

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**TAMOKSİFEN - DEBİO 1143 KOMBİNASYONUNUN ÖSTROJEN
RESEPTÖR POZİTİF MEME KANSER HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve İŞSEVEN

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL**




MANİSA-2018

TEZ ONAYI

Merve İŞSEVEN tarafından hazırlanan " Tamoksifen - DEBİO 1143 Kombinasyonunun Östrojen Reseptör Pozitif Meme Kanseri Hücre Kültürlerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması "adlı tez çalışması 19/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

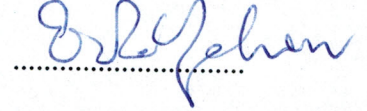
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



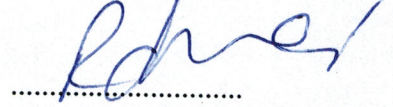
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Erdal BALCAN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Remziye DEVECİ
Ege Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Merve İŞSEVEN



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Meme Kanseri Tipleri	3
2.1.2. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları	4
2.1.2.1. Tamoksifen.....	5
2.1.3. Meme Kanseri Araştırmalarında Kullanılan Hücre Hatları	6
2.1.3.1. MCF-7 Hücre Hattı	8
2.1.3.2. BT-474 Hücre Hattı	8
2.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları	9
2.2.1. Apoptozis.....	9
2.2.2. Nekroptozis.....	13
2.2.3. Otofaji	15
2.3. Apoptozis İnhibitör Proteinleri (IAP'ler).....	17
2.4. İkinci Mitokondri Kökenli Kaspaz Aktivatörleri (SMAC'lar).....	20
2.5. SMAC Mimetikleri.....	20
2.5.1. SMAC Mimetiklerinin Etki Mekanizması.....	21
2.5.2. SMAC Mimetiziği Olarak DEBİO 1143	22
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Kullanılan Malzemeler	24
3.1.2. Kullanılan Aletler	24
3.2. Yöntem	25

3.2.1. Hücre Hatlarının Kültüre Edilme İşlemi.....	25
3.2.2. İlaçların Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	26
3.2.3. MCF-7 ve BT-474 Hücrelerinin Sayımı	26
3.2.4. XTT Hücre Canlılık Testi	27
3.2.5. Hüce Ölümünün Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler	27
3.2.5.1. Floresan Mikroskopu Analizi.....	29
3.2.5.2. Akım Sitometri Analizi.....	30
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	33
4.1. Araştırma Bulguları	33
4.1.1. XTT Yöntemi ile Elde Edilen Sitotoksikite Bulguları	33
4.1.1.1 Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi	33
4.1.1.2. Tamoksifen ve DEBİO 1143 Kombinasyonunun MCF-7 ve BT-474 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi	35
4.1.2. Birden Fazla Parametre Kullanılarak Apoptozisin Analizi ile ilgili Elde Edilen Bulgular	36
4.1.2.1. Floresan Mikroskopi Görüntüleme Bulguları	37
4.1.2.1.1. Mitokondrial Membran Potansiyelinin Ölçümü Bulguları	37
4.1.2.1.2. Nükleer Morfolojinin Değerlendirilmesi Bulguları	39
4.1.2.1.3. Apoptotik Hücrelerin Dış Membranları Üzerindeki Fosfatidilserin Boyanması Bulguları	41
4.1.2.2. Tamoksifen ve DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Akım Sitometrisi (Flow Sitometri) ile Görüntülenmesi.....	42
4.1.3. İstatistiksel Analiz Bulguları	44
4.2. Tartışma	46
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AI	Aromatase Inhibitors (Aromataz İnhibitörleri)
ATG14	Autophagy Related 14 (Otofaji İlişkili 14)
ATPF	Ala-Thr-Pro-Phe
AVPI	Ala-Val-Pro-Ile
BAK	BCL2 Antagonist/Killer (BCL2 Antagonisti/Öldürücü)
BAX	BCL2-Related X Protein (BCL2 İlişkili X Proteini)
BIR	Baculovirus Repeat Domain (Bakulovirüs Tekrar Domaini)
BMP/TGFβ	Bone Morphogenetic Protein/Transforming Growth Factor Beta (Kemik Morfogenetik Proteini/Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)
BRUCE	BIR Repeat Containing Ubiquitin-Conjugating Enzyme (BIR Tekrarı İçeren Ubikitin Konjuge Edici Enzim)
CARD	Caspase Recruitment Domain (Kaspaz Toplama Domaini)
CC	Coiled Coil (Sarı Halka)
cFLIP	Cellular Flice (FADD-Like Il-1β-Converting Enzyme)-Inhibitory Protein (Hücresel Flice (Fadd-Benzeri Il-1β-Çevirici Enzim)-Inhibe Edici Protein)
CHOP	C/Ebp Homolog Protein
cIAP1	Cellular IAP1(Hücresel IAP1)
cIAP2	Cellular IAP2 (Hücresel IAP2)
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy (Şaperon Aracılı Otofaji)
DAI	DNA-Dependent Activator Of Interferon-Regulatory Factor (İnterferon Düzenleyici Faktörün DNA Bağımlı Aktivatörü)
DISC	Death Inducing Complex (Ölüm İndükleyici Kompleks)
DR4/5	Fas Death Receptor (Fas Ölüm Reseptörü)
EGFR/HER2	Epidermal Growth Factor Receptor/ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü/İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2)
ER	Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)
ER +	Estrogen Receptor Positive (Östrojen Reseptör Pozitif)

ET	Endocrine Therapy (Endokrin Tedavi)
FADD	Fas-Associated Protein With Death Domain (Fas İlişkili Ölüm Domaini)
FasL	Fas Ligand (İlk Apoptotik Sinyal Ligandı)
HR+	Hormon Reseptör Pozitif
IAP	Inhibitor Of Apoptosis Proteins (Apoptozis İnhibitör Proteinleri)
IFN	Interferon (İnterferon)
IKK	IκB Kinase (Ikb Kinaz)
ILP2	Testis Specific IAP (Testis Spesifik IAP)
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme-1 (İnositol Toplayıcı Protein-1)
LRRs	Leucine-Rich Repeat (Lösence Zengin Tekrarlar)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz)
MBC	Metastatic Breast Cancer (Metastatik Meme Kanseri)
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-Like (Karmaşık Lineage Kinaz Domain Benzeri Protein)
MTS	Mitochondria-Targeting Sequence (Mitokondriyal Hedefleyici Sinyal)
NAIP, BIRC1	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (Nöronal Apoptozis İnhibe Edici Protein)
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B (Nükleer Faktör-Kappa B)
NIK	Nuclear Factor-Kappa B Inducing Kinase (Nükleer Faktör-Kappa B İndükleyici Kinaz)
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (Nükleotit Bağlanma ve Oligomerizasyon Domaini)
PI3K/AKT/MTOR	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B/Mammalian Target Of Rapamycin (Fosfatidil İnositol 3 Kinaz/Protein Kinaz B/Rapamisinin Memeli Hedefi)
PR	Progesterone Receptor (Progesteron Reseptörü)
RING	Really Interesting New Gene (Gerçekten İlginç Yeni Gen)
IP1	Receptor-Interacting Protein-1 (Reseptörle Etkileşen Protein 1)

SERD	Estrogen Receptor Down Regulators (Östrojen Reseptörü Down Regülatörleri)
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator (Seçici Östrojen Reseptör Modülatörü)
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspases (İkinci Mitokondriyal Kökenli Kaspaz Aktivatörü)
TAB1	Tak1 Binding Protein (Tak1 Bağlanma Proteini)
TAK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 7 (Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz 7)
TAM	Tamoxifen (Tamoksifen)
TLR	Toll-Like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)
TNFR	TNF Receptor (TNF Reseptör)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alpha (Tümör Nekrozis Faktör-Alfa)
TRADD	TNFR1 Associated Death Domain Protein (TNFR1 İlişkili Ölüm Domain Proteini)
TRAF2	TNFR Associated Factor 2 (TNFR İlişkili Faktör 2)
TRAIL	TNF Associated Apoptosis Inducing Ligand (TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand)
TWEAK	Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer Of Apoptosis (TNF-Benzeri Apoptozis Zayıf İndükleyicisi)
UBA	Ubiquitin-Associated Domain (Ubikitin İlişkili Domain)
UBC	Ubiquitin Conjugation Domain (Ubikitin Bağlayıcı Domain)
VPS15	Vacuolar Protein Sorting 15 (Vakuolar Protein Tasnifi 15)
VSP34	Vacuolar Protein Sorting 34 (Vakuolar Protein Tasnifi 34)
XIAP	X Chromosome-Linked IAP (X Kromozomu Bağlı IAP)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Tamoksifen'in kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.2. Meme kanseri hücre hatları ve tümör alt türleri.....	7
Şekil 2.3. Farklı oranlardaki hücre ölümünün homeostazis üzerine etkisi.....	10
Şekil 2.4. Apoptozis sırasında gerçekleşen prokaspaz aktivasyonu.....	11
Şekil 2.5. Apoptozis sorasındaki morfolojik değişikliklerin şematik gösterimi...	12
Şekil 2.6. Apoptotik yolaklar ve düzenlenmeleri.....	13
Şekil 2.7. Nekroptozis ve apoptozisin TNFR1 aracılı hücre ölüm yolakları.....	15
Şekil 2.8. Temel otofaji işlemi.....	17
Şekil 2.9. İnsan IAP ailesinin domain yapıları.....	18
Şekil 2.10. IAP'lerin hücre içerisindeki görevleri.....	19
Şekil 2.11. IAP antagonisti olarak SMAC'lar.....	20
Şekil 2.12. SMAC mimetiklerinin etki mekanizması.....	22
Şekil 2.13. DEBİO 1143'ün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 3.1. (A) BT-474, (B) MCF-7 hücre hatları (10 X).....	26
Şekil 4.1. MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak canlılığın (A) Tamoksifen ve (B) DEBİO 1143 tarafından inhibisyonu.....	34
Şekil 4.2. (A) MCF-7 ve (B) BT-474 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak canlılığın Tamoksifen ve DEBİO 1143 kombinasyonu tarafından inhibisyonu. Grafikler, üç farklı deneyin verileri kullanılarak oluşturulmuştur (**p<0.001)....	35
Şekil 4.3. TMRE boyası ile boyanan MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm).....	38
Şekil 4.4. TMRE boyası ile boyanan BT-474 hücrelerinin floresan mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm).....	39
Şekil 4.5. Hoechst boyası ile boyanan MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm).....	40
Şekil 4.6. Hoechst boyası ile boyanan BT-474 hücrelerinin floresan mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm).....	41
Şekil 4.7. Annexin V ve RedDot™2 ile boyanan MCF-7 hücrelerinin akım sitometrisi cihazından elde edilen bulguları.....	43
Şekil 4.8. Annexin V ve RedDot™2 ile boyanan BT-474 hücrelerinin akım sitometrisi cihazından elde edilen bulguları.....	44

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Meme kanseri hücrelerinin sınıflandırılışına göre ekspresyon durumları..	4
Tablo 2.2. MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarının özellikleri.....	8
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi.....	24
Tablo 3.2. Kullanılan aletlerin listesi.....	25
Tablo 3.3. Floresan mikroskopi analizi için optimal belirleme işlemleri ve kullanılan kitin içeriğindeki boyaların özellikleri.....	30
Tablo 3.4. Akım sitometri için optimal belirleme işlemleri ve kullanılan kitin içeriğindeki boyaların özelliği.....	31
Tablo 4.1. MCF-7 ve BT-474 Hücrelerindeki Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün IC ₅₀ değerleri.....	34
Tablo 4.2. MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücrelerinde Tamoksifen ile kombinlenen DEBİO 1143'ün kombinasyon indeks analizi.....	36
Tablo 4.3. MCF-7 hücre hattı için istatistiksel p değerleri.....	45
Tablo 4.4. BT-474 hücre hattı için istatistiksel p değerleri.....	45

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aőamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL'a ve çalıőmamdaki deneysel aőamalarda değerli görüő ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Sayın Doç. Dr. Harika ATMACA'ya; lisans ve lisansüstü öğrenim hayatım boyunca bilgi ve tecrübesi ile manevi desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Erdal BALCAN'a; çalıőmanın gerçekleştirilmesi için gerekli laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEFAM)'ne; DEFAM çalıőanlarına; bu tez çalışması için gerekli finansal desteği 2016-133 numaralı proje ile sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP); ve bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi sevgili aileme destek, güven ve en önemlisi sevgileri için minnet dolu sonsuz teşekkür ederim.

Merve İŐEVEN

Manisa, 2018

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tamoksifen - DEBİO 1143 Kombinasyonunun Östrojen Reseptör Pozitif Meme Kanseri Hücre Kültürlerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Merve İŞSEVEN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL

Dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türlerinden ve ölüm sebeplerinden biri meme kanseridir. Meme kanseri tedavisinde en çok tercih edilen endokrin tedavisi, seçici östrojen reseptör modülatörü (SERM) olan Tamoksifen (TAM)'dir. Östrojen reseptör pozitif (ER+) meme kanserinde TAM'nin uzun süreli kullanımını sonucu gelişen dirence karşı ve tedavinin etkinliğinin artırılması amacıyla kombine tedaviler geliştirilmektedir. Endojen IAP protein ailesinin antagonistisi olarak fonksiyon gören çeşitli SMAC mimetikleri farklı kanser türlerinde tedavide yeni kanser ajanları olarak ilgi çekmektedir. Bu çalışmada MCF-7 ve BT-474 ER+ meme kanser hücre hatlarında 48. ve 72. saatlerde Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün artan konsantrasyonlarının ayrı ayrı ve birlikte kombine edilmesinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için XTT testi, sitotoksik etkinin hangi hücre ölüm tipi ile ilişkili olduğunu belirlemek için birden fazla parametre kullanılarak apoptozis testi yapılmıştır. Elde edilen bulgular ANOVA ve ardından Dunnet's istatistiksel analizleriyle değerlendirilmiştir. XTT testi bulgularımıza göre IC₅₀ değeri MCF-7 ve BT-474 hücre hattında TAM için sırasıyla 3.8 ± 0.6 µM, 18.9 ± 6.7 µM'dur, DEBİO 1143 için MCF-7 için IC₅₀ değeri 15 ± 0.5 µM, BT-474 hücre hattı için artan dozlardan sadece 20 µM'da etki görülmüştür. Kombinasyon bulgularımıza göre tüm kombinasyon dozlarında her iki hücre hattı için de sinerjistik etki olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kombinasyon bulgularımız, ANOVA ve Dunnet's analizlerine göre her iki hücre hattı için de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001). Kombinasyonun sitotoksik etkisinin her iki hücre hattında da apoptozis ile olmadığı, diğer hücre ölüm tipleri ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, ER+ meme kanseri hücre hatlarında kombinasyon dozlarının sitotoksik etkisinin, kemoterapötik ilacın ve SMAC mimetiğinin kombinasyondaki dozlarının tek başına uygulanmasına göre sinerjistik etkili olduğu belirlenmiştir. Kombine uygulamanın sitotoksik etkisinin apoptozis dışında hangi hücre ölüm tipi mekanizması ile olabileceğini belirlemek amacıyla ileri araştırmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: DEBİO 1143, ER + meme kanseri, SMAC mimetik, Tamoksifen.

2018, 77 sayfa.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Tamoxifen - DEBIO 1143 combination on Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cell Culture

Merve İSSEVEN

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin TUĞRUL

Breast cancer is one of the most common and deadly cancer type among the women in the world. Tamoxifen (TAM), which is a selective estrogen modulator (SERM) is the most favoured anti-hormone therapy for breast cancer. Combination therapies are being developed against developing resistance due to long time usage of TAM in the estrogen receptor positive (ER+) breast cancer and to increase the efficacy of treatment. Various SMAC mimetics which function as antagonists of the endogenous IAP protein family have drawn great attention as new cancer agents in treatment of different types of cancer in recent years. In this study, it is aimed to be revealed cytotoxic effect of using TAM and DEBIO 1143 as single agents and combined agents with increasing concentrations in MCF-7 and BT-474 ER+ breast cancer cell lines. Concentrations applied at 48th and 72th hours. Results are achieved by using XTT cytotoxicity test. To determine cytotoxic effect and which type of cell death to associate with, multi parameter apoptosis assay has been performed. The obtained data were analyzed by using one-way analysis of variance test (ANOVA) and Dunnet's statistical test. According to XTT test results IC₅₀ value of TAM has been detected as $3.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$, $18.9 \pm 6.7 \mu\text{M}$ in MCF-7 and BT-474 cells, respectively. However IC₅₀ value of DEBIO 1143 has been detected only in MCF-7 cells as $15 \pm 0.5 \mu\text{M}$. DEBIO 1143 agent's low cytotoxic effect has been detected only for 20 μM in BT-474 cells. According to our combination data, it has been observed that there is a synergistic effect to all of combination doses in both cell lines. Our combination results obtained were found statistically significant according to ANOVA and Dunnet's analysis for both cell lines ($p < 0.001$). It is showed that the cytotoxic effect of combination was not associated with apoptosis, might be related to the other types of cell death. As a result, cytotoxic effect of combination doses in ER+ cells, compared to single application of TAM and DEBIO 1143 has synergistic effect. It is concluded that advanced researches are needed to be performed to determine cytotoxic effect of combined treatment might be associated with which type of cell death mechanism except for apoptosis.

Key Words: DEBIO 1143, ER + breast cancer, SMAC mimetic, Tamoxifen.

2018, 77 sayfa.

1. GİRİŞ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın ölüm sebeplerinden biri olan heterojen hastalık gruplarından birisidir. Hastalığın ortaya çıkmasında rol oynayan nedenler kontrolsüz hücre gelişimi ve farklılaşması ve normal programlanmış hücre ölümünün kaybıdır. Meme kanserinin alt tipleri arasındaki moleküler farklılıklara göre çeşitli tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. Klasik tedavide uygulanan kemoterapötik ilaçların yan etkileri ve uzun süreli kullanımı sonucunda ilaca karşı direnç gelişebilmektedir [1].

İnsanlardaki meme kanserlerinin %60'dan fazlası östrojen reseptör (ER) pozitifdir. Seçici östrojen reseptör modülatörü (SERM) olan Tamoksifen (TAM), bu kanser tipinde kullanılan en yaygın endokrin tedavidir. Östrojen reseptör pozitif (ER+) meme kanseri olan hastaların yaklaşık olarak %50-60'ı Tamoksifen'den yarar sağlarken, bazılarında ise Tamoksifen'e karşı yanıt alınmamaktadır. Tamoksifen'in ya da membrana/sitoplazmaya bağımlı ER'nün sinyallemeye aracılık eden moleküllerle çoklu etkileşimi aracılığıyla epidermal büyüme faktörü reseptörü/insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (EGFR/HER2) yolağı aktive edilebilir. Aktive edilen alt kademedeki (downstream) kinazlar nükleer ER ve onun kofaktörlerini fosforilleyebilir. Böylece, sinyal çevrimiyle EGFR/HER2 yolağındaki genlerin ifadesinde artış olur. HER2'yi aşırı ifade eden hücrelerde alt kademedeki kinazların aktivasyonu sonucu Tamoksifen'e direnç gelişebilmektedir [2].

İkinci mitokondriyal kökenli kaspaz aktivatörü (SMAC) mimetikleri, kanser tedavisinde hedeflenen ilaçların yeni bir sınıfıdır. Hematolojik kanserler ve solid tümörlerin tedavisi için geliştirilmektedir.

Son yıllarda farklı kanser tiplerinde kemoterapötiklerle birlikte endojen apoptozis inhibitör proteini (IAP) antagonisti SMAC'ı taklit eden IAP'nin küçük molekülü inhibitörleri olan SMAC mimetikleriyle kombinasyon tedavilerine yönelik çalışmalara ilgi artmıştır. Çeşitli çalışmalar, hem monovalent hem de bivalent SMAC mimetiklerinin; diğer antikanser ajanların antitümör aktivitesini artırdığını, *in vitro* insan kanser hücre

hatlarında apoptozisi teşvik ettiğini, insan kanseri hayvan modellerinde tümör iyileştirme kapasitesi olduğunu göstermiştir [3].

SMAC mimetiklerinden olan DEBİO 1143, XIAP'ı ve cIAP1/2'yi etkili şekilde hedefleyen oral açıdan aktif bir SMAC mimetiğidir [4]. DEBİO 1143'ün, çeşitli insan kanser hücre hatları ile ilgili *in vitro* araştırmalarda kanser hücresi gelişimini yüksek etkinlikle baskıladığı belirtilmektedir. Fare, sıçan, köpek ve insan olmayan primatlarda yapılmış *in vivo* ksenograft tümör araştırmalarında apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Günümüzde DEBİO 1143, insan kanser tedavisi için faz-1 klinik denemelerinde araştırılmaktadır [5].

Günümüzde kullanılan anti-endokrin ilaçlar farklı aksiyon mekanizmalarına sahiptir ve onların ajanlarla kombine edilmesi endokrin tedavinin (ET) etkinliğini artırır yaklaşımı mantıklı tedavi stratejilerindedir [6]. Hurwitz ve arkadaşlarının [7] ilk kez yaptıkları ilerlemiş farklı tipte kanser hastalarında DEBİO 1143 ile ilgili farmokokinetik ve farmokodinamik araştırmada, ajanın yardımcı bir tedavi olarak geliştirilebileceği belirtilmektedir.

SMAC mimetiklerinin kaspaz-8'i aktive ederek apoptozisin teşvik edilmesiyle sitotoksik etki gösterdiği belirtilmektedir [8, 9]. Ancak yapılmış bazı çalışmalarda da, kaspaz aktivasyonu olmayan kanser hücrelerinde SMAC mimetiklerinin diğer hücre ölüm tiplerinden nekroptozisi aktive ettiği rapor edilmiştir [10].

Yeni bir ajan olan DEBİO 1143 ile Tamoksifen'in kombine tedavisi ile ilgili meme kanserine ilişkin yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Bu kapsamda çalışmamızda, MCF-7 (Luminal A tipi) ve BT-474 (Luminal B tipi) östrojen reseptör pozitif meme kanseri hücre hatlarında Tamoksifen ile SMAC mimetiği DEBİO 1143'ün birlikte uygulanmasının hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve bu etkinin hangi hücre ölüm tipi ile ilişkili olabileceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlar arasında en geniş dağılım gösteren, tüm kanser vakalarının % 26'sına denk gelen ve kadın ölümlerindeki nedenlerin ikinci faktörü olan bir kanser türüdür. Genel olarak, meme kanseri riski yaşla birlikte artmaktadır, ama aynı zamanda genetik olarak da bileşen içermektedir. Çünkü meme kanserinin gelişimi sıklıkla hücrenel farklılaşmayı ve büyümeyi kontrol eden genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Meme kanseri klinik ve biyolojik olarak çeşitli özelliklere sahip farklı alt tipleri olan heterojen bir hastalık olduğundan tedavisinde birçok zorlukla karşılaşmaktadır [1].

Meme kanseri, heterojen bir hastalıktır. Kadınlarda en sık rastlanılan ve kanserin sebep olduğu ölümlerde ikinci sırada gelen bir kanser türü olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilmektedir. Meme kanseri ile ilişkili bazı risk faktörleri yaş, cinsiyet, aile geçmişi, alkol tüketimi ve obezitedir [11].

Amerika'da 2015'te tahmin edilen yeni meme kanseri vakaları yaklaşık olarak 231800'dür ve bu rakam da tüm kanserlerin %29'una denk gelmektedir. Avrupa birliğinde ise meme kanseri 2009'dan beri azalmaktadır ve bu yüzde %10.2'dir [12].

Türkiye'de meme kanseri sıklığı hızla artmaktadır. 1993 yılında yapılan bir çalışmada 24.1/100.000 olarak hesaplanan meme kanseri sıklığının, 2010 yılında 50/100.000'e ulaştığı tahmin edilmektedir. Bu sonuçlar, son 20 yıl içerisinde Türkiye'de meme kanseri sıklığının 2 katından daha fazla arttığını göstermektedir [13].

2.1.1. Meme Kanseri Tipleri

Yapılan çalışmalarda meme kanseri beş sınıfa ayrılmıştır: Luminal A, Luminal B, HER2 Pozitif, Bazal benzeri, Üçlü Negatif (Tablo 2.1). Çeşitli çalışmalar Luminal A'nın daha iyi farklılaşmış tümörler olduğunu, yaşlı hastalarda görüldüğünü ve diğer tiplere kıyasla en iyi prognoza sahip olduğunu göstermiştir. Beş yıllık sağkalım oranı %95'tir. Luminal B tipi, proliferasyon ile ilgili genlerin daha yüksek ekspresyonuna sahiptir ve Luminal A'dan daha kötü prognozu vardır. Beş yıllık sağkalım oranı %50'dir. HER2 tipi nodal metastaz ile karakterizedir. Beş yıllık sağkalım oranı %30'dur [14]. Bazal benzeri

tip sıklıkla daha genç hastalarda oluşmaktadır ve iç organ metastazıyla karakterizedir. Beş yıllık sağkalım oranı %10'dur [15]. Üçlü negatif meme kanseri, hızlı tümör büyümesiyle ve diyagnozdan iki üç yıl sonra tekrarlamasıyla karakterizedir. Üçlü negative meme kanseri olan hastalarda, tekrarlamaların birçoğu diyagnozdan sonraki beş yıldan kısa sürede gerçekleşmektedir. Hastanın yaşına ve klinik faktörlere bağlı olarak beş ve on yıllık sağkalım oranı vardır [16].

Tablo 2.1. Meme kanseri hücrelerinin sınıflandırılışına göre ekspresyon durumları [14]

Meme Kanseri Hücre Tipi	ER*	HER2**	EGFR***
Luminal A	+	-	-/+
Luminal B	+	+	-/+
HER2 Pozitif	-	+	-/+
Bazal Benzeri	-	-	+
Üçlü Negatif	-	-	-

*ER Östrojen Reseptörü (Estrogen Receptor)

**HER2 İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Human epidermal growth factor receptor 2)

*** Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR Epidermal growth factor receptor)

2.1.2. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve ERBB2/HER2 gibi belirteçler tanı için ve hastaların tedavilerine karar vermek için ayırmakta kullanılmaktadır [17]. Luminal tümörlerde hormon reseptörleri pozitif olduğundan kemoterapiden kaçınılması ve endokrin tedavinin ön plana alınması gerekmektedir. Diğer tip tümörlerde ise kemoterapinin ön plana alınması gerekmektedir [18].

Meme kanserlerinin yaklaşık %80'ni östrojen reseptör pozitifdir (ER+). Bu nedenle hastaların büyük bir kısmında cerrahi müdahaleyi tamamlayıcı tedavi endokrin terapidir (ET). ET'de seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM), ER down regülatörleri (SERD) ve aromataz inhibitörleri (AI) kullanılmaktadır. Seçici östrojen reseptör modülatörü olan Tamoksifen en yaygın kullanılan kemoterapötiklerdendir [6].

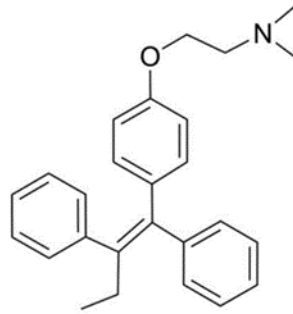
Menopoz sonrası kadınlarda adrenal bezlerden androjenik substratların sentezlendiği zaman aromataz enzimi tarafından östradiole dönüştürüldüğü belirtilmektedir. Aromataz inhibitörleri (AI), bu hastalarda plazma östrojen seviyelerini baskılamaktadır [19].

Ulusal Kanada Kanser Enstitüsü (NCIC) MA.17 denemesi, 5 yıl boyunca Tamoksifen kullanan hastaların sonrasında 5 yıl letrozol kullanmasının plasebo ile karşılaştırıldığında hastaliksız sağkalımı önemli derecede arttırdığını göstermiştir [19].

Endokrin direnci metastatik meme kanseri olan ER+ hastalarda kritik bir konudur. Bazı tümörler, endokrin ajanlarına karşı intrinsik direnç göstermektedir. PI3K/Akt/mTOR yolağının aktivasyonu, ER'in östrojen bağımsız aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu durum endokrin tedavisine dirençle ilişkilendirilmektedir. Preklinik çalışmalar, mTOR inhibisyonunun endokrin tedavisine hassasiyeti yenilediğini ve meme kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklediğini göstermiştir. [19].

2.1.2.1. Tamoksifen

Tamoksifen (Şekil 2.1) [20] seçici östrojen reseptör modülatörüdür (SERM). [21]. Endokrin terapisi gerekli olduğunda hem premenopoz hem de postmenopoz dönemindeki kadınlarda en yaygın kullanılan ilaçtır [12].



Şekil 2.1. Tamoksifen'in kimyasal yapısı

Tamoksifen'in meme kanseri tedavisinde kullanılmaya başlanması, 1958 yılında Dr. Elwood Jensen'in östrojen reseptörlerini keşfetmesine dayanmaktadır [22]. Jensen'in bu buluşu birçok kadının hayatını kurtarmıştır [23]. İlk keşfedildiği yıllarda Tamoksifen,

subfertil kadınlarda ovulasyonun indüklenmesi ve postmenopoz dönemdeki kadınların metastatik meme kanserinin tedavisi gibi limitli alanda kullanılmıştır. Ancak daha sonradan yapılan çalışmalar, yüksek meme kanseri riskine sahip kadınlarda Tamoksifen sayesinde bu risk oranının düştüğünü göstermiştir. 1970'lerde yapılan çalışma sayesinde, Tamoksifen'in östrojen reseptör meme kanserlerini uzun dönemde tedavi ettiği keşfedilmiştir [24].

Östrojen, normal ve kanserli meme epitel hücrelerindeki östrojen reseptörüne (ER) bağlanarak reseptörü aktive etmekte ve bu da hücre bölünmesi, hücre ölümünün baskılanması, yeni kan damarı oluşumu ve proteaz aktivitesinden sorumlu olan genlerin aktivasyonuna yol açmaktadır [25]. Bu nedenle hormon reseptör pozitif (HR+) hastalarda endokrin terapi (ET), tedavinin temelini oluşturmaktadır [6].

TAM, östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri olan kadınlarda ölümü ve hastalığın tekrarlanmasını azaltır. Ayrıca, yüksek meme kanseri riski taşıyan kadınlarda primer önlem yöntemidir [21].

Postmenapozal kadınlarda, Tamoksifen gibi geleneksel endokrin tedavileri, östrojen reseptörünü hedefleyerek östrojeni inhibe etmeye çalışmaktadır [26]. Tamoksifen, meme dokusunda ER antagonisti olarak davranarak [21], östrojen reseptörüne bağlandığında tümör hücre ölümünü başlatarak, gelişmeyi durdurarak, metastazı önleyerek, anjiyogenezi azaltarak etkisini göstermektedir [27]. Tamoksifen tedavisinden optimal verim genellikle 5 yıllık kullanımla alınmaktadır. Ne yazık ki uzun süreli Tamoksifen kullanımı de novo ya da kazanılmış ilaca direnç ve tromboembolik durumlar, endometriyal kanser oranında artma gibi istenmeyen yan etkilerle ilişkilendirilmektedir [28].

2.1.3. Meme Kanseri Araştırmalarında Kullanılan Hücre Hatları

Meme kanseri, kadınlarda en sık karşılaşılan malignitedir. Bu kanserin populasyon üzerindeki büyük etkisi nedeniyle, kritik bir halk sağlığı problemidir. Prognozunu ve spesifik tedavisini belirlemek için moleküler seviyede daha çok araştırma gerekmektedir.

Öte yandan meme kanseri çalışmaları için kullanılan hücre hatları çok azdır (MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 gibi) [30].

Luminal meme kanseri hücre hatları pozitif ER ve/veya PR ekspresyonlarıyla karakterizedir. Bu hücre hatları, daha çok farklılaşmıştır ve sıkı hücre-hücre bağlantıları nedenleriyle migrasyona daha eğilimlidir. Bu durum tümör seviyesiyle bağlantılıdır [30].

2.1.3.1. MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7, dünyada en çok çalışılan insan meme kanseri hücre hattıdır [32]. MCF-7 hücre hattı, Dr. Soule ve arkadaşları tarafından 1973 yılında metastatik hastalığı olan 69 yaşındaki Kafkas bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir [29] MCF-7 hücre hattının meme kanseri araştırmalarına en büyük katkılarından birisi ER α çalışması için uygun olmasıdır. Çünkü ER+ invazif insan meme kanserlerinin çoğunu taklit eden, yüksek seviyelerde ER eksprese eden çok az hücre hattından bir tanesidir [32]. Bu hücreler aynı zamanda onları medikal araştırmada değerli araçlar yapan androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini üretir [33]. MCF-7 hücre hatlarının özellikleri Tablo 2.2’de verilmektedir.

2.1.3.2. BT-474 Hücre Hattı

BT-474 hücre hattı, Lasfargues ve arkadaşları [34] tarafından 1978 yılında 60 yaşındaki Kafkas bir kadınının solid invazif duktal meme karsinomasından elde edilmiştir. Kanser biyolojisini çalışmak ve yeni ilaçlar geliştirmek için kullanılan popüler bir hücre hattıdır. [35]. Güçlü hücre-hücre adezyonuna ve düzensiz şekilde yerleşmiş çekirdeğe sahip olan BT-474 hücre hattı yığın morfolojisi içerisinde sınıflandırılmaktadır [36]. BT-474 hücre hatlarının özellikleri Tablo 2.2’de verilmektedir.

Tablo 2.2. MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarının özellikleri

Hücre Hattı	Tümör Tipi	ER	PR	HER2	P53	Alt Tipi
MCF-7	İnvaziv Duktal Karsinom	+	+	-	Sağlam	Luminal A
BT-474	İnvaziv Duktal Karsinom	+	+	+	Mutant	Luminal B

2.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları

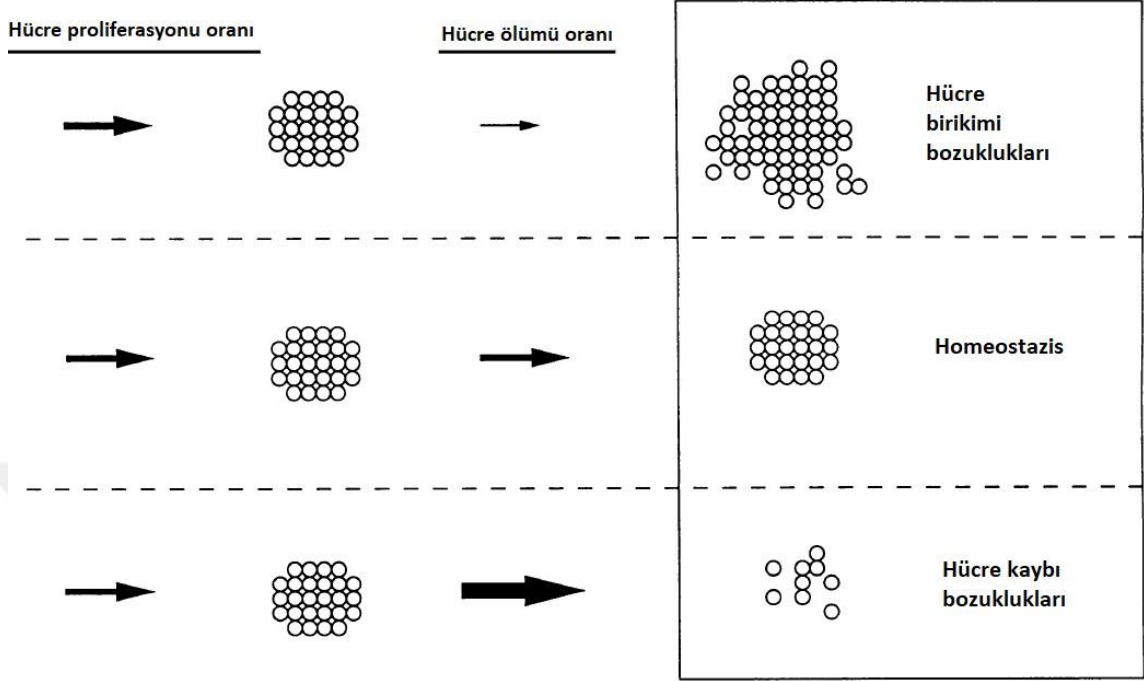
DNA hasarı olan, organelleri strese giren veya onkogenleri aşırı eksprese durumda olan hücrelerin elimine edilmesinde major bir mekanizma olan hücre ölümü rol almaktadır. Aksi takdirde hücre içinde gerçekleşen tüm bu olaylar hücreyi onkogenik transformasyona eğilimli hale getirmektedir. Hücre ölümünü başlatan ve gerçekleştiren yollar, genetik olarak kodlanmıştır, komplekstir ve sıkı şekilde düzenlenmektedir. Sonuç olarak, malignite durumlarında tüm bu yollar sıklıkla mutasyona uğramıştır ve tedavi açısından tümör hücrelerinin ölümünü indüklemek önemli bir konudur [37].

2.2.1. Apoptozis

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis, normal gelişimde ve hasarlı veya mutasyonlu hücrelerin elimine edilmesinde çok hücreli organizmaların homeostazisinin sağlanması için gerçekleşen önemli hücrel bir işlemdir [38] (Şekil 2.3).

DNA hasarı, kromozomal anormallikler, onkogen aktivasyonu, viral enfeksiyon ve hipoksi normal hücrede apoptozisi tetikleyebilir [39]. Bir insanda, her gün apoptozis nedeniyle milyarlarca hücre ölmektedir. Bu işlem dolay her bir kişi, bir yılda vücut ağırlığına eşit miktarda hücre üretilip yok etmektedir [40].

Organizmalarda hücre sayısı, hücre proliferasyonu ve ölümü ile dengede tutulmaktadır. Apoptozis bozukluğu, nörodejeneratif, otoimmün hastalıkların ve birçok malignitenin karakteristiğidir [41] (Şekil 2.3).

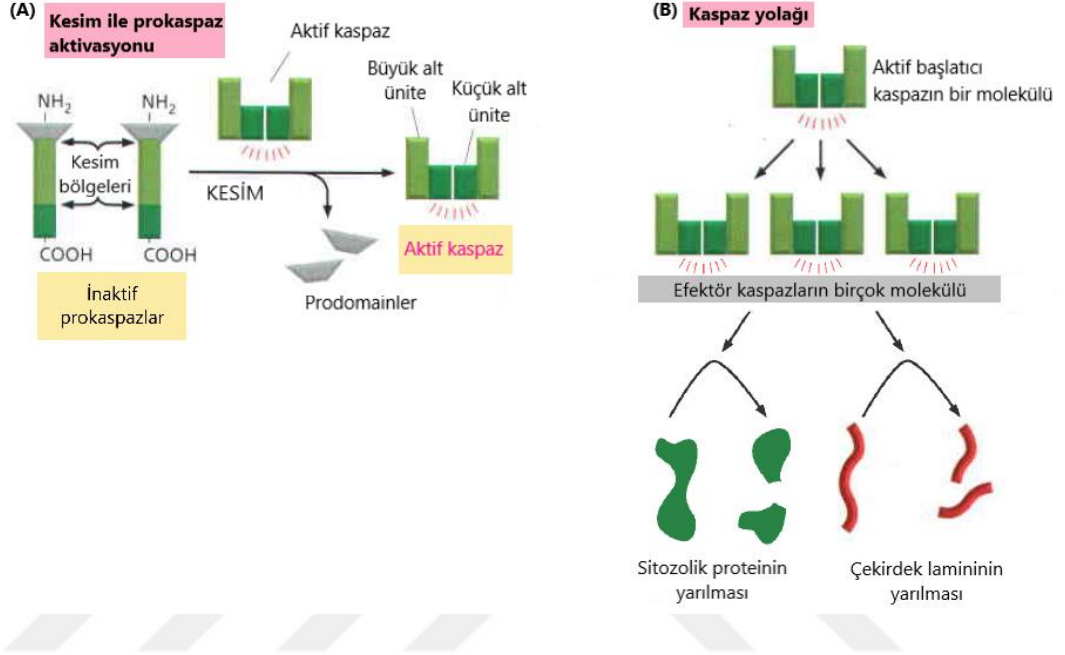


Şekil 2.3. Farklı oranlardaki hücre ölümünün homeostazis üzerine etkisi. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümünün oranları okların büyüklüğüyle belirtilmiştir. Hücre proliferasyonunun ve hücre ölümünün oranlarında dengeleyici değişikliklerin olmaması durumunda hücre birikimi veya hücre kaybıyla sonuçlanmaktadır [42]

Apoptozisin temel efektörleri, hücre içindeki proteinleri spesifik olarak sistein aspartil rezidüelerinden kesen kaspazlardır [43]. Kaspazlar, apoptozisi karakterize eden morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerden sorumludur [40]. Apoptotik süreçte görev alan kaspazlar, apoptozisin hem başlamasını (başlatıcı kaspazlar; kaspaz-2, -8, -9 ve -10) hem de yürütülmesini (efektör kaspazlar; kaspaz-3, -6 ve -7) sağlar [44].

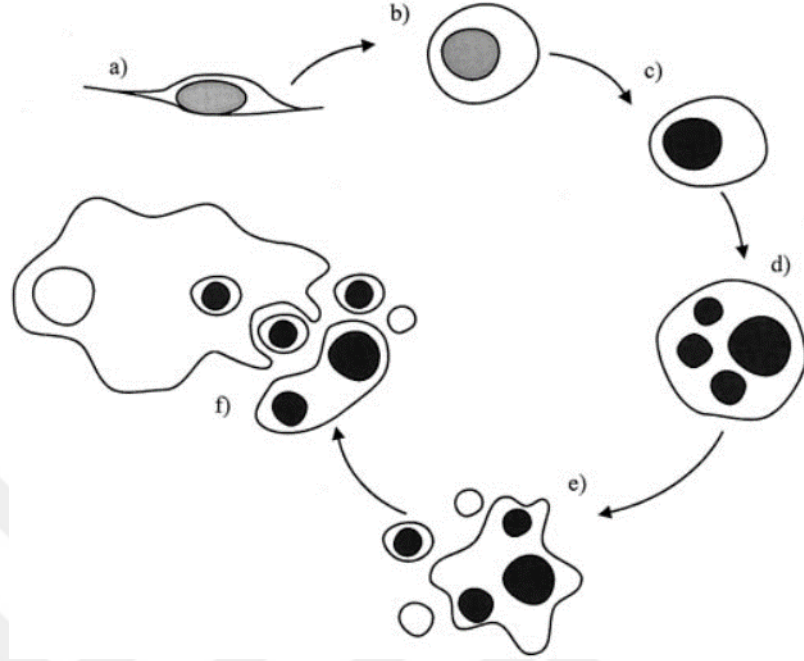
Sistein proteazlar tüm memeli hücrelerinde inaktif prokaspazlar olarak sentezlenmektedir. Başlatıcı prokaspazlar, otokatalitik kesim ile aktive olmaktadır; iki prokaspaz molekülünden iki kesilen kısım, aktif kaspazı oluşturmak için birleşir. Bu molekül iki küçük ve iki büyük alt üniteden oluşan tetramer bir moleküldür. Başlatıcı kaspazlar, birçok efektör kaspazı aktive etmek için keserler. Bu durum proteolitik kaspaz yolağını başlatır. Efektör kaspazlar, daha sonra hücre içindeki çeşitli anahtar proteinleri

(spesifik sitozolik proteinler ve çekirdek laminleri) keserek kontrollü hücre ölümüne neden olur. (Şekil 2.4) [45].



Şekil 2.4. Apoptosis sırasında gerçekleşen prokaspaz aktivasyonu [45]

Apoptosis süreci ile oluşan hücre morfolojisindeki karakteristik değişiklikler şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.5). Adhezif hücreye apoptotik sinyal gelir (A). Hücre iskeleti, kaspazlar tarafından yıkıldıktan sonra hücre büzüşmesi ve yuvarlaklaşma gerçekleşir (B). Bu sırada apoptotik hücre, etrafındaki hücrelerle olan bağlantısını kaybeder. Kromatin kondensasyonu gözlenir (C). DNA fragmentasyona uğrar (D) Hücre; sitozol, kondanse kromatin ve organelleri içeren kompakt ve membranla çevrili yapılarla (apoptotik cisimler) paketlenir (E). Oluşan bu yapılar, makrofajlar tarafından fagositozla elimine edilir. (F) [44].

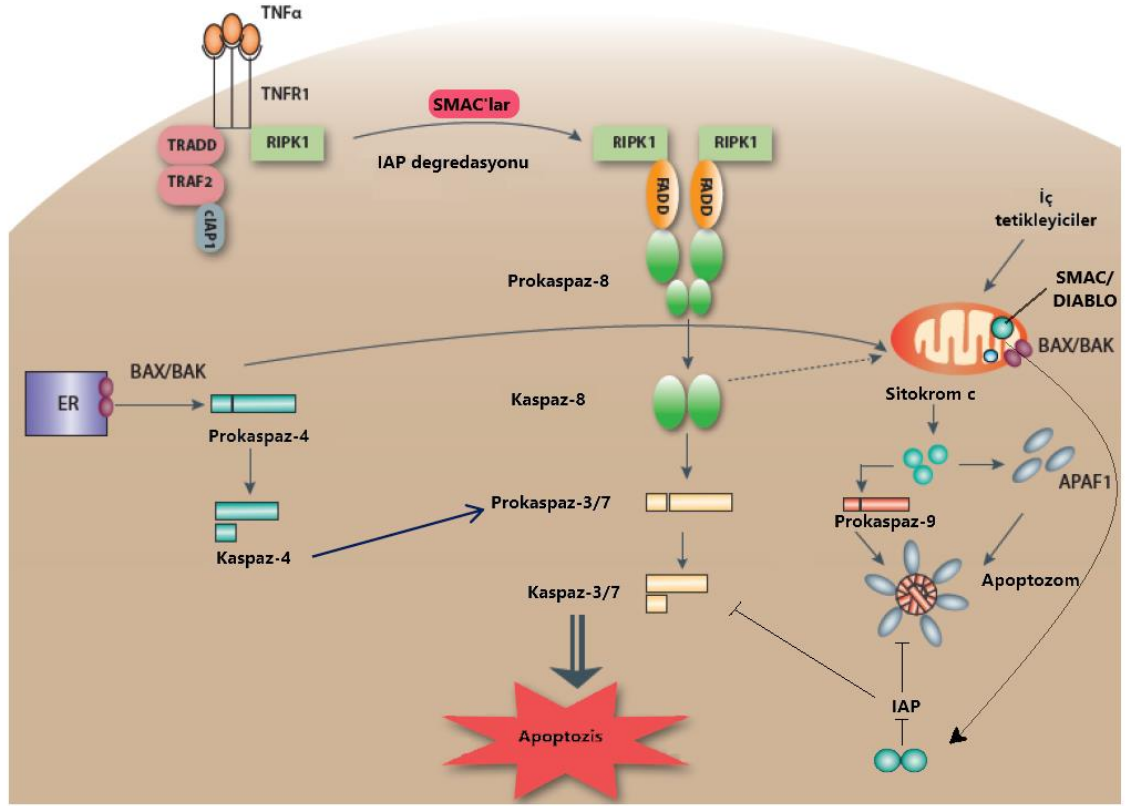


Şekil 2.5. Apoptozis sırasında morfolojik değişikliklerin şematik gösterimi [44]

Apoptozisin başlaması, hücre ölüm sinyalinin orjinine bağlı olarak iki temel sinyal yolağı ile gerçekleşir; İç (intrinsik) yolak (mitokondriyal yolak) ve dış (ektrinsik) yolak (ölüm reseptörü yolağı) [46].

Apoptozisin dış yolağı, ölüm ligandlarının (Fas ligand (FasL), TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL), Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), TNF-benzeri apoptozis zayıf indükleyicisi (TWEAK)) TNF reseptör (TNFR) süper ailesine dahil olan ölüm reseptörlerine (Fas, ölüm reseptörü (DR)4/5, TNFR ve DR3) bağlanmasıyla başlatılır. Bu etkileşim, IAP yokluğunda prokaspaz aktivasyon platformu olan ölüm indükleyici kompleksin (DISC) toplanması ile devam eder. Aktif kaspaz-8 efektör kaspazlar olan prokaspaz-3 ve 7'yi keserek aktive eder ve apoptozisin gerçekleşmesini sağlar. Bazı durumlarda hücre tipine bağlı olarak dış yolağın devamında iç yolak da devreye girer ve böylece apoptozis meydana gelir. İntrasellüler stres (DNA hasarı, radyasyona ve kemoterapötik ajanlara maruziyet gibi) iç yolağın aktivasyonu ile sonuçlanır. İç yolakta, proapoptotik BCL-2 ailesi üyelerinin (BAX/BAK) aktivasyonu, mitokondriyal membran geçirgenliğine neden olur. Apoptojenik proteinler (sitokrom c, SMAC gibi) sitozole salınır [47]. Sitokrom c, Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u

aktivasyonunu sağlayan apoptozomun formasyonuna neden olur. Sonraki adımda ise kaspaz-3 ve 7'nin aktivasyonu, dolayısıyla da apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Ek olarak, kronik endoplazmik retikulum (ER) stresi, iç apoptotik yolağı inositol toplayıcı protein-1 (IRE1) ve C/EBP homolog protein (CHOP) aktivitesi aracılığıyla tetikler. Tüm apoptotik sinyalleme yolları efektör kaspazlar (kaspaz-3,-7) seviyesinde birleşir [48] (Şekil 2.6).



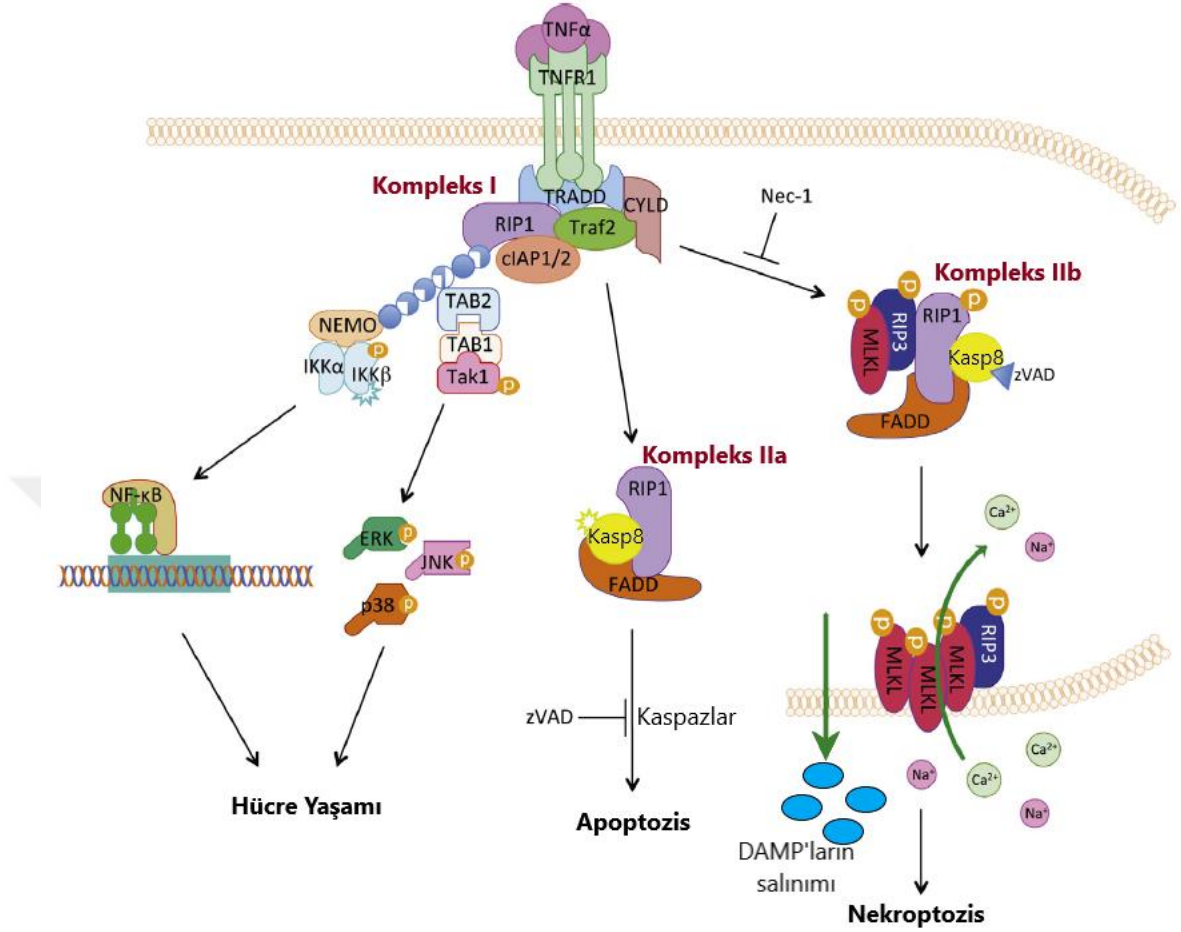
Şekil 2.6. Apoptotik yollar ve düzenlenmeleri [49]

2.2.2. Nekroptozis

TNFR1 aracılı apoptotik sinyallemenin kaspaz inhibisyonu nedeniyle blokajı alternatif hücre yolağı olan nekroptozise neden olabilir. Nekroptozis nekrotik hücre ölümünün düzenlenmiş formudur [50]. Nekroptozis sinyallemesi birçok tetikleyici faktörle başlatılır; Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF α), ilk apoptotik sinyal ligandı (FasL), TNF ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL), interferonlar (IFN), Toll benzeri

reseptör (TLR) ligandları ve DNA sensörü DAI (İnterferon düzenleyici faktörün DNA bağımlı aktivatörü) aracılı viral enfeksiyon [51]. Nekroptozis, reseptörle etkileşen protein 1 (Receptor-Interacting Protein 1, RIP1), RIP3 ve karmaşık lineage kinaz domain benzeri (Mixed Lineage Kinase Domain-Like, MLKL) protein tarafından yönetilmektedir [10]. Apoptozis kaspaz-8 bağımlıyken, nekroptozis kaspaz-8 bağımsızdır ve RIP1 aracılı olarak gerçekleşir. Her iki ölüm tipi de aynı ölüm reseptörü ile başlatılır [52, 53]. Nekroptotik hücrelerde plazma membran bütünlüğünün erken kaybı söz konusudur, yarı saydam sitozol ve kabarmış bir mitokondri içerir [10].

En iyi anlaşılan nekroptozis tipi TNF α ligandı ile indüklenendir [51]. TNF α 'nın TNFR1 ile etkileşimi TNFR1 ilişkili ölüm domain proteini (TRADD), TNFR ilişkili faktör 2 (TRAF2), RIP1 ve cIAP1'i içeren kompleks I'in sitoplazmik membranda oluşumuna neden olur. cIAP1 tarafından RIP1'in poliubikitinasyonu I κ B Kinaz (IKK) kompleksinin, mitojenle aktive olan protein kinaz 7 (TAK1)'nin toplanmasına ve nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yaşam yollarının aktivasyonuna neden olur [54, 55]. NF- κ B ve MAPK sinyallemesinin aktivasyonu transkripsiyon faktörlerinin çekirdeğe translokasyonunu sağlayarak yaşam yanlısı ve inflamatuvar yanlısı genlerin (TNF α , cFLIP, cIAP2 gibi) ekspresyonuna neden olur [56]. cIAP1 veya cFLIP yokluğunda RIP1, FADD ve kaspaz-8'i içeren sitozolik kompleks IIa oluşur. Kompleks IIa, kaspaz yolağını ve apoptozisi indükler. Kaspaz-8'in inhibe olduğu durumlarda, RIP1, RIP3 ve MLKL ile etkileşerek nekroptozisin aracısı olan kompleks IIb'yi oluşturur. RIP1'in kinaz aktivitesi kompleks IIb için önemlidir ve RIP1 kinaz inhibitörü Nec-1 nekroptozisi engeller. Kompleks IIb içindeki RIP3 ve MLKL fosforillenerek plazma membranına transloke olur [54, 55]. Böylece membran bütünlüğü bozulan hücrede nekroptozis tetiklenir [55] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Nekroptozis ve apoptozisin TNFR1 aracılı hücre ölüm yolları Zhou ve arkadaşları [54] ve Moreno-Gonzalez ve arkadaşlarının [55] yayınlarından adapte edilmiştir.

2.2.3. Otofaji

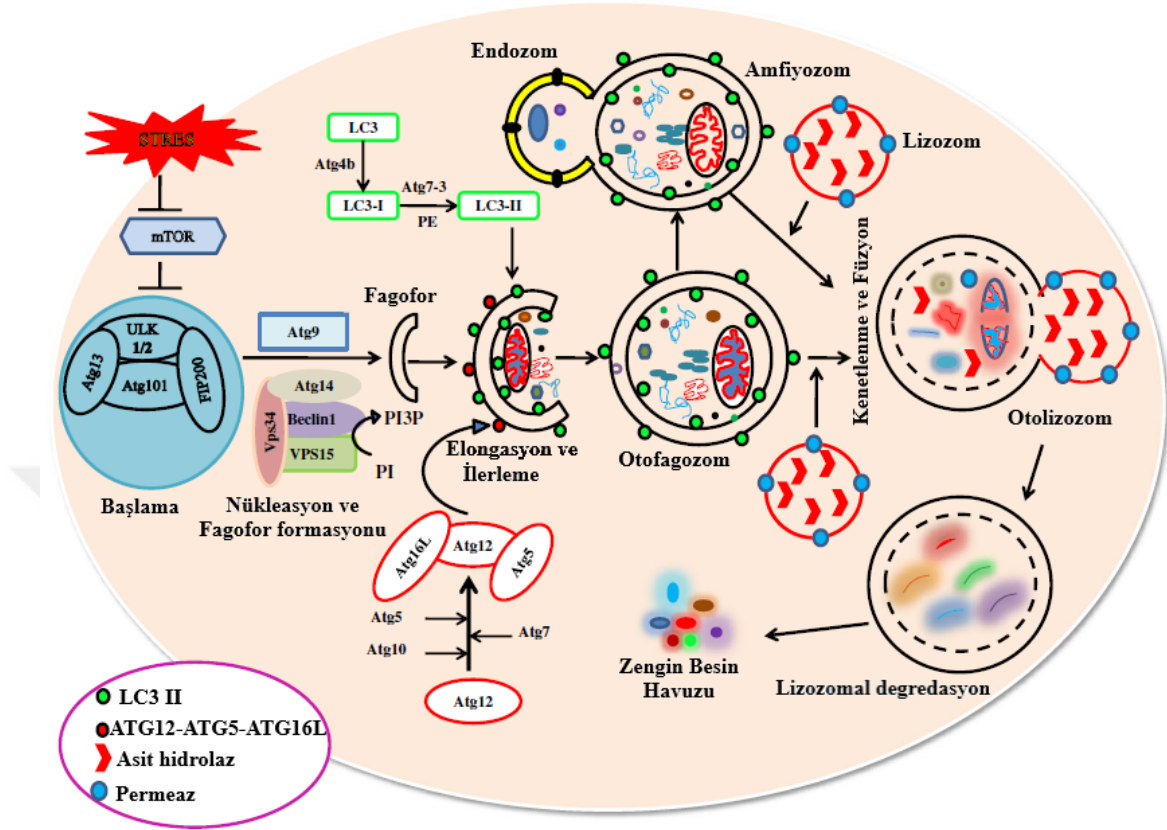
Otofaji veya hücrenin kendini sindirme, protein ve organel degradasyonunu içeren, insan hastalığıyla ve fizyolojiyle bağlantıları olan hücrenin bir yoludur. Christian de Duve 1963 yılında elektron mikroskopisiyle sitoplazmik materyal içeren tek ve çift membranlı vakuollerini gözlemlediğinde 'otofaji' terimini literatüre katmıştır. Otofajideki bir bozukluk kanser, nörodejenerasyon, mikrobiyal enfeksiyon ve yaşlanmayla ilişkili olabilmektedir [57].

Otofajinin çeşitli tipleri vardır; mikro-otofaji, makro-otofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA). Bu otofaji tiplerinin mekanizma ve fonksiyonları farklıdır. Mikro-otofaji

ve makro-otofaji büyük yapıları seçici ve seçici olmayan mekanizmalarla yutma kapasitesine sahipken, CMA seçici olarak çalışarak sadece çözünebilen proteinleri parçalar [58].

Memeli hücrelerindeki otofaji, kupa şekilli çift membranlı fagoforun (izolasyon membranı) sitoplazmik materyali kapatan küre şeklinde çift membranlı otofagozom halini almasını içerir. Bu sırada hedef hücresel bileşenler ve organeller sitoplazmadan ayrılır. Sonuçta otofagozomun dış membranı lizozom ile kaynaşarak otolizozomu oluşturur ve otofagozomun iç membranının ve taşıdığı materyalin parçalanmasına neden olur [57].

Rapamisin kinazın memeli hedefi (mTOR), otofajinin kritik düzenleyicisidir. mTOR aktivasyonu otofagozom düzeneğinin toplanmasını inhibe eder [59]. Hücre açlığı sırasında mTOR inhibe edilir ve başlama kompleksinin oluşumu tetikler [60]. Otofaji fagoforun şekillenmesiyle başlar ve mTORC1 ile yönetilen Ulk1/2-Atg13-FIP200-ATG101 başlatıcı kompleksin aktivasyonu tarafından kontrol edilir. Nükleasyon ve fagofor şekillenmesi Beclin1, Vakuolar protein tasnifi 15 (Vps15) ve Otofaji ilişkili 14 (Atg14) kompleksini şekillendiren Vps34 aktivasyonu tarafından yönlendirilir. Ubikitin benzeri protein bağlayan sistemler (Atg12-Atg5 ve PE ile bağlı Atg8 (LC3 II)) tarafından düzenlenen fagoforların elongasyonu ve ilerlemesinden sonra otofagozomlar şekillenir. Otofagozomlar; (1) endozomlarla veya endozom kökenli veziküllerle kaynaşarak amfiyozomları şekillendirebilir veya (2) lizozomlarla kaynaşarak otofagozomal kargoları parçalamak için taşıyan otolizozomları şekillendirebilir. (Şekil 2.8) [61].



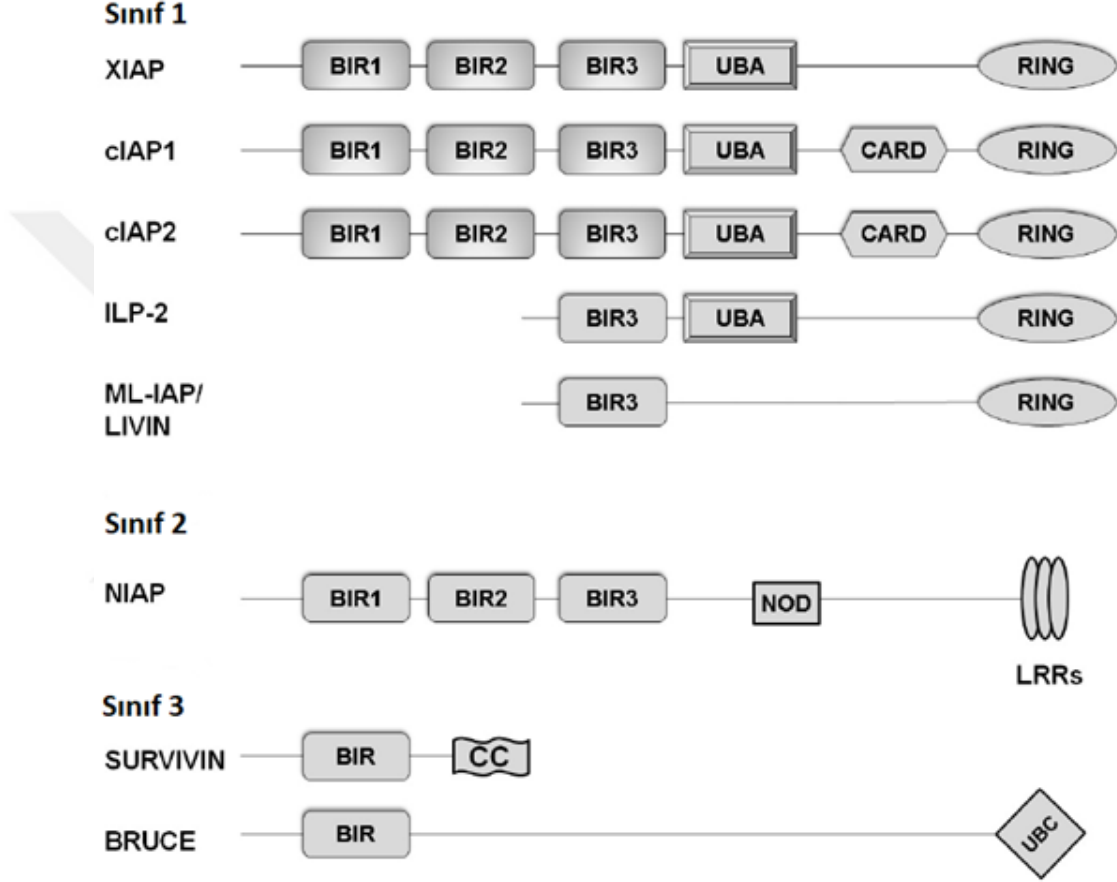
Şekil 2.8. Temel otofaji işlemi [61]

2.3. Apoptozis İnhibitör Proteinleri (IAP'ler)

Apoptozis doku homeostazisini sağlayan çok önemli bir işlem olduğundan dolayı hücrenin kaderini belirleyecek olan pro- ve antiapoptotik faktörler tarafından sıkı bir şekilde yönetilmektedir. Bunlardan ikisi apoptozis inhibitör proteinleri (IAP'ler) ve ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörleri (SMAC'lar)'dir.

Günümüzde 8 adet IAP proteini tanımlanmıştır. Bu proteinler; Nöronal Apoptozis İnhibe Edici Protein (NAIP, BIRC1); X Kromozomu bağlı IAP (XIAP); Hücrel IAP1 (cIAP1); Hücrel IAP2 (cIAP2); Testis spesifik IAP (ILP2); BIR içeren ubikitin konjuge edici enzim (Bruce), Survivin, ve Livin (ML-IAP)'dir [62]. IAP'lerin özelliğini tanımlayan anahtar özellik, en az bir en fazla üç adet Bakulovirüs tekrar domaini (BIR) içermeleridir (BIR1, 2 ve 3) (Şekil T). BIR domainleri, IAP'lerin kaspazlara bağlanarak inhibe etmesini sağlayan ~80 aminoasit içeren zinc bağlama domainleridir. NAIP,

Survivin ve Bruce dışındaki IAP'lerin yapısında, degradasyon amacıyla kaspazların ubiquitinasyonunu sağlayan Gerçekten İlginç Yeni Gen (Really Interesting New Gene, RING) bulunur ve bazı IAP'ler, ubiquitinlenmiş proteinlerle etkileşen ubiquitin ilişkili (UBA) domaini içerirler [63, 64] (Şekil 2.9).

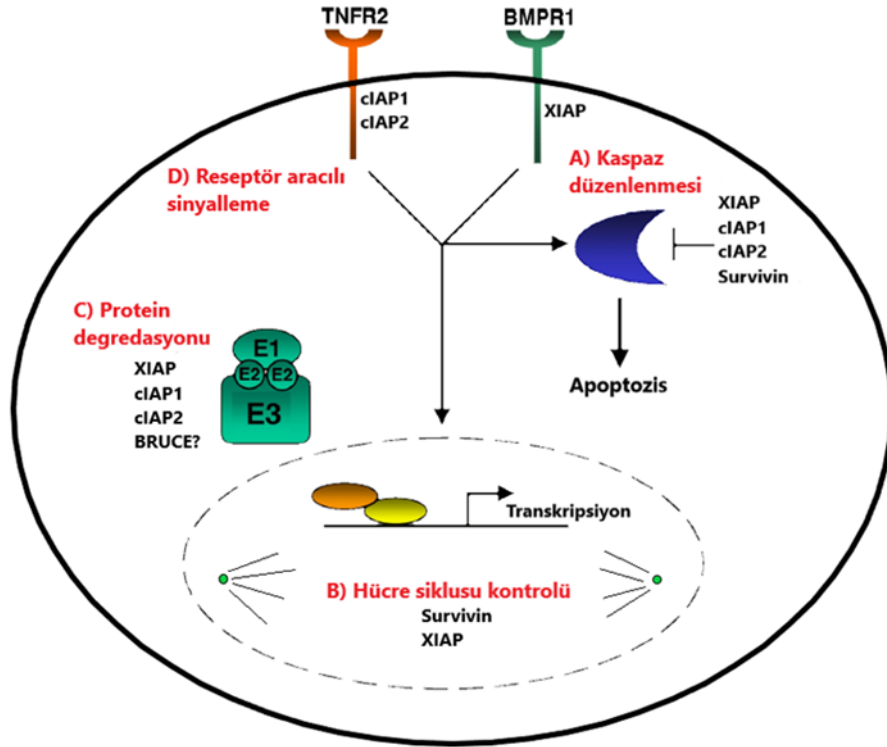


Şekil 2.9. İnsan IAP ailesinin domain yapıları. CARD: kaspaz toplama domaini; CC: sarılı halka; LRRs: lösince zengin tekrarlar; NOD: nükleotit bağlanma ve oligomerizasyon domaini; RING: ‘gerçekten ilginç yeni gen’; UBA: ubiquitin ilişkili; UBC: ubiquitin bağlayıcı [65]

IAP'lerin yüksek seviyede olması, IAP ile indüklenmiş kaspaz inhibisyonuyla sonuçlanır. Kaspaz-IAP etkileşimi, hem kaspazın hem de IAP'nin otoubikitinasyonunu tetikler. Bütün kompleks yıkıma uğrar ve apoptotik işlem durdurulur [62]. XIAP, etkili bir apoptozis düzenleyicisi olduğu için en iyi bilinen IAP üyesidir. Sadece XIAP, kaspaz-3' e, kaspaz-7'ye bağlanarak ve kaspaz-9'un homodimerizasyonunu ve aktivasyonunu

önleyerek direk olarak kaspaz aktivitesini engeller. Böylece apoptotik yollarını inhibe eder [4].

IAP'ler hücre içerisinde çeşitli görevlerde bulunurlar; (A) Kaspaz düzenlenmesi; XIAP, c-IAP'ler ve survivin belirli kaspazları inhibe ederler. (B) Hücre siklusu kontrolü; Survivin mitotik iğlerin mikrotübülleriyle ilişkilendirilmektedir ve G2/M kontrol noktasında düzenleyici fonksiyonu olabileceği düşünülmektedir. XIAP, kaspaz-3 ve hücre siklusu regülatörü p21 ile üçlü kompleks oluşturmaktadır. (C) Protein degradasyonu; XIAP ve c-IAP1 timositlerde apoptozisin indüksiyonuyla ubiquitinlenerek degrade edilir. BRUCE ubiquitin konjuge edici enzim olarak tanımlanmıştır. (D) Reseptör aracılı sinyalleme; c-IAP1 ve c-IAP2 TNFR2 sinyalleme komplekslerinin bileşenleri olarak tanımlanmıştır ve TRAF1 ve TRAF2 sinyalleme araçlarının birlikteliği aracılığıyla TNFR2'ye indirekt olarak toplanmaktadır. XIAP aynı zamanda BMP/TGF β sinyallemesinin regülatörü olan TAB1 birlikteliğiyle BMP/TGF β yolağına da dahil edilmektedir (Şekil 2.10) [66].

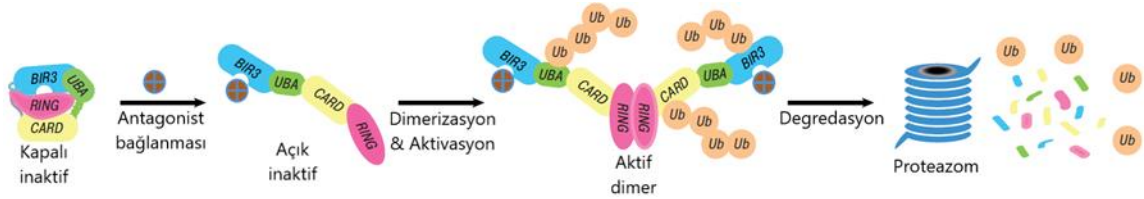


Şekil 2.10. IAP'lerin hücre içerisindeki görevleri [66]

2.4. İkinci Mitokondri Kökenli Kaspaz Aktivatörleri (SMAC'lar)

SMAC'lar, 25 kDa'luk pro-apoptotik mitokondriyal proteinlerdir. SMAC'ın, amino ucunda mitokondriyal hedefleyici sinyal (MTS) bulunur. Apoptotik uyarının gelmesiyle birlikte bu sinyal sekansı proteolitik olarak mitokondri içinde kesilir. Olgun SMAC, BCL2 ilişkili X Protein/BCL2 antagonisti (Bax/Bak) kanalları aracılığıyla sitozol içine salınır [67]. SMAC proteininin N terminal ucu dört aminoasit sekansı (Ala-Val-Pro-Ile) içerir ve SMAC'ın, IAP'lerdeki BIR2 ve BIR3 bölgelerine bağlanmasına izin verir. Böylece IAP'nin kaspazlara karşı inhibitör fonksiyonu oluşmaz ve hücre ölümü teşvik edilir [68, 69]. IAP'lerin kanserlerde yüksek derecede eksprese ediliyor olmasından ve tümör gelişimi, kemoterapiye direnç, kötü prognoz ile ilişkisinden dolayı IAP'ler terapötik hedefler olarak değerlendirilmektedir [70, 71].

SMAC, XIAP, cIAP1 ve cIAP2'nin endojen antagonistidir [4]. IAP'lerde RING dimerizasyonunu ve E3 aktivasyonunu sağlayarak konformasyonel değişikliği tetikler (Şekil 2.11) [73]. Kaspaz-9'un XIAP tarafından inhibisyonunu etkisiz hale getirir. Bunu, XIAP'nin BIR3 domainine Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) tetrapeptit motifi aracılığıyla bağlanarak yapar. Ve kaspaz-9'daki benzer tetrapeptit Ala-Thr-Pro-Phe (ATPF) motifi ile direkt olarak yarışır. SMAC proteini XIAP BIR2'ye AVPI motifi aracılığıyla bağlanır ve XIAP'nin kaspaz-3/kaspaz-7'ye bağlanmasını engeller [72].



Şekil 2.11. IAP antagonisti olarak SMAC'lar [73]

2.5. SMAC Mimetikleri

Endojen IAP antagonisti SMAC'ı taklit eden IAP'nin küçük molekülü inhibitörleri SMAC mimetikleri olarak adlandırılır [65]. IAP proteinlerine bağlanırlar ve IAP-kaspaz etkileşimini bozarak IAP'lerin inhibitor aktivitesini engellerler [74].

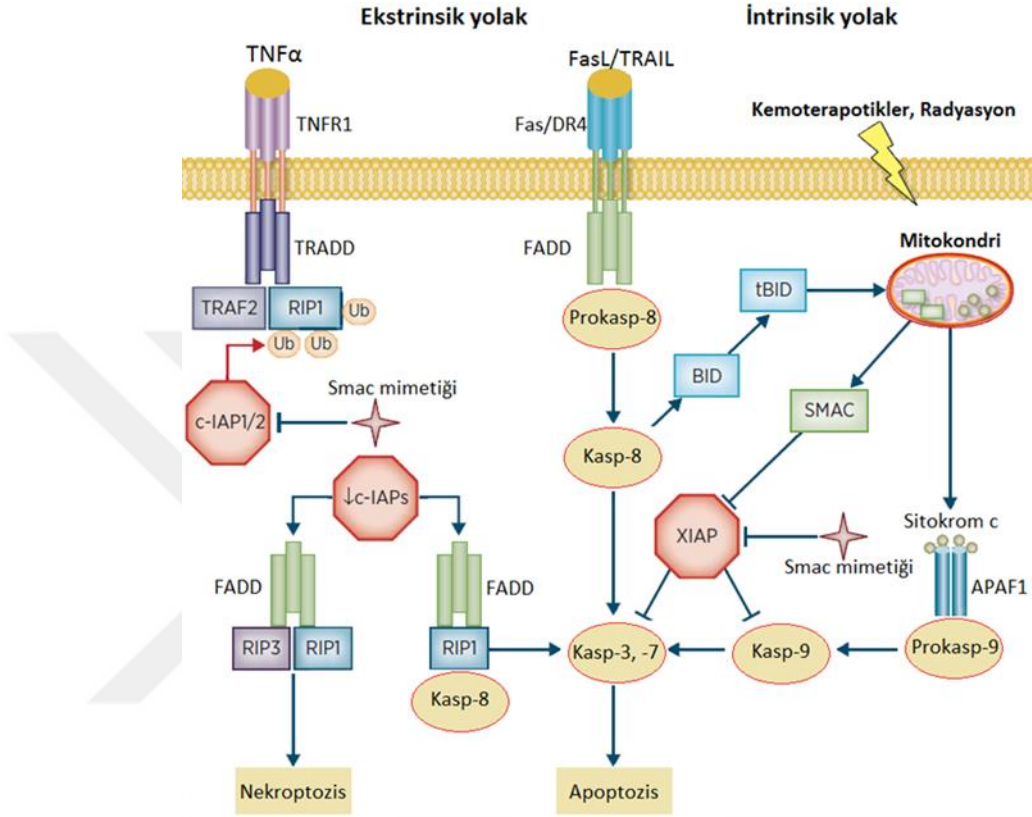
Endojen SMAC'lar ile ilgili yapısal ve biyokimyasal çalışmalardan elde edilen veriler, SMAC proteininin XIAP, cIAP1 ve cIAP2'ye bağlanmasını taklit eden SMAC mimetiklerinin tasarlanmasının temelini oluşturmuştur [70]. SMAC mimetikleri, hem bir tetrapeptit parçası taşıyan endojen SMAC'ı taklit eden monovalent bileşenler olarak hem de kimyasal bağlayıcı ile birbirine bağlı iki taklit sekansı içeren bivalent bileşenler olarak tasarlanmıştır [69]. Monovalent bileşenler, tek AVPI bağlanma motifinin IAP'lere bağlanmasını taklit ederler. Bivalent bileşenler, bağlayıcı aracılığıyla bağlanmış iki AVPI bağlanma motifi içerirler. Çeşitli çalışmalar, hem monovalent hem de bivalent SMAC mimetiklerinin; (1) Diğer antikanser ajanların antitümör aktivitesini artırdığını, (2) *in vitro* insan kanser hücre hatlarında apoptozisi teşvik ettiğini, (3) İnsan kanseri hayvan modellerinde tümör iyileştirme kapasitesi olduğunu göstermiştir [3]. Endojen IAP antagonisti olan SMAC ve IAP inhibitörlerinden sonra geliştirilen SMAC mimetikleri, faz I/II klinik denemelerinde yeni küçük moleküllerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır [68].

Şimdiye kadar dört monovalent (DEBİO 1143, GDC-0917/CUDC-427, LCL-161, ve GDC-0152) ve iki bivalent (TL-32711/birinapant ve HGS-1029/AEG-40826) SMAC mimetiği bileşeni farmakolojik, dozaj ve güvenlik karakteristiklerinin belirlenmesi amacıyla klinik teste dahil edilmiştir [68].

2.5.1. SMAC Mimetiklerinin Etki Mekanizması

SMAC'lar, AVPI tetrapeptit motifi ile IAP'leri inhibe ettikleri için, SMAC mimetiklerinin dizaynı bu prensibe göre oluşturulur ve SMAC proteininin cIAP1, cIAP2, ve XIAP'a bağlanma aktivitesini iki katına çıkarır. SMAC mimetiklerinin cIAP1 ve cIAP2 ile etkileşimi IAP proteinlerinin konformasyonel değişikliklerine neden olur. Bu değişimler, cIAP1 ve cIAP2'lerin endojen E3 ubiquitin ligaz aktivitesinin uyarılmasına, otoubikütinasyonuna ve proteazomal degradasyonuna neden olur [69]. SMAC mimetiği ile indüklenen hücre ölümünün TNF sinyallemesine bağlı olduğu bulunmuştur [75]. SMAC mimetiği aracılı cIAP'nin azalması, nükleer faktör-kappa B (NF-κB) indükleyici kinaz (NIK) birikimine, kanonik ve kanonik olmayan NF-κB sinyallemesine ve TNFα gibi NF-κB hedef genlerinin upregülasyonuna neden olur. Reseptörle etkileşen protein 1 (RIP1)'in ubiquitinasyonu engellenir. TNFα, RIP1, FAS ilişkili ölüm domaini (FADD) ve

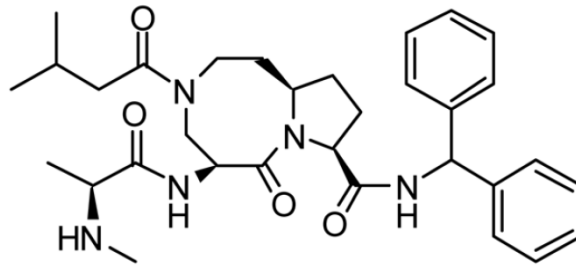
kaspaz-8 içeren sitozolik hücre ölüm kompleksinin oluşumu teşvik edilir. Sonuç olarak, kaspaz-8 aktivasyonu ve apoptozis tetiklenir [8, 9] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. SMAC mimetiklerinin etki mekanizması [69]

2.5.2. SMAC Mimetığı Olarak DEBİO 1143

DEBİO 1143 (SM-406/AT-406), XIAP'ı ve cIAP1/2'yi etkili şekilde hedefleyen oral açıdan aktif bir SMAC mimitiğidir [4]. Kimyasal yapısı Şekil 2.13'de gösterilmektedir [72].



Şekil 2.13. DEBİO 1143'ün kimyasal yapısı [72]

DEBİO 1143, XIAP BIR3 proteinini etkisizleştirir ve cIAP1 proteininin hızlı yıkımını teşvik eder. Böylece kanser hücre hatlarında kanserli hücre gelişimini baskılar. *In vivo* çalışmalarda DEBİO 1143'ün oral biyo-yararlanımının iyi olduğu ve tümör gelişimini apoptozisi tetikleyerek engellediği belirtilmektedir [72].

Çeşitli insan kanser hücre hatları ile ilgili *in vitro* araştırmalarda DEBİO 1143'ün kanser hücresi gelişimini yüksek etkinlikle baskıladığı belirtilmektedir. Fare, sıçan, insan olmayan primatlarda ve köpeklerde yapılmış *in vivo* ksenograft tümör araştırmalarında apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Günümüzde DEBİO 1143, insan kanser tedavisi için faz-1 klinik denemelerinde araştırılmaktadır [72].

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

İnsan meme kanseri hücre hatlarından MCF-7, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden, BT-474, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden temin edildi.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

Kullanılan kimyasal malzemelerin listesi Tablo 3.1'de belirtilmektedir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi

Kullanılan Kimyasal	Markası
Tamoksifen	Sigma (Almanya)
DEBİO 1143	ApexBio (Tayvan)
DMEM Besiyeri/F12	Thermo (ABD)
Fetal Bovine Serum	Thermo (ABD)
Penicillin-Streptomycin Sol.	Thermo (ABD)
Tripsin Edta B	Biological Industries Sci (ABD)
XTT Detection Kit	Biotium (ABD)
Multiparameter Apoptosis Assay Kıt	Cayman Chemical (ABD)
İnsülin	Sigma (Almanya)
Dmso Cell Culture Freezing Medium	Sigma (Almanya)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hücre kültürü, XTT testi, floresan mikroskopisi ve akım sitometri değerlendirilmeleri için yapılan deney aşamalarında kullanılan aletlerin listesi Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.2. Kullanılan aletlerin listesi

Kullanılan Alet	Markası
Inverted Mikroskop	Zeiss (Almanya)
CO ₂ Nemli inkübatör	Nuaire (ABD)
Hücre sayım cihazı	Invitrogen (ABD)
Vortex	Wisd/Wisemix (Almanya)
Mikroplaka okuyucu	Tecan/Infinite (İsviçre)
Santrifüj makinası	Hettich (Almanya)
Kabin	Metisafe (Türkiye)
Mikrosantrifüj	Hettich (Almanya)
Dondurucu -20°C	Arçelik (Türkiye)
Dondurucu -80°C	Nuaire (ABD)
Mikrodalga	LG (Güney Kore)
Buzdolabı	Arçelik (Türkiye)
Otoklav	Hirayama (Japonya)
Akım Sitometri	BD Biosciences (ABD)
Floresan Mikroskop	Olympus (Japonya)

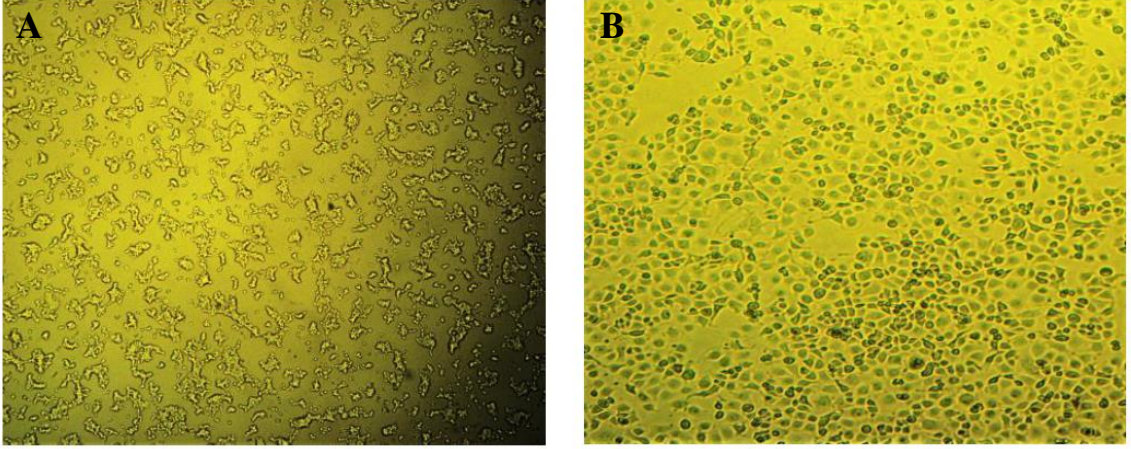
3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Hatlarının Kültüre Edilme İşlemi

MCF-7 hücre hattı, L-glutamin içeren DMEM besiyerine %10 fetal sığır serumu, %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek kültürü yapıldı [14]. BT-474 hücre hattı, L-glutamin içeren DMEM besiyerine %10 fetal sığır serumu, %1 Penisilin/Streptomisin, 10 µg/ml insulin eklenerek kültürü yapıldı [34]. Hücreler % 5 CO₂'li, 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde çoğaltıldı.

Hücre kültürü işlemleri hava akımlı kabinde sürdürüldü. -80°C dondurucuda saklanan MCF-7 ve BT-474 hücreleri 37°C sıcaklıktaki su banyosunda çözüldü. Daha sonra MCF-7, 75 cm²'lik hücre kültür flaskına, BT-474 ise 25 cm²'lik hücre kültür flaskına aktarıldı. 75 cm²'lik flaskaya 10 ml besiyeri, 25 cm²'lik flaskaya 7 ml besiyeri eklendi. Hücreler, % 5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde çoğaltıldı. Flaskalarda

çoğaltılan hücreler, inverted mikroskop (Zeiss, Almanya) yardımıyla, günlük olarak izlendi. MCF-7 ve BT-474 hücrelerinin confluent faza gelme (Şekil 3.1) süreleri sırasıyla 30 ve 45 saat olarak belirlendi. Pasajlama işlemi bu sürelere uygun olarak sürdürüldü.



Şekil 3.1. (A) BT-474, (B) MCF-7 hücre hatları (10 X)

3.2.2. İlaçların Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

0,01 gr toz Tamoksifen (Sigma, Almanya) 26,917 ml DMSO içerisinde koyu renkli şişede çözülerek 1mM'lık stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi. Daha sonra 2ml'lik ependorf tüplerine alınarak -20°C'de saklandı.

5 mg toz DEBİO 1143 (ApexBio, Tayvan) 8,901 ml DMSO içerisinde koyu renkli şişede çözülerek 1 mM'lık stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 0,22 µm'lik filtrelerden geçirildi. Daha sonra 2ml'lik ependorf tüplerine alınarak -20°C'de saklandı.

Her deney için yeni stok solüsyon kullanıldı.

3.2.3. MCF-7 ve BT-474 Hücrelerinin Sayımı

Flaskların zeminine tutunan hücreler, 3 ml Tripsin/EDTA ile 5 dakika muamele edilerek flask zemininden kaldırıldı. Hücreler zeminden kalkınca besiyeri eklenerek 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Bu adım sonrasında süpernatant atılarak hücre pelleti 10 ml besiyeri ile seyreltildi ve

karışımın homojenitesi sağlandı. Bu süspansiyondan 10 µl ve Tripan mavisinden 10 µl alınarak (1:1 ölçüde) karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnek neubeuer lamına aktarıldı. Neubeuer lamı, otomatik hücre sayım cihazına takılarak hücre sayım işlemi gerçekleştirildi. Canlı hücreler, tripan mavisi boyasını membrandan içeriye almadıkları için parlak gözükürken, ölü hücreler boyayı aldıklarından koyu mavi renkte gözlemlendi (Invitrogen, ABD).

3.2.4. XTT Hücre Canlılık Testi

MCF-7 ve BT-474 hücrelerinden 10^4 hücre miktarları, 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Hücre ekilen bu plakalar, %5 CO₂'li 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde 24 saat bekletildi. Böylece hücrelerin kuyucuklara tutunması sağlandı. Tamoksifen, 1µM, 2µM, 5µM, 10µM, 20µM'lık dozlarda [76], DEBİO 1143 ise 3µM, 5µM, 10µM, 15µM, 20µM'lık dozlarda kuyulara eklendi. 48 ve 72 saat sonra kuyucuklardaki sitotoksik etkilerin belirlenmesi için XTT Hücre Canlılık Testi (Biotium, Amerika) kullanıldı. XTT solüsyonundan 5 ml, aktivasyon ayırıcından 25 µl alınarak karıştırıldı. Her kuyucuğa toplam hacmin (200 µl) yarısı kadar aktive edilen XTT solüsyonu (100 µl) eklendi. Hücreler, %5 CO₂'li 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde 4 saat bekletildi. 4 saat sonra kuyucukların absorbans değeri 450 - 650 nm referans aralığında mikro plaka okuyucuda (Tecan, İsviçre) ölçüldü. Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün hücre kültürlerinde etkisinin belirlenmesi için sitotoksik etkinin ölçümüne olanak sağlayan CompuSyn 1.0 yazılımı kullanıldı.

3.2.5. Hüce Ölümünün Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Hücre ölümünün araştırılmasında floresan mikroskopu ve akım sitometri analizleri kullanıldı. Tamoksifen ve DEBİO 1143 kombinasyonunun MCF-7 ve BT-474 hücreleri üzerindeki etkisini görüntülemek için TMRE, Hoechst 33342, Annexin V FITC ve RedDot^{TM2} boya larını içeren çok parametrelili apoptozis deney kiti (CaymanChem, Michigan, ABD) kullanıldı.

TMRE: Sağlam mitokondriyal membran potansiyeli olan sağlıklı ve polarize durumdaki hücreleri boyayıp işaretleyerek canlı hücreleri görünür hale getiren pozitif yüklü lipofilik boyalardır [77, 78]. Bu nedenle mitokondrinin membran potansiyelinin

sağlam ve negatif yüklü olması bu boyaların mitokondriye çekilmesi için gereklidir [79]. Daha fazla polarize durumdaki mitokondri (hiperpolarize; yani iç kısım daha fazla negatiftir.) daha çok pozitif yüklü boya biriktirir ve depolarize durumdaki mitokondri (yani iç kısmı daha az negatif) TMRE'yi içinde biriktirmekte başarısız olur, boyanmadan kalır. Mitokondri içindeki TMRE boyası birikimi floresan mikroskop ile görüntülenebilmektedir [80]. Bu boyanın lipofilik yapısı sayesinde membrandan kolayca geçebilmesi nedeniyle TMRE floresan analizleri metodları aracılığıyla mitokondriyal geçirgenlik tespitinde sıklıkla tercih edilmektedir [81].

Hoechst 33342: Hücrelerin DNA'ya spesifik mavi floresan boya olan Hoechst 33258, Hoechst 34580 ve Hoechst 33342 ile boyanması uygulamanın basitliği, maliyetin düşük olması açısından tercih edilmektedir [82]. Hoechst boyalarının kimyasal yapısındaki torsional açılar adenin timince zengin olan bölgelerde DNA'nın minör oluşuna bağlanmaya uygundur ve sahip olduğu katyonik gruplar negatif bazlarla etkileşimi sağlar [82, 83]. Hoechst 33342'de ek olarak lipofilik etil grubunun olması nedeniyle hücreler bu boyaya karşı diğer Hoechst boyalarından daha geçirgendir. Bu yüzden genellikle canlı hücre boyanmasında tercih edilmektedir. Hoechst 33342'ye karşı hücrelerin daha geçirgen olması ve diğerlerine göre bu boyanın minimal sitotoksitesinin olması nedeniyle daha çok tercih edilen bir boyadır. Hoechst 33342 floresan ışması boyanın lipid membranlara girmesiyle ve DNA'nın minör oluşuna bağlanmasıyla artmaktadır [82].

Hücrelerdeki Hoechst 33342'nin floresan ışması intrasellüler pH, membran potansiyeli, kromozomal DNA'nın ve plazma membranının Hoechst 33342 bağlanmasına erişilebilirliği gibi çevresel parametrelere karşı hassasiyet göstermektedir [84].

Annexin V FITC: Annexin V fosfatidilserine yüksek afinitesi olan 36 kDa'luk proteindir [85]. Erken apoptotik hücrelerin belirteci normalde hücresel membranın iç tarafında bulunan fosfatidilserin rezidüelerinin dış tarafına translokasyonudur. FITC bağlı Annexin V, Ca^{+2} varlığında negatif yüklü fosfatidilserinlere bağlanarak o hücreyi görünür hale getirir [86]. Annexin V FITC apoptotik hücrelerin akım sitometri ile analizleri için

hassas bir prob oluşturmaktadır. Bu bağlanma apoptotik hücrelerin akım sitometri ile tespit edilmesini sağlar [85].

RedDot™2: Hücre membranından geçebilen ve seçici olarak ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan bir boyadır [87]. Apoptozisin geç evrelerinde plazma membranı bozulmaya başlar ve bozulmuş membran geçirgenliğini tanıyan RedDot™2 DNA'ya bağlanarak ışımaya yapar [88].

3.2.5.1. Floresan Mikroskobu Analizi

Floresan mikroskopi yöntemi, test edilmek istenen objelerden spesifik bir görüntü almak için geliştirilen bir yöntemdir. Bu analiz metodunun çalışma şekli, uyarılmamış en düşük enerjideki bir elektronun dışsal bir enerji ile uyarılarak enerjisinin artırılması ve böylece kararsız olan elektronun enerjisinin tekrar temel seviyeye düşerken belirli dalga boyunda ışınması olarak açıklanmaktadır [89].

Hücrelere uygulanan floresan boyalar, uygun dalga boylarındaki ışığa maruz bırakıldıklarında daha uzun dalga boyunda ışımaya yaparlar. Floresan boyalar, siyah arka plan üzerinde çeitli renklerde (kırmızı, mavi, yeşil gibi) gözlemlenir. Farklı floresan boyanın gözlemlenebilmesi için farklı filtreler kullanılmaktadır [90].

Floresan mikroskopi yönteminde mitokondriyal membran potansiyelinin ve nükleer morfolojinin görüntülenmesi yaklaşımları izlendi. Bu yaklaşımlarda kullanılan kitin içeriğindeki boyaların özellikleri ve optimal belirleme işlemleri Tablo 3.3'de verilmektedir.

Tablo 3.3. Floresan mikroskopi analizi için optimal belirleme işlemleri ve kullanılan kitin içeriğindeki boyaların özellikleri

Belirteç	Ex/Em Filtreler	Boyadığı kısım
TMRE	540/595 nm	Sağlam membran potansiyeline sahip mitokondri
Hoechst 33342	350/461 nm	Tüm çekirdek (Kondanse kromatin)
Annexin V FITC	490/517 nm	Apoptotik hücrelerin dış membranının üzerindeki fosfatidilserinler

nm: Nanometre.

MCF-7 ve BT-474 hücreleri, her kuyucukta 10^6 hücre olacak şekilde 6'lı plakalara ekildi. Hücre ekilen bu plakalar, %5 CO₂'li, 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde 24 saat boyunca bekletildi. Daha sonra MCF-7 hücreleri 3.8 µM Tamoksifen, 5 µM veya 10 µM DEBİO 1143 ve ikisinin kombinasyonu ile 72 saat boyunca %5 CO₂'li 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde muamele edildi. İnkübasyonun ardından BT-474 hücreleri 18.9 µM Tamoksifen, 15 µM veya 20 µM DEBİO 1143 ve ikisinin kombinasyonu ile 72 saat boyunca %5 CO₂'li 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde muamele edildi. Boyama solüsyonu, 2,5 µl tetra metil rodamin etil ester (TMRE), 2 µl Hoechst Boyası, 25 µl Annexin V FITC karıştırılarak hazırlandı. Bu boya solüsyonundan 250 µl alınarak kuyulara eklendi ve 6'lı plakalar karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Kuyulardaki boya solüsyonu aspire edildikten sonra kitin içerdiği RedDot™2 solüsyonundan 250 µl alınarak kuyulara eklendi. Hücreler floresan mikroskopta (Olympus, Japonya) görüntülendi. TMRE ile mitokondrileri sağlıklı olan hücrelerin, Hoechst ile kondanse olmuş kromatine sahip olan hücrelerin, Annexin V FITC ile apoptozise uğrayan hücrelerin görüntülenmesi sağlandı.

3.2.5.2. Akım Sitometri Analizi

Akan bir sıvının içindeki hücrelerin özelliklerinin belirlenmesi akım sitometri olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntem floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon haldeki hücrelerin büyüklüğü ve granülaritesine göre tek tek ölçümünü sağlar [91]. Bu amaçla hücreler floresan boyalarla işaretlenmektedir. Akım sitometrideki temel prensip,

hücreler sıvının içerisinde bir ışık demetinin önünden tek tek geçerken hücrelere ilişkin verilerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüllerite veya hücrelere bağlanan çeşitli florokromlar açısından değerlendirilerek grafik haline getirilmesidir [92].

Akım sitometri cihazında üç ana sistem bulunmaktadır; (1) Hidrolik, (2) Optik, (3) Elektronik. Hidrolik sistemde hücrelerin, ışık demetinin önünden tek tek geçişi sağlanır. Optik sistemde, ışık demetinin önünden akan hücrelerden yansıyan floresan ışımının filtreler ile toplanarak fotodetektöre aktarılmasını sağlar. Elektronik sistemde ise görüntülenen sinyalin elektrik sinyaline çevrimi ve analiz için bilgisayara aktarımı sağlanır [91].

Akım sitometri yönteminde membrandaki apoptotik değişimin ve plazma membran geçirgenliğinin akım sitometride görüntülenmesi yaklaşımları izlendi. Bu yaklaşımlarda kullanılan kitin içeriğindeki boyaların özellikleri ve optimal belirleme işlemleri Tablo 3.4’de verilmektedir.

Tablo 3.4. Akım sitometri için optimal belirleme işlemleri ve kullanılan kitin içeriğindeki boyaların özelliği

Belirteç	Akım sitometrinin lazer/filtre ayarları	Boyadığı kısım
Annexin V FITC	488/525 nm	Apoptotik hücrelerin dış membranın üzerindeki fosfatidilserinler
RedDot™2	633/700 nm	Sadece ölü hücrelerin çekirdeği (plazma membran geçirgenliği)

nm: Nanometre.

MCF-7 ve BT-474 hücreleri, her kuyucukta 10^6 hücre olacak şekilde 24’lü plakalara ekildi. Bu plakalar, %5 CO₂’li 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde 24 saat bekletildi. Daha sonra MCF-7 hücreleri 3.8 µM Tamoksifen, 5 µM veya 10 µM DEBİO 1143 ve ikisinin kombinasyonu ile 72 saat boyunca %5 CO₂’li 37°C sıcaklıktaki nemli inkübatörde muamele edildi. BT-474 hücreleri 18.9 µM Tamoksifen, 15 µM veya 20 µM DEBİO 1143 ve ikisinin kombinasyonu ile 72 saat boyunca %5 CO₂’li 37°C sıcaklıktaki

nemli inkübatörde muamele edildi. Hücreler tripsin eklenerek toplandıktan sonra eppendorflara alındı. Tüpler 400g'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüjün ardından süpernatantlar aspire edildi. Boyama solüsyonu, 2,5 µl TMRE, 2 µl Hoechst Boyası, 25 µl Annexin V FITC karıştırılarak hazırlandı. Bu boya solüsyonundan 100 µl alınarak santrifüjle elde edilen pelletin üstüne eklendi. Tüpler oda sıcaklığında, karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra eppendorflar 400g'de 5 dakika tekrar santrifüjlendi ve süpernatant tekrar aspire edildi. Elde edilen pellet üzerine 100 µl RedDot™2 eklenerek ile homojenize edildi. Hücrelerin analizi akım sitometride (BD Biosciences, ABD) yapıldı.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Deneylerde Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün artan konsantrasyonları üçer kuyuda test edildi ve her bir deney üç kez tekrarlandı. Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün artan konsantrasyonlarına ait doz cevap eğrileri, Graphpad Prism 5.0 istatistik yazılımında (La Jolla, CA, ABD) oluşturuldu. Sitotoksik etki yüzdesi açısından Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün artan konsantrasyonları ile kontroller arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett's testi kullanılarak araştırıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. XTT Yöntemi ile Elde Edilen Sitotoksik Bulguları

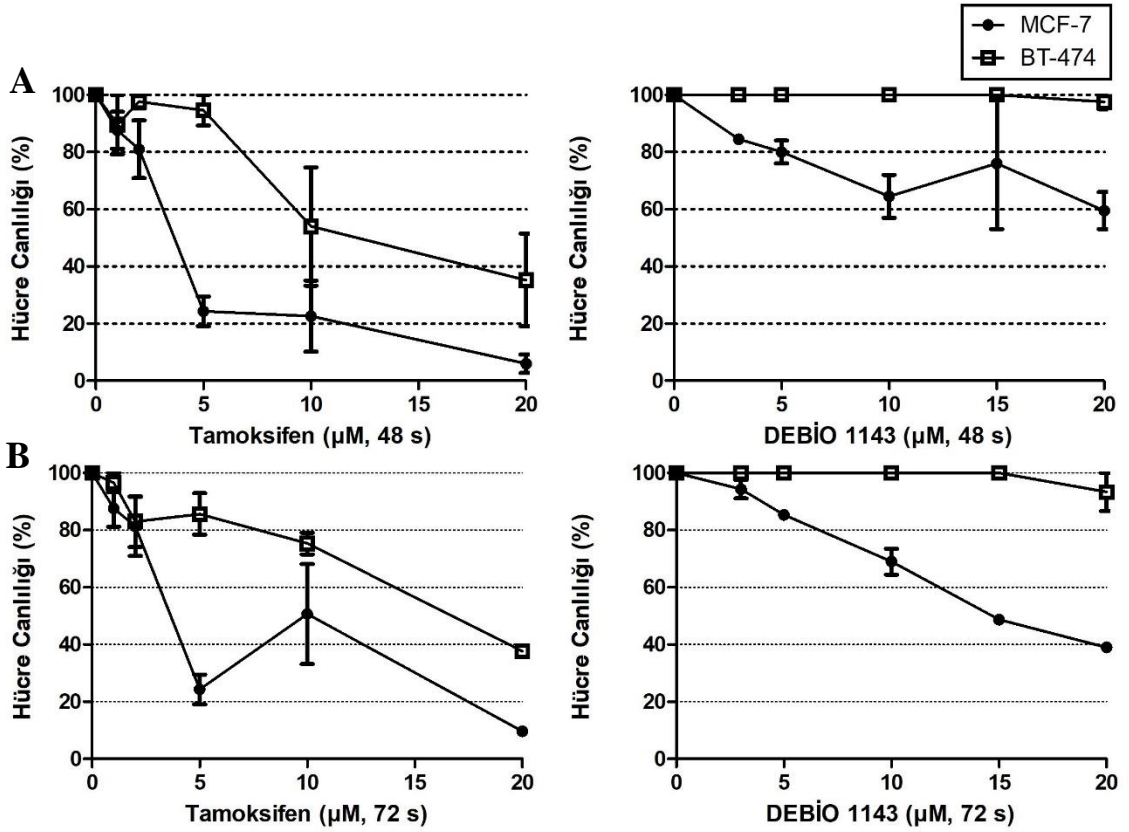
4.1.1.1 Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi

Tamoksifen'in veya DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek için XTT hücre canlılığı testinden elde edilen bulgulara göre 48. saatte DEBİO 1143'ün BT-474 hücre hattı üzerinde önemli bir sitotoksik etki belirlenmedi (Şekil 4.1A). Bu nedenle her iki ajan için de 72. saat uygulamasından elde edilen bulgular verilmektedir.

Tamoksifen (1µM, 2µM, 5µM, 10µM, 20µM), 72. saatte tek başına MCF-7 ve BT-474 hücrelerinde canlılığı doza bağlı olarak azalttı ($p < 0.001$) (Şekil 4.1B).

DEBİO 1143 (3µM, 5µM, 10µM, 15µM, 20µM) 72. saatte tek başına MCF-7 hücre hattında canlılığı doza bağlı azaltırken ($p < 0.001$), BT-474 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisini sadece 20 µM'lık uygulanan dozda gösterdi (Şekil 4.1B).

CompuSyn yazılımından elde edilen, Tamoksifen için MCF-7 ve BT-474 hücrelerinde 72. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 3.8 ± 0.6 µM ve 18.9 ± 6.7 µM, DEBİO 1143 için MCF-7 hücre hattında 15 ± 0.5 µM olarak hesaplandı (Tablo 4.1).



Şekil 4.1. DEBİO 1143 ve Tamoksifen'in MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarının canlılığı üzerine (A) 48. ve (B)72. saatlerdeki etkisi.

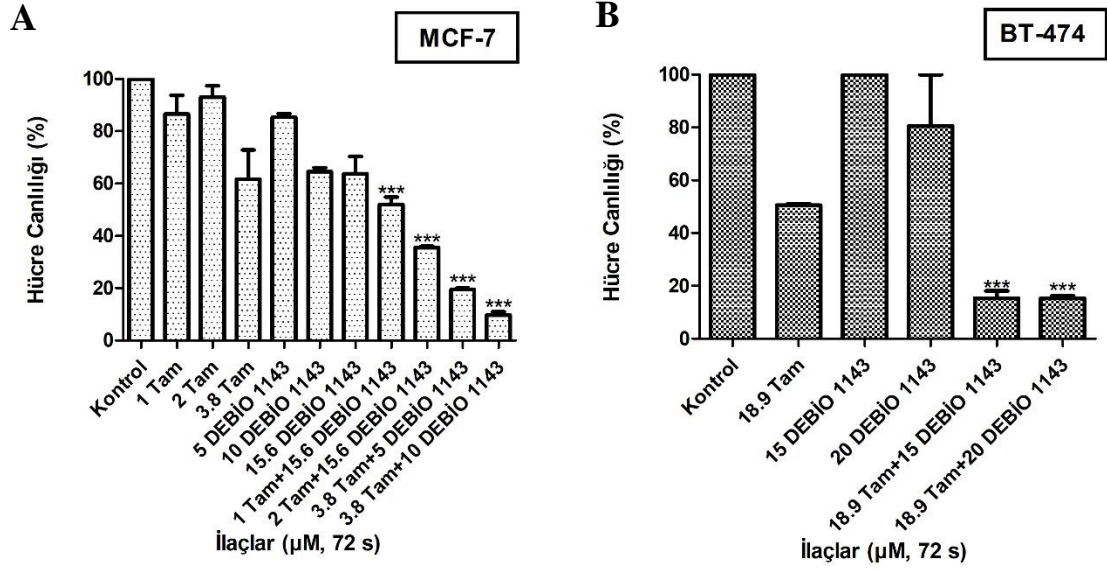
Tablo 4.1. MCF-7 ve BT-474 Hücrelerindeki Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün IC₅₀ değerleri.

Meme Kanseri Hücre Hattı	IC ₅₀ (μM)	
	Tamoksifen	DEBİO 1143
MCF-7	3.8 ± 0.6	15 ± 0.5
BT-474	18.9 ± 6.7	-

4.1.1.2. Tamoksifen ve DEBİO 1143 Kombinasyonunun MCF-7 ve BT-474

Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisi

DEBİO 1143 ve Tamoksifen kombinasyonunun sitotoksik etkilerini çalışmak için, MCF-7 ve BT-474 hücreleri, tek başına her iki ajanın da farklı konsantrasyonlarına ve kombinasyonlarına 72 saat boyunca maruz bırakıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. (A) MCF-7 ve (B) BT-474 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak canlılığın Tamoksifen ve DEBİO 1143 kombinasyonu tarafından inhibisyonu. Grafikler, üç farklı deney verileri kullanılarak oluşturulmuştur (***) $p < 0.001$).

MCF-7 hücrelerindeki 5 µM DEBİO 1143 ve 3.8 µM Tamoksifen'in sitotoksik etkisi sırasıyla % 15 ve % 39, kombinasyonunun ise sitotoksik etkisi % 81 oranında gözlemlendi ($p < 0.001$). MCF-7 hücrelerindeki 10 µM DEBİO 1143 ve 3.8 µM Tamoksifen'in sitotoksik etkisi sırasıyla % 36 ve % 39, kombinasyonunun ise sitotoksik etkisi % 91 oranında gözlemlendi ($p < 0.001$). MCF-7 hücrelerindeki 15.6 µM DEBİO 1143 ve 1 µM Tamoksifen'in sitotoksik etkisi sırasıyla % 37 ve % 14, kombinasyonunun ise sitotoksik etkisi % 52 oranında gözlemlendi ($p < 0.001$). MCF-7 hücrelerindeki 15.6 µM DEBİO 1143 ve 2 µM Tamoksifen'in sitotoksik etkisi sırasıyla % 50 ve % 7, kombinasyonunun ise sitotoksik etkisi % 65 oranında gözlemlendi ($p < 0.001$).

BT-474 hücrelerindeki 15 µM DEBİO 1143 ve 18.9 µM Tamoksifen'in sitotoksik etkisi sırasıyla % 0 ve % 50, kombinasyonunun ise sitotoksik etkisi % 85 oranında gözlemlendi (p<0.001). BT-474 hücrelerindeki 20 µM DEBİO 1143 ve 18.9 µM Tamoksifen'in sitotoksik etkisi sırasıyla % 20 ve % 50, kombinasyonunun ise sitotoksik etkisi % 85 oranında gözlemlendi (p<0.001). Kombinasyon çiftlerinin kombinasyon indeks analizler Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücrelerinde Tamoksifen ile kombinlenen DEBİO 1143'ün kombinasyon indeks analizi.

Hücre Hattı	Kombine Edilen Ajanlar	Fa	CI*	Tanımı
BT-474	DEBİO 1143 (15 µM) + Tam (18.9 µM)	0.85	0.60	Sinerjistik
	DEBİO 1143 (20 µM) + Tam (18.9 µM)	0.85	0.69	Sinerjistik
MCF-7	DEBİO 1143 (5 µM) + Tam (3.8 µM)	0.81	0.22	Yüksek Sinerjistik
	DEBİO 1143 (10 µM) + Tam (3.8 µM)	0.91	0.20	Yüksek Sinerjistik
	DEBİO 1143 (15,6 µM) + Tam (1 µM)	0.52	0.58	Sinerjistik
	DEBİO 1143 (15,6 µM) + Tam (2 µM)	0.65	0.77	Sinerjistik

*CI = 1.00, CI < 0.50, yüksek sinerjistik; CI < 1.00, sinerjistik; CI > 1.00, antagonistik

4.1.2. Birden Fazla Parametre Kullanılarak Apoptozisin Analizi ile ilgili

Elde Edilen Bulgular

XTT sitotoksikite testi sonuçlarına göre TAM ve DEBİO 1143 kombinasyon uygulamalarında, MCF-7 hücrelerinde kombinasyon indeks değeri en düşük olan yani sinerjistik açıdan en etkili olan doz (DEBİO 1143 (10 µM) + Tam (3.8 µM)); BT-474 hücrelerinde ise DEBİO 1143'ün tek olarak etki gösterdiği 20 µM'lık doz bu parametrenin testinde kullanılmıştır.

4.1.2.1. Floresan Mikroskopi Görüntüleme Bulguları

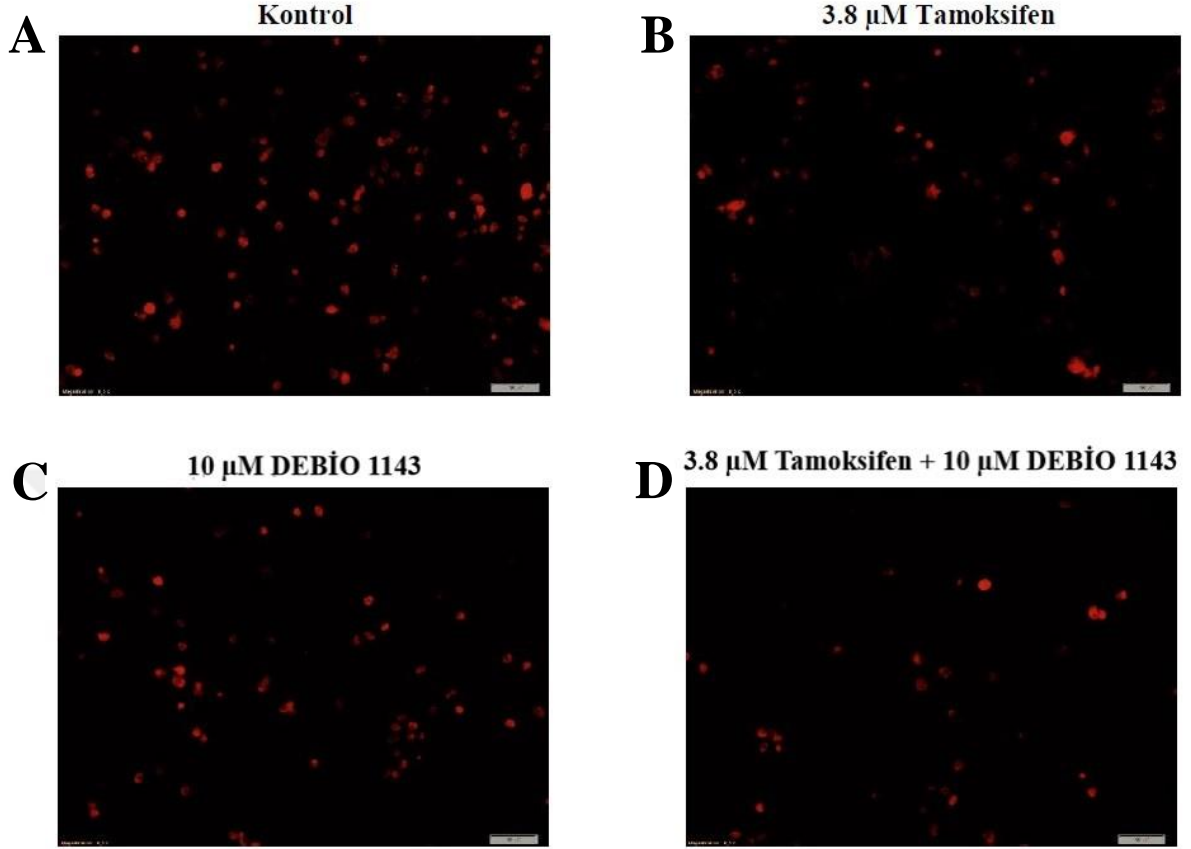
Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 hücre kültürleri üzerindeki Hoechst, TMRE ve Annexin V FITC ile boyanmasından elde edilen floresan mikroskopi analizi bulguları aşağıda verilmektedir.

4.1.2.1.1. Mitokondrial Membran Potansiyelinin Ölçümü Bulguları

İlaç ve SMAC mimetği uygulanmamış MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücre hatlarında (kontrol), mitokondrilerin kırmızı floresan boya ile boyandığı gözlemlendi (sırasıyla Şekil 4.3A, Şekil 4.4A).

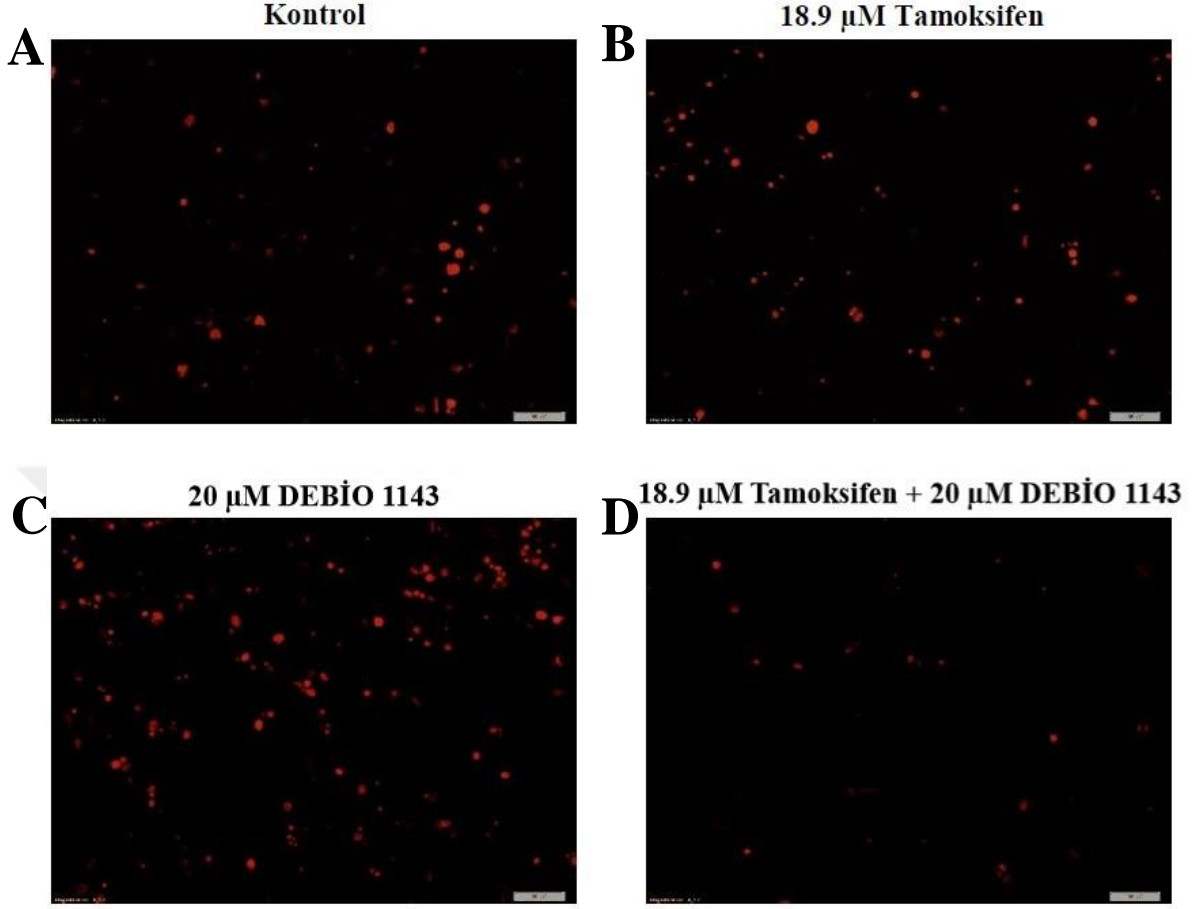
Çalışma grubunda ise ilaç ve SMAC mimetği uygulamasında 72 saat sonunda alınan TMRE boyaması görüntüleri ile ilgili bulgular aşağıda belirtilmektedir.

MCF-7 hücrelerine 3.8 μ M Tamoksifen, 10 μ M DEBİO 1143'ün ayrı ayrı uygulanmasına (sırasıyla Şekil 4.3B, Şekil 4.3C) göre ikisinin kombine edilerek uygulanmasından (Şekil 4.3D) elde edilen kırmızı floresan boyanmada azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3. TMRE boyası ile boyanan MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm)

BT-474 hücrelerine 18.9 µM Tamoksifen'in tek başına (Şekil 4.4B) ve Tamoksifenle 20 µM DEBİO 1143'ün kombinasyonu (Şekil 4.4D) uygulanmasından elde edilen boyamada kontrole göre azalma varken, DEBİO 1143'ün tek başına (Şekil 4.4C) uygulamasında boyanmanın fazla olduğu görüldü.



Şekil 4.4. TMRE boyası ile boyanan BT-474 hücrelerinin floresan mikroskobundaki görüntüleri (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm)

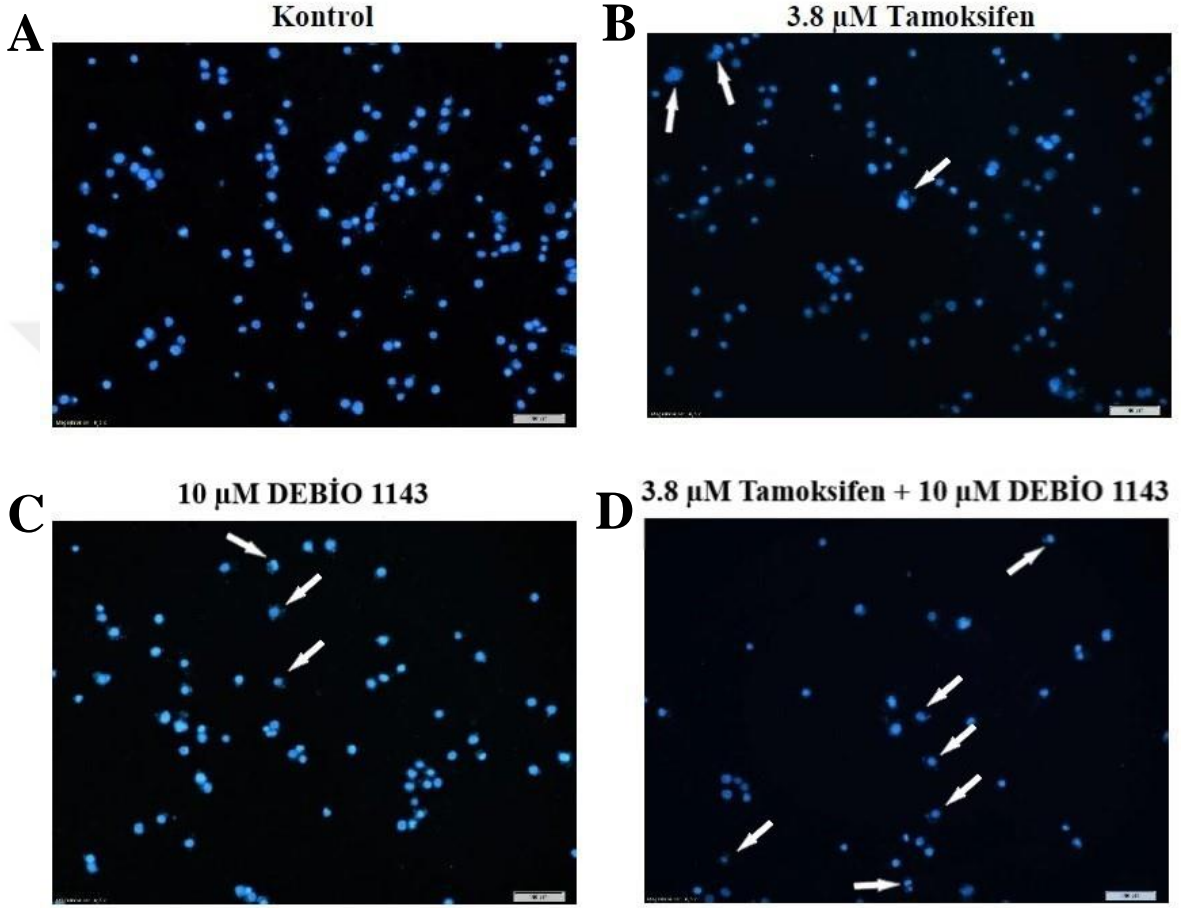
4.1.2.1.2. Nüklear Morfolojinin Değerlendirilmesi Bulguları

İlaç ve SMAC mimetiği uygulanmamış (kontrol) MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücrelerinin, sağlam bir çekirdeğe sahip olduğu gözlemlendi (sırasıyla Şekil 4.5A, Şekil 4.6A).

Çalışma grubunda ise ilaç ve SMAC mimetiği uygulamasının 72 saat sonunda alınan Hoechst boyaması görüntüleri ile ilgili bulgular aşağıda belirtilmektedir.

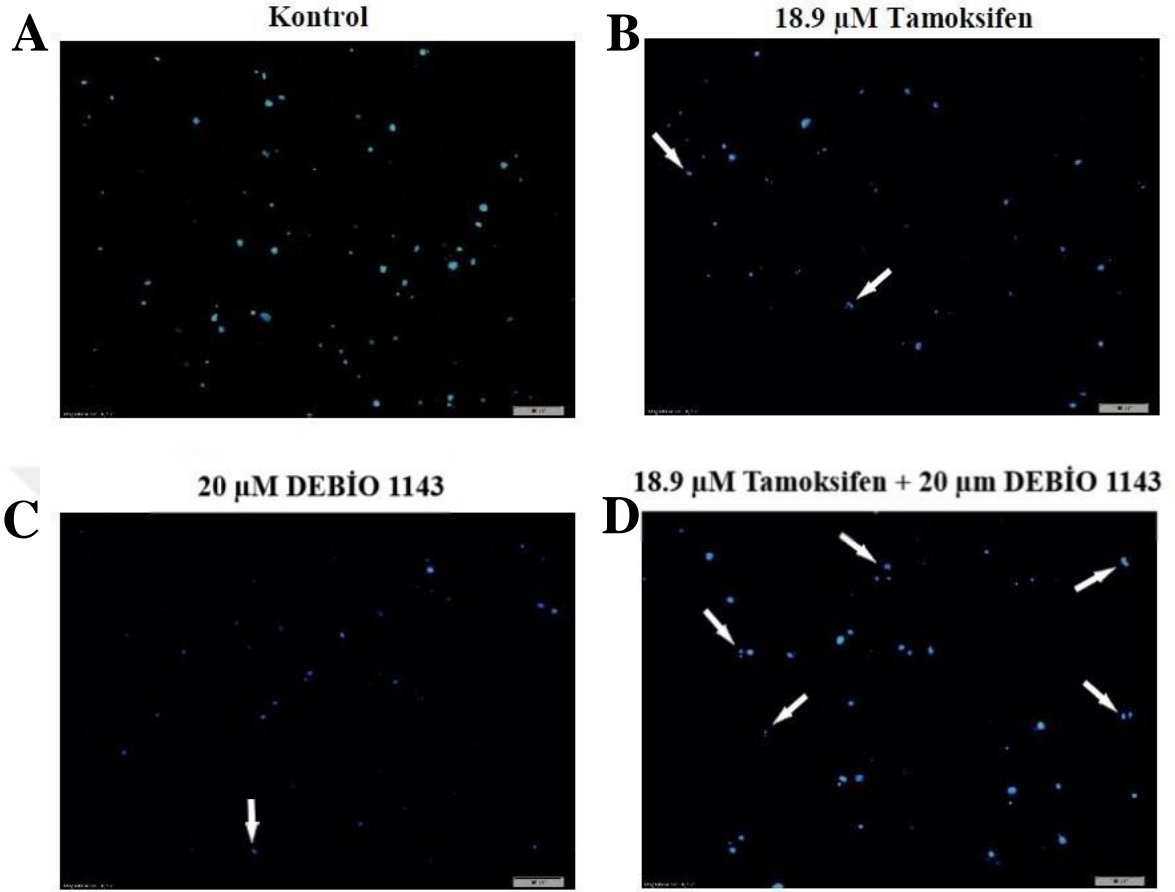
MCF-7 hücrelerine 3.8 µM Tamoksifen, 10 µM DEBİO 1143'ün ayrı ayrı (sırasıyla Şekil 4.5B, Şekil 4.5C) uygulanmasına göre ikisinin kombine edilerek

uygulanmasından alınan sonuçlarda (Şekil 4.5D) elde edilen mavi floresan boyamada sağlam olmayan nukleusa sahip hücrelerin arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.5. Hoechst boyası ile boyanan MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskopundaki görüntüleri. B, C, D'deki oklar sağlam nukleusa sahip olmayan hücreleri göstermektedir. (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm).

BT-474 hücrelerine 18.9 µM Tamoksifen, 20 µM DEBİO 1143'ün ayrı ayrı (sırasıyla Şekil 4.6B, Şekil 4.6C) uygulanmasına göre ikisinin kombine edilerek (Şekil 4.6D) uygulanmasından elde edilen boyamada sağlam nukleusa sahip olmayan hücrelerin arttığı görüldü.



Şekil 4.6. Hoechst boyası ile boyanan BT-474 hücrelerinin floresan mikroskobundaki görüntüleri. B, C, D'deki oklar sağlam nukleusa sahip olmayan hücreleri göstermektedir. (Büyütme oranı: 6,3X; Ölçek: 100. µm).

4.1.2.1.3. Apoptotik Hücrelerin Dış Membranları Üzerindeki Fosfatidilserin Boyanması Bulguları

TAM ve DEBİO 1143 uygulanmamış hücre hatlarında (kontrol) ve bu ajanlarla ayrı ayrı ve kombine edilerek 72 saat boyunca maruz bırakılan MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücre hatlarında apoptozisin varlığını gösteren Annexin V FITC boyanması gözlenmedi.

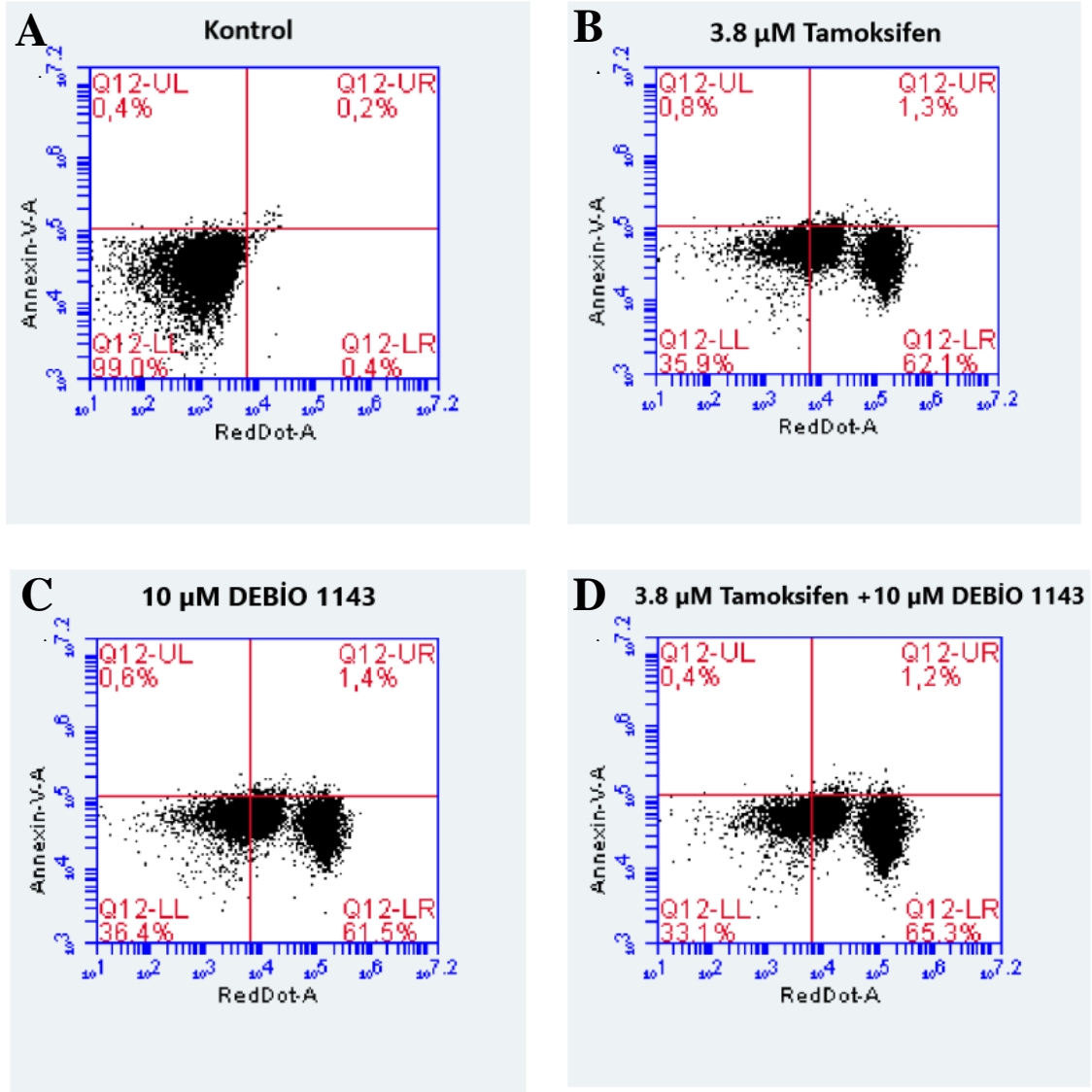
4.1.2.2. Tamoksifen ve DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Akım Sitometrisi (Flow Sitometri) ile Görüntülenmesi

Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün MCF-7 ve BT-474 hücre kültürleri üzerindeki etkilerini incelemek için hücreler Annexin V FITC ve RedDot™2 ile boyama uygulamasından elde edilen akım sitometri analiz bulguları aşağıda belirtilmektedir.

İlaç ve SMAC mimetiği uygulanmamış (kontrol) MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücre hatlarının % 99'unun Annexin V ve RedDot™2 ile boyanmadığı belirlendi (Şekil 4.7A, Şekil 4.8A).

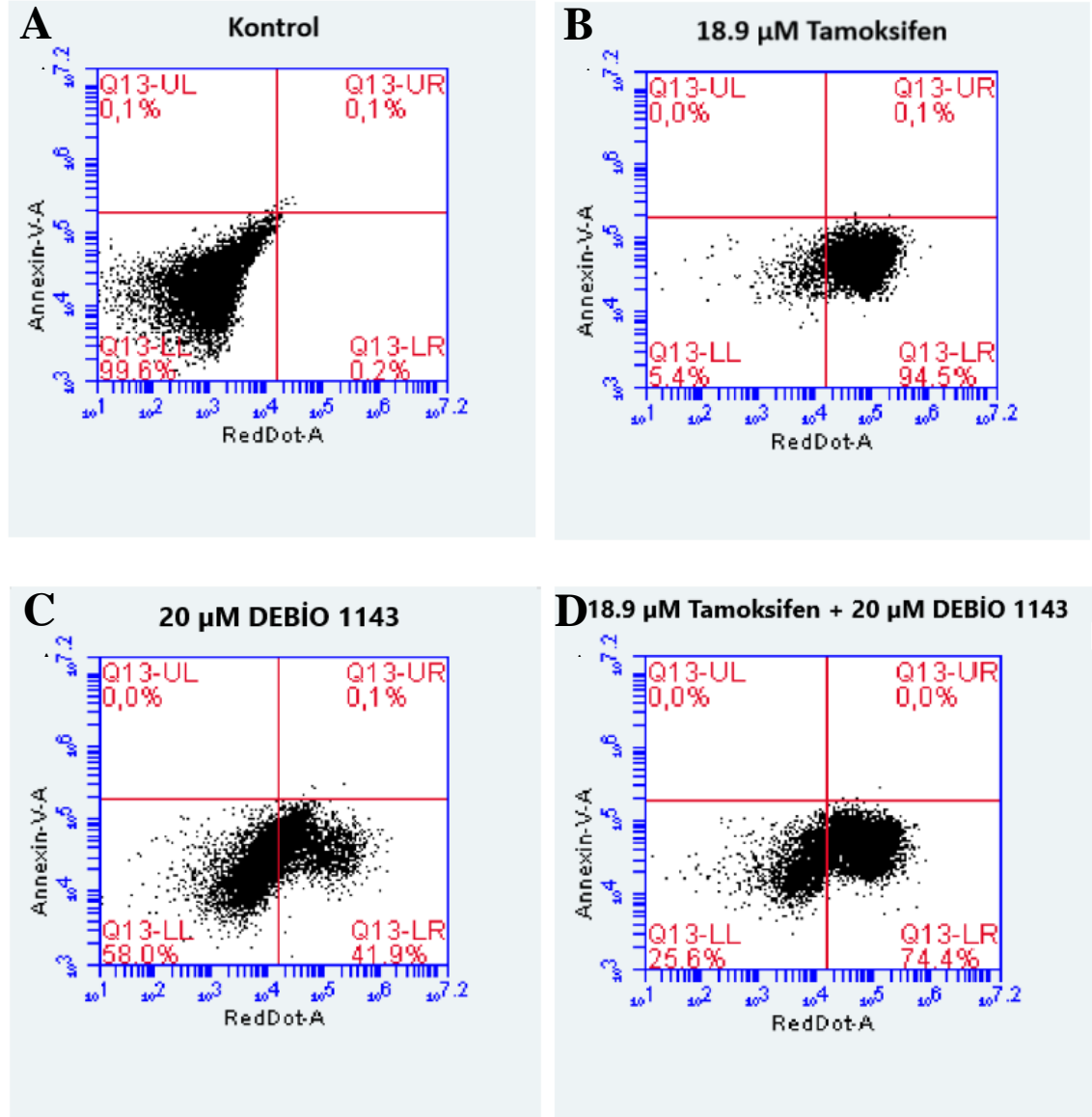
Çalışma grubunda ise TAM ve DEBİO 1143 uygulamasından 72 saat sonra alınan görüntüler ile ilgili bulgular aşağıda belirtilmektedir.

MCF-7 hücrelerine 3.8 µM Tamoksifen, 10 µM DEBİO 1143'ün ayrı ayrı ve ikisinin kombine edilerek uygulandığı kuyulardaki hücre canlılığı sırasıyla % 35.9, % 36.4, % 33.1 olarak belirlendi. Aynı kuyulardaki hücrelerin RedDot™2 boyaması sırasıyla % 62.1, % 61.5, % 65.3 olarak gözlendi (Şekil 4.7B, Şekil 4.7C Şekil 4.7D).



Şekil 4.7. Annexin V ve RedDot™2 ile boyanan MCF-7 hücrelerinin akım sitometrisi cihazından elde edilen bulguları

BT-474 hücrelerine 18.9 µM Tamoksifen, 20 µM DEBİO 1143'ün ayrı ayrı ve ikisinin kombine edilerek uygulandığı kuyulardaki hücre canlılığı sırasıyla % 5.4, % 58, % 25.6 olarak belirlendi. Aynı kuyulardaki hücrelerin RedDot™2 boyaması sırasıyla % 94.5, % 41.9, % 74.4 olarak gözlemlendi (Şekil 4.8B, Şekil 4.8C Şekil 4.8D).



Şekil 4.8. Annexin V ve RedDot™2 ile boyanan BT-474 hücrelerinin akım sitometrisi cihazından elde edilen bulguları

4.1.3. İstatistiksel Analiz Bulguları

XTT sitotoksosite deneyinden elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett's testi kullanılarak elde edilen bulgular, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri $p < 0.05$ 'dir.

Tablolarda karşılaştırılan gruplar;

1. Kontrol (K) ile Tamoksifen (T) ve DEBİO 1143 (D) kombinasyonunun,

2. Tamoksifen'in (T) ve DEBİO 1143 (D)'ün her birinin ayrı ayrı kombinasyon değerleriyle karşılaştırılmasından elde edilen istatistiksel bulguları göstermektedir.

Tablo 4.3. MCF-7 hücre hattı için istatistiksel p değerleri

MCF-7 Hücre Hattındaki İstatistiksel Analiz Sonuçları			
Karşılaştırılan gruplar	p değeri	Karşılaştırılan gruplar	p değeri
K-T ₁ μM+D _{15.6} μM	***	D ₅ μM -T ₁ μM +D _{15.6} μM	**
K-T ₂ μM +D _{15.6} μM	***	D ₅ μM - T ₂ μM +D _{15.6} μM	***
K-T _{3.8} μM +D ₅ μM	***	D ₅ μM - T _{3.8} μM +D ₅ μM	***
K-T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	***	D ₅ μM - T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	***
T ₁ μM -T ₁ μM +D _{15.6} μM	**	D ₁₀ μM -T ₁ μM +D _{15.6} μM	n.s.
T ₁ μM -T ₂ μM +D _{15.6} μM	***	D ₁₀ μM -T ₂ μM +D _{15.6} μM	n.s.
T ₁ μM -T _{3.8} μM +D ₅ μM	***	D ₁₀ μM - T _{3.8} μM +D ₅ μM	**
T ₁ μM -T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	***	D ₁₀ μM -T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	***
T ₂ μM -T ₁ μM +D _{15.6} μM	***	D _{15.6} μM -T ₁ μM +D _{15.6} μM	n.s.
T ₂ μM -T ₂ μM +D _{15.6} μM	***	D _{15.6} μM -T ₂ μM +D _{15.6} μM	n.s.
T ₂ μM -T _{3.8} μM +D ₅ μM	***	D _{15.6} μM -T _{3.8} μM +D ₅ μM	n.s.
T ₂ μM -T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	***	D _{15.6} μM -T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	**
T _{3.8} μM -T ₁ μM +D _{15.6} μM	n.s.		
T _{3.8} μM -T ₂ μM +D _{15.6} μM	n.s.		
T _{3.8} μM -T _{3.8} μM +D ₅ μM	**		
T _{3.8} μM -T _{3.8} μM +D ₁₀ μM	***		

D:DEBİO 1143; **K:** Kontrol; **T:**Tamoksifen

n.s.:İstatistiksel olarak önemli değil (non significant) $p > 0.05$

** $p \leq 0.01$

*** $p \leq 0.001$

Tablo 4.4. BT-474 hücre hattı için istatistiksel p değerleri.

BT-474 hücre hattındaki istatistiksel analiz sonuçları			
Karşılaştırılan gruplar	p değeri	Karşılaştırılan gruplar	p değeri
K-T _{18.9} μM +D ₁₅ μM	***	D ₁₅ μM -T _{18.9} μM +D ₁₅ μM	***
K-T _{18.9} μM +D ₂₀ μM	***	D ₁₅ μM -T _{18.9} μM +D ₂₀ μM	***
T _{18.9} μM -T _{18.9} μM +D ₁₅ μM	*	D ₂₀ μM - T _{18.9} μM +D ₁₅ μM	***
T _{18.9} μM -T _{18.9} μM +D ₂₀ μM	*	D ₂₀ μM - T _{18.9} μM +D ₂₀ μM	***

D:DEBİO 1143; **K:** Kontrol; **T:**Tamoksifen

* $p \leq 0.05$

*** $p \leq 0.001$

4.2. Tartışma

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün kombine edilerek uygulanmasının MCF-7 (Luminal A tipi), BT-474 (Luminal B tipi) ER+ meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik etkisine yönelik elde edilen ilk verilerdir. Bulgular her iki hücre hattında da kombine uygulamanın sinerjistik sitotoksik etki gösterdiğini işaret etmektedir. Sitotoksik etkinin hücre ölüm mekanizmalarından apoptozis mekanizması ile olmadığını, diğer hücre ölüm tiplerinden otofaji ya da nekrozis ile olabileceğini göstermektedir.

Yaptığımız araştırmada Tamoksifen'in, MCF-7 ve BT-474 hücrelerinde 72. saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 3.8 µM ve 18.9 µM olarak belirlenmiştir.

MCF-7 hücre hattı için 3.8 µM olarak belirlenen değer, Wang ve arkadaşlarının [93] aynı hücre hattı ile yaptıkları çalışma ile benzer bulunmuştur. MCF-7 hücreleriyle yapılmış Tamoksifen'in 72. saatteki IC₅₀ değeri Barrett ve arkadaşlarının [94] çalışmasında 4.12 µM, Yenigün ve arkadaşlarının [95] çalışmasında ise 10 µM olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdan farklı olan IC₅₀ değerleri, deneysel farklılıklardan (test edilen hücre sayısı, çoğaltım koşulları gibi) dolayı olabilir.

Araştırmamızda, BT-474 hücre hattı için elde edilen Tamoksifen'in 72. saatteki IC₅₀ değeri olan 18.9 µM, MCF-7 hücre hattı için bulunan değerden daha yüksektir. BT-474 hücre hattı gen ekspresyon profiline göre p53 mutant, HER2 + 'dir. MCF-7 hücre hattında ise p53 wild tip, HER2 ise eksprese edilmemektedir. HER2'nin aşırı ifade edilmesi meme kanserinde Tamoksife'ne direnç gelişmesiyle ilişkilendirilmektedir [96]. Meme kanseri hücre hatlarında, p53 durumunun da östrojen reseptör modülatörü Tamoksifen'e ve östrojen ligandına karşı hücre sel yanıtı etkilediği ve p53 mutant hücre hatlarının Tamoksifen'in sitotoksik etkisine karşı daha az duyarlı olduğu belirtilmektedir. Bunun sebebinin, p53 fonksiyon kaybının östrojen reseptörü ve EGFR/HER2 yolağı arasındaki etkileşim (cross-talk) artmasına yol açmasından dolayı olabileceği belirtilmektedir [97]. Çalışmamızda, hücre hatlarından BT-474 üzerinde tamoksifenin IC₅₀ değerinin daha yüksek olması, olasılıkla p53 ve HER2 gen ekspresyon profilinden kaynaklanmaktadır.

Bulgularımız SMAC mimetiği olan DEBİO 1143'ün 72. saatte, MCF-7 hücre hattındaki IC₅₀ değerinin 15 µM olduğunu göstermektedir. Chessari ve arkadaşlarının MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-, p53 mutant), EVSA-T (ER-, PR-, HER2+, p53 mutant) meme kanseri hücreleri ile yaptığı çalışmada, DEBİO 1143 ajanının IC₅₀ değerleri sırasıyla 72. saatte 0.019 µM ve 0.0021 µM olarak tespit edilmiştir [98]. IC₅₀ değerleri arasındaki bu farklılık, DEBİO 1143 ajanının tek başına uygulanmasında sitotoksik etkinin hormon reseptör profiline bağlı olabileceğini göstermektedir. DEBİO 1143'ün ER+, PR+ meme kanser hücre hatlarına göre ER- ve PR- meme kanser hücre hatlarında daha düşük dozda etkili olduğunu işaret etmektedir.

BT-474 hücre hattında XTT hücre canlılığı testinde 20 µM DEBİO 1143'ün uygulandığı kuyularda sitotoksik etkisinin %20 olduğunu gözlemledik. Bunun nedeninin; BT-474 hücrelerindeki ekspresyon değişiklikleri olduğu tahmin edilmektedir. MCF-7'den farklı olarak, BT-474 hücrelerindeki HER2+ ve P53'ün mutant olmasının DEBİO 1143 ajanına verilen yanıtı azalttığı düşünülmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, IAP olan Survivin ekspresyonunun HER2'nin aşırı ekspresyonu ile artış gösterdiği ve P53 mutant durumda olduğu için Survivin ekspresyonunu engelleyemediği bulunmuştur [99]. Ayrıca SMAC mimetiklerinin IAP'düzeylerine etki etmesiyle birlikte IAP düzeyinin yüksekliğinin de SMAC düzeyini etkilediği saptanmıştır. Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, IAP olan Livin'in SMAC'ı azalttığı gösterilmiştir [100].

Kombinasyon uygulamalarında ise MCF-7 hücre hattında DEBİO 1143 (5 µM) + Tam (3.8 µM) ve DEBİO 1143 (10 µM) + Tam (3.8 µM) dozları yüksek sinerjistik (CI < 0.50), DEBİO 1143 (15.6 µM) + Tam (1 µM) ve DEBİO 1143 (15.6 µM) + Tam (2 µM) dozları sinerjistik (CI < 1.00) etkili bulundu. İlginç olan ise BT-474 hücre hattında DEBİO 1143'ün 15 µM'lık dozunun tek başına uygulanmasında sitotoksik etki gözlenmezken, DEBİO 1143 (15 µM) + Tam (18.9 µM) kombinasyon dozunda sinerjistik etkili (CI < 1.00) olduğu belirlendi. BT-474 hücre hattında 20 µM DEBİO 1143 dozunun %20 oranı gibi az bir seviyede sitotoksik etkisi gözlenirken DEBİO 1143 (20 µM) + Tam (18.9 µM) kombinasyon dozunun sinerjistik (CI < 1.00) etkili olduğu belirlendi. BT-474 meme kanseri hücre hattında 20 µM üzerinde uygulanacak DEBİO 1143 dozunun artışına bağlı olarak etkisinin değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Fandy ve arkadaşlarının [101] MCF-7 (ER+, PR+ HER2-), MDA-MB-453 (ER-, PR-, HER2+) ve MDA-MB-468 (ER-, PR-, HER2-) meme kanseri hücreleriyle yaptıkları çalışmada SMAC mimetiği ile muamelenin Tamoksifen'in etkisini arttırdığı saptanmıştır. Bu bulgularla tutarlı olarak çalışmamızda Tamoksifen ve DEBİO 1143 kombinasyonunun MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin sinerjistik olduğunu tespit ettik (Tablo 4.2).

Stanculescu ve arkadaşlarının [102] yaptığı çalışmada MCF-7 ve T47D ER+ meme kanseri hücrelerinde östrojenin NF- κ B aracılığıyla TNF α sayesinde cIAP2'nin yüksek ekspresyonuna neden olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda DEBİO 1143'ün BT-474 hücresinde 15 μ M dozda sitotoksik etki göstermeme nedeninin cIAP2 seviyesinin yüksek olması ve bu nedenle DEBİO 1143'ü baskılamış olabileceğini düşünmekteyiz. Tamoksifen ve DEBİO 1143 kombinasyonuna maruz kalan BT-474 hücrelerinde ise östrojen seviyesi azalan hücrelerin daha fazla cIAP2 eksprese edemediği ve dolayısıyla yüksek sinerjistik etkinin bu yüzden görülebileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca DEBİO 1143'ün BT-474 ve MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik etki sonuçlarının farklılığı MCF-7 ve BT-474 hücrelerindeki IAP proteini çeşitlerinin ekspresyon farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü yapılan bir araştırmada, DEBİO 1143'ün tercihen cIAP1 ve cIAP2'ye bağlandığı ve XIAP'a karşı daha az afinite gösterdiği belirtilmektedir [72]. Bu nedenle MCF-7 ve BT-474 hücrelerindeki IAP ekspresyon seviyelerinin incelenmesi yararlı olacaktır.

Hoechst 33342 boyasıyla yapılan floresan mikroskopi analizinde MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücrelerine Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün ayrı ayrı uygulanmasına göre kombinasyon uygulanmasında nukleus morfolojisi bozuk hücrelerde önemli derecede artış gözlemlenmiştir. Ayrıca TMRE boyaması yapılan MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücrelerinde kontrol grubuna göre kombinasyon grubunda anlamlı şekilde daha az boyanma (yani daha az canlılık) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerin XTT sitotoksikite testi ile uyumlu bulgular olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan in vitro çalışmalar, çeşitli kanser hücre hatlarında DEBİO 1143 ile birlikte bortezomib [103] ya da karboplatin [4] ya da radyasyon [104] ya da JQ1 [105] uygulanmasının apoptozisi indükleyebileceğini desteklemektedir.

Çalışmamızda Annexin V FITC apoptozis analizi sonuçlarına göre, her iki hücre hattında da kombinasyonun sitotoksik etkisinin apoptozis olmadığını göstermektedir. RedDot™2 boyama sonucuna göre ise hücre ölümünün apoptozis dışında hücre ölüm mekanizmalarından biriyle gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar, Tamoksifen'in ER+ meme kanseri hücrelerinde otofajiyi ve apoptozisi indüklediğini göstermiştir [106, 107]. Bununla birlikte bazı çalışmalar, meme kanseri hücrelerinde Tamoksifen'in apoptozisle tutarlı olarak karakteristik morfolojik değişiklikleri indüklediğini belirtmektedir [108]. Tamoksifen'in retinal fotoreseptör, glioblastoma ve meme kanseri hücrelerinde ise otofajiyi indükleyebildiği de gösterilmiştir [106, 109, 110]. Bursch ve arkadaşları [106], otofajinin inhibisyonunu sağlayarak MCF-7 hücrelerinde Tamoksifen ile indüklenen hücre ölümünün engellendiğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada da, Tamoksifene maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde otofagozomun floresan probu olan dansilkadaverin (MDC) sayesinde otofagozom şekillenmesi görüntülenmiştir [111]. Hwang ve arkadaşları [112] Tamoksifen'e maruz bırakılan ER+ MCF-7 ve ER- SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde LC3-II artışıyla otofajinin indüklendiğini ve ER bağımsız olarak gerçekleştiğini tespit etmişlerdir [109].

Meme kanseri hastalarından alınan örneklerde Beclin 1 (BECN1, mayalardaki otofaji ilişkili genin (ATG (AuTophagy)) insanlardaki homoloğu) genindeki azalmış ekspresyonunun onun tümör baskılayıcı rolü olabileceğini desteklemektedir. Bu durum tümörigenez sırasındaki genomik instabiliteye katkı sağlamaktadır [113]. Beclin 1 ekspresyonu olmayan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde genetik olarak tekrar yapılandırma sayesinde; besin yetersizliğine yanıt olarak otofaji indüksiyonu sağlanmış ve daha az malign fenotip teşvik edilmiştir [57].

Birçok kanser tipinde apoptozisten kaçış karakteristik bir özelliktir. Tedaviye direnç ile de ilişkilendirilmektedir. Son yıllarda nekroptozisin kanser hücrelerinde terapötik etkisine olan ilgi alternatif hücre ölüm mekanizması olarak ilgi çekicidir [114].

Nekroptozis, strese ve engellenmiş apoptozise cevap olarak verilen kritik bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekroptozis kemoterapötik ilaçlar tarafından indüklenebilmektedir. Klinik olarak geliştirilmekte olan SMAC mimetikleri, apoptozise ek olarak nekroptozisi de tetiklemektedir [10].

Apoptozis yollarında sorun olan kanser hücreleri nekroptozise gitme eğilimindedir. Örneğin, SMAC mimetiklerinin kaspaz-8 veya FADD olmayan lösemi hücrelerinde TNF α ile tetiklenen nekroptozisi arttırdığı gözlenmiştir [115, 114]. Ek olarak glukokortikoidlerle SMAC mimetiklerinin lösemi hücrelerine birlikte uygulanmasıyla apoptozisin tetiklendiği [116] ancak belirli bir kaspaz-8 ekspresyonu olmayan lösemi hücrelerinde ise nekroptozisi indüklediği gösterilmiştir. [117] Hannes ve arkadaşlarının [118] ulaştığı veriler de bu bulgularla tutarlı olarak, pankreatik kanser hücrelerinde kaspaz aktivasyonunun engellenmesi durumunda SMAC mimetiklerinin nekroptozisi tetiklediği bulunmuştur. Hücresel strese cevap olarak RIP1'in multifonksiyonel rolü de dikkate alınmalıdır. Hücresel stres durumlarında fonksiyonel kaspaz-8 yoksa ya da ubikitinlenmemiş RIP1 varsa hücre nekroptozise gider [70]. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleriyle yapılmış çalışmada SMAC mimetiğinin cIAP'i yıkması sonucunda RIP1 birikiminin olduğu dolayısıyla nekroptozisin gerçekleştiği düşünülmektedir [119].

Tamoksifen ve DEBİO 1143'ün sitotoksik etkisine ilişkin daha önce yapılmış araştırma sonuçlarının ışığında, çalışmamızdan elde edilen sitotoksik etkinin nekroptozisle mi yoksa otofaji ile mi olduğunun ve hangi ajanın hangi ölüm tipini teşvik ettiğinin belirlenebilmesi için ileri çalışmaların yapılması, kombinasyonun sinerjistik etki mekanizmasının anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu amaçla Tamoksifen ve SMAC mimetiği uygulanmış hücre hatlarımızda kaspaz-8, BECLIN 1, LC3-II, ve RIP1 gen ekspresyon düzeyinin ortaya konması gerektiğini düşünmekteyiz.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

DEBİO 1143'ün Tamoksifen ile kombine edilerek ER+ meme kanseri hücre hatlarında uygulanmasının sinerjistik sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular hem ilaç ve SMAC mimetiğinin tek başlarına hem de kombine edilerek uygulanması sonucunda meydana gelen hücre ölümünün, apoptozis ile olmadığını, diğer hücre ölüm tipleri ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Hangi hücre ölüm tipi ile sitotoksik etkinin meydana geldiğinin ortaya konması için apoptozis, nekroptozis ve otofaji ile ilişkili anahtar proteinlerin ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

Tamoksifen'in ve DEBİO 1143'ün kombine edilerek uygulanmasının MCF-7 (Luminal A tipi) ve BT-474 (Luminal B tipi) ER+ meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik etkisine yönelik bu tez çalışmasından elde edilen ilk verilerin daha sonra alanla ilgili yapılacak olan ileri çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abotaleb, M., Kubatka, P., Caprnda, M., Varghese, E., Zolakova, B., Zubor, P., Opatrilova, R., Kruzliak, P., Stefanicka, P., Büsselberg, D. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, 101, 458-477 s.
2. Chen, B., Wang, Y., Kane, S.E., Chen, S. Improvement of sensitivity to tamoxifen in estrogen receptor-positive and Herceptin-resistant breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2008, 41(5), 367-377 s.
3. Sun, H., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.Y., Qian, D., Lu, J., Qiu, S. Design of small-molecule peptidic and nonpeptidic Smac mimetics. *Accounts of Chemical Research*. 2008, 41(10), 1264-1277 s.
4. Brunckhorst, M.K., Lerner, D., Wang, S., Yu, Q. AT-406, an orally active antagonist of multiple inhibitor of apoptosis proteins, inhibits progression of human ovarian cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2012, 13(9), 804-811 s.
5. Tuğrul, B., İşseven, M. SMAC Mimetiği Olarak AT-406'nın Kanserdeki Rolü. *Akdeniz Tıp Dergisi*. 2018, 2, 114-119 s.
6. Reinert, T., Barrios, C.H. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2015, 7(6) 304–320 s.
7. Hurwitz, H.I., Smith, D.C., Pitot, H.C., Brill, J.M., Chugh, R., Rouits, E., Rubin, J., Strickler, J., Vuagniaux G., Sorensen, J.M., Zanna, C. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic properties of oral DEBIO1143 (AT-406) in patients with advanced cancer: results of a first-in-man study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2015, 75, 851–859 s.
8. Vince, J.E., Wong, W.W., Khan, N., Feltham, R., Chau, D., Ahmed, A.U., Benetatos, C.A., Chunduru, S.K., Condon, S.M, McKinlay, M., Brink, R., Leverkus, M., Tergaonkar, V., Schneider, P., Callus, B.A., Koentgen, F., Vaux, D.L., Silke, J., IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*. 2007, 131(4), 682-693 s.
9. Fulda, S., Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clinical Cancer Research*. 2015, 21(22), 5030-5036 s.

10. Chen, D., Yu, J., Zhang, L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016, 1865(2),228-236 s.
11. Dubey, A.K., Gupta, U., Jain, S. Breast cancer statistics and prediction methodology: a systematic review and analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015, 16(10), 4237-4245 s.
12. Lumachi, F., Santeufemia, D.A., Basso, S.M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World Journal of Biological Chemistry*. 2015, 6(3), 231-239 s.
13. Özmen, V. Breast Cancer in Turkey: Clinical and Histopathological Characteristics (Analysis of 13.240 Patients). *European Journal of Breast Health*. 2014, 10(2):98-105 s.
14. Subik, K., Lee, J.F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., Tang, P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2010, 4, 35-41 s.
15. Nakshatri, H., Srour, E.F., Badve, S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2009, 4(1), 50-60 s.
16. Shachar, S.S., Jolly, T.A., Jones, E., Muss, H.B. Management of Triple-Negative Breast Cancer in Older Patients: How Is It Different? *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2018, 32(2), 58-63 s.
17. Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Pollack, J.R. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*. 2009, 4(7), e6146.
18. Başaran, G. Meme Kanserine Moleküler ve Genetik Yaklaşım. Ed.: Ayfer Haydaroğlu, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, Türkiye, 2011, 239-247 s.
19. Zelnak, A.B., O'Regan, R.M. Optimizing Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2015, 13(8), e56-64.
20. Raju, K.S., Taneja, I., Valicherla, G.R., Challagundla, M.K., Rashid, M., Syed, A.A., Gayen, J.R., Singh, S.P., Wahajuddin, M. No effect on pharmacokinetics of

tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen by multiple doses of red clover capsule in rats. *Scientific Reports*. 2015, 4, 5, 16126, 1-10 s.

21. Lorizio, W., Wu, A.H.B., Beattie, M.S., Rugo, H., Tchu, S., Kerlikowske, K., Ziv, E. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012, 132(3), 1107-1118 s.

22. Moore, D.D. A Conversation with Elwood Jensen. *Annual Review of Physiology*. 2012, 74, 1–11 s.

23. O'Malley, B.W., Khan, S. Elwood V. Jensen (1920-2012): father of the nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(10), 3707-3708 s.

24. Maximov, P.Y., Lee, T.M., Jordan, V.C. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Current Clinical Pharmacology*. 2013, 8(2), 135-155 s.

25. Fabian, C.J. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice*. 2007, 61, 12, 2051–2063 s.

26. Hiscox, S., Davies, E.L., Barrett-Lee, P. Aromatase inhibitors in breast cancer. *Maturitas*. 2009, 275–279 s.

27. Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmark, N. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998, 90, 1371-1388 s.

28. Fan, P., Craig Jordan, V. Acquired resistance to selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice (tamoxifen & raloxifene) by selection pressure in breast cancer cell population. *Steroids*. 2014, 90, 44-52 s.

29. Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*. 2015, 35(6), 3147-3154 s.

30. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*. 2017, 8(16), 3131-3141 s.
31. Riaz, M., van Jaarsveld, M.T., Hollestelle, A., Prager-van der Smissen, W.J., Heine, A.A., Boersma, A.W., Liu, J., Helmijr, J., Ozturk, B., Smid, M., Wiemer, E.A., Foekens, J.A., Martens, J.W. miRNA expression profiling of 51 human breast cancer cell lines reveals subtype and driver mutation-specific miRNAs. *Breast Cancer Research*. 2013, 15(2), R33, 1-17 s.
32. Lee, A.V., Oesterreich, S., Davidson, N.E. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015, 107(7) 1-4 s.
33. Horwitz, K.B., Costlow, M.E., McGuire, W.L. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*. 1975, 26(6), 785-795 s.
34. Lasfargues, E.Y., Coutinho, W.G., Redfield, E.S. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1978, 61(4), 967-978 s.
35. Ciotlos, S., Mao, Q., Zhang, R.Y., Li, Z., Chin, R., Gulbahce, N., Liu, S.J., Drmanac, R., Peters, B.A. Whole genome sequence analysis of BT-474 using complete Genomics' standard and long fragment read technologies. *Gigascience*. 2016, 5:8.
36. Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Gray, J.W., Bissell, M.J. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*. 2007, 1(1), 84-96 s.
37. Dillon, C.P., Green, D.R. Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy. Ed: Christopher D. Gregory, *Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer*. Springer Nature, Switzerland, 2016, 1-23 s.
38. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000, 407(6805), 770-776 s.
39. LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R.G. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*. 2008, 27(48), 6252-6275 s.

40. Andreeff, M., Goodrich, D.W., Pardee, A.B. *Cancer in Medicine*. Ed.: Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil. BC Decker inc, Hamilton, Canada, 2000, 2546 s.
41. Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal*. 2001, 322(7301), 1536-1538 s.
42. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995, 267(5203), 1456-1462 s.
43. McArthur, K., Kile, B.T. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*. 2018, 28(6), 475-493 s.
44. Krauss, G. *Biochemistry Of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2014, 815 s.
45. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. Ed.: Anderson, Marjorie, Granum, Sherry, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, London, USA and UK, 2002, 1601 s.
46. Campbell, K.J., Tait, S.W.G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*. 2018, 8(5). pii: 180002.
47. Peña-Blanco, A., García-Sáez, A.J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 2018, 285(3), 416-431 s.
48. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*. 2015, 6(11), 8474-8490 s.
49. Holcik, M., Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, 6(4), 318-327.
50. Varfolomeev, E., Vucic, D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*. 2018, 101, 26-32 s.
51. Wegner, K.W., Saleh, D., Degterev, A. Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017, 38(3), 202-225 s.
52. Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., Yuan, J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell

death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 2005, 1(2), 112-119 s.

53. Ofengeim, D., Yuan, J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013, 14(11), 727-736 s.

54. Zhou, W., Yuan, J. Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2014, 35, 14-23 s.

55. Moreno-Gonzalez, G., Vandenabeele, P., Krysko, D.V. Necroptosis: A Novel Cell Death Modality and Its Potential Relevance for Critical Care Medicine. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016, 194(4), 415-428 s.

56. de Almagro, M.C., Vucic, D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015, 39, 56-62 s.

57. Rubinsztein, D.C., Frake, R.A. Yoshinori Ohsumi's Nobel Prize for mechanisms of autophagy: from basic yeast biology to therapeutic potential. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. 2016, 46(4), 228-233s.

58. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008, 451(7182), 1069-1075 s.

59. Castedo, M., Ferri, K.F., Kroemer, G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell death and Differentiation*. 2002, 9, 99-100 s.

60. Levine, B., Klionsky, D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*. 2004, 6, 463-477 s.

61. Das, C.K., Mandal, M., Kögel, D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2018, DOI: 10.1007/s10555-018-9727-z

62. Hunter, A.M., LaCasse, E.C., Korneluk, R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*. 2007, 12(9), 1543-1568.

63. Budhidarmo, R., Day, C.L. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015, 39, 80-90 s.

64. Finlay, D., Teriete, P., Vamos, M., Cosford, N.D.P., Vuori, K. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Research*. 2017, 27, 6, 587 1-18 s.
65. Philchenkov, A., Miura, K. The IAP Protein Family, SMAC Mimetics and Cancer Treatment. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2016, 21(3-4), 185-202 s.
66. Richter, B.W., Duckett, C.S. The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2000, 2000(44), pe1.
67. Fulda, S., Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012, 11(2), 109-124 s.
68. Dubrez, L., Berthelet, J., Glorian, V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *OncoTargets and Therapy*. 2013, 9, 1285-1304 s.
69. Derakhshan, A., Chen, Z., Van Waes, C. Therapeutic Small Molecules Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Cancers with Deregulation of Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways. *Clinical Cancer Research*. 2017, 23(6), 1379-1387 s.
70. Bai, L., Smith, D.C., Wang, S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2014, 144, 82–95 s.
71. Toubai, T., Rossi, C., Oravec-Wilson, K., Liu, C., Zajac, C., Wu, S.J., Sun, Y., Fujiwara, H., Tamaki, H., Peltier, D., Riwes, M., Henig, I., Brabbs, S., Duckett, C.S., Wang, S., Reddy, P. IAPs protect host target tissues from graft-versus-host disease in mice. *Blood advances*. 2017, 1(19), 1517-1532 s.
72. Cai, Q., Sun, H., Peng, Y., Lu, J., Nikolovska-Coleska, Z., McEachern, D., Liu, L., Su, Q., Chao-Yie, Y., Rebecca, M., Han, Yi., Tao, Z., Duxin, S., Sanmao, K., Ming, G., Lance, L., Dajun, Y., Shaomeng, W. A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of poptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, 54(8), 2714-2726 s.
73. de Almagro, M.C., Vucic, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental oncology*. 2012, 34(3), 200-211 s.
74. Vucic, D., Fairbrother, W.J. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007, 13(20), 5995-6000 s.

75. Varfolomeev, E., Blankenship, J.W., Wayson, S.M., Fedorova, A.V., Kayagaki, N., Garg, P., Zobel, K., Dynek, J.N., Elliott, L.O., Wallweber, H.J., Flygare, J.A., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Dixit, V.M., Vucic, D. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*. 2007, 131(4), 669-681 s.
76. Karami-Tehrani, F., Salami, S. Cell kinetic study of tamoxifen treated MCF-7 and MDA-MB 468 breast cancer cell lines. *The Iranian Biomedical Journal*. 2003, 7, 51–56 s.
77. Zhang, C.J., Hu, Q., Feng, G., Zhang, R., Yuan, Y., Lu, X., Liu, B. Image-guided combination chemotherapy and photodynamic therapy using a mitochondria-targeted molecular probe with aggregation-induced emission characteristics. *Chemical Science*. 2015, 6(8), 4580-4586 s.
78. Crowley, L.C., Christensen, M.E., Waterhouse, N.J. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016, 2016(12).
79. Chazotte, B. Labeling mitochondria with fluorescent dyes for imaging. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009, 2009(6)pdb.prot4948.
80. Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., Gelbard, H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*. 2011, 50(2), 98-115 s.
81. Gortat, A., *Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors Methods and Protocols*. Ed.: Mar Orzáez, Mónica Sancho Medina, Enrique Pérez-Payá, Springer, Valencia, Spain, 2016, 95-109 s.
82. Bucevicius, J., Lukinavicius, G., Gerasimaite, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors*. 2018, 18, 1-12 s.
83. Guo, Y., Xu, L., Hong, S., Sun, Q., Yao, W., Pei, R. Label-free DNA-based biosensors using structure-selective light-up dyes. *Analyst*. 2016, 141(24), 6481-6489 s.
84. Neuberger, A., van Veen, H.W. Hoechst 33342 Is a Hidden "Janus" amongst Substrates for the Multidrug Efflux Pump LmrP. *PLoS One*. 2015, 10(11), e0141991.
85. Demchenko, A.P. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*. 2013, 65(2), 157-172 s.

86. Farinacci, M. Improved apoptosis detection in ovine neutrophils by annexin V and carboxyfluorescein diacetate staining. *Cytotechnology*. 2007, 54(3), 149-155 s.
87. Shapira, S., Shapira, A., Kazanov, D., Hevroni, G., Kraus, S., Arber, N. Selective eradication of cancer cells by delivery of adenovirus-based toxins. *Oncotarget*. 2017, 8(24), 38581-38591 s.
88. Skindersoe, M.E., Kjaerulff, S. Comparison of three thiol probes for determination of apoptosis-related changes in cellular redox status. *Cytometry Part A*. 2014, 85(2), 179-187 s.
89. Pural, N. Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2004, 35, 107-113 s.
90. Karakoç, Z., Ketani, M.A., Ketani, Ş. Mikroskopların Çalışma Mekanizması ve Çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2016, 1(1), 1-6 s.
91. Kanev, M.O., Muranlı, F.D.G. Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2016, 20(1), 33-38 s.
92. Taneli, F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2007, 5(2), 75-82 s.
93. Wang, C., Wu, P., Shi, J.F., Jiang, Z.H., Wei, X.Y. Synthesis and cancer cell growth inhibitory activity of icaritin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 100, 139-150 s.
94. Barrett, I., Meegan, M.J., Hughes, R.B., Carr, M., Knox, A.J., Artemenko, N., Golfis, G., Zisterer, D.M., Lloyd, D.G. Synthesis, biological evaluation, structural-activity relationship, and docking study for a series of benzoxepin-derived estrogen receptor modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008, 16(21), 9554-9573 s.
95. Yenigün, V.B., Ozpolat, B., Kose, G.T. Response of CD44+/CD24-/low breast cancer stem/progenitor cells to tamoxifen- and doxorubicin-induced autophagy. *International Journal of Molecular Medicine*. 2013, Jun, 31(6), 1477-1483 s.
96. Kharbanda, A., Rajabi, H., Jin, C., Raina, D., Kufe, D. Oncogenic MUC1-C promotes tamoxifen resistance in human breast cancer. *Molecular Cancer Research*. 2013, 11(7), 714-723 s.

97. Fernandez-Cuesta, L., Anaganti, S., Hainaut, P., Olivier, M. p53 status influences response to tamoxifen but not to fulvestrant in breast cancer cell lines. *International Journal of Cancer*. 2011, 128(8), 1813-1821 s.
98. Chessari, G., Buck, I.M., Day, J.E., Day, P.J., Iqbal, A., Johnson, C.N., Lewis, E.J., Martins, V., Miller, D., Reader, M., Rees, D.C., Rich, S.J., Tamanini, E., Vitorino, M., Ward, G.A., Williams, P.A., Williams, G., Wilsher, N.E., Woolford, A.J. Fragment-Based Drug Discovery Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins: Discovery of a Non-Alanine Lead Series with Dual Activity Against cIAP1 and XIAP. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 58(16), 6574-6588 s.
99. Sah, N.K., Khan, Z., Khan, G.J., Bisen, P.S. Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters*. 2006, 244(2), 164-171 s.
100. Ma, L., Huang, Y., Song, Z., Feng, S., Tian, X., Du, W., Qiu, X., Heese, K., Wu, M. Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Death & Differentiation*. 2006, 13(12), 2079-2088 s.
101. Fandy, T.E., Shankar, S., Srivastava, R.K. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Molecular Cancer*. 2008, 7:60, 1-10 s.
102. Stanculescu, A., Bembinster, L.A., Borgen, K., Bergamaschi, A., Wiley, E., Frasor, J. Estrogen promotes breast cancer cell survival in an inhibitor of apoptosis (IAP)-dependent manner. *Hormones and Cancer*. 2010, 1(3), 127-135 s.
103. Fristedt, D.C., Lub, S., Agarwal, P., Arngården, L., Hammarberg, A., Maes, K., Van, V.E., Vanderkerken, K., Jernberg, W.H. Increased resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma mediated by cIAP2-implications for a combinatorial treatment. *Oncotarget*. 2015, 6(24), 20621-20635 s.
104. Matzinger, O., Viertl, D., Tsoutsou, P., Kadi, L., Rigotti, S., Zanna, C. The radiosensitizing activity of the SMAC-mimetic, Debio 1143, is TNF- α -mediated in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and Oncology*. 2015, 116(3), 495-503 s.
105. Langdon, C.G., Wiedemann, N., Held, M.A., Mamillapalli, R., Iyidogan, P., Theodosakis, N. Platt, J.T., Levy, F., Vuagniaux, G., Wang, S., Bosenberg, M.W., Stern, D.F. SMAC mimetic Debio 1143 synergizes with taxanes, topoisomerase inhibitors and

bromodomain inhibitors to impede growth of lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget*. 2015, 6(35), 37410-37425 s.

106. Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Török, L., Pandey, S., Sikorska, M., Walker, R., Hermann, R.S. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. 1996, 17, 1595-1607 s.

107. Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D., Yahalom, J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Research*. 2001, 61, 439-444 s.

108. Zhang, G.J., Kimijima, I., Onda, M., Kanno, M., Sato, H., Watanabe, T., Tsuchiya, A., Abe, R., Takenoshita, S. Tamoxifen-induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Relates to Down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without Alteration of p53 Protein Levels. *Clinical Cancer Research*. 1999, 5, 2971-2977 s.

109. Cho, K.S., Yoon, Y.H., Choi, J.A., Lee, S.J., Koh, J.Y. Induction of autophagy and cell death by tamoxifen in cultured retinal pigment epithelial and photoreceptor cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012, 53(9), 5344-5353 s.

110. Graham, C.D., Kaza, N., Klocke, B.J., Gillespie, G.Y., Shevde, L.A., Carroll, S.L., Roth, K.A. Tamoxifen Induces Cytotoxic Autophagy in Glioblastoma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2016, 75(10), 946-954 s.

111. Li, C., Ip, K.W., Man, W.L., Song, D., He, M.L., Yiu, S.M., Lau, T.C., Zhu, G. Cytotoxic (salen)ruthenium(iii) anticancer complexes exhibit different modes of cell death directed by axial ligands. *Chemical Science*. 2017, 8(10), 6865-6870 s.

112. Hwang, J.J., Kim, H.N., Kim, J., Cho, D.H., Kim, M.J., Kim, Y.S., Kim, Y., Park, S.J., Koh, J.Y. Zinc(II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line. *Biometals*. 2010, 23(6), 997-1013 s.

113. Aqbi, H.F., Tyutyunyk-Massey, L., Keim, R.C., Butler, S.E., Thekkudan, T., Joshi, S., Smith, T.M., Bandyopadhyay, D., Idowu, M.O., Bear, H.D., Payne, K.K., Gewirtz, D.A., Manjili, M.H. Autophagy-deficient breast cancer shows early tumor recurrence and escape from dormancy. *Oncotarget*. 2018, 9(31), 22113-22122 s.

114. Cekay, M.J., Roesler, S., Frank, T., Knuth, A.K., Eckhardt, I., Fulda, S. Smac mimetics and type II interferon synergistically induce necroptosis in various cancer cell lines. *Cancer Letters*. 2017, 410, 228-237 s.

115. Laukens, B., Jennewein, C., Schenk, B., Vanlangenakker, N., Schier, A., Cristofanon, S., Zobel K, Deshayes, K., Vucic, D., Jeremias, I., Bertrand, M.J., Vandenameele, P., Fulda, S. Smac Mimetic Bypasses Apoptosis Resistance in FADD- or Caspase-8-Deficient Cells by Priming for Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Necroptosis. *Neoplasia*, 2011, 13, 971-979 s.

116. Belz, K., Schoeneberger, H., Wehner, S., Weigert, A., Bonig, H., Klingebiel, T., Fichtner, I., Fulda, S. Smac mimetic and glucocorticoids synergize to induce apoptosis in childhood ALL by promoting ripoptosome assembly. *Blood*, 2014, 124, 240-250 s.

117. Rohde, K., Kleinesudeik, L., Roesler, S., Lowe, O., Heidler, J., Schroder, K., Wittig, I., Dröse, S., Fulda, S. A Bak-dependent mitochondrial amplification step contributes to Smac mimetic/glucocorticoid-induced necroptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2017, 24, 83-97 s.

118. Hannes, S., Abhari, B.A., Fulda, S. Smac mimetic triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked. *Cancer Letters*. 2016, 380(1), 31-38 s.

119. Jin, G., Lan, Y., Han, F., Sun, Y., Liu, Z., Zhang, M., Liu, X., Zhang, X., Hu, J., Liu, H., Wang, B. Smac mimetic-induced caspase-independent necroptosis requires RIP1 in breast cancer. *Molecular Medicine Reports*. 2016, 13(1), 359-366 s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve İŞSEVEN

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : merveisseven@ogr.cbu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise : Karşıyaka Gazi Lisesi, 2009

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2014

Yayımları

Tuğrul, B., İsseven, M. SMAC Mimetği Olarak AT-406'nın Kanserdeki Rolü. Akdeniz Tıp Dergisi. 2018, 2, 114-119