

**T.C
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AURORA B KİNAZ İNHİBİTÖRÜ BI 831266 MOLEKÜLÜNÜN
SİSPLATİN TEDAVİSİNİN SİTOTOKSİK POTANSİYELİ ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ronahi AŞKAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU

BİNGÖL-2023

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca tez çalışmamda beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU, tüm süreç boyunca benim için gerçek bir kılavuz oldunuz. Özellikle araştırma konusunda verdiğiniz değerli öneriler ve eleştiriler sayesinde çalışmamı daha da geliştirme fırsatı buldum. Sizin teşvikleriniz ve sabrınız sayesinde zorlu süreçlerde bile motive olmayı başardım. Siz olmasaydınız, bu tez çalışması başarıya ulaşamazdı. Benim için gösterdiğiniz yoğun çaba, özveriniz ve öncülük ettiğiniz süreçler için en içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

Aynı şekilde, çalışmamın akademik yönünde beni destekleyen Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kadir ERDOĞAN'a da en derin minnettarlığımı sunmak isterim.

Bunun yanı sıra, laboratuvar çalışmalarımda becerilerimi geliştirmeme ve elde ettiğim sonuçları daha doğru bir şekilde yorumlamama yardımcı olan Yusuf TOY ve Öğr. Gör. Aydın SEVER'e teşekkürlerimi sunmak isterim.

Bana her zaman sonsuz sevgi ve destek veren, hayatımın her alanında beni motive eden ve başarıma inanmamı sağlayan sevgili annem Rahime AŞKAN ve sevgili babam İskan AŞKAN, sevgili kardeşlerim Sabiha AŞKAN, Süleyman AŞKAN, Suzan BOZTOPRAK, Selvihan YILDIZ, Mesude AŞKAN, Evin AŞKAN, Rojhat AŞKAN ve Azade AŞKAN'a sonsuz teşekkür ederim. Sizlerin varlığı her zaman yanımda olduğunuzu hissettirdi ve başarıma katkıda bulundu. Hepinize teşekkür etmek için yeterli kelimeler yok, her birinize minnettarım.

Bu proje Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje No: BAP-SHMYO.2023.001) desteklenmiştir.

Ronahi AŞKAN

Bingöl 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Tanımı ve Kişiselleştirilmiş Tedavi Yöntemleri.....	1
1.2. DNA Hasarı.....	3
1.2.1. DNA Tamir Mekanizmaları.....	4
1.2.1.1. Doğrudan Tamir Mekanizması.....	5
1.2.1.2. Doğrudan Olmayan Tamir Mekanizması.....	6
1.3. Apoptozis.....	9
1.3.1. Apoptozis Mekanizmaları.....	10
1.3.1.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak.....	11
1.3.1.2. İntrinsik (İçsel) Yolak.....	11
1.4. Hücre Döngüsü.....	13
1.4.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları.....	15
1.5. Aurora Kinazlar.....	18
1.6. Aurora Kinaz B.....	21
1.7. BI 831266.....	23
1.8. Sisplatin.....	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Memeli hücre kültürü çalışmaları.....	31
3.2.2. 2D Koloni sağ-kalım analizi.....	31
3.2.3. 3D Soft agar koloniformasyon analizi.....	32

3.2.4. Yara-kapanma analizi.....	33
3.2.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve Western blot analizleri.....	33
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Aurora Kinaz B İnhibitörü BI 831266 Molekülünün MCF-7 Meme Kanseri Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkisinin Ön Çalışmalarla Belirlenmesi.....	35
4.2. MCF-7 Hücrelerinde BI 831266 Molekülünün ve Sisplatinin IC50 Doz Değerinin Koloni Sağ-kalım Analiziyle Belirlenmesi.....	36
4.3. BI 831266 Molekülünün ve Sisplatin Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde Koloni Sağ-Kalımına Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	38
4.4. Sisplatin ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kanser 3D Koloni Oluşumuna Olan Etkisinin Belirlenmesi.....	41
4.5. Sisplatin ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kanser Hücre Göçüne Olan Etkisinin Belirlenmesi (İn Vitro Hücre Migrasyon Analizi.....	42
4.6. Sisplatin ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kanser Hücrelerinde Hücre Döngüsü ve Apoptotik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi (SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri.....	44
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AIF	: Apoptoz indükleyici faktör (Apoptosis Inducing Factor)
APC	: Anafaz teşvik kompleksi (Anaphase Promoting Complex)
AURK-A	: Aurora Kinaz A proteini (Aurora kinase A protein)
AURK-B	: Aurora Kinaz B proteini (Aurora kinase B protein)
AURK-C	: Aurora Kinaz C proteini (Aurora kinase C protein)
ABI	:Aurora B İnhibitör
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
°C	: Santigrad derece
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
nM	: Nanomolar
CO ₂	: Karbondioksit
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
kDa	: Kilo Dalton
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (Michigan Cancer Foundation-7)
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri
TEMED	: N,N,N,N-tetrametietilendiamin
HCL	: Hidroklorik asit
KCL	: Potasyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma 2
p53	: Tümör Baskılayıcı Protein 53
cPARP	: Cleaved Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florür
DTT	: Dithiothreitol

Tris	: Trihidroksimetil Aminometan
NP-40	: Nonidet P40
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EGTA	: Etilenglisoltetraasetik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PVDF	: Poliviniliden Diflorid
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	DNA Onarım Fonksiyonları.....	4
Şekil 1.2.	DNA onarım mekanizmaları.....	5
Şekil 1.3.	DNA çift zincir kırığı onarım mekanizmaları.....	8
Şekil 1.4.	Apoptoz meydana geldiğinde hücrenin morfolojik değişimi.....	10
Şekil 1.5.	İntrinsik (iç) mitokondriyal ve ekstrinsik (dış) apoptotik yollar.....	12
Şekil 1.6.	Hücre döngüsü safhaları.....	14
Şekil 1.7.	Hücre döngüsü kontrol noktaları; siklin ve CDK'lar.....	17
Şekil 1.8.	Aurora kinaz proteinlerinin şematik gösterimi.....	20
Şekil 1.9.	Aurora Kinaz B Aktivitesi.....	23
Şekil 1.10.	BI 831266 kimyasal formülü.....	24
Şekil 1.11.	Sisplatin kimyasal formülü.....	25
Şekil 4.1.	Aurora Kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülünün MCF-7 meme kanseri üzerindeki anti-proliferatif etkisi.....	35
Şekil 4.2.	BI 831266 molekülü ile 24 saat tedavi edilen MCF-7 hücrelerin artan konsantrasyonlara bağlı canlılık grafikleri.....	36
Şekil 4.3.	Sisplatin ile 1 saat tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin artan konsantrasyonlarına bağlı canlılık grafikleri.....	37
Şekil 4.4.	Kombinasyon dozların uygulanma saatleri.....	38
Şekil 4.5.	BI 831266 molekülü ve sisplatin kombinasyon tedavisinin MCF-7 hücrelerine olan etkisinin koloni sağ-kalım grafikleri.....	39
Şekil 4.6.	BI 831266 molekülü ve sisplatin kombinasyon tedavisinin MCF-7 hücrelerine olan etkisinin koloni sağ-kalım grafikleri.....	40
Şekil 4.7.	Sisplatin ve BI 831266 molekülü kombinasyon tedavisinin 3D koloni oluşumuna olan etkisinin belirlenmesi.....	41
Şekil 4.8.	MCF-7 hücreleri ile gerçekleştirilen yara iyileşmesi analizi sonuçları.....	42
Şekil 4.9.	BI 831266 molekülü, sisplatin ve BI 831266+sisplatin kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki cPARP proteinin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	44

Şekil 4.10.	BI 831266 molekülü, sisplatin ve BI 831266+sisplatin kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki p53 proteinin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi	45
Şekil 4.11.	BI 831266 molekülü, sisplatin ve BI 831266+sisplatin kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki BCL-2 proteinin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	46
Şekil 4.12.	BI 831266 molekülü, sisplatin ve BI 831266+sisplatin kombinasyon tedavileri sonucu MCF-7 hücrelerindeki pro-cas3 proteinin ifade düzeyini gösteren bant görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	47

AURORA KİNAZ B İNHİBİTÖRÜ BI 831266 MOLEKÜLÜNÜN SİSPLATİN TEDAVİSİ ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Kanser, proteinlerin işlevsizliği nedeniyle hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda vücutta meydana gelen tedavi edilmesi zor bir hastalıktır. Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel yöntemler başarılı sonuçlar sağlasa da bu tedaviler hastalar üzerinde ciddi yan etkilere ve bir süre sonra hücrelerin bu tedavilere direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu önemli nedenlerden dolayı kişiselleştirilmiş tedaviler oldukça önem arz etmektedir. Kemoterapide hali hazırda kullanılan ilaçlarla küçük molekül inhibitörlerin kombinasyon tedavileri sinerjistik etki yaratarak bu olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için önemli rol oynamakta ve küçük molekül inhibitörleri önemli kılmaktadır.

Bu çalışmada, hücre döngüsünün önemli bir regülatörü olan Aurora B kinaz inhibisyonunun konvansiyonel anti-kanser tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılan sisplatinin sitotoksitesisi üzerine olan etkisi araştırıldı. Aurora B inhibisyonu için daha önce üzerine herhangi bir kombine sitotoksik analiz yapılmamış olan BI 831266 molekülü kullanıldı. Sisplatin ve BI 831266 molekülünün mono ve kombine tedavi sitotoksik etkileri insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) incelendi. MCF-7 hücreleri artan dozlarda sisplatin ve BI 831266 molekülü ile tedavi edildi ve sitotoksik etki koloni sağ-kalım analiziyle belirlendi. IC50 dozları belirlenen sisplatin ve BI 831266 molekülünün sinerjistik etkisi kombine tedavi ile belirlendi. Sisplatin ve BI 831266 molekülünün kombinasyon tedavisi, koloni sağ-kalım analizi ile kanser hücrelerinin koloni oluşma kapasitelerini inhibe ettiği gösterildi. Sisplatin ve BI 831266 molekülünün mono ve kombinasyon tedavileri MCF-7 hücrelerinde DNA hasarı ve apoptotik sinyal yollarındaki proteinlerin ekspresyon düzeylerine western blot yöntemiyle bakıldı.

Bu çalışmada elde edilen veriler, sisplatin ve BI 831266 molekülünün kombinasyon tedavileri hücre canlılığını azalttığı ve koloni sağ-kalımlarını baskıladığı, apoptozisle ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerini regüle ederek DNA hasarına ve apoptoza sebep olduğunu göstermektedir.

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

DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF AURORA KINASE B INHIBITOR BI 831266 MOLECULE ON CISPLATIN THERAPY

ABSTRACT

Cancer is a difficult to treat disease that occurs in the body as a result of the uncontrolled proliferation of cells due to the dysfunction of proteins. Although conventional methods used in cancer treatment provide successful results, these treatments cause serious side effects on patients and after a while, the cells develop resistance to these treatments. For these important reasons, personalized treatments are very important. Combination treatments of drugs currently used in chemotherapy and small molecule inhibitors play an important role in eliminating these negative effects by creating a synergistic effect, making small molecule inhibitors important.

In this study, the effect of inhibition of Aurora B kinase, an important regulator of the cell cycle, on the cytotoxicity of cisplatin, which has been used successfully in conventional anti-cancer therapy, was investigated. For Aurora B inhibition, BI 831266 molecule, on which no combined cytotoxic analysis was performed before, was used. The mono- and combined-therapy cytotoxic effects of cisplatin and BI 831266 were investigated in human breast cancer cells (MCF-7). MCF-7 cells were treated with increasing doses of cisplatin and the BI 831266 molecule, and the cytotoxic effect was determined by colony survival analysis. The synergistic effect of cisplatin and BI 831266 molecule, whose IC₅₀ doses were determined, was determined by combined treatment. Combination treatment of cisplatin and BI 831266 molecule was shown to inhibit colony formation capacity of cancer cells by colony survival assay. Mono and combination treatments of cisplatin and BI 831266 molecule DNA damage and expression levels of proteins in apoptotic signaling pathways in MCF-7 cells were evaluated by western blot method.

The data obtained in this study show that combination treatments of cisplatin and BI 831266 molecule reduce cell viability and suppress colony survival, and cause DNA damage and apoptosis by regulating the expression levels of apoptosis-related proteins.

Keywords: Cisplatin, BI 831266 molecule, Aurora kinases, Aurora Kinase B, cell cycle, MCF-7.

1.GİRİŞ

1.1. Kanserin Tanımı ve Kişiselleştirilmiş Tedavi Yöntemleri

Kanser, hücrenin büyümesini, bölünmesini, farklılaşmasını sağlayan ve hücreleri programlı hücre ölümüne yönlendiren proteinlerin işlevsizliği sonucunda hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasdır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Hücre büyümesi, bölünmesi, farklılaşması ve programlı hücre ölümünde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin endojen faktörler ve/veya eksojen genotoksik saldırılar neticesinde mutasyona uğramasıyla sağlıklı hücreler neoplastik transformasyona uğramakta ve kontrolsüz bir şekilde bölünme yeteneği kazanmaktadırlar (Hanahan ve Weinberg, 2011). Meme kanseri, tümör süpresör genlerin ya da protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalıp, büyümesi sonucu oluşmaktadır (Kormi vd., 2016). Meme kanseri kadınlar arasında ve dünya genelinde en sık görülen kanser çeşididir (Arbyn vd., 2020; Sung vd., 2021).

Kanserin gelişmesinde; genetik yatkınlık, yaş, yeme alışkanlıkları, alkol ve sigara tüketimi, iyonize radyasyon, reaktif oksijen türleri gibi endojen (iç) ve eksojen (dış) birçok faktör rol oynar (Reya vd., 2001). Kanser primer olarak doğduğu hücre tipine göre türlere ayrılır. Epitel hücrelerde meydana gelirse karsinom, kemik ya da yumuşak dokuda oluşursa sarkoma, bağışıklık hücrelerinde oluşursa miyelom ve lenfoma ve kan hücrelerinde oluşursa lösemi olarak türlere ayrılır. Kanserin erken teşhis edilmesinde düzenli olarak yapılan kanser tarama testleri kadar büyük önem arz eden semptomlar, kanser çeşitlerine göre değişkenlik gösterir. Bağırsak hareketlerindeki değişiklikler, vücudun herhangi bir yerinde ağrı, nefes darlığı, geçmeyen öksürük, kanamalar, cilt değişiklikleri, yutma zorluğu, karında şişlik, ani kilo kayıpları ve nedensiz morluklar bu semptomlara örnek gösterilebilir.(Cleeland vd., 2003; Kirkova vd., 2006)

Kanserli hastalara genel olarak uygulanan belli başlı tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve bu yöntemlere kıyasla uygulanma oranı düşük hormon tedavileri başta gelmektedir. Kanser tedavisinde uygulanan kimyasal ve

radasyon tedavileri başarılı sonuçlar sağlasa da, *de novo* ve/veya kazanılmış ilaç direnci ve söz konusu tedavilere bağlı gelişen ciddi yan etkiler uzun vadeli klinik başarıyı engellemektedir (O'Connor, 2015; Tsimberidou vd., 2020; Wake vd., 2019). Neoplastik hücrelerin genetik, epigenetik ve proteomik profillerinin hastaların standart ve/veya yeni nesil anti-kanser ajanlara (antikor-ilâç konjugatları, küçük molekül inhibitörler vd.) karşı yanıtlarında önemli bir prediktif biyogösterge ya da farmakolojik bir hedef olabileceği yapılan araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır (Chambliss ve Chan, 2016; Relling ve Evans, 2015; Wake vd., 2019; Witzmann ve Grant, 2003). Bu nedenle hücre döngüsü, DNA hasar yanıt/tamiri ve hücrenin programlı ölümü gibi önemli hücresel mekanizmalarda rol oynayan proteinlerin işlevlerinin tanımlanması tedavide başarı için önem arz etmektedir (Jones vd., 2019).

Kronik proliferasyon eğilimi neoplastik hücrelerinin en belirleyici özelliklerinin temelini oluşturmaktadır. Sağlıklı hücreler büyümeyi teşvik eden makromoleküler sinyallerin üretilmesini ve salınımını kontrollü bir şekilde regüle ederek hücresel homeostaziye sağlamak ve dolayısıyla doku bütünlüğü ve işlevselliğini korumaktadırlar (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bununla birlikte, büyüme baskılayıcı moleküler mekanizmalardan kaçınma veya söz konusu mekanizmalara karşı duyarsızlık da yine kanser hücrelerinin sahip olduğu temel kazanımlardan biridir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bunun yanı sıra, hücresel ölümüne karşı gelişen direnç, invazyon ve metastas mekanizmalarının aktivasyonu, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenez, bağışıklık sisteminden kaçınma ve hücresel enerji yollarının de-regülasyonu transformasyona uğramış hücrelerin diğer önemli özellikleri arasındadır (Hanahan, 2022; Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır (Ferro vd., 2012; Pilié vd., 2019; Vlodavsky vd., 2002).

Biyoteknolojik gelişmelerle birlikte hormon tedavileri, kök hücre tedavisi, immünoterapi ve kanser aşıları gibi birçok farklı tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Konvansiyonel tedavilerin her hasta üzerindeki etkisi ve sonucu farklı olduğundan, kanserli hastaya özgü tedavilerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Kanser hücrelerinin heterojen olması sebebiyle, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında amaç kanser hücrelerinin genetik, epigenetik ve proteomik profili esas alınarak en etkin tedavinin uygulanmasıdır (Duffy ve Crown, 2008; O'Connor, 2015; Tsimberidou vd., 2020). Hücre döngüsü ve DNA hasar

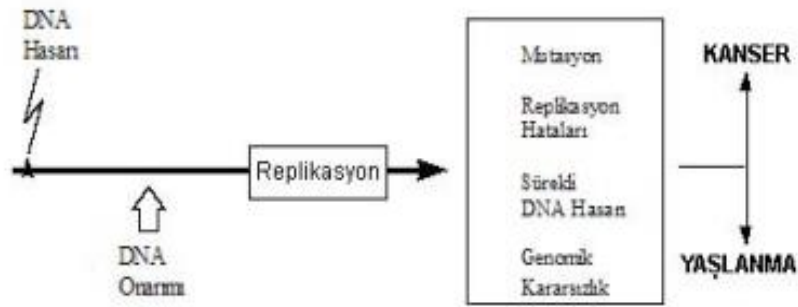
yanıt (DDR: “DNA damage response”) regülasyonunda rol oynayan faktörler "genom gözetleyicileri" (“care-takers”) olarak adlandırılmaktadır. Bu sınıftaki proteinler genellikle tümör baskılayıcı olarak görev alır ve (a) DNA hasarının anında tespitini, hücre döngüsünün durdurulmasını ve ilgili onarım mekanizmasının aktive edilmesini, (b) hasarlı kromatin bölgesinin tamirini ve (c) mutajenik moleküllerin DNA'da lezyon oluşturmada önce inaktivasyonunu sağlamakla görevlidirler. Hücresel transformasyon sırasında genom gözetleyicileri proteinlerin fonksiyonları inaktivasyon (loss-of-function mutations) mutasyonları veya epigenetik baskılama (epigenetic repression) yoluyla kaybolabilmektedir (Baylin ve Jones, 2016; Hanahan ve Weinberg, 2011).

1.2. DNA Hasarı

DNA, bütün organizmaların sahip olduğu genetik bilgiyi içeren ve bu bilginin nesilden nesile aktarılmasını sağlayan en önemli makro moleküldür (Gooding, 2002; Y. Wang vd., 2000). Bu önemli makro molekül endojen veya ekzojen kaynaklı çeşitli etkenlere maruz kalabilir ve bu maruziyetler sonucunda DNA’da hasar meydana gelir. Endojen kaynaklı nedenler; DNA’da meydana gelen baz kayıpları, yanlış eşleşmeler, oksidatif hasarlar ve replikasyon hataları gibi rastgele hatalar, metabolizma yan ürünleri reaktif oksijen türleri (ROS) örnek verilebilir (Alemi vd., 2022; Groelly vd., 2023; Y. Zhao vd., 2023). Ekzojen kaynaklı nedenler ise; güneş ışınlarından gelen UV ışınları, kimyasallar, iyonize radyasyon, ağır metaller DNA hasarına neden olan ekzojen kaynaklı sebeplerdir (Hoeijmakers, 2009; Iyama ve Wilson III, 2013). DNA’da meydana gelen bu hasarlar DNA şifrelerinde farklılığa neden olacağından dolayı yanlış proteinlerin sentezlenmesinde, birçok mutasyona ve çeşitli hastalıkların meydana gelmesine sebep olur (Dabravolski vd., 2022).

Hücrede DNA hasarı oluştuğunda DNA tamir mekanizmaları ile hasar giderilir. Hasar tamir edilemez ise hücreyi apoptoza yani programlı hücre ölümüne yönlendiren birçok apoptotik yolak aktifleşir. DNA tamir sisteminde 130 gen görev alır. Bu genler tarafından kodlanan proteinler DNA tamir sisteminde rol oynar. Örnek olarak DNA hasarına radyasyon sebep olursa ATM/ATR ve p53 sinyal yolağı aktifleşir (Altieri vd., 2008). Hücre döngüsünde her faz öncesi kontrol noktaları bulunur. Hücre bölünmesi boyunca DNA’da bir hasar meydana geldiğinde öncelikle hücre döngüsü durdurulur ve DNA’daki hasarın

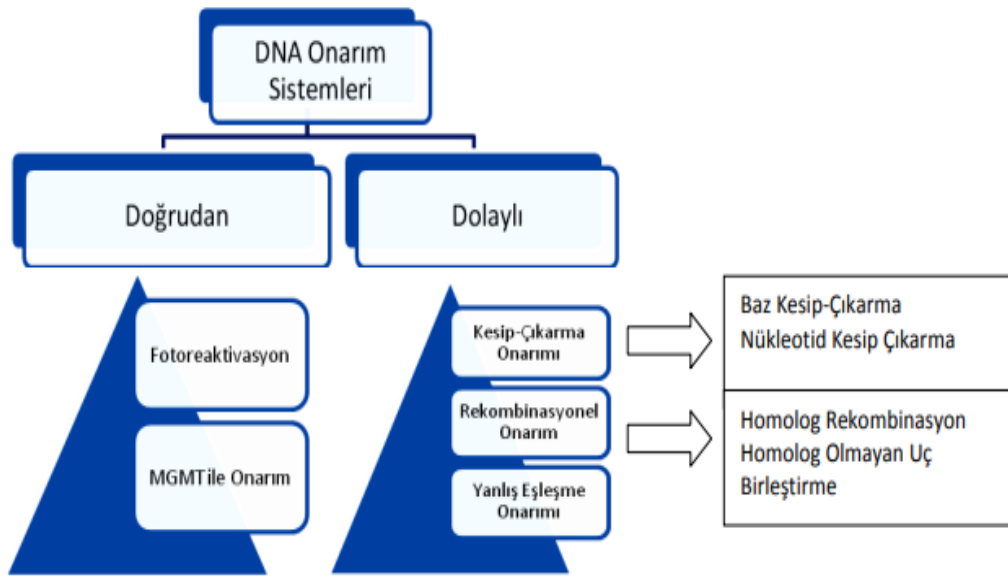
giderilmesi için tamir mekanizmaları devreye girer ve DNA tamir edilir. DNA'nın tamir edilememesi durumunda ise hücre apoptoza yönlendirilir. DNA tamir mekanizmaları genomik dengeyi sağlayan ve sürdüren sistemlerdir. Hücrede oluşan DNA hasarı proteinlerin hasarı algılaması, hücre döngüsünün durdurulması DNA onarım mekanizmalarının aktifleştirilmesi, programlı hücre ölümü, kanser ve yaşlanma gibi birbirini izleyen (Şekil 1.1) bir dizi adımdan oluşur (Sancar vd., 2004).



Şekil 1.1. DNA Onarım Fonksiyonları (Alberts vd., 2023)

1.2.1. DNA Tamir Mekanizmaları

Hücrelerde genomik dengenin sağlanabilmesi için kompleks bir dizi DNA hasar yanıt sistemi bulunmaktadır (Şekil 1.2). DNA hasar onarımı için bazı enzimler (helikazlar, ligazlar, nükleazlar, topoizomerazlar, polimerazlar, kinazlar, rekombinazlar) kimyasal bakımdan değişime uğrar ve bu değişim sonucuna göre hasar giderilir (Hustedt ve Durocher, 2017; Jeggo vd., 2016).



Şekil 1.2. DNA onarım mekanizmaları (Patel ve Ahnen, 2018)

1.2.1.1. Doğrudan Tamir Mekanizması

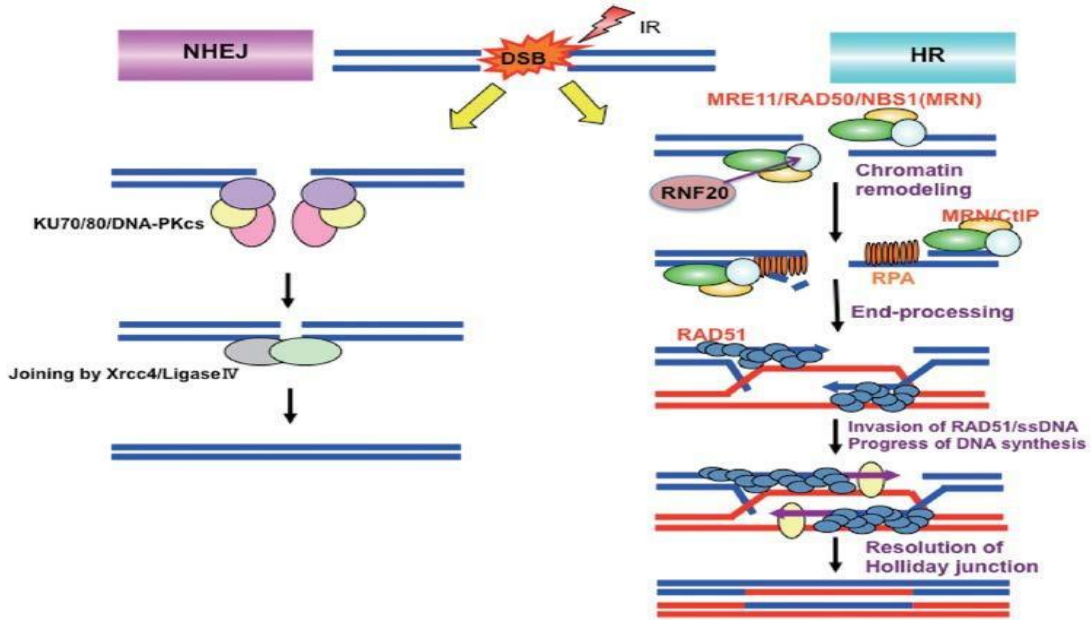
Canlılar 2 tür doğrudan tamir mekanizmasına sahiptir (D. Fu vd., 2012). Fotoreaktivasyon ile onarım; fotolizaz enzimleri tarafından gerçekleşen primidin dimerlerine bağlı olan UV ışınlarını onaran 2 tip tamir mekanizmasından ilkidir. İkinci mekanizma olan MGMT (O6-metilguanin- DNA -metiltransferaz) metil-guanin DNA metil transferaz enzimlerince alkilleyici ajanların bulunmasıyla meydana gelen DNA’da bulunan O6metil grubu çıkarılır. Bu enzimlerden DNA transferaz enzimi insan dahil pek çok canlıda bulunurken fotolizaz enzimi çok az türde bulunmaktadır. Fotolizaz, monomerik bir proteindir ve moleküler ağırlığı 55-65 kDa’dır. Fotolizaz bulunan bazı bakteriler mavi dalga fotonlarını enerji üretebilmek için kullanır ve siklobütan pirimidinlerini onarmaktadır (Jin ve Robertson, 2012; Liu vd., 2015). Metil guanin DNA metiltransferaz enzimi ise doğada kendiliğinden bulunan ve içinde kofaktör bulunmayan proteindir. DNA hasarı oluştuğunda bu enzim hasarın meydana geldiği noktaya bağlanır ve az afinite göstererek bir kompleks meydana getirir. Doğru olmayan biçimde metillenen bazların –CH3 grubunu kendi sistemine aktararak hasarın giderilmesini sağlamaktadır (Chatterjee ve Walker, 2017; Jeggo vd., 2016).

1.2.1.2. Doğrudan Olmayan Tamir Mekanizması

Doğrudan olmayan tamir mekanizması, baz kesip-çıkarma, nükleotit eksizyon (kesip-çıkarma) mekanizması (NEM) çift zincir kırıklarının onarımı ve çapraz bağlantı onarımı (CROSS-LINK) olarak dört mekanizma ile açıklanır (Curtin, 2012). Bu mekanizmaların ilki baz kesip-çıkarma tamir mekanizması; glikozilaz enzimi adı verilen enzim DNA'da bulunan hedefteki bazlarla etkileşime girer ve hasarın meydana geldiği bölgedeki glikozidik bağı keserek çıkarma işlevini yerine getirmektedir. Bu kesip çıkarma sonucunda apürinik ya da aprimidik (AP) kısım oluşturulur ve kesip çıkarma yapılan bölgeye 2-10 nükleotitlik eklemeler yapılır ve hasar giderilmektedir (Kumar vd., 2020; Lee ve Kang, 2019). Diğer bir mekanizma olan nükleotit kesip-çıkarma mekanizması; DNA'da meydana gelen daha büyük hasarların giderilmesi için görev almaktadır. Güneş ışınlarından gelen UV ışınları, bazı kimyasallar, iyonize radyasyon ve kanser ilaçları gibi ekzojen kaynaklı hasarlar DNA'da meydana geldiğinde nükleotit kesip-çıkarma mekanizması ile giderilmektedir. Nükleotit kesip çıkarma mekanizması, DNA'da oluşan hasarları tanımak için pek çok protein kompleksine sahiptir. Hasar tanınması yapıldıktan sonra protein kompleksleri hasarlı kısma bağlanır ve hasarlı bölgenin iki tarafı nükleotit eksizyon tarafından küçük nükleotit parçaları oluşturmak için kesilmektedir. Bu kısa nükleotit parçaları hasarlı DNA'yı içerdiğinden uzaklaştırılır ve boşluklar ligasyon işlemiyle birleştirilmektedir (Dong vd., 2015; Kuper ve Kisker, 2013; Shafirovich ve Geacintov, 2017). NEM mekanizması transkripsiyon ilişkili ve global olarak iki alt başlığa ayrılmaktadır. Transkripsiyon ile ilişkili mekanizma RNA polimeraz II enzimi ile bağlantı halindedir ve transkripsiyon anında transkripsiyon faktörü IIH ve RNA polimeraz II etkileşime girer ve transkripsiyon sırasında meydana gelen hasarlar giderilmektedir. Global mekanizmada ise hasar sönsörü olarak görev alan XPC proteini RAD23B ve CETN2 ile kompleks meydana getirmektedir. Oluşan bu kompleks DNA'da bulunan hasarlı bazları saptamak için görev almaktadır (Fontana vd., 2019; Peris-Díaz vd., 2022). Çift zincir kırıklarının giderilmesini sağlayan mekanizmalar endojen ve ekzojen nedenler sonucunda DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının giderilmesinde rol oynamaktadır (Khanna ve Jackson, 2001).

Homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) tamir mekanizmaları çift zincir kırıklarını gidermektedir (Fujii vd., 2022). Homolog rekombinasyon, DNA'da bulunan iki zincirden birinin kalıp olarak kullanılmasıyla çift zincir kırığı onarımı yapılmaktadır. Homolog rekombinasyon çift zincir kırığı onarım mekanizması hücre döngüsünün S ve G2/M safhalarında gerçekleşmektedir (Stover vd., 2020). Homolog rekombinasyon tamir mekanizması, onarım esnasında hücrede kromozom dağılımının stabilizasyonunu ve replikasyon çatalının korunmasını sağlamaktadır ve homolog rekombinasyonda kardeş kromatidteki bilgi kopyalandığından dolayı bilgi kaybı yoktur. Homolog rekombinasyon çift zincir kırığı mekanizması sıralanacak adımlarla onarım gerçekleştirmektedir. İlk olarak DNA'da meydana gelen çift zincir kırığının olduğu bölge heterotrimerik bir yapıda olan MRE11, RAD50 ve NBS1 (MRN) proteinlerinin bir araya gelerek oluşturdukları kompleks tarafından tanımlanmaktadır (Şekil 1.3). MRN kompleksi çift zincir kırığının oluşturduğu lezyonun etrafındaki DNA'ya bağlanır ve 5' ucundan 3' ucuna doğru kırığın olduğu DNA MRE11 tarafından kesilmektedir. Aynı zamanda DNA zincir kırık sensörü olarak da görev alan MRN kompleksi kesim işlemini gerçekleştirirken diğer hasar tanıma proteinlerinin hasarlı bölgeye toplanmasının sağlayacak sinyal üretmektedir (Lee ve Kang, 2019). MRE11 proteini tarafından oluşturulan çentik Exo1 proteinin hasarlı bölgeye gelmesiyle tek zincir stabilizasyonu sağlanır ve daha geniş bir kesim yapılmaktadır. Diğer önemli bir protein olan BRCA1 tek zincir stabilizasyonunu sağlar ve stabil hale gelen zincir DNA tek zincirine bağlanan RPA (Replikasyon proteinin A) tek zinciri DNA nükleaz aktivitelerinden korumaktadır. Bu işlemde sonra BRCA2 proteini RAD51 proteinin hasarlı bölgeye yüklenmesini sağlar ve RAD51 tarafından RPA proteini bölgeden uzaklaştırılır. Rad51 proteini bir nükleoprotein filamenti oluşturur ve kardeş kromatidin kalıp olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Kalıp kardeş kromatidin bilgileri kopyalanır, zincir DNA polimeraz tarafından uzatılarak DNA çift zincir kırık hasarı giderilmektedir (Hsiehchen vd., 2020; Kay vd., 2019; L. Liu vd., 2020; Meyer vd., 2020). Homolog olmayan uçların birleştirilmesi tamir mekanizması (NHEJ) DNA zincirinde kırığın meydana gelen bölge kesilip çıkarıldığından dolayı bilgi kaybı olmaktadır. Bu tamir mekanizması hücre döngüsünün G1, S, G2 ve M safhalarında aktif olabilmektedir. Hasar meydana geldiğinde ilk olarak hasar tespit proteinleri olan Ku70 ve Ku80 proteinleri hasarlı bölgeye toplanmaktadır (Şekil 1.3). Ardından DNAPK fosforile olur ve fosforile olduktan sonra DNAPK tarafından artemis proteini fosforile edilmektedir. Artemis proteini hasarlı

zincirin uçlarını keser. Kesim işlemi gerçekleştikten sonra XRCC4, Lig4 ve XLF proteinlerinin oluşturduğu kompleks uçları birleştirir ve çift zincir kırık hasarı onarılır (Chaplin vd., 2021; Hnízda ve Blundell, 2019; Patterson-Fortin vd., 2022).



Şekil 1.3. DNA çift zincir kırığı onarım mekanizmaları; homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi tamir mekanizmaları (Iyama ve Wilson III, 2013)

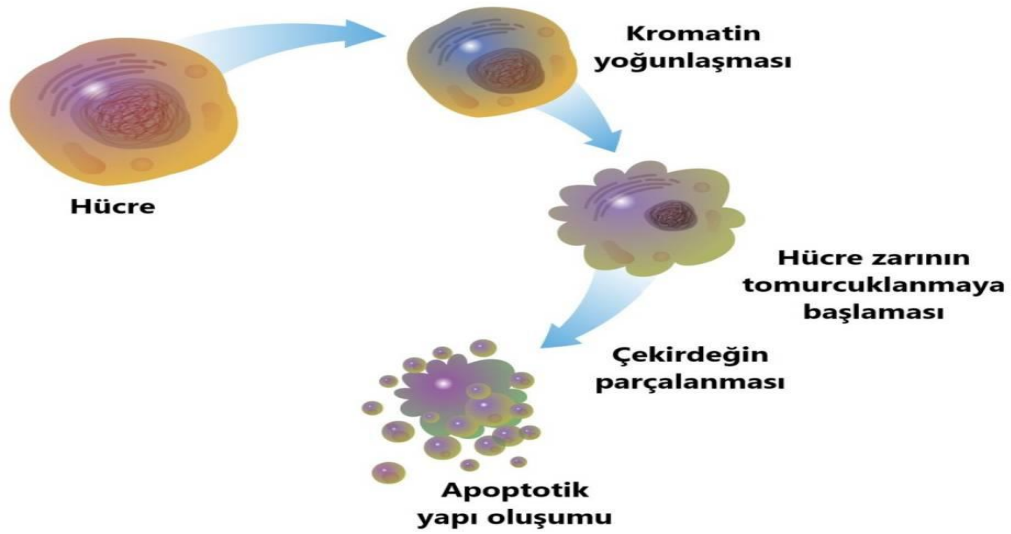
Son olarak çapraz bağlantı onarımı (CROSS-LINK) ise; kanser tedavisinde kullanılan birçok kemoterapötik ilaç ve DNA'da hasar meydana getirmek için kullanılan ajanlar DNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazları arasındaki bağları çapraz bağlayarak hasar meydana getirmektedir. Prokaryotik canlılar çapraz bağlantı hasarını homolog rekombinasyon ve nükleotit eksizyon tamir mekanizmalarını kullanarak gidermektedir. Ökaryotik canlılar ise nükleotid eksizyon mekanizmasının içerdiği XPF-ERCC1 endonükleaz aktivitesine sahip olduğu için çapraz bağları açmaktadır. Bu açılma sonucunda çift zincir kırığı meydana gelir ve bu hasar ise homolog rekombinasyonu ile giderilmektedir (Semlow ve Walter, 2021; Tang vd., 2022; Wei vd., 2021).

1.3. Apoptozis

Programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptozis, vücutta herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşturmada hücre ölümünün kontrolünü sağlayan sinyallerin ardı ardına aktifleştiği, kusursuz bir şekilde regüle edilen hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu mekanizma, doku veya organların oluşumu gelişimi esnasında ve dokunun şekil alabilmesi için artık gereksinim duyulmayan hücrelerin yok edilmesini sağlayarak çalışmaktadır (Formigli vd., 2000; Kerr vd., 1972).

Apoptozis kavramının ortaya çıkışı 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. Kerr ve arkadaşları apoptotik bir hücrenin küçük parçalara bölünmesini, bir ağacın yapraklarını dökmesine benzeterek Yunancada ‘dökülmek’ anlamına gelen apoptozisi tanımlamışlardır (Kerr vd., 1972). Apoptozis kompleks sistemlerde hücrelerin hasar görmesi ve ihtiyaç duyulmaması sonucu makrofajlar tarafından fagosite edilir (Nathan ve Ding, 2010). Kurbağaların erişkin evresine geçerken kuyruklarının kaybolması ve insan embriyosunun el ve ayak parmakları arasındaki perdelerin hücrelerin intihar etmesi yani apoptoza yönelmeleri sonucunda ölüme gitmeleri apoptoza örnek olarak verilebilir.

Apoptoza yönelen hücrelerde (Şekil 1.4) morfolojik olarak değişimler söz konusudur. Bu değişimler; hücrenin su kaybetmesi sonucu büzüşmesi, plazma, çekirdeğin parçalanması, kromatin ve sitoplazmanın yoğunlaşması ve apoptotik cisimcik olarak adlandırılan küçük parçalara ayrılması olarak sıralanabilir (Chaabane vd., 2013; Mariño vd., 2014).



Şekil 1.4. Apoptoz meydana geldiğinde hücrenin morfolojik değişimi (G. G. Chen ve Lai, 2009)

1.3.1. Apoptozis Mekanizmaları

Hücrelerin apoptoza yönelmesi için hücrede belli başlı bazı olayların meydana gelmesi gerekmektedir (Danial ve Korsmeyer, 2004). Hücrelerin bölünmesi için gerekli olan büyüme faktörlerinin azalması, hücre bölünmesi esnasında meydana gelen DNA hasarı, hipoksi ve oksidatif stres gibi olaylar sonucunda hücrede apoptozis için ardı ardına sinyaller aktifleşmektedir. Programlı hücre ölümünde görev alan primer üç protein: Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'dir (Igney ve Krammer, 2002; Ulukaya vd., 2011). Bu protein ailelerinin fonksiyonuyla apoptozisteki yapısal değişimler, mitokondriyal permabilitenin bozulması, nükleus membran ve kromozomal değişimler, DNA hasarı, gibi reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Programlı hücre ölümünde iki biyokimyasal yolak bulunmaktadır. İlk biyokimyasal yolak, ölüm reseptörleri tarafından meydana gelen ekstrinsik (dışsal) yolak, ikinci biyokimyasal yolak ise Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla meydana gelen intrinsik (içsel) yolaktır (Adams ve Cory, 2001; Danial ve Korsmeyer, 2004).

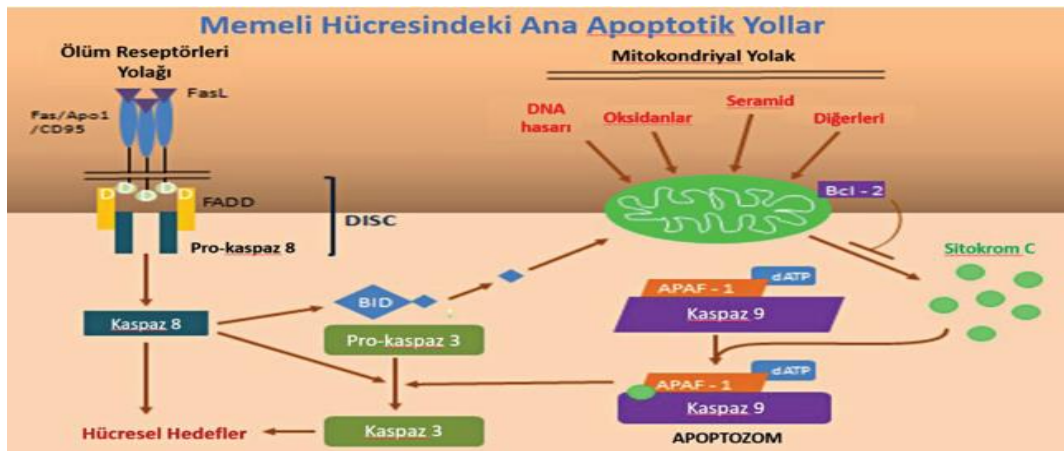
1.3.1.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Ölüm reseptörleri ligandlara çok kısa sürede bağlanarak kaspaz kaskadının aktifleşmesini sağlayarak ekstrinsik yolağın çok hızlı gerçekleşmesine neden olmaktadır (X. Zhou vd., 2017). Hücre zarının dış kısmında var olan reseptörlere hücre dışından gelen ölüm sinyalleri bağlanmaktadır. Sitoplazmada reseptörlerin geriye kalan kısımları birleşir ve hücre ölümüne aracılık eden proteinlere bağlanmaktadır. Pro-kaspazların proteolitik görevini yerine getirmesini engelleyen kısımlar kesilmekte ve pro-kaspazlar aktif kaspazlara dönüşmektedirler (Elmore, 2007). Hücrelerin yüzeyinde olan reseptörler TNF (Tumor necrosis factor) gen ailesi üyesidir ve TNF gen ailesi üyelerinde ölüm domaini (Death domain; DD) adı verilen kısımlar bulunmaktadır. Ölüm domainleri, hücre dışından gelen ölüm sinyallerini hücre içine ileterek önemli bir rol üstlenmektedir. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) DR4, DR5, CAR1, Fas, P75 ve TNF-R1 (Tumor necrosis factor Receptor-1) TNF gen ailesi üyeleridir. Bu ölüm ligantları, plazma zarındaki reseptörlere bağlanırlar ve bu bağlanma sonucunda ekstrinsik apoptotik yolak aktifleşmektedir. Reseptörlerin homotrimerizasyonu sonucu Fas ilişkili ölüm domaini (FADD: Fas-associated via death domain) ve prokaspaz-8 benzeri adaptör proteinler ölüm-indükleyen sinyal komplekslerine dönüşür (Boldin vd., 1996). Reseptörlere gelen sinyaller sonucunda adaptör proteinler kaspazlara bağlanırlar ve onların aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktifleşmiş kaspazlar DNaz enzimi ile birlikte DNA yıkımına sebep olmaktadır (Ashkenazi, 2008; Elmore, 2007; Ulukaya vd., 2011).

1.3.1.2. İntrinsik (İçsel) Yolak

İntrinsik yolak, reseptöre bağlı olmayan mitokondrinin merkezi rol oynadığı hücre içi uyarılar sonucunda gerçekleşen apoptozis mekanizmasıdır. İç yolak, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi hormon ve sitokinlerin hücreye ulaşmaması viral enfeksiyonlar gibi birçok hücrel stres sinyalleri sonucunda aktifleşmektedir (Tait ve Green, 2010). Apoptozise giden bir hücrede mitokondri ihtiyaç olan enerjiyi üretir ve mitokondri dış zarında meydana gelen transmembran potansiyelin düşmesi sonucunda ‘permeability transition pore (PT)’ adı verilen por oluşumu gerçekleşmektedir. Por oluşumunun gerçekleşmesi iki protein grubunun sitozole salınımına sebep olmaktadır. İlk protein grubu,

sitokrom c, serin proteaz HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO'dır. Sitokrom, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) adı verilen proteine bağlanır ve apoptozom kompleksinin oluşmasında Apaf-1 ile birlikte kaspaz 9'un aktifleşmesinde görev almaktadır (Elmore, 2007). HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO, IAP'lerin yani apoptozis inhibitörlerinin fonksiyonlarını inhibe ederek apoptozisi düzenlemektedir. İkinci protein grubu, endonükleaz G, AIF ve CAD'dır. Bu protein grubu da apoptozis sırasında mitokondri tarafından salınmaktadır (Şekil 1.5). Hücre ölümünün meydana gelmesiyle bu proteinler salınır ve çekirdeği hedef alan AIF, DNA'yı küçük parçalara böler bunun sonucunda kromatin yoğunlaşmaktadır. Diğer bir protein olan endonükleaz G çekirdeğe giderek DNA'yı fragmentlere ayırmaktadır. Kaspaz-3 diğer bir protein olan CAD'ın aktifleşmesini sağlar ve CAD nükleozomlar arasından DNA'yı kesmektedir (Adams ve Cory, 2001; Riedl ve Salvesen, 2007; Ulukaya vd., 2011). Bcl-2 protein ailesi apoptozisi düzenleyen, apoptozis üzerinde negatif ve pozitif etkinlik gösteren pro-apoptotik ve anti-apoptotik olarak isimlendirilen iki üyeye sahip bir onkogen sınıfıdır. Pozitif yönde etkileyen proteinler; Bax ve Bak iken negatif yönde etkileyen proteinler; Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-xL'dir. Proapoptotik protein olan Bax ve Bak etkilerini sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişini sağlayarak göstermektedir. Antiapoptotik üyeler ise bu reaksiyonun gerçekleşmesini engellemektedir. Mitokondri, kaspazların fonksiyonel hale gelmesinde rol oynar ve kaspaz üyelerinin mitokondri zarından sitoplazmaya geçişini sağlamaktadır. Aktif kaspaz-9 Kaspaz-3'ü aktive eder ve kaspaz-3 kaspaz aktive edici DNaz (CAD) ı aktifleştirmektedir. Özetle mitokondri dış zarının geçirgenliğinin artması ve bunu takip eden kaspaz kaskadı sayesinde içsel apoptozis yolağı tamamlanmaktadır (Fan vd., 2005; Susin vd., 2023).



Şekil 1.5. İnterinsik (iç) mitokondriyal ve ekstrinsik (dış) apoptotik yollar (Elmore, 2007)

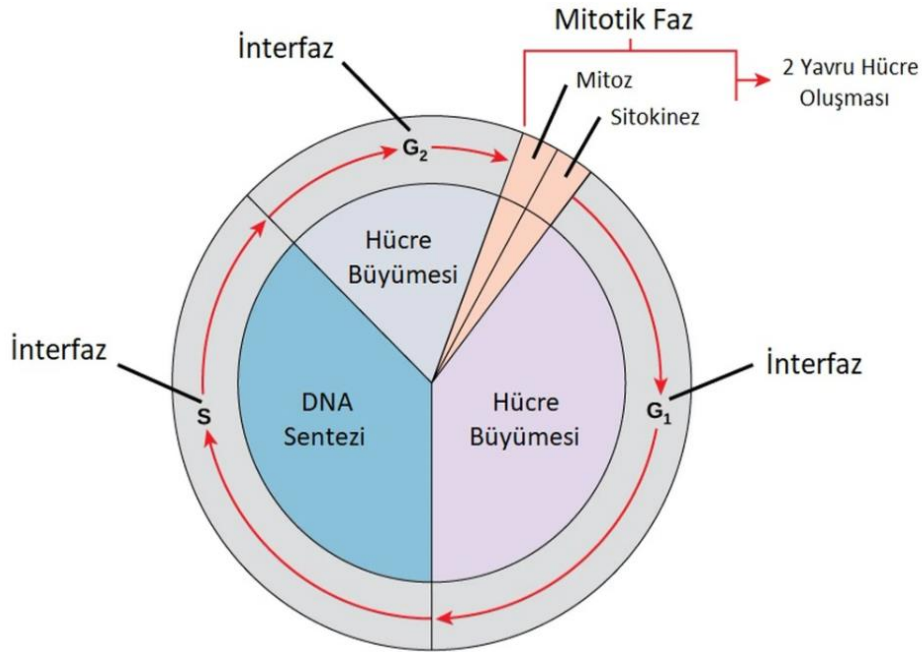
1.4. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücrenin büyümesi ve büyüdüktan sonra bölünmesine kadar geçirdiği aşamalardır. Hücre bölünmesi; hücrenin bölünme için yeterli büyüklüğe ulaşması, hücre dışından yeterli büyüme sinyallerinin gelmesi ve DNA bütünlüğünün sağlanması için birçok kontrol noktasının bulunduğu kompleks bir süreçtir. Bölünmeye hazır olan hücreler DNA'nın kendini eşlemesi yani DNA replikasyonu ve genetik materyalin oluşacak iki yeni yavru hücreye eşit olarak dağılması hücre döngüsünün temel iki görevidir (Matthews vd., 2022; Yin vd., 2019).

Hücre bölünmesi; interfaz (G1, S, G2) ve mitoz (M) olmak üzere 2 safhadan oluşmaktadır (Şekil 1.6). İnterfaz safhasının S evresinde kromozomun kopyalanması meydana gelir ve S evresi yaklaşık olarak 12 saat sürmektedir. S evresi interfaz safhasının yaklaşık yarısına tekabül etmektedir. S evresinden sonra asıl bölünmenin gerçekleşeceği safha olan M safhasında kromozomların kutuplara çekilme olayı yani ayrılması meydana gelmektedir. M safhası ise memeli hücrelerde neredeyse 1 saat sürmektedir (Cecchini vd., 2012; Mazia, 1974). İnterfaz safhasında hücre bölünecek şekilde büyür ve DNA kendini eşler. Mitoz safhasında ise sitokinez (sitoplazma bölünmesi) ve karyokinez (çekirdek bölünmesi) meydana gelerek hücre bölünmesi tamamlanır. İnterfaz safhasının diğer evreleri olan G1 ve G2 evrelerinde ise S ve M safhalarının başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gerçekleşen ara fazlardır (Kim ve Sederstrom, 2015; Otto ve Sicinski, 2017; Yano vd., 2020).

Hücre döngüsünün interfaz safhasında, hücre bölünmeye hazırlık yapar ve mitoz safhasına geçebilmek için bütün koşulların sağlanması gerekmektedir. G1 evresi interfaz safhasının ilk evresidir ve hücrenin bölünmesi için hücre dışından gelen bölünme sinyallerine karşı hassas olduğu safhadır. Hücre büyümesinden kaynaklı metabolik olarak hücrenin aktif olduğu evredir. İnterfazın G1 safhasında, hücrenin bölünüp bölünmeyeceğine karar verilir. Eğer hücre bölünmek için yeterli büyüklükte değil ise dinlenme fazı olan G0 evresine girmektedir. Hücre bölünmek için yeterli büyüklüğe ulaşmamışsa ya da hücrenin bölünmesi için büyüme faktörleri yeterli miktarda değilse hücre döngüden çıkarak G0 evresine girmektedir (Lea vd., 2003; Zetterberg ve Larsson, 1985). G0 evresine giren hücreler metabolik olarak aktiftirler fakat bölünmezler. Hücre bölünmesi için gerekli ve yeterli sinyaller alındığında hücre G0 evresinden çıkarak döngüye katılmaktadır. G0

evresinde hücrenin metabolik aktivitesi devam eder ve hücre dışından bölünme için gerekli sinyaller iletilmedikçe hücre G₀ evresinden çıkmaz. Hücre dışından gerekli büyüme sinyalleri gelirse hücre G₀ evresinden çıkar ve hücre döngüsüne tekrardan girer. Hücre bölünmesi için gerekli kontrollerin yapıldığı yeterli miktarda bölünme sinyallerinin olup olmadığının kontrolünün gerçekleştiği G₁ evresi bunlardan dolayı önemli bir evredir (Y.-W. Chen vd., 2016; P. Sun vd., 2018). RNA ve protein sentezi G₁ safhasında başlar fakat DNA sentezi henüz başlamaz. S safhasında, DNA duplike olur, RNA sentezi devam eder ve protein sentezi en yüksek seviyeye ulaşır. G₂ safhası, mitoz hazırlık safhasıdır ve S evresinden sonra gelen evredir (Cuddihy ve O'Connell, 2003; R. Y. Zhao ve Elder, 2005). DNA hatalı bir şekilde duplike olmuşsa mitoz giriş engellenir. Mitoz fazı, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere kendi içinde 4 safhadan oluşmaktadır. Bu safhalarda sırasıyla şu olaylar gerçekleşir; çekirdek zarfı kaybolmaya başlar, sentrozomlar meydana gelir, kromozomlar kısalıp kalınlaşır, kardeş kromatitler zıt kutuplara çekilir, çekirdek zarfı oluşur ve sitokinez sonucunda iki yavru hücre meydana gelir (Carlton vd., 2020; Z. Li vd., 2016).



Şekil 1.6. Hücre döngüsü safhaları (Dalton, 2015)

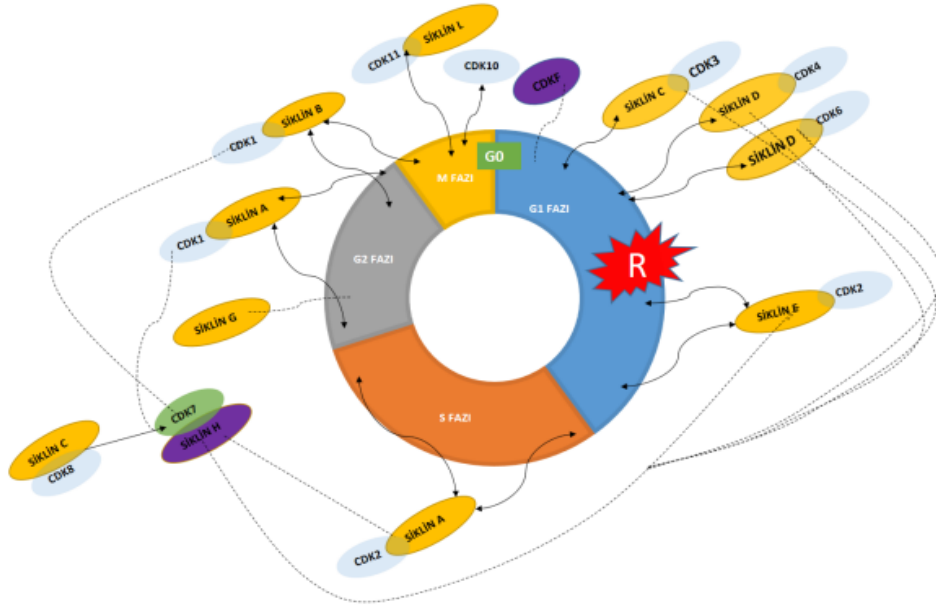
1.4.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre bölünmesinin sorunsuz gerçekleşmesi için hücre döngüsünde birçok kontrol noktası vardır ve bu kontrol noktaları bütün canlılarda evrimsel olarak çok iyi korunmuştur. Ökaryotik hücrelerde bütün safhalarda kontrol noktası bulunmaktadır. İnterfazda bulunan G1, S ve G2 fazları arasında kontrol noktaları bulunmaktadır. G1/S kontrol noktasında, hücre G1'den S safhasına geçerken, S safhasındaki DNA replikasyonu için gereken koşulların oluşturulup oluşturulmadığı kontrol edilmektedir (Y.-W. Chen vd., 2016). G2/M kontrol noktasında ise hücrenin mitoz için hazır olup olmadığı kontrol edilmektedir. Son kontrol noktası olan M, doğru ve eksiksiz bir bölünme için mitoz sonunda kromozomların iğ ipliği üzerinde doğru bir şekilde dizilip dizilmediği kontrol edilir (Gupta vd., 2018). İnterfazın sentez evresinde gerçekleşen DNA replikasyonu ve mitoz evresinde gerçekleşen kromozomal segregasyon süreçlerinin başarıyla tamamlanması hücre biyolojisi açısından önem arz etmektedir (Todorov vd., 1988).

Hücre döngüsünde kontrol noktaları serin/treonin kinazlar, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve CDK'lerin düzenleyicileri olan siklinler (Şekil 1.7) tarafından düzenlenmektedir (Malumbres ve Barbacid, 2007). CDK'ler kinaz ve siklinin bir araya gelerek kompleks oluşturmasıyla aktif hale gelmektedir. Siklin ve CDK'ler tarafından oluşan kompleks hücre döngüsünün temel kontrol sistemidir. Hücre döngüsü devam ettikçe bu oluşan kompleksler siklin ve kinazlarda değişikliğe uğramaktadır. CDK ve siklinler arasındaki bu aktif ilişki döngünün kontrolü için önem arz etmektedir. Hücre döngüsünün ilerlemesi CDK'ler tarafından fosforile edilerek aktif hale gelen ya da inaktif forma dönüştürülen proteinler tarafından gerçekleşmektedir (Ullah vd., 2019; Wenzel ve Singh, 2018). Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü kontrol noktalarında birçok siklin ve CDK'ler bulunmaktadır ve siklinler farklı CDK'lerle bir araya gelip kompleks oluşturarak hücre döngüsünün kontrolü sağlanmaktadır. Hücre döngüsünde G1 evresinden M evresine doğru döngü devam ederken her bir evrenin sonunda bulunan kontrol noktalarının düzenlenmesinde rol oynayan dört çeşit CDK vardır. Bunlar; CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6'dır. CDK'lerin aktif hale gelmesinde rol oynayan dört siklin, CDK'ler ile birlikte hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumludur. Hücre döngüsü devam ettikçe CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 siklin A, B, D ve E ile birlikte ifade edilmektedir (Park ve Lee 2003). Siklin ve CDK'lerin oluşturduğu kompleksler farklı kombinasyonlarla bir araya gelerek hücre

döngüsünde farklı olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Akaike ve Chibazakura, 2020; Ding vd., 2020; Fisher, 2016).

Hücre döngüsünde hücre dışından gelen sinyallerin yanıtlanması sonucunda üretilen ilk siklin çeşidi siklin D'dir. Siklin D siklin bağımlı kinaz 4'e bağlanır ve siklin D-CDK4 kompleksi meydana gelmektedir. Oluşan bu kompleks Retinoblastoma (RB) proteinini fosforilleyerek aktif hale getirir (Weinberg, 1995). Fosforile RB, E2F/DP1/RB kompleksinden ayrılır ve bunun sonucunda E2F aktifleşmektedir. E2F aktif hale geldikten sonra siklin E, siklin A ve bazı genlerin transkripsiyonu olmaktadır. Siklin E CDK2'ye bağlanır ve siklin E-CDK2 kompleksi oluşmaktadır. Oluşan bu kompleks hücrenin G1 evresinden S evresine geçişi sağlamaktadır. G1 safhasının kontrol noktasında rol oynayan siklin D ve CDK4/CDK6 ve siklin E-CDK2'nin oluşturduğu kompleksler hücre döngüsünün tamamlanmasında rol oynar (Mendoza ve Grossniklaus, 2015). Siklin A ve CDK2'nin oluşturduğu kompleks S evresine geçişi sağlayan kontrol noktasıdır. Siklin B ve CDK1 kompleksi ise G2 safhasından M safhasına girişinde görev almaktadır. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında herhangi bir sorun ile karşılaşırsa bir sonraki evreye geçmeden hücre döngüsü sensör mekanizmalarca durdurulmaktadır. Sensör mekanizmalar, DNA'da veya herhangi başka bir yerde sorun algırsa hücre döngüsü kontrol noktaları tarafından durdurulur, sorunun giderilmesi için gerekli proteinler toplanır ve hasar giderilene kadar hücre döngüsü durdurulmaktadır. Hasar giderilirse hücre döngüsü kaldığı yerden devam eder fakat sorun giderilmez ise hücre gerekli apoptotik yollarının aktif hale gelmesiyle apoptoza yönlendirilmektedir (Sherr ve Bartek, 2017).



Şekil 1.7. Hücre döngüsü kontrol noktaları; siklin ve CDK'lar (Malumbres ve Barbacid, 2005)

Hücre döngüsünde asıl bölünme safhası olan mitoz safhasına geçişi sağlayan siklin B-CDK1 kompleksi, kromozom ayrışmasının doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini, metafazdan anafaza geçişi ve mikrotübül oluşumunu kontrol etmektedir. 'iğ ipliği' kontrol noktası İğ iplikçiklerinin kromozomlara doğru bir şekilde bağlanıp bağlanmadığı kontrol eder ve eğer bir hata yoksa anafaz safhasına geçiş sağlanmaktadır (Hara vd., 2023; Kramer vd., 2023). Kromozomların ekvatorial düzlemde dizilmesi ve mikrotübüllerin kromozomların kinetokor bölgesine bağlanması mitozun metafaz safhasında gerçekleşmektedir. Bu bağlanma sonucu kromatitler mikrotübüller ve kardeş kromatitler arasında bağ zayıflayarak kromatitler zıt kutuplara çekilmektedir. Kromatitler doğru bir şekilde ayrılmazsa kromozomlarda anöploidi meydana gelmektedir. Bu nedenden dolayı iğ ipliği kontrol noktasının rolü, kromozom ayrışması gerçekleşmeden önce bütün mikrotübüllerin kromozomlara bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilmektedir. Mikrotübüller kromozomlara doğru bir şekilde bağlanmazsa, CDK20 ve SAC proteinleri kromozomların kinetokor bölgelerine yoğunlaşır ve kinetokorlar tarafından üretilen 19 iğ ipliği bağlanma noktasına sahip SAC (spindle-assembly checkpoint) doğru mikrotübül-kinetokor bağlantısı olana dek CDK20 ve SAC proteinleri tarafından aktif tutulmaktadır. SAC sinyalinde, MAD2/MAD3 (mitotic arrest deficient), BUB3, CDK20, MAD1 ve

Aurora kinaz B proteini görev almaktadır (Bates vd., 2020; Depeursinge vd., 2010; Mariani vd., 2012).

Hücre döngüsünde bu tür hasarlar veya sorunlar meydana geldiğinde durdurulmaz ise hücrenin kanserli hücreye evrilmesine neden olur ve genomik kararsızlık meydana gelmektedir. (Malumbres ve Barbacid, 2007). Kanser oluşumunun temel nedenleri arasında hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan proteinlerin işlevlerini yerine getirmemesi sonucunda hücrelerin apoptoza gitmemesi vardır. Hücre bölünmesi esnasında hücrede oluşan hasarlar giderilmez ve hücre döngüsü durdurulamaz ise hücre tümörleşebilmektedir. Hücrede denge oldukça önemli bir faktördür ve eğer bu denge sağlanamaz ise hücre kontrolsüz ve denetimsiz bir şekilde çoğalabilmektedir. Hücre döngüsünde oluşan bozulmalar hücrelerin tümörleşmesine neden olduğu birçok araştırma sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu nedenden dolayı hücre döngüsünün kontrolünden sorumlu sistemler tümörün meydana gelmesinde direkt olarak neden olabilmektedir (Bahassi, 2007; Cordon-Cardo, 2023).

1.5. Aurora Kinazlar

Aurora kinazlar, hücre döngüsünde önemli rol oynayan ve hücre döngüsünü düzenleyen kinaz aile üyelerindendir. Serin/treonin kinaz aile üyeleri olan Aurora kinazlar mitoz safhasında, kromozomların eşit bir şekilde ayrılması, sentrozom büyümesi ve bölünmesi, kromozom yoğunlaşması ve dizilmesi, iğ ipliklerinin oluşumu, kinetokor-mikrotübül bağlanmaları, DNA fragmentlerinin kromozom halinde paketlenmesi, gibi pek çok önemli hücresel süreçte rol oynamaktadır (Bolanos-Garcia, 2005; Carmena ve Earnshaw, 2003; Kimura ve Okano, 2005). Aurora kinazlar, ilk olarak meyve sineği olan *Drosophila melanogaster*'de mutasyona uğrayan alleller sonucunda hatalı iğ ipliği oluşumu üzerinde araştırma yapılırken keşfedilmiştir (Kollareddy vd., 2008). Aurora kinaz proteinleri hücrede işlevlerini yerine getirmemezse hücre bölünmesinde iğ ipliği oluşumu esnasında eksikliğe sebep olmaktadır. Aurora kinazlar; A, B ve C olmak üzere üç çeşittir ve birçok kanser türünde overekspres edilirler (Anand vd., 2003; Kollareddy vd., 2008; Zhang, 2008). Aurora kinaz A, B ve C DNA'da farklı yerlerde bulunurlar ve birbirlerinden farklı işlevlere sahiptirler. Aurora kinaz A, sağlıklı hücrelerde, hücre döngüsünde G1'den S safhasına geçişte sentrozomlara lokalize olur ve sentrozomların işlevlerinin kontrol

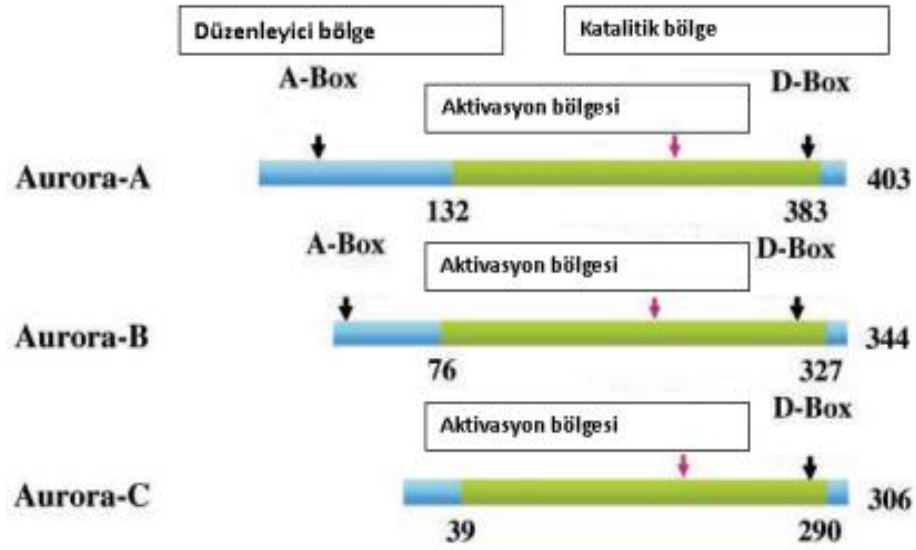
edilmesinde ve mikrotübüllerin oluşmasında rol oynarlar (Andrews, 2005). Aurora A, interfaz safhası boyunca sentrozomlara lokalize olmakta ve sentrozomların belirli bir olgunluğa gelmesini sağlayarak mitoz fazının başlamasını sağlamaktadır. Mitoz evresi başladıktan sonra prometafaz aşamasında çok fazla etkinlik göstermekte ve mitoz sonuna kadar etkinliğini devam ettirmektedir (Bayliss vd., 2003; Eysers ve Maller, 2003). Hakkında çok az şey bilinen Aurora kinaz C diğer bir aurora kinaz aile üyesidir. Mitoz bölünmede kromozomların eşit bir şekilde ayrılmasında rol oynadığı ve eşey hücrelerinde ifade edildiği bilinmektedir (Bejar vd., 2021; Quartuccio ve Schindler, 2015).

Aurora kinazların bazı kanser türlerinde aşırı eksprese edilmesi, Aurora kinazların kanser tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini ve dolayısıyla Aurora kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesinin ve biyolojik aktivitelerinin ortaya çıkarılmasının önemini göstermektedir (Borah ve Reddy, 2021; Liang vd., 2012; Libertini vd., 2010).

Aurora kinazlar iki temel domaine sahiptirler;

- Amino terminalinde düzenleyici bölge (A-box)
- Karboksil terminalinde katalitik bölge (D-box)

Amino terminalinde düzenleyici bölge, karboksil terminalinde ise katalitik domaininde aktivasyon bölgesi bulunmaktadır (Şekil 1.8). Aktivasyon ve düzenleyici bölgeden meydana gelen Aurora kinazlar aktivasyon bölgesi tarafından işlevli hale gelmektedir. Aktivasyon bölgesinde bulunan treonin aktif hale gelmesi sonucunda kinaz aktivitesi meydana gelmektedir. Aurora kinaz A 403, Aurora kinaz B 344 ve Aurora kinaz C 306 aminoasitten meydana gelmektedir. Aurora kinazlarda mutasyonlar ve bu proteinlerin yüksek ekspresyonları Aurora kinazların aktivasyon bölgesinde meydana gelmektedir (Crane vd., 2023; J. Fu vd., 2007).



Şekil 1.8. Aurora kinaz proteinlerinin şematik gösterimi (J. Fu vd., 2007)

Aurora kinazlar sadece mitoz bölünmede değil birçok mitotik olmayan işlevleri de yerine getiren proteinlerdir. Aurora kinaz A ve B'nin homolog rekombinasyon (HRR: "homologous recombination repair") ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ: "non-homologous end-joining") tamir yollarında rol aldığı bilinmektedir (Conde vd., 2017; Fell vd., 2016; Y. Wang, Sun, vd., 2014). Çeşitli çalışmalar Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B'nin özellikle DNA hasar yanıtında birçok önemli görevi yerine getiren p53 proteini ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (Ma ve Poon, 2020; Sasai vd., 2016). Genomun koruyucusu olarak tanımlanan p53 proteini, hücre döngüsünde rol oynayan bir tümör süpressör ve transkripsiyon faktörü olarak önemli hücresel rolleri icra etmektedir. p53 hücre döngüsünde görev alarak herhangi bir DNA hasarı durumunda hücre döngüsünü durdurarak DNA hasarını tamir etmek için gerekli proteinlerin hasarlı bölgede toplanmasını sağlamaktadır. Oluşan DNA lezyonunun tamir edilmemesi durumunda ise p53 proteini anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonları düzenleyerek hücreyi apoptoza yönlendirmektedir (Gundogdu ve Hergovich, 2022; Kulaberoglu ve Hergovich, 2023).

1.6. Aurora Kinaz B

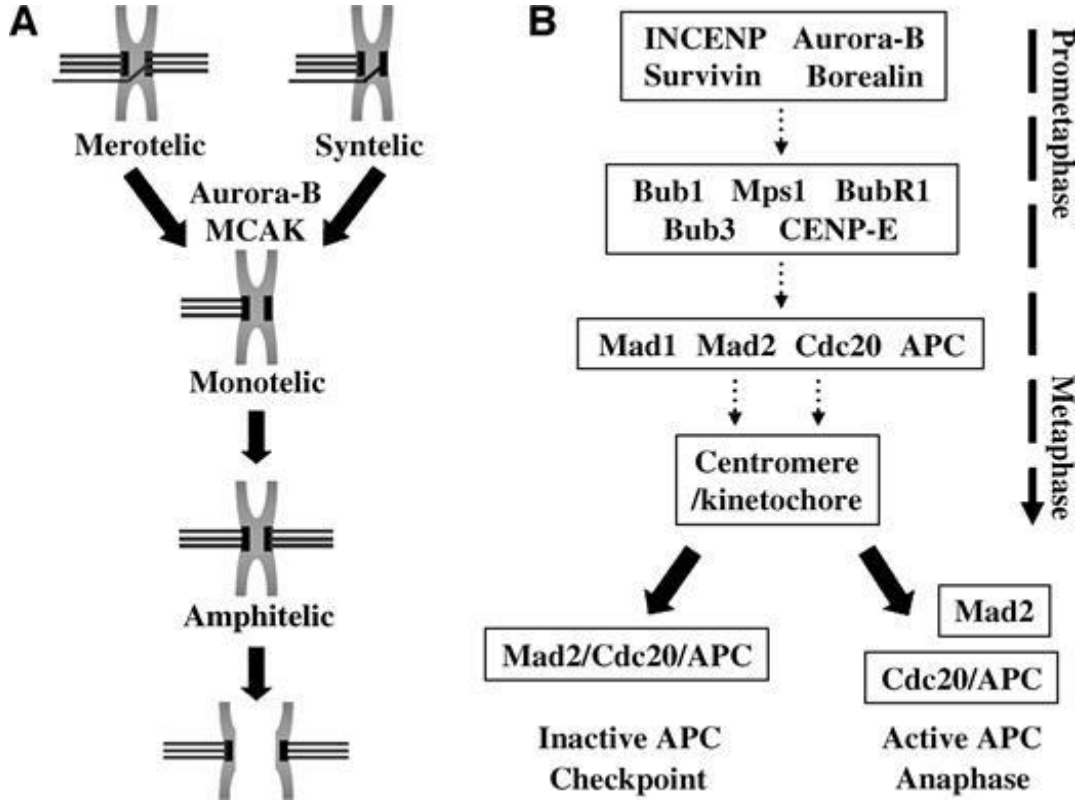
Aurora kinaz B, *AURKB* geni tarafından kodlanan Aurora kinaz aile üyesidir. Aurora B, 9 ekzonlu, 1287 baz çifti uzunluğunda, 344 aminoasit dizisinden meydana gelen 39 kilodantonluk protein kodlayan ve normal hücrelerde mikrotübül bağlantılarını kontrol eden proteindir. Aurora B iç sentromer proteini (INCENP), survivin (BIRC5), borealin (CDCA8) ve diğer non-enzimatik alt ünitelerin birleşmesiyle CPC kompleksi (“chromosomal passenger complex”) oluşmakta ve bunun sonucunda Aurora B fosforile edilerek aktive olmaktadır. Aurora kinaz B bu komplekse CPC proteinleri ve INCENP (“inner centromere protein”) ile etkileşimlerinin artmasıyla tutunabilmektedir (Gorbsky, 2004; Lens ve Medema, 2003; Zhang, 2008). Diğer bir kontrol noktası proteini olan MAD2 profaz safhasından anafaz safhasına kadar kinetokorlarda lokalize olur, iç iplikçliğini kontrol eder ve aktive eder. Aurora kinaz B ve MAD2, diğer kontrol noktası proteinleri (CENP-E, MAD1, BUB1, BUB3, BUBR1, MPS1) ile birlikte kompleks oluşturarak hücrelerin, iç iplikçikleri ile kinetokor-mikrotübül bağlantısı hatasız oluncaya kadar anafaza geçişi engellerler. MAD2 proteini, CDC20/APC kompleksiyle doğrudan etkileşim halinde olduğu için uygun kinetokor-mikrotübül bağlantısı olmadığında bu komplekse bağlanarak APC’yi inaktif hale getirir ve anafaza geçiş bu şekilde engellenir (Şekil 1.9). Kinetokor-mikrotübül bağlantısı doğru bir şekilde oluştuğunda MAD2 proteini, CDC20/APC kompleksine bağlanmayacağı için APC aktif hale gelir ve anafaza geçiş sağlanır (Yu, 2002; Zich vd., 2012).

Aurora kinaz B proteinin temelini meydana getiren apoptoz inhibitörü olarak görev alan protein survivindir. Kanserin ne kadar ilerlediğini öğrenmek için biyobelirteç olarak kullanılan survivin proteinin seviyesine bakılmaktadır. Survivin proteini ortamda olmazsa kromozom ayrılmasında hata olur ve doğru bir şekilde sitokinez olmamaktadır (J. Chen vd., 2003). Sitokinezde önemli bir rol oynayan Aurora B, anafaz safhasında sitokinez esnasında genetik materyalin yavru hücrelere eşit bir şekilde dağılmasını sağlamaktadır (Andrews, 2005; J. Fu vd., 2007).

Aurora kinaz B, profazdan metafaza, metafazdan anafaza ve sitokinez safhalarına kadar bütün kromozomal regülasyonlarda rol oynayan bir proteindir (Bolanos-Garcia, 2005; Vas ve Clarke, 2008). Aurora kinaz B’nin aktivitesi metafaz safhasından mitozun son safhasına

kadar çok yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Aurora kinaz B, metafazdan anafaza geçiş sırasında sentromerlere lokalize olarak histon H3'ü fosforile etmekte ve kromozomların yoğunlaşmasında rol oynamaktadır. Aurora B, anafaz safhası başladıktan sonra ise genetik materyalin yavru hücrelere eşit bir şekilde dağılımını sağlamaktadır. Öte yandan, Aurora B'nin aşırı ifadesi sonucunda meydana gelen kromozomal kararsızlık tümör oluşumuna neden olmaktadır. Genel olarak Aurora B, mitoz esnasında kinetokorlar ve iç mikrotübüller arasında ekleri düzenleyerek kromozomların mikrotübüllere bağlanmasını sağlayan, yanlış mikrotübül-kinetokor bağlanmalarını engelleyen ve kromozomların eşit sayıda ayrılmasını sağlayan bir proteindir (Richie ve Golden, 2005; Ricke ve Van Deursen, 2011). Kanseri tedavisinde inhibitörlerle Aurora B'nin hedeflenmesi sonucunda hücrelerin programlı hücre ölümüne yöneldiği veya hücrelerin G2/M evresinde durduğu yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Bunların sonucunda Aurora B kanser tedavilerinde özgün bir tedavi hedefi haline gelmiştir (Kitzen vd., 2010; Portella vd., 2011).

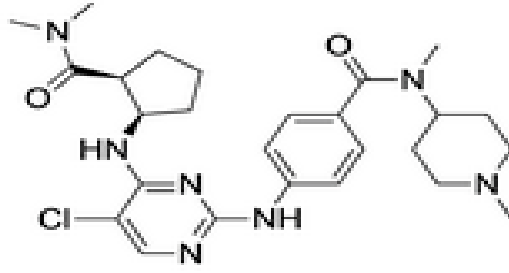
Son olarak yapılan çalışmalar Aurora kinaz B ile P53 proteini arasında dolaylı olarak bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Bir histon asetil transferaz engelleyici olan NIR (novel INHAT repressor) transkripsiyon ortak baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Aurora B NIR'a bağlanarak p53 proteinin aktivitesini iki şekilde etkilemektedir. İlk olarak, Aurora B'nin aşırı ifade edilmesi sonucunda NIR aracılı P53'ün aktivasyonu engellenmektedir. İkinci durumda ise, Aurora B'nin eksikliği sonucunda aynı şekilde NIR aracılı P53'e bağlı apoptoza, P21 ile BAX'ın yukarı yönde düzenlenmesine ve hücre büyümesinin durmasına neden olmaktadır (Gully vd., 2023).



Şekil 1.9. Aurora Kinaz B Aktivitesi (J. Fu vd., 2007)

1.7. BI 831266

BI 831266 molekülü, serin/treonin kinaz aile üyesi olan Aurora B'yi hedefleyen küçük molekül inhibitördür (Şekil 1.10). Güçlü bir inhibitör olan bu molekül yüksek çözünürlüğe sahiptir ve Aurora B inhibisyonu için negatif kontrol görevi görmektedir. BI 831266 molekülünün yapısında; 5-(triflorometil)pirimidin analogu (BI 811283) ile kompleks haline getirilmiş Aurora B/INCENP'nin ortak kristal yapısı mevcuttur. BI 831266 molekülünün kanser hücrelerinde IC₅₀ değeri 42 nM'dir. (Gollner vd., 2023).

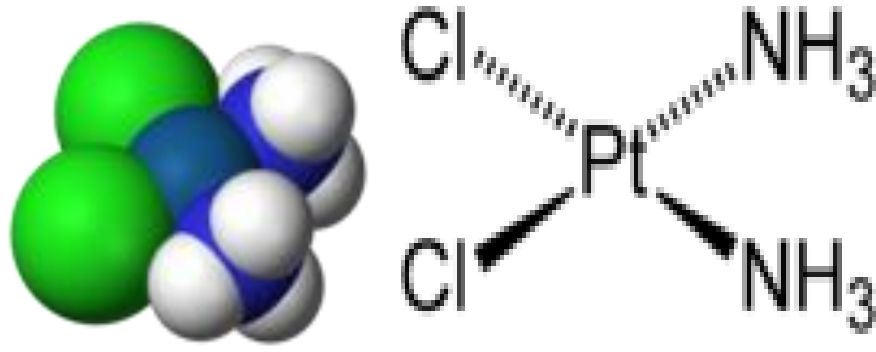


Şekil 1.10. BI 831266 kimyasal formülü (Gollner vd., 2023)

1.8. Sisplatin

Sisplatinum ya da *cis*-diamindikloroplatin isimleri de olan sisplatin 1978 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, Food and Drug Administration) tarafından onaylanan ve birçok kanser türünde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır (Ghosh, 2019; Rybak vd., 2019). Sisplatin, DNA üzerinde bulunan pürin bazları ile etkileşimde bulunarak DNA hasarı oluşmasına neden olmakta ve programlı hücre ölümüne yol açan birkaç sinyal iletim yolunun aktifleşmesini sağlamaktadır (Şekil 1.11). Sisplatin ile oluşturulan kombinasyon tedavilerin kanserli hücreleri yok etmede daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Y. Ma vd., 2015; Polacchini vd., 2016; Wu vd., 2017).

Sisplatin akciğer, meme, mesane, testis, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomaları da kapsayan birçok insan kanser çeşidi tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır (Alderden vd., 2006; Fouad vd., 2017). Sisplatin ilacı etki mekanizması, DNA üzerinde bulunan pürin bazlarını çapraz bağlar ve hücrelerde DNA hasarı meydana getirerek çalışmaktadır. DNA hasar tamir mekanizmalarına etki ederek hasarın giderilmesini engeller ve apoptozu indüklemektedir. Hastalar, sisplatin ilacına karşı direnç, alerjik reaksiyonlar, böbrek sorunları, enfeksiyonlara karşı bağışıklık direncinin zayıflaması ve kanama gibi birçok olumsuz yan etkiler gösterebilmektedir (Galluzzi vd., 2012). Sisplatin ilacının farklı doğal bileşenlerle veya diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine edilmesi ilaç direncini ve toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir. Sisplatin gibi platin temelli kemoterapötik ilaçlar kanser tedavilerinde monoterapi veya diğer ilaçlarla kombine edilerek hastalara verilmektedir (Y. Ma vd., 2015; Polacchini vd., 2016).



Şekil 1.11. Sisplatin kimyasal formülü (Díaz vd., 2013)

Sisplatin, nefrotoksik, ototoksik ve nörotoksiktir. Sisplatine bağlı ototoksisite mekanizması tam olarak açıklanabilmiş olmamakla beraber; progresif olarak dış tüy hücrelerini hasara uğrattığı, antioksidan madde(glutatyon) ve enzimlerin sentezini azaltarak serbest oksijen radikallerini artırdığı; oksidatif stresin artışının koklea, stria vaskularis, spiral ligament ve spiral ganglion hücrelerde hasar ile ototoksisiteye sebep olduğu gözlenmiştir (Wu vd., 2017; M. Zhou vd., 2018). Sisplatin kaynaklı ototoksisiteye, reaktif oksijen türlerinin seviyelerindeki artışlara ek olarak inflamatuvar moleküller de eşlik eder; tümör nekroz faktör alfa (TNF α), interlökin 1 β (IL1 β), ve interlökin 6 (IL6); ve nükleer faktör kappa B (NF κ B) . SP, kullanımı ile kokleada özellikle stria vaskülaris ve spiral ligamentte, NF κ B ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu arttırır. NF κ B aktivasyonu, TNF α , IL1 β , IL6 gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerini artırır (Eberle vd., 2011; Fouad vd., 2017; Rashid vd., 2017). Sisplatin kaynaklı ototoksisitenin, artan miktarlarda toksik serbest radikallerden veya hücre içi kalsiyum içeriğinin azalmasına yol açan hücre zarı değişikliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gentilin vd., 2019).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC) tahminlerine göre 2020 yılında yaklaşık 19 milyon insana kanser teşhisi konulmuş ve 10 milyondan fazla insan kanser nedeniyle yaşamını yitirmiştir (Sung vd., 2021). Her yıl artan kanser vakaları ve kansere bağlı ölüm oranları kanser araştırmalarının önemini ortaya çıkarmaktadır.

Aurora kinaz B'nin çeşitli kanser türlerinde (özofagus kanseri, yumurtalık kanseri, tiroit kanseri, lösemi vd.) aşırı ifade edildiği belirtilmektedir (Bolanos-Garcia, 2005). Bu nedenle, ilgili kinazın küçük molekül inhibitörlerle farmakolojik inhibisyonunun klinikte kullanılmakta olan konvansiyonel tedavilerin sitotoksik kapasitesini arttırabileceği düşünülmektedir. Aurora kinaz B'nin küçük molekül inhibitörlerinin, başarılı bir kromozom ayrımı olmadan erken mitotik çıkışa neden olduğu ve devam eden inhibisyon sonucunda hücrelerin apoptoza uğradığı rapor edilmektedir (Kitzen vd., 2010).

Daha önce yapılan çalışmalar, Aurora B'nin kimyasal veya genetik inhibisyonunun kanser hücrelerini G2/M evresinde durdurduğunu veya programlı hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir (Portella vd., 2011; Yeung vd., 2008). Bu durum Aurora B'yi kişiselleştirilmiş kanser tedavi yaklaşımlarında potansiyel bir hedef haline getirmektedir. Aurora kinazlar için farklı küçük molekül inhibitörler geliştirilmiştir ve preklinik araştırmaları başarıyla tamamlanan bazı inhibitörlerin klinik testlerinin devam ettiği bildirilmektedir (Kitzen vd., 2010; Yan vd., 2016).

Bu küçük inhibitörlerden bazıları barasetib, hesperadin ve danusertibtir. Bunlardan ilki olan barasetib (AZD1152) Aurora B'nin klinik öncesi ve klinik çalışmalarında geliştirilen ve test edilen ilk inhibitörüdür. Barasetib, Aurora kinaz B'yi seçici olarak inhibe etmektedir. Klinik çalışmalarda malign tümörleri ve katı tümörleri olan hasta bireylerde değerlendirilmiştir. Barasetib hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve akut miyeloid lösemi (AML) hücre tiplerinde apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir (Borah ve Reddy, 2021). Bu inhibitör AML'ye sahip hasta bireylerde çeşitli klinik testler yapılarak uygulanmıştır. Sadece 19 hastadan 3'ünün tedaviye olumlu yanıt vermesi sebebiyle daha fazla ek

çalışmanın yapılması kanaatine varılmış ve çalışma faz I'de durdurulmuştur. Başka bir çalışmada ise lenfomaya sahip hasta bireylerde barasertib ile uygulanan tedavide faz II'ye kadar çalışmalar devam etmiştir. Fakat tedavi beklenenden düşük yanıtlar vermesi ve uygulama açısından zor olması gibi nedenlerden dolayı monoterapi için uygun bulunmayıp faz II'de durdurulmuştur (Bavetsias ve Linardopoulos, 2015; Borah ve Reddy, 2021; He vd., 2019).

Hesperadin, serin 10 bölgesinden histon H3'ün fosforilasyonunu inhibe ederek kromozom ayrışmasına engel olan sitokinez kusurlarına sebep olmaktadır. In vitro ortamda yüksek oranda hücreler canlılıklarını kaybetmediğinden dolayı klinikte güçlü bir ilaç olup olmayacağı tartışılmaktadır (Alam vd., 2022; Yap vd., 2021).

Yuan ve arkadaşları, danusetib inhibitörünün etki mekanizmasını mide kanseri hücre hatları üzerinde çalışarak hücre proliferasyonuna olan etkisini, hücrelerin apoptoz ve otofajiye yönelimini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda danusetib inhibitörünün hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücrelerin apoptoza yöneldiğini göstermişlerdir (Yuan vd., 2015).

Faz I çalışmalarında katı tümörlere sahip hastalarda danusetibin anti-tümör aktivitesinin yüksek oranda olduğu ve tatmin edici sonuçların alındığı gösterilmiştir. 37 hasta üzerinde faz I klinik çalışmaları yapılmıştır ve sonuçlar anti-tümör etkisi gösteren danusetibin kabul edilebilir toksisite gösterdiği ve faz II çalışmalarının devam ettiği bildirilmektedir (Borah ve Reddy, 2021).

Danusetib, prostat kanserine sahip hasta bireylere uygulandığında hasta bireylerde iyi bir şekilde tolere edildiği ve monoterapi olarak minimal düzeyde etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Danusetib molekülü Faz II çalışmalarında test edilmiştir (Borah ve Reddy, 2021). Danusetibin faz II çalışmalarında bu denli olumlu sonuçlar vermesi sebebiyle daha kapsamlı çalışmalar önerilmiştir (Borah ve Reddy, 2021; Goldenson ve Crispino, 2015; Yan vd., 2016).

Anti-kanser ilaçları tümör hücrelerinde yüksek oranda aktivite göstererek tümör hücrelerini öldürmektedir. Fakat anti-kanser ilaçlarının dozu arttırıldıkça tümör hücrelerinin direnç

kazanma riski ve hızlı çoğalan sağlıklı hücrelere de etki etmesi gibi olumsuz sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, konvansiyonel anti-kanser ilaçların doğal bileşikler veya küçük molekül inhibitörlerle kombine edilerek uygulanması söz konusu olumsuz etkilerin en aza indirilmesi neticesinde uzun vadeli klinik başarı sunacağı değerlendirilmektedir. Aurora kinaz inhibitörlerinin farklı kemoterapi ilaçlarının minimal etkin dozlarıyla kombinasyonu neticesinde gözlenen sitotoksitenin sinerjistik olduğu rapor edilmiştir (Bavetsias ve Linardopoulos, 2015; Yeung vd., 2008).

Sisplatin kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan ilaçlardan biridir (Ghosh, 2019). Sisplatin, DNA üzerinde bulunan pürin bazları ile etkileşimde bulunarak DNA hasarı oluşmasına neden olmakta ve programlı hücre ölümüne yol açan birkaç sinyal iletim yolunun aktifleşmesini sağlamaktadır. Sisplatin ile oluşturulan kombinasyon tedavilerin kanserli hücreleri yok etmede daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Y. Ma vd., 2015; Polacchini vd., 2016; Wu vd., 2017).

Aurora kinaz inhibitörü olan PHA-680632 ve sisplatinin kombinasyon tedavisi sonucunda nöroblastom hücrelerinde apoptosisin arttırdığı gösterilmiştir (Polacchini vd., 2016). Kanser tedavisinde inhibitörlerle Aurora B'nin hedeflenmesi sonucunda hücrelerin programlı hücre ölümüne yöneldiği veya hücrelerin G2/M evresinde durduğu yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Bunların sonucunda Aurora B kanser tedavilerinde özgün bir tedavi hedefi haline gelmiştir (Kitzen vd., 2010; Portella vd., 2011).

Aurora kinazların bazı kanser türlerinde aşırı eksprese edilmesi, Aurora kinazların kanser tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini ve dolayısıyla Aurora kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesinin ve biyolojik aktivitelerinin ortaya çıkarılmasının önemini göstermektedir. Kanser tedavisinde inhibitörlerle Aurora kinaz inhibisyonu için birçok farklı inhibitör tümör hücrelerinin profilerasyonunu engellemek ve/veya hücreleri konvansiyonel sitotoksik ajanlara karşı hassas hale getirmek amacıyla geliştirilmektedir (Borah ve Reddy, 2021; Liang vd., 2012; Libertini vd., 2010).

Danuseritin, yumurtalık kanser hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurduğu, apoptozu ve otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir (Yan vd., 2016).

Aurora kinazlar sadece mitoz bölünmede değil birçok mitotik olmayan işlevleri de yerine getiren enzimlerdir. Aurora kinaz A ve B'nin homolog rekombinasyon (HRR: "homologous recombination repair") ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ: "non-homologous end-joining") tamir yollarlarında rol aldığı bilinmektedir (Conde vd., 2017; Fell vd., 2016; Y. Wang, Sun, vd., 2014).

Çeşitli çalışmalar Aurora kinaz A ve Aurora kinaz B'nin özellikle DNA hasar yanıtında birçok önemli görevi yerine getiren p53 proteini ile bağlantılı olduğunu göstermektedir (H. T. Ma ve Poon, 2020; Sasai vd., 2016). Genomun koruyucusu olarak tanımlanan p53 proteini, hücre döngüsünde rol oynayan bir tümör süpressör ve transkripsiyon faktörü olarak önemli hücresel rolleri icra etmektedir. p53 hücre döngüsünde görev alarak herhangi bir DNA hasarı durumunda hücre döngüsünü durdurarak DNA hasarını tamir etmek için gerekli proteinlerin hasarlı bölgede toplanmasını sağlamaktadır. Oluşan DNA lezyonunun tamir edilmemesi durumunda ise p53 proteini anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonları düzenleyerek hücreyi apoptoza yönlendirmektedir (Gundogdu, Hergovich, ve Gómez, 2021; Kulaberoglu vd., 2021).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmalarda MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kullanıldı. Tez çalışması kapsamında tüm hücre kültürü çalışmaları Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Kanser Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Kullanılan tüm kimyasal, sarf malzemeler ve kitler ticari olarak satın alındı.

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler şunlardır; cPARP (cell signaling, 9541S), Bcl-2 (401r-4229), Cas-3 (sc-271759), p53 (sc-126), sisplatin (koçak), BI 831266 (Boehringer Ingelheim tarafından temin edilmiştir), DMEM (Sigma, D6429), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, 10270106), Penisilin (64µg/mL)/Streptomisin (100µg/mL) (GIBCO, 15140122), Dulbecco's phosphate-buffered saline (dPBS) (GIBCO, 14190094), Trypsin-EDTA (Biological Industries, 03050), Trypan Blue (Thermo Fisher, 15250061) Aquaguard 1 (Biological Industries, 018671B); X-Ray film (18x24 cm) (Carestream MXBE Film, 7710783), Tris (Fisher Chemical, BP153-1), NaCl (ROTH, 2618.1), Glycerol (Sigma Aldrich, 15524), EDTA (Sigma, E5134), EGTA (Glenthomls, GE7249), Bradford Solüsyonu (Bio-Rad, 5000006EDU), Spektrofotometre Küvetleri (Biosigma, 20P1006010), Sodyum dodesil sülfat (SDS) (MERCK KGaA, 8.17034.1000), β-mercaptoethanol (SIGMA LS, M3148), Bromophenolblue (MERCK, 536092), Akrilamid/Bisakrilamid (CARLO ERBA, 480141), Amonyum Persülfat (MERCK KGaA, 101201.0500), TEMED (Sigma, 110-18-9), İzopropanol (Riedel-de Haen, 24137), Yağsız Süt Tozu (SIGMA ALDLRICH, 70166), Metanol (MERCK KGaA, 1.06007.2500), Tween-20 (Sigma, P1379), H₂O₂ (KarloErba, 7722841), Luminol (SIGMA ALDLRICH, 123072-5G), p-coumaric acid (Sigma, C9008-10G); CO₂ incubator (ESCO, CCL170B8), Otoklav (HIRAYAMA, HVE-50), Santrifüj (Weightlab Instruments, WN-CL6500), Hücre kültürü flask: 75 cm² (NEST, 708003), Hücre kültürü kapları 60x18mm (LABSOLUTE, 7696771), Biyogüvenlik kabini (ESCO Class II), Mikropipet (ISO Lab), Mini çalkalayıcı (ISO Lab, 61311001); Mikrosantrifüj tüpleri (ISOLAB, S.078.03.002.500), Spektrofotometre (Shanghai Metash, UV-5100), Western Blot aparatları (BIO-RAD,

041BR307525), Serolojik pipet (Lab Marker, 10082019), Sıcak su banyosu (Thermomax, 201910103425), PVDF Transfer Membran 0.2 μ m, 26.5 cm x 3.75 m (Merck Millipore, IPVH00010). Tüm reaktif ve örnekler uygun şekilde hazırlandı ve uygun koşullarda saklandı (Buzdolabı 2-8 °C / SEG, Derin Dondurucu -20 °C / Vestel, Derin Dondurucu -86 °C / Nuair Glacier NU-9668GC).

3.2. Yöntem

3.2.1. Memeli Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmalarımızda gerçekleştirdiğimiz hücre canlılığı, SDS/Western blot, koloni sağ-kalım, 3D tümör formasyon ve wound-healing analizleri için memeli hücre kültürü araştırmalarında başarılı bir şekilde kullanılan MCF-7 kanser hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64 μ g/mL penisilin ve 100 μ g/mL streptomisin ile desteklenen DMEM/F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe çoğaltıldı. Tüm hücre kültürü çalışmaları GCCP (Good Cell Culture Practice) aseptik standartlarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

3.2.2. 2D Koloni Sağ-Kalım Analizi (Anchorage-Dependent Colony Survival Assay)

Hücre koloni formasyon deneyleri (Gomez vd., 2015; Gundogdu, Erdogan, vd., 2021)' de açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Öncelikle pilot deneyler planlanarak sisplatin ve BI 831266 moleküllerinin ilgili hücrelerdeki koloni sağ-kalım IC₅₀ değerleri belirlendi. Kısaca, 1,5x10³ hücrenin 6-cm kültür kaplarına ekimi yapıldı. 24 saat sonra hücrelerin çeşitli konsantrasyonlarda sisplatin veya BI 831266 tedavisi başlatıldı. Hücreler 10-12 gün boyunca %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe koloni formasyonu için bekletildi ve her 3-4 günde bir besiyeri ortamı tazelenerek koloni oluşumları mikroskop altında incelendi. Her bir kolonin en az elli hücreye ulaşması ve kolonilerin birbirlerine temas etmemesi dikkate alınarak deney belirli bir sürede durduruldu. PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0.5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Sonrasında kuyucuklar su ile dikkatlice yıkandı ve koloniler mikroskop altında sayıldı. En

az elli hücre oluşumu koloni olarak kabul edildi. Kontrol dahil olmak üzere her bir grup için en az 2 tekrar olacak ve birbirinden bağımsız en az 3 deney gerçekleştirildi ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.3. 3D Soft Agar Koloni Formasyon Analizi (Anchorage-Independent Colony Formation Assay)

Tedavi baskısı altında bulunan kanser hücrelerinin koloni oluşturabilme kapasiteleri soft agar analizi ile karşılaştırıldı (Bettoun vd., 2016). Öncelikle alt tabaka agaroz hazırlandı; ddH₂O içerisinde hazırlanarak otoklav edilen %1,2 agaroz solüsyonu ile hücre besiyeri (DMEM, %20 FBS) 1:1 oranında karıştırılarak (agaroz son konsantrasyon %0,6) 42°C su banyosunda 15 dakika süreyle bekletildi. Sonrasında 6 kuyulu plakaların her bir kuyusuna 1 mL agaroz-besiyeri karışımı eklendi ve plaka alt tabaka agarozun solidifiye olması için kültür kabininde 30 dakika bekletildi. Bu esnada hücrelerin bulunacağı üst tabaka agaroz hazırlandı; ddH₂O içerisinde hazırlanarak otoklav edilen %0,7 agaroz solüsyonu ile içerisinde 5x10³ hücre ve ilgili tedavi ajanları bulunan hücre besiyeri (DMEM, %20 FBS) 1:1 oranında karıştırılarak (agaroz son konsantrasyon %0,35) 37°C su banyosunda 15 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra agaroz-hücre-besiyeri karışımından 1 mL alınarak (2,5x10³ hücre) %0,6 agaroz bulunan alt tabakanın üzerine dikkatli bir şekilde aktarıldı. Hücreler 7-21 gün boyunca %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe bekletildi ve her 3-4 günde bir hücrelerin bulunduğu üst tabaka agarozun üzerine tedavi ajanlarının bulunduğu hücre besiyeri eklendi. Deney sonunda koloni oluşumları mikroskop altında incelenecek ve oluşan koloniler metanol içerisinde hazırlanan %0.005 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Plakalar taranarak kolonilerin miktarı tayini Image-j programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol dâhil olmak üzere her bir grup için en az 2 tekrar olacak ve birbirinden bağımsız en az 3 deney gerçekleştirildi ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2.4. Yara-Kapanma Analizi (Wound-Healing Assay)

Tedavi baskısı altında bulunan kanser hücrelerinin migrasyon kapasiteleri yara-kapanma analizi ile karşılaştırıldı (Jonkman vd., 2014). Hücreler 6 kuyucuklu hücre ekim plakalarına 1×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek tüm yüzeyin kaplanması sağlandı. Ertesi gün, plaka yüzeyi 1000 μ L steril pipet ucu kullanılarak çizildi ve hücre kalıntılarını gidermek amacıyla kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücreler %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Oluşturulan yaraların 0., 6., 12. ve 24. saatlerdeki kapanma oranları fotoğrafları çekilerek kontrol hücreleriyle karşılaştırıldı.

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

Hücrelerdeki proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin gösterilebilmesi için total protein içerikleri özütlenerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri Western blot tekniği ile tespit edildi (Erdogan vd., 2019; Gomez vd., 2015). Hücrelerin ekildiği kültür kuyucukları öncelikle soğuk PBS (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄; pH 7.4) tamponuyla iki kez yıkandı. Proteinlerin purifikasyonu için içerisinde 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, NP-40 0.5%, (v/v), 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, proteaz inhibitör koktail (complete EDTA-free) bulunan standart lizis tamponu kullanıldı. Tripsin yardımı ile toplanan hücreler, PBS tampon ile süspanse edildikten sonra oda sıcaklığında 1100 RPM'de 5 dakika süresince santrifüj edildi ve süpernatant kısmı aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldı. Elde edilen pelet yeterli miktarda (0.5×10^6 hücre için 100 μ L) lizis tamponu ile yeniden süspanse edildi ve süspansiyon esnasında 1 mL'lik enjektörler kullanılarak etkin bir homojenizasyon ve protein eldesi sağlandı. Örnekler 60-120 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 4°C'de 15000 RPM'de ve 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir mikro-santrifüj tüpüne aktarıldı. Bradford metodu kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları karşılaştırıldı. Protein örnekleri uygun konsantrasyonlarda SDS-PAGE jel ile ayrıldı. Daha sonra, PVDF (poliviniliden florür) membranına transfer edildi ve transfer sonrası bloklama tamponunda (TBS-T içerisinde hazırlanan %5'lik BSA) inkübe edildi. Bloklamanın ardından membranların gece boyunca ilgili primer antikoru (%5'lik BSA içerisinde dilute edilmiş) ile 4°C'de inkübasyonu sağlandı. Membranlar TBS-T (0.3 M NaCl, 0.1 M Tris-base, 0.5% Tween; pH 7.4) kullanılarak yıkandı (3x10 dakika) ve sonra HRP ile işaretli ilgili sekonder

antikor (%5'lik BSA içerisinde dilute edilmiş) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar TBS-T kullanılarak tekrar yıkandı (3x10 dakika). Görüntüleme için kemilüminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı. Kemilüminesans görüntü, X-ray görüntüleme sisteminin kullanılmasıyla filme aktararak elde edildi. Son olarak, bant yoğunluklarının dansitometrik analizi Image-j programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

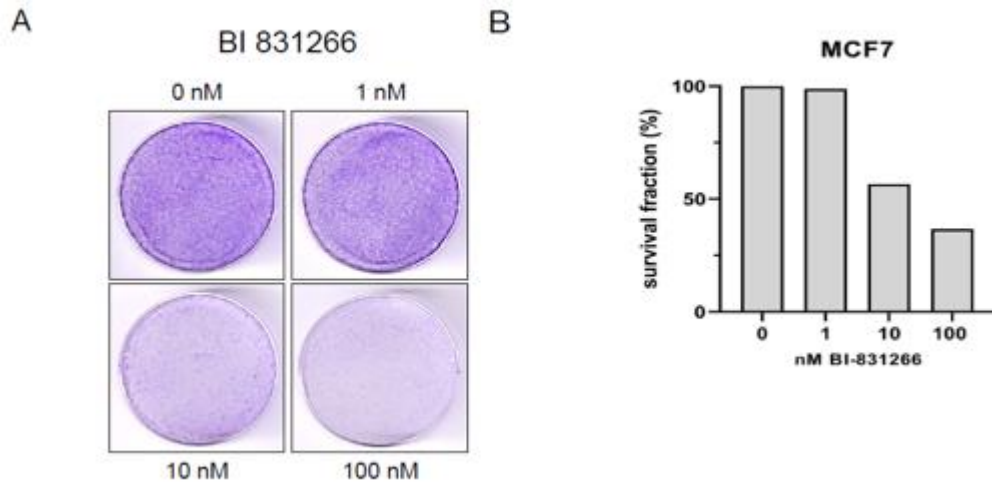
3.2.6. İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm çalışmalar en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) programı kullanılarak elde edildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular t-testi ve One-Way Anova testi ile değerlendirildi ve (means $\pm$ SEM) p-değeri 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) veya 0.0001 (****)'den küçük neticeler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülünün MCF-7 meme kanseri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ön çalışmalarla belirlenmesi.

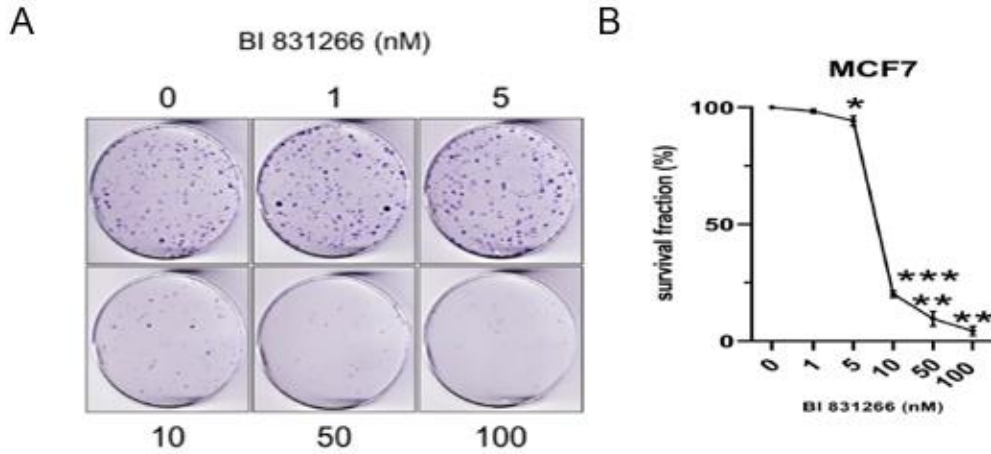
MCF-7 hücreleri artan dozlarda BI 831266 molekülü ile (0-1-10-100 nM), 72 saat boyunca tedavi edildi. 72 saat geçtikten sonra tedavi sonlandırıldı ve hücre proliferasyonu için hücreler 5 gün boyunca inkübe edildi. 5. günün sonunda hücreler artan dozlara bağlı olarak anti-proliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. (A) 1×10^4 MCF-7 meme kanseri hücresi 6-cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra artan dozlarda BI 831266 (1 – 10 – 100 nM) ile 72 saat süreyle tedavi edildi. Sonrasında hücreler 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı ve taze besiyeri eklenerek 5 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0.5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, kuyucuklar su ile dikkatlice yıkandı ve petri kuyuları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik

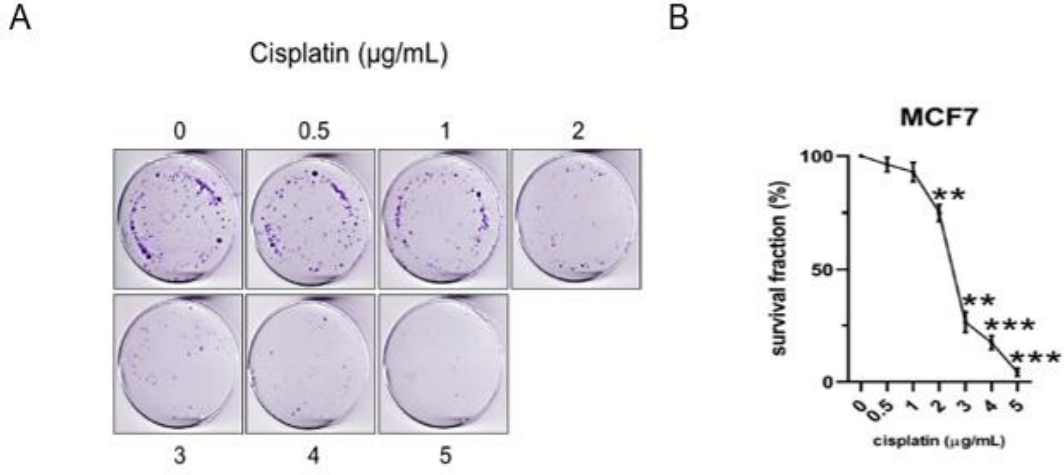
4.2. MCF-7 Hücrelerinde BI 831266 Molekülünün ve Sisplatinin IC50 Sitotoksik Doz Değerinin Koloni Sağ-Kalım Analiziyle Belirlenmesi.

BI 831266 molekülü; kontrol grubu, 1-5-10-50-100 nM olarak 6 grup oluşturularak uygulandı. Hücre ekiminden 24 saat sonra belirlenen dozlar uygulanarak MCF-7 hücreleri 24 saat boyunca tedavi edildi. 24 saat sonra tedavi sonlandırıldı ve hücreler 14 gün boyunca inkübe edildi. 14. günün sonunda hücreler boyandı ve deney sonlandırıldı. 24 saatlik BI 831266 molekülü ile tedavi edilen hücrelerin artan dozlara bağlı koloni sayısının azaldığı buna bağlı olarak BI 831266 molekülünün koloni yapma kapasitesini engellediği görülmüştür ve koloni sağ-kalım analizi IC50 değerinin 7.67 nM olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Sisplatin; kontrol grubu, 0,5-1-2-3-4-5 µg/mL grup oluşturularak uygulandı. Hücre ekiminden 24 saat sonra belirlenen dozlar uygulanarak MCF-7 hücreleri 1 saat boyunca sisplatin ile tedavi edildi. 24 saat sonra tedavi sonlandırıldı ve hücreler 14 gün boyunca inkübe edildi. 14. günün sonunda hücreler boyandı ve deney sonlandırıldı. 1 saatlik sisplatin ile tedavi edilen hücrelerin artan dozlara bağlı sisplatinin hücreler üzerinde koloni yapma kapasitesini engellediği görülmüştür ve koloni sağkalım analizi IC50 değeri 2.89 µg/mL olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Aurora B inhibitörü BI 831266 molekülünün seçilen farklı doz değerleri 3 bağımsız tekrar uygulanarak koloni sağ kalım analizi ile sitotoksik etkisine bakıldı. (A) $1,5 \times 10^3$ MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra artan dozlarda BI 831266 (0, 1, 5, 10, 50 ve 100 nM) ile 24 saat süreyle tedavi edildi. Sonrasında hücreler 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı ve taze besiyeri eklenerek 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fiks edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0.5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve

akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



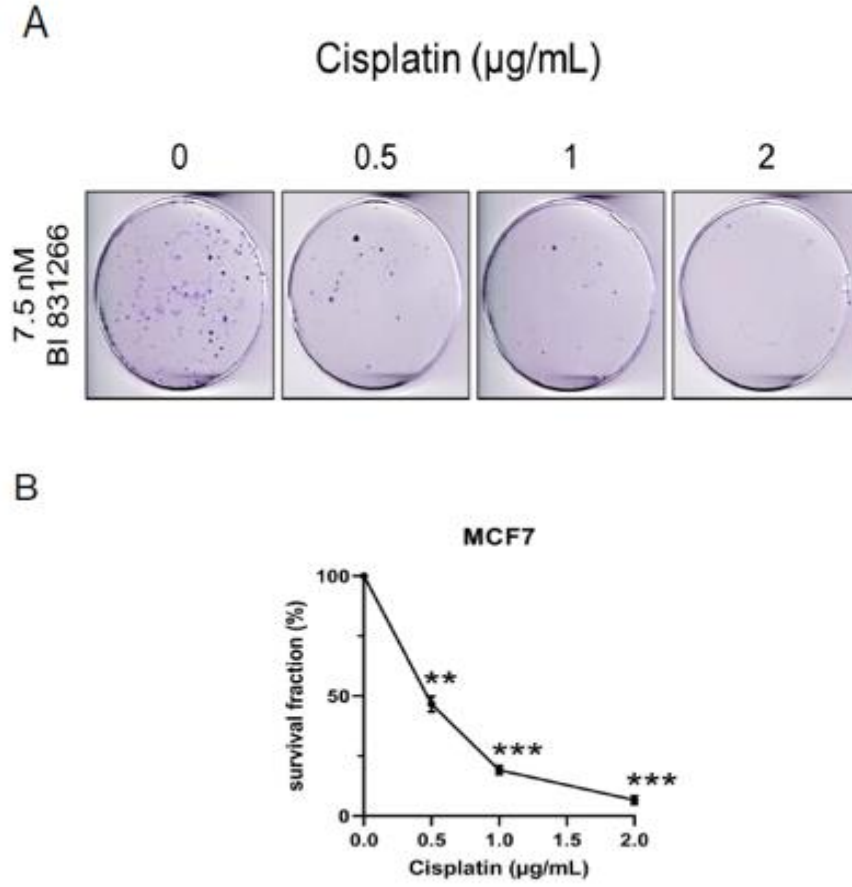
Şekil 4.3. Sisplatinin seçilen farklı doz değerleri 3 bağımsız tekrar uygulanarak koloni sağ kalım analizi ile sitotoksik etkisine bakıldı. (A) $1,5 \times 10^3$ MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra artan dozlarda (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 $\mu\text{g/mL}$) sisplatin ile 1 saat süreyle tedavi edildi. Sonrasında hücreler 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı ve taze besiyeri eklenerek 14 gün süreyle %5 CO_2 içeren nemli 37°C 'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fikse edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0.5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p<0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p<0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p<0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

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

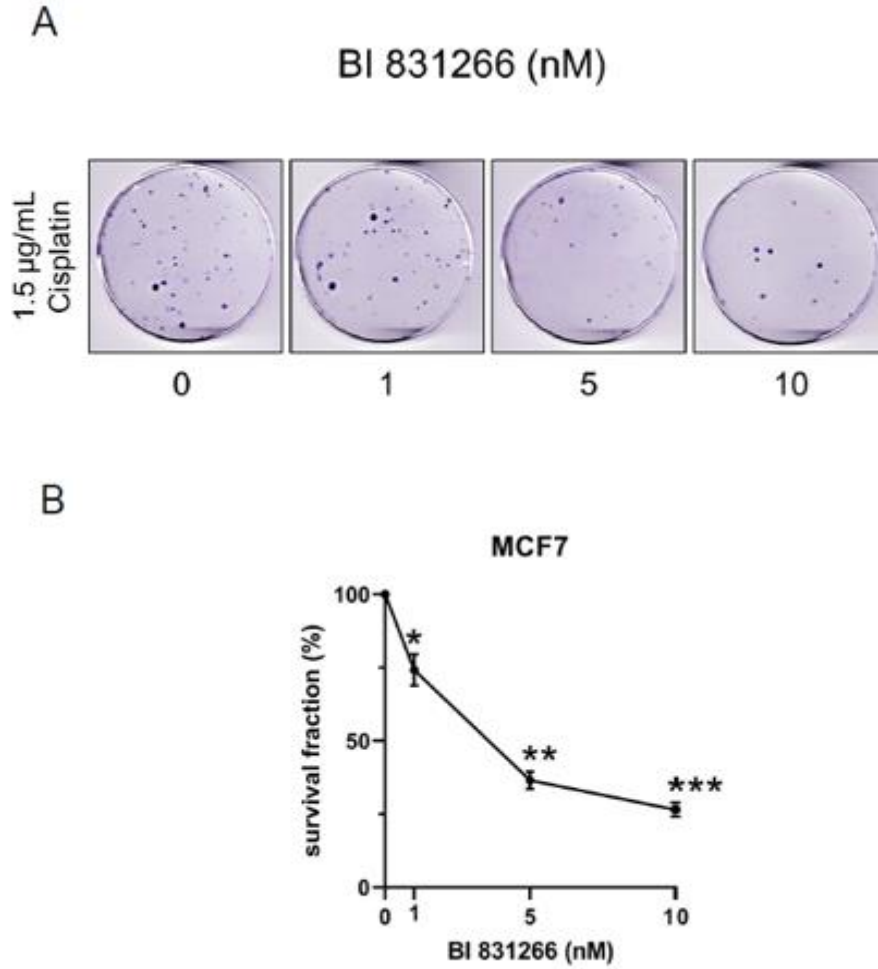


Şekil 4.4. Kombinasyon dozlarının uygulanma saatleri. 24 saat BI 831266, 1 saat sisplatin

MCF-7 hücreleri ekildikten 24 saat sonra BI 831266 molekülü (7,5 nM) sabit tutularak hücreler artan dozlarda (0-0,5-1-2 $\mu\text{g/mL}$) sisplatin ile kombine edilerek tedavi edildi. Kombinasyon tedavi süreci 24 saat BI 831266 molekülü, 1 saat ise sisplatin olarak uygulandı. Tedavi süresi 24 saat olan ABI+sisplatin kombinasyon tedavisinde hücreler ilk olarak 23 saat BI 831266 ile tedavi edildi daha sonra hücelere 23. saatte artan dozlarda sisplatin eklendi ve 24. saatte ise tedavi sonlandırıldı (Şekil 4.5). BI 831266 molekülünün sabit tutulup sisplatin dozlarının arttırıldığı kombinasyon tedavide, birlikte sinerjistik bir etki gösterip hücreler üzerinde koloni sağ-kalımını mono tedavilere kıyasla daha fazla inhibe ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.5). Sisplatin (1,5 $\mu\text{g/mL}$) sabit tutulup BI 831266 molekülünün artan dozlarda (0-1-5-10 nM) uygulanması ABI+sisplatinin birlikte kombinasyonları aynı şekilde sinerjistik etki gösterdi ve koloni yapma kapasitesini mono tedavilere kıyasla daha fazla inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4.6).



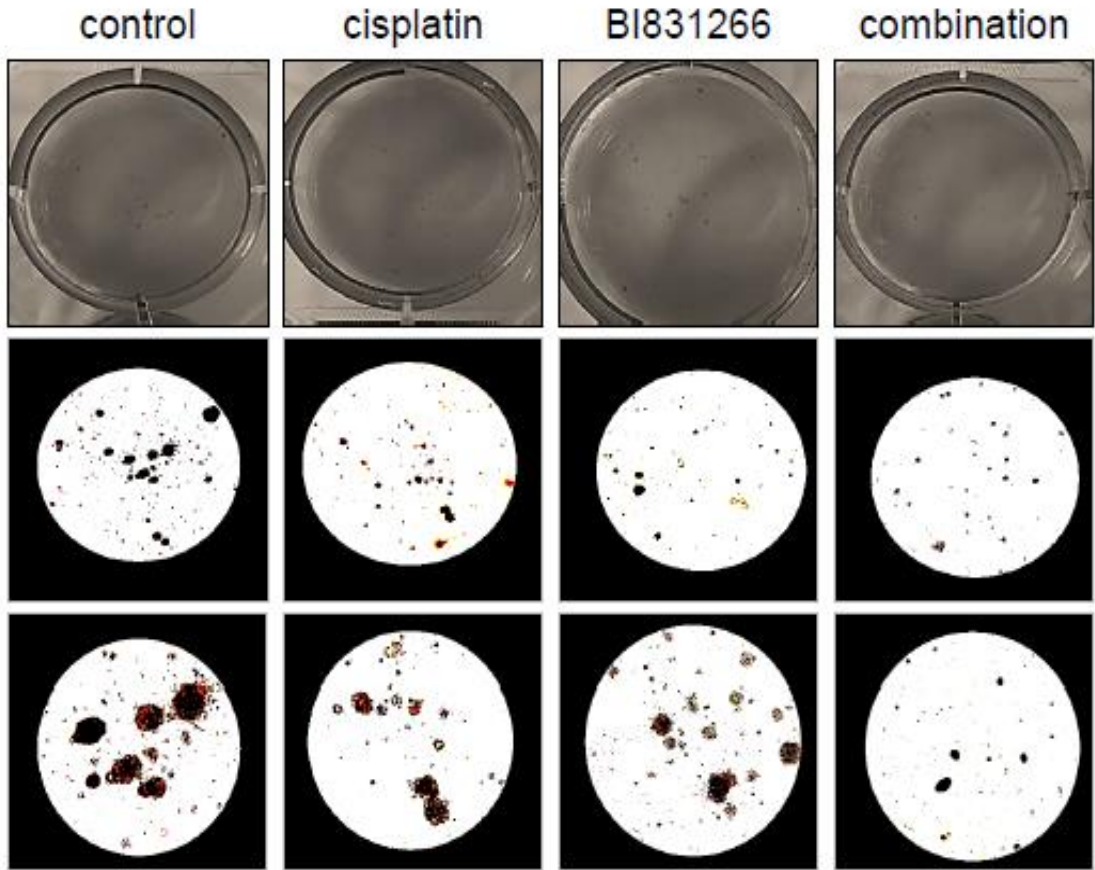
Şekil 4.5. BI 831266 molekülü ve sisplatin dozlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkiye bakıldıktan sonra BI 831266 molekülü ve sisplatin kombinasyon dozları, BI 831266 molekülü için 7.5 nM, sisplatin için ise 1.5 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. (A) Sisplatin grupları; kontrol (7,5 nM BI 831266), 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin+7.5 nM BI 831266 şeklinde tedavi uygulandı. 1.5×10^3 MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra hücreler öncelikle 7.5 nM BI 831266 ile tedavi edildi. 23. saatte ise artan dozlarda 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin ile 1 saat tedavi edildi. Toplam 24 saatlik tedaviden sonra tedavi sonlandırıldı her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fiks edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0.5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.6. BI 831266 grupları; kontrol grubu (1.5 µg/mLsisplatin), 1, 5, 10 nM BI 831266 molekülü+1.5 µg/mL sisplatin olarak belirlendi. (A) 1,5x10E3 MCF-7 meme kanseri hücresi 6 cm hücre kültürü plakasına ekildikten 24 saat sonra hücreler artan dozlarda 1, 5, 10 nM BI 831266 molekülü ile 24 saat tedavi edildi. 23. saatte ise 1.5 µg/mL sisplatin ile tedavi edildi. Toplam 24 saatlik tedaviden sonra tedavi sonlandırıldı her bir hücre kültürü plakasına taze besiyeri eklenerek hücreler 14 gün süreyle %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik hücre kültür inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra, PBS (-Mg/-Ca) ile yıkanmasının ardından metanol-asetik asit (3:1) solüsyonu ile 5 dakika fiks edilen hücreler metanol içerisinde hazırlanan %0.5 kristal violet ile 15 dakika boyunca boyandı. Son olarak, plakalar su ile dikkatlice yıkandı ve hücre kültürü plakaları gece boyunca oda sıcaklığında kurutuldu ve akabinde taranarak hücre yoğunluğu Image-J programıyla analiz edildi. (B) Kontrol grubu ile kıyaslandığında oluşan koloni yüzdeleri gösteren grafik. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında

4.4. Sisplatin ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kanser 3D Koloni Oluşumuna Olan Etkisinin Belirlenmesi (Soft-Agar Tümör Formasyon Analizi).

3D koloni oluşturma çalışması için gruplar; kontrol, 0,5 µg/mL sisplatin, 7,5 nM BI 831266 molekülü ve kombinasyon (0,5 µg/mL sisplatin +7,5 nM BI 831266) olarak belirlendi. Hücre ekiminden 24 saat sonra belirlenen dozlarda ve her 3 günde bir tedavi yenilenerek MCF-7 hücreleri tedavi edildi. 21. günün sonunda deney sonlandırıldı. Sadece sisplatin ve BI 831266 ile tedavi edilen hücrelerde tümörler büyümüşken kombinasyon grubunda BI 831266 ve sisplatinin sinerjistik etki göstererek tümör boyutlarının kontrole ve mono tedavilere kıyasla çok küçük kaldığı görülmüştür (Şekil 4.7).

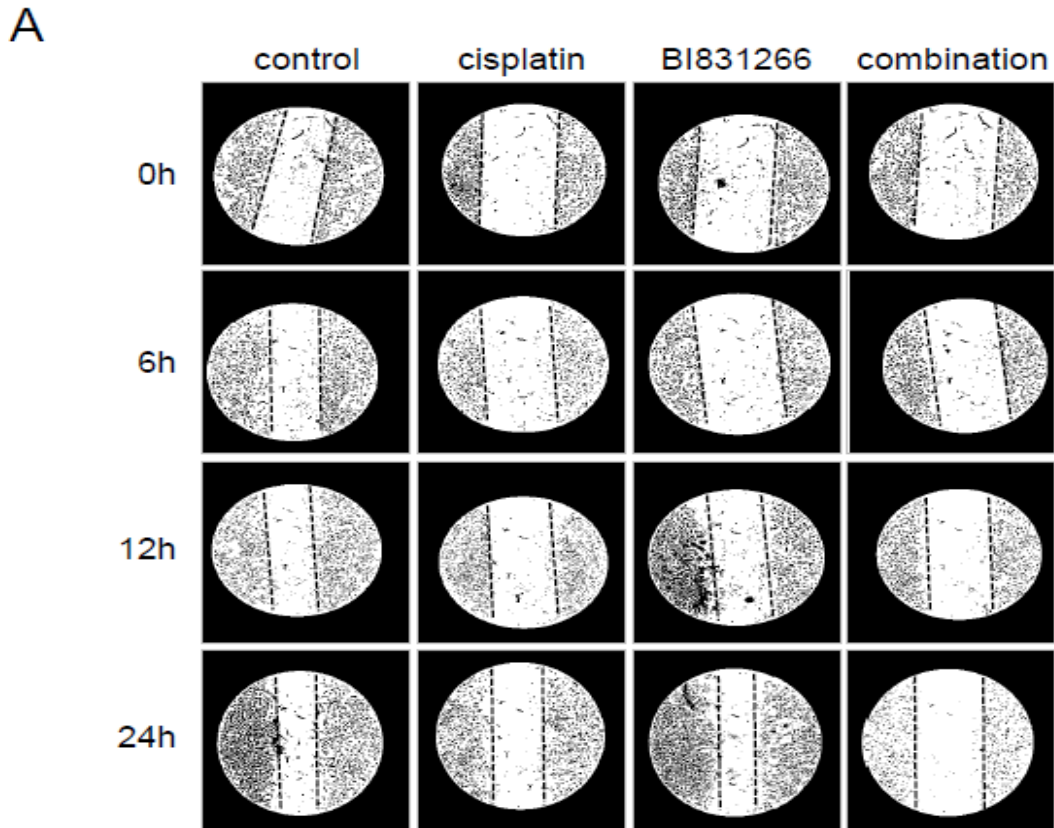


Şekil 4.7. Soft agar deneyi için öncelikle %1 LMP+ddH₂O agar hazırlandı ve mikrodalgada eritildi. Agar eritildikten sonra su altında ılıyana kadar bekletildi ve önceden 37°C'ye ayarlanmış su banyosuna alındı. %20 FBS içeren DMEM hazırlandı ve su banyosunda bekletildi. Alt katman için; 1:1 oranında agar+%20 FBS'li DMEM karıştırıldı ve her bir well'e 1 ml agar+%20 FBS'li DMEM koyuldu ve +4°C'de 30 dk bekletildi. O esnada MCF-7 hücre sayımı yapıldı, her bir well'e 6 bin hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı. Üst katman için ise; 2:1 oranında hücre süspansiyonu+agar hazırlandı. Her well'e 2 ml eklendi ve +4°C'de 30 dk bekletildi ve ardından inkübatöre alındı. Gruplar; kontrol, 0,5 µg/mL sisplatin, 7,5 nM BI 831266 molekülü ve kombinasyon (0,5 µg/mL sisplatin+ 7,5 nM BI 831266) olarak belirlendi. 24 saat sonra MCF-7 hücrelerine

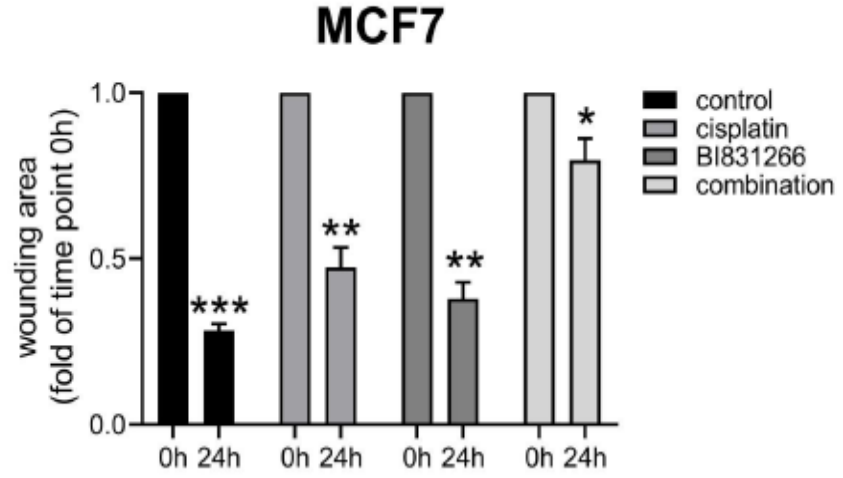
0.5 µg/mL sisplatin, 7,5 nM BI 831266 molekülü ve 0.5 µg/mL+7,5 nM dozlarında tedavi uygulandı. Tedavi her 3-4 günde bir yenilendi. 21 gün süresince hücrelerin tümör oluşumu mikroskopta incelendi ve 21 gün sonunda oluşan tümörlerin fotoğrafı çekildi. Fotoğraflama işleminden sonra tümörlerin boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işlemi için; eski medium çekildi ve % 0,005'lik kristal viyole tartıldı %10 etil alkol içeren solüsyon ile karıştırıldı. Her bir well'e 750 µl boyama solüsyonu eklendi ve 30 dakika beklendi. Ardından boya uzaklaştırılıp 1 ml dH₂O ile 3X30 dakika yıkama yapıldı. Boyama işleminden sonra her bir grubun fotoğrafı çekildi ve deney sonlandırıldı

4.5. Sisplatin ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kansere Hücre Migrasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi (İn Vitro Hücre Migrasyon Analizi).

MCF-7 hücrelerinde migrasyonun incelenmesi için gruplar; kontrol, 0,5 µg/mL sisplatin, 7,5 nM BI 831266 molekülü ve kombinasyon (0,5 µg/mL sisplatin +7,5 nM BI 831266) olarak belirlendi. 24 saatlik toplam mono ve kombinasyon tedaviden sonra hücreler 0-6-12-24 saatlerde mikroskop altında görüntülendi. Mono tedavilerde yara açıklığı azalmışken, kombinasyon grubundaki yara açıklığı mono tedavilerdeki yara açıklığına kıyasla 0 ve 24.saatleri arasında az bir fark olduğu ve kombinasyon tedavinin hücreler üzerinde migrasyonu inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4.8)



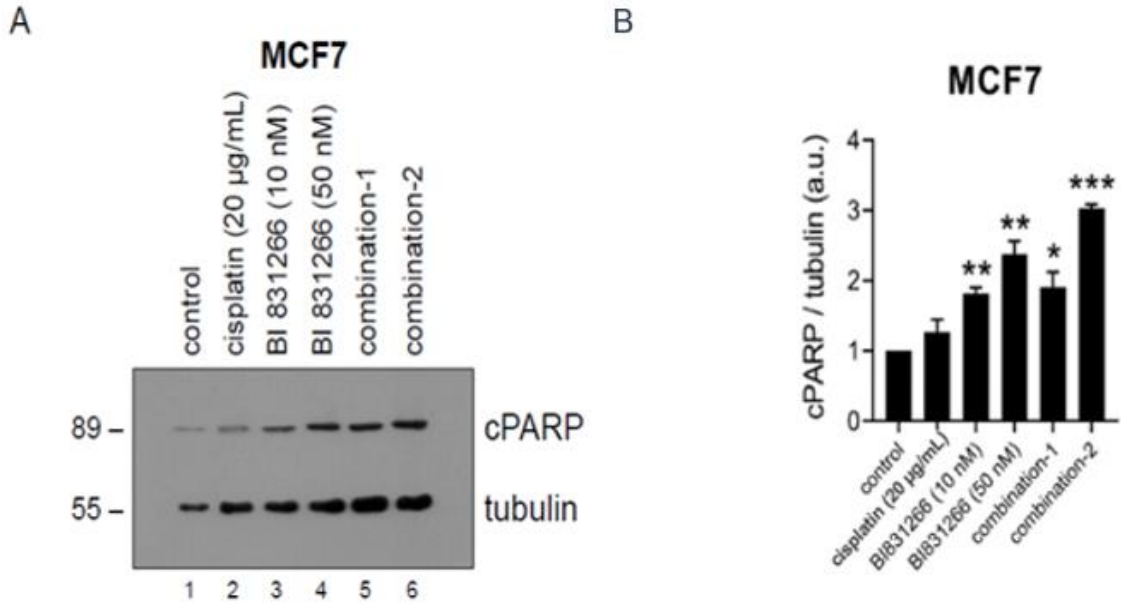
B



Şekil 4.8. MCF-7 hücrelerinde migrasyon wound healing yöntemi ile analiz edildi. (A) Gruplar; kontrol (0), sisplatin 0,5 µg/mL, BI 831266 molekülü 7,5 nM ve kombinasyon (0,5 µg/mL +7,5 nM) olarak belirlendi. 6 kuyucuklu plakaya 1x10E6 MCF-7 meme kanseri hücresi ekildi ve hücre yoğunluğu %90 civarına ulaştıktan sonra steril 100 µL pipet ucu ile düz bir çizgi oluşturuldu. Çizgi oluşturulduktan sonra hücre kalıntıları gidermek için kuyucuklar 2 defa PBS (-Mg/-Ca) ile yıkandı. Taze besiyeri eklendi ve hücreler belirlenen dozlarda tedavi 24 saat edildi ve %5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Yapılan wound healing deney planı ile hücreler 0. saat, 6. saat, 12. saat ve 24. saatlerde mikroskop altında görüntülendi. (B) Her grup kendi arasında 0. saat değerleri kullanılarak normalize edildi. Normalizasyon yapılan yara açıklığı yüzdesi grafiği. *p<0,05; kontrol ile kıyaslandığında, ** p<0,01; kontrol ile kıyaslandığında, *** p<0,001; kontrol ile kıyaslandığında

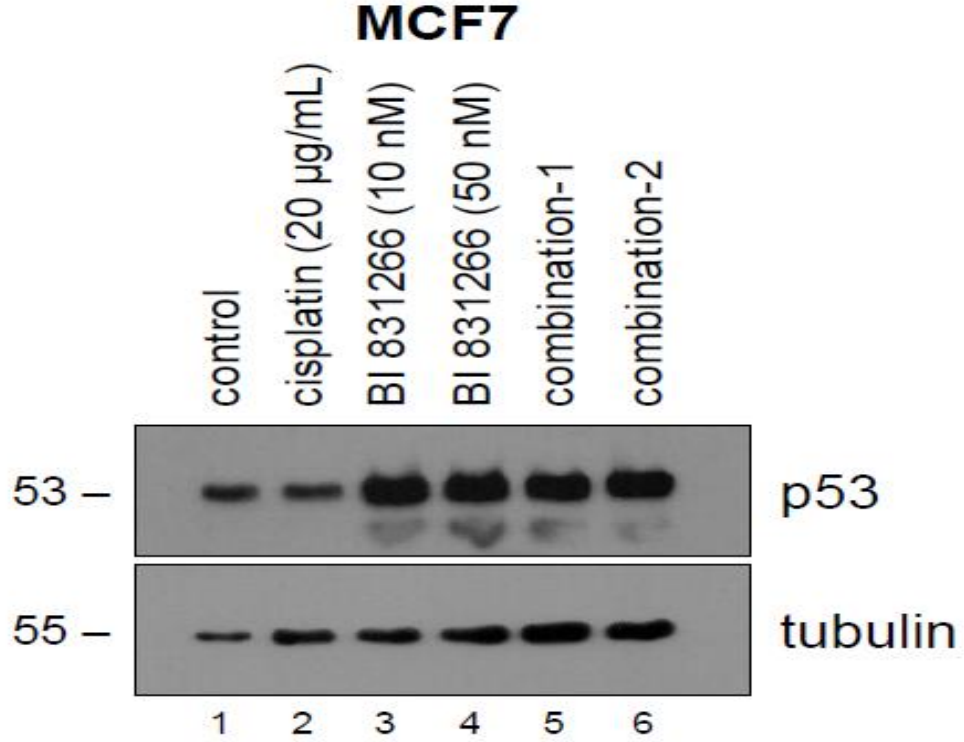
4.6. Sisplatin ve BI 831266 Kombinasyon Tedavisinin Kansere Hücresinde Hücre Döngüsü ve Apoptotik Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi (SDS-PAGE ve Western blot analizleri).

Mono ve kombinasyon tedavilerin hücrelerde bulunan apoptozla ilişkili proteinler üzerinde etkisine bakıldı. İlk olarak cPARP proteinin ekspresyon seviyesine bakıldı. Kontrole kıyasla mono tedavilerde az miktarda artmışken, kombinasyon tedavilerinde kontrole ve mono tedavilere kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.9). Tümör baskılayıcı protein olan p53 seviyesine bakıldığında ise kontrole kıyasla mono ve kombinasyon tedavilerde anlamlı bir artış gözlemlenmedi (Şekil 4.10). Diğer bir protein olan anti-apoptotik BCL-2 proteininde kontrole kıyasla mono ve kombinasyon tedavilerde ifade düzeyinde anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.11). Son protein olan pro-kaspaz 3 proteinin mono ve özellikle kombinasyon tedavilerinde kontrole kıyasla protein seviyelerinde anlamlı bir azalış görülmüştür (Şekil 4.12).

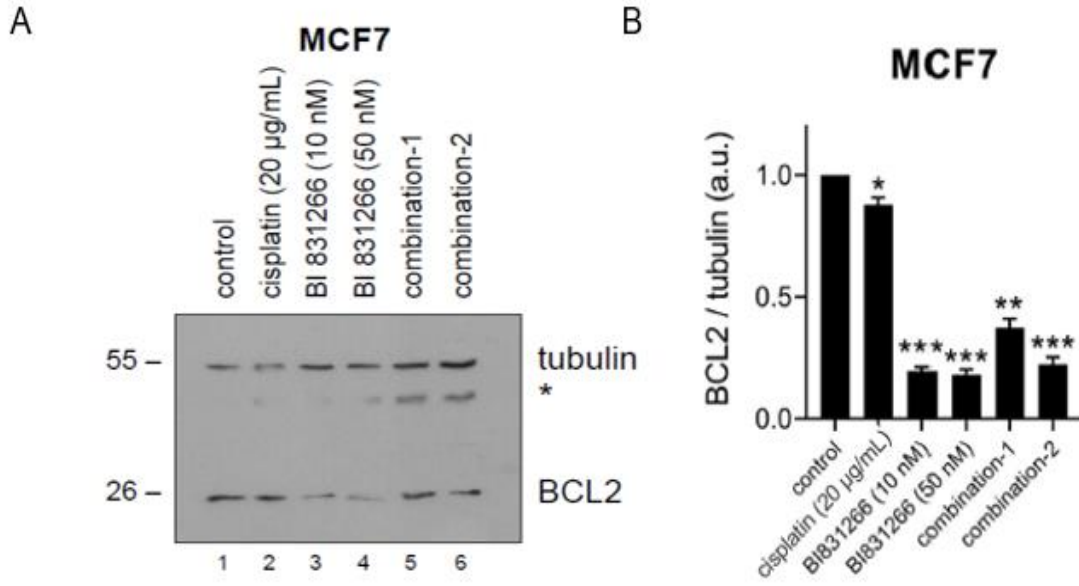


Şekil 4.9. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücrelerinin tripsinizasyon işleminden sonra sayımı gerçekleştirildi. 1x10E6 MCF-7 hücresi DMEM içerisinde süspansiyon edilerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, sisplatin 20 µg/mL, BI 831266 10 nM, 50 nM, sisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 10 nM, sisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 50 nM olarak belirlendi. Hücreler 24 saat sonra belirlenen dozlarda tedavi edildi. Hücreler 24 saatlik tedavinin ardından toplanarak protein lizati oluşturuldu ve Western blot işlemi gerçekleştirilerek cPARP miktarı tayin edildi. (A) cPARP bant görüntüsü (B) Elde edilen Western

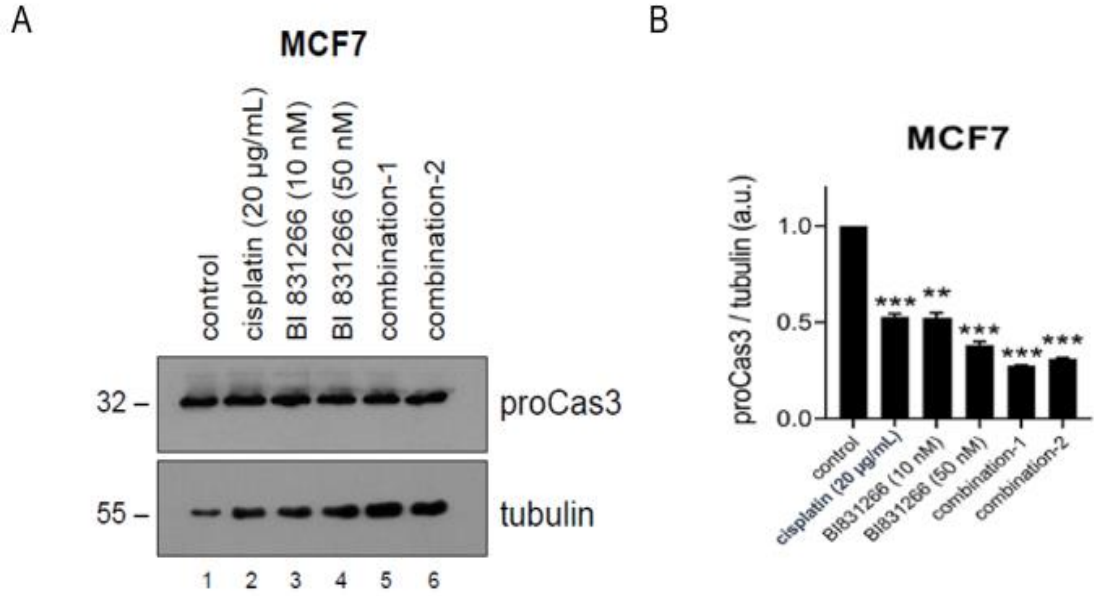
blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.10. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücrelerinin tripsinizasyon işleminden sonra sayımı gerçekleştirildi. 1×10^6 MCF-7 hücresi DMEM içerisinde süspanse edilerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, sisplatin 20 µg/mL, BI 831266 10 nM, 50 nM, sisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 10 nM, sisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 50 olarak belirlendi. Hücreler 24 saat sonra belirlenen dozlarda tedavi edildi. Hücreler 24 saatlik tedavinin ardından toplanarak protein lizatı oluşturuldu ve Western blot işlemi gerçekleştirilerek p53 miktarı tayin edildi



Şekil 4.11. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücrelerinin tripsinizasyon işleminden sonra sayımı gerçekleştirildi. 1×10^6 MCF-7 hücresi DMEM içerisinde süspansiyon edilerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, sisplatin 20 µg/mL, BI 831266 10 nM, 50 nM, sisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 10 nM, sisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 50 olarak belirlendi. Hücreler 24 saat sonra belirlenen dozlarda tedavi edildi. Hücreler 24 saatlik tedavinin ardından toplanarak protein lizati oluşturuldu ve Western blot işlemi gerçekleştirilerek BCL-2 miktarı tayin edildi. (A) BCL-2 bant görüntüsü (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında



Şekil 4.12. Logaritmik büyüme eğrisine sahip MCF-7 meme kanser hücrelerinin tripsinizasyon işleminden sonra sayımı gerçekleştirildi. 1×10^6 MCF-7 hücresi DMEM içerisinde süspansiyon edilerek 6-cm petri kaplarına ekildi. Gruplar; kontrol, cisplatin 20 µg/mL, BI 831266 10 nM, 50 nM, cisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 10 nM, cisplatin 20 µg/mL+ BI 831266 50 olarak belirlendi. Hücreler 24 saat sonra belirlenen dozlarda tedavi edildi. Hücreler 24 saatlik tedavinin ardından toplanarak protein lizati oluşturuldu ve Western blot işlemi gerçekleştirilerek proCas-3 miktarı tayin edildi. (A) proCas-3 bant görüntüsü (B) Elde edilen Western blot sonuçlarının densitometrik analizi Image-J programı kullanılarak gerçekleştirildi. * $p < 0,05$; kontrol ile kıyaslandığında, ** $p < 0,01$; kontrol ile kıyaslandığında, *** $p < 0,001$; kontrol ile kıyaslandığında

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan raporda 2020 yılında yaklaşık 19 milyon insana kanser teşhisi konulduğu ve 10 milyondan fazla insan kanser nedeniyle yaşamını yitirdiği tahmin edilmektedir (Sung vd., 2021). Yapılan araştırmalar, klinikte daha başarılı anti-kanser tedavi imkânlarının sunulmasında klinik öncesi kanser araştırmalarının önemini ortaya çıkarmaktadır. Hücre büyümesi, bölünmesi, farklılaşması ve programlı hücre ölümünde rol oynayan genlerin çeşitli genotoksik saldırılar neticesinde mutasyona uğramasıyla sağlıklı hücreler neoplastik transformasyona uğramakta ve kontrolsüz bir şekilde bölünme yeteneği kazanmaktadırlar (Weinberg, 2007). Klinikte uygulanmakta olan konvansiyonel anti-kanser tedavilerde başarılı sonuçlar sağlasa da, hali hazırda var olan (*de novo*) ve/veya zamanla kazanılan ilaç direnci ve söz konusu tedaviler neticesinde ortaya çıkan ciddi yan etkiler uzun vadeli klinik başarıyı sınırlamaktadır (O'Connor, 2015; Tsimberidou vd., 2020; Wake vd., 2019). Son yıllarda gerçekleştirilen çok sayıda araştırma, kanserojenik hücrelerin genetik, epigenetik, transkriptomik ve proteomik profillerinin hastaların standart ve/veya yeni nesil anti-kanser ajanlara (monoklonal antikorlar, antikor-ilaç konjugatları, küçük molekül inhibitörler vd.) karşı yanıtlarında önemli bir prediktif biyolojik gösterge ya da farmakolojik bir hedef olabileceğini göstermiştir (Chambliss ve Chan, 2016; Relling ve Evans, 2015; Wake vd., 2019; Witzmann ve Grant, 2003). Hücre döngüsünün sentez evresinde gerçekleşen genetik replikasyon ve mitoz evresinde gerçekleşen kromozomal segregasyon süreçlerinin başarıyla tamamlanması hücre biyolojisi açısından önemlidir. Söz konusu moleküler süreçlerin işleyişine katkı sunan çok sayıda proteinin özellikle neoplastik transformasyon sürecindeki rollerinin araştırılması hedefe özel tedavi yaklaşımları açısından önem arz etmektedir (Bahassi, 2007).

Aurora kinazlar mitoz evresinde; kromozomların eşit bir şekilde ayrılması, sentrozom büyümesi ve bölünmesi, kromozom yoğunlaşması ve dizilmesi, kinetokor- mikrotübül bağlanmaları gibi pek çok önemli hücresel süreçte rol oynamaktadırlar (Bolanos-Garcia, 2005; Kimura ve Okano, 2005; Zhang, 2008). Bunlardan Aurora kinaz B, profazdan metafaza, metafazdan anafaza ve sitokinez safhalarına kadar bütün kromozomal regülasyonlarda rol oynayan bir proteindir. Aurora kinaz B'nin aktivitesi metafaz safhasından mitozun son safhasına kadar çok yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Aurora kinaz B, metafazdan anafaza geçiş sırasında sentromerlere lokalize olarak histon H3'ü fosforile etmekte ve kromozomların yoğunlaşmasında rol oynamaktadır. Aurora B, anafaz safhası

başladıktan sonra ise genetik materyalin yavru hücrelere eşit bir şekilde dağılımını sağlamaktadır (Y. Ma vd., 2015; Vas ve Clarke, 2008). Öte yandan, Aurora B'nin aşırı ifadesi sonucunda meydana gelen kromozomal kararsızlığın tümör oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Aurora kinaz B'nin özofagus, yumurtalık ve tiroit gibi çeşitli kanser türlerinde aşırı ifade edildiği belirtilmektedir. Bu nedenle, ilgili kinazın küçük molekül inhibitörlerle farmakolojik inhibisyonunun klinikte kullanılmakta olan konvansiyonel tedavilerin sitotoksik kapasitesini arttırabileceği düşünülmektedir. Aurora kinaz B'nin küçük molekül inhibitörlerinin, başarılı bir kromozom ayrımı olmadan erken mitotik çıkışa neden olduğu ve devam eden inhibisyon sonucunda hücrelerin apoptosise uğradığı rapor edilmektedir (Ahmed vd., 2021).

Bu tez çalışmasında, yeni geliştirilmiş olan Aurora B kinaz inhibitörü BI 831266 molekülünün klinikte yaygın bir şekilde kullanılan sisplatin sitotoksitesite üzerine olan sinerjistik potansiyeli araştırılmıştır. İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) kullanarak gerçekleştirdiğimiz in vitro sitotoksitesite analizleriyle (hücre canlılık, koloni sağ-kalım, tümör formasyon ve yara-kapanma analizleri) BI 831266 ve sisplatin kombinasyonunun anti- neoplastik kapasitesi araştırılmıştır. Ayrıca, apoptozisde rol oynayan çeşitli belirteçlerin post-translasyonel ekspresyon profilleri western blot tekniğiyle incelenerek söz konusu kombinasyon tedavinin, kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, hücre biyolojisi açısından önemli rolleri bulunan moleküler bir hedefin kimyasal inhibisyonunun konvansiyonel anti-kanser tedavilerin sitotoksitesitesini arttırma potansiyeli ortaya çıkarılmıştır.

Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 ile ilk defa gerçekleştirilen in vitro sitotoksitesite analizlerinde elde ettiğimiz sonuçlarda, Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 tedavisinin konvansiyonel anti-kanser tedavi ajanlarının sitotoksik kapasitesini arttırabileceği belirlendi.

Memeli hücre kültürü uygulamaları kapsamında gerçekleştirilen in vitro hücre canlılığı ve sitotoksitesite deneyleri, çeşitli kimyasal maddelerin sitotoksitesite analizleri ve etkin ilaç taraması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tahlillerin uygulanmasına son yıllarda artan bir ilgi olmuştur. Hâlihazırda bu analizler, ilaç geliştirme sırasında hem bileşik toksitesitesini hem de tümör hücresi büyümesi inhibisyonunu değerlendirmek için onkolojik

araştırmalarda da kullanılmaktadır (Ishiyama, M; Tominaga, H; Shiga, M; Sasamoto, K; Ohkura, Y; Ueno, 1996) . Klonojenik sağ-kalım, tek bir hücrenin bir koloniye (en az elli hücre) dönüşme yeteneğine dayanan bir in vitro hücre sağkalım analizidir. Bu tahlil, esas olarak popülasyondaki her bir hücreyi "sınırsız" bölünmeye tabi tutma yeteneği açısından test eder. Klonojenik sağ-kalım, iyonize radyasyonla tedaviden sonra hücresel toksisiteyi belirlemek için tercih edilen bir yöntemdir, ancak diğer sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Franken vd., 2006). Hücre proliferasyon analizinden en önemli farkı, tedavi edilen kanser hücrelerinin yalnızca bir kısmının koloni oluşturma kapasitesini korumasıdır. Aurora kinaz B inhibisyonunun, kromozomal segregasyonu engelleyerek erken mitotik çıkışa neden olduğu ve sonuç olarak hücreleri apoptosise sürüklediği gösterilmiştir (Kitzen vd., 2010). Aynı şekilde önceki araştırmalarda, Aurora kinaz B inhibisyonunun kanser hücrelerini G2/M hücre döngüsü kontrol noktasında durdurduğunu ve muhtemelen bu nedenle apoptosise neden olduğunu gösterilmiştir (Portella vd., 2011; Yeung vd., 2008). Çalışmamız kapsamında, Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülü ile gerçekleştirilen ön çalışmalarda, 72 saatlik 10 nM BI 831266 tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücre proliferasyonunu önemli oranda baskılandığı belirlendi (Şekil 4.1). Bu çalışma neticesinde dizayn edilen koloni sağkalım tahlillerinde, MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saat süreyle artan dozlarda (0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 nM) BI 831266 molekülü ile tedavi edildi ve Aurora kinaz B aktivitesi engellenen MCF-7 kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi kontrol hücreleriyle mukayese edildi. 1 nM BI 831266 tedavisinin ilgili kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirse de 5 nM BI 831266 tedavisi neticesinde kanser hücrelerinin önemli bir kısmının (%94) koloni oluşturma kapasitesini koruduğu belirlendi (Şekil 4.2). Öte yandan, 10 nM BI 831266 tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin klonojenik kapasitesini ciddi manada baskıladığı ve hücrelerin yalnızca yaklaşık %20'sinin koloni yapabildiği belirlendi (Şekil 4.2). Benzer şekilde, 50 nM ve 100 nM BI 831266 tedavilerinin de meme kanseri koloni oluşturma kapasitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskıladığı belirlendi (Şekil 4.2). Sonuç olarak, Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülünün MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki koloni sağ-kalım analizi IC50 değerinin 7.67 nM olduğu tespit edildi (The Quest Graph™ IC50 Calculator, (Sebaugh, 2011)). Bu nedenle, aşağıda bahsi geçen kombinasyon deneylerinde BI 831266 sabit tedavi değeri 7.5 nM olarak uygulandı.

Sisplatin (CDDP) [(SP-4-2)-diamindikloridoplatin(II)], testis, yumurtalık, baş ve boyun, mesane, akciğer, rahim ağzı kanseri ve melanom gibi çeşitli solid kanserlerin tedavisi için yaygın olarak kullanılan anti-kanser ilaçlardan biridir. Sisplatin, çeşitli hücresel sistemleri kullanarak anti-kanser etki gösterdiği tahmin edilmektedir, ancak en kabul edilebilir etki mekanizması, DNA üzerindeki pürin bazları ile etkileşerek DNA lezyonlarının oluşmasını ve ardından apoptosise yol açan çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonunu içerir. Bununla birlikte, sisplatin tedavisi neticesinde oluşan ciddi yan etkiler ve zamanla gelişen ilaç direnci, sisplatinin uygulamasını ve klinik etkililiğini sınırlayan faktörlerdir. Sisplatin direncinden kanser hücrelerinde ilaç birikiminin azalması, ilacın glutatyon ve metalloproteinlerle reaksiyona girerek inaktif olması ve DNA lezyonlarının daha hızlı onarılması sorumludur. Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalarda, sisplatin yan etkilerini ve direncini en aza indirmek için kombinasyon tedavileri test edilmiş ve sisplatin kombinasyon tedavilerinin anti-kanser kapasitesinin daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014; Ghosh, 2019). Çalışmamız doğrultusunda gerçekleştirdiğimiz in vitro analizlerde, Aurora kinaz B inhibisyonunun sisplatin sitotoksitesi üzerine olan etkisini araştırıldı. Kombinasyon deneylerinden önce, sisplatin tedavisinin elimizdeki MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi üzerine olan etkisi belirlendi. İlgili kanser hücreleri 1 saat süreyle artan dozlarda (0 – 0.5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 µg/mL) sisplatin tedavisine maruz bırakıldı ve takip eden süre boyunca hücrelerin koloni sağ-kalım aktivitesi incelendi. Beklenildiği gibi (Y. Sun vd., 2011), artan sisplatin miktarıyla birlikte koloni oluşumunun azaldığı ve özellikle 2 µg/mL sisplatin tedavisiyle birlikte anlamlı bir şekilde baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.3). Sonuç olarak, sisplatin molekülünün MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki koloni sağ-kalım analizi IC50 değerinin 2.89 µg/mL olduğu belirlendi (The Quest Graph™ IC50 Calculator, (Sebaugh, 2011)). Aşağıda bahsi geçen kombinasyon deneylerinde, güçlü bir genotoksik kapasiteye sahip olan sisplatin molekülünün IC25 değeri sabit tutuldu ve artan dozlarda BI 831266 molekülü kullanılan kombinasyon tedaviler uygulandı (yaklaşık sisplatin IC25 1.5 µg/mL). Küçük molekül inhibitör ve kemoterapötik ajanların in vitro kombinasyon etkinliklerini test eden çeşitli raporlarda en az 16 saatlik kimyasal inhibisyonun ardından kemoterapötik stresin uygulanmasının daha sinerjik bir etki gösterdiği dikkate alınarak (Y. Zhao vd., 2006), kombinasyon deneylerimizde, 24 saatlik Aurora kinaz B inhibisyonunun neticesinde sisplatin tedavisi uygulandı. Kombinasyon analizleri için 2 farklı strateji uygulandı. Birinci strateji kombinasyon deneylerinde, ilgili MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat süreyle

7.5 nM BI 831266 tedavisi uygulandı. Ertesi gün hücreler, BI 831266 tedavisine ilave olarak 1 saat süreyle 23.saatte artan dozlarda (0 – 0.5 – 1 – 2 $\mu\text{g/mL}$) sisplatin tedavisine maruz bırakıldı ve devam eden süre boyunca hücrelerin klonojenik sağkalım kapasiteleri karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de gerçekleştirilen analizlerdeki kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında, 7.5 nM BI 831266 monoterapi tedavisinin uygulandığı grupta koloni sağ-kalımın yaklaşık %50 oranında azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.5). 7.5 nM BI 831266 monoterapi uygulanan grupla kıyaslandığında, 7.5 nM BI 831266 ve 0.5 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalımını yaklaşık %47’ye düşürdüğü tespit edildi (Şekil 4.5). Tedavi edilmeyen kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.5 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin bireysel tedavisinin meme kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalımının yaklaşık %97 olduğu dikkate alındığında (Şekil 4.3), elde edilen sonuçların Aurora kinaz B inhibisyonunun sisplatin tedavisinin sitotoksik potansiyelini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı değerlendirildi. Benzer şekilde, kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, 1 ve 2 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin tekli tedavilerinin koloni oluşturma kapasitesine sırasıyla yaklaşık %93 ve %75’e düşürdüğü (Şekil 4.3), 7.5 nM BI 831266 kombinasyonunun ise bu oranları sırasıyla %9 ve %7’ye düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.5). Sonuç olarak elde edilen veriler, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bireysel sisplatin tedavisinin koloni sağkalım IC50 konsantrasyonunun 2.89 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu, Aurora kinaz B kombinasyonunun bu oranı 0.8 $\mu\text{g/mL}$ ’a düşürdüğünü gösterdi (The Quest Graph™ IC50 Calculator, (Sebaugh, 2011)).

İkinci strateji kombinasyon deneylerinde, ilgili MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat süreyle artan dozlarda (0 – 1 – 5 – 10 nM) BI 831266 tedavisi uygulandı. Ertesi gün hücreler, BI 831266 tedavisine ilave olarak 23.saate 1 saat süreyle 1.5 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin tedavisine maruz bırakıldı ve devam eden süre boyunca hücrelerin koloni sağ-kalım kapasiteleri mukayese edildi. Şekil 4.2. incelendiğinde, tedavi uygulanmayan kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, 1 ve 5 nM BI 831266 tedavilerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin koloni sağ-kalım kapasitesini sırasıyla yaklaşık %98 ve %94’e düşürdüğü, diğer taraftan, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin kombinasyonunun bu oranları sırasıyla yaklaşık %74 ve %36’ya düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.6). Benzer şekilde, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin ve 10 nM BI 831266 tedavisi uygulanan kanser hücrelerinin koloni sağ-kalım kapasitesinin de anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.6). Netice itibarıyla elde edilen bulgular, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bireysel BI 831266 tedavisinin koloni sağ-kalım IC50

konsantrasyonunun 7.67 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu, sisplatin kombinasyonunun bu oranı 1.96 $\mu\text{g/mL}$ 'a düşürdüğünü gösterdi (The Quest Graph™ IC50 Calculator, (Sebaugh, 2011)).

Yüzey-bağımsız (anchorage-independent) büyüme, kanser hücrelerinin katı bir yüzeyden bağımsız olarak büyüebilme yeteneğidir ve kanserojenik transformasyon sürecinin ayırt edici özelliğidir. 3D soft agar tümör oluşum analizi (3D soft agar tumour formation assay), söz konusu neoplastik yeteneğin in vitro olarak karakterizasyonu için kullanılan bir yöntemdir ve hücrelerde habis transformasyonun tayini için sık kullanılan testlerden biri olarak kabul edilir (Borowicz vd., 2014). Yukarıda bahsi geçen 2D koloni sağ-kalım analizleri, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Aurora kinaz B aktivitesinin BI 831266 molekülü vasıtasıyla engellenmesinin sisplatinin sitotoksik etkisini yoğunlaştırdığı gösterdi. Gerçekleştirdiğimiz 3D soft agar analizleriyle söz konusu sisplatin ve BI 831266 kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 3D tümör formasyonu üzerine olan etkisi araştırıldı. Şu ana kadar yapılan çok sayıda araştırmada (Garcia-Flores vd., 2019; Kannan vd., 2010), MCF-7 meme kanseri hücrelerinin 3D soft agar analizi için model bir hücre hattı olduğu gösterilmiştir. İlgili deneysel prosedürler dikkatle uygulanarak gerçekleştirilen analizlerde, agar içerisine ekimi gerçekleştirilen MCF-7 kanser hücreleri 21-28 gün süreyle ilaçlı (0.5 $\mu\text{g/mL}$ sisplatin ve/veya 7.5 nM BI 831266) veya ilaçsız besiyeriyle inkübe edildi. (Şekil 4.7)'de gösterilen sonuçlar incelendiğinde, kontrol, sisplatin bireysel veya BI 831266 bireysel tedavi gruplarında oluşan tümör kolonileriyle karşılaştırıldığında, sisplatin ve BI 831266 kombinasyon tedavisinin uygulandığı hücrelerin 3D klonojenik tümör formasyonunun önemli oranda baskılandığı dikkat çekmektedir. Sonuç olarak elde edilen veriler, küçük molekül Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266'in klinikte kanser hastalarının tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılmakta olan sisplatin molekülünün anti-kanser potansiyelini yoğunlaştırdığını ve dolayısıyla tümör formasyonunu daha etkili bir şekilde baskıladığı göstermiştir.

In vitro yara iyileştirme deneyi (wound-healing/scratch assay), hücre göçünün (migrasyon) in vitro şart altında araştırılması için yaygın bir şekilde kullanılan kolay uygulanabilir tekniklerden biridir. Bu yöntem ile in vivo yara iyileşmesi sırasında gerçekleşen hücre göçünün taklit edilmesi sağlanarak farklı hücresel kontekstler karşısında migrasyonun tahlil edilmesi amaçlanır (Rodriguez vd., 2005; X. Wang vd., 2019). MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, in vitro yara iyileştirme analizi için model bir hücre hattı olduğu farklı

araştırmalarda gösterilmiştir (Kannan vd., 2010; M. Xie vd., 2015; Y. Xie vd., 2017). Yara oluşumu gerçekleştirildikten sonra ilaçlı (0.5 µg/mL sisplatin ve/veya 7.5 nM BI 831266) veya ilaçsız besiyeriyle inkübe edilen hücrelerdeki yara kapanma kinetiğinin karşılaştırılması için yara oluşturulduktan 0 – 6 – 12 – 24 saat sonra ters ışık mikroskobu kullanılarak kuyucukların resimleri çekildi (Şekil 4.8). Kontrol, sisplatin bireysel, BI 831266 bireysel ve sisplatin+BI 831266 kombinasyon gruplarında oluşturulan yaraların 24 saat sonraki (24h) iyileşme potansiyeli ilk oluşturulan yara açıklığıyla (0h) mukayese edildiğinde, diğer gruplara kıyasla kombinasyon tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücre migrasyonu üzerine anlamlı ve etkili bir engelleyici etkisinin olduğu tespit edildi (Şekil 4.8). 24 saatlik tedavi neticesinde, kontrol grubunda oluşturulan yaranın yaklaşık %71'nin, sisplatin bireysel tedavi grubunda oluşturulan yaranın yaklaşık %52'sinin ve BI 831266 tedavi grubunda oluşturulan yaranın yaklaşık %62'sinin iyileştiği, öte yandan, kombinasyon tedavi grubunda ise oluşturulan yaranın sadece yaklaşık %20'sinin iyileştiği belirlendi (Şekil 4.8). Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, sisplatin ve BI 831266 kombinasyon tedavisinin MCF-7 meme kanseri hücre migrasyonunu önemli ölçüde engellediğini ortaya çıkarmıştır.

Şu ana kadar elde ettiğimiz veriler, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Aurora kinaz B inhibitörü BI 831266 molekülünün sisplatin tedavisinin sitotoksik etkisini anlamlı bir şekilde artırdığını gösterdi. Sisplatin ve BI 831266 kombinasyon tedavisine maruz kalan hücrelerdeki programlı hücre ölüm sürecinin (apoptosis) takibi için gerçekleştirilen Western blot analizlerinde çeşitli biyolojik göstergelerin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. 113-kDa'lık nükleer bir enzim olan poli(ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1), DNA lezyonlarına bağlanarak aktive edilen ve PARP1'in kendisi de dâhil olmak üzere nükleer akseptör proteinlerin poli(ADP-ribosil)asyonunu (PARilasyon) katalize ederek DNA onarım mekanizmasını DNA lezyonlarına yönlendiren bir nükleer proteindir. PARP1, kaspaz bağımlı apoptosisde aktif kaspaz 3 ve 7'nin bir substratıdır. İlgili kaspazlar tarafından kesilen PARP1 aktivitesini kaybeder ve böylece DNA onarımını baskılar. Kaspase-bağımlı bir şekilde gerçekleşen PARP1 kesimi (PARP1 cleavage), DNA bağlama alanının yakınında bir nükleer lokalizasyon sinyali içinde meydana gelir ve 24-kDa ve 89-kDa fragmanlarının oluşumuyla sonuçlanır. Dolayısıyla 89-kDa'lık kesilmiş PARP (cleaved PARP, cPARP) oluşumu apoptosis sürecinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Chaitanya vd., 2010; Gobeil vd., 2001; Mashimo vd., 2021). Farklı dozlarda

sisplatin ve BI 831266 molekülleriyle tedaviye maruz kalan kanser hücrelerindeki cPARP aktivasyonu dikkate alındığında, sispaltin ve BI 831266 kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptosisi aktif hale getirmek suretiyle güçlü sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. 1 saatlik akut sispaltin tedavisi neticesinde cPARP oluşumunun bir miktar arttığı ancak 24 saatlik BI 831266 tedavileriyle kıyaslandığında yeterince artış gözlenmediği belirlendi (Şekil 4.9). Bu durumun, uygulanan sispaltin tedavi süresinin kısa (akut) olmasından kaynaklanabileceği değerlendirildi, nitekim, Jiang ve arkadaşlarının 2017 yılında yayımladıkları raporda (Jiang vd., 2017), MCF-7 meme kanseri hücrelerine 48 saatlik 0 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 µg/mL sispaltin tedavisi uygulanmış ve cPARP ekspresyonu araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, cPARP ekspresyonunun doza bağımlı bir şekilde arttığını, özellikle 8 ve 10 µg/mL sispaltin tedavisi neticesinde cPARP oluşumunun önemli ve anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir (Jiang vd., 2017). Sonuç olarak, yukarıda bahsi geçen 2D klonojenik sağkalım ve 3D klonojenik tümör formasyon tahlillerinden elde edilen bulgulara paralel olarak, BI 831266 Aurora kinaz B inhibitörünün sispaltinin sitotoksitesini önemli ölçüde arttırdığını Western blot analiziyle gösterildi. p53 tümör baskılayıcı (süpressör) protein, farklı hücresel yollarda rol oynayan çok sayıda genin ekspresyonunu kontrol ederek farklı biyolojik kontekstlere münhasır biyokimyasal ve moleküler yanıtların düzenlenmesini sağlayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Gundogdu, Hergovich, ve Gomez, 2021; Kulaberoglu vd., 2016). p53'ün işlevi, genotoksik strese yanıtta özel bir öneme sahiptir; öyle ki çeşitli hücresel stres yanıt yollarını bütünleştiren ve apoptotik aktivasyon, hücre döngüsünün durdurulması, yaşlanma ve diğer fizyolojik süreçler arasındaki kararı yöneten merkezi bir koordinasyonu oluşturur (Speidel, 2010, 2015). DNA hasarını takiben hücre ölümünün normal bir şekilde indüklenmesi için p53 proteini gerekli olmakla birlikte, p53'ten bağımsız mekanizmalar vasıtasıyla da apoptotik bir yanıt etkinleştirebilir (McNamee ve Brodsky, 2009). Gerçekleştirdiğimiz Western blot analizlerinde, tedavi uygulanmayan kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, sispaltin ve/veya BI 831266 ile tedavi edilen hücrelerde p53 ekspresyonun arttığı, ayrıca sispaltin tedavisine kıyasla BI 831266 tedavisinin daha fazla p53 ekspresyonuna neden olduğu belirlendi ancak p53 ekspresyonu bağlamında bireysel ve kombinasyon tedavileri arasında anlamlı ve önemli bir farkın oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.10). Apoptotik sürecin p53'den bağımsız bir şekilde aktive olan kaspazlar vasıtasıyla gerçekleşebileceği (Marchini vd., 1999) ve apoptosisi neticesinde PARP1 molekülünün kaspazlar tarafından kesildiği (Chaitanya vd., 2010; Gobeil vd., 2001; Mashimo vd., 2021)

dikkate alındığında, elde ettiğimiz sonuçlar bireysel tedavilere kıyasla sisplatin ve BI 831266 kombinasyonunun çoğunlukla p53'den bağımsız bir şekilde apoptosise neden olabileceğini göstermektedir. B hücreli lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2; BCL-2) protein ailesi, endojen kaynaklı apoptosis yolağını düzenleyen ve yapısal formlarına göre üç alt aileye (anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik proteinler ve hücre ölümünü düzenleyen aracı proteinler) ayrılan 20'den fazla üyeden oluşmaktadır. BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinler (BCL-XL, BCL-W, MCL-1 ve A1/BFL-1), dört tandem BCL-2 homoloji (BH) alanına sahiptir ve bu proteinler hücrenin hayatta kalmasını desteklemektedir. BAX başta olmak üzere çeşitli pro-apoptotik efektör proteinler (BAK, BIM, PUMA, BAD ve NOXA) ise, farklı şekillerde oluşan stres durumlarında mitokondriyal dış zar geçirgenliğini arttırmak suretiyle mitokondriden sitokrom C'nin salınması sağlar ve böylece apoptosisi teşvik ederler. Özetle, anti-apoptotik ve pro-apoptotik BCL-2 protein ailesi arasındaki etkileşim, hücrelerin apoptotik durumunu düzenlemektedir (Kale vd., 2018). Farklı dozlarda sisplatin ve/veya BI 831266 tedavisine maruz bırakılan hücrelerdeki anti-apoptotik BCL-2 ekspresyonu incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla sisplatin ile tedavi edilen hücrelerdeki BCL-2 ekspresyonunun kısmen azaldığı, öte yandan, BI 831266 tedavisinin bireysel veya sisplatin kombinasyonunun BCL-2 ekspresyonunu anlamlı ve etkin bir şekilde baskıladığı belirlendi (Şekil 4.11). Benzer şekilde, farklı hücresel şartlar neticesinde aktive olan apoptosis sinyal yolağının önemli bir üyesi olan kaspaz-3'ün aktivasyonunun BI 831266 tedavisinin bireysel veya sisplatin ile kombine bir şekilde uygulandığı hücrelerde arttığı ve dolayısıyla söz konusu hücrelerde prokaspaz-3 protein miktarında önemli bir azalmanın gerçekleştiği ortaya çıkarıldı (Şekil 4.12). Sonuç olarak, Aurora kinaz B inhibisyonunun sisplatin sitotoksitesini arttırdığı ve MCF-7 meme kanseri hücrelerini apoptosise sürüklediği belirlendi.

Hâlihazırda devam eden çeşitli klinik çalışmalar, Aurora kinaz inhibitörlerinin kanser tedavisindeki potansiyelini değerlendirmektedir. Aurora kinazları (Aurora A/B/C), mitoz ve sitokinez süreçlerini düzenledikleri için hücre döngüsü kontrolünde önemli roller oynayan yüksek düzeyde korunmuş serin/treonin kinazlardan oluşan bir protein ailesi oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, Aurora kinaz A ve B'nin her ikisi de kanserle ilişkilendirmiştir. Aurora kinaz A, sentrozom olgunlaşmasını, iki kutuplu iğ ipliği düzenliğini ve kromozom segregasyonunu koordine ederken, Aurora kinaz B ise, kromozom yoğunlaşmasını, spindle kontrol noktasını ve sitokinezi düzenlemektedir.

Aromataz inhibitörleri, östrojen reseptör α (ER)-pozitif meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılmasına rağmen hastalar zamanla bu inhibitörlere karşı direnç kazanmaktadır. Aromataz inhibitörlerine dirençli meme kanseri hücrelerinde potansiyel yeni tedavi hedeflerini belirlemeyi amaçlayan bir araştırmada, parental MCF-7 meme kanseri hücreleri ve aromataz inhibitörleri eksemestan veya letrozole karşı direnç oluşturulmuş dört farklı MCF-7 hücre dizisi, fonksiyonel bir kinaz inhibitörü taraması için kullanılmıştır (Hole vd., 2015). Bu araştırmada, aromataz inhibitörlerine dirençli hücre hatlarının şartlı büyüme inhibisyonu için çok sayıda farklı kimyasal bileşik test edilmiş ve seçilen hedeflerin, hücre büyüme, hücre döngüsü faz dağılım, protein ekspresyon ve subsellüler lokalizasyon analizleriyle teyidi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, Aurora kinaz inhibisyonunun aromataz inhibitör tedavisine dirençli MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olduğu ve söz konusu inhibisyonun aromataz inhibitörlerinin sitotoksitesini arttırabileceğini gösterilmiştir (Hole vd., 2015). Tanaka ve arkadaşlarının 2021 yılında yayımladıkları bir araştırmada ise, Aurora kinaz B inhibisyonunun, BIM ve PUMA-aracılı apoptosisi arttırmak suretiyle akciğer kanseri hücrelerindeki EGFR inhibitör direncini engellediği gösterilmiştir (Tanaka vd., 2021). EGFR-mutant akciğer kanserinde EGFR inhibitörlerinin klinik başarısı, ne yazık ki kazanılmış direncin nihai gelişimi ile kısıtlanmaktadır. Kombinasyon tedavileri vasıtasıyla apoptosisi artırmanın kanser hücrelerini yok edebileceğini ve ilaca toleranslı dirençli klonların ortaya çıkışını azaltabileceğini varsayan Tanaka vd. gerçekleştirdikleri kimyasal bileşik taramasında Aurora B kinaz inhibitörlerinin, EGFR inhibitörü osimertinibin sitotoksitesini arttırdığını ve apoptotik aktivasyonun daha güçlü bir şekilde gerçekleştiğini göstermişlerdir (Tanaka vd., 2021).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Aurora kinaz B'nin mitotik süreçteki önemli işlevleri dikkate alındığında, Aurora kinaz B'nin amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu gibi regülasyonlarının kanser hücrelerine proliferatif bir avantaj sağlayabileceği değerlendirilmektedir. Aurora kinaz B'nin çeşitli tümörlerde aşırı eksprese edildiği ve tümör gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunduğu çok sayıda farklı araştırmada gösterilmiştir. Kronik miyeloid lösemi (KML) ve ALL ile ilişkili bir protein tirozin kinaz olan Bcr-Abl onkoproteininin Akt sinyal yolağı aracılığıyla Aurora kinaz A ve B ifadesini indüklediğini bildirmiştir (Yang vd., 2014). DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon mekanizmasıyla onarılması dahil olmak üzere çok sayıda hücresel sinyal yolağında rol oynadığı tahmin edilen BRCA1 ve/veya BRCA2 proteinlerinin inaktivasyonu, tümör gelişimini indüklemektedir. Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada, BRCA1/2 ve Aurora kinaz B arasında, tümör hücrelerinin tetraploidisini ve tümör proliferasyonunu karşılıklı olarak kontrol ettikleri bir etkileşim olduğu gösterilmiştir (Y. Wang, Wang, vd., 2014). Öyle ki, Aurora kinaz B işlevsizliğinin hücre proliferasyonunda ve sitokinezde bir azalmaya yol açtığı, buna karşılık BRCA1/BRCA2 işlevsizliğinin ise anormal sitokinez ile sonuçlandığı ve sonuç olarak tümörün ilerlemesini teşvik ettiği bildirilmiştir (Y. Wang, Wang, vd., 2014). Aurora kinazların düzensiz ifadesi ile neoplastik transformasyon arasında ilişki, Aurora kinazların giderek daha fazla potansiyel bir ilaç hedefi olarak görülmesini sağlamıştır. Aurora kinazlar, birkaç prelinik hücre hattında ve hayvan modellerinde başarılı bir şekilde inhibe edilmiştir. Bu amaçla, Aurora kinazları hedef alan çeşitli inhibitörler geliştirilmiştir ve bu küçük molekül inhibitörler klinik deneylerin farklı aşamalarında test edilmektedir. Aurora kinaz B'yi hedef alma olasılığı son birkaç yılda ivme kazanmıştır. Hesperadin ve Barasertib ATP-kompetitif Aurora kinaz B inhibitörleridir. Aurora kinaz A göre Aurora kinaz B için 1000 kat daha fazla seçicilik gösteren Barasertib, yıllar boyunca çeşitli tümörlerde kapsamlı bir şekilde test edilmiştir ve dolayısıyla Aurora kinaz B inhibisyonu için önde gelen bir terapötik molekül olarak tanımlanmaktadır. SP-96, GSK1070916, Danusertib, AT9283, AMG900 ve CYC116 başta olmak üzere çok sayıda farklı Aurora kinaz inhibitörü geliştirilmiştir (Borah ve Reddy, 2021). Tedaviye bağlı ilaç direnci ve sonuç olarak ortaya çıkan tümör progresyonu, çeşitli kanserlerde kötü prognoz ana nedenlerinden biridir.

Dirençli tümörler, genellikle belirli onkogenlerde veya tümör baskılayıcılarda mutasyonlar geliştirmekte veya belirli genler anormal derecede yüksek seviyelerde ifade edilmektedir. Aurora kinaz B ekspresyonu, vemurafenib'e dirençli melanom, temozolomide dirençli glioblastoma ve epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz inhibitörüne dirençli NSCLC dahil olmak üzere farklı malignitelerde tedaviyle ilişkili ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir (Borah ve Reddy, 2021). Sonuç olarak, BI 831266 molekülü aracılığıyla Aurora kinaz B inhibisyonunun klinikte yaygın bir şekilde kullanılan kemoterapi ajanı sisplatin ile kombinasyonunun test edildiği tez çalışmamızda elde edilen bulgular, BI 831266 molekülünün sisplatinin sitotoksik kapasitesini arttırabileceğini gösterdi. Gelecekte farklı hücre hatlarıyla yapılacak prelinik çalışmalar ve deney hayvanlarıyla gerçekleştirilecek in vivo araştırmalarla BI 831266 ve sisplatin arasındaki sinerjik ilişkinin teyit edilmesi, klinikteki hastalara daha başarılı tedavi imkânlarının sunulmasını sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

Adams, J. M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01740-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01740-0)

Ahmed, A., Shamsi, A., Mohammad, T., Hasan, G. M., Islam, A., and Hassan, M. I. (2021). Aurora B kinase: a potential drug target for cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(8), 2187–2198. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03669-5>

Akaike, Y., and Chibazakura, T. (2020). Aberrant activation of cyclin A-CDK induces G2/M-phase checkpoint in human cells. *Cell Cycle*, 19(1), 84–96.

Alam, F., Mohammadin, K., Shafique, Z., Amjad, S. T., and Asad, M. H. H. bin. (2022). Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: A review. *Phytotherapy Research*, 36(4), 1417–1441.

Alberts B, Johnson A, L. J. (2023). *DNA Repair DNA Sequences*. 1–7.

Alderden, R. A., Hall, M. D., and Hambley, T. W. (2006). The discovery and development of cisplatin. *Journal of chemical education*, 83(5), 728.

Alemi, F., Raei Sadigh, A., Malakoti, F., Elhaei, Y., Ghaffari, S. H., Maleki, D., ... and Majidinia, M. (2022). Molecular mechanisms involved in DNA repair in human cancers: An overview of PI3k/Akt signaling and PIKKs crosstalk. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 313–328.

Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., and Chichiarelli, S. (2008). DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and redox signaling*, 10(5), 891–938.

Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, 3(1), 51–62. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00235-0)

Andrews, P. D. (2005). Aurora kinases: Shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene*, 24(32), 5005–5015. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208752>

Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., and Bray, F. (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e191–e203.

Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 19(3–4), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.04.001>
Bahassi, M. (2007). The Cell Cycle and Cancer. *Medical Cell Biology: Third Edition*,

226(2), 273–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370458-0.50014-1>

Bates, M., Furlong, F., Gallagher, M. F., Spillane, C. D., McCann, A., O'Toole, S., and O'Leary, J. J. (2020). Too MAD or not MAD enough: The duplicitous role of the spindle assembly checkpoint protein MAD2 in cancer. *Cancer Letters*, 469(October 2019), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.005>

Bavetsias, V., and Linardopoulos, S. (2015). Aurora kinase inhibitors: Current status and outlook. *Frontiers in Oncology*, 5(DEC), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00278>

Baylin, S. B., and Jones, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9), a019505.

Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Molecular Cell*, 12(4), 851–862. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00392-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00392-7)

Bejar, J. F., DiSanza, Z., and Quartuccio, S. M. (2021). The oncogenic role of meiosis-specific Aurora kinase C in mitotic cells. *Experimental Cell Research*, 407(2), 2021–2022. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112803>

Bettoun, A., Joffre, C., Zago, G., Surdez, D., Vallerand, D., Gundogdu, R., ... and Meunier, B. (2016). Mitochondrial clearance by the STK38 kinase supports oncogenic Ras-induced cell transformation. *Oncotarget*, 7(28), 44142.

Bolanos-Garcia, V. M. (2005). Aurora kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(8), 1572–1577. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.021>

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85(6), 803–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81265-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81265-9)

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

Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K., and Winn, R. A. (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 92, 51998. <https://doi.org/10.3791/51998>

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

Carmena, M., and Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(11), 842–854. <https://doi.org/10.1038/nrm1245>

Cecchini, M. J., Amiri, M., and Dick, F. A. (2012). Analysis of cell cycle position in mammalian cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 59, e3491.

Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J.,

and Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 43–58. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>

Chaitanya, G. V., Alexander, J. S., and Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>

Chambliss, A. B., and Chan, D. W. (2016). Precision medicine: from pharmacogenomics to pharmacoproteomics. *Clinical proteomics*, 13, 1–9.

Chaplin, A. K., Hardwick, S. W., Stavridi, A. K., Buehl, C. J., Goff, N. J., Ropars, V., ... and Meek, K. (2021). Cryo-EM of NHEJ supercomplexes provides insights into DNA repair. *Molecular cell*, 81(16), 3400–3409.

Chatterjee, N., and Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(5), 235–263.

Chen, G. G., and Lai, P. B. S. (2009). *Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy*. Springer.

Chen, J., Jin, S., Tahir, S. K., Zhang, H., Liu, X., Sarthy, A. V, ... and , Rosenberg, S. (2003). Survivin Enhances Aurora-B Kinase Activity and Localizes Aurora-B in Human Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 486–490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211119200>

Chen, Y.-W., Chen, Y.-F., Chen, Y.-T., Chiu, W.-T., and Shen, M.-R. (2016). The STIM1-Orai1 pathway of store-operated Ca²⁺ entry controls the checkpoint in cell cycle G1/S transition. *Scientific reports*, 6(1), 1–13.

Cleeland, C. S., Bennett, G. J., Dantzer, R., Dougherty, P. M., Dunn, A. J., Meyers, C. A., ... and Wang, X. S. (2003). Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? A cytokine-immunologic model of cancer symptoms. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(11), 2919–2925.

Conde, M., Michen, S., Wiedemuth, R., Klink, B., Schröck, E., Schackert, G., and Temme, A. (2017). Chromosomal instability induced by increased BIRC5/Survivin levels affects tumorigenicity of glioma cells. *BMC Cancer*, 17(1), 1–63. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3932-y>

Cordon-Cardo, C. (2023). *Mutations of cell cycle regulators . Biological and clinical implications for human*. 1–11.

Costa, B., Amorim, I., Gärtner, F., and Vale, N. (2020). Understanding breast cancer: From conventional therapies to repurposed drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151, 105401.

Crane, R., Gadea, B., Littlepage, L., Wu, H., and Ruderman, J. V. (2023). *Biology of the*

Cell Aurora A , Meiosis and Mitosis. 96(3), 1–7.

Cuddihy, A. R., and O’Connell, M. J. (2003). Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *International review of cytology*, 222, 99–140.

Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 801–817.

Dabravolski, S. A., Khotina, V. A., Sukhorukov, V. N., Kalmykov, V. A., Mikhaleva, L. M., and Orekhov, A. N. (2022). The role of mitochondrial DNA mutations in cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 952.

Dalton, S. (2015). Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends in cell biology*, 25(10), 592–600.

Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)

Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

Depeursinge, A., Racoceanu, D., Iavindrasana, J., Cohen, G., Platon, A., Poletti, P.-A., and Muller, H. (2010). Fusing Visual and Clinical Information for Lung Tissue Classification in HRCT Data. *Artificial Intelligence in Medicine*, 15, ARTMED1118. <https://doi.org/10.1016/j>

Díaz, A., González, M. L., Pérez, R. J., David, A., Mukherjee, A., Báez, A., ... and Colón, J. L. (2013). Direct intercalation of cisplatin into zirconium phosphate nanoplatelets for potential cancer nanotherapy. *Nanoscale*, 5(23), 11456–11463.

Ding, L., Cao, J., Lin, W., Ao, H., Yu, M., Lin, J., and Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1960.

Dong, H., Shi, Q., Song, X., Xia, X., Song, E., and Song, Y. (2015). Polychlorinated biphenyl quinone induces oxidative DNA damage and repair responses: The activations of NHEJ, BER and NER via ATM-p53 signaling axis. *Toxicology and applied pharmacology*, 286(1), 10–16.

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

Eberle, K. E., Sansing, H. A., Szaniszló, P., Resto, V. A., and Berrier, A. L. (2011). Carcinoma matrix controls resistance to cisplatin through talin regulation of NF-κB. *PLoS One*, 6(6), e21496.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic*

Pathology, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Erdogan, M. K., AĞCA, C. A., and AŞKIN, H. (2019). İnsan kolorektal kanser hücrelerinde Pistacia eurycarpa ekstraktlarıyla kombine 5-florourasilin artırılmış antiproliferatif ve apoptotik etkileri. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 12(1), 27–38.

Eyers, P. A., and Maller, J. L. (2003). Regulating the regulators: Aurora A activation and mitosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(4), 286–288. <https://doi.org/10.4161/cc.2.4.444>

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., and Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>

Fell, V. L., Walden, E. A., Hoffer, S. M., Rogers, S. R., Aitken, A. S., Salemi, L. M., and Schild-Poulter, C. (2016). Ku70 Serine 155 mediates Aurora B inhibition and activation of the DNA damage response. *Scientific Reports*, 6, 1–27. <https://doi.org/10.1038/srep37194>

Ferro, V., Hammond, E., and Fairweather, J. (2012). The Development of Inhibitors of Heparanase, a Key Enzyme Involved in Tumour Metastasis, Angiogenesis and Inflammation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(6), 693–702. <https://doi.org/10.2174/1389557043403729>

Fisher, R. P. (2016). Getting to S: CDK functions and targets on the path to cell-cycle commitment. *F1000Research*, 5.

Fontana, G. A., Hess, D., Falquet, B., Klein, D., Shore, D., Thomä, N. H., and Rass, U. (2019). Rif1 S-acylation mediates DNA double-strand break repair at the inner nuclear membrane. *Nature communications*, 10(1), 2535.

Formigli, L., N., Tempestini, A., Orlandini, G. E., Capaccioli, S., and Zecchi Orlandini, S. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of cellular physiology*, 182(1), 41–49.

Fouad, A. A., Qutub, H. O., Fouad, A. E. A., Audeh, A. M., and Al-Melhim, W. N. (2017). Epigallocatechin-3-gallate counters cisplatin toxicity of rat testes. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1710–1714.

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

Fu, D., Calvo, J. A., and Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 104–120.

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

Fujii, S., Sobol, R. W., and Fuchs, R. P. (2022). Double-strand breaks: When DNA repair events accidentally meet. *DNA repair*, 103303.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–1883.

Garcia-Flores, A. E., Sollome, J. J., Thavathiru, E., Bower, J. L., and Vaillancourt, R. R. (2019). HER2/HER3 regulates lactate secretion and expression of lactate receptor mRNA through the MAP3K4 associated protein GIT1. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46954-7>

Gentilin, E., Simoni, E., Candito, M., Cazzador, D., and Astolfi, L. (2019). Cisplatin-induced ototoxicity: updates on molecular targets. *Trends in molecular medicine*, 25(12), 1123–1132.

Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, 31003078. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>

Gobeil, S., Boucher, C. C., Nadeau, D., and Poirier, G. G. (2001). Characterization of the necrotic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1): Implication of lysosomal proteases. *Cell Death and Differentiation*, 8(6), 588–594. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400851>

Goldenson, B., and Crispino, J. D. (2015). The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*, 34(5), 537–545. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.14>

Gollner, A., Heine, C., and Hofbauer, K. S. (2023). Kinase Degraders, Activators, and Inhibitors: Highlights and Synthesis Routes to the Chemical Probes on opnMe.com, Part 1. *ChemMedChem*, 202300031. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202300031>

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

Gooding, J. J. (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14(17), 1149–1156.

Gorbsky, G. J. (2004). Mitosis: MCAK under the Aura of Aurora B. *Current Biology*, 14(9), 15120087. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.022>

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

Gully, C. P., Velazquez-torres, G., and Shin, J. (2023). *Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53*. 1–7.

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

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

Gundogdu, R., Hergovich, A., and Gomez, V. (2021). Cell cycle control and DNA damage signalling in mammals. İçinde I. Kovalchuk and O. Kovalchuk (Ed.), *Genome Stability* (2. baskı, ss. 237–255). Academic Press Inc.

Gupta, S., Silveira, D. A., and Mombach, J. C. M. (2018). Modeling the role of microRNA-449a in the regulation of the G2/M cell cycle checkpoint in prostate LNCaP cells under ionizing radiation. *PloS one*, 13(7), e0200768.

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

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

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646–674.

Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., and Okumura, E. (2023). *Greatwall kinaz ve siklin B-Cdk1 ' in her ikisi de M fazı destekleyici faktörün kritik bileşenleridir . Soyut Drosophila*.

He, J., Qi, Z., Zhang, X., Yang, Y., Liu, F., Zhao, G., and Wang, Z. (2019). Aurora kinase B inhibitor barasertib (AZD1152) inhibits glucose metabolism in gastric cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 30(1), 19–26. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000684>

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

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

Hole, S., Pedersen, A. M., Lykkesfeldt, A. E., and Yde, C. W. (2015). Aurora kinase A and B as new treatment targets in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 149(3), 715–726. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3284-8>

Hsiehchen, D., Hsieh, A., Samstein, R. M., Lu, T., Morris, L. G. T., and Zhu, H. (2020). DNA repair gene mutations as predictors of immune checkpoint inhibitor response beyond tumor mutation burden. *Cell Reports Medicine*, 1(3), 100034.

Hustedt, N., and Durocher, D. (2017). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature cell biology*, 19(1), 1–9.

Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277–288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>

- Ishiyama, M; Tominaga, H; Shiga, M; Sasamoto, K; Ohkura, Y; Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1518–1520.
- Iyama, T., and Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620–636.
- Jeggo, P. A., Pearl, L. H., and Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 35–42.
- Jiang, Y., Ji, F., Liu, Y., He, M., Jin, Q., Ye, X., and Chen, T. (2017). Cisplatin-induced autophagy protects breast cancer cells from apoptosis by regulating yes-associated protein. *Oncology Reports*, 38(6), 3668–3676. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6035>
- Jin, B., and Robertson, K. D. (2012). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Epigenetic alterations in oncogenesis*, 3–29.
- Jones, G. G., Del Río, I. B., Sari, S., Sekerim, A., Hynds, R. E., and Lei, W. (2019). SHOC2 phosphatase-dependent RAF dimerization mediates resistance to MEK inhibition in RAS-mutant cancers. *Nature communications*, 10(1), 2532.
- Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., and Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell adhesion and migration*, 8(5), 440–451.
- Kale, J., Osterlund, E. J., and Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Kannan, N., Kang, I., Kong, X., Tang, J., Perry, J. K., Mohankumar, ... and Lobie, P. E. (2010). Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. *Neoplasia*, 12(12), 1041–1053. <https://doi.org/10.1593/neo.10916>
- Kay, J., Thadhani, E., Samson, L., and Engelward, B. (2019). Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA repair*, 83, 102673.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239–257.
- Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 27(3), 247–254.
- Kim, K. H., and Sederstrom, J. M. (2015). Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Current protocols in molecular biology*, 111(1), 26–28.
- Kimura, M., and Okano, Y. (2005). Aurora kinases and cancer. *Gan to kagaku ryoho. Cancer and chemotherapy*, 32(1), 1–5.

- Kirkova, J., Davis, M. P., N., LeGrand, S. B., Lagman, R. L., and Russell, K. M. (2006). Cancer symptom assessment instruments: a systematic review. *Journal of Clinical Oncology*, 24(9), 1459–1473.
- Kitzen, J. J. E. M., Jonge, M. J. A. De, and Verweij, J. (2010). *Aurora kinase inhibitors*. 73(March 2009), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.03.009>
- Kollareddy, M., Dzubak, P., Zheleva, D., and Hajduch, M. (2008). Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 152(1), 27–33. <https://doi.org/10.5507/bp.2008.004>
- Kormi, S. M. A., Ardehkhani, S., Azizi, A., Martins, L. S., Pordel, A., and Nezhad, M. B. N. B. (2016). Molecular Genetics in Breast Cancer: Signaling Pathways and Tumor Biology. *Cancer Press Journal*, 2(4), 67–70.
- Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R. G., Wilkinson, C. J., and Erich, A. (2023). *Centrosome ile ilişkili Chk1 , siklin-B – Cdk1 kinazın erken aktivasyonunu önler*. 1–10.
- Kulaberoglu, Y., Gundogdu, R., and Hergovich, A. (2016). The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair. *Çinde Genome Stability* (ss. 243–253). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803309-8.00015-X>
- Kulaberoglu, Y., and Hergovich, A. (2023). *Chapter 15 - The role of p53 / p21 / p16 in DNA damage signaling and DNA repair*. 26, 1–2.
- Kulaberoglu, Y., Hergovich, A., and Gómez, V. (2021). The role of p53/p21/p16 in DNA damage signaling and DNA repair. *Çinde Genome Stability* (ss. 257–274). Elsevier.
- Kumar, N., Raja, S., and Van Houten, B. (2020). The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage. *Nucleic acids research*, 48(20), 11227–11243.
- Kuper, J., and Kisker, C. (2013). DNA Helicases in NER, BER, and MMR. *DNA Helicases and DNA Motor Proteins*, 203–224.
- Lea, N. C., Orr, S. J., Stoeber, K., Ibrahim, M. A. A., Mufti, G. J., and Thomas, N. S. B. (2003). Commitment point during G0→ G1 that controls entry into the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2351–2361.
- Lee, T.-H., and Kang, T.-H. (2019). DNA oxidation and excision repair pathways. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6092.
- Lens, S. M. A., and Medema, R. H. (2003). The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(6), 507–510. <https://doi.org/10.4161/cc.2.6.559>

- Li, J., Hong, M. J., Chow, J. P. H., Man, W. Y., and Poon, R. Y. C. (2015). Co-inhibition of polo-like kinase 1 and aurora kinases promotes mitotic catastrophe. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3313>
- Li, Z., Ji, X., Wang, D., Liu, J., and Zhang, X. (2016). Autophagic flux is highly active in early mitosis and differentially regulated throughout the cell cycle. *Oncotarget*, 7(26), 39705.
- Liang, X., Wang, D., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., and Li, J. (2012). Expression of Aurora Kinase A and B in chondrosarcoma and its relationship with the prognosis. *Diagnostic Pathology*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-84>
- Libertini, S., Abagnale, A., Passaro, C., Botta, G., and Portella, G. (2010). Aurora A and B Kinases - Targets of Novel Anticancer Drugs. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 5(3), 219–241. <https://doi.org/10.2174/157489210791760517>
- Liu, L., Cai, S., Han, C., Banerjee, A., Wu, D., Zhang, X., and McLaughlin, E. (2020). ALDH1A1 Contributes to PARP Inhibitor Resistance via Enhancing DNA Repair in BRCA2–/– Ovarian Cancer CellsALDH1A1 Increases PARPi Resistance by Enhancing DNA Repair. *Molecular cancer therapeutics*, 19(1), 199–210.
- Liu, Z., Wang, L., and Zhong, D. (2015). Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(18), 11933–11949.
- Ma, H. T., and Poon, R. Y. C. (2020). Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen Aurora kinases and DNA damage response. *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen*, 821(July), 111716. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111716>
- Ma, Y., Cao, H., Lou, S., Shao, X., Lv, W., Qi, X., ... and Yang, X. (2015). Sequential treatment with aurora B inhibitors enhances cisplatin-mediated apoptosis via c-Myc. *Journal of Molecular Medicine*, 93(4), 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1228-0>
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), 630–641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2007). Cell cycle kinases in cancer. *Current opinion in genetics and development*, 17(1), 60–65.
- Marchini, S., Ciro', M., and Broggin, M. (1999). p53-Independent caspase-mediated apoptosis in human leukaemic cells is induced by a DNA minor groove binder with antineoplastic activity. *Apoptosis*, 4(1), 39–45. <https://doi.org/10.1023/A:1009630132087>
- Mariani, L., Chiroli, E., Nezi, L., Muller, H., Piatti, S., Musacchio, A., and Ciliberto, A. (2012). Role of the Mad2 dimerization interface in the spindle assembly checkpoint independent of kinetochores. *Current Biology*, 22(20), 1900–1908. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.028>
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., and Kroemer, G. (2014). Self-

consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>

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

Matthews, H. K., Bertoli, C., and de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74–88.

Mazia, D. (1974). The cell cycle. *Scientific American*, 230(1), 54–68.

McNamee, L. M., and Brodsky, M. H. (2009). P53-independent apoptosis limits DNA damage-induced aneuploidy. *Genetics*, 182(2), 423–435. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.102327>

Mendoza, P. R., and Grossniklaus, H. E. (2015). The Biology of Retinoblastoma. İçinde *Molecular Biology of Eye Disease* (1. baskı, C. 134). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.012>

Meyer, F., Becker, S., Classen, S., Parplys, A. C., Mansour, W. Y., Riepen, B., ... and Wikman, H. (2020). Prevention of DNA replication stress by CHK1 leads to chemoresistance despite a DNA repair defect in homologous recombination in breast cancer. *Cells*, 9(1), 238.

Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6), 871–882.

O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 60(4), 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040>

Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93–115.

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

Patel, S. G., and Ahnen, D. J. (2018). Colorectal cancer in the young. *Current gastroenterology reports*, 20, 1–12.

Patterson-Fortin, J., Bose, A., Tsai, W.-C., Grochala, C., Nguyen, H., Zhou, J., ... and McQueen, K. (2022). Targeting DNA repair with combined inhibition of NHEJ and MMEJ induces synthetic lethality in TP53-mutant cancers. *Cancer Research*, 82(20), 3815–3829.

Peris-Díaz, M. D., Krężel, A., and Barran, P. (2022). Deciphering the antioxidative role of p53 against H2O2-induced DNA damage using ion mobility mass spectrometry.

Pilié, P. G., Tang, C., Mills, G. B., and Yap, T. A. (2019). State-of-the-art strategies for

targeting the DNA damage response in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 16(2), 81–104.

Polacchini, A., Albani, C., Baj, G., Colliva, A., Carpinelli, P., and Tongiorgi, E. (2016). Combined cisplatin and aurora inhibitor treatment increase neuroblastoma cell death but surviving cells overproduce BDNF. *Biology Open*, 5(7), 899–907. <https://doi.org/10.1242/bio.016725>

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

Quartuccio, S. M., and Schindler, K. (2015). Functions of Aurora kinase C in meiosis and cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(AUG), 26347867. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00050>

Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H. M., and Cortes, J. E. (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control*, 16(2), 122–131.

Rangel, L. (2013). *Cancer treatment: Conventional and innovative approaches*. BoD–Books on Demand.

Rashid, S., Nafees, S., Siddiqi, A., Vafa, A., Afzal, S. M., Parveen, R., ... and Shahid, A. (2017). Partial protection by 18 β Glycrrheticinic acid against

Cisplatin induced oxidative intestinal damage in wistar rats: Possible role of NFkB and caspases. *Pharmacological Reports*, 69, 1007–1013.

Relling, M. V, and Evans, W. E. (2015). Pharmacogenomics in the clinic. *Nature*, 526(7573), 343–350.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*, 414(6859), 105–111.

Richie, C. T., and Golden, A. (2005). Chromosome segregation: Aurora B gets Tousled. *Current Biology*, 15(10), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.009>

Ricke, R. M., ve Van Deursen, J. M. (2011). Aurora B hyperactivation by Bub1 overexpression promotes chromosome missegregation. *Cell Cycle*, 10(21), 3645–3651. <https://doi.org/10.4161/cc.10.21.18156>

Riedl, S. J., ve Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 405–413. <https://doi.org/10.1038/nrm2153>

Rodriguez, L. G., Wu, X., ve Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>

Rybak, L. P., Mukherjea, D., ve Ramkumar, V. (2019). Mechanisms of cisplatin-induced

ototoxicity and prevention. *Seminars in hearing*, 40(02), 197–204.

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

Sasai, K., Treekitkarnmongkol, W., Kai, K., Katayama, H., ve Sen, S. (2016). Functional significance of Aurora kinases-p53 protein family interactions in cancer. *Frontiers in Oncology*, 6(NOV), 1–2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00247>

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

Semlow, D. R., and Walter, J. C. (2021). Mechanisms of vertebrate DNA interstrand cross-link repair. *Annual review of biochemistry*, 90, 107–135.

Shafirovich, V., and Geacintov, N. E. (2017). Removal of oxidatively generated DNA damage by overlapping repair pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 53–61.

Sherr, C. J., and Bartek, J. (2017). *Cell Cycle – Targeted Cancer Therapies*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-040716-075628>

Speidel, D. (2010). Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology*, 20(1), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.10.002>

Speidel, D. (2015). The role of DNA damage responses in p53 biology. *Archives of Toxicology*, 89(4), 501–517. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1459-z>

Stover, E. H., Fuh, K., Konstantinopoulos, P. A., Matulonis, U. A., and Liu, J. F. (2020). Clinical assays for assessment of homologous recombination DNA repair deficiency. *Gynecologic oncology*, 159(3), 887–898.

Sun, P., Wu, H., Huang, J., Xu, Y., Yang, F., Zhang, Q., and Xu, X. (2018). Porcine epidemic diarrhea virus through p53-dependent pathway causes cell cycle arrest in the G0/G1 phase. *Virus research*, 253, 1–11.

Sun, Y., Li, Y. X., Wu, H. J., Wu, S. H., Wang, Y. A., Luo, D. Z., and Liao, D. J. (2011). Effects of an indolocarbazole-derived CDK4 inhibitor on breast cancer cells. *Journal of Cancer*, 2(1), 36–51. <https://doi.org/10.7150/jca.2.36>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2023). *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. 1–8.

Tait, S. W. G., and Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 621–632. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>

Tanaka, K., Yu, H. A., Yang, S., Ramani, S., Ganesan, Y. T., Hsieh, J. J., ... and Cheng, E. H. (2021). Targeting Aurora B kinase prevents and overcomes resistance to EGFR inhibitors in lung cancer by enhancing BIM- and PUMA-mediated apoptosis. *Cancer Cell*, 39(9), 1245–1261.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.07.006>

Tang, J., Tang, F., and Zhao, L. (2022). Facile preparation of model DNA interstrand cross-link repair intermediates using ribonucleotide-containing DNA. *DNA repair*, 111, 103286.

Todorov, I. T., Philipova, P. N., Zhelev, N. Z., and Hadjiolov, A. A. (1988). Changes in a nuclear matrix antigen during the cell cycle: interphase and mitotic cells. *Biology of the Cell*, 62(2), 105–110.

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

Ullah, A., Prottoy, N. I., Araf, Y., Hossain, S., Sarkar, B., and Saha, A. (2019). Molecular docking and pharmacological property analysis of phytochemicals from *Clitoria ternatea* as potent inhibitors of cell cycle checkpoint proteins in the cyclin/CDK pathway in cancer cells. *Computational Molecular Bioscience*, 9(03), 81.

Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., Ikitimur, E., and Yilmaz, Y. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(3), 261–269.

Vas, A. C. J., and Clarke, D. J. (2008). Aurora B kinases restrict chromosome decondensation to telophase of mitosis. *Cell Cycle*, 7(3), 293–296. <https://doi.org/10.4161/cc.7.3.5381>

Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., ... and Friedmann, Y. (2002). Mammalian heparanase: Involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Seminars in Cancer Biology*, 12(2), 121–129. <https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0420>

Wake, D. T., Ilbawi, N., Dunnenberger, H. M., and Hulick, P. J. (2019). Pharmacogenomics: prescribing precisely. *Medical Clinics*, 103(6), 977–990.

Wang, X., Decker, C. C., Zechner, L., Krstin, S., and Wink, M. (2019). In vitro wound healing of tumor cells: Inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0284-4>

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes and development*, 14(8), 927–939.

- Wang, Y., Sun, H., Wang, Z., Liu, M., Qi, Z., Meng, J., ... and Yang, G. (2014). Aurora-A: A potential DNA repair modulator. *Tumor Biology*, 35(4), 2831–2836. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1393-8>
- Wang, Y., Wang, Z., Qi, Z., Yin, S., Zang, R., Zhang, Z., and Yang, G. (2014). The negative interplay between Aurora A/B and BRCA1/2 controls cancer cell growth and tumorigenesis via distinct regulation of cell cycle progression, cytokinesis, and tetraploidy. *Molecular Cancer*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-94>
- Wei, X., Peng, Y., Bryan, C., and Yang, K. (2021). Mechanisms of DNA– protein cross-link formation and repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1869(8), 140669.
- Weinberg, R. A. (1995). *The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control*. 81, 323–330.
- Weinberg, R. A. (2007). *The Biology of Cancer*. New York, USA: Garland Science. Taylor and Francis Group, LLC.
- Wenzel, E. S., and Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer. *In Vivo*, 32(1), 1–5.
- Witzmann, F. A., and Grant, R. A. (2003). Pharmacoproteomics in drug development. *The pharmacogenomics journal*, 3(2), 69–76.
- Wu, Y., Zhu, Y., Li, S., Zeng, M., Chu, J., Hu, P., ... and Huang, G. (2017). Terrein performs antitumor functions on esophageal cancer cells by inhibiting cell proliferation and synergistic interaction with cisplatin. *Oncology letters*, 13(4), 2805–2810.
- Xie, M., Vesuna, F., Botlagunta, M., Bol, G. M., Irving, A., Winnard, P. T., ... and Raman, V. (2015). NZ51, a ring-expanded nucleoside analog, inhibits motility and viability of breast cancer cells by targeting the RNA helicase DDX3. *Oncotarget*, 6(30), 29901–29913. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4898>
- Xie, Y., Filchakova, O., Yang, Q., Yesbolatov, Y., Tursynkhan, D., Kassymbek, A., ... and Fan, H. (2017). Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Carbon Dots Derived from Date Pits at Low-Dose. *ChemistrySelect*, 2(14), 4079–4083. <https://doi.org/10.1002/slct.201700575>
- Yan, M., Wang, C., He, B., Yang, M., Tong, M., Long, Z., ... and Liu, Q. (2016). Aurora-A Kinase: A Potent Oncogene and Target for Cancer Therapy. *Medicinal Research Reviews*, 36(6), 1036–1079. <https://doi.org/10.1002/med.21399>
- Yang, J., Ikezoe, T., Nishioka, C., Udaka, K., and Yokoyama, A. (2014). Bcr-Abl activates AURKA and AURKB in chronic myeloid leukemia cells via AKT signaling. *International Journal of Cancer*, 134(5), 1183–1194. <https://doi.org/10.1002/ijc.28434>
- Yano, S., Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T., and Hoffman, R. M. (2020). FUCCI real-time cell-cycle imaging as a guide for designing improved cancer therapy: A review of innovative strategies to target quiescent chemo-resistant cancer cells. *Cancers*, 12(9), 2655.

Yap, K. M., Sekar, M., Wu, Y. S., Gan, S. H., Rani, N. N. I. M., Seow, L. J., ... and Lum, P. T. (2021). Hesperidin and its aglycone hesperetin in breast cancer therapy: A review of recent developments and future prospects. *Saudi journal of biological sciences*, 28(12), 6730–6747.

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

Yin, H., Qu, J., Peng, Q., and Gan, R. (2019). Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Medical microbiology and immunology*, 208, 573–583.

Yu, H. (2002). *Regulation of APC – Cdc20 by the spindle checkpoint Hongtao Yu*. 706–714.

Yuan, C.-X., Zhou, Z.-W., Yang, Y.-X., He, Z.-X., Zhang, X., Wang, D., ... and Zhou, S.-F. (2015). Danusertib, a potent pan-Aurora kinase and ABL kinase inhibitor, induces cell cycle arrest and programmed cell death and inhibits epithelial to mesenchymal transition involving the PI3K/Akt/mTOR-mediated signaling pathway in human gastric cancer AGS and N. *Drug design, development and therapy*, 9, 1293.

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

Zhang, X. (2008). Aurora kinases. *Current Biology*, 18(4), 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.004>

Zhao, R. Y., ve Elder, R. T. (2005). Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell research*, 15(3), 143–149.

Zhao, Y., Simon, M., Seluanov, A., ve Gorbunova, V. (2023). DNA damage and repair in age-related inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 23(2), 75–89.

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

Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., and Li, C. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International journal of cancer*, 143(4), 921–930.

Zhou, X., Jiang, W., Liu, Z., Liu, S., and Liang, X. (2017). Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110316>

Zich, J., Sochaj, A. M., Syred, H. M., Milne, L., Cook, A. G., Ohkura, H., ... and Yang, K. G. (2012). Report Kinase Activity of Fission Yeast Mph1 Is Required for Mad2 and Mad3

to Stably Bind the Anaphase Promoting Complex. *Current Biology*, 22(4), 296–301.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.049>