

**T.C.**  
**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**TRİPTOLİD VE METFORMİN UYGULAMASININ DOĞAL TİP MDA-MB-  
231 VE BÜYÜME HORMONU ARTTIRILMIŞ MDA-MB-231 HÜCRE  
HATLARINDA APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Gizat RAKHMATULA**  
**1700004566**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA**

**OCAK 2020**

**T.C.  
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**TRİPTOLİD VE METFORMİN UYGULAMASININ DOĞAL TİP MDA-MB-  
231 VE BÜYÜME HORMONU ARTTIRILMIŞ MDA-MB-231 HÜCRE  
HATLARINDA APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Gizat RAKHMATULA  
1700004566**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA**

**Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Prof. Dr. Elif Damla ARISAN (Gebze Teknik Üniversitesi)**

**OCAK 2020**

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamı tamamlama sürecinde bilgileri ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini benden hiç esirgemeyen ve göstermiş olduğu sabrından dolayı çok saygı duyduğum değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN-YERLİKAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvarında çalıştığım süre boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Deneyisel çalışmalarımızda her konuda yardımcı olan ve deneyimlerini bizden esirgemeyen Araş. Gör. Özge BERRAK, Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ ve Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvarında çalıştığım süre boyunca her zaman bana yardımcı olan ve aynı ortamı paylaşmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım: Amani ABDULMUNEM, Berre SERRA AKDENİZ, Elif KANSIZ, Kadriye KOYUNCU, Zeynep Elif APAYDIN, Tamer GÜMÜŞ, Börteçine SEVGİN, Mervenur ÇOBAN, Osman Orçun OKUMUŞ, Kaan ADACAN ve Sina KASHANİ'ye teşekkürlerimi borç bilirim.

Beni yalnız bırakmayan ve her konuda destek olan KIRGÖZ ailesine ve kardeşim Ahmet BAHADIR KIRGÖZ'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olup sonsuz destek veren Khairulla MASSADİKOV'a ve onun ailesine en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Uzağımda olsalar da hep sevgi ve desteklerini hissettiğim sevgili babam Gaziz KIRGİZOV, annem Ardak MADUANOVA, kardeşlerim Alua, Almat ve Adiya'ya sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR .....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1 MEME KANSERİ .....	2
2.2 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ .....	2
2.2.1 Üçlü Negatif Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	4
2.2.2 Üçlü Negatif Meme Kanserinin Etiyolojisi.....	4
2.2.3 Üçlü Negatif Meme Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizması .....	5
2.3 BÜYÜME HORMONU.....	7
2.4 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE BÜYÜME HORMONUNUN ETKİSİ.....	9
2.5 BÜYÜME HORMONUNUN KEMODİRENÇTEKİ ROLÜ .....	10
2.6 BÜYÜME HORMONUNUN METASTAZDAKİ ROLÜ .....	11
2.7 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNİN TEDAVİSİ.....	11
2.7.1 Cerrahi.....	12
2.7.2 Radyoterapi .....	12
2.7.3 Kemoterapi.....	13
2.7.3.1 TNBC'de adjuvan kemoterapi .....	13

2.8	TRİPTOLİD.....	14
2.8.1	Triptolidin Moleküler Hedefleri.....	14
2.8.2	Triptolidin Etki Mekanizmaları.....	15
2.9	METFORMİN.....	16
2.9.1	Metforminin Moleküler Hedefleri .....	16
2.9.2	Metformin Kanser Hücrelerindeki Etki Mekanizmaları .....	17
2.10	APOPTOZ.....	18
2.10.1	İntrinsik (içsel) apoptoz.....	19
2.10.2	Ekstrinsik (dışsal) apoptoz .....	20
2.11	OTOFAJİ .....	23
2.11.1	Otofaji tipleri.....	24
2.11.2	Makrootofaji.....	24
2.11.2.1	<i>Ulk1 protein kinaz kompleksi</i> .....	26
2.11.2.2	<i>Vps34-Beclin PI3K- kompleksi</i> .....	26
2.11.2.3	<i>ATG12 konjügasyonu sistemi</i> .....	26
2.11.2.4	<i>LC3 lipidasyonu</i> .....	27
2.11.3	Kanserde Otofajinin Rolü .....	27
<b>3</b>	<b>MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>31</b>
3.1	HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	31
3.2	HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ .....	32
3.3	TRİPAN MAVİSİ İLE HÜCRE SAĞKALIMININ BELİRLENMESİ.....	32
3.4	ASILI DAMLA TEKNİĞİ.....	33
3.5	PROPİDYUM İYODÜR BOYAMA VE FACS ANALİZİ .....	33
3.6	YARA İYİLEŞTİRME YÖNTEMİ.....	33
3.7	YUMUŞAK AGAR TEKNİĞİ.....	34
3.8	KOLONİ FORMASYON DENEYİ .....	34
3.9	BRADFORD PROTEİN MİKTAR TAYİNİ .....	34
3.10	İMMUNOBLOTLAMA .....	35
3.10.1	Proteinlerin Hazırlanması .....	35
3.10.2	Membrana Transfer ve Bloklama.....	35
3.10.3	Primer ve Sekonder antikor İşaretlemeleri ve Bantların görüntülenmesi .....	35
3.11	İSTATİKSEL ANALİZ .....	36

<b>4 SONUÇLAR .....</b>	<b>37</b>
4.1 DOZA BAĞLI TRİPTOLİD UYGULANMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ .....	37
4.2 DOZA BAĞLI TRİPTOLİD UYGULAMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 BH+ MEME KANSERİ ÜZERİNDE APOPTOTİK ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ .....	38
4.3 ZAMANA BAĞLI TRİPTOLİD UYGULAMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 BH+ MEME KANSERİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ VE METFORMİN İLE TRİPTOLİD+METFORMİN DOZUNUN BELİRLENMESİ .....	41
4.4 MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 GH+ MEME KANSERİ ÜZERİNDE TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULAMASININ ETKİSİ AKRİDİN ORANJ BOYAMASI İLE GÖSTERİLMESİ.....	44
4.5 MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 GH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULAMASININ ETKİSİ YUMUŞAK AGAR TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ.....	46
4.6 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ KOLONİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE GÖSTERİLMESİ.....	49
4.7 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ASILI DAMLA MODELİ TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ.....	51
4.8 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN YARA İYİLEŞME YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ .	54
4.9 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ OTOFAJİ VE APOPTOTİK ÖLÜM ÜZERİNE ETKİSİNİN MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE GÖSTERİLMESİ .....	56

<b>5</b>	<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>KAYNAKÇA</b> .....	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>EKLER</b> .....	<b>76</b>
7.1	KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	76
7.1.1	Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml için).....	76
7.1.2	Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için).....	76
7.1.3	5X Laemmlı Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için).....	76
7.1.4	Bradford Çözeltisinin Hazırlanışı (250 ml için).....	76
7.1.5	Tris-Baz Çözeltisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı (pH 8,8).....	77
7.1.6	Tris-Baz Çözeltisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı (pH 6,8).....	77
7.1.7	%10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için) .....	77
7.1.8	%30 (v/v) Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için) .....	77
7.1.9	%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için) .....	77
7.1.10	10X Yürütme Tamponun Hazırlanışı (pH 8,3) .....	77
7.1.11	10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3).....	78
7.1.12	%12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı.....	78
7.1.13	10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6).....	78
7.1.14	%5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için).....	78
7.1.15	5 Tris-Baz Çözeltisinin (1 Molar) Hazırlanışı (pH 8,5).....	79
7.1.16	50x TAE Çözeltisinin Hazırlanışı (1L için) (pH 8,6) .....	79
7.1.17	Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için) .....	79
7.1.18	Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için) .....	79
7.1.19	10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4) .....	79
7.2	KULLANILAN CİHAZLAR.....	80
7.3	HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI .....	80
7.4	KİMYASAL MADDELER.....	81
7.5	KULLANILAN ANTİKORLAR .....	83
<b>8</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>84</b>

## KISALTMALAR

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

AO: Akridin turuncusu

APS: Amonyum persülfat

ATG: Otofaji ilişkili protein

ATP: Adenozin trifosfat

Bax: Bcl2-ilişkili X proteini

Bcl-2: B-hücre lenfoma-2

Beclin-1: Bcl-2 etkileşimli protein

BH: Büyüme Hormonu

BH+: Büyüme hormonu anlatımı indüklenmiş

BSA: Sığır serum albümin

CLB: Hücre özütleme tamponu

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DiOC<sub>6</sub>: 3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

FDA: Gıda ve İlaç İdaresi

FBS: Fetal sığır serumu

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit

IFN: İnterferon

LC3: Mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir 3

MAPK: Mitoj enle aktifleştirilmiş protein kinaz

mTOR: Memeli rapamisin hedefi

MTT: Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PI: Propidyum iyodür

PI3K: Fosfotidilinositol-3 kinaz

PK: Prostat Kanseri

ROS: Reaktif oksijen türevi

SDS: Sodyum dodesil sülfat



TBS: Tris tamponlu tuz  
TBS-T: TBS-Tween  
TEMED: Tetrametiletildiamin  
TLR: Toll benzeri reseptör  
TNF: Tümör nekroz faktörü  
UV : Ultraviyole  
TNBC: Üçlü Negatif Meme Kanseri  
vd. : ve diğerleri  
sa. : saat



## SEMBOL LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

bç : Baz çifti

cm : Santimetre

cm<sup>2</sup>: Santimetre kare

g: Santrifüj kuvveti

gr: Gram

kDa: Kilodalton

L: Litre

M: Molar

mA: Miliamper

ml: Mililitre

mm: Milimetre

nm: Nanometre

pH: Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

sa: Saat

V: Volt

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Üçlü Negatif Meme Kanserinin oluşma mekanizması[22].....	6
Şekil 2. 2. Büyüme hormonu sinyal mekanizması [31] .....	7
Şekil 2. 3. Triptolidin kimyasal yapısı.(Pubchem'den alınmıştır) .....	14
Şekil 4. 1. Doza bağlı triptolid uygulamasının bağlı hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	37
Şekil 4. 2. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde zamana bağlı triptolid uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile, mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir. ....	39
Şekil 4. 3. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde zamana bağlı triptolid uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile, mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir. ....	40
Şekil 4. 4. MDA-MB-231 DT hücrelerinde zamana bağlı triptolid ve metforminin farklı doz uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile, mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir. ....	42
Şekil 4. 5. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde zamana bağlı triptolid ve metforminin farklı doz uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile, mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir. ....	43
Şekil 4. 6. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi. ....	45
Şekil 4. 7. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının koloni oluşumu ve hücre canlılığına etkisinin yumuşak agar tekniği ile gösterilmesi .....	47

Şekil 4. 8. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının koloni oluşumu ve hücre canlılığına etkisinin yumuşak agar tekniği ile gösterilmesi .....	48
Şekil 4. 9. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi. ....	50
Şekil 4. 10. Zamana bağlı triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi (****p<0.0001).....	52
Şekil 4. 11. Zamana bağlı triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi (****p<0.0001).....	52
Şekil 4. 12. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasını takiben 24 saat , 48 saat , 72 saat sonrasında yara iyileşmesi modelinde oluşturulan yarıkların kapatılması.....	53
Şekil 4. 13. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasını takiben 24 saat , 48 saat , 72 saat sonrasında yara iyileşmesi modelinde oluşturulan yarıkların kapatılması.....	54
Şekil 4. 14. Triptolid ve metformin uygulamasının doğal ip ve BH+ MDA-MB-231 hücrelerinde otofajide görevli proteinlerin anlatımı üzerine etkilerinin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	55
Şekil 4. 15. Triptolid ve metformin uygulamasının doğal ip ve BH+ MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozda görevli proteinlerin anlatımı üzerine etkilerinin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	56
Şekil 4. 16. Triptolid ve metformin uygulamasının doğal ip ve BH+ MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozda görevli proteinlerin anlatımı üzerine etkilerinin immunoblotlama ile gösterilmesi .....	58
Şekil 4. 17. Triptolid ve metformin uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücrelerinde otofajide görevli proteinlerin anlatımı üzerine etkilerinin immunoblotlama ile gösterilmesi.....	58

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Üçlü negatif meme kanseri alt tipleri.....	3
Tablo 2. 2. Fizyolojik ve patolojik koşullarda apoptoz.....	18
Tablo 2. 3. İntrinsik apoptotik yolda görevli moleküller .....	19
Tablo 2. 4 Ekstrinsik apoptotik yolda görevli moleküller.....	21
Tablo 2. 5. Apoptotik yolların düzenleyicileri .....	22
Tablo 2. 6. Kaspazlar ve kaspaz inhibitörleri.....	22
Tablo 2. 7. Memelilerdeki otofaji genleri .....	24

## ÖZET

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olarak tanımlanmaktadır. Büyüme hormonunun (BH) artan ifadesinin, meme kanserinde hücre büyümesine, ilaç direncine ve metastaza neden olduğu bulunmuştur. Triptolid, kanser önleyici aktiviteye sahip *Tripterygium wilfordii*'den izole edilmiş bir diterpenoitir. Verilerimiz aşırı BH+ anlatımı bulunan MDA-MB-231 hücrelerinin doğal tip MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla triptolid tedavisine karşı bir direnç mekanizması sergilediğini göstermiştir. Bu direnci aşmak için, triptolid ile anti-tümörjenik etkiye sahip bir anti-diyabetik ajan ve meme kanseri yönetiminde potansiyel bir adjuvan olan metformin eş zamanlı uygulanmıştır. Bulgularımız, BH + hücrelerinin, metformin ile birlikte uygulandığında artan hücre canlılığı kaybı, mitokondriyal membran potansiyel kaybı ve apoptotik hücre ölümü gösterdiğini tespit etmiştir. Ek olarak, kombine tedavi nedeniyle koloni boyutları önemli ölçüde azaldı. Otofaji, stres koşulları altında enerji seviyesini kontrol etmek için makromoleküllerin, zarar görmüş organellerin lizozoma iletildiği bir hücresel süreçtir. Hücreler, otofaji yolaklarını kontrol ederek proliferasyon veya apoptoz arasında bir denge oluşturabilmektedir, bu bir kemodirenç mekanizması olarak önerilmiştir. Verilerimiz, triptolid ve metformin ile işlenmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde otofaji indüksiyonunda önemli bir değişiklik olmadığını göstermiştir.

## **ABSTRACT**

Breast cancer is identified as the most common cancer among women and the leading cause of cancer-related deaths. Increased expression of growth hormone (GH) has been found to cause cell growth, drug resistance and invasion-metastasis in breast cancer. Triptolide is a diterpenoid isolated from *Tripterygium wilfordii* with anti-cancer activity. Our data showed that GH overexpressing MDA-MB-231 cells exhibited a resistance mechanism against triptolide treatment when compared to wild type MDA-MB-231 cells. To overcome the resistance, we combined triptolide with metformin, an anti-diabetic agent with anti-tumorigenic effect and a potential adjuvant in the management of breast cancer. Our findings indicated that GH+ cells exhibited increased cell viability loss, mitochondrial membrane potential loss and apoptotic cell death with metformin co-treatment. In addition, colony sizes were significantly decreased due to combined treatment. Autophagy is a process of cellular self-degradation during which macromolecules, damaged organelles are delivered to the lysosome in order to control energy level under stressed conditions. Cells can control proliferation or apoptosis by changing the level of autophagy, it has been proposed as a chemoresistance mechanism. Our data showed that there was no significant change in the autophagy induction in MDA-MB-231 wt and GH+ cells treated with triptolide and metformin.

## 1 GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık tanımlanan kanser ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Her yıl tahminen 1 milyon meme kanser vakası teşhis edilmektedir. Bunların 150.000'den fazlası üçlü negatif olarak tanımlanmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) protein ekspresyonu olmaması ve HER2 protein aşırı ekspresyonu olmaması ile tanımlanır. Meme kanserinin oluşumunu tetikleyen faktörler arasında yaş, üreme ve adet öyküsü, fiziksel aktivite eksikliği, obezite ve tip II diyabet ve çevresel faktörler gözükmektedir. Üçlü-negatif meme kanseri oldukça proliferatiftir ve sistemik kemoterapilere duyarlıdır.

Yapılan araştırmalara göre büyüme hormonunun (BH) meme kanserinde anlatımının artması hücrenin büyümesine, ilaç direncine ve invazyon-metastaza neden olduğu tespit edilmiştir. Hem hayvan modellerinde hem de insanlarda, deneysel, epidemiyolojik, genetik ve klinik çalışmalardan BH ve karsinogenezi bağlayan çok sayıda kanıt üretilmiştir. Ayrıca, BH sinyalleşme sisteminin birkaç bileşeni, yeni kanser tedavileri için hedefler olarak incelenmiştir.

Otofaji ike kanser arasındaki ilişki, yapılan araştırmaların sonucuna göre, büyüme faktörlerinin eksik olduğunda tümör hücrelerinde otofajide artış gözlemlendiği ve hücrelerin otofajiyi ölümden kaçış mekanizması olarak kullandığı tespit edilmiştir. Ayrıca otofaji baskılandığı durumda hücrelerin apoptoz ile ölüme gittiği gözlemlenmiştir. Kanser hücrelerinde otofajinin inhibe edilmesi ile birlikte kombine tedavilerin uygulanmasının sonucu tümör baskılanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu tezin amacı MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolidin hücre sağkalım-ölüm mekanizmaları üzerine etkisinin zamana bağlı olarak modellenmesi ve ayrıca triptolidin ile metforminin beraber uygulanması etkinliğinin otofajik ve apoptotik ölüm yolları üzerinde gösterilmesi amaçlanmıştır.



## **2 GENEL BİLGİLER**

### **2.1 MEME KANSERİ**

Meme kanseri en yaygın kanserdir ve 2018'de tahmin edildiği gibi kadınlarda kansere bağlı ölümlerin% 15'ine katkıda bulunur. Son yıllarda teşhislerde özellikle de moleküler biyoloji ve kanser genomiklerinde kaydedilen ilerlemeler meme kanserinin tespitinde devrim yaratmıştır. Geliştirilen sekanslama teknolojileri, prognostik ve tanısal belirteçleri tanımlamaya yardımcı olmuş ve çeşitli meme kanseri tipleri ve alt tipleri tanımlamıştır. Meme kanserinin moleküler profili, meme kanserini, üç temel biyobelirteçlerin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak, hormonal reseptör pozitif ve negatif meme kanserine göre sınıflandırır; östrojen reseptörü (ER); progesteron reseptörü (PR); ve insan epidermal büyüme faktörü-2 (HER2) reseptörü. Meme kanserin riski yaş ile birlikte artmaktadır. Postmenopozal kadınlarda meme kanseri olaylarının %80'inin ve 50-69 yaşları arasında tanı alan olayların yaklaşık %50'sinin olduğu tahmin edilmektedir. Yanı sıra, meme kanserinin çok faktörlü etiyojisi genetik, üreme ve yaşam tarzı faktörleri de içerir [1].

### **2.2 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ**

Üçlü negatif meme kanseri, sistemik tedaviye rağmen kötü prognoz, uzak metastaz, nüks ve daha kötü mortalite oranları ile ilişkili olan biyolojik olarak agresif meme kanseri alt tiplerinden biridir. Şimdiye kadar, TNBC'nin moleküler özellikleri nedeniyle, etkili bir hedefli tedavi mevcut değildir ve cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, sistemik tedavinin başlıca seçenekleridir [2]. Bununla birlikte, bu yaygın sistemik tedaviler yüksek nüks oranına eşlik eder ve hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde etkiler [3].

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyon olmaması ile karakterize edilen üçlü-negatif meme kanseri (TNBC), en agresif meme kanserinin alt tipi olarak bilinir ve tüm meme

kanserlerinin yaklaşık % 15-20'sini temsil eder. TNBC hastaları, kısmen etkili hedefli tedavilerin bulunmamasından dolayı uzak metastaz riski ve diğer meme kanseri hastalarından daha kötü genel sağkalım riskine sahiptir. TNBC'nin araştırılması için harcanan çabaya rağmen, TNBC'nin agresif davranışının altında yatan moleküler mekanizmalar hala TNBC tedavisine engel olmaktadır [4]. Gen ekspresyon profili, TNBC'yi altı farklı moleküler alt tipte sınıflandırmıştır: bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör (IM), mezenkimal benzeri (M), mezenkimal kök benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörleri (LAR);ve bu alt tipler klinik olarak seçim ve tedaviye duyarlılık, nüks ve prognoz açısından değişkenlik gösterir (Tablo 1) [5][6].

Tablo 2. 1. Üçlü negatif meme kanseri alt tipleri

Alt tip	Gen ekspresyon profili
Bazal benzeri 1 (BL-1)	Hücre döngüsü ilerlemesi, hücre bölünmesi ve DNA hasarı tepki yollarında rol oynayan genlerin ekspresyonunda yüksek.
Bazal benzeri 2 (BL-2)	Hücre döngüsü ilerlemesi, hücre bölünmesi ve büyüme faktörü sinyalleşmesinde rol oynayan genlerin ekspresyonunda yüksek.
İmmünomodülatör (IM)	Bağışıklık süreci ve hücre sinyalizasyonunda rol oynayan genlerin ifadesinde yüksek.
Mezenkimal benzeri (M)	Hareketlilik ve hücre dışı matrikse katılan genlerin ekspresyonunda yüksek.
Mezenkimal kök benzeri (MSL)	Hareketlilik, hücre dışı matris ve büyüme faktörü sinyalleşmesinde rol oynayan genlerin ekspresyonunda yüksek; Klaudin-düşük içsel alt tipi ile tutarlı.
Luminal androjen reseptörleri (LAR)	Hormonal olarak düzenlenmiş yollarda yer alan genlerin ekspresyonunda yüksek.

### **2.2.1 Üçlü Negatif Meme Kanserinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri**

Perou vd. (2000), meme kanserlerinin çeşitli moleküler alt tiplerini veya moleküler profillerini tanımlamışlardır. Bazal benzeri meme kanseri de dahil olmak üzere cDNA mikro dizilerine dayanan dört alt tip tanımlamışlar ve çoğu üçlü negatif tümörün, bazal benzeri alt tipte kümelenildiğini belirtmişler [7]. O zamandan beri, gen ekspresyonu profillemeye ile ilgili çok sayıda araştırma meme kanserinin moleküler teşhisi anlayışını geliştirmiş ve onkologların bazal benzeri alt tip tipini tanımlamak için üçlü negatif fenotipi kullanmalarına zemin hazırlamıştır. Her yıl tanı konulan meme kanseri tiplerinin yaklaşık 170 000'in TNBC olduğu ve çoğu zaman, bazal benzeri meme kanseri olduğu tahmin edilmektedir[8]. Tanı alan meme kanseri vakalarının, 75% 'inin bazal benzeri olduğu tahmin edilmiştir.[9]

Cinsiyet meme kanseri için en güçlü risk faktörüdür [10]. Kalıtsal genetik değişiklikler, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık onda biri ile ilişkilidir. Diğer önemli risk faktörleri arasında yaş, üreme ve adet öyküsü, fiziksel aktivite eksikliği, obezite ve tip II diyabet sayılabilir [11]. Hem obezite hem de tip II diyabetli tüm kadınlar için meme kanseri riski %20'ye kadar artar. Gebelik diyabeti, veya ailede diyabet öyküsü de bir kadının meme kanseri riskini artırır. Obezitenin meme kanseri riski üzerindeki etkisi yaş ve etnik kökene de bağlıdır [12]. Premenopozal dönemde yüksek risk oluşturmaya da artan yaş ile hem obezite hem de tip II diyabet, hormon reseptör pozitif meme kanseri riskini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu kronik hastalıklar ayrıca, kötü prognoz ve hastalıkla ilişkili ölüm oranı ile de ilişkili bulunmuştur. Buna karşılık, obezite, Afrika kökenli Amerikalı kadınlarda meme kanseri riski ile anlamlı şekilde ilişkilidir[13]. Bu kadınlar genellikle standart kemoterapiye dirençli ve terapötik tedavileri hedef alan bir alt tip olan TNBC'yi geliştirir.[14]

### **2.2.2 Üçlü Negatif Meme Kanserinin Etiyolojisi**

TNBC tüm invaziv meme kanseri alt tiplerinin %12-17'sini temsil eder ve agresif bir patolojik profil ve zayıf klinik özellikleri ile karakterize edilir. Çeşitli araştırmalar, TNBC'lerde farklı molekülerin değişikliklerini tespit etmiş ve tümörü oluşturan hücrelerin (örneğin bazal ve claudin düşük alt tipleri) heterojenite gösterdiğini ortaya koymuştur. Genellikle genç kadınlarda ve Afrika ve Afrika kökenli Amerikan

kadınlarında görülen yüksek histolojik dereceye ve çoğalma oranına sahiptirler, hastaliksız hayatta kalma süresinin kısılması ve merkezi sinir sistemi dahil viseral organlarda daha sık metastaz yapma eğilimi vardır [15]. TNBC tanısı alan kadınların %20'sinde BRCA1 / BRCA2 mutasyonları bulunmaktadır. Bu oran aile öyküsüne ve tanı sırasına göre değişir, ancak meme veya yumurtalık kanserinden etkilenen akrabaları olmayan hastalarda bile % 10 civarında kalır. Yapısal BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında ortaya çıkan meme kanserlerinin yaklaşık % 60-80'i üçlü negatif fenotip gösterirken [16], BRCA2 taşıyıcılarında TNBC oranı genel popülasyonda gözlenene yakındır[17].

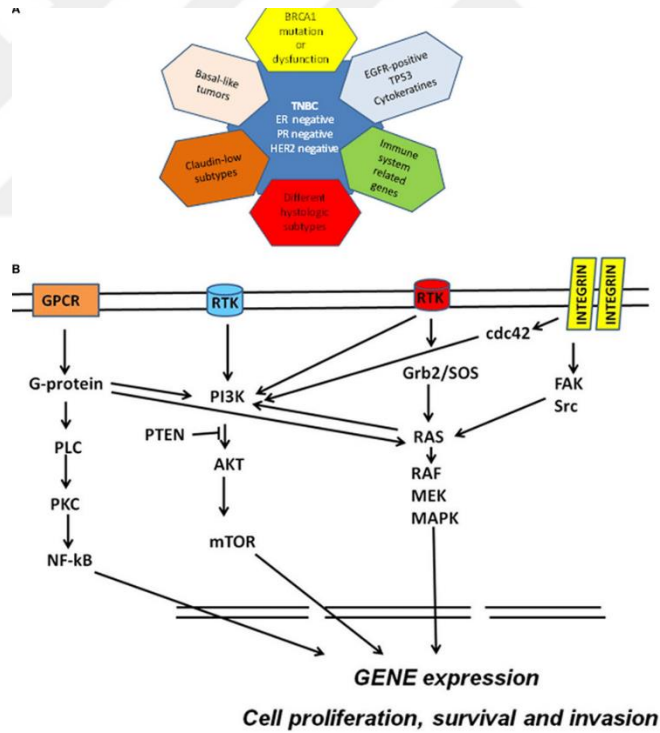
### 2.2.3 Üçlü Negatif Meme Kanseri Oluşumunun Moleküler Mekanizması

TNBC vakalarında (1) yüksek TP53 mutasyon sıklığı (% 80); (2) RB1 ve BRCA1'in kaybı; (3) PI3K yolunun yüksek aktivasyonu (yaklaşık olarak % 9'luk) PIK3CA gen mutasyonu ya da INPP4B ve / veya PTEN negatif düzenleyicilerinin kaybı); (4) artmış FOXM1 aktivitesi ve (5) bazal benzeri meme kanseri ve seröz over kanserleri arasındaki genetik benzerlik bulunmaktadır [18]. Bu benzerlikler arasında *ATM* ve *TP53* mutasyonları, *AKT3* ve *MYC* ekspresyonu, *BRCA1* ve *BRCA2* inaktivasyonu, *RB1* kaybı ve siklin *E1* amplifikasyonu bulunmaktadır. Terapötik hedefleme perspektifinden bakıldığında, bazal benzeri tümörlerin yaklaşık % 20'si platin ve / veya *PARP* inhibitörlerine duyarlılık kazandırabilir ve somatik *BRCA* mutasyonunu barındırmıştır. Amplifikasyonlar arasında *PIK3CA* (% 49), *KRAS* (% 32), *BRAF* (% 30) ve *EGFR* (% 23) bulunmaktadır. *FGFR1*, *FGFR2*, *IGFR1*, *KIT*, *MET* ve *PDGFRA*'da diğer daha az yaygın amplifikasyonlar görülmüştür. Yukarıda belirtildiği gibi, *PI3K* yolunun aktivasyonunu sağlayan *PTEN* ve *INPP4B*'de delesyonlar görülmüştür.[19]

Bu nedenle, farklı sinyal yolları kanser patogenezinde önemli roller üstlenir. *EGFR*'nin proliferasyon ve damar oluşumuyla yakından ilişkili olduğu ve klinik prognozla anlamlı şekilde korele olduğu ve aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiştir. *MAPK* sinyal yolağı, tümör proliferasyonunu düzenler, *MAPK*'nın, TNBC hücrelerine, apoptoz, proliferasyon ve direnç kabiliyeti sağlayabildiği ve anormal şekilde aktive olduğu gösterilmiştir. *PI3K / AKT / mTOR* sinyal yolu, kanserin proliferasyonunu, metabolizmasını, hayatta kalmasını ve hareketini kontrol eder ve

MAPK sinyal yolu ile sık sık iletişim kurar. DNA onarımı gibi diğer sinyal yollarının da TNBC'de düzensiz olduğu bildirilmiştir.

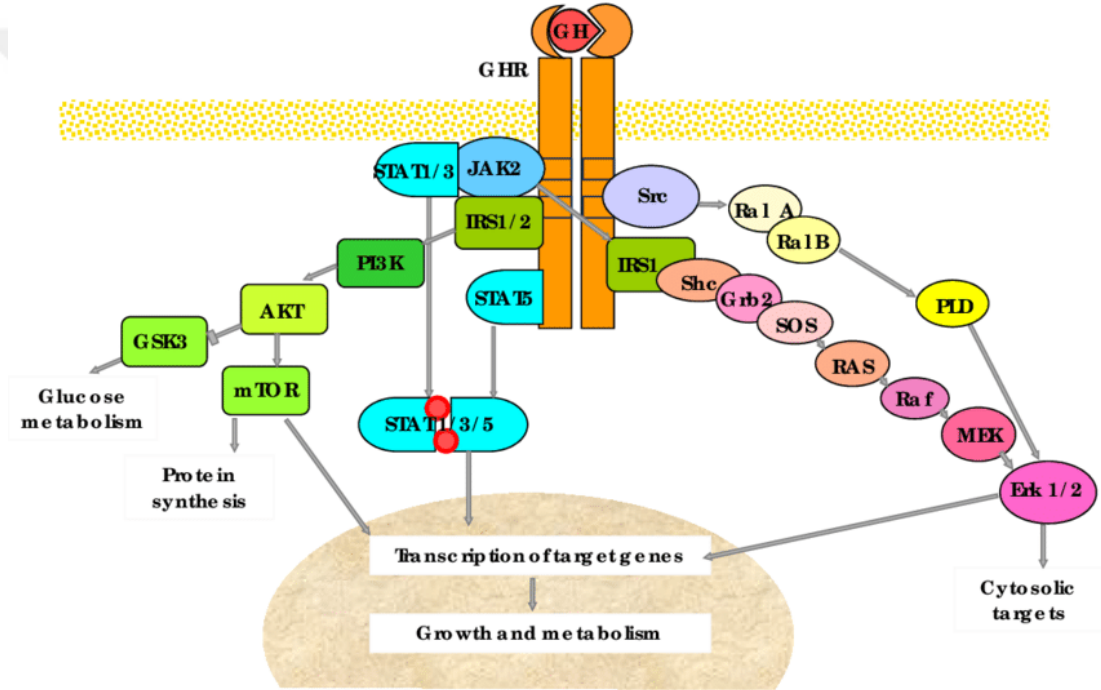
Meme kanseri duyarlılığı geni 1 (BRCA1), kalıtsal meme kanseri ile bağlantılı bir tümör baskılayıcı genidir. BRCA1 mutasyonu olan bir kişi, BRCA1 ile ilişkili meme kanseri denilen% 60-80 meme kanseri gelişme şansına sahip olabilir [20]. Metastaz, kansere bağlı ölümlerin ana nedenidir. Nükleoprotein türlerinden biri olan BRCA1'deki mutasyonların, tümör oluşumunu arttırdığı keşfedilmiştir. BRCA1'in TNBC'deki rolünü incelemek için, BRCA1 ile ilişkili PPI (Protein-protein interaction) ağı oluşturulmuştur. Sonuçlar, anlatımı artan genler tarafından kodlanan hiçbir protein BRCA1 ile etkileşime girmediğini fakat anlatımı azalan genler tarafından kodlanan 8 protein, AR, CDK12, KIAA0101, PCGF2, TOX3, HIST2H4B, MED1 ve ERBB2'nin BRCA1 ile etkileşime girdiğini göstermiştir [21]. Ek olarak, androjen reseptörünün ekspresyon seviyelerinde BRCA1 ile önemli bir etkileşim gözlemlenmiştir (Şekil 2.2.2.1)[22].



Şekil 2. 1. Üçlü Negatif Meme Kanserin oluşma mekanizması[23]

### 2.3 BÜYÜME HORMONU

Büyüme hormonu esas olarak hipotalamik büyüme hormonu salgılayan hormona cevap olarak ön hipofizden sentezlenir ve salgılanır. Plasental laktojen ve prolaktin ile birlikte büyüme hormonu, evrimsel olarak ilişkili peptid hormonlarının ailesine aittir. Bu aile üyeleri arasında, hipofiz prolaktin yoğun olarak çalışılmıştır. Prolaktin, normal meme ve meme kanseri gelişimi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik işlemlerde rol oynadığı gösterilmiştir [24]. Prolaktin'in Janus kinaz (JAK) / STAT yolağının aktivatörüdür, fakat aynı zamanda Ras-Raf-mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolu, fosfoinositid 3-kinaz / AKT sağkalım yolu ve Src kinaz sinyal yolu gibi diğer sinyal yollarını da etkiler (Şekil 2. 2.) [25].



Şekil 2. 3. Büyüme hormonu sinyal mekanizması [26]

Büyüme hormonu / prolaktin ailesinin bir diğer üyesi olan insan plasenta laktojeni meme kanserlerinde sıklıkla eksprese edilir. Lokal olarak üretilen plasental laktojenin meme kanserindeki kesin rolü tam olarak anlaşılmamıştır, ancak bir meme kanseri biyobelirteç işlevi görmesi beklenir. İnsan plasenta laktojeni iyi huylu meme hastalığı olan hastaların serumunda veya normal kadınların serumunda tespit edilmezken, bazı meme kanseri hastalarının serumunda sıklıkla saptanır [27]. Buna karşılık, meme kanseri hastalarının serumlarının tespit edilebilir düzeyde insan plasenta laktojeni içermediği bildirilmiştir. Koyun, kemirgen ve balık gibi diğer türlerde, proliferin,

proliferin ile ilişkili peptid ve somatolaktin gibi faktörlerin de bu peptid hormonları ailesinin üyeleri olduğu düşünülmektedir. Proliferin'in, endotel hücrelerinin tüp oluşumunu ve invazif özelliklerini geliştirdiği için anjiyogenezin otokrin düzenleyicisi olduğu öne sürülmüştür. Proliferinin bu proanjiyogenik etkisine STAT5 aracılık eder [28]. Öte yandan, proliferin ile ilgili protein, gastrik hücreli karsinomun proliferasyonunu, hareketliliğini ve tümörijenliğini inhibe eder.

İnsanlarda, büyüme hormonu geni, kromozom 17'nin uzun kolunda bulunur ve uzunluğu yaklaşık 3000 nükleotittir [29]. Büyüme hormonu prekürsör proteininden, amino terminalin çıkarılmasıyla elde edilir; bu, 191-amino asit proteini ile 22 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Alternatif eklemelere bağlı olarak 20 kDa'lık bir büyüme hormonu değişkeni de mevcuttur ve salgılanan toplam büyüme hormonunun %5 ila %10'unu oluşturur [30]. Büyüme hormonu reseptörü, sınıf I sitokin reseptörü süper ailesine ait bir zara bağlı reseptördür. Büyüme hormonunun ayrıca prolaktin reseptörlerine bağlandığı ve bir küçük modelde plasenta laktojen reseptörlerini bağladığı, akış aşağı sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir. Büyüme hormonunun büyüme hormonu reseptörüne bağlanması, hücre büyümesi ve hayatta kalmak için hayati olan çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Reseptörüne bağlanan büyüme hormonu, Janus kinaz-2'nin (JAK2) daha fazla bağlanmasını kolaylaştırır. Bu bağlanma hem JAK2'nin hem de büyüme hormonu reseptörünün fosforilasyonunu aktive eder. Aktif hale getirilmiş GHR / JAK2 kompleksi, çeşitli sinyal proteinlerinin toplanmasıyla birkaç sinyal iletim yolunu etkiler. GHR / JAK2 kompleksinden etkilenen ana yollar, STAT sinyal yolu, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sinyal yolu, fosfininoid 3-kinaz / AKT sinyal yolu içinde yer alan insülin reseptör substrat proteinleri ve MAPK sinyal yolu içerir [31]. Ayrıca, protein sentezinin büyüme hormonu tarafından hızlı aktifleştirilmesinin mTOR'un aracılık ettiği gösterilmiştir. Genel olarak, büyüme hormonu / büyüme hormonu reseptörü sinyallemesine hücre çoğalması, hayatta kalma, metabolizma vb. İçin gerekli olan birçok hayati sinyal iletim yolu aracılık eder [32]. Büyüme hormonu sinyalinin değiştirilmesi, kanser gibi patolojilere yol açan çeşitli yolların düzenlenmesi ile sonuçlanır [33].

## 2.4 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE BÜYÜME HORMONUNUN ETKİSİ

Meme bezi ergenlik, hamilelik, emzirme sırasında büyük değişiklikler geçirir. Başlangıçta doğumda, meme bağı bir ana kanaldan ve birkaç ikincil dallanma kanalından yapılır. Ergenliğe kadar, meme bezinin kadınlarda ve erkeklerde gelişimi benzerdir. Kadınlarda, ergenlik döneminde, duktal uzama ve dallanma açısından anlamlı bir duktal gelişme meydana gelir [34]. Meme bezi yumurtalık döngüsü sırasında değişikliklere uğrar. Meme bezinin ana farklılaşması ve lobuloalveoler büyümesi hamilelik sırasında meydana gelir ve laktasyon boyunca korunur. Sütten kesilmeden sonra, meme bezi, çözülme sürecine maruz kalmaktadır, bu da çoğunlukla gerileyen kanallara ve az sayıda lobuloalveoler yapıya sahip bir bezle sonuçlanmaktadır. Endokrin sistem, meme bezinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Yumurtalıktan salgılanan hormonları östrojen ve progesteron normal meme bezlerinin gelişiminde çok önemli rol oynar. Yumurtalık hormonlarına ek olarak, büyüme hormonu ve prolaktin gibi hipofiz hormonları da meme bezinin büyümesini etkileyen ve laktasyon sürecinde önemli bir rol oynar. [35] Daha önce, yumurtalıkları alınmış hayvanlarda, östradiolün meme bezi büyümesini geri kazanabileceği, ancak östrojen replasmanının yumurtalıkları alınmış ve hipofizektomize edilmiş hayvanlarda meme bezlerinin gelişimini geri kazanmada etkili olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, hipofizektomize ve yumurtalıkları alınmış fareler kullanılarak, tek başına büyüme hormonunun, meme duktal gelişimini indükleyebildiği ve büyüme hormonu ve östrojen birlikte uygulandığında bu etkinin daha büyük olduğu gösterilmiştir[36]. Ek olarak, saf büyüme hormonu, prolaktin ve plasental laktojen preparatları kullanılarak, büyüme hormonunun meme büyümesini arttırmada etkili olduğu, prolaktin ve plasental laktojenin etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, büyüme hormonu reseptörünün inhibe edilmesi, gecikmiş kanal gelişimi ve azalmış yan dallanma ile kanıtlanan, meme bezindeki büyümenin bozulmasına neden olmuştur. Büyüme hormonunun ayrıca lobuloalveolar gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Büyüme hormonu eksikliği olan sıçanlara ve farelere büyüme hormonu verilmesi, meme bezi büyümesini yeniden sağlamıştır. Diğer yandan, büyüme hormonunun inhibisyonu, meme bezlerinin büyümesini olumsuz yönde etkilemiştir. [37] Ayrıca, otokrin büyüme hormonunun da meme bezlerinin büyümesini etkilediği gösterilmiştir. Büyüme hormonu ve reseptörü ekspresyonu ergenlik döneminde yüksektir ve büyüme



hormonunun aşırı ekspresyonu, erken meme bezinin gelişmesine yol açar. Genel olarak, tüm bu bulgular, meme bezi gelişiminde büyüme hormonunun önemini göstermektedir [33]. Endokrin ve otokrin / parakrin BH normal meme bezlerinin büyümesini ve laktasyon sürecini etkiler; hem tek başına hem de östrojen ve progesteron ile birlikte etki eder. İnsanlarda, BH ayrıca prolaktin reseptörünü (PRLR) bağlayabilir ve aktive edebilir ve göğüs kanseri hücrelerinde, BH sinyal iletimini modüle eden PRLR ile heterodimerler oluşturabilir. BH'in meme gelişimi üzerindeki birçok etkisine, özellikle IGF-I'in IGF-I aracılık ettiği, ancak BH'in göğüs kanseri hücre hatlarında IGF-I'den bağımsız proliferatif etki gösterdiği anlaşılmaktadır. BH'in meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını, sağkalımını, invazyonu ve vaskülarizasyonu arttırdığı ve östrojen reseptörü-negatif meme kanserlerinde bile metastatik büyümeyi desteklediği, kemodirence neden olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, gen ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinde eksojen ve otokrin BH tarafından farklı şekilde düzenlenebilir ve daha agresif bir hücre fenotipi teşvik eder. İnsanlarda meme kanseri hücrelerinde daha yüksek BHR ekspresyonu gözlenmiştir ve BH'in tümör anlatımı, metastatik meme kanseri ve zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir. IGF-I ve IGF-IR'nin aşırı anlatımı ayrıca insan meme kanserlerinde belgelenmiştir ve bazı çalışmalarda hepsi olmasa da, malign ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, bir genomwide'in dernek çalışması, BH kaynaklı hücre içi sinyal yollarını 3962 gen içeren 421 yollar arasında meme kanseri duyarlılığı ile ilişkili olarak tanımlamıştır.[38].

## **2.5 BÜYÜME HORMONUNUN KEMODİRENÇTEKİ ROLÜ**

Çeşitli kanserlerin standart tedavi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Kanser hastalarının başlangıçta kemoterapiye yanıt verdiği, ancak daha sonra kemodirenci geliştirdiği bilinmektedir [39]. Kemodirenç gelişmesi kanserin tekrarlanmasına neden olur ve kemoterapinin başarısızlığı nedeniyle ölümlerle sonuçlanır. Kanser hastaları kemoterapötik ilaçlara içsel veya edinilmiş direnç gösterirler. Kemodirenç genellikle sitotoksik ilaçlara maruz kalmayı takip eder ve herhangi bir tedaviye cevap vermeyen agresif kanserlerin gelişmesine neden olur. İlaç akışı mekanizmalarını, değiştirilmiş sinyal iletim yollarını, genetik faktörleri, ilaçları metabolize etmek için kapasiteyi değiştirmeyi, vb. içeren kemodirenç gelişimini etkileyen birkaç faktör vardır. Bu bağlamda, kanser hücresi çoğalmasını, hayatta kalmasını etkileyerek, meme kanser

gelişimini uyarabilen büyüme hormonu, aynı zamanda kemodirenci artırma ile de ilişkilendirilmiştir. Büyüme hormonu, oksidatif stres yanıtı ve apoptoz gibi çeşitli işlemleri değiştirerek kemodirenç sağlar [40]. Otokrin büyüme hormonu, büyüme durması ve DNA hasarında rol oynayan çeşitli proteinleri değiştirerek kemodirencinin gelişmesine katkıda bulunur. Büyüme hormonu ayrıca, hepsi oksidatif stres kaynaklı apoptozda rol oynayan katalaz, glutamilsistein sentetaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz 1'i düzenleyerek kemo dirençliliği etkiler. Genel olarak, büyüme hormonu / büyüme hormonu reseptörü sinyalleri, metastatik büyümeyi destekleyen, kemodirenç indüklenmesinde önemli bir rol oynar [33].

## **2.6 BÜYÜME HORMONUNUN METASTAZDAKİ ROLÜ**

Kanser hücrelerinin kan ve lenf damarları yoluyla farklı organlara yayılmasına ve yeni bir koloni oluşturmaya metastaz denir. Meme kanserlerinin çoğunda, büyüme hormonunun ve büyüme hormonu reseptörlerinin anlatımı artar, ancak metastatik meme kanseri sürecinde bu anlatım daha da artar [41]. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) metastaz için önemli bir adım olarak kabul edilir. Mezenkimal özelliklerin alınması, kanser hücrelerinin göç ve istila etme yeteneğini geliştirir. Epitel-mezenkimal geçişi ayrıca kanser hücrelerinin apoptoza direnç geliştirmesine yardımcı olur. Otokrin insan büyüme hormonunun, invaziv bir fenotiple sonuçlanan epitelyal meme kanseri hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Büyüme hormonu sinyali, bu süreçte yer alan birçok geni etkileyerek epitelyal-mezenkimal geçişi destekler ve ayrıca meme kanseri hücrelerinin büyümesini teşvik etmede önemli bir rol oynar[42]. Otokrin insan büyüme hormonu, metastazda önemli bir rol oynadığı düşünülen meme kanseri kök hücrelerini destekleyen onkojenik bir faktör olarak belirlenmiştir. İnsan büyüme hormonunun, tümör başlatma kapasitesini, göçünü ve meme kanseri hücrelerinin istilasını artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, büyüme hormonunun inhibisyonu, meme kanserinin başlatılmasını, ilerlemesini ve metastazını önlemek için potansiyel bir terapötik stratejidir [33].

## **2.7 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNİN TEDAVİSİ**

Günümüzde, TNBC için tedavi rejimi, antirasiklinlerin, taksanların ve platin ilaçların erken evre tedavi için uygulanmasını ve metastatik kanser tedavisi için taksanların, topoizomeraz II inhibitörlerinin ve antimetabolitlerin uygulanmasını içerir. TNBC için

son safha tedavi stratejisi ise immünoterapi, poli adenosin difosfat (ADP), riboz polimeraz (PARP) inhibitörleri gibi küçük molekül inhibitörleri, rapamisin (mTOR) inhibitörler, siklin bağımlı kinaz 4 ve 6 (CDK4 / 6) inhibitörleri, ve androjen reseptör bazlı hormon tedavisinden oluşmaktadır [43]. TNBC ile mücadele için bir farklı stratejiler sınırlı başarı ile sürdürülmekte ve bu nedenle minimal yan etkilere sahip daha verimli tedavi rejimleri bu noktada şarttır [6].

TNBC'li hastalar ER, PGR ve HER-2 gibi hedef reseptörlerin kaybı nedeniyle hormonal veya trastuzumab bazlı tedaviden fayda görmezler. Dolayısıyla, tek tek veya kombinasyon halinde cerrahi ve kemoterapi, mevcut tek yöntem gibi görünmektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar bazı reseptörleri yeni terapötik ilaçlar için hedef olarak tanımlamıştır [6].

### **2.7.1 Cerrahi**

Hastaların lumpektomi yerine mastektomi seçiminin daha olası olup olmadığını belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, genç yaş ve daha yüksek dereceli tümör ile ilişkilendirilirken cerrahi tedavi seçimini etkilemektedir. Cerrahiye karar verme geleneksel klinikopatolojik değişkenlere ve hastanın tercihinine dayanmaktadır. Freedman ve arkadaşları, TNBC'de meme konservatif cerrahi sonrası lokal nüks oranının diğer meme tiplerinin diğer alt tiplerine göre yüksek olmadığı ve dolayısıyla meme korumasına uygun adaylar oldukları sonucuna varmışlardır.[44]

### **2.7.2 Radyoterapi**

Geleneksel olarak radyoterapi, mastektomi veya konservatif meme cerrahisi sonrası diğer meme kanseri alt tiplerinde olduğu gibi TNBC'de verilmektedir, ancak bu konuda hala tartışmalar vardır. TNBC hızla büyüyen ve lokal olarak agresif kanserler olduğu için, erken evrede (T1-2N0) radyasyon tedavisi ile takip edilen cerrahi, diğer meme kanseri türlerinde olduğu gibi mastektomiye eşdeğer olmayabilir. Bununla birlikte, Abdulkarim ve diğerleri, TNBC'li kadınların BRCA1 geninde patojenik bir mutasyona sahip olduklarını ve fonksiyonel BRCA1'den yoksun tümörlerin, homolog rekombinasyon ile DNA kırılması onarımında yetersiz olduğunu ve potansiyel olarak yüksek derecede radyosensitif olduklarını bildirmiştir. Cerrahi, radyoterapi ile takip edilirse, meme ve çevresindeki doku gizli BRCA1 eksikliği olan tümör odaklarını yok edebilir ve böylece bu hastalarda nüksü azaltabilir.[45]

### 2.7.3 Kemoterapi

Bazı raporlar kemoterapiye diğer meme kanseri türlerinden daha iyi yanıt verdiklerini gösterse de prognoz zayıf kalmaktadır. Bunun nedeni olarak: adjuvan ve neoadjuvan terapi ile kısaltılmış hastaliksız aralık ve metastatik ortamda daha agresif bir seyir gösterilmiştir. TNBC'nin tedavisi için terapötik stratejiler platin bileşikler ve taksanlar olup, antrasiklinler ve hedefli tedavilerdir. Ayrıca birçok neoadjuvan çalışma, yeni antimetabolitler ve yeni mikrotübül stabilize edici ajanlar gibi kemoterapötiklerin standart kemoterapiyle birleştirilmesinin faydasını belirlemeye çalışmıştır. [46][47]

Neoadjuvan tedavi, geleneksel adjuvan tedaviye kıyasla daha az hasta tahakkukları kısa sürede tedavi etkinliğinin modelin sunar. Neoadjuvan kemoterapi çalışmaları, TNBC'de TNBC dışı hastalara göre daha yüksek yanıt oranları olduğunu ve patolojik tam yanıtın, TNBC için iyileştirilmiş uzun vadeli sonuçları öngördüğü gösterilmiştir. ER negatifliği ve yüksek Ki-67 ekspresyonu gibi neoadjuvan kemoterapiyle klinik ve patolojik duyarlılıkla ilişkili olduğu gösterilen TNBC'ye özgü çeşitli özellikler vardır. Ayrıca, neoadjuvan tedavi, tümör tepkilerini belirleme fırsatı sunar. PCR şimdi neoadjuvan kemoterapinin etkinliğini değerlendiren klinik çalışmalarda önemli nokta olarak kabul edilir.[48]

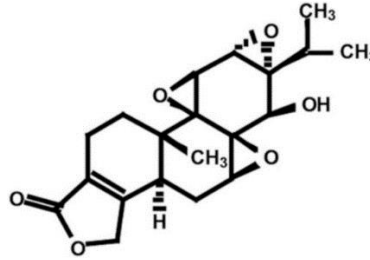
Dees ve ark. neoadjuvan antrasiklin-siklofosfamid bazlı kemoterapi için ER- ve HER-2 negatif hastalarda diğer alt tiplere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Buna rağmen, HER-2-pozitif / ER-negatif alt tipleri, ER-pozitif alt tipleri olan hastalara kıyasla, belirgin bir genel sağkalım azalmıştır. Le Tourneau ve arkadaşları, antrasiklinlere uygulanan artmış yanıt oranları, uygulanan kemoterapinin dozunu artırılmasıyla sonucu elde edilebileceğini göstermiştir[49]. Bazı çalışmalarda sisplatin ve mitomisin dahil olmak üzere DNA hedefli terapiye alışılmadık derecede duyarlı olduğunu ve bu duyarlılığın, BRCA1 artan anlatımı veya BRCA1 fonksiyonunun restorasyonu ile tersine çevrildiğini göstermiştir. [50]

#### 2.7.3.1 TNBC'de adjuvan kemoterapi

TNBC'de erken evre kemoterapinin optimize edilmesinin önemi, 3 yıl içerisinde tekrarlama riskinin artması, uzak metastaz ve beyin metastazı riskinin artması, uzak tekrarlardan ölüme hızlı bir ilerleme ile ve tedavi için doğrulanmamış hedeflerden kaynaklanmaktadır.[51]

## 2.8 TRIPTOLİD

*Celastraceae* familyasından *Tripterygium wilfordii* kök ekstraktından izole edilen diterpen triepoksit olan Triptolid, yan etkilere sahip etkili bir antikanser ilacı olarak önem kazanmıştır. Triptolid, Çin tıbbında romatoid artrit, lupus, Behçet hastalığı, sedef hastalığı ve merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [52]. Triptolid, antiproliferatif ve immünsüpresif özellikler dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir, ancak kesin hedefleri anlaşılmamıştır. Triptolid tedavisinin, akciğer, prostat, gastrik, pankreas ve yumurtalık kanserlerinin yanı sıra lösemi tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Gastrik kanserde hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak apoptozu artıran triptolid ve sisplatin kombinasyonu kullanıldığında sinerjik anti-kanser aktivitesi gözlemlenmiştir [6] [53]. Çok sayıda prelinik çalışmalarda *in vitro* ve farklı hayvan modellerinde güçlü anti-enflamatuar ve immünsüpresif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Dahası, triptolid bir süksinil türevinin, grefte karşı konakçı hastalığı önleyebileceği gösterilmiştir. Anti-enflamatuar ve immünsüpresif aktivitelerine ek olarak, triptolid ayrıca güçlü antitümör ve anti-lösemik aktiviteler sergilemiştir [54].



Şekil 2. 4. Triptolidin kimyasal yapısı.(Pubchem'den alınmıştır)

### 2.8.1 Triptolidin Moleküler Hedefleri

Triptolid tedavisi, insan meme kanseri kök hücreleri ve primer meme kanseri hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* sitotoksosite ile ilişkilendirildi. Triptolidle tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ERK aktivasyonunun aracılık ettiği otofaji ve apoptoz indüksiyonu rapor edildi. Triptolidle inhibe edilmiş vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), *in vitro* MDA-MB-231 ve Hs578T meme kanseri hücrelerinde anjiyogenez indüklemiş ve *in vivo* nude fare modelinde, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir [55]. Shaoet vd. triptolidle tedavi edilen MCF-7, BT-474 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptoz ile ilişkili indüksiyon sinyallerini Wnt /  $\beta$ -katenin sinyal yolları üzerinden bildirmiştir.

Başka bir çalışma, triptolidle muamele edilmiş MDA-MB-468 hücrelerinde Akt inhibisyon aracılı anti-proliferatif etki bildirmiştir. Triptolid'in ayrıca anti-apoptotik proteinleri X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörünü (XIAP) ve apoptoz protein1 / 2'nin hücrel inhibitörünü (cIAP1 / 2) inhibe ettiği gösterilmiştir [56]. Bilimsel çalışmalar bu nedenle kanser hücrelerinde triptolid tedavisiyle ilişkili antineoplastik etkilerde yer alan çoklu hücre sinyal yollarını göstermektedir [6].

### 2.8.2 Triptolidin Etki Mekanizmaları

Triptolid'in, anti-kanser aktivitelerini apoptozu tetikleyerek işlediği bildirilmiştir. Kemoterapötik sitotoksik ilaçlar genel olarak DNA hasarına neden olur ve onarılan DNA kırılmaları apoptozu ve hücre ölümünü tetikler [57]. Bilimsel çalışmalar, triptolidin, siklinler, sikline bağımlı kinazlar, kaspazlar, ısı şoku proteinleri ve hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinazların (ERK) proteinleri, nükleer faktör-kappa B (NFkB) ve anjiyogenez yolları gibi hücrel hedefleri hedefleyerek çoklu onkojenik ve tümör baskılayıcı yolları modüle etmedeki etkinliğini bildirmektedir [6]. Triptolid molekülünün C-14 beta-hidroksi ve gama bütirolakton kısımlarının, anti-enflamatuar özellikleri ve ayrıca sitotoksitesi için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Geçtiğimiz yıllarda yapılan moleküler biyolojik araştırmalar, MAP kinaz yollarının yanı sıra transkripsiyon faktörü NFkB *in vivo* ve *in vitro* olarak çeşitli hücrelerde enflamatuar tepkileri düzenleyen ana hedefler olduğunu göstermektedir.

Farelerde, triptolid, tümör nekroz faktörü a (TNF-a) / tümör nekroz faktörü reseptörü 2'de, kolondaki lenfositlerin 2 yolu ve NF-kB'nin aktivasyonunu ve ayrıca interferon (IFN) -g ifadesini inhibe eder. Triptolid, insan bronş epitel hücrelerinde TNF-a, interlökin (IL) -1b, IL-6 ve IL-8 üretimini ve ayrıca stafilokokal ekotoksinle uyarılmış T-hücresi çoğalmasımı ve IL-1b, IL-6, TNF'nin ekspresyonunu inhibe edebilir, IFN-g, monosit kemotaktikprotein (MCP) -1, periferal kan mononükleer hücrelerinden (PBMC'ler) salınan makrofaj enflamatuar proteini (MIP) -1 $\alpha$  ve MIP-1 $\beta$ . Pürin kutusu (box)/ antijen reseptör yanıt elemanındaki transkripsiyonu zayıflatarak, triptolid, IL-2 üretimini azalttı ve Jurkat T hücrelerinden salıverildi. Son zamanlarda triptolidin murin CD4 + T hücrelerinin Th17 hücrelerine doza bağımlı bir şekilde farklılaşmasını inhibe ettiği bulunmuştur. Triptolid, Th17 hücrelerinin gelişiminde rol oynayan kilit bir sinyal molekülü olan STAT3'ün IL-17 mRNA'sının ve IL-6'nın neden olduğu fosforilasyonunun transkripsiyon seviyesini düşürmüştür.

## 2.9 METFORMİN

Metformin (MET) ilk olarak 1920'lerde *Galega officinalis* tüketen çiftlik hayvanlarında düşük kan şekeri seviyesine sahip olması ile keşfedilmiştir. Daha sonra, kan glukozunu düşürmekten sorumlu olan bu aktif bileşiğin bir guanidin analogu olduğu tespit edilmiştir. Diyabet tedavisi için guanidinin sentetik homologları oluşturulmuş fakat, hepatotoksik olduğu kanıtlanmıştır. 1960'lı yıllarda guanidine olan ilginin artması, biguanid bileşikleri ailesinin yaratılmasına yol açtı. Fenformin, diyabetik hastalara verilen ilk biguanid aile üyesiydi; bununla birlikte kullanımı laktik asidoz gelişimi ile ilişkiliydi. Biguanid metformin, diyabetik hastalar tarafından fenformine göre daha iyi tolere edildi ve 1990'larda Tip 2 diyabetin tedavisi için Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylandı. En yaygın kullanılan biguanid ilacıdır ve göreceli olarak düşük toksisite ve yan etki insidansı vardır. MET, olası antikanser aktivitesi nedeniyle son yıllarda artan ilgi görmüştür. Prostat kanseri dahil birçok tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bir dizi *in vivo* deney, MET'in kanser hücresi büyümesini doğrudan etkilediğini ortaya koymuştur. MET, kanser hücrelerinin büyümesini azaltarak apoptozu ve hücre döngüsü durmasını tetikler. Bununla birlikte MET'in kemoterapiye duyarlılığı arttırdığını ve çeşitli kanser hücre hatlarında gerekli kemoterapi ilaç dozlarını azalttığını bildirdi [58]. MET, hepatik glukoz üretimini inhibe ederek, glikoz alımını ve iskelet kası tarafından kullanımını artırarak, periferik dokudaki insülin direncini azaltarak ve karaciğerdeki glukoneogenezi baskılayarak kan glukoz seviyelerini düşürür. İlaç prostat kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, özofagus kanseri, kolon kanseri ve melanom gelişimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, metformin kanser kök hücrelerini hedeflemede ve kanser metastazında kritik bir işlem olan epitelyal-mezenkimal geçişi ters çevirmede önemli bir rol oynar [59].

### 2.9.1 Metforminin Moleküler Hedefleri

MET, hiperglisemili diyabetik hastalarda kan şekeri seviyesini düşürdüğü için karaciğer, bağırsak ve iskelet kası üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. 2000'nci yılında yapılan bir araştırmada, MET'in mitokondrinin elektron taşıma zinciri I - kompleksi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir [60]. Ancak buna karşılıklı başka bir çalışma, metforminin mitokondriyal kompleks I üzerinde doğrudan bir etkisi olmadığını belirlenmiştir [61]. Sonuç olarak bu karşılıklı görüşler yıllarca devam etmiş ve bugünleri MET'in moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. LKB1 /

AMPK, adenilat siklaz, AMP deaminaz, NADPH oksidaz ve mitokondriyal gliserofosfat dehidrojenaz dahil olmak üzere çeşitli gruplar çeşitli hedefler önerilmiştir [61]. MET'in temel moleküler hedefinin aydınlatılması, 2014 yılında, kompleks I üzerindeki inhibitör özellikleri hakkında kesin kanıtlar yayınlanması ile olmuştur. Kompleks I, izole edilmiş mitokondri ve saflaştırılmış kompleks I eksprese etmeyen kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmaları içermektedir. Günümüzde MET'in doğrudan moleküler hedefinin kompleks I olduğu kabul edilir. Önerilen diğer etkilerin ve MET'in hedeflerinin birçoğu, kompleks I inhibisyonunun neden olduğu NAD / NADH'deki bir değişim ile açıklanabilir, bu da hücrel NAD / NADH'nin ince dengesine bağlı olan enzimlerin aktivitesinin azalmasına neden olur. MET'in hücreler üzerindeki etkisi kısmen deneysel sistemlerde kullanılan çeşitli konsantrasyonlarla açıklanabilir.[62]

### **2.9.2 Metformin Kanser Hücrelerindeki Etki Mekanizmaları**

MET'in kanser hücrelerinde etkisinin en yaygın olarak bilinen mekanizması, hem AMPK'ya bağımlı hem de bağımsız olarak, mTORC1 inhibisyonudur. MET'in ayrıca farklı kanser hücrelerinde onkojenik sinyal yollarını azalttığı gösterildi. Örnek olarak STAT3, büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Smad2 / Smad3 inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir [63]. MET'in microRNA 193b'nin anlatımını arttırarak, yağ asidi sentaz enziminin (FASN) anlatımını düşürdüğü gösterilmiştir. MET ayrıca kolesterol sentezini ve EGFR sinyalini de inhibe etmektedir [14].

Oral bir antidiyabetik ilaç olan MET, birçok klinik çalışmada kemoterapiye yardımcı bir ilaç olarak değerlendirilmektedir. Diyabetik hastalarda yapılan çalışmalar, MET'in bazı tip meme kanserlerinde sağkalımı uzattığını ve üçlü negatif meme kanseri üzerinde önemli bir etkisi olmadığını öne sürmüştür [64]. Bununla birlikte, MET mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I'e bağlanarak doğrudan kanser hücrelerini hedefleyebilir, böylece oksidatif fosforilasyonu baskılayabilir. Ayrıca, MET, mitokondriyal besin metabolizmasını hafifleten ve glikolize bağımlılıklarını arttıran kanser hücrelerinde glutamin türevli karbonun indirgeyici karboksilasyonunu indükler. Glikolizin inhibisyonu, muhtemelen ana etki mekanizmasıdır, ancak yeni çalışmalar 2-deoxy glukoz'un (2-DG) da spesifik olmayan etkileri olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, MET ve 2-Deoksi-Glukoz, AMP konsantrasyonlarını arttıran



ve AMPK aktive eden enerji krizi yaratır. AMPK aktivasyonu, kanser hücreleri aynı anda her iki bileşik ile tedavi edildiğinde arttırılır [65]. Bununla birlikte, her iki bileşik ile kombine tedavi, sinerjik olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamasına rağmen, mutlak olarak hücre ölümüne sebebiyet vermeyebileceği gösterilmiştir [66].

## 2.10 APOPTOZ

Apoptoz, nekrozun aksine, bir hücrenin belirli uyarılarından sonra aktif bir şekilde ölüm yolunda ilerlemesi durumunu tanımlamak için kullanılır. Apoptoz, 1970'lerde Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlandığından beri, biyolojik araştırmalarda en çok araştırılan süreçlerden biri olmaya devam etmektedir. Çok seçici bir işlem olan apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda önemlidir (Tablo 2.2) [67]. Apoptozis, hücre zarı şişmesi, hücre büzülmesi, nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşması ve kromozomal DNA parçalanması ile karakterize bir programlanmış hücre ölümü türüdür. İki temel apoptotik sinyal yolu vardır: dışsal(extrinsic) ve içsel (intrinsic) yollar [68]

Tablo 2. 2. Fizyolojik ve patolojik koşullarda apoptoz

<u>Fizyolojik koşullar</u>
Doku şekillendirilmesi amacıyla embriyonik gelişme programlanmış hücre yıkımı
Endometriyumun dökülmesi, emziren memenin gerilemesi gibi fizyolojik evrim
Bağırsak epitelinde olduğu gibi replasman proliferasyonun eşlik ettiği hücrelerin normal imhası
Timusun erken yaşta evrimi
<u>Patolojik koşullar</u>
Antikanser ilaç tümörlerde hücre ölümüne neden oldu
Sitotoksik T hücresi, immün reddedilme ve konakçı hastalığa karşı gibi hücre ölümüne neden oldu
AİDS'te progresif hücre ölümü ve CD4 + hücrenin tükenmesi
Hepatit B veya C gibi virüs kaynaklı bazı hücre ölümleri
Orşiektomi sonrası prostatik atrofi gibi uyarıcıların çıkarılması sonucu organ ve dokuların patolojik atrofisi
Radyasyon, hipoksi ve hafif termal yaralanma gibi zararlı ajanlar nedeniyle hücre ölümü
Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi dejeneratif hastalıklarda hücre ölümü
Miyokard enfarktüsü gibi kalp hastalıklarında meydana gelen hücre ölümü

### 2.10.1 İntrensik (içsel) apoptoz

İçsel apoptotik yol, DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli hücre içi uyaranlarla aktive edilir. Prokaspaz-9, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve sitokrom c'den oluşan apoptozom adı verilen bir kompleksin oluşumuna dayanır. Bax, Bak, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi bir dizi Bcl-2 ailesi üyesi mitokondriyal membran geçirgenliğini düzenleyerek sitokrom c salınımını kontrol eder (Tablo 2.3) [68]

Tablo 2. 3. İntrensik apoptotik yolakta görevli moleküller

Gen	Açıklaması	Kanser metastazı ile ilişkisi (temsili örnekler).
<b>İçsel apoptotik yol</b>		
Apaf-1	Önemli apoptosome bileşeni	Apaf-1 gen haploins yetmezliği kolorektal karsinom progresyonu ve hepatik metastaz ile koreledir.
Bcl-2	Mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eder	Pulmoner metastatik yük, Bcl-2 transfektanları ile aşıl原因mış farelerde çarpıcı bir şekilde arttırıldı. Bcl-2'nin yüksek nükleer ekspresyonu, hepatoselüler karsinom metastazı artışı ile koreledir.
Bcl-xL	Mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eder	Bcl-xL aşırı ekspresyonu apoptoz direncine neden oldu ve primer tümör büyümesini değil, metastaz arttırıcı olarak görev yaptı.
Bax	Mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eder	Bax ekspresyonu, metastatik kolorektal kanser hücrelerinde belirgin şekilde azaldı. Bax inhibitörü-1, kanser metastazın arttırmıştır.
Maspin	Serin proteaz inhibitörü	Beyin metastazlı meme kanseri hücrelerinde Maspin ekspresyonu azaldı. Maspin ekspresyonu azalması, farelerde kolorektal kanser ksenograftlarının büyümesini ve metastazını sınırladı.

Adından da anlaşılacağı gibi, intrinsik yolak hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyarıcılar, iç mitokondriyal yolun başlamasının bazı tetikleyicileridir. Uyarılara bakılmaksızın, bu yol artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının sonucudur. Bu yol, foliküler Hodgkin olmayan lenfomada 18 ila 14 kromozomunun translokasyonunun kromozomal kopma noktasında gözlenen *BCL2* geninden sonra adlandırılan Bcl-2 ailesine ait bir grup protein tarafından yakından düzenlenir [69]. Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır: pro-apoptotik proteinler (örn. Bax, Bak, Bad, Bcl-X'ler, Teklif, Bik, Bim ve Hrk) ve anti-apoptotik proteinler (örneğin, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) [70]. Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salıverilmesini bloke ederek apoptozu düzenlerken, proapoptotik proteinler, bu salıvermeyi teşvik ederek etki eder. Mutlak miktar değil, apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını belirleyen pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir[70]. Mitokondriyal intermembran boşluktan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz indükleyici faktör (AIF),kaspaz (Smac) 'nın ikinci mitokondri türevli aktivatörü, Düşük pI (DIABLO) ve Omi / yüksek sıcaklık gereksinimi proteini A (HtrA2) içeren doğrudan IAP bağlama proteini. Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive eder. Diğer taraftan, Smac / DIABLO veya Omi / HtrA2, daha sonra IAP'lerin kaspaz-3 veya -9 ile etkileşimlerinde bozulmaya yol açan apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörüne bağlanarak kaspaz aktivasyonunu teşvik eder [67].

### **2.10.2 Ekstrinsik (dışsal) apoptoz**

Apoptozun dışsal yolu, ölüm ligandlarının [örneğin, Fas ligandı (FasL), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligandın (TRAIL) ve TNF-a] TNF reseptör süper ailesinin ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır [68]

Tablo 2. 4 Ekstrinsik apoptotik yolda görevli moleküller

Gen	Açıklaması	Kanser metastazı ile ilişkisi (temsili örnekler).
FADD	Ölüm alıcılarının aracılık ettiği ölüm sinyallerini ileten anahtar adaptör	FADD'de somatik mutasyonlar, metastatik KHDAK tümörlerinde, karşılık gelen primer tümörlerden daha yüksek bir frekansta gözlemlendi. Yüksek FADD ekspresyonu, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda bölgesel ve uzak metastaz ile ilişkilidir.
FasL ve Fas	Anahtar ölüm ligand ve reseptörü	Fas-duyarlı melanom klonları yüksek oranda tümörjenikti, ancak vahşi tip sinjenik farelerde nadiren metastatiktir. Bununla birlikte FasL eksikliği olan farelerde hem insidans hem de metastaz sayısı artmıştır. Osteosarkom hücrelerinin akciğer metastazı oluşturma yeteneği, hücre yüzeyi Fas ekspresyonu ile ters orantılıdır.
sFas ve DcR3	Çözünür Fas ve FasL tuzak reseptörü	Gastrik karsinomlarda, serum DcR3 seviyeleri tümör farklılaşma durumu ve TNM sınıflandırması ile yakından ilişkilidir.
TRAIL	TNF ailesi ölüm ligandı	NK hücrelerini tüketmeyen veya TRAIL bloke edici bir antikora tedavi edilen fareler, spontan karaciğer metastazında önemli bir artış sergilemiştir.
DR4 ve DR5	TRAIL için ölüm reseptörleri	Farelerde TRAIL reseptörü eksikliği, primer tümör gelişimini etkilemeden skuamöz hücreli karsinomun lenf nodu metastazını arttırdı.
DcR1, DcR2 ve OPG	TRAIL tuzak reseptörleri	Tuzak reseptörlerinin tümör hücrelerinde ekspresyonu, TRAIL kaynaklı apoptoza karşı direnç için alternatif bir mekanizma olarak görev yaptı.

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolu, adından da anlaşılacağı gibi, ölüm ligandları bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlar. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmış olmasına rağmen, en iyi bilinen ölüm reseptörleri tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) olarak adlandırılan ilgili bir proteindir ve ligandları sırasıyla TNF ve Fas ligandı (FasL) olarak adlandırılır. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi bağdaştırıcı proteinleri ve ayrıca kaspaz-8 gibi sistein proteazlarını tutan hücre içi bir ölüm alanına sahiptir. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör proteini için bir bağlanma bölgesi oluşumu ile sonuçlanır ve tüm ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir. DISC daha sonra pro-kaspaz 8'in montajını ve aktivasyonunu başlatır. Enzimin aktive edilmiş şekli olan kaspaz 8, diğer akış aşağı veya yürütücü kaspazların parçalanmasıyla apoptozu başlatan bir başlatıcı kaspazdır (Tablo 2.5 ve 2.6) [67]. [68]

Tablo 2. 5. Apoptotik yolların düzenleyicileri

Gen	Açıklaması	metastazi ile ilişkisi (temsili örnekler).
<i>2. Apoptotik yolların düzenleyicileri</i>		
JNKs	Apoptozun çift rol düzenleyicileri	JNK'ler, kanser hücresi apoptozunu hücre tipine, uyarıcıya, JNK aktivasyonunun süresine ve diğer yolların aktivitesine bağlı bir şekilde indükler veya inhibe eder. JNK'lar, hem baskılayıcı hem de kanser metastazi destekleyicileri olarak ikili roller üstlendiler.
NF-κB	Transkripsiyon faktörü	Aktive edilmiş NF-κB, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, cIAP-1/2 ve c-FLIP dahil birçok anti-apoptotik geni ve birçok anjiyogenez ile ilgili genleri işlemden geçirmiştir. NF-κB aktivitesi, kanser metastazi ile yakından ilişkilidir.
p53 ve p63	Transkripsiyon faktörleri	p53, Fas, DR5, Bax, Bak ve Apaf-1 gibi pro-apoptotik genleri ve Bcl-2, Bcl-xL ve survivin gibi bastırılmış anti-apoptotik efektörleri düzenlemiştir. p53 kaybı veya mutasyonu, tümör metastazi teşvik etti. P53 kaybı, kanserojen kaynaklı kolorektal tümörlerin istila ve lenf nodu metastazlarına yol açmıştır. Mutant p53 ile etkileşerek, p63, tümörjenez ve metastazi bastırdı.
TGF-β, TβRI / II ve SMAD'ler	TGF-β yolak genleri	SMAD kompleksi, bir dizi apoptozla ilgili gen üzerinde işlem yaptı. TGF-β sinyalleri ayrıca ARTS ve Daxx-JNK yollarının aktivasyonu ile apoptozis oluşturdu. Tümör başlangıcından ve ilerlemenin erken evrelerinden önce, TGF-β sinyalleri bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmüş, ancak daha sonraki aşamalarda sıklıkla metastazi desteklemiştir.
MMP'ler	Proteinlerin belirgin ailesi	MMP'ler, ECM cirosunun düzenlenmesi, kanser hücresi göçü, hücre büyümesi, iltihaplanma ve anjiyogenezde rol oynamıştır. Ayrıca malign hücrelerde apoptozun apoptotik yollardaki ligandların veya reseptörlerin bölünmesi yoluyla indüklenmesini engelledi.

Tablo 2. 6. Kaspazlar ve kaspaz inhibitörleri

Gen	Açıklaması	metastazi ile ilişkisi (temsili örnekler).
<i>1. Kaspazlar ve kaspaz inhibitörleri</i>		
Kaspaz-8	Başlatıcı kaspaz	Kaspaz-8 nakavt Th-MYCN fareleri, kemik iliği metastazi olan gelişmiş nöroblastom geliştirmiştir.
Kaspaz-10	Başlatıcı kaspaz	Kaspaz-10 mutasyonları, lenf nodu metastazi olan KHDAC hastalarında tanımlandı.
Kaspaz-3	Efektör kaspaz	Kaspaz-3 protein düzeyi, NSCLC ( KHDAC) hastalarında lenf nodu metastazi ile negatif korelasyon gösterdi. Başka bir raporda, kaspaz-3 ekspresyonu ile gastrik karsinomlarda lenf nodu metastazi arasında ters bir ilişki tanımlanmıştır, ancak kaspaz-3 proteininin çoğu aktive olmamıştır.
IAP'ler (XIAP, survivin ve cIAP1 / 2)	Kaspaz inhibitörleri	Apoptoz inhibitörü protein XIAP'in artan seviyeleri, dolaşımdaki insan prostat kanseri metastatik öncül hücrelerinin anoikis direncine katkıda bulunmuştur. Yakın tarihli bir çalışma, XIAP ve survivin arasındaki moleküller arası işbirliğinin, tümör hücresi istilasını uyardığını ve metastazi teşvik ettiğini ve bu yolun, IAP aracılı hücre ölümünün önlenmesinden bağımsız olduğunu gösterdi.
DAPK	Kaspaz-3/6/7 upstream regülatörü	Birkaç metastatik kanserde DAPK anlatımının azalması veya inaktivasyonu gözlemlendi. Bazı durumlarda, DAPK anlatımının azalması metastatik nüks ile koreledir.

## 2.11 OTOFAJİ

Otofaji, hücre içi zar yapılarının, bu sitoplazmik bileşenleri bozmak ve yenilemek için protein kompleksleri ve organelleri içerdiği evrimsel olarak korunmuş katabolik bir süreçtir. Bu nedenle hücre büyümesinin düzenlenmesi ve iç homeostazı için kritik öneme sahiptir[71]. Otofaji fizyolojik olarak stres koşullarında hayatta kalmak için hücresel bir strateji ve mekanizmadır. Belirli koşullar altında aşırı aktive edildiğinde, aşırı otofaji hücre ölümüyle sonuçlanır (Tablo 2.7) [68]. Otofaji, açlık, gelişim, hücre ölümü ve tümör baskılanmasına uyum içinde işlev gören yanlış katlanmış proteinlerin ve hasar görmüş organellerin parçalanması ve yok edilmesi için fizyolojik hücresel bir süreçtir. Otofajinin önemli mekanizmalarından biri, otofagosom adı verilen çift membran veziküllerinin aracılık ettiği hücre içi bir bozulma yoludur. Bu otofagosomlar, stresli koşullar altında geri dönüştürülecek olan parçalanmış sitoplazmik bileşenleri lizozoma verir. Bu otofaji mekanizması, hücreleri hasarlı proteinlerden korumak, hücre organellerini toksinlerden korumak, hücre metabolizmasını ve enerji homeostazını korumak ve hücre yaşamını sürdürmek için gereklidir [72].

Tablo 2. 7. Memelilerdeki otofaji genleri

Mammals	Yeasts	Comments	References
<b>ULK1 protein kinase complex</b>			
<i>ULK1</i>	<i>ATG1</i>	Protein kinase, target of mTor kinase	(16)
<i>ATG13/APG13</i>	<i>ATG13</i>	Phosphorylated protein, target of mTor kinase	(33)
<i>FIP200</i>	<i>ATG17</i>	Essential for both stability and phosphorylation of ULK1	(31)
<i>ATG101</i>		Important for stability and basal phosphorylation of Atg13 and ULK1, conserved from <i>S. pombe</i> to mammals	(34, 35)
<b>Atg9-WIP1 complex</b>			
<i>ATG9A, B</i>	<i>ATG9</i>	Membrane-protein	(18, 42)
<i>WIP1-1,2,3,4</i>	<i>ATG18</i>	PI(3)P binding protein	(30, 45)
<b>Vps34-beclin1 class III PI3-kinase complex</b>			
<i>PIK3C3/VPS34</i>	<i>VPS34</i>	PI3 kinase that interacts with Rab5 and Rab7	(101)
<i>PIK3R4/VPS15</i>	<i>VPS15</i>	Core activator of the Vps34 PI3 kinase complex	(101)
<i>BECN1</i>	<i>ATG6</i>	Beclin1, one of the core subunits, bcl2-interacting protein	(17, 102)
<i>ATG14</i>	<i>ATG14</i>	Enhancer of autophagosome formation	(27, 102)
<i>UVRAG</i>	<i>VPS38</i>	Enhancer of autophagosome-lysosome fusion and endocytic traffic	(26)
<i>Rubicon</i>		Negative regulator of autophagosome-lysosome fusion and endocytic traffic	(28, 29)
<i>AMBRA1</i>		WD40 domain containing a positive regulator of autophagy	(40)
<b>Atg12 conjugation</b>			
<i>ATG12</i>	<i>ATG12</i>	Modifier conjugates with Atg5	(21, 22)
<i>ATG5</i>	<i>ATG5</i>	Target of Atg12 localizing to isolated membranes	(21, 22)
<i>ATG16L1,L2</i>	<i>ATG16</i>	Atg16L determines the site of LC3 conjugation	(54, 56)
<i>ATG7</i>	<i>ATG7</i>	E1-like enzyme for Atg12 and LC3/Atg8 conjugation	(21, 48, 51)
<i>ATG10</i>	<i>ATG10</i>	E2-like enzyme for Atg12 conjugation	(49, 53)
<b>LC3/Atg8 conjugation</b>			
<i>MAP1LC3B/LC3B</i>	<i>ATG8</i>	Modifier conjugating with PE and localizing to autophagosomes, LC3-A and LC3-C are isoforms	(23)
<i>GABARAP</i>	<i>ATG8</i>	Modifier, GABA <sub>A</sub> -receptor associating protein	(103)
<i>GATE-16</i>	<i>ATG8</i>	Modifier, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa	(104)
<i>GABARAPL1</i>	<i>ATG8</i>	Modifier, myotube-differentiation-specific	(57)
<i>GABARAP</i>	<i>ATG8</i>	Modifier, GABA <sub>A</sub> -receptor associating protein	(103)
<i>GATE-16</i>	<i>ATG8</i>	Modifier, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa	(104)
<i>GABARAPL1</i>	<i>ATG8</i>	Modifier, myotube-differentiation-specific	(57)
<i>ATG7</i>	<i>ATG7</i>	E1-like enzyme for Atg12 and Atg8/LC3 conjugation	(48, 51)
<i>ATG3</i>	<i>ATG3</i>	E2-like enzyme for Atg12 and Atg8/LC3 conjugation	(24, 58)
<i>ATG4A-D (autophagins 1-4)</i>	<i>ATG4</i>	Cytosolic cysteine protease for processing and recycling of Atg8/LC3	(24, 98)
<b>PI(3)P-related proteins</b>			
<i>ALFY/WDFY3</i>		FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes	(70)
<i>DFCP1/ZFYVE1</i>		Double FYVE-domain containing protein1, omegasome-localization for autophagosome-initiation	(105)
<i>FYCO1</i>		Rab7 effector binding to LC3 and PI(3)P and mediating microtubule plus end directed vesicle transport	(74)
<i>MTMR14</i>		Jumpy, PI3P phosphatase, negative regulator of autophagosome-initiation	(66)
<i>MTMR3</i>		PI3P phosphatase, negative regulator of autophagosome-initiation	(67)

### 2.11.1 Otofaji tipleri

Bugüne kadar, birden fazla otofaji tanımlanmıştır. Biyolojik süreçlerde en sıklıkla karşılaşılan ise: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofajidir [73]. Bu tez kapsamında makrotofaji ele alınacaktır.

### 2.11.2 Makrotofaji

Makrotofaji, substratların otofagosomlar olarak adlandırılan sitozolik çift membranlı veziküllerde tutulduğu bir tür otofajik işlemdir. Makrotofajinin substratları, gereksiz ve hasarlı organeller, sitosolik proteinler ve invazif mikroorganizmalardır. Makromoleküler bileşenleri geri dönüştürmek, elverişsiz koşullar altında hücre

canlılığını korumak ve çeşitli stres koşulları sırasında hücreyi korumak için enerji üretmek için sitozole geri salınır. Otofaji, hem morfolojik olarak hem de çekirdek otofaji makinesini oluşturan protein bileşenleri bakımından mayadan memelilere karşı yüksek oranda korunur [73].

Makrotofaji, ciro açlığın biyoenerjetik yönetimine katılan, hücrel bileşenlerin parçalanması ve geri dönüşümünün düzenlenmiş bir işlemidir. Makrotofaji sırasında, sitoplazmanın bir kısmı veya organellerin tamamı otofagosomlar adı verilen çift membranlı veziküllere ayrılır. Otofagosomlar nihayetinde lizozomlarla kaynaşır, böylece tek membranlı otofagolizozomları oluşturur ve bunların içeriğini azaltır. *Saccharomyces cerevisiae*'de, özellikle de genetik düzeyde yoğun bir şekilde çalışılmıştır Atg genleri olarak adlandırılan otofajiye ilişkin genlerin bulunmasına yol açmıştır. Bazı Atg proteinleri otofagosom oluşumunda rol oynamaktadır. Atg5 ve Atg12'nin E1 benzeri enzimler tarafından ilişkilendirilmesi Atg7 ve Atg10'un, diğer proteinleri otofagosomal membrana alması ve otofajik vakuölü, ilk önce maya için açıklanmıştır. LC3, maya Atg8'in memeli homologudur. Sitosolde (LC3-I) veya otofagosomal membranlarda (LC3-II) lokalize olan LC3-I ve onun proteolitik türevi LC3-II (sırasıyla 18 ve 16 kDa) olmak üzere iki formda bulunur [74]. Dolayısıyla LC3-II, lizozomlar ile füzyon yoluyla tahrip edilmeden önce otofagosomların bolluğunu tahmin etmek için kullanılabilir. Benzer şekilde, LC3 yeşil floresan proteini (GFP) füzyon proteini, oluşturulduğunda bir dağımaktan bir vakuolar düzenine yeniden dağıtır. Son olarak, Beclin 1 maya, Atg6 memeli homologudur. Beclin 1, trans-Golgi ağına yerleşir, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksine aittir ve otofagosom oluşumuna katılır. Beclin 1, sporadik meme, yumurtalık ve prostat kanseri olan birçok insan hastada monoalel olarak silinir. Ayrıca, Beclin 1 mutant fareler, spontan tümörlerin yüksek bir insidansı ve in vitro azalmış otofaji gösterir; bu, otofajinin (ve belki de otofajik hücre ölümünün) hücrel transformasyonu önleyebileceğini gösterir [75].

Memelilerde, Atg proteinleri beş alt gruba ayrılır: ULK1 protein kinaz kompleksi, Vps34-Beclin1 sınıf III PI3-kinaz kompleksi, Atg9-WIPI-1 kompleksi, Atg12 konjugasyon sistemi ve LC3 konjugasyon sistemi. Bu Atg genlerinin hiçbirinde bozulma olmadan otofaji, kinazlar, fosfatazlar, lipitler ve ATP'ye bağlı konjugasyon



dahil birçok protein kompleksinin sıralı bir reaksiyonunun, tüm otofaji işlemi için vazgeçilmez olduğunu gösterir. Vps34-beclin 1 sınıf III PI3-kinaz kompleksi, en az üç tipe, Atg14-Vps34-Vps15-beclin1, UVRAG-Vps34-Vps15-beclin1 ve Rubicon-UVRAG-Vps34-Vps15-beclin1 komplekslerine ayrılmıştır. Her bir kompleks, otofaji sırasında farklı bir fonksiyona bağlanır. TheAtg9-WIPI-1 kompleksi, bir Atg9 membran proteini ve WIPI-1'den oluşur. İki yaygınlaştırma benzeri reaksiyon, Atg12 ve LC3 konjugasyon sistemleri, otofagosomların başlatılması ve oluşumu için esastır.[76]

#### *2.11.2.1 Ulk1 protein kinaz kompleksi*

ULK1 protein kinaz kompleksi, ULK1 (bir protein kinaz), Atg13, FIP200 ve Atg101'den oluşur. mTOR kinaz, otofajiyi negatif olarak düzenlemek için Atg13'ü doğrudan fosforile eder. Atg101, Atg13 ve ULK1'in stabilitesi ve bazal fosforilasyonu için önemlidir. FIP200, ULK1'in stabilitesi ve fosforilasyonu için önemlidir. Atg13'ün, A14'ün mayalarda ön-otofagosomal yapıya alınmasından sorumlu olduğunu göz önünde bulundurarak, ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 kompleksinin memelilerde Atg14-Vps34 sınıf III PI3-kinaz kompleks ile etkileşime girmesi mümkündür[77].

#### *2.11.2.2 Vps34-Beclin PI3K- kompleksi*

Vps34-Beclin1 kompleksi, III. Sınıf PI3-kinazın bir çekirdek kompleksidir. Memelilerde, en az üç tip III. Sınıf PI3-kinaz kompleksi otofajiye katkıda bulunur. Atg14-Vps34-Vps15-beclin 1 kompleksi, otofagosom oluşumu için elzemdir ve UVRAG-Vps34-Vps15-beclin1 kompleksi, otofagosom olgunlaşması ve endositik trafikte pozitif olarak işlev görür. Buna karşılık, otofagosom olgunlaşmasını ve endositik trafiği negatif olarak düzenler. Beclin 1 ile düzenlenmiş otofajiyi aktive eden Ambra 1, otofajiyi düzenler ve embriyogenezde önemli bir rol oynar. Duyusal nöronlarda, Vps34 bağımsız otofaji kanonik olmayan otofaji yolu olarak bildirilmiştir [77].

#### *2.11.2.3 ATG12 konjugasyonu sistemi*

İlk ubiquitin-benzeri reaksiyon olan Atg12 konjugasyon sistemi, izolasyon membranının oluşumu ve uzaması için esastır. Atg12 ve ubiquitin'in amino asit sekansları birbirine benzemese de, Atg12 bir ubiquitin kıvrımına sahiptir. Atg12 konjugasyon sisteminde, Atg12, E1 benzeri bir enzim olan Atg7 tarafından aktive

edilir, E2 benzeri bir enzim olan Atg10'a aktarılır ve Atg12-Atg5 konjüгатlarını oluşturmak için Atg5'e konjuge edilir. Ubikuitinde olduğu gibi, Atg12'nin arabaxil terminali Gly, Atg7 ve Atg10'un aktif bölgesi Cys kalıntıları ile tiyoester bağlarının oluşumu için esastır ve ayrıca Atg5'teki Lys130residu ile amidbonların oluşumu için esastır. Bu nedenle, Atg12, yapısal ubikuitin kıvrımına sahip bir değiştiricidir. Atg16, bir multimerik kompleksi oluşturan Atg5 ile etkileşime girer. Birçok dokuda ve hücre çizgisinde, çoğu endojen Atg5 ve Atg12, Atg12-Atg5 konjüгатı olarak bulunur ve Atg12-Atg5 konjüгатı miktarında otofaji sırasında çok az artış gözlenir [77].

#### 2.11.2.4 LC3 lipidasyonu

İkinci ubikuitin benzeri konjüгasyon sistemi, LC3 konjüгasyon sistemi, hedefinin bir fosfolipid PE olması bakımından benzersizdir. Bu nedenle, LC3 konjüгasyon sistemine LC3-lipidasyon adı verilmiştir. LC3-II, ümit verici bir otofagosom marker olarak kabul edilir. LC3, karboksil terminali Fly açığa çıkana kadar LC3-I oluşturmak üzere Atg4B ile ayrılan pro LC3 olarak sentezlenir. LC3-I Atg7 ile aktive edilir, Atg3'e aktarılır ve son olarak PE'ye konjuge edilir. LC3'ün karboksi terminali Gly ayrıca Atg7 ve Atg3'ün aktif bölge Cys kalıntıları ile bir tiyoester bağının oluşturulması ve PE ile bir amid bağının oluşturulması için de esastır. Atg7 ve Atg3'ün aracılık ettiği reaksiyonlar LC3'ünkilerle benzerdir. Atg8 homologları ve maya Atg8 ayrıca Atg12'de olduğu gibi bir ubikuitin katına sahiptir, ancak amino asit sekansları Atg12 ve ubikuitininkinden farklıdır. Bu nedenle, bu Atg8 homologları, Atg7 ve Atg10 tarafından aktive edilen ikinci değiştiricilerdir. Çünkü LC3-I, sitozolde lokalize olup, LC3-II otofagosom halindedir, LC3-II, memelilerde ümit verici bir otofagosome markeridir. Otofagosomların sitoplazmik yüzeyindeki LC3-II, daha fazla otofagosom oluşumu için LC3-I'in geri dönüşümü için Atg4B ile harap edilir. Atg12-Atg5 konjüгатı ile olanların aksine, endojen LC3-II'nin miktarı otofaji sırasında değişir [77].

#### 2.11.3 Kanserde Otofajinin Rolü

Kanser biyolojisinde otofaji, tümör teşviki ve baskılanmasında çift rol oynar ve kanser hücresi gelişimine ve çoğalmasına katkıda bulunur. Bazı antikanser ilaçları otofajiyi düzenleyebilir. Bu nedenle, otofaji ile düzenlenen kemoterapi, kanser hücresinin hayatta kalmasında veya ölümünde rol oynayabilir. Ek olarak, otofajinin düzenlenmesi, tümör baskılayıcı proteinlerin veya onkogenlerin ekspresyonuna

katkıda bulunur. Tümör baskılayıcı faktörler mTOR ve AMPK tarafından negatif olarak düzenlenir, bu da otofajinin indüklenmesi ve kanser başlangıcının baskılanması ile sonuçlanır. Buna karşılık, onkojenler mTOR, sınıf I PI3K ve AKT tarafından aktive edilebilir, bu da otofajinin baskılanması ve kanser oluşumunun arttırılması ile sonuçlanabilir. Bu kanserlerde artmış otofajinin inhibisyonu, hücre proliferasyonunu azaltır ve tümör baskılanmasını teşvik eder. Bu nedenle, otofaji, tümörün başlatılması ve baskılanmasında rol oynar ve takip eden bölümlerde onkojenezin bir indükleyicisi ve bir tümör süpresörü olarak otofajinin çeşitli rollerini tartışılmaktadır [72].

Bazal otofaji seviyesi, hasarlı hücrel parçaların ve proteinlerin indirgenmesi ve hücrel homeostazın korunması yoluyla tümör baskılanması için bir mekanizma olarak işlev görür. Önceki çalışmalar, otofajiye bağlı BECN1 kaybı, çeşitli insan meme, prostat ve yumurtalık kanserlerinde gözlemlendiğini bildirmiştir. Beclin 1, fagforun oluşumunda önemlidir; bu, Beclin 1'in bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü gösterir. Kanser hücre hatları ve fare modellerinde, BECN1'in kaybı, otofajinin azalmasına ve hücre çoğalmasında bir artışa neden olarak BECN1 geninin bir tümör baskılayıcı olarak hareket ettiğini gösterir. Ek olarak, çeşitli çalışmalar, servikal skuamöz hücreli karsinomlar ve hepatoselüler karsinomlar gibi çeşitli kanserlerde Beclin 1'in seviyesinin azaldığını göstermiştir. Diğer çalışmalar, diğer anahtar otofaji genlerinin tükenmesinin kanserde tümör ilerlemesini baskıladığını bildirmiştir. BECN1 ile tümöre baskı yapan ve pozitif olarak otofajiyi düzenleyen, UV radyasyon direnci ile ilişkili gen (UVRAG) ve Bax etkileşimli faktör-1 (Bif-1) dahil olmak üzere çeşitli proteinler UVRAG'ın tükenmesi ve Bif-1 bozulmuş otofagozom oluşumu ve otofajinin azalması, kolon, mide, meme ve prostat kanserlerinde kanser hücresi çoğalmasının artmasına neden olur.

Otofajik çekirdek proteinlerinin nakavt olduğu farelerde, ATG5 ve ATG7'nin silinmesi, hasarlı mitokondri ve oksidatif strese bağlı olarak otofaj eksikliği olan hepatositlerden karaciğer kanseri oluşturur. Diğer çalışmalar, ATG3, ATG5, ATG9 gibi otofajik regülatör eksikliğinin onkogeneze ilişkili olduğunu göstermiştir. ATG4 te farelerin, kimyasal kanserojenlere maruz kaldıklarında fibrosarkom oluşumuna duyarlılıklarının arttığı gözlenmiştir. Ek olarak, otofaji, reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzenlenmesi yoluyla tümör oluşumunu önler. Mitokondri hasarı, aşırı ROS üretimine neden olarak kanserojenez oluşumunu teşvik eder. Bu sonuçlar, otofajinin,

tümör oluşumunu önleyen önemli bir mekanizma olduğunu ve bozulmuş otofajinin onkogenezele sonuçlanabileceğini göstermektedir.[72]

Bazı çalışmalar, otofajinin, ilerlemiş kanserlerde tümörün hayatta kalmasını ve büyümesini desteklediğini göstermektedir. Tümörler, hipoksi ve besin yoksunluğu dahil olmak üzere aşırı stresli koşullara maruz kalmaktadır. Otofaji, hücrelerin bu streslerin üstesinden gelmesine yardımcı olur. Otofaji, hücrelerin hipoksik koşullar altında bulunduğu katı tümörlerin orta kısmında aktive edilir. Beclin 1'in silinmesiyle otofajinin baskılanması hücre ölümünü artırır. Ek olarak, otofaji, metabolik substratları beslemek için hücre içi bileşenleri geri dönüştürerek çoğalan tümörlerin yüksek metabolik ve enerjik taleplerini yerine getirir. Hayvan çalışmalarında, otofajiye sahip olmayan hücrelerde metabolik stres gözlenir ve bu da hücre sağlığının bozulmasına neden olur. Bu nedenle, otofaji, tümörlerin metabolik taleplerini karşılamak için stres toleransını artırarak ve besleyici maddeler sağlayarak tümör hücresinin hayatta kalmasına katkıda bulunur ve otofajinin veya otofaji genlerinin yıkılmasının önlenmesi, tümör hücresi ölümüne neden olabilir.

Bazal otofajiyi yüksek tutan RAS mutasyonlu kanser hücrelerinde otofaji de artmıştır. RAS, proliferasyon, hayatta kalma ve metabolizma için önemli sinyal yollarında yer alan küçük GTPazlardır. RAS aktive edici mutasyon, tümör büyümesini, hayatta kalmayı ve onkogeneziyi artıran ve akciğer, kolon ve pankreas dahil olmak üzere bazı ölümcül kanserlerin gelişmesiyle ilişkili olan otofajiyi artırır. Bazı çalışmalar, RAS'ı aktive eden mutasyona uğramış hücrelerde yüksek düzeyde bir otofaji gözlendiğini ve hücre sağkalımının, besleyici açlık sırasında otofajiye bağlı olduğunu göstermiştir. Ek olarak, otofajiye bağlı proteinin inhibisyonu, hasarlı mitokondri birikimini artırır ve hücre büyümesini azaltır. Bu sonuçlar, otofajinin, RAS aktivasyonuna bağlı çeşitli tümörlerin hücre yaşamında önemli bir rol oynadığını göstermektedir [72].

Kanser hücreleri, vasküler ve lenfatik sistemler yoluyla yeni doku ve organların istila ve kolonizasyonu olan metastazlara girme yeteneğine sahiptir. Metastaz sırasında, orijin bölgesindeki kanser hücrelerinin ikincil bölgelere göç etme kabiliyeti artar. Birincil kanser hücrelerinde, otofaji hipoksi ve besin yoksunluğu ile indüklenir ve hücre nekrozu ve iltihabına karşı korur. Otofaji, pro-metastatik ve anti-metastatik etkileri göstermiştir. Otofaji, kanser metastazının erken evrelerinde kanser nekrozunun ve inflamasyon yanıtlarının sınırlandırılması yoluyla anti-metastatik bir rol oynar.

Erken metastazda, otofaji ayrıca kanser hücrelerinin yayılma ve kök bölgelerden göçünü azaltır. Bununla birlikte, metastazın ileri evrelerinde, otofaji, ikincil bölgelerde kanser hücresi sağkalımı ve kolonizasyonunun teşviki yoluyla metastatik bir rol oynar. Otofaji anti-metastatiktir. Beclin 1 ve LC3 gibi otofajiye bağlı genlerin yıkılması, meme kanserinde apoptoziye yol açan proliferasyon, göç ve istila inhibe edilir. Otofajinin ana düzenleyicisi olan ATG5 ekspresyonunda bir azalma, 158 primer melanom hastasında sağkalım oranını düşürdü ve ATG5 ekspresyonunda azalma, kanser hücresi proliferasyonunu artırır ve erken evre kanserin ilerlemesi ile ilişkilidir. Bir çalışma mTOR sinyalini bloke etmenin otofajik hücre ölümünü indüklediğini ve mide kanseri hücrelerinde metastazı inhibe ettiğini göstermektedir.

Otofaji ayrıca pro-metastatiktir. Metastaz yapmak için kanser hücrelerinin ECM yokluğunda hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi gerekir ve dolaşım sistemleri ve ikincil bölgelere yayılması da önemlidir. Kanser hücresi ölümü, anoikis adı verilen ECM ekinin kaybını takiben apoptoz ile indüklenir. Önemli kanıtlar, otofajinin ECM ile ayrılan kanser hücrelerinin anoikislerden korunmasını ve hayatta kalmasını sağladığını gösterir. Bir çalışma, otofajinin inhibisyonunun, bir akciğer metastazı modelinde hepatoselüler karsinoma metastazını azalttığını ve otofajinin inhibe edilmesinin sadece istila ve göçü azaltmakla kalmayıp aynı zamanda hepatoselüler karsinoma hücrelerinin anoikis direnci ve akciğer metastazını da azalttığını göstermiştir.[72]

### 3 MATERYAL VE METOD

#### 3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ

MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif, ER-) büyüme hormonu anlatımı bulunmayan meme kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection'dan temin edilmiştir. Hücreler %10 sıgır fetüs serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren DMEM besiyeri içerisinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri 0.22 µM por çapındaki hücrekültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır. Hücreler 25 ve 75 cm<sup>2</sup> 'lik hücre kültürü petrilerinde büyütülmüştür. Protein, RNA izolasyonları için 60 ve 100 mm'lik, floresan mikroskobu çalışmaları için de 96, 12 ve 6 kuyucuklu, 60 mm'lik hücre kültürü petrilerine ekimler yapılmıştır. Hücreler bir gece boyunca hücre kültürü petrilerine yapıştıktan sonra kullanılan ilaç belirlenen sürelerde uygulanmıştır ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 mm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü petrisi içerisine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. Petri kabı içerisine 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (%0,25) eklenerek CO<sub>2</sub> içeren etüvde 3-4 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir. İyi pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının ulunabilmesi için 10<sup>4</sup> ile çarpılmıştır. 1,5x10<sup>6</sup> hücre, 75 cm<sup>2</sup>'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.2 HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

3,3'Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC6) Boyama Atiprimodun MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla DiOC6 boyama gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 104 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 2µl triptolid ve 2µl metformin 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DiOC6 (ana stok: 4 mM) 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir. İlaç uygulamasının kaynaklı hücre ölümünü belirlemek amacıyla PI boyama gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 104 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 2µl triptolid, 2µl metformin ve ikisi kombine olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 2 ug/ml PI (ana stok:50 mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir. 4',6-diamidino -2-fenilindol (DAPI) Boyama uygulanan ilaçların MDA-MB- 231doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 104 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 2µl triptolid, 2µl metformin ve ikisi kombine olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1ul/ml DAPI boyası 30 dakika uygulanmıştır.<sup>34</sup> 5.Mitotraker/DAPI boyama Hücreler 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisine 3x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere 2µl triptolid, 2µl metformin ve ikisi kombine olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda mitotraker ve DAPI floresan boyası hücreler üzerine eklenmiş ve 30 dakika inkübasyon yapılmış ve floresan mikroskopunda görüntülenmiştir.

### 3.3 TRİPAN MAVİSİ İLE HÜCRE SAĞKALIMININ BELİRLENMESİ

Triptolid ve Metformin'in Mda-Mb 231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla hücre sağ kalım deneyi yapılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 2µl triptolid, 2µl metformin ve

kombine olarak 0-72 saat boyunca uygulanmıştır. 72 saat sonunda hücreler tripsin ile toplanarak 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Hücre pelleti 100 µl besiyeri ile çözülür. Çözülen pelletlerden 10 µl alınır ve 10 µl tripan mavisi ile karıştırılarak hemositometride sayımı yapılır.

### **3.4 ASILI DAMLA TEKNİĞİ**

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücreler 60 mm' lik petrilere her damlacıkta  $2,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde kontrol ve 2µl triptolid ve 2µl Metformin tek ve kombine olarak iki farklı petriye damlacık halinde ekilir. Kontrol hücreleri ve 2µl triptolid ile 2 µl metformin kombine ve tek olarak uygulanmasıyla ilaçlı hücreler ışık mikroskobunda 3 gün boyunca gözlenmekte ve damlacık çapı kaydedilmektedir. 3 günün sonunda damlacıklar DAPI ve DiOC6 floresan boya ile boyanıp 24 saat inkübe edilmektedir. 24 saat sonunda floresan mikroskobu ile damlacıklar gözlenmektedir.

### **3.5 PROPİDYUM İYODÜR BOYAMA VE FACS ANALİZİ**

Triptolid ve Metformin'in MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometresi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 2µl Triptolid, 2µl Metformin, kombine olarak ve tek olarak 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra %70 soğuk etanol ile muamele edilip fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fikse edilen hücreler 1-2 hafta boyunca -20 C'de inkübe edilmiştir. inkübasyon sonunda etanol uzaklaştırılarak 1ml 1X PBS içerisinde 1µl PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama yapılmıştır. Hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildikten sonra akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

### **3.6 YARA İYİLEŞTİRME YÖNTEMİ**

Triptolid ve metforminin MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde yara iyileşme potansiyeli üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra 200 ul'lik steril pipet ucu ile petri kabında bir yara oluşturulur. 0, 24 ve 48 saat boyunca yara



uzunluğunun değişimi ölçülmüştür. Asılı Damla metodu ile 3B sferoid hücre kültürü MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ hücreler 60 mm' lik petrilere her damlacıkta  $2,5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde kontrol ve 2mM metformin, 20nM triptolid ve triptolid metformin kombine olarak dört farklı petriyen damlacık halinde ekilmiştir. Kontrol hücreleri ve ilaçlı hücreler ışık mikroskobunda 3 gün boyunca gözlenmekte ve damlacık çapı kaydedilmektedir. 3'üncü günün sonunda damlacıklar DAPI, Pİ ve DiOC6 floresan boya ile boyanıp 24 saat inkübe edilmektedir. 24 saat sonunda floresan mikroskobu ile damlacıklar gözlenmektedir.

### **3.7 YUMUŞAK AGAR TEKNİĞİ**

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde 3 boyutlu ortam içerisinde koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla softa gar tekniği kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine %0,5'lik agar ve %20 FBS içeren besiyeri 1:1 oranda hazırlanarak dökülmüştür. Agar donduktan sonra  $3 \times 10^4$  hücre, 0,3%'lik agar ve medya ile alt ağarın üzerine ekim yapılmıştır. 10-15 gün inkübasyon sonrasında koloni çapları ışık mikroskobu altında ve DiOC6 boyaması ile belirlenmiştir.

### **3.8 KOLONİ FORMASYON DENEYİ**

6 kuyucuklu petriye  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılır. Ertesi gün 24 saatlik ilaçların uygulaması gerçekleştirilir. 24 saat ilaç uygulamasının sonunda hücrelerin normal medya ile değişimi yapılır. 10-14 gün sonunda medya uzaklaştırılır. Kuyucuklar 1X PBS ile yıkama yapılır. 3ml %100 metanol, 1ml asetik asit ile 5 dakika inkübe edilir. Kristal viole yüzeyi sarıcağ miktarda eklenip 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. 20 dakika sonunda distile su ile yıkanarak boya uzaklaştırılır. Kolonilerin çekimi gerçekleştirilir.

### **3.9 BRADFORD PROTEİN MİKTAR TAYİNİ**

Bradford tekniği, izole edilmiş proteinlerin miktar tayini yapmak için kullanılmıştır. Öncelikli  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  olarak sığır serum albümini (BSA) kullanarak standart değer eğri oluşturulmuştur. Bu eğri  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA'nın üzerine  $200 \mu\text{l}$  Bradford çözeltisi eklenerek 595nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür.

Elde edilen proteinler 1 µg/µl alınarak aynı dalga boyunda absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### **3.10 İMMUNOBLOTLAMA**

#### **3.10.1 Proteinlerin Hazırlanması**

İmmüno blotlama yöntemi için 20-25µg protein ile 5X-Laemli tamponu 1:4 oranında karıştırılıp 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. %4' lük yükleme jeli ve 12% ayırma jeli ile SDS-PAGE hazırlanarak, sistemde ilk kuyuda protein markeri olarak ve diğer kuyularda proteinler bu jele yüklenmiştir. 70 voltta 4 saat boyunca yürütülmüştür.

#### **3.10.2 Membrana Transfer ve Bloklama**

Yürütme işlemi bittikten sonra yükleme jeli kesilerek aynı büyüklükte olan poliviniliden florid (PVDF) membran jelin altına koyulmuştur. Membranın altına ve jelin üstüne transfer tamponu ile ıslatılan filtre kağıtları yerleştirilir ve bu sistem transfer kasetine yerleştirilir. Bio-Rad firmasına ait cihazı ile hedef kDa'ya göre farklı sürelerde amper uygulanarak transfer gerçekleştirilmiştir. Protein transfer edilen PVDF membranları %5 yağsız süt kullanılarak bloklanmıştır.

#### **3.10.3 Primer ve Sekonder antikor İşaretlemeleri ve Bantların görüntülenmesi**

5% yağsız sütte bloklanmış membranlar primer antikorlarda gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:250-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:3000 aralığında çalışılmıştır (CST). Primer antikor uygulandıktan sonrası membranlar 10 dakika boyunca oda sıcaklığında 3 kez 1xTBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkama bittikten sonra membranlar anti-tavşan veya anti-fare ikincil antikorlar ile (1:3000) gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilip 3 kez 1xTBS-Tween ve 1xTBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında, örnekler kemiluminisans tamponu (ECL) (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 3 dakika muamele edilmiştir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenmiştir.

#### **A Çözeltisi**

9 ml dH<sub>2</sub> O içerisine 1ml 1M Tris-HCl ( pH:8,5), 75 µl kumarik asit ve 150 µl luminol

kimyasalları ilave edilerek hazırlanır.

### **B Çözeltisi**

9 ml dH<sub>2</sub> O içerisine 1ml 1M Tris-HCl ( pH:8,5) ve 15 µl H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> kimyasalları ilave edilerek hazırlanır.

Bu her iki çözelti hazırlandıktan sonra karıştırılarak karanlık koşullarda bekletilmiştir.

### **3.11 İSTATİKSEL ANALİZ**

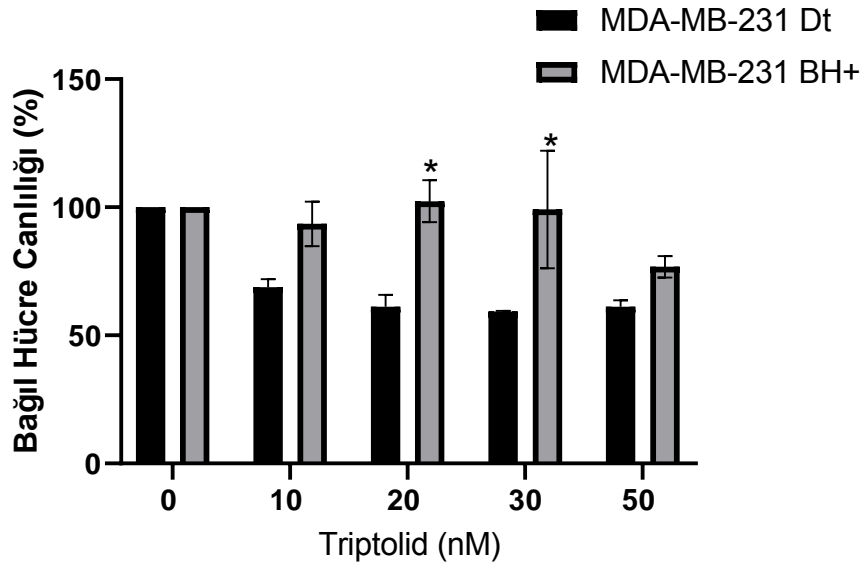
Tüm tez boyunca gerçekleştirilen MTT hücre canlılık testi, asılı damla modeli analizi, yara iyileşme gibi deneylerden elde edilen sayısal veriler GraphPad Prism 6 kullanılarak grafik haline dönüştürülmüş ve istatistiksel olarak analizleri bu program sayesinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz olarak İki yönlü ANOVA Bonforreni testi kullanılarak analiz sonuçları gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri olarak “p değeri” kullanılmıştır. p değerleri sırasıyla \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001 olarak verilmiştir. MTT hücre canlılığı analizi üç kez, asılı damla modeli ve yarı akışkan agar deneyi ise iki kez tekrarlanan deney ortalamasına göre belirlenmiştir.



## 4 SONUÇLAR

### 4.1 DOZA BAĞLI TRIPTOLİD UYGULANMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

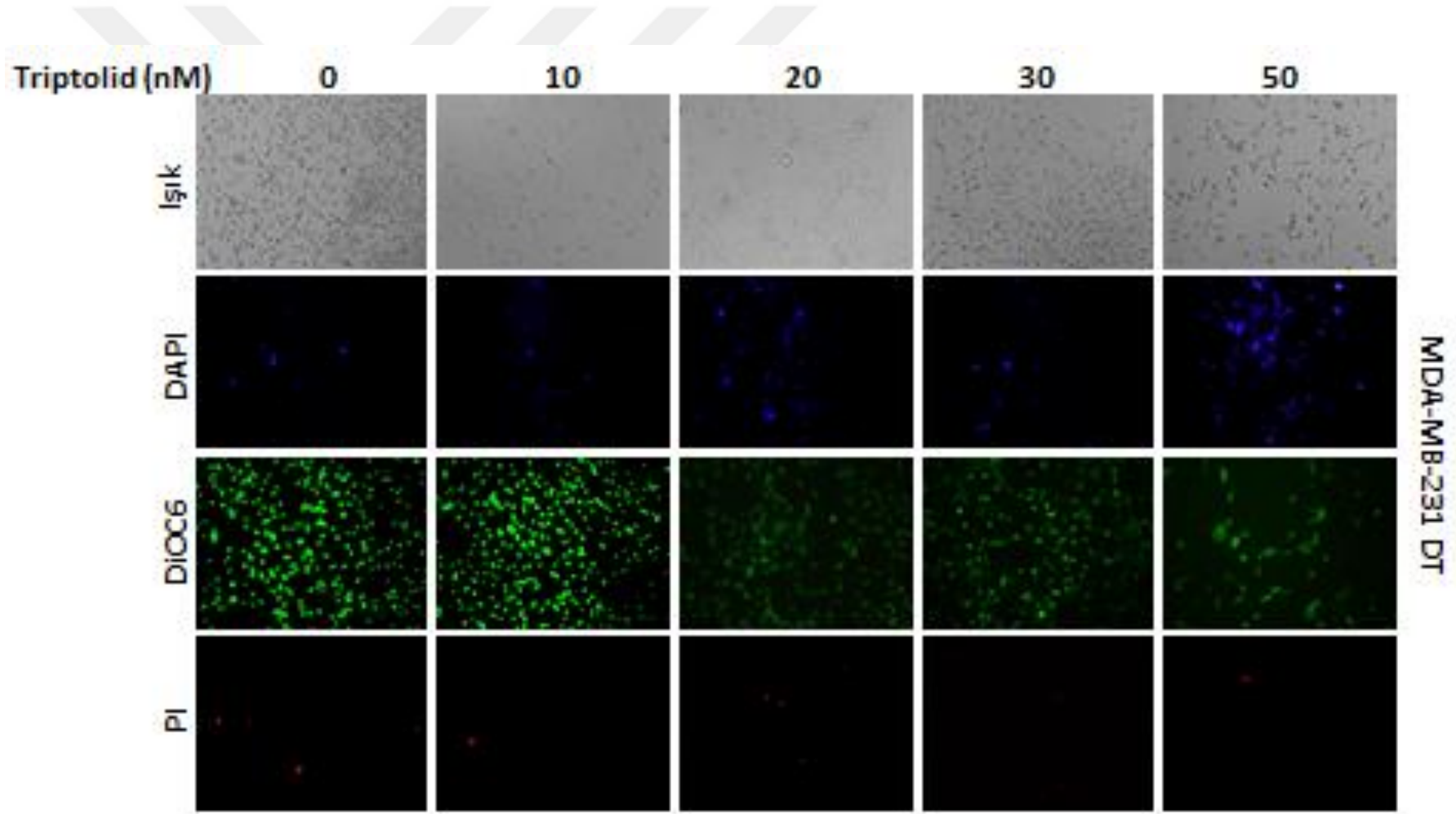
Triptolid uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri üzerinde göstermek için MTT testi gerçekleştirilmiştir. Triptolid (0-50nM) dozda uygulanmıştır. Doza bağlı olarak triptolid uygulanması sonucunda hem MDA-MB-231 doğal tip'te hem MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde 20 nM dozda hücre canlılığında anlamlı sayıda azalma gözlemlenmiştir. 30nM ve 50nM dozdaki triptolid etkisinin artmadığı ve aşırı sitotoksosite etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1).MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde doğal tipe kıyasla triptolide direnç olduğu tespit edilmiştir.



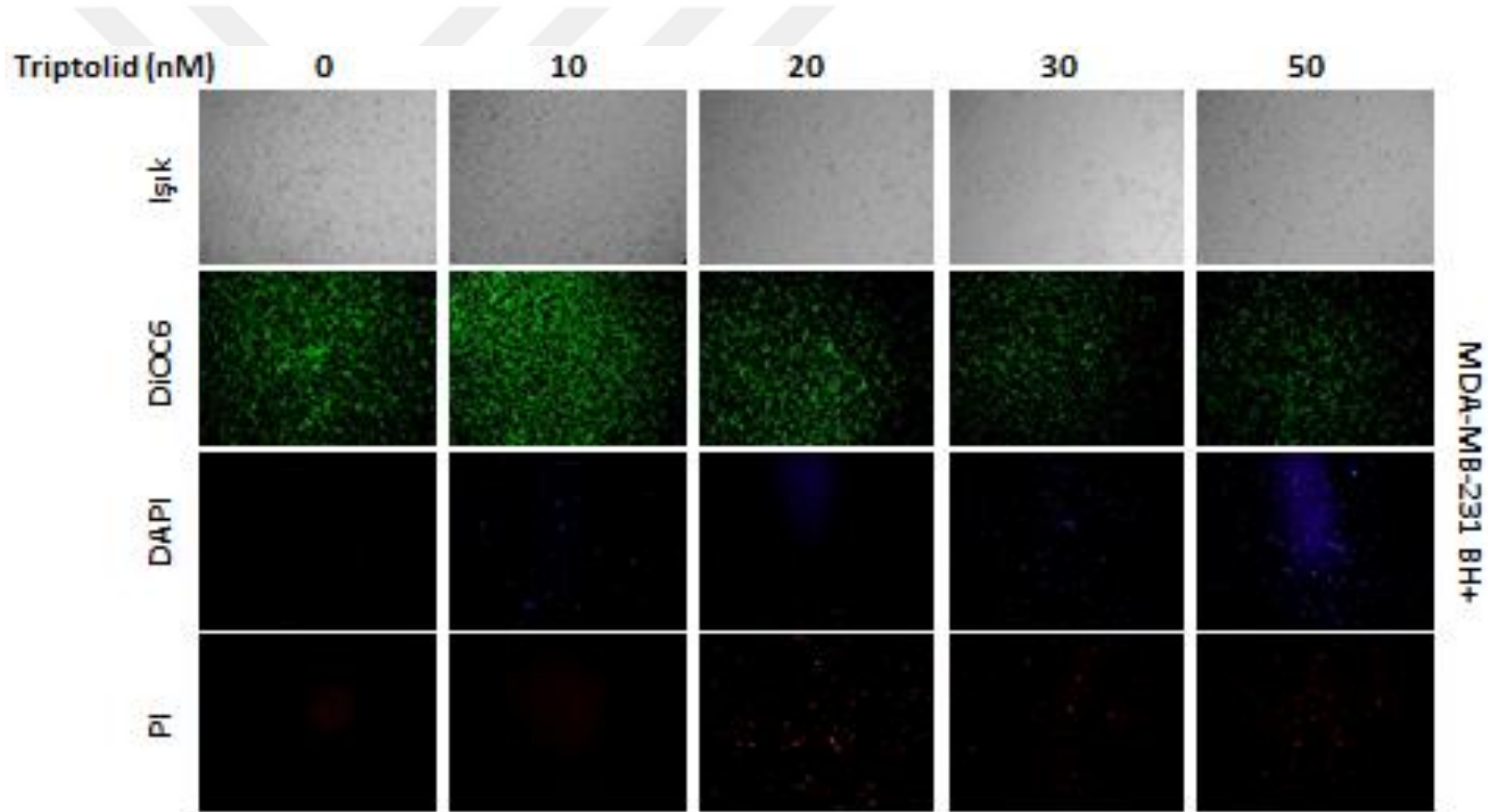
Şekil 4. 1. Doza bağlı triptolid uygulamasının bağıl hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile gösterilmesi

## **4.2 DOZA BAĞLI TRIPTOLİD UYGULAMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 BH+ MEME KANSERİ ÜZERİNDE APOPTOTİK ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ**

Triptolid uygulamasının hücre canlılığı üzererine etkisinin MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri üzerinde etkisinin belirlenmesi için DAPI, DiOC6 ve PI üçlü boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre ölümünü göstermek için PI, DNA kırıklıkların göstermek için DAPI boyaması uygulanmıştır, hücre canlılığını ise DiOC6 boyası göstermektedir. Fluorasan boyamalarına göre doza bağlı olarak triptolid uygulanması (0-50nM) hem MDA-MB-231 doğal tip'te hem MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde hücre canlılığının azalttığını PI boyaması göstermektedir. Fakat BH+ anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 kanser hücrelerinde MDA-MB-231 doğal tip kıyasla triptolide karşı DiOC6, PI ve DAPI boyamalarında daha az anlamlılık tespit edilmiştir. (Şekil 4.2.) Doz artışına bağlı triptolid uygulanmasının etkisi de arttığı gözlemlendi fakat 30nM ve üzeri dozda artmış sitotoksik etki gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 2. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde zamana bağlı tiptolid uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir.

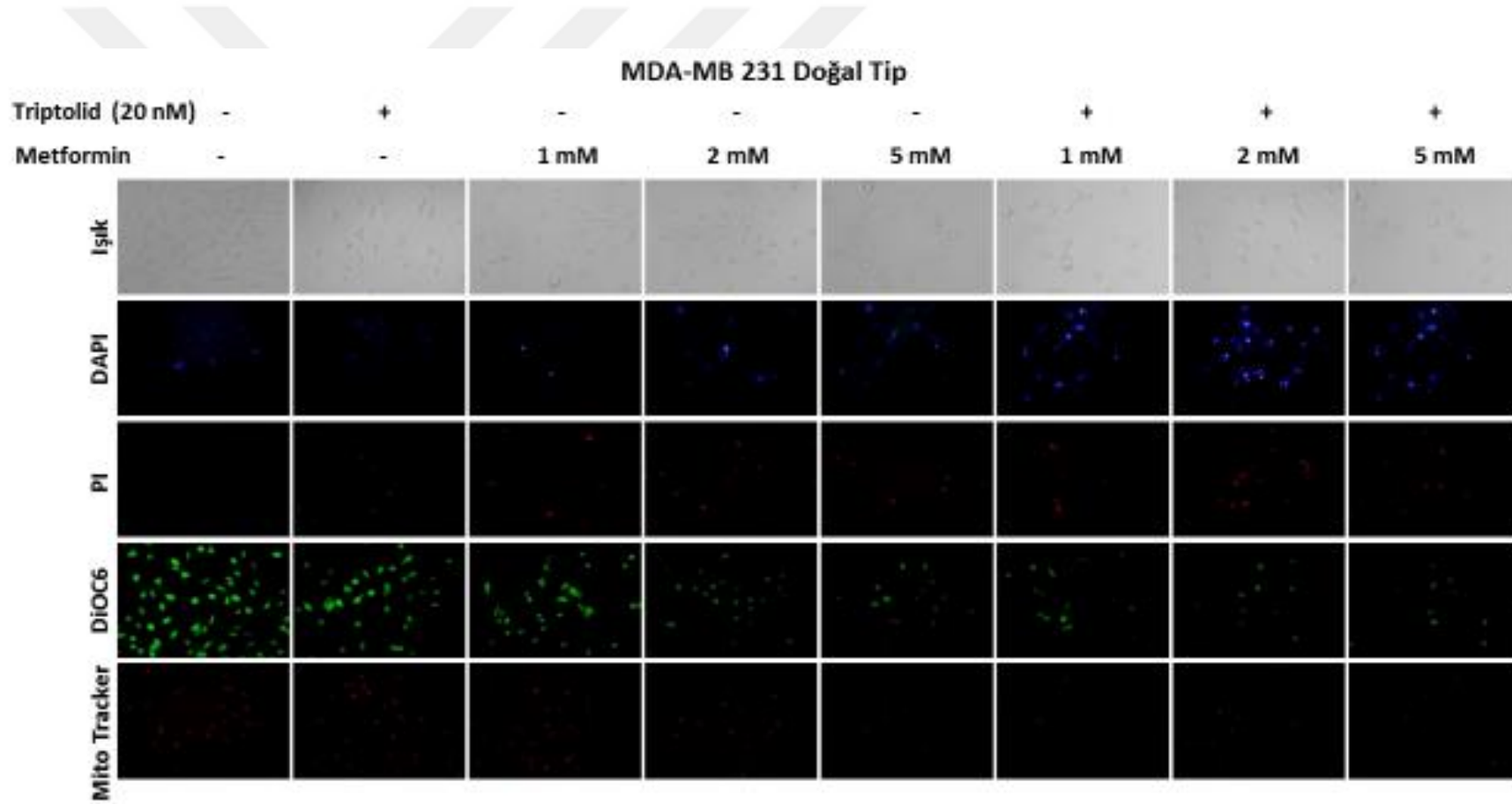


Şekil 4. 3. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde zamana bağlı tiptolid uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir.

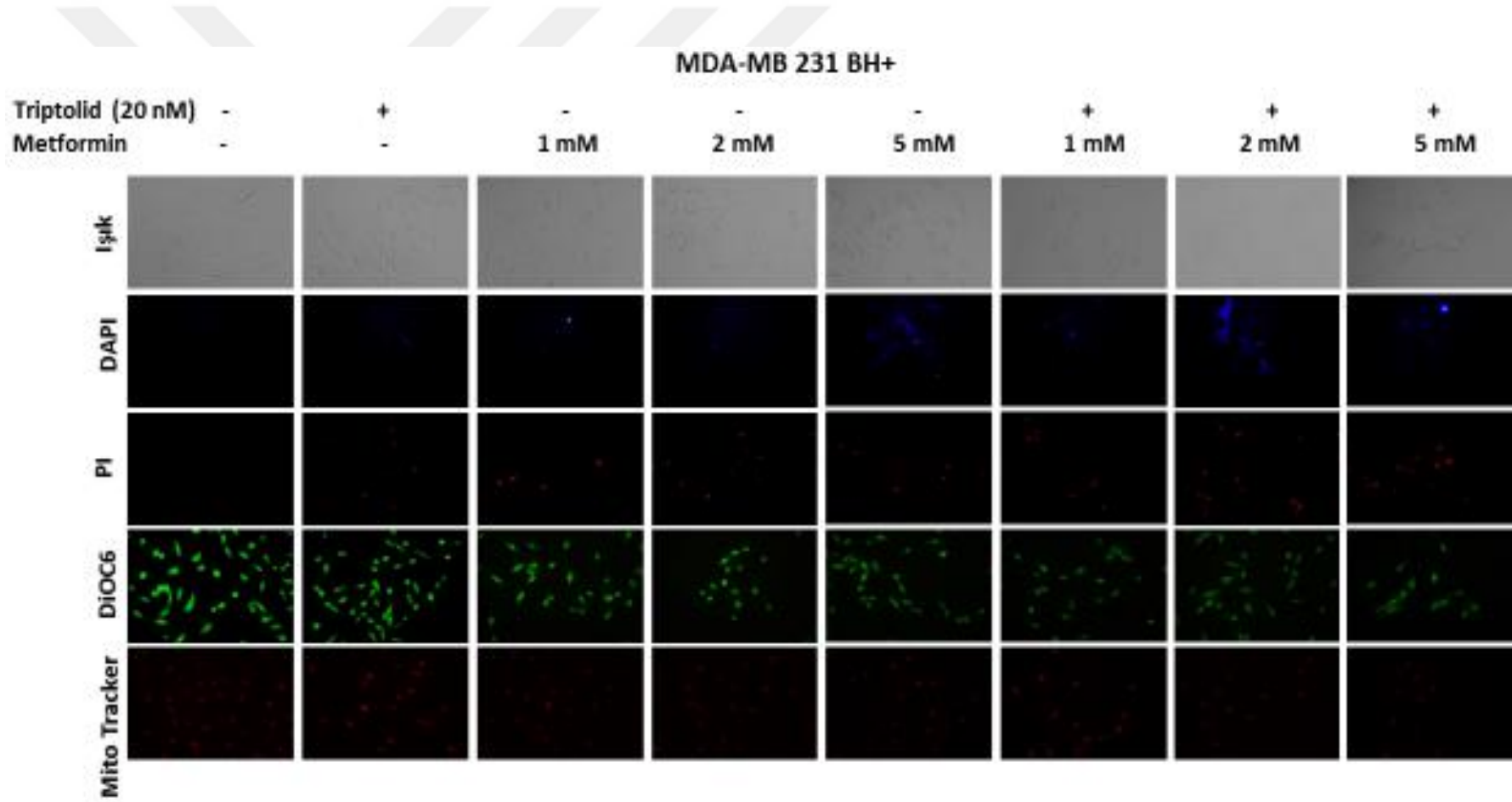
### **4.3 ZAMANA BAĞLI TRİPTOLİD UYGULAMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 BH+ MEME KANSERİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ VE METFORMİN İLE TRİPTOLİD+METFORMİN DOZUNUN BELİRLENMESİ**

Triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücreleri üzerinde etkisinin gösterilmesi için DAPI, DiOC6 ve PI üçlü boyama gerçekleştirildi. Hücre ölümünü göstermek için PI boyaması uygulanmıştır, DNA kırıklıkların ise DAPI ve hücre canlılığını ise Dioc6 boyası göstermektedir. Floresan boyamalarına göre doza bağlı olarak triptolid (0-50nM) ve metforminm (1-5mM) uygulanması hem MDA-MB-231 doğal tip'te hem MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde doza bağlı hücre canlılığının azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.1). Fakat BH+ anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 kanser hücrelerinde MDA-MB-231 doğal tip kıyasla triptolide karşı daha az anlamlılık göstermiştir (Şekil 4.3.2). Triptolid ve metformin kombine uygulanan hücrelerde ise hücre canlılığı daha da azaldığı PI, DAPI ve DiOC6 boyamalarında gösterilmiştir (Şekil 4.4). Sonraki deneylerde 20nM triptolid ve 2mM metformin dozu kullanılıcağı kabul edilmiştir (Şekil 4.5).

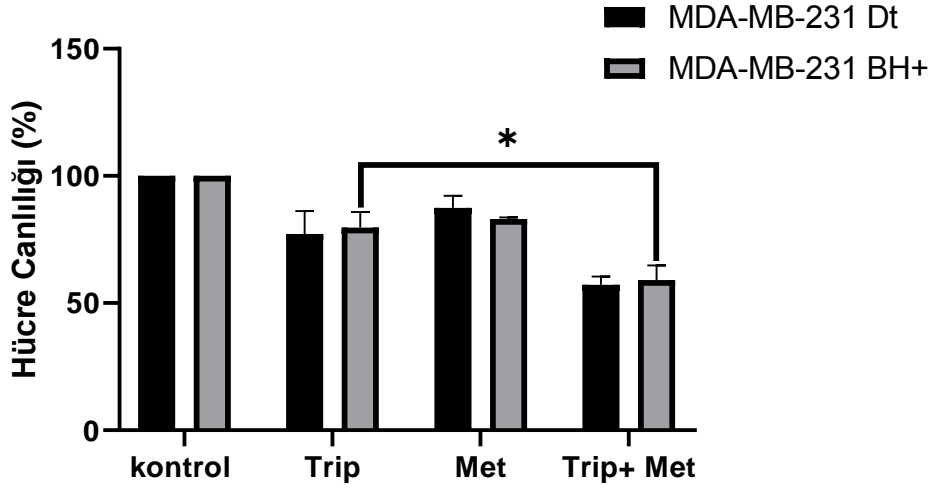




şekil 4. 4. MDA-MB-231 DT hücresinde zamana bağlı tiptolid ve metforminin farklı doz uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile, mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir.



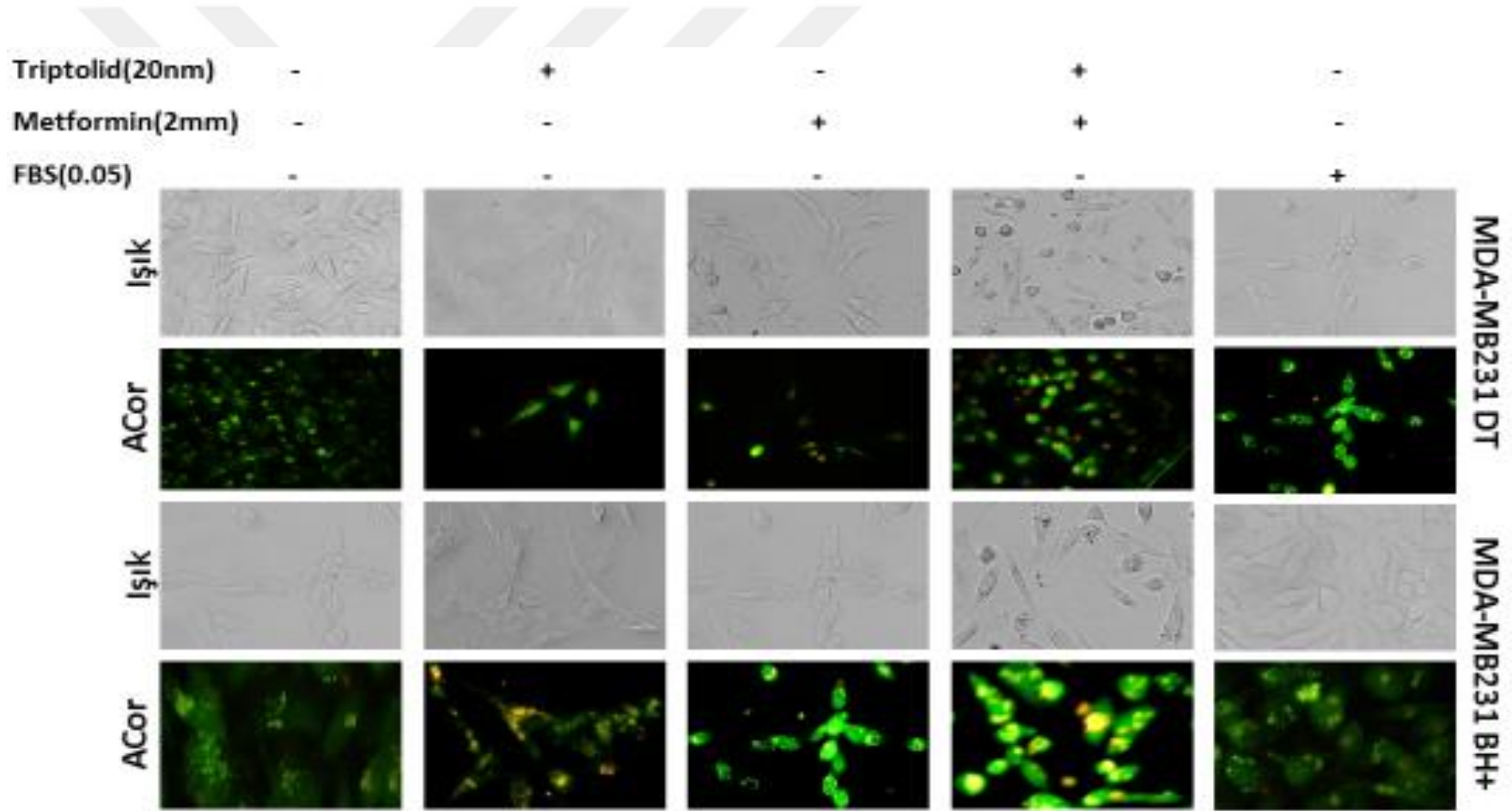
Şekil 4. 5. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde zamana bağlı tiptolid ve metforminin farklı doz uygulamasının DNA fragmentasyonuna etkisi DAPI boyama ile, mitokondri membran potansiyeline etkisi DiOC6 boyama ile, hücre ölümüne etkisi propidyum iyodür boyama sonrası flüoresan mikroskopi ile izlenmiştir.



Şekil 4.6. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde doza bağlı triptolid ve MET kombine uygulamasının canlılığına etkisinin gösterilmesi

#### 4.4 MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 GH+ MEME KANSERİ ÜZERİNDE TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULAMASININ ETKİSİ AKRIDİN ORANJ BOYAMASI İLE GÖSTERİLMESİ

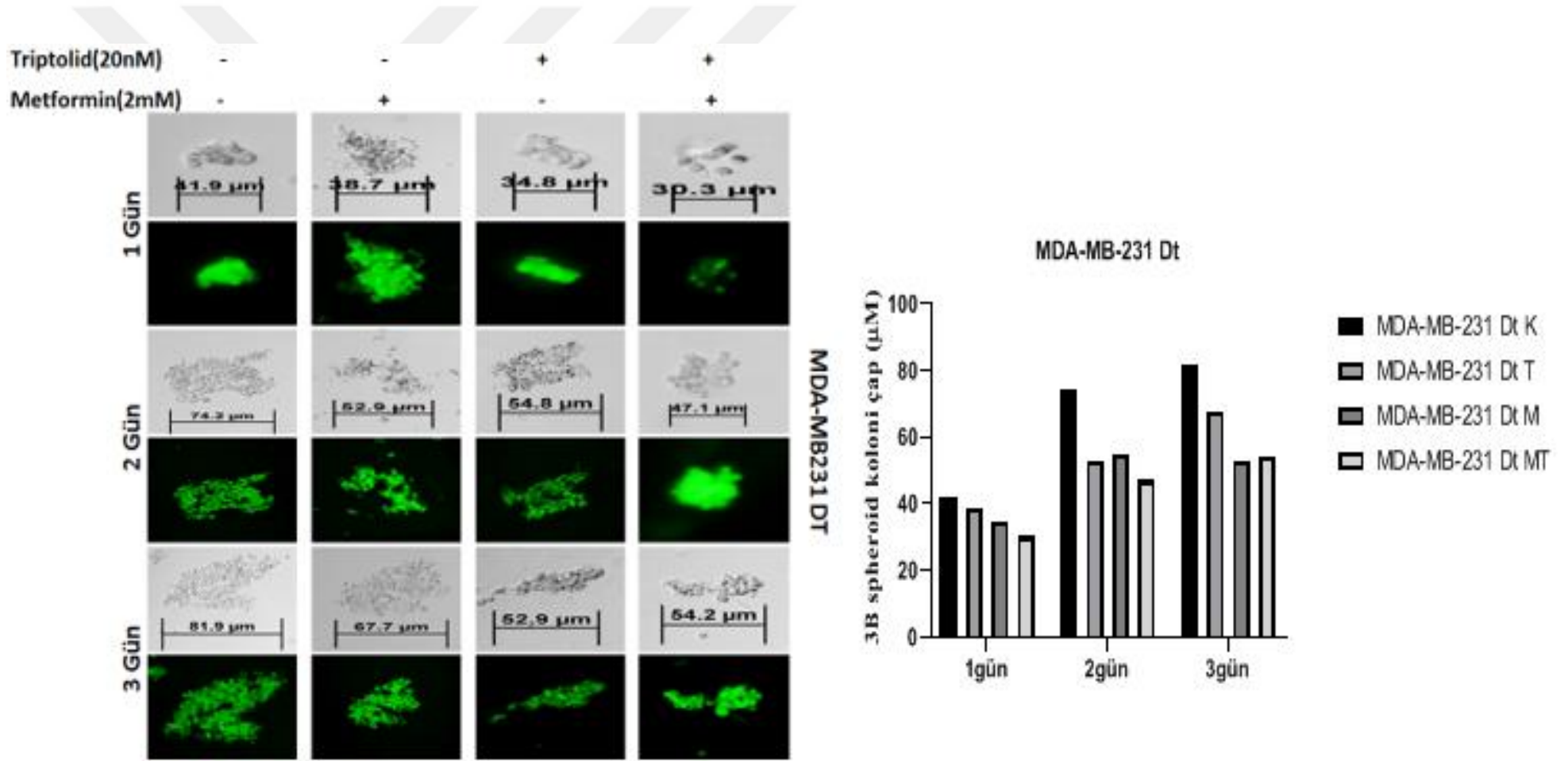
Triptolid ve MET tek ve kombine uygulanan MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin (asidik veziküler oluşumların) baskılanıp baskılanmadığını kontrol etmek amacıyla, akridin oranj fluoresan boyaması gerçekleştirilmiştir. Hem MDA-MB- 231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinin ilaç uygulanmayan sağlıklı kontrol hücrelerde asidik veziküler oluşumu gözlemlenmemiştir. Ancak triptolid (20nM) ve MET (2mM) tek uygulamasının hem doğal tip hem de BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde asidik vezikül oluşumu bulunmuştur. Kombine tedavi uygulanan hücrelerinde ise diğer hücelere göre otofajide daha da önemli bir artış olduğu akridin oranj boyaması ile tespit edilmiştir (Şekil 4. 6.).



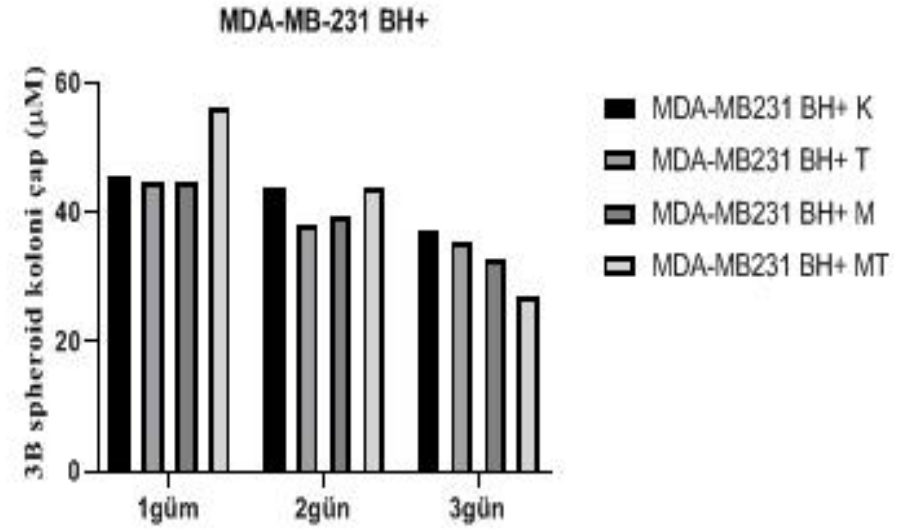
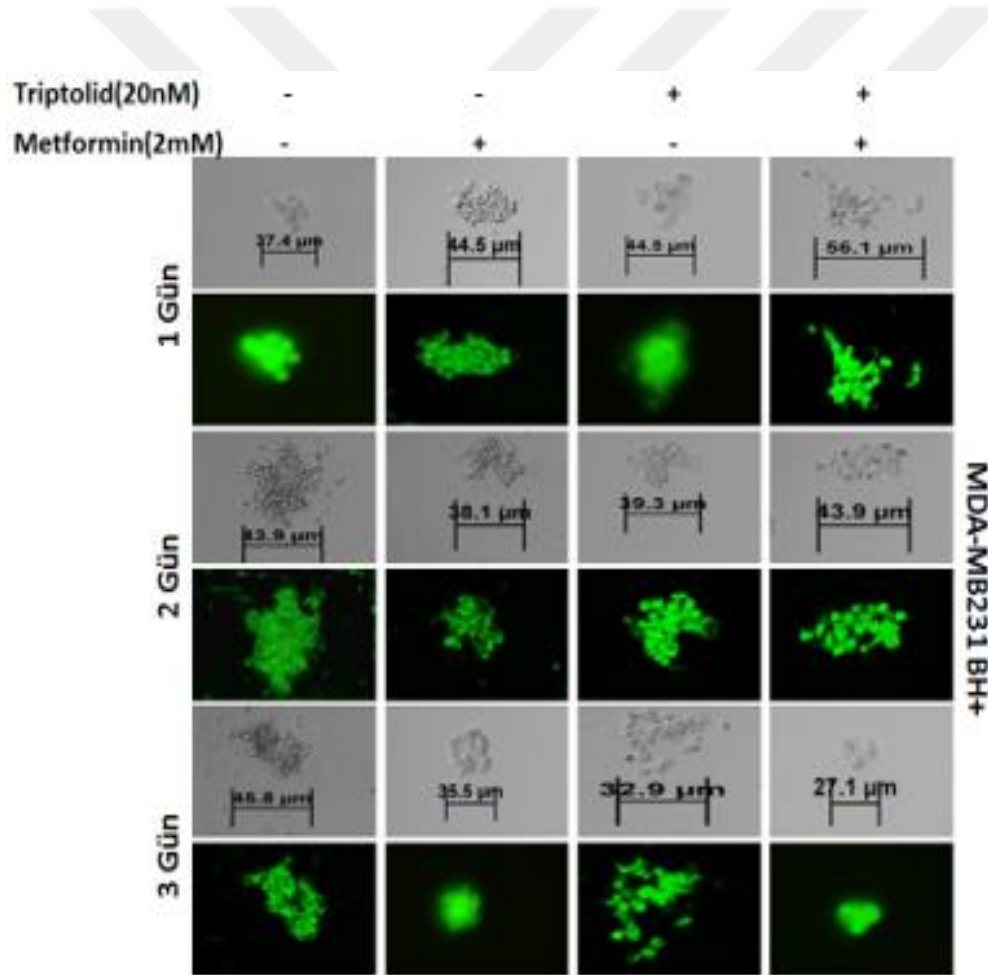
Şekil 4. 7. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi.

#### **4.5 MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE MDA-MB-231 GH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULAMASININ ETKİSİ YUMUŞAK AGAR TEKNIĞI İLE GÖSTERİLMESİ**

Agar arası hücre tekniği ile hücrelerin hareket kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Alt agarda FBS miktarı yüksek olan ve agar konsantrasyonu düşük olan bir kompozisyon bulunurken üst agarda normal besiyeri ve hücreler ile birlikte daha yüksek konsantrasyonda agar mevcuttur. Bu durumda üst agarda oluşan sferoid yapılar hücre açlığı veya bölünmeye olan isteği takiben alt agara hareket edeceklerdir. Agarlar arası konsantrasyon farklı epitel hücre geçişini zorlaştıracak şekilde ayarlanmıştır. Bu sebeple sadece hareket edebilme yeteneğine sahip hücreler alt agara geçebilmektedir. Yumuşak agar deneyine göre; MDA-MB-231 dt hücrelerinde koloni çapının 24 saat sonrası 41.9  $\mu$ M olduğu ve 72 saat sonrası 81.9  $\mu$ M olduğu tespit edilmiştir, MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde ise koloni çapının 24 saat sonrası 37.4  $\mu$ M ve 72 saat sonrası 45.8  $\mu$ M'a arttığı tespit edilmiştir. Kontrole kıyasla triptolid ve MET tek uygulanması koloni oluşumunda anlamlı değişiklik göstermediği fakat tritolid ve MET kombine uygulanmasında sferoid yapı oluşumunda ciddi bir azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4. 8. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının koloni oluşumu ve hücre canlılığına etkisinin yumuşak agar tekniği ile gösterilmesi

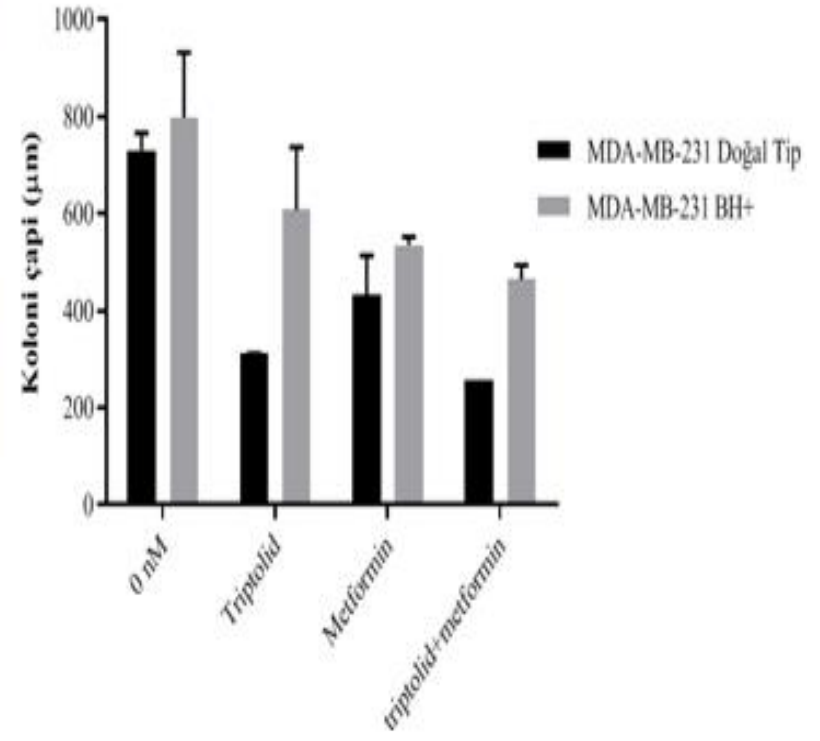
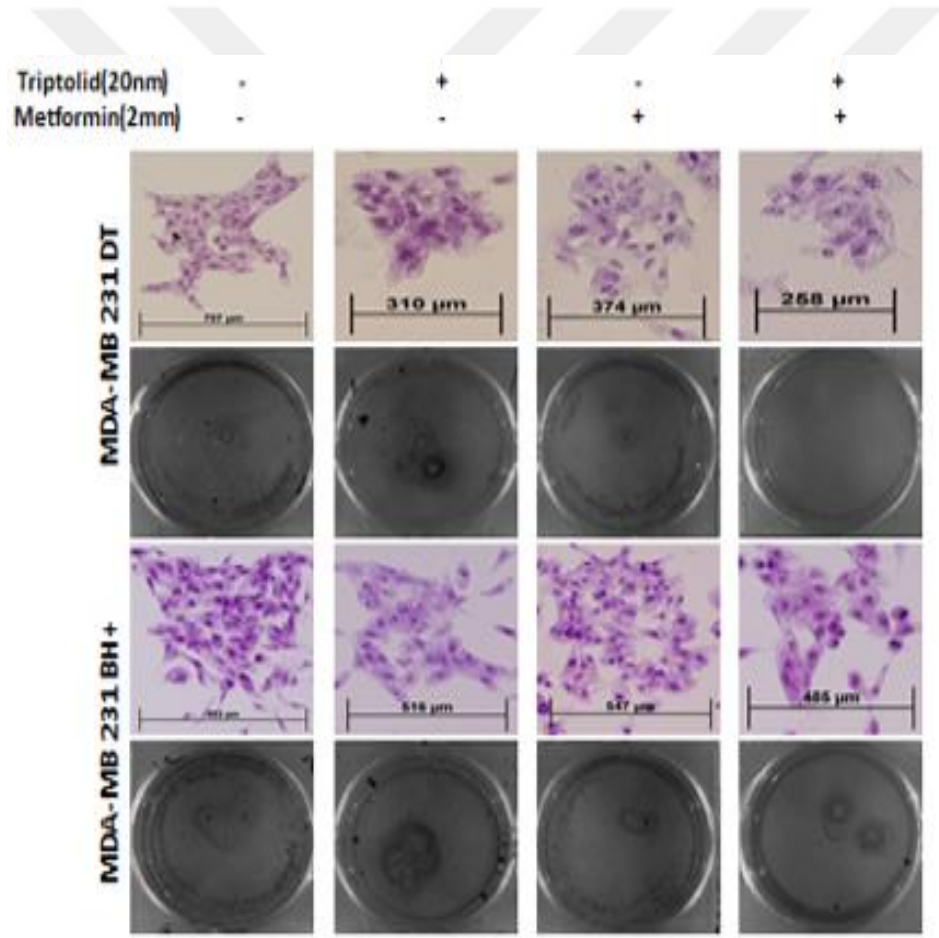


Şekil 4.9. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının koloni oluşumu ve hücre canlılığına etkisinin yumuşak agar tekniği ile gösterilmesi

#### **4.6 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ KOLONİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE GÖSTERİLMESİ**

MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında triptolid ve MET'in koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek için koloni formasyon tekniği kullanılmıştır. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre hattında doğal tip hücrelere kıyasla koloni oluşumunu tetiklediği saptanmıştır. Ayrıca triptolid ve MET koloni oluşumu üzerine baskılayıcı etkisi hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanser hücre hatlarında tespit edilse de triptolidin MET ile birlikte uygulanması koloni oluşumu üzerine baskılayıcı bir etki göstererek hücre canlılığın azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.1).

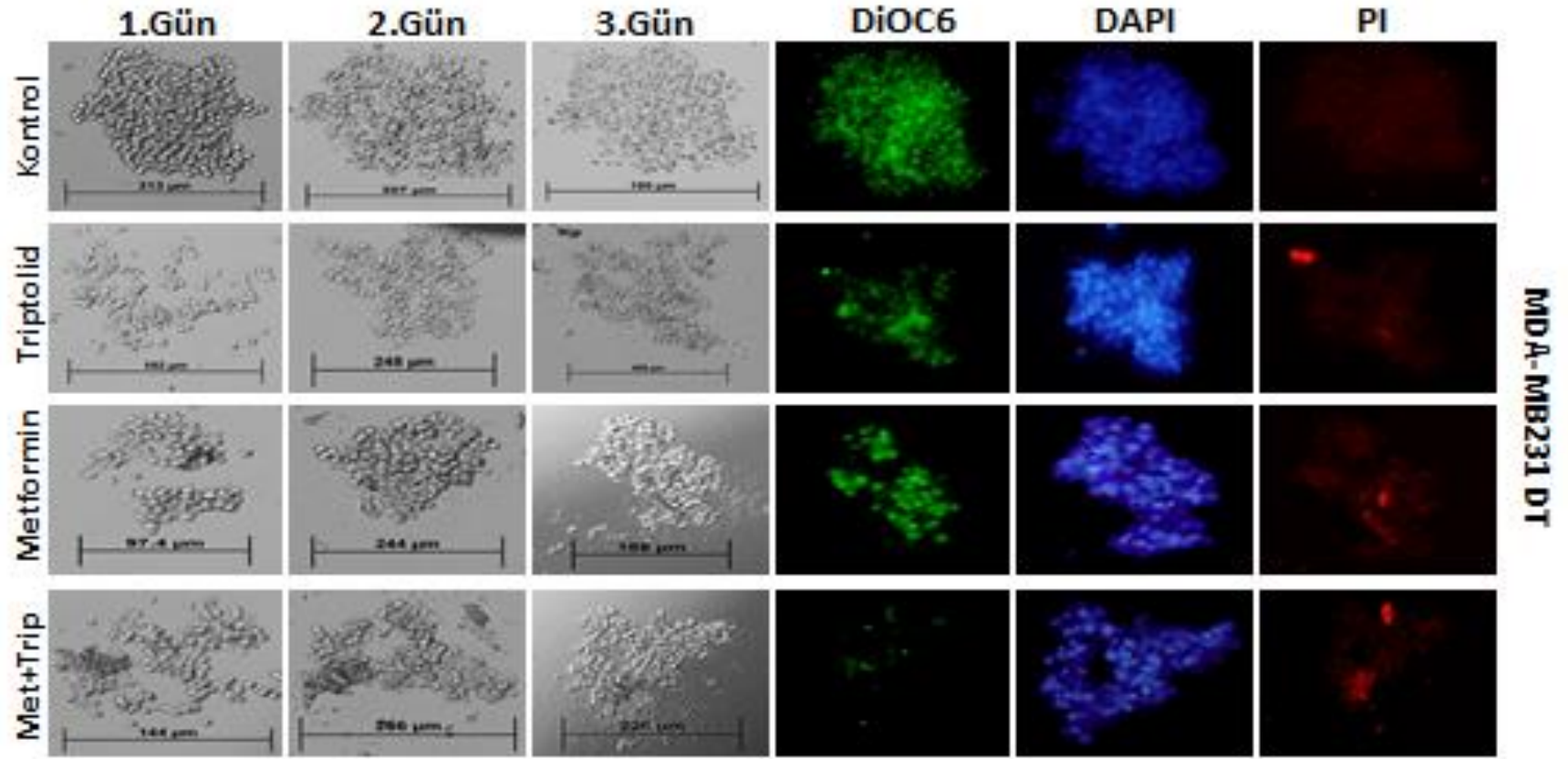




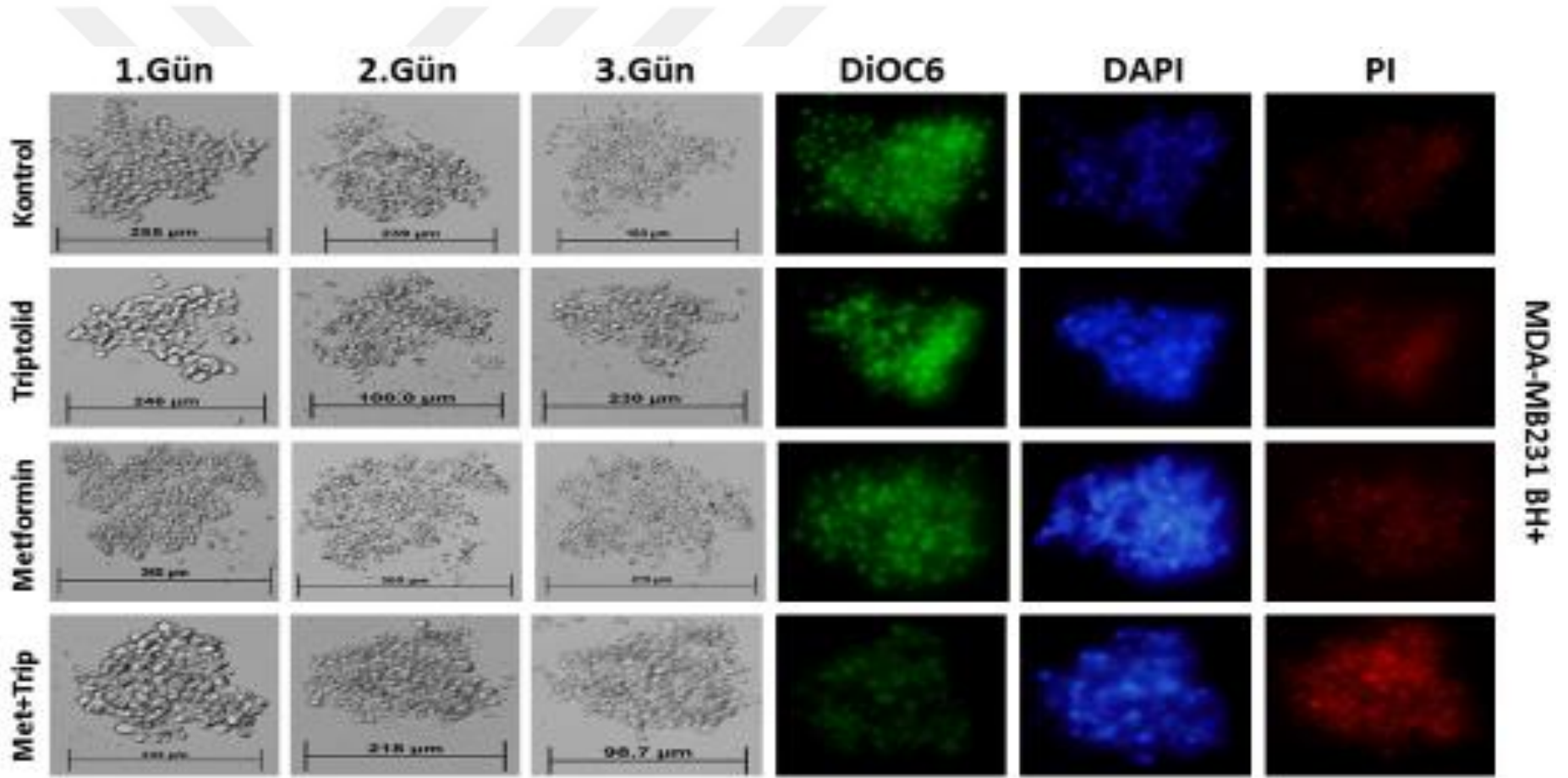
Şekil 4.10. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde triptolid ve metformin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

#### **4.7 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ASILI DAMLA MODELİ TEKNİĞİ İLE GÖSTERİLMESİ**

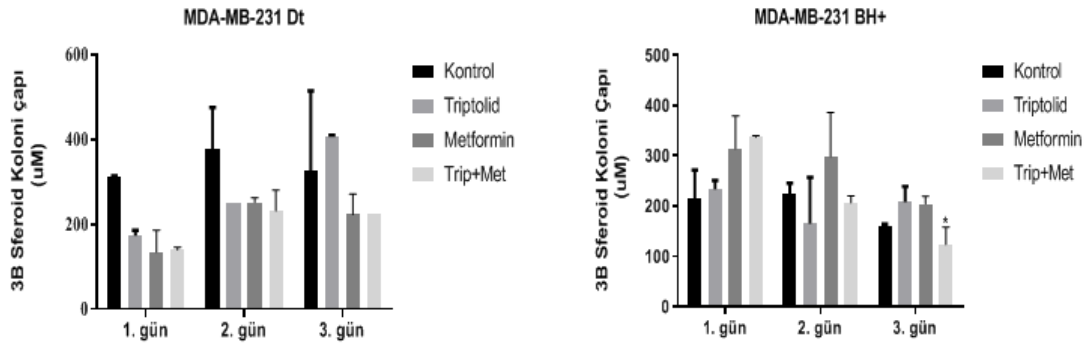
MDA-MB-231 Doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri üzerine triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının 3D hücre kültürü modellerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde agar üzerinde sferoid oluşturma deneyi ve asılı damla deneyi gerçekleştirilmiş 72 saat sonrasında oluşan sferoid hücre popülasyonlarının çapında azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.1). MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri asılı damla modeli tekniği ile sağlıklı kontrol hücrelerde 1 gün boyunca kolonilerin çapının 313  $\mu\text{m}$ 'a ulaştığı tespit edilmiştir. Ancak, triptolid (20nM) uygulanması sağlıklı kontrol hücrelere kıyasla asılı damla modeli ile gerçekleştirilen 3D kültürlerde MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinin çapının 182  $\mu\text{m}$ 'a ve metformin (2mM) uygulandığı hücrelerin çapı 97.4  $\mu\text{m}$ 'a gerilediği tespit edilmiştir. Ancak, hem triptolid hem metformin uygulandığı durumda günün sonunda MDA-MB-231 doğal tip hücrelerin çapının 144 $\mu\text{m}$ 'a ulaşmış olduğu görülse de ikili ilaç uygulamasının koloni oluşumunu dağıttığı ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiş



Şekil 4. 11. Zamana bağlı triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 DT meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi.



Şekil 4. 12. Zamana bağlı triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi.

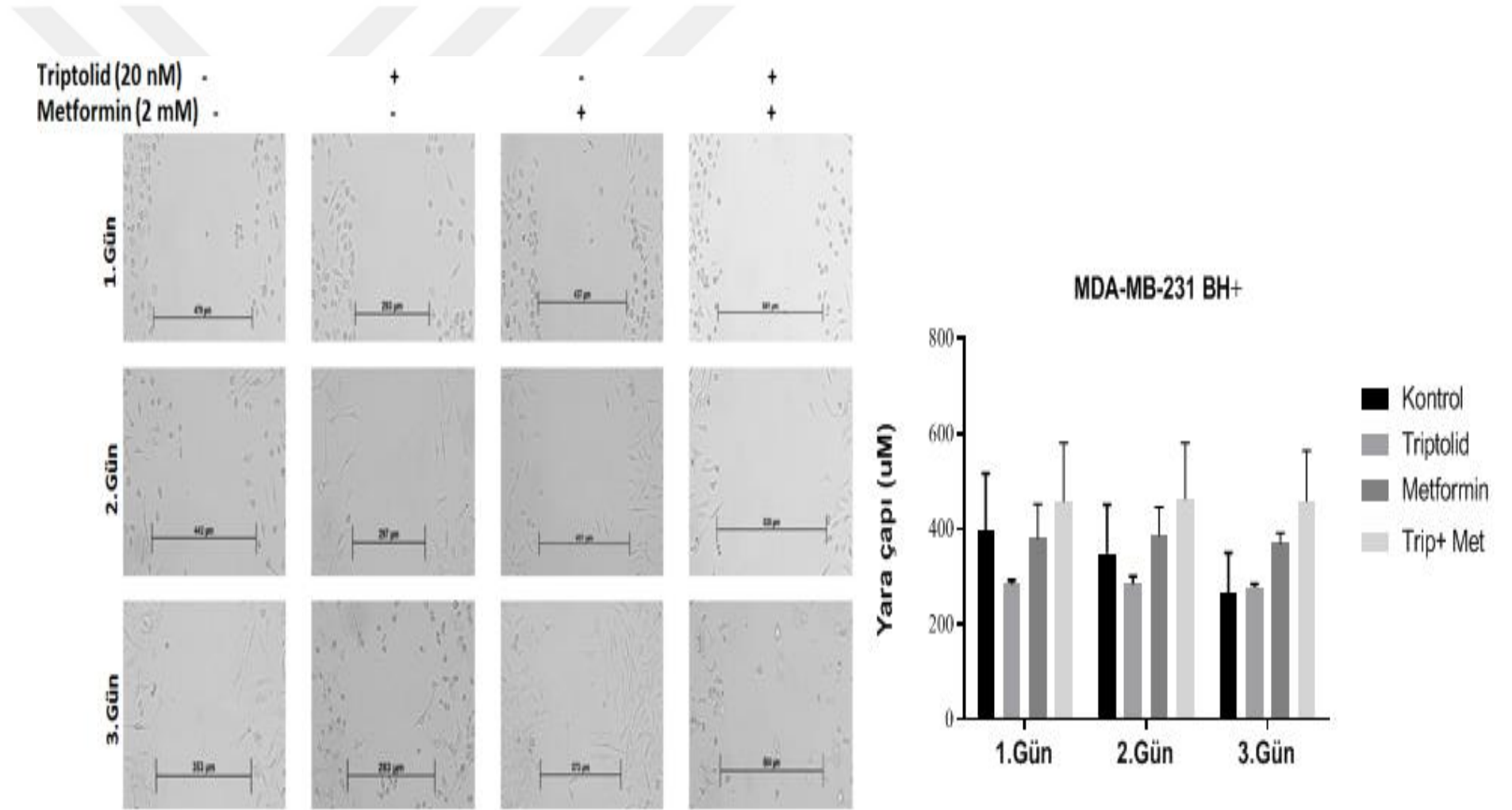


Şekil 4.13 Zamana bağlı triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 DT ve BH+ meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi.

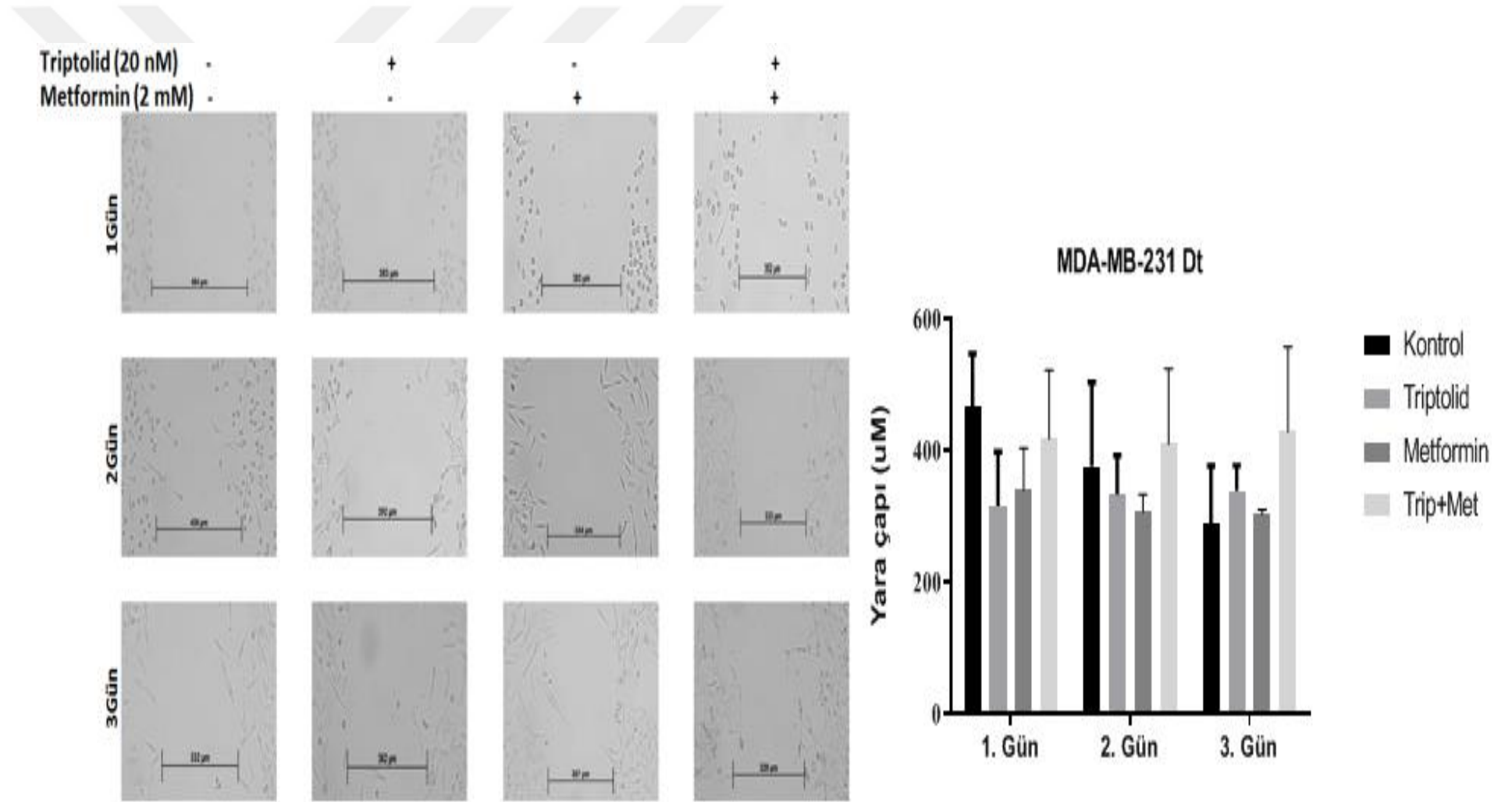
Aynı model sistem otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde incelendiğinde; sağlıklı kontrol hücrelerde 1 günün sonunda koloni çapının 255 µm'a çıktığı gözlenmiştir. Ancak, triptolid (20nM) uygulanması sağlıklı kontrol hücrelere kıyasla 246 µm'a ve metformin uygulanması sonrası 360 µm'a ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7.2). Ancak hem triptolid hem de metforminin beraber uygulandığı durumda ise 1 günün sonunda MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerin çapının 335 µm'a ulaşmış olduğu görüldü de ikili ilaç uygulamasının koloni oluşumunu dağıttığı ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. 1 gün sonunda metformin uygulaması MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde kolonilerin büyüklüklerine azaltıcı yönde etki yaparken otokrin BH anlatımı kazandırılmış ve DT hücrelerde triptolide karşı direnç mekanizmasını aktive ettiği ve 2'nci ve 3'ncü günü ilacın etkisi azaldığı gözlemlenmiştir.

#### **4.8 TRİPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN YARA İYİLEŞME YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ**

Yara iyileşmesi deneyinde zamana bağlı (0-72 saat) triptolid ve MET tek ve kombine uygulaması gerçekleştirilmişti. Hem MDA-MB-231 dt hem de MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde kontrole kıyasla triptolid ve metformin tek uygulanması hücrelerin çoğalmasını ve yara iyileşmesini 3 farklı sürede de anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlenmedi. Fakat triptolid ve MET kombine uygulanması ise hücrelerin çoğalmasını ve yara iyileşmesini durdurduğu tespit edildi.



Şekil 4. 14. MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulamasını takiben 24 saat , 48 saat , 72 saat sonrasında yara iyileşmesi modelinde oluşturulan yarıkların kapatılması.

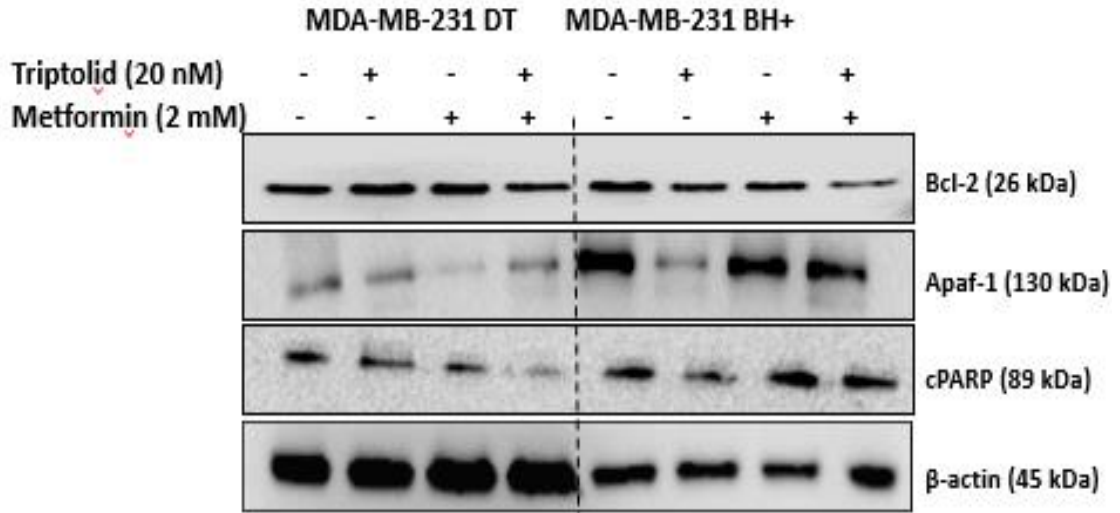


Şekil 4.15. MDA-MB-231 DT hücrelerinde triptolid ve metformin tek ve kombine uygulanmasını takiben 24 saat, 48 saat, 72 saat sonrasında yara iyileşmesi modelinde oluşturulan yarıkların kapatılması.

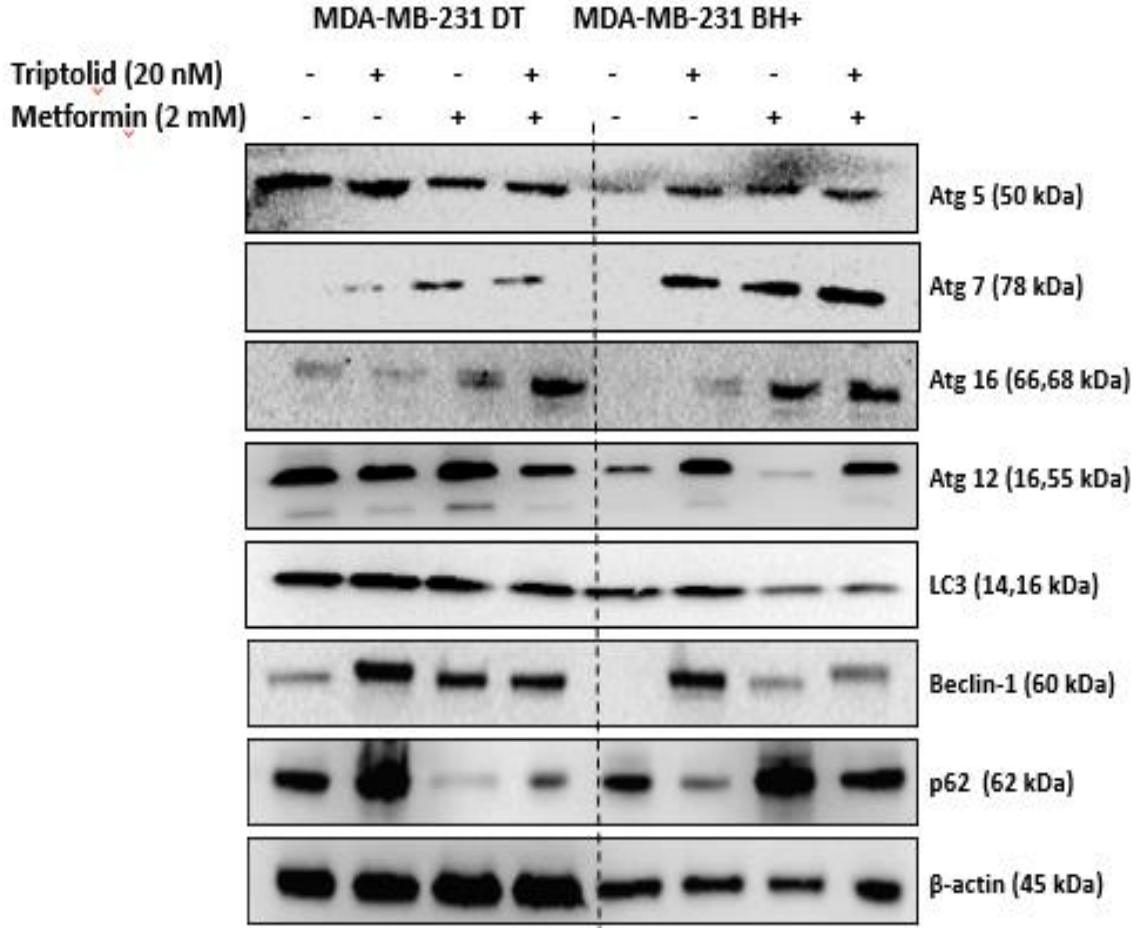
#### **4.9 TRIPTOLİD, METFORMİN TEK VE KOMBİNE UYGULANMASININ OTOFAJİ VE APOPTOTİK ÖLÜM ÜZERİNE ETKİSİNİN MDA-MB-231 DOĞAL TİP VE BH+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE GÖSTERİLMESİ**

Triptolid, Metformin tek ve kombine uygulanmış durumda MDA-MB-231 DT ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisini belirlemek için immünoblotlama tekniği kullanılmıştır. MDA-MB-231 DT ve BH+ hücrelerinde otofaji yolağı immünoblotlama yöntemiyle incelendiğinde DT grubuna kıyasla BH+ grubunda ATG5, ATG7 ve ATG16'de kombine tedavisinde bant intensitelerinin arttığı görülmektedir. Bu durumda kombine tedavinin hücreleri otofajiye götürdüğü görülmektedir. Fakat bir otofaji markeri olan LC3A/B'de artış olmamıştır. Diğer tüm sonuçlarımızın otofajiyi işaret ettiği göze alınarak bu durumun protein kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Pro-otofajik olduğunu bildiğimiz p62'de DT grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumda hücreler otofaji yolağını kullanarak otofajiye gitmektedir (Şekil 4.15). MDA-MB-231 DT ve BH+ hücrelerimizde apoptoz yolağını incelediğimizde apoptozun bir belirtecisi olan Apaf-1 seviyesinin DT grubuna göre arttığı görülmektedir. BH+ hücre hattı kendi içinde değerlendirildiğinde Apaf-1 seviyesinin kombine tedavide arttığı görülmektedir. Aynı şekilde diğer apoptoz markeri olan c-PARP seviyeleri artmıştır. Ayrıca, anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 de azalma göstermektedir (Şekil 4. 16.).





Şekil 4. 16. Triptolid ve metformin uygulamasının doğal ip ve BH+ MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozda görevli proteinlerin anlatımı üzerine etkilerinin immunoblotlama ile gösterilmesi



Şekil 4. 17. Triptolid ve metformin uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ hücrelerinde otofajide görevli proteinlerin anlatımı üzerine etkilerinin immunoblotlama ile gösterilmesi

## 5 TARTIŞMA

Üçlü negatif meme kanseri, uygulanan hedefli ilaçların eksikliği nedeniyle kötü prognoz ve yüksek mortalitesi olan agresif bir meme kanseri türüdür [78]. Terapötik anlamda net ve kanıtlanmış etki mekahnması bilinen ajanlar bulunmamakta, potansiyel tedavilerin araştırılmasına devam edilmektedir [79]. Bu sebeple üçlü negatif meme kanserinde alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmakta ve yeni tedavi seçenekleri ile hızlı şekilde desteklenmesi gerekmektedir. Meme kanseri birçok farklı faktör sebebi ile gelişmektedir. Bunlar içerisinde yaş, diyet, çevresel etkenler, vücut kitle endeksi, genetik mutasyonlar ve yanlış beslenme bulunmaktadır. Çeşitli klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar, büyüme hormonu da dahil olmak üzere hipofiz hormonlarının insan meme kanserinin gelişiminde rol oynadığını göstermektedir[80]. Büyüme faktörleri doğrudan malign transformasyona yol açmaz, ancak hücre döngüsünün hızlı ilerlemesi sırasında DNA onarımı için zamanı azaltarak mutasyon riskini arttırmaya yardımcı olabilmektedirler[38]. Maria Gebre-Medhin ve arkadaşları yaptığı çalışmada büyüme hormonu reseptörünün (GHR) insan meme kanserinde eksprese edildiğini ve normal meme dokusuna kıyasla anlatımının arttığını ortaya koymuştur [80].

BH, ön hipofizin somatotrof hücreleri tarafından sentezlenen bir proteindir ve hedef hücrelerde, BH reseptörünün (BHR) hücre dışı kısmına bağlanır. BHR'nin aktivasyonu, sinyal transdüseri ve transkripsiyon (STAT) 5 aktivatörü gibi reseptör ile ilişkili Janus kinaz-2 ve diğer substratların fosforilasyonunu tetikler. Ek olarak BH, MAPK / ERK, Ras-like GTPazlar ve PI3K / protein kinaz B (Akt) gibi diğer mitojenik yolları da aktive etmekte ve fokal adezyon kinazları ile etkileşime girmektedir. BH sinyalleşme sisteminin ana bileşenlerini düzenleyen miRNA'ların doku ekspresyonunu değiştirdiği ve böylece BH ekspresyonu ve aksiyonunun yeni bir düzenleyici mekanizma olduğu gösterilmiştir. BH hepatik IGF-I üretiminin de ana düzenleyicisidir. Ghrelin, adipokinler, serbest yağ asitleri, östrojen, tiroid hormonları ve glukokortikoidler ve çeşitli hormonlar da BH salgılanmasını tetiklemektedir.

Karaciğer, BH bağımsız bir şekilde salgılanan IGF-II'nin ana kaynağıdır. Her iki IGF de pek çok ekstrahepatik dokuda otokrin ve parakrin etki gösterir. Her ne kadar IGF-I ve IGF-II, benzer biyolojik tepkiler ortaya çıkarmaktadır ve MAPK, PI3K / Akt sinyalleşme kaskadlarını aktive etmekten sorumludurlar. BH ve IGF-I'in etkileri sıklıkla birbirine bağlı olmasına rağmen, BH ayrıca karaciğerde hepatosit büyüme faktörü, kondrositte fibroblast büyüme faktörü gibi diğer ara maddeleri içeren kas, kemik ve adipoz dokusunda IGF-I'den bağımsız eylemler uygular. Ek olarak BH, lipogenezi bloke eder ve diyabetojenik etkilere sahipken, IGF-I, glukoz ve lipid metabolizması üzerinde zıt etkilere sahiptir. Hem hayvan modellerinde hem de insanlarda, deneysel, epidemiyolojik, genetik ve klinik çalışmalardan BH ve karsinogenezi bağlayan çok sayıda kanıt üretilmiştir. Sonuç olarak, BH sinyalleşme sisteminin birkaç bileşeni, yeni kanser tedavileri için hedefler olarak belirlenmiştir. BH tedavisi sırasında kanser riski artması tartışılmaktadır. BH direnci çeşitli kanser türlerine karşı koruma gösterir ve bu modeller BH'nin kanserojenizdeki rolü için en güçlü kanıtlar arasındadır. Meme kanserinde BH'nin ekspresyonunun artması tümör büyümesine, ilaç direncine ve invazyon-metastaza neden olur [38]. Bu çalışmada amacımız otokrin BH alınımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerindeki ilaç direncinin otofaji ve apoptotik ölüm sürecinde rol alan hücre sinyalleriyle ilişkisini göstermektir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerin sonuçlarına göre otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB231 hücreleri, doğal tip MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla triptolid'e karşı dirençli olarak bulunmuşlardır.

Triptolid, *Tripterigium wilfordii*'den izole edilen biyoaktif bir bileşiktir. Kimyasal olarak, bir di-terpenoid tri-epoksittir. Triptolid, akciğer, karaciğer, meme, prostat ve yumurtalık kanserleri gibi birçok kanser türünde hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir [81]. Sağkalım önleyici yolların anlatımını azalattığı ve farklı pro-apoptotik proteinlerin anlatımını arttırdığı tespit edilmiştir [82][83][84]. Soundararajan vd. yaptığı MTS testindeki proliferasyon verileri, triptolidin zaman, konsantrasyon ve hücre tipine bağlı etkilerini göstermiştir [85]. MDA-MB-231 hücrelerinde ilacın sitotoksitesisi, nM aralığında konsantrasyon için bile çok yüksek olduğu tespit edilmiştir [6]. Miyata ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada triptolidin antitümör etkilerinin, siklinler (A, B1 ve D1) ve c-Myc'in meme tümörü MDA-MB-435 hücreleri gibi hücre döngüsü oluşturan faktörlerin ekspresyonunun azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir [86]. Ayrıca triptolidin insan fibrosarkom HT-1080

hücrelerinde [87] ve prostatik adenokarsinom hücrelerinde [88] S fazında hücre döngüsünün durmasına neden olabileceği bildirilmiştir [89]. Elizabeth Varghese vd. yaptığı çalışmada 10 nM triptoli uygulamasının triptolidin apoptotik hücre ölümünü arttırdığını göstermiştir [6]. Varghese vd. yaptığı çalışmada, triptolid dozu arttırıldığında MDA-MB-231 hücre canlılığının azalmasına neden olduğunu göstermiştir[6]. Potansiyel bir antikanser ilaç olarak triptolidin güvenliği ve etkinliği, klinik denemeler göz önüne alındığında dikkatlice değerlendirilmelidir, çünkü hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak etkileri gözlemlenen triptolid, klinik senaryolarda kanser ilerleme ve bağışıklık tepkisi daha karmaşık mekanizmalar içerdiğinden insanlarda tamamen çevirilmeyebilir. Çalışmamızda bizim bulgularımız da MDA-MB-231 BH+ hücrelerinin triptolid uygulamasına direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu direnci aşmak amacıyla triptolid ile metformin kombine olarak uygulanmıştır.

Oral antidiyabetik ilaç olan metforminin (1,1-dimetilbiguanid hidroklorür) diyabetik kanser hastaları için faydalı olabileceği gösterilmiştir [90]. Metformin, obezite, kısırlık, polikistik over sendromu (PKOS) ve çeşitli kanserlerin tedavisinde de kullanılmaktadır [91]. İnsülin ve analogları pankreas kanserlerinde, kollorektal kanserde ve ayrıca meme kanserlerinde risk artışına neden olurken, metformin potansiyel anti-neoplastik etkinliği için geniş çapta çalışılmış ve meme kanseri riskini de azalttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, konvansiyonel kemo ve radyoterapiye duyarlılaştırma ile bağlantılı olduğu da bulunmuştur [92]. Metforminin, meme kanserine karşı kemoterapötik etki gösterdiği de bulunmuştur [93]. Meme kanserlerinde, 50 adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK) sinyal yolunun aktivasyonu ile metformin kaynaklı apoptozu indüklemiştir [94], ancak diğer raporlar bu mekanizmaya karşı sonuçlar göstermiştir [95]. Metformin meme kanseri ile ve daha özel olarak TNBC ile ilişkili düzensiz lipid ve karbohidrat metabolizmasının hedefleri üzerinde geniş etkilere sahiptir [14][96]. Metforminin GLUT1 de dahil olmak üzere TNBC'de özellikle anahtar glikoz taşıyıcılarının ekspresyonunu azalttığını gösterilmiştir [96]. Ayrıca, tümör hücre çoğalması ve sağ kalımı için kritik olan anahtar enzimlerin transkripsiyonunu azalttığı da gösterilmiştir [14]. TNBC'lerde, metforminin kemoterapötik etkisi ya düzenleyici glukoz homeostazı yoluyla ya da doğrudan kanser hücrelerinde sağkalım yollarını hedef olarak etki gösterdiği de ileri sürülmüştür [97]. Metformin terapötik ajanlar ile kombine kullanılarak sinerjistik etki gösterdiği de bilinmektedir [91]. Fakat literatürde

metformin ile triptolidin kombine uygulanmasının BH+ meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında metformin, MDA-MB-231 BH+ meme kanserindeki triptolid direncini aşmak amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada triptolid ile metformin kombine uygulandığında hücre canlılığı, koloni oluşumu gibi faktörlerde sadece triptolid uygulamasına kıyasla önemli bir azalma tespit edilmiştir. Triptolidin, MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde, metformin kombinasyonu ile daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra apoptotik hücre ölümü hem doğal tip hem de BH+ hücrelerde anlamlı bir şekilde kombine uygulama ile artmıştır. Özellikle BH+ MDA-MB-231 hücrelerinde kombine terapi ile azalan Bcl-2 seviyesi ve artan cPARP anlatımı, kombine tedavini triptolid direnci kırma noktasında doğru bir adım olduğunun göstergesidir.

Otofaji, lizozomlardaki hücre içi proteinleri ve organelleri yakalayan, parçalayan ve geri dönüştüren, yaşamı teşvik eden bir hücreyel olaydır. Otofaji organel fonksiyonunu korur, hücreyel atık ürünlerin toksik birikmesini önler ve açlık durumunda hücreyel metabolizmayı sürdürmek için substratlar sağlar. Otofaji, katabolik rölünden dolayı kanser gelişiminin başlangıç basamaklarında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan koruyucu mekanizma olarak gösterilmektedir. Kanser hücreleri, mikroçevre stresin kurtulmak, büyümeyi ve agresifliği artırmak için otofajiyi düzenleyebilmektedirler [98]. Her ne kadar ilk keşfedildiğinde otofaji sürecinin tümör oluşumunu baskıladığı düşünülse de, otofajinin tümörü oluşturan hücrelerde ölümü tetiklediği de gösterilmiştir[99][100][101]. Metabolik stres, hipoksi ve kemoterapiklerin ya da radyoterapinin otofajiyi tetiklediği gösterilmiştir [102]. Otofajinin, hormonal terapiler ve DNA hasarlayıcı ajanların uygulamasından sonra apoptotik hücre ölümünü geciktirdiği de gösterilmiştir [102]. Pre-kanser ve kanser hücrelerinin gelişiminde enerji taleplerinin karşılanması ve ATP seviyesinin korunması amacıyla bu hücrelerde otofaji aktive edilir. Aynı zamanda otofoji, hücre ölürken özellikle apoptozun başlaması, apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu için ihtiyaç duyulan ATP gibi enerji kaynaklarının sağlanmasına da rol oynamaktadır [103]. Dolayısıyla, otofajinin kanserle ilişkisi literatürde oldukça karmaşıktır [104]. Bazı çalışmalar otofajinin tümör süpressör bir rolü olduğunu fakat bazı çalışmalar ise otofajinin tümör hücrelerini yaşamaya ve çoğalmaya teşvik ederek onkogenik etkisini olduğunu ortaya koymuşlardır [103][105].

Bu çalışmadaki amaç; laboratuvarımızda otkrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında seçilmiş dozlarla triptolidin apoptotik etkisini arttırmak için anti-proliferasyon etkisi olan metformin ile birlikte kombine ederek BH+ sinyaline bağlı ilaç direncini kırmaktır. Bu amaç doğrultusunda triptolid'e karşı direnç gösteren BH+ anlatımı yapan MDA-MB-231 hücrelerinde, metforminin triptolid ile kombine uygulanması sonucunda hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı baskılayıcı etki tespit edilmiştir. Bununla ilgili olarak BH+ anlatımı yapan MDA-MB231 hücrelerin triptolid ile metforminin uygulanmasıyla sağ kalım analizinin sonucunda triptolide göre önemli bir artış gösterdiği ispat edilmiştir. Triptolid ile metformin kombine uygulanmasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılayarak apoptozu indüklediği bu tez kapsamında ilk defa gösterilmiştir. Çalışmamızda, metforminin, otkrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki triptolid'in direnci üzerine etkisi koloni oluşum deneyinde ket vurucu etkisi MTT ve floresan boyamalarını destekler nitelikte sonuç verilmiştir. Triptolid ve metformin'in anti-proliferatif etkileri yara iyileşme yöntemi, koloni oluşumu ve asılı damla teknikleri destekler nitelikte sonuç verilmiştir. Ding ve arkadaşları yaptığı çalışmada triptolid ve cisplatin kombinasyonunun gastrik kanserde apoptozu hem *in vitro* hem de *in vivo* arttırdığı saptanmıştır [106]. Lau ve arkadaşları yaptığı çalışmada metformin ile erlotinib kombine uygulanması MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde apoptozu inüklediğinin ve koloni oluşumunu elimine ettiğini saptamıştır [107].

Triptolid ve metformin kombine uygulamasının doğal tip ve BH+ hücrelerde meydana getirdiği apoptotik cevabın incelenmesi bu çalışmanın bir diğer amacıdır. Apoptotik proteinlerin anlatımları incelendiğinde anti-apoptotik Bcl-2 ailesinden Bcl-2'nin anlatımının kombine uygulama ile her iki hücre hattında da azaldığı bulunmuştur. Fakat, kombine terapi ile apoptozom kompleksinin yapıtaşlarından olan Apaf-1 anlatımı ile PARP kesilimi doğal tip hücrelerde gözlemlenmezken, BH+ hücrelerde bu proteinlerin anlatımlarının artması apoptotik hücre ölümünün tetiklendiğini göstermiştir. CJ Li ve arkadaşları yaptığı çalışmada, triptolid ile cisplatin kombinasyon halindeki düşük dozları, SC-M1 hücrelerinin önemli ölçüde apoptozunu indüklediğini ve hayvanlarda herhangi bir toksisite göstermeden SC-M1 ksenograft farelerinde tümör büyümesini etkili bir şekilde baskıladığı saptamıştır. Triptolid ve cisplatin kombine tedavi edilen mide kanseri hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3, kaspaz-

9 ve PARP ekspresyon seviyelerinin, kontrole kıyasla 6.8-, 6.7- ve 5.7-kat fazla arttığı bulunmuştur [108]. Falah ve arkadaşları yaptığı çalışmada metformin ile curcumin kombine tedavisi meme kanser hücrelerinde tümör proliferasyonunu ve büyümesini azalttığını, anjiyogenezi inhibe ettiğini, apoptozu indüklediğini ve Th2 bağışıklık yanıtını tetiklediğini saptamıştır. Sonuç olarak curcumin'in inhibe edici etkisi, metformin ile birleştirildiğinde artırılmıştır. Bu kombinasyon, VEGF ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir[109].

Bu tez çalışmasında bir diğer amaç, BH anlatımı olan MDA-MB-231 hücrelerinde triptolide karşı saptanan direnç mekanizmasında otofaji sürecinin rolünün gösterilmesi hedeflenmiştir. ATG5, ATG7, ATG16 gibi otofajide temel rol oynayan molekülerinin anlatımının imümunoblotlama yaparak hem MDA-MB-231 BH+ hem MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde indüklendiği görülmüştür. Ayrıca otofajinin belirteci olarak kabul edilen Beclin-1 ekspresyonunun her iki tip meme kanseri hücresinde de arttığı gözlemlenmiştir. p62 ekspresyonunun, MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde, triptolid uygulanması sonucunda arttığı fakat MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde triptolid uygulandığında azaldığı ve metformin tek ve triptolid ile kombine uygulandığında ise arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla triptolid ile metformin kombine uygulandığında doğal tip hücrelerinde otofaji'nin aktifleştiği ve BH+ hücrelerinde otofaji aktifleşmesi sadece triptolid tek uygulandığında gözlemlenmiştir. Varghese ve arkadaşları yaptığı çalışmada triptolid ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde LC3B-II ve p62 seviyelerindeki değişiklik gözlemlendi böylece otofajinin aktivasyonu doğrulanmıştır[6]. Otofaji, TNBC kanserlerinde koruyucu bir mekanizma olarak bildirilmesine rağmen çeşitli çalışmalarda triptolid tedavisini takiben otofajinin aktivasyonu, hücre canlılığın azalması ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir[110] [111] [112]. Anti-apoptotik protein ve aynı zamanda otofajide rol olan Beclin-1 proteini ile kompleks oluşturan Bcl-2 proteini ekspresyonunun MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde kontrole göre triptolid ve metformin tek uygulandığında arttığı fakat kombine tedavi uygulandığında azaldığı gözlemlenmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde ise Bcl-2 ekspresyonu kontrole kıyasla hem triptolid ve metformin tek uygulandığında hem de kombine uygulandığında da azalma göstermiştir. Kombine tedavi, MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde Bcl-2 seviyesini azaltıp ve cPARP anlatımını arttırarak bu meme kanseri hücrelerinde apoptotik yolu ve otofaji sinyal yollarını

modüle ederek hücre ölümünü teşvik ettiği ispat edilmiştir. Literatürde triptolidin otofaji markırları üzerindeki etkisinin meme kanseri hücrelerinde modellenmesi çalışmalarını destekler nitelikte MDA-MB-231 hücrelerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir [55] [6] [113].

Gelecek çalışmalarda, elde edilen *in vitro* verilerin *in vivo* fare modellerinde irdelenmesi ile otokrin BH ekspresyonu olan üçlü negatif meme kanseri tedavisine yönelik girişimler söz konusu olabilecektir. Bu tez kapsamında elde edilen veriler, triptolid ve metforminle kombine tedavisinde etkin apoptotik ajan olma özelliğini, otofaji anahtar moleküllerinin etkinliği üzerinden gösterdiğini tespit etmiştir. Gelecekte bu veriler ile gerçekleştirilecek çalışmalar; özellikle hormona bağlı ilaç direnç mekanizmasının meme kanserinde etkin tedavi başarılarının artırabilmesi için kombine ilaç uygulamalarının *in vivo* deneylerle desteklenerek triptolid ve metforminin terapötik etkinliğinin artırılmasında otofaji sinyallerinin moleküler mekanizmasının açıklanması, pre-klinik çalışmaların önemini arttıracığı umut edilmektedir.



## 6 KAYNAKÇA

- [1] B. Krusinska, L. Wadolowska, M. Biernacki, M. A. Slowinska, and M. Drozdowski, "Serum 'Vitamin-Mineral' Profiles: Associations with Postmenopausal Breast Cancer Risk Including Dietary Patterns and Supplementation. A Case-Control Study," *Nutrients*, vol. 11, no. 9, p. 2244, 2019.
- [2] L. Malorni *et al.*, "Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 136, no. 3, pp. 795–804, 2012.
- [3] C. Yin *et al.*, "Alantolactone promotes ER stress- mediated apoptosis by inhibition of TrxR1 in triple- negative breast cancer cell lines and in a mouse model," *J. Cell. Mol. Med.*, 2019.
- [4] Y. Pang *et al.*, "MYC and DNMT 3A- mediated DNA methylation represses micro RNA- 200b in triple negative breast cancer," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 22, no. 12, pp. 6262–6274, 2018.
- [5] L. J. Van't Veer *et al.*, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer," *Nature*, vol. 415, no. 6871, p. 530, 2002.
- [6] E. Varghese, S. Samuel, S. Varghese, S. Cheema, R. Mamtani, and D. Büsselberg, "Triptolide Decreases Cell Proliferation and Induces Cell Death in Triple Negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cells," *Biomolecules*, vol. 8, no. 4, p. 163, 2018.
- [7] C. M. Perou *et al.*, "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, p. 747, Aug. 2000.
- [8] T. Sørlie *et al.*, "Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms," *BMC Genomics*, vol. 7, no. 1, p. 127, 2006.
- [9] P. Boyle, "Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations," *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. suppl\_6, pp. vi7–vi12, Aug. 2012.
- [10] S. E. Singletary, "Rating the risk factors for breast cancer," *Ann. Surg.*, vol. 237,

- no. 4, p. 474, 2003.
- [11] S. Wu, J. Cai, H. Wang, H. Zhang, and W. Yang, "Association between 1p11-rs11249433 polymorphism and breast cancer susceptibility: evidence from 15 case-control studies," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e72526, 2013.
- [12] K. H. Schmitz *et al.*, "Impact of obesity on cancer survivorship and the potential relevance of race and ethnicity," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 18, pp. 1344–1354, 2013.
- [13] I. J. Hall, B. Newman, R. C. Millikan, and P. G. Moorman, "Body size and breast cancer risk in black women and white women: the Carolina Breast Cancer Study," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 151, no. 8, pp. 754–764, 2000.
- [14] R. S. Wahdan-Alaswad, S. M. Edgerton, H. S. Salem, and A. D. Thor, "Metformin Targets Glucose Metabolism in Triple Negative Breast Cancer," *J. Oncol. Transl. Res.*, vol. 4, no. 1, p. 129, 2018.
- [15] A. Stark *et al.*, "African ancestry and higher prevalence of triple-negative breast cancer: findings from an international study," *Cancer*, vol. 116, no. 21, pp. 4926–4932, 2010.
- [16] S. R. Lakhani *et al.*, "The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2," *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 9, pp. 2310–2318, 2002.
- [17] E. Rapiti *et al.*, "Opportunities for improving triple-negative breast cancer outcomes: results of a population-based study," *Cancer Med.*, vol. 6, no. 3, pp. 526–536, Feb. 2017.
- [18] C. G. A. Network, "Comprehensive molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 490, no. 7418, p. 61, 2012.
- [19] C. K. Anders, V. Abramson, T. Tan, and R. Dent, "The evolution of triple-negative breast cancer: from biology to novel therapeutics," *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.*, vol. 36, pp. 34–42, 2016.
- [20] A. Paul and S. Paul, "The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers," *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 19, p. 605, 2014.
- [21] M. D. Tischkowitz and W. D. Foulkes, "The basal phenotype of BRCA1-related breast cancer: past, present and future," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 9, pp. 963–967, 2006.
- [22] F. Qi, W. Qin, and Y. Zang, "Molecular mechanism of triple-negative breast

- cancer-associated BRCA1 and the identification of signaling pathways,” *Oncol. Lett.*, vol. 17, no. 3, pp. 2905–2914, 2019.
- [23] E. Iorio *et al.*, “Key players in choline metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer,” *Front. Oncol.*, vol. 6, p. 205, 2016.
- [24] C. V Clevenger, S. L. Gadd, and J. Zheng, “New mechanisms for PRLr action in breast cancer,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 20, no. 5, pp. 223–229, 2009.
- [25] J. Á. F. Vara, M. V. Carretero, H. Gerónimo, K. Ballmer-Hofer, and J. Martín-Pérez, “Stimulation of c-Src by prolactin is independent of Jak2,” *Biochem. J.*, vol. 345, no. 1, pp. 17–24, 1999.
- [26] L. González, J. G. Miquet, and A. I. Sotelo, “Effects of Growth Hormone (GH) Overexpression in Signaling Cascades Involved in Promotion of Cell Proliferation and Survival,” *Contemp. Asp. Endocrinol.*, p. 73, 2011.
- [27] N. A. Sheth, J. N. Suraiya, A. R. Sheth, K. J. Ranadive, and D. J. Jussawalla, “Ectopic production of human placental lactogen by human breast tumors,” *Cancer*, vol. 39, no. 4, pp. 1693–1699, 1977.
- [28] X. Yang, D. Qiao, K. Meyer, T. Pier, S. Keles, and A. Friedl, “Angiogenesis induced by signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) is dependent on autocrine activity of proliferin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 9, pp. 6490–6502, 2012.
- [29] W. L. Miller and N. L. Eberhardt, “Structure and evolution of the growth hormone gene family,” *Endocr. Rev.*, vol. 4, no. 2, pp. 97–130, 1983.
- [30] U. J. Lewis, R. N. P. Singh, G. F. Tutwiler, M. B. Sigel, E. F. VanderLaan, and W. P. VanderLaan, “Human growth hormone: a complex of proteins,” in *Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference*, 1980, pp. 477–508.
- [31] D. Le Roith, C. Bondy, S. Yakar, J.-L. Liu, and A. Butler, “The somatomedin hypothesis: 2001,” *Endocr. Rev.*, vol. 22, no. 1, pp. 53–74, 2001.
- [32] A. A. Hayashi and C. G. Proud, “The rapid activation of protein synthesis by growth hormone requires signaling through mTOR,” *Am. J. Physiol. Metab.*, vol. 292, no. 6, pp. E1647–E1655, 2007.
- [33] R. Subramani, S. B. Nandy, D. A. Pedroza, and R. Lakshmanaswamy, “Role of growth hormone in breast cancer,” *Endocrinology*, vol. 158, no. 6, pp. 1543–1555, 2017.
- [34] D. L. Kleinberg, “Early mammary development: growth hormone and IGF-1,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 2, no. 1, pp. 49–57, 1997.

- [35] J. Stingl, “Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer,” *Horm. Cancer*, vol. 2, no. 2, pp. 85–90, 2011.
- [36] S. Nandi, “Endocrine control of mammary-gland development and function in the C3H/He Crgl mouse,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 21, no. 6, pp. 1039–1063, 1958.
- [37] M. I. Gallego *et al.*, “Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects,” *Dev. Biol.*, vol. 229, no. 1, pp. 163–175, 2001.
- [38] C. L. Boguszewski and M. C. da S. Boguszewski, “Growth hormone’s links to cancer,” *Endocr. Rev.*, vol. 40, no. 2, pp. 558–574, 2018.
- [39] A. H. N. Kamdje *et al.*, “New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers,” *World J. Clin. Cases WJCC*, vol. 2, no. 12, p. 769, 2014.
- [40] M. Videira, R. L. Reis, and M. A. Brito, “Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Reviews Cancer*, vol. 1846, no. 2, pp. 312–325, 2014.
- [41] M. Raccurt *et al.*, “High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland,” *J. Endocrinol.*, vol. 175, no. 2, pp. 307–318, 2002.
- [42] J. Felipe Lima, S. Nofech-Mozes, J. Bayani, and J. Bartlett, “EMT in breast carcinoma—a review,” *J. Clin. Med.*, vol. 5, no. 7, p. 65, 2016.
- [43] S. J. Isakoff, “Triple negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents,” *Cancer J.*, vol. 16, no. 1, p. 53, 2010.
- [44] G. M. Freedman, P. R. Anderson, T. Li, and N. Nicolaou, “Locoregional recurrence of triple- negative breast cancer after breast- conserving surgery and radiation,” *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.*, vol. 115, no. 5, pp. 946–951, 2009.
- [45] J. E. Panoff *et al.*, “Risk of locoregional recurrence by receptor status in breast cancer patients receiving modern systemic therapy and post-mastectomy radiation,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 128, no. 3, pp. 899–906, 2011.
- [46] F. Cardoso, E. Senkus-Konefka, L. Fallowfield, A. Costa, M. Castiglione, and E. G. W. Group, “Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,” *Ann. Oncol.*, vol.

- 21, no. suppl\_5, pp. v15–v19, 2010.
- [47] H. A. Wahba and H. A. El-Hadaad, “Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer,” *Cancer Biol. Med.*, vol. 12, no. 2, p. 106, 2015.
- [48] O. Gluz, C. Liedtke, N. Gottschalk, L. Pusztai, U. Nitz, and N. Harbeck, “Triple-negative breast cancer—current status and future directions,” *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 12, pp. 1913–1927, 2009.
- [49] L. A. Carey *et al.*, “The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes,” *Clin. cancer Res.*, vol. 13, no. 8, pp. 2329–2334, 2007.
- [50] A. Bhattacharyya, U. S. Ear, B. H. Koller, R. R. Weichselbaum, and D. K. Bishop, “The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 31, pp. 23899–23903, 2000.
- [51] R. Dent *et al.*, “Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence,” *Clin. cancer Res.*, vol. 13, no. 15, pp. 4429–4434, 2007.
- [52] E. Varghese, S. M. Samuel, M. Abotaleb, S. Cheema, R. Mamtani, and D. Büsselberg, “The ‘yin and yang’ of natural compounds in anticancer therapy of triple-negative breast cancers,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 10, p. 346, 2018.
- [53] X. Tao and P. E. Lipsky, “The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F,” *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, vol. 26, no. 1, pp. 29–50, 2000.
- [54] R. Han, M. Rostami- Yazdi, S. Gerdes, and U. Mrowietz, “Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune- mediated inflammatory diseases,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 74, no. 3, pp. 424–436, 2012.
- [55] J. Li *et al.*, “Triptolide-induced in vitro and in vivo cytotoxicity in human breast cancer stem cells and primary breast cancer cells,” *Oncol. Rep.*, vol. 31, no. 5, pp. 2181–2186, 2014.
- [56] H. Liu, L. Tang, X. Li, and H. Li, “Triptolide inhibits vascular endothelial growth factor- mediated angiogenesis in human breast cancer cells,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 830–836, 2018.
- [57] Z. Zhang *et al.*, “Triptolide interferes with XRCC1/PARP1-mediated DNA repair and confers sensitization of triple-negative breast cancer cells to cisplatin,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, pp. 1541–1546, 2019.

- [58] Y. Zhao, X. Zeng, H. Tang, D. Ye, and J. Liu, "Combination of metformin and paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis of human prostate cancer cells via oxidative stress and targeting the mitochondria-dependent pathway," *Oncol. Lett.*, vol. 17, no. 5, pp. 4277–4284, 2019.
- [59] Y. Lei *et al.*, "Metformin targets multiple signaling pathways in cancer," *Chin. J. Cancer*, vol. 36, no. 1, p. 17, 2017.
- [60] E. DORAN and A. P. HALESTRAP, "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain," *Biochem. J.*, vol. 348, no. 3, pp. 607–614, 2000.
- [61] M.-Y. El-Mir, V. Nogueira, E. Fontaine, N. Avéret, M. Rigoulet, and X. Leverve, "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 1, pp. 223–228, 2000.
- [62] S. Andrzejewski, P. M. Siegel, and J. St-Pierre, "Metabolic Profiles Associated With Metformin Efficacy in Cancer," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, 2018.
- [63] R. S. Wahdan-Alaswad, S. M. Edgerton, H. S. Salem, and A. D. Thor, "Metformin Targets Cholesterol Biosynthesis Pathway, GM1 Lipid Raft Stabilization, EGFR Signaling and Proliferation in Triple Negative Breast Cancers," *Canc Ther. Oncol Int J*, vol. 9, p. 555765, 2018.
- [64] H. J. Kim *et al.*, "Metformin increases survival in hormone receptor-positive, HER2-positive breast cancer patients with diabetes," *Breast Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, p. 64, 2015.
- [65] D. G. Hardie, "AMPK—sensing energy while talking to other signaling pathways," *Cell Metab.*, vol. 20, no. 6, pp. 939–952, 2014.
- [66] M. Bizjak, P. Malavašič, K. Dolinar, J. Pohar, S. Pirkmajer, and M. Pavlin, "Combined treatment with Metformin and 2-deoxy glucose induces detachment of viable MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 1761, 2017.
- [67] R. S. Y. Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 30, no. 1, p. 87, 2011.
- [68] Z. Su, Z. Yang, Y. Xu, Y. Chen, and Q. Yu, "Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis," *Mol. Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 48, 2015.
- [69] Y. Tsujimoto, L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell, and C. M. Croce, "Cloning

- of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation,” *Science* (80-. ), vol. 226, no. 4678, pp. 1097–1099, 1984.
- [70] J. C. Reed, “Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies,” in *Seminars in hematology*, 1997, vol. 34, no. 4 Suppl 5, pp. 9–19.
- [71] P. Boya, F. Reggiori, and P. Codogno, “Emerging regulation and functions of autophagy,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 713–720, 2013.
- [72] C. W. Yun and S. H. Lee, “The roles of autophagy in cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 11, p. 3466, 2018.
- [73] Y. Feng, D. He, Z. Yao, and D. J. Klionsky, “The machinery of macroautophagy,” *Cell Res.*, vol. 24, no. 1, p. 24, 2014.
- [74] D. J. Klionsky *et al.*, “A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes,” *Dev. Cell*, vol. 5, no. 4, pp. 539–545, 2003.
- [75] P. Boya *et al.*, “Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis,” *Mol. Cell Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 1025–1040, 2005.
- [76] Y. Kabeya *et al.*, “LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 21, pp. 5720–5728, 2000.
- [77] I. Tanida, “Autophagy basics,” *Microbiol. Immunol.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–11, 2011.
- [78] L. Ding *et al.*, “MicroRNAs Involved in Carcinogenesis, Prognosis, Therapeutic Resistance and Applications in Human Triple-Negative Breast Cancer,” *Cells*, vol. 8, no. 12, p. 1492, 2019.
- [79] C. A. Hudis and L. Gianni, “Triple-negative breast cancer: an unmet medical need,” *Oncologist*, vol. 16, no. Supplement 1, pp. 1–11, 2011.
- [80] M. Gebre-Medhin, L.-G. Kindblom, H. Wennbo, J. Törnell, and J. M. Meis-Kindblom, “Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer,” *Am. J. Pathol.*, vol. 158, no. 4, pp. 1217–1222, 2001.
- [81] S. M. Samuel *et al.*, “Metformin represses glucose starvation induced autophagic response in microvascular endothelial cells and promotes cell death,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 132, pp. 118–132, 2017.
- [82] W. Huang *et al.*, “Triptolide inhibits the proliferation of prostate cancer cells and down-regulates SUMO-specific protease 1 expression,” *PLoS One*, vol. 7,

no. 5, 2012.

- [83] J. M. Song *et al.*, “Triptolide suppresses the in vitro and in vivo growth of lung cancer cells by targeting hyaluronan-CD44/RHAMM signaling,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 16, p. 26927, 2017.
- [84] H. Zhao *et al.*, “Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 44, no. 11, pp. 633–641, 2012.
- [85] R. Soundararajan, R. Sayat, G. S. Robertson, and P. A. Marignani, “Triptolide: An inhibitor of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) in cancer cells,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 8, no. 21, pp. 2054–2062, 2009.
- [86] Y. Miyata, T. Sato, and A. Ito, “Triptolide, a diterpenoid triepoxide, induces antitumor proliferation via activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 1 by decreasing phosphatidylinositol 3-kinase activity in human tumor cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 336, no. 4, pp. 1081–1086, 2005.
- [87] J. M. Fidler *et al.*, “PG490-88, a derivative of triptolide, causes tumor regression and sensitizes tumors to chemotherapy,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 2, no. 9, pp. 855–862, 2003.
- [88] T. M. Kiviharju, P. S. Lecane, R. G. Sellers, and D. M. Peehl, “Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 8, pp. 2666–2674, 2002.
- [89] W.-T. Chang *et al.*, “Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis A role for the p53 pathway,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 3, pp. 2221–2227, 2001.
- [90] J. O. Lee *et al.*, “Metformin overcomes resistance to cisplatin in triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting RAD51,” *Breast Cancer Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–18, 2019.
- [91] S. Varghese, S. Samuel, E. Varghese, P. Kubatka, and D. Büsselberg, “High Glucose Represses the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effect of Metformin in Triple Negative Breast Cancer Cells,” *Biomolecules*, vol. 9, no. 1, p. 16, 2019.
- [92] S. M. Samuel, E. Varghese, S. Varghese, and D. Büsselberg, “Challenges and perspectives in the treatment of diabetes associated breast cancer,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 70, pp. 98–111, 2018.



- [93] J. Zhang *et al.*, “Metformin inhibits tumorigenesis and tumor growth of breast cancer cells by upregulating miR-200c but downregulating AKT2 expression,” *J. Cancer*, vol. 8, no. 10, p. 1849, 2017.
- [94] M. Zakikhani, R. Dowling, I. G. Fantus, N. Sonenberg, and M. Pollak, “Metformin is an AMP kinase–dependent growth inhibitor for breast cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 21, pp. 10269–10273, 2006.
- [95] I. Ben Sahra *et al.*, “The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level,” *Oncogene*, vol. 27, no. 25, p. 3576, 2008.
- [96] R. S. Wahdan-Alaswad *et al.*, “Metformin-induced killing of triple-negative breast cancer cells is mediated by reduction in fatty acid synthase via miRNA-193b,” *Horm. Cancer*, vol. 5, no. 6, pp. 374–389, 2014.
- [97] I. Ben Sahra *et al.*, “Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 13, pp. 4366–4372, 2011.
- [98] E. White, “The role for autophagy in cancer,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 1, pp. 42–46, 2015.
- [99] V. Karantza and E. White, “Role of autophagy in breast cancer,” *Autophagy*, vol. 3, no. 6, pp. 610–613, 2007.
- [100] E. White, “Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer,” *Nat. Rev. cancer*, vol. 12, no. 6, pp. 401–410, 2012.
- [101] R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, and E. White, “Role of autophagy in cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 12, pp. 961–967, 2007.
- [102] Y. Xin *et al.*, “Role of autophagy in regulating the radiosensitivity of tumor cells,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 143, no. 11, pp. 2147–2157, 2017.
- [103] C. Cerella, M.-H. Teiten, F. Radogna, M. Dicato, and M. Diederich, “From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 6, pp. 1111–1122, 2014.
- [104] B. Ozpolat and D. M. Benbrook, “Targeting autophagy in cancer management—strategies and developments,” *Cancer Manag. Res.*, vol. 7, p. 291, 2015.
- [105] Y. Chen *et al.*, “Unravelling the multifaceted roles of Atg proteins to improve cancer therapy,” *Cell Prolif.*, vol. 47, no. 2, pp. 105–112, 2014.
- [106] X. Ding *et al.*, “Triptolide induces apoptotic cell death of human cholangiocarcinoma cells through inhibition of myeloid cell leukemia-1,” *BMC*

- Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 271, 2014.
- [107] Y.-K. I. Lau *et al.*, “Metformin and erlotinib synergize to inhibit basal breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 21, p. 10503, 2014.
- [108] C.-J. Li *et al.*, “Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo,” *Cancer Lett.*, vol. 319, no. 2, pp. 203–213, 2012.
- [109] R. R. Falah, W. H. Talib, and S. J. Shbailat, “Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis,” *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 9, no. 4, pp. 235–252, 2017.
- [110] J. Liu *et al.*, “Triptolide inhibits colon-rectal cancer cells proliferation by induction of G1 phase arrest through upregulation of p21,” *Phytomedicine*, vol. 19, no. 8–9, pp. 756–762, 2012.
- [111] X. Yan, X.-X. Ke, H. Zhao, M. Huang, R. Hu, and H. Cui, “Triptolide inhibits cell proliferation and tumorigenicity of human neuroblastoma cells,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 11, no. 2, pp. 791–796, 2015.
- [112] H. Zhang *et al.*, “Triptolide inhibits proliferation and invasion of malignant glioma cells,” *J. Neurooncol.*, vol. 109, no. 1, pp. 53–62, 2012.
- [113] H. Gao *et al.*, “Triptolide induces autophagy and apoptosis through ERK activation in human breast cancer MCF-7 cells,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 15, no. 4, pp. 3413–3419, 2018.

## 7 EKLER

### 7.1 KULLANILAN ÇÖZELTİLER

#### 7.1.1 Hücre Dondurma Medyası Hazırlanışı (10 ml için)

Fetal sığır serumu (FBS) 9 ml

Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 1 ml

DMSO kullanılarak hücre kültürüne uygun hazırlanan medya 0,22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir.

#### 7.1.2 Hücre Lizis Tamponunun (CLB) Hazırlanışı (10 ml için)

M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent 10 ml

Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli 1 tablet

Roche® proteaz inhibitör kokteyli 1 tablet

+4°C'de muhafaza edilir

#### 7.1.3 5X Laemmli Tamponunun Hazırlanışı (10 ml için)

1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8) 2,0 ml

Bromofenol mavisi (%1(ağırlık/hacim)) 0,5 ml Gliserol 5,0 ml

β-merkaptoetanol 2,5 ml

Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>) 2,0 gr

-20°C'de muhafaza edilir.

#### 7.1.4 Bradford Çözeltilisinin Hazırlanışı (250 ml için)

Coomassie mavisi (C<sub>47</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>) 25,0 mg

%95 (hacim/hacim) etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 12,5 ml

%85 (hacim/hacim) asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH)25,0 ml

Distile su (dH<sub>2</sub>O) 212,5 ml 100

+4°C'de muhafaza edilir.

#### **7.1.5 Tris-Baz Çözeltisinin (1,5 Molar) Hazırlanışı (pH 8,8)**

Tris-baz ( $C_4H_{11}NO_3$ ) 90,8 gr

Distile su ( $dH_2O$ ) 500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 8,8'e ayarlanır.

Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır.

#### **7.1.6 Tris-Baz Çözeltisinin (0.5 Molar) Hazırlanışı (pH 6,8)**

Tris-baz ( $C_4H_{11}NO_3$ ) 30,25 gr

Distile su ( $dH_2O$ ) 500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde çözülerek pH 6,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır.

#### **7.1.7 %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)**

Sodyum dodesil sülfat (SDS,  $NaC_{12}H_{25}SO_4$ ) 10,0 gr

Distile su ( $dH_2O$ ) 100 ml

Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### **7.1.8 %30 (v/v) Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltisinin Hazırlanışı (100 ml için)**

Akrilamid ( $C_3H_5NO$ ) 29,2 gr

Bis-Akrilamid ( $C_7H_{10}N_2O_2$ ) 0,8 gr

Distile su ( $dH_2O$ ) 100 ml

+4°C'de muhafaza edilir.

#### **7.1.9 %10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)**

Amonyum persülfat ( $(NH_4)_2S_2O_8$ ) 1,0 gr

Distile su ( $dH_2O$ ) 10 ml

-20°C'de muhafaza edilir

#### **7.1.10 10X Yürütme Tamponun Hazırlanışı (pH 8,3)**

Tris-baz ( $C_4H_{11}NO_3$ ) 30,3 gr

Glisin ( $C_2H_5NO_2$ ) 144,0 gr

Sodyum dodesil sülfat (SDS,  $NaC_{12}H_{25}SO_4$ ) 10,0 gr

Distile su ( $dH_2O$ ) 1000 ml

Tris-baz ve glisin 800 ml distile su içinde çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. SDS eklenir ve çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### 7.1.11 10X Transfer Tamponunun Hazırlanışı (pH 8,3)

Tris-baz (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) 30,3 gr

Glisin (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) 144,0 gr

Distile su (dH<sub>2</sub>O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### 7.1.12 %12 (v/v) Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

	ALT JEL	ÜST JEL
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	3,4 ml	3,075 ml
Tris-Baz çözeltisi	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,125 ml (0,5 M, pH 6,8)
%10 (ağırlık/hacim) SDS	0,1 ml	0,05 ml
%30 (hacim/hacim) Akrilamid/Bis-akrilamid	4,0 ml	0,67 ml
%10 (ağırlık/hacim) APS	0,05 ml	0,025 ml
Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005 ml	0,005 ml

#### 7.1.13 10X Tris Tampon (TBS) Çözeltisinin Hazırlanışı (pH 7,6)

Tris-baz (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) 12,11 gr

Sodyum klorür (NaCl) 86,6 gr

Distile su (dH<sub>2</sub>O) 1000 ml

Kimyasallar 800 ml suyun içinde çözülerek pH 7,6'ya ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve TBS-Tween çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 (hacim/hacim) oranında Tween eklenilerek çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### 7.1.14 %5 (w/v) Süt Çözeltisinin Hazırlanışı (50 ml için)

Yağsız süt tozu 2,5 gr

1X TBS-T çözeltisi 50 ml

-20°C'de muhafaza edilir.

#### 7.1.15 5 Tris-Baz Çözeltisinin (1 Molar) Hazırlanışı (pH 8,5)

Tris-baz ( $C_4H_{11}NO_3$ ) 60,5 gr  
Distile su ( $dH_2O$ ) 500 ml  
Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

#### 7.1.16 50x TAE Çözeltisinin Hazırlanışı (1L için) (pH 8,6)

EDTA disodium tuzu 18.61 gr  
Tris baz 242g Asetik asit 57.1 ml  
İyonize edilmiş distile su ( $DDH_2O$ )

#### 7.1.17 Kumarik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

P-Kumarik asit ( $C_9H_8O_3$ ) 0,15 gr  
Dimetilsülfoksit ( $DMSO, (CH_3)_2SO$ ) 10 ml  
+4°C'de muhafaza edilir.

#### 7.1.18 Luminol Çözeltisinin Hazırlanışı (10 ml için)

Luminol ( $C_8H_7N_3O_2$ ) 0,44 gr  
Dimetilsülfoksit ( $DMSO, (CH_3)_2SO$ ) 10 ml  
-20°C'de muhafaza edilir.

#### Kemiluminesans Çözeltisinin hazırlanışı

Kemiluminesans A Çözeltisi	
Distile su ( $dH_2O$ )	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Kumarik asit çözeltisi	75,0 $\mu$ l
Luminol çözeltisi	150,0 $\mu$ l
Kemiluminesans B Çözeltisi	
Distile su ( $dH_2O$ )	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )	15,0 $\mu$ l

A ve B çözeltileri hazırlandıktan sonra karıştırılır ve karanlık koşullarda kullanılır.

#### 7.1.19 10X Fosfat Tampon Çözeltisinin (PBS) Hazırlanışı (pH 7,4)

Sodyum klorür ( $NaCl$ ) 80,0 gr  
Potasyum klorür ( $KCl$ ) 2,0 gr  
Disodyum hidrojen fosfat ( $Na_2HPO_4$ ) 14,4 gr  
Mono potasyum fosfat ( $KH_2PO_4$ ) 2,4 gr

Distile su (dH<sub>2</sub>O) 1000 ml

## 7.2 KULLANILAN CİHAZLAR

Kullanılan cihazlar Tablo 7.1 de verilmiştir.

Tablo 7.1 Kullanılan Cihazlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer	Arctiko
Derin dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı ( No frost )	4263TMB	Arçelik
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore q-5UV
UV-Translüminatör Transluminatör	GelDOC	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Laminar flow	LN090	Nüve
Otoklav cihazı	OT40L	Nüve
Soğutmalı etüv	ES120	Nüve
Mikropipet (0,5-10 µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200 µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200-1000 µl)	T27274	Thermo Scientific
Floresan mikroskopu	1X71	Olympus
İnverted mikroskop	XDS-1B	SOIF
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
Akış sitometri cihazı	AC6531180147	BD Biosciences
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
Elektroforez sistemi	1658004	Bio-Rad
Transfer cihazı	10016505C	Bio-Rad
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
Hassas tartı	LE6202S	Sartorius
pH metre	N315	BIO Technologies
Spektrofotometre	2100	Amershan Biosciences
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Santrifüj cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj cihazı (Büyük)	5810R	Eppendorf
Karıştırıcı İnkübatörü	Escella E25	New Brunswick
Santrifüj cihazı	22331	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
PVDF Membran	88518	Thermo

## 7.3 HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Tablo 7.2'de verilmiştir.

Tablo 7.2 Hücre kültür donanımlar listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	90026	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör set	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
DMEM Medium	41966-029	Gibco
MDA-MB-231 hücreleri		
Etüv	Heracell 1150	Thermo
Hemastometre	-	Neubauer
Laminar flow	12469,2	Thermo Scientific
Laminar flow	LN090	Nüve
Pipet uçları (1000 µl )	4130135	CAPP
Pipet uçları (200 µl )	5130070	CAPP
Pipet uçları (10 µl )	5030010	CAPP

#### 7.4 KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler Tablo 7.3'te verilmiştir.

Tablo 7.3 Kullanılan kimyasallar listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid/Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMAALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka



DAPI Boya		
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Appllichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Appllichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
Sodyum Klorür	A2941	Appllichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
Ponceau kırmızı Belirteci	A1405	Appllichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Paraffin 42-44	8002-74-2	MERCK
Acridine Orange	A1398,0025	Appllichem
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas

## 7.5 KULLANILAN ANTİKORLAR

Kullanılan antikolar Tablo 7.4'te verilmiştir.

Tablo 7.4 Kullanılan antikolar listesi

<b>ADI</b>	<b>KATALOG NO</b>	<b>FİRMA ADI</b>
Bax	610982	BD Biosciences
LC3A/B	12741	Cell Signaling Technology
Beclin-1	3495	Cell Signaling Technology
Bcl-2	15071	Cell Signaling Technology
Atg3	3415	Cell Signaling Technology
Atg5	12994	Cell Signaling Technology
Atg7	8558	Cell Signaling Technology
Atg12	4180	Cell Signaling Technology
Atg 16		Cell Signaling Technology
$\beta$ -aktin	12620	Cell Signaling Technology
Apaf		

## 8 ÖZGEÇMİŞ



**1.ADI SOYADI:** Gizat Rakhmatula

### 2. KİŞİSEL BİLGİLER:

Cinsiyet: Erkek

Uyruğu: Kazakistan Cumhuriyeti

Doğum Yeri: Şimkent

Doğum Tarihi: 21/07/1995

### 3.İLETİŞİM BİLGİLERİ:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon:+905530774750

E-posta: gunch.kz@gmail.com

### 5.OĞRENİM DURUMU

2013-2017	Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü - Lisans
2017-2020	İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü- Yüksek Lisans

### 6. YAYINLAR

## 6.1 Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. **Gizat Rakhmatula**, Pınar Obakan Yerlikaya, Elif Damla Arisan, Ajda Coker Gurkan, “Triptolide resistance was prevented by metformin co-treatment under increased growth hormone signaling conditions in MDA-MB-231 cells” 3rd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, 18-20 December 2019, Kayseri-TURKEY

## 7.YABANCI DİL BİLGİSİ

Kazakça	Okuma, yazma, konuşma: Ana dil
Rusça	Okuma, yazma, konuşma: Ana dil
İngilizce	Okuma, yazma, konuşma: Orta seviye (Intermediate)
Türkçe	Okuma, yazma, konuşma: İleri düzey Türkçe (C1)