

T.C
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AURORA B KİNAZ İNHİBİSYONUNUN PAKLİTAKSEL SİTOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze EROL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU

BİNGÖL-2024

**AURORA B KİNAZ İNHİBİSYONUNUN PAKLİTAKSEL SİTOTOKSİSİTESİ
ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU danışmanlığında, Gamze EROL tarafından hazırlanan bu çalışma 19/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Abdullah ASLAN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini paylaşan, araştırmalarımın her aşamasında beni yönlendiren ve destekleyen değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU hocama çok teşekkür ederim. Araştırmalarımda verdiğiniz öneriler, teşvikiniz ve özveriniz ile zorlu süreçlerde motive olarak başarıya ulaşabildim. Kıymetli zamanınızı bana ayırıp, her sorun yaşadığımda çekinmeden danışabildiğim, samimiyetini ve güler yüzünü esirgemeyen hocama en içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

Laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN'a; deneylerde elde ettiğim sonuçları daha iyi yorumlamama yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Yusuf TOY, Ronahi AŞKAN, Öğr. Gör. Aydın SEVER ve Biritan AVCI'ya teşekkür ederim.

Son olarak, bana her zaman güvenen, fedakarlık yapan, sonsuz sevgi ve destek veren canım eşim Vural EROL'a ve biricik kızım İPEK'e sonsuz teşekkürler.

Gamze EROL

Bingöl 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Kanserin Tanımı	1
1.2. Konvansiyonel ve Kişiselleştirilmiş Tedavi Yöntemleri	2
1.3. DNA Hasarı	3
1.3.1. DNA Onarım Mekanizmaları	4
1.3.1.1. Doğrudan Onarım Mekanizması	5
1.3.2.2. Doğrudan Olmayan Onarım Mekanizması.....	6
1.4. Apoptosis.....	9
1.5. Hücre Döngüsü	10
1.5.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	12
1.6. Aurora Kinazlar	13
1.6.1. Aurora Kinaz B	15
1.7. BI 831266.....	17
1.8. Paklitaksel	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Memeli hücre kültürü çalışmaları.....	24
3.2.2. Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizleri	24

3.2.3. Kombinasyon İndeksinin (KI) Hesaplanması.....	25
3.2.4. 2D Koloni sağ-kalım analizi (anchorage-dependent colony survival assay) ..	25
3.2.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizleri.....	26
3.2.6. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Paklitaksel ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizleri ve Sinerjizmin Belirlenmesi.....	28
4.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde BI 831266 Molekülü ile Paklitaksel Molekülünün IC25 ve IC50 Sitotoksik Doz Değerlerinin Koloni Sağ-Kalım Analiziyle Belirlenmesi.....	30
4.3. BI 831266 Molekülünün ve Paklitaksel Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde Koloni Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi	32
4.4. BI 831266 ve Paklitaksel Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik ve Hücre Döngüsü Protein Ekspresyonları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi (SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri)	34
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AU	: Arbitrary Unit
AURK-A	: Aurora Kinaz A proteini (Aurora kinase A protein)
AURK-B	: Aurora Kinaz B proteini (Aurora kinase B protein)
AURK-C	: Aurora Kinaz C proteini (Aurora kinase C protein)
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
°C	: Santigrad derece
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
ml	: Mililitre
nM	: Nanomolar
µg	: Mikrogram
CO ₂	: Karbondioksit
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
kDa	: Kilo Dalton
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (Michigan Cancer Foundation-7)
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
TEMED	: N,N,N,N-tetrametietilendiamin
HCL	: Hidroklorik asit
KCL	: Potasyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
P53	: Tümör Baskılayıcı Protein 53
cPARP	: Cleaved Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florür
DTT	: Dithiothreitol
Tris	: Trihidroksimetil Aminometan
NP-40	: Nonidet P40

EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGTA	: Etilenglisoltetraasetik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PVDF	: Poliviniliden Diflorid
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Kanserin ayırt edici özellikleri.....	2
Şekil 1.2.	DNA hasarına karşı tepki reaksiyonları.....	4
Şekil 1.3.	DNA onarım mekanizmaları.....	5
Şekil 1.4.	Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) onarım sistemi	8
Şekil 1.5.	Dışsal ve içsel apoptotik sinyal yolları	9
Şekil 1.6.	Hücre döngüsünün mitotik evresi.....	11
Şekil 1.7.	Siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilen hücre döngüsünün ilerlemesi.....	13
Şekil 1.8.	Aurora kinaz proteinlerinin şematik olarak lokalizasyonu	14
Şekil 1.9.	Aurora A ve Aurora B lokalizasyonu	15
Şekil 1.10.	Aurora kinaz B'nin hücre döngüsündeki rolü.....	17
Şekil 1.11.	BI 831266 molekülünün moleküler yapısı.....	18
Şekil 1.12.	Paklitakselin moleküler yapısı.....	18
Şekil 4.1.	BI 831266 molekülü ile 24 saat ve paklitakselle 1 saat tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin kristal viyole canlılık analizleri.....	29
Şekil 4.2.	Paklitaksel ve BI 831266 kombinasyon tedavisinin kristal viyole hücre canlılık analizleri.....	30
Şekil 4.3.	BI 831266 molekülü ile 24 saat tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri.....	31
Şekil 4.4.	Paklitaksel ile 1 saat tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri.....	32
Şekil 4.5.	Kombinasyon dozlarının uygulanma saatleri.....	33
Şekil 4.6.	BI 831266 molekülü ve paklitaksel kombinasyon tedavisinin MCF-7 hücrelerine olan etkisinin koloni sağ-kalım grafikleri.....	33
Şekil 4.7.	BI 831266 molekülü ve paklitaksel kombinasyon tedavisinin MCF-7 hücrelerine olan etkisinin koloni sağ-kalım grafikleri.....	34

Şekil 4.8.	BI 831266 molekülü, paklitaksel ve BI 831266+paklitaksel kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki p53 proteininin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	35
Şekil 4.9.	BI 831266 molekülü, paklitaksel ve BI 831266+paklitaksel kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki p21 proteininin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	36
Şekil 4.10.	BI 831266 molekülü, paklitaksel ve BI 831266+paklitaksel kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki cPARP proteininin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	37
Şekil 4.11.	BI 831266 molekülü, paklitaksel ve BI 831266+paklitaksel kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki Bcl-2 proteininin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	38

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar.....	22
--	----



AURORA B KINAZ İNHİBİSYONUNUN PAKLİTAKSEL SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Kanser, hücrelerin büyüme, bölünme, farklılaşmasında, gelişmesinde ve programlı ölümünde rol oynayan proteinlerin işlevini kaybetmesi sonucunda, hücrelerin kontrolünü kaybederek sürekli olarak çoğalmasındır. Kanserın klinik tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar ciddi yan etkiler oluşturarak hayat kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca kemoterapi yöntemiyle istenilen terapötik etki elde edilemeyebilmektedir. Kemoterapötik ajanlara karşı gelişen ilaç direnci ve hastalar üzerinde oluşan ciddi yan etkiler sebebiyle kişiselleştirilmiş tedaviler oldukça önem arz etmektedir. Küçük molekül inhibitörlerle kemoterapötik ilaçların kombine tedavileri sinerjistik etki yaratarak, yan etkilerin azaltılmasını veya ortadan kaldırılmasını ve kazanılmış ilaç direncine karşı etkili olmasını sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada, Aurora B kinaz inhibisyonunun paklitaksel sitotoksitesisi üzerine olan etkisi araştırıldı. Aurora B inhibisyonu için BI 831266 molekülü kullanıldı. BI 831266 ve paklitaksel molekülünün mono ve kombine tedavi sitotoksik etkileri MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde incelendi. MCF-7 hücreleri artan dozlarda BI 831266 ve paklitaksel molekülü ile tedavi edilerek sitotoksik etkileri koloni sağ-kalım analiziyle belirlendi. BI 831266 ve paklitaksel molekülünün kombinasyon tedavisi, koloni sağ-kalım analizi ile kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini inhibe ettiği gösterildi. BI 831266 ve paklitaksel molekülünün mono ve kombinasyon tedavileri MCF-7 hücrelerinde apoptotik sinyal yollarındaki ve hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyon düzeylerine Western blot yöntemiyle bakıldı.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, BI 831266 ve paklitaksel molekülünün kombinasyon tedavilerinin hücre canlılığını azaltıp koloni sağ-kalımlarını inhibe ettiği, apoptosisle alakalı proteinlerin ekspresyon seviyelerini regüle ederek apoptosise ve DNA hasarına neden olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: BI 831266 molekülü, Paklitaksel, Aurora kinazlar, Aurora Kinaz B, MCF-7, Hücre döngüsü.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF AURORA B KINASE INHIBITION ON PACLITAXEL CYTOTOXICITY

ABSTRACT

Cancer is the continuous proliferation of cells as a result of the loss of function of proteins that play a role in the growth, division, differentiation, development and programmed death of cells. Chemotherapeutic drugs used in the clinical treatment of cancer cause serious side effects and reduce quality of life. In addition, the desired therapeutic effect may not be achieved with chemotherapy. Personalized treatments are very important due to drug resistance to chemotherapeutic agents and serious side effects on patients. The combination of small molecule inhibitors and chemotherapeutic drugs can have a synergistic effect, reducing or eliminating side effects and being effective against acquired drug resistance.

In this study, we investigated the effect of Aurora B kinase inhibition on paclitaxel cytotoxicity. BI 831266 molecule was used for Aurora B inhibition. The cytotoxic effects of mono- and combined treatment of BI 831266 and paclitaxel molecule were examined in MCF-7 human breast cancer cells. MCF-7 cells were treated with increasing doses of BI 831266 and paclitaxel molecule and their cytotoxic effects were determined by colony survival analysis. The combination treatment of BI 831266 and paclitaxel molecule was shown to inhibit the colony forming capacity of cancer cells by colony survival analysis. The expression levels of apoptotic signaling pathways and cell cycle proteins in MCF-7 cells treated with mono and combination treatments of BI 831266 and paclitaxel molecule were examined by Western blot method.

The findings obtained in this study indicate that combination treatments of BI 831266 and paclitaxel molecule decreased cell viability, inhibited colony survival and caused apoptosis and DNA damage by upregulating the expression levels of apoptosis-related proteins.

Keywords: BI 831266 molecule, Paclitaxel, Aurora kinases, Aurora Kinase B, MCF-7, Cell Cycle.

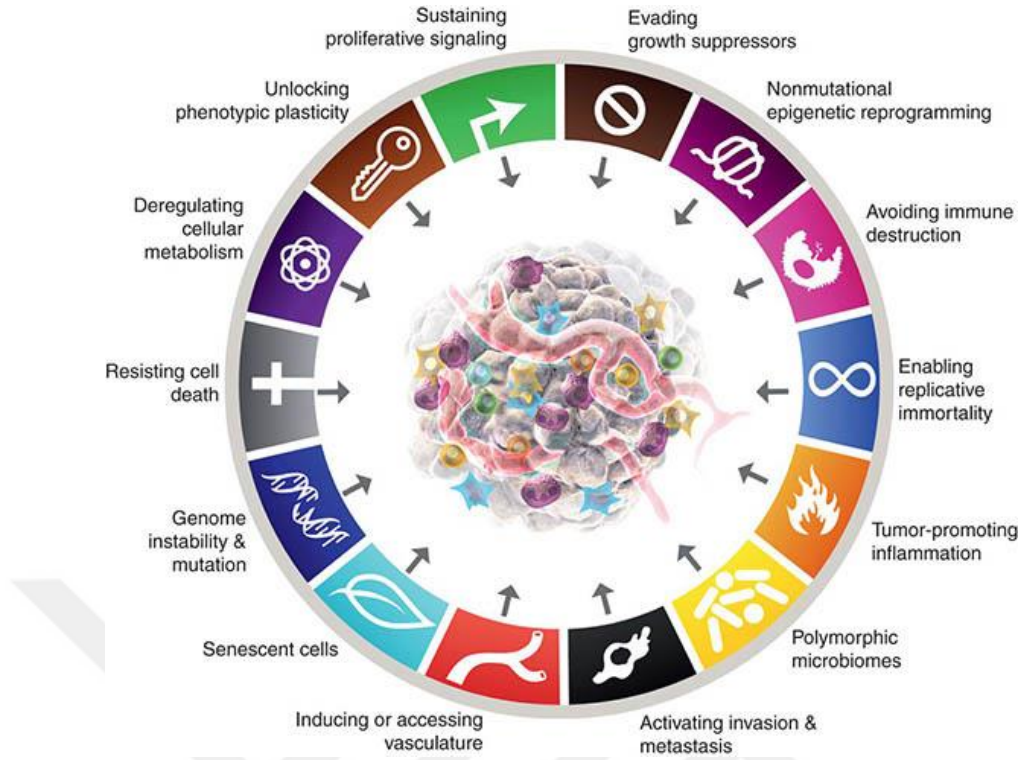
1.GİRİŞ

1.1. Kanserin Tanımı

Kanser, hücrelerin büyüme, bölünme, farklılaşmasında, gelişmesinde ve programlı ölümünde rol oynayan proteinlerin işlevini kaybetmesi sonucunda, hücrelerin kontrolünü kaybederek sürekli olarak çoğalmasındır (Hanahan and Weinberg, 2000). Sağlıklı dokular, hücrelerin büyümeleri, hücre döngüsüne girişi ve bu döngü boyunca normal ilerlemeyi teşvik eden sinyallerin üretilmesini ve salınmasını dikkatli şekilde kontrol ederler. Bu sayede hücre sayısında bir homeostazi sağlanmış olur ve böylelikle hücrelerin normal doku yapısı ve işlevi korunmuş olur (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Sürekli olarak endojen ve eksojen kaynaklı genotoksik saldırılara maruz kalan DNA, sahip olduğu kompleks DNA hasar yanıt (DDR: DNA damage response) sinyal sistemi sayesinde bütünlüğünü koruyabilmekte ve genetik bilgiyi bozulmadan ve değişmeden gelecek nesillere aktarabilmektedir. Bunu başarabilmek için DNA hasarı anında tespit edilmeli ve gerekli hücre içi sinyal yolları vasıtasıyla onarım yapılmalıdır. Hücrelerimizin sahip olduğu bu sistemler kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkları önlediği için önem teşkil etmektedir (Jackson ve Bartek, 2009). DNA'da sürekli ortaya çıkan çift sarmal kırıkları yüksek oranda sitotoksik etki yaratabilmektedir. Hücrede mutasyonun artmasına, genetik bilgi kaybına, kromozom anormalliklerine, erken yaşlanmaya, immün yetmezliğe, kanser ve ölüme neden olmaktadır (Peraza-Vega vd., 2022).

Dünya genelinde 2020 yılında tahminen 19,3 milyon teşhis edilmiş kanser vakası (18,1 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) ve neredeyse 10 milyon kanserden kaynaklı ölüm (9,9 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) gerçekleşmiştir. Meme kanseri, vaka oranlarına bakıldığında dünyada en çok teşhis edilen kanser türüdür ve kadınlarda da en sık görülen kanser çeşitidir (Sung vd., 2021). Meme kanseri olan vakaların yaşa ve çevresel faktörlere bağlı olarak %85-90 oranında, genetik olarak ise özellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonların sonucunda %10-15 oranında kaynaklandığı tespit edilmiştir (Peleg Hasson vd., 2020).



Şekil 1.1. Kanserın Ayırt Edici Özellikleri (Hanahan, 2022)

Hücreler sağlıklı formlarından neoplastik büyüme durumuna geçerken birçok farklı özellik kazanmaktadırlar. Bu özelliklerden bazıları; bağışıklık yanıtından kaçınma, genomik kararsızlık, hücre ölümüne direnç, tümör baskılayıcılardan kaçınma, sürekli proliferasyon olarak sıralanabilir. Son yıllarda kanserin ayırt edici özelliklerine ek olarak 4 farklı özellik dahil edilmiştir. Bunlar; fenotipik plastisite, polimorfik mikrobiyom, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlanma ve yaşlanmış hücrelerdir (Hanahan, 2022).

1.2. Konvansiyonel ve Kişiselleştirilmiş Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinin günümüzdeki başlıca biçimleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Cerrahi operasyon ve radyoterapi ile tümörlü dokunun lokal temizliği sağlanmakta, klinikte yaygın bir şekilde kullanılmakta olan anti-kanser ajanlarla da geride kalması muhtemel kanser hücrelerinin eliminasyonu sağlanmaktadır. Ayrıca son yıllarda kişiselleştirilmiş kanser tedavisi ve immünoterapideki başarılı çalışmalar da kanser tedavisi için yeni seçenekler sunmaktadır (Jia vd., 2023). Tıp ve teknolojiye ilerlemelerle beraber yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen kanser hayat boyu devam eden bir tehdit olarak düşünülmektedir (Sajjadi vd., 2016).

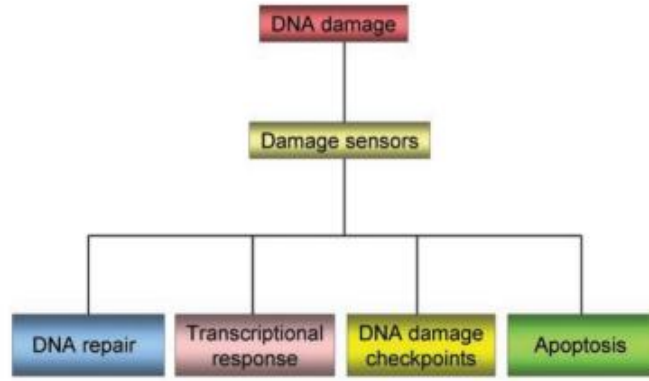
Kemoterapötik ajanlar DNA'nın bütünlüğüne zarar verme, mikrotübüllerle etkileşime girme, DNA replikasyonunu ve kontrolsüzce olan hücre bölünmesini önleyerek etkilerini göstermektedirler. Geleneksel olarak kullanılan kemoterapötik ajanların tümör boyutunu küçülttüğü, ölüm oranını azalttığı ve hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı bilinmektedir. Öte yandan kemoterapötik ajanların tümör hücrelerinin dışında hızlı bölünen sağlıklı hücrelere de etki ettiği bilinmektedir. Bulantı, kusma, saç dökülmesi ve bağışıklık sisteminin baskılanması gibi yan etkiler görülebilmektedir (A Baudino, 2015).

Son yıllarda kişiselleştirilmiş kanser tedavileri kök hücre tedavisi, immünoterapi, kanser aşıları ve hormon tedavileri gibi güncel anti-kanser tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Geleneksel tedavilerin hastalar üzerindeki etkileri ve sonuçları farklı olduğu için hastaya özgü tedavi yönteminin geliştirilmesi gerekmektedir. Kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerindeki amaç kanser hücrelerinin proteomik, genomik ve epigenetik özelliklerinden faydalanarak en iyi tedavi yönteminin belirlenmesidir (Duffy ve Crown, 2008; Tsimberidou vd., 2020).

1.3. DNA Hasarı

Hücreler mutasyonların nesilden nesile geçişini engellemek amacıyla DDR olarak adlandırılan bir sisteme sahiptir. DDR, hücre döngüsü kontrol noktaları aracılığıyla DNA onarımını düzenlemektedir. DDR proteinlerini kodlayan genler kanser hücrelerinde sık sık mutasyon geçirerek birçok tümörlü hücrenin metastaz yapmasına ve DNA hasarı oluşturan tedavilere cevap verme yeteneklerinin farklılaşmasına neden olmaktadır. Sonuç itibarıyla genomik kararsızlık ortaya çıkmaktadır (Groelly vd., 2023).

İnsanlarda genetik materyalin bütünlüğü ekzojen ve endojen kaynaklı sürekli olarak tehdite maruz kalmaktadır. Ekzojen faktörler; iyonize radyasyon, ultraviyole ışığı, ağır metaller, sigara dumanı, hava kirliliği, kemoterapötik ilaçlar olarak sıralanabilmektedir. Endojen faktörler ise telomer kısalması, yanlış baz eşleşmesi, oksidatif stres ve baz kayıpları gibi sıralanabilir (Toy vd. 2022).



Şekil 1.2. DNA hasarına karşı tepki reaksiyonları (Sancar vd., 2004)

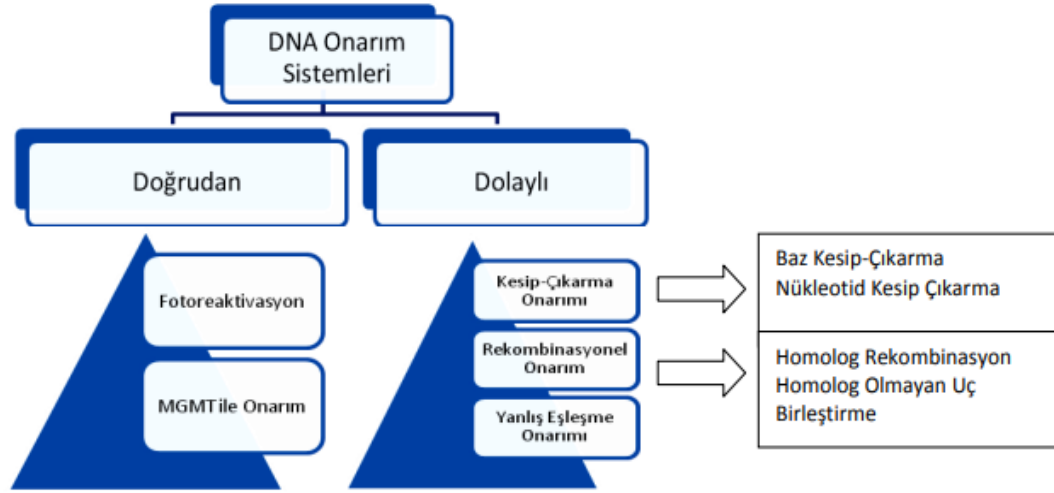
Meydana gelmiş olan endojen hasarlar DNA'nın yapısındaki bağların kararsızlığı sebebiyle normal koşullarda dahi sürekli ve kendiliğinden oluşmaktadır. Bu kusurların sonuçları genellikle lezyonun kimyasal olarak yapısına bağlıdır. Bu lezyonlar çoğunlukla DNA replikasyonunun doğru şekilde gerçekleşmesini engellemektedir. Endojen ve ekzojen faktörler mutasyonların birikmesine sebep olur. Bunun sonucunda biriken mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerin inhibe olmasına ve protoonkogen genleri aktive ederek hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalmasına sebep olmaktadır (Hoeijmakers, 2009; Morita vd., 2010).

Hücre içerisindeki ve çevreden kaynaklı faktörlere bağlı olarak meydana gelen DNA hasarı, hücrelerin normal görevlerini yerine getirme yeteneğini tehlikeye atarak genomik kararsızlığın ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Genomik kararsızlık, onkogenlerin aktivasyonu ve bazı tümör baskılayıcıların inaktivasyonu tümör oluşumuyla bağlantılıdır. Genomik kararsızlığın yıkıcı etkilerine bakıldığında, hücreler onkogenezi önlemek ve genom bütünlüğünü korumak amacıyla bir takım sistemler geliştirmişlerdir. İnsanlarda kansere yatkın olan hastaların birçoğunda DNA hasarı onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığını kanıtlayan çalışmalar günümüzde artmaktadır (Hoeijmakers, 2001; Tian vd., 2015).

1.3.1. DNA Onarım Mekanizmaları

DNA tamiri; helikazlar, polimerazlar, nükleazlar, rekombinazlar, topoizomerazlar, ligazlar, glikosilazlar, kinazlar, fosfatazlar ve demetilazlar olmak üzere kimyasal olarak

enzimatik aktivite aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu tamirde görev alan enzimlerin düzeni oldukça önemlidir. Aksi taktirde enzimlerin her biri tek başına DNA bütünlüğünü bozabilmektedir (Ciccia ve Elledge, 2010). DNA onarım sistemleri (Şekil 1.3) doğrudan ve dolaylı onarım mekanizmaları olmak üzere iki kısımda incelenmektedir.



Şekil 1.3. DNA onarım mekanizmaları (Sameer vd., 2014)

1.3.1.1. Doğrudan Onarım Mekanizması

DNA’da meydana gelmiş olan UV kaynaklı alkilasyon eklentileri ve pirimidin dimerleri iki adet mekanizma ile doğrudan onarılabilmektedir. Birinci mekanizma fotoreaktivasyon ile onarım, ikinci mekanizma MGMT (O6-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz) ile onarımdır. Bu onarım mekanizmalarında DNA’nın yeniden sentezi veya kesilmesi söz konusu değildir (Morita vd., 2010). Fotoreaktivasyon ile onarım fotoliyaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu onarım sistemi bakterilerde, bitkilerde, mantarlarda ve çoğu omurgalılarda bulunmaktadır fakat insan da dahil olmak üzere çoğu ökaryot hücreye sahip canlı türlerinde bulunmadığından dolayı evrensel bir onarım mekanizması değildir (Sancar vd., 2004).

MGMT proteinlerin ve diğer kofaktörlerin yardımı olmaksızın DNA’daki alkil eklentilerini kendisinde bulunan sistein amino asidine gönderir ve alkilasyonun mutasyona yol açabilecek etkilerini ortadan kaldırır. Alkil gruplarının çıkarılmasıyla hücre alkilleyici ajanlardan korunmuş olmaktadır (Hansen vd., 2007; Slupphaug vd., 2003).

1.3.2.2. Doğrudan Olmayan Onarım Mekanizması

DNA'da meydana gelen hasarların ardından karmaşık ve kompleks bir onarım mekanizması olan DDR, DNA'da oluşmuş kusurları belirleyebilmek için hasarlı bölgeye onarımda görev alan kinaz içerikli sinyal ağı gönderir. Hasarın durumuna göre birkaç farklı onarım yolu bulunmaktadır: Bunlar; Baz kesip-çıkarma onarımı (BER: base excision repair), nükleotit kesip-çıkarma onarımı (NER: nucleotide excision repair), çift zincir kırıkları onarımı ve yanlış eşleşme onarımı (MMR: mismatch repair) olmak üzere gruplandırılabilir (Tian vd., 2015).

Baz eksizyon onarımı (BER), DNA'nın genel yapısını önemli ölçüde bozmamaktadır. Alkile edilmiş, oksitlenmiş ve deamine edilmiş olan bazların tamirinden sorumlu olan bir onarım mekanizmasıdır (Krokan ve Bjørås, 2013). BER tamir mekanizmasında görevli enzimler; AP DNA liyaz, AP endonükleaz, DNA polimeraz, DNA glikozilaz ve DNA ligazdır. BER genellikle DNA glikozilaz enziminin aktivitesiyle başlatılmaktadır (Robertson vd., 2009; Wallace, 2014). BER'de kısa yamalı ve uzun yamalı olmak üzere iki ayrı onarım sistemi bulunmaktadır. Kısa yolakta tek bir nükleotit onarımı gerçekleşirken, uzun yolakta en az iki tane nükleotidin kesilip çıkarılması ve onarılması gerçekleştirilir (Robertson vd., 2009).

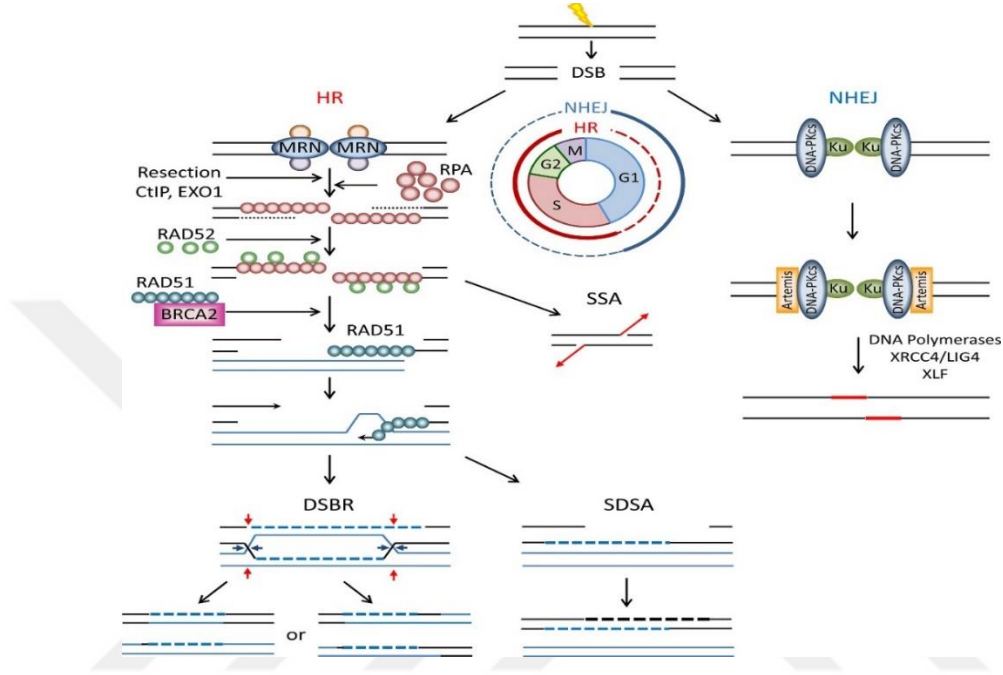
Nükleotit eksizyon onarımı (NER) prokaryot canlılardan ökaryot canlılara kadar korunmuş olan önemli bir DNA onarım sistemidir (Van Houten, 1990). NER onarım mekanizması ökaryot canlılarda prokaryotlardakine göre daha komplekstir. Ökaryotik canlılardaki mekanizma prokaryot canlılardakine oranla daha fazla protein içermektedir (Gillet ve Schärer, 2006). Nükleotit eksizyon onarım sistemi geniş substrat özgüllüğüne sahiptir. NER mekanizması, DNA'nın heliks yapısının bozulmasına yol açan ultraviyole ile indüklenmiş olan pirimidin dimerlerini, kemoterapötik ajanların ve mutajenik kimyasalların oluşturduğu DNA lezyonlarını onarmakla görevlidir (Hoeijmakers, 2009; Truglio vd., 2006). NER mekanizmasının iki alt yolu bulunmaktadır. Bunlardan ilki transkripsiyona bağlı onarım, diğeri ise global genomik onarımdır. Transkripsiyona bağlı onarımda aktif olarak transkribe edilebilen genlerin onarımı gerçekleşmektedir. Global genomik onarımda ise genomda meydana gelmiş hasarların tanınması ve ortamda uzaklaştırılması gerçekleştirilmektedir (Jeppesen vd., 2011).

DNA çift zincir kırıkları katastrofik lezyonlardır ve bu kırıkların onarılabilmesi için iki yol bulunmaktadır. Bu yollar homolog rekombinasyon (HR: homologous recombination) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesidir (NHEJ: non-homologous end-joining) (Jeppesen vd., 2011). Çift zincir kırıklarının büyük bir kısmı, DNA tarafından tamir edilememiş replikasyon çatalının çökmesiyle oluşmaktadır (Nowosielska, 2007).

HR sisteminde hasara uğramamış homolog DNA şablon olarak kullanılmaktadır, bu nedenle hata oluşturma ihtimali düşüktür (error-free) ancak sadece S fazından gerçekleşen DNA replikasyonundan sonra işlev görebilmektedir. NHEJ sisteminde ise homolog bölgeye ihtiyaç duyulmamaktadır, bu nedenle hücre döngüsünün tüm evrelerinde aktif bir şekilde onarım sağlayabilmektedir. Verimli bir tamir mekanizması olan NHEJ sistemi sonrasında genetik bilginin kaybı olabilmektedir (error-prone) (Cromie vd., 2001). HR mekanizmasının ilk aşamasında çift zincir kırığının tanınması gerekmektedir. MRE11, NBS1 ve RAD50 proteinlerinden meydana gelen heterotrimerik MRN DNA hasar sensör kompleksi çift zincir kırıklarını tanır ve mekanizmayı başlatır. MRN kompleksi (dolayısıyla MRE11 enzimi) hasarın olduğu bölgeye bağlanarak 5' uçtan 3' ucuna doğru (uç reseksiyonu) kesim işlemi başlatılır. EXO1 proteini DNA'nın stabilizasyonunu sağlamakta ve daha düzgün bir kesim yapılabilmesine yardımcı olmaktadır (Jekimovs vd., 2014). Reseksiyon neticesinde açıkta kalan 3' ucundaki tek zincir DNA'ya bağlanan RPA protein kompleksleri, BRCA1 proteini tarafından o bölgede kalmaktadır (Jekimovs vd., 2014; Slupphaug vd., 2003). BRCA2 proteini tarafından bağlanmış olan RAD51 rekombinaz enzimleri, RPA proteininin DNA'dan uzaklaştırılmasında görev almaktadır. RAD51 proteini bozulmamış kardeş kromatidi kalıp olarak kullanarak bilgilerin hatasız bir şekilde kopyalanmasını sağlamaktadır (Slupphaug vd., 2003).

Diğer çift zincir kırık onarım yolu olan NHEJ mekanizması hücre döngüsünün tüm evrelerinde etkinlik gösteren bir mekanizmadır fakat G1 evresinde en aktiftir (Hendrickson, 1997). NHEJ onarım mekanizmasıyla hasar görmemiş olan DNA kalıbına ihtiyaç duyulmamaktadır. Hata oranı HR'a göre daha yüksektir ve nükleotit kaybıyla DNA tamir edilmektedir (Jeppesen vd., 2011; Slupphaug vd., 2003). DNA' da hasar meydana geldiğinde ilk aşama olarak DNA uçlarını bağlayan Ku70 ve Ku80 heterodimer yapıdaki proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır. İkinci olarak; DNAPK proteini fosforile olarak artemis proteinini aktive eder (Cromie vd., 2001). NHEJ mekanizmasının son aşamasında ise

XRCC4 ve ligaz4 kompleksi ligasyon işlemi gerçekleştirir ve onarım sonlandırılır (Hnızda and Blundell, 2019). Çift zincir kırıklarının hatalı onarılması veya onarılmaması durumunda, hücre ölümlerine, genomik kararsızlığın artmasına ve kromozom değişikliklerine sebep olmaktadır (Shrivastav vd., 2008).



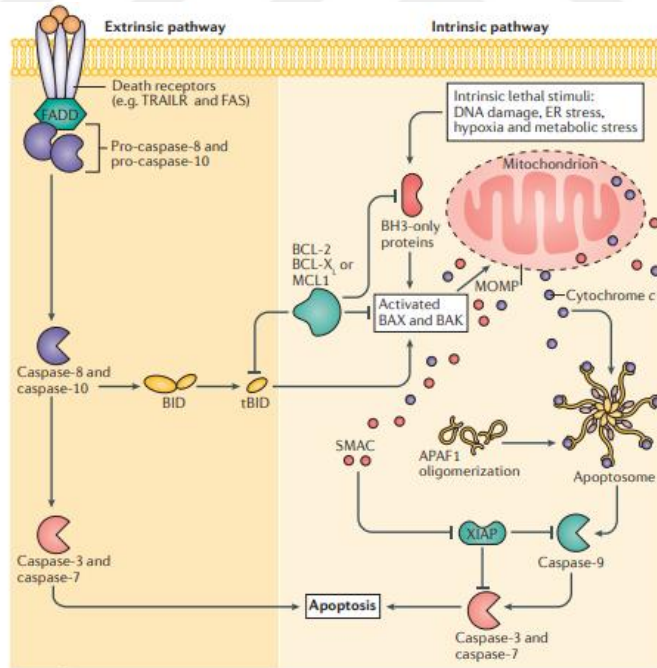
Şekil 1.4. Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) onarım sistemi (Iyama ve Wilson III, 2013)

DNA yanlış eşleşme onarımı (MMR), DNA replikasyonu esnasında DNA polimeraz enziminin sebep olduğu hatalardan kaynaklanmış olan eşlenmemiş ve uyumsuz olan bazıları tanıyarak düzeltmektedir (Schaaper, 1993). MMR, DNA'nın replikasyonu esnasında oluşan insersiyon-delesyon ve baz-baz uyumsuzluklarını onarmaktan sorumludur. MMR mekanizmasında eksiklik olan kanserli hücrelerde mutasyon oranları normal hücrelere kıyasla 100 ila 1000 kat daha fazla olmaktadır (Martin vd., 2010). MMR'de meydana gelmiş kusurlar; kalıtsal polipsiz kolorektal kanseri dahil belirli kanser türlerine yatkınlık, genomik istikrarsızlık, bazı kemoterapötik ajanlara karşı direnç ve memeli canlılarda mayoz bölünmede anormallik ve kısırlıkla ilişkilidir (G.-M. Li, 2008).

1.4. Apoptosis

Apoptosis, ökaryot hücrelerin kendilerini imha ettikleri bir programlı hücre ölüm mekanizmasıdır. Bir canlıda, düzenli olarak programlı hücre ölüm mekanizması ile olmaması gereken ve kusurlu (hasara uğramış) hücrelerin yok edilmesi sağlanır (Pucci vd., 2000). Hücreler, çift zincir kırıklarını veya diğer DNA kusurlarını algılayan, DNA onarım yollarını aktive eden ve hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayan sinyal ağlarında görev yapan proteinler geliştirmiştir. Bu sinyal ağlarında görev yapan proteinler DNA hasar kontrol noktası proteinleri olarak adlandırılmaktadır. Ancak hücreler çok fazla hasara maruz kaldıklarında, sinyal yolları genomik kararsızlığa sahip olan hücrelerin artışını önlemek için apoptosisi indükleyebilir (Su, 2006).

Apoptosis ile hücre ölümü iki farklı sinyal yolağı ile gerçekleşmektedir. Birincisi dışsal (ekstrinsik) yolak ikincisi ise içsel (intrinsik) yolaktır (Adams ve Cory, 1998).



Şekil 1.5. Dışsal ve içsel apoptotik sinyal yolları. (Ichim ve Tait, 2016)

Ekstrinsik yolakta; Fas (CD95/APO1), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ve TNFR1 gibi ölüm reseptörleri görev almaktadır. Bu reseptörlerin bağlanması proteaz

olarak görev yapan kaspazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Aktifleşen kaspazlar DNAaz enzimi ile birlikte DNA yıkımına neden olmaktadır (Taates vd., 2008).

Diğer apoptosis mekanizması olan içsel yolda mitokondri ve diğer hücre içi uyarılar görev yapmaktadır. Viral enfeksiyonlar, radyasyon, hipoksi ve DNA hasarı hücre içi uyarılardan bazılarıdır. Bu süreçte görev yapan ve apoptosisi düzenleyen, apoptosis üzerinde pozitif ve negatif yönde yönlendirme yapan protein ailesi Bcl2'dir. Bcl-2 anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerden oluşan bir proteindir. Pro-apoptotik proteinler; Bax, Bid, BclXs, Bak, Noxa, Bad ve Puma'dır. Anti-apoptotikler ise Mcl-1, Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleridir. Anti-apoptotik üyelerden olan Bcl-2 ve Bcl-xL, kaspazların öncü formuyla birlikte mitokondriyal sitokrom c salınımını engelleyerek apoptosisi inhibe etmektedirler (Adrain ve Martin, 2001; Ghatage vd., 2012). Anti-apoptotik üyelerin fazlalığı hücreleri apoptosise eğilimini azaltırken, pro-apoptotik üyelerin fazlalığı apoptosise eğilimi arttırmaktadır (Adams ve Cory, 2001).

Programlanmış hücre ölümü olan apoptosise karşı gösterilen direnç, tümör hücrelerinin özelliklerinden biridir. Apoptosis mekanizmasında meydana gelen hatalar sadece tümör gelişimini değil, kanser tedavilerine karşı direnç göstermenin de temelini oluşturmaktadır (Okada ve Mak, 2004).

1.5. Hücre Döngüsü

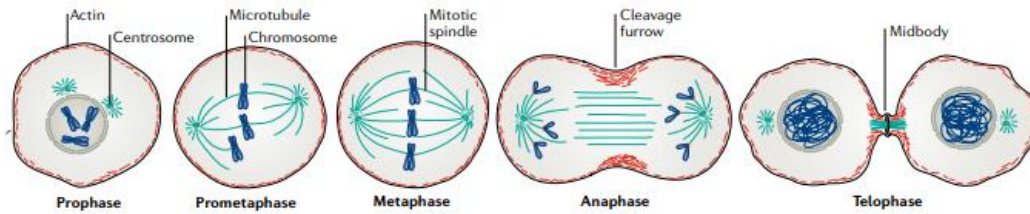
Hücre döngüsü, genetik bilginin bir hücreden diğerine kopyalanmasıyla sonuçlanan dolayısıyla DNA replikasyonu ve kromozomal segregasyon olaylarını kapsayan süreçtir. Olaylar sırasında DNA doğru bir şekilde replike olmalı ve özdeş kromozomal kopyalar iki kardeş hücreye başarılı bir şekilde dağıtılmalıdır (T. C. Cycle, 2000).

Hücre döngüsü; G1, S, G2 (İnterfaz) ve M (Mitoz) olmak üzere birbirini takip eden 2 safhadan oluşmaktadır. İnterfaz hücre döngüsünün %90'nını kapsar, mitoz ise %10'nunu kapsamaktadır (C. Cycle, 2008). Hücre döngüsünün büyük bir bölümünü kapsayan interfaz evresi hücredeki metabolik faaliyetlerin yoğun olarak gerçekleştiği, bölünme için hazırlık yapıldığı, büyüme ve gelişme evresidir (Luo vd., 1995). İnterfazın G1 evresinde RNA ve protein sentezi faaliyetleri fazladır. Bu evrede DNA replikasyonu gerçekleşmemektedir.

G1 evresi hücrenin büyümekte olduğu ve metabolizmasının hızlı çalıştığı bir evredir. S evresinde DNA replike olur ve miktarını iki katına çıkarmaktadır. G2 evresinde ise RNA ve protein sentezi devam etmektedir. Ayrıca mitoz bölünmeye hazırlık safhası olarak bilinen bu evrede, sentrozom eşlenmesi tamamlanarak organel miktarı artmaktadır (Mens and Ghanbari, 2018; Williams and Stoeber, 2012).

Hücreler gerekli mitojenik uyarıları alamadığında ve bölünme için yeterli büyüklüğe ulaşmadığı zaman G1 evresinden çıkıp G0 evresi denilen durgunluk fazına girerler. G0 evresine girmiş olan hücrelerin metabolik aktiviteleri devam etmektedir fakat bölünebilmek için sinyal iletilmediği takdirde G0 evresinden çıkamazlar (Zetterberg ve Larsson, 1985). Hücre dışından yeterli büyüme sinyalleri geldiğinde ve hücrenin bölünmesi gerektiğinde hücre G0 safhasından çıkarak G1 safhasına tekrardan girer ve döngüsünü devam ettirir (P. Sun vd., 2018).

Mitoz safhası birbirini takip eden karyokinez (çekirdek bölünmesi) ve sitokinez (sitoplazma bölünmesi) iki kısımdan meydana gelmektedir. Bu bölünmeler sonucunda birbiriyle özdeş iki hücre oluşmaktadır (Campbell vd., 2006). Mitoz bölünmenin evreleri sırası ile profaz, metafaz, anafaz ve telofazdır. Profaz evresinde başlangıçta karışık olan kardeş kromatitler kısalıp kalınlaşır ve kromozomu meydana getirerek daha belirgin bir hal alırlar. Ayrıca çekirdek zarı erir. (Gibcus vd., 2018). Metafaz evresinde kromozomlar hücrenin orta kısmında hizalanırlar. Anafaz evresinde kardeş kromatitler sentrozomlar aracılığıyla zıt kutuplara doğru çekilirler. Telofaz evresinde ise çekirdek zarı yeniden oluşur. Çekirdek bölünmesinin ardından meydana gelen sitoplazma bölünmesinde ise iki yavru hücre meydana gelmektedir (Carlton vd., 2020; Yu, 2006).



Şekil 1.6. Hücre döngüsünün mitotik evresi (Carlton vd., 2020)

1.5.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsünde kontrol noktaları büyüme faktörleri gibi uyaran sinyaller ile düzeni ve çoğalmayı sağlayan bir sistemdir. Genetik bilginin, nesiller boyunca geçişinin doğruluğunu düzenlemektedir. Hücrede hasar olması durumunda büyüme durdurularak hasarın onarılması sağlanır ve ardından hücre döngüsü devam eder. Hücrede oluşan hasar onarılamaz ise hücre apoptosis ile yok edilir (Pucci vd., 2000).

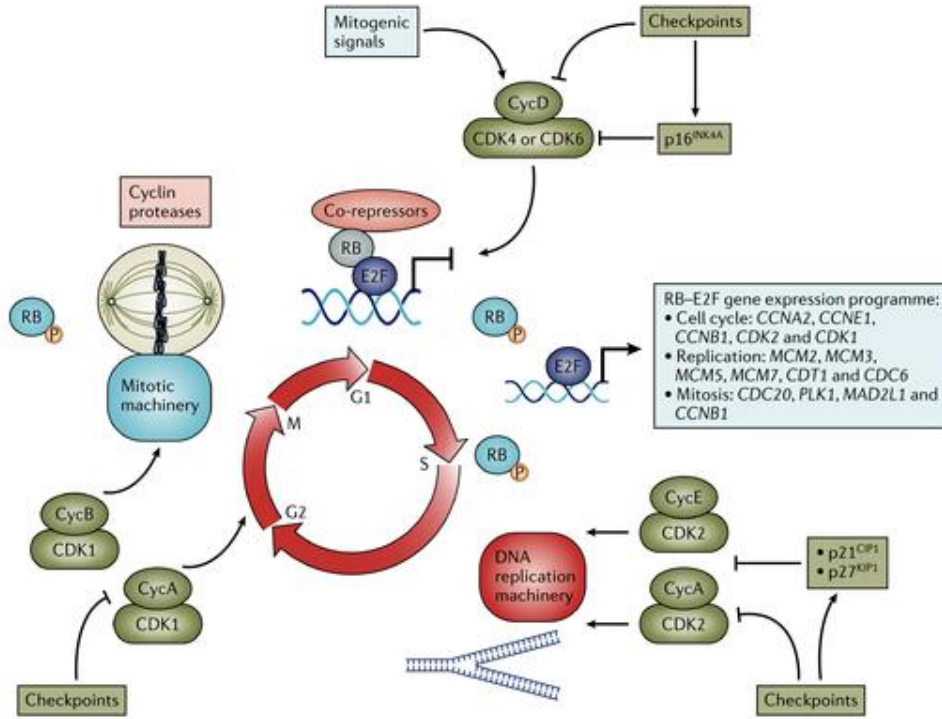
Hücre döngüsünün düzenlenebilmesi üç kontrol noktasına ihtiyaç vardır. Bunlar; G1/S, G2/M ve M kontrol noktalarıdır (Zhang vd., 2021). G1/S hücre döngüsü kontrol noktasında S fazında gerçekleşecek olan DNA replikasyonu için gerekli olan biyomoleküllerin sentezi ve DNA'da hasar oluşup oluşmadığı kontrol edilmektedir. G1/S kontrol noktasında sıkıntı olan hücrelerde, DNA hasarı görülebilmektedir (Benedict vd., 2018). G2/M kontrol noktasında, M fazına giriş düzenlenir. Hücrenin mitoz bölünmeye hatasız bir şekilde geçiş yapılıp yapılmayacağı kontrol edilir. M kontrol noktasında ise kromozomların iğ ipliklerine düzenli bir şekilde dizilmesi kontrol edilir. Genel olarak kontrol noktaları, hücredeki büyümenin veya bölünmenin önceki evresi hatasız olarak tamamlanana kadar hücre döngüsünün ilerlemesinin durdurulduğu noktalardır (Yasutis ve Kozminski, 2013).

Hücre döngüsünün kontrolünde siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK) önemli işlevleri olan proteinlerdir. Siklin bağımlı kinazların yoğunlukları genellikle sabittir fakat aktiviteleri her hücre döngüsü esnasında siklin seviyelerinin salınımı ile kontrol edilmektedir (Roskoski Jr, 2019).

Siklin bağımlı kinazlar, görev yapabilmek için ilgili oldukları siklinlerle kompleks oluşturabilen bir serin/treonin kinaz grubudur. Bazı CDK'ların hücre döngüsü kontrolünde doğrudan rolü vardır (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6). Bazı CDK'ların ise daha dolaylı rolleri bulunmaktadır (CDK7, CDK8, CDK9, CDK10, ve CDK11). CDK4 ve CDK6, siklin D ile bağlantı kurarak hücre döngüsünün G1 evresinden S evresine geçişini uyarmaktadır. Oluşan bu kompleks tümör baskılayıcı gen olan Retinoblastoma (RB)'yi fosforile etmektedir. RB fosforile edildikten sonra E2F transkripsiyon faktörleri serbest kalmaktadır. Böylelikle E2F'nin serbest hale gelmesi sonucunda siklin A, siklin E ve bazı genlerin transkripsiyonu başlamaktadır (DiPippo vd., 2016). CDK2 ve siklin E

kompleksleri G1 evresinden S evresine geçişte rol oynamaktadır. Daha sonrasında S fazında ilerlerken CDK2 siklin A ile birleşir. CDK1 ilk olarak siklin A ve daha sonrasında siklin B'ye bağlanarak S/G2 ve G2/M geçişlerinde görev alır (Malumbres ve Barbacid, 2005).

Hücre içerisindeki düzenleyici ve kontrol edici mekanizmalardan herhangi birinde meydana gelebilecek bir mutasyon, genetik hasar taşıyan hücrelerin çoğalmasına ve anormal kromozom sayısına sahip hücrelerin oluşmasına yol açarak genomik kararsızlığa sebep olabilir (Wenzel ve Singh, 2018).

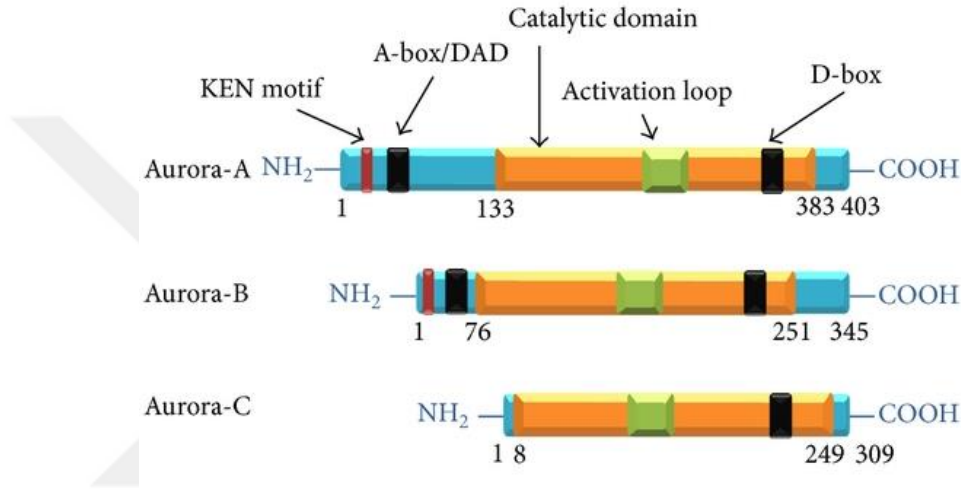


Şekil 1.7. Siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilen hücre döngüsünün ilerlemesi (DiPippo vd., 2016)

1.6. Aurora Kinazlar

Mitoz bölünme esnasında DNA replike olduktan sonra iki katına çıkmış olan kardeş kromatitler yeni hücrelere eşit şekilde paylaştırılmalıdır. Oluşturulan iğ iplikleri kardeş kromatitleri kromozom şeklinde paketler ve ardından oluşan kromozomların ekvator düzleminde düzgün bir şekilde sıralanmasını sağlar. Ardından kardeş kromatitleri yavru hücrelere doğru bir şekilde paylaştırmada görev alır (Hochegger vd., 2013).

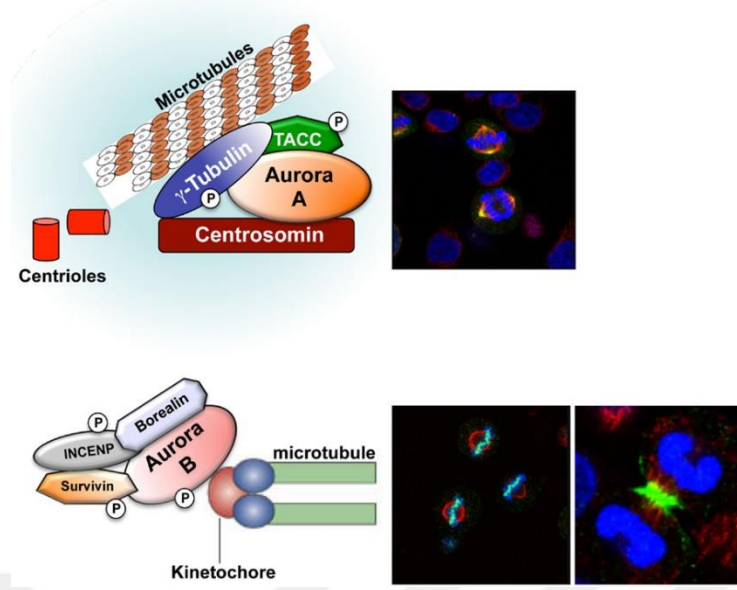
Sistemin düzenlenmesinde önemli görevleri olan mitotik kinazlar ve çok sayıda protein işlev görmektedir. Aurora kinazlar, hücre bölünmesi için önemli protein kinazlardır ve mitoz sırasında aktif oldukları bilinmektedir. Kanseri ilişkileri nedeniyle kısa sürede büyük önem kazanmışlardır (Kollareddy vd., 2012; Lens vd., 2010). Aurora ailesinin üyeleri, kodladıkları proteinler arasındaki sekans benzerliklerine dayalı olarak, diğer çok hücreli ökaryotlardaki bilinen üyeleri kapsayan üç sınıfa (A, B ve C) ayrılmıştır (Anand vd., 2003).



Şekil 1.8. Aurora Kinaz proteinlerinin şematik olarak lokalizasyonu (Baldini vd., 2014)

Aurora kinazlar *Drosophila melanogaster*'de iğ ipliği oluşumunun araştırması yapılırken keşfedilmiştir. Elde edilen yapı kuzey ışıklarına benzetildiğinden dolayı keşfedilen proteine Aurora adı verilmiştir (Weimer vd., 2016). Aurora kinazlar hücrede farklı kısımlarda lokalize olmuşlardır (Ducat ve Zheng, 2004).

Aurora kinaz A (AURK-A), mitoz sırasında sentrozom olgunlaşması ve iğ ipliğinin oluşumunun düzenlenmesi, mitotik faza giriş gibi hücresel süreçlerin yönetilmesinde rol oynar (Lee ve Lee, 2023). Aurora kinaz A interfaz sırasında sentrozomda ve mitoz sırasında mitotik kutuplarda ve bitişik iğ mikrotübüllerinde lokalize olmaktadır. Aurora kinaz B profazda kromozomlarda, prometafaz ve metafazda sentromerde ve anafazda merkezi mitotik iğde lokalize olur (Bavetsias ve Linardopoulos, 2015).



Şekil 1.9. Aurora A ve Aurora B lokalizasyonu (Bavetsias and Linardopoulos, 2015)

Yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmiş olmasına rağmen, diğer 2 Aurora kinazla karşılaştırıldığında AURK-C'nin işlevleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Quartuccio ve Schindler, 2015). Aurora kinaz C esas olarak mayoz bölünmede ifade edilen bir genidir. Bu genin sentezi Testis Çinko Parmak Proteini olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörü aracılığıyla düzenlenmektedir (Vader ve Lens, 2008). AURK-C birçok yetişkin vücut hücrelerinde orta derecede ifade edilmektedir veya baskılanmaktadır. Erken embriyonik gelişim esnasında aktiftir ve çoğu insan kanserinde fazlaca ifade edilmektedir. Aurora kinaz C'nin tümör hücrelerindeki aşırı ekspresyonu, AURK-B'nin fonksiyonel ve yapısal özelliklerini farklılaştırarak genomik kararsızlığa yol açmaktadır (Sasai vd., 2016).

1.6.1. Aurora Kinaz B

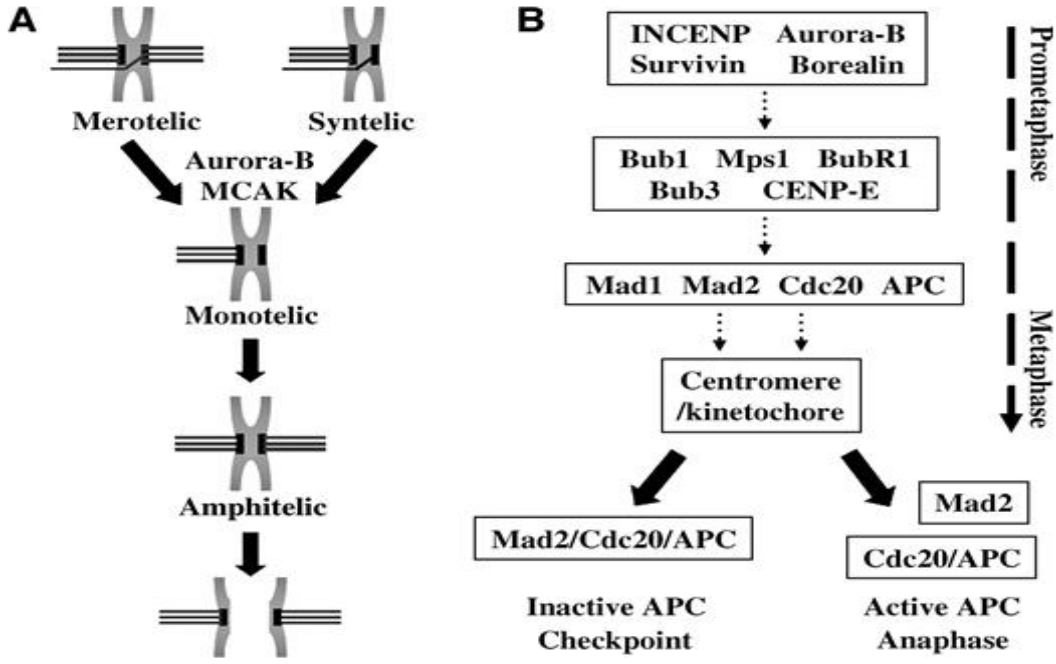
Aurora kinaz B, Aurora kinaz A ve Aurora kinaz C ile birlikte Aurora kinaz ailesine ait bir mitotik serin/treonin protein kinazdır. Aurora kinaz B, 17. kromozomda bulunan AURK-B geni tarafından kodlanır. AIM1, IPL1, ARK2, AIK2, AIRK2, STK1, STK5 ve STK12 gibi diğer isimlerle de bilinir. AURK-B, diğer Aurora kinazlarla birlikte hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Borah ve Reddy, 2021). İnsanlarda yapılan deneylerde Aurora kinaz B'nin işlevinin mikrotübül-kinetokor etkileşimlerini düzeltmek olduğu tespit edilmiştir (Lens ve Medema, 2003).

Aurora kinaz B, sentromerlerin orta kısmında yer almaktadır. G2/M safhasında fazlaca işlev görmektedir. Kinaz aktivitesi metafaz evresinden mitozun son kısmına doğru geçişte en yüksek seviyelere çıkmaktadır. AURK-B, profaz evresinde kromozomlara bağlanır, kromozom ayrışması ve sitokinezde rol oynar. (Mattei vd., 2020)

Aurora kinaz B; borealin (CDCA8), survivin (BIRC5), iç sentromer proteini (INCENP) ve diğer non-enzimatik alt birimlerle birlikte CPC kompleksini oluşturur. CPC kompleksi son derece dinamiktir. Aurora kinaz B'nin kinaz aktivitesi ve komplekse tutunabilmesi, özellikle INCENP ile olan etkileşimi sonucu artmaktadır. Kromozom yoğunlaşması, mitoz bölünme sırasında kromozomlara yön verme, kromozom-mikrotübül bağlantı hatalarını kontrol etme gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Bavetsias ve Linardopoulos, 2015; Honda vd., 2003). Aurora kinaz B, survivin ve INCENP tüm kromozomlarda uygun kinetokor ve mikrotübül bağlantısı gerçekleşene kadar mitoz bölünmenin ilerlemesine engel olan iç kontrol noktalarını denetlemektedir (Carmena vd., 2009).

Aurora kinaz B yokluğunda diğer kontrol noktası bileşenleri olan MAD2, BUBR1 ve CENP-E'nin kinetokordaki lokalizasyonu azalmaktadır. Ayrıca Aurora kinaz B'nin inhibe edilmesi BUBR1'in metafaz kinetokorlarına tekrardan bağlanmasını önlemektedir ve mitoz giriş sırasında BURB1'in fosforilasyonunu da gerçekleştirmektedir. Bunların yanı sıra BURB1'in sadece kontrol noktası görevi bulunmamaktadır, kromozomların hizalanması için de işlev görmektedir. Birlikte bu sonuçlara bakıldığında kontrol noktası proteinleri kinetokorlara yönlendirilmekte ve Aurora kinaz B'nin kromozom hizalamasını anafaz evresi başlangıcında gerçekleştirmektedir (Ditchfield vd., 2003).

Aurora kinaz B inhibe edildiğinde, hücreler G2/M kontrol noktasında durur, kromozom dağılımı normal olarak gerçekleşmez ve hücreler mitozdan erken çıkmaktadırlar. Bu durum hücrelerin apoptosise uğramasını sağlar (Kitzen vd., 2010; Portella vd., 2011; Yeung vd., 2008).

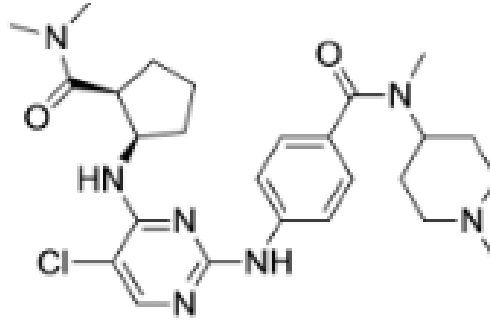


Şekil 1.10. Aurora kinaz B'nin hücre döngüsündeki rolü (Fu vd., 2007)

Yapılan son çalışmalarda; p53 proteini ve Aurora kinaz B arasında dolaylı olan bir etkileşim keşfedilmiştir. Histon asetil transferaz inhibe edicisi olan NIR (novel INHAT repressor) transkripsiyon baskılayıcısı olarak işlev görmektedir. Aurora kinaz B ile NIR bağlantı kurarak p53 proteinin aktivitesini farklı iki yol ile etkilemektedir. İlk yol; Aurora B'nin fazla ifadesi sonucunda NIR aracılığıyla p53'ün transkripsiyonel aktivitesi engellenmektedir. İkinci olarak ise; NIR, P53 proteini ile etkileşime girer ve bazı promotor bölgelerine yerleşerek p53'den kaynaklı apoptosisi baskılar (L. Wu vd., 2011).

1.7. BI 831266

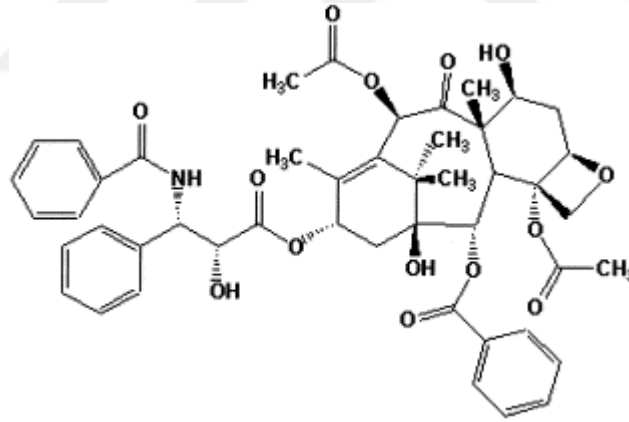
BI 831266 düşük moleküler ağırlığa sahip, seçici ve güçlü bir Aurora kinaz B inhibitörüdür (Şekil 1.11). Aurora kinaz B'nin enzimatik aktivitesini engellemek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. BI831266 molekülü fizyolojik pH'da yüksek çözünürlüğe (pH 7,4'te 875 µg/mL), CaCo2 testinde iyi geçirgenliğe ve orta düzeyde akışa sahiptir. Kanser hücrelerinde IC50 değeri 42 nM olarak ölçülmüştür (Gollner vd., 2023). Klinik öncesi çalışmalara bakıldığında BI831266'nın prostat kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve pankreas kanserinin çoğalmasını önlediğini göstermektedir (Dittrich vd., 2015).



Şekil 1.11. BI831266 molekülünün moleküler yapısı (Gollner vd., 2023)

1.8. Paklitaksel

Paklitaksel küçük bir ağaç olan, yaprak dökmeyen ve büyümesi yavaş olan *Taxus brevifolia* (Pasifik porsuğu) kabuğundan izole edilmiştir. Bilim insanları 1971 yılında kimyasal formülünü açıklayarak ‘taksol’ ismini vermişlerdir (Bernabeu vd., 2017; Wani vd., 1971). Moleküler formülü $C_{47}H_{51}NO_{14}$, moleküler ağırlığı ise 853,9 ‘dur (Singla vd., 2002).



Şekil 1.12. Paklitakselin moleküler yapısı (Singla vd., 2002)

Paklitaksel, bitkisel kaynaklı ilk onaylanmış kemoterapötik ajandır. Paklitakselin antikanser etkisi hücre döngüsünün inhibe edilmesidir ve tümör hücrelerini baskılayabilme özelliğine sahiptir (D.-L. Yu vd., 2022). Kanser hücrelerinin direnci antikanser ajanların etkinliğini büyük ölçüde azaltmaktadır. Paklitaksel, tümör hücrelerinin kök hücrelerinde otofajiye sebep olur ve bu durum tümör direncinin gelişmesiyle sonuçlanmaktadır (Škubník vd., 2023).

Paklitaksel, meme ve yumurtalık kanserleri üzerinde çok başarılı klinik etkinliğe sahip olan antikanser ilaçtır. Baş, boyun, deri ve akciğer kanserlerinin tedavisinde olumlu sonuçlar vermektedir ve bu da umut vericidir (Baloglu vd., 2003). Paklitaksel hücreleri döngünün G2/M safhasında durdurarak zamana ve yoğunluğa bağlı olarak sitotoksiteyi engelleyen kemoterapötik ajandır. Paklitaksel; yumurtalık kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunu tedavi etmek için mono tedavi veya başka antikanser ajanlarla kombine halde kullanılmak üzere FDA' dan onay almıştır (Ahmed Khalil vd., 2022; Barbuti and Chen, 2015).

Paklitaksel, apoptosisi uyarabilmek için bir takım gen ürünleri ve sinyal molekülleri aracılığıyla Bcl-2 ailesi üyelerini fosforile etmektedir. Anti-apoptotik proteinlerin gen ifadelerini düşürüp pro-apoptotik proteinlerin gen ifadelerini arttırarak apoptosisin indüklenmesinde görev almaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde Bcl-2 aile üyeleri fosforile edilerek inhibe edilmekte ve Bcl-2'nin fosforilasyonu hücrenin apoptosise yönlendirilmesine sebep olmaktadır (Ruvolo vd., 2001).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hücrelerin büyüme, bölünme, farklılaşmasında, gelişmesinde ve programlı ölümünde rol oynayan proteinlerin işlevini kaybetmesi sonucunda, hücrelerin kontrolünü kaybederek sürekli olarak çoğalması kanser olarak tanımlanmaktadır (Hanahan and Weinberg, 2000). Bilimdeki ilerlemeler ile ilgili kanseri kontrol altına almak için tanı yöntemlerinin yanı sıra birçok ilaç ortaya çıkmış ve bu hastalığın bir nebze de olsa tedavi edilmesine yardımcı olmuştur (Chhikara vd., 2023).

Aurora kinazlar, bazı tümör hücrelerinde aşırı ifade edilir. Bu durum Aurora kinazların tümör gelişimindeki rollerinin önemine dikkat çekmektedir (Mountzios vd., 2008). Aurora kinazların aşırı ifadesi ve bunların tümör hücrelerinde genetik kararsızlığı, Aurora kinaz inhibitörlerine tedavi edici olarak yanıt verebileceğini düşündürür. Aurora kinaz B'nin genomik olarak kararsızlık yaşayan hücrelerin neoplastik dönüşüme uğramasına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Son on yılda, birçok ilaç şirketi ve akademik kurum Aurora kinaz inhibitörleri geliştirmiştir. Hem Aurora kinaz A hem de Aurora kinaz B inhibitörleri farklı mekanizmalar yoluyla apoptosisi indükleyerek hücrenin ölümüne sebep olur (Bavetsias vd Linardopoulos, 2015; Mountzios vd., 2008). Aurora kinaz inhibitörlerinden bazıları hesperadin, barasertib ve danusertibdir. Hesperadin, Aurora B kinazın ATP kompetitif inhibitörüdür ve Aurora B aktivitesini azaltarak hücre proliferasyonunu inhibe eder (Wu vd., 2020). Hesperadinin influenza A ve B virüslerinin viral replikasyonunu inhibe ettiği ve viral ribonükleoprotein oluşumunu geciktirdiği bulunmuştur. Hesperadinin influenza antiviral olarak keşfi, bir influenza epidemisi veya pandemisi durumunda savunma hattı olarak kullanılabileceği için önem arz etmektedir (Hu vd., 2017). Barasertib (AZD1152), oldukça güçlü ve seçici bir aurora B kinaz inhibitörüdür. Aurora kinaz B'nin aktivitesini inhibe ederek kromozom kaymasına ve poliploidinin ortaya çıkmasına neden olur ve hücre bölünmesini sonlandırarak apoptosise sebep olur (Yamauchi vd., 2013). Aurora kinaz B'nin akut miyeloid lösemi (AML) hücre hatlarında ve AML hastalarından alınan numunelerde ekspresyonunun fazla olduğu görülmüştür. Klinik çalışmalar, Aurora kinaz B inhibitörü barasertibin insan AML hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını engellediğini göstermektedir (Dennis vd., 2012). Bir diğer inhibitör olan danusertib, tüm

Aurora kinaz üyelerine karşı etki gösteren güçlü bir inhibitördür. Faz I ve II denemelerinde incelenerek ilerlemiş katı tümörler ve lösemiler dahil çok çeşitli kanser türlerinde önemli tedavi edici potansiyel göstermiştir (Pan, 2015). Kemoterapi kanser tedavisinde etkili ve ana yöntemlerden birisidir. Ancak kemoterapi yöntemiyle istenilen terapötik etki elde edilemeyebilir. Vücutta bıraktığı yan etkiler ve çoklu ilaç direnci tedavinin dezavantajlarından bazılarıdır. Tedavide genellikle tek bir kemoterapötik ilaç ile istenilen sonuca ulaşamadığı için farklı kemoterapötik ilaç veya tedavilerin kombinasyonu uygulanmaktadır (Sun vd., 2021). Kemoterapinin en büyük zorluğu kanserli hücrelerin kontrol noktası yanıtı ve DNA onarımı başlamadan DNA'ya zarar veren ilacın bulunmasıdır (Sancar vd., 2004).

Paklitaksel, çok iyi bir etki mekanizmasına sahip, mevcut en başarılı doğal antikanser ilaçlardan birisidir. Paklitaksel, *Taxus brevifolia*'nın kabuğu ve iğnelerinde doğal olarak üretilen bir trisiklik diterpenoid bileşiktir. Tübülün mikrotübüller halinde birleşmesini sağlama ve mikrotübüllerin ayrışmasını önleme görevi vardır. Bu sayede hücre döngüsünün devam etmesini engelleyerek, mitozu durdurur ve kanser hücrelerinin büyümelerini önler (Zhu ve Chen, 2019). Paklitaksel başarılı bir antikanser ilaç olmasına rağmen, kanser hastalarının ilaca verdiği değişken yanıt klinik başarısını sınırlamaktadır. Bu değişken yanıtın altında yatan nedenler büyük ölçüde bilinmemektedir (Nan vd., 2022). Kemoterapik ilaca dirençli olan kanser hücrelerini hedeflemek için Aurora kinaz inhibitörleri ile kombinasyon tedavileri daha başarılı sonuçlar vermiştir (Polacchini vd., 2016).

Aurora kinaz inhibitörlerinden olan ZM447439 ile tedavi edilmiş hücrelerde; interfaz ve mitoz girişte herhangi bir problem olmazken kromozomların dizilimi ve sitoplazma bölünmesi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu durumun Aurora B'nin inhibe edilmesinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Ditchfield vd., 2003).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmalarımızda Dr. Alexander Hergovich (UCL, Londra, İngiltere) tarafından gönderilen MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanıldı. Yapılan tüm tez çalışmaları Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Kanser Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Kullanılan tüm kimyasallar, kitler ve sarf malzemeler ticari olarak satın alındı.

Tablo 3.1. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

MALZEMELER	MARKA	KATALOG NUMARASI
DMEM	SIGMA	D6429
dPBS	GIBCO	14190094
Trypsin-EDTA	Biological Industries	03050
10% Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO	10270106
1% penicillin (64 µg/mL)/ streptomycin (100 µg/mL)	GIBCO	15140122
Trypan Blue	Thermo Fisher	15250061
Aquaguard 1	Biological Industries	018671B
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	MERCK KGaA,	8.17034.1000
β-mercaptoethanol	SIGMA LS	M3148
Bromophenolblue	MERCK	536092
Akrilamid/bisakrilamid mix (30%)	CARLO ERBA	480141
Amonyum persülfat (APS)	MERCK KGaA	101201.0500
TEMED	SIGMA	110-18-9
EDTA	SIGMA	E5134
EGTA	GLENTHOMS	GE7249
Tris	Fisher Chemical	BP153-1
NaCl	ROTH	2618.1
Gliserol	SIGMA ALDRICH	15524

Tablo 3.1. (Devam) Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

Methanol	MERCK KGaA	1.06007.2500
Tween-20	SIGMA	P1379
H ₂ O ₂	KarloErba	7722841
Spektrofotometre küvetleri	BİOSIGMA	20P1006010
Izopropanol	Riedel-de Haen	24137
PVDF Transfer Membrane, 0.2 µm, 26.5 cm x 3.75 m	Merck Millipore	IPVH00010
X-Ray film (18x24 cm)	Carestream MXBE Film	7710783
Bicinchoninic Acid Protein Assay kit (Bradford reactive)	BIO-RAD	5000006EDU
Luminol	SIGMA ALDLRICH	123072-5G
p-coumaric acid	SIGMA	C9008-10G
Skim milk powder	SIGMA ALDLRICH	70166
NaF	CARL ROTH	2618.1
Molecular weight marker (Protein)	Intron	24052
CO ₂ incubator	ESCO	CCL170B8
Otoklav	HIRAYAMA	HVE-50
Santrifüj	Weightlab Instruments	WN-CL6500
Hücre kültürü flask: 75 cm ²	NEST	708003
Hücre kültürü kapları: 60x18mm	LABSOLUTE	7696771
Biyogüvenlik kabini	ESCO Class II	-
Mikropipet	ISO Lab	-
Mini çalkalayıcı	ISO Lab	61311001
Microsantrifüj tüpleri	ISOLAB	S.078.03.002.500
Spektrofotometre	Shanghai Metash	UV-5100
Western Blot aparatları	BIO-RAD	041BR307525
Serolojik pipet	Lab Marker	10082019
Sıcak su banyosu	Thermomax	201910103425
Thoma lamı	Thoma ISO Lab	-
Invert Mikroskop	Motic	AE2000
Hassas terazi	ISO Lab	S1909002

c-PARP (cell signaling, 9541S), Bcl-2 (401r-4229), Cas-3 (sc-271759), p53 (sc-126), paklitaksel (Cayman, 10461), BI 831266 (Boehringer Ingelheim firması tarafından temin edilmiştir). Tüm örnekler ve reaktifler uygun şekilde hazırlanarak ve olması gereken koşullarda saklandı (SEG, Derin Dondurucu -20 °C / Vestel, Derin Dondurucu -86 °C / Buzdolabı 2-8 °C / SEG Nuaire Glacier NU-9668GC).

3.2. Yöntem

3.2.1. Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmalarımızda yaptığımız koloni sağ-kalım, hücre canlılığı, SDS-PAGE/Western blot analizleri için memeli hücre kültürü araştırmalarında başarılı bir şekilde kullanılan MCF-7 kanser hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 µg/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenen DMEM/F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe çoğaltıldı. Tüm hücre kültürü çalışmaları GCCP (Good Cell Culture Practice) aseptik standartlarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

3.2.2. Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizleri

Kristal viyole *in vitro* sitotoksitesite analizi ilgili çalışmada belirtildiği üzere gerçekleştirildi (Parker vd., 2022). MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak her bir kuyucuğa $1,5 \times 10^3$ hücre ekildi. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'de inkübatörde çoğaltıldıktan sonra, pilot deneyler neticesinde belirlenen miktarda hücre 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler tedavi edildikten sonra besiyeri aspire edildi ve hücreler 2 defa dPBS ile yıkandı. Daha sonra, her bir kuyucuktaki hücreler MetOH-Asetik Asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edildi ve fiksatif aspire edildikten sonra kuyucuklara %0,5 kristal viyole solüsyonu eklendi. 15 dakikalık boyamanın ardından canlı hücrelere bağlanmış olan kristal viyole %10 asetik asit solüsyonu ile kurtarıldı ve örneklerin son olarak 595 nm'de absorbansı ölçülerek hücrelerin canlılığı belirlendi.

3.2.3. Kombinasyon İndeksinin (KI) Hesaplanması

BI 831266 ve paklitaksel tedavilerinin MCF-7 hücrelerindeki kombinasyon indeksi, şu formülle hesaplandı;

$$KI = (A_{\text{Paklitaksel}}) 50 / (B_{\text{Paklitaksel}}) 50 + (A_{\text{BI831266}}) 50 / (B_{\text{BI831266}}) 50.$$

Bu formülde;

($A_{\text{Paklitaksel}}$) 50: BI 831266 IC50 konsantrasyonunun yarısı uygulandığında hücre canlılığını % 50' ye indiren paklitaksel konsantrasyonunu,

($B_{\text{Paklitaksel}}$) 50: Paklitaksel IC50 konsantrasyonunu,

(A_{BI831266}) 50: Paklitaksel IC50 konsantrasyonunun yarısı uygulandığında hücre canlılığını % 50' ye indiren BI 831266 konsantrasyonunu,

(A_{BI831266}) 50: BI 831266 IC50 konsantrasyonunu, ifade etmektedir (J. Li vd., 2017)

Hesaplamadan sonra bulunan KI değeri için; $KI > 1$ ise antagonizm, $KI = 1$ ise güçlendirici ve $KI < 1$ ise sinerjizm olduğunu gösterir (Chou, 2006).

3.2.4. 2D Koloni Sağ-Kalım Analizi (Anchorage-Dependent Colony Survival Assay)

Hücre koloni formasyon deneyleri (Gomez vd., 2015; Gundogdu vd., 2021)' de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Deneylerin öncesinde planlanmış olan pilot deneylerle BI 831266 ve paklitaksel moleküllerinin IC50 dozları belirlendi. 6 cm hücre kültürü kaplarına $1,5 \times 10^3$ hücrenin ekimi yapıldı. 24 saatin ardından hücrelerin farklı konsantrasyonlarda BI 831266 ve paklitaksel tedavisi başlatıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'de %95 nem içeren ortamda inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücrelerin 3-4 günde bir besiyeri yenilendi ve mikroskop altında koloni oluşumları incelendi. Kolonilerin birbirine temas etmemesi ve her koloninin en az elli hücreye ulaşması göz önünde bulundurularak deney durduruldu. Hücre kültürü flasklarındaki besiyeri çekildi ve ardından PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı. Ardından hücreler metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika boyunca fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra metanol içerisinde hazırlanan kristal violet ile 15 dakika boyama yapıldı. Kristal violet ile yıkanmış olan flasklar dikkatlice su ile yıkandı ve mikroskop altında koloniler sayıldı. Minimum elli hücre oluşumu koloni kabul edildi ve kontrol grubu dahil olacak şekilde her bir grup için en az 2 kere tekrar olacak şekilde 3 bağımsız deney gerçekleştirildi ve ardından deneylerin sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.5. SDS–Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizleri

MCF-7 hücrelerindeki DNA hasarı ve apoptosisle alakalı proteinlerin ekspresyon düzeylerini belirleyebilmek için toplam protein içerikleri özütlenerek, hedeflenmiş olan proteinlerin ifade düzeyleri Western blot yöntemi ile belirlendi. MCF-7 hücrelerinin ekildiği ve tedavilerin yapıldığı kültür kuyucukları ilk olarak soğuk PBS (1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl 2,7 mM KCl,; pH 7,4) tamponuyla iki defa yıkandı. Proteinleri pürifiye etmek için içerisinde 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 150 mM NaCl, NP-40 0,5%, (v/v), proteaz inhibitör koktail (complete EDTA-free) bulunan lizis tamponu kullanıldı. Tripsin ile toplanan hücreler PBS tamponuyla yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 1100 RPM’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet yeterli miktarda ($0,5 \times 10^6$ hücre için 100 µL) lizis tamponu ile tekrardan süspanse edildi ve süspansiyon sırasında 1 mL’lik enjektörler kullanılarak etkin bir homojenizasyon ve protein eldesi sağlandı. 60-120 dakika buz üzerinde bekletilen örnekler sonrasında 4°C’de 15000 RPM’de 10 dakika santrifüj edildi. Yeni bir mikro-santrifüj tüpüne elde edilen süpernatant kısım aktarıldı. Proteinler yükleme tamponuyla süspanse edilmeden önce örnekler arasındaki protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle karşılaştırıldı. Protein örneklerinin içerisine 5X Laemmli örnek yükleme tamponu eklendi. İzole edilmiş örnekler 95°C’de 5 dakika inkübe edildi. Protein örneklerinin uygun konsantrasyonlarda SDS-PAGE jel ile moleküler boyutlarına göre ayrılmaları sağlandı. Sonrasında, jelin içine gömülü proteinler PVDF (poliviniliden florür) membranına transfer edildi ve transfer sonrası bloklama tamponunda (TBS-T içerisinde hazırlanan %5’lik BSA) inkübe edildi. Bloklama tamponundaki membranlar gece boyunca ilgili primer antikor ile 4°C’de inkübe edildi. Membranlar 3 defa 10’ar dakika TBS-T (0,3 M NaCl, 0,1 M Tris-base, 0,5% Tween; pH 7,4) kullanılarak yıkandı. HRP ile işaretli sekonder antikor ile 2 saat 4°C’de inkübe edildi. Membranlar 3 defa 10’ar dakika TBS-T ile tekrar yıkandı. Görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı. Kemilüminesans görüntü, X-ray görüntüleme sisteminin kullanılmasıyla filme aktarılarak elde edildi. Son olarak, bantta görülen yoğunluklar Image-j programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak dansitometrik olarak değerlendirildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm çalışmalar en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) programı kullanılarak elde edildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi ve (means $\pm$ SEM) p-değeri 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***) veya 0,0001 (****)'den küçük neticeler anlamlı kabul edildi.



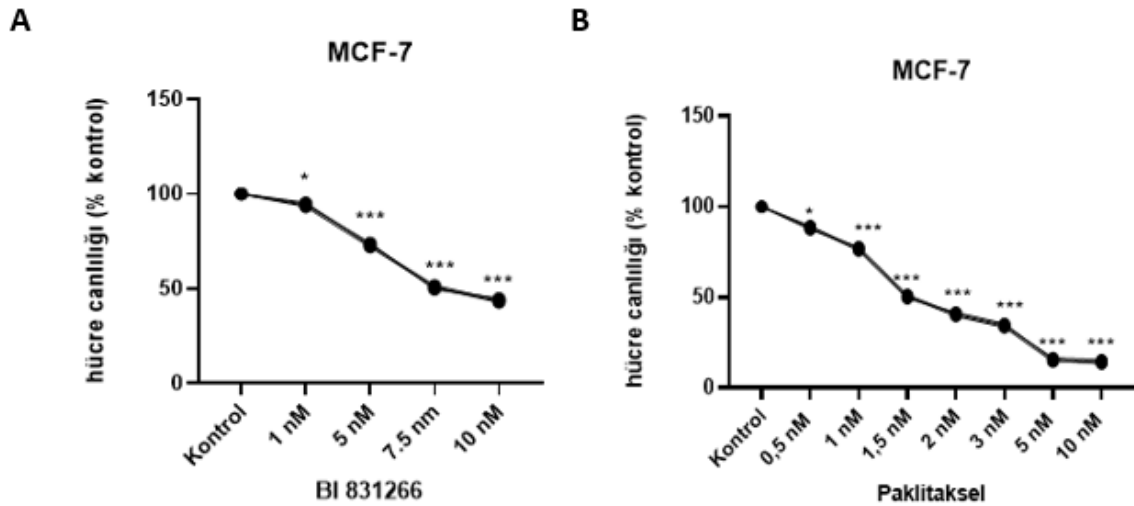
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Paklitaksel ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kristal Viyole Hücre Canlılık Analizleri ve Sinerjizmin Belirlenmesi

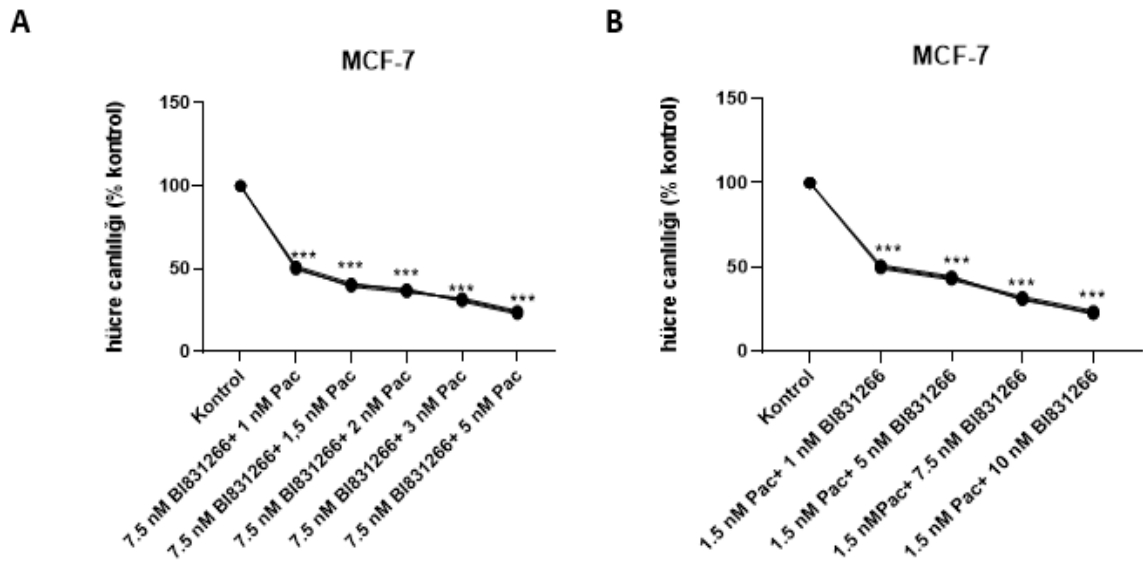
Kristal viyole *in vitro* canlılık deneyi için Parker vd (2022)'de açıkladığı gibi protokol optimize edilmiştir (Parker vd., 2022). MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak 24 kuyucuklu hücre kaplarına ekim gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra hücreler artan dozlarda (1-5-7,5-10 nM) BI 831266 molekülü ile 24 saat (Şekil 4.1.A), artan dozlarda (0-5-1-1,5-2-3-5-10 nM) paklitaksel ile 1 saat (Şekil 4.1.B) tedavi edildi. Ayrıca mono tedavilerin analizi gerçekleştirildikten sonra paklitaksel ve BI 831266 moleküllerinin kombinasyon tedavileri gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, 7,5 nM BI 831266 molekülü sabit tutulup artan dozlarda paklitaksel tedavisi yapılmıştır (Şekil 4.2.A), 1,5 nM paklitaksel molekülü sabit tutulup artan dozlarda BI 831266 tedavisi yapılmıştır (Şekil 4.2.B). Belirtilen deney süresi sonunda hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkanmıştır. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her kuyucuğa yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edildi. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp 0,5% kristal viyole boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirildi. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanıp %10 asetik asit solüsyonundan 1 er ml eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Kristal viyole analizlerinde BI831266 molekülü için IC₂₅ değeri 4,498129 nM, IC₅₀ değeri 8,063072783 nM olarak hesaplanmıştır. Paklitaksel molekülü için IC₂₅ değeri 0,807710265 nM, IC₅₀ değeri ise 1,768328734 nM olarak hesaplanmıştır. Hücre canlılık analizleri neticesinde BI 831266 molekülünün MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı kontrol gruplarıyla kıyaslanmıştır. BI 831266 molekülünün artan dozlarda hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Hücre canlılık yüzdeleri kontrole göre 7,5 nM BI 831266 tedavisi için %50,7 ve 10 nM BI 831266 tedavisi için %43,8 olarak hesaplanmıştır. Paklitakselin 1 saatlik akut tedavisi için ise bu oranlar kontrole göre 1,5 nM %50,4, 2 nM %40,7 ve 3 nM %34,4 olarak hesaplanmıştır. Yapılan mono tedavilerin ardından BI 831266 ve paklitakselin kombinasyon tedavilerine bakıldığında BI 831266 molekülü sabit

tutulup (7,5 nM) artan dozlarda (1-1,5-2-3-5 nM) paklitaksel ile tedavi edilmiştir. Canlılık yüzdelere bakıldığında sırasıyla %50,5, %43,2, %36,7, %31,2, %23,6 olarak hesaplanmıştır. Paklitaksel molekülü sabit tutulup (1,5 nM) artan dozlarda (1-5-7,5-10 nM) BI 831266 ile tedavi edilmiştir. Canlılık yüzdelere bakıldığında sırasıyla %50,2, %43,5, %31,4, %23 olarak hesaplanmıştır.

Paklitaksel ve BI 831266 kombinasyon tedavilerinin sinerjistik etki gösterip göstermediği materyal ve yöntemde belirtilen formüller ile hesaplanmıştır (J. Li vd., 2017). Kombinasyon indeksinin hesaplanması sonucu iki ayrı bileşenin sinerjistik etki göstermesi, ilaçların hücreler üzerindeki terapötik etkinliğinin saptanması, hedef molekül veya mekanizmanın hücre metabolizmasındaki etkinliğinin artırılması veya azaltılması gibi süreçlerin tanımlanması için gereklidir (Chou, 2006). Yaptığımız çalışmada, Paklitaksel + BI 831266 kombinasyonunun kombinasyon indeksi (KI) 0,787 olarak hesaplanmıştır. Bu değer KI <1 olduğundan Paklitaksel ile BI 831266 arasında sinerjizm olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1. (A) Kristal viyole hücre canlılık deneyi için 24 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup 1×10^5 MCF-7 hücresi ekildi. 24 saat sonra hücreler artan dozlarda (1-5-7,5-10 nM) BI 831266 molekülü ile 24 saat, (B) artan dozlarda (0,5-1-1,5-2-3-5-10 nM) paklitaksel ile 1 saat tedavi edildi. Tedavi sonlandırıldıktan sonra hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her kuyucuğa yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edildi. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %0,5 kristal viyole boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirildi. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanıp %10 asetik asit solüsyonundan 1 er ml eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, graphpad prism programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir

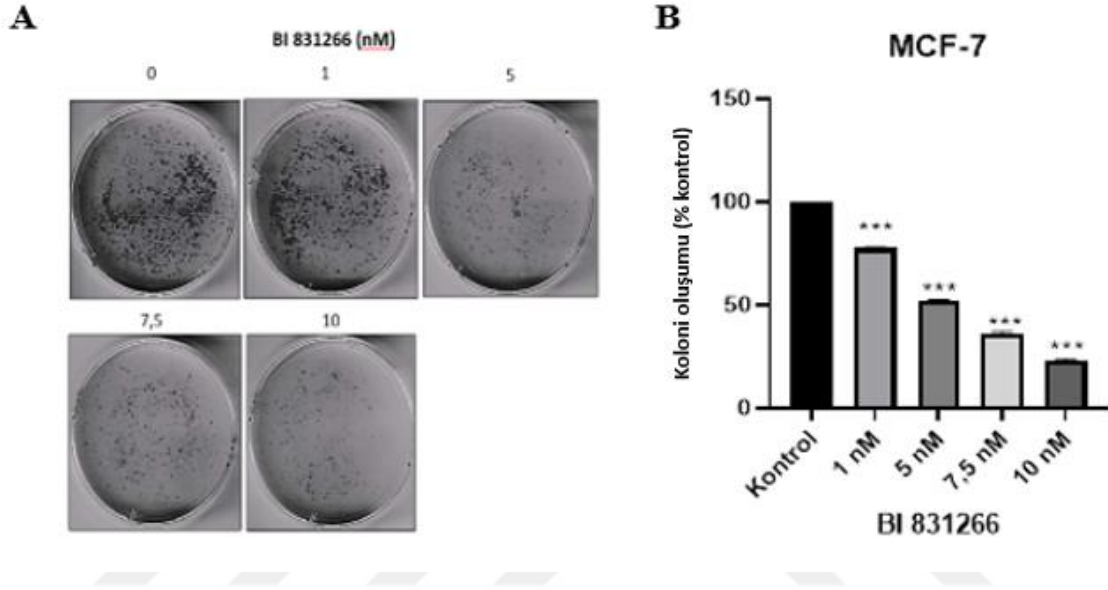


Şekil 4.2. (A) Kristal viyole hücre canlılık deneyi için 24 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup 1×10^5 MCF-7 hücresi ekildi. 24 saat sonra 7,5 nM BI 831266 molekülü sabit tutulup artan dozlarda paklitaksel tedavisi yapılmıştır. (B) 1,5 nM paklitaksel molekülü sabit tutulup artan dozlarda BI 831266 tedavisi yapılmıştır. Tedavi sonlandırıldıktan sonra hücrelerin eski besiyerleri aspire edilip PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile her kuyucuğa yaklaşık 1 ml eklenip 5 dakika oda sıcaklığında hücreler fikse edildi. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılıp %0,5 kristal viyole boyasından yaklaşık 1 ml alınıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu gerçekleştirildi. Boyanan kuyucuklar musluk suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanıp %10 asetik asit solüsyonundan 1 er ml eklenerek yaklaşık 5 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra asetik asit mikropipet yardımıyla çekilip spektrofotometre ölçüm kuvvetlerine aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile 595 nm dalga boyunda hücre canlılık değerleri analiz edilip, graphpad prism programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

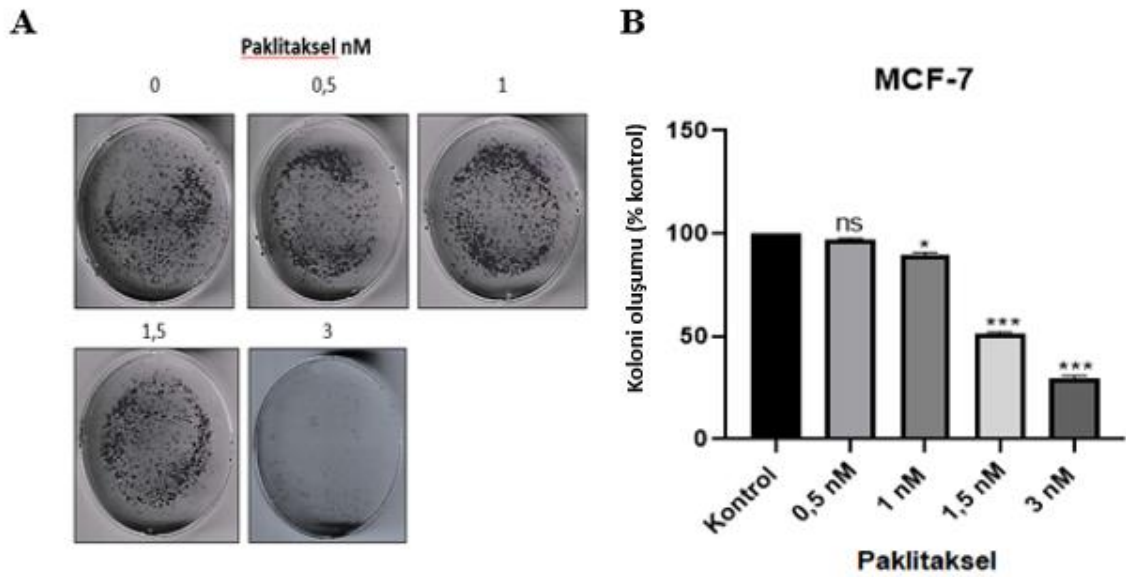
4.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde BI 831266 Molekülü ile Paklitaksel Molekülünün IC25 ve IC50 Sitotoksik Doz Değerlerinin Koloni Sağ-Kalım Analiziyle Belirlenmesi

MCF-7 meme kanseri hücrelerine BI 831266 molekülü; (kontrol grubu-1-5-7,5-10 nM) olacak şekilde 5 grup oluşturularak uygulandı. MCF-7 hücreleri ekildikten 24 saat sonrasında belirlenen dozlar ile 24 saat boyunca tedavi edildi ve 24 saatin sonunda tedavi sonlandırılarak hücreler 14 gün boyunca inkübe edildi. 14. Günün sonunda hücreler boyanarak deney sonlandırıldı. 24 saat süresince BI 831266 molekülüyle tedavi edilen hücrelerin artan dozlara bağlı olarak koloni sayılarının azaldığı ve BI 831266 molekülünün koloni yapma kapasitesini engellediği görülmüştür. Koloni sağ kalım analizi IC25 değerinin 1,43 nM, IC 50 değerinin ise 7,464 nM olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.1). Paklitaksel (kontrol grubu-0,5-1-1,5-3 nM) olacak şekilde 5 grup oluşturularak uygulandı. Hücre ekiminden 24 saat sonra belirlenen dozlar uygulanarak MCF-7 hücreleri 1 saat boyunca paklitaksel ile tedavi edildi. 24 saat sonra tedavi sonlandırıldı ve hücreler 14 gün

boyunca inkübe edildi. 14. Günü sonunda hücreler boyanarak deney sonlandırıldı. 1 saatlik paklitaksel ile tedavi edilen hücrelerin artan dozlara bağlı olarak koloni sayılarının azaldığı ve paklitakselin koloni yapma kapasitesini engellediği görülmüştür. Koloni sağ kalım analizi IC₂₅ değerinin 1,133 nM, IC₅₀ değerinin ise 1,604 nM olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.2).



Şekil 4.3. Aurora B inhibitörü BI 831266 molekülünün seçilen farklı doz değerleri 3 bağımsız tekrar uygulanarak koloni sağ kalım analizi ile sitotoksik etkisine bakıldı. (A) $1,5 \times 10^3$ MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra artan dozlarda BI 831266 (0-1-5-7,5-10 nM) ile 24 saat süreyle tedavi edildi. Sonrasında hücreler 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı ve taze besiyeri eklenerek 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0,5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

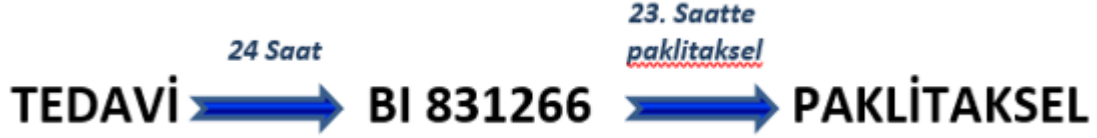


Şekil 4.4. Paklitakselin seçilen farklı doz değerleri 3 bağımsız tekrar uygulanarak koloni sağ kalım analizi ile sitotoksik etkisine bakıldı. (A) $1,5 \times 10^3$ MCF-7 meme kanseri hücreleri 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra artan dozlarda (0-0,5-1-1,5-3 nM) paklitaksel ile 1 saat süreyle tedavi edildi. Sonrasında hücreler 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı ve taze besiyeri eklenerek 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0,5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

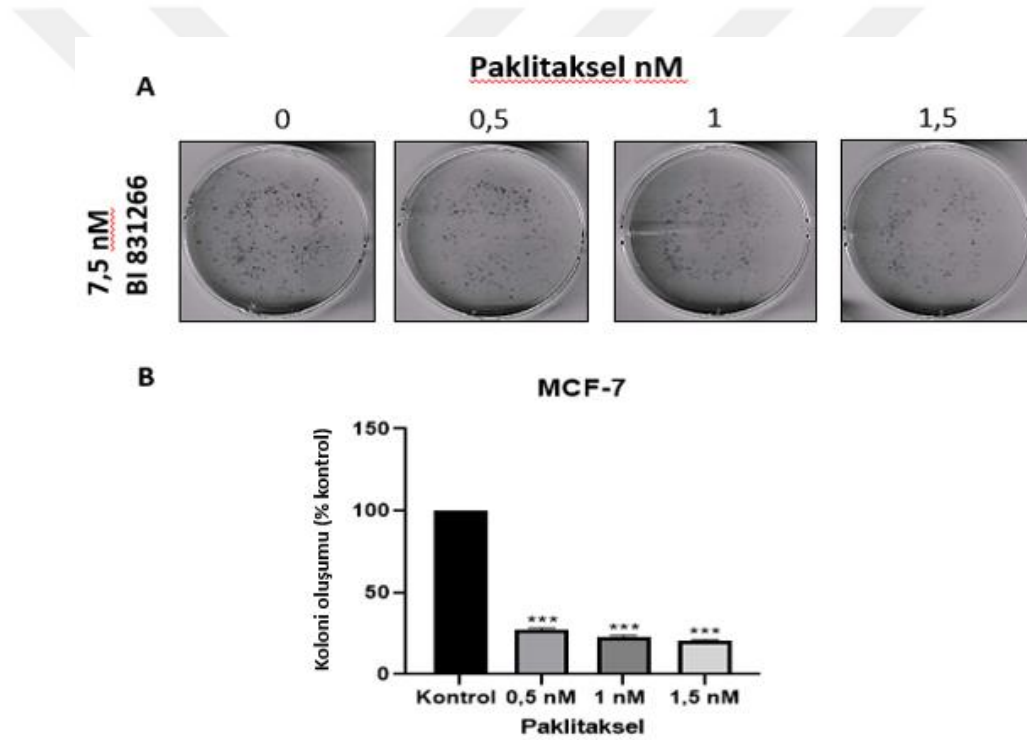
4.3. BI 831266 Molekülünün ve Paklitaksel Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde Koloni Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi

Yapılan tez çalışmasında MCF-7 hücre hattı kullanılarak BI 831266 molekülünün paklitakselle olan kombine tedavileri uygulanmıştır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ekiminin ardından 24 saat beklenildikten sonra BI 831266 molekülünün dozu 7,5 nM olacak şekilde sabit tutulup hücrelere artan dozlarda sırasıyla (0-0,5-1-1,5 nM) paklitaksel eklenerek tedavi edildi. Hücreler toplamda 24 saat olmak üzere ilk 23 saat 7,5 nM BI 831266 molekülü ile son 1 saat ise artan dozlarda paklitaksel ile tedavi edildi ve 24. saatte tedaviye son verildi (Şekil 4.2.1). Aurora kinaz B inhibitörü BI831266 molekülünün dozunun sabit tutulup paklitaksel molekülünün dozlarının artırıldığı kombinasyon tedavisinde, hücrelerin koloni sağ-kalımının mono tedavilerle kıyaslandığında daha fazla inhibe olduğu gözlenmiştir. Hücreler BI831266 ve paklitaksel molekülleriyle kombine olarak tedavi edildiğinde bu moleküllerin sinerjistik etki gösterdiği görüldü (Şekil 4.2.2).

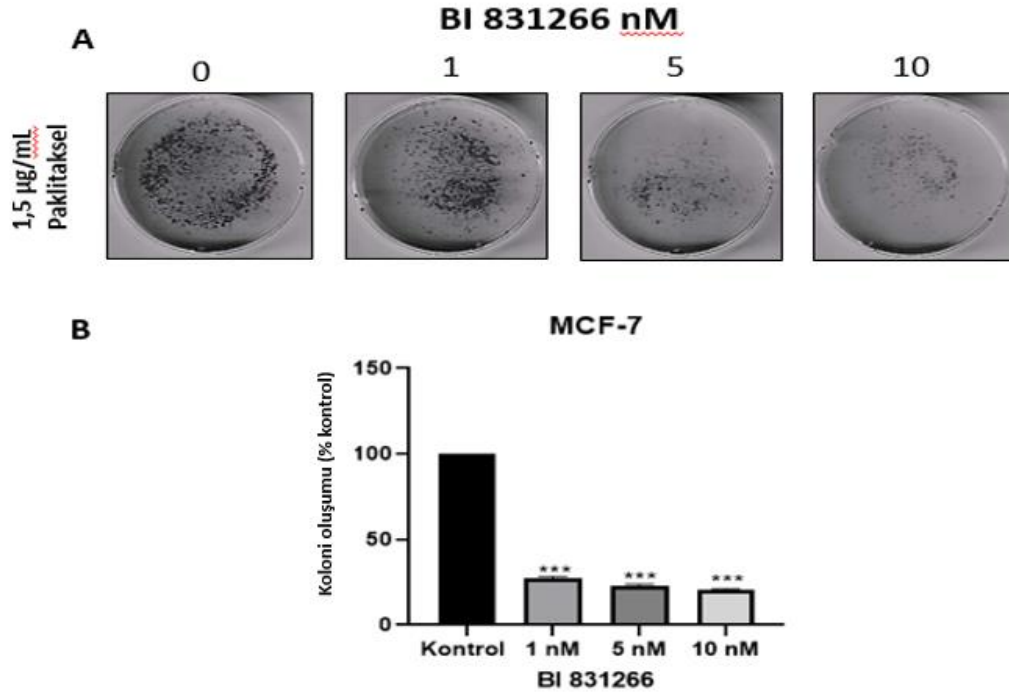
Paklitaksel molekülünün dozu 1,5 nM’da sabit tutulup hücelere artan dozlarda sırasıyla (0-1-5-10 nM) BI831266 molekülü uygulanıp tedavi edildiğinde aynı şekilde mono tedavilere kıyasla kombine tedavilerin sinerjistik etki göstererek koloni sağ-kalımlarının daha az olduğu görüldü (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.5. BI 831266 molekülü ve paklitakselin kombine dozlarının uygulanma saatleri. 24 saat BI 831266, 1 saat paklitaksel



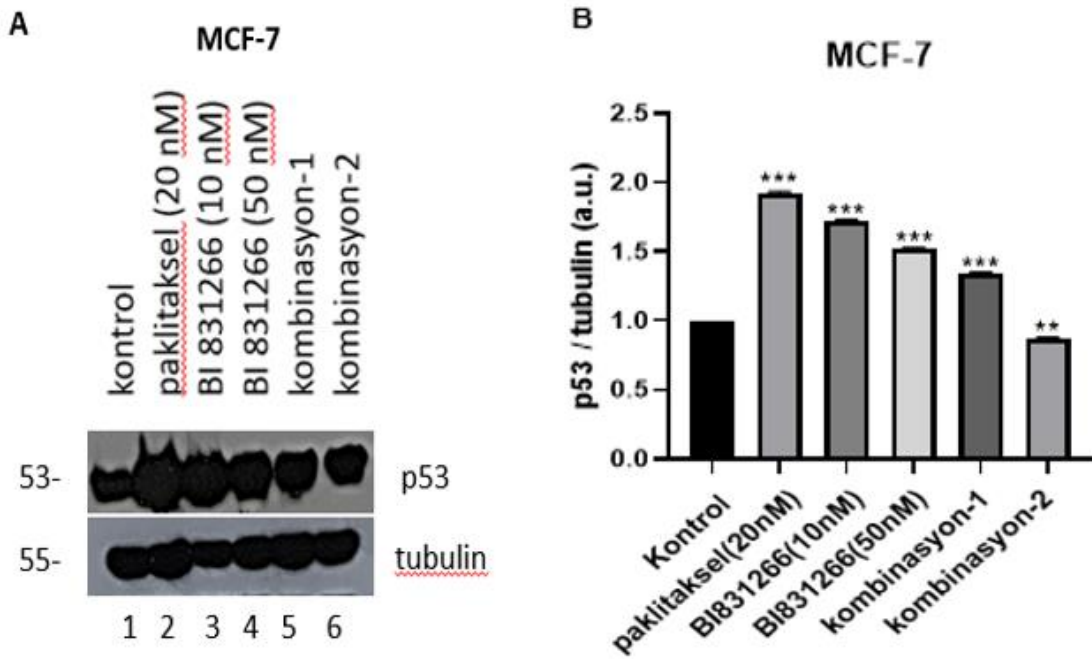
Şekil 4.6. BI 831266 molekülü ve paklitaksel dozlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkiye bakıldıktan sonra BI 831266 molekülü ve paklitaksel kombinasyon dozları, BI 831266 molekülü için 7,5 nM, paklitaksel için ise 1,5 nM olarak belirlendi. (A) Paklitaksel grupları; kontrol (7,5 nM BI 831266), 0,5-1-1,5 nM paklitaksel + 7,5 nM BI 831266 şeklinde tedavi uygulandı. $1,5 \times 10^3$ MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra hücreler öncelikle 7,5 nM BI 831266 ile tedavi edildi. 23. saatte ise artan dozlarda (0,5-1-1,5 nM) paklitaksel ile 1 saat tedavi edildi. Toplam 24 saatlik tedaviden sonra tedavi sonlandırıldı. Her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C’lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Sonrasında, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0,5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdelere gösteren grafik. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında



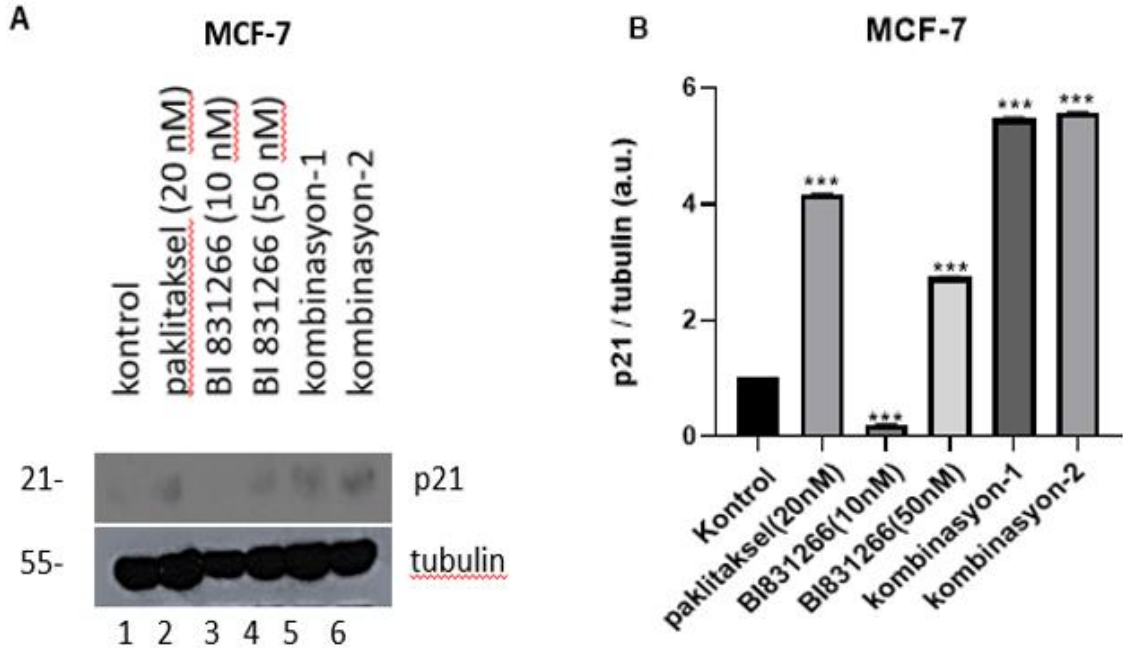
Şekil 4.7. BI 831266 grupları; kontrol grubu (1,5 nM paklitaksel), 1, 5, 10 nM BI 831266 molekülü + 1,5 nM paklitaksel olarak belirlendi. (A) $1,5 \times 10^3$ MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra hücreler artan dozlarda (1-5-10 nM) BI 831266 molekülü ile 24 saat tedavi edildi. 23. saatte ise 1,5 nM paklitaksel ile tedavi edildi. Toplam 24 saatlik tedaviden sonra tedavi sonlandırıldı. Her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Sonrasında, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0,5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

4.4. BI 831266 ve Paklitaksel Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptotik ve Hücre Döngüsü Protein Ekspresyonları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi (SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri)

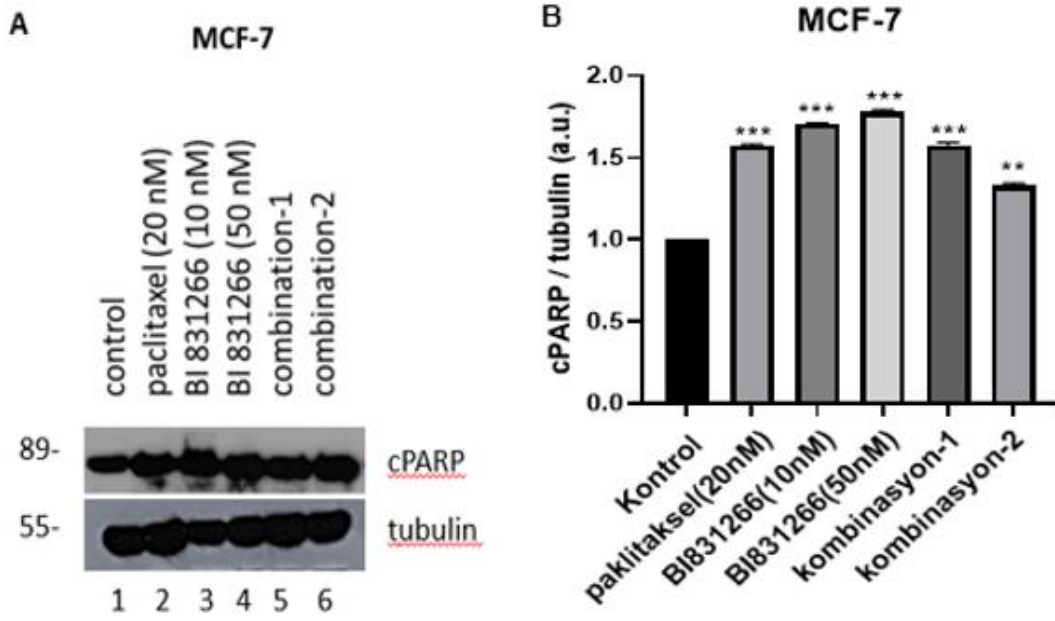
BI 831266 molekülü ve Paklitaksel ile mono tedavi ve kombinasyon tedavilerinin hücrelerde mevcut olan apoptosisle alakalı proteinler üzerindeki etkilerine bakılmıştır.



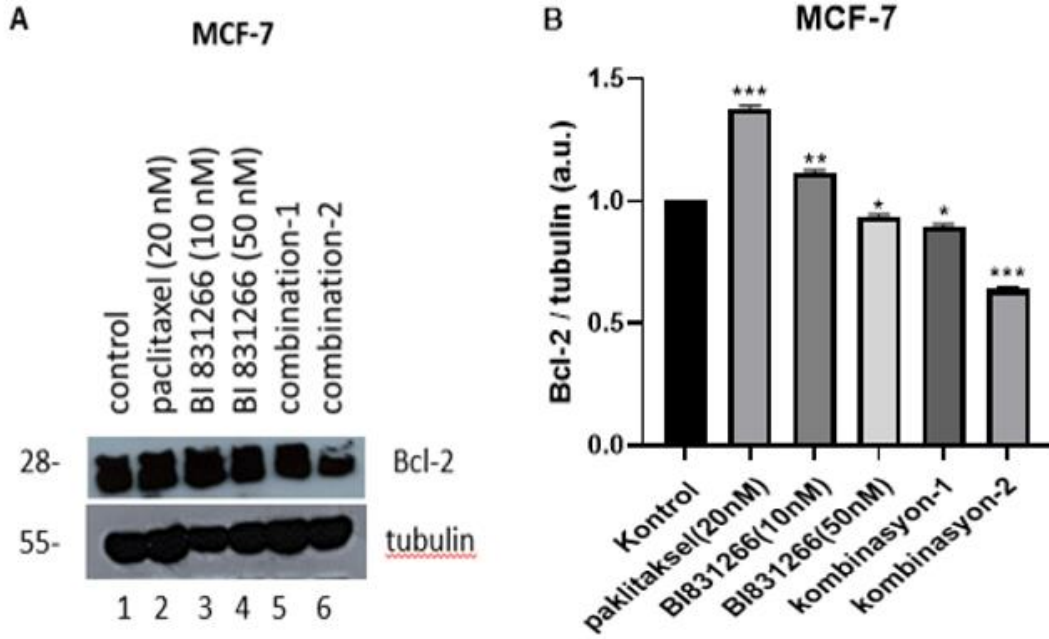
Şekil 4.8. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücreleri tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücreler sayıldı. 1×10^6 MCF-7 hücresi medium içerisinde çözündürülerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, paklitaksel 20 nM, BI 831266 10 nM, 50 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 10 nM, paklitaksel 20 nM + BI 831266 50 olarak belirlendi. 24 saat geçtikten sonra hücreler belirlenen dozlarla tedavi edildi. 24 saat süren tedavi sonrasında toplanarak protein lizati oluşturuldu. Western blot tekniği ile p53 proteini miktarı tayin edildi. (A) p53 bant görüntüsü (B) Western blot görüntülerinin densitometrik analizinin İmage-J programı kullanılarak grafik oluşturulmuş hali. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında (a.u.: arbitrary unit)



Şekil 4.9. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücreleri tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücreler sayıldı. 1×10^6 MCF-7 hücresi medium içerisinde çözündürülerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, paklitaksel 20 nM, BI 831266 10 nM, BI 831266 50 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 10 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 50nM olarak belirlendi. 24 saat geçtikten sonra hücreler belirlenen dozlarla tedavi edildi. 24 saat süren tedavi sonrasında toplanarak protein lizatı oluşturuldu. Western blot tekniği ile p21 proteini miktarı tayin edildi. (A) p21 bant görüntüsü (B) Western blot görüntülerinin densitometrik analizinin Image-J programı kullanılarak grafik oluşturulmuş hali. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında (a.u.: arbitrary unit)



Şekil 4.10. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücreleri tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücreler sayıldı. 1×10^6 MCF-7 hücresi medium içerisinde çözündürülerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, paklitaksel 20 nM, BI 831266 10 nM, BI 831266 50 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 10 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 50nM olarak belirlendi. 24 saat geçtikten sonra hücreler belirlenen dozlarla tedavi edildi. 24 saat süren tedavi sonrasında toplanarak protein lizatı oluşturuldu. Western blot tekniği ile cPARP proteini miktarı tayin edildi. (A) cPARP bant görüntüsü (B) Western blot görüntülerinin densitometrik analizinin İmage-J programı kullanılarak grafik oluşturulmuş hali. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında (a.u.: arbitrary unit)



Şekil 4.11. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücreleri tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücreler sayıldı. 1×10^6 MCF-7 hücresi medium içerisinde çözündürülerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, paklitaksel 20 nM, BI 831266 10 nM, BI 831266 50 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 10 nM, paklitaksel 20 nM+ BI 831266 50nM olarak belirlendi. 24 saat geçtikten sonra hücreler belirlenen dozlarla tedavi edildi. 24 saat süren tedavi sonrasında toplanarak protein lizatı oluşturuldu. Western blot tekniği ile Bcl-2 proteini miktarı tayin edildi. (A) Bcl-2 bant görüntüsü (B) Western blot görüntülerinin densitometrik analizinin İmage-J programı kullanılarak grafik oluşturulmuş hali. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında (a.u.: arbitrary unit)

Kanser, dünya geneline bakıldığında hızla büyüyen bir sağlık sorunudur ve kalp-damar rahatsızlıklarından sonra meydana gelen ölümlerin ikinci büyük sebebini oluşturmaktadır (Sung vd., 2021). Kanser, hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin mutasyona uğraması neticesinde hücrelerin kontrolsüz bölünmesi olarak tanımlanmaktadır (Pecorino, 2012). Tümör süpresör genlerin etkisiz hale getirilmesi, genomik kararsızlıkta eksiklik, epigenetik veya genetik mutasyonlar, onkogenlerin aşırı ifadesi, hücre içi sinyal ve apoptosis günümüzde önemli mekanizmalar olarak bilinmektedir (Imani vd., 2021). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın raporunda 2020 senesinde yaklaşık olarak 19 milyon insanın kansere yakalandığı ve 10 milyondan fazla insanın hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (Sung vd., 2021).

Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi ve kemoterapi istenilmeyen yan etkileri olan ve hayat kalitesinin düşmesine sebep olan tedavi türleridir. Ayrıca kemoterapi yöntemiyle istenilen terapötik etki elde edilemeyebilmektedir. Çoklu ilaç direnci ve vücutta bıraktığı yan etkiler tedavinin dezavantajlarından bazılarıdır. Tek bir kemoterapötik ilaçla istenilen

sonuca ulaşamadığından dolayı farklı kemoterapötik ilaç veya tedavilerin kombinasyonu uygulanmaktadır (Y. Sun vd., 2021). Kemoterapi ilaçlarının toksitelerinin yüksekliği ve maliyet fazlalığı sebebiyle etkinlikleri kısıtlıdır. Bu sebeple, en az yan etkiye sahip, güvenli ve etkili kemoterapötik ajanların kullanımı önem arz etmektedir. Paklitaksel, vinkristin ve kamptotesin gibi kimyasallar güçlü antikanser etkileri sebebiyle geliştirilmiş ve klinikte kullanılmaktadır (Rasouli vd., 2020).

Aurora kinazlar; hücre döngüsünde lokalize olmuş, kromozom dizilimi, kromozom ayrışması, sentrozom olgunlaşması ve sitokinezde görev alan düzenleyici proteinlerdir. Aşırı ekspresyonları kanser hücrelerinin değişiminde rol oynadığı için, antikanser ilaç buluşu için test edilmiş ilaç hedeflerinden biri olarak kabul edilmektedir. Aurora kinaz inhibitörleri, farklı kanser hücrelerinde apoptosisi ve hücrelerin büyümelerini indüklemektedir. Aurora kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi ve tasarımı, kanserli hücrelere olan etkilerinden dolayı antikanser ajanlar olarak büyük çapta araştırılmaktadır (Pradhan vd., 2021). Aurora kinaz B çeşitli mitotik işleve sahip Aurora kinaz çeşitidir. Kardeş kromatit uyumu, iğ düzeneğinin kontrolü, kromozom mikrotübül etkileşimi, profazdan anafaza kadar mitotik evrede ve sitokinezde sentromerlerde lokalize olmaktadır. Aurora kinaz B'nin hücre döngüsünde en aktif olduğu evre G2/M evresidir. Mitoz sırasında histon H3'ün fosforilasyonunda ve kromozomların uygun dinamiklerde dizilmesinde görev almaktadır. Aurora kinaz B'nin inhibisyonu potansiyel olarak mitoz bölünme ve kanserli hücrelerin proliferasyonunun bozulmasını sağlayabilir (Tatsuka vd., 1998; Z. Zhao vd., 2019).

Yapılan bu çalışmada, Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülünün antikanser ajan olarak tedavilerde yaygın olarak kullanılan paklitaselin sitotoksitesi üzerine olan sinerjistik etkisi araştırılmıştır. *In vitro* çalışmalarımızda MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Gerçekleştirilen sitotoksite analizleriyle paklitaksel ve BI 831266 molekülünün kombine tedavisinin tümör hücrelerinin büyümesini, gelişmesini ve çoğalmasını ne derece engelleyebildiği araştırılmıştır. Sitotoksite analizlerinin yanında apoptosisi ve hücre döngüsünde rol oynayan proteinlerin ekspresyon seviyelerine Western blot tekniğiyle bakılarak kombine tedavinin kanser hücrelerindeki etkileri incelenmiştir.

Paklitaksel oldukça güçlü bir kemoterapötik ajandır ve çoğu kanser türüne karşı ilk sırada antikanser ilacı olarak önerilmektedir. Paklitaksel, son yirmi senede kemoterapi tedavisinde en önemli ilerleme sağlamış ve taksan grubuna ait bir kemoterapi ajanıdır. Zhao (Fratantonio vd., 2019). Paklitaksel mitoz bölünme inhibitörü olarak görev yapmakta ve mesane, yumurtalık, akciğer, prostat, yemek borusu, melanom gibi çeşitli kanser türlerinde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Bethesda, 2012; Farrar and Jacobs, 2019). Paklitaksel ökaryot hücre iskeletinin önemli bir elemanı olan tübülün proteinine bağlanıp etkisini arttırarak mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Hücre, mikrotübüllerin stabilizasyonundan kaynaklı olarak hücre döngüsünün M safhasında kalır. Bunun sonucunda hücre bölünmesi inhibe edilir ve hücre apoptosise gitmektedir. Paklitaksel mitotik içciklerin yapısını bozarak kromozom kırıkları oluşturmaktadır (Farrar and Jacobs, 2019; Ntemou vd., 2022). Paklitakselin bir diğer görevi Bcl-2 proteinini inhibe ederek hücrenin apoptosise sonuçlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca, bağışıklık yanıtını aktive ederek tümörlü hücrelerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunmaktadır (Abu Samaan vd., 2019). Paklitakselle tedavinin doz sınırlayan ve en önemli yan etkisi periferik nöropati gelişimidir. Yaşanılan bu semptomlar ilacın uygulama ve klinik olarak etkinliğini sınırlamaktadır (Staff vd., 2020).

Yapılan deneyler doğrultusundaki *in vitro* çalışmalarda, Aurora kinaz B'nin inhibe edilmesinin paklitaksel üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite analizleriyle (koloni sağ-kalım ve kristal viyole analizleri) paklitaksel ve BI 831266 molekülünün kombinasyonunun anti-neoplastik kapasitesi araştırılmıştır. Ayrıca apoptosiste görev alan çeşitli belirteçlerin ekspresyon düzeyleri, Western blot yöntemiyle incelenerek gerçekleştirdiğimiz kombinasyon tedavinin, MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Kristal viyole canlılık analizi, sitotoksikitenin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem boyanan hücrelerin kalorimetrik tespiti ile canlılık düzeyleri belirlenmektedir (Itagaki vd., 1991). Kristal viyole analizlerinde BI 831266 molekülü için IC₂₅ değeri 4,498129 nM, IC₅₀ değeri 8,063072783 nM olarak hesaplanmıştır. Paklitaksel molekülü için IC₂₅ değeri 0,807710265 nM, IC₅₀ değeri ise 1,768328734 nM olarak hesaplanmıştır. Hücre canlılık analizleri neticesinde BI 831266 molekülünün MCF-7 meme kanseri hücre

hattı üzerindeki hücre canlılığı kontrol gruplarıyla kıyaslanmıştır. BI 831266 molekülünün artan dozlarda hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Hücre canlılık yüzdeleri kontrole göre 7,5 nM BI 831266 tedavisi %50,7 ve 10 nM BI 831266 tedavisi %43,8 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1.A). Paklitakselin 1 saatlik akut tedavisi için ise bu oranlar kontrole göre 1,5 nM %50,4, 2 nM %40,7 ve 3 nM %34,4 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1.B). Yapılan mono tedavilerin ardından BI 831266 ve paklitakselin kombinasyon tedavilerine bakıldığında BI 831266 molekülü sabit tutulup (7,5 nM) artan dozlarda (1-1,5-2-3-5 nM) paklitaksel ile tedavi edilmiştir. Canlılık yüzdelerine bakıldığında sırasıyla %50,5, %43,2, %36,7, %31,2, %23,6 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.A). Paklitaksel molekülü sabit tutulup (1,5 nM) artan dozlarda (1-5-7,5 nM) BI 831266 ile tedavi edilmiştir. Canlılık yüzdelerine bakıldığında sırasıyla %50,2, %43,5, %31,4, %23 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.B). Yapılan analiz sonucunda, kombinasyon tedavilerinin mono tedavilere kıyasla MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksitenin arttığı saptanmıştır. Bu durumda BI 831266 molekülü ve paklitaksel kombinasyonunun sinerjistik bir etki gösterdiği görülmektedir. Fujioka vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada MCF-7 hücre hattı kullanılarak paklitaksel tedavisi uygulanmıştır. Yapılan hücre canlılığı deneyinde paklitaksel IC50 dozu 1,5 nM olarak bulunmuştur (Fujioka vd., 2017). Bu çalışmalar da bizim yaptığımız deneyleri destekler niteliktedir.

Koloni sağ-kalım analizi; tek bir hücrenin bir koloni (en az elli hücre) oluşturma yeteneğine dayanan *in vitro* hücre sağ-kalım analizidir. Çeşitli kimyasal maddelerin sitotoksite analizinin belirlenmesinde ve etkin ilaç taraması için kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Franken vd., 2006). Çalışmamız doğrultusunda yaptığımız *in vitro* analizlerde, Aurora kinaz B inhibisyonunun paklitakselin sitotoksitesi üzerine olan etkisi araştırıldı. Kombinasyon deneyleri öncesinde BI 831266 molekülü ve paklitaksel molekülünün MCF-7 hücreleri üzerindeki koloni yapma kapasiteleri belirlendi. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde BI 831266 molekülü ile paklitaksel molekülünün IC25 ve IC50 sitotoksik doz değerleri koloni sağ-kalım analiziyle belirlendi. MCF-7 meme kanseri hücrelerine BI 831266 molekülü; kontrol grubu, (1-5-7,5-10 nM) olacak şekilde 5 grup oluşturularak uygulandı (Şekil 4.3). MCF-7 hücreleri ekildikten 24 saat sonrasında belirlenen dozlar ile 24 saat boyunca tedavi edildi ve tedavi sonlandırılarak hücreler 14 gün boyunca inkübe edildi. 14. Günün sonunda hücreler boyanarak deney sonlandırıldı. Aurora kinaz B aktivitesi engellenen MCF-7 kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi

kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı. MCF-7 hücrelerinin BI 831266 molekülü ile 1 nM tedavi edildiğinde koloni yapma kapasitesinin %78, 5 nM ile tedavi edildiğinde %61, 7,5 nM ile tedavi edildiğinde %47 ve 10 nM ile tedavi edildiğinde ise %23 olduğu tespit edildi. 24 saat süresince BI 831266 molekülüyle tedavi edilen hücrelerin artan dozlara bağlı olarak koloni sayılarının azaldığı ve BI 831266 molekülünün koloni yapma kapasitesini engellediği görüldü. BI 831266 molekülünün koloni sağ kalım analizi IC25 değerinin 1,43 nM, IC 50 değerinin ise 7,464 nM olduğu tespit edildi. Paklitaksel (kontrol grubu-0,5-1-1,5-3 nM) olacak şekilde 5 grup oluşturularak uygulandı (Şekil 4.4). Hücre ekiminden 24 saat sonra belirlenen dozlar uygulanarak MCF-7 hücreleri 1 saat boyunca paklitaksel ile tedavi edildi ve 1 saatin sonunda tedavi sonlandırılarak hücreler 14 gün boyunca inkübe edildi. 14. Günün sonunda hücreler boyanarak deney sonlandırıldı. MCF-7 hücrelerinin paklitaksel molekülü ile 0,5 nM tedavi edildiğinde koloni yapma kapasitesinin %96, 1 nM ile tedavi edildiğinde %89, 1,5 nM ile tedavi edildiğinde %52 ve 3 nM ile tedavi edildiğinde ise %30 olduğu tespit edildi. 1 saatlik paklitaksel ile tedavi edilen hücrelerin artan dozlara bağlı olarak koloni sayılarının azaldığı ve paklitakselin koloni yapma kapasitesini engellediği görülmüştür.

Khongkow vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada artarak uygulanan paklitaksel dozlarıyla birlikte koloni oluşumunun azaldığı görülmektedir (Khongkow vd., 2016). Sonuç olarak paklitaksel molekülünün koloni sağ kalım analizi IC25 değerinin 1,133 nM, IC50 değerinin ise 1,604 nM olduğu tespit edildi (The Quest Graph™ IC50 Calculator (Sebaugh, 2011)). Bu çalışmalar da bizim bulduğumuz sonuçları destekler niteliktedir.

Gerçekleştirdiğimiz kombinasyon deneylerinde, güçlü bir genotoksik kapasiteye sahip olan paklitaksel molekülünün IC50 değeri sabit tutuldu ve artan dozlarda BI 831266 molekülü kullanılan kombinasyon tedaviler uygulandı (yaklaşık paklitaksel IC50 1,5 ng/mL). Kemoterapötik ajanların ve küçük molekül inhibitörlerin *in vitro* ortamda kombinasyon etkinliklerini test eden çeşitli raporlarda en az 16 saatlik kimyasal inhibisyonun ardından kemoterapötik stresin uygulanmasının daha sinerjik bir etki gösterdiği dikkate alınarak (Y. Zhao vd., 2006), kombinasyon deneylerimizde, 23 saatlik Aurora kinaz B inhibisyonunun neticesinde 1 saat akut paklitaksel tedavisi uygulandı.

Kombinasyon analizleri için 2 farklı strateji uygulandı. Birinci strateji kombinasyon deneylerinde, MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat süreyle 7,5 nM BI 831266 tedavisi uygulandı. Ertesi gün hücreler, BI 831266 tedavisine ilave olarak 1 saat süreyle (tedavinin 23. Saatinde) artan dozlarda (0–0,5–1–1,5 nM) paklitaksel tedavisi uygulandı. Devam eden süre boyunca hücrelerin klonojenik sağ-kalım kapasiteleri karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Şekil 4.6’da yapılan analizlerdeki kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında 7,5 nM BI 831266 molekülünün monoterapi tedavisinin uygulandığı grupta koloni sağ-kalımının yaklaşık olarak %50 oranında azaldığı gözlemlendi. 7,5 nM BI 831266 monoterapi uygulanan grupla kıyaslandığında, 7,5 nM BI 831266 ve 0,5 nM paklitaksel kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalımını yaklaşık %27’ye düşürdüğü tespit edildi (Şekil 4.6). Tedavi uygulanmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında 0,5 nM paklitakselin bireysel tedavisinin meme kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalımının yaklaşık %96 olduğu dikkate alındığında (Şekil 4.4), elde edilen sonuçların Aurora kinaz B inhibisyonunun paklitaksel tedavisinin sitotoksik potansiyelini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı değerlendirildi. Benzer şekilde, kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, 1 ve 1,5 nM paklitaksel mono tedavilerinin koloni oluşturma kapasitelerinin sırasıyla yaklaşık %89 ve %52’ye düşürdüğü (Şekil 4.4), 7,5 nM BI 831266 kombinasyonunun ise bu oranları sırasıyla %23 ve %21’e düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.6).

İkinci strateji kombinasyon deneylerinde, ilgili MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat süreyle artan dozlarda (0–1–5–10 nM) BI 831266 tedavisi uygulandı. Ertesi gün hücreler, BI 831266 tedavisine ilave olarak (tedavinin 23.saatinde) 1 saat süreyle 1,5 nM paklitaksel tedavisine maruz bırakıldı ve devam eden süre boyunca hücrelerin koloni sağ-kalım kapasiteleri karşılaştırıldı. Şekil 4.7 incelendiğinde, tedavi uygulanmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında, 1 ve 5 nM BI 831266 tedavilerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalım kapasitesini sırasıyla yaklaşık %78 ve %61’e düşürdüğü (Şekil 4.3), diğer taraftan, 1,5 nM paklitaksel kombinasyonunun bu oranları sırasıyla yaklaşık %61 ve %33’e düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.7). Benzer şekilde, 1,5 nM paklitaksel ve 10 nM BI 831266 tedavisi uygulanan kanser hücrelerinin koloni sağ-kalım kapasitesinin de anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.7).

Çalışmalarda elde edilen veriler doğrultusunda, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülünün paklitaksel tedavisinin sitotoksitesini anlamlı

derecede arttırdığını gösterdi. BI 831266 ve paklitaksel ile 24 saat tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki apoptotik protein seviyeleri (p53, p21, c-PARP, BCL-2), Western blot analiziyle ekspresyon düzeylerine bakılarak karşılaştırıldı. Tubulin proteinine normalize edilerek protein seviyelerindeki değişimler artma azalma durumlarına göre değerlendirildi.

P53 proteini çok sayıda genin ekspresyon seviyelerini düzenleyerek farklı hücresel yollarda rol alan, genomun koruyucusu olarak bilinen ve tümör süpressör olarak görev yapan transkripsiyon faktörüdür. DNA’da hasar meydana geldiği zaman hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayarak DNA hasarını tamir edebilmek için hasarlı bölgeye gerekli proteinlerin toplanmasını düzenlemektedir. DNA hasarı tamir edilemediği zaman pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerini regüle ederek hücrenin apoptosise yönlendirilmesini sağlamaktadır (Gundogdu ve Hergovich, 2022; Kulaberoglu ve Hergovich, 2023). P53 proteini hücre döngüsünü durdurarak p21, kaspaz-8 ve DR5 gibi tümör süpressör genlerin aktivitesi ile hücreyi apoptosise yönlendirerek kanser hücrelerin çoğalmasını inhibe etmektedir (Feng vd., 2020). Gerçekleştirdiğimiz Western blot analizlerinde, tedavi uygulanmayan kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, paklitaksel ve BI 831266 ile tedavi edilen hücrelerde (kombinasyon-2 hariç) p53 proteininin ekspresyon seviyesinin arttığı belirlendi. Ayrıca paklitaksel tedavisinin BI 831266 molekülüyle olan tedaviye kıyasla daha fazla p53 ekspresyonuna neden olduğu belirlendi (Şekil 4.8). Shi vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattında 20 nM paklitaksel tedavisi uygulanmıştır. Uygulanan tedavi sonrasında p53 ekspresyon miktarının kontrole kıyasla arttığı gözlenmiştir (Shi vd., 2015). Bizim yaptığımız çalışmada 20 nM paklitaksel tedavisi uygulanmış olup p53 miktarının arttığı gözlenmiştir. Shi vd. (2015) yapmış oldukları çalışma bizim yaptığımız çalışmayı desteklemektedir. P21 proteini anti-proliferatif olarak etki eden ve hücre döngüsü inhibisyonunda görev alan bir proteindir. Hücre döngüsünü durdurma görevini p53 proteininin aktivitesine bağlı olarak gerçekleştirmektedir. P21 siklin bağımlı kinazları (CDK) inhibe ederek etkisiz hale getiren bir proteindir. Bu sebeple p53 proteininin aktivitesi doğrultusunda p21 seviyesi yükselir ve p21 tarafından CDK’lar inhibe edilerek hücre döngüsünün G1 ve G2 safhasında durdurulması kontrol edilmektedir (Mansilla vd., 2020; Shamloo and Usluer, 2019). P21 proteinine bakıldığında, paklitaksel ve BI 831266 ile tedavi edilen hücrelerde kontrole kıyasla BI 831266 molekülünün 10 nM’lık mono tedavisi hariç ekspresyon seviyesinin

proteinlerini sınırlamaktadır (Kalonı vd., 2023). Farklı dozlarda paklitaksel ve/veya BI 831266 tedavisine maruz bırakılan hücrelerdeki anti-apoptotik BCL-2 proteininin ekspresyonu incelendiğinde; kontrole kıyasla paklitaksel 20 nM ile tedavide ve BI 831266 10 nM ile tedavide artış olduğu, BI 831266 ile 50 nM ve kombinasyon tedavilerinde ise azalış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Quispe-Sato and Calaf (2016)'nın yapmış olduğu çalışmada MCF-7 hücrelerinde paklitaksel (120 nM) ve curcumin (30 µM) tedavileri uygulanmıştır. BCL-2 protein ekspresyonlarının kontrole kıyasla kombinasyon tedavide azaldığı saptanmıştır (Quispe-Soto and Calaf, 2016). Bizim de yaptığımız çalışmada kombinasyon tedavisinde benzer bir şekilde kontrole kıyasla BCL-2 ekspresyon miktarı azalmaktadır. Paklitaksel mono tedavisindeki (20 nM) BCL-2 miktarının artışı akut tedaviye bağılı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Aurora kinazlar, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında lokalize olmuş serin/treonin kinaz ailesidir. Kromozom hizalanması, kromozom dağılımı, sentrozom olgunlaşması ve sitokinezde rol oynamaktadırlar (Borisa and Bhatt, 2017). Aurora kinazların inhibisyonu antikanser tedavilerde uygulanan etkili bir stratejidir. AZD1152, Hesperadin, MLN8237 ve VX680 dahil olmak üzere çok sayıda farklı Aurora kinaz inhibitörleri keşfedilmiştir. 30'dan fazla Aurora kinaz inhibitörü klinik çalışmaların farklı aşamalarında, ancak henüz FDA' dan klinikte kullanım için onay almamışlardır (Xie vd., 2013). Aurora kinaz B farklı tümör hücrelerinde anormal seviyede eksprese edilmekte ve bu sebepten dolayı anti-kanser tedavisi için umut verici bir hedeftir (M. Li vd., 2021).

Aurora kinaz B'nin aşırı ekspresyonu prostat, kolon, baş, boyun, tiroid, endometriyum gibi kanserlerde oldukça fazladır (Takeshita vd., 2013). Aurora kinaz B aktivitesinin baskılanması; mitozdan anormal çıkışa, poliploid hücre oluşumuna, sitokinez başarısızlığına ve sonuç olarak hücrelerin apoptosisine sebep olur (Borisa and Bhatt, 2017). Anti-kanser ilaçlar kanser hücrelerinde yüksek oranda işlev göstererek kanser hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca ilacın dozu arttırıldıkça hızlı çoğalan sağlıklı hücrelere etki ettiği ve tümör hücrelerinin direnç kazanma riski gibi olumsuz sonuçlar çıkabilmektedir. Bu sebeple konvansiyonel anti-kanser ilaçların küçük molekül inhibitörlerle veya doğal bileşiklerle kombine edilerek uygulanması görülebilecek yan etkileri en aza indirmeyi ve daha iyi bir klinik başarıyı vadetmektedir. Aurora kinaz inhibitörlerinin farklı kemoterapi ilaçları ile kombine halde eş zamanlı inhibisyonun daha iyi bir klinik sonuç elde etmek ve oluşacak yan etkileri en aza indirmek için uygulanabilecek iyi bir strateji olabileceği rapor edilmiştir (Bavetsias and Linardopoulos, 2015).

Sonuç olarak, BI 831266 molekülü aracılığıyla Aurora kinaz B inhibisyonunun klinikte yaygın bir şekilde kullanılan kemoterapi ajanı paklitaksel ile kombinasyonunun test edildiği tez çalışmamızda elde edilen bulgular, BI 831266 molekülünün paklitakselin sitotoksik kapasitesini arttırabileceğini gösterdi. Gelecekte farklı hücre hatlarıyla yapılacak

pre-klinik çalışmalar ve deney hayvanlarıyla gerçekleştirilecek *in vivo* araştırmalarla BI 831266 ve paklitaksel arasındaki sinerjik ilişkinin teyit edilmesi, klinikteki hastalara daha başarılı tedavi imkânlarının sunulmasını sağlayabilecektir.



KAYNAKLAR

- Baudino, T. A. (2015). Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current drug discovery technologies*, 12(1), 3–20.
- Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., and Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, 9(12), 789.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322–1326.
- Adams, J. M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01740-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01740-0).
- Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences*, 26(6), 390–397.
- Ahmed Khalil, A., Rauf, A., Alhumaydhi, F. A., Aljohani, A. S. M., Javed, M. S., Khan, M. A., Khan, I. A., El-Esawi, M. A., Bawazeer, S., and Bouyahya, A. (2022). Recent Developments and Anticancer Therapeutics of Paclitaxel: An Update. *Current Pharmaceutical Design*, 28(41), 3363–3373.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, 3(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00235-0).
- Baldini, E., D'Armiento, M., and Ulisse, S. (2014). A new aurora in anaplastic thyroid cancer therapy. *International journal of endocrinology*, 2014.
- Baloglu, E., Hoch, J. M., Chatterjee, S. K., Ravindra, R., Bane, S., and Kingston, D. G. I. (2003). Synthesis and biological evaluation of C-3' NH/C-10 and C-2/C-10 modified paclitaxel analogues. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 11(7), 1557–1568.
- Barbuti, A. M., and Chen, Z. S. (2015). Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers*, 7(4), 2360–2371.
- Bavetsias, V., and Linardopoulos, S. (2015). Aurora kinase inhibitors: Current status and outlook. *Frontiers in Oncology*, 5(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00278>.
- Benedict, B., Harn, T. Van, Dekker, M., Hermsen, S., Kucukosmanoglu, A., Pieters, W., and Delzenne-goette, E. (2018). Loss of p53 suppresses replication-stress- induced DNA breakage in G1 / S checkpoint deficient cells. 1–25.

Bernabeu, E., Cagel, M., Lagomarsino, E., Moretton, M., and Chiappetta, D. A. (2017). Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. *International journal of pharmaceutics*, 526(1–2), 474–495.

Bethesda, L. (2012). Clinical and Research Information on Drug-Induced liver injury [Internet]. *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*.

Borah, N. A., and Reddy, M. M. (2021). Aurora kinase B inhibition: A potential therapeutic strategy for cancer. *Molecules*, 26(7), 1–30. <https://doi.org/10.3390/molecules26071981>.

Borisa, A. C., and Bhatt, H. G. (2017). A comprehensive review on Aurora kinase: Small molecule inhibitors and clinical trial studies. *European journal of medicinal chemistry*, 140, 1–19.

Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., and Plénat, F. (2009). Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(4), 289–300.

Campbell, N. A., Reece, J. B., Meyers, N., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V, and Jackson, R. B. (2006). Biology: Australian Version. *New South Wales, Australia: Prentice Education Australia*, 955–972.

Carlton, J. G., Jones, H., and Eggert, U. S. (2020). Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(3), 151–166.

Carmena, M., Ruchaud, S., and Earnshaw, W. C. (2009). Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Current opinion in cell biology*, 21(6), 796–805.

Chhikara, B. S., Parang, K., and Etters, L. (2023). *Global Cancer Statistics 2022 : the trends projection analysis*. 10(1), 1–16.

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*, 58(3), 621–681.

Ciccica, A., and Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40(2), 179–204.

Cromie, G. A., Connelly, J. C., and Leach, D. R. F. (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular cell*, 8(6), 1163–1174.

Cycle, C. (2008). *Hücre siklusu ve kanser*. 9(3), 51–61.

Cycle, T. C. (2000). *O ncologist*. 510–513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>.

Dennis, M., Davies, M., Oliver, S., Souza, R. D., Pike, L., and Stockman, P. (2012). *Phase I study of the Aurora B kinase inhibitor barasertib (AZD1152) to assess the pharmacokinetics , metabolism and excretion in patients with acute myeloid leukemia.* 461–469. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-1939-2>.

DiPippo, A. J., Patel, N. K., and Barnett, C. M. (2016). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Pharmacotherapy*, 36(6), 652–667. <https://doi.org/10.1002/phar.1756>.

Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S. S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology*, 161(2), 267–280.

Dittrich, C., Fridrik, M. A., Koenigsberg, R., Lee, C., Goeldner, R. G., Hilbert, J., and Greil, R. (2015). A phase 1 dose escalation study of BI 831266, an inhibitor of Aurora kinase B, in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*, 33, 409–422.

Ducat, D., and Zheng, Y. (2004). Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Experimental cell research*, 301(1), 60–67.

Duffy, M. J., and Crown, J. (2008). A personalized approach to cancer treatment: How biomarkers can help. *Clinical Chemistry*, 54(11), 1770–1779. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.110056>.

Farrar, M. C., and Jacobs, T. F. (2019). *Paclitaxel*.

Feng, L., Li, J., Li, F., Li, H., Bei, S., Zhang, X., and Yang, Z. (2020). Long noncoding RNA VCAN-AS1 contributes to the progression of gastric cancer via regulating p53 expression. *Journal of cellular physiology*, 235(5), 4388–4398.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., and Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315–2319.

Fratantonio, D., Molonia, M. S., Bashllari, R., Muscarà, C., Ferlazzo, G., Costa, G., Saija, A., Cimino, F., and Speciale, A. (2019). Curcumin potentiates the antitumor activity of Paclitaxel in rat glioma C6 cells. *Phytomedicine*, 55, 23–30.

Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., and Zhang, C. (2007). Roles of aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0208>.

Fujioka, H., Sakai, A., Tanaka, S., Kimura, K., Miyamoto, A., Iwamoto, M., and Uchiyama, K. (2017). Comparative proteomic analysis of paclitaxel resistance-related proteins in human breast cancer cell lines. *Oncology letters*, 13(1), 289–295.

Ghatage, D. D., Gosavi, S. R., Ganvir, S. M., and Hazarey, V. K. (2012). Apoptosis: molecular mechanism. *Journal of Orofacial Sciences*, 4(2), 103–107.

Gibcus, J. H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M. T., Xie, L., Paulson, J. R., and Earnshaw, W. C. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*, 359(6376), eaao6135.

Gillet, L. C. J., and Schärer, O. D. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical reviews*, 106(2), 253–276.

Gollner, A., Heine, C., and Hofbauer, K. S. (2023). Kinase Degradors, Activators, and Inhibitors: Highlights and Synthesis Routes to the Chemical Probes on opnMe. com, Part 1. *ChemMedChem*, e202300031.

Gomez, V., Gundogdu, R., Gomez, M., Hoa, L., Panchal, N., O'Driscoll, M., and Hergovich, A. (2015). Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2. *Cellular signalling*, 27(2), 326–339.

Grimme, J. M., Honda, M., Wright, R., Okuno, Y., Rothenberg, E., Mazin, A. V, Ha, T., and Spies, M. (2010). Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52–ssDNA complexes. *Nucleic acids research*, 38(9), 2917–2930.

Groelly, F. J., Fawkes, M., Dagg, R. A., Blackford, A. N., and Tarsounas, M. (2023). Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 23(2), 78–94.

Gundogdu, R., Erdogan, M. K., Ditsiou, A., Spanswick, V., Garcia-Gomez, J. J., Hartley, J. A., Esashi, F., Hergovich, A., and Gomez, V. (2021). hMOB2 deficiency impairs homologous recombination-mediated DNA repair and sensitises cancer cells to PARP inhibitors. *Cellular Signalling*, 87, 110106.

Gundogdu, R., and Hergovich, A. (2022). *Genome Stability (Second Edition) Chapter 14 - Cell cycle control and DNA-damage signaling in mammals*. 26, 1–2.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57–70.

Hansen, R. J., Ludeman, S. M., Paikoff, S. J., Pegg, A. E., and Dolan, M. E. (2007). Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. *DNA repair*, 6(8), 1145–1154.

Hendrickson, E. A. (1997). Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *The American Journal of Human Genetics*, 61(4), 795–800.

Hnízda, A., and Blundell, T. L. (2019). Multicomponent assemblies in DNA-double-strand break repair by NHEJ. *Current opinion in structural biology*, 55, 154–160.

Hochegger, H., Hégarat, N., and Pereira-Leal, J. B. (2013). Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle. *Open biology*, 3(3), 120185.

Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *nature*, 411(6835), 366–374.

Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485.

Honda, R., Korner, R., and Nigg, E. A. (2003). Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Molecular biology of the cell*, 14(8), 3325–3341.

Hu, Y., Zhang, J., Musharrafieh, R., Hau, R., and Ma, C. (2017). *Chemical Genomics Approach Leads to the Identification of Hesperadin , an Aurora B Kinase Inhibitor , as a Broad-Spectrum Influenza Antiviral*. 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms18091929>.

Ichim, G., and Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539–548.

Imani, A., Maleki, N., Bohlouli, S., Kouhsoltani, M., Sharifi, S., and Maleki Dizaj, S. (2021). Molecular mechanisms of anticancer effect of rutin. *Phytotherapy Research*, 35(5), 2500–2513.

Itagaki, H., Hagino, S., Kato, S., Kobayashi, T., and Umeda, M. (1991). An in vitro alternative to the draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. *Toxicology in vitro*, 5(2), 139–143.

Iyama, T., and Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620–636.

Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078.

Jekimovs, C., Bolderson, E., Suraweera, A., Adams, M., O’Byrne, K. J., and Richard, D. J. (2014). Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. *Frontiers in oncology*, 4, 86.

Jeppesen, D. K., Bohr, V. A., and Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, 94(2), 166–200.

Jia, Y., Wang, X., Deng, Y., Li, S., Xu, X., Qin, Y., and Peng, L. (2023). Pyroptosis Provides New Strategies for the Treatment of Cancer. *Journal of Cancer*, 14(1), 140–151.

Kaloni, D., Diepstraten, S. T., Strasser, A., and Kelly, G. L. (2023). BCL-2 protein family: Attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis*, 28(1–2), 20–38.

- Khongkow, P., Gomes, A. R., Gong, C., Man, E. P. S., Tsang, J. W. H., Zhao, F., Monteiro, L. J., Coombes, R. C., Medema, R. H., and Khoo, U. S. (2016). Paclitaxel targets FOXM1 to regulate KIF20A in mitotic catastrophe and breast cancer paclitaxel resistance. *Oncogene*, 35(8), 990–1002.
- Kitzen, J. J. E. M., Jonge, M. J. A. De, and Verweij, J. (2010). *Aurora kinase inhibitors*. 73(March 2009), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.03.009>.
- Kollareddy, M., Zheleva, D., Dzubak, P., Brahmshatriya, P. S., Lepsik, M., and Hajduch, M. (2012). Aurora kinase inhibitors: Progress towards the clinic. *Investigational New Drugs*, 30(6), 2411–2432. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9798-6>.
- Krokan, H. E., and Bjørås, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a012583.
- Kulaberoglu, Y., and Hergovich, A. (2023). Chapter 15 - The role of p53 / p21 / p16 in DNA damage signaling and DNA repair. 26, 1–2.
- Lee, I. G., and Lee, B. J. (2023). Aurora Kinase A Regulation by Cysteine Oxidative Modification. *Antioxidants*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020531>.
- Lens, S. M. A., and Medema, R. H. (2003). The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(6), 507–510. <https://doi.org/10.4161/cc.2.6.559>.
- Lens, S. M. A., Voest, E. E., and Medema, R. H. (2010). Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(12), 825–841.
- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell research*, 18(1), 85–98.
- Li, J., Wang, R., Kong, Y., Broman, M. M., Carlock, C., Chen, L., Li, Z., Farah, E., Ratliff, T. L., and Liu, X. (2017). Targeting Plk1 to enhance efficacy of olaparib in castration-resistant prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 16(3), 469–479.
- Li, M., Liu, H., Zhao, Q., Han, S., Zhou, L., Liu, W., Li, W., and Gao, F. (2021). Targeting Aurora B kinase with Tanshinone IIA suppresses tumor growth and overcomes radioresistance. *Cell Death and Disease*, 12(2), 152.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massagué, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21 Cip1. *Nature*, 375, 159–161.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), 630–641.
- Mansilla, S. F., De La Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., and Gottifredi, V. (2020). CDK-independent and PCNA-dependent functions of p21 in DNA replication. *Genes*, 11(6), 593.

Martin, S. A., Lord, C. J., and Ashworth, A. (2010). Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. *Clinical cancer research*, 16(21), 5107–5113.

Mashimo, M., Onishi, M., Uno, A., Tanimichi, A., Nobeyama, A., Mori, M., Yamada, S., Negi, S., Bu, X., Kato, J., Moss, J., Sanada, N., Kizu, R., and Fujii, T. (2021). The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100046. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014479>.

Mattei, J. C., Bouvier-Labit, C., Barets, D., Macagno, N., Chocry, M., Chibon, F., Morando, P., Rochwerger, R. A., Duffaud, F., and Olschwang, S. (2020). Pan aurora kinase inhibitor: a promising targeted-therapy in dedifferentiated liposarcomas with differential efficiency depending on sarcoma molecular profile. *Cancers*, 12(3), 583.

Mei, M., Xie, D., Zhang, Y., Jin, J., You, F., Li, Y., Dai, J., and Chen, X. (2014). A new 2 α , 5 α , 10 β , 14 β -tetraacetoxy-4 (20), 11-taxadiene (SIA) derivative overcomes paclitaxel resistance by inhibiting MAPK signaling and increasing paclitaxel accumulation in breast Cancer cells. *PloS one*, 9(8), e104317.

Mens, M. M. J., and Ghanbari, M. (2018). Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs. *Stem cell reviews and reports*, 14, 309–322.

Morales, J., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., Gao, J., and Boothman, D. A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1).

Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino, H., Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S. (2010). Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of nucleic acids*, 1-32.

Mountzios, G., Terpos, E., and Dimopoulos, M.A. (2008). Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer treatment reviews*, 34(2), 175–182.

Murai, J., Huang, S. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshov, J. H., Ji, J., Takeda, S., and Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer research*, 72(21), 5588–5599.

Nan, G., Zhao, S., Wang, T., Chao, D., Tian, R., Wang, W., Fu, X., Lin, P., Guo, T., and Wang, B. (2022). *CD147 supports paclitaxel resistance via interacting with*. November p41388-021-02143-3 2021. <https://doi.org/10.1038/>.

Nowosielska, A. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 483–494.

Ntemou, E., Vidal, P. D., Alexandri, C., Van den Steen, G., Lambertini, M., and Demeestere, I. (2022). Ovarian toxicity of carboplatin and paclitaxel in mouse carriers of mutation in BRIP1 tumor suppressor gene. *Scientific reports*, 12(1), 1658.

Okada, H., and Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 4(8), 592–603.

Pan, S. (2015). *Danuserib , a potent pan-Aurora kinase and ABL kinase inhibitor , induces cell cycle arrest and programmed cell death and inhibits epithelial to mesenchymal transition involving the PI3K / Akt / mTOR-mediated signaling pathway in human gastric cancer AGS*. 1293–1318.

Parker, C., Chambers, A. C., Flanagan, D. J., Ho, J. W. Y., Collard, T. J., Ngo, G., Baird, D. M., Timms, P., Morgan, R. G., and Sansom, O. J. (2022). BCL-3 loss sensitises colorectal cancer cells to DNA damage by targeting homologous recombination. *DNA repair*, 115, 103331.

Pazzaglia, S., and Pioli, C. (2019). Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. *Cells*, 9(1), 41.

Pecorino, L. (2012). Stem cells for cell-based therapies. *ActionBioscience*.

Peleg Hasson, S., Menes, T., and Sonnenblick, A. (2020). Comparison of patient susceptibility genes across breast cancer: Implications for prognosis and therapeutic outcomes. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 227–238.

Peraza-Vega, R. I., Valverde, M., and Rojas, E. (2022). Interactions between miRNAs and Double-Strand Breaks DNA Repair Genes, Pursuing a Fine-Tuning of Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3231.

Polacchini, A., Albani, C., Baj, G., Colliva, A., Carpinelli, P., and Tongiorgi, E. (2016). *Combined cisplatin and aurora inhibitor treatment increase neuroblastoma cell death but surviving cells overproduce BDNF*. 899–907. <https://doi.org/10.1242/bio.016725>.

Portella, G., Passaro, C., and Chieffi, P. (2011). Aurora B: A New Prognostic Marker and Therapeutic Target in Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 18(4), 482–496. <https://doi.org/10.2174/092986711794480203>.

Pradhan, T., Gupta, O., Singh, G., and Monga, V. (2021). Aurora kinase inhibitors as potential anticancer agents: Recent advances. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 221, 113495.

Pucci, B., Kasten, M., and Giordano, A. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, 2(4), 291–299.

Quartuccio, S. M., and Schindler, K. (2015). Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(AUG). <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00050>.

Quispe-Soto, E. T., and Calaf, G. M. (2016). Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis. *International journal of oncology*, 49(6), 2569–2577.

Rasouli, S., Montazeri, M., Mashayekhi, S., Sadeghi-Soureh, S., Dadashpour, M., Mousazadeh, H., Nobakht, A., Zarghami, N., and Pilehvar-Soltanahmadi, Y. (2020). Synergistic anticancer effects of electrospun nanofiber-mediated codelivery of Curcumin and Chrysin: Possible application in prevention of breast cancer local recurrence. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101402.

Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and molecular life sciences*, 66, 981–993.

Roskoski Jr, R. (2019). Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacological research*, 139, 471–488.

Ruvolo, P. P., Deng, X., and May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15(4), 515–522.

Sajjadi, M., Rassouli, M., Abbaszadeh, A., Brant, J., and Majd, H. A. (2016). Lived experiences of “illness uncertainty” of Iranian cancer patients: A phenomenological hermeneutic study. *Cancer nursing*, 39(4), E1–E9.

Sameer, A. S., Nissar, S., and Fatima, K. (2014). Mismatch repair pathway. *European journal of cancer prevention*, 23(4), 246–257.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 39–85.

Sasai, K., Katayama, H., Hawke, D. H., and Sen, S. (2016). Aurora-C interactions with survivin and INCENP reveal shared and distinct features compared with Aurora-B chromosome passenger protein complex. *PLoS One*, 11(6), e0157305.

Schaaper, R. M. (1993). Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 23762–23765.

Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>

Shamloo, B., and Usluer, S. (2019). p21 in cancer research. *Cancers*, 11(8), 1178.

Shi, Y., Sun, L., Chen, G., Zheng, D., Li, L., and Wei, W. (2015). A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines. *Targeted oncology*, 10, 565–573.

Shrivastav, M., De Haro, L. P., and Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), 134–147.

- Singla, A. K., Garg, A., and Aggarwal, D. (2002). Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*, 235(1–2), 179–192.
- Škubník, J., Pavlíčková, V. S., Ruml, T., and Rimpelová, S. (2023). Autophagy in cancer resistance to paclitaxel: Development of combination strategies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 161, 114458.
- Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1–2), 231–251.
- Staff, N. P., Fehrenbacher, J. C., Caillaud, M., Damaj, M. I., Segal, R. A., and Rieger, S. (2020). Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. *Experimental neurology*, 324, 113121.
- Su, T. T. (2006). Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 187–208.
- Sun, P., Wu, H., Huang, J., Xu, Y., Yang, F., Zhang, Q., and Xu, X. (2018). Porcine epidemic diarrhea virus through p53-dependent pathway causes cell cycle arrest in the G0/G1 phase. *Virus research*, 253, 1–11.
- Sun, Y., Liu, Y., Ma, X., and Hu, H. (2021). *The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy*. 1–25.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
- Taatjes, D. J., Sobel, B. E., and Budd, R. C. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry and cell biology*, 129, 33–43.
- Takeshita, M., Koga, T., Takayama, K., Ijichi, K., Yano, T., Maehara, Y., Nakanishi, Y., and Sueishi, K. (2013). Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 80(1), 85–90.
- Tatsuka, M., Katayama, H., Ota, T., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F., and Terada, Y. (1998). Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora-and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer research*, 58(21), 4811–4816.
- Tian, H., Gao, Z., Li, H., Zhang, B., Wang, G., Zhang, Q., Pei, D., and Zheng, J. (2015). DNA damage response—a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. *Cancer letters*, 358(1), 8–16.

Toy, Y., Gündoğdu, R., Sever, A., and Erdoğan, M. K. (2022). Defektif Homolog Rekombinasyon DNA Tamiri ve PARP İnhibisyonu Arasındaki Sentetik Letal Etkileşim. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2459–2475.

Truglio, J. J., Croteau, D. L., Van Houten, B., and Kisker, C. (2006). Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chemical reviews*, 106(2), 233–252.

Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Nikanjam, M., and Kurzrock, R. (2020). Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer treatment reviews*, 86, 102019.

Vader, G., and Lens, S. M. A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1786(1), 60–72.

Van Houten, B. (1990). Nucleotide excision repair in Escherichia coli. *Microbiological reviews*, 54(1), 18–51.

Wallace, S. S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. *DNA repair*, 19, 14–26.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., and McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327.

Weimer, A. K., Demidov, D., Lermontova, I., Beeckman, T., and Van Damme, D. (2016). Aurora kinases throughout plant development. *Trends in plant science*, 21(1), 69–79.

Wenzel, E. S., and Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo*, 32(1), 1–5.

Williams, G. H., and Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*, 226(2), 352–364.

Wu, L., Ma, C. A., Zhao, Y., and Jain, A. (2011). Aurora B interacts with NIR-p53, leading to p53 phosphorylation in its DNA-binding domain and subsequent functional suppression. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2236–2244.

Wu, X., Wu, J., Hu, W., Wang, Q., Liu, H., Chu, Z., Lv, K., and Xu, Y. (2020). *MST4 Kinase Inhibitor Hesperadin Attenuates Autophagy and Behavioral Disorder via the MST4 / AKT Pathway in Intracerebral Hemorrhage Mice*. 2020.

Xie, H., Lee, M.H., Zhu, F., Reddy, K., Peng, C., Li, Y., Lim, D. Y., Joon Kim, D., Li, X., and Kang, S. (2013). Identification of an Aurora kinase inhibitor specific for the Aurora B isoform. *Cancer research*, 73(2), 716–724.

Yamauchi, T., Uzui, K., Shigemi, H., Negoro, E., Yoshida, A., and Ueda, T. (2013). *Aurora B inhibitor barasertib and cytarabine exert a greater-than-additive cytotoxicity in acute myeloid*. <https://doi.org/10.1111/cas.12164>.

Yasutis, K. M., and Kozminski, K. G. (2013). *Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion*. 1501–1509.

Yeung, S. C., Gully, C., and Lee, M. H. (2008). Aurora-B Kinase Inhibitors for Cancer Chemotherapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(14), 1514–1525. <https://doi.org/10.2174/138955708786786480>.

Yu, D. L., Lou, Z. P., Ma, F. Y., and Najafi, M. (2022). The interactions of paclitaxel with tumour microenvironment. *International immunopharmacology*, 105, 108555.

Yu, H. (2006). Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint: the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model. *The Journal of cell biology*, 173(2), 153–157.

Zetterberg, A., and Larsson, O. (1985). Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(16), 5365–5369.

Zhang, M., Zhang, L., Hei, R., Li, X., Cai, H., Wu, X., and Zheng, Q. (2021). Review Article *CDK inhibitors in cancer therapy , an overview of recent development*. 11(5), 1913–1935.

Zhao, Y., Thomas, H. D., Batey, M. A., Cowell, I. G., Richardson, C. J., Griffin, R. J., Calvert, A. H., Newell, D. R., Smith, G. C. M., and Curtin, N. J. (2006). Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4275>.

Zhao, Z., Jin, G., Yao, K., Liu, K., Liu, F., Chen, H., Wang, K., Gorja, D. R., Reddy, K., and Bode, A. M. (2019). Aurora B kinase as a novel molecular target for inhibition the growth of osteosarcoma. *Molecular carcinogenesis*, 58(6), 1056–1067.

Zhu, L., and Chen, L. (2019). *Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy*. 1–11.