



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



[Yüksek Lisans Tezi]

[ZM447439'UN FARKLI TİPTEKİ TÜMÖR HÜCRELERİNİN
HÜCRE KİNETİĞİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

[Gülendam DADAŞOVA]

[Biyoloji Anabilim Dalı]

[Genel Biyoloji Programı]

DANIŞMAN
[Doç. Dr.] [Mehmet Rifki TOPÇUL]

[Haziran, 2021]

İSTANBUL

Bu çalışma, 21.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Biyoloji Anabilim Dalı], Genel Biyoloji Programında [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Doç. Dr.] [Mehmet Rıfki TOPÇUL] (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

[Doç. Dr.] [Nadim YILMAZER]
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

[Dr. Öğr. Üyesi] [İdil ÇETİN]
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneliği olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yaptığımız bu çalışmada meme kanserinin en yaygın ve tedavisi en zor türleri kullanılmıştır. En yaygın tür olan Luminal A ve meme kanseri tedavisi en zor tür olan üçlü negatif meme kanseri için yeni tedavi yöntemlerine katkıda bulunmaya çalışılmıştır.

Bilim insanı bilimin bir veya birden fazla alanında uzman olabilen, evrene ilişkin olgulara ve değişkenlere yönelik bilimsel veri elde etme yöntemlerini kullanarak sistemli şekilde bilgi elde etmeye çalışan kişidir. Bilim insanı olmakta atılacak ilk adım Yüksek Lisans yaparak önemli çalışmalara imza atmaktır. Benim de hedefim bilim insanı olmaktır ve bu adımı atmış olmanın haklı sevincini yaşıyorum.

Bana hedeflerime ulaşmak için destek olan, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, yoluma her zaman ışık tutan, her şeyi en ince ayrıntısına kadar anlatan, sonsuz sabrı, hoşgörüsü ve bana olan inancıyla her daim yanımda olan değerli Hocam Sayın Doç.Dr. Mehmet Rıfkı TOPÇUL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Üniversiteye geldiğim ilk günden beri bildiği her şeyi bana sabırla öğreten, yaptığım her işte bıkmadan hep yardımcı olan, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, arkamda duran ve bana okulu bile aile ortamı gibi hissettiren değerli Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve son olarak her zaman bana inanan, güvenen, destekleyen, her zorlukta elimden tutan, istediğim her şeyi bana sunan, hedeflerime ulaşmam için canını dişine takan canım aileme, hayatım boyunca beni kendi evladı gibi sevip, destek olan canım halama ve arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum. |

Haziran 2021

Gülendam DADAŞOVA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. KANSER.....	5
2.2. MEME ANATOMİSİ	8
2.3. MEME KANSERİ	9
2.4. LUMİNAL A MEME KANSERİ	10
2.5. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ	11
2.6. AURORA KİNAZLAR	11
2.7. AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ	12
2.8. ZM447439.....	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1. KULLANILAN HÜCRE HATLARI.....	15
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	15
3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ.....	15
3.4. ZM447439 KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI	16
3.5 MİTOZ İNDEKSİ İÇİN PREPARATLARIN HAZIRLANMASI.....	16
3.6 APOPTOZ İNDEKSİ İÇİN PREPARATLARIN HAZIRLANMASI	16
3.7. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ.....	16
3.7.1. Hücre Canlılığı: Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Tayini	16
3.7.2. Hücre İndeksi: xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi	17
3.7.3. Mitoz İndeksi.....	17
3.7.4. BrdU Proliferasyon Analizi	18
3.7.5. Apoptoz İndeksi.....	18

4. BULGULAR.....	20
4.1 HÜCRE CANLILIĞI.....	20
4.2. HÜCRE İNDEKSİ.....	23
4.3. MİTOZ İNDEKSİ.....	24
4.4. % BRDU.....	26
4.5. APOPTOZ İNDEKSİ.....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	43

|



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümör.....	5
Şekil 2.2: Kanserin ayırt edici özellikleri.....	7
Şekil 2.3: Meme anatomisi.....	8
Şekil 2.4: Kanser hücreleri oluşmuş meme anatomisi	9
Şekil 2.5: Kanser alt tipleri ile ilişkili insan meme bezi hiyerarşisi modeli.....	10
Şekil 2.6: ZM447439'un kimyasal yapısı.....	14
Şekil 4.1: 24 saat süresince 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	21
Şekil 4.2: 24 saat süresince 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	21
Şekil 4.3: 24 saat süresince 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	22
Şekil 4.4: 24 saat süresince 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	22
Şekil 4.5: 20 µM, 40 µM ve 80 µM dozlarında ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 20 µM, -- 40 µM , -- 80 µM).	23
Şekil 4.6: 20 µM, 40 µM ve 80 µM dozlarında ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (-- Kontrol, -- 20 µM, -- 40 µM , -- 80 µM).	24
Şekil 4.7: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitoz indeksi değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	25
Şekil 4.8: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitoz indeksi değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	25
Şekil 4.9: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % BrdU değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0,05).	26

Şekil 4.10: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % BrdU değerleri (* Kontrolle göre anlamlı p<0,05).	26
Şekil 4.11: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait apoptoz indeksi değerleri (* Kontrolle göre anlamlı p<0,05).	27
Şekil 4.12: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait apoptoz indeksi değerleri (* Kontrolle göre anlamlı p<0,05).	27



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
AURKA	: Aurora kinaz A
AURKB	: Aurora kinaz B
AURKC	: Aurora kinaz C
BRCA	: Breast cancer susceptibility
BrdU	: Bromodeoksiüridin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	: Dimetil sulfoksit
DNA	: Deoksiribonukleik asit
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Fetal dana serumu
HCl	: Hidroklorik asit
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IC50	: Enzimin %50'sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonu
Ki67	: Proliferasyon indeksi
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MTT	: 3-[4,5 dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
PBS	: Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PR	: Progesteron reseptörü
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
RTCA	: Gerçek zamanlı hücre analizi

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[ZM447439'UN FARKLI TİPTEKİ TÜMÖR HÜCRELERİNİN HÜCRE KİNETİĞİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

[Gülendam DADAŞOVA]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Biyoloji Anabilim Dalı]

Danışman : Doç. Dr. Mehmet Rıfki TOPÇUL

[Bu tez çalışmasında Luminal A meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerine aurora kinaz inhibitörü ZM447439'un antiproliferatif etkileri tespit edilmiştir. Bu amaçla Luminal A meme kanseri modeli olarak da MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak da MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Deneylerde hücre kinetiği parametreleri olarak hücre canlılığı, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden elde edilen hücre indeksi değerleri, mitoz indeksi, BrdU hücre proliferasyon analizi ve apoptoz indeksi değerlendirilmiştir.]

Deneylerde her iki hücre hattı için 20 µM, 40 µM ve 80 µM'lık ZM447439 konsantrasyonları uygulanmış, 40 µM'lık ZM447439 konsantrasyonu IC50 dozu olarak belirlenmiştir.

Tüm uygulamalar sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde her iki hücre hattında zamana bağlı olarak hücre canlılığı, hücre indeksi, mitoz indeksi ve % BrdU değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenirken, apoptoz indeksi değerlerinde anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir.]

Haziran 2021, [56] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Aurora kinaz inhibitörü, ZM447439, Meme kanseri, MCF-7, MDA-MB-231]



SUMMARY

[M.Sc. THESIS]

[INVESTIGATION OF *IN VITRO* EFFECTS OF ZM447439 ON CELL KINETICS OF DIFFERENT TYPES OF TUMOR CELLS

[Gülendam DADAŞOVA]

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Biology]

Supervisor : [Assoc. Prof. Dr.] [Mehmet Rifkî TOPÇUL]

[In this thesis study, the antiproliferative effects of Aurora kinase inhibitor ZM447439 on Luminal A breast cancer and triple negative breast cancer cells were determined. For this purpose, MCF-7 was used as a Luminal A breast cancer model and MDA-MB-231 cell line was used as a triple negative breast cancer model. In the experiments, cell viability, cell index values obtained from xCELLigence real time cell analysis system, mitotic index, BrdU cell proliferation analysis and apoptotic index were evaluated as cell kinetics parameters.

In the experiments, ZM447439 concentrations of 20 µM, 40 µM and 80 µM were applied for both cell lines, and the concentration of 40 µM ZM447439 was determined as the IC₅₀ dose.

When the data obtained as a result of all applications were examined, a significant decrease was observed in cell viability, cell index, mitotic index and BrdU % values in both cell lines, while a significant increase was observed in apoptotic index values.]

June 2021, 56 pages.

Keywords: | Aurora kinase inhibitor, ZM447439, Breast cancer, MCF-7, MDA-MB-231 |



1. GİRİŞ

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında hücrelerin kontrolsüz bölünmesi, büyümesi ve çoğalması ile ortaya çıkan, 100'den fazla türü bilinen hastalık olarak tanımlanır. İnsanların DNA'sı birbirine benzemediği gibi kanser hastalığı da her insanda farklı seyretmektedir. Kanser, insan sağlığını tehdit eden önemli bir hastalıktır ve hastalar tedavilere farklı cevaplar vermektedir. Teknolojinin ilerlemesi, kanser hastalıklarının tedavisine ilişkin yöntemlerin geliştirilmesinde büyük rol oynamaktadır (Fitzmaurice ve diğ., 2015).

Meme kanseri dünya genelinde kadınlar arasında görülen kanserler arasında en yaygın olandır. Erkeklerde nadir görülmektedir (Greenlee ve diğ., 2000). İnsanlarda meme kanserinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenler hastalığın oluşumuna neden olmaktadır (Tannock ve Hill, 1992). Türkiye genelinde meme kanseri sıklığı, 1994 yılında yayınlanan bir çalışmada, 24/100.000 olarak belirlenmiştir (Eryilmaz ve diğ., 2012). Geçmiş 25 yıllık sürede meme kanseri riskinde 2,5 kat artış görülmektedir (Gosain ve diğ., 2016). Gün geçtikçe meydana gelen bu artışın bazı sebepleri vardır. Bunlar, yaşam tarzının değişmesi, nüfusun artması ve yaşlanması ile düzensiz olarak çekilen mamografi sayısının artması olarak sıralanabilir. Ülkemizde meme kanserinin sıklığında görülen bu hızlı artış, korunma ve erken tanı için ciddi bir çalışma yapılmasını gerektirmektedir (McCray ve diğ., 2016).

Yüksek insidansa sahip Avrupa ülkeleri ve yanında Amerika, Afrika, Asya gibi ülkelerde de meme kanseri insidans oranı artmaktadır. Bu artış fiziksel hareketsizlik, aşırı kilo alma sonucu meydana gelen obezite, tüketilen zararlı yiyecekler, hava kirliliği, geç doğum yapma, az çocuk sahibi olmak, erken menarş ve geç menapoz yaşı, laktasyon gibi durumlardan kaynaklanmaktadır (Lukong, 2017).

Meme dokusu; meme lobları, yağ dokusu, bağlar, boşluklar, salgı bezleri ve süt kanallarından oluşur. Meme dokusunda yer alan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla oluşan meme kanseri, meme lobülleri veya kanallarını kaplayan hücrelerin anormal bir şekilde büyümesi ile meydana gelmektedir. Meme karsinomları heterojen tümörlerdir. Heterojen olması biyolojik etkenlerin yanısıra farklı terapötik yanıtlardan da kaynaklanmaktadır (Zhang ve Long, 2015). ER (östrojen reseptörü), PR (progesteron reseptörü) ve HER-2'nin (insan epidermal büyüme

faktörü 2) anlatım seviyeleri klinik açıdan, meme tümörlerinin mevcut kemoterapötik ajanlara tepkisini belirlemede son derece önemlidir (Vinod ve diğ., 2015). Her kadının tümöründeki hücreler bedenindeki diğer hücreler gibi kendine has genetik bir kod taşır, üstelik meme kanseri için genomik ve proteomik profillerin analizi, sağlıklı hücreler veya tümör hücreleri tarafından üretilen karakteristik biyolojik belirteçlerin bulunması açısından önem taşımaktadır (Willman ve diğ., 2015).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), bunun yanı sıra mikroarray teknolojisindeki gelişmeler sayesinde meme kanserlerinin moleküler olarak gen anlatım profilleri çıkarılmıştır. Çıkarılan bu gen anlatım profilleri doğrultusunda meme kanseri sınıflandırılmıştır. Bu alanda, 2000 yılında Perou ve arkadaşları meme tümörlerini dört ana gruba ayırmıştır. Bunların içinde bazal tip meme kanseri, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve c-erbB2 negatif özellikte olup en kötü prognoza sahiptir (Sorlie ve diğ., 2001; Sorlie ve diğ., 2003; Gusterson ve diğ., 2005). Son yıllarda, aynı anda binlerce genin aktivite seviyesini inceleyen çalışmalar sayesinde, meme kanseri biyolojisi daha iyi anlaşılmaktadır. Bu kapsamda, meme kanserinin 5 moleküler alt tipi (Luminal A, Luminal B, HER-2 neu, Bazal benzeri ve Claudin-düşük) tanımlanmıştır (Prat ve diğ., 2015). Meme kanserinin alt tiplerinden biri olan bazal tip, üçlü negatif meme kanseri olarak da bilinmektedir. Üçlü negatif meme kanseri, farklı aktivite yollarına sahip bir dizi kanser içeren, çeşitli düzeylerde kanser ilacı duyarlılığı ve metastaz için farklı eğilimler gösteren heterojen bir hastalıktır (Le Du ve diğ., 2015). Üçlü negatif meme kanseri, bazal (%70) ve bazal olmayan (%30) tümörlerden oluşan heterojenik bir tümördür (Fantini ve diğ., 2012). Üçlü negatif meme kanserlerinin %90'ında patolojik tanı invaziv duktal karsinomdur ve yüksek histolojik dereceye sahiptir. Hücre sağ kalımı azdır ve lenf noduna yayılımı sıktır (Kinalis ve diğ., 2018).

Yapılan çalışmalar ve analizler doğrultusunda meme tümörlerinin %75'inde östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü bulunduğu anlaşılmıştır. Bu da tümörün luminal gruba dahil olduğunu göstermektedir (Yersal ve Barutca, 2014). Luminal tümör de kendi arasında farklı davranışlar gösterdiği için iki alt gruba ayrılır. Bunlar, Luminal A ve B olarak bilinir. Meme kanserleri içinde en yüksek yayılıma sahip Luminal A grubu; proliferatif aktivitesi, mitoz oranı ve histolojik derecesi düşük Her-2 negatif tümörleri kapsamaktadır. Luminal A tümürlü hastaların prognozları iyidir, metastazı kemiklerle sınırlıdır. Ancak Luminal-B tümörleri, daha agresif seyretmektedir. Luminal A ile B arasındaki sınır değeri, genellikle immünohistokimyasal

olarak tümör hücrelerinin %14'ünden azının nükleer Ki67 ekspresyonu göstermesi olarak kabul edilir. Ayrıca Her-2 pozitif tümörlerden yaklaşık %30 kadarı immünohistokimyasal olarak luminal B fenotipindedir. Luminal A ve Luminal B'ye göre de daha kötü seyretmektedir. Beyne metastaz ile sonuçlanmaktadır (Tsutsui ve diğ., 2003; Kesse-Adu ve Shousha, 2004; Putti ve diğ., 2005; Moasser, 2007; Gutierrez ve Schiff., 2011; Wesolowski ve Ramaswamy, 2011; Anderson ve diğ., 2014; Diniz ve diğ., 2015).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan geleneksel tedaviler çeşitli sınırlamalara sahiptir. Geleneksel ilaçlar sadece kanser hücrelerini hedefleyememekte, dolayısı ile yüksek toksisiteye neden olmaktadır. Gün geçtikçe kansere neden olan mekanizmaların aydınlatılması, yeni anahtar moleküllerin ve yolların keşfedilmesine yol açmıştır. Bu anahtar moleküller ve yollar sadece kanser hücrelerini yok eden tedavilerde başarılı hedefler haline gelmiştir (Topcul ve Cetin, 2014). Hedefe yönelik tedavi, ilaçların kanser hücrelerine veya kanser büyümesini destekleyen doku ortamına özgü belirli genlere veya proteinlere verilmesini amaçlamaktadır. Hedefe yönelik tedavi, kanser hücresi çoğalmasını bloke eden, hücre döngüsü düzenlenmesini destekleyen, apoptoz veya otofajiyi tetikleyen ve toksik maddelerin spesifik olarak kanser hücrelerine hedeflenmiş şekilde verilmesini içeren ilaçlar geliştirmeyi içermektedir (Gerber, 2008).

Ser/treonin kinazların aurora ailesi, mitoz girişten sitokineze kadar değişen çeşitli aşamalarda önemli rollere sahip önemli mitoz düzenleyicilerdir (Carmena ve diğ., 2009). Bu kinazlar, sentrozom olgunlaşması ve ayrılması dahil olmak üzere kromozomal ve hücre iskeleti olaylarının doğru koordinasyonunun yanı sıra kromozomların yavru hücrelere düzgün bir şekilde ayrılmasını sağlayan uygun iğ ipliği düzeneğinin oluşturulmasında önemli roller oynamaktadır ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur. Aurora kinaz ailesi üyelerinin sayısı, farklı hayvan filumlarına göre değişmektedir. Aurora-A ve aurora-B kinazların, farklı hücrelerel lokalizasyonları ve fonksiyonları bulunmaktadır. Kinaz ailesinin üçüncü bir üyesi olan aurora-C, yalnızca memelilerde bulunur ve ağırlıklı olarak testislerde anlatımı yapılır, ancak aynı zamanda, *in vitro* olarak aurora-B'den yoksun insan somatik hücrelerinde de bulunmaktadır. Memeli aurora kinaz ailesinin üç üyesi, benzer karboksil terminal katalitik alanları paylaşır. Her üç aurora kinazın da insan kanser hücrelerinde aşırı anlatımının yapıldığı bulunmasına rağmen, aurora-C'nin tümörjenik fenotiplerin gelişimine olası katılımı, minimal

ekspresyonu ve somatik hücrelerde saptanan fonksiyonu açısından bilinmemektedir (Katayama ve Sen, 2010).

Son zamanlarda umut vaat eden aurora kinaz inhibitörü olan ZM447439, tümör hücre hatlarında tek başına veya biyoterapötik ve kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde antiproliferatif ve proapoptotik etkilere neden olmaktadır (Dar ve diğ., 2010).

Bu tez çalışmasında aurora kinaz inhibitörü ZM447439'un Luminal A meme kanseri MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde tek başına meydana getireceği etkilerin çeşitli hücre kinetiği parametreleri kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. |

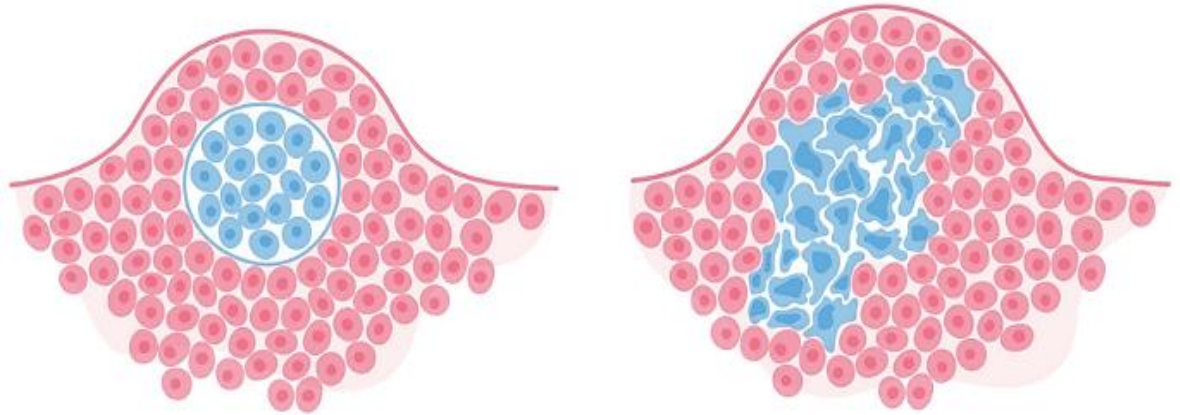


2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser, çok hücreli organizmalara ait bir hastalık grubudur. Hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması için normal hücresel programın düzensizliğine yol açan çoklu genlerin anlatımındaki değişikliklerle karakterizedir. Bu değişiklikler, bir tümör hücresi popülasyonunun büyümesini destekleyen hücre replikasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengesizlik ile sonuçlanır. Kötü huylu tümör oluşumu tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yapabilme yeteneği kazanması sonucu meydana gelmektedir (Ruddon, 2007). Klinik olarak kanser, köken aldıkları hücre tipine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüze yakın sayıdaki karmaşık hastalıkları kapsayan bir olgu olarak tanımlanmaktadır (Klug ve Cummings, 2006).

İnsanlarda gelişen tümörler; iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) olabilir. Kanser olarak bilinen malign tümörler kaynak aldıkları hücrelere göre, karsinom veya sarkom olarak isimlendirilirler. Karsinomlar epitel hücrelerinden kaynak alırken, sarkomlar mezenkimal hücrelerden kaynak almaktadır. İyi huylu tümörler kanser değildir. Ancak malign tümör yayılarak sağlıklı dokulara zarar verir ve tümörden koparak kan dolaşımına veya lenf sistemine girerek metastaz yapabilirler (Kumar ve diğ., 2015; Goljan, 2019; Niederhuber ve diğ., 2020).



Şekil 2.1: Benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümör

Kansere karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi kanserin temel özelliklerinin tespit edilmesine bağlıdır. Kanserin temel özellikleri şunlardır:

Kendi büyüme faktörlerine sahip olma: Normal hücreler çoğalmak için dış ortamdan gelen büyüme faktörlerine ihtiyaç duyar, ancak kanser hücreleri geçirdikleri mutasyonlar sayesinde büyümek için kendi büyüme faktörlerini üretirler.

Büyüme engelleyici faktörlerden kurtulma: Normal hücreler homeostaz adı verilen iç dengeyi sağlamak için belli bir büyüme kapasitesine ulaştıklarında dış ortamdan alınan sinyal ile büyümelerini durdururlar. Kanser hücreleri büyüme engelleyici sinyaller aldıkları reseptörleri (algaçları) bozarak bu sistemi atlatırlar.

Bağışıklık sisteminden kaçma: Bağışıklık sistemimiz vücudumuza giren yabancı maddeleri tanır ve yok eder. Normal hücrelerimiz bağışıklık sistemi hücrelerine “dost” olarak görünmesini sağlayan proteinleri yüzeylerinde taşır. Aynı zamanda kanser hücreleri de bu proteinleri yüzeylerinde taşıyarak bağışıklık sistemine görünmez olmayı öğrenir.

Sürekli bölünme yeteneği: İnsan vücudunda kök hücreler dışındaki diğer hücreler sınırlı sayıda bölünme yeteneğine sahiptir. Belirli bir süre bölündükten sonra senesens adı verilen yaşlılık dönemine girerler. Biyolojik yaşlanmaya telomerlerin kısalması sebep olur. Her hücre çoğalmasında telomerler azalır ve böylece genler korunur. Kanser hücreleri telomer kısalmasını engellemek için “telomerez” adı verilen enzimlerin aktivitesini artırır. Böylece sınırsız çoğalma yeteneğine sahip olurlar.

Kanserleşmeyi destekleyen iltihaplanma: Tümör ortamı sadece kanser hücrelerini barındırmaz, aynı zamanda iltihaplanma ile ilişkili bağışıklık sistemi hücrelerini de içerir. Bu hücreler büyüme faktörleri ve enzimlerin sayısını artırarak kanserin damar oluşturmasını ve yayılmasını destekleyen bir ortam oluşturur. Aynı zamanda reaktif oksijen radikalleri üreterek DNA'nın hasar görmesine ve bunu takiben kanserleşmeye neden olur.

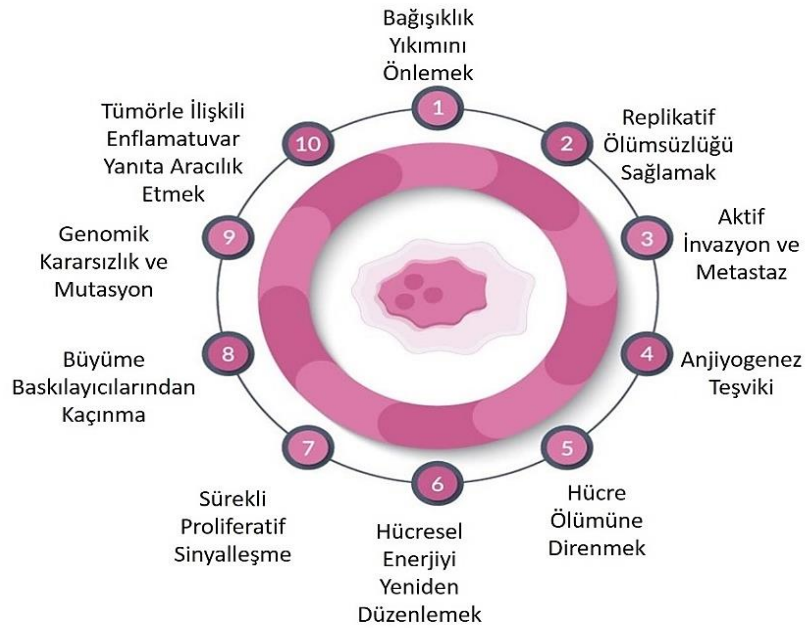
İnvazyon veya metastaz: Normal hücreler genellikle buldukları konumlardan ayrılmazlar. Kanser hücreleri belirli bir çoğalmaya ulaştıklarında başka doku ve organlara göç ederler. Bu olaya metastaz adı verilir. Kansere bağlı yaşam kayıplarının %90'ından metastazlar sorumludur. Hücrelerin birbirlerine veya bir dokuya tutunmasını sağlayan proteinlerin genlerinde meydana gelen hasarlar metastazı tetikler.

Anjiyogenez: Normal hücreler besin ve oksijen ihtiyaçlarını karşılamak için kan damarlarına ihtiyaç duyar. Ancak erişkin bireylerde damar oluşumu çok azdır. Kanser hücreleri çok hızlı bölündüklerinden dolayı yüksek oranda besin ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple damar oluşturma yeteneğine sahiptirler.

Genetik denge bozukluğu: DNA hasarlarının birikmesi kanserleşmenin en önemli sebebidir. Aynı zamanda DNA tamirinde görev alan enzimlerin fonksiyonlarının kaybolması gen yapısındaki bozulmaların artmasını destekler.

Apoptozdan kaçınma: Normal hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde tümör büyümesini baskılayan genler hücre çoğalmasını durdurarak DNA tamir mekanizmalarını başlatır. Ancak DNA'daki hasar tamir edilemeyecek boyutta ise programlı hücre ölümüyle (apoptoz) hücre ortadan kaldırılır. Kanser hücreleri bu programlı hücre ölümüne karşı direnç gösterecek mekanizmalara sahiptir.

Enerji metabolizmasını değiştirme: Kanser hücreleri çok hızlı bölünme yeteneğine sahip olduklarından dolayı fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bunun için oksijen varlığına bakmadan glikozu kullanarak sürekli enerji üretirler. Bu duruma "Warburg etkisi" adı verilir (Hanahan, 2011).

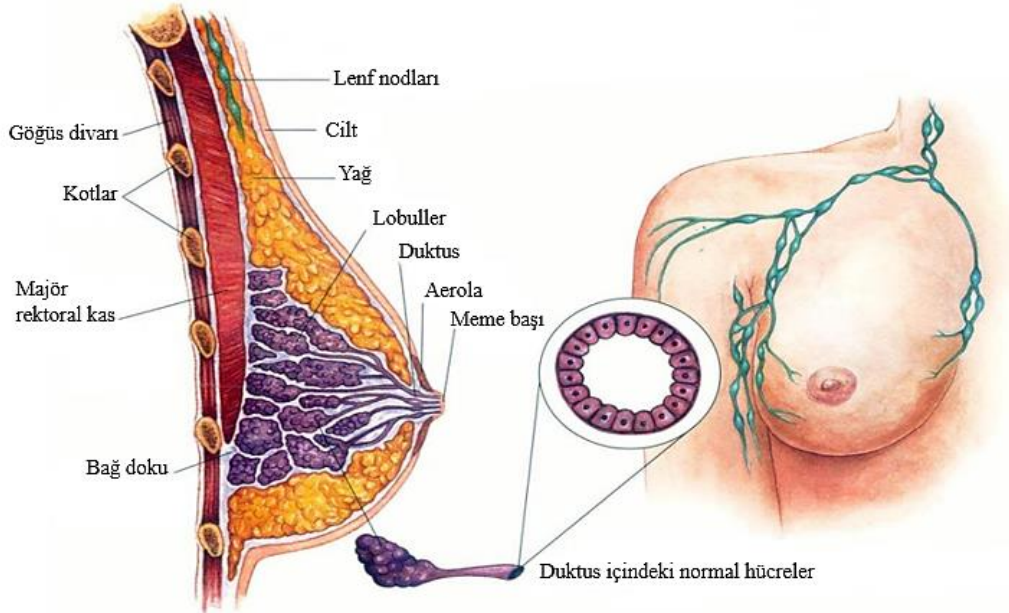


Şekil 2.2: Kanser ayırt edici özellikleri

2.2. MEME ANATOMİSİ

Memelilere özgü olan meme bezleri, süt sentezleme, salgılama ve yeni doğanı besleme gibi özel işlevlere sahiptir. Bu işlev göz önüne alındığında, meme bezinin mikro ve makro anatomisinde ciddi değişiklikler meydana gelmektedir. Meme bezleri hücresel düzeyde hormonal etkiler yoluyla yeniden şekillenerek yalnızca gebelik/emzirme döngüsü sırasında olgun bir gelişim durumuna ulaşmaktadır (Hassiotou ve Geddes, 2013).

Memenin merkezindeki meme ucu, büzüşebilen düz kaslar içerir ve bu da meme ucunun cinsel uyarılmaya, soğuk havaya veya emziren bir bebeğe yanıt olarak dikleşmesine neden olur. Meme ucunu çevreleyen pigmentli bölge areola olarak isimlendirilmektedir. Meme, süt üretmek için özelleşmiş meme bezlerini içerir. Meme bezleri, yüzlerce küçük süt üreten lobülde oluşur. Her lobülde salgı üretici kısımların etrafındaki kasılğan hücreler(miyoeitel hücreler) sütün kanallara geçmesine izin verir. Kanal hücreleri etrafındaki miyoeitel hücrelerin kasılmasıyla süt kanallarında ilerler ve meme ucuna gelir. Memenin büyük bir kısmı yağ dokusundan oluşmakta, bu nedenle meme büyüklüğü süt üretim potansiyelini göstermemektedir. Düzensiz sıkı bağ dokusu lobülleri ve yağ dokusunu desteklemektedir (Johnson, 2012).

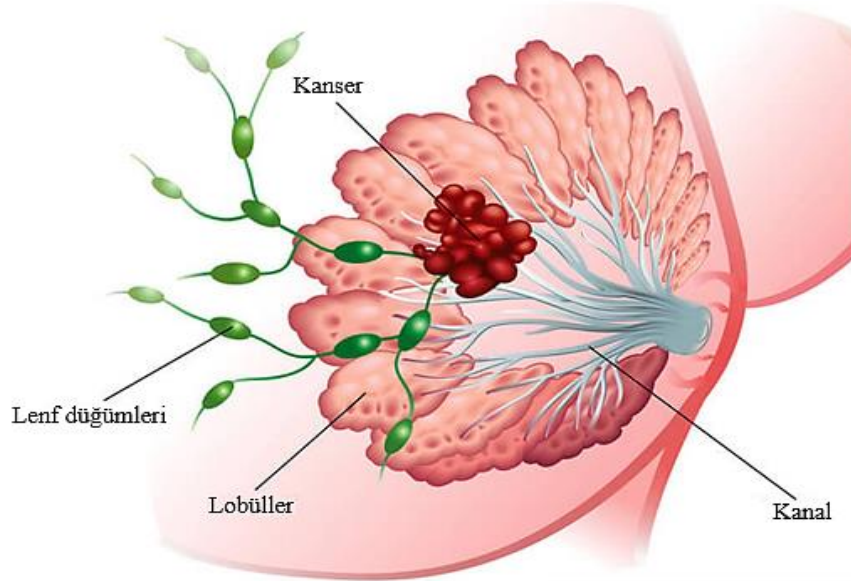


Şekil 2.3: Meme anatomisi

2.3. MEME KANSERİ

Meme kanseri, memenin süt kanallarında veya süt üreten bezlerinde oluşan anormal büyüme ve kontrolsüz çoğalma sonucu meydana gelmektedir. Meme kanseri tanısına en çok rastlanan yaş grubu 35-64 yaş arası kadınlardır (Seo ve Noh, 2017). Meme kanserinin invazyon ve metastaz yeteneği, bu tümörleri agresif hale getirmektedir (Melzer ve diğ., 2017).

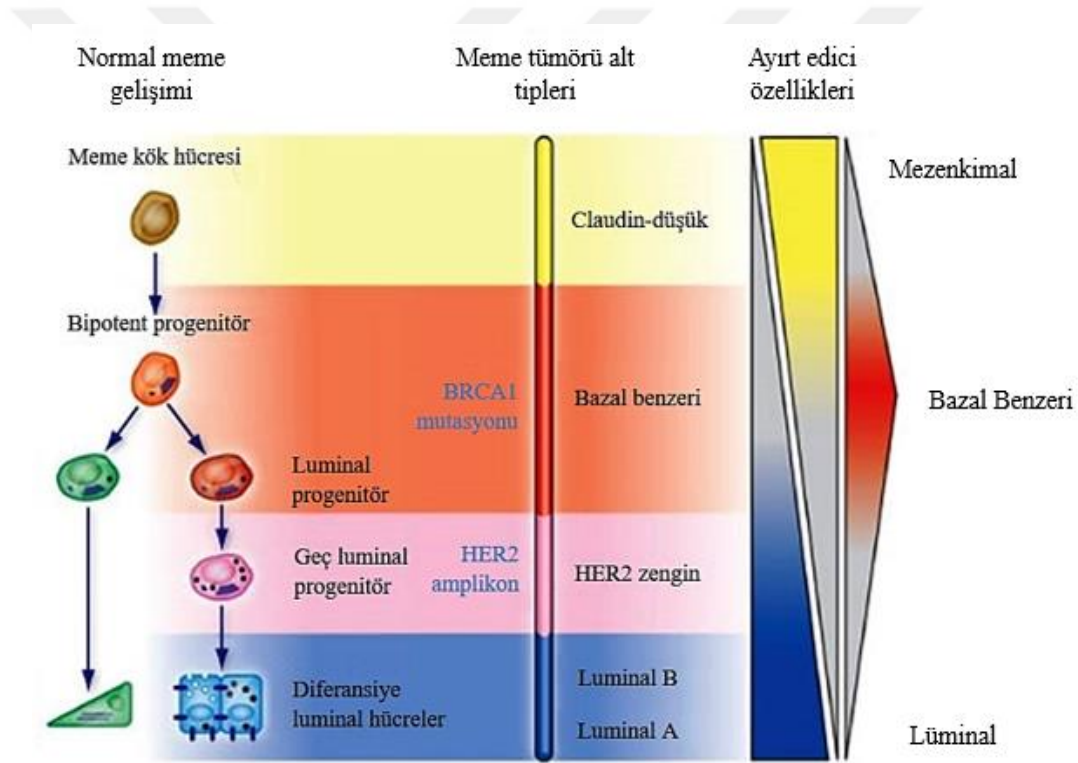
Meme kanseri, çok nedenli bir sağlık sorunudur. Erken menarş, hiç doğum yapmamış olmak, ilk doğumun geç yaşlarda yapılması, kısa süreli emzirme ve geç menopoz değiştirilmesi güç olan temel risk faktörleri olup, meme kanserinin %25'inden sorumludur. Bu faktörlerin yanı sıra obezite, fiziksel inaktivite, beslenme ve diyet gibi değiştirilebilir risk faktörleri de hastalığın ortaya çıkmasını etkilemektedir (Yılmaz ve Atak, 2014).



Şekil 2.4: Kanserli meme anatomisi

Morfolojik olarak özdeş meme kanserleri farklı klinik sonuçlar ve tedaviye gösterdikleri farklı yanıtlar ile heterojenlik göstermektedirler. Bu heterojenite, ağırlıklı olarak histopatolojik bakımdan benzer kanser türleri arasında var olan moleküler sınıf farklılıklarına dayanmaktadır. Bu nedenle, moleküler sınıflandırma, farklı tedavi protokollerinin uygulanabilmesi için

histopatolojiden daha güçlü bir öngörü sağlamaktadır (Shawarby ve diğ., 2013). Mevcut tedavi kılavuzları, meme kanserinin histopatolojik derecelendirmesi, tümör boyutu, lenf düğümü, hormon reseptörü, İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2) ve proliferasyon (Ki67) durumuna dayanmaktadır. c-DNA mikroarray teknolojisini kullanan gen anlatımı analizleri, meme kanserinin karmaşıklığının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Engström ve diğ., 2013). Bu çalışmalar meme tümörlerinin gen ekspresyon profillerine dayalı olarak Şekil 2.5’de gösterildiği gibi en az beş moleküler alt türe ayrılabileceğini göstermiştir (Perou ve diğ., 2000; Sorlie ve diğ., 2001; Hu ve diğ., 2006).



Şekil 2.5: Kanser alt tipleri ile ilişkili insan meme bezi hiyerarşisi modeli

2.4. LUMİNAL A MEME KANSERİ

Luminal A; meme kanserlerinin en sık görülen (%40) alt tipidir (Ergüç ve Orhan, 2019). Östrojen reseptörlerini (ER) ve/veya progesteron reseptörlerini (PR) ifade eden, ancak insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) anlatımı için negatif olan Luminal A meme kanserleri, endokrin tedaviye iyi yanıt verir ve genel olarak olumlu bir prognoza sahiptir.

(Rouzier ve diğ., 2005). Bununla birlikte, uzun vadeli endokrin bazlı tedavi, ters sistemik toksisite, edinilmiş tümör direnci ve terapötik etkinliği tehlikeye atan ve hastalığın ilerlemesini destekleyen ilaca dirençli kanser kök hücrelerinin ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir (Lippman, 1983; Johnston ve Dowsett, 2003; Musgrove ve Sutherland, 2009).

2.5. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ

Üçlü negatif meme kanseri meme tümörleri içinde östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) gen anlatımı olmayan küçük bir grubu kapsar ve yeni tanı konmuş hastaların %15-20'sini oluşturur (Gluz ve diğ., 2009). Hormon reseptörleri pozitif olan meme kanserlerine kıyasla daha agresif bir klinik seyir gösterir ve yüksek visseral ve sinir metastazları insidansına sahiptir. Daha çok BRCA1 mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir (Foulkes ve diğ., 2003; Bauer ve diğ., 2007). Aynı zamanda tedaviden üç yıl sonra yüksek bir nüks oranı ve 5 yılda yüksek bir ölüm oranı ile ilişkilendirilmiştir. Uzak metastaz durumlarında hayatta kalma oranı zayıftır (Mersin ve diğ., 2008).

Erken gebeliğin meme kanserine karşı koruyucu bir faktör olarak kabul edildiği diğer alt tiplerden (Luminal A, B ve HER2) farklı olarak, gebelik üçlü negatif fenotipin gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak görünmektedir (Uscanga-Perales ve diğ., 2016). Üçlü negatif meme tümörlerinin özel terapötik hedeflerinin olmaması, agresif biyolojik özelliklere sahip olması, hormonal tedaviye yanıt vermemesi ve hastalığın genel sağ kalım açısından yüksek risk oluşturması, bu alt tip için yeni hedefe yönelik tedavi arayışlarının devam etmesine neden olmaktadır (Chen ve Pu, 2017).

2.6. AURORA KİNAZLAR

Aurora A, B ve C olmak üzere sırasıyla AURKA, AURKB ve AURKC üç izoformu bulunan aurora kinazlar, mitoz bölünmenin devamı için sentrozomların, iğ ipliklerinin ve kinetokorların fonksiyonunu düzenleyen en önemli serin/treonin protein kinazlardır (Katayama ve Sen, 2010). Aurora kinazlar, mitozun birçok fonksiyonunda rol oynamaktadır. Aurora A, mitozu giriş, sentriyol çiftlerinin ayrılması, doğru bipolar iğ ipliği düzeneği, metafaz kromozomlarının hizalanması ve sitokinezin tamamlanmasında rol oynamaktadır (Marumoto ve diğ., 2003).

Aurora A'nın aktivitesi sentrozomlarla yakından ilişkilidir. Bipolar iğ ipliği oluşturmak için, D-Tacc24, γ -tubulin25, SPD-2 ve sentromerik ChToh27 dahil olmak üzere çeşitli proteinleri bir araya getirerek kopyalanmış sentrozomların olgunlaşmasında rol oynamaktadır (Berdnik ve Knablich., 2002; Hannak ve diğ., 2001; Kemp ve diğ., 2004; Conte ve diğ., 2003). Yakın zamanda Aurora A'nın nuklear zarf parçalanmasının teşvik edilmesindeki rolü de tanımlanmıştır (Portier ve diğ., 2007).

Aurora B, fonksiyonel bir mitotik yapı olan kromozomal yolcu kompleksinin ana bileşenlerinden biridir. Kinetokor-mikrotübül birliğini ve sitokinezi düzenleyen kromozomal bioryantasyonda yer almaktadır (Adams ve diğ., 2001). Kardeş kromatid kinetokorlarının mikrotübüllere yanlış bağlanması aurora B tarafından çözülebilmektedir (Hauf ve diğ., 2003; Knowlton ve diğ., 2006). Aurora B, kromatin yoğunlaşmasına ve ayrılmasına yardımcı olduğuna inanılan histon H3'ü (Ser 10) fosforile etmektedir (Goto ve diğ., 2002).

Aurora C, aurora B ile benzer işlevlere sahiptir ve sitokinez için gereklidir (Li ve diğ., 2004). Bu nedenle aurora C'nin çeşitli mitotik olayların düzenlenmesinde diğer kinazlar kadar önemli bir kinaz olabileceği düşünülmektedir (Kollareddy ve diğ., 2008). Aurora kinazlar ayrıca siklinler ve sikline bağımlı kinazlarla birlikte hücre döngüsünün G2 / M geçişi ile bağlantılıdır (Dutertre ve diğ., 2004). Ayrıca, çeşitli raporlardan aurora kinazların p53 ve cdc25 dahil olmak üzere hücre döngüsü ve hücre bölünmesi ile ilgili birçok önemli hücre protein ile etkileşime girdikleri bilinmektedir (Gizatullin ve diğ., 2006).

Aurora A'nın meme kanseri, insan gliomaları, overyum, prostat, serviks, kolon, pankreas ve akciğer kanserlerinde; aurora B, meme, kolon, tiroid, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve oral kanserlerde; aurora C'nin ise meme ve karaciğer kanserlerinde aşırı anlatımı yapılmaktadır (Zhou ve diğ., 1998; Kimura ve diğ., 1999; Reichardt ve diğ., 2003; Li ve diğ., 2003; Sorrentino ve diğ., 2005; Smith ve diğ., 2005; Buschhorn ve diğ., 2005; Tchatchou ve diğ., 2007; Gu ve diğ., 2007; Guangying ve diğ., 2007). Aurora kinazların aşırı anlatımları kanserlerde kromozomal karasızlık ve klinik agresiflik ile pozitif korelasyon göstermektedir (Yang ve diğ.; 2006).

2.7. AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Hücre döngüsü sırasında mitotik süreçteki önemli rolleri, kanserdeki aşırı anlatımları ve onkogenik sinyal yolları göz önüne alındığında, aurora kinaz ailesinin üyeleri kanser için

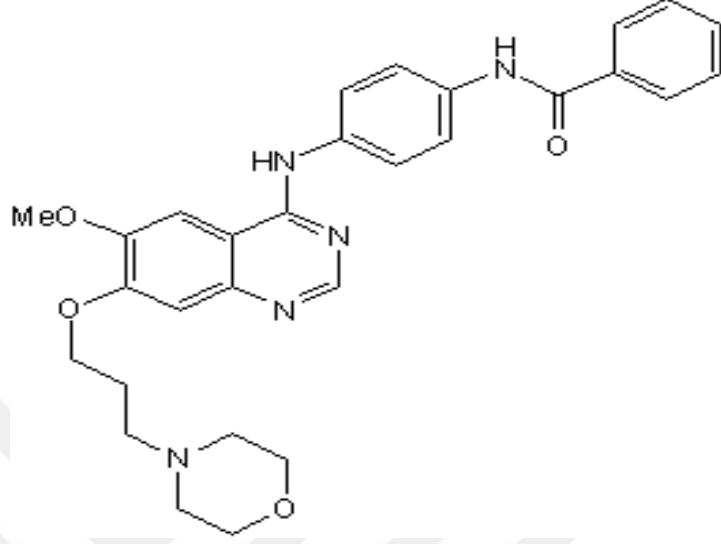
umut verici kemoterapötik hedefler olarak ortaya çıkmıştır. Bu proteinler tercihen sadece proliferatif amaçlı çoğalan hücrelerde eksprese edilmektedirler (Lapenna ve Giordano, 2009). Bu fikri destekleyen aurora kinaz inhibitörü ZM447439 ile yapılan ilk *in vitro* deneyler, bu inhibitörün bölünmeyen hücreler üzerine etki göstermezken yalnızca hızlı bölünen hücreleri seçici olarak öldürdüğünü göstermiştir (Ditchfield ve diğ., 2003). Üç aile üyesine yönelik farklı IC₅₀ değerleri sergileyen bir dizi aurora kinaz inhibitörü geliştirilmiş ve mitoz sürecinde aurora kinazların fonksiyonel rolünü incelemek için kullanılmıştır. Bu inhibitörlerin anti-tümör aktiviteleri de prelinik çalışmalarda değerlendirilmiş ve bunlardan birkaçı farklı kanser türlerinin tedavisi için erken evre klinik deneylere girmiştir (Cheung ve diğ., 2009; Pérez ve diğ., 2009).

2.8. ZM447439

ZM447439 (N-[4-({6-Metoksi-7-[3-(morfolin-4-yl)propoksi]kinazolin-4-yl}amino), aurora-A ve aurora-B'yi sırasıyla 110 ve 130 nM IC₅₀ değerleriyle inhibe ederek histon H3'ün fosforilasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Ditchfield ve diğ., 2003). Hücrelerin ZM447439 ile muamelesi, büyük olasılıkla iğ ipliği bütünlüğü kontrol noktasına müdahale ederek kromozom hizalamasında, ayrılması ve sitokinezde kusurlara neden olmaktadır (Gadea ve Ruderman, 2005). ZM447439 ile muamele edilen hücreler S fazından geçerler, ancak bölünemezler ve ardından kromozom hizalanması ve ayrılmasındaki başarısızlık nedeniyle ikinci bir S fazına girerler. P53'ü hasarlı olan hücrelerde ZM447439'un, p53'ü sağlam olan hücrelere kıyasla endoreduplikasyonu arttırması, p53'ten bağımsız mekanizmaların ZM447439 ile indüklenen tetraploidizasyonu etkileyebileceğini düşündürmektedir. ZM447439'un aracılık ettiği H3 fosforilasyonunda azalma, BUBR1, Mad2 ve Cenp-E'nin kinetokor lokalizasyonunun inhibisyonu gibi işlevler, AURKA'dan çok AURKB inhibisyonuna özgüdür (Ditchfield ve diğ., 2003).

ZM447439, poliploidizasyonu takiben konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde apoptozu indüklemektedir. Ayrıca, aurora kinazların inhibisyonu ile indüklenen apoptoz, hem Bak hem de Bax'a bağlı olarak mitokondriyal yolaklar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Aurora kinaz inhibitörlerine yanıt olarak ikincil bir olay olarak apoptoz, yalnızca poliploidizasyona değil, aynı zamanda inhibitörlerle muamele edilen hücrelerin hücre içi apoptotik sinyalizasyonuna da bağlıdır. Bu nedenle, apoptozu uyaran terapötik seçenekler, anti-tümöral etkilerini

güçlendirmek için aurora kinaz inhibitörleri ile sinerjik olarak hareket edebilmektedir (Dar ve diğ., 2010).



Şekil 2.6: ZM447439'un kimyasal yapısı

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN HÜCRE HATLARI

Bu çalışmada Luminal A meme kanseri modeli olarak MCF-7 hücre hattı ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan bu hücre hatları laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen hücrelerdir. Hücreler 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amfoterisin B (Sigma) ve %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco lab.) içeren pH'sı %4.4'lük NaHCO₃ ile 7.2'ye ayarlanmış RPMI-1640 (MCF-7) ve yüksek glikozlu DMEM (MDA-MB-231) doku kültürü besiyerlerinde pasajlanmıştır.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Pasaj işlemi, çoğaltılan hücreler kültür kaplarında tek tabaka haline geldiklerinde yapılmıştır. Tek tabaka haline gelmiş hücreler ilk önce %0.25'lik tripsin (Gibco lab.) ile kaldırılmış ve süspansiyon edilerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 2 ml besiyeri eklenip tripsin inaktif hale getirilmiştir. Daha sonra 500 g dönme hızında 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pelet kuyucuk başına ekilecek olan hücre sayısı hesaplanarak sulandırılmıştır. Yapılan bu işlemlerden sonra ekim işlemine geçilmiştir.

3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ

Hücre canlılığı ve % BrdU proliferasyon analizi için 96 kuyucuklu steril kültür kaplarına her bir kuyucukta 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Mitoz indeksi parametresi için 24 kuyucuklu steril kültür kaplarının her bir kuyucuğun içerisine önceden steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş ve her bir kuyucuk başına 15×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler lamellere yapıştıktan sonra her kuyucuğa 1 ml besiyeri eklenmiştir. Apoptoz indeksi parametresi için, 6 kuyucuklu steril kültür kaplarına ekim işlemi yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca, 37 °C'de %95 hava, %5 karbondioksit içeren inkübatörde hazır hale getirilmiştir.

3.4. ZM447439 KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatları için kullanılan 20 μ M, 40 μ M ve 80 μ M'lık inhibitör konsantrasyonları ZM447439'un (Tocris) 1 mM'lık stok solüsyonunun seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

3.5 MİTOZ İNDEKSİ İÇİN PREPARATLARIN HAZIRLANMASI

Kontrol ve deney gruplarındaki hücrelerin inhibitör uygulama süreleri (24 saat, 48saat ve 72saat) tamamlandığında, mitoz indeksi işlemi için ayrılan lameller kuyucuklardan çıkarılmıştır. Havada kurutulduktan sonra şeffaf oje ile lamlara yapıştırılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar hava ile kurutulduktan sonra, Carnoy fiksatif [glasiyal asetik asit: %96 etanol (1:3 v/v)] ile 10 dakika fikse edilmiş ve iki kez 5'er dakika %70 etanol ile yıkanmıştır. Preparatlar daha sonraki hidroliz ve boyama işlemleri için kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır.

3.6 APOPTOZ İNDEKSİ İÇİN PREPARATLARIN HAZIRLANMASI

Apoptoz indeksi için inhibitör uygulama süreleri (24 saat, 48saat ve 72saat) sonunda hücreler % \uparrow 0.25'lik tripsin ile yüzeyden kaldırıp steril tüplere alınmıştır. 500 g hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücreleri fikse etmek için pelet üzerine 1 ml metanol: PBS (1:1 v/v) konulmuş ve aynı şekilde 500 g hızda 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Sonraki işlemde pelet üzerine 1 ml metanol eklenmiş ve pipetaj ile süspanse edilerek 4 $^{\circ}$ C'de saklanmıştır.

Preparatın hazırlanması için lamalar ilk önce etanol:HCl (1:1 v/v) karışımı içerisinde 4 $^{\circ}$ C'de 24 saat bekletilmiştir. Bu işlemin sonunda 24 saat akarsu altında bekletilmiştir. Sonrasında saf su ile tekrar durulanan lamalar preparat yapılmak üzere 4 $^{\circ}$ C'de saklanmıştır.

3.7. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ

3.7.1. Hücre Canlılığı: Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Tayini

Hücreler ZM447439 ile 24 saat süreyle muamele edildikten sonra, hücre canlılıkları MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) ile analiz edilmiştir. MTT, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimini etkilemekte ve tetrazolyum tuzları renkli formazan bileşiklerine indirgenmektedir. Deney sürenin sonunda her bir kuyucuktaki besiyeri

uzaklaştırılmış ve 40 µl taze MTT solüsyonu (PBS'de 5 mg / ml) eklenmiş 4 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 160 µl DMSO (Dimetil Sülfoksit, Sigma) eklenerek çalkalayıcılı etüvde 1 saat inübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristallerinin 1 saatlik inkübasyon süresince çözünmesinin ardından oluşturulan deney gruplarının absorbands değerleri spektrofotometrede (µQuant, Bio-Tek Instruments INC.)570 nm'de ölçülmüştür.

3.7.2. Hücre İndeksi: xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence DP kullanılarak elde edilen hücre indeksi parametrelerinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu E-Plate kullanılmıştır. İlk önce E-Plate'in her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklenmiştir. Besiyeri yerleştirildikten sonra xCELLigence DP cihazında background ölçümleri alınmıştır. Ekim işlemleri MCF-7 hücreleri için 100 µl besiyerinde 1×10^4 hücre ve MDA-MB-231 hücreleri için 100 µl besiyerinde 5×10^3 hücre olacak şekilde yapılmıştır. Ekim işleminin ardından E-Plate'ler 20 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra xCELLigence DP cihazındaki yerlerine yerleştirildikten sonra 37 °C ve %5 CO₂ ortam şartlarında inkübasyona devam edilmiştir. Bu işlemlerden sonra xCELLigence DP cihazına her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verilmiştir. Hücre ekiminde yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde E-Plate'lerdeki besiyeri inhibitör konsantrasyonları ile değiştirilmiş, 72 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edilmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağlı hücre değerlerine ait grafikler bilgisayar ekranına aktarılmıştır.

3.7.3. Mitoz İndeksi

Deney gruplarına göre hazırlanan preparatlar ilk önce oda sıcaklığındaki 1N HCl ile 1 dakika daha sonra 60 °C deki 1N HCl ile 10 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz işlemi yapıldıktan sonra preparatlara 1 saat süresince Feulgen metodu uygulanmıştır. Feulgen metodu uygulanmış preparatlar daha sonra Feulgen metoduna özel yıkama solüsyonu ile 2'şer dakikadan 3 kez yıkanmış, havada kurutulmuş ve 2 dakika süre ile Giemsa boyası ile boyanarak sayım için hazır duruma getirilmiştir. Bu preparatlardan mitoz indeksi değerlerini saptamak amacı ile geç profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sayılmıştır. İşlem x1000 büyütmede sayılmıştır. Erken profaz evresi interfaz grubundaki hücrelere morfolojik olarak benzerlik gösterdiğinden bu evre ile birlikte değerlendirilmiştir. Uygulanan her bir inhibitör konsantrasyonu ve süre için

üçer preparat değerlendirilmiştir. Her bir preparattan ortalama 3×10^3 hücre sayılarak, mitoz indeksi değerleri tespit edilmiştir.

3.7.4. BrdU Proliferasyon Analizi

BrdU proliferasyon analizi için hücre ekiminden 24 saat sonra total hacim 200 µl olacak şekilde istenilen konsantrasyonda test reaktifi eklenmiştir. Test reaktifi eklendikten 3-4 saat sonra BrdU eklenmiş ve deney süreleri devam ettirilmiştir. Bu işlem her deney süresi için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle kit içerisindeki 500x BrdU'nun 1:500 oranında seyreltik solüsyonu hazırlanmıştır. Bu seyreltilmiş BrdU'dan 20 µl alınarak deney gruplarının bulunduğu kuyucuklara eklenmiştir. 24 saat inkübasyona devam edilmiştir. Kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µl sabitleme solüsyonu uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inübe edilerek bu sürenin sonunda sabitleme solüsyonu tamamen uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamasında kit içerisinde yer alan 50 x Wash Buffer, 1:50 oranında seyreltilerek 3 kez yıkama yapılmış, son yıkamadan sonra Wash Buffer kuyucuklardan iyice uzaklaştırılmıştır. Her kuyuya 100 µl Anti-BrdU antikoru eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. 2000x Goat anti-mouse IgG, peroksidaz konjugatı 1:2000 oranında seyreltilerek milipor filtreden geçirilmiş ve her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Her kuyuya 100 µl TMB Peroksidaz Substrat eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Kit içerisinde yer alan anti-stop solüsyonundan her kuyuya 100 µl eklenmiş ve 450-550 nm çift dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.7.5. Apoptoz İndeksi

4⁰C'de bekletilen hücreler 500 g hızda 5 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve tekrar 1 ml taze metanol ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler daha önce temizlenen lamalar üzerine tüm lam yüzeyi kaplanacak şekilde 100 µl damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Preparatlara ışık almayan bir ortamda, boyama kaplarında 20 dakika boyunca oda sıcaklığında DAPI uygulanmıştır. Boyama kabından alınan preparatlar 20 dakikada boyunca PBS'de bekletilip yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından preparatların üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskopta (Leitz, Wetzlar Ortholux) (λ_{exc} 364 nm; λ_{em} 454 nm) sayımları gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlarda DAPI uygulanan hücreler, normal ve apoptotik nükleus olarak belirlenmiş ve AI değerleri hesaplanmıştır. Her deney grubu için en

az 30 alanda yaklaşık 100 hücre sayılmış ve her alan için apoptotik hücrelerin toplam hücrelere olan yüzde oranları hesaplanmıştır.

3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm deney gruplarında uygulanan konsantrasyon ve zamana göre saptanan hücre kinetiği parametreleri değerleri kontrole ve birbirine göre değerlendirilmiş ve bu amaçla tüm deney gruplarından saptanan değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Grupların kontrole göre anlamlılıkları DUNNETT`S testi ile grupların birbirileri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde $p<0,05$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır. |



4. BULGULAR

Bu çalışmada, kanser tedavisinde hedefe yönelik bir ajan olarak kullanılabilir aurora kinaz inhibitörü ZM447439'un in vitro koşullarda östrojen reseptörü pozitif olan Luminal A meme kanseri modeli olarak MCF-7 ile östrojen, progesteron reseptörü ve HER-2 gen anlatımı negatif olan üçlü negatif meme kanseri modeli olarak da MDA-MB-231 hücreleri üzerine tek başına etkileri değişik süre ve konsantrasyonlarda uygulanarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla hücre canlılığı, hücre indeksi, mitoz indeksi, % BrdU proliferasyon analizi ve apoptoz indeksi parametreleri kullanılmıştır.

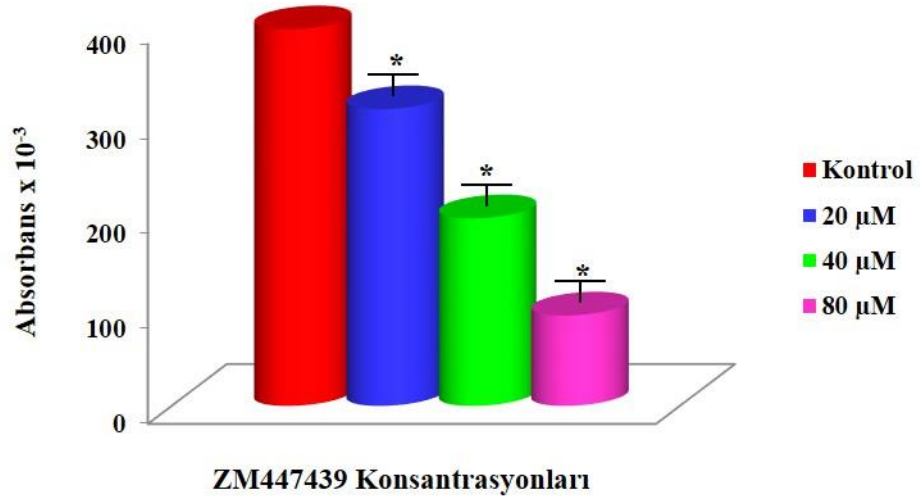
4.1 HÜCRE CANLILIĞI

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine ZM447439'un uygulanması sonucunda hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla, kültüre edilen hücrelere 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda ZM447439 uygulanmıştır. Her iki hücre hattı için 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 konsantrasyonları kullanılmıştır. Uygulama sonucunda MCF-7 hücrelerine ait absorbans değerleri sırasıyla kontrol ile 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 konsantrasyonları için $396,296 \times 10^{-3}$; $312,212 \times 10^{-3}$; $197,436 \times 10^{-3}$ ve $95,136 \times 10^{-3}$ olarak ölçülürken (Şekil 4.1),MDA-MB-231 hücrelerine ait absorbans değerleri sırasıyla kontrol ile 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 konsantrasyonları için $402,287 \times 10^{-3}$; $326,213 \times 10^{-3}$; $208,534 \times 10^{-3}$ ve $108,136 \times 10^{-3}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.2).

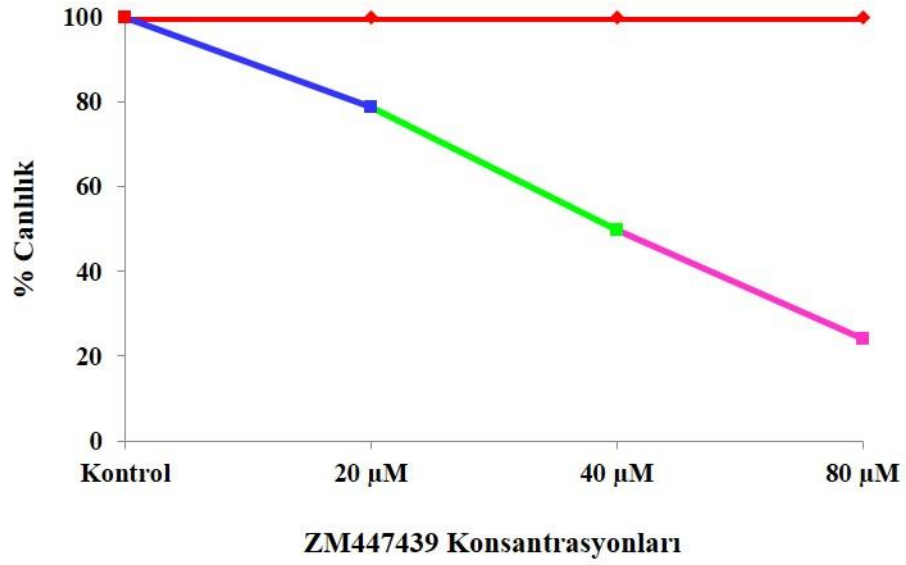
Absorbans değerleri incelendiğinde MCF-7 hücreleri için %100 kabul edilen kontrol grubuna göre 20 µM'lık ZM447439 konsantrasyonunun hücrelerin canlılığını %78,78'e, 40 µM ZM447439 konsantrasyonunun % 49,82'ye ve 80 µM'lık ZM447439 konsantrasyonunun ise %24'e düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.3). MDA-MB-231 hücreleri için bu değerler %100 kabul edilen kontrol grubuna göre 20 µM'lık ZM447439 konsantrasyon için %81,08, 40 µM'lık ZM447439 konsantrasyonu için %51,83 ve 80 µM'lık ZM447439 konsantrasyonu için ise %26,88 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



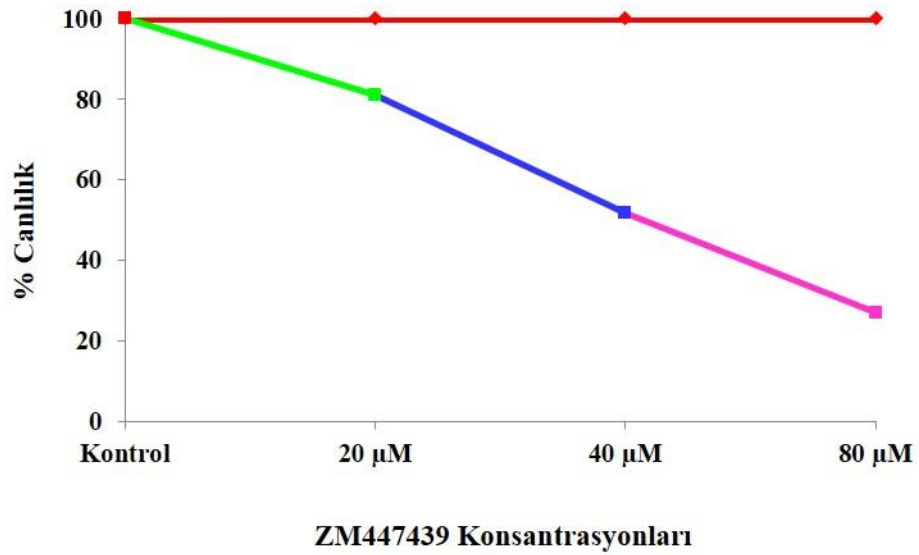
Şekil 4.1: 24 saat süresince 20 μM, 40 μM ve 80 μM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0,05).



Şekil 4.2: 24 saat süresince 20 μM, 40 μM ve 80 μM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0,05).



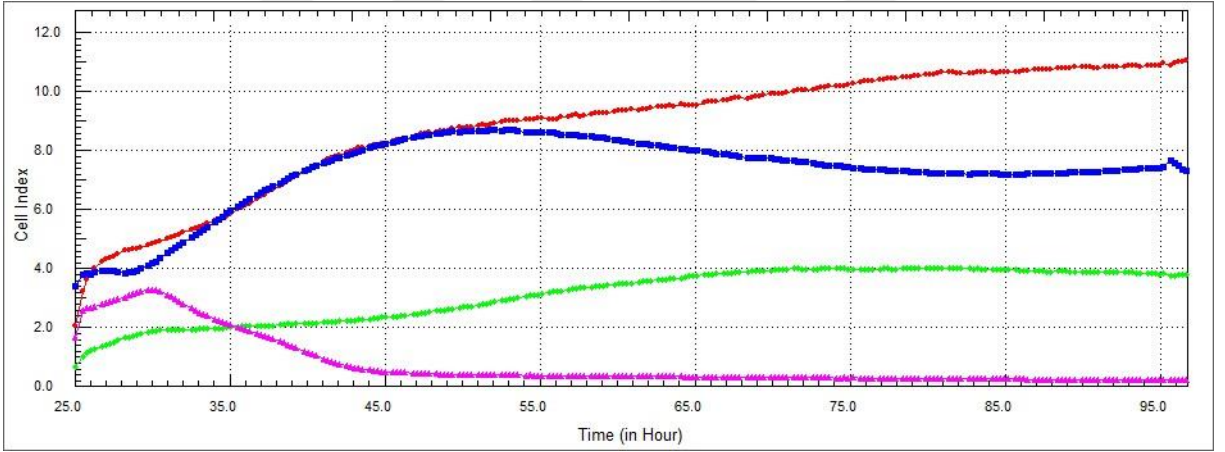
Şekil 4.3: 24 saat süresince 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0,05$).



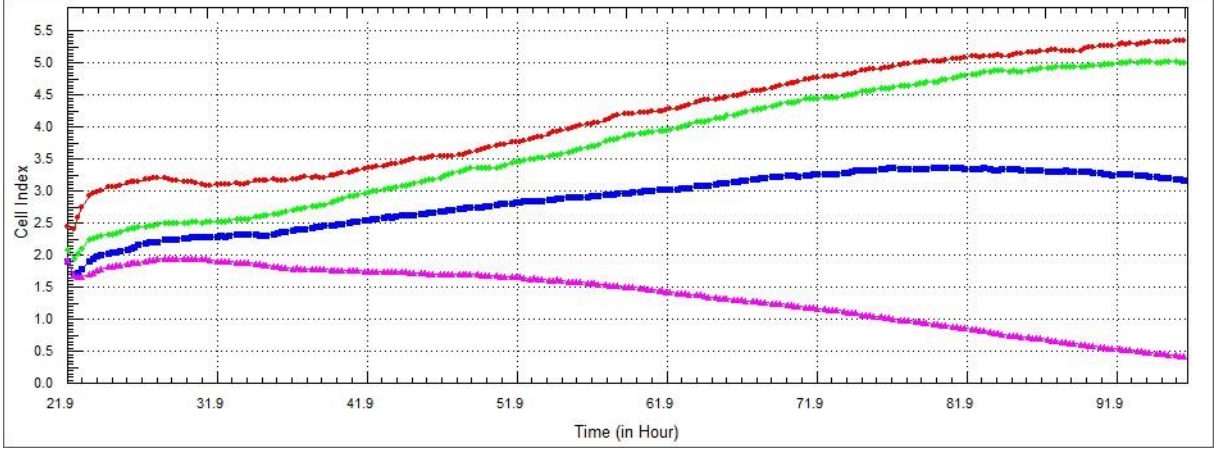
Şekil 4.4: 24 saat süresince 20 µM, 40 µM ve 80 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0,05$).

4.2. HÜCRE İNDEKSİ

Aurora kinaz inhibitörü ZM447439'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M konsantrasyonlarında uygulanması sonucunda xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminden elde edilen hücre indeksi değerleri incelendiğinde, farklı inhibitör konsantrasyonlarında farklı antiproliferatif etkiler gözlemlenmiştir. Hücre indeksi değerlerine ait grafiğin eğrileri, kullanılan standart eğriler ile karşılaştırıldığında, MCF-7 hücreleri için 20 μ M, 40 μ M ve 80 μ M ZM447439 konsantrasyonları sırasıyla antimitotik, sitostatik ve sitoskeletal etkiler göstermiştir (Şekil 4.5). MDA-MB-231 hücreleri için, uygulanan tüm ZM447439 konsantrasyonlarının sitostatik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: 20 μ M, 40 μ M ve 80 μ M dozlarında ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, -- 20 μ M, - - 40 μ M, - - 80 μ M).



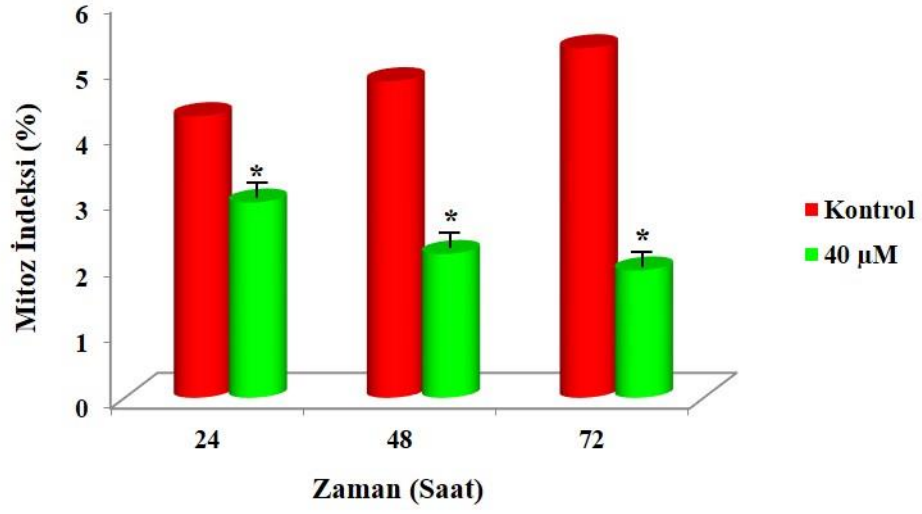
Şekil 4.6: 20 µM, 40 µM ve 80 µM dozlarında ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği (--- Kontrol, --- 20 µM, --- 40 µM , --- 80 µM).

4.3. MİTOZ İNDEKSİ

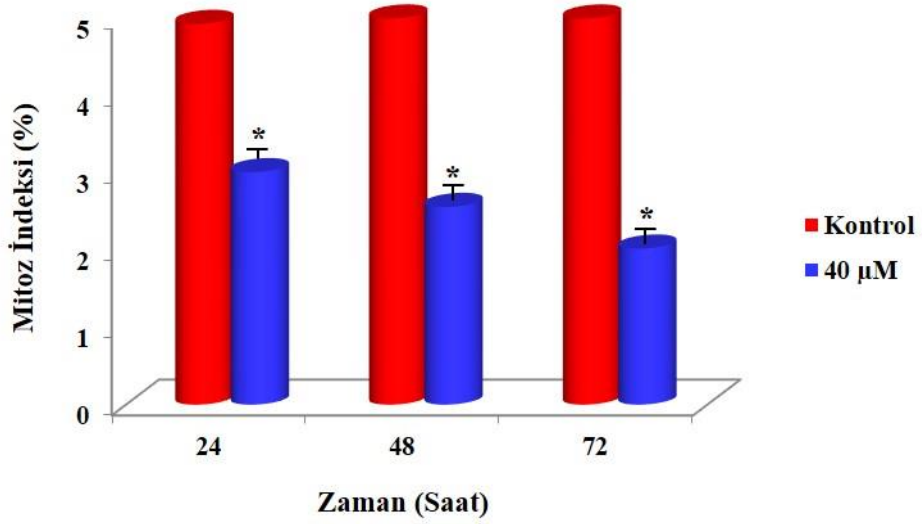
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine ZM447439'un uygulanması sonucunda mitoz indeksi değerleri, 0-72 saat süresince kültüre edilen her iki hücre hattına 40 µM'lık inhibitör konsantrasyonu uygulanarak saptanmıştır. Uygulama sonucunda her iki hücre hattının mitoz indeksi değerleri önemli ölçüde azalmıştır.

MCF-7 hücre hattına ait mitoz indeksi değerleri 24. saatte %4,27'den %2,96'ya; 48. saatte %4,8'den %2,18'e ve 72. saatte %5,3'ten %1,93'edüşmüştür (Şekil 4.7).

Mitoz indeksi değerleri MDA-MB-231 hücreleri için ise 24. Saatte %4,93'ten %3,01'e; 48. saatte %5,02'den %2,56'ya ve 72. saate %5,38'den %2,02'ye düşmüştür (Şekil 4.8). Meydana gelen bu düşüşün her iki hücre hattında istatistiksel olarak anlamlılığı $p < 0,05$ seviyesinde saptanmıştır.



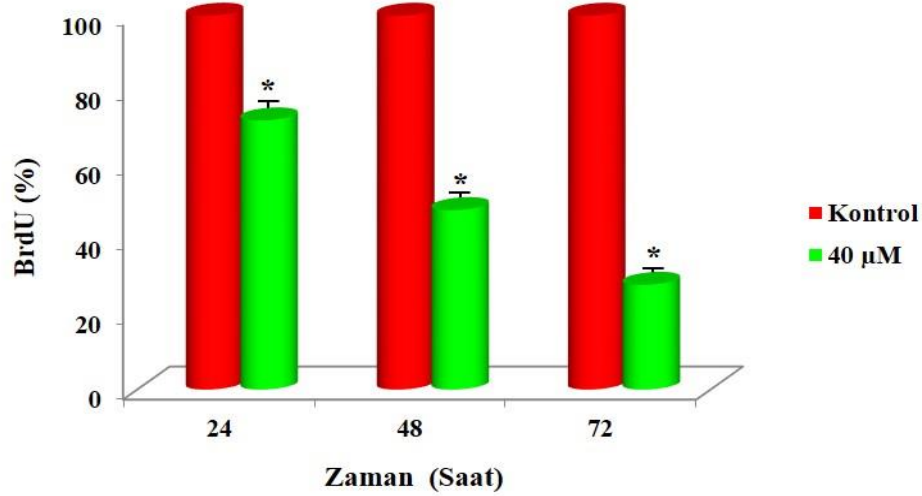
Şekil 4.7: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitoz indeksi değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0,05$).



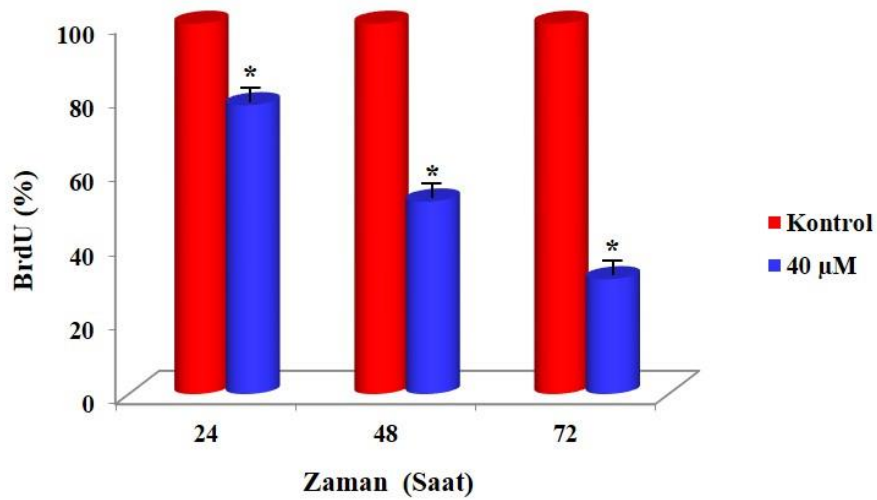
Şekil 4.8: 0-72 saat süresince 40 µM ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitoz indeksi değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0,05$).

4.4. % BRDU

Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerine 40 μ M ZM447439 uygulandıktan sonra, % BrdU proliferasyon değerleri incelendiğinde her iki hücre hattında da anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. %100 olarak kabul edilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MCF-7 hücreleri için % BrdU değerleri 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %72, %48 ve %28 (Şekil 4.9) olarak hesaplanırken MDA-MB-231 için %78, %52 ve %31 (Şekil 4.10) olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve tüm deney grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).



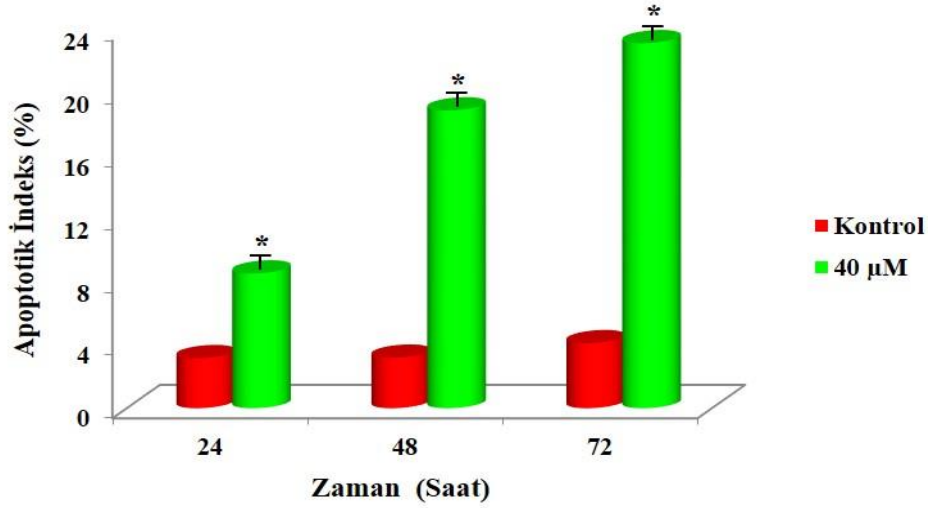
Şekil 4.9: 0-72 saat süresince 40 μ M ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % BrdU değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0,05$).



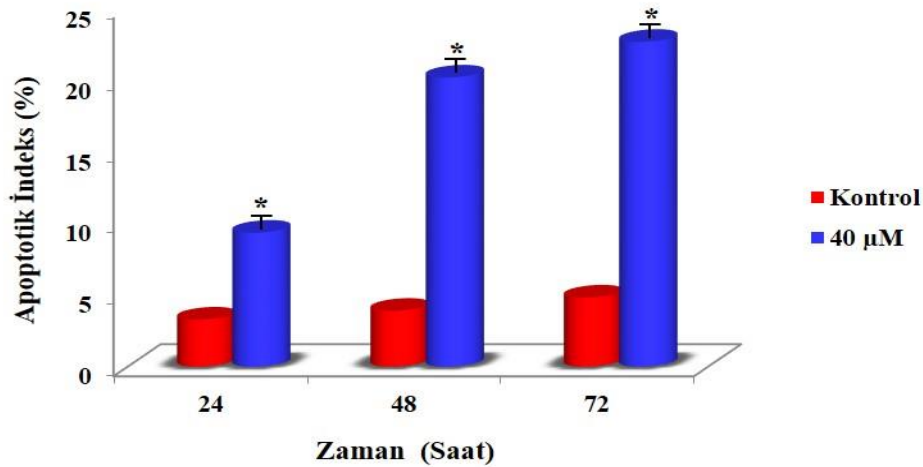
Şekil 4.10: 0-72 saat süresince 40 μ M ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % BrdU değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0,05$).

4.5. APOPTOZ İNDEKSİ

40 μ M konsantrasyonda ZM447439'un MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine 0-72 süresince uygulanması sonucunda hücrelerin apoptoz indeksi değerleri belirlenmiştir. İnhibitör uygulanmayan kontrol grubu ile paralel yürütülen deney serilerinden elde edilen apoptoz indeksi değerleri MCF-7 hücreleri için 24. saatte %3,18 'den %8,56'ya; 48. saatte %3,21'den %18,92'ye ve 72. saatte %4,13'ten %23,19'a yükselmiştir (Şekil 4.11). Bu değerler MDA-MB-231 için 24. saatte % 3,28 'den % 9,34'e; 48. saatte % 3,89'dan % 20,18'e ve 72 saatte % 4,82'den % 22,67'ye yükselmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11: 0-72 saat süresince 40 μ M ZM447439 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait apoptoz indeksi değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0,05$)



Şekil 4.12: 0-72 saat süresince 40 μ M ZM447439 uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait apoptoz indeksi değerleri (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0,05$). |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hedefe yönelik tedavi veya moleküler hedefli terapi, kanser için tıbbi tedavinin en önemli yöntemlerinden biridir. Hedefe yönelik tedavi, geleneksel kemoterapide olduğu gibi hızla bölünen tüm hücrelere basitçe müdahale etmek yerine, karsinogenez ve tümör büyümesi için gerekli olan spesifik hedefli moleküllere müdahale ederek kanser hücrelerinin büyümesini engeller. Hedefe yönelik kanser tedavilerinin, geleneksel standart tedavi yöntemlerinden daha etkili ve normal hücrelere daha az zararlı olması beklenmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Luo ve diğ., 2009).

Yüksek oranda korunmuş serin/treonin protein kinazların aurora kinaz ailesinin (aurora A, aurora B ve aurora C), mitotik hücre döngüsünün erken aşamalarında çok önemli olduğu bilinmektedir (Crane ve diğ., 2004). Aurora kinaz ailesi, düzenleyici bir N-terminal alanı, bir protein kinaz alanı ve yüksek dizi homolojisini paylaşan bir C-terminal alanı içerir ve yüksek derecede korunmuş fonksiyonel motiflere sahiptir (Kollareddy ve diğ., 2008; Fu ve diğ., 2009; Hans ve diğ., 2009). Aurora ailesinin fonksiyonel rolü, bunların lokalizasyonu ve onlara bağlanan spesifik substrat proteinleri ile ilişkilidir (Cheung ve diğ., 2014).

Aurora kinazların anormal anlatımı, mitoz ve sitokinezi engelleyerek daha sonra genetik kararsızlığa yol açabilir; bu da tümörlerin gelişmesine neden olabilir. Aurora kinaz etki mekanizması, farklı izoform ve kanser tipine dayanmaktadır. Klinik öncesi ve klinik veriler, farklı kanser tiplerinde standart tedaviyi güçlendirmek için yeni anti-mitotik ajanların geliştirilmesine yol açmıştır (Kollareddy ve diğ., 2008).

Aurora kinaz A'nın meme kanseri hücre transformasyonu sırasında aşırı anlatımının yapıldığı bildirilmektedir (Sen ve diğ., 1997; Zhou ve diğ., 1998). Ayrıca, aurora A'nın yüksek anlatımı yumurtalık, kolon ve akciğer kanserinde de bulunur (Zhou ve diğ., 1998; Gu ve diğ., 2007). Aurora B'nin anormal anlatımının tiroid anaplastik karsinom (Sorrentino ve diğ., 2005), kolon kanseri (Katayama ve diğ., 1999) ve oral kanser (Qi ve diğ., 2007) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aurora C mayozda rol oynamaktadır (Hu ve diğ., 2000) ve aşırı anlatımı bazı somatik kanserlerle de ilişkilidir (Falchook ve diğ., 2015).

Onkogeneizde rol oynayan AURKA ve AURKB'nin aşırı anlatımı kötü terapötik sonuçlar ile ilişkilendirilmiştir ve bu spesifik moleküllerin hedeflenmesi fikrini güçlendirmiştir (Warner ve

diğ., 2006). Aurora kinazlar, kanser için terapötik bir hedef olarak onaylanmıştır ve bu nedenle aurora kinaz inhibitörlerinin gelişimi, prelinik çalışmalardan klinik çalışmalara ilerlemiştir (Falchook ve diğ., 2015; Choudary ve diğ., 2015). Başlangıçta bir düzineden fazla küçük moleküllü aurora kinaz inhibitörü klinik olarak araştırılmıştır (Carpinelli ve Moll, 2009; Boss ve diğ., 2009). Hedefe yönelik tedavi için kanser tedavisinde potansiyel bir ilaç olarak ilk aurora kinaz inhibitörü ZM447494'ün keşfedilmesinden sonra, tümör tedavisinde 30'dan fazla aurora kinaz inhibitörü tanımlanmıştır (Cai et al., 2014; Gavriilidis ve diğ., 2015). ZM447439'un hem AURKA ve diğer hem de AURKB aktivitelerini etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Crispi ve diğ., 2010).

Aurora kinazların aşırı anlatımı veya gen amplifikasyonu göz önüne alındığında, çeşitli kanserlerde tanımlanmış olmaları, onları kanser tedavisinin güçlü hedefleri haline getirmiştir. Bu güne kadar bir dizi aurora kinaz inhibitörü üretilmiştir ve bu inhibitörler tarafından aurora kinazların anlatımının veya aktivitesinin inhibisyonu, aslında kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını, migrasyonu ve invazyonu baskılamakta (Diaz ve diğ., 2012; Romain ve diğ., 2014; Zhu ve diğ., 2014); dolayısıyla birçok kanserin ilerlemesini ve büyümesini inhibe etmektedir (Yang ve diğ., 2007; Bavetsias ve Linardopoulos, 2015; Yan ve diğ., 2016).

Yapılan bir çalışmada, küçük moleküllü ZM447439'un, 4N/8N DNA içeriğine sahip hücrelerde birikimi ile G2/M'de hücre döngüsü tutuklamasına ve sonrasında apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, ZM447439 tarafından aurora kinazın baskılanması Ser473'te Akt fosforilasyonunu etkili bir şekilde düşürmüştür. Bu veriler, birlikte ele alındığında hedefe yönelik kanser tedavisinde Aurora kinazın ZM447439 inhibe edilmesinin önemine işaret etmektedir (Long ve diğ., 2008).

Aurora kinazlar yalnızca mitoz sırasında anlatımı yapılır ve aktiftir (Walter ve diğ., 2000; Willems ve diğ., 2018). Bu nedenle çoğalmayan sağlıklı hücreler, çoğalan kanser hücrelerine kıyasla aurora kinaz inhibitörlerinden daha az etkilenmektedir. Çoğalan A549, H1299, MCF-7 ve HepG2 tümör hücrelerinin, submikromolar aralıkta IC50 değerleri kullanılarak ZM447439 ile muamele edildikten sonra öldüğü, bu ajanın normal HLF hücreleri üzerinde çok az etki gösterdiğini doğrulanmıştır. ZM447439'un sitotoksitesine ek olarak, bu ajan ayrıca A549 hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu da inhibe etmiştir. Bu in vitro etkinlik, ZM447439'un güçlü bir kanser kemoterapötik ilacı olabileceğini öne sürmektedir (Lee ve diğ., 2019).

Apoptoz gen ailesinin inhibitörü olan survivin, birçok tümörde aşırı anlatımı yapılan kromozom yolcu kompleksini oluşturmak için AURKB'ye bağlanır. Yapılan bir çalışma, antisens oligonükleotitler ve AURKB inhibitörü ZM447439 tarafından survivinin ikili inhibisyonunun radyasyondan sonra mezotelyom hücrelerinde mitozun dondurulmasını teşvik ederek mezotelyom hücrelerini sinerjistik olarak radyasyona duyarlı hale getirdiğini göstermiştir (Kim ve diğ., 2007).

Farklı gastroenteropankreatik nöroendokrin tümör hücre hatları ile yapılan bir çalışmada ZM447439'un antineoplastik etkileri araştırılmış ve bu inhibitörün tümör hücre hatlarının proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca ZM447439 ile aurora kinaz inhibisyonunun DNA'nın parçalanmasına ve kaspaz 3 ile 7 aktivasyonunun eşlik ettiği apoptozu güçlü bir şekilde indüklediği, hücre döngüsünü G0/G1 fazında durduğu ve G2/M geçişinde bir blok oluşturduğu belirlenmiştir (Georgieva ve diğ., 2010).

İnsan meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231 ile yapılan bir çalışmada aurora kinazların meme kanseri hücrelerinin hareketliliğini üzerine etkisi değerlendirilmeye çalışılmış ve bu amaçla aurora kinaz inhibitörü ZM447439 kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda ZM447439'un, insan meme MDA-MB-231'in yapışmasını teşvik ettiği ve MCF-7 hücrelerinin göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu da aurora kinazların önemli prognostik göstergeler olduğunu ve tedavide önemli hedefler olduğunu düşündürmektedir (Zhao ve diğ., 2017).

Aurora kinaz A/B inhibitörü olan AS703569'un kullanıldığı bir çalışmada insan meme kanserlerinin prelinik modellerinde aurora kinazlar hedef alınmış ve terapötik potansiyelleri araştırılmıştır. In vitro koşullarda AS703569, 15 insan meme kanseri hücre hattında test edilmiştir. Bu hücre hatlarından üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarının AS703569'a diğer meme kanseri hücre tiplerinden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Hücre çoğalmasının engellenmesi hücre döngüsünün durdurulması, anöploidi ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir.

AS703569, in vivo olarak tek başına uygulandığında 11 hastadan türetilen meme kanseri ksenograftından yedisinde tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. AS703569 ile tedavi, fosfo-histon H3 anlatımında bir azalma ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, doksorubisin-siklofosamid ile kombine olarak uygulandığında AS703569, in vivo tümör nüksünü önemli

ölçüde inhibe etmiş, bu da aurora kinaz inhibitörlerinin hem tek başına hem de kombinasyon tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (Romanelli ve diğ., 2012).

Aurora kinaz inhibitörlerinin tek başına ve diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanımının değerlendirildiği Faz I/II klinik çalışmalarda , antitümör etkilerin arttığı gözlenmiştir, ancak bu sonuçlar daha fazla klinik çalışma gerektirmektedir (Warner ve diğ., 2006).

Tek ajan olarak kullanıldığında, aurora kinaz inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinde farklı klinik sonuçlara neden olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle aurora kinaz inhibitörleri ile yapılacak çalışmalar, bu ajanların kemoterapi veya diğer hedeflenen antikanser ajanlarla kombinasyon olasılığına da odaklanmalıdır (Romanelli ve diğ., 2012).

Bu tez çalışmasında, her iki hücre hattı için kullanılan aurora kinaz inhibitörü ZM447439'un 40 μM 'lık konsantrasyonu hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatları için IC50 konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. İnhibitörün IC50 konsantrasyonu farklı hücre kinetiği parametreleri ile değerlendirildiğinde her iki hücrenin proliferasyon değerlerinde anlamlı bir düşüşe neden olmuştur.

Yapılan bu çalışmada, hem Luminal A, hem de üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarına farklı konsantrasyonda (20 μM , 40 μM ve 80 μM) ZM447439'un uygulanarak antiproliferatif etkiler xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile değerlendirildiğinde, elde edilen hücre indeksi değerleri ve bu değerlerden elde edilen eğrilerin standart eğrilerle karşılaştırılması sonucunda MCF-7 hücrelerinde 20 μM 'lık konsantrasyonun antimitotik, 40 μM 'lık konsantrasyonun sitostatik ve 80 μM 'lık konsantrasyonun sitoskeletal etkiye sahip olduğu gözlemlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde tüm ZM447439 konsantrasyonlarının sitostatik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, Luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan ve MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hatları üzerine ZM447439'un etkisi hücre canlılığı, hücre indeksi, mitoz indeksi, % BrdU ve apoptoz indeksi gibi hücre kinetiği parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler hücre canlılığı, hücre indeksi, mitoz indeksi ve % BrdU değerlerinde zamana bağlı olarak anlamlı bir düşüşün, apoptoz indeksi değerlerinde ise her iki bulgu için anlamlı ($p < 0,05$) bir yükselişin olduğu gösterilmektedir. Her iki hücre hattında da benzer sonuçların açığa çıkması, bu

inhibitörün etkisinin östrojen reseptöründen bağımsız olduğunu ve diğer kanser tiplerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. |



KAYNAKLAR

- Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C., Carmena, M., 2001, Essential roles of drosophila inner centromere protein (INCENP) and Aurora B in Histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation, *J Biol Chem*, 15, 865-580.
- Anderson, W.F., Rosenberg, P.S., Prat, A., Perou, C.M., Sherman, M.E., 2014, How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst*, 106 (8), dju165.
- Bauer, K.R., Brown, M., Cress, R.D., Parise, C.A., Caggiano, V., 2007, Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a populationbased study from the California Cancer Registry, *Cancer*, 109, 1721-1728.
- Bavetsias, V., Linardopoulos, S., 2015, Aurora kinase inhibitors: Current status and Outlook, *Front Oncol*, 5, 278.
- Berdnik, D., Knoblich, J.A., 2002, Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis, *Curr. Biol*, 12, 640-647.
- Boss, D.S., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., 2009, Clinical experience with aurora kinase inhibitors: a review, *Oncologist*, 14, 780-793.
- Buschhorn, H.M., Klein, R.R., Chambers, S.M., Hardy, M.C., Green, S., Bearss, D., Nagle, R.B., 2005, Aurora-A over-expression in high-grade PIN lesions and prostate cancer, *The Prostrate*, 64, 341-346.
- Cai, J., Li, L., Hong, K.H., Wu, X., Chen, J., Wang, P., Cao, M., Zong, X., Ji, M., 2014, Discovery of 4-aminoquinazoline-urea derivatives as Aurora kinase inhibitors with antiproliferative activity, *Bioorg Med Chem*, 22 (21), 5813-5823.
- Carmena, M., Ruchaud, S., Earnshaw, W.C., 2009, Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins, *Curr Opin Cell Biol*, 21, 796-805.
- Carpinelli, P., Moll, J., 2009, Is there a future for Aurora kinase inhibitors for anticancer therapy? *Curr Opin Drug Discov Dev*, 12, 533-542.
- Chen, F., Pu, F., 2017, Role of postmastectomy radiotherapy in early-stage (T1-2N0-1M0) triple-negative breast cancer: a systematic review, *OncoTargets and Therapy*, 10, 2009-2016.
- Cheung, C.H., Coumar, M.S., Hsieh, H.P., Chang, J.Y., 2009, Aurora kinase inhibitors in preclinical and clinical testing, *Expert Opin Investig Drugs*, 18, 379-398.

- Cheung, C.H., Sarvagalla, S., Lee, J.Y., Huang, Y.C., Coumar, M.S., 2014, Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2011 - 2013). *Expert Opin Ther Pat*, 24 (9), 1021-1038.
- Choudary, I., Barr, P.M., Friedberg, J., 2015, Recent advances in the development of Aurora kinases inhibitors in hematological malignancies, *Ther Adv Hematol*, 6 (6), 282-294.
- Conte, N., Delaval, B., Ginestier, C., Ferrand, A., Isnardon, D., Larroque, C., Prigent, C., Séraphin, B., Jacquemier, J., Birnbaum, D., 2003, TACC1–chTOG–Aurora A protein complex in breast cancer, *Oncogene*, 22, 8102-8116.
- Crane, R., Gadea, B., Littlepage, L., Wu, H., Ruderman, J.V., 2004, Aurora A, meiosis and mitosis, *Biol Cell*, 96 (3), 215-229.
- Crispi, S., Fagliarone, C., Biroccio, A., D'Angelo, C., Galati, R., Sacchi, A., Vincenzi, B., Baldi, A., Verdina, A., 2010, Antiproliferative effect of Aurora kinase targeting in mesothelioma, *Lung Cancer*, 70, 271-279.
- Dar, A.A., Goff, L.W., Majid, S., Berlin, J., El-Rifai, W., 2010, Aurora kinases' inhibitors- rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther*, 9 (2), 268.
- Diaz, R.J., Golbourn, B., Shekarforoush, M., Smith, C.A., Rutka J.T., 2012, Aurora kinase B/C inhibition impairs malignant glioma growth in vivo, *J Neurooncol*, 108 (3), 349-360.
- Diniz, G., Irkkan, Ç., Kelten, C., Özekinci, S., 2015, HER2 değerlendirmesindeki ipucu ve tuzaklar. *Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*, 25 (1), 7-12.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., Taylor, S.S., 2003, Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores, *J Cell Biol*, 161, 267-280.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C., Ducommun, B., 2004, Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition, *J Cell Sci*, 117, 2523-2531.
- Engstrøm, M.J., Opdahl, S., Hagen, A.I., Romundstad, P.R., Akslen, L.A., Haugen, O.A., Vatten, L.J., Bofin, A.M., 2013, Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients, *Breast Cancer Res Treat*, 140:463-473.
- Ergüç, E.İ., Orhan, H.G., 2019, Östrojenle indüklenen meme kanseri, tedavi yaklaşımları ve melatoninin tedavideki rolü, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39 (2), 113-128.
- Eryılmaz, M.A., Igcı, A., Muslumanoglu, M., Ozmen, V., Koc, M., 2012, Male breast cancer: A retrospective study of 15 years, *J BUON*, 17 (1), 51-56.
- Falchook, G.S., Bastida, C.C., Kurzrock, R., 2015, Aurora kinase inhibitors in oncology clinical trials: Current state of the progress, *Semin Oncol*, 42 (6), 832-848.

- Fantini, M., Santelmo, C., Drudi, F., Ridolfi, C., Barzotti, E., Gianni, L., Arcangeli, V., Affatato, A., Ravaioli, A., 2012, Triple negative breast cancer treatment, use of platinum and platinum analogs, *Journal of Cancer Therapy*, 3, 777-781.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M.F., et al., 2015, The global burden of cancer 2013, *JAMA Oncol*, 1 (4), 505-527.
- Foulkes, W.D., Stefansson, I.M., Chappuis, P.O., Bégin, L.R., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M., Akslen, L.A., 2003, Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer, *J Natl Cancer Inst*, 95, 1482-1485.
- Fu, J., Bian, M., Liu, J., Jiang, Q., Zhang, C., 2009, A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (17), 6939-6944.
- Fidalgo, J.A.P., Roda, D., Roselló, S., Rodríguez-Braun, E., Cervantes, A., 2009, Aurora kinase inhibitors: a new class of drugs targeting the regulatory mitotic system, *Clin Transl Oncol*, 11, 787-798.
- Gadea, B.B., Ruderman, J.V., 2005, Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome-induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in xenopus egg extracts, *Mol Biol Cell*, 16, 1305-1318.
- Gavriilidis, P., Giakoustidis, A., Giakoustidis, D., 2015, Aurora kinases and potential medical applications of aurora kinase inhibitors: a review, *J Clin Med Res*, 7 (10), 742-751.
- Georgieva, I., Koychev, D., Wang, Y., Holstein, J., Hopfenmüller, W., Zeitz, M., Grabowski, P., 2010, ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines. *Neuroendocrinology*, 91 (2), 121-130.
- Gerber, D.E., 2008, Targeted therapies: a new generation of cancer treatments, *Am Fam Physician*, 77, 311-319.
- Gizatullin, F., Yao, Y., Kung, V., Harding, M.V., Loda, M., Shapiro, G.I., 2006, The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function, *Cancer Res*, 66, 7668-7677.
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., Harbeck, N. 2009, Triple-negative breast cancer-current status and future directions, *Ann Oncol*, 20, 1913-1927.
- Goljan, E.F., 2019, *Rapid Review Pathology*, Elsevier, Philadelphia.
- Gosain, R., Pollock, Y.Y., Jain, D., 2016, Age related disparity: Breast cancer in the elderly, *Curr Oncol Rep*, 18 (11), 69.

- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A., Inagaki, M., 2002, Aurora B phosphorylates Histone H3 at serine 28 with regard to the mitotic chromosome condensation, *Genes Cells*, 7:11-17.
- Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A., 2000, Cancer statistics, 2000, *CA Cancer J Clin*, 50, 7-33.
- Gu, J., Gong, Y., Huang, M., Lu, C., Spitz, M.R., Wu, X., 2007, Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians, *Carcinogenesis*, 28 (2), 350-355.
- Gusterson, B.A., Ross, D.T., Heath, V.J., Stein, T., 2005, Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer, *Breast Cancer Res*, 7 (4), 143-148.
- Gutierrez, C., Schiff, R., 2011, HER2: biology, detection, and clinical implications, *Arch Pathol Lab Med*, 135, 55-62.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (1), 57-70.
- Hanahan, D., 2011, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*, 144 (5), 646-674.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., Oegema, K., 2001, Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in caenorhabditis elegans, *J Cell Biol*, 155, 1109-1116.
- Hans, F., Skoufias, D.A., Dimitrov, S., Margolis, R.L., 2009, Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B, *Mol Biol Cell*, 20 (15), 3491-3502.
- Hassiotou, F., Geddes, D., 2013, Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge, *Clin Anat*, 26, 29-48.
- Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C.L., Peters, J.M., 2003, The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint, *J Biol Chem*, 278, 281-294.
- Hu, H.M., Chuang, C.K., Lee, M.J., Tseng, T.C., Tang, T.K., 2000, Genomic organization, expression, and chromosome localization of a third aurora-related kinase gene, Aie1. *DNA Cell Biol*, 19 (11), 679-688.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., ve diğer., 2006, The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*, 7, 96.
- Johnson, M.D., 2012, Reproductive Systems, *Human Biology Concepts and Current Issues*, In: Johnson, M.D. (ed.), Pearson, USA, 376-403.
- Johnston, S.R., Dowsett, M., 2003, Aromatase inhibitors for breast cancer: Lessons from the laboratory, *Nat Rev Cancer*, 3, 821-831.

- Katayama, H., Ota, T., Jisaki, F., Ueda, Y., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F., Terada, Y., Tatsuka, M., 1999, Mitotic kinase expression and colorectal cancer progression, *J Natl Cancer Inst*, 91, 1160-1162.
- Katayama, H., Sen, S., 2010, Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules, *Biochim Biophys Acta*, 1799, 829-839.
- Kemp, C.A., Kopish, K.R., Zipperlen, P., Ahringer, J., O'Connell, K.F., 2004, Centrosome maturation and duplication in *C. elegans* require the coiled-coil protein SPD-2, *Dev Cell*, 6, 511-523.
- Kesse-Adu, R., Shousha, S., 2004, Myoepithelial markers are expressed in at least 29 % of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma, *Mod Pathol*, 17 (6), 646-652.
- Kim, K.W., Mutter, R.W., Willey, C.D., Subhawong, T.K., Shinohara, E.T., Albert, J.M., Ling, G., Cao, C., Gi, Y.J., Lu, B., 2007, Inhibition of survivin and aurora B kinase sensitizes mesothelioma cells by enhancing mitotic arrests, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 67, 1519-1525.
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., Okano, Y., 1999, Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human Aurora/ Ipl1-related protein kinase, AIK3, *J Biochem*, 274, 7334-7340.
- Kinalis, S., Nielsen, F.C., Talman, M.L., Ejlersen, B., Rossing, M., 2018, Characterization of basal-like subtype in a Danish consecutive primary breast cancer cohort, *Acta Oncol*, 57 (1), 51-57.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., 2006, *Concepts of Genetics*, Pearson, UK, 0-13191883-8.
- Knowlton, A.L., Lan, W., Stukenberg, P., 2006, Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulated MCAK, *Curr Biol*, 16, 1705-1710.
- Kollareddy, M., Dzubak, P., Zheleva, D., Hajdich, M., 2008, Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 152 (1), 27-33.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., 2015, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Lapenna, S., Giordano, A., 2009; Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 547-566.
- Le Du, F., Ueno, N.T., 2015, Targeted therapies in triple-negative breast cancer: failure and future, *Womens Health*, 11 (1),1-5.
- Lee, H.A., Kwon, M., Kim, H.A., Kim, K.S., 2019, Antitumor profiles and cardiac electrophysiological effects of aurora kinase inhibitor ZM447439. *Korean J Physiol Pharmacol*, 23 (5), 393-402.

- Li, D., Zhu, J., Firozi, P.F., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Cleary, K., Friess, H., Sen, S., 2003; Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer, *Clin Cancer Res*, 9, 991-997.
- Li, X., Sakashita, G., Matsuzaki, H., Sugimoto, K., Kimura, K., Hanaoka, F., Taniguchi, H., Furukawa, K., Urano, T., 2004, Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C, *J Biol Chem*, 279, 47201-47211.
- Lippman, M.E., 1983, Efforts to combine endocrine and chemotherapy in the management of breast cancer: Do two and two equals three? *Breast Cancer res Treat*, 3,117-127.
- Long, Z.J., Xu, J., Yan, M., Zhang, J.G., Guan, Z., Xu, D.Z., Wang, X.R., Yao, J., Zheng, F.M., Chu, G.L., Cao, J.X., Zeng, Y.X., Liu, Q., 2008, ZM 447439 inhibition of aurora kinase induces Hep2 cancer cell apoptosis in threedimensional culture, *Cell Cycle*, 7 (10), 1473-1479.
- Lukong, K.E., 2017, Understanding breast cancer - The long and winding road, *BBA Clinical*, 7, 64-77.
- Luo, J, Solimini, N.L., Elledge, S.J., 2009, Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction, *Cell*, 136 (5), 823-837.
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., Saya, H., 2003, Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells, *J Biol Chem*, 278, 51786-51795.
- McCray, D.K., Simpson, A.B., Flyckt, R., Liu, Y., O'Rourke, C., Crowe, J.P., Grobmyer, S.R., Moore, H.C., Valente, S.A., 2016, Fertility in women of reproductive age after breast cancer treatment: Practice patterns and outcomes, *Ann Surg Oncol*, 23 (10), 3175-3181.
- Melzer, C., Hass, R., von der Ohe, J., Lehnert, H., Ungefroren, H., 2017, The role of TGF- β and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma, *Cell Commun Signal*, 15 (1),19.
- Mersin, H., Yildirim, E., Berberoglu, U., Gulben, K., 2008, The prognostic importance of triple negative breast carcinoma, *Breast*, 17, 341-346.
- Moasser, M.M., 2007; The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis, *Oncogene*, 26: 6469-6487.
- Musgrove, E.A., Sutherland, R.L., 2009, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer, *Nat Rev Cancer*, 9, 631-643.
- Niederhuber, J.E., Armitage, J.O., Doroshow, J.H., Kastan, M.B., Tepper, J.E., 2020, *Abeloff's Clinical Oncology*, Elsevier, Philadelphia.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., ve diğer. 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406, 747-752.

- Portier, N., Audhya, A., Maddox, P.S., Green, R.A., Dammermann, A., Desai, A., Oegema, K., 2007, A microtubule-independent role for centrosomes and Aurora A in nuclear envelope breakdown, *Dev Cell*, 12, 515-529.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., Muñoz, M., 2015, Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer, *Breast*, 24 (2), 26-35.
- Putti, T.C., El-Rehim, D.M.A., Rakha, E.A., Paish, C.E., Lee, A.H.S., Pinder, S.E., Ellis, I.O., 2005, Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis, *Mod Pathol*, 18 (1), 26-35.
- Qi, G., Ogawa, I., Kudo, Y., Miyauchi, M., Siriwardena, B.S.M.S., Shimamoto, F., Tatsuka, M., Takata, T., 2007, Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer, *Virchows Arch*, 450 (3), 297-302.
- Qi, G., Ogawa, I., Kudo, Y., Miyauchi, M., Siriwardena, B.S.M.S., Shimamoto, F., Tatsuka, M., Takata, T., 2007, Aurora-B overexpression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer, *Springer*, 450, 297-302.
- Reichardt, W., Jung, V., Brunner, C., Klein, A., Wemmert, S., Romeike, B.F.M., Zang, K.D., Urbschat, S., 2003, The putative serine/threonine kinase gene STK15 on chromosome 20q13.2 is amplified in human gliomas, *Oncol Rep*, 10, 1275-1279.
- Romain, C., Paul, P., Kim, K.W., Lee, S., Qiao, J., Chung, D.H., 2014, Targeting Aurora kinase-A downregulates cell proliferation and angiogenesis in neuroblastoma, *J Pediatr Surg*, 49 (1), 159-165.
- Romanelli, A., Clark, A., Assayag, F., Chateau-Joubert, S., Poupon, M.F., Servely, J.L., Fontaine, J.J., Liu, X., Spooner, E., Samantha Goodstal, S., de Cremoux, P., Bieche, I., Decaudin, D., Marangoni, E., 2012, Inhibiting aurora kinases reduces tumor growth and suppresses tumor recurrence after chemotherapy in patient-derived triple-negative breast cancer xenografts, *Mol Cancer Ther*, 11 (12), 2693-2703.
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J.S., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., 2005, Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy, *Clin Cancer Res*, 11 (16), 5678-5685.
- Ruddon, R.W., 2007, *Cancer Biology*, Oxford University Press, Oxford.
- Sen, S., Zhou, H., White, R.A., 1997, A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines, *Oncogene*, 14 (18), 2195-2200.
- Seo, H.J., Noh, D.Y., 2017, Care pathway for cancer survivorship in Korea: Trend of breast cancer pathway from 2003 to 2010, *Healthcare Informatics Research*, 23 (2), 119-125.

- Shawarby, M.A., Al-Tamimi, D.M., Ahmed, A., 2013, Molecular classification of breast cancer: An overview with emphasis on ethnic variations and future perspectives, *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*, 1, 14-19.
- Smith, S.L., Bowers, N.L., Betticher, D.C., Gautschi, O., Ratschiller, D., Hoban, P.R., Booton, R., Santibáñez-Koref, M.F., Heighway, J., 2005, Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability, *Br J Cancer*, 93:719-729.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., 2001, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10869-10874.
- Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J.S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C.M., Lønning P.E., Brown P.O., Børresen-Dale A.L., Botstein D., 2003, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (14), 8418-8123.
- Sorrentino, R., Libertini, S., Pallante, P.L., Troncone, G., Palombini, L., Bavetsias, V., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Linardopoulos, S., Chieffi, P., Fusco, A., Portell, G., 2005, Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation, *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 928-935.
- Tannock, I.F., Hill, R.P., Bristow, R.G., Harrington, L., 1992, *The basic science of Oncology*, Mc Graw-Hill, New York.
- Tchatchou, S., Wirtenberger, M., Hemminki, K., Sutter, C., Meindl, A., Wappenschmidt, B., Kiechle, M., Bugert, P., Schmutzler, R.K., Bartram, C.R., Burwinkel, B., 2007, Aurora kinases A and B and familial breast cancer risk, *Cancer Lett*, 247, 266-272.
- Topcul, M., Cetin, I., 2014, Endpoint of cancer treatment: Targeted therapies, *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (11), 4395-4403.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Kataoka, A., Kinoshita, J., Hachitanda, Y., 2003, Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer, *Am J Surg*, 185, 165-167.
- Uscanga-Perales G.I., Santuario-Facio S.K., Ortiz-López R, 2016, Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity, *Medicina Universitaria*, 18, 105-114.
- Vinod, B.S., Nair, H.H., Vijayakurup, V., Shabna, A., Shah, S., Krishna, A., Pillai, K.S., Thankachan, S., Anto, R.J., 2015, Resveratrol chemosensitizes HER-2-overexpressing breast cancer cells to docetaxel chemoresistance by inhibiting docetaxel-mediated activation of HER-2-Akt axis, *Cell Death Discov*, 1, 15061.

- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., Lees, E., 2000, The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation, *Oncogene*, 19, 4906-4916.
- Warner, S.L., Munoz, R.M., Stafford, P., Koller, E., Hurley, L.H., Hoff, D.D.V., Han, H., 2006, Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells, *Mol Cancer Ther*, 5, 2450-2458.
- Wesolowski, R., Ramaswamy, B., 2011, Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management, *Gene Expr*, 15, 105-115.
- Willems, E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat, P.N., Rogister, B., 2018, The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review, *Cell Div*, 13, 7.
- Willmann, L., Erbes, T., Halbach, S., Brummer, T., Jäger, M., Hirschfeld, M., Fehm, T., Neubauer, H., Stickeler, E., Kammerer, B., 2015, Exometabolom analysis of breast cancer cell lines: Metabolic signature, *Nature*, 5, 13374.
- Yan, M., Wang, C., He, B., Yang, M., Tong, M., Long, Z., Liu, B., Peng, F., Xu, L., Zhang, Y., Liang, D., Lei, H., Subrata, S., Kelley, K.W., Lam, E.W.F., Jin, B., Liu, Q., 2016, Aurora-A kinase: A potent oncogene and target for cancer therapy, *Med Res Rev*, 36 (6), 1036-1079.
- Yang, H., He, L., Kruk, P., Nicosia, S.V., Cheng, J.Q., 2006, Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells, *Int J Cancer*, 119 (10), 2304-2312.
- Yang, J., Ikezoe, T., Nishioka, C., Tasaka, T., Taniguchi, A., Kuwayama, Y., Komatsu, N., Bandobashi, K., Togitani, K., Koeffler, H.P., Taguchi, H., Yokoyama, A., 2007, AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells *in vitro* and *in vivo*, *Blood*, 110 (6), 2034-2040.
- Yersal, O., Barutca, S., 2014, Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications, *World J Clin Oncol*, 5 (3), 412-424.
- Yılmaz, M.S., Atak, N., 2014, Meme kanseri riskinin beslenme ile ilişkili faktörler açısından Değerlendirilmesi, *Turk J Public Health*, 12 (1), 51-60.
- Zhang, L., Long, X., 2015, Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies, *Scientific Reports*, 5, 17869.
- Zhao, H., Owen, S., Davies, E.L., Jiang, W.G., Tracey, A., Martin, T.A., 2017, The effect of aurora kinase inhibitor on adhesion and migration in human breast cancer cells and clinical implications, *World J Oncol*, 8 (5), 151-161.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., Sen, S., 1998, Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation, *Nat Genet*, 20, 189-193.

Zhu, X.P., Liu, Z.L., Peng, A.F., Zhou, Y.F., Long, X.H., Luo, Q.F., Huang, S.H., Shu, Y., 2014, Inhibition of Aurora-B suppresses osteosarcoma cell migration and invasion, *Exp Ther Med*, 7 (3), 560-564. |



ÖZGEÇMİŞ

İşisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gulandam DADAŞOVA
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer: Azerbaycan
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bakü Mühendislik Üniversitesi
Fakülte	Kimya Biyoloji Öğretmenliği
Bölümü	Kimya Biyoloji Öğretmenliği
Mezuniyet Yılı	21.06.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Genel Biyoloji

Akademi ve Bildiriler	