



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**MEME KANSERİ VE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE
BIBR1532'NİN EPİTELYAL MEZENKİMAL TRANSİZYON ÜZERİNE
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Alican KUŞOĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Adı
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MEME KANSERİ VE MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE
BIBR1532'NİN EPİTELYAL MEZENKİMAL TRANSİZYON ÜZERİNE
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Alican KUŞOĞLU

Danışman(lar)
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Adı
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

Üye : Doç.Dr. Ashı TETİK VARDARLI

Yüksek Lisans Tezinin Kabul edildiği tarih: 23.01.2020

Önsöz

Tezin başlangıç aşaması olarak kabul edebileceğimiz hipotez sorularının oluşturulmasından, tez deneylerinin analiz edilerek sonuca bağlandığı bölümün sonuna kadar yaptığımız çalışmalardan keyif aldım. Bu çalışma sayesinde gelecekte başarılı bir bilim insanı olma yolunda, literatür bilgisini de kullanarak bilinmeyenleri keşfetmek üzere soru sormayı öğrendim. Sorularına cevap bulmak adına yine literatürden yararlanarak deney planı yapmayı, bu deneyleri kesinlik içerisinde gerçekleştirmeyi ve sonuçlarını analiz etmeyi öğrendim. Sonuç olarak bilim dünyasına literatür bilgisi olarak katkı sağlayacağını düşündüğüm bu çalışmayı tamamladığım için mutluyum.

İzmir, 29.01.2020

Alican KUŞOĞLU

Özet

Meme Kanseri Ve Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Telomeraz İnhibitörü BIBR1532'nin Epitelyal Mezenkimal Transizyon Üzerine Potansiyel Moleküler Etkilerinin İncelenmesi

Kanser kök hücreleri (KKH) tümör dokusunda bir alt popülasyon olarak yer alan ve tümör oluşturma kapasitesine sahip, aynı zamanda tedavi direncine neden olan hücre grubudur. Tümör heterojenitesine katkı sağlayan KKH'leri, günümüzde kanser tedavisinin tam olarak başarılı olamamasının sebepleri arasında gösterilmektedir. Bu hücrelerin kanser tedavisinde bir hedef haline gelmesi ilgi çekici bir konudur.

Yüksek telomeraz aktivitesi ile yüksek migrasyon ve invazyon kabiliyetleri sonucunda metastaza neden olmaları KKH'lerinin ortak özellikleri olarak kabul edilmektedir. Kemoterapötik ajanların sağlıklı dokuya hasar vermesi ve KKH'lerinin tedaviye direnç oluşturmaları yeni terapötik hedef arayışı ihtiyacını doğurmaktadır. Seçici bir küçük molekül inhibitörü olan BIBR1532, telomerazı inhibe ederek kanser hücrelerinin etkili bir şekilde hedeflenmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yanında, yapılan son çalışmalar telomerazın epitelyal mezenkimal transizyon (EMT) ile ilişkili olduğunu savunmaktadır. Epitel hücrelerin mezenkimal bir morfoloji kazanmasına sebep olan EMT programının, kanser metastazında etkili olduğu bilinmektedir. Meme kanseri hücrelerinde telomerazın baskılanarak EMT mekanizmasının sekteye uğratılması çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır. Çalışmamızda, meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 ve MCF-7, meme kanseri kök hücreleri ve meme epitel kök hücrelerinde telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin sitotoksitesisi bulunmuş ve maddenin apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Yara iyileşme testiyle BIBR1532'nin hücrelerin migrasyon hızına etkisi incelenmiş, asılı damla deneyi ile sphere oluşturma kapasiteleri gözlenmiştir. Son olarak EMT ilişkili 84 genin ekspresyonları gerçek zamanlı qPCR ile analiz edilmiştir.

BIBR1532 etken maddesinin MDA-MB-231 ve MEKH'leri için IC_{50} değerleri 72. saatte sırasıyla 18,04 ve 38,71 μ l olarak analiz edilmiştir. Etken maddenin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde apoptotik bir etkisi gözlenmezken, MKKH ve MEKH'leri üzerinde kontrole göre sırasıyla %26.5 ve %32.2 oranında apoptoz görülmüştür. Etken maddenin MEKH'leri üzerindeki etkisi ilk kez araştırılmıştır ve ilacın kök hücreler üzerinde apoptotik bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Asılı damla

deneyi ile incelenen sphere yapıları ise, BIBR1532 uygulanan kök hücrelerde kontrol grubuna göre küçülmüştür. Yara iyileşme deneyinde etken maddenin kök hücreler üzerindeki migrasyon hızını azaltıcı etkisinin kanser hücrelerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. BIBR1532 uygulanan hücre hatlarında EMT ilişkili genlerin regüle olması ise telomeraz inhibisyonunun EMT mekanizmasını etkilediğini göstermektedir. Kanser tedavisinde KKH'lerinin telomeraz inhibisyonuyla hedefli eliminasyonu, kanser hücrelerinin EMT mekanizmasına bağlı olarak hareket yeteneğini ve köklülüğünü sınırlandırabilmektedir. Yüksek telomeraz aktivitesiyle korele meme kanserinde, metastazın önlenmesi ve kanser nüksünün önüne geçilebilmesi açısından umut verici bir adım olabilir.

Anahtar Kelimeler; BIBR1532; meme kanseri kök hücresi; telomeraz; EMT

Abstract

Investigation Of The Potential Molecular Effects Of Telomerase Inhibitor "BIBR1532" On Epithelial-Mesenchymal Transition In Breast Cancer And Breast Cancer Stem Cells

Cancer stem cells (CSCs) are a subgroup of cells that are involved in tumor tissue as a subpopulation and are capable of forming tumors and cause treatment resistance. CSCs, which contribute to tumor heterogeneity, are now considered as one of the reasons why cancer treatment is not fully successful. It is an attractive issue to target these cells to increase the efficiency of cancer therapies.

CSCs which have the common features of high telomerase activity and high migration and invasion capabilities are accepted as the initiator of metastasis. The fact that chemotherapeutic agents damage healthy tissue and CSCs are resistant to standard treatment raises the need for new therapeutic targets. BIBR1532, a selective small molecule inhibitor, enables effective targeting of cancer cells by inhibiting telomerase. Moreover, recent studies have suggested that telomerase is associated with epithelial mesenchymal transition (EMT). EMT program, which causes epithelial cells to acquire a mesenchymal morphology, is known to play a role in cancer metastasis. The hypothesis of our study is that suppression of telomerase in breast cancer cells would result in interruption of EMT mechanism. In our study, the cytotoxicity of telomerase inhibitor BIBR1532 was found in breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7, breast cancer stem cells and breast epithelial stem cells and the effects of the substance on apoptosis were investigated. The effect of BIBR1532 on the migration rate of cells was examined by wound healing test and sphere forming capacities were observed with hanging drop test. Finally, the expression of 84 EMT-related genes was analyzed by real-time qPCR.

The IC₅₀ values for the MDA-MB-231 and BESC of the active substance BIBR1532 were calculated as 18.04 and 38.71 μ l at 72 hours, respectively. While the apoptotic effects of the active substance on MDA-MB-231 and MCF-7 cells were not observed, apoptosis was found in BCSCs and BESC as 26.5% and 32.2%, respectively. The effect of the active substance on BESC was investigated for the

first time and the drug had an apoptotic effect on stem cells. The sphere structures examined by the hanging drop test which showed that sphere areas were reduced in stem cells treated with BIBR1532 compared to the control group. In wound healing assay, we observed that active substance decreased the migration rate of stem cells more efficiently than cancer cells. The regulation of EMT-related genes in BIBR1532-treated cell lines indicated that telomerase inhibition affects the EMT mechanism. The targeted elimination of CSCs by telomerase inhibition in cancer treatment may limit the mobility and stemness of cancer cells due to the EMT mechanism. In breast cancer which is correlated with high telomerase activity, it can be a promising step in preventing metastasis and preventing cancer recurrence.

Keywords; BIBR1532, breast cancer stem cell, telomerase, EMT



İçindekiler

Önsöz.....	I
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Şekiller Dizini	X
Kısaltma Listesi.....	XII
1. Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	3
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Kansere Genel Bakış.....	4
2.2. Meme Kanseri	4
2.3. Kök Hücre ve Tipleri	5
2.3. Kanser Kök Hücresi.....	6
2.4. Meme Kanseri Kök Hücresi.....	7
2.5. Telomeraz	7
2.5.1. Telomer Yapısı ve Telomeraz Enzimi	7
2.5.2. Telomer ve Telomeraz Fonksiyonları	9
2.5.3. Telomerazla İlişkili Hastalıklar ve Kanser	9
2.5.4. Telomeraz İnhibitörleri	10
2.6. BIBR1532 Molekülü ve Etki Mekanizması	10
2.7. Epitelyal Mezenkimal Transizyon	11
2.8. Kanser Hücrelerinde Migrasyon ve İnvazyon.....	12
2.9. EMT ve Telomeraz İlişkisi	13
3. Gereç ve Yöntem	14
3.1. Hücre Kültürü	14
3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması	14

3.1.2. Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon).....	15
3.1.3. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	16
3.1.4. Hücre Canlılık Tayini	16
3.2. BIBR1532 Etken Maddesinin Hazırlanması	17
3.3. Hücre Proliferasyon Deneyi	17
3.4. Sitotoksikite Testleri.....	18
3.5. Apoptoz Analizi	18
3.5.1. Annexin V Yöntemi.....	18
3.6. Migrasyon Deneyi	20
3.7. BIBR1532 Uygulanan Hücre Hatlarında Asılı Damla Deneyi.....	20
3.8. Gen Ekspresyonu Analizi	21
3.8.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu	21
3.8.2. RNA Miktar ve Safılıklarının Ölçümü.....	22
3.8.3. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi.....	22
3.8.4. Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi.....	23
4. Bulgular.....	30
4.1. MDA-MB-231, MCF-7, MKKH ve MEKH Hatlarının Çoğaltılması	30
4.2. Uygun Hücre Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	32
4.3. BIBR1532'nin Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	32
4.3.1. BIBR1532'nin MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	32
4.3.2. BIBR1532'nin MEKH Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	33
4.4. BIBR1532'nin Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	34
4.5. BIBR1532'nin Hücre Hatlarında Migrasyon Üzerine Etkisi	38
4.6. BIBR1532 Uygulanan ve Kontrol Hücre Gruplarında Asılı Damla Deneyi....	48
4.7. BIBR1532'nin Hücre Hatlarında Meydana Getirdiği EMT İlişkili Gen Ekspresyon Değişimlerinin İncelenmesi	55
5. Tartışma	66
6. Sonuç ve Öneriler	72
7. Kaynaklar	73
Teşekkür	Error! Bookmark not defined.
Özgeçmiş	Error! Bookmark not defined.

Tablolar Dizini

Tablo 1. EMT plakasında bulunan genler ve tanımları.....	24
Tablo 2. EMT plakası gen dizilimi	29
Tablo 3. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında EMT ilişkili genlerin ısı haritası	56
Tablo 4. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi.....	56
Tablo 5. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında EMT ilişkili genlerin ısı haritası.....	59
Tablo 6. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi.....	59
Tablo 7. BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili genlerin ısı haritası.....	62
Tablo 8. BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi.....	62
Tablo 9. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde EMT ilişkili genlerin ısı haritası	65
Tablo 10. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi.....	65

Şekiller Dizini

Şekil 1. Hücre hatlarının 10x büyütmede inverted mikroskop görüntüleri A) MDA-MB-231, B) MCF-7, C) MKKH, D) MEKH	31
Şekil 2. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 72. saatte canlılık/doz grafiği	33
Şekil 3. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde 72. saatte canlılık/doz grafiği	34
Şekil 4. BIBR1532 etken maddesinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	35
Şekil 5. BIBR1532 etken maddesinin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	36
Şekil 6. BIBR1532 etken maddesinin MKKH'leri üzerindeki apoptotik etkisi	37
Şekil 7. BIBR1532 etken maddesinin MEKH'leri üzerindeki apoptotik etkisi	37
Şekil 8. Etken madde uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	39
Şekil 9. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	40
Şekil 10. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları	40
Şekil 11. Etken madde uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	41
Şekil 12. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MCF-7 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	42
Şekil 13. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları	42
Şekil 14. Etken madde uygulanmayan MKKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	43
Şekil 15. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MKKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	44
Şekil 16. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MKKH'lerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları	44
Şekil 17. Etken madde uygulanmayan MEKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	45
Şekil 18. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MEKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi	46

Şekil 19. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MEKH'lerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları.....	46
Şekil 20. Etken madde uygulanmayan kontrol hücre gruplarında 24. ve 48. saatlerde yara kapanma oranlarının karşılaştırılması	47
Şekil 21. BIBR1532 uygulanan hücre gruplarında 24. ve 48. saatlerde yara kapanma oranlarının karşılaştırılması.....	47
Şekil 22. BIBR1532 etken maddesinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi.....	49
Şekil 23. BIBR1532 etken maddesinin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi	50
Şekil 24. BIBR1532 etken maddesinin MKKH'leri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi	51
Şekil 25. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MKKH'lerinde oluşan sphere alanlarının karşılaştırılması	52
Şekil 26. BIBR1532 etken maddesinin MEKH'leri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi	53
Şekil 27. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MEKH'lerinde oluşan sphere alanlarının karşılaştırılması	54
Şekil 28. MKKH ve MEKH'lerinin 10 gün sonunda kontrol ve doz gruplarındaki sphere alan değişiminin karşılaştırılması	54
Şekil 29. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında EMT ilişkili genlerin clustergram analizi	55
Şekil 30. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında EMT ilişkili genlerin clustergram analizi	58
Şekil 31. BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili genlerin clustergram analizi	61
Şekil 32. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde EMT ilişkili genlerin clustergram analizi	64

Kısaltma Listesi

ALDH : Aldehid dehidrogenaz

AML : Akut Myeloid Lösemi

Apaf-1 : Apoptoz aktive edici faktörü

BRCA1: Meme kanseri geni 1

BRCA2: Meme kanseri geni 2

°C: Santigrat

dk: Dakika

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

ER: Östrojen reseptörü

FBS: Fötal sığır serumu

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FITC: Floresein izotiyosiyanat

gr: Gram

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü

hTERT: İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz

IC₅₀ : İnhibitör Konsantrasyon Oranı

ICM : İç Hücre Kütleli

kDa: kilodalton

KKH: Kanser kök hücreleri

Log: Logaritma

MACS : Manyetik aktif hücre ayırma

MKKH: Meme kanser kök hücreleri

MEKH: Meme epitel kök hücreleri

mM: Milimolar

nm: Nanometre

nM: Nanomolar

PBS: Fosfat buffer saline

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PI: Propidium Iodide

POT1: Telomerlerin korunması-1

PR: Progesteron hormon reseptörü

PS: Fosfatidilserin

RAP1: Maya telomerik proteini Rap1'in insan homologu

Rap1: Ras ilişkili protein 1

rpm: Dakikada devir sayısı

RT-qPCR: Gerçek zamanlı kantitatif PCR

TERC: Telomeraz RNA Bileşeni

TIN2: TRF1 ile etkileşen protein 2

TNF: Tümör nekroz faktörü

TPP1: Tripeptidyl peptidaz 1

TRF1: Telomer tekrar faktörü-1

TRF2: Telomer tekrar faktörü-2

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WST-1: Suda çözünebilen tetrazolyum tuzu

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

1. Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Dünyada kadınlar arasında en sık görülen meme kanseri, her yıl binlerce insanın ölümüne neden olmaktadır. Tedavilerin yetersizliği ve yan etkileri, hastalığın nüksü ve metastaz halen kanserin önüne geçilmesini engelleyen etmenlerdir.

Tümör içerisinde kendini yenileyip farklılaşabilen, tedaviye direnç gösteren ve invazyon kabiliyeti yüksek bir alt grup bulunmaktadır. KKH'si denen bu hücrelerin, tümörün büyümesine, kanserin nüksüne, ilaç direnci ve metastaza neden olduğu savunulmaktadır. İlk kez 2003 yılında keşfedilen MKKH'leri, CD44⁺, CD24⁻ yüzey antijenleri ile yüksek invazyon, migrasyon ve proliferasyon kapasitesiyle karakterizedir. Wnt, Notch gibi köklülük ve farklılaşma ile ilişkili sinyal yollarının yanında SOX2, c-MYC gibi kök hücre ilişkili transkripsiyon faktörleri MKKH'lerinde aktif bir rol oynamaktadır. Meme kanseri tedavisindeki en büyük engellerden biri MKKH'lerinin neden olduğu düşünülen metastazdır. Metastaz hastalığın tedavisini zorlaştırmakta, çoklu ilaç direnci gelişimine yer hazırlamaktadır. EMT mekanizması, meme kanseri hücrelerinin metastatik özellikler kazanmalarında önemli bir rol oynamaktadır. MKKH'lerinin EMT ile migrasyon ve invazyon kabiliyetlerini arttırarak farklı dokulara göçebildiği vurgulanmaktadır. Bunun yanında, EMT mekanizmasının hücrelerin köklülük özelliklerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Kanser hücrelerinde yüksek oranda aktif olduğu bilinen telomeraz, terapötik bir hedef haline gelmiştir. hTERT aktif bölgesinin inhibisyonuyla telomeraz aktivitesini durduran BIBR1532 spesifik bir moleküldür. Meme kanseri hücrelerinde etkili olduğu önceki çalışmalarda bildirilen molekülün yan etkilerinin azlığı, BIBR1532'nin önemli özelliklerinden biridir. Yapılan çalışmalar, EMT mekanizmasıyla telomeraz aktivitesi arasında bir ilişki olduğuna işaret etmekte, yüksek telomeraz aktivitesinin EMT programını başlatıcı bir etkisinin olduğunu savunulmaktadır. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip ve migrasyon, invazyon yetenekleri gelişmiş bu hücrelerin KKH özellikleri taşıdığı düşünülmektedir. Bununla beraber, meme kanserinde telomeraz aktivitesinin durdurulması ile EMT mekanizması arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir çalışma yoktur.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin MDA-MB-231 ve MEKH'leri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 testiyle belirlenecektir. Etken maddenin 4 hücre hattı üzerindeki olası apoptotik etkileri Annexin V testiyle araştırılacaktır. Etken maddenin hücreler üzerindeki sphere oluşturma kapasitesine etkisi asılı damla deneyi ile gözlemlenecektir. BIBR1532'nin hücrelerin migrasyon yetenekleri üzerindeki olası etkisi yara iyileşme deneyiyle incelenecek, EMT mekanizmasıyla ilişkili genlerin ekspresyonları ise gerçek zamanlı qPCR yöntemiyle kontrol grubuyla karşılaştırılarak analiz edilecektir. Çalışmamızda, telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu bilinen meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerinde, telomeraz inhibisyonunun hücrelerin migrasyon yeteneklerini etkileyeceğini ve EMT mekanizmasını düzenleyeceğini düşünmekteyiz.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Etken madde uygulanan hücrelerde EMT ilişkili genlerin regüle olması, telomeraz inhibisyonunun EMT mekanizmasıyla ilişkili olduğunu gösterecektir. Yüksek telomeraz aktivitesinin hücelere hareket ve başka dokulara göç etme potansiyeli kazandırabileceğini bilindiğinden, telomeraz inhibisyonunun hücrelerin hareket kabiliyetlerini azaltacağını varsaymaktayız.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda kullanılan hücrelerin iki boyutlu hücre kültürü ortamında çoğaltılması ve ileri aşama deneylerin iki boyutlu hücre kültüründe yetişen hücrelerle gerçekleştirilmesi araştırmamızın sınırlanırını oluşturmaktadır zira aktif EMT mekanizması sonucunda hareket yeteneği kazanarak başka bölgelere göçen hücrelerin gözlemlenmesi mümkün olmayacaktır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızın amacı meme kanseri hücreleri üzerinde BIBR1532 etken maddesini kullanarak telomeraz aktivitesini inhibe etmek ve telomeraz inhibisyonunun hücrelerdeki EMT mekanizmasıyla ilişkisini gen ekspresyonu düzeyinde araştırmaktır.



2. Genel Bilgiler

2.1. Kansere Genel Bakış

Kanser, 2018 yılında dünya genelinde 9.6 milyon insanın ölümüne yol açan tehlikeli bir hastalıktır. Amerika'daki ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer alan ve insidansı her geçen yıl artan kanserin, erkeklerde görülme sıklığının kadınlara göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir. 2012 verilerine göre yeni kanser vakalarının %57'si gelişmemiş ülkelerde görülürken, kansere bağlı ölümlerin %65'i yine bu ülkelerde gerçekleşmiştir(World Health Organization, 2018). 2018 yılında dünyada 2.1 milyon yeni vaka ile başı çeken akciğer kanserini 2 milyon yeni vakayla meme kanseri takip etmektedir. Sırasıyla kolon, prostat ve mide kanseri en çok görülen kanser tipleridir. Bununla beraber, akciğer kanseri 1.76 milyon insanın ölümüne yol açmış, kolon (862 000 ölüm), mide (783 000 ölüm) ve meme kanseri (627 000 ölüm) ise ölümlerle sonuçlanan kanser türlerinde başı çekmiştir(WHO, 2018).

Mutasyonlar sonucu protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin işlevini yitirmesi, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmalarına neden olarak kansere sebebiyet vermektedir. Hayatta kalma mekanizmalarının yüksek oranda aktif olduğu kanser hücreleri, şartlar büyümelerini engelleyecek kadar yetersiz olduğunda başka dokulara göç edip metastaza neden olmaktadır. Kansere bağlı ölümlerin en önemli sebebi kabul edilen tümör metastazı, hastalar ve klinisyenler için tedavi sürecinde zorluk çıkarmaktadır(Gupta ve Massague, 2006; Tabassum ve Polyak, 2015).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri olgularının büyük bir çoğunluğu karsinomdur. Epitel hücrelerinden köken alan kanser tipi olan karsinom, komşu dokulara yayılma özelliği gösteriyorsa invaziv meme kanseri olarak adlandırılır. İn situ meme kanseri çevre dokulara yayılmamaktadır. Klinikte en çok karşılaşılan meme kanseri türü kanserin başladığı bölgeden adını alan invaziv duktal karsinomdur. Duktal karsinoma in situ, lobüler karsinoma in situ, invaziv lobüler karsinom ve inflamatuvar meme kanseri en sık görülen diğer tiplerdir(American Cancer Society, 2017).

İnvaziv meme kanseri, moleküler olarak östrojen reseptörü pozitif (ER+), progesteron reseptörü pozitif (PR+), HER2 pozitif ve üçlü (triple) negatif meme

kanseri olarak dört ana tip altında incelenmektedir. ER+ ve PR+ meme kanseri tipleri hormon tedavisine cevap verebilen grubu oluşturmakta, üçlü negatif alt tipi ise hormon tedavisine cevap vermeyen ve bir hayli invaziv olan meme kanseri türüdür(American Cancer Society, 2011; Cancer Genome Atlas Network ve ark., 2012). İstatistikler, BRCA1 geninde meydana gelen mutasyonların meme kanseri riskini %72 arttırdığını, BRCA2 genlerinde görülen mutasyonların ise riski %69'a kadar arttırabildiğini göstermektedir(American Cancer Society, 2011).

2.3. Kök Hücre ve Tipleri

Mitozla çoğalma, kendini yenileme, başka hücre tiplerine farklılaşma ve doku onarımı gibi yetenekleri ile öne çıkan kök hücrelerin ilk tanımı, 19. yüzyıl sonunda evrim bilimci ve zoolog Ernst Haeckel tarafında yapılmıştır. Daha sonra kök hücrelerin embriyonik gelişim dönemindeki öneminin August Weismann tarafından keşfedilmesiyle, kök hücre biyolojisini aydınlatma çalışmaları hız kazanmıştır(Ramalho-Santos ve Willenbring, 2007).

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak ikiye ayrılır. Embriyonik kök hücreler iç hücre kitlesinden (Inner Cell Mass-ICM) izole edilir ve endoderm, mezoderm ve ektodermi oluşturan hücrelere farklılaşma kabiliyetine sahiptirler. Embriyonik olmayan kök hücreler ise erişkin, kordon kanı, fetal ve uyarılmış kök hücreler olarak gruplandırılır(Brien-ball ve Biddle, 2017). Kök hücrelerin diğer hücrelere farklılaşma kabiliyeti potens olarak adlandırılır. Farklılaşma kapasitelerine göre ise kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak beş gruba ayrılmaktadır(Morgani ve Brickman, 2014).

Embriyonik ve ekstraembriyonik hücrelere farklılaşma yeteneğine sahip totipotent kök hücreler sadece zigot ve blastomer aşamasına kadar bölünen hücrelerden oluşmaktadır. Dolayısıyla totipotent kök hücreler eksiksiz olarak bir canlıyı oluşturma yeteneğine sahiptir. Embriyonik kök hücreler, 200'den fazla hücreye dönüşebilme kapasitesiyle pluripotent kök hücreleri oluştururlar. İlk kez deri hücrelerinin yeniden programlanmasıyla oluşturulan uyarılmış kök hücreler de pluripotent kök hücre grubuna girer. Multipotent kök hücreler ise sadece yakından ilişkili oldukları hücre tiplerine farklılaşabilir. Mezenkimal kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler, multipotent özelliktedir. Unipotent hücreler ise sadece

bir hücre grubuna dönüşebilen kök hücreleri oluşturmaktadır(Brien-ball ve Biddle, 2017; Morgani ve Brickman, 2014).

2.3. Kanser Kök Hücreleri

İlk olarak Bonnet ve Dick tarafından 1997 yılında Akut Myeloid Lösemi (AML) hücrelerinin bir alt popülasyonundan izole edilen kanser kök hücreleri (KKH), normal kök hücreler gibi kendini yenileme ve farklılaşma kabiliyetine sahiptir. Kanser başlatan hücre olarak da bilinen KKH'lerinin terapi direncinde önemli bir rol oynadığı vurgulanırken, yüksek migrasyon ve invazyon yetenekleriyle birlikte metastaza neden oldukları düşünülmektedir(Nandy ve Lakshmanaswamy, 2017).

Genetik ve epigenetik değişimler sonucu tümör heterojenitesine neden olduğu birçok kanser tipinde gösterilmiştir(Fulawka, Donizy, ve Halon, 2014).

Kanser türüne göre farklılık gösteren KKH'lerinin tespiti ve izolasyonu spesifik yüzey belirteçleri kullanılarak akış sitometrisi, sphere formation, manyetik aktif hücre ayırma (MACS) ve ksenotransplantasyon yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir(Clevers, 2017; Clevers, 2011). Çalışmalarda CD44, CD133, CD166, EpCAM gibi yüzey ve aldehid dehidrojenaz (ALDH) gibi sitozolik KKH belirteçlerine yer verilmekle birlikte, henüz tüm KKH'leri kapsayan bir belirteç bulunamamıştır(Clevers, 2011).

Kanser kök hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel tedavi yöntemlerine dirençli oluşu, KKH'lerinde DNA tamir mekanizmalarının son derece aktif oluşu, ABC taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu ve hücrelerin uygun olmayan çevre koşullarına adapte olabilmesiyle açıklanmaktadır(Battle ve Clevers, 2017). Migrasyon ve invazyon yeteneklerine sahip olan KKH'lerin intravazasyon ve ekstrasvazasyon gibi metastazın basamaklarını oluşturan fenomenlerin gerçekleşmesinde avantajlı oldukları belirtilmekte, kanser tedavisinde en büyük engellerden birini oluşturan metastazın KKH'leri hedefleyen tedavi yöntemleriyle engellenebileceği düşünülmektedir(Yoshida ve Saya, 2016). Telomeraz enziminin aşırı aktivasyonu, apoptozdan kaçış ve hipoksik mikroçevreye uyum gibi fenomenler KKH'leriyle karakterize edilmiştir(Lipinska ve ark., 2017).

2.4. Meme Kanseri Kök Hücreleri

Asimetrik olarak bölünüp çoğalan ve tümör dokusunda heterojeniteye neden olan KKH'lerin kanser relapsına neden olduğu düşünülmektedir. Al-Hajj ve arkadaşları tarafında 2003 yılında spesifik CD44 pozitif CD24 negatif yüzey belirteçleriyle karakterize edilen meme kanseri kök hücrelerinin (MKKH), immün sistemi baskılanmış farelerde tümör oluşturabildiği gözlenmiştir(Al-Hajj, 2003). Kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip MKKH'lerinde ALDH pozitif fenotipin tümorojenik özelliğinin çok fazla olduğu vurgulanmaktadır(Luo ve ark., 2015).

Bir transmembran glikoproteini olan CD44 reseptörü, hücre iskeleti proteinleri ve hücre hareketini etkileyen proteinlerin gen ekspresyonlarını değiştiren önemli bir sinyal molekülüdür(Yoshida ve Saya, 2016). CD44 ve izoformlarının meme kanserinin yanında kolon ve karaciğer gibi kanser türlerinde tek başına veya diğer yüzey belirteçleriyle kullanılması KKH'lerin tanımlanmasında güvenilir bir kaynak oluşturmaktadır(Phillips, McBride, ve Pajonk, 2006; Yoshida ve Saya, 2016).

Sağlıklı kök hücrelerinde embriyogenez sırasında aktif olan Wnt, Notch, Hedgehog gibi sinyal yollarının ve TGF- β , VEGF gibi reseptör kinazların aktivasyonu, MKKH'lerinin köklülük özellikleriyle, invazyon ve migrasyon gibi metastaza neden olabilen hareket yeteneklerini geliştirmektedir(Battle ve Clevers, 2017; Koury, Zhong, ve Hao, 2017). Bununla beraber, MKKH'lerinin kemoterapi sırasında proliferasyonu durdurup, sessiz (quiescent) kalmalarında ve daha sonra tümör relapsına neden olmalarında TGF- β molekülünün önemli bir rolü olduğu savunulmaktadır(Battle ve Clevers, 2017). Meme kanseri olgularında, ölümlerin genellikle başka dokulara metastaz sonucu gerçekleşmesi, MKKH'leri ve metastaz biyolojisi arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasını önemli kılmaktadır.

2.5. Telomeraz

2.5.1. Telomer Yapısı ve Telomeraz Enzimi

İnsan kromozomları telomer adı verilen guanince zengin 5'-TTAGGG-3' baz tekrarlarından oluşan ve kromozomları uçtan uca füzyonlardan ve bozunmalardan koruyan dizilerdir. DNA polimeraz enzimleri DNA'yı sentezlemeye başlamak için RNA primere ihtiyaç duyduğundan ve sentez aşaması zincirin sonuna kadar

gerçekleşemediğinden, kromozom uçlarındaki telomer dizilerinde kayıplar olur(de Lange ve ark., 1990).

Telomeraz enzimi evrimsel olarak korunmuş TERT alt birimi ve TERC adı verilen RNA komponentinden oluşmaktadır. Telomeraz, kromozom uçlarındaki telomerlerin sentezinden sorumlu olan bir ribonükleoprotein polimerazıdır(Cairney ve Keith, 2008).

İnsan genomunda uzunluğu yaklaşık 37 kb olan hTERT geni, bir kopya olarak 5. kromozomun p kolunda bulunmaktadır (5p15.33)(Bryce ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar, 127 kDa ağırlığındaki TERT proteininin DNA ve RNA bağlanma bölgelerini barındıran uzun bir N terminal ucu, merkezdeki katalitik ters transkriptaz bölgesi ve kısa bir C terminal ucunu meydana getiren üç ana yapısal bölümden oluştuğunu vurgulamaktadır(Gomez ve ark., 2012).

Telomerazın RNA komponentini oluşturan TERC ise insan genomunda 3. kromozomun q kolunda (3q26) tek kopya olarak bulunmaktadır. RNA molekülünün telomeraz aktivitesi için gerekli olduğu bilinmekle birlikte, telomeraz aktivitesi için kısıtlayıcı olmadığı savunulmaktadır(Cairney ve Keith, 2008).

Birçok ökaryotta telomerleri korumakla görevli olan shelterin kompleksi, aynı zamanda telomeraz regülasyonundan sorumlu olan bir protein kompleksidir. Telomerin 300 baz çifti içeren tek zincirli kısmı telomer-loop (T-loop) bölgesini oluşturmakta ve düğüme benzeyen bu yapı telomerin stabilizasyonunu sağlamaktadır. T-loop organizasyonunda bulunan telomer tekrar faktörü-1 ve 2 (TRF1, TRF2), telomer koruyucu 1 (POT1), TRF1 etkileşimli protein 2 (TIN2), organizasyon proteini (TPP1), Rap1 maya telomerik proteininin homologu (RAP1) shelterin kompleksini oluşturmaktadır. Shelterin kompleksi kaybının, tamir mekanizmalarını ve apoptozu uyarabildiği bilinmektedir(Gomez ve ark., 2012; Martínez ve Blasco, 2011).

Shelterin kompleksi elemanlarından RAP1'in subtelomerik gen susturma ve transkripsiyonel regülasyonun yanında nükleer faktör- κ B (NF- κ B) yolağının modülasyonunda görev aldığı bildirilmiştir(Teo ve ark., 2010). Telomerazın ve telomeraz aktivitesini etkileyen faktörlerin hedeflenmesi kanser tedavisinde ilgi çekici bir konudur. Telomerlerin organizasyonundan sorumlu protein TPP1'i hedefleyen ilaçların, telomeraz aktivitesini durdurarak telomerlerin uzamasını

engelleyerek kanser hücrelerinin anormal bölünmesini engelleyeceği düşünülmektedir(Gomez ve ark., 2012).

2.5.2. Telomer ve Telomeraz Fonksiyonları

Normal insan somatik hücrelerinde telomeraz aktivitesinin düşük veya saptanamaz oluşu, hücrelerin yaşlanmasıyla birlikte hücre döngüsünün p53 ve Rb gibi tümör supresörlerin sinyalleriyle durdurulması ve hücrelerin apoptoza gitmesiyle sonuçlanır(Leach, 1998). Telomerazın deregülasyonu ise hücre ölümü ve onkogenezele ilişkilendirilmiştir. Telomer boyunun aşırı kısalmasıyla krize giren hücreler, genetik kararsızlık içerisindedir. Kanser hücrelerinde telomerazın aktivasyonu, kriz noktasını aşabilen hücrelerin kontrolsüzce çoğalmalarını sağlamaktadır. Bu sebeple, telomeraz aktivasyonu hücrelerin ölümsüzleşmesini sağlayan kritik bir adım olarak kabul edilmektedir(Saretzki, 2014).

Kök hücrelerin ve kanser hücrelerinin uzun süreli proliferasyon kapasitelerini korumada ve normal doku yenilenmesinde çok önemli olduğu bilinen telomerazın, telomer uzunluğu regülasyonundan farklı fonksiyonlarının da bulunduğu vurgulanmaktadır(Gomez ve ark., 2012). Wnt sinyal yolağında transkripsiyonel düzenleyici olarak görev yapan TERT, ayrıca β -katenin transkripsiyonel kompleksi için kofaktör görevi görmektedir(Park ve ark., 2009).

Çalışmalarda, apoptozun telomer boyutundan bağımsız regülasyonunda telomerazın bir fonksiyonu olduğu, TERT' yapısında mitokondriyal lokalizasyon sinyali bulunduğu ve TERT'in mitokondri içinde aktif olduğu savunulmaktadır. Bununla beraber, oksidatif hasar karşısında telomerazın mitokondriyal DNA'yı duyarlılaştırdığı vurgulanmaktadır(Cong ve Shay, 2008). TERT ekspresyonunun azalması BAX proteinini aktive ederek mitokondri üzerinden apoptozu indüklerken, TERT'in aşırı ekspresyonu apoptozu baskılamaktadır(Martínez ve Blasco, 2011).

2.5.3. Telomerazla İlişkili Hastalıklar ve Kanser

Telomeraz aktivitesiyle ilişkilendirilen ilk hastalık diskeratozis konjenital adı verilen nadir ve multi sistemik bir hastalıktır. Genellikle çocuklarda görülen bu hastalığın abnormal deri pigmentasyonu ve oral lökoplaki gibi semptomlarının yanında, gelişimsel gecikmeler ve organ iflası gibi hastanın hayatını tehlikeye sokan süreçler yaşanabilmektedir(Nishio ve Kojima, 2010). Telomeraz aktivite bozukluğuyla ilişkili

diğer önemli hastalıklar klinikte Hoyeraal-Hreidarsson sendromu, aplastik anemi ve pulmoner fibroz olarak belirtilmektedir(Gomez ve ark., 2012).

Normal yaşlanma koşullarında telomeraz aktivitesinin görülmemesiyle korele olarak her bir hücre bölünmesiyle kısalan telomerlerin hücrel senesense neden olduğu bilinmektedir(Gomez ve ark., 2012). Meme kanseri, kolorektal karsinom ve lösemi gibi malignitelerde gözlenen telomer kısalmasının onkogeneizde rol oynadığı düşünülmekte; telomer kısalmasına bağlı olarak, primer insan tümörlerinin yaklaşık yüzde doksanında telomeraz aktivitesinin arttığı savunulmaktadır(Saretzki, 2014).

2.5.4. Telomeraz İnhibitörleri

Sağlıklı somatik ve kök hücrelere göre daha kısa fakat kritik noktaya ulaşmamış telomerlere sahip hızla çoğalan kanser hücrelerini telomeraz inhibitörleriyle elimine etmenin avantajlı olduğu bilinmektedir(Pascolo ve ark., 2002; Puri ve Girard, 2013; Röth, Harley, ve Baerlocher, 2010). Sağlıklı ve kanser hücreleri arasındaki telomer boyu ve telomeraz aktivitesi farkı dolayısıyla terapötikler kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken, ajanların sağlıklı hücrelerdeki etkisi minimal düzeydedir(Gomez ve ark., 2012; Puri ve Girard, 2013). Günümüzde, telomerazı inhibe etme amacıyla tasarlanan, direkt olarak telomerazın enzimatik aktivitesini engelleyen moleküller ve aktif immünoterapi yöntemleri klinik faz aşamasına ulaşmışken; gen terapi yöntemleri ve telomeraz biogenezi bloke ederek enzim aktivitesini durdurma amacındaki çalışmalar ise klinik öncesi aşamalarda takılı kalmıştır(Martínez ve Blasco, 2011). En çok çalışılan telomeraz inhibitörü olan GRN163L (imetelstat), telomeraz ve telomerik DNA etkileşimini bloklayarak enzim aktivitesini inhibe etmektedir(Röth ve ark., 2010). Solid tümörlerde ikinci klinik fazda beklenen yeterliliği gösterememiş olsa da, myeloproliferatif neoplazilerdeki başarısı ajanın faz üç çalışmalara geçmesini sağlamıştır(Arndt ve MacKenzie, 2016). Çalışmalara konu olan bir diğer telomeraz inhibitörü BIBR1532 ise rekabetçi olmayan ve spesifik inhibisyon yeteneğiyle bilinmektedir(Biray Avcı ve ark., 2018).

2.6. BIBR1532 Molekülü ve Etki Mekanizması

Moleküler formülü $C_{21}H_{17}NO_3$, moleküler ağırlığı 331.36 g/mol olan sentetik molekül BIBR1532, seçici bir doğal ve rekombinant telomeraz inhibitörüdür(Bolton, Wang, Thiessen, ve Bryant, 2008). Çalışmalar, BIBR1532'nin rekabetsiz bir

telomeraz inhibitörü olduğunu, deoksiribonükleotidler ve DNA primerine farklı noktalardan bağlanabildiğini göstermektedir. HIV1 ters transkriptaz inhibitörleriyle benzerlik gösteren BIBR1532 direkt olarak telomerazın aktif bileşenlerinden hTERT'i hedefler(Pascolo ve ark., 2002).

BIBR1532'nin etki mekanizmasını reaksiyon ürünlerini inhibe etmesiyle açıklayan araştırmacılar, inhibitörün genel anlamda TTAGGG tekrar sayısı artışını engellediğini, dolayısıyla enzim - DNA substrat kompleksi translokasyonunu etkilediğini savunmaktadır(Pascolo ve ark., 2002).

2.7. Epitelyal Mezenkimal Transizyon

Epitelyal mezenkimal transizyon (EMT), epitel hücrelerin birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucunda mezenkimal bir morfoloji kazanmalarına neden olan gelişimsel bir süreçtir. EMT sonucunda mezenkimal bir fenotip kazanan hücreler, gelişim sürecinde organizmanın farklı bölgelerine göç ederek bu bölgelerde yeni doku oluşturabilmek için hareketli bir yapı kazanırlar(Radisky ve LaBarge, 2008).

EMT mekanizması üç alt tip olarak incelenmektedir. Tip 1 EMT, embriyonik gelişim sürecinde mezoderm, endoderm dokularının oluşumunda görevliken, tip 2 EMT yara iyileşmesi ve doku tamirinde etkilidir(Banyard ve Bielenberg, 2016). Tip 3 EMT ise kanser hücrelerinin hareketliliğini ve invazyon yeteneğini etkileyen, onkogen ve tümör supresörlere bağımlı olarak çalışan mekanizmadır(Kuşoğlu ve Biray Avcı, 2019).

Yapılan çalışmalar, EMT ve KKH plastisitesi arasında güçlü bir ilişki olduğunu savunmaktadır. KKH'lerinin EMT sonucunda migrasyon yeteneği kazanarak metastaza neden olduğu düşünülmekte, aynı zamanda EMT'nin hücrelerin köklülük durumunu etkilediği belirtilmektedir(Pastushenko ve ark., 2018).

EMT'nin moleküler mekanizması indükleyiciler, regülatörler ve efektörler olmak üzere üç kategori altında incelenmektedir. İndükleyiciler, tümör oksijensiz ve besinsiz kaldığında dönüşümün başlangıç sinyalinin veren moleküllerdir(Banyard ve Bielenberg, 2016). Başlıca EMT indükleyicisi TGF- β kabul edilmekle birlikte, VEGF, IGF moleküllerinin ve Wnt, Notch gibi kök hücrelerin moleküler biyolojide rol alan yolların da EMT mekanizmasını harekete geçirdiği bilinmektedir(Jiang,

Tang, ve Liang, 2011). EMT regülatörleri ise başlangıç sinyali verilen hücrelerdeki gen ekspresyon değişimlerinden sorumlu olan EMT transkripsiyon faktörlerinden (EMT-TF) oluşmaktadır. Twist, Snail, Slug ve Zeb transkripsiyon faktörü ailelerinin başlıca EMT-TF'leri kapsadığı, bu TF'lerin hücre morfolojisini doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği vurgulanmaktadır(Banyard ve Bielenberg, 2016; Craene ve Berx, 2013). EMT regülatörlerinin ise hücre iskeletinde farklılaşmaya neden olan ve hücrenin migrasyon yeteneğini arttırabilen proteinlerdeki değişikliklerden oluştuğu bilinmektedir. Epitelyal kaderinin (E-kaderin) ekspresyonunun azalması mezenkimal bir fenotipe işaret ederken, matriks metalloproteinazlarında (MMP) ekspresyon artışı hücrenin invazyon yeteneğini pozitif olarak etkilemektedir(Banyard ve Bielenberg, 2016; Shibue ve Weinberg, 2017).

2.8. Kanser Hücrelerinde Migrasyon ve İnvazyon

Hücreler arası adezyon moleküllerini kaybeden malign hücrelerin motilite kazanarak tümör odağından ayrılıp çevredeki dokulara sıçrayabilmesi EMT mekanizmasıyla yakından ilişkilidir. Moleküler ve hücresele alterasyonlar sonucu morfolojilerini değiştirerek hareketli bir yapıya bürünen hücreler, aynı zamanda stromayı yeniden düzenleme kapasiteleriyle hücre göçünü kolaylaştırmaktadır(Krakhmal, Zavyalova, Denisov, Vtorushin, ve Perelmuter, 2015).

Sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında, fizyolojik bir dur sinyali olmayan kanser hücrelerinde migrasyon mekanizması, kanser progresyonuna ve tümörün başka dokulara sıçramasına neden olmaktadır. EMT sırasında malign epitelyal hücrelerde e-kaderin ve integrin gibi hücresele adezyon moleküllerin kaybıyla birlikte hücre iskeletinde meydana gelen değişimlerle devam eden süreç, bazal membranın degradasyonu ve hücrelerin çevredeki stromal matrikse penetrasyonu son bulmaktadır(Krakhmal ve ark., 2015; Mitra ve ark., 2015).

E-kaderin geninin promotör bölgesine bağlanarak genin ekspresyonunu azaltabilen EMT-TF'leri Snail ve Slug aynı zamanda mezenkimal fenotiple ilişkilendirilen vimentin ekspresyonunu arttırarak hücrelerin migrasyon yeteneğini geliştirmektedir(Krakhmal ve ark., 2015).

2.9. EMT ve Telomeraz İlişkisi

EMT'nin kanser biyolojisindeki önemini araştıran çalışmalar, E-kaderini direkt olarak bloke eden EMT-TF'lere odaklanmıştır. Meme kanseri hastalarında, başlıca EMT-TF'lerden SNA1 tümör relapsıyla ilişkilendirilirken, SNA2 aşırı ekspresyonu metastazla ilişkilendirilmiştir. Yüksek miktarda eksprese edilen ZEB1/2'nin ise hayatta kalım oranlarını negatif yönde etkilediği gösterilmiştir(May ve ark., 2011). Son yapılan çalışmalar, hTERT ile EMT'nin metastatik etkileri arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. REF

MKKH'lerinde hTERT'i susturarak EMT ile telomeraz ilişkisini gözlemleyen araştırmacılar, hTERT ekspresyonunun mezenkimal fenotiple ilişkili olduğunu vurgulamış, KKH belirteci kabul edilen CD133 ekspresyonunun nükleer β -katenin lokalizasyonunu regüle ettiğini savunmuştur. Bununla birlikte, hTERT'in kemoterapi direncine neden olduğu vurgulanmıştır(El-Badawy ve ark., 2018).

Mide kanseri hücrelerinde hTERT aşırı ekspresyonunun TGF- β üzerinden EMT mekanizmasını indüklediği ve hücrelerin köklülük özelliklerini geliştirdiği gözlenmiştir. Telomerazın telomerleri uzatma işlevinden bağımsız olarak β -kateninin transkripsiyonel aktivitesini etkileyerek EMT prosesini regüle edebildiği ve metastaza neden olduğu savunulmuştur(Liu ve ark., 2013).

Skvamöz hücreli karsinom hücreleri kullanılan başka bir çalışmada, CRISPR/Cas9 yöntemiyle susturulan hTERT geni ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, hTERT negatif hücrelerinde EMT prosesiyle ilişkili hücre morfoloji değişimi görülmüş, aynı hücrelerin tümör oluşturma kapasiteleri bir hayli azalmıştır. Ayrıca, hTERT susturulmuş hücrelerde p65 transkripsiyon faktörünün nukleusa translokasyonunun azalması ile, EMT mediyatörü sayılan NF- κ B yolağındaki negatif geri bildirim tümör progresyonunu yavaşlatmış, hücrelerin migrasyon yeteneğini azaltmıştır(Y. Wu ve ark., 2017).

EMT-TF'lerinden ZEB1'in hTERT ile kompleks oluşturup direkt olarak E-kaderinin promotör bölgesine bağlandığını savunan bir çalışmada ise kolorektal kanseri hücrelerinde hTERT'in aşırı ekspresyonunun EMT'yi indüklediği gözlenmiştir(Qin ve ark., 2016). Hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini arttırarak tümör progresyonuna ve metastaza yol açtığı düşünülen EMT mekanizmasının hTERT ile ilişkisi, aydınlatılmayı bekleyen önemli bir konudur.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları, hücrelerin yaşamlarını sürdürmeleri ve çoğalmaları için ihtiyaç duyulan besinlerin ve optimal koşulların sağlandığı bir süreçtir. Çalışmamızdaki insan meme kanseri ve insan meme epitel kök hücreleri Celprogen'den, MDA-MB 231 (ATCC, HTB-26) ve MCF-7 (ATCC, HTB-22) hücreleri ana bilim dalımızın hücre stoğundan temin edilmiştir. MEKH'ler için 'Meme Epitel Kök Hücresi Büyüme Ortamı' kullanılmış, MKKH'leri için 'Meme Kanseri Kök Hücresi Büyüme Ortamı' kullanılmıştır. MDA-MB 231 ve MCF-7 hücre hattı için Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM besiyeri kullanılmıştır.

Hücreler deneyler için uygun yoğunluğa ulaşıncaya dek %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde 25cm² ve 75cm²'lik flasklarda steril koşullarda çoğaltılmıştır. Hücrelerin düzenli kontrolleri inverted mikroskop ile yapılmıştır. Ortam değişimi, hücre açma ve dondurma gibi hücre kültürü işlemleri steril laminar kabin içerisinde, steril ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ticari olarak elde edilen hücre hatları kullanılmış, dolayısıyla etik kurul belgesine gerek duyulmamıştır.

3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklardaki hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücre pasajlama prosedürü aşağıdaki gibi ilerlemiştir:

- Hücrelerin pasajlanması için ilk olarak flastaki besiyeri çekilmiş, hücreler serumsuz besiyeri ile yıkanmıştır.
- Serumsuz besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 25 cm² flask için 500 µl, 75 cm² flask için 1 ml tripsin-EDTA (%0,25-%0,05 v/v) solüsyonu eklenmiş ve hücreler 5 dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
- 5 dakika sonra hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskopta gözlenmiştir.

- Flasklardaki hücreler kaldırıldıktan sonra, tripsin aktivitesini inhibe etmek için flasklara kullanılan tripsinin iki katı kadar serumlu besiyeri eklenmiştir.
- Flasktan 15 ml'lik falkon tüpe aktarılan hücre-ortam karışımı santrifüjlenmiştir.
- Daha sonra falkon tüp içerisindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine yeterli miktarda besiyeri eklenip hücre solüsyonu eşit iki flaska bölünmüştür.
- Flasklar üzerine besiyeri eklenerek pasajlama işlemi tamamlanmıştır.
- Hücrelerin flask yüzeyine yapışıp çoğalmaya devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılmış, ertesi günlerde hücrelerin durumu takip edilmiştir.

3.1.2. Hücrelerin Dondurulması (Kriyoprezervasyon)

Deneylede kullanılmayacak hücrelerin yaşlanmalarını önlemek ve daha sonra tekrar kullanmak amacıyla fazla hücreler dondurulmuştur. Hücre dondurma işlemi aşağıdaki gibi ilerlemiştir:

- Flask yüzeyinde yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler ilk olarak tripsin ile yüzeyden kaldırılmıştır.
- Flasklarda bulunan tüm hücreler kalkınca, tripsinin aktivasyonunu sonlandırmak ve hücreleri toplamak amacıyla flaska serum içeren besiyeri eklenmiş ve hücre solüsyonu 15 ml'lik falkon tüpler içerisinde santrifüjlenmiştir.
- Elde edilen hücre pelletinin üzerine buz üstünde muhafaza edilen 900 µl serum ve 100 µl DMSO içeren karışımdan 900 µl eklenmiş ve karışım yine buz üzerindeki kriyotüplere aktarılmıştır. Kök hücreler ise yine 900 µl kendi ortamlarına ilaveten 100 µl DMSO karışımına aktarılmıştır.
- Kriyotüpler hızlıca -80°C dondurucuya kaldırılmıştır.

3.1.3. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Kriyotüpler içerisinde -80°C 'de saklanan hücrelerin tekrar kullanılabilmesi ve çoğaltılabilmesi için hücreler çözülmüştür. Hücre çözme prosedürü aşağıdaki gibi ilerlemiştir:

- DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkileri olduğundan çözme işlemi ivedilikle gerçekleştirilmiştir. Kriyotüplere 1 mL besiyeri eklenerek çözülen hücreler pipetaj yapılarak karıştırılmış ve çözme işlemi hızlandırılmıştır.
- Serumsuz ortam bulunan 15 ml'lik falkonlara alınan hücreler santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pellet üzerine 10 ml serumsuz ortam eklenmiş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu sayede DMSO en etkili şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Santrifüj sonrası hücre pelleti üzerine yeterli miktarda serumlu besiyeri eklenerek 75 cm^2 'lik flasklara aktarılmıştır.
- Hücreler, flasklara yapışmaları ve çoğalmaları için etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücreler düzenli olarak kontrol edilmiş, besi yerinde renk değişimi gözlenmeye başladığında ortam değişimi yapılmıştır.

3.1.4. Hücre Canlılık Tayini

Tripan mavisi boyası testi hücre canlılığı ve sayısını tespit etmekte kullanılan bir boyadır. Ölü hücreler boyayı içlerine alıp ışık mikroskopuyla incelendiğinde mavi gözükmekte, canlı hücreler ise parlak beyaz görülmektedir. Hücre canlılığını belirlemek için aşağıdaki prosedür izlenmiştir:

- Flasktan ayrılan ve santrifüjlenen pellet üzerine 1 mL besiyeri eklenen hücre süspansiyonundan 50 μl hücre alınmıştır.
- 50 μl tripan mavisi boyası 50 μl hücre içeren süspansiyonla pipetaj yöntemiyle karıştırılmıştır.

- Karışım Neubauer lamına aktarılmış ve ışık mikroskobu altında hücreler incelenmiştir.
- Mavi gözükten ölü hücreler ve boya almayan parlak, canlı hücreler 4x4'lük karelerden 4 tanesinde sayılmıştır.
- 4 karede sayılan hücrelerin ortalaması alınmış, dilüsyon faktörü göz önüne alınarak mililitredeki toplam canlı ve ölü hücre sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre} \times (\text{dilüsyon faktörü}) \times 2 \times 10^4$$

3.2. BIBR1532 Etken Maddesinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak BIBR1532 toz olarak temin edilmiş ve -20°C'de saklanmıştır. DMSO'da çözülebilen 10 mg BIBR1532'den 50 mM ana stok hazırlanmıştır. Literatür araştırmasına ve laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalara göre hücrelere uygulanacak maddenin doz aralığına karar verilmiştir. BIBR1532 etken maddesi MDA-MB-231 ve MEKH'lerine 100 µM ile 1,56 µM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. Çalışmamızda etken madde uygulanmayan hücre grupları kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3. Hücre Proliferasyon Deneyi

Hücre hatları için 72 saatlik sitotoksosite deneyi öncesinde, mililitredeki en uygun hücre konsantrasyonunu bulmak adına proliferasyon testi yapılmıştır. Hücreler seri dilüsyon uygulanarak 100 µl'lik besiyeri içerisinde kuyucuk başına 1×10^5 - $15,625 \times 10^2$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 96 saat sonunda her kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu eklenmiştir. Spektrofotometrik ölçüm ELISA mikropalak okuyucuda 450 ve 620 nm dalga boylarında yapılmıştır. Verilerin analizi Graphpad Prism 8 programıyla gerçekleştirilmiştir.

3.4. Sitotoksosite Testleri

WST-1 (Water Soluble Tetrazolium), radyoaktif madde içermeyen ve hücre proliferasyonunun, canlılığının spektrofotometrik olarak ölçülmesini sağlayan bir solüsyondur. Bu yöntemin temeli metabolik olarak aktif olan canlı hücrelerin glikoliz sırasında NAD (P) H üretmeleri ve sonuç olarak çözünür bir formazan olan tetrazolium tuzlarını turuncu formazan boyası rengine dönüştürmesine dayanmaktadır. Oluşan formazan boyasının miktarı, kültür içinde metabolik olarak aktif olan hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkilidir. 96 kuyucuklu plakalara ekilen süspanse veya adherent hücreler yıkanma ya da toplanma gibi herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmaksızın 30dk – 4 saat arası WST-1 ile inkübe edildikten sonra oluşan formazan boya miktarı spektrofotometre (ELISA okuyucu) ile ölçülmelidir. Ölçülen absorbans değeri canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Telomeraz inhibitörü BIBR1532 etken maddesinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini analiz etmek için WST-1 deneyi gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite deneyi için 96 kuyulu plakalara ekilen hücrelere 24, 48 ve 72 saat inkübasyon grupları olacak şekilde BIBR1532 uygulanmıştır. Hücrelerin BIBR1532 ile inkübasyonları sonrası her kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu eklenip spektrofotometrede 450 ve 620 nm dalga boyu aralığında yarım saatlik aralıklarla okutmalar yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri Graphpad Prism 8 programıyla analiz edilmiş ve etken maddenin hücreler için IC₅₀ değerleri bulunmuştur.

3.5. Apoptoz Analizi

BIBR1532 etken maddesinin hücre hatlarındaki apoptotik etkisini incelemek amacıyla Annexin V deneyi gerçekleştirilmiştir. Etken madde uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

3.5.1. Annexin V Yöntemi

Apoptoz geçiren hücrelerin ayırıcı özelliği, hücre zarının iç yüzeyine bakan bir fosfolipid olan fosfatidilserinin hücre zarının dışına transloke olmasıdır. Annexin V, Ca⁺² bağımlı fosfolipid bağlayıcı bir proteindir ve erken apoptozu spesifik olarak

hücre zarının dışına transloke olan fosfatidilserine bağlanarak gözlemlemeye yarayan bir probtur. Fluorescein Isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilen Annexin V, erken apoptotik hücrelerde yeşil florasan ışınmasıyla akım sitometrisinde tespit edilir. Bununla beraber, geç apoptotik hücrelerde de fosfatidilserin hücre dışına transloke olduğundan, hücreler ayrıca kırmızı ışına veren Propidium Iodide (PI) ile boyanır. Böylece erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler ayırt edilmiş olur. Çalışmamızda, akım sitometrisinde erken apoptotik hücreler Annexin V pozitif, PI negatif sonuç verirken, geç apoptotik hücreler Annexin V ve PI pozitif sonuç verir. Nekrotik hücreler ise Annexin V negatif, PI pozitif sonuç verdiği için hücrelerin ayrımı yapılabilmektedir. Annexin V prosedürü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- Deneysel öncesi kit içeriğindeki Annexin V bağlanma tamponuna distile H₂O ile 1:10 oranında dilüsyon uygulanmıştır.
- Hücreler 1 doz grubu ve 3 kontrol grubu olarak ayrı ayrı etiketlenmiş ependorflara toplanıp santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjden sonra süpernatant atılmış ve hücreler besiyerini tamamen uzaklaştırmak adına iki defa PBS ile yıkanmıştır.
- Her örnek üzerine 100µl hazırlanan çalışma tamponu eklenmiş, kontrollerden birine hiç boya eklenmemiş, birine sadece 2,5µl FITC Annexin V, birine ise 2,5µl FITC Annexin V ve 2,5µl PI eklenmiştir. Doz gruplarına ise yine 2,5µl FITC Annexin V ve 2,5µl PI eklenmiştir.
- Karışımlar vortekslenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrası akım sitometrisinde kontrol gruplarının analizleri gerçekleştirilmiştir. Hiç boya eklenmeyen kontrol grubuna 2,5µl PI eklenmiş, 15 dk inkübasyon sonrasında analizi yapılmıştır.
- Kontrol grubunun ardından, doz uygulanan hücrelerin akım sitometrisi ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.6. Migrasyon Deneyi

BIBR1532 uygulanmış hücreler ve kontrol gruplarında migrasyon analizi için, 6 kuyucuklu plakalara uygun sayıda hücre ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra besiyeri ortamdan çekilmiş ve steril 200µl'lik pipet ucu ile kuyularda yara oluşturulmuştur. Hücre artıklarını içeren ortamı uzaklaştırmak amacıyla serumsuz ortam ile yıkama yapılmıştır. Kontrol grubu için normal büyüme ortamı ilave edilmiş, doz gruplarına BIBR1532'nin IC₅₀ dozunu içeren ortam ilave edilmiş ve 0. saat mikroskop görüntüleri alınmıştır. Daha sonra kontrol grubunda oluşturulan yara kapanana kadar 6. saat, 24. saat, 48. saat görüntüleri alınmaya devam edilmiştir. Deney sonunda görüntüler ImageJ programı ile analiz edilmiştir.

3.7. BIBR1532 Uygulanan Hücre Hatlarında Asılı Damla Deneyi

BIBR1532 uygulanmış hücreler ve kontrol gruplarında hücrelerin sphere oluşturma kapasitelerini incelemek amacıyla asılı damla deneyi gerçekleştirilmiştir. 6'lı plakalara ekilmiş etken madde uygulanan ve uygulanmayan hücre grupları toplanmış ve mililitrede 5×10^5 hücre olacak şekilde deney için hazırlanmıştır. Daha sonra petrilerin kapağına bu hücre solüsyonundan her damla 20 µl olacak şekilde beş ayrı damla yerleştirilmiştir. Petrinin alt haznesi ise steril PBS ile doldurulmuştur. Petri kapağı nazikçe kapatılmış ve etüvde 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. 10 gün sonunda petrilerdeki damlaların görüntüleri ışık mikroskopu kullanılarak alınmış ve sphere boyutları ImageJ programıyla analiz edilmiştir.

3.8. Gen Ekspresyonu Analizi

3.8.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu

BIBR1532 uygulanmış hücreler ve kontrol grubundan RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kiti (Qiagen) ile gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon prosedürü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/ml olarak ekilen MDA-MB 231, MCF-7, MKKH ve MEKH hücre hatlarına BIBR1532 IC₅₀ dozu uygulanmıştır.
- Etken madde uygulanan hücreler ve kontrol grubu hücreleri santrifüj tüplerine toplanmış ve 5 dk 1200 rpm'de santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant kısmı atılan her bir gruba 350 µl RLT Plus tamponu ve 350 µl %70'lik etanol eklenerek pipetajla karıştırılmıştır.
- Homojen karışım 2 ml tüp içine yerleştirilen ve etiketlenen gDNA eleyici dönüş kolonlarına aktararak 15 sn 10000 g'de santrifüjlenmiştir.
- 2 ml tüp içindeki sıvı uzaklaştırılmış, kolon tekrar takılmış ve üzerine 700 µl RW1 tamponu eklendikten sonra 15 s 10000 g'de santrifüjlenmiştir.
- 2 ml tüp içindeki sıvı uzaklaştırılmış, kolon tekrar takılmış ve üzerine 500 µl RPE tamponu eklenip, 10000 g'de 15 s santrifüjlenmiştir. Aynı işlem tekrarlanmış, bu kez tüpler 10000 g'de 2 dk santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj ardından kolonun altına 1.5 ml ependorf takılmış, kolon üzerine 35 µl RNase/DNase içermeyen H₂O eklenmiştir. İki dakika 10000 g'de santrifüj yapılmıştır.
- Ependorflara toplanan örnekler etiketlenmiş ve RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.8.2. RNA Miktar ve Saflıklarının Ölçümü

Hücre örneklerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflıkları Nanodrop cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Her bir RNA örneğinden 2 µl kullanılarak 260 nm dalga boyunda konsantrasyonlar µg/ml cinsinden ölçülmüştür. Örneklerin gen ekspresyon analizinde kullanılabilirliği, izole edilen RNA örneklerinin, A260:A280 oranının 1.8 - 2.0 aralığında, A260:A230 nm oranının ise 1.8'den büyük olması durumuyla belirlenmiştir.

3.8.3. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

Konsantrasyonları ölçülen RNA örneklerinden RT² First Strand Kit (Qiagen) kiti ile komplementer DNA (cDNA) elde edilmiştir. cDNA sentez protokolü aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- RNA örneklerinin konsantrasyonları hücre gruplarında kontrol ve doz grupları eşit olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Ependorflar etiketlenmiş ve GE2 solüsyonundan her bir ependorfa 6 µl eklenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlardaki RNA örnekleri ve su ependorflara eklenip pipetaj yapılmıştır.
- Örnekler 42°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra örneklere 6 µl BC4 (RT Master Mix) eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- Örnekler kitin protokolüne uygun olarak hazırlanan programda, belirli sürelerde inkübasyona bırakılarak reaksiyon tamamlanmıştır.
- Her örneğe 9µl RNase içermeyen H₂O eklenmiştir. Örnekler -20°C'de saklanmıştır.

3.8.4. Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi

Gerçek zamanlı PCR (qPCR), florasan boya ve propların verdikleri sinyaller ile nükleik asit miktarlarının ölçülmesine yarayan bir metottür. Çift zincirli DNA'nın oluklarına bağlanan SYBR Green florasan boyasıyla gerçek zamanlı olarak reaksiyonlar takip edilerek DNA miktarı belirlenir. Bu çalışmada RT² SYBR Green qPCR Mastermiks (Qiagen) kiti kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan "İnsan Epitelyal Mezenkimal Transizyon RT² PCR Array Profili" (Human Epithelial to Mesenchymal Transition RT² Profiler PCR Array) EMT mekanizmasıyla ilişkilendirilen 84 genin ekspresyonunu profileştirmektedir. Panelde, epitel ve mezenkimal hücre morfolojisiyle karakterize genlerin yanında EMT ilişkili transkripsiyon faktörlerine ve köklülük genlerine yer verilmiştir. Bu sayede, hücrelerdeki olası EMT ilişkili gen ekspresyonu değişimi, gerçek zamanlı PCR ile gösterilebilecektir.

EMT mekanizması ile ilişkili 84 geni kapsayan PCR plakası (Qiagen), iç kontrol olarak 5 adet housekeeping gen, 1 adet genomik DNA kontrolü, 3 adet ters transkripsiyon kontrolü ve 3 adet pozitif PCR kontrolü olmak üzere toplamda 96 kuyucuktan oluşmaktadır. Çalışmada, BIBR1532 etken maddesi uygulanan hücre hatlarıyla kontrol gruplarından izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılmış, daha sonra EMT ilişkili genlerin ekspresyonunu incelemek adına qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR yöntemi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- RT² SYBR Green Mastermiks solüsyonu her örnek için 600 µl olacak şekilde etiketlenen ependorflara aktarılmıştır.
- cDNA örnekleri etiketlenen ependorflara aktarılmış ve pipetajla karıştırılmıştır.
- Hazırlanan örnekler PCR plakasına kuyucuk başına 6,5 µl olacak şekilde çoklu pipet kullanılarak aktarılmıştır.
- Örnekler eklenen PCR plakası üzerine optik film yapıştırılmış ve örneklerin dibe çökmesi için santrifüjlenmiştir.

LightCycler 480 (Roche) cihazına yerleştirilen örnekler belirlenen programda çalıştırılmış ve veri analizi $\Delta\Delta CT$ yöntemi ile "Qiagen RT² Profiler PCR Data Analysis" üzerinden yapılmıştır.

Tablo 1. EMT plakasında bulunan genler ve tanımları

Gen Sembolü	Genin açıklaması
AHNAK	AHNAK nükleoproteini
AKT1	V-akt mürin thymoma viral onkogen homologu 1
BMP1	Kemik morfogenetik protein 1
BMP2	Kemik morfogenetik protein 2
BMP7	Kemik morfogenetik protein 7
CALD1	Kaldesmon 1
CAMK2N1	Kalsiyum/Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II inhibitör 1
CAV2	Kaveolin 2
CDH1	Kaderin 1, type 1, E-kaderin (epithelial)
CDH2	Kaderin 2, type 1, N-kaderin (neuronal)
COL1A2	Kollajen, tip I, alpha 2
COL3A1	Kollajen, tip III, alpha 1
COL5A2	Kollajen, tip V, alpha 2
CTNNB1	Katenin (Kaderin-ilişkili protein), beta 1, 88kDa

DSC2	Desmokollin 2
DSP	Desmoplakin
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERBB3	V-erb-b2 eritroblastik lösemi viral onkogen homologu 3 (avian)
ESR1	Östrojen reseptör 1
F11R	F11 reseptör
FGFBP1	Fibroblast büyüme faktör bağlanma protein 1
FN1	Fibronektin 1
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
FZD7	Frizzled ailesi reseptör 7
GNG11	Guanin nucleotid bağlanma proteini (G protein), gamma 11
GSC	Goosecoid homeobox
GSK3B	Glikojen sentaz kinaz 3 beta
IGFBP4	İnsülün benzeri büyüme faktörü bağlanma proteini 4
IL1RN	İnterlökin 1 reseptörü antagonisti
ILK	İntegrin-linked kinaz
ITGA5	İntegrin, alpha 5 (fibronektin reseptör, alpha polipeptid)
ITGAV	İntegrin, alpha V (vitronektin reseptör, alpha polipeptid, antijen CD51)
ITGB1	İntegrin, beta 1 (fibronektin reseptör, beta polipeptid, antijen CD29)
JAG1	Jagged 1

KRT14	Keratin 14
KRT19	Keratin 19
KRT7	Keratin 7
MAP1B	Microtübül-ilişkili protein 1B
MMP2	Matriks metallopeptidaz 2 (gelatinaz A, 72kDa gelatinaz, 72kDa type IV kollajenaz)
MMP3	Matriks metallopeptidaz 3 (stromelysin 1, progelatinaz)
MMP9	Matriks metallopeptidaz 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
MSN	Moesin
MST1R	Makrofaj uyarıcı 1 reseptör (c-met-ilişkili tirozin kinaz)
NODAL	Nodal homolog (mouse)
NOTCH1	Notch 1
NUDT13	Nudix (nucleosid diphosphate linked moiety X)-type motif 13
OCLN	Okludin
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PLEK2	Plekstrin 2
DES11	PPPDE peptidaz domain containing 2
PTK2	PTK2 protein tirozin kinaz 2
PTP4A1	Protein tirozin fosfataz tip IVA, üye 1
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP

	binding protein Rac1)
RGS2	G-protein sinyal regülasyonu 2, 24kDa
SERPINE1	Serpin peptidaz inhibitörü, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
GEMIN2	Survival of motor neuron protein interacting protein 1
SMAD2	SMAD ailesi üyesi 2
SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
SPARC	Salgılanan protein, asidik, sistein-zengin (osteonektin)
SPP1	Salgılanan fosfoprotein 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
STEAP1	Altı transmembran epitelyal prostat antijeni 1
TCF3	Transkripsiyon faktör 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
TCF4	Transkripsiyon faktörü 4
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2
TGFB1	Transforme edici büyüme faktörü, beta 1
TGFB2	Transforme edici büyüme faktörü, beta 2
TGFB3	Transforme edici büyüme faktörü, beta 3

TIMP1	TIMP metalloproteinaz inhibitörü 1
TMEFF1	Transmembran proteini, EGF-benzeri ve iki follistatin-benzeri domains 1
TMEM132A	Transmembran proteini 132A
TSPAN13	Tetraspanin 13
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
VCAN	Versikan
VIM	Vimentin
VPS13A	Vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)
WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
ACTB	Aktin, beta
B2M	Beta-2-mikroglobulin
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribozomal protein, large, P0

Tablo 2. EMT plakası gen dizilimi

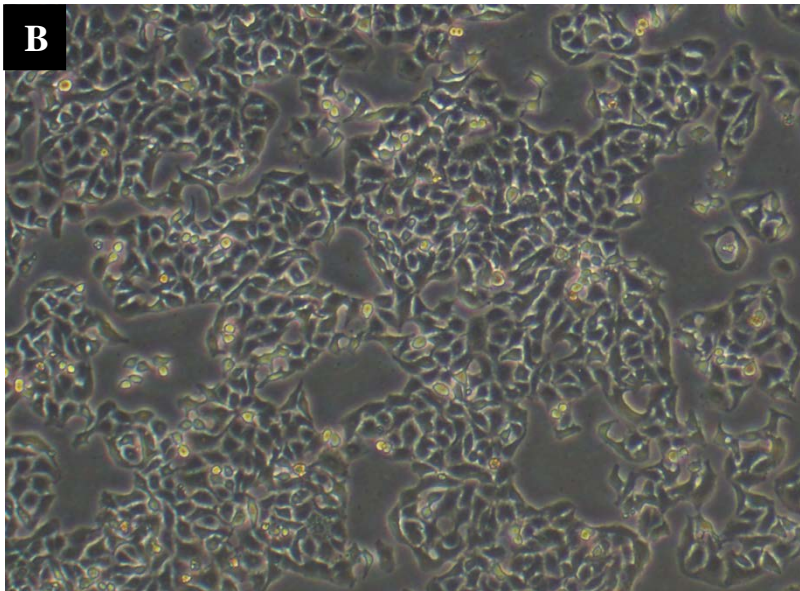
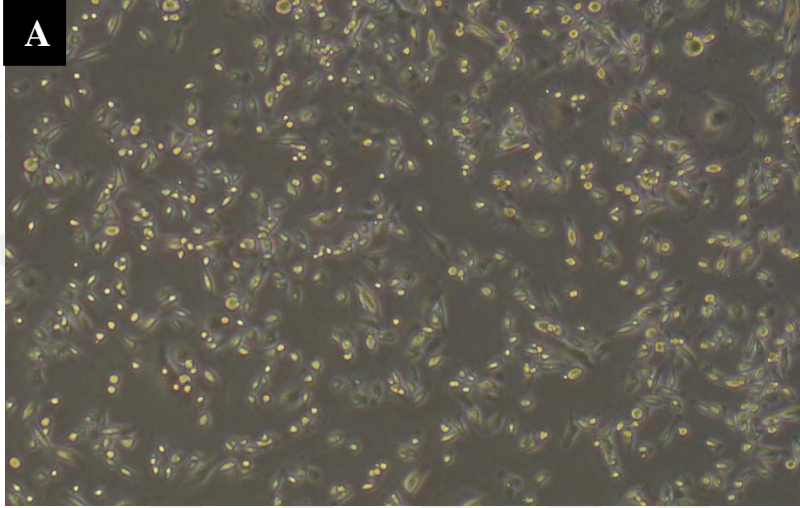
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AHNAK	AKT1	BMP1	BMP2	BMP7	CALD1	CAMK2N1	CAV2	CDH1	CDH2	COL1A2	COL3A1
B	COL5A2	CTNNB1	DSC2	DSP	EGFR	ERBB3	ESR1	F11R	FGFBP1	FN1	FOXC2	FZD7
C	GNG11	GSC	GSK3B	IGFBP4	IL1RN	ILK	ITGA5	ITGAV	ITGB1	JAG1	KRT14	KRT19
D	KRT7	MAP1B	MMP2	MMP3	MMP9	MSN	MST1R	NODAL	NOTCH1	NUDT13	OCLN	PDGFRB
E	PLEK2	DESI1	PTK2	PTP4A1	RAC1	RGS2	SERPINE1	GEMIN2	SMAD2	SNAI1	SNAI2	SNAI3
F	SOX10	SPARC	SPP1	STAT3	STEAP1	TCF3	TCF4	TFPI2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TIMP1
G	TMEFF1	TMEM132A	TSPAN13	TWIST1	VCAN	VIM	VPS13A	WNT11	WNT5A	WNT5B	ZEB1	ZEB2
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

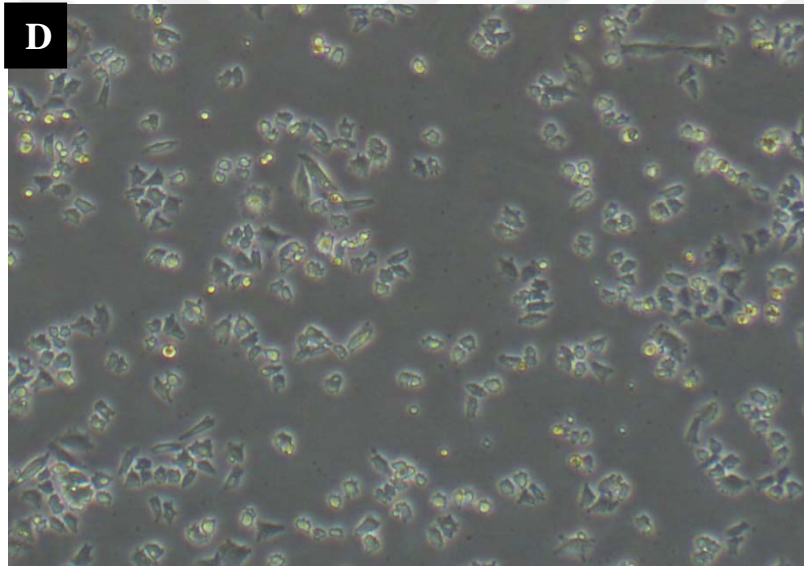
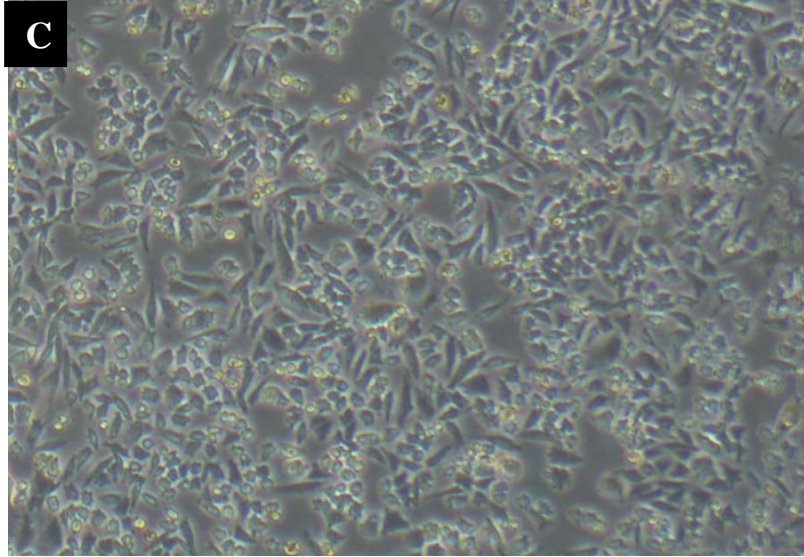


4. Bulgular

4.1. MDA-MB-231, MCF-7, MKKH ve MEKH Hatlarının oğaltılması

Hücreler %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatörde çoğaltılmış ve hücrelerin 10x büyütmede inverted mikroskop görüntüleri alınmıştır.





Şekil 1. Hücre hatlarının 10x büyütmede inverted mikroskop görüntüleri A) MDA-MB-231, B) MCF-7, C) MKKH, D) MEKH

4.2. Uygun Hücre Konsantrasyonunun Hesaplanması

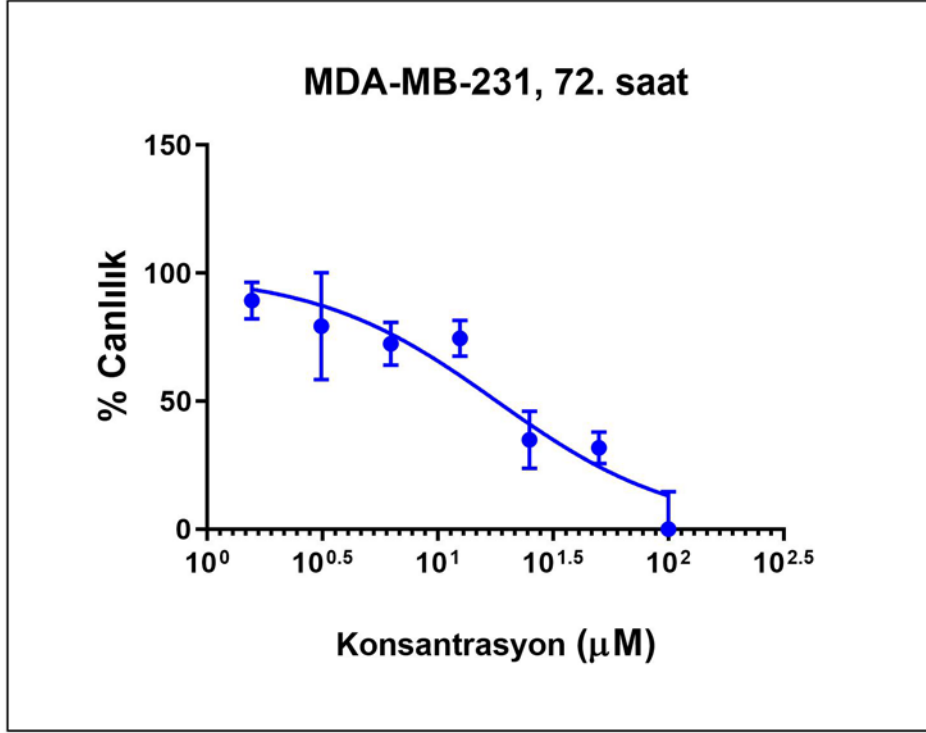
MDA-MB-231, MCF-7, MKKH ve MEKH hücre hatları için mililitredeki uygun hücre konsantrasyonu hesaplanmıştır. Tüm hücre hatları için mililitredeki en uygun hücre konsantrasyonu 50.000 hücre/ml olarak hesaplanmıştır.

4.3. BIBR1532'nin Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

MDA-MB-231, MCF-7, MKKH ve MEKH hücre hatları için BIBR1532 etken maddesinin IC₅₀ değerini belirlemek için sitotoksikite deneyi yapılmıştır. Kontrol grubu ise BIBR1532 içermeyen hücreler olarak değerlendirilmiştir.

4.3.1. BIBR1532'nin MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

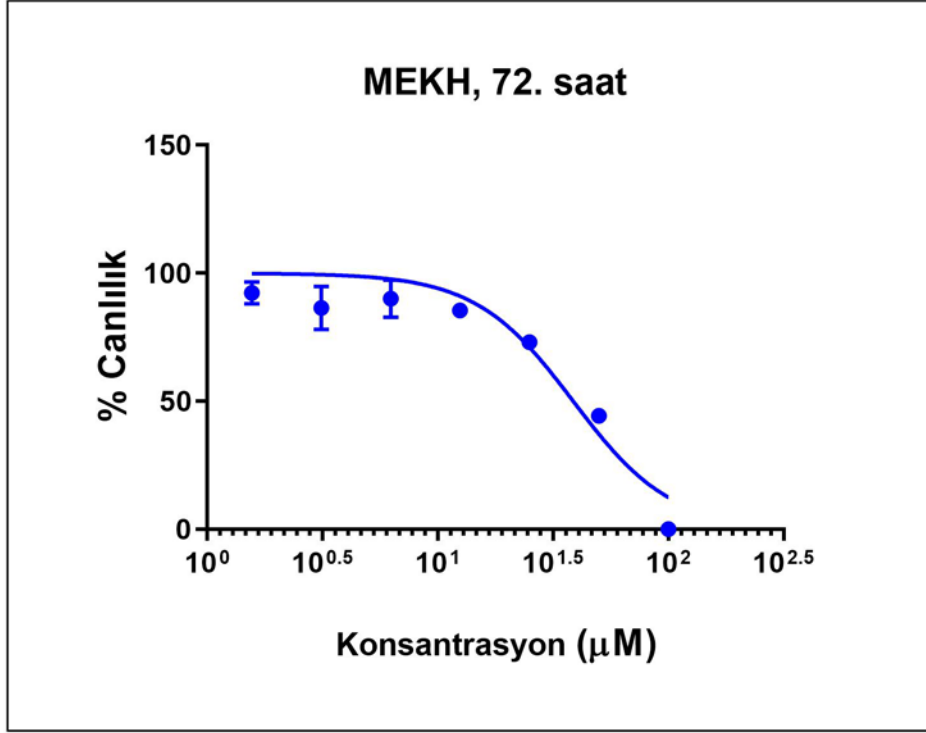
Literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak belirlenen BIBR1532 inhibitörünün 1,5625 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM'lık konsantrasyonları uygulanan hücreler için 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi gerçekleştirilmiş, MDA-MB-231 hücreleri için IC₅₀ dozu 72. saatte 18,04 µM bulunmuştur.



Şekil 2. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 72. saatte canlılık/doz grafiği

4.3.2. BIBR1532'nin MEKH Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

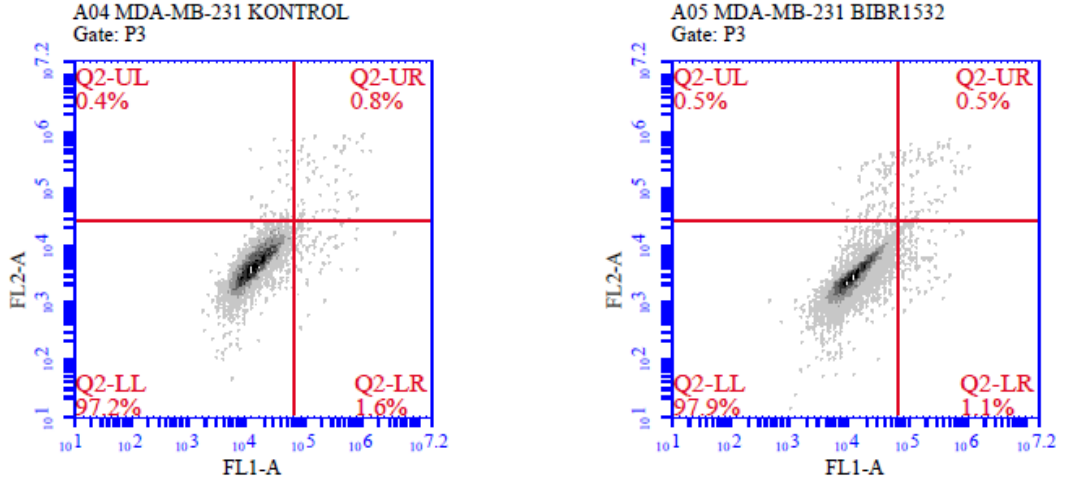
Literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak belirlenen BIBR1532 inhibitörünün 1,5625 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM'lık konsantrasyonları uygulanan hücreler için 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi gerçekleştirilmiş, MEKH'leri için IC₅₀ dozu 72. saatte 38,71 µM bulunmuştur.



Şekil 3. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde 72. saatte canlılık/doz grafiği

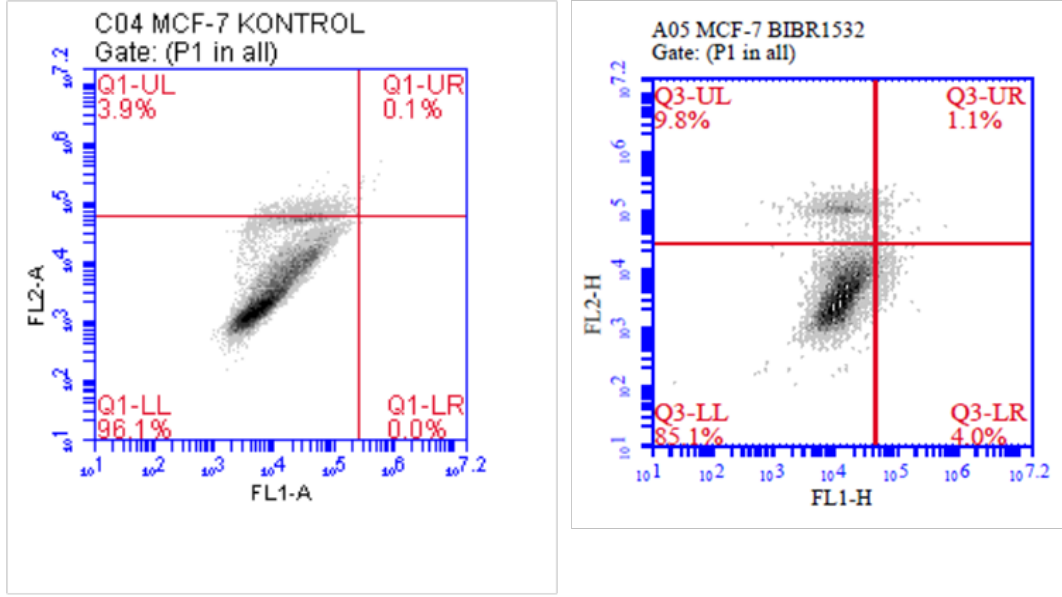
4.4. BIBR1532'nin Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkisi

MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde BIBR1532 etken maddesinin apoptotik etkileri Annexin V yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre etken madde uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranı %97.2 bulunurken, doz grubunda canlılık oranı %97.9 bulunmuştur. Kontrol grubunda erken apoptoz %1.6, geç apoptoz %0.8, nekroz ise %0.4 olarak tespit edilmiştir. Doz uygulanan hücrelerde ise erken apoptoz %1.1, geç apoptoz %1.1, nekroz ise %0.5 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak BIBR1532'nin MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik etkisi gözlenmemiştir.



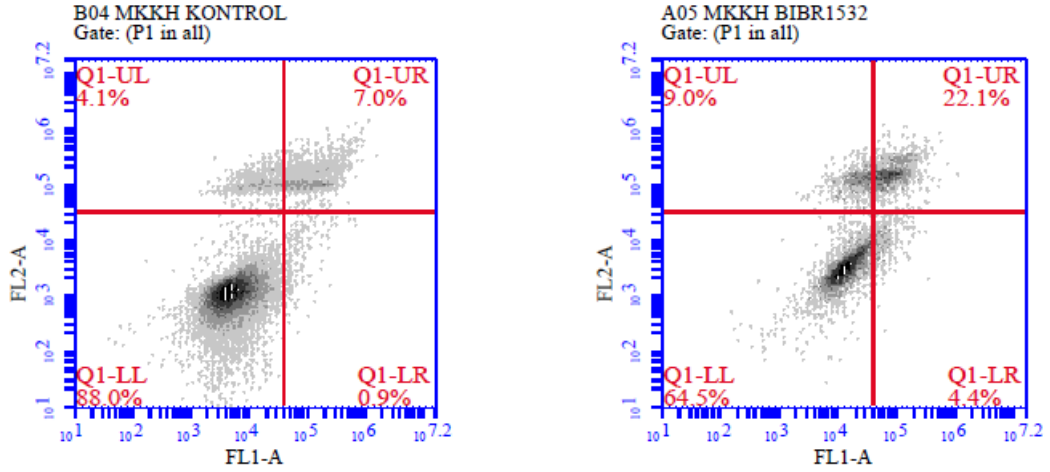
Şekil 4. BIBR1532 etken maddesinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi

MCF-7 hücre hattı üzerinde BIBR1532 etken maddesinin apoptotik etkileri Annexin V yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre etken madde uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde canlılık oranı %97.2 bulunurken, doz grubunda canlılık oranı %97.9 bulunmuştur. Kontrol grubunda erken apoptoz %1.6, geç apoptoz %0.8, nekroz ise %0.4 olarak tespit edilmiştir. Doz uygulanan hücrelerde ise erken apoptoz %4, geç apoptoz %1.1, nekroz ise %9.8 olarak tespit edilmiştir.



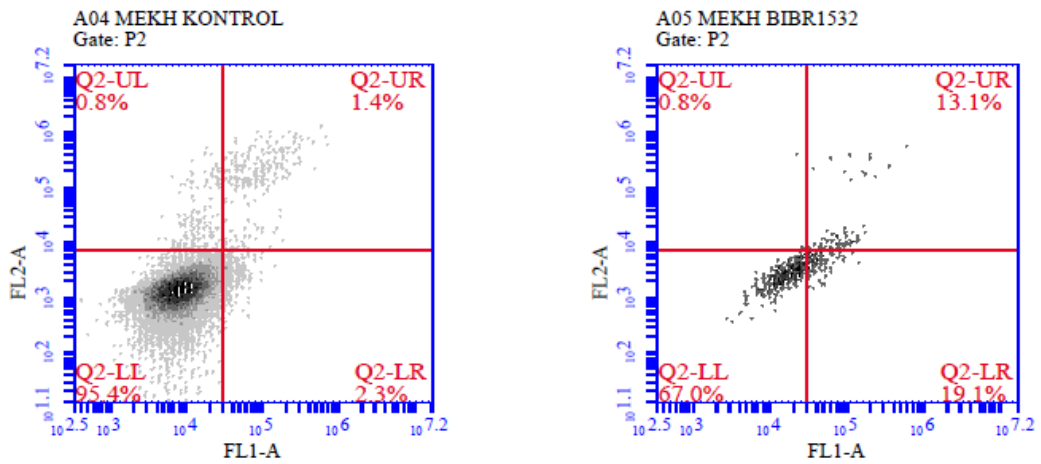
Şekil 5. BIBR1532 etken maddesinin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi

MKKH hücre hattı üzerinde BIBR1532 etken maddesinin apoptotik etkileri Annexin V yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre etken madde uygulanmayan MKKH'lerinde canlılık oranı %88 bulunurken, doz grubunda canlılık oranı %64.5 bulunmuştur. Kontrol grubunda erken apoptoz %0.9, geç apoptoz %7, nekroz ise %4.1 olarak tespit edilmiştir. Doz uygulanan hücrelerde ise erken apoptoz %4.4, geç apoptoz %22.1, nekroz ise %9 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak MKKH'lerinde BIBR1532 apoptozu 3.35 kat arttırmıştır.



Şekil 6. BIBR1532 etken maddesinin MKKH'leri üzerindeki apoptotik etkisi

MEKH hücre hattı üzerinde BIBR1532 etken maddesinin apoptotik etkileri Annexin V yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre etken madde uygulanmayan MKKH'lerinde canlılık oranı %95.4 bulunurken, doz grubunda canlılık oranı %67 bulunmuştur. Kontrol grubunda erken apoptoz %2.3, geç apoptoz %1.4, nekroz ise %0.8 olarak tespit edilmiştir. Doz uygulanan hücrelerde ise erken apoptoz %19.1, geç apoptoz %13.1, nekroz ise %0.8 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak MEKH'lerinde BIBR1532 apoptozu 8.7 kat arttırmıştır.



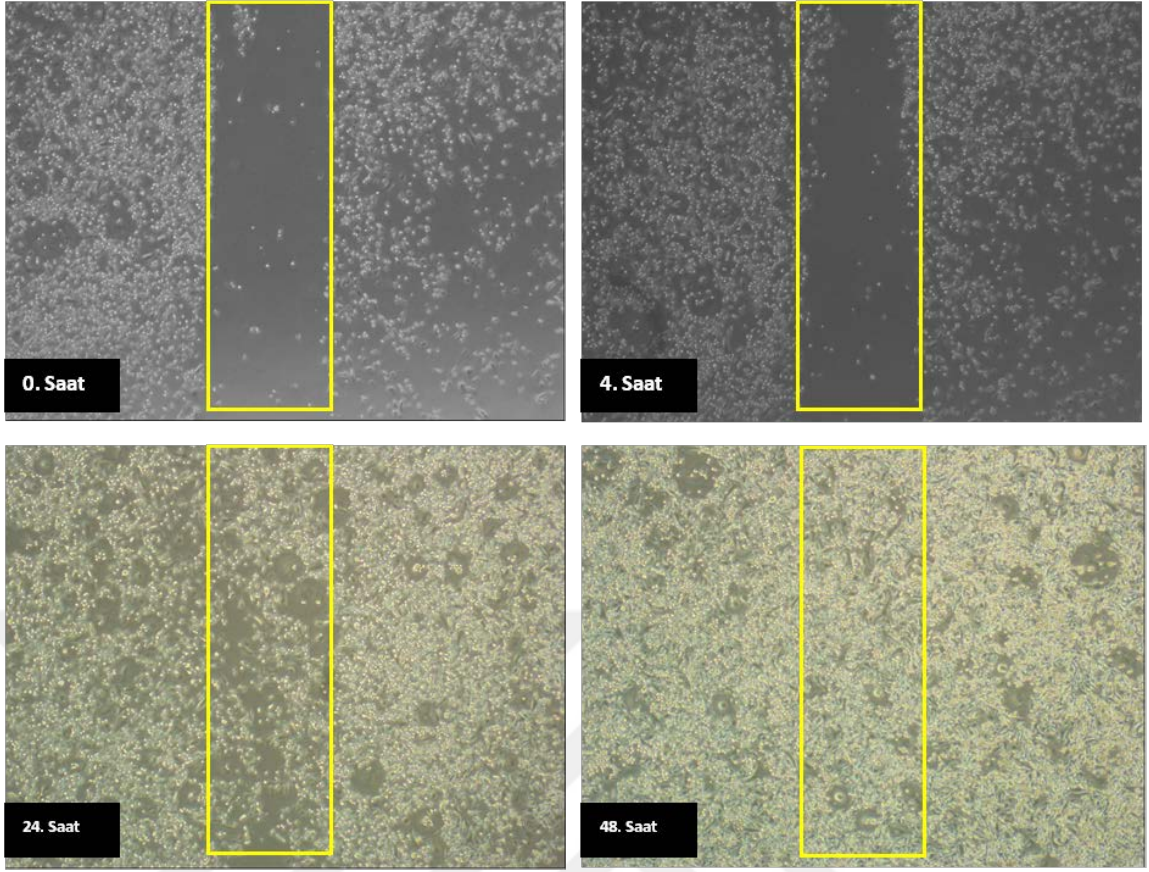
Şekil 7. BIBR1532 etken maddesinin MEKH'leri üzerindeki apoptotik etkisi

4.5. BIBR1532'nin Hücre Hatlarında Migrasyon Üzerine Etkisi

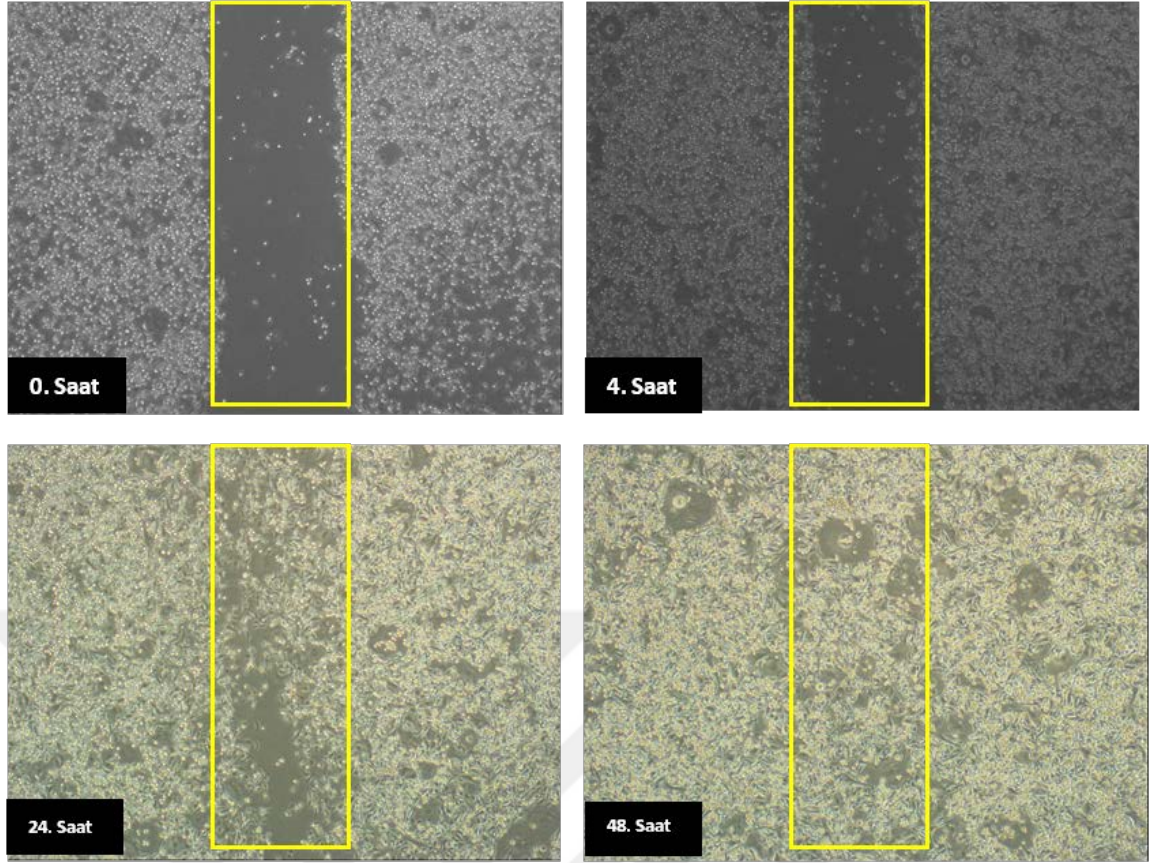
BIBR1532 etken maddesinin hücrelerin migrasyon yeteneğine etkilerini incelemek adına MDA-MB-231, MCF-7, MKKH ve MEKH'leri üzerinde yara iyileşme deneyi gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubu ve etken madde uygulanan doz grubu olarak iki gruba ayrılan hücre hatlarında oluşturulan yaraların alanları, 0. saatte çekilen görüntüde "%0 yara kapanması" olarak kabul edilmiştir. Her grup için kendi içinde 4., 24., ve 48. saatlerde çekilen görüntülerdeki yara alanları 0. saatteki alana oranlanmış, "%100 yara kapanması" tamamen kapanan yarayı ifade etmek için kullanılmıştır. Analizler sonucunda, her hücrenin kontrol ve doz grubu birbiriyle karşılaştırılmıştır.

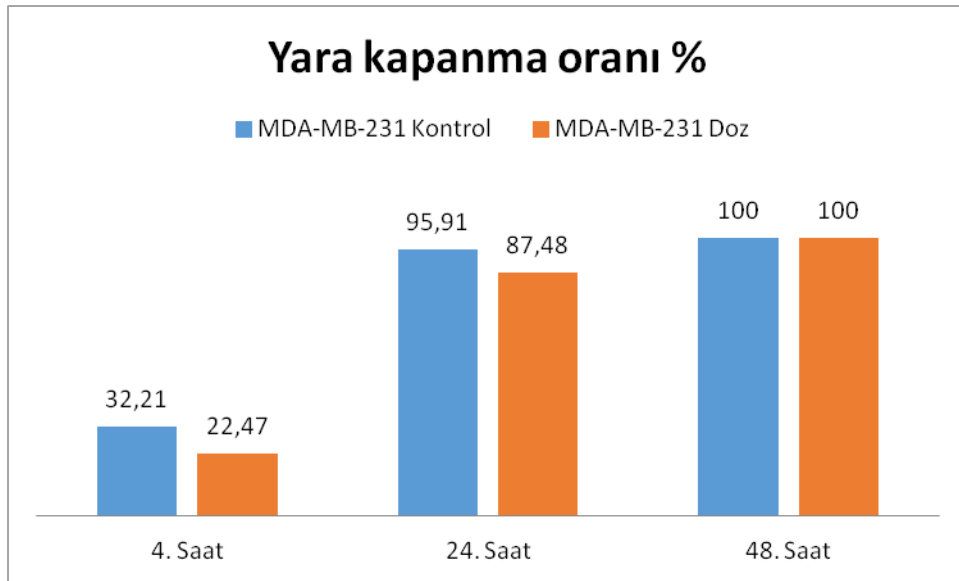
MDA-MB-231 hücrelerinin kontrol grubunda 4. saatte %32,21 kapanma, 24. saatte %95,91 kapanma, 48. saatte %100 kapanma gözlenirken, doz uygulanan grupta 4. saatte %22,47 kapanma, 24. saatte %87,48 kapanma, 48. saatte ise %100 kapanma gözlenmiştir.



Şekil 8. Etken madde uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi

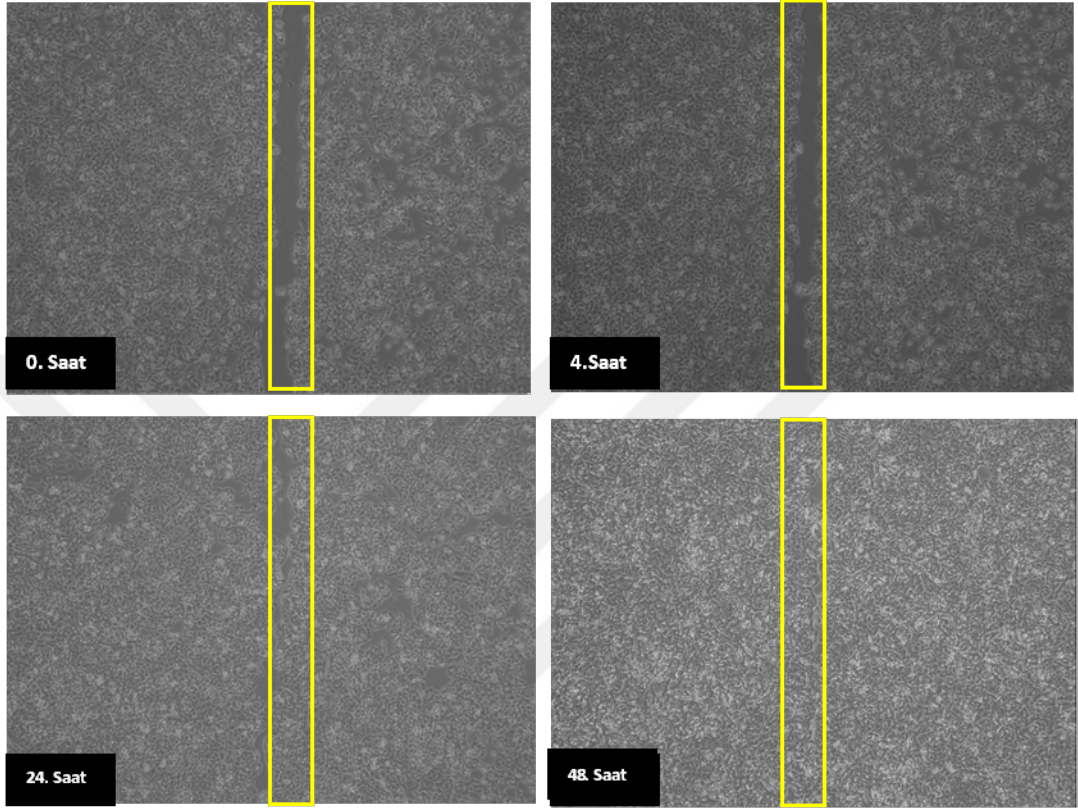


Şekil 9. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi

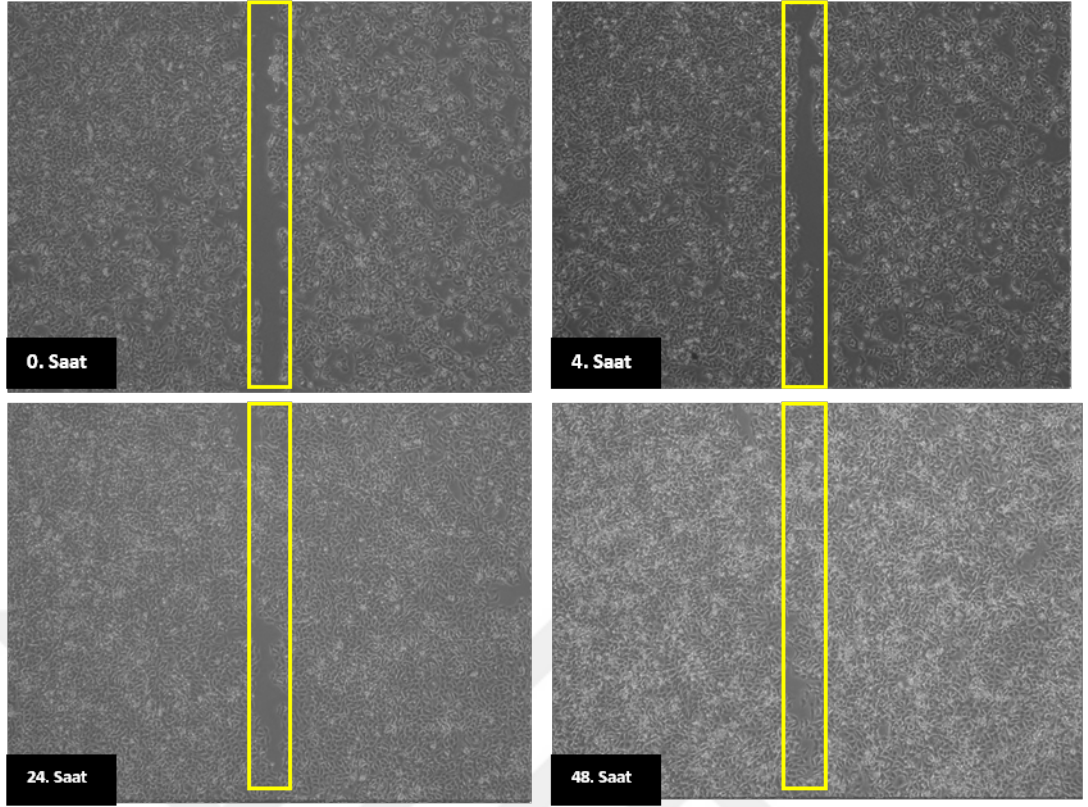


Şekil 10. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MDA-MB-231 hücrelerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları

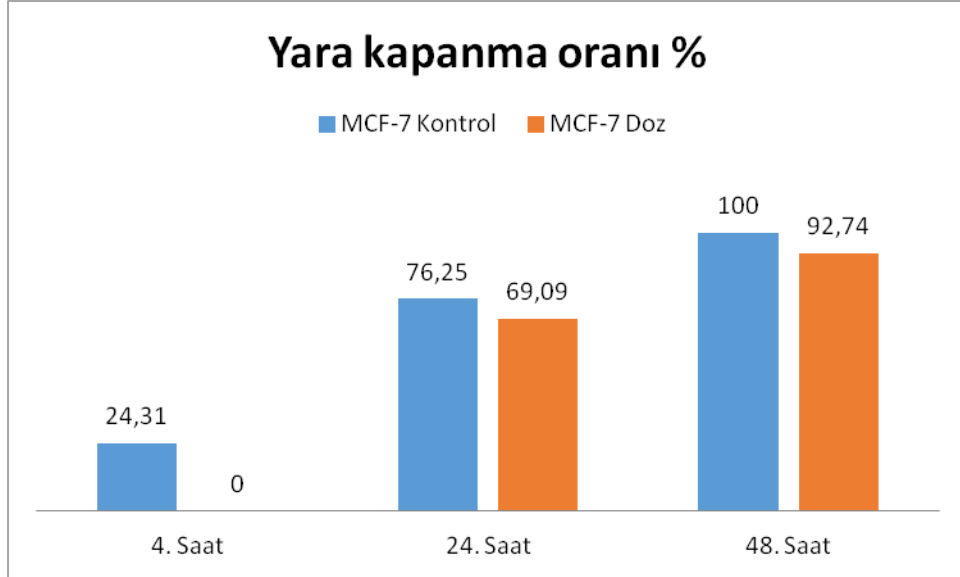
MCF-7 hücrelerinin kontrol grubunda 4. saatte %24,31 kapanma, 24. saatte %76,25 kapanma, 48. saatte %100 kapanma gözlenirken, doz uygulanan grupta 4. saatte %0 kapanma, 24. saatte %69,09 kapanma, 48. saatte ise %92,74 kapanma gözlenmiştir.



Şekil 11. Etkin madde uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi

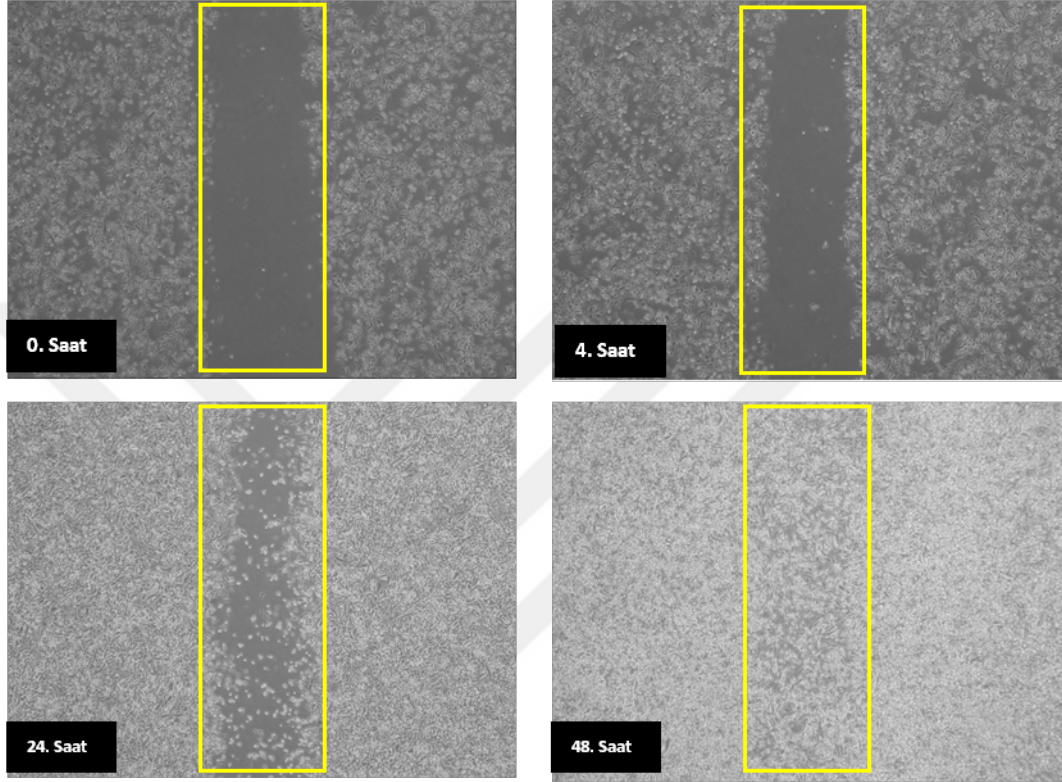


Şekil 12. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MCF-7 hücrelerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi

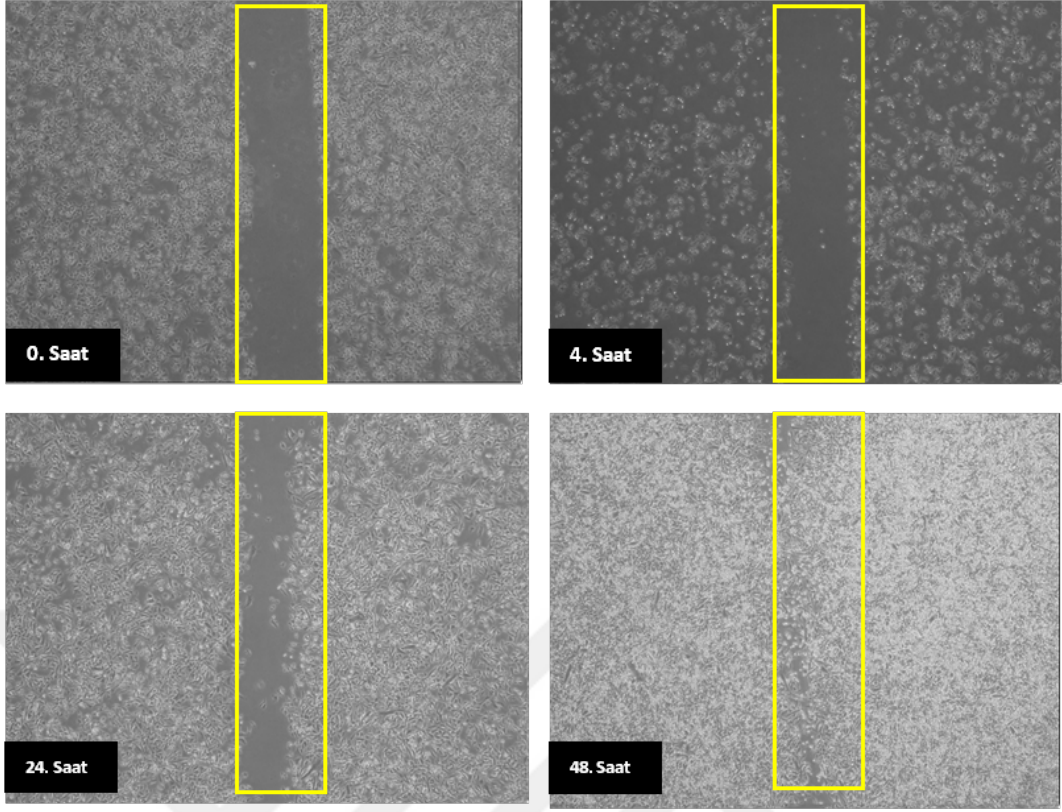


Şekil 13. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları

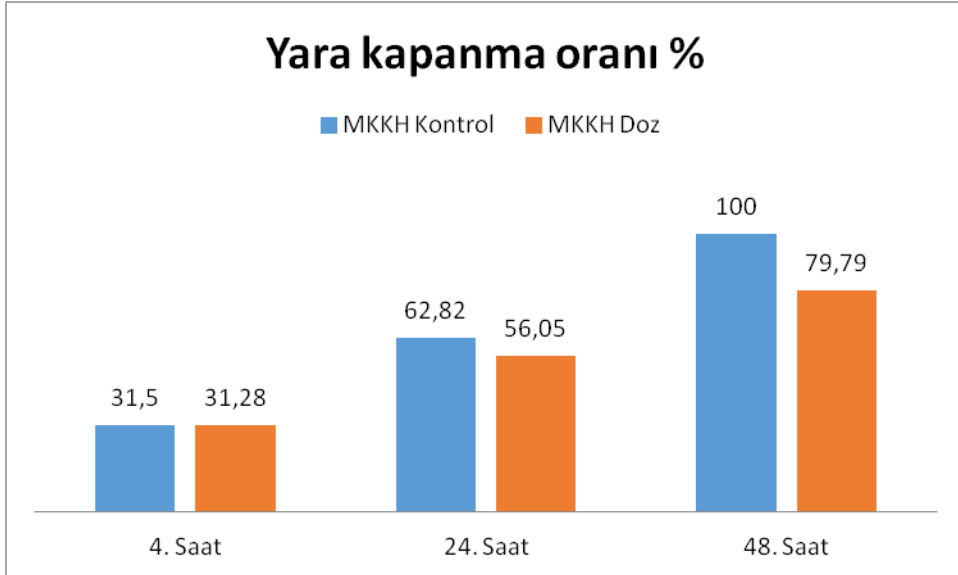
MKKH'lerinin kontrol grubunda 4. saatte %31,5 kapanma, 24. saatte %62,82 kapanma, 48. saatte %100 kapanma gözlenirken, doz uygulanan grupta 4. saatte %31,28 kapanma, 24. saatte %56,05 kapanma, 48. saatte ise %79,79 kapanma gözlenmiştir.



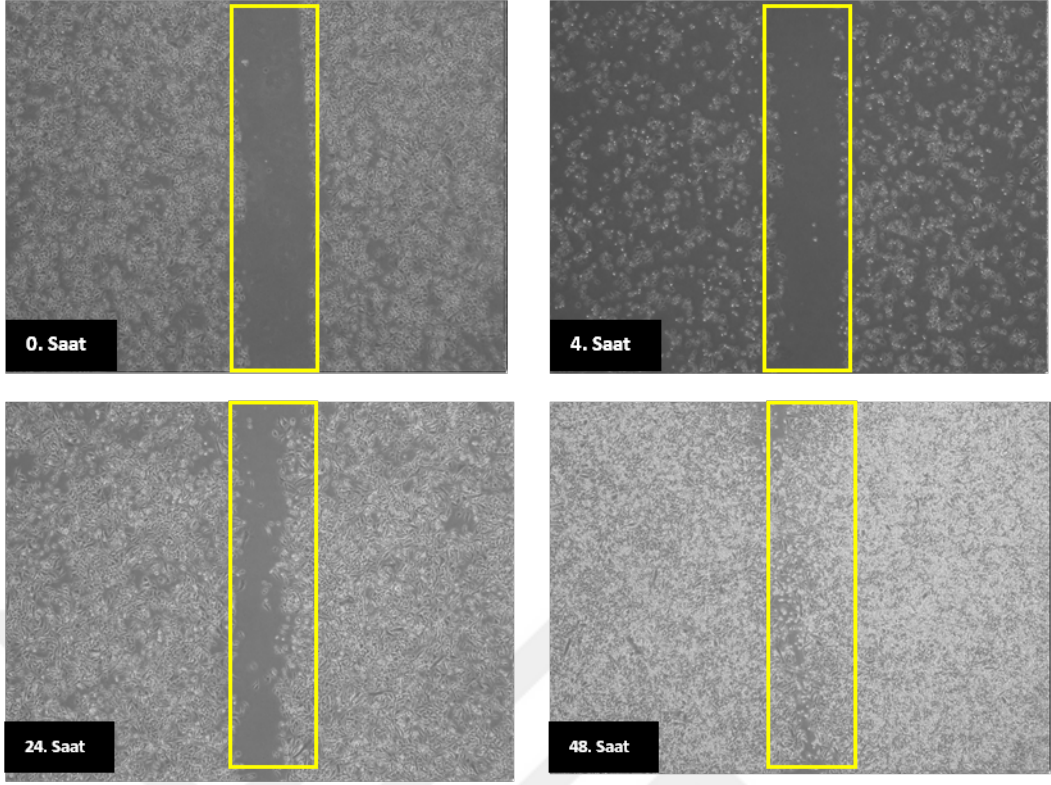
Şekil 14. Etken madde uygulanmayan MKKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi



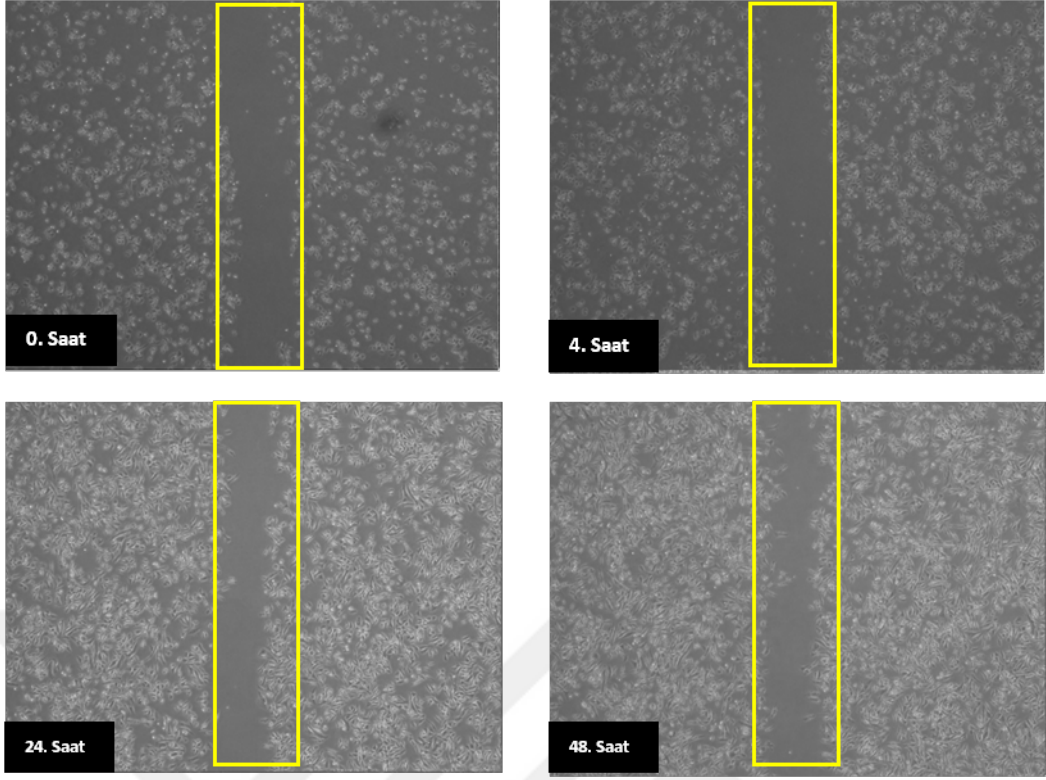
Şekil 15. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MKKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi



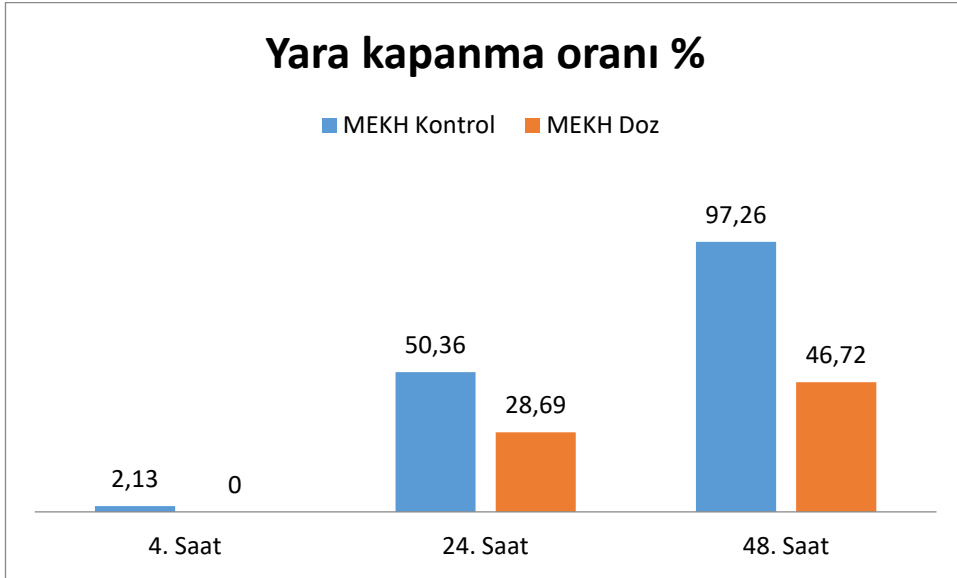
Şekil 16. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MKKH'lerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları



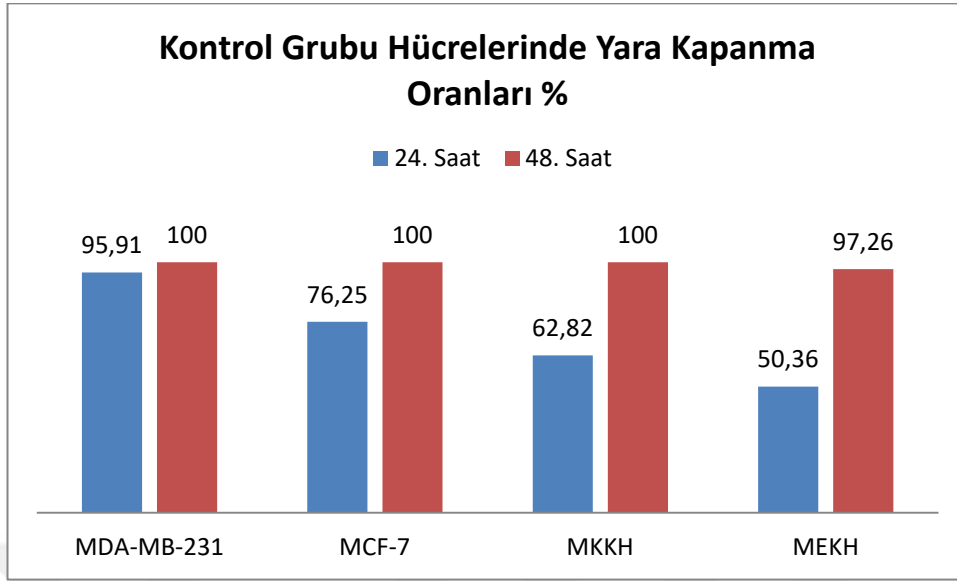
Şekil 17. Etken madde uygulanmayan MEKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi



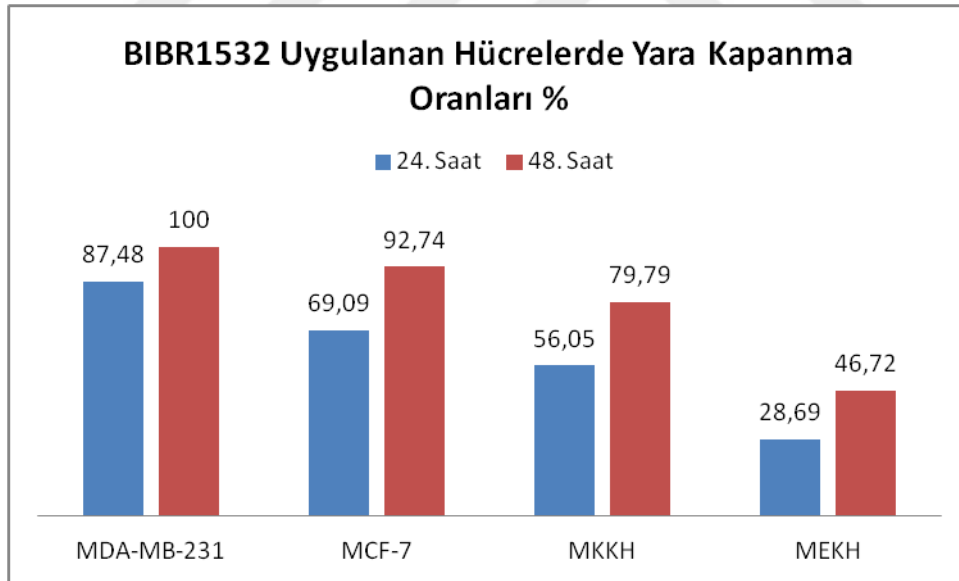
Şekil 18. BIBR1532 etken maddesi uygulanan MEKH'lerinde 0., 4., 24., 48. saatlerde migrasyon analizi



Şekil 19. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MEKH'lerinde 4., 24., 48. saatlerde yara kapanma oranları



Şekil 20. Etken madde uygulanmayan kontrol hücre gruplarında 24. ve 48. saatlerde yara kapanma oranlarının karşılaştırılması



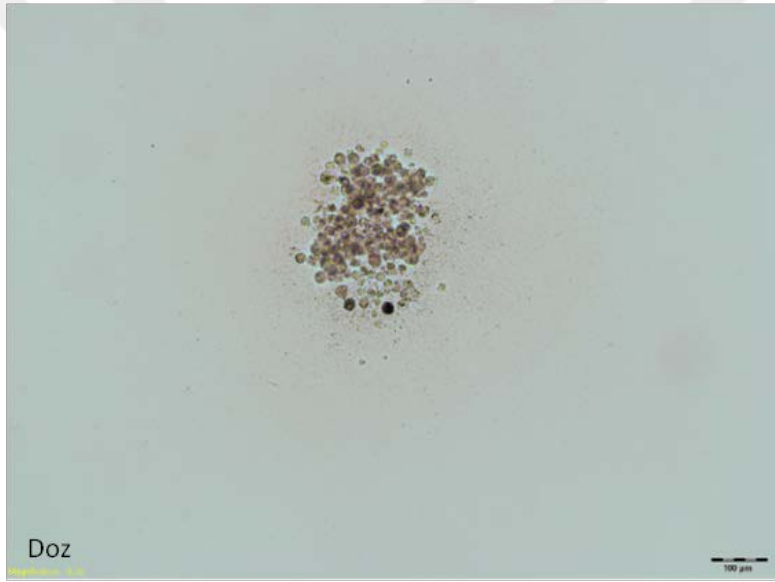
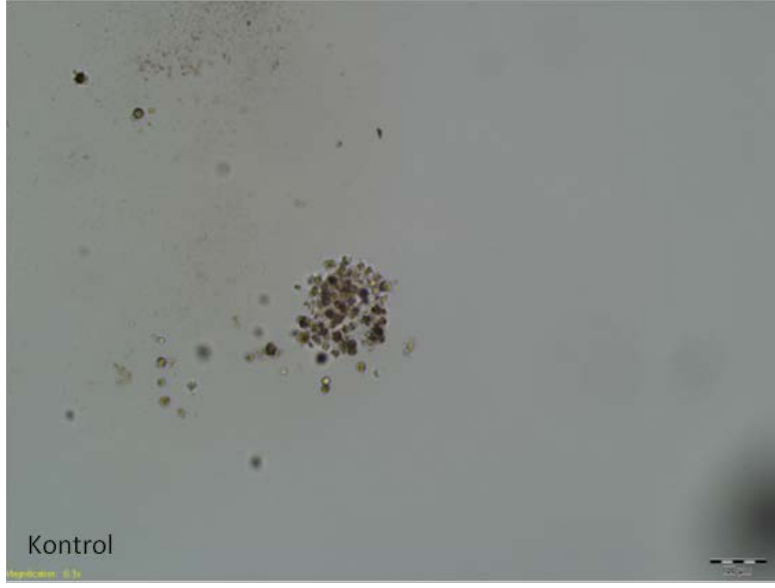
Şekil 21. BIBR1532 uygulanan hücre gruplarında 24. ve 48. saatlerde yara kapanma oranlarının karşılaştırılması

4.6. BIBR1532 Uygulanan ve Kontrol Hücre Gruplarında Asılı Damla Deneyi

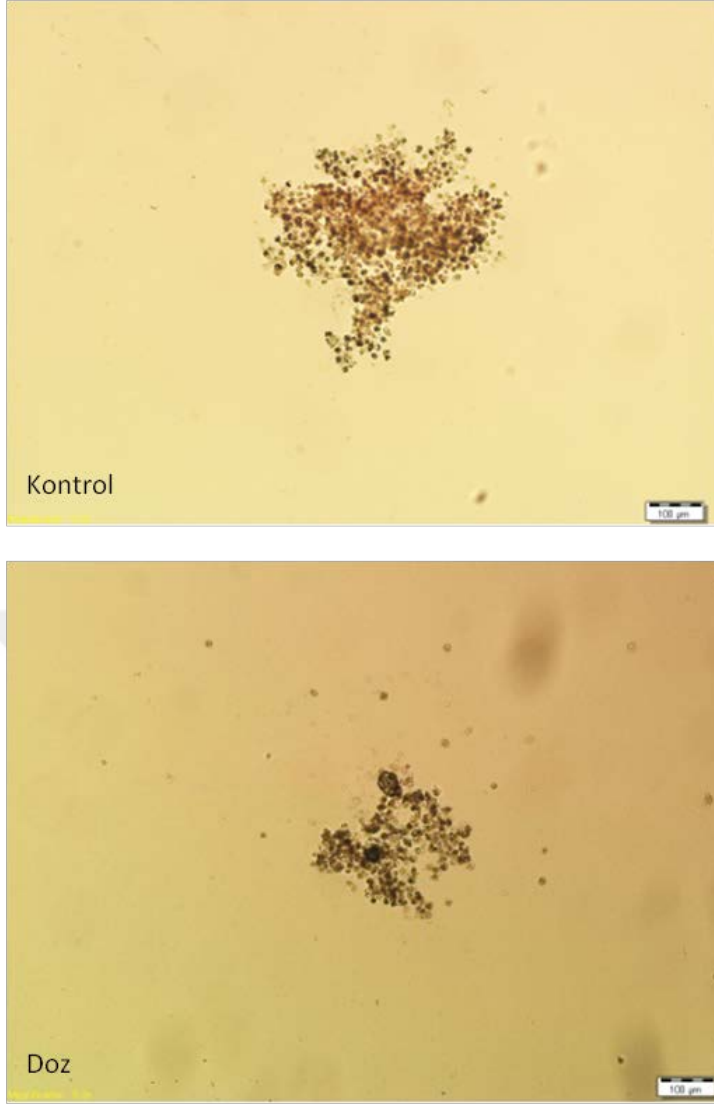
BBR1532 etken maddesinin hücrelerin sphere oluşturma yeteneklerine etkisini araştırmak amacıyla asılı damla deneyi gerçekleştirilmiştir.

10 günlük inkübasyon sonunda kontrol ve doz uygulanan hücre grupları ışık mikroskopuyla incelenmiş ve görüntüleri alınmıştır.

Deney sonucunda MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin kontrol ve doz gruplarında sphere oluşumu gözlenmemiştir. Kontrol ve doz gruplarında sphere oluşumu gözlenen meme kanseri ve meme epitel kök hücrelerinde ise, 3 farklı sphere'den alınan görüntülerdeki sphere alanları hesaplanarak ortalamaları alınmıştır. Analiz sırasında grafik oluşturma amacıyla kontrol gruplarının alanları 1 birim kabul edilmiş, doz grupları ise kontrol grubuna göre oranlanarak aşağıda belirtilmiştir.

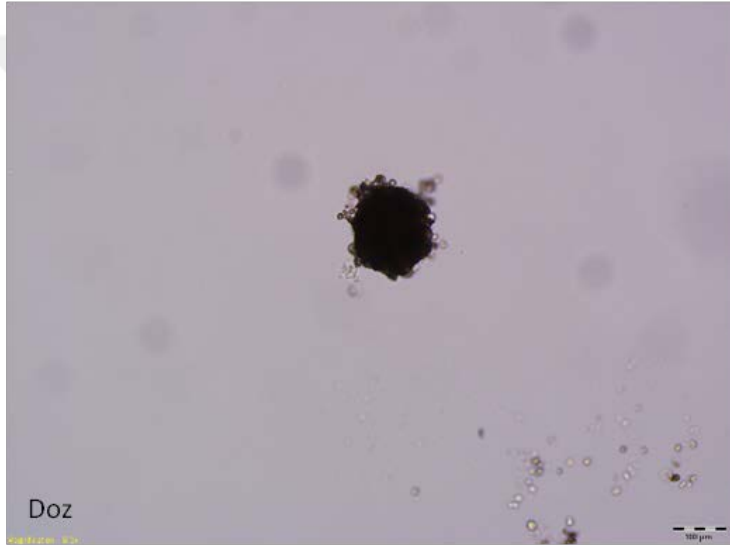
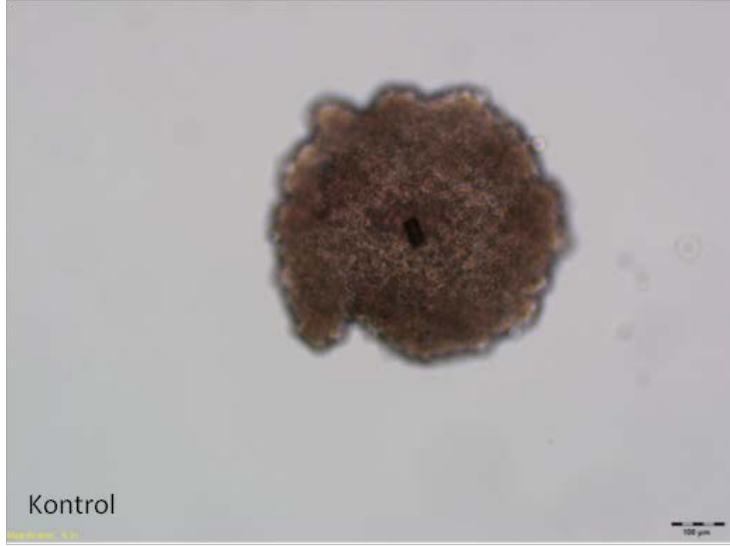


Şekil 22. BIBR1532 etken maddesinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi

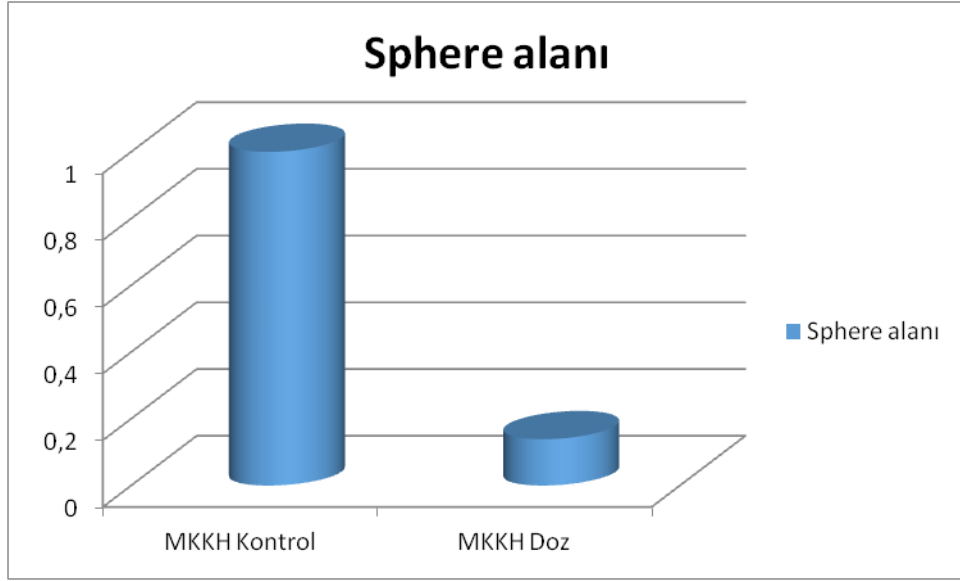


Şekil 23. BIBR1532 etken maddesinin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi

MKKH'lerinin kontrol grubunda oluşan sphere alanı 1 birim olarak kabul edilmiştir. Buna göre, doz uygulanan hücrelerin oluşturduğu sphere alanı ise 0,13 birim olarak hesaplanmıştır.

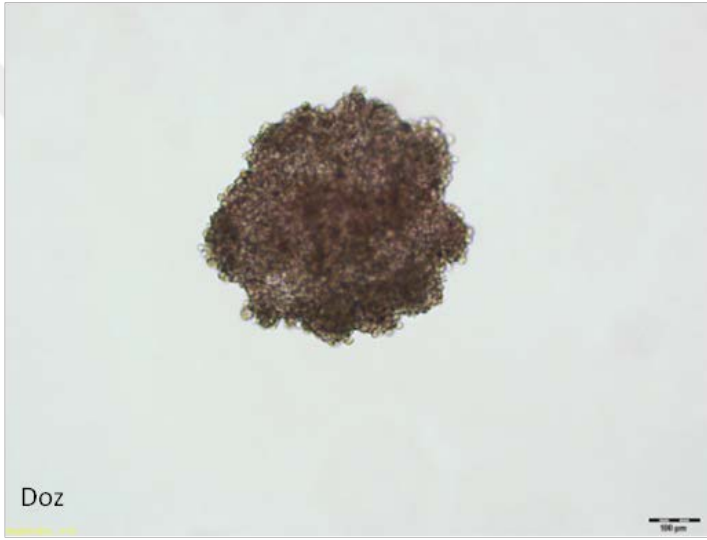
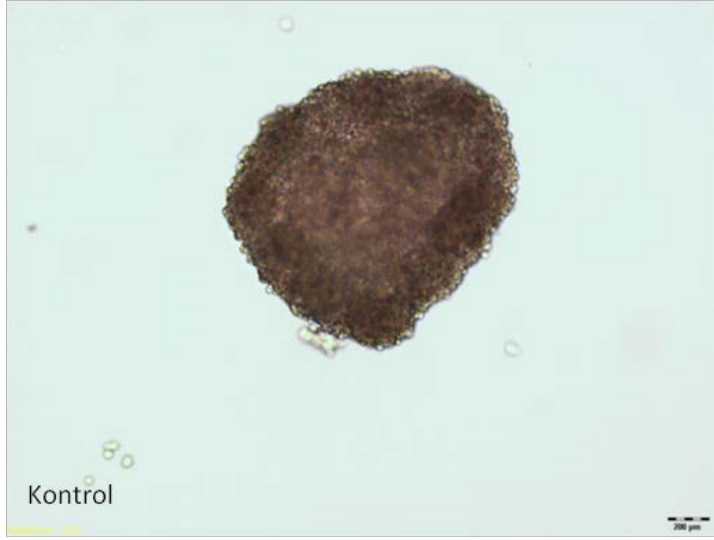


Şekil 24. BIBR1532 etken maddesinin MKKH'leri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi

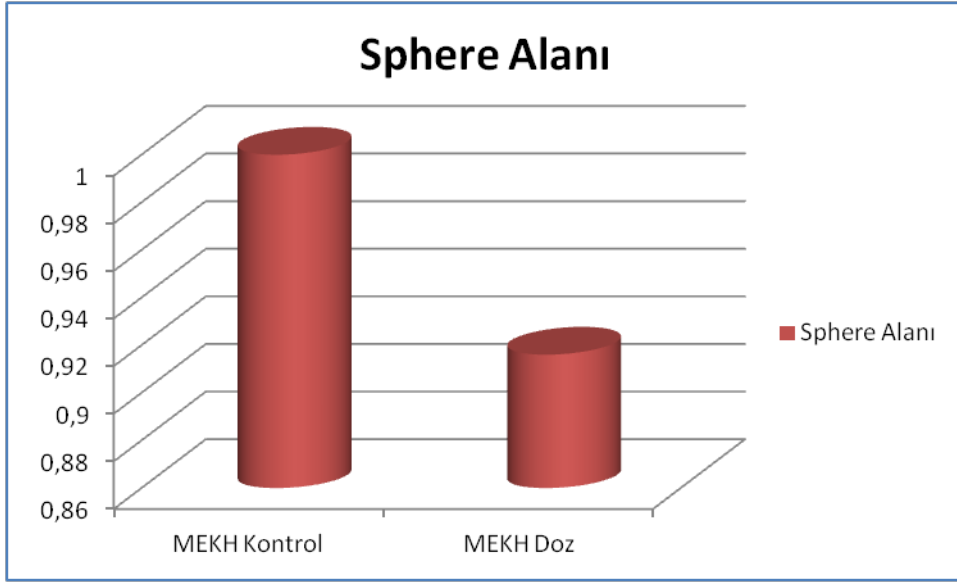


Şekil 25. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MKKH'lerinde oluşan sphere alanlarının karşılaştırılması

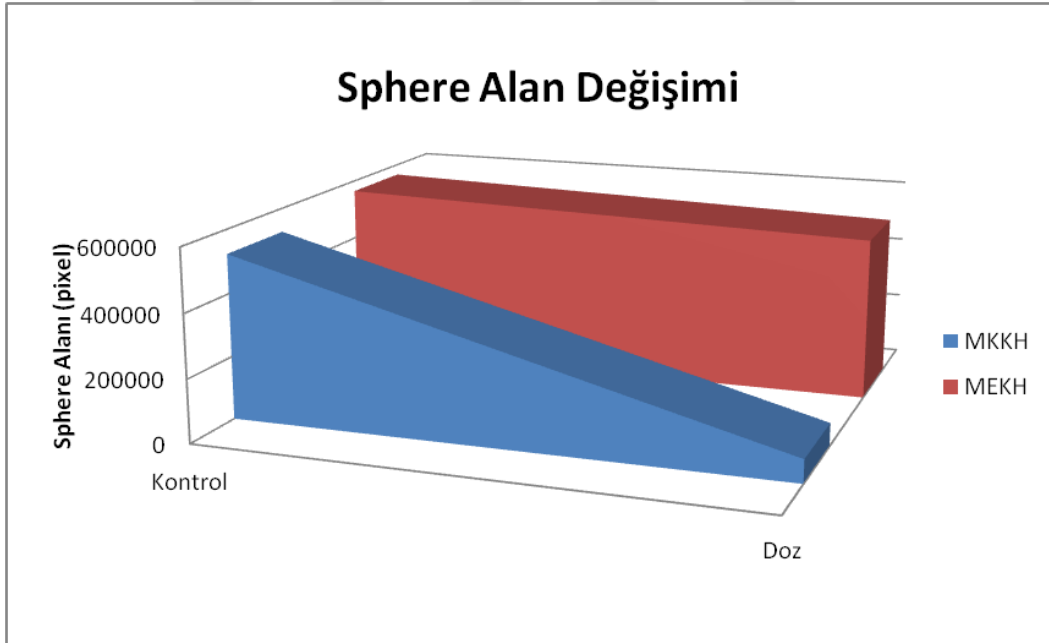
MEKH'lerinin kontrol grubunda oluşan sphere alanı 1 birim olarak kabul edilmiştir. Buna göre, doz uygulanan hücrelerin oluşturduğu sphere alanı ise 0,91 birim olarak hesaplanmıştır.



Şekil 26. BIBR1532 etken maddesinin MEKH'leri üzerindeki etkisinin asılı damla deneyi ile incelenmesi



Şekil 27. BIBR1532 etken maddesi uygulanan ve uygulanmayan MEKH'lerinde oluşan sphere alanlarının karşılaştırılması

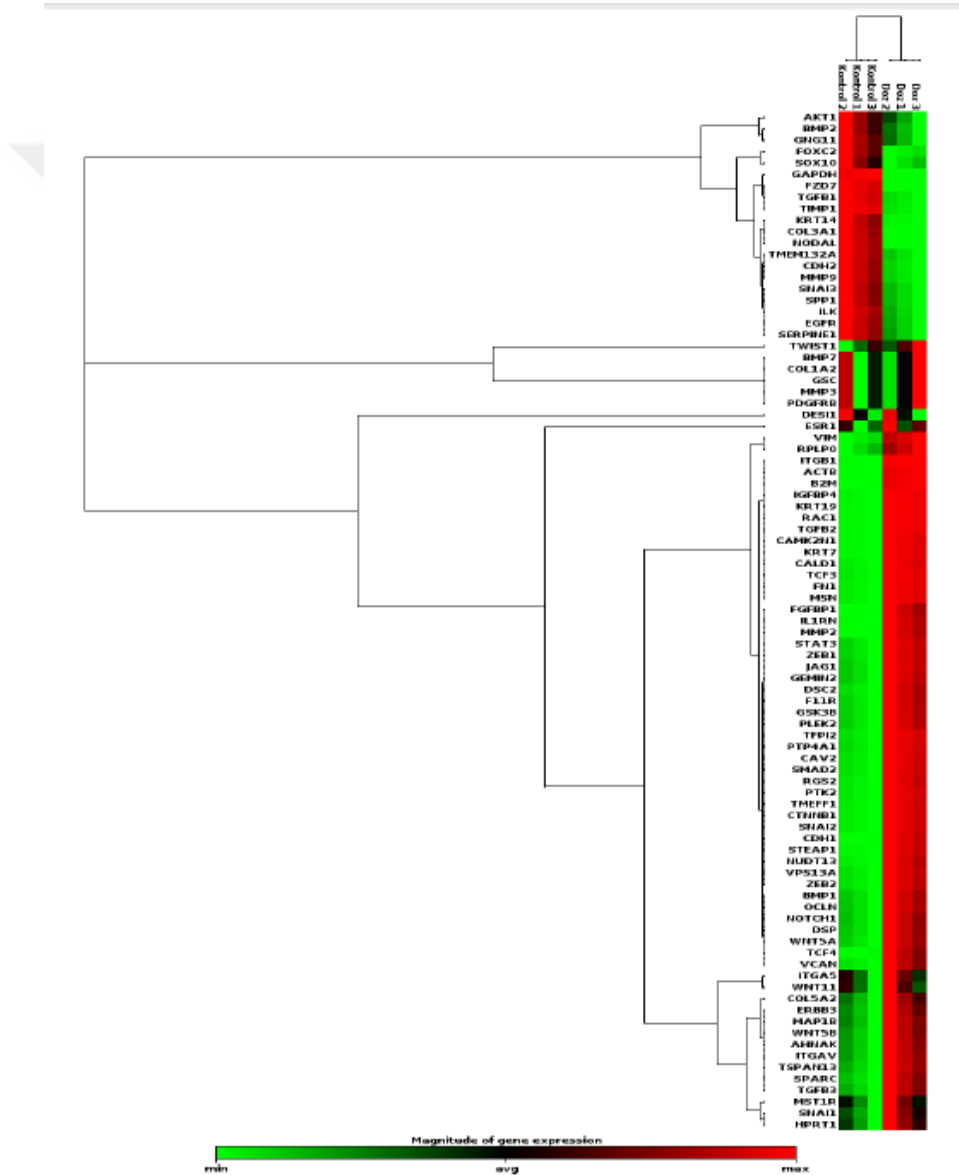


Şekil 28. MKKH ve MEKH'lerinin 10 gün sonunda kontrol ve doz gruplarındaki sphere alan değişiminin karşılaştırılması

4.7. BIBR1532'nin Hücre Hatlarında Meydana Getirdiği EMT İlişkili Gen Ekspresyon Değişimlerinin İncelenmesi

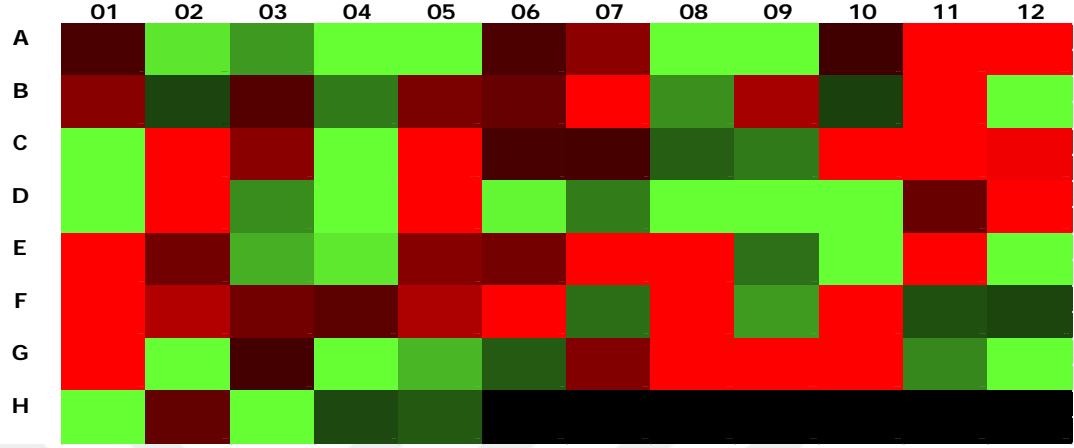
BIBR1532 etken maddesi uygulanan MDA-MB-231, MCF-7, MKKH ve MEKH'lerinde EMT mekanizmasıyla ilişkili genlerin kontrol hücre gruplarına göre ekspresyon değişimleri incelenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında CDH1, CDH2, MMP9, SNAI2 ve ZEB2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre 2 kattan fazla regüle olmuştur.



Şekil 29. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında EMT ilişkili genlerin clustergram analizi

Tablo 3. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında EMT ilişkili genlerin ısı haritası

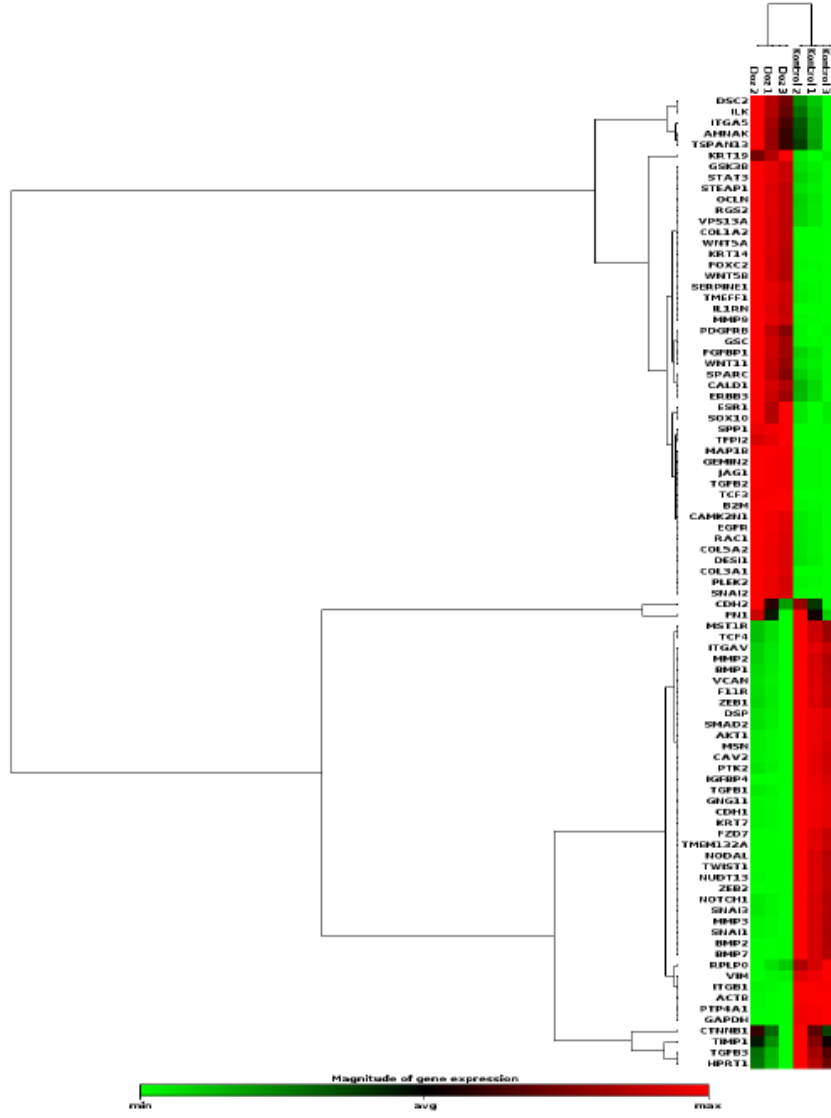


Tablo 4. BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değışimi

Gen Sembolü	Kat Regülasyonu	p Değeri
CDH1	16844.62	0,000009
CDH2	-2.93	0,000176
CTNNB1	4.43	0,000005
FN1	2.82	0,000001
MMP9	-2.72	0,000199
SMAD2	2.20	0,0001
SNAI2	3.85	0,000005
TGFB2	4.58	0

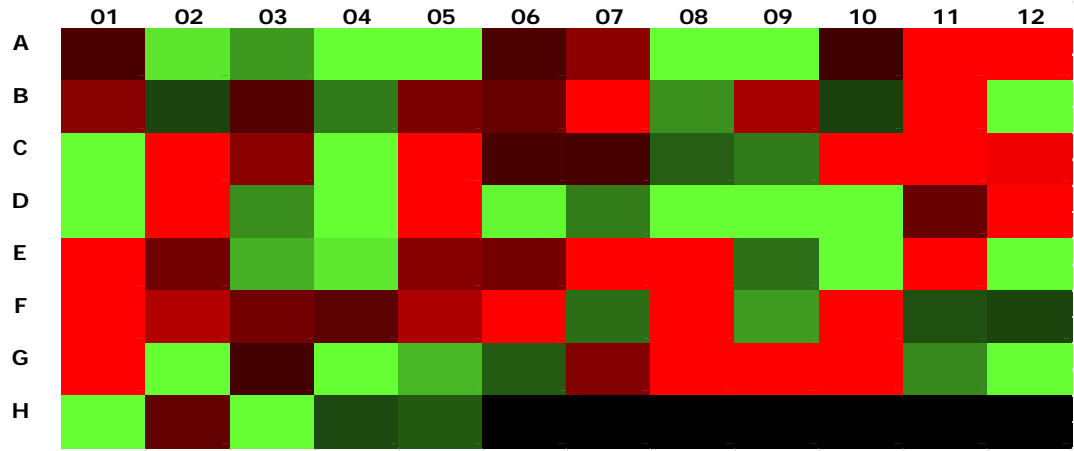
VCAN	5.16	0,00032
VIM	1.59	0,000027
WNT5A	2.42	0,000211
ZEB2	3.05	0,000028

BIBR1532 ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında CDH1, FZD7, NOTCH1, SNAI1, TWIST1 ve ZEB1 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre iki kattan fazla değişiklik göstermiştir.



Şekil 30. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında EMT ilişkili genlerin clustergram analizi

Tablo 5. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında EMT ilişkili genlerin ısı haritası

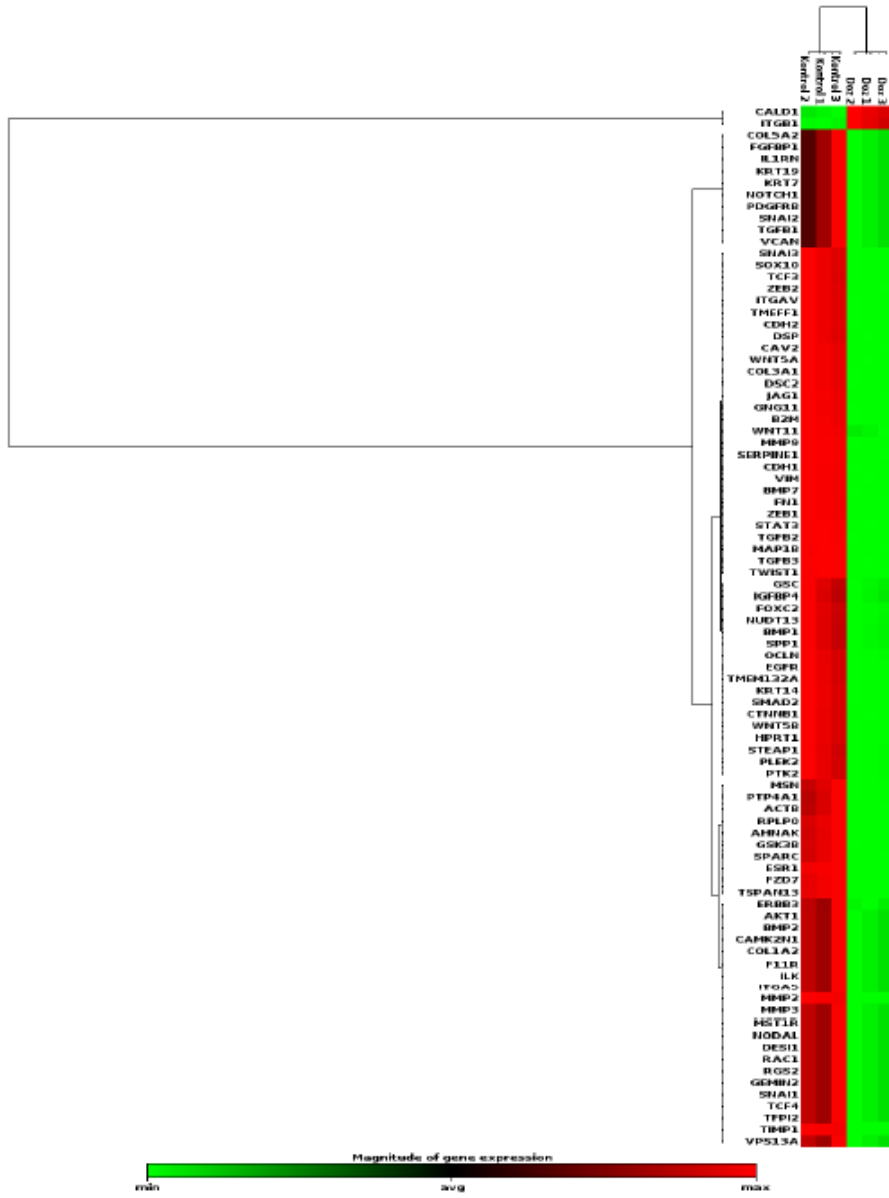


Tablo 6. BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücre hattında EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değışimi

Gen Sembolü	Kat Regülasyonu	p Değeri
BMP1	-2.39	0,000039
CDH1	-5.30	0
COL1A2	50.33	0,000012
FZD7	-149.78	0,000008
GSK3B	2.18	0,000008
JAG1	5.18	0
MMP9	16.15	0,000005
NOTCH1	-5.64	0,000032
SNAI1	-13.99	0,000037

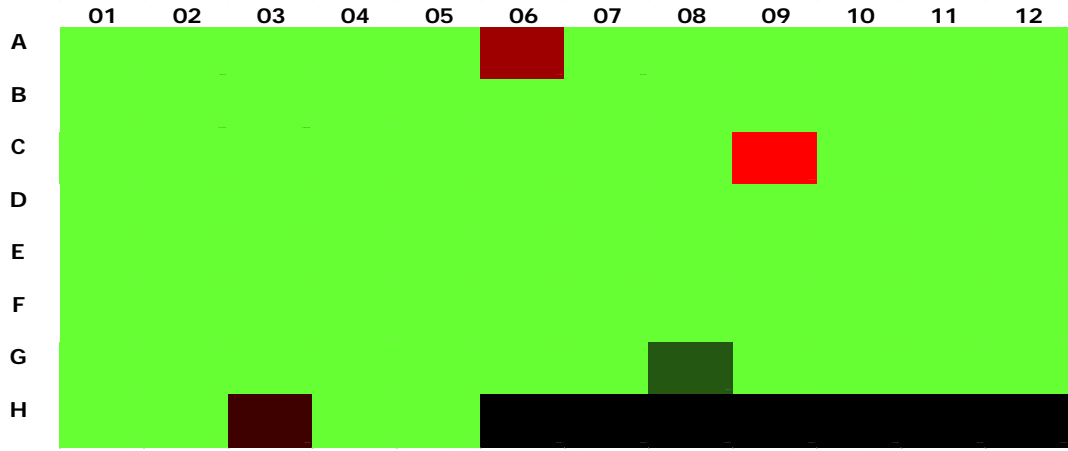
SNAI2	36.09	0,000002
SNAI3	-4.68	0,000029
TWIST1	-143.01	0,000018
WNT11	4.57	0,000139
VCAN	-2.86	0,000024
ZEB1	-2.12	0,000029

BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili genlerden FN1, FZD7, GSK3B, TWIST1, VIM, ZEB1 ve ZEB2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre iki kattan fazla regüle olmuştur.



Şekil 31. BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili genlerin clustergram analizi

Tablo 7. BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili genlerin ısı haritası



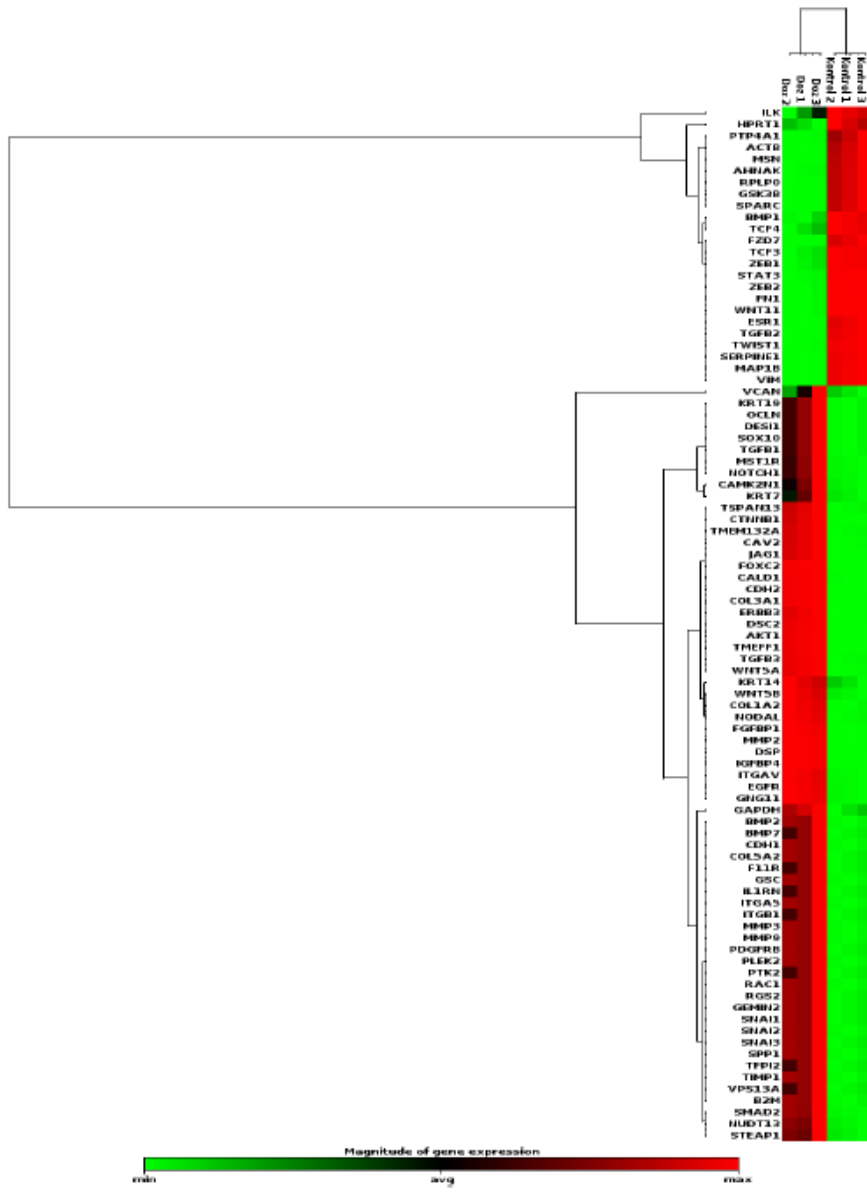
Tablo 8. BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi

Gen Sembolü	Kat Regülasyonu	p Değeri
AHNAK	-101.13	0,000003
DSP	-224.93	0
FN1	-760.08	0
FZD7	-1758.34	0
GSK3B	-14.52	0,00002
JAG1	-73.01	0
SERPINE1	-202.25	0
TWIST1	-278.20	0
VIM	-1555.68	0

WNT5A	-495.70	0
ZEB1	-109.9	0
ZEB2	-38.59	0

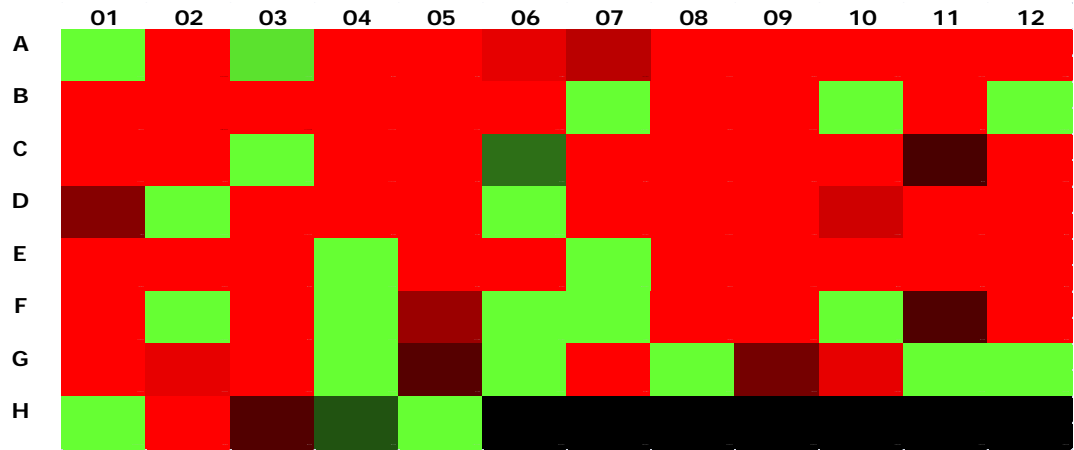
BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde CDH1, FN1, FZD7, GSK3B, VIM ve ZEB2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre iki kattan fazla değişmiştir.





Şekil 32. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde EMT ilişkili genlerin clustergram analizi

Tablo 9. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde EMT ilişkili genlerin ısı haritası



Tablo 10. BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde EMT ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi

Gen Sembolü	Kat Regülasyonu	p Değeri
CDH1	10.41	0,00019
FN1	-16.6	0
FZD7	-925.02	0,000002
GSK3B	-19.7	0,000012
JAG1	7.26	0,00001
SERPINE1	-106.4	0
VIM	-83.48	0
ZEB2	-14.25	0

5. Tartışma

Meme kanseri hiyerarşisinde küçük bir grubu kapsayan ve kök hücre özelliği gösteren tümör hücreleri meme kanseri kök hücreleri olarak gruplandırılmıştır. Bu hücreler EpCAM pozitif, CD24 negatif, CD44 pozitif fenotipi ve immün yetersiz farelerde tümör oluşturma yeteneğiyle solid tümörler arasında ilk keşfedilen KKH popülasyonu konumundadır(Luo ve ark., 2015). Sağlıklı kök hücrelerle kendini yenileme ve farklılaşma, yüksek telomeraz aktivitesi gibi ortak özellikleri bulunan KKH'lerinin sağlıklı hücrelerden farklı olarak tümör relapsı, tedavi direnci ve metastaza neden olduğu düşünülmektedir(Lipinska ve ark., 2017). Tümör heterojenitesini oluşturan baş etmenlerden biri kabul edilen KKH'leri, tümörün farklı dokulara yayılmasında da önemli bir rol oynamaktadır(Mitra, Mishra, ve Li, 2015).

MKKH'lerinde, EMT ilişkili genlerin ekspresyon profilinde dinamik bir değişim görüldüğü savunulmaktadır. Dolayısıyla moleküler hedefli tedavi yöntemi araştırmalarında, MKKH'lerinin hedeflenmesi büyük önem taşımaktadır(S. Liu ve ark., 2014).

EMT mekanizmasının KKH fenotipini koruma ve kök hücrelerin kendini yenileme özelliklerinde etkili olduğu bildirilmektedir(Kuşoğlu ve Biray Avcı, 2019). Çalışmamızda BIBR1532 molekülünün hücrelerin kendini yenileme (self renewal) kapasiteleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla asılı damla deneyi gerçekleştirilmiştir. MKKH ve MEKH doz ve kontrol gruplarında sphere oluşumu gözlenirken MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde sphere oluşumu gözlenmemiştir. Bu durum kök hücrelerin kendini yenileme özelliğiyle ilişkilendirilmiştir. MEKH ve MKKH grupları kendi içinde karşılaştırıldığında, BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinin sphere oluşturma kapasitesinde sağlıklı kök hücelere oranla büyük bir düşüş tespit edilmiştir. Sonuç olarak telomeraz inhibitörünün KKH'lerinin köklülük özelliklerini inhibe etmekte daha etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Klinik çalışmalarda, hTERT ekspresyonunun artışı insan malignitelerinde kötü prognozla sonuçlanırken, in vitro ve in vivo araştırmalarda hTERT aşırı ekspresyonu kemoterapi direnciyle ilişkilendirilmektedir(Z. Liu ve ark., 2013). Telomeraz pozitif kanser kök hücreleri ise tümörü oluşturan hücreler arasında tedaviye en dirençli alt grup olarak kabul edilmektedir(Lipinska ve ark., 2017). Telomer uzatma görevi dışında, birçok biyolojik aktivitede fonksiyonu olan hTERT'in transkripsiyon faktörü

olarak görev yaptığı bilinmekte, ayrıca KHH'lerinin köklülüğü, kanser hücrelerinin mobilizasyonu ve proliferasyonunu büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir(Lipinska ve ark., 2017; Sarin ve ark., 2005).

Çalışmamızda spesifik bir telomeraz inhibitörü olan BIBR1532'nin MDA-MB-231 hücre hattı için IC₅₀ değeri 72. saatte 18,04 µM bulunmuştur ve literatürle benzerlik göstermektedir(Wardi ve ark., 2014). Literatür incelendiğinde BIBR1532 etken maddesinin MEKH'leri için IC₅₀ değeri bulunmamaktadır. Çalışmamızda, MEKH'lerinde BIBR1532'nin IC₅₀ dozu 72. saatte 38,71 µM olarak hesaplanmıştır. BIBR1532'nin MCF-7 ve MKKH'leri için IC₅₀ değeri olarak ise önceki çalışmalarımızda elde edilen veriler kullanılmıştır.

TERT aşırı ekspresyonunun, telomeraz aktivitesinden bağımsız olarak, β-katenin transkripsiyonunu düzenleyerek kök hücre proliferasyonunu ve mobilitesini arttırdığı savunulmaktadır(Sarin ve ark., 2005). Mide kanseri hücreleriyle yapılan bir çalışmada, hTERT'in β-katenin degradasyonunu önlediği, hTERT aşırı ekspresyonunun β-katenin ekspresyonunu ve EMT programını uyardığı vurgulanmıştır. Çalışmada, hTERT aşırı ekspresyonu Snail ve vimentin mRNA transkripsiyonunu artırmış, bunun yanında in vivo hücre kolonizasyonunda artışa neden olmuştur. Sonuç olarak, mide kanseri hücrelerinde hTERT tarafından indüklenen EMT'nin ve köklülük fenotipinin Wnt/β-katenin sinyal yolağıyla ilişkili olduğu savunulmuştur(Xu ve ark., 2012).

Çalışmalar yüksek GSK3β ekspresyonunun genel sağkalım oranıyla negatif olarak korele olduğunu göstermektedir. Ayrıca KKH'lerinde aktif ekspresyonu gözlenen GSK3β'nin inhibisyonunun, mezenkimal belirteç ekspresyonlarını azaltarak EMT mekanizmasını regüle ettiği bilinmektedir(Vijay et al., 2019). Çalışmamızda BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde GSK3β ekspresyonunun kontrol grubuna göre 14.52 kat azaldığı gözlenmiştir. Etken madde uygulanan MKKH'lerinin migrasyon potansiyelinin kontrol grubuna göre azalması, ekspresyon değişimini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda, BIBR1532 uygulanan meme epitel ve meme kanseri kök hücrelerinde telomerazın inhibisyonuyla Wnt sinyal yolağında görevli Frizzled ailesi reseptör 7 geninin (FZD7) ekspresyonu azalmıştır. Bununla beraber MEKH'lerinde WNT11 geninin ekspresyonu azalırken, MKKH'lerinde WNT5A ekspresyonunun azaldığı

gözlemlenmiş ve telomeraz inhibisyonunun hücrelerin köklülük özelliğini etkilediğini düşündürmüştür.

TGF- β , Notch, Wnt ve Ras/Erk sinyal yollarının yanında inflamasyon, hipoksi ve UV ışığı, EMT mekanizmasını tetikleyen ve EMT-TF'lerini aktive eden uyaranlar arasındadır(Nieto, Huang, Jackson, ve Thiery, 2016).

Wnt/ β -katenin yolağı üzerinden hTERT tarafından regüle edilen EMT mekanizmasının, KKH'lerinin köklülük ve kendini yenileme özellikleriyle ilişkili olduğu savunulmaktadır. β -kateninin, TGF- β aracılığıyla EMT mekanizmasıyla ilişkili hedef genlerin transkripsiyonunu regüle ettiği bilinmekte, dolayısıyla hTERT'in hedeflenmesinin, kanser progresyonunu önleme açısından faydalı olabileceği öngörülmektedir(Z. Liu ve ark., 2013). Çalışmamızda, MKKH'lerinde TGF- β 3 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.

Meme epitel hücrelerinde EMT'nin indüklendiği bir çalışmada, bu hücrelerin mezenkimal kök hücre benzerliği gösterdikleri ve birden fazla dokuya farklılaşabildikleri gözlenmiştir(Battula ve ark., 2010).

Normal meme kök hücrelerinde Slug tarafından kontrol edilen mezenkimal fenotipik değişiklikler, meme kanseri kök hücrelerinde Snail tarafından kontrol edilmektedir. Meme kanserinde ATM aracılıklı DNA hasar cevabını düzenleyen Snail ve Slug, EMT mekanizması dışında tümör progresyonu ve ilaç direnci gibi farklı alanlarda etkili olmaktadır(Ye ve ark., 2017) Çalışmamızda, EMT ilişkili transkripsiyon faktörü Slug (SNAI2) ekspresyonunun MCF-7, MDA-MB-231, MEKH'lerinde BIBR1532 uygulanmayan kontrol gruplarına göre sırasıyla 36.09, 3.85 ve 10.41 kat arttığı tespit edilmiştir.

Kanser hücrelerini normal epitel hücrelere farklılaştırma odaklı tedavi yöntemlerinin hücre proliferasyonunu azalttığı ve kemoterapi duyarlılığını arttırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte, kanser hücre plastisitesi ile metastaz sırasında EMT'nin dinamik bir mekanizma olması epitelyal de-diferansiyasyon tedavilerinin etkisini azaltmaktadır(Brabletz, Kalluri, Nieto, ve Weinberg, 2018).

EMT'nin yalnızca DNA sekansında gerçekleşen değişikliklere bağlı olmadığına, epigenetik değişikliklerin kanser hücrelerinde EMT'yi düzenlediğine dair birçok kanıt bulunmakta, bu sebeple, diğer biyolojik programlarda olduğu gibi, kanser

hücrelerinin genom düzeyinde sekanslanması EMT'yi aydınlatma konusunda yetersiz kalmaktadır(Dongre ve Weinberg, 2018).

Tedavi direncine neden olduğu çalışmalarda vurgulanan EMT mekanizmasının, hücre sağkalımıyla ilişki genleri regüle ederek meme kanserinde kemoterapi direncine neden olduğu ve kanser hücrelerine tümör başlatma yeteneği kazandırdığı bildirilmektedir(Lim ve ark., 2013). Bununla beraber, EMT sonucunda oluşturulan savunulan KKH'lerinde, ABC taşıyıcı proteinlerinin artışı tedavi direnciyle ilişkilendirilmektedir(Shibue ve Weinberg, 2017).

EMT'nin metastaz formasyonu ile ilişkisini gösteren nihai kanıt az olmakla birlikte, ZEB1 ekspresyonunun invazyon ve metastaz; SNAIL ekspresyonunun ise tümör disseminasyonu için gerekli olduğu son çalışmalarda vurgulanmaktadır(Dongre ve Weinberg, 2018). Çalışmamızda ZEB1 ekspresyonu BIBR1532 uygulanan MDA-MB-231 ve MKKH'lerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 2.12 ve 109.9 kat azalmıştır. ZEB1 ekspresyonunun azalmasıyla hücrelerin invazyon kapasitelerinin azalacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, meme kanseri metastazına neden olduğu savunulan MKKH'lerinde, BIBR1532 ile muamele sonrası ZEB1 ve ZEB2 ekspresyonlarının sırasıyla 109,9 ve 38,59 kat azaldığını gözlemlenmiştir. Gerçekleştirdiğimiz yara iyileşme deneyinde, BIBR1532'nin uygulanan MKKH'lerinin kontrol grubuna göre 48 saat sonunda hücrelerin yara kapatma hızında %20 oranında bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu verilerin gen ekspresyon değişimlerinden elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

Bir başka çalışmada ise kolorektal kanser örneğinde hTERT'in ZEB1 ile kompleks oluşturarak doğrudan e-kaderin promoter bölgesine bağlandığı ve e-kaderin'in ekspresyonunu düzenleyerek EMT mekanizmasını regüle ettiği savunulmaktadır(Qin ve ark., 2016). Bu çalışmada, BIBR1532 uygulanan MEKH'lerinde telomeraz inhibisyonu ile birlikte e-kaderin gen ekspresyonunun 10.41 kat arttığını, ZEB2 ekspresyonunun ise 14.25 kat azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber, etken maddenin MEKH'lerinin yara kapatma hızını kontrol hücrelerine göre %50 oranında yavaşlattığı saptanmıştır. Proliferasyon kapasitesi yüksek MEKH'lerinde telomerazın aktif olarak görev yaptığı göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen veriler şaşırtıcı değildir.

HER-2 pozitif meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışma, EMT programının WNT yolağı üzerinden aktiveleştirilebildiğini göstermiştir. WNT3A'nın transkripsiyon faktörleri Twist, Slug ve N-kaderin ekspresyonunu arttırdığı, e-kaderin ekspresyonunu baskılandığı bildirilmektedir(Wu ve ark., 2012).

Benzer şekilde, NOTCH sinyal yolağının aktivasyonunun, üçlü-negatif meme kanserinde EMT'yi indüklediği ve saldırgan bir tümör fenotipine neden olduğu vurgulanmaktadır(Zhang ve ark., 2016). Bir NOTCH reseptörü ligandı olan Jagged 1 (JAG1), meme kanseri kök hücrelerinin kendini yenileme ve mammosphere oluşturma yetenekleriyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca meme kanserinde JAG1'in yüksek ekspresyonu, yüksek invazyon kapasitesi ve SLUG üzerinden EMT mekanizması regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir(Li, Masiero, Banham, ve Harris, 2014). Çalışmamızda, BIBR1532 uygulanan MKKH'lerinde JAG1 ekspresyonunun kontrol hücrelerine göre 73 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bununla beraber çalışmamızda, BIBR1532 uygulanan MCF-7 hücrelerinde NOTCH1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre 5.64 kat azaldığı tespit edilmiştir.

NOTCH sinyal yolağının ayrıca TGF- β ile SMAD transkripsiyon faktörü üzerinden etkileşerek EMT mekanizmasını indükleyebildiği bilinmektedir(Zavadil, Cermak, Soto-Nieves, ve Böttinger, 2004). Yine meme kanseri hücreleriyle yapılan bir çalışmada, TGF- β 'nin EGF ile sinerji göstererek SMAD üzerinden EMT'yi indükleyebildiği, EGFR reseptörünün yüksek ekspresyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerinde motiliteyi arttırdığı vurgulanmıştır(Kim, Kong, Chang, Kim, ve Kim, 2016). Çalışmamızda, telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin EGFR gen ekspresyonunu etkilemediği gözlenmiştir.

Akalay ve ark., EMT mekanizmasının aktif olduğu kanser hücre gruplarında, CD8⁺ T hücrelerinin sitolitik aktivitesinin otofaji indüksiyonuyla durdurulduğunu, otofajinin inhibe edildiği meme kanseri hücrelerinin T hücre lizisine duyarlılık gösterdiğini savunmaktadır(Akalay ve ark., 2013).

Hücre homeostasisini korumada önemli bir yere sahip olan otofaji, KKH potensinin devamlılığı sağlamanın yanında, düşük besin ve oksijen koşullarında hücre canlılığı için gerekli bir mekanizmadır(Bordi, Locatelli, Nazio, Cianfanelli, ve Cecconi, 2019). Meme kanseri çalışmalarında otofajinin KKH ilişkili mammosphere artışına

neden olduğu, otofaji ilişkili genler BECLIN 1 ve ATG4'ün büyüme için gerekli olduğu vurgulanmıştır(Gong ve ark., 2013).

MKKH'lerinde otofajinin EGFR/STAT3 veya TGF- β /SMAD sinyal yolağını kullanarak regüle olduğu, otofaji inhibisyonunun TGF- β 2 ve TGF- β 3 ekspresyonunu azaltarak KKH fenotipinin devamlılığı için gerekli olan SMAD sinyal yolağını sekteye uğrattığı savunulmaktadır. Bununla birlikte, KKH devamlılığı için önemli olduğu savunulan IL-6'nın, otofaji inhibisyonuyla korele olarak baskılanarak STAT3/JAK2 yolağı üzerinden MKKH biyolojisini regüle ettiği bildirilmektedir(Bordi ve ark., 2019; Thorburn, Maycotte, Goodall, Thorburn, ve Jones, 2015).

Otofaji mekanizmasının EMT ile ilişkisini aydınlatan alışmalar, MKKH'lerinde otofaji inhibisyonunun hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini sınırladığını, bununla beraber epitelyal belirteç olan CD24 ekspresyonunun artıp mezenkimal fenotip belirteci vimentinin azaldığını göstermiştir(Cufı ve ark., 2011).

6. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda telomeraz inhibitörü BIBR1532 molekülünün MDA-MB-231, MCF-7, meme kanseri kök ve meme epitel kök hücrelerinde EMT mekanizmasıyla ilişkisi incelenmiştir. Hücre hatlarında etken maddenin sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiş, daha sonra asılı damla deneyiyle hücrelerin sphere oluşturma yetenekleri araştırılmıştır. Her hücre hattı için gerçekleştirilen yara iyileşmesi deneyiyle telomeraz inhibisyonunun hücrelerin migrasyonuna etkisi incelenmiştir. Etken madde uygulanan hücrelerde EMT ilişkili genlerin ekspresyon değişimleri gerçek zamanlı qPCR ile incelenmiş ve kontrol gruplarına göre analiz edilmiştir.

Çalışmamızda BIBR1532'nin MDA-MB-231 ve MEKH'leri için IC₅₀ değerleri 72. saat için sırasıyla 18,04 µM ve 38,71 µM bulunmuştur. MDA-MB-231 hücreleri için bulunan IC₅₀ değeri literatürdeki verilerle örtüşmektedir. MEKH'leri için BIBR1532 IC₅₀ değeri ilk kez bu çalışmayla elde edilmiştir. Etken maddenin çalışmamızda kullanılan kanser hücreleri üzerinde apoptotik etki göstermemesi nedeniyle, BIBR1532'nin kanser kök hücreler üzerinde daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Asılı damla deneyiyle BIBR1532'nin köklülük belirteci olan sphere oluşturma kapasitelerini incelediğimizde, etken maddenin kök hücrelerin sphere alanlarını azalttığını gözlemledik. BIBR1532'nin hücrelerin migrasyonuna etkisini yara iyileşme deneyiyle incelediğimizde, kanser kök ve epitel kök hücrelerin migrasyon potansiyelinin kontrol grubuna göre bir hayli azaldığını gözlemledik. Etken madde uygulanan kök hücrelerde EMT transkripsiyon faktörü ZEB2 ve mezenkimal hücre belirteci vimentinin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre büyük oranda azalması, telomeraz inhibisyonunun EMT mekanizmasını regüle ettiğinin göstergesi olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, telomeraz inhibitörü BIBR1532'nin özellikle kanser kök hücreler üzerinde migrasyon ve EMT ilişkili gen ekspresyonları üzerindeki etkisini gösterdiğimiz bu çalışmanın literatüre katkı sağlayacağını ve sonraki çalışmalarla telomeraz aktivitesi ve EMT mekanizması arasındaki ilişkinin aydınlatılması açısından önem taşıdığını düşünmekteyiz.

7. Kaynaklar

- & A. C. S. B. C. F., & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, I. 2017. (2011). American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 01(03), 153–157. <https://doi.org/10.4236/ojog.2011.13029>
- Akalay, I., Janji, B., Hasmim, M., Noman, M. Z., André, F., De Cremoux, P., ... Chouaib, S. (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from t-cell-mediated lysis. *Cancer Research*, 73(8), 2418–2427. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2432>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- American Cancer Society. (2017). Understanding a Breast Cancer Diagnosis - Types of Breast Cancer Stages and Outlook (Prognosis). Retrieved from <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8580.00.pdf>
- Arndt, G. M., & MacKenzie, K. L. (2016). New prospects for targeting telomerase beyond the telomere. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 508–524. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.55>
- Banyard, J., & Bielenberg, D. R. (2016). HHS Public Access, 56(5), 403–413. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1060970>.The
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Publishing Group*, 23(10), 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Battula, V. L., Evans, K. W., Hollier, B. G., Shi, Y., Marini, F. C., Ayyanan, A., ... Mani, S. A. (2010). Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 28(8), 1435–1445. <https://doi.org/10.1002/stem.467>
- Biray Avcı, C., Dogan, F., Ozates Ay, N. P., Goker Bagca, B., Abbaszadeh, Z., & Gunduz, C. (2018). Effects of telomerase inhibitor on epigenetic chromatin modification enzymes in malignancies. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.27301>
- Bolton, E. E., Wang, Y., Thiessen, P. A., & Bryant, S. H. (2008). PubChem

- Substance and PubChem Compound. *Annual Reports in Computational Chemistry*, 4, 217–241. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(08\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(08)00012-1)
- Bordi, M., Locatelli, F., Nazio, F., Cianfanelli, V., & Cecconi, F. (2019). Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death & Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0292-y>
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>
- Brien-ball, C. O., & Biddle, A. (2017). Reprogramming to developmental plasticity in cancer stem cells. *Developmental Biology*, (May), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.025>
- Bryce, L. A., Morrison, N., Hoare, S. F., Muir, S., Keith, W. N., Morrisont, N., ... Keith, W. N. (2000). Mapping of the Gene for the Human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT, to Chromosome 5p15.33 by Fluorescence in Situ Hybridization. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2(3), 197–201. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900092>
- Cairney, C. J., & Keith, W. N. (2008). Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*, 90(1), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.025>
- Cancer Genome Atlas Network, Network, C. G. A., Cancer Genome Atlas Network, Cancer, T., Atlas, G., & Network, C. G. A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 313–319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>
- Cong, Y., & Shay, J. W. (2008). Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.74>
- Craene, B. De, & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3447>
- Cufí, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Vellon, L., & Menendez, J. A. (2011). Autophagy positively regulates the CD44+CD24-/low breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle*, 10(22), 3871–3885. <https://doi.org/10.4161/cc.10.22.17976>

- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., & Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(2), 518–527. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.2.518>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- El-Badawy, A., Ghoneim, N. I., Nasr, M. A., Elkhenany, H., Ahmed, T. A., Ahmed, S. M., & El-Badri, N. (2018). Telomerase reverse transcriptase coordinates with the epithelial-to-mesenchymal transition through a feedback loop to define properties of breast cancer stem cells. *Biology Open*, *7*(7), bio034181. <https://doi.org/10.1242/bio.034181>
- Fulawka, L., Donizy, P., & Halon, A. (2014). Cancer stem cells--the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biological Research*, *47*, 66. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-66>
- Gomez, D. E., Armando, R. G., Farina, H. G., Menna, P. L., Cerrudo, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Alonso, D. F. (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). *International Journal of Oncology*, *41*(5), 1561–1569. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1611>
- Gong, C., Bauvy, C., Tonelli, G., Yue, W., Deloménie, C., Nicolas, V., ... Mehrpour, M. (2013). Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*, *32*(18), 2261–2272. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.252>
- Gupta, G. P., & Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, *127*(4), 679–695. <https://doi.org/10.1016/J.Cell.2006.11.001>
- Jiang, J., Tang, Y. L., & Liang, X. H. (2011). EMT: A new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biology and Therapy*. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.8.15274>
- Kim, J., Kong, J., Chang, H., Kim, H., & Kim, A. (2016). EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget*, *7*(51). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13116>
- Koury, J., Zhong, L., & Hao, J. (2017). Targeting Signaling Pathways in Cancer

- Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells International*.
<https://doi.org/10.1155/2017/2925869>
- Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V., & Perelmuter, V. M. (2015). Cancer invasion: Patterns and mechanisms. *Acta Naturae*, 7(2), 17–28.
- Kuşoğlu, A., & Biray Avcı, Ç. (2019). Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*, 681. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.052>
- Kuşoğlu, Alican, & Biray Avcı, Ç. (2019). Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*, 681(September 2018), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.052>
- Leach, A. P. (1998). Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death. *Clinical Laboratory Science*, 11(6), 346–349. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10345500
- Li, D., Masiero, M., Banham, A. H., & Harris, A. L. (2014). The Notch ligand Jagged1 as a target for 1 anti-tumour therapy. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00254>
- Lim, S., Becker, A., Zimmer, A., Lu, J., Buettner, R., & Kirfel, J. (2013). SNAI1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Confers Chemoresistance and Cellular Plasticity by Regulating Genes Involved in Cell Death and Stem Cell Maintenance. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066558>
- Lipinska, N., Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Toton, E., Kopczynski, P., & Rubis, B. (2017). Telomerase and drug resistance in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2573-2>
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., ... Wicha, M. S. (2014). Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*, 2(1), 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.009>
- Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., ... Xu, D. (2013). Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene*, 32(36), 4203–4213. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.441>
- Luo, M., Clouthier, S. G., Deol, Y., Liu, S., Nagrath, S., Azizi, E., & Wicha, M. S.

- (2015). Breast cancer stem cells: Current advances and clinical implications. *Methods in Molecular Biology*, 1293, 1–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3_1
- Martínez, P., & Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews Cancer*, 11(3), 161–176. <https://doi.org/10.1038/nrc3025>
- May, C. D., Sphyris, N., Evans, K. W., Werden, S. J., Guo, W., & Mani, S. A. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: A dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/bcr2789>
- Mitra, A., Mishra, L., & Li, S. (2015). EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*, 6(13), 10697–10711. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4037>
- Morgani, S. M., & Brickman, J. M. (2014). The molecular underpinnings of totipotency. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0549>
- Nandy, S. B., & Lakshmanaswamy, R. (2017). Cancer Stem Cells and Metastasis. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 151, pp. 1–32). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.007>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Nishio, N., & Kojima, S. (2010). Recent progress in dyskeratosis congenita. *International Journal of Hematology*. <https://doi.org/10.1007/s12185-010-0695-5>
- Park, J. Il, Venteicher, A. S., Hong, J. Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., ... Artandi, S. E. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08137>
- Pascolo, E., Wenz, C., Lingner, J., Huel, N., Priepke, H., Kauffmann, I., ... Schnapp, A. (2002). Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15566–15572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201266200>
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., ... Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states

- occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>
- Phillips, T. M., McBride, W. H., & Pajonk, F. (2006). The response of CD24⁻/low/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(24), 1777–1785. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj495>
- Puri, N., & Girard, J. (2013). Novel therapeutics targeting telomerase and telomeres. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 5(10), 1–3. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000e127>
- Qin, Y., Tang, B., Hu, C.-J., Xiao, Y.-F., Xie, R., Yong, X., ... Yang, S.-M. (2016). An hTERT/ZEB1 complex directly regulates E-cadherin to promote epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(1), 351–361. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5968>
- Radisky, D. C., & LaBarge, M. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.05.007>
- Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell*, 1(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.013>
- Röth, A., Harley, C. B., & Baerlocher, G. M. (2010). Imetelstat (GRN163L)--telomerase-based cancer therapy. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 184, 221–234. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8_16
- Saretzki, G. (2014). Extra-telomeric Functions of Human Telomerase: Cancer, Mitochondria and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, (June 2014), 6386–6403. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140630095606>
- Sarin, K. Y., Cheung, P., Gilson, D., Lee, E., Tennen, R. I., Wang, E., ... Artandi, S. E. (2005). Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature*, 436(7053), 1048–1052. <https://doi.org/10.1038/nature03836>
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nature Publishing Group*, (July), 1–11. <https://doi.org/10.1038/nrc3971>
- Teo, H., Ghosh, S., Luesch, H., Ghosh, A., Wong, E. T., Malik, N., ... Tergaonkar,

- V. (2010). Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF- κ B-dependent gene expression. *Nature Cell Biology*, 12(8), 758–767. <https://doi.org/10.1038/ncb2080>
- Thorburn, J., Maycotte, P., Goodall, M. L., Thorburn, A., & Jones, K. L. (2015). Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion. *Molecular Cancer Research*, 13(4), 651–658. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-14-0487>
- Vijay, G. V., Zhao, N., Den Hollander, P., Toneff, M. J., Joseph, R., Pietila, M., ... Mani, S. A. (2019). GSK3 β regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1125-0>
- Wardi, L., Alaaeddine, N., Raad, I., Sarkis, R., Serhal, R., Khalil, C., & Hilal, G. (2014). Glucose restriction decreases telomerase activity and enhances its inhibitor response on breast cancer cells: Possible extra-telomerase role of BIBR 1532. *Cancer Cell International*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-60>
- World Health Organization. (2018). Cancer key facts. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00032-0>
- Wu, Y., Bian, C., Zhen, C., Liu, L., Lin, Z., Nisar, M. F., ... Zhong, J. L. (2017). Telomerase reverse transcriptase mediates EMT through NF- κ B signaling in tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(49), 85492–85503. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20888>
- Wu, Y., Ginther, C., Kim, J., Mosher, N., Chung, S., Slamon, D., & Vadgama, J. V. (2012). Expression of Wnt3 Activates Wnt/ -Catenin Pathway and Promotes EMT-like Phenotype in Trastuzumab-Resistant HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, 10(12), 1597–1606. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0155-T>
- Xu, D., Hou, M., Lindvall, C., Li, W., Björkholm, M., Jia, J., ... Liu, Z. (2012). Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial–mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene*, 32(36), 4203–4213. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.441>
- Ye, X., Brabletz, T., Kang, Y., Longmore, G. D., Nieto, M. A., Stanger, B. Z., ... Weinberg, R. A. (2017). Upholding a role for EMT in breast cancer metastasis.

Nature, 547(7661), E1–E3. <https://doi.org/10.1038/nature22816>

Yoshida, G. J., & Saya, H. (2016). Therapeutic strategies targeting cancer stem cells, *107*(1). <https://doi.org/10.1111/cas.12817>

Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., & Böttinger, E. P. (2004). Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO Journal*, 23(5), 1155–1165. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600069>

Zhang, J., Shao, X., Sun, H., Liu, K., Ding, Z., Chen, J., ... Li, H. (2016). NUMB negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by antagonizing Notch signaling. *Oncotarget*, 7(38), 61036–61053. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11062>



Teşekkür

Akademik hayatımın başlangıcında danışmanım olduğu için şanslı hissettiğim, her konuda desteğini esirgemeyen, bilgi birikimi ve tecrübesiyle sorunlarıma içtenlikle yaklaşan ve hemen çözüm bulan değerli hocam ve danışmanım ***Sn. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI***'ya,

Açık kapısıyla her zaman ulaşılabilir olan ve sorularımızı sevecenlikle yanıtlayan değerli hocam ***Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ***'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerine girdiğim, bilgi ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım ***Sn. Doç. Dr. Zuhal EROĞLU***'na, ***Sn. Doç. Dr. Buket KOSOV***'ya, ***Sn. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL***'e, ***Sn. Doç. Dr. Vildan BOZOK***'a, ***Sn. Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI*** ve ***Sn. Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER***'e,

Deneyler esnasında her zaman yanımda olan, sıkıcı günleri keyifli hale getiren, kedileri köpeklerden daha çok sevebileceğimi düşündüren ***Sn. Arş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA***'ya,

Çalışmalarda desteğini esirgemeyen, sorularına iki saniyede çözüm üreten, kelime dağarcığımı geliştirmemi sağlayan ***Sn. Arş. Gör. Neslihan Pınar ÖZATEŞ AY***'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ne zaman yardım istesem yanımda olan dönem dostum ***Sn. Yük. Lis. Öğr. Selin ÇEŞMELİ***'ye,

Karanlık günleri keyifli hale getiren sevgili arkadaşlarım ***Sn. Yük. Lis. Öğr. Eda TAYFUR*** ve ***Sn. Yük. Lis. Öğr. İlknur KARATEKİN***'e

Çalışmalar sırasında her konuda yardımcı olan, kahve ve çikolata arkadaşlarım ***Sn. Dok. Öğr. Röya GASIMLI*** ve ***Sn. Arş. Gör. AYCAN AŞIK***'a,

Çalışmalar sırasında desteklerini esirgemeyen ekip arkadaşlarım ***Sn. Dok. Öğr. Fatma SÖĞÜTLÜ, Sn. Dok. Öğr. Cansu ÇALIŞKAN KURT ve Sn. Dok. Öğr. Vahidreza KARAMAD'a,***

Laboratuvar çalışmalarında destek olan değerli teknikerimiz ***Sn. Hale GÜNDÜZ'e,*** her işimize koşturan iyi kalpli sekreterimiz ***Sn. Bahar BİLGİLİ'ye*** ve değerli personelimiz ***Sn. Ümit KEBUDE'ye,***

Her konuda desteğini hissettiğim ve bu süreçte her zaman yanımda olan ***Civan ALTAN'a,***

Son olarak bana en çok güvenen, aldığım kararlarda, başarılarımda ve başarısızlıklarımda yanımda olan, her konuda destekçim canım annem, babam ve kardeşime,

Sonsuz Teşekkürler...

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonu'na projemize verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği ***TYL-2019-20781*** nolu BAP projesi sayesinde sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 29.01.2020

Alican KUŞOĞLU

Özgeçmiş

Tam bursla okuduğum Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümününü 2017 yılında tamamladım. Lisans döneminde Acıbadem ve Ege Üniversitesi'nde yaptığım stajlar, laboratuvar ortamına alışmamı ve sahip olduğum bilgiyi arttırabilmek adına yüksek lisans yapmayı teşvik etti. 2017 yılında Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2 yıl boyunca hücre biyolojisi, kanser ve kök hücre konularında çalıştım. 2019 yılında yüksek lisans programından mezun olacağım.

E-posta: alicankusoglu@gmail.com

