

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

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ PROGRAMI**

**MEME KANSERİ VE KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE  
THİORİDAZİNE'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ash KISIM**

**Danışman  
Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU**



**MANİSA-2016**

**TEZ ONAYI**

Ash KISIM tarafından hazırlanan "MEME KANSERİ VE KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE THİORİDAZİNE'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması 22/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak savunulmuş ve ~~oyçokluğu~~ / **oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.



**Danışman**

**Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU**  
Celal Bayar Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Erdal BALCAN**  
Celal Bayar Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ**  
Ege Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Çiğır Biray AVCI**  
Ege Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ**  
Celal Bayar Üniversitesi

**Enstitü Müdürü**

**Prof. Dr. Kenan DOST**

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Aslı KISIM**



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

İÇİNDEKİLER .....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
TABLO DİZİNİ .....	VII
TEŞEKKÜR .....	VIII
ÖZET .....	IX
ABSTRACT .....	XI
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Antipsikotik Bir İlacın Kanser Tedavisinde Kullanılması .....	3
2.2. Phenothiazine Sınıfına Ait Antipsikotik Bir İlaç: Thioridazine .....	3
2.2.1. Thioridazine'in Etkisi Dopamin Reseptörüne Bağlıdır .....	4
2.3. Thioridazine, Dopamin Reseptörü ve Meme Kanseri İlişkisi.....	6
2.4. Thioridazine ile Yapılmış Literatür Çalışmaları.....	7
2.5. Meme Kanseri.....	9
2.6. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Kültürünün Özellikleri.....	10
2.7. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Kültürünün Özellikleri.....	11
2.8. MCF-10A İnsan Normal Meme Epitel Hücre Kültürünün Özellikleri .....	11
2.9. CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> İnsan Meme Kanseri Kök Hücre Kültürünün Özellikleri .....	12
2.10. Bu Tez Çalışmasında Araştırılan Hipotezler .....	13
3. DENEYSEL KISIM .....	14
3.1. Materyal .....	14
3.2. Yöntemler .....	15
3.2.1. Tüm İş Paketlerinde Yer Alan Ortak Yöntemler .....	15
3.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini, Kültüre Edilmesi ve Çoğaltılması ...	15
3.2.1.2. Kanser Kök Hücrelerinin Akım Sitometrisi ile İzole Edilmesi .....	16
3.2.1.3. Thioridazine'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması .....	17
3.2.1.4. Hücrelerin Sayımı .....	17
3.2.2. Araştırma Sorularına Özgü Yöntemler .....	18
3.2.2.1. Araştırma Sorusu 1: Thioridazine'in meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkisi var mı? .....	18
3.2.2.1.1. Yöntem 1: XTT Canlılık (Vitality) Testi .....	18
3.2.2.1.2. Araştırma Sorusu 2: Meme kanseri hücre kültürlerinde Thioridazine'nin hücre morfolojisine etkisi var mı? .....	19
3.2.2.2. Yöntem 2: Crystal Violet Boyasıyla Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi .....	19
3.2.2.3. Araştırma Sorusu 3: Thioridazine'in sitotoksik etkisi dopamin reseptörlerine bağlı mı?.....	19
3.2.2.3.1. Yöntem 3: Dopamin Aktivatör Transporterların İnhibe Edilmesi .....	19
3.2.2.4. Araştırma Sorusu 4: Dopamin reseptörlerinin meme kanseri hücre kültürlerindeki ifade düzeyleri nedir? .....	20
3.2.2.4.1. Yöntem 4: Dopamin 2 Reseptör Miktarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi .....	20

3.2.2.5. Araştırma Sorusu 5: Meme kanseri hücre kültürlerinde Thioridazine'in sitotoksitesi apoptozis aracılı mı? .....	21
3.2.2.5. Yöntem 5a: ELISA Yöntemi .....	21
3.2.2.5. Yöntem 5b: Anneksin V/7AAD Yöntemi .....	22
3.2.2.6. Araştırma Sorusu 6: Meme kanseri hücre kültürlerinde Thioridazine'in sitotoksitesi otofaji aracılı mı? .....	22
3.2.2.6. Yöntem 6a: Western Blot Yöntemi .....	22
3.2.2.6. Yöntem 6b: Otofajinin Chloroquine diphosphate salt İnhibitörüyle Doğrulanması .....	24
3.2.2.6. Yöntem 6c: Otofajik Vakuollerin Monodansylcadaverine (MDC) Boyasıyla Görüntülenmesi .....	25
3.2.3. Thioridazine'in Epitelyal-Mezenkimal Geçişteki Rolünün Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	25
3.2.3.1 Araştırma Sorusu 7: Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rolü var mı? .....	25
3.2.3.1 Yöntem 7a: İnvazyon Deneyi/Scratch Deneyi .....	25
3.2.3.1 Yöntem 7b: Migrasyon Deneyi .....	26
3.2.3.1 Yöntem 7c: Immunositokimya .....	26
3.2.3.2 Western Blot Yöntemi .....	27
3.2.4 İstatistiksel Analiz .....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	30
4.1. Bulgular .....	30
4.1.1. MCF-7 Hücre Kültüründen İzole Edilen Meme Kanseri Kök Hücreleri .....	30
4.1.2. Araştırma sorusu 1: THZ'nin meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkisi var mı? .....	30
4.1.3. Araştırma sorusu 2: Etkisinin büyük bir kısmını dopamin 2 reseptörü (DR2) üzerinden gösteren THZ ile muamele edilmiş hücre kültürlerinde DR2 reseptörünün ifade düzeyi nedir? .....	32
4.1.4. Araştırma sorusu 3: THZ'nin sitotoksik etkisinin göstermesinde rol alan dopamin aktivatör taşıyıcılar inhibe edildiğinde THZ'nin sitotoksik etkisinde nasıl bir değişim gözlenir? .....	33
4.1.5. Araştırma sorusu 4: THZ sitotoksik etkisini hangi ölüm çeşiti üzerinden göstermektedir? .....	34
4.1.6. Araştırma sorusu 5: Thioridazine'nin epitelyal mezenkimal geçişte rolü var mıdır? .....	38
4.1.7. Araştırma sorusu 6: MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajinin epitelyal belirteçlerle olan ilişkisinin ortaya konması amacıyla, otofajik belirteçleri inhibe ettiğimizde epitelyal belirteçlerde ifade düzeyi nasıl değişmektedir? .....	41
4.1.8. Araştırma sorusu 7: EMT'de rol alan Snail'in Akt-GSK-3β yolağı üzerinden fosforilasyon / defosforilasyon durumu E-kaderin ifade düzeyini nasıl etkilemektedir? .....	43
4.2. Tartışma .....	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	51
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>7-AAD</b>	7-Aminoaktinomisin D
<b>AC</b>	Adenil siklaz
<b>AKT</b>	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog
<b>ALDH</b>	Aldehit Dehidrogenaz
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance (Varyans analizi)
<b>ATG5</b>	Autophagy Related 5
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>Bcl-2</b>	B-hücreli lenfoma proteini (B-cell lymphoma protein)
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>CDC25A</b>	Cell Division Cycle 25A (Hücre bölünme döngüsü 25A)
<b>CQ</b>	Chloroquine diphosphate salt
<b>D1</b>	Dopamin 1
<b>D2</b>	Dopamin 2
<b>DAB</b>	Diaminobenzidine
<b>DAT</b>	Dopamin aktivatör transporter
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DR1</b>	Dopamin reseptörü 1
<b>DR2</b>	Dopamin reseptörü 2
<b>DR3</b>	Dopamin reseptörü 3
<b>DR4</b>	Dopamin reseptörü 4
<b>DR5</b>	Dopamin reseptörü 5
<b>DRD2</b>	Dopamin reseptörü dopamin 2 geni
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic Acid
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme (çoğalma) faktörü (Epidermal growth factor)
<b>EMT</b>	Epitelyal-mezenkimal geçiş
<b>EpCAM</b>	Epitelyal hücre adezyon molekülü
<b>FACS</b>	Fluorescent activated cell sorting
<b>FAK</b>	Fokal adezyon molekülü
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum (Fetal sığır serumu)
<b>FITC</b>	Fluorescein
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

<b>GPCR</b>	Guanin bağlı reseptör
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$
<b>HER-2</b>	Epidermal büyüme (çoğalma) faktörü reseptör-2
<b>ITGA6</b>	Integrin alfa 6
<b>LC3</b>	Light Chain 3 (Hafif zincir 3)
<b>MDC</b>	Monodansylcadaverine
<b>MET</b>	Mezenkimal-epitelyal geçiş
<b>MLH-1</b>	MutL Homolog 1
<b>MMP-1</b>	Matriks Metalloproteinaz 1
<b>MMP-2</b>	Matriks Metalloproteinaz 2
<b>MMP-9</b>	Matriks Metalloproteinaz 9
<b>MSH2</b>	MutS Homolog 2
<b>Nras</b>	Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Onkogen Homolog
<b>p16</b>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
<b>p21</b>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A
<b>p53</b>	Protein 53
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Buffer Salin)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PI3K</b>	Fosfotidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz
<b>PKA</b>	Protein kinaz A
<b>PKC</b>	Protein kinaz C
<b>Rb</b>	Retinoblastoma proteini
<b>SCID</b>	Ağır kombine bağışıklık yetmezliği
<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1/p62
<b>TBST</b>	Tris-buffered saline tween
<b>TGF <math>\alpha</math></b>	Transforme edici büyüme (çoğalma) faktörü $\alpha$
<b>THZ</b>	Thioridazine
<b>TMH</b>	Threo-methylphenidate hydrochloride
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelial çoğalma faktörü
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WNT7B</b>	Wingless type MMTV integration site family member 7B

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Phenothiazine sınıfına ait ilaçların kimyasal yapıları.....	4
<b>Şekil 2.2.</b> D1 benzeri ve D2 benzeri dopamin reseptör ailesi (Şekil A. Finch (2013) ders notlarından alınarak türkçeleştirilmiştir).....	5
<b>Şekil 2.3.</b> Dopamin, Dopamin 2 reseptör ve Dopamin aktivatör transporterlar arasındaki etkileşim mekanizması (Şekil Cummings JL ve ark.'nın yaptığı yayından (2011) alınarak, türkçeleştirilmiştir) .....	6
<b>Şekil 4.1.</b> MCF-7 hücre kültüründen, meme kanseri kök hücrelerinin izolasyonu (Akım sitometrisinde CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> belirteçleri üzerinden ayrıştırma yöntemiyle) .....	30
<b>Şekil 4.2.</b> THZ ile 24 saat muamele edilmiş <b>A)</b> MDA-MB-231, <b>B)</b> MCF-7, <b>C)</b> CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> , <b>D)</b> MCF-10A, hücre kültürlerinde sitotoksitenin XTT canlılık testi ile ölçülmesi (*p<0.05, **p<0.01).....	31
<b>Şekil 4.3.</b> <b>A)</b> THZ ile muamele edilmemiş (Kontrol grubu) MDA-MB-231 hücre kültürü. <b>B)</b> THZ'nin IC <sub>50</sub> konsantrasyonu (9 µM) ile 24 saat muamele edilmiş olan MDA-MB-231 hücre kültürü. Hücre kültürü crystal violet boyası ile boyanarak inverted faz kontrast mikroskopunda görüntülendi (Büyütme oranı:10X).....	32
<b>Şekil 4.4.</b> <b>A)</b> MDA-MB-231, <b>B)</b> MCF-7, <b>C)</b> CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> hücre kültürlerinde DR2'nin bazal ve THZ'nin artan konsantrasyonlarında ifade düzeylerinin ölçülmesi (24.saat) *p<0.05, **p<0.01.....	33
<b>Şekil 4.5.</b> Dopamin aktivatör transport inhibitörü (TMH: Threo-methylphenidate hydrochloride) ile 2 saat ön muamele edilen <b>A)</b> MDA-MB-231, <b>B)</b> MCF-7 ve <b>C)</b> CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> hücre kültürlerinde THZ'nin IC <sub>50</sub> uygulaması sonrası sitotoksik etkilerinin belirlenmesi (24. saat)*p<0.05, **p<0.01.....	34
<b>Şekil 4.6.</b> MDA-MB-231, MCF-7, CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> hücre kültürlerinde iki farklı yöntemle [DNA Fragmentasyonu ( <b>A1</b> ), <b>B1</b> ), <b>C1</b> ) ve Anneksin V/7AAD <b>A2</b> ), <b>B2</b> ), <b>C2</b> ] apoptozisin ölçümü (*p<0.05).....	35
<b>Şekil 4.7.</b> THZ'nin IC <sub>50</sub> konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajik belirteçlerin <b>A)</b> Western Blot yöntemi ile gösterilmesi ve <b>B)</b> Western Blottaki protein miktarlarının değişim kat sayıları.....	37
<b>Şekil 4.8.</b> <b>A)</b> MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajinin, Chloroquine (CQ, 50µM) inhibitörü varlığında Western Blot yöntemiyle doğrulanması <b>B)</b> LC3I-II ve Beclin-1 ifade düzeylerindeki değişim oranları <b>C)</b> THZ ve CQ'nun ..... (tekli ve kombinasyonda) sitotoksik etki yüzdesi (*p<0.05, **p<0.01).	37
<b>Şekil 4.9.</b> THZ (9 µM, 24 saat) ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajik vakuollerin Monodansylcadaverine (MDC) floresan boyası ile gösterilmesi (Büyütme oranı:10X).....	38
<b>Şekil 4.10.</b> THZ'nin <b>A)</b> CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> , <b>B)</b> MDA-MB-231 ve <b>C)</b> MCF-7 hücre kültürlerinde 24. saatteki invazyon potansiyelinin scratch assay yöntemiyle ölçülmesi (Kapanma yüzdeleri, mikroskop yazılımında yer alan ölçüm programı ile boşluklar arası mesafenin ölçülmesi ile hesaplandı. Kontrol hücreleri arasındaki mesafe sıfırıncı saatte ölçülerek %100 olarak kabul edildi). <b>D)</b> MDA-MB-231, CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> ve MCF- hücre kültürlerinin invazyon potansiyeli görüntülerinin yüzde değerleri (24. saat) **p<0.001 .....	39



<b>Şekil 4.11.</b> THZ ile muamele edilen MDA-MB-231 (9 µM) , CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> (18 µM) ve MCF-7 (16.4 µM) hücre kültürlerinin migrasyon potansiyelinin ölçülmesi (24. saat) *p<0.05.....	40
<b>Şekil 4.12.</b> THZ ile muamele edilen MCF-7 (16.4µM), MDA-MB-231 (9 µM), CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> (18 µM), hücre kültürlerinde epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin Western Blottaki ifade düzeyleri ve proteinlerin değişim oranları (24. saat). ( <b>A1-A2</b> ; MCF-7, <b>B1-B2</b> ; MDA-MB-231, <b>C1-C2</b> ; CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> ).....	41
<b>Şekil 4.13.</b> <b>A)</b> THZ'nin IC <sub>50</sub> (9µM) konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre kültüründe otofaji inhibitörü, Chloroquine (CQ, 50µM), varlığında epitelyal-mezenkimal belirteçlerden E-cad ve Vimentin ifade düzeylerinin gösterilmesi. <b>B)</b> E-Cad ve Vimentin değişim oranları (24. saat).....	42
<b>Şekil 4.14.</b> THZ'nin IC <sub>50</sub> konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen <b>A)</b> MCF-7 <b>B)</b> CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> <b>C)</b> MDA-MB-231 hücre kültürlerinde E-cad ve Vimentin moleküllerinin ifade düzeylerinin Immunositokimya yöntemi ile doğrulanması (24. saat).....	43
<b>Şekil 4.15.</b> THZ ile muamele edilen MCF-7 (16.4µM), MDA-MB-231 (9 µM), CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> (18 µM), hücre kültürlerinde E-cad ifade düzeyini düzenleyen yolakta önemli rol oynayan moleküllerin THZ ve Bio-Acetoxime (50µM) varlığındaki ifade düzeylerinin Western Blottaki ifade düzeyleri ve E-cad proteininin değişim oranı (24. saat). ( <b>A1-A2</b> ; MCF-7, <b>B1-B2</b> ; MDA-MB-231, <b>C1-C2</b> ; CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> ).....	44

## TABLO DİZİNİ

	Sayfa
<b>Tablo 2.1.</b> Çalışmada kullanılan hücre kültürlerinin özellikleri.....	13
<b>Tablo 2.2.</b> Çalışmada kullanılan hücre kültürlerinin crystal violet boyası ile boyanarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülenmesi (4X).....	13
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal ve kitlere ait bilgiler .....	14
<b>Tablo 3.2.</b> Western Blot yönteminde kullanılan tüm antikorlar .....	28
<b>Tablo 4.1.</b> Model olarak kullanılan hücre kültürlerinde THZ'nin IC <sub>50</sub> değerleri (Deneyler üç tekrarlı ve bağımsız olarak gerçekleştirildi, değerler ± standart sapmalarıyla beraber sunuldu).....	31
<b>Tablo 4.2.</b> Meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde DR2 ifade düzeylerinin IC <sub>50</sub> değerleri ile ilişkisinin gösterilmesi (24. saat)....	33
<b>Tablo 4.3.</b> ELISA ve Annexin V/7AAD yöntemlerinden (toplam apoptotik hücre yüzdesi) elde edilen bulguların karşılaştırılması.....	36

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalıőmamın her aőamasında bana destek olan, bilgiye ulaőmanın ve farkındalığın önemini aőılayan, deneyimleri ile yol gosteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya; çalıőmamı yurüttüğüm gerekli alt yapıyı (Ege Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı) sağlayan bilgi ve tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aőamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, sevgili Sayın Prof. Dr. F. Rüçhan USLU ve Sayın Doç. Dr. őaziye Burçak KARACA'ya; bu yolda ilerlerken ekip olmanın önemini hissettiren ekip arkadaşlarım Uzman Biyolog Özge ÖZER ve Doktora öğrencisi Emir BOZKURT'a; çalışmada finansal desteği 2013-TIP-089 nolu projeyle sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri őube Müdürlüğüne; TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı ile (Proje No: 113S482) alıőmanın bir kısmını destekleyen TÜBİTAK kurumuna; 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine; öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Aslı KISIM  
Manisa, 2016

## ÖZET

### Doktora Tezi

## MEME KANSERİ VE KÖK HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE THİORİDAZİNE'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

### Ash KISIM

**Celal Bayar Üniversitesi**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU**

Çalışmanın amacı, meme kanseri (MDA-MB-231, MCF-7) ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) antipsikotik Thioridazine'in (THZ) sitotoksik etkisini araştırmak ve bunun hangi ölüm çeşiti aracılığıyla gerçekleştiğini belirlemektir. İkinci amacı ise; THZ'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rolünün olup olmadığını ortaya çıkarmaktır.

THZ (1-30 µM, 24 saat) ile muamele edilen hücrelerin canlılık yüzdeleri XTT testi ile ölçüldü. IC<sub>50</sub> değerleri Calculusyn 2.1 programında hesaplandı. THZ'nin, hücreye alınma yolunun doğrulanmasında, dopamin aktivatör transportlara spesifik bir inhibitör olan Threo-methylphenidate hydrochloride (TMH) kullanıldı. Apoptosis, ELISA kit ve Annexin V/7-AAD; otofaji ise LC-3 I/II ve Beclin-1 protein ifade düzeylerinin western blot yöntemiyle ölçülmesiyle araştırıldı. Otofajik vakuollerin floresan mikroskopunda gösterilmesinde Monodansylcadaverine boyası kullanıldı. Epitelyal-mezenkimal geçişteki etkileri ise, migrasyon, invazyon ve Western blot yöntemleri ile araştırıldı.

THZ'nin IC<sub>50</sub> değerleri 9±1.2 µM (MDA-MB-231, 24. saat), 16.4±1.8 µM (MCF-7, 24. saat), ve 18.1±2.3 µM (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, 24. saat) olarak bulundu. DR2'nin bazal ifade düzeyleri [(MDA-MB-231, 111.6±2 ng/mL), (MCF-7, 86.5±1.4 ng/mL), (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, 52±2.3 ng/mL)] ile IC<sub>50</sub> değerleri arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu saptandı. TMH ile inhibe edilen hücre hatlarına, THZ uygulandığında sitotoksik etkinin azaldığı gözlemlendi (p<0.05). THZ aracılı apoptozis yüzdeleri MDA-MB-231 için %10.8, MCF-7 için %30 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> için %46.8 olarak bulundu. MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücrelerinde apoptozis saptanırken, MDA-MB-231 hücrelerinde otofaji saptandı.

THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarına ait invazyon potansiyeli MCF-7, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde sırasıyla, %29, %24, %16.5 olarak belirlendi. Migrasyon potansiyeli MCF-7, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde sırasıyla, %28.5, %63.2, %61 olarak belirlendi. Her üç hücre kültürü arasında MDA-MB-231 hücrelerinin diğerlerine göre daha yüksek oranda invazyon ve migrasyon kapasitesine sahip olduğu gösterildi. THZ E-kaderin, Sitokeratin-18, β-Catenin proteinlerinin ifade düzeyini artırırken, N-kaderin,

Vimentin, Fibronektin proteinlerinin ifade düzeyini azalttı. Immunositokimya yöntemi ile de doğrulandığında, E-kaderin proteini artış gösterirken, Vimentin proteininin ifade düzeyinde yine azalma gözlemlendi.

Bu çalışmada meme kanseri ve kanser kök hücrelerinde THZ'nin sitotoksik etkisinin iki farklı ölüm çeşidi ile gerçekleştiği ortaya çıkarıldı. THZ'nin epitelyal-mezenkimal geçişi baskıladığı bağımsız yöntemlerle test edilerek gösterildi. Sonuç olarak, in vitro hücre kültürlerinde THZ'nin sitotoksik ve anti-metastatik özellikleri ile meme kanseri tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceği gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis, Dopamin reseptörü, Otofaji, Sitotoksisite, Thioridazine,

**2016, 86 Sayfa**



## **ABSTRACT**

**PhD Thesis**

### **INVESTIGATION of THE EFFECT of THIORIDAZINE in BREAST CANCER CELL CULTURES**

**Ash KISIM**

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

**Supervisor: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU**

The aim of this study was to investigate cytotoxic effects of antipsychotic Thioridazine and to reveal type of cell death in breast cancer (MDA-MB-231, MCF-7) and breast cancer stem (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) cells. The second aim is, to reveal role of THZ in epithelial mesenchymal transition.

The percentage viability of THZ (1-30  $\mu$ M, 24 hours) treated cells was measured with XTT test. IC<sub>50</sub> values were calculated by Calcsyn 2.1 software. To validate uptake of THZ by cells, specific inhibitor of dopamine activator transporters, Threo-methylphenidate hydrochloride (TMH), was used. ELISA kit and Annexin V/7-AAD were used to investigate apoptosis, measurement of protein expressions of LC-3 I/II and Beclin-1 were done by performing western blot analysis. Monodansylcadaverine dye (stain) was used to show autophagosomes in the fluorescence microscope. The effect of THZ on epithelial mesenchymal transition was investigated by using cell migration, invasion and Western blot methods.

IC<sub>50</sub> values of THZ were found as 9 $\pm$ 1.2  $\mu$ M (MDA-MB-231, 24 hours), 16.4 $\pm$ 1.8  $\mu$ M (MCF-7, 24 hours), and 18.1 $\pm$ 2.3  $\mu$ M (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, 24 hours). The significant correlation between basal expressions of DR2 [(MDA-MB-231, 111.6 $\pm$ 2 ng/mL), (MCF-7, 86.5 $\pm$ 1.4 ng/mL), (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, 52 $\pm$ 2.3 ng/mL)] and IC<sub>50</sub> values was detected. In TMH inhibited cell cultures, THZ mediated cytotoxic effect was observed to be decreased (p<0.05). THZ mediated apoptotic cell percentages were calculated as 10.8% for MDA-MB-231, 30% for MCF-7, and 46.8% for CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Apoptosis was detected in MCF-7 and CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> while MDA-MB-231 cells were autophagic. Invasion potency of MCF-7, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and MDA-MB-231 cells was determined as 29%, 24%, 16.5%, respectively. Migration potency of MCF-7, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and MDA-MB-231 cells was determined as 28.5%, 63.2%, 61%, respectively. Among the three cell lines, MDA-MB-231 cells have highest invasive and migration ability than other cell lines. We demonstrated that THZ significantly increases E-cadherin, Cytokeratin-18,  $\beta$ -Catenin, while inhibiting N-cadherin, Vimentin, Fibronectin at protein level. We also confirmed the expressions of E-cadherin and Vimentin by using immunocytochemistry. E-cadherin expression increased while Vimentin decreasing all three tested cell lines.

In this study, the cytotoxic effect of THZ is mediated by two different types of cell death in breast cancer and breast cancer stem cells. Inhibition of epithelial mesenchymal transition was confirmed by using independent methods.

In conclusion, these data suggest that THZ might be a novel cytotoxic and anti-metastatic agent for breast cancer at in vitro cell culture.

**Key words:** Apoptosis, Dopamine receptor, Autophagy, Cytotoxicity, Thioridazine

**2016, 86 Pages**



## 1. GİRİŞ

Tanımlanmış, özgün ve yanlışlanabilir hipotezler üzerinden bilimsel araştırmaların yürütülmesi, ölçüm ve gözlemlerin kullanılan yöntem ve teknoloji ile sınırlanmış olması, bir şeyi ölçerken diğerk özelliklerinin gözardı edilmesi, bilimsel araştırmanın algoritmasıdır.

Karmaşık, dinamik, hiyerarşik örgütlenme ve çevreye uyum sağlama özelliğı gösteren canlılarda, bir molekülün etki ve etkileşimleri canlıdan canlıya farklılaşma gösterir. Tanı etiketlemesi olan hastalıklar bireyden bireye varyasyonlar gösterdiği gibi tedavide kullanılan ilaçların etkileri de, doku, organ, sistem ve birey bazında farklılık gösterir. Bundan dolayı, bir ilaç bir durumda olumlu etki gösterirken bir başka durumda olumsuz etki gösterebilir. Ayrıca ilaçlara sadece tek bir hastalıkta etki gösterebileceğine dair anlam yüklenmesi insan merkezli bir yaklaşım olup, gerçekte bunun ne ölçüde doğru olduğunun test edilmesi gerekir ki, insan zihninin sınırlandırıcı etkileri en aza indirgenebilsin. İlacın etkinliğı, kendi kimyasal konfigürasyonuna bağılı olduğu kadar, etkileştiğı moleküllere ve ortam şartlarına göre de değışebilmektedir. Bir ilacın çeşitli hastalıklarda da etkili olabileceğı düşüncesini test eden birçok bilimsel araştırma yapılmakta ve kullanımdaki ilaçların potansiyel etkileri taranmaktadır.

Maliyet/yarar ve zaman kısıtlaması açısından bir molekülün bütün özellikleri ve canlı sistemlerdeki bütün etkileri çalışılmamaktadır. Bilimsel araştırmalar, gerçeğin tamamını değıl, tanımlanmış ve filtre edilmiş belli bir kısmını ortaya koyar. Ortaya konan kısmi gerçeğin, yanlışlanabilir hipotezler üzerinden doğrulanmaya ve tekrarlanabilirliğe açık olması, bilimin gerçek gücüdür.

Yaşam bilimlerinde yapılan her doktora tezi, tanımlanmış ve araştırmaya değıer yanlışlanabilir hipotezlerin kurgu içinde planlanarak projelendirilmesini, hipotezlere uygun yöntemlerle test edilmesini, elde edilen gözlem ve ölçüme dayalı verilerin doğru yorumlanmasını ve belirli bir sistematik kurgu içinde hikayeleştirilmesini gerektirir.

Bu tez çalışması, yukardaki bakış açısından esinlenilerek, antipsikotik bir ilaç olan Thioridazine'nin meme kanseri hücre kültürlerindeki etkilerinin araştırılmasını kapsamaktadır. Thioridazine'in kanser gibi çok farklı bir hastalık grubunda antiproliferatif etki gösterdiğine dair literatür verilerinden güç alarak, meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkisinin dopamin reseptörlerine



bağlı olup olmadığı, analitik bakış açısıyla adım adım alt sorular ve hipotezler oluşturularak araştırıldı. Araştırmanın her aşamasında elde edilen bulgular, bağımsız veya ikinci bir yöntemle doğrulandı. Meme kanserinin *in vitro* hücre kültürü modellerinde yürütülen bu tez çalışmasında, Thioridazine'in gösterdiği sitotoksik etkinin hangi hücre ölüm eşitisi kaynaklı olduğunun ortaya konulmasından sonra, Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rolünün olup olmadığı, epitelyal-mezenkimal geçişte rol oynayan moleküller ölçümlenerek test edildi. Elde edilen verilerin hikayesini daha okunabilir ve anlaşılır kılmak için sistematik bir kurgu ve özgün yazım dili tercih edildi.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antipsikotik Bir İlacın Kanser Tedavisinde Kullanılması

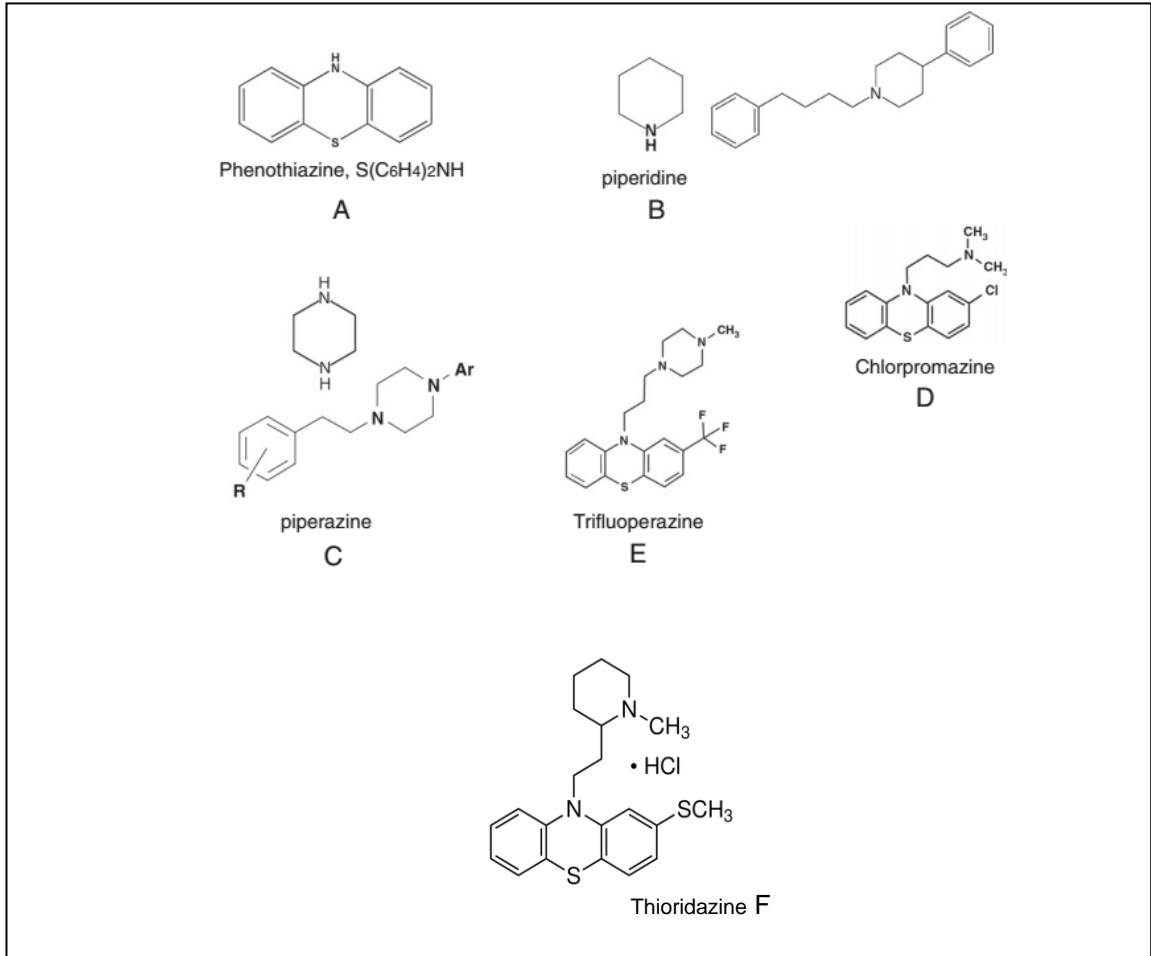
Psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaç kanser tedavisinde kullanılabilir mi? sorusu, güncel ilaç geliştirme çalışmalarında gündemde kalan stratejik bir yaklaşımdır. Çünkü sıfırdan bir hastalığa yeni bir ilaç geliştirme oldukça maliyetli ve zaman alıcıdır. Maliyeti düşürmek ve süreci kısaltmak için kullanımda olan ilaçların farklı hastalık gruplarında test edilmesi güncel araştırma yaklaşımlarından biridir [1]. Bu yaklaşım biçimi, ilaçlara ikinci bir hayat vermek gibi düşünülmektedir. Geleneksel ilaç geliştirme yöntemleri, sürekli olarak yeni moleküllerin sentezlenmesine dayanır. Giderek artan ilaç sayısı, araştırmacıları, var olan ilaçların farklı özelliklerinin yeniden çalışılması gerektiğine yönlendirmiştir. Hedefe yönelik üretilen ilaçların hedef dışındaki hastalıklarda da etkili olabileceğini gösteren ve test edilen ilaç sayısı son on yılda yaklaşık 100 adete ulaşmıştır [2]. Bu ilaçlara örnek olarak; Thalidomide sakinleştirici ve antiemetik olarak kullanılan bir ilaç iken İsraili dermatologlar tarafından bazı dermatolojik hastalıklara iyi geldiği bulunmuştur. Amerikalı bir çalışma grubu ise; ilacı multiplemyeloma hastalığındaki etkilerini araştırmaya başlamış ve tümör nekrozis faktör alfa molekülü üzerinde inhibe edici etkisini göstermişlerdir [3]. Kanser tedavisi olan tip 2 diyabet hastalarda Metformin ilacının, hastaların sağkalımını uzattığı görülmüş ve Metformin'in kanser tedavisindeki etkileri araştırılmıştır. Literatür taraması yapıldığında Metformin'in farklı kanser türlerinde etkili olduğu birçok çalışmaya rastlanmaktadır [4].

Bu tez çalışmasında etkilerini araştırdığımız Thioridazine (THZ) bu ilaçlardan biridir. Antipsikotik hastalıkların tedavisinde kullanılan THZ, ilk önce antimikrobiyal olarak kullanılmıştır [5]. Daha sonra diğer etkileri araştırılarak, ilacın antioksidan [6] ve antitümör özellikte taşıdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

### 2.2. Phenothiazine Sınıfına Ait Antipsikotik Bir İlaç: Thioridazine

Phenothiazine sınıfına ait ilaçlar antipsikotik özellikleri ile tanınmaktadır. Bu sınıfa ait geliştirilen ilk ilaç Chlorpromazine olup, oldukça önemli bir yere sahiptir. Phenothiazines ailesi 1950'li yıllardan 1990'a kadar psikiyatrik tedavilerde kullanılmıştır. Chlorpromazine ve Fluphenazine bu ailenin birinci neslinden olan ve günümüzde hala kullanılan üyelerindedir [7]. Phenothiazine'ler trisiklik yapıda olup, yapısal formülünde sülfür ve azot içerir. İlacın yapısındaki azot ve azotun

konfigürasyonu ailedeki ilaçlara farklı özellik kazandırır. Konfigürasyondaki değişimler ilaçların aktivitesini etkilemektedir. Phenothiazine'ler antipsikotik etkisini dopamini ve dopamin reseptörlerini inhibe ederek gösterir [8]. Phenothiazine ailesinin birinci nesil üyelerinde çok görülen yan etkiler, ikinci nesil Phenothiazine'lerde azaltılmıştır. Thioridazine (THZ) yan etkilerin en az görüldüğü birinci nesil antipsikotik olup, molekülün antipsikotik özellik dışında taşıdığı özellikler (antimikrobiyal, antioksidan, antitümör) bulunmaktadır [9]. THZ'in (10-[2-(1-methyl-2-piperidyl) ethyl]-2-methylthio-phenothiazine), moleküler ağırlığı 407.04 g/mol'dür.



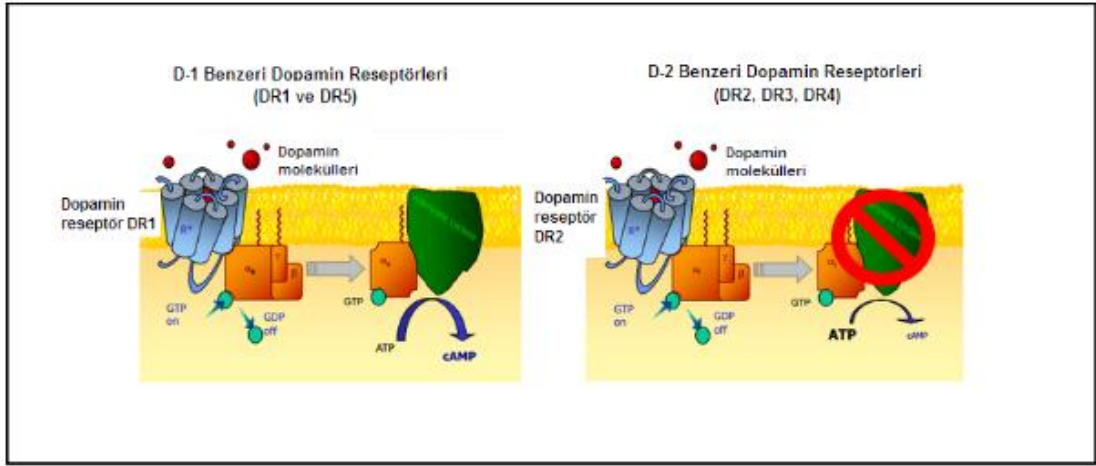
**Şekil 2.1.** Phenothiazine sınıfına ait ilaçların kimyasal yapıları. A. Phenothiazine,  $S(C_6H_4)_2NH$ , B. Piperidine, C. Piperazine, D. Chlorpromazine, and E. Trifluoperazine, F. Thioridazine (Sudeshna, 2010).

### 2.2.1. Thioridazine'in Etkisi Dopamin Reseptörüne Bağlıdır

Dopamin reseptörleri GPCR (G protein-coupled receptors) ailesinden olup, D1 benzeri ve D2 benzeri dopamin reseptörleri olarak iki büyük gruba ayrılır. D1

benzeri dopamin reseptörleri DR1 ve DR5, D2 benzeri dopamin reseptörleri DR2, DR3, DR4'ten oluşmaktadır. Bu sınıflandırma, dopamin reseptörlerinin adenilsiklaz aktivitesi üzerinde oynadıkları role göre yapılmıştır. Adenilat siklaz, ATP'yi cAMP'ye dönüştürür. cAMP üretimi farmakolojik özelliklerin belirlenmesinde rol oynamaktadır. D1 benzeri dopamin reseptörleri (DR1 ve DR5)  $G_{s/olf}$  proteinini aktive ederek, cAMP üretimini uyarır. D2 benzeri dopamin reseptörleri (DR2, DR3, DR4)  $G_{i/o}$  proteinine bağlanarak, adenil siklazın inhibe edilmesini uyarır [10].

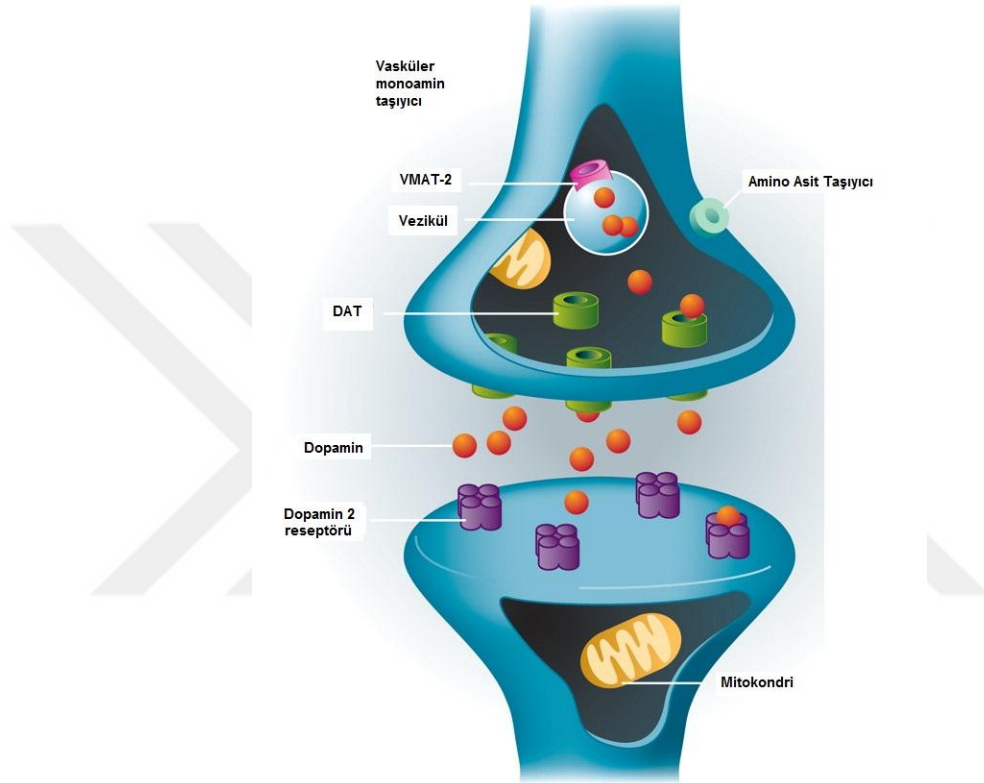
cAMP, PKA (protein kinaz A)'yı aktive ederek D2 reseptör antagonizmasının hücre içinde yarattığı değişikliklere aracılık eder ve bu sayede antipsikotik teröpatik etki ortaya çıkar.



**Şekil 2.2.** D1 benzeri ve D2 benzeri dopamin reseptör ailesi. (Şekil A. Finch (2013) ders notlarından alınarak Türkçeleştirilmiştir [11].)

Thioridazine etkisini, dopamin reseptör ailesi üyelerinden D2 reseptörüne bağlanarak gösterir. D2 reseptörü GCPR ailesindedir. Thioridazine'in etkisini, dopaminin kendi spesifik reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek ortaya çıkarır. Dopamin aktivatör transporterlar (DAT) aracılığıyla hücre içine alınan dopamin miktarında azalma gözlenir. Thioridazine molekülü, Adenilsiklaz (AC) enziminin aktivitesini azaltarak, cAMP ve PKA (Protein kinaz A) sentezini de azaltır. PKA ise, moleküllerin fosforilasyonundan sorumlu olan kinazlardandır. Aktivitesi azalan PKA, hücre içi diğer substratların (iyon kanalları gibi) ve DNA'ya bağlanan proteinlerin fosforilasyonunu da azaltır. THZ DAT'ları dolaylı yoldan etkileyerek, DAT aracılı dopamin taşınmasını inhibe eder. DAT aracılı taşınma mekanizmaları:

1) Endositoz ile PKC (Protein kinaz C) aktivasyonu bağımlı olarak taşınma 2) Erk1/2 aktivitesinin inhibisyonu sonucu DAT'ların plazma membranındaki lokalizasyonunun düzenlenmesi 3) DAT'ların spesifik proteinler ile düzenlenmesi örneğin; alpha-synuclein DAT aktivitesini düzenleyen negatif bir modulatördür. 4) Psiko uyarıcılar, direkt DAT ile etkileşerek hücre yüzeyindeki DAT sayısını düzenleyebilir [12, 13].



**Şekil 2.3.** Dopamin, Dopamin 2 reseptör ve Dopamin aktivatör transporterlar arasındaki etkileşim mekanizması (Şekil Cummings JL ve ark.'nın yaptığı yayından (2011) alınarak, Türkçeleştirilmiştir [14].)

### 2.3. Thioridazine, Dopamin Reseptörü ve Meme Kanseri İlişkisi

Dopamin reseptörleri çoğunlukla merkezi sinir sisteminde ifade edilmekte olup, diğer dokularda da ifade edilmektedir. Dopamin reseptörleri, tükrük bezlerinde, periferik sinir sisteminde, böbrek, adrenal bezler, kardiyovasküler sistemde de sentez edilmektedir. Bunun dışında pankreas, prostat, kolon ve meme kanserinin görüldüğü dokularda da dopamin reseptörlerinin sentezlendiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [15,16].

Bu ilacın, bir nörotransmitter olan dopamin reseptörünü inhibe etmesi, meme kanseri kök hücrelerindeki dopamin reseptörlerine bağlanarak etkisini göstereceğini düşündürmektedir. Meme kanseri kök hücrelerinin dopamin reseptörleri ifade ettiği Sachlos ve ark. tarafından tanımlanmıştır [17]. Bu kısıtlı sayıdaki literatür verileri THZ'nin dopamin reseptörü ifade eden çeşitli doku ve organların kanserlerinin tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir ilaç olduğunu göstermektedir.

THZ'nin şizofreni tedavisinde ve diğer psikiyatrik hastalıklarda kullanımı son yıllarda yeni nesil antipsikotik ilaçların devreye girmesiyle azalmıştır. Ancak molekülün sahip olduğu ilginç kimyasal konfigürasyondan dolayı başka hastalıkların tedavisinde potansiyel bir ilaç olup olamayacağı araştırılmaya başlanmıştır. İlk araştırmalar THZ'nin antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerine yönelik olup, sonraki araştırmalar antiproliferatif özelliğinin keşfedilmesine yol açmıştır. İlk kullanım amacı dışında gözlenen bu etkilerin THZ'nin hücre içine alınım mekanizmalarıyla da ilişkili olup olmadığı araştırılan konular arasındadır.

#### **2.4. Thioridazine ile Yapılmış Literatür Çalışmaları**

Akut myeloid lösemi kök hücresi hedefli olan bu ilaç normal hücrelerde sitotoksik etki göstermezken, kanser kök hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir [18]. Yüksek teknolojiler ile test edilen 590 tane ajan arasından sadece THZ'nin kanser kök hücrelerine (Akut myeloid lösemi kök hücresi) spesifik olarak etki gösterdiği tespit edilmiştir [17].

1999 yılında yapılan bir çalışmada Lialiaris ve Pantazaki, THZ'nin doza bağlı olarak DNA'yı etkilediğini jel elektroforezinde nükleik asit bantlarının kaybolduğunu göstererek kanıtlamışlardır. İnterkalator özelliği sayesinde DNA'nın yapısını değiştirerek major oluşuna bağlanıp, replikasyonu ve DNA tamir mekanizmalarını inhibe etmektedir [19]. Yapısında bulunan aromatik N-dialkil grubu THZ'ye bu özelliği kazandırmaktadır [20].

Curti ve ark.'nın 2002 yılındaki çalışmasında ise; THZ'nin sıçan karaciğerinden izole edilen mitokondride antioksidan aktivite göstererek, reaktif oksijen türevlerinin ve sitokrom *c*'nin salınımına yol açtığını böylece apoptozisi uyardığı gösterilmiştir [21].

THZ'nin de içlerinde bulunduğu Phenothiazine sınıfına ait ilaçlarla yapılan bir çalışmada, bu ilaçların hücre canlılığı üzerine etkileri lösemi hücre hatlarında ve normal lenfositlerde karşılaştırılarak çalışılmıştır. Phenothiazine lösemi hücre

hatlarında 0.1–10 µM dozlarda sitotoksik etki göstermezken, THZ 5-10 µM dozlarda sitotoksik etki göstermiştir. Bu sınıfa ait ilaçlardan uygun dozlarda en etkin olanın THZ olduğu ve normal lenfositlerde sitotoksik etki göstermeyerek apoptozisi uyardığı belirlenmiştir. THZ'nin daha düşük dozlarda sitotoksik etki göstermesi yan etkileri tolere etmesi açısından bir avantajdır. Apoptozisin uyarılma mekanizmaları araştırılarak mitokondrial DNA polimeraz enziminin ve ATP üretiminin inhibisyonundan kaynaklandığı tespit edilmiştir [22].

B16 fare melanom hücre hatlarında ve *in vivo* yapılan çalışmada, THZ'nin melanom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin diğer Phenothiazine sınıfına ait ilaçlara nazaran daha etkin olduğu ve *in vivo* tümör gelişiminde de inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir [23].

Kang ve ark.'nın 2012 yılında yumurtalık kanseri hücre hatlarıyla (SKOV-3 ve OVCAR-3) yaptığı çalışmada, THZ'nin phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmasını araştırmışlardır [24]. (PI3K)/Akt inhibitörleri ve THZ kullanılarak yapılan çalışmada yolaktaki etkiler aydınlatılmıştır. Ayrıca hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve apoptozisde rol alan moleküller de araştırılmış, THZ'nin hücreleri hücre döngüsünün G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında tutuklu bıraktığı, hücre döngüsü düzenleyicilerden Siklin-D1, Siklin bağımlı kinaz-4'ün ifade düzeyini düşürdüğü, p21, p16, CDC25A gibi düzenleyicilerin ifade düzeyini ise arttırdığı bulunmuştur. Hücre döngüsü analizleri sonucu, hücrelerin G<sub>1</sub> fazında tutuklu kalması, THZ'nin antiproliferatif etkilerinin (PI3K)/Akt yolağının inhibe edilmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür [24].

2014 yılında Park ve ark.'nın çalışmasında ise THZ'nin anti-anjiyogenik etkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan kanser hücre hatlarında (OVCAR-3, MDAH-2774) THZ sitotoksik etki gösterirken, normal hücreleri temsil eden hücre hatlarında (MCF-10A, BEAS-2B, MRC-5, HOSE-E6E7) herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Vasküler endotelial çoğalma faktörü (VEGF)'i baskılayarak, VEGF aracılı proliferasyon ve invazyonu da durdurmuştur. Fokal adezyon kinaz molekülünün (FAK) fosforilasyonunu baskılayarak, αvβ3/FAK/mTOR sinyal yolağının moleküler mekanizması araştırılmıştır [25]. Sitotoksik özelliklerinin yanı sıra ilaç direncini azaltma, P-glikoprotein ailesini inhibe etme, DNA hasarı, anti-oksidan özellikler taşıması, bu ajanın antikanser ajan olarak moleküler mekanizmalarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır

[26]. Meme kanseri kök hücrelerinde ve kök hücre olmayan heterojen popülasyonda etkileri ve moleküler mekanizmaları ise bilinmemektedir.

## 2.5. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında oldukça yaygın (%41) görülen heterojen bir hastalık olup, akciğer ve pankreas kanserinden sonra ölüm oranı oldukça yüksektir [27]. Kanseri, heterojen bir hastalık olup, tek bir hücredeki çoklu moleküler işlemlerin etkileşiminden kaynaklanır. Kanseri olgusunda, genetik, epigenetik, metabolik, hücre içi ve hücreler arası haberleşme, hücre enerji akışı gibi olayların ve metabolitlerin düzenlenmesinde ve kontrolünde farklılaşmalar meydana gelir. Ayrıca, kanserin oluşumunda tamir edilemeyen DNA hasarlarının kalıcı hale gelmesinin de rolü vardır. Mutasyonların çoğu tamir edilemeyen ve nesilden nesile aktarılan kalıtsal DNA hasarlarıdır. Kanseri hücrelerinde oluşan DNA hasarlarının büyük bir oranı, DNA tamir sistemleriyle onarılır ve ya hücre kendini ölüme götürür. Normal dokularda ise hücre çoğalması ile apoptozise bağlı hücre kayıpları arasında uyumlu bir denge vardır. Genetik ve epigenetik düzlemde meydana gelen mutasyonlar, genetik ve epigenetik mekanizmaların akışını bozarak, kanseri hücrelerine çoğalma avantajı sunmaktadır [28,29].

Genetik ve epigenetik bilgidaki değişiklikler, DNA hasarının onarılıp onarılamaması, kontak inhibisyonun ortadan kalkması, apoptozisten kaçan tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına sebep olur [30].

Kontrolsüz çoğalan hücreler, artan besin ve oksijen ihtiyaçlarını yeni kan damarları oluşturarak ve vücudun diğer bölgelerine göç ederek sağlamaya çalışır. İnvazyon ve metastazda rol alan moleküllerde meydana gelen mutasyonlar da kanseri hücrelerinin çeşitli dokulara ulaşmasında etkilidir [31]. Epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) destekleyen bu değişimler, kanseri hücrelerinin invaziv hale gelerek, metastaz yapmasına neden olur. EMT olayında hücre-hücre adezyonunun düzenlenmesinde rol alan Snail protein ailesi oldukça önemlidir. Transkripsiyon faktörü olan Snail, hedef molekülü olan E-kaderini transkripsiyonel düzeyde kontrol eder. Fosforillenmiş Snail, E-kaderini inhibe eder [32]. EMT sırasında, transkripsiyonel düzeyde ifadesi engellenen E-kaderin molekülünün yokluğu kanseri hücrelerinin invaziv hale gelerek, metastaz yapmasına neden olur. Snail ailesi üyelerinden özellikle Snail1'in meme, kolon, gastrik birçok kanseri tipinde aşırı sentezlendiği gösterilmiştir [33].



Snail'in fosforilasyonu, GSK-3 $\beta$  (Glikojen sentazkinaz 3 $\beta$ ) tarafından kontrol edilir. GSK-3 $\beta$ , PI3K/Akt yolağının aşağısında bulunur ve defosforile durumdayken inaktiftir. Akt molekülünün GSK-3 $\beta$ 'ı ser 9 motifinden fosforillemesi ile aktif duruma geçer. PI3K/Akt ile başlayan ve E-kaderin molekülünü de kapsayan bu yolda kinazlar oldukça önemli bir role sahiptir. GSK-3 $\beta$ 'ın aktifleşmesi, Snail molekülünü fosforiller. Fonksiyonel olarak aktifleşen Snail, E-kaderin molekülünün transkripsiyonunu engeller. Dolayısıyla, Snail molekülünün fosforilasyon/defosforilasyon durumu oldukça önemlidir. E-kaderin molekülünün, Snail tarafından transkripsiyonel düzeyde E-kaderinin baskılanması, EMT'yi başlatıcı faktörlerden biridir. Sonuç olarak, transkripsiyonel düzeyde E-kaderin sentezinin devam etmesi, hücrelerin epitelyal mezenkimal geçişini engeller.

Preliminer veriler elde etmek için yapılan translasyonel çalışmalarda, meme kanserini modelleyen hücre kültürleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda; meme kanserini hücre düzeyinde modelleyen hücre kültürleri kullanıldı. Her bir hücre kültürü farklı moleküler özelliklere sahip olup, heterojen bir hastalık olan meme kanserinin farklı alt tiplerini modellemektedir.

## **2.6. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Kültürünün Özellikleri**

51 yaşındaki meme adenokarsinomalı bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiş olan MDA-MB-231 hücreleri anöploid yapıdadır. Karyotip analizinde kromozom sayılarının triploide yakın değerlerde (52-68) olduğu gözlenmiştir. Karyotip analizleri, hücre popülasyonunun kromozom sayısı ve yapısı bakımından homojen olmadığını göstermiştir N8 ve N15 kromozomları mevcut değildir. Bu kromozomlar sitogenetik analizlerde belirteç (marker) olarak kullanılmaktadır [34]. Meme kanseri hücrelerinin bazı özelliklerini modelleyen bu hücre kültürü, invaziv kanseri *in vitro* koşullarda çalışmak için oldukça uygun bir modeldir. Östrojen reseptör negatif olan MDA-MB-231 hücreleri normal meme hücrelerinin gösterdiği özelliklerini kaybetmiştir. Hem MCF-7 hem de bu hücre kültüründe WNT7B onkogeninin ifadesi mevcuttur. Ayrıca HER-2 geninin ifade düzeyi de normal seviyededir. Epitelyal morfolojide olan MDA-MB-231 hücreleri, EGF ve TGF  $\alpha$  sentezler. Ayrıca, p53, MMP-1, MMP-2, MMP-9 ve Vimentin gibi invazyon faktörlerinin de ifadesi vardır [35]. p53 geni, bu hücre kültüründe mutant durumdadır ve aşırı ifadesi söz konusudur [36].

## 2.7. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Kültürünün Özellikleri

MCF-7 hücreleri, 64 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomalı bir kadın olgunun plevral efüzyonundan 1970 yılında izole edilmiştir [37]. Morfolojisi epitelyal olup, insülin benzeri büyüme (çoğalma) faktörü bağlanma proteinleri sentezler. Ayrıca WNT7B onkogeninin ifadesi mevcuttur. HER-2 geninin ifadesi normaldir. MCF-7 hücrelerinin sitogenetik analizlerinde; kromozom sayılarındaki anormal artış ve azalış (anöploid 66-87), hatalı eşleşmiş bazların onarım sisteminde (mismatch repair) bozukluklar görülmektedir [38, 39]. DNA'da hatalı eşleşen bazlar, DNA tamir proteinleri (mismatch repair, MMR) tarafından onarırlar ve ayrıca genomun bütünlüğünün korunmasında görev alırlar. Hatalı eşleşmiş bazların onarımında görev alan MLH1 ve MSH2 tamir proteinleri MCF-7 hücrelerinde mutasyona uğradığı için, hücreler antikanser ajanlara karşı direnç geliştirir. Sonuç olarak, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ve/veya tamir proteinlerinin az veya aşırı ifadesi, direnç gelişiminde önemli bir faktördür [40]. Meme kanseri ve diğer birçok insan kanserinin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1'de oluşan mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de mevcuttur [41].

MCF-7 hücre kültüründe kaspaz -6, -7 ve -9 ifadesinin yanı sıra Bcl-2 ifadesi de oldukça iyidir. Diğer yandan *p53* ve *p21* genlerinin ifadesi ve düzenlenmesi normaldir [42]. MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmasında; aşırı artmış östrojen ifadesi ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF'den bağımsız çoğalma, artmış Her-2/Neu/c-ErbB-2 ifadesi [43] artmış N-ras [44] ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır [45].

## 2.8. MCF-10A İnsan Normal Meme Epitel Hücre Kültürünün Özellikleri

MCF-10A hücreleri, hücre kültürü için modifiye edilmiş normal meme epitelyum hücreleridir. 36 yaşında beyaz ırktan bir kadının meme dokusundan izole edilmiştir. Mikroskopta luminal duktal hücre özellikleri gösterirler. Hücre kültürlerinde adherent (flaska tutunarak) hücreler olarak çoğalırlar.

Diploit karyotipe sahip hücrelerdir. *p53* ifadesi normal olup, agarda koloni oluşturmazlar. İmmun sistemi olmayan farelerde çoğalıp tümör oluşturmazlar [46].

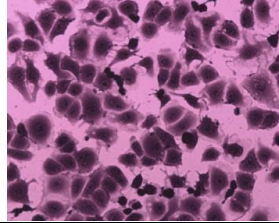
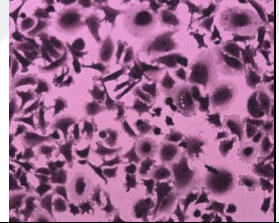
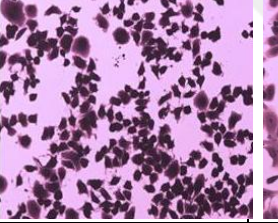
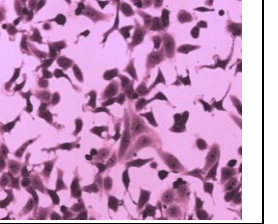
## 2.9. CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> İnsan Meme Kanseri Kök Hücre Kültürünün Özellikleri

Meme kanseri kök hücreleri, fare ksenograftlarında hücrelerin membran yüzeylerinde yer alan biyobelirteçler (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) sayesinde ilk defa 2003 yılında keşfedilmiştir. CD44 ve CD24 molekülleri tüm kanserlerde eksprese edilen moleküller değildir. Al-Hajj ve ark. yaptıkları çalışmada CD44 ve CD24 moleküllerinin ifade düzeylerinin (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) bu hücre grubunda tümör formasyonunda önemli rol oynadığını göstermişlerdir [47]. Ayrıca CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> olan hücrelerin kendini yenileme, mamosfer oluşturma, metastaz yapma kapasiteleri yüksektir. Kök hücrelerin in vitro olarak izole edilmesinde kullanılan akım sitometrisi-FACS (Fluorescent activated cell sorting) yönteminin iki prensibi vardır; iki kategori üzerinden izolasyon yapılmaktadır. Bunların ilki hücre yüzey belirteçleri (CD44, CD24, ALD1H<sup>+</sup> gibi) ikincisi ise, sitoplazmik belirteçlerdir; aldehid dehidrogenaz enzimi gibi [48]. Meme kanseri kök hücrelerinin birçok karakteristik özelliği mevcuttur. Tümörijenik özelliği SCID fareler üzerinde yapılan çalışmalarla kanıtlanmış olup, ayrıca yüksek ALDH<sup>+</sup> enzim aktivitesi göstermektedir. CD44, CD24 gibi yüzey belirteçlerinin yanısıra ek olarak başka belirteçlerle de (CD133, CD49f, ITGA6, EpCAM gibi) meme kanseri kök hücreleri izole edilebilmektedir. Kansere tedavisinde standart olarak kullanılan radyasyon ve kemoterapi sonrası, primer meme kanseri hücrelerinin CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> moleküllerince zengin bir ifade düzeyine sahip olduğu ve bu hücrelerden 4 nesil sonrası bile ksenograft modelleri oluşturulabildiği gözlenmiştir. Bu tip çalışmaların sonuçları yorumlandığında, tümörlerin nüksünde ve metastazda kanser kök hücrelerinin rolü olduğu anlaşılmıştır. Standart kemoterapide gelişen direncin nedenleri araştırıldığında ise, DNA tamir mekanizmalarının çalışmadığı, reaktif oksijen türevlerinin arttığı, Wnt/ $\beta$ -katenin ve Notch sinyal yollarının düzenlenmesinin bozulduğu görülmüştür. Kök hücreler farklı hücre hatlarında farklı miktarlarda bulunur. Her hücre kültürü aynı sayıda kök hücre popülasyonuna sahip değildir. Kök hücrelerin, en fazla elde edilebileceği meme kanseri hücre kültürü tipi bazal-benzeri olanlardır. Genel popülasyon %2 iken, bazal benzeri hücre hatlarında bu oran  $\geq$ %10 civarındadır [49].

**Tablo 2.1.** Çalışmada kullanılan hücre kültürlerinin özellikleri

Hücre Kültürü	Klinik Sınıflandırma	Reseptör Profili	Mutasyonlar
MDA-MB-231	Bazal like/Bazal B	ÖR- PR- /HER2-	BRAF,CDKN2A, KRAS, TP53
MCF-7	Luminal A	ÖR+ PR+/HER2+	CDKN2A,PIK3C A
MCF-10A	Bazal B	-	Sağlam
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>	Meme Kanseri Kök Hücreleri		

**Tablo 2.2.** Çalışmada kullanılan hücre kültürlerinin crystal violet boyası ile boyanarak faz-kontrast mikroskopundaki görüntüleri (4X). [ÖR: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, HER2: Proto-onkogen neu, BRAF: B-raf proto-onkogen, CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A, TP53: Tümör protein 53, PIK3CA: fosfotidilinositol 4,5 bifosfat 3 kinaz katalitik alt ünite alfa].

Luminal A	Bazal B	Bazal B	Meme Kanseri Kök Hücreleri
MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A	CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>
			

## 2.10. Bu Tez Çalışmasında Cevabı Araştırılan Sorular

- 1.Thioridazine'in meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkisi var mı?
  - 2.Thioridazine'in sitotoksik etkisi dopamin reseptörlerine bağlı mı?
  - 3.Dopamin reseptörlerinin meme kanseri hücre kültürlerindeki ifade düzeyleri nedir?
  - 4.Thioridazine'in gösterdiği sitotoksik etki hangi hücre ölüm çeşidine bağlıdır?
  5. Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rolü var mı?
  - 6.Epitelyal-mezenkimal geçişte rol oynayan moleküller hangileridir?
- Thioridazine varlığında bu moleküllerdeki ifade düzeyleri nasıl değişmektedir?

Tezin amacı, anti psikotik Thioridazine'nin çeşitli meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerinin nasıl ve hangi moleküller/yolaklar üzerinden ortaya çıktığını tanımlama ve Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rolünün olup olmadığını test etme olarak belirlendi.



### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1. Materyal

Tezde kullanılan kimyasal ve kitlerin hangi aşamalarda kullanıldığı ve nereden satın alındığı Tablo 3.1.'de özetlendi.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan kimyasal ve kitlere ait bilgiler

<b>Kimyasallar ve Kitler</b>	<b>Kullanıldığı Deneyler</b>	<b>Satın Alındığı Firma ve Katalog Numarası</b>
RPMI 1640 Besiyeri	Hücrelerin kültüre edilmesi	Merck Millipore, FG1215
Fetal Sığır Serum	Besiyerine çoğaltıcı faktör olarak eklendi	Merck Millipore, S0113
Penisilin-Streptomisin	Besiyerine bakteri kaynaklı kontaminasyonu önleme amaçlı eklendi	Merck Millipore, A2213
DMSO	Hücrelerin dondurulması	Merck Millipore, 102952
FACS Solüsyonu	Kök hücrelerin izole edilmesi	BD Bioscience, 349202
Thioridazine	Çalışmada etkilerini araştırdığımız ilaç	Sigma Aldrich, T9025
Tripsin/EDTA	Hücrelerin flask tabanından ayrılmasının sağlanması	Merck Millipore, L2143
Tripan Mavisi	Hücre canlılığının ve sayısının belirlenmesi	Merck Millipore, 111732
XTT Cell Proliferation Assay Kit	Hücrelerin canlılık yüzdelerinin belirlenmesi	Roche,11465015001
Crystal Violet Boyası	Hücre morfolojilerinin incelenmesi	Sigma Aldrich, C3886
Human Dopamine Receptor D2 ELISA Kit	Dopamin reseptör 2'nin (DR2) ifade düzeyinin ölçülmesi	Mybiosource, MBS723432

Threo-methylphenidate hydrochloride	Dopamin aktivator transportlarının inhibe edilmesi	Tocris,1812
Cell Death Detection ELISA Plus	Apoptozis ve nekrozun belirlenmesi	Roche, 11544675001
Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit	Apoptozisin doğrulanması	Merck Millipore, MCH100105
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	Protein izolasyonu	Thermo Fisher Scientific, 78501
Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit	Western blot bantlarının görüntülenmesi	BioRad, 1705070
Chloroquine diphosphate salt	Otofajinin inhibe edilmesi	Sigma Aldrich, C6628
Monodansylcadaverine	Otofajik vakuollerin boyanması	Sigma Aldrich, 30432
CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay	Hücrelerin migrasyon potansiyelinin ölçülmesi	Cellbiolabs, CBA-100-C
Fosfat Buffer Salın	Immunositokimya deneyinde hücrelerin yıkanması	Merck Millipore, BSS-1005-B
Histostain-Plus IHC Kit	Immunositokimya deneyinin gerçekleştirilmesi	Thermo Fisher Scientific, 858943

### 3.2. Yöntemler

#### 3.2.1. Tüm İş Paketlerinde Yer Alan Ortak Yöntemler

##### 3.2.1.1. Hücre Hatlarının Temini, Kültüre Edilmesi ve Çoğaltılması

İnsan meme kanseri hücre kültürleri (MCF-7, MDA-MB-231) ve normal meme epitelyal hücre kültürü (MCF-10A) sırasıyla Interlab Cell Line Collection (ICLC, İtalya) ve Health Protection Agency (HPA, İngiltere) hücre kültürü bankalarından satın alındı. Hücre kültür işlemlerinin tamamı laminar hava akımlı steril klas II kabinde (NuAire, ABD) gerçekleştirildi.

- MCF-7, MDA-MB-231 hücre kültürleri, RPMI 1640 besiyerine %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde (Binder, Almanya) çoğaltıldı.

- MCF-10A hücre kültürünün normal meme epitelyal kaynaklı olması nedeniyle, RPMI 1640 besiyerine 100 mg/ml EGF, 1 mg/ml hidrokortizon 10 mg/ml insülin, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, % 5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı.

- Hücre kültürleri, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted ışık mikroskopunda günlük olarak izlenerek her hücre kültürüne ait ikilenme sürelerine dikkat edilerek pasajlandı ve çoğaltıldı.

- Hücrelerin devamlılığını sağlamak için periyodik olarak stoklama işlemi yapıldı. Hücreler FBS ve DMSO içeren bir solüsyonda donduruldu. Stoklama -80°C ve daha sonra -196°C sıvı azot tankında saklanarak gerçekleştirildi.

### **3.2.1.2. Kanser Kök Hücrelerinin Akım Sitometrisi ile İzole Edilmesi**

Meme kanseri kök hücreleri (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) MCF-7 hücre kültüründen, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı'ndaki (AREL) akım sitometrisi kullanılarak elde edildi.

- MCF-7 hücre kültürü enzimatik olmayan bir solüsyon yardımıyla flask tabanından kaldırılarak, hücre sayımı ile belirlenen  $\sim 5 \times 10^4$  hücre 1:100 oranda FACS solüsyonunda dilüe edilerek %0.5 bovin serum albumin, 2 mM NaN<sub>3</sub> ve 5 mM EDTA ile yıkandı ve 15 dk +4°C'de inkübe edildi.

- PE (phycoerythrin) işaretli CD24 (Miltenyi Biotec Ltd., Woking, Surrey, İngiltere) ve FITC (Fluorescein) işaretli CD44 (clone G44-26; BD Biosciences) antikoları kullanıldı. Hücreler FACS solüsyonu ile yıkanarak süspansiyon edildi.



- CD44<sup>+</sup> popülasyonu yoğun ve CD24<sup>-</sup> olan hücreler meme kanseri kök hücresi olarak değerlendirildi.

- Meme kanseri kök hücreleri (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) kök hücre stabilitesinin korunması için, RPMI 1640 besiyerinde, hiç bir ek serum, anitibiyotik, antimikotik kimyasal ilave edilmeden çoğaltıldı [16].

### **3.2.1.3. Thioridazine'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması**

Thioridazine liyofilize formu Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alındı. 10 mg Thioridazine 1mL suda çözülerek, 24.5 mM'lık ana stok hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 15 µl'lik parçalar halinde - 20°C 'de saklandı. Her deney için taze stok kullanıldı.

### **3.2.1.4. Hücrelerin Sayımı**

Hücreler sayım işlemi ile çalışılmak istenen sayıda hazırlandı.

- Meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinin, kültür flasklarının zemininde tutunarak oluşturdukları hücre tabakası (tek katlı tabaka), 4 ml Tripsin/EDTA (% 0.05) ile 5-7 dk muamele edilerek hücre tabakasının flask zemininden ayrılması sağlandı.

- Tripan mavisi (hücre canlılığının ve sayısının belirlenmesinde kullanılır) boyası ile muamele edilen hücreler bu boyanın prensibine uygun çalışan T4 cellometer otomatik sayım cihazı (Cellometer, Nexcelom, ABD) yardımıyla sayıldı. Boyanın prensibine göre Tripan mavisi ile muamele edilen hücreler canlı ise boyayı hücre içine almaz ve boyanmazlar, mikroskopta incelendiklerinde parlak görünürler. Ölü hücreler ise boyanırlar ve mikroskopta incelendiğinde koyu renkte görülürler.

- Flasklardaki besiyerleri çekilip, 4 ml Tripsin EDTA eklenerek ~ 10 dk inkübatörde bekletildi. Flask zemininden ayrılan hücreler 1:1 oranında besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik tüplere aktarıldı.

- Santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi.

- Pipetajla homojenize edilen hücrelerin süspansiyonundan 50 µl alındı ve 50 µl Tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırıldı. Bu karışım otomatik sayım cihazının lamına aktarıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı otomatik olarak belirlendi.

- Hücre sayımından sonra 96 kuyucuklu mikro plakaların her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri içerisinde  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

- Hücre kültürlerinin aderent özelliğe sahip olması sebebiyle, hücreler, plakaların tabanlarına tutunması için yaklaşık 24 saat inkübasyona bırakıldı.

### **3.2.2. Araştırma Sorularına Özgü Yöntemler**

**3.2.2.1 Araştırma Sorusu 1: Thioridazine'in meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkisi var mı?**

#### **3.2.2.1 Yöntem 1: XTT Canlılık (Vitality) Testi**

THZ ile muamele edilen hücrelerin canlılık yüzdelerinin belirlenmesinde XTT testi (Roche, Almanya) kullanıldı.

- Deney tasarımı olarak; her bir kuyucuğunda 104 hücre olan 96 kuyucuklu mikro plaka ve THZ'nin 1-30 µM arasında değişen konsantrasyonları ve 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süreleri seçildi.

- İnkübasyon sonunda, her bir kuyucuğa toplam hacmin (200 µl) yarısı kadar (100 µl) XTT solüsyonu eklendi.

- Daha sonra 96 kuyucuklu hücre kültür mikro plakalar 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde 4 saat inkübe edildi.

- Dört saat sonunda her kuyucuğun absorbansı 450-490 nm referans dalga boyu aralığında mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü.

- Absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konarak çalışılan her konsantrasyonun yüzde sitotoksitesi hesaplandı.

$\% \text{ Sitotoksosite} = 1 - [(\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması} / \text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}) \times 100]$ ,

- Sonraki adımda THZ'nin konsantrasyon-etki eğrisi, IC<sub>50</sub> (Hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) değeri CalcuSyn 2.1 (Biosoft, İngiltere) programında sitotoksosite yüzdeleri girilerek hesaplandı.

### **3.2.2.2 Araştırma Sorusu 2: Meme kanseri hücre kültürlerinde Thioridazine'nin hücre morfolojisine etkisi var mı?**

#### **3.2.2.2 Yöntem 2: Crystal Violet Boyasıyla Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi**

THZ'nin hücre morfolojisine etkisini incelemek amacıyla crystal violet boyası tercih edildi.

- Crystal violet boyası %10'luk etanolde çözülerek %0.1 konsantrasyonda hazırlandı.

- %4'lük formaldehit ile 5-10 dk fikse edilen hücreler daha sonra crystal violet ile boyanarak 10-20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

- Saf su ile boyanın fazlalığı yıkanarak, boyanan hücreler inverted ışık mikroskopunda incelendi.

### **3.2.2.3 Araştırma Sorusu 3: Thioridazine'in sitotoksik etkisi dopamin reseptörlerine bağlı mı?**

#### **3.2.2.3 Yöntem 3: Dopamin Aktivatör Transporterların İnhibe Edilmesi**

Literatürde, dopaminin dopamin aktivatör transportlarına bağlanarak endositoz ile hedef molekülüne taşındığı bilinmektedir. Deney koşullarımızda bunun geçerliliğinin doğrulanması için dopamin aktivatör transport protein inhibitörü Threo-methylphenidate hydrochloride (TMH) ile hücreler muamele edildi. TMH inhibitörünün en etkin çalıştığı konsantrasyonu belirlemek için optimizasyon deneyleri aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

- İnhibitörün en etkin konsantrasyonunu belirlemek için, üç farklı hücre kültürüne de 1-100  $\mu$ M konsantrasyonlarda TMH inhibitörü 24 saat süresince uygulandı.

- Optimum inhibitör konsantrasyonu ile hücreler 2 saat ön muameleye maruz bırakıldı.

- Aynı hücrelere, 2 saatlik inhibitörle muamele sonunda THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları uygulandı.

-24. saatte THZ'in sitotoksik etkisinin olup olmadığı XTT yöntemi ile değerlendirildi.

#### **3.2.2.4 Araştırma Sorusu 4: Dopamin reseptörlerinin meme kanseri hücre kültürlerindeki ifade düzeyleri nedir?**

#### **3.2.2.4 Yöntem 4: Dopamin 2 Reseptör Miktarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi**

Dopamin reseptör 2'nin (DR2) ifade düzeyi "Human Dopamine Receptor D2 ELISA Kit" (Mybiosource, San Diego, CA, ABD) protokolüne uygun olarak belirlendi.

- Altı kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 10<sup>5</sup> hücre ekilerek THZ'nin artan konsantrasyonları uygulanan hücreler tripsin ile kaldırılarak santrifüj edildi.

- Kitin protokolüne uygun olarak hazırlanan hücre lizatları ve kitin içerdiği standartlar 100 $\mu$ l'lik hacimlerde, kitin içinden çıkan DR2-HRP konjuge kaplı plakada 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar 5 defa yıkandı. Sonrasında tüm kuyucuklar HRP ile 37 °C'de 10-15 dk. inkübe edildi.

- Enzim substrat reaksiyonu sonucu oluşan mavi renk, reaksiyonu durdurucu solüsyonunun eklenmesi ile sarı renge döndü.

- Çok modüllü mikro plaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

- Standartların konsantrasyonları ile oluşturulan standart eğriye ait absorbans değerleri üzerinden DR2 miktarı hesaplandı.

### **3.2.2.5 Araştırma Sorusu 5: Meme kanseri hücre kültürlerinde Thioridazine'in sitotoksitesi apoptozis aracılı mı?**

#### **3.2.2.5 Yöntem 5a: ELISA Yöntemi**

Sitotoksitenin apoptozis aracılı olup olmadığının belirlenmesinde "Cell Death Detection ELISA Plus Kit" (Roche, Almanya) tercih edildi.

- Doksan altı kuyucuklu mikro plakaların her bir kuyucuğuna  $10^4$  sayıda ekilerek THZ'nin artan konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelere, lizis solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.

- Elde edilen hücre lizatları, streptavidin kaplı mikro plakalara aktarıldı.

-Histon proteinleri ve nükleozomlara bağlanmayı sağlayacak (Anti-histon biotin ve Anti-DNA Peroksidaz) antikorumları içeren reaktiften 80 µl eklenen mikro plaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında anti-histon antikoru bir taraftan nükleozomlardaki histonlara tutunurken bir taraftan da oluşan immunokompleks streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır.

-Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanmaktadır. Bağlanmayan bileşenlerin yıkama basamaklarıyla uzaklaştırılmasının ardından, nükleozom miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesi immuno komplekslere tutunmuş olan peroksidazların ölçülmesiyle gerçekleştirildi.

- Peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda mikro plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçüldü.

- Kit ile birlikte gelen %100 apoptotik hücreler negatif kontrol, hiçbir ilaç uygulaması yapmadığımız hücreler ise pozitif kontrol olarak referans alındı.

- Kitin ihtiva ettiği %100 apoptotik hücrelerin (kit kontrol) absorbanans değeri baz alınarak, hücre lizatlarında meydana gelen histon ve nükleozom miktarındaki artış, apoptozis miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirildi.

-Kit aynı zamanda hücrelerdeki nekrozu da ölçebilen özellikte olması nedeniyle, hücrelerin süpernatantı kullanılarak hücrelerdeki nekroz durumu da belirlendi.

### **3.2.2.5 Yöntem 5b: Anneksin V/7AAD Yöntemi**

Apoptozis Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit (Merck Millipore, Amerika) kullanılarak bağımsız bir yöntemle doğrulandı.

-Altı kuyucuklu plakalara  $10^5$  sayıda ekilerek THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile muamele edilen hücreler, tripsinizasyon işlemi ile toplanarak 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

-Tripsin uzaklaştırılarak, hücreler pipetajla homojenize edildi. Hücreler PBS'te tekrar çözülerek, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant kısmı atılarak hücrelerin üzerine %1 FBS içeren 100 µl besiyeri eklendi ve pipetajla hücre süspansiyonu oluşturuldu.

-Oda sıcaklığına getirilmiş olan Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonundan her tüpe 100 µl eklenip yavaşça pipetaj yapıldı. Karanlıkta, oda sıcaklığında, 20 dakika inkübe edildi.

- Muse Hücre Analiz cihazında Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Almanya) protokolüne uygun olarak analizi yapıldı.

### **3.2.2.6 Araştırma Sorusu 6: Meme kanseri hücre kültürlerinde Thioridazine'in sitotoksitesisi otofaji aracılı mı?**

#### **3.2.2.6 Yöntem 6a: Western Blot Yöntemi**

Meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürleri 25 cm<sup>2</sup>'lik küçük flasklara 4x10<sup>6</sup> olacak şekilde ekildi. THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu uygulanan hücreler 24. saatin sonunda protein izolasyonuna tabii tutularak, Western blot işlemi için hazırlandı. Western blot deneyleri ile hem otofajik hem de EMT biyobelirteçlerinin ifade düzeyi belirlendi.

-Protein izolasyonu "M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent" (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, ABD) solüsyonu ile yapıldı. 14.000xg +4°C 'de 15 dk santrifüj edilen hücrelerin pelletleri uzaklaştırılarak, süpernatantları toplandı.

- Örneklerdeki toplam protein konsantrasyonları Bradford yöntemi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) ile belirlendi.

- Hazırlanan proteinler Laemmlı tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak 96°C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dk kaynatıldı.

- Proteinler ve standart belirteç (molecular weight marker) %7.5 ve %15'lik SDS poliakrilamid jellere yüklenerek ve elektroforez işlemi Tris-Glisin SDS tamponu (BioRad, CA, ABD) içinde önce 20 dk 40V'ta daha sonra 90dk 120V'ta sabit akımda yürütüldü. Bu işlem için BioRad Mini Protean elektroforez tankı ve BioRad PowerPac 200 güç kaynağı kullanıldı.

- Moleküler ağırlıklarına göre jelde ayrılması sağlanan proteinler nitroselüloz (BioRad, CA, ABD) membranlara transfer edilmek üzere sırasıyla; sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve süngerden oluşan aktarma sandviçine alınarak, BioRad blotting tankında BioRad PowerPac 200 güç kaynağı kullanılarak 115V'ta sabit akımda 1 saat 15 dk transfer tampon solüsyonu içinde transfere tabi tutuldu.

- Transferin gerçekleşip, gerçekleşmediği membranı boyayan ponceau ve jeli boyayan comassie mavisini boyaları ile kontrol edildi.

- Transfer sonrası membranlar, %5 yağsız süt tozu ve %0.1 Tween 20 içeren TBS ile hazırlanan karışım kullanılarak oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1 saat bloklandı.

- Ardından membranlar, dilüsyonları üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanan primer antikor ile +4°C'de yaklaşık 16 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.

- TBST ile 8 defa 5'er dk. yapılan yıkama basamaklarından sonra membranlar, yine üretici firmanın talimatlarına göre dilüe edilen sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat süresince çalkalayıcıda inkübe edildi.

-  $\beta$ -Actin ve GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı ve tüm inkübasyon basamakları orbital çalkalayıcıda yapıldı.

- TBST ile tekrar yıkama yapılan membranlardaki protein bantları, Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit (BioRad, CA, ABD) kullanılarak Kodak Gel Logic 1500 (Carestream Molecular Imaging, Newhaven, CT, ABD) görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

### **3.2.2.6 Yöntem 6b: Otofajinin Chloroquine diphosphate salt İnhibitörüyle Doğrulanması**

Otofagozom-lizozom füzyonunu engelleyerek etkisini gösteren Chloroquine diphosphate salt (CQ) otofaji inhibitörü olarak kullanıldı. İnhibitör (Sigma Aldrich, Almanya) lyofilize olarak satın alındı.

- CQ'nun en uygun konsantrasyonunu belirlemek için optimizasyon deneyleri CQ'un artan konsantrasyonları (1-100  $\mu$ M) ile hücreler 24 saat muamele edilerek yapıldı.

- Optimum inhibitör konsantrasyonu ile hücreler 2 saat ön muameleye maruz bırakıldı.

- Aynı hücrelere, 2 saatlik inhibitörle muamele sonunda THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları uygulandı.



- 24. saatte THZ'in otofajiyi tetikleyip tetiklemediği WB yöntemi ile uygun antikolar kullanılarak araştırıldı.

### **3.2.2.6 Yöntem 6c: Otofajik Vakuollerin Monodansylcadaverine (MDC) Boyasıyla Görüntülenmesi**

Otofajik vakuollerin görüntülenmesi için Monodansylcadaverine boyası DMSO'da çözülerek 149 mM'lık ana stok hazırlandı.

- Hücreler 96 kuyucuklu mikro plakalara  $10^4$  sayıda ekilerek THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ile 24 saat muamele edildi.

- İlaç ve besiyeri kuyucuklardan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücreler, 3 mM Monodansylcadaverine (MDC) boyası (Sigma Aldrich, Almanya) ile boyanarak inkübatörde (37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de) 10 dk inkübasyona bırakıldı.

- Otofajik vakuoller floresan mikroskopunda görüntülendi (Leica,  $\lambda_{ex}$  338 nm,  $\lambda_{em}$  500 nm).

### **3.2.3 Thioridazine'in Epitelyal-Mezenkimal Geçişteki Rolünün Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

THZ'nin epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) rol alıp almadığı, invazyon, migrasyon deneyleri ve western blot yöntemiyle araştırıldı.

#### **3.2.3.1 Araştırma Sorusu 7: Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rolü var mı?**

##### **3.2.3.1 Yöntem 7a: İnvazyon Deneyi/Scratch Deneyi**

THZ ile muamele edilen CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre kültürlerinin invazyon potansiyeli scratch assay tekniğiyle belirlendi.

- Altı kuyucuklu plakalara  $5 \times 10^5$  sayıda ekilen hücrelerin, plaka tabanını %100 olarak kaplayıp kaplamadığı mikroskopta kontrol edildi.

- Plakalardaki besiyerleri dökülerek 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla kuyucuklarda tutunmuş olan hücrelerin ortasından çizim işlemi yapıldı.

- Çizilen kuyucuklar 500 µl PBS ile hafifçe yıkandı.

- Çizimden hemen sonra (0. saat) faz-kontrast mikroskopta görüntüleme yapıldı.

- Daha sonra THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile muamele edilen kuyucuklar, 24. saat sonunda inverted ışık mikroskobunda tekrar görüntülendi.

### **3.2.3.1 Yöntem 7b: Migrasyon Deneyi**

Migrasyon potansiyeli "CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion AssayKit (8 µm size, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, ABD)" ile ölçüldü.

-Hücreler, kitin özel 24'lük transfer plakalarına (iç içe geçmiş üst ve alt kuyucuktan oluşan) 10<sup>5</sup> olacak şekilde ve serum-free besiyeri içinde plakanın üst kuyucuğuna ekildi.

-Alttaki kuyucuklara da sadece %10 FBS ihtiva eden besiyeri eklendi.

-24 saat inkübe edilen hücrelerden alttaki kuyucuğa göç etmemiş olanlar uzaklaştırıldı, göç ederek alttaki kuyucuğa geçmiş olanlar ise boyanarak 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

-Her deney üç tekrarlı yapılarak ortalama absorbans değerleri üzerinden analiz edildi.

### **3.2.3.1 Yöntem 7c: Immunositokimya**

- Hücreler beş dk süresince iki defa Fosfat Buffer Salin (PBS) ile yıkandı. PBS ile hazırlanan %4'lük paraformaldehitte 30 dk fikse edildi ve 3 kez 5'er dk PBS ile tekrar yıkandı.

- Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için distile suyla hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitle (Sigma, USA) 10 dk muamele edildi.

-Üç kez 5'er dk PBS ile yıkandı ve 15 dk Tritonix ile muamele edildi.

-Üç kez 5'er dk PBS ile yıkandı ve blok solüsyonu (non-immün serum) (Invitrogen, ABD) eklenerek 1 saat bekletildi.

-Serumun fazlası uzaklaştırıldıktan sonra örnekler uygun şekilde dilüe edilmiş primer antikorlarla muamele edilip kapalı ve nemli kutuda 1 gece +4<sup>0</sup>C'de bekletildi.

-Üç kez 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra biotinle işaretlenmiş sekonder antikorla (Invitrogen, USA) 30 dk muamele edildi.

-Üç kez 5'er dk PBS ile yıkandıktan sonra 30 dk streptavidinle işaretli sekonder antikorla (Invitrogen, ABD) muamele edildi.

-Ardından üç kez 5'er dk PBS ile yıkanarak Diaminobenzidine (DAB) (Invitrogen, ABD) ile muamele edildiler.

- Mikroskopta renk değişimi gözleninceye kadar inkübe edildi.

- Yeterli boyanma görüldüğünde 5 dk PBS ile sonrasında da 15 dk distile su ile yıkandı.

- Karşıt boyama 1 dk süresince Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Mounting medium ile kapatılıp mikroskopta görüntüleme yapıldı.

### **3.2.3.2 Western Blot Yöntemi**

Otofajik belirteçlerin ölçülmesinde kullanılan Western blot protokolünün aynısı epitelial-mezenkimal belirteçler ve GSK3-β Snail yolağın rol alan proteinler için de uygulandı.

**Tablo 3.2.** Western Blot yönteminde kullanılan tüm antikorlar

<b>Katalog No</b>	<b>Antikor Adı</b>	<b>Host and Clonity</b>	<b>kDa</b>	<b>Dilüsyon oranı</b>
ab8227	beta Actin	Rabbit polyclonal	42	1/1000-1/5000
ab56416	SQSTM1/p62	Mouse monoclonal	75	1 - 5 µg/ml
ab58610	LC3A/B	Rabbit polyclonal	14-16	0.5 - 2 µg/ml
ab108327	APG5L/ATG5	Rabbit monoclonal	32	1/1000 - 1/10000
ab51031	Beclin	Rabbit monoclonal	52	1-5000
ab76055	E Cadherin	Mouse monoclonal	97	1/1000
ab668	Cytokeratin 18	Mouse monoclonal	45	Deney şartlarına bağlı dilüsyon
ab32572	β-Catenin	Rabbit monoclonal	92	1/5000 - 1/10000
ab98952	N Cadherin	Mouse monoclonal	100	1/500 - 1/2000
ab8978	Vimentin	Mouse monoclonal	57	1/100 - 1/1000
ab6328	Fibronectin	Mouse monoclonal	250	1/400
ab32391	GSK3 beta	Rabbit monoclonal	46	1/5000 - 1/10000
ab75814	GSK3 beta (phospho S9)	Rabbit monoclonal	47	1/10000 - 1/2000

ab63568	SNAIL + SLUG (phospho S246)	Rabbit polyclonal	26-29	1/500 - 1/1000
ab78105	SNAIL + SLUG antibody	Mouse monoclonal	29	Deney şartlarına bağlı dilüsyon
ab6789	Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG - H&L (HRP)		1/2000 - 1/10000
ab6721	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - H&L (HRP)		1/2000 - 1/20000

### 3.2.4 İstatistiksel Analiz

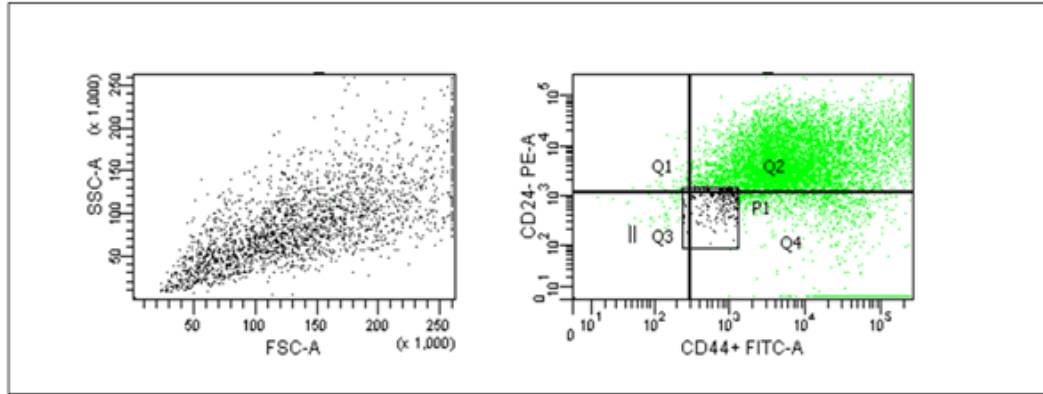
Thioridazine'in sitotoksik etkileri 96 kuyucuklu mikro plakalarda her bir konsantrasyon için en az üç kuyucukta çalışıldı ve her deney üç kez tekrar edildi. XTT testi ile elde edilen absorbans değerleri çok modlu mikro plaka okuyucu tarafından otomatik olarak ortalama absorbans ve  $\pm$  SD değerleri hesaplandı. Absorbans değerleri üzerinden formül yardımıyla hesaplanan sitotoksik yüzdeler, ilacın IC<sub>50</sub> değerini belirlemek için Calcsyn 2.1 (Biosoft, İngiltere) programına aktarıldı. Tüm grafikler Graphpad Prism 6.0 (La Jolla, CA, ABD) programında çizildi. Her üç hücre kültüründe (MCF-7, MDA-MB-231 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) uygulanan konsantrasyonlar arasındaki sitotoksik etkilerin anlamlı olup olmadığı tek yönlü ANOVA ile araştırıldı, ardından Dunnett's *t*-testleri kullanıldı.  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ardından  $p < 0.05$  bulunan değerler  $p < 0.001$  için de test edildi. Apoptozis deneylerine (Anneksin/7AAD yöntemi) ait veriler MuseSoft Analysis 1.4 yazılımında analiz edildi. Western blot bantları Image J v1.48 (NIH, Maryland, ABD) programında sayısallaştırıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

#### 4.1.1. MCF-7 Hücre Kültüründen İzole Edilen Meme Kanseri Kök Hücreleri

Akım sitometrisi yöntemi ile izole edilen meme kanseri kök hücrelerine ait grafikler Şekil 4.1’de verildi.  $CD44^+$  popülasyonu yoğun ve  $CD24^-$  olan hücreler meme kanseri kök hücresi olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. MCF-7 hücre kültüründen, meme kanseri kök hücrelerinin izolasyonu (Akım sitometrisinde  $CD44^+/CD24^-$  belirteçleri üzerinden ayrıştırma yöntemiyle)

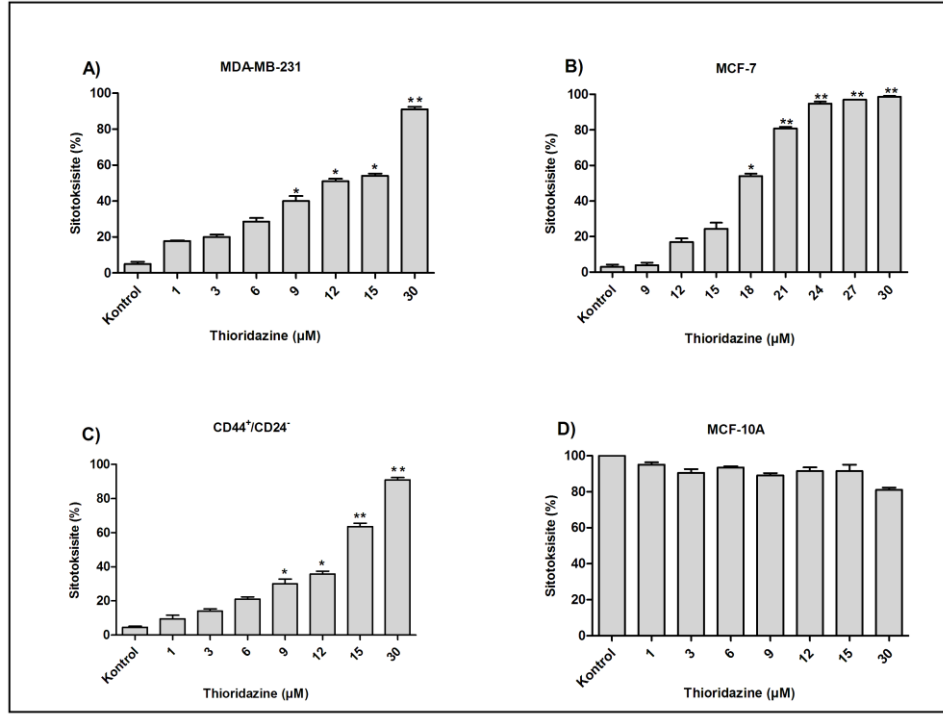
#### 4.1.2. Araştırma sorusu 1

THZ'nin meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkisi var mı?

#### Bulgu 1:

THZ'nin hücre canlılığı üzerine etkileri, insan normal (MCF-10A), meme kanseri (MCF-7, MDA-MB-231) ve meme kanseri kök hücre ( $CD44^+/CD24^-$ ) kültürlerinde, artan konsantrasyon (1-100  $\mu$ M) ve zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak ölçüldü. Geniş konsantrasyon aralığında (1-100  $\mu$ M) yapılan deneylerin

sonuçları değerlendirilip, konsantrasyon aralığı 1-30  $\mu\text{M}$ 'a daraltılarak sitotoksosite deneyleri tekrarlandı. THZ ile muamele edilen hücre kültürlerinde artan zaman aralıklarından (24., 48. ve 72. saat) istatistiksel olarak anlamlı ve en etkin sonuç 24. saatte elde edildi. MCF-10A, MDA-MB-231 ve  $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$  hücre kültürlerinde THZ'nin 1-30  $\mu\text{M}$  arasındaki konsantrasyonları çalışılırken, MCF-7 hücre kültüründe ise 9-30  $\mu\text{M}$  aralığındaki konsantrasyonlar çalışıldı (Şekil 4.2).



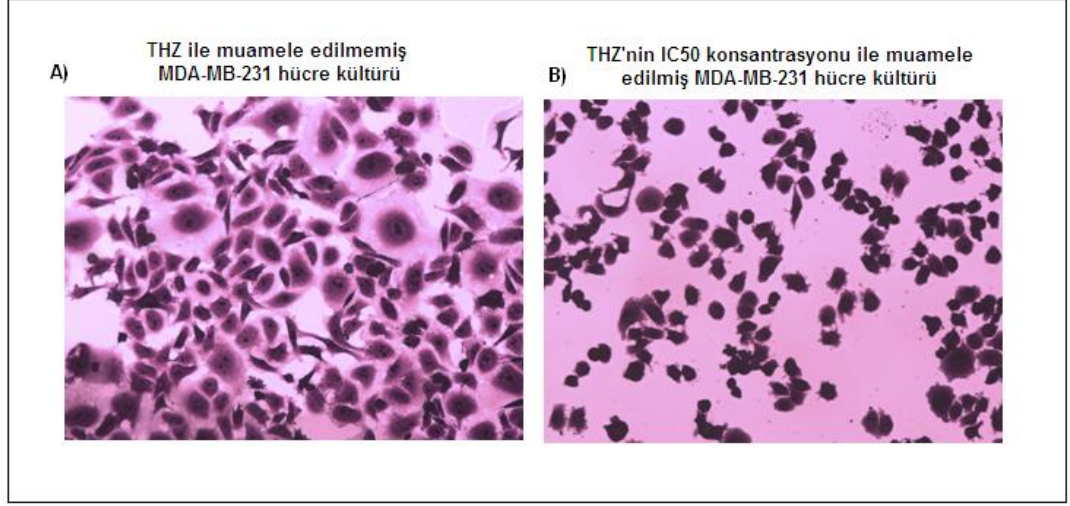
**Şekil 4.2.** THZ ile 24 saat muamele edilmiş **A)** MDA-MB-231, **B)** MCF-7, **C)**  $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$ , **D)** MCF-10A, hücre kültürlerinde sitotoksitenin XTT canlılık testi ile ölçülmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

THZ ile muamele edilen MCF-7, MDA-MB-231,  $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$  hücre kültürlerinde  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla, 16.4, 9, 18  $\mu\text{M}$  olarak Calcsyn (2.1) programında hesaplandı (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Model olarak kullanılan hücre kültürlerinde THZ'nin  $\text{IC}_{50}$  değerleri (Deneyler üç tekrarlı ve bağımsız olarak gerçekleştirildi, değerler  $\pm$  standart sapmalarıyla beraber sunuldu)

Hücre Kültürleri	$\text{IC}_{50}$ Değerleri (24. saat)
------------------	---------------------------------------

MCF-7	16.4 ± 1.8 µM
MDA-MB-231	9 ± 1.2 µM
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>	18.1 ± 2.3 µM



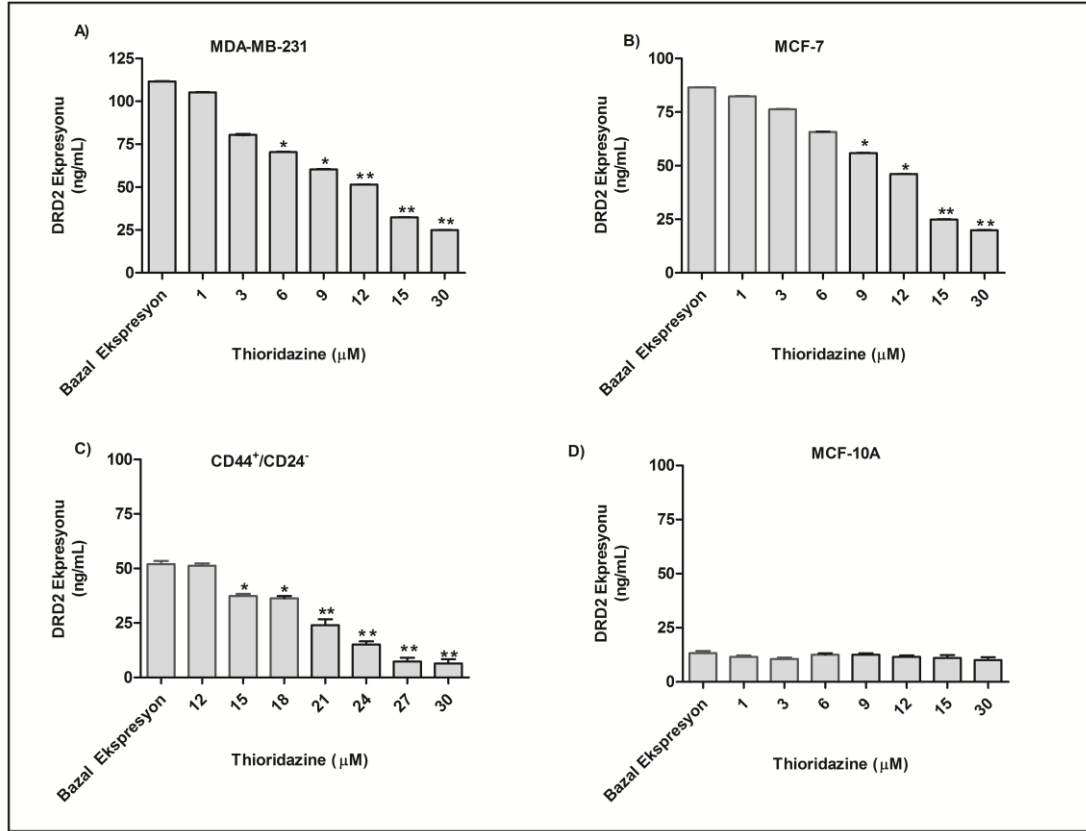
**Şekil 4.3.** A) THZ ile muamele edilmemiş (Kontrol grubu) MDA-MB-231 hücre kültürü. B) THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu (9 µM) ile 24 saat muamele edilmiş olan MDA-MB-231 hücre kültürü. Hücre kültürü crystal violet boyası ile boyanarak inverted faz kontrast mikroskopunda görüntülendi (Büyütme oranı:10X).

#### 4.1.3. Araştırma sorusu 2

Etkisinin büyük bir kısmını dopamin 2 reseptörü (DR2) üzerinden gösteren THZ ile muamele edilmiş hücre kültürlerinde DR2'nin ifade düzeyi nedir?

**Bulgu 2:** MCF-7, MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde bazal (THZ ile muamele edilmemiş) DR2 ifade düzeyi sırasıyla 86.8 ± 1.4 ng/mL, 111.6 ± 2 ng/mL, 52 ± 2.3 ng/mL olarak belirlendi. THZ'nin artan konsantrasyonları ile (1-30 µM) muamele edilen hücre kültürlerinde konsantrasyon arttıkça DR2 ifade düzeylerinin azaldığı gösterildi (Şekil 4.4).





**Şekil 4.4.** A) MDA-MB-231, B) MCF-7, C) CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> D) MCF-10A hücre kültürlerinde DR2'nin bazal ve THZ'nin artan konsantrasyonlarında ifade düzeylerinin ölçülmesi (24. saat) \*p<0.05, \*\*p<0.01

Belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin, hücre kültürlerindeki DR2 ifade düzeyi ile ilişkili olduğu gözlemlendi (Tablo 4.2). IC<sub>50</sub> değeri yüksek olan hücre kültürlerinde DR2'nin daha az sentezlendiği, IC<sub>50</sub> değeri düşük olan hücre kültürlerinde ise DR2 sentezinin daha fazla olduğu tespit edildi.

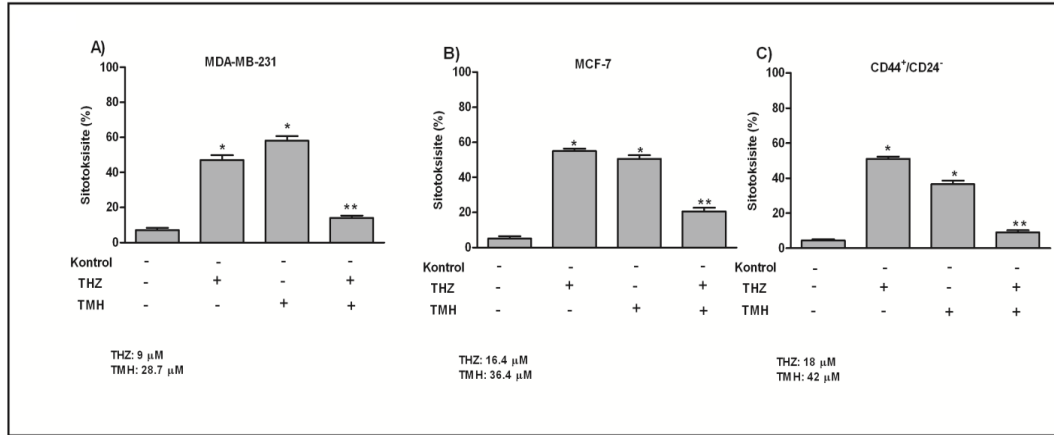
**Tablo 4.2.** Meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde DR2 ifade düzeylerinin IC<sub>50</sub> değerleri ile ilişkisinin gösterilmesi (24. saat)

Hücre Kültürleri	THZ IC <sub>50</sub> Değeri (24. saat)	DR2 miktarı (Bazal ifade düzeyi)
MCF-7	16.4 μM ± 1.8 μM	86.8 ± 1.4 ng/mL
MDA-MB-231	9 μM ± 1.2 μM	111.6 ± 2 ng/mL
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>	18.1 μM ± 2.3 μM	52 ± 2.3 ng/mL

#### 4.1.4. Araştırma sorusu 3

THZ'nin sitotoksik etkisinin göstermesinde rol alan dopamin aktivatör taşıyıcılar inhibe edildiğinde THZ'nin sitotoksik etkisinde nasıl bir değişim gözlenir?

**Bulgu 3:** Dopamin aktivatör taşıyıcılar inhibe edildiğinde THZ'nin gösterdiği sitotoksik etkiler XTT canlılık testi ile ölçüldü. Dopamin aktivatör taşıyıcı inhibitörü olan, Threo-methylphenidate hydrochloride (TMH) ile muamele edilen MCF-7, MDA-MB-231 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde inhibitörün en uygun konsantrasyonları, sırasıyla 36.4 µM, 28.7 µM, 42 µM olarak belirlendi. TMH ile 2 saat ön muamele edilen MCF-7, MDA-MB-231 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücrelerinde THZ'nin IC<sub>50</sub> uygulaması sonrası sitotoksik etkiler sırasıyla yüzde 20.5, 14, 9 olarak hesaplandı (Şekil 4.5). TMH inhibitörü kullanıldığında, THZ'nin tek başına gösterdiği sitotoksik etkiye nazaran inhibitör ile ön muamele yapılarak oluşturulan kombinasyonda sitotoksik etkisinin azaldığı belirlendi.



**Şekil 4.5.** Dopamin aktivatör transport inhibitörü (TMH: Threo-methylphenidate hydrochloride) ile 2 saat ön muamele edilen **A)** MDA-MB-231, **B)** MCF-7 ve **C)** CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde THZ'nin IC<sub>50</sub> uygulaması sonrası sitotoksik etkilerinin belirlenmesi (24. saat) \*p<0.05, \*\*p<0.01

#### 4.1.5. Araştırma sorusu 4

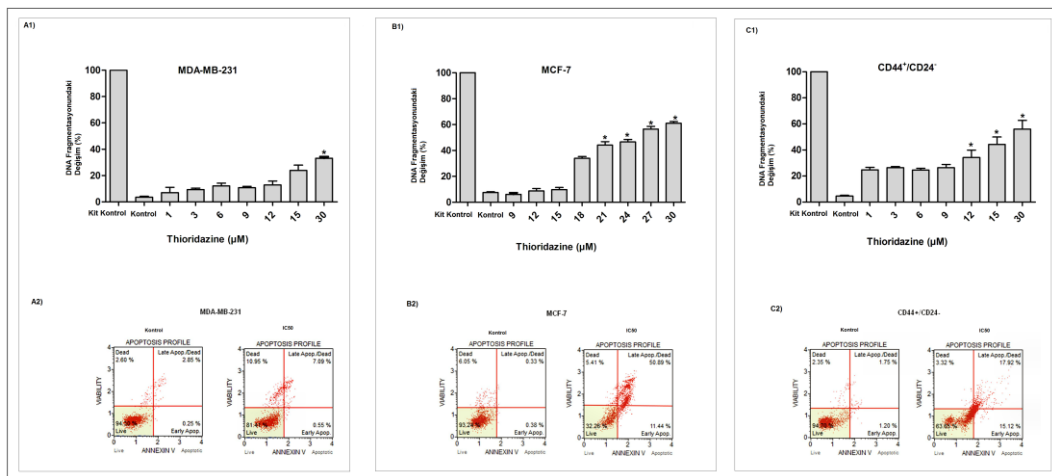
THZ sitotoksik etkisini hangi ölüm tipi üzerinden göstermektedir?

**Bulgu 4:** Sitotoksik etkinin neden olduğu hücre ölüm tipleri araştırılarak, model olarak çalışılan hücre kültürlerinde hangi çeşit hücre ölümünün gerçekleştiği belirlendi.

#### *Thioridazine'in Apoptozise Bağlı Sitotoksik Etkisi*

THZ'nin artan konsantrasyonlarında (1-30  $\mu$ M) gözlenen sitotoksik etkinin hangi hücre ölüm çeşiti ile tetiklendiği farklı yöntemlerle test edildi. Apoptozisin varlığının gösterilmesi ve bağımsız bir yöntemle doğrulanması için ELISA ve Anneksin/7AAD yöntemleri kullanıldı.

THZ ile 24 saat muamele edilen MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde apoptozisin belirteci olan DNA fragmentasyonu miktarı (ELISA yöntemi) konsantrasyona bağlı artış gösterdi. CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültüründe THZ'nin 12, 15 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonlarında DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla 34.1, 44.2, 56, MCF-7 hücre kültüründe THZ'nin 21, 24, 27 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonlarında DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla 44.1, 46.6, 56.5, ve 61 olarak hesaplandı ( $p < 0.05$ ). MDA-MB-231 hücre kültüründe IC<sub>50</sub> değerinin (9  $\mu$ M) üstünde olan 15 ve 30  $\mu$ M konsantrasyonlarda bile gözlenen DNA fragmentasyon yüzdeleri sırasıyla 23.8 ve 33.1 oldu (Şekil 4.6). Sonuç olarak, MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerindeki apoptozis yüzdeleri ile MDA-MB-231 hücre kültüründe saptanan apoptozis yüzdeleri anlamlı derecede farklıydı ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.6.** MDA-MB-231, MCF-7, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde iki farklı yöntemle [DNA Fragmentasyonu (A1), B1), C1)) ve Anneksin V/7AAD A2), B2), C2)] apoptozisin ölçümü (\*p<0.05).

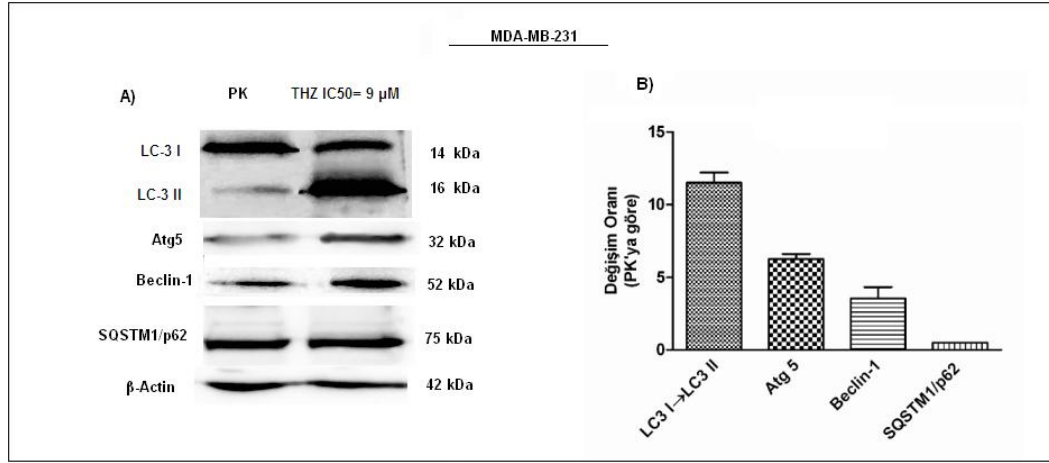
ELISA yöntemi ile gösterilen apoptotik hücre yüzdesi, Anneksin V/7AAD yöntemiyle de doğrulandı. Apoptozisin negatif kontrolü tüm kontrol gruplarında Anneksin V/7AAD yöntemiyle yüzde canlılık ölçülerek gerçekleştirildi. Tüm kontrol gruplarında (THZ ile muamele edilmemiş) canlılık %90'nın üzerinde ölçüldü. MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde toplam apoptotik hücre yüzdesi sırasıyla 39.7 ve 33 bulunurken, MDA-MB-231 hücre kültüründe yüzde 7 olarak belirlendi. Birbirinden bağımsız olan her iki yöntemde de MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde apoptozis gözlenirken, MDA-MB-231 hücre kültüründe apoptotik etki gözlenmedi. İlacın IC<sub>50</sub> konsantrasyonunun uygulanması sonucu görülen apoptotik hücre yüzdesi, Anneksin V/7AAD yöntemi ile doğrulanarak DNA fragmentasyon sonuçları ile paralel bulgular elde edildi (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** ELISA ve Annexin V/7AAD yöntemlerinden (toplam apoptotik hücre yüzdesi) elde edilen bulguların karşılaştırılması.

Hücre Kültürleri	ELISA	ANNEXIN V/7 AAD
MDA-MB-231	% 10	%7.64
MCF-7	%34	%39.72
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup>	%45	%33.03

#### ***Thioridazine'in Otofajiye Bağlı Sitotoksik Etkisi***

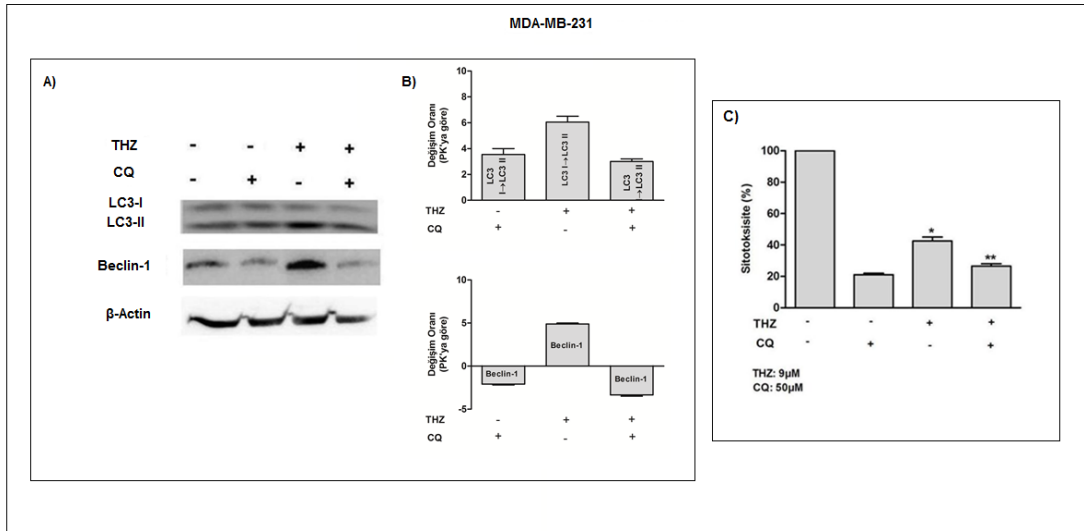
Apoptozisin saptanmadığı MDA-MB-231 hücre kültürü THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu (9µM) ile muamele edildiğinde, otofajik belirteçlerden LC-3 I'in LC-3 II'ye dönüşümünde (12 kat), Atg 5 (6.5 kat) ve Beclin-1 (4.1 kat) proteinlerinde artış gözlenirken, SQSTM1/p62 proteininde ise değişimin daha az olduğu tespit edildi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajik belirteçlerin A) Western Blot yöntemi ile gösterilmesi ve B) Western Blottaki protein miktarlarının değişim kat sayıları (PK: pozitif kontrol)

#### ***MDA-MB-231 Hücre Kültüründe, Otofajinin Doğrulanması***

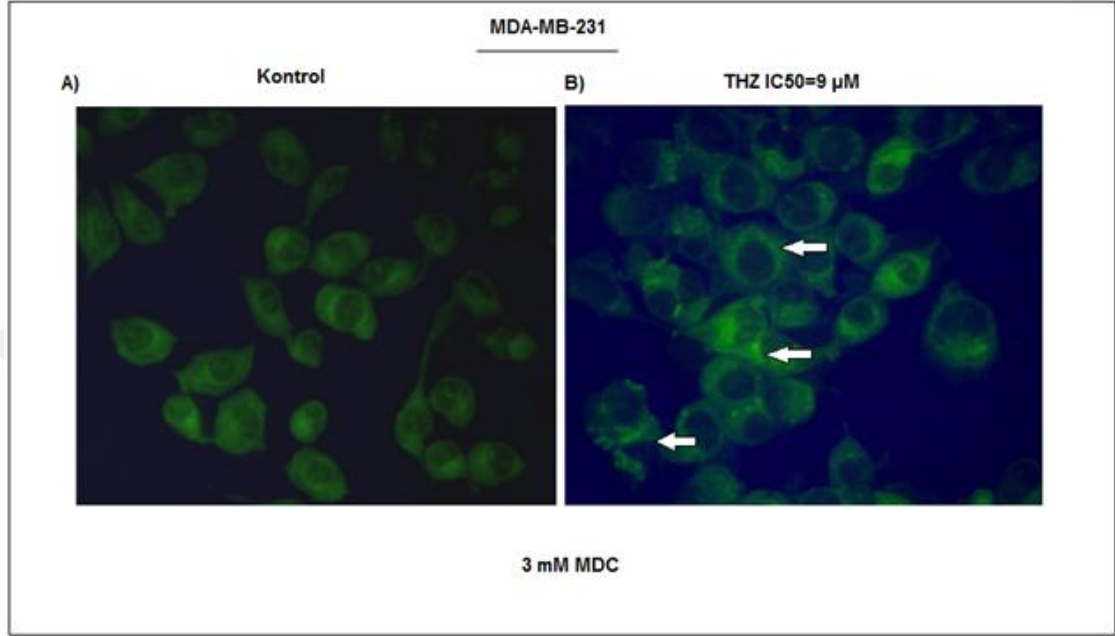
Otofajinin doğrulanması için LC3 I-II ve Beclin-1 proteinleri otofaji inhibitörü olan Chloroquine'in (CQ) 50 μM konsantrasyonu (tekli ve THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ile kombinasyonunda) ile inhibe edildiğinde, otofajik belirteçlerin ifade düzeylerinde azalma gözlemlendi (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** A) MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajinin, Chloroquine (CQ, 50μM) inhibitörü varlığında Western Blot yöntemiyle doğrulanması B) LC3I-II ve Beclin-1 ifade düzeylerindeki değişim oranları C) THZ ve CQ'nun (tekli ve kombinasyonda) sitotoksik etki yüzdesi (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

### ***Otofajik Vakuollerin Görüntülenmesi***

THZ'nin IC<sub>50</sub> değeri (9 µM) ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre kültüründe oluşan otofaji, otofajik vakuoller görüntülenerek de doğrulandı (Şekil 4.9).

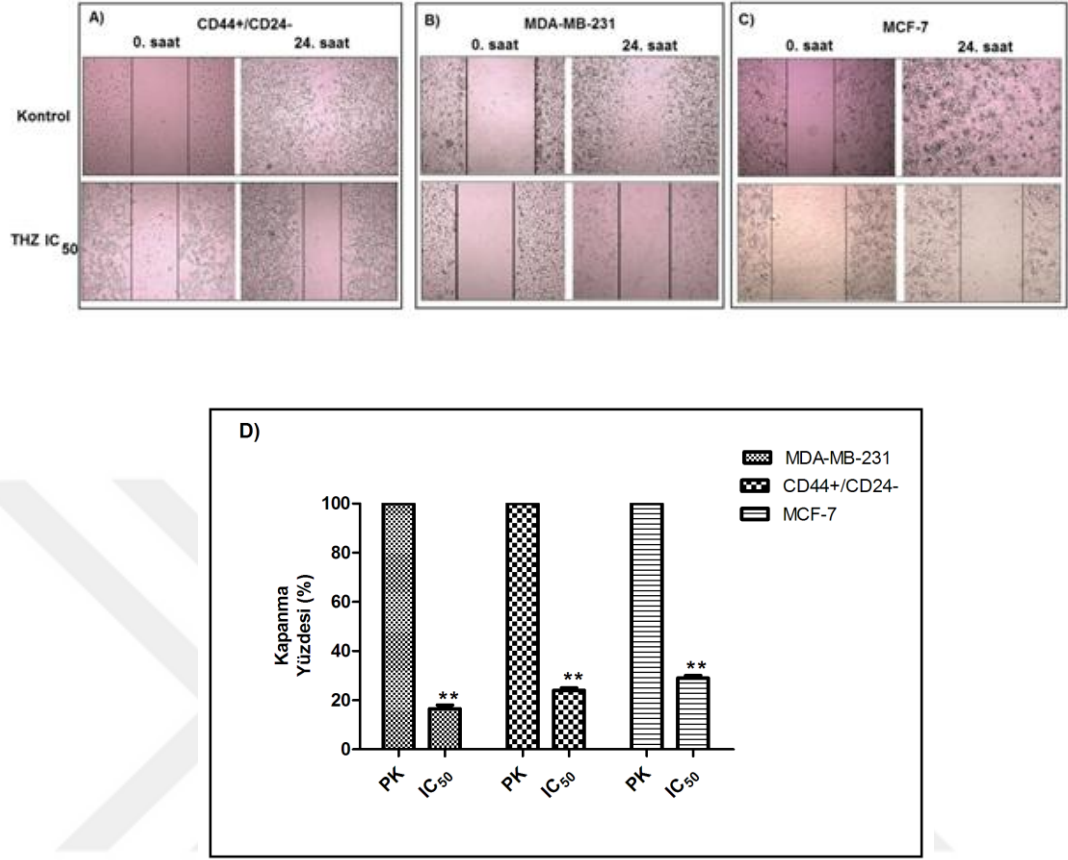


**Şekil 4.9.** THZ (9 µM, 24 saat) ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajik vakuollerin Monodansylcadaverine (MDC) floresan boyası ile gösterilmesi (Büyütme oranı:10X).

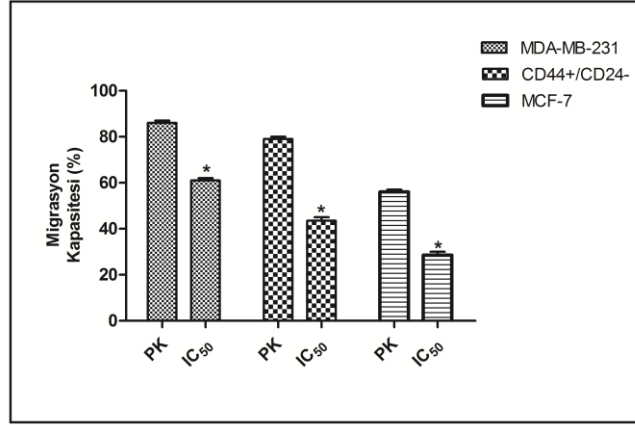
#### **4.1.6. Araştırma sorusu 5**

Thioridazine'nin epitelyal mezenkimal geçişte rolü var mıdır?

**Bulgu 5:** CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre kültürlerinde THZ varlığında invazyon potansiyeli belirlendi. MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MCF-7 hücre kültürlerinde, IC<sub>50</sub> konsantrasyonların ait kapanma yüzdeleri sırasıyla, 16.5, 24, 29 olarak hesaplandı (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** THZ'nin **A)** CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, **B)** MDA-MB-231 ve **C)** MCF-7 hücre kültürlerinde 24. saatteki invazyon potansiyelinin scratch assay yöntemiyle ölçülmesi (Kapanma yüzdeleri, mikroskop yazılımında yer alan ölçüm programı ile boşluklar arası mesafenin ölçülmesi ile hesaplandı. Kontrol hücreleri arasındaki mesafe sıfırıncı saatte ölçülerek %100 olarak kabul edildi) **D)** MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MCF-7 hücre kültürlerinin invazyon potansiyeli görüntülerinin yüzde değerleri (24. saat) \*\*p<0.001



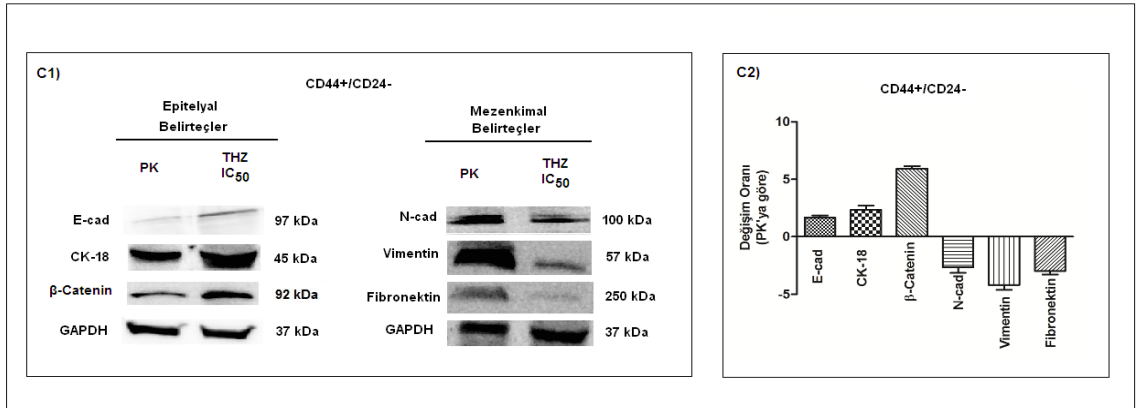
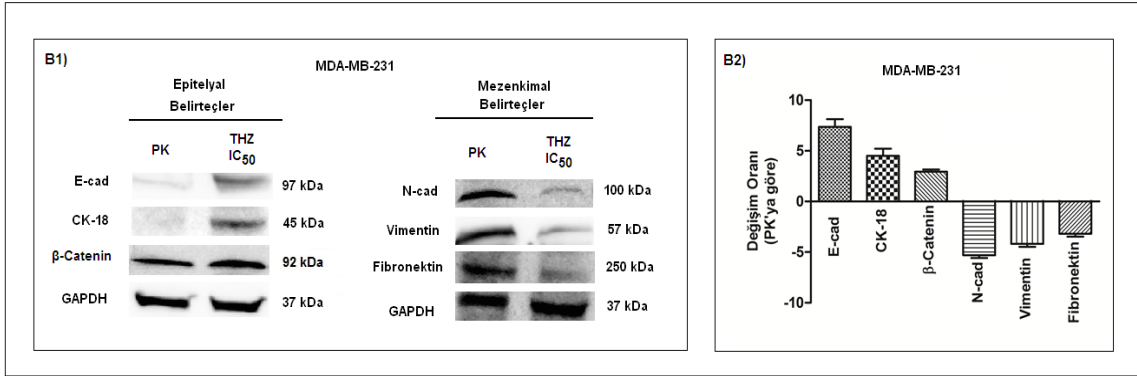
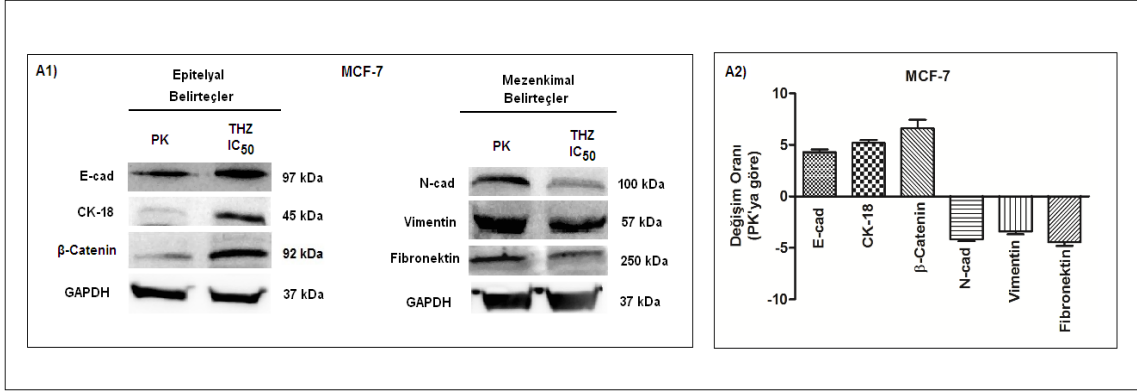
**Şekil 4.11.** THZ ile muamele edilen MDA-MB-231 (9 µM) , CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (18 µM) ve MCF-7 (16.4 µM) hücre kültürlerinin migrasyon potansiyelinin ölçülmesi (24. saat) \*p<0.05 (PK: pozitif kontrol)

Migrasyon kiti kullanılarak, migrasyon potansiyeli ölçülen hücre kültürleri THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile 24 saat süresince muamele edildiğinde; MDA-MB-231'in migrasyon potansiyelinin %86'dan %61'e, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>'in migrasyon potansiyelinin %79'dan %43.2'ye, MCF-7'nin migrasyon potansiyelinin %56'dan %28.5'e düştüğü gözlemlendi.

#### ***Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rol alan proteinler üzerindeki etkisi***

MCF-7 hücre kültürlerinde, E-cad (4.3 kat), CK-18 (5.2 kat), β-catenin (6.2 kat) artarken, N-cad (-4.1 kat), Vimentin (-3.4 kat), Fibronektin (-4.4 kat) azaldı (Şekil 13). MDA-MB-231 hücre kültürlerinde, E-cad (7.3 kat), CK-18 (4.5 kat), β-catenin (2.8 kat) artarken, N-cad (-5.3 kat), Vimentin (-4.2 kat), Fibronektin (-3.2 kat) azaldı (Şekil 14). CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde, E-cad (1.6 kat), CK-18 (2.3 kat), β-catenin (5.4 kat) artarken, N-cad (-2.6 kat), Vimentin (-4.2 kat), Fibronektin (-3 kat) azaldı (Şekil 4.12).





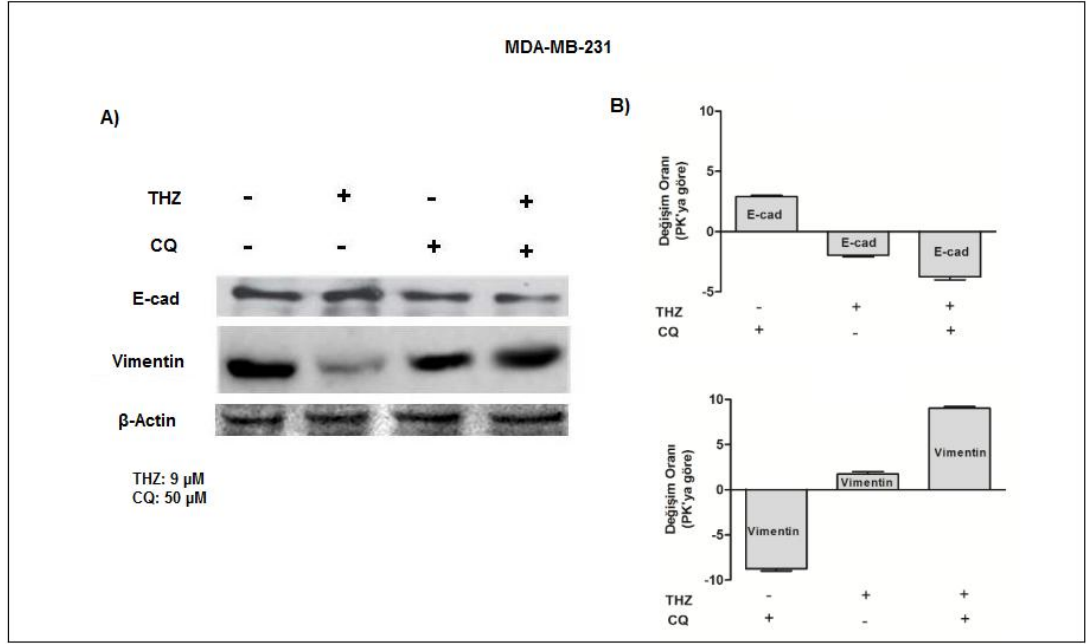
**Şekil 4.12.** THZ ile muamele edilen MCF-7 (16.4 $\mu$ M), MDA-MB-231 (9  $\mu$ M), CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (18  $\mu$ M), hücre kültürlerinde epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin Western blot ifade düzeyleri ve proteinlerin değişim oranları (24. saat). (**A1-A2**; MCF-7, **B1-B2**; MDA-MB-231, **C1-C2**; CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) (PK: pozitif kontrol)

#### 4.1.7. Araştırma sorusu 6

MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajinin epitelyal belirteçlerle olan ilişkisinin ortaya konması amacıyla, otofajik belirteçleri inhibe ettiğimizde epitelyal belirteçlerde ifade düzeyi nasıl değişmektedir?

**Bulgu 6:** MDA-MB-231 hücre kültürlerinde THZ'nin otofajiye bağlı sitotoksik etkisinin EMT belirteçleri ile ilişkisi araştırıldı.

THZ ve CQ (otofaji inhibitörü) ile beraber uygulandığında, epitelyal belirteçlerden E-cad'in ifade düzeyinin azaldığı mezenkimal belirteçlerden Vimentin'in ifade düzeyinin ise arttığı gözlemlendi (Şekil 4.13).

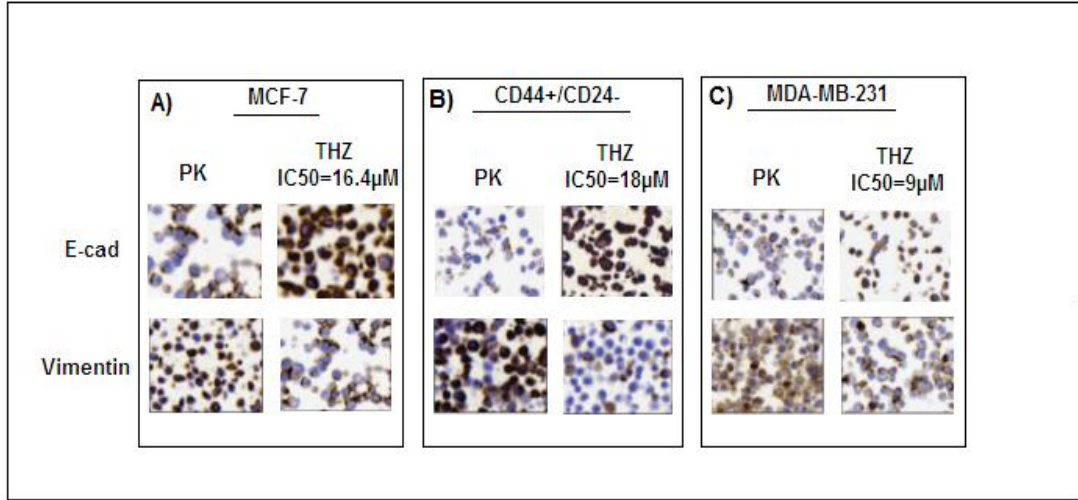


**Şekil 4.13.** A) THZ'nin IC<sub>50</sub> (9 $\mu$ M) konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen MDA-MB-231 hücre kültüründe otofaji inhibitörü, Chloroquine (CQ, 50 $\mu$ M), varlığında epitelyal-mezenkimal belirteçlerden E-cad ve Vimentin ifade düzeylerinin gösterilmesi. B) E-Cad ve Vimentin değişim oranları (24. saat).

#### *Epitelyal-mezenkimal geçişin immunositokimyasal yöntemle doğrulanması (E-cad ve Vimentin belirteçleri ile)*

Epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ifade düzeyleri, Western blot yöntemi ile belirlendikten sonra bağımsız bir yöntem olan immunositokimyasal boyama

yöntemi ile de doğruladığında sonuçların paralel olduğu görüldü. THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu uygulandığında, her üç hücre kültüründe de E-cad molekülü artış gösterirken, mezenkimal belirteç olan Vimentin molekülü azalış gösterdi (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen **A)** MCF-7 **B)** CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> **C)** MDA-MB-231 hücre kültürlerinde E-cad ve Vimentin moleküllerinin ifade düzeylerinin Immunositokimya yöntemi ile doğrulanması (24. saat). (PK: pozitif kontrol)

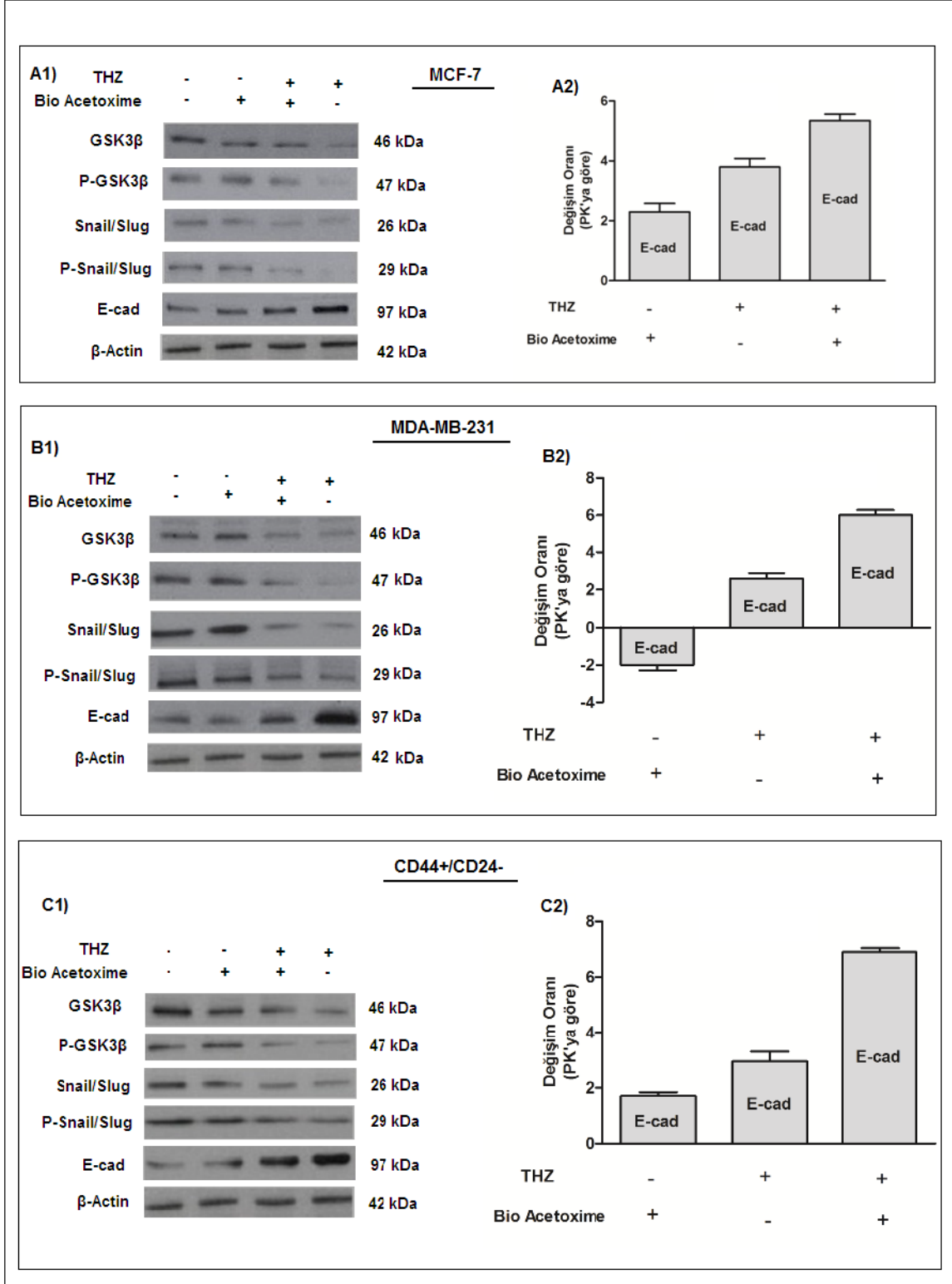
#### 4.1.8. Araştırma sorusu 7

EMT'de rol alan Snail'in Akt-GSK-3β yolağı üzerinden fosforilasyon / defosforilasyon durumu E-kaderin ifade düzeyini nasıl etkilemektedir?

**Bulgu 7:** Epitelyal-mezenkimal geçişi düzenleyen yolda görev alan moleküllerin THZ varlığındaki ifade düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü.

Yolağı düzenleyen moleküllerden; GSK-3β, P-GSK-3β, Snail/Slug, P-Snail/Slug, E-cad moleküllerinin ifade düzeyleri test edildi. Her üç hücre kültürüne de THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ve 50 μM Bio acetoxime (GSK-3β inhibitörü) tekli ve kombinasyon olarak uygulandı. MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MCF-7 hücre kültürlerinde THZ ve inhibitörün tekli uygulamalarına göre, kombinasyonda P-Snail molekülünün ifade düzeyinde azalma gözlenirken, E-cad ifade düzeyi arttı. MCF-7,

MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, hücre kültürlerinde E-cad ifade düzeyi, THZ ve Bio acetoxime kombinasyonunda kontrole göre, sırasıyla 5.2 kat, 7.3 kat, 8.1 kat artış gösterdi.



**Şekil 4.15.** THZ ile muamele edilen MCF-7 (16.4µM), MDA-MB-231 (9 µM), CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (18 µM), hücre kültürlerinde E-cad ifade düzeyini düzenleyen yolakta önemli rol oynayan moleküllerin THZ ve Bio-Acetoxime (50µM) varlığındaki ifade düzeylerinin Western blottaki ifade düzeyleri ve E-cad proteininin değişim oranı (24. saat). (**A1-A2**; MCF-7, **B1-B2**; MDA-MB-231, **C1-C2**; CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>)



## 4.2. Tartışma

Bu çalışma, THZ'nin gerçek hedefi olan psikotik hastalıkların tedavisinde kullanımının yanı sıra meme kanseri ve meme kanseri kök hücrelerindeki etkilerinin araştırılması üzerine kurgulandı. Heterojen bir hastalık olan meme kanserinin, in vitro koşullarda çalışılması için model olarak hücre kültürleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda meme kanserinin farklı özelliklerini temsil eden iki farklı hücre kültürü (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve bunların kök hücreleri (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) kullanıldı. Bu şekilde, THZ'nin etkileri, daha dirençli fenotipte olan meme kanseri kök hücrelerinde de araştırıldı.

Meme kanseri heterojen ve alt tiplere sahip bir hastalık olup, kadınlar arasındaki ölüm oranı yüksektir. Meme kanserinin tedavisinde, klinikte mevcut olan birçok ilaç kullanılmaktadır. Fakat eş zamanlı olarak ilaçlara kazanılan direnç ve hastalığın tekrar etmesi, yeni ilaç arayışlarına yönlendirmektedir [50]. İlaç geliştirme aşamaları oldukça maliyetli ve zaman alıcı olduğundan, ilaç geliştirenler klinikte kullanımda olan ilaçların mevcut hedefleri dışında başka hangi hastalıklarda etkili olduğuna yönelik araştırmalara yönelmişlerdir [51]. Uzun yıllar sadece antipsikotik özellikleri çalışılan THZ'nin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu çalışmalarda gösterilince, ilacın kanser üzerindeki etkilerinin daha detaylı olarak araştırılmasına karar verilmiştir.

Şizofreni, psikoz ve anksiyete gibi hastalıkların tedavisinde kullanımda olan birçok dopamin reseptör (DR) antagonisti ilaç mevcuttur. Dalton ve ark. yapmış oldukları çalışmada, DR antagonisti alan şizofren hastalarında rektum, kolon, prostat kanseri gibi kanserlerin görülme oranı DR antagonisti almayan hastalara nazaran daha az olduğunu gözlemişleridir [52]. Klinik bulgular içeren bu çalışma, DR antagonistlerinin kanser tedavisinde de etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Literatür taraması yapıldığında, dopamin antagonistleri kullanılarak, dopamin reseptörleri üzerinden kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden birçok çalışma bulunmaktadır [53]. Sutton ve ark. THZ'nin sitotoksik etkisinin dopamin reseptörü bağımlı ya da bağımsız olabileceğini göstermiştir [54].

Literatürde dopamin 2 antagonistlerinin hücre ölümünü uyardığına dair çalışmalar mevcuttur. Yan ve ark. dopamin antagonisti olan Raclopride'in yenidoğan sıçan ventiküler miyosit hücrelerinde otofajiyi uyaran belirteçler üzerinden otofajik hücre ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir [55]. Shin ve ark. ise dopamin 2

antagonisti olan Sertindole'un nöroblastoma hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin artmasına neden olarak otofajiyi uyardığını ifade etmişlerdir [56].

Çalışmamızda, her üç hücre kültüründe de dopamin reseptör ifade düzeyleri ölçüldü. Elde edilen bulguların, THZ'nin sitotoksik etkisi ile doğru orantılı olduğu gözlemlendi. Özellikle dopamin 2 reseptör miktarı yüksek olan hücre kültürlerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) THZ daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik olarak etkili olurken, dopamin reseptör 2 miktarının daha az ifade edildiği hücre kültürlerinde (CD44+/CD24-) THZ'nin IC<sub>50</sub> değeri daha yüksek bulundu. (Şekil 4.2) (Şekil 4.4.) Bu gözlem, THZ'nin sitotoksik etkisinin dopamin reseptör 2 ilişkili olabileceğine dair veriler sundu.

Literatürde, MCF-7, GBM8401, U87MG, AML-OCI2 ve AML-OCI3 gibi çok çeşitli kanser türlerine ait olana hücre kültürlerinin dopamin reseptörü ifade ettikleri gösterilmiştir [17, 57, 58].

Literatürdeki bu sonuçlarla uyumlu olan verilerimiz, THZ'nin meme kanseri ve meme kanseri kök hücre kültürlerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bunun yanı sıra normal meme epitelyal hücre kültürü olan MCF-10A hücrelerinde THZ sitotoksik etki göstermedi. Byun ve ark. da MCF-10A ve HOSE-E6E7 (normal ovaryum epitelyum hücreleri) hücre kültürlerinde THZ'nin 25 µM konsantrasyonuna kadar sitotoksik etki gözlememişlerdir [59]. THZ'nin MCF-10A gibi normal meme epitelyal hücrelerinde sitotoksik etki göstermemesinin bir nedeni dopamin reseptör 2 ifade düzeyinin (12.6 ng/mL) oldukça düşük olması ve THZ'nin hücre içine alımını inhibe etmesi olabilir. THZ'nin artan konsantrasyonlarına rağmen MCF-10A hücrelerinde DR2 ifade düzeyinin değişmediği Şekil 4.4'te gösterildi. İkinci nedeni ise; membran transporterların normal epitelyal meme hücrelerinde ve kanser hücrelerinde yapısal farklılık göstermesi olabilir. Buradan çıkarılan bir başka sonuç ise; THZ'nin sitotoksik etkisinin DR2 ve dopamin sinyaline ihtiyaç duymasındır.

Dopamin aktivatör taşıyıcılar (DAT), dopamin konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev alan transmembran proteinlerdir. DAT'ların dağılımı ve ifade düzeyi birçok hastalığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. DAT'lar dopamin reseptörleri ile nörotransmitter olan dopamin arasında iletişimi sağlayan önemli moleküllerdir [60]. Literatürde DAT'ların biyobelirteç olarak kullanıldığı çalışmalar vardır. Schrödter ve ark. metastatik böbrek kanseri hastalarında SLC6A3 isimli dopamin transporterını prognostik belirteç olarak tanımlamışlardır [61]. THZ, meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisini göstermek için dopamin sinyaline

ihtiyaç duymaktadır. DAT'lar dopamin ve dopamin reseptörleri arasında iletişim sağlayan moleküllerdir. Bu sinyal, dopamin DAT inhibitörü kullanılarak inhibe edildiğinde THZ'nin sitotoksik etkisinde azalma olduğunu gözlemledik (Şekil 4.5). Bu sonuç bize; THZ'nin sitotoksik etkisinin dopamin sinyali yokluğunda azaldığını kanıtladı. Dopamin reseptörü 2 ile dopamin sinyali arasındaki iletimi sağlayan dopamin aktivatör taşıyıcılar inhibe (TMH inhibitörü ile) edildiğinde THZ'nin sitotoksik etkisinin azalması, THZ'nin bu yolu kullandığının kanıtıdır. Dopamin sinyalinin TMH ile inhibe edilmesi, DR2 ifade düzeyini etkilememektedir. Bu sinyalin inhibe edilmesi, THZ'nin sitotoksik etkisini değiştirdiği gözlemlendi.

Gil-Ad ve ark.'nın fare melanom hücre kültüründe phenothiazine sınıfına ait çeşitli ilaçların etkisini (Perphenazine, Thioridazine, Fluphenazine, Chlorpromazine gibi) çalışmışlardır. Phenothiazine sınıfına ait ilaçlar bu hücre kültüründe apoptozis kaynaklı hücre ölümüne yol açmıştır. Bu ilaçların içinde en etkin performansı THZ göstermiştir [23]. Çalışmamızda THZ, MCF-7 ve CD44+/CD24- meme kanseri kök hücrelerinde apoptotik etki gösterirken MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik etki gösterdi. CD44+/CD24- meme kanseri kök hücreleri, MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında ise, meme kanseri kök hücrelerinin apoptozise daha dirençli olduğu bulundu. Bunun nedeni kanser kök hücrelerinin heterojen yapıda olup, reseptör ifade düzeylerinin kanser hücrelerine nazaran daha fazla değişkenlik göstermesi olabilir.

Apoptozis bağımsız iki yöntemle (ELISA ve Anneksin/7AAD yöntemleri) doğrulandı. Her iki yöntemden elde edilen bulgular paraleldi. Kang ve ark. çalışmalarında serviks ve endometrial kanser hücrelerinde, THZ'nin neden olduğu apoptotik etkinin PI3K/Akt yolağının inhibisyonu ile ortaya çıktığını göstermişlerdir [24]. Çalışmamızda THZ apoptotik etkisini proapoptotik mekanizmalar üzerinden ve PI3K/Akt yolağının inhibisyonu ile göstermiş olduğunu düşündürmektedir.

THZ ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen sitotoksik etkinin neden olduğu ölüm tipi otofaji oldu. Otofagozomların oluşmasında başrol oynayan LC-3 I'in LC-3 II'ye dönüşümünü Western blot yöntemi ile MDA-MB-231 hücrelerinde göstermemiz, otofajinin en iyi kanıtlarından biri oldu. Atg 5 ve Beclin-1 gibi otofajiyi indükleyen moleküllerde de artış gözlemlendi. SQSTM1/p62 degradasyon için ubiquitınlenen proteinlerin taşınmasında görev alan kargo proteindir [62]. Bulgularımızda SQSTM1/p62 ifade düzeyinin, otofajiyi uyaran diğer proteinlere (LC3 I-II, Beclin-1, Atg5) göre az değiştiği gözlemlendi.



THZ'nin sitotoksik etkisinin otofaji ile bağlantılı olup olmadığını araştırmak için, otofaji inhibitörü (Chloroquine) kullanarak, otofajik belirteçler inhibe edildi. Chloroquine, otofagozom ve lizozomların füzyonunu inhibe ederek etkisini gösterir [63]. Otofajinin doğrulaması, Chloroquine inhibitörü ile yapıldı ve otofajiyi indükleyen LC3 I-II, Beclin-1 belirteçlerinin ifadesinde THZ'nin tek başına etkisine nazaran daha az azalma gözlemlendi.

Otofajik belirteçlerin ve sitotoksik etkisinin THZ'nin tekli etkisine göre daha az azalma göstermesi, sitotoksik etkinin otofaji üzerinden olduğunu kanıtladı (Şekil 4.8).

Araştırma sorularımızdan biri olan ve çalışmamızın ikinci büyük ayağını oluşturan; THZ'nin epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) etkisi/rolü nedir sorusuydu. EMT, epitelyal fenotipin kaybolarak mezenkimal özellik kazanmasıdır. Bu özellik, invazyon, metastaz ve hastalığın seyri (progrezyon) ile ilişkilidir. Kanserde EMT'nin düzenleyici moleküllerinden olan Snail/Slug, Twist, GSK3- $\beta$ , E-kaderin gibi proteinlerin ifade düzeyleri değişerek sinyalin bozulmasına neden olmaktadır [64]. Apiko-bazal polarizasyonun, hücre içi sıkı bağlantıların ve adezyonu sağlayan yapının bozulması, sitoskelette meydana gelen değişimler, sitokeratin ifadesinin azalması buna karşın vimentin ifadesinin artması hücrelere hareket ve invazyon yeteneği kazandırmaktadır [65, 66, 67].

THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarını uyguladığımız her üç hücre kültüründe invazyon ve migrasyon kapasitelerinin azaldığı belirlendi. İnvazyon yüzdeleri hesapladığımızda invazyonun yüzde 100'den MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MCF-7 hücre kültürlerinde, sırasıyla yüzde 16.5, 24, 29'a düştüğü belirlendi. Bu sonuçların doğrulandığının göstergesi ise; E-cad ifade düzeyinin sırasıyla MCF-7, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde THZ varlığında artmış olmasıydı. THZ uygulandığında E-cad ifade düzeyinin en çok arttığı MCF-7 hücre kültüründe aynı zamanda invazyonun azalma yüzdesi de yüksek bulundu. İnvazyon kapasitesi ve migrasyon potansiyeli sonuçlarına göre; MDA-MB-231 hücreleri agresif davranış gösterirken, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MCF-7 hücrelerinde bu agresifliğin daha az olduğu tespit edildi.

THZ ile muamele edilen hücre kültürlerinde epitelyal belirteçlerden olan E-cad (E-kaderin), CK-18 (Sitokeratin-18),  $\beta$ -catenin moleküllerinde artış gözlerinken, mezenkimal belirteçlerde N-cad (N-kaderin), Vimentin, Fibronektin azalma gözlemlendi. Hücre kültürlerinin farklı karakteristik özellikleri nedeniyle farklı oranlarda

değişim gösteren belirteçler, meme kanserinin heterojenitesini ortaya koydu. Model olarak çalıştığımız hücre kültürlerinden triple negatif olarak sınıflandırılan MDA-MB-231 hücreleri agresif fenotipe sahiptir. ER (-), PR(-) ve HER2 (-) olan ve düşük claudin ifadesi olan bu hücreler EMT'ye daha yatkındır. Birçok çalışmada da düşük claudin ifadesi olan hücre kültürlerinin mezenkimal fenotipe daha kolay geçtiği gösterilmiştir [68, 69]. İnvazyon potansiyelini ölçtüğümüz scratch assay yönteminde IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarına ait kapanma yüzdesi en çok MCF-7 (%29) en az ise MDA-MB-231 (%16.5) hücre kültüründe gözlemlendi. Meme kanserini modelleyen hücre kültürlerinin sınıflandırılma kriterine göre Luminal A olan ve hücre-hücre adezyon moleküllerinin ifade düzeylerinin yüksek olduğu MCF-7 hücre kültürü scratch assay sonucumuzu doğruladı. Daha invaziv olan MDA-MB-231 hücrelerinde ise, kapanma yüzdesinin düşük bulunması literatürde yapılan sınıflandırmaya uygun bulgular elde ettiğimizi gösterdi [70, 71].

MDA-MB-231 hücre kültüründe, gözlenen otofajinin EMT ile ilişkili olup olmadığı, otofaji inhibitörü (CQ) varlığında E-cad ve Vimentin proteinlerinin ifade düzeyleri ölçülerek belirlendi. E-cad hücre-hücre adezyonunun bütünlüğünü sağlayan önemli bir moleküldür [72].

Adezyon molekülleri arasındaki sinyalin sağlıklı bir şekilde devamının sağlanması E-cad tarafından kontrol edilir. Otofaji uyarıldığında, ATP miktarı düşer, AMPK Ulk1 proteinini fosforiller ve aynı zamanda otofajinin inhibitörü olan mTOR'u inaktif duruma getirir. Membran bağımlı E-cad molekülünün lokalizasyonunun değişmesi AMPK sinyalini artırır ve otofaji gerçekleşir [73]. MDA-MB-231 hücre kültüründe otofajiyi uyaran THZ tek başına uygulandığında E-cad ifade düzeyini arttırırken, hücreler otofaji inhibitörü CQ ile ön muameleye bırakılarak THZ tekrar uygulandığında E-cad ifade düzeyi azalmaktadır. Bu bulgu bize E-cad ifade düzeyi azalınca otofajinin arttığını ve EMT ile otofaji arasındaki bağlantıyı gösterdi.

EMT ve MET (mezenkimal-epitelyal geçiş) olaylarının her ikisi de E-cad bağımlıdır ve hücreler E-cad ifadesinin azalması ile EMT'ye yatkın hale gelirler. E-cad ifade düzeyinin azalması, mezenkimal belirteçlerden olan N-cad'ın ifade düzeyinin artmasına neden olur. E-cad molekülü iki nedenden dolayı tümör baskılayıcı olarak düşünülebilir. Bu nedenlerden birincisi; promotor bölgesinin hipermetilasyon sonucu transkripsiyonel düzeyde sessizleşmesi, ikincisi ise; hücrelerde yeniden sentezlenmeye başladığında tümörün agresifliğini azaltmasıdır

[74]. Promotor bölgesinin hipermetilasyon sonucu transkripsiyonel düzeyde sessizleşmesi aynı zamanda, molekülü düzenleyen yolda transkripsiyon faktörü olarak rol alan Snail'in fosforillenmesine neden olur. Snail molekülünün fosforillenmesi E-cad ifade düzeyinin baskılanması anlamına gelmektedir [75]. Amacımız THZ varlığında Snail fosforilasyonunu engelleyerek, Snail'in sebep olduğu E-cad baskılamasının önüne geçmektir.

EMT'de önemli bir yeri olan Snail, kinaz protein olan GSK-3 $\beta$  (Glikojen Sentaz Kinaz 3 $\beta$ ) tarafından kontrol edilir. Snail'in fosforile/defosforile durumunun belirlenmesinde bu protein kritik bir rol oynar. Snail'in fosforile edildiği iki motifi vardır; GSK-3 $\beta$  tarafından ilk motifinden fosforilendiğinde degradasyona uğrarken, ikinci motiften fosforillenmesi Snail'in E-cad'i baskılamasına neden olmaktadır [76].

Çalışmamızda Bio acetoxime (GSK-3 $\beta$  inhibitörü) kullanılarak, Snail'in fosforillenmesi inhibe edildi. Western blot sonuçlarında da elde ettiğimiz üzere P-Snail'in ifade düzeyi azaldı. İnhibitör ile THZ eş zamanlı olarak uygulandığında ise P-Snail'in ifade düzeyinin daha da azaldığı gözlemlendi. Buna bağlı olarak, THZ'nin inhibitör ile eş zamanlı uygulandığında gösterdiği etki, THZ'nin tek başına E-cad üzerinde gösterdiği etkiye göre E-cad ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. Bu sonuç bize THZ'nin EMT üzerindeki etkisinde GSK-3 $\beta$  yolağının rol aldığını gösterdi. Transkripsiyon faktörü olan ve E-cad'i baskılayan Snail'in ifade düzeyinin azalması sonucu her üç hücre kültüründe de E-cad ifade düzeyi arttı.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında planlanan iş paketlerinden elde edilen sonuçlar;

- THZ'nin hücre canlılığı üzerine etkileri, insan normal (MCF-10A), meme kanseri (MCF-7, MDA-MB-231) ve meme kanseri kök hücre (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) kültürlerinde, artan konsantrasyon (1-30 µM) ve zamana (24., 48. ve 72. saat) bağlı olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı ve en etkin sonuç 24. saatte elde edildi.
- THZ ile muamele edilen MCF-7, MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla, 16.4, 9, 18 µM olarak bulundu.
- THZ'nin artan konsantrasyonları ile (1-30 µM) muamele edilen hücre kültürlerinde konsantrasyon arttıkça DR2 ifade düzeylerinin azaldığı gösterildi.
- Belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin, hücre kültürlerindeki DR2 ifade düzeyi ile ilişkili olduğu gözlemlendi. IC<sub>50</sub> değeri yüksek olan hücre kültürlerinde DR2'nin daha az sentezlendiği, IC<sub>50</sub> değeri düşük olan hücre kültürlerinde ise DR2 sentezinin daha fazla olduğu tespit edildi.
- Dopamin aktivatör taşıyıcı inhibitörü olan, Threo-methylphenidate hydrochloride (TMH) ile muamele edilen hücrelerde THZ'nin tek başına gösterdiği sitotoksik etkiye nazaran inhibitör ile ön muamele yapılarak oluşturulan kombinasyonda sitotoksik etkisinin azaldığı belirlendi.
- THZ ile 24 saat muamele edilen MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde apoptozisin belirteci olan DNA fragmentasyonu miktarı konsantrasyona bağlı artış gösterdi.

- Birbirinden bağımsız olan her iki yöntemde de MCF-7 ve CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücre kültürlerinde apoptozis gözlenirken, MDA-MB-231 hücre kültüründe apoptotik etki gözlenmedi. Apoptozisin saptanmadığı MDA-MB-231 hücre kültüründe otofaji tespit edildi.
- CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre kültürlerinde THZ varlığında invazyon ve migrasyon potansiyeli belirlendi.
- Thioridazine'nin epitelyal-mezenkimal geçişte rol alan proteinler üzerindeki etkisi her üç hücre kültüründe de araştırıldı.
- MDA-MB-231 hücre kültürlerinde THZ'nin otofajiye bağlı sitotoksik etkisinin EMT belirteçleri ile ilişkisi araştırıldı. THZ ve CQ (otofaji inhibitörü) ile beraber uygulandığında, epitelyal belirteçlerden E-cad'in ifade düzeyinin azaldığı mezenkimal belirteçlerden Vimentin'in ifade düzeyinin ise arttığı gözlemlendi.
- Epitelyal-mezenkimal geçişi düzenleyen yolda görev alan moleküllerin THZ varlığındaki ifade düzeyleri western blot yöntemi ile ölçüldü.
- Yolağı düzenleyen moleküllerden; GSK-3 $\beta$ , P-GSK-3 $\beta$ , Snail/Slug, P-Snail/Slug, E-cad moleküllerinin ifade düzeyleri test edildi. Her üç hücre kültürüne de THZ'nin IC<sub>50</sub> konsantrasyonu ve 50  $\mu$ M Bio acetoxime (GSK-3 $\beta$  inhibitörü) tekli ve kombinasyon olarak uygulandı. MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ve MCF-7 hücre kültürlerinde THZ ve inhibitörün tekli uygulamalarına göre, kombinasyonda P-Snail molekülünün ifade düzeyinde azalma gözlenirken, E-cad ifade düzeyi arttı. MCF-7, MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, hücre kültürlerinde E-cad ifade düzeyi, THZ ve Bio acetoxime kombinasyonunda kontrole göre, sırasıyla 5.2 kat, 7.3 kat, 8.1 kat artış gösterdi.

Hücre kültürleri model olarak kullanılarak yapılan bu doktora tezinde, THZ'nin etkilerine dair orijinal bulgular elde edildi. Literatürde çeşitli hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar gibi bizim çalışmamız da THZ'nin meme kanseri hücre kültürlerinde etkilerinin ön verilerini elde etti. Çalışmanın kısıtlayıcı tarafı, THZ'nin neden olduğu apoptoziste hangi moleküllerin görev aldığı aydınlatılmamasıdır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bir yan etkisi bulunmaktadır, THZ az yan etkilere sahip olan ve normal insan hücre kültürlerinde sitotoksik etkiye neden olmayan, güçlü bir kemoterapötik bir ilaç adaydır. Elde edilen bu verilerin hayvan deneyleriyle de doğrulanması önerilmektedir. Ayrıca, antipsikotik bir asıl hedefi dışında da etkili olabileceği yaklaşımı meme kanseri hücre kültürlerinde gösterildi.



## KAYNAKLAR

1. MacPherson, R. The curious stories of drugs with two lives: a new paradigm in drug development. *J R Soc Med.* 2015, 108(7), 255–258.
2. Murteria, S., Ghezaiel, Z., Karey, S., Lamure, M. Drug reformulations and repositioning in pharmaceutical industry and its impact on market access: reassessment of nomenclature. *J Market Access Health Policy.* 2014, 2, 22813.
3. Bach, A., Bichel, J., Hejgaard, J.J. Studies on the possible anti-neoplastic effect of thalidomide. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1963, 59, 491–499.
4. Emami Riedmaier, A., Fisel, P., Nies, A.T., Schaeffeler, E., Schwab, M. Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 2013, 34, 126–135.
5. Thanacoody, H.K.R. Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent? *Brit J Clin Pharmacol.* 2007, 64, 566–574.
6. Rodrigues, T., Santos, A. C., Pigoso, A. A., Mingatto, E. F., Uyemura, A. S., Curti, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis potentially implicated mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2002, 136, 136-142.
7. Ohlow, M. J., and B. Moosmann. 2011. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug Discov Today* 16:119-131.
8. Horn, A. S., and S. H. Snyder. 1971. Chlorpromazine and dopamine: conformational similarities that correlate with the antischizophrenic activity of phenothiazine drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2325-2328.
9. Motohashi, N., S. R. Gollapudi, J. Emrani, and K. R. Bhattiprolu. 1991. Antitumor properties of phenothiazines. *Cancer Invest* 9:305-319.

10. Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011, 63(1), 182-217.
11. Finch, A. Receptor Signalling Lecture Slides. 2013, PHAR2011. UNSW.
12. Rabin, C.R., Siegel, S.J. Antipsychotic Dosing and Drug Delivery. *Curr Topics Behav Neurosci.* 2010, 4, 141-77.
13. Schmitt, K.C., Rothman R.B., Reith, M.E. Non-classical Pharmacology of the Dopamine Transporter: Atypical Inhibitors, Allosteric Modulators and Partial Substrates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013, 346(1), 2-10.
14. Cummings, J.L., Henchcliffe, C., Schaefer, S., Simuni, T., Waxman, A., Kemp, P. The role of dopaminergic imaging in patients with symptoms of dopaminergic system neurodegeneration. *Brain.* 2011, 134(11), 3146-3166.
15. Scemama, J.L., Ruellan, C., Clerc, P., Clemente, F., Ribet, A. Dopamine receptors in a human colonic cancer cell line (HT29). Some receptor-related biological effects of dopamine. *Int J Cancer.* 1984, 34, 675-679.
16. Arvigo, M., Gatto, F., Ruscica, M., Ameri, P., Dozio, E., Albertelli, M., Culler, M. D., Motta, M., Minuto, F., Magni, P., Ferone, D. Somatostatin and dopamine receptor interaction in prostate and lung cancer cell lines. *J Endocrinol.* 2010, 207, 309-317.
17. Sachlos, E., Risueño, R.M., Laronde, S., Shapovalova, Z., Lee, J.H., Russell, J., Malig, M., McNicol, J.D., Fiebig-Comyn, A., Graham, M., Levadoux-Martin, M., Lee, J.B., Giacomelli, A.O., Hassell, J.A., Fischer-Russell, D., Trus, M.R., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., Brown, E.D., Collins, T.J., Bhatia, M. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell.* 2012, 149(6), 1284-97.



18. Strobl, J.S., Kirkwood, K.L., Lantz, T.K., Lewine, M.A., Peterson, V.A., Worley, 3rd J.F. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. *Cancer Res.* 1990, 50, 5399–5405.
19. Lialiaris, T., Pantazaki, A., Sivridis, E., Mourelatos, D. Chlorpromazine-induced damage on nucleic acids: a combined cytogenetic and biochemical study. *Mutat Res.* 1992, 265, 155–163.
20. Amaral, L., Kristiansen, J.E. Phenothiazines: potential management of Creutzfeldt–Jacob disease and its variants. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2001, 18, 411–417.
21. Rodrigues, T., Santos, A.C., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A, Curti, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2002, 136(1), 136-42.
22. Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y., Baba, Y. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004, 53(3), 267-75.
23. Gil-Ad, I., Shtauf, B., Levkovitz, Y., Nordenberg, J., Taler, M., Korov, I., Weizman, A. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncol Rep.* 2006, 15(1), 107-12.
24. Kang, S., Dong, S.M., Kim, B.R., Park, M.S., Trink, B., Byun, H.J., Rho, S.B. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells. *Apoptosis.* 2012, 17(9), 989-997.
25. Park, M.S., Dong, S.M., Kim, B.R., Seo, S.H., Kang, S., Lee, E.J., Lee, S.H., Rho, S.B. Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts. *Oncotarget.* 2014, 5(13), 4929–4934.

26. Amaral, L., Kristiansen, J.E. Phenothiazines: potential management of Creutzfeldt–Jacob disease and its variants. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2001, 18, 411–417.
27. Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafour, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J., Thun, M.J. Cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2012, 54-58.
28. Soner, B.C., Aktug, H., Acikgoz, E., Duzagac, F., Guven, U., Ayla, S., Cal, C., Oktem, G. Induced growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells by flavopiridol. *Int J Mol Med*. 2014, 34(5), 1249-1256.
29. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013, 1546, 33.
30. Raymond, W. *Cancer Biology*, In: Ruddon, M.D. Oxford University Press. New York, 2007, 3-14.
31. Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011, 144(5), 646-674.
32. Olmeda D., Moreno-Bueno G., Flores J.M., Fabra A., Portillo F., Cano A. SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11721-31.
33. Kim, J.Y., Kim, Y.M., Yang, C.H., Cho, S.K., Lee, J.W., Cho M. Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation. *FEBS J*. 2012, 279(16), 2929-2939.
34. Satya-Prakash, K.L., Pathak, S., Hsu, T.C., Olive, M., Cailleau, R. Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1 q, 11q and HeLa-like marker. *Cancer Genet Cytogenet*. 1981, 3, 61–73.

35. Sheikh, M.S., Garcia, M., Pujol, P., Fontana, J.A., Rochefort, H. Why are estrogen-receptornegative breast cancer more aggressive than the estrogen-receptor-positive breast cancers? *Invasion Metastasis*. 1995, 14, 329-336.
36. Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Kha, M.A., Haris, C.C., Hainau, P. *Hum Mutat*. 2002, 19, 607–614.
37. Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973, 51, 1409–1416.
38. Watanabe, N., Okochi, E., Mochizuki, M., Sugimura, T., Ushijima, T. The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 2001, 61, 7739–7742.
39. Nieves-Neira, W., Pommier, Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer*. 1999, 82, 396–404.
40. Schwarz, V.A., Hornung, R., Fedier, A., Fehr, M.K., Walt, H., Haller, U., Fink D. Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient and proficient tumour cells. *Br J Cancer*. 2002,86, 1130 – 1135.
41. Nagasawa, H., Keng, P., Maki, C., Yu, Y.J., Little, J.B. Absence of a radiation-induced first-cycle G(1)-S arrest in p53(+) human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Res*. 1998, 58, 2036–2041.
42. Nieves-Neira, W., Pommier, Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer*. 1999, 82, 396–404.

43. Rait, A.S., Pirollo, K.F., Rait, V., Krygier, J.E., Xiang, L.M., Chang, E.H. Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 2001, 8, 728–739.
44. Sutherhland, R.L., Watts, C.K.W., Lee, C.S.L., Musgrove, E.A. Breast cancer. In: Masters J.R.W., Palsson B. *Human cell culture. Vol. II. Cancer cell lines. Part 2.* Ed: Kluwer Academic Publishers, Boston, 1999, 79–106 s.
45. Botos, J., Barhoumi, R., Burghardt, R., Kochevar, D.T. Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2002, 38, 235–241.
46. Imbalzano, K.M., Tatarkova, I., Imbalzano, A.N., Nickerson, J.A. Increasingly transformed MCF-1 0A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture. *Cancer Cell International.* 2009, 9, 7.
47. Iqbal, J., Chong, P.Y., Tan, P.H. Breast cancer stem cells: an update. *J Clin Pathol.* 2013, 66(6), 485-490.
48. Al-Hajj, M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003,100(7), 3983-3988.
49. Filipova, A., Seifrtova, M., Mokry, J., Dvorak, J., Rezacova, M., Filip, S., Diaz-Garcia, D. Breast cancer and cancer stem cells: a mini-review. *Tumori.* 2014,100(4), 363-9.
50. Jaggupilli, A., Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol.* 2012, 708036.

51. Srivastava, A.N, Rumana, A., Khan, M.A. Evaluation and Comparison of the In Vitro Cytotoxic Activity of *Withania somnifera* Methanolic and Ethanolic Extracts against MDA-MB-231 and Vero Cell Lines. *Sci Pharm.* 2016, 84, 41-59.
52. MacPherson R. The curious stories of drugs with two lives: a new paradigm in drug development. *J R Soc Med.* 2015, 108, 255-58.
53. Dalton, S.O, Mellemkjaer, L., Thomassen, L., Mortensen, P.B., Johansen, C. Risk for cancer in a cohort of patients hospitalized for schizophrenia in Denmark, 1969-1993. *Schizophr Res.* 2005, 75, 315-324.
54. Mu, J, Xu H., Yang, Y., Huang, W., Xiao, J., Li M., Tan, Z., Ding, Q., Zhang, L., Lu, J., Wu, X., Liu, Y. Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2014, 31, 2107-2114.
55. Sutton, L.P., Rushlow, W.J. The dopamine D2 receptor regulates Akt and GSK-3 via Dvl-3. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2012, 15, 965-979.
56. Yan, H., Li, W.L, Xu. J.J, Zhu, Q., Long, X., Che, J.P. D2 dopamine receptor antagonist raclopride induces non-canonical autophagy in cardiac myocytes. *J Cell Biochem.* 2013, 114,103-110.
57. Shin, J.H., Park, S.J., Kim, E.S., Jo, Y.K., Hong, J., Cho, D.H. Sertindole, a potent antagonist at dopamine D2 receptors, induces autophagy by increasing reactive oxygen species in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2012, 35, 1069-1075.
58. Pornour, M., Ahangari, G., Hejazi, S.H., Deezag,i A. New perspective therapy of breast cancer based on selective dopamine receptor D2 agonist and antagonist effects on MCF-7 cell line. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2015, 10, 214-23.
59. Cheng, H.W., Liang, Y.H., Kuo, Y.L., Chuu, C.P., Lin, C.Y., Lee, M.H., Wu, A.T., Yeh, C.T., Chen, E.I., Whang-Peng, J., Su, C.L., Huang, C.Y. Identification of

thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death Dis.* 2015, 6, 1753.

60. Byun., H.J., Lee JH, Kim, B.R., Kang, S., Dong, S.M., Park, M.S., Lee, S.H., Park, S.H., Rho, S.B. Anti-angiogenic effects of thioridazine involving the FAK-mTOR pathway. *Microvasc Res.* 2012, 84, 227-234.

61. Kyle, C. Schmitt, Richard, B., Rothman, Maarten, E.A. Reith. Non-classical Pharmacology of the Dopamine Transporter: Atypical Inhibitors, Allosteric Modulators and Partial Substrates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013, 346(1), 2-10.

62. Schrödter, S., Braun, M., Syring, I., Klümper, N., Deng, M., Schmidt, D., Perner, S., Müller, S.C., Ellinger, J. Identification of the dopamine transporter SLC6A3 as a biomarker for patients with renal cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2016, 15, 10.

63. Hewitt, G., Carroll, B., Sarallah, R., Correia-Melo, C., Ogrodnik, M., Nelson, G., Otten, E.G., Manni, D., Antrobus, R., Morgan, B.A, von Zglinicki, T., Jurk, D., Seluanov, A., Gorbunova, V., Johansen, T., Passos, J.F., Korolchuk, V.I. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy.* 2016, 8, 0. [Epub ahead of print]

64. Iljoong, O., Hyunchul, C., Yonghoon, L., Minseok, C., Deokbae, P., Youngki, L. Blockage of Autophagy Rescues the Dual PI3K/mTOR Inhibitor BEZ235-induced Growth Inhibition of Colorectal Cancer Cells. *Dev Reprod.* 2016, 20, 1-10.

65. Douglas, S., Micalizzi, Susan M., Farabaugh, Heide, L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010, 15, 117–134.

66. Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., Wrana, J.L. Regulation of the polarity protein Parp by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* 2005, 307(5715), 1603–1609.

67. Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., Tsukita, S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003, 116(10), 1959–67.
68. Kokkinos, M.I., Wafai, R., Wong, M.K., Newgreen, D.F., Thompson, E.W., Waltham, M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs.* 2007, 185(1–3), 191–203.
69. Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006, 295(21), 2492–2502.
70. Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno, B.G., Palacios, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008, 68(4), 989-997.
71. Hollida, D.L., Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011, 12, 13(4), 215.
72. Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., Gray, J.W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006, 10, 515-527.
73. Li, L., Bennett, S.A., Wang, L. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr.* 2012, 6(1), 59-70.
74. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011, 13(2), 132-141.

75. Lionel, L., Alfonso, B. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3 kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005, 24, 7443–7454.

76. Grille, S.J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A.J., van Roy F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tschlis, P.N., Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*. 2003, 63, 2172–2178.

77. Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., Hung, M.C. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004, 6(10), 931-940.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Aslı KISIM

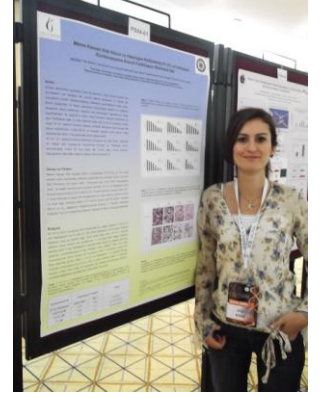
Doğum Tarihi : 5 Ocak 1985

### İletişim Bilgileri

Adres : 283/1 Sok. No:42/1 D:9 Özev Apt. Bornova-İZMİR

Telefon : 0555 264 43 16

E-posta: [aslikisim@gmail.com](mailto:aslikisim@gmail.com)



### Eğitim Bilgileri

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi	2004-2008
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji	Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	2008-2010
Doktora	Moleküler Biyoloji	Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	2010-2016

**Bildiği yabancı dil:** İngilizce

**Üyesi olduğu mesleki kuruluşlar:**

1. Moleküler Kanser Araştırma Derneği (**MOKAD**)

2. Hücre Ölümü Araştırma Derneği (**HÖAD**)
3. European Association for Cancer Research (**EACR**)

### **Çalışma Deneyimleri ve Laboratuvar Becerileri:**

2008-2016 yıllarında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi, Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarında görev adım.

- Hücre Kültürü,
- Sitotoksite Deneyleri,
- RNA, DNA ve Protein İzolasyonu,
- RT-PCR,
- Protein ve PCR Array,
- Western Blot Yöntemi,
- ELISA.

### **Projeler:**

1) Selim Uzunoğlu, Aslı Kısım. “**AT-101(-/- Gossypol) ve rekombinant insan Apo2L/TRAIL’in Tekli ve Kombine Dozlarının Meme Kanseri Hücre Hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması**” FBE 2009-093, Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, Lisansüstü Tez Projesi (**Araştırmacı**).

2) Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Doseksel/Octreotid’in Apoptotik Etkisinin Moleküler Hedeflerinin Araştırılması (**EGE BAP-Proje No: 2011-TIP-029**). (**Yardımcı Araştırmacı**).

3) AtT20 kortikotrop adenom hücre hattında gossypol ve retinoik asidin apoptoz, hormon salınımı ve sitokin profili üzerine sinerjistik etkisi. (**EGE BAP-Proje No: 2011-TIP-075**). (**Yardımcı Araştırmacı**).

4) AtT20 Kortikotrop Adenom Hücre Hattında Gossipolün Hücre Proliferasyonu ve Hormon Sentezi Üzerine Olan İnhibisyon Etkisinin Moleküler Hedeflerinin Araştırılması. (EGE BAP-Proje No: 2011-TIP-077). (Yardımcı Araştırmacı).

5) Antipsikotik Thioridazine'in Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Araştırılması. (TÜBİTAK 1002 HIZLI DESTEK- Proje No: 113S482) (Çalışan).

### Ödüller:

1) Prof. Dr. Mustafa Samur En İyi Bildiri Ödülü. **“Doksetaksel-Octreotid Kombinasyonunun Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Apoptotik Proteinler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”** 6. Ulusal Tıbbi Onkoloji Kongresi (24-28 Eylül 2009, Antalya).

2) En İyi Bildiri Ödülü. **“Türk Meme Kanseri Hastalarında Kanseri Ve Normal Meme Dokusu Örneklerinde FGFR2 Gen Polimorfizminin Belirlenmesi”** 7. Ulusal Tıbbi Onkoloji Kongresi (22-26 Eylül 2010, Antalya).

3) En İyi sözlü Bildiri Ödülü. **“AT-101 Sensitizes Human Breast Cancer Cells To Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Through Synergistic Cytotoxicity and Apoptosis”**. 8<sup>th</sup> Mediterranean Conference on Oncology, Innovations In Breast Cancer Management (28-30 Kasım 2010, Antalya).

4) Temel Tıp Bilimleri Ödülü. **“Pretreatment with AT-101 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of breast cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels”** V. DR. AYSUN-AHMET KÜÇÜKEL TIP ÖDÜLLERİ (2013, Ankara).

## TEZLER

- 1) **Yüksek Lisans Tezi:** “AT-101 (-/- Gossypol) ve Rekombinant İnsan Apo2L/TRAIL’in Tekli ve Kombine Dozlarının Meme Kanseri Hücre Hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” Celal Bayar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ABD, 2010.

**Tez Danışmanı:** Doç. Dr. Selim UZUNOĞLU Celal Bayar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ABD

- 2) **Doktora Tezi:** Meme Kanseri ve Kök Hücre Kültürlerinde Thioridazine’in Etkilerinin Araştırılması

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU Celal Bayar Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD

## Bilimsel Makaleler:

1) **Kisim A**, Atmaca H, Cakar B, Karabulut B, Sezgin C, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Pretreatment with AT-101 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of breast cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. *J of Cancer Res and Clin Oncol*, 138(7):1155-63, 2012. (10 atıf)

2) Bozkurt E, Atmaca H, **Kisim A**, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Effects of Thymus serpyllum Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1245–1250, 2012. (5 atıf)

3) Ergun M., Eyigor S., Karaca B., **Kisim A**, Uslu R. Effects of exercise on angiogenesis and apoptosis-related molecules, quality of life, fatigue and depression

in breast cancer patients. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2013 Sep;22(5):626-37. doi: 10.1111/ecc.12068. (9 atıf)

4) *Kısım A*, Karaca B, Atmaca H, Purcu D.U, Uzunoğlu S, Uslu R. Türk Meme Kanseri Hastalarında Kanserli ve Normal Meme Dokusu Örneklerinde FGFR2 Gen Polimorfizminin Belirlenmesi. *Meme Sağlığı Dergisi*, 7(1):135-140, 2010.

5) *Kısım A*, Uzunoğlu S. Hormesis: Toksik Ajanların Düşük Dozlarına Uyum Sağlamada Öncül Fenomen. *J For Med* 2012;26(3):180-90 doi: 10.5505/adlitip.2012.96720.

#### **Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler:**

1) Karaca B, *Kısım A*, Atmaca H, Karabulut B, Sezgin C, Uzunoğlu S, Uslu R. AT-101 Sensitizes Human Breast Cancer Cells To Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Through Synergistic Cytotoxicity and Apoptosis. *8<sup>th</sup> Mediterranean Conference on Oncology, Innovations In Breast Cancer Management, SB:0003, Antalya, Turkey, November 28-30, 2010.*

2) Özer Makay, Mutlu Unver, *Asli Kısım*, Gulruh Emiroglu, A. Aktas, B. Karaca, Recep Gokhan Icoz, M. Akyildiz, M. Yilmaz. Is BRAF V600E mutation associated with aggressiveness in well-differentiated thyroid cancer? Preliminary results of an on-going study. *5TH ESES WORKSHOP Surgery of Thyroid Cancer, Berlin, May 23 – 25, 2013. (Sözlü bildiri)*

3) *Aslı Kısım*, Selim Uzunoglu. Bir Doktora Tezinin Hikayesi (Sözlü Bildiri). Story of a PhD Thesis (Oral Presentation). Celal Bayar Üniversitesi, **Sağlık Bilimleri Enstitüsü, I. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi, 12-14 Mayıs, Manisa, Turkey.**

**4) Asli Kısım,** Selim Uzunoglu, Burcak Karaca, Ruchan Uslu. Antipsikotik thioridazine'in meme kanseri hücre kültürlerinde sitotoksik etkisinin araştırılması.  
**14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim, Fethiye, 2015.**

