, R., DE GIORGI, U., FOCA, F., CASADIO, V. (2016). GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Dis Markers.*, **2016**: 1-6.
- MASSEY, A. J., WILLIAMSON, D. S., BROWNE, H., MURRAY, J. B., DOKURNO, P., SHAW, T., MACIAS, A. T., DANIELS, Z., GEOFFROY, S., DOPSON, M., LAVAN, P., MATASSOVA, N., FRANCIS, G. L., GRAHAM, C. J., PARSONS, R., WANG, Y., PADFIELD, A., COMER, M., DRYSDALE, M. J., WOOD, M. (2010). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **66**: 535-545.
- MAWATARI, T., NINOMIYA, I., INOKUCHI, M., HARADA, S., HAYASHI, H., OYAMA, K., MAKINO, I., NAKAGAWARA, H., MIYASHITA, T., TAJIMA, H., TAKAMURA, H., FUSHIDA, S., OHTA, T. (2015). Valproic acid inhibits proliferation of HER2-expressing breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis through Hsp70 acetylation. *Int J Oncol.*, **47**: 2073-2081.
- MAYER, M. P. (2010). Gymnastics of Molecular Chaperones. *Molecular Cell*, **39**: 321-331.
- MAYER, M. P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci.*, **38**: 507-514.
- MAYER, M. P., BUKAU, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.*, **62**: 670-684.
- McKEON, A.M., EGAN, A., CHANDANSHIVE, J., MCMAHON, H., GRIFFITH, D.M. (2016). Novel Improved Synthesis of HSP70 Inhibitor, Pifithrin- $\mu$ . In Vitro Synergy Quantification of Pifithrin- $\mu$  Combined with Pt Drugs in Prostate and Colorectal Cancer Cells. *Molecules.*, **21**: 949.
- MENG, X. Y., ZHANG, H. H., MEZEI, M., CUI, MENG. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.*, **7**: 146-157.

- MENG, L., HUNT, C., YAGLOM, J. A., GABAI, V. L., SHERMAN, M. Y. (2011). Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene.*, **30**: 2836-2845.
- MIN, J. N., WHALEY, R. A., SHARPLESS, N. E., LOCKYER, P., PORTBURY, A. L., PATTERSON, C. (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol.*, **28**: 4018-4025.
- MIYATA, Y., LI, X., LEE, H., JINWAL, U. K., SRINIVASAN, S.R., SEGUIN, S.P., YOUNG, Z.T., BRODSKY, J.L., DICKEY, C.A., SUN, D., GESTWICK, J.E. (2013). Synthesis and Initial Evaluation of YM-08, a Blood-Brain Barrier Permeable Derivative of the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Inhibitor MKT-077, Which Reduces Tau Levels. *ACS Chem Neurosci.*, **6**: 930-939.
- MOSSER, D. D., CARON, A. W., BOURGET, L., DENIS-LAROSE, C., MASSIE, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.*, **17**: 5317-5327.
- MULTHOFF, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, **43**: 229-237.
- MULTHOFF, G., HIGHTOWER, L. E. (2011). Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones*, **16**: 251-255.
- MURPHY, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, **34**: 1181-1188.
- NADEAU, K., NADLER, S. G., SAULNIER, M., TEPPER, M. A., WALSH, C. T. (1994). Quantitation of the interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin and analogs with Hsc70 and Hsp90. *Biochemistry*, **33**: 2561-2567.
- NEWMAN, E. A., LU, F., BASHLLARI, D., WANG, L., OPIPARI, A. W., CASTLE, V. P. (2015). Alternative NHEJ Pathway Components Are Therapeutic Targets in High-Risk Neuroblastoma. *Mol Cancer Res.*, **13**: 470-482.
- NYKANEN, P., ALASTALO, T. P., AHLKOG, J., HORELLI-KUITUNEN, N., PIRKKALA, L., SISTONEN, L. (2001). Genomic organization and promoter analysis of the human heat shock factor 2 gene. *Cell Stress Chaperones*, **6**: 377-385.
- OLIE, R. A., SIMÕES-WÜST, A. P., BAUMANN, B., LEECH, S. H., FABBRO, D., STAHEL, R. A., ZANGEMEISTER-WITTKE, U. (2000). A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res.*, **60**: 2805-2809.
- PANVICHIAN, R., TANTIWETRUEANGDET, A., ANGKATHUNYAKUL, N., LEELAUDOMLIPI, S. (2015). TOP2A Amplification and Overexpression in Hepatocellular Carcinoma Tissues. *BioMed Research International.*, **2015**: 1-8.
- PAPOUTSI, Z., ZHAO, C., PUTNIK, M., GUSTAFSSON, J.A., DAHLMAN-WRIGHT, K. (2009). Binding of estrogen receptor alpha/beta heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *J Mol Endocrinol.*, **43**: 65-72.

- PARK, H. S., LEE, J. S., HUH, S. H., SEO, J. S., CHOI, E. J. (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J.* **20**: 446-56.
- PATURY, S., MIYATA, Y., GESTWICKI, J. E. (2009). Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone. *Curr Top Med Chem.*, **9**: 1337-1351.
- POCALY, M., LAGARDE, V., ETIENNE, G., RIBEIL, J. A., CLAVEROL, S., BONNEU, M., MOREAU-GAUDRY, F., GUYONNET-DUPERAT, V., HERMINE, O., MELO, J. V., DUPOUY, M., TURCQ, B., MAHON, F. X., PASQUET, J. M. (2007). Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **21**: 93-101.
- POWERS, M. V., CLARKE, P. A., WORKMAN, P. (2009). Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle*, **8**: 518-526.
- POWERS, M. V., JONES, K., BARILLARI, C., WESTWOOD, I., VAN MONTFORT, R. L., WORKMAN, P. (2010). Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle*, **9**: 1542-1550.
- QIAN, X., HOU, W., ZHENGANG, L., SHA, B. (2002). Direct interactions between molecular chaperones heat-shock protein (Hsp) 70 and Hsp40: yeast Hsp70 Ssa1 binds the extreme C-terminal region of yeast Hsp40 Sis1. *Biochem J.*, **361**: 27-34.
- RAMOS, C. H., OLIVEIRA, C. L., FAN, C. Y., TORRIANI, I.L., CYR, D. M. (2008). Conserved central domains control the quaternary structure of type I and type II Hsp40 molecular chaperones. *J Mol Biol.*, **383**: 155-166.
- RAVIOL, H., SADLISH, H., RODRIGUEZ, F., MAYER, M. P., BUKAU, B. (2006). Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J.*, **25**: 2510-2518.
- REN, A., YAN, G., YOU, B., SUN, J. (2008). Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **68**: 2266-2274.
- RITOSSA, F. (1962). A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, **18**: 571-573.
- RODINA, A., PATEL, P.D., KANG, Y., PATEL, Y., BAAKLINI, I., WONG, M.J., TALDONE, T., YAN, P., YANG, C., MAHARAJ, R., GOZMAN, A., PATEL, M.R., PATEL, H.J., CHIRICO, W., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TALELE, T.T., YOUNG, J.C., CHIOSIS, G. (2013). Identification of an allosteric pocket on human hsp70 reveals a mode of inhibition of this therapeutically important protein. *Chem Biol.*, **12**: 1469-1480.
- ROJO, F., GARCIA-PARRA, J., ZAZO, S., TUSQUETS, I., FERRER-LOZANO, J., MENENDEZ, S., EROLES, P., CHAMIZO, C., SERVITJA, S., RAMÍREZ-MERINO, N., LOBO, F., BELLOSILLO, B., COROMINAS, J. M., YELAMOS, J., SERRANO, S., LLUCH, A., ROVIRA, A., ALBANELL, J. (2012). Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Ann Oncol.*, **23**: 1156-1164.
- ROODVELDT, C., BERTONCINI, C. W., ANDERSSON, A., VAN DER GOOT, A. T., HSU, S. T., FERNÁNDEZ-MONTESINOS, R., DE JONG, J., VAN HAM, T. J., NOLLEN, E. A., POZO, D., CHRISTODOULOU, J., DOBSON, C. M. (2009). Chaperone proteostasis in

Parkinson's disease: stabilization of the Hsp70/alpha-synuclein complex by Hip. *EMBO J.*, **28**: 3758-3770.

- ROUSAKI, A., MIYATA, Y., JINWAL, U. K., DICKEY, C. A., GESTWICKI, J. E., ZUIDERWEG, E. R. (2011). Allosteric drugs: the interaction of antitumor compound MKT-077 with human Hsp70 chaperones. *J Mol Biol.*, **411**: 614-632.
- RUCHALSKI, K., MAO, H., LI, Z., WANG, Z., GILLERS, S., WANG, Y., MOSSER, D. D., GABAI, V., SCHWARTZ, J. H., BORKAN, S. C. (2006). Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J Biol Chem.*, **281**: 7873-7880.
- SAH, N.K., KHAN, Z., KHAN, G. J., B SEN, P. S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Lett.*, **244**: 164-171.
- SAMALI, A., CAI, J., ZHIVOTOVSKY, B., JONES, D. P., ORRENIUS, S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J.* **18**: 2040-2048.
- SARTO, C., BINZ, P. A., MOCARELLI, P. (2000). Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*, **21**: 1218-1226.
- SCHIRMER, E. C., QUEITSCH, C., KOWAL, A. S., PARSELL, D. A., LINDQUIST, S. (1998). The ATPase activity of Hsp104, effects of environmental conditions and mutations. *J Biol Chem.*, **273**: 15546-15552.
- SCHLECHT, R., SCHOLZ, S.R., DAHMEN, H., WEGENER, A., SIRRENBURG, C., MUSIL, D., BOMKE, J., EGGENWEILER, H.M, MAYER, M.P., BUKAU, B. (2013). Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS One.*, **8**: e78443.
- SCHLESINGER, J. M. (1990). Heat Shock Proteins. *J Biol Chem*, **265**: 12111-12114.
- SCHMITT, E., GEHRMANN, M., BRUNET, M., MULTHOFF, G., GARRIDO, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.*, **81**: 15-27.
- SCHUERMANN, J. P., JIANG, J., CUELLAR, J., LLORCA, O., WANG, L., GIMENEZ, L. E., JIN, S., TAYLOR, A. B., DEMELER, B., MORANO, K. A., HART, P. J., VALPUESTA, J. M., LAFER, E. M., SOUSA, R. (2008). Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell*, **31**: 232-43.
- SCHULTZ, N., LOPEZ, E., SALEH-GOHARI, N., HELLEDAY, T. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 4959-4964.
- SHANER, L., MORANO, K. A. (2007). All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperones*, **12**: 1-8.
- SHARMA, D., MASISON, D. C. (2009). Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept Lett.*, **16**: 571-581.
- SHARP, F. R., ZHAN, X., LIU, D. Z. (2013). Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential. *Transl Stroke Res.*, **4**: 685-692.



- SHERMAN, M., MULTHOFF, G. (2007). Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci.*, **1113**: 192-201.
- SHERMAN, M.Y., GABAI, V.L. (2015). Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene.*, **32**: 4153-4161.
- SINGH, S. (2015). Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **75**: 1-15.
- SKLIRIS, G. P., LEYGUE, E., CURTIS-SNELL, L., WATSON, P. H., MURPHY, L. C. (2006). Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer.*, **95**: 616-626.
- SMITH, M. R., WILSON, M.L., HAMANAKA, R., CHASE, D., KUNG, H., LONGO, D. L., FERRIS, D. K. (1997). Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem Biophys Res Commun.*, **234**: 397-405.
- SONDERMANN, H., SCHEUFLER, C., SCHNEIDER, C., HOHFELD, J., HARTL, F. U., MOAREFI, I. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, **291**: 1553-1557.
- SREEDHAR, A. S., KALMÁR, E., CSERMELY, P., SHEN, Y. F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.*, **562**: 11-15.
- STANKIEWICZ, A. R., LACHAPELLE, G., FOO, C. P., RADICIONI, S. M., MOSSER, D. D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.*, **280**: 38729-38739.
- STROM, E., SATHE, S., KOMAROV, P. G., CHERNOVA, O. B., PAVLOVSKA, I., SHYSHYNOVA, I., BOSYKH, D. A., BURDELYA, L. G., MACKLIS, R. M., SKALITER, R., KOMAROVA, E. A., GUDKOV, A. V. (2006). Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol.*, **2**: 474-479.
- SUN, C., LI, H. L., SHI, M. L., LIU, Q. H., BAI, J., ZHENG, J. N. (2014). Diverse roles of C-terminal Hsp70-interacting protein (CHIP) in tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.*, **140**: 189-197.
- SWAIN, J. F., DINLER, G., SIVENDRAN, R., MONTGOMERY, D. L., STOTZ, M., GIERASCH, L. M. (2007). Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol Cell.*, **26**: 27-39.
- TAIPALE, M., JAROSZ, D. F., LINDQUIST, S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**: 515-528.
- TAMM, I., WANG, Y., SAUSVILLE, E., SCUDIERO, D. A., VIGNA, N., OLTERSDFORF, T., REED, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, **58**: 5315-5320.
- TOY, W., WEIR, H., RAZAVI, P., LAWSON, M., GOEPPERT, A. U., MAZZOLA, A. M., SMITH, A., WILSON, J., MORROW, C., WONG, W. L., DE STANCHINA, E., CARLSON, K. E., MARTIN, T. S., UDDIN, S., LI, Z., FANNING, S., KATZENELLENBOGEN, J. A., GREENE, G., BASELGA, J., CHANDARLAPATY, S.

- (2017). Activating ESR1 Mutations Differentially Affect the Efficacy of ER Antagonists. *Cancer Discov.*, **7**: 277-287.
- TSAI, Y. P., YANG, M. H., HUANG, C. H., CHANG, S. Y., CHEN, P. M., LIU, C. J., TENG, S. C., WU, K. J. (2009). Interaction between HSP60 and beta-catenin promotes metastasis. *Carcinogenesis*, **30**: 1049-1057.
- TSOURLAKIS, M. C., KHOSRAWI, P., WEIGAND, P., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., MINNER, S., KOOP, C., GRAEFEN, M., HEINZER, H., WITTMER, C., SAUTER, G., KRECH, T., WILCZAK, W., HULAND, H., SIMON, R., SCHLOMM, T., STEURER, S. (2015). VEGFR-1 Overexpression Identifies a Small Subgroup of Aggressive Prostate Cancers in Patients Treated by Prostatectomy. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**: 8591-8606.
- TUNCEL, H., SHIMAMOTO, F., KANEKO GUANGYING QI, H., AOKI, E., JIKIHARA, H., NAKAI, S., TAKATA, T., TATSUKA, M. (2012). Nuclear Aurora B and cytoplasmic Survivin expression is involved in lymph node metastasis of colorectal cancer. *Oncol Lett.*, **3**: 1109-1114.
- TUTAR, Y. (2007). Therapeutic Use of Heat Shock Protein 70. *Recent Pat DNA Gene Seq.*, **1**: 125-127
- TUTAR, Y. (2006a). Heat shock proteins, substrate specificity and modulation of function. *Protein Pept Lett.*, **13**: 699-705.
- TUTAR, Y. (2006b). Key Residues Involved in Hsp70 Regulatory Activity and Affect of Co-Chaperones on Mechanism of Action. *Protein Pept Lett.*, **13**: 693-8.
- TUTAR, L., TUTAR, Y. (2010). Heat shock proteins; an overview. *Curr Pharm Biotechnol.*, **11**: 216-222.
- TUTAR, L., TUTAR, Y. (2008). Ydj1 but not Sis1 stabilizes Hsp70 protein under prolonged stress in vitro. *Biopolymers.*, **3**: 171-174.
- TUTAR, Y., SONG, Y., MASISON, D. C. (2006). Primate Chaperones Hsc70 (Constitutive) and Hsp70 (Induced) Differ Functionally in Supporting Growth and Prion Propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **172**: 851-861.
- WANG, C., CHEN, J., CAO, W., SUN, L., SUN, H., LIU, Y. (2016). Aurora-B and HDAC synergistically regulate survival and proliferation of lymphoma cell via AKT, mTOR and Notch pathways. *Eur J Pharmacol.*, **779**: 1-7.
- VAN DE WEERDT, B. C., MEDEMA, R. H. (2006). Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle.*, **8**: 853-864.
- VOGEL, M., MAYER, M. P., BUKAU, B. (2006a). Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *J Biol Chem.* **281**: 38705-38711.
- VOGEL, M., BUKAU, B., MAYER, M.P. (2006b). Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch. *Mol Cell.*, **3**: 359-367.
- WHETSTONE, H., LINGWOOD, C. (2003). 3'Sulfogalactolipid binding specifically inhibits Hsp70 ATPase activity in vitro. *Biochemistry*, **42**: 1611-1617.

- WHITESELL, L., LINDQUIST, S. (2009). Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin Ther Targets.*, **13**: 469-478.
- WHITLEY, D., GOLDBERG, S. P., JORDAN, W. D. (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J. Vasc. Surg.*, **29**: 748–751.
- WILLIAMS, D. R., KO, S. K., PARK, S., LEE, M. R., SHIN, I. (2008). An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70. *Angew Chem Int Ed Engl.*, **47**: 7466-7469.
- WILLIAMSON, D. S., BORGOGNONI, J., CLAY, A., DANIELS, Z., DOKURNO, P., DRYSDALE, M. J., FOLOPPE, N., FRANCIS, G. L., GRAHAM, C. J., HOWES, R., MACIAS, A. T., MURRAY, J. B., PARSONS, R., SHAW, T., SURGENOR, A. E., TERRY, L., WANG, Y., WOOD, M., MASSEY, A. J. (2009). Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem.*, **52**: 1510-1513.
- WRIGHT, C. M., SEGUIN, S. P., FEWELL, S. W., ZHANG, H., ISHWAD, C., VATS, A., LINGWOOD, C. A., WIPF, P., FANNING, E., PIPAS, J. M., BRODSKY, J. L. (2009). Inhibition of Simian Virus 40 replication by targeting the molecular chaperone function and ATPase activity of T antigen. *Virus Res.*, **141**: 71-80.
- YAGLOM, J., O'CALLAGHAN-SUNOL, C., GABAI, V., SHERMAN, M. Y. (2003). Inactivation of dual-specificity phosphatases is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinases by heat shock and hsp72. *Mol Cell Biol.*, **23**: 3813-3824.
- YAGLOM, J. A., GABAI, V. L., SHERMAN, M. Y. (2007). High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res.*, **67**: 2373-2381.
- YANG, X., WANG, J., ZHOU, Y., WANG, Y., WANG, S., ZHANG, W. (2012). Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.*, **321**: 137-143.
- YI, F., REGAN, L. (2008). A Novel Class of Small Molecule Inhibitors of Hsp90. *ACS Chem. Biol.*, **3**: 645–654.
- YOUNG, J. C. (2010). Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol.* **88**: 291-300
- YOUNG, J. C., AGASHE, V. R., SIEGERS, K., HARTL, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **5**: 781-791.
- YUAN, X. M., LI, W., DALEN, H., LOTEM, J., KAMA, R., SACHS, L., BRUNK, U. T. (2002). Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 6286-6291.
- ZENG, F., TEE, C., LIU, M., SHERRY, J.P., DIXON, B., DUNCKER, B.P., BOLS, N.C. (2014). The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethynesulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells. *Aquat Toxicol.* **146**: 45-51.
- ZENG, Y., CAO, R., YANG, J., LI, X., LI, S. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of novel HSP70 inhibitors: N, N'-disubstituted thiourea derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, **119**: 83-95.

- ZHANG, F., WANG, X., XU, X., LI, M., ZHOU, J., WANG, W. (2016). Reconstituted high density lipoprotein mediated targeted co-delivery of HZ08 and paclitaxel enhances the efficacy of paclitaxel in multidrug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci.*, **92**: 11-21.
- ZORZI, E., BONVINI, P. (2011). Inducible Hsp70 in the Regulation of Cancer Cell Survival: Analysis of Chaperone Induction, Expression and Activity. *Cancers*, **3**: 3921–3956.
- ZUIDERWEG, E. R., BERTELSEN, E. B., ROUSAKI, A., MAYER, M. P., GESTWICKI, J. E., AHMAD, A. (2013). Allosteric in the Hsp70 chaperone proteins. *Top Curr Chem.*, **328**: 99-153.
- ZYLICZ, M., WAWRZYNOW, A. (2001). Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life*, **51**: 283-287.



# ÖZGEÇM

## I- KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı:** Mustafa

**Soyadı:** Ergül

**Doğum yeri ve tarihi:** Kayseri / 07.12.1984.

**İletişim adresi:** Cumhuriyet Üniv. Eczacılık Fak. Biyokimya A.D. Kampüs/Sivas.

**Halen Görevi:** Araştırma Görevlisi.

**Telefon:** (0346) 2191010

**E-mail:** m.ergul@yahoo.com.tr, mergul@cumhuriyet.edu.tr

## II- EĞİTİM

**2013-Halen:** Doktora. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

**2009-2012:** Yüksek Lisans. Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

**2003-2008:** Lisans. Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya.

**Yabancı dil:** İngilizce (ÜDS Puan: 73,75).

## III- ÜNVANLARI

**2012:** Araştırma Görevlisi.

#### IV- MESLEK DENEY M

**2012:** Cumhuriyet Üniversitesi Ecacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Ara tırma Görevlisi.

#### V- B L MSEL LG ALANLARI

##### **Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

**Mustafa Ergül**, Merve Ergül, Yusuf Tutar. (2013). Important Anti-Cancer Applications of Protein Based Nanoparticles. *Current Proteomics*. 10, 334-340.

##### **SCI, SCI-Expanded, SSCI ve AHCI kapsamında olmayan dergilerdeki yayınlar:**

Ahmet Altun, **Mustafa Ergül**, Ali Kemal Filiz, Mesut Parlak, Merve Ergül, Tijen Kaya Temiz. (2014). The Effects of Daily Repeated Magnetic Field on S-Nitroso-Nacetyl-DL penicillamine Induced Hyperalgesia. *Cumhuriyet Medical Journal*. 36: 310-319.

Nergiz Hacer Turgut, Ahmet Altun, Haki Kara, Bekta Tepe, Merve Ergül, **Mustafa Ergül**, Necati Barı , Tuncel, Ne e Yılmaz Tuncel. (2016). Anticancer and antiangiogenic effects of methanol extracts of *Lonicera caprifolium* L. on C6 rat glioma cells. *Cumhuriyet Medical Journal*. 38: 6-19.

##### **Kongrelerde sunulan ve aynı kapsamdaki kongre kitaplarında özeti yayınlanan bildiriler:**

Gulderen Karakus, **Mustafa Ergul**. Synthesis, Characterization, Cytotoxic Potential on L929, and Antiproliferative Activity on T98G, of Poly(maleic anhydride-co-vinyl acetate)/cis-Platin Conjugate. *2 nd international bau-drug design symposium*. P-56, pp. 130. stanbul, 17-18-19 April 2014.

Nergiz Hacer Turgut, Ahmet Altun, Haki Kara, Bekta Tepe, Merve Ergül, **Mustafa Ergül**, Necati Barı Tuncel, Ne e Yılmaz. C6 sıçan glioma hücreleri üzerinde

Lonicera caprifolium L. Metanol ekstraktlarının anti-kanser ve anti-anjiyogenik etkileri. 23. *Ulusal Farmakoloji Kongresi* Ankara, 7-10 Eylül 2015.

## **VI- B L MSEL ETK NL KLER**

### **Projeler:**

Meme Kanseri Hücrelerinde Hsp70 inhibitörünün Anti-Kanser Etkilerinin Araştırılması (BAP- 15L0237006, Araştırmacı).

Prostat Kanseri Üzerinde Siklosporin-A'nın Apoptotik Etki Mekanizması (BAP-ECZ-003, Araştırmacı).

### **Verdiği Seminerler:**

MikroRNA (miRNA)'ların Yapıları, Fonksiyonları ve Kanserdeki Önemleri (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Nano-Taşıyıcılar ve Doku Hedefleme Stratejileri (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)