

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ASTAKSANTİN KAROTENODİNİN SIKLI BAĞIMLI KİNAZ 7 (CDK7)
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceren Elif YETİM

EKİM 2024

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ASTAKSANTİN KAROTENOİDİNİN SIKLIĞI BAĞIMLI KİNAZ 7 (CDK7)
ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ceren Elif YETİM

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19 / 09 / 2024

Tezin Savunma Tarihi : 25 / 10 / 2024

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Uğur UZUNER

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“Astaksantin Karotenoidinin Siklin Bağımlı Kinaz 7 (CDK7) Üzerindeki İnhibisyon Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezi Astaksantinın meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin yanı sıra hücre döngüsü üzerindeki rolünü de ortaya koyan bilgiler içermektedir. İlgili çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası FYL-2023-10973)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimime başladığım günden beri birlikte çalıştığım danışman hocam Sayın Doç. Dr Uğur UZUNER’e desteği, deneyimi ve engin bilgisiyle akademik yaşantıma ve eğitim hayatıma kattığı her biri birbirinden kıymetli bilgiler için teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarımı Memeli Hücre Kültürü Laboratuvarı’nda gerçekleştirmem için bana olanak sağlayan hocam Sayın Doç. Dr. Selcen ÇELİK UZUNER’e tez çalışmalarım boyunca bilgisini, tecrübesini ve gerektiğinde sarf malzemesini dahi esirgemediği için teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvarda beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, desteğe ihtiyacım olan her anda yanımda olan başta Sinan TETİKOĞLU olmak üzere tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teker teker teşekkür ederim.

Beni elimden tutup anaokuluna götürdükleri ilk eğitim gününden beri destekleyen, maddi ve manevi her desteği sunan ve yalnız olmadığımı hissettiren sevgili Annem’e, Babam’a ve kardeşime ve tüm zorlu zamanlarımda desteğini hissettiğim, her kararında yanımda olan yol arkadaşım Mert’e beni ben yaptıkları için sonsuz teşekkürü ve minneti borç bilirim.

Ceren Elif YETİM

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans Tezi olarak sunduğum “Astaksantin Karotenoidinin Siklin Bağımlı Kinaz 7 (CDK7) Üzerindeki İnhibisyon Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr Uğur UZUNER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 25/10/2024

Ceren Elif YETİM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Meme Kanseri	1
1.2.1. Meme Kanseri Türleri.....	2
1.2.2. Meme Kanserinin Genetik Temeli	3
1.3. Siklin Bağımlı Kinazlar.....	4
1.4. Siklin Bağımlı Kinazların Hücre Döngüsündeki Rolü.....	4
1.4.1. Hücre Döngüsü	4
1.4.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	5
1.4.3. Hücre Döngüsünün Siklin Bağımlı Kinazlar Tarafından Düzenlenmesi.....	7
1.5. Transkripsiyonel Siklin Bağımlı Kinazlar.....	8
1.6. Siklin Bağımlı Kinaz 7	9
1.6.1. CDK7'nin Hücre Döngüsündeki Rolü.....	10
1.6.2. CDK7'nin Transkripsiyondaki Rolü.....	10
1.7. Kanserde Siklin Bağımlı Kinazlar.....	12
1.8. Karotenoidler.....	14
1.8.1. Astaksantin.....	14
Çalışmanın Amacı.....	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	18
2.1. Moleküler Docking Çalışmaları	18
2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	18
2.2.1. Hücrelerin Dondurulması.....	20

2.2.2. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi	20
2.3. Astaksantin Molekülü İçin Ana Stok Hazırlanması	20
2.4. Astaksantin Muamelesi Sonrası MTT ile Sitotoksosite Tayini.....	20
2.5. SPSS Analizi	21
2.6. Astaksantin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkisinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi.....	21
3. BULGULAR.....	23
3.1. Moleküler Docking Çalışmaları	23
3.2. MTT ile Sitotoksosite Tayini Deneyi ve SPSS Analizi	26
3.3. Astaksantin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkisinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi.....	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
5. ÖNERİLER.....	38
6. KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

ASTAKSANTİN KAROTENOİDİNİN SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ 7 (CDK7) ÜZERİNDEKİ İNHİBİSYON POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceren Elif YETİM

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Uğur UZUNER
2024, 61 Sayfa

Hücre siklusunda kilit role sahip moleküllerde meydana gelen mutasyonlar, kontrolsüz hücre bölünmesine yol açarak normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesine neden olmaktadır. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK'lar), hücre döngüsünün en iyi bilinen ve önemli düzenleyicilerindendir ve CDK7, hücre döngüsünü, CDK1, 2, 4 ve 6'nın T-looplarından fosforilleyerek aktifleştirmek suretiyle regüle eder. Son yıllarda çeşitli tümör tiplerinde yapılan analizler, tümör hücrelerinde CDK7 ekspresyonunun arttığını ve CDK7 inhibisyonunun çoklu tümör gelişimlerini inhibe etmede etkili olduğunu göstermiştir. Doğada bilinen karotenoidler arasında şimdiye kadar tanımlanmış en güçlü antioksidan olan astaksantin (ATK), anti-lipid peroksidasyonu, anti-inflamatuar, kardiyovasküler hastalıkları önleme, anti-diyabetik ve antikanser etkilere sahip çok güçlü bir antioksidandır.

Bu çalışmada, ATK karotenoidinin antitümör ve hücre bölünmesini geciktirici etkileri, CDK7 proteini üzerindeki inhibisyon potansiyelinin *in silico* moleküler kenetlenme, MCF10A ve MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde hücre kültürü çalışmaları, MTT ve akım sitometrisi deneyleri ile araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda ATK, düşük bağlanma enerjisi varlığında CDK7 proteinine yüksek afinite göstermiştir. Ayrıca ATK, 72 saatlik inkübasyondan sonra MDA-MB-231 tümör hücreleri üzerinde $IC_{50}=9.89 \mu M$ konsantrasyonunda sitotoksik etki göstermiştir. Hücre döngüsü analizi de ATK'nın hem kanser hem de normal hücreleri G0/G1 fazında durdurmada etkili olduğunu ortaya koymuştur. Mevcut bulgular, ATK'nın bilinen insan sağlığı faydalarına ek olarak hücre bölünmesini geciktirici aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, mevcut bulgular ATK'nın hücre proliferasyonunu geciktirme ve transkripsiyonu durdurma potansiyeli için somut kanıtlar sunmakta ve bu alanda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Astaksantin, CDK7, antitümör, proliferasyon durdurma, moleküler kenetleme, MTT, akım sitometrisi

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE INHIBITORY POTENTIAL OF ASTAXANTHIN CAROTENOID ON CYCLIN-DEPENDENT KINASE 7 (CDK7)

Ceren Elif YETİM

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Uğur UZUNER
2024, 61 Pages

Mutations in molecules that play a key role in the cell cycle lead to uncontrolled cell division, resulting in the transformation of normal cells into tumor cells. Cyclin Dependent Kinases (CDKs) are among the best known and important regulators of the cell cycle. Cyclin Dependent Kinase 7 (CDK7) regulates the cell cycle by phosphorylating and activating the T-loops of CDK1, 2, 4 and 6. In recent years, analyses in various tumor types have shown that CDK7 expression is increased in tumor cells and CDK7 inhibition is effective in inhibiting multiple tumor growths. Among the carotenoids known in nature, astaxanthin is the most potent antioxidant identified so far. Astaxanthin (ATK) is a very potent antioxidant with anti-lipid peroxidation, anti-inflammatory, cardiovascular disease prevention, anti-diabetic and anticancer effects.

In this study, the antitumor and cell division retarding effects of ATK carotenoid were investigated through in silico molecular docking of its inhibition potential on CDK7 protein, cell culture studies on MCF10A and MDA-MB-231 human metastatic breast cancer cells, MTT and flow cytometry assays. As a result of the studies, ATK showed high affinity for CDK7 protein in the presence of low binding energy. In addition, ATK showed a cytotoxic effect on MDA-MB-231 tumor cells at a concentration of $IC_{50}=9.89 \mu M$ after 72 hours of incubation. Cell cycle analysis also revealed that ATK was effective in arresting both cancer and normal cells in G0/G1 phase.

The present findings suggest that ATK has cell division retarding activity in addition to its known human health benefits. In conclusion, the present findings provide concrete evidence for the anti-aging potential of ATK and point to the need for more extensive studies in this field.

Key Words: Astaxanthin, CDK7, antitumor, proliferation inhibition, molecular docking, MTT, flow cytometry

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Meme kanseri gelişiminden sorumlu genler (Peleg Hasson vd., 2020)	4
Şekil 2. Hücre döngüsü üzerinde farklı CDK'ların kontrol noktaları (Wang vd., 2024).....	6
Şekil 3. Hücre döngüsü gelişiminde farklı CDK'ların fosforilasyonu ve hormon reseptörleri, aracı proteinler, transkripsiyon faktörleri ve Pol II'nin fosforilasyonu aracılık etmektedir (Song vd., 2024).	8
Şekil 4. CDK7'ye ait trimerik CAK kompleksi ve aktif bölgeyi işaret eden görseller	9
Şekil 5. Transkripsiyonun aşamaları ve CDK7'nin transkripsiyondaki rolleri	11
Şekil 6. Astaksantin kimyasal yapısı	15
Şekil 7. MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri (ATCC, HTB-26)'nin düşük ve yüksek hücre yoğunluğunda mikroskop görüntüleri	19
Şekil 8. MCF10A insan fibroblastik meme hücreleri (ATCC, CRL-10317)'nin düşük ve yüksek hücre yoğunluğunda mikroskop görüntüleri.....	19
Şekil 9. AutoDock4.0 tabanlı moleküler docking çalışmaları sonunda belirlenmiş 1UA2 (CDK7)-ATK kompleksine ait moleküler yerleştirme	24
Şekil 10.1UA2-ATK Enzim-ligand kompleksine ait biyokimyasal etkileşimlerin şematize edilmiş 2 boyutlu görseli	25
Şekil 11. AutoDock4.0 tabanlı moleküler docking çalışmaları sonunda belirlenmiş 6XD3 (CDK7)-Astaksantin kompleksine ait moleküler yerleştirme görseli	26
Şekil 12.6XD3-ATK Enzim-ligand kompleksine ait biyokimyasal etkileşimlerin şematize edilmiş 2 boyutlu görseli	26
Şekil 13.Astaksantin meme kanseri hücreleri (A) ve normal hücreler (B) üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren % hücre canlılığı grafiği	27
Şekil 14. Astaksantin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimini gösteren grafik.....	28
Şekil 15. Astaksantin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimini gösteren grafik.....	29
Şekil 16. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına astaksantin muamelesi sonucu SPSS istatistiksel analizi veri sonuçları	30
Şekil 17.MCF10A meme kanseri hücre hattına astaksantin muamelesi sonucu SPSS istatistiksel analizi veri sonuçları	31

Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinin ATK'nın 0, 5 ve 10 μ M artan dozları ile 48 saat inkübasyonu sonrası mikroskop görüntüleri	32
Şekil 19. MCF10A hücrelerinin ATK'nın 0, 5 ve 10 μ M artan dozları ile 48 saat inkübasyonu sonrası mikroskop görüntüleri	32
Şekil 20. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının ATK bileşiği ile 48 saat muamelesi sonrası hücre döngüsü analizi A) Kontrol grubu B) 5 μ M ve C)10 μ M ATK	34
Şekil 21. MCF10A hücre hattının ATK bileşiği ile 48 saat muamelesi sonrası hücre döngüsü analizi A) Kontrol grubu B) 5 μ M ve C)10 μ M ATK	35



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. FDA onaylı CDK7 inhibitörlerinin ve Astaksantin CDK7'yi inhibe etme potansiyellerinin bağlanma enerjilerinin AutoDock4.0 programı ile moleküler yerleştirme sonucunda karşılaştırmalı listesi	23
Tablo 2. MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin astaksantin ile 48 saat muamelesi sonrası hücre döngüsü analizi sonuçları.....	33



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
$\pm SE$	: Standart Hata
μ	: Mikro
μM	: Mikromolar
μL	: Mikrolitre
ATK	: Astaksantin
CO ₂	: Karbondioksit
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medyası
FBS	: Fetal Sığır Serumı
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kanser

Kanser, dünya genelinden en yaygın olarak görülen ölüm nedenlerinden biridir ve hücrelerin otokontrolünü kaybetmesi sonucu gelişen düzensizlikler bütünüdür. Vücudumuzdaki normal hücreler ise, gerektiği zaman ihtiyaç duyduğu kadar bölünür ve farklılaşır. Kanser hücreleri ise, zamanla biriken mutasyonlar sonucu hücre siklusu mekanizmasının düzensizliğiyle birlikte kontrolsüz olarak çoğalmaya başlar ve böylelikle kanser oluşur. Tümörler; köken aldığı hücreden farklılaşma yeteneği, büyüme hızı ve metastaz özelliklerinin göre benign ve malign tümörler olarak iki sınıfa ayrılır. Benign tümörler halk arasında iyi huylu tümörler olarak adlandırılır. Yavaş ve sınırlı yayılım gösterirken, bulundukları hücreden köken alırlar. Malign tümörlerin ise farklılaşma yetenekleri fazla, büyüme hızı kararsız ve yayılımları oldukça hızlıdır. Malign tümörler ilk köken aldıkları bölgeden metastaz yoluyla çevre dokulara yayılır.

1.2. Meme Kanseri

Kadınlar arasında en sık ve yaygın olarak görülen malignite olan meme kanseri nadiren erkeklerde de görülmekle beraber, kanser kaynaklı ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır ve her yıl 1 milyondan fazla yeni meme kanseri vakası teşhis edilmektedir. 2020 yılı itibarıyla dünya çapında 2.3 milyon meme kanseri vakası ve 685.000 ölüm gözlenirken bu sayının önümüzdeki 50 yıl içerisinde iki katına çıkması tahmin edilmektedir (Swaminathan vd., 2023). Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi yaş, etnik köken, ırk ve yaşam tarzı gibi etkenler meme kanseri gelişiminde de rol oynar. Meme kanseri gelişimindeki yüksek insidans oranı önlenemese de meme kanseri kaynaklı ölümler erken teşhis ve etkili tedavi yöntemleri ile sınırlandırılabilir.

Meme kanserleri, bulunduğu meme dokusundaki spesifik hücre tipine göre sarkoma ve karsinoma olarak iki alt grupta sınıflandırılır. Sarkomalar, epitelyal olmayan kemik, kas, yağ ve sinirleri içeren bağ dokusunda meydana gelen nadir tümör tipidir ve meme kanseri özelinde insidansı %1'den az görülür. Karsinomalar ise epitel dokuda oluşur ve meme kanseri vakalarının %12'sini oluşturur (Swaminathan vd., 2023).

İn situ duktal meme kansinomu (DCIS), kanserin, kanalın veya süt bezinin dışına taşmayan invaziv olmayan formudur ve tüm dokular arasında en sık görülen nc kanser türüdür. DCIS, nc bir tümördür ve genellikle bu lezyonların çoğu invaziv aşamaya ilerlemez (Bertoli vd., 2013). İnvaziv meme kanseri, tümörün süt bezi ve kanallarının dışına taştığı, bazal membranla sınırlı olmayan bulunduğu doku ve hücre tipine göre duktal ve lobüler olarak sınıflandırılan kansinomadır. İnvaziv duktal kansinoma (IDC), tüm vakaların %80'inin oluşturan en yaygın meme türü iken, invaziv lobüler kansinoma (ILC), meme kanseri vakalarının yalnızca %5-15'ini oluşturur (Hong & Xu, 2022).

Metastatik meme kanseri (MBC), başlangıç yeri meme dokusu olan fakat tümörün ilerlemesiyle birincil bölgeden uzak vücudun diğer bölgelerine yayılan tümör tipidir. Metastaz süreci invazyon, intravazasyon ve ekstrasvazasyon süreçlerini içerir.

1.2.1. Meme Kanseri Türleri

Moleküler tabanda meme kanseri 4 alt türde sınıflandırılır; Luminal A; Luminal B; l Negatif Meme Kanser (TNBC) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2 (Her2) Pozitif (Swaminathan vd., 2023)

Luminal A: Luminal A meme kanseri, %50-60'lık oranla en sık görülen meme kanseri alt türüdür. Yüksek ER (strojen Reseptörü), negatif Her2 ve düşük Ki67 gen ekspresyon seviyesiyle tanımlanırken düşük mitotik aktivite gösterirler. Diğer alt türlerle karşılaştırıldığında hastalar daha iyi prognoza sahiptir. Yavaş proliferasyon göstermeleri nedeniyle, bu tür tümörler kemoterapi yerine endokrin tedavi edilir (Swaminathan vd., 2023).

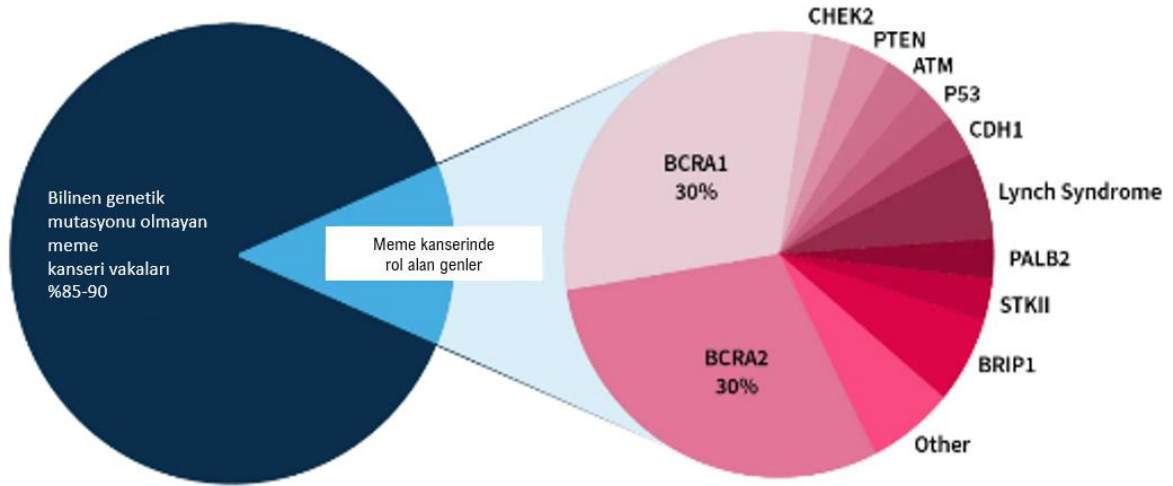
Luminal B: Luminal B meme kanseri, %40'lık bir insidansla daha agresif bir alt türdür ve yüksek histolojik dereceyle, yüksek proliferasyona sahiptir. Düşük ER (strojen Reseptörü), negatif PR (Progesteron Reseptörü) ve Her2 pozitif gen ekspresyonuyla tanımlanır. Luminal A tümörleriyle kıyaslandığında nüks etme olasılığı daha yüksektir ve düşük sağ kalım oranı vardır. Bu tip tümörler endokrin tedaviye duyarsızken kemoterapiye daha yüksek oranda yanıt verirler (Swaminathan vd., 2023).

l Negatif Meme Kanser (TNBC): Negatif ER (strojen Reseptörü), PR (Progesteron Reseptörü) ve Her2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2) ekspresyonu ile tanımlanan tümörlerdir. Tedavide hedeflenecek moleküllerin eksikliği nedeniyle oldukça yüksek mitotik oranlara ve kötü prognoza sahip olsa da kemoterapiye dirençli değildir.

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2 (Her2) Pozitif: Her2 pozitif meme kanseri, invaziv meme kanseri vakalarının %15-25'ini kapsar ve kötü sağ kalım oranlarıyla agresif bir alt türdür. Her2 pozitif meme kanseri vakalarının %40-80'inde TP53 (tümör protein 53) mutasyonu görülür. Sıklıkla beyne ve diğer iç organlara metastaz yaparak hastada yaşam kalitesinin düşmesine neden olurlar. Her2, tirozin kinaz ailesine dahildir ve trastuzumab/pertuzumab gibi monoklonal antikolar ile lapatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilirler.

1.2.2. Meme Kanserinin Genetik Temeli

Meme kanserlerinin yaklaşık olarak %10'u kalıtsal temele sahiptir ve birinci derece akrabalarında meme kanseri görülen kişiler 35 yaş öncesi erken başlangıçlı meme kanseri için yüksek risk grubu oluşturur (Harbeck vd., 2019). Görülen vakaların yarısı BRCA1 (17q21) ve BRCA2 (13q13) mutasyonlarıyla ilişkilendirilir ve BRCA1/2 germ hattı mutasyonları üçlü negatif meme kanserleri (TNBC)'nin yaklaşık %15-20'sini oluşturur. BRCA1/2 genleri, çift sarmallı DNA (dsDNA) kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarımında önemli rol oynayan genlerdir ve BRCA1/2 lokuslarında fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar tümör oluşumuna yol açar (Hong & Xu, 2022). PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2), BRCA2 geniyle beraber yüksek penetrans oranına sahip meme kanseri belirteç genleri olarak kabul edilir. PALB2'nin tek allelinde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonu sonucu meme kanseri riskinin arttığı görülmüştür (Hong & Xu, 2022). Meme kanserlerinde en sık mutasyona uğradığı görülen bir diğer gen tümör baskılayıcı TP53 genidir. TNBC tip meme kanserinin %80'inde ve Her2 Pozitif meme kanserinin %70'inde çerçeve kayması mutasyonları oluşturur. Bunun yanında Luminal A tip meme kanserinde %12-23 ve Luminal B meme kanserinde %15-29 oranlarıyla daha düşük frekansla mutasyonlar oluşturur (Swaminathan vd., 2023). Sıklıkla mutasyona uğrayan diğer genler PIK3CA, MYC, PTEN, CCND1, FGFR1, ATM ve CHEK2 (Şekil 1).



Şekil 1. Meme kanseri gelişiminden sorumlu genler (Peleg Hasson vd., 2020)

1.3. Siklin Bağımlı Kinazlar

Hücreler bölünme sürecine girdiğinde birçok önemli enzim hücre döngüsü reaksiyonlarında rol oynar. Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK'lar), hücre döngüsünün en iyi bilinen ve önemli düzenleyicilerindendir. Hücre döngüsünün G1, S ve G2 fazları boyunca farklı CDK-siklin kompleksleri fonksiyon görür ve hücre döngüsü arasındaki geçişleri etkileyen sinyalleşme, transkripsiyonel ve enzimatik olaylarda etkin roller üstlendikleri bilinmektedir (Łukasik vd., 2021). Ökaryotik hücrelerde evrimsel süreçte korunmuş CDK'lar işlevlerine göre gruplandırılan 21 alt ailede sınıflandırılır. Bunlar, (1) hücre döngüsü düzenleyicileri (CDK 1-6 , 14-18); (2) transkripsiyon düzenleyicileri (CDK7-13, 19, 20) (Huang vd., 2024). CDK'lar enzimatik aktivite gösterebilmek için regülatör bir alt ünite olan siklinlere ihtiyaç duyan protein kinazlardır (Łukasik vd., 2021).

1.4. Siklin Bağımlı Kinazların Hücre Döngüsündeki Rolü

1.4.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bir hücrenin genetik materyalini ve hücre içeriğini sonraki nesillere aktarmak için iki katına çıkararak bölündüğü oldukça sistemli bir reaksiyondur. Bu sistematik ve organize süreçte hücresel çoğalma boyunca bir çok siklin ve siklin bağımlı kinaz proteinleri, onkogenler, proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler gibi bir çok gen

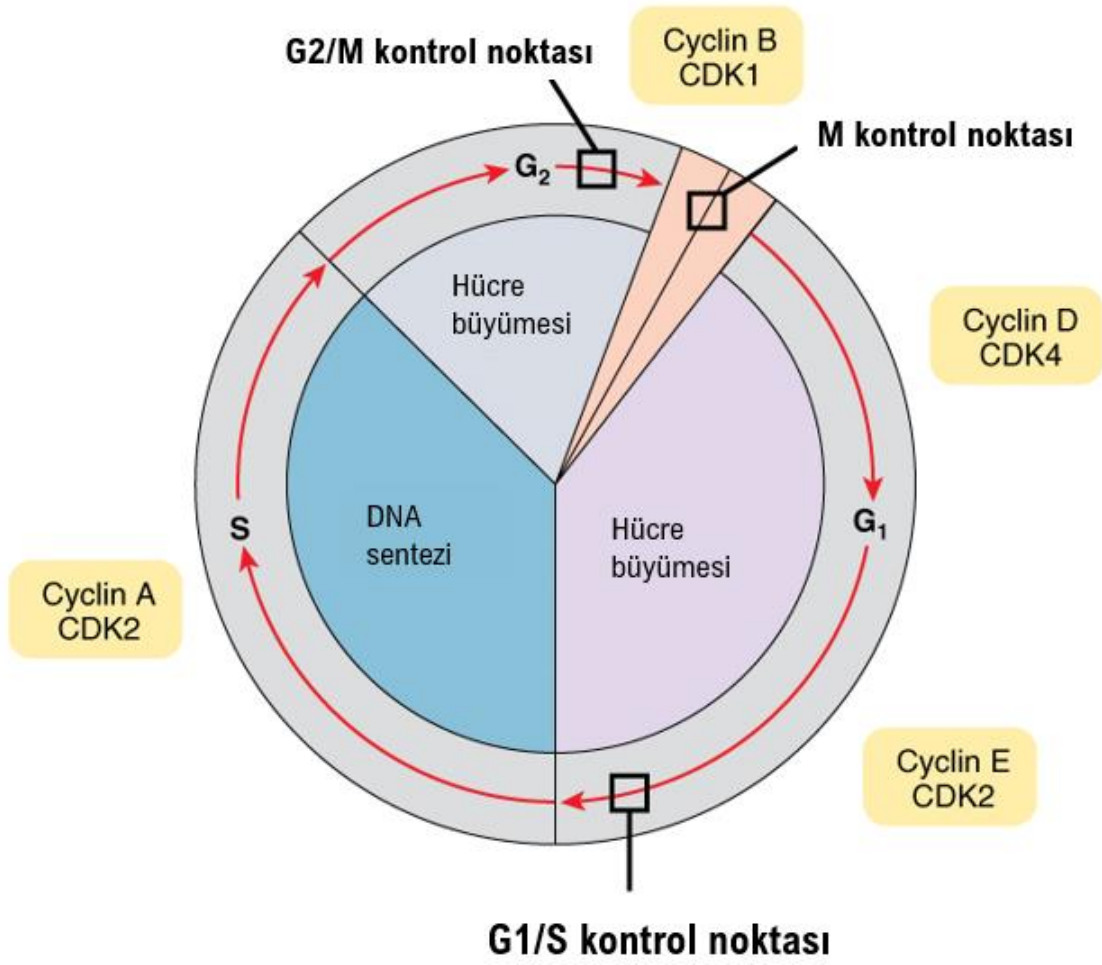
grubu görev alır (Huang vd., 2024). Hücre bölünmesi, bir hücrenin hücre döngüsüne girmesine ve bölünmek üzere mitotik evreye girmesine izin verilmeden önce hiçbir hatanın meydana gelmemesini sağlamak için düzenleyici mekanizmalar ve kontrol noktalarıyla regüle edilir (Matthews vd., 2022). Hücre bölünmesinin gerekli olduğu zamanda, olması gerektiği gibi işlemesi için hücre döngüsünün düzenlenmesi oldukça önemlidir çünkü hücre döngüsü sırasında meydana gelen mutasyonlar, önce hücresel sistemde sonra ise organizma boyutunda işlev kayıplarına neden olabilir. Günümüzde dünya çapında en çok ölüme neden olan kanser gibi hastalıklara hücre döngüsünün düzenlenmesi esnasında oluşan aksaklıkların neden olduğu bilinmektedir (Santo vd., 2015). Kanser, düzensizlikler bütünüdür ve hücre bölünmesi dahil tüm hücresel süreçler kanserde kontrolsüz olarak gerçekleşir (Otto & Sicinski, 2017).

Hücre döngüsü, G1, S ve G2 evrelerinden oluşan interfaz ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği mitoz evresi olmak üzere 2 farklı aşamadan oluşmaktadır. Hücre siklusunun düzenlenmesi, siklin ve siklin bağımlı kinazlardan oluşan kontrol noktaları tarafından regüle edilir. İnterfaz evresi, hücrenin bölünmeye hazırlandığı evredir ve bu evrede hücre hacimsel olarak artış gösterirken DNA içeriği de replikasyon ile iki katına çıkarılır. G1 evresi bir önceki bölünmeden sonra hücrenin tekrar bölünmeye ya da durgun faz olan G0'a girme kararını verdiği evredir. G1 evresi hücre siklusunda zamansal olarak en uzun fazdır ve hücre, bölünme süresince gerekli olan protein, enzim ve metabolitleri bu süreçte sağlamaktadır. S evresi, DNA replikasyonu ile genetik materyalin iki katına çıkarılmasından sonra her bir kromozomun kendini eşleyerek kardeş kromatidler oluşturduğu fazı kapsar (Z. Wang vd., 2024). G2 fazında, hücre mitoz evresine hazırlanmak adına lipid sentezini artırır ve böylece membran oluşumu için gerekli lipid sentezlenir. Mitoz fazı (M), hücre döngüsünde en kısa zaman dilimini kapsar ve bu evrede kromozomların iğ ipliklerinin düzenlenmesiyle çekirdek bölünmesi başlar. Mitoz evresi kendi içinde; (1) profaz; (2) metafaz; (3) anafaz; (4) telofaz ve (5) sitokinezden meydana gelmektedir (Matthews vd., 2022).

1.4.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre siklusunda kilit role sahip moleküllerde meydana gelen mutasyonlar, kontrolsüz hücre bölünmesine yol açarak normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesine neden olmaktadır. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları; (1) G1 kontrol noktası, hücrenin hacimsel olgunluğunu, büyüme faktörleri ve gerekli besinlerin varlığını; (2) S kontrol

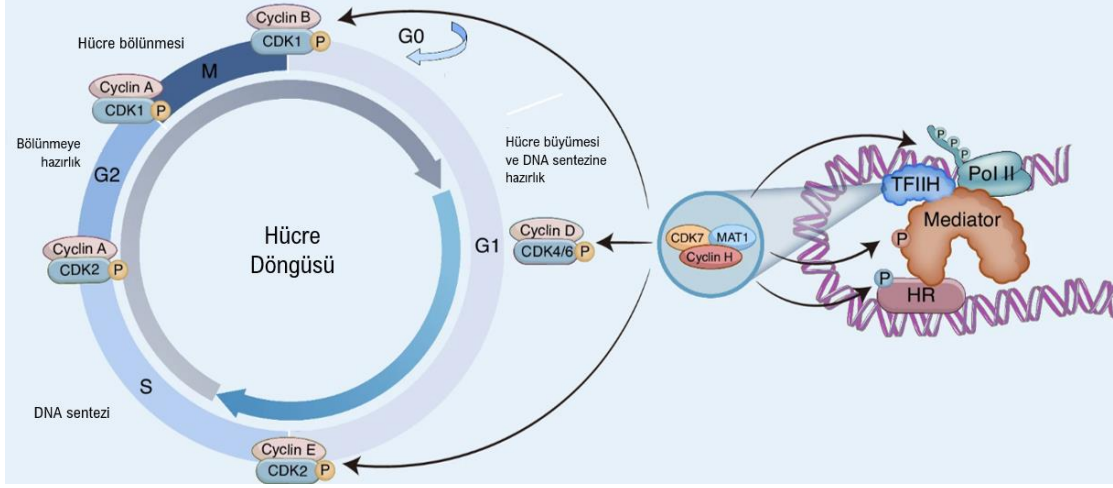
noktası, DNA replikasyonunu ve DNA hasarını; (3) G2 kontrol noktası, hücre büyüklüğünü ve DNA replikasyonunu; (4) M kontrol noktası ise; kromozomlara iç ipliklerinin bağlanmasının eksiksiz tamamlanmasını kontrol eder (Şekil 2). Bu kontrol noktalarında meydana gelen anormallikler, tümör oluşumunun merkezinde yer alır ve kanser hücrelerini transformasyona uğratarak sonsuz bölünme yeteneği kazandırarak hücre döngüsünden çıkamamalarına neden olur (Wang vd., 2024).



Şekil 2. Hücre döngüsü üzerinde farklı CDK'ların kontrol noktaları (Wang vd., 2024)

1.4.3. Hücre Döngüsünün Siklin Bağımlı Kinazlar Tarafından Düzenlenmesi

Siklin Bağımlı Kinazlar ve CDK'lar tarafından regüle edilen transkripsiyon, hücre döngüsünün ilerlemesini düzenler. CDK aktivitesindeki değişiklikler, hücrenin, hücre siklusuna girişini, ilerleyişini ve tamamlanmasını düzenler. CDK4/6 aktivitesi, D tipi siklinler olan siklin D1, siklin D2 ve siklin D3 ile regüle edilir (Şekil 3). Aktif siklin D/CDK4-CDK6 kompleksleri, RB1 geni tarafından kodlanan RB (retinoblastoma) proteininin fosforilasyonunu başlatır. Bu fosforilasyon, p53 tümör süpresör geninin inaktivasyonuna neden olarak, E2F transkripsiyon faktörünün salınmasına neden olur ve böylece hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonu artırılır. Aynı zamanda bu fosforilasyon, G1 kontrol noktasının inaktivasyonuna yol açarak hücre döngüsünün G1'den S fazına ilerlemesine neden olur (Łukasik vd., 2021). Fosforile edilen RB, G1/S girişinde ve hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan Siklin E/A/B, dihidrofolat redüktaz (DHFR), ribonükleotid redüktaz M1 (RRM1) ve mitotik kontrol noktası serin/treonin kinazı BUB1 gibi genlerin transkripsiyonunu indükler (Bertoli vd., 2013). Geç G1 fazında, E2F'nin hedef genleri olan Siklin E1/E2 aktive edilir böylece Siklin E/CDK2 kompleksi G1/S fazındaki kontrol noktasını inhibe ederek S fazını başlatır (Bertoli vd., 2013). CDK4/6 ve CDK2'nin aktivitesi hücre döngüsünün "kısıtlama fazı" olarak bilinen S fazına ilerlemesini sağlar. S fazının sonunda Siklin A, Siklin E'yi uzaklaştırarak CDC6 ve E2F1'i fosforile eden Siklin A/CDK2 kompleksini oluşturur böylece S fazı tamamlanır ve hücre döngüsü S fazından G2 fazına yönlendirilir. CDK1'in aktivasyonu hücrenin mitoz evresine girme kararında çok kritik bir rol oynar (Matthews vd., 2022). Mitoz evresinde CDK1 aktivitesi Siklin B/CDK1 kompleksi tarafından düzenlenir ve düzensiz CDK1 ekspresyonu kromozomların ayrılmasını sağlayarak mitozun tamamlanmasına olanak verir. Bunlara ek, Siklin C/CDK3, RB'yi fosforile ederek hem hücrelerin G0 fazından S fazına yönlendirilmesini hem de geri dönüşümlü veya kalıcı olarak G0 evresine giriş yapan hücrelerin hücre siklusundan çıkışını düzenler (Bertoli vd., 2013).



Şekil 3. Hücre döngüsü gelişiminde farklı CDK'ların fosforilasyonu ve hormon reseptörleri, aracı proteinler, transkripsiyon faktörleri ve Pol II'nin fosforilasyonu aracılık etmektedir (Song vd., 2024).

1.5. Transkripsiyonel Siklin Bağımlı Kinazlar

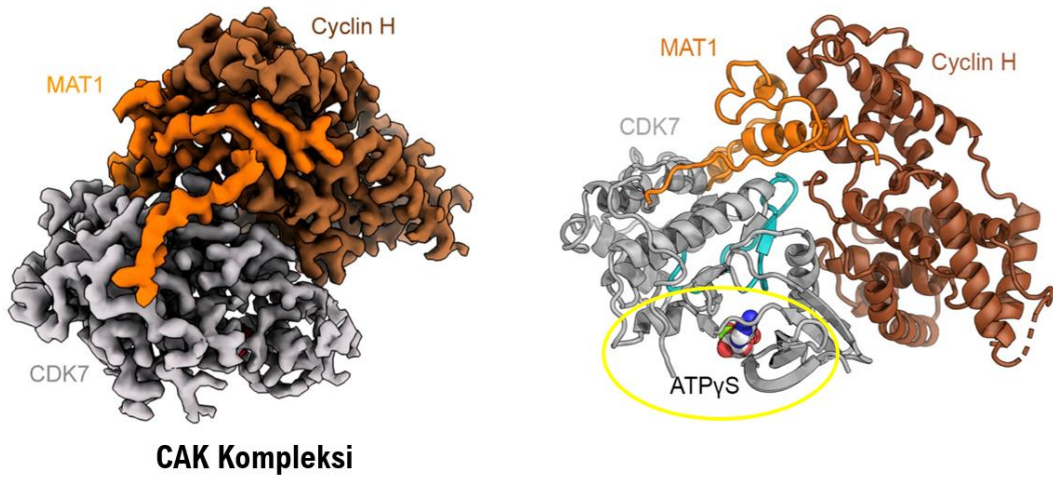
Siklin bağımlı kinazların hücre döngüsünün regülasyonunda yer alan fonksiyonlarına ek olarak gen ifadesinde transkripsiyon düzeyinde de önemli rolü vardır. Siklin bağımlı kinazlar, CAK (CDK activating kinase) kompleksini oluşturmak için siklinlere bağlanır ve fosforilasyon yoluyla transkripsiyonu düzenler (Liu vd., 2022). Siklin bağımlı kinazların transkripsiyon üzerindeki düzenleyici etkisi, siklinler ile oluşturduğu heterodimer kompleksin RNAII Polimeraz (RNAPII)'ın karboksi-terminal ucu (CTD)'nu fosforile etmesi yoluyla gerçekleşir. RNAPPI, gen transkripsiyonu için en kritik proteindir. Karboksi-terminal domain, birden fazla Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser tekrarından oluşan ve fosforilasyona uğrayan, RNAPII'nin en büyük alt birimidir. Ayrıca CTD, RNA işlenmesinde de rol oynar.

Transkripsiyon oldukça kompleks ve sistemli bir reaksiyondur ve 4 aşamada gerçekleşir. Bunlar; (1) başlama, (2) duraklama, (3) uzama ve (4) sonlanma aşamalarıdır. Siklin bağımlı kinaz 7 (CDK7) ise bu kompleks transkripsiyon reaksiyonunda en önemli role sahip siklin bağımlı kinazdır.

1.6. Siklin Bağımlı Kinaz 7

Siklin bağımlı kinaz 7 (CDK7), siklin H ve MAT1 ile bir araya gelerek CDK-aktifleştirici kinazı (CAK) oluşturur. CAK kompleksinin oluşumu hücre döngüsünde rol oynayan CDK1, 2, 4, ve 6'nın aktifleştirilmesi aşamasında önemli görev görür (Sava vd., 2020). CAK kompleksi T-loop fosforilasyonunu sağlayarak CDK1, 2, 4 ve 6'yı aktifleştirir. T-loop fosforilasyonu hem hücre döngüsünde hem de bir genel transkripsiyon faktörü olan TFIIF'in bir bileşeni olarak transkripsiyon regülasyonunda rol alır (Wong vd., 2014).

CDK7, 346 aminoasit uzunluğunda ve 39 kDa moleküler ağırlığında bir kinazdır (Şekil 5A). Hücre döngüsü gelişiminde farklı CDK'ların fosforilasyonu ve Hormon reseptörleri, aracı proteinler, transkripsiyon faktörleri ve Pol II'nin fosforilasyonu aracılık etmektedir. N-kuyruğunda siklin-H bağlanma bölgesi ve C-kuyruğunda MAT1 bağlanma bölgesinden oluşur (Şekil 4). Siklin-H bağlanması, CDK7 aktivitesinde kilit rol alır. Komplekse MAT1 bağlanması ise CAK kompleksinin stabilizasyonunu sağlamaktadır. CDK7'ye siklin-H ve MAT1 bağlanmasının substrat spesifitesini düzenlediği görülmüştür. CDK7, Siklin-H ve MAT1'den oluşan CAK kompleksinin RNA Polimeraz II için çok daha yüksek kinaz aktivitesi sağladığı ortaya konmuştur (Sava vd., 2020). CDK7'nin T-loopunun, Thr170 (treonin 170) ve Ser164 (serin164) pozisyonlarından fosforile edilmesiyle hem kinaz aktivitesi artar hem de Siklin H'a bağlanma kapasitesi artar.



Şekil 4. CDK7'ye ait trimerik CAK kompleksi ve aktif bölgeyi işaret eden görseller

1.6.1. CDK7'nin Hücre Döngüsündeki Rolü

CDK7, hücre döngüsünü, CDK1, 2, 4 ve 6'nın T-looplarından fosforilleyerek aktivitelerini teşvik ederek regüle eder (Liu vd., 2022). CDK1, Thr161 ve CDK2, Thr160 pozisyonlarından CDK7 tarafından fosforillenir. Hücre siklusunun farklı aşamalarında CDK7'nin inhibisyonunun hücre döngüsünü regüle ettiği görülmüştür. Örneğin; hücre siklusunun G1 fazındaki inhibisyon CDK2 aktivasyonunu inhibe ederek S fazına geçişi geciktirir. S/G2 fazındaki inhibisyon ise CDK1 aktivasyonunu inhibe ederek mitotik faza girişi engeller (Sava vd., 2020). Hücre siklusu, aktif siklin D/CDK4-CDK6 komplekslerinin, RB1 geni tarafından kodlanan RB (retinoblastoma) proteinini fosforillemesi yoluyla kontrol noktalarında regüle edilir. CDK7 ise, CDK4 ve CDK6'yı sırasıyla Thr172 ve Thr177 pozisyonlarından fosforile ederek aktifleştirir. CDK7'nin inhibisyonu RB kinaz aktivitesini inhibe ettiğinden hücre siklusunun G1'e yönelmesi de engellenmiş olur (Schachter vd., 2013).

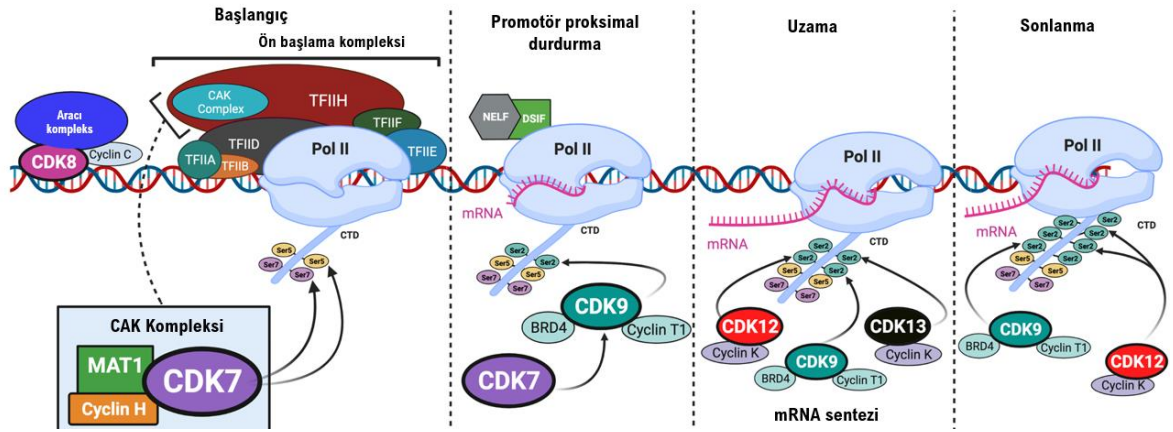
CDK2, bir kez CDK7 tarafından fosforillendiğinde 12 saate kadar fosforillenmiş halde kalarak S/G2 fazında aktivite gösterirken, CDK4 ve CDK6 aktivitesi CDK7 inhibisyonuyla hızlı bir şekilde inhibe olur bu nedenle CDK4/6'nın G1 fazı esnasında aktivite gösterebilmesi için CDK7 aktivitesi zorunludur (Sava vd., 2020). CDK'ların fosforilasyonu koruma sürelerindeki farklılık komplekslerin yapılarından kaynaklanır. Siklin D'ye bağlı CDK4/6'nın T loopları fosfatazlara açıkken, CDK2 siklin bağlanması sonucu fosfatazlardan korunmuş pozisyonunda kalır.

1.6.2. CDK7'nin Transkripsiyondaki Rolü

CDK7, genel transkripsiyon faktörü olan TFIIH'nin bir bileşenidir. 10 alt birimli bir genel transkripsiyon faktörü olan TFIIH, iki alt birimden oluşur; iki DNA helikaz enzimi (xeroderma pigmentosum tip B (XPB) ve xeroderma pigmentosum tip D (XPD)) ve CAK kompleksi (Sava vd., 2020). CDK7 gen ekspresyonunu ve transkripsiyonunu TFIIH'nin bir bileşeni olarak regüle eder. Çünkü TFIIH, aktif gen promotörlerine dahil olarak diğer transkripsiyon faktörleri (TFs) ve Pol'II'ye ön başlatma kompleksine (PIC = pre initiation complex) katılır.

Transkripsiyon PolII'ye bağlı oldukça kompleks bir reaksiyondur (Şekil 5). Promotor kaçıışı olarak adlandırılan aşamada DNA, transkripsiyon başlama bölgesinde (TSS = transcription start site) XBP helikazı tarafından çözüldükten sonra, CDK7, Pol II'nin

karboksi-terminal ucunu Ser5 ve Ser7 pozisyonlarından fosforile eder böylece Pol II ön başlama kompleksinden salınır. Bu proses promotör kaçıışı olarak adlandırılır ve CDK7 tarafından regüle edilir. Promotör kaçışının ardından promotör-proksimal duraklama meydana gelir. Duraklatılmış Pol II'nin salınması ve transkripsiyonun uzama aşamasına geçilmesi için PTETb (positive transcription elongation factor)'nin bir bileşeni olan CDK9 gereklidir. CDK9'un aktivite gösterebilmesi için, CDK7 tarafından fosforilasyona uğraması gerekir. Bu fonksiyonları nedeniyle, CDK7 hem promotör-proksimal duraklama hem de promotör kaçışı safhalarında rol oynar (Sava vd., 2020). Aktif CDK9, Pol II'yi karboksi-terminal domaininden fosforilleyerek transkripsiyonel uzamayı teşvik eder.



Şekil 5. Transkripsiyonun aşamaları ve CDK7'nin transkripsiyondaki rolleri

Transkripsiyonun ardından işlenmemiş RNA bazı işlemlere tabi tutularak olgunlaştırılır. Transkripsiyonda oluşan pre-mRNA transkriptine 5'-monometil guanozin kepi eklenmesi de CTD (karboksi terminal domain)'in CDK7 tarafından fosforillenmesiyle regüle edilir (Sava vd., 2020).

CDK7, transkripsiyonu PolII'yi fosforilleyerek regüle etmesinin yanında birçok genel transkripsiyon faktörünü (TFs) de fosforile ederek onların aktivitelerini veya degradasyonlarını düzenlemektedir. Retinoik asit reseptörü α (RAR α) ve retinoik asit reseptörü γ (RAR γ)'nın aktivitelerinin regülasyonu da CDK7 tarafından fosforilasyonla kontrol edilir. Retinoik asit reseptörleri, transkripsiyon faktörü olarak görev yapan Nükleer Reseptör (NRs) ailesinin üyeleridir (Rastinejad, 2022). Östrojen reseptörü α (Er α)'yı ve

androjen reseptörü (AR)'nü de sırasıyla Ser118 ve Ser515 pozisyonlarından fosforilleyerek görev görür.

1.7. Kanserde Siklin Bağımlı Kinazlar

Kanser hücrelerinin en büyük karakteristik özelliklerinden olan düzensizlik ve kontrolsüz çoğalma hücre döngüsü ve transkripsiyonun regülasyonundaki düzensizliklerden yani CDK/Siklin aktivitelerinden kaynaklanır. CDK aktivitesinde upregülasyona neden olan mutasyonlar hücrelerin kontrolsüz büyümesine sebep olurken, hücre döngüsü kontrol noktalarının, tümör baskılayıcı genlerin ve CDK'ların inhibisyonuna neden olan mutasyonlar, hücre döngüsünün kontrolünde ve baskılanmasında sorunlar meydana getirir (Santo vd., 2015).

CDK1, hücre siklusunun S ve G2 fazlarını regüle etmekte oldukça önemli rol oynar. CDK1'e SiklinA/B bağlanması, hücre siklusunun G2 fazından mitozaya geçişini yönlendirir (Thiel vd., 2022). CDK1 ve siklin B'nin düzensiz ekspresyonu sonucu meydana gelen aktivite değişiklikleri, başta meme olmak üzere, akciğer ve kolorektal kanserler olmak üzere birçok kanser türünde negatif etkiye yol açmaktadır (Łukasik vd., 2021). Bu nedenle CDK1 inhibisyonu anti tümör ilaç çalışmaları için oldukça etkili bir hedeftir. CDK1 ve poli-ADP-riboz polimeraz (PARP)'in eşzamanlı inhibisyonunun, fare tümörlerinde sağ kalımı uzattığı gösterilmiştir. Ayrıca CDK1 knock-out edilmiş farelerle yapılan çalışmada, CDK1'in mitozu başlatmak için gerekli olduğu gösterilmiştir (Santamaría vd., 2007). Bir kinaz olan Wee1'in CDK1 ve siklin B kompleksini fosforillemesi CDK1'in inhibisyonuna neden olur. Wee1'in inhibe edilmesiyle CDK1 ekspresyonunun arttırılabileceği, Wee1 inhibitörü olan adavosertib ile çeşitli sarkomalarda yapılan çalışmayla ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışmalar sonucunda CDK1 ekspresyonunun, hücrelerin proliferasyon yeteneğini düzenlediği görülmüştür.

G1 fazından S fazına geçişte rol oynayan CDK2 ile siklinA/E'nin düzensiz ifadesi meme, kolon ve prostat kanserleriyle ilişkilendirilmiştir. Siklin E'nin overekspresyonunun, hastalarda zayıf prognoza yol açtığı görülmüştür. CDK2 aktivitesinde meydana gelen düzensizlikler, prostat kanserinin metastazıyla, KRAS mutasyonlu akciğer kanseriyle, hepatosellüler karsinoma (HCC) ile, akut miyeloid lösemi (AML) gibi kanser türlerinin gelişimiyle ilişkilidir (Łukasik vd., 2021). CDK2 ve PI3K inhibitörlerinin sinerjik

etkileşimleri glioma ve kolorektal kanser hücrelerinde apoptozla ilişkilendirilir. Diğer bir çalışmada CDK2 ve BCL-2 çift inhibisyonunun sinerjistik apoptozu teşvik etmiş ve anti tümör etki geliştirmiştir. CDK2 ve CDK4/6 inhibisyonunun, RB proteininde ekspresyon kaybına ve TNBC hücrelerinde proliferasyonun baskılanması yol açar. Bunun yanında TNBC’de CDK2 inhibisyonunun kemoterapi veya radyoterapi ile kombine edilmesi sonucu direnç gösteren tümörlerde yüksek etki görülmüştür.

Hem CDK4 hem de CDK6 üç tipi olduğu bilinen siklin D1, D2 ve D3 ile etkileşime girer. CDK4 ve CDK6, G1 fazının ilerlemesini ve G1 fazından S fazına geçişi yönlendirmektedir. CDK4/6’nın, retinoblastoma (Rb1) tümör baskılayıcı proteinini fosforillemesiyle gen ekspresyonu, kanser hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve dönüşümü regüle edilir. CDK4/6 ifadesindeki amplifikasyonlar liposarkom ve glioblastoma ile ilişkilendirilmiştir. Liposarkomların %85’inde hem CDK4 hem de CDK6’nın yüksek ekspresyonu görülmüştür. Yüksek CDK4 ekspresyonunun liposarkomların ameliyatla tedavi sonrası nüks etme oranını önemli ölçüde artırdığı, bunun yanında düşük ekspresyonunun daha iyi bir prognoza ve yüksek sağ kalıma neden olduğu da ortaya konmuştur. İyi bilinen bir seçici CDK4 inhibitörü olan ribosiklible yapılan çalışmada tümör hücrelerinin ribosiklible 24 saatlik inkübasyonu sonrasında tümör hücrelerinin, G0 ve G1 fazında durakladığı ve böylece proliferasyonunun sınırlandırıldığı görülmüştür (Zhang vd., 2014).

Medüller tiroid kanseri (MTC) ve hepatoselüler karsinoma (HCC) gibi birçok malign kanser türü yüksek CDK5 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. CDK5, hücre döngüsü, apoptoz ve DNA tamiri gibi birçok sinyal yolunun regülasyonunda rol oynadığı bilinen CK1 (kazein kinaz 1)’i fosforilleyerek dolaylı olarak regüle eder. CDK5’in knock-out edilmesinin fare embriyolarında letal sonuca yol açtığı görülmüştür. Hepatoselüler karsinomada CDK5’in inhibisyonu anjiyogenezi de inhibe eder bu da CDK5’in inhibisyonunun yüksek anjiyogenez kapasitesine sahip kanser türlerinin tedavisi için etkili bir hedef olduğunu ortaya koyar (Herzog vd., 2016). Yapılan çok sayıda çalışmada, CDK5’in, mide, prostat, akciğer, pankreas, meme ve melanom dahil olmak üzere bazı kanser türlerinin metastazını da düzenlediğini ortaya koymuştur. CDK5, PI3K Akt yolağını uyararak hücre göçünü teşvik eder.

CDK7 inhibisyonu, RNAPII aracılı fosforilasyonu inhibe ederek hayati genlerin mRNA ekspresyonunu sınırlandırır. Normal hücrelerin apoptotik uyaranlara karşı düşük hassasiyete sahip olduğu bilinirken tümör hücreleri apoptotik uyaranlara karşı oldukça hassastır. CDK7 aracılı RNAPII inhibisyonu, apoptotik inhibitörleri baskılar ve apoptoza yol açar. Yapılan çalışmalarda, CDK7'nin BS-181 ile inhibisyonu sonucunda, gastrik kanser hücrelerinin proliferasyon, göç ve invazyon oranlarında azalma görülmüştür (B.-Y. Wang vd., 2016).

Son yıllarda çeşitli tümör tipleriyle yapılan immünohistokimyasal analizler, tümör hücrelerinde CDK7 ekspresyonunun normal hücrelere kıyasla arttığını göstermektedir (Yuan vd., 2022). CDK7'nin hücre bölünmesi ve çoğalması sürecinin sorunsuz bir şekilde ilerlemesi için hem hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve transkripsiyonda oynadığı kilit rol daha önceki bölümlerde detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

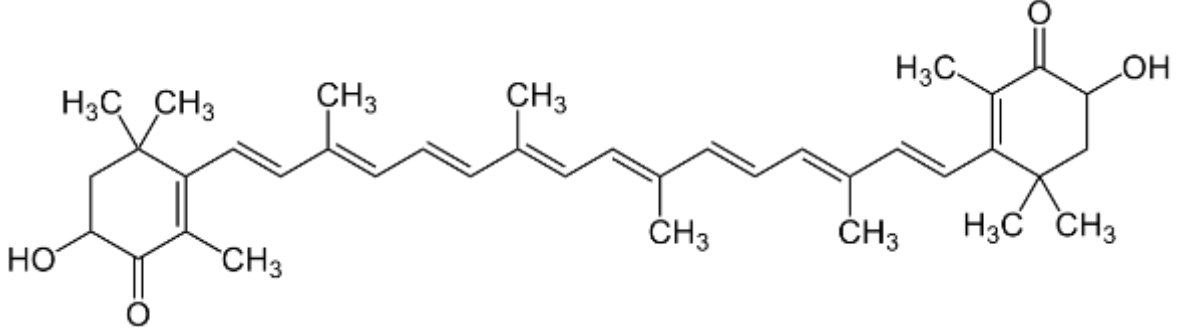
1.8. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkiler, algler ve bazı fotosentetik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen 850'den fazla çeşidi olan doğal biyolojik pigmentlerdir. En iyi bilinen karotenoidler, β - ve α - karoten, lutein, astaksantin (ATK), likopen gibi pigmentlerdir. İnsan kanı serumunda bulunan 6 çeşit karotenoid vardır ve yapılan çok sayıda çalışmada karotenoidlerin başta kanser olmak üzere birçok hastalığın gelişimini önlemede olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Çoğu karotenoid, 40 karbonlu iskelete bağlı 8 izopren biriminden oluşur ve iki grupta sınıflandırılırlar; α -karoten, β -karoten ve likopenleri içeren karotenler ve astaksantin, lutein, zeaksantin ve fukoksantinleri içeren ksantofiller. Karotenler yalnızca karbon ve hidrojen atomlarından oluşurken, ksantofiller ise en az 1 oksijen atomu içermektedir.

1.8.1. Astaksantin

Astaksantin, somon balığı ve kabuklu deniz canlıları yetiştiriciliğinde pigmentasyon kaynağı olarak kullanılan kırmızı renkli pigmenttir. 1938 yılında Kuhn ve arkadaşları tarafından ıstakozlarda keşfedilmiş olup başlangıçta deniz ürünleri yetiştiriciliğinde tek pigmentasyon maddesi olarak kullanılmıştır (Fakhri vd., 2018). ATK, fitoplanktonlar, karides, ıstakoz, somon gibi deniz canlılarından elde edilebileceği gibi, yeşil bir mikroalg

türü olan *Haematococcus pluvialis* de insan diyetine astaksantin sağlamada en yüksek kaynağı oluşturmaktadır. Uzun bir lipofilik zincire ek hidrofilik uçlarında keton ve hidroksil gruplarını içerir (Şekil 6).



Şekil 6. Astaksantin kimyasal yapısı

Organizmalar normal metabolik aktiviteleri sonucunda, oksidatif moleküller, serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Fakat fazla üretim sonucunda biriken bu metabolik ürünlerin diğer çeşitli hücresel bileşenlerle reaksiyonlara girebilme potansiyeli organizma için tehlike oluşturur (Higuera-Ciapara vd., 2006). Organizmalarda sürekli olarak devam eden bu serbest radikal birikimi oksidatif stres olarak bilinir. Oksidatif stres, kanser ve Alzheimer başlıca olmak üzere birçok hastalığın ilerlemesiyle ilişkilendirilir. İnsan vücudu, oksidatif stresi azaltmak ve kontrol etmek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi enzimatik antioksidanları üretir. Antioksidanlar, ya serbest radikallerle etkileşime girerek onlardan zararsız bileşikler üretme yoluyla ya da onların oksidasyon reaksiyonları bozarak serbest radikalleri vücuttan uzaklaştırır (Aslankoç vd., 2019).

Astaksantin, yağda çözünen antioksidanlardan biridir. Karotenoidlerin ve özellikle de astaksantin kansere karşı aktivitesi son yıllarda oldukça rağbet gören bir araştırma konusudur ve B-karoten, kantaksantin gibi diğer antioksidan karotenoidlere kıyasla daha etkili antitümör aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Astaksantin, meme kanseri, melanoma, prostat kanseri ve akciğer kanseri gibi tümörlerde kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellediği ve hücre ölümünü indüklediği sıçanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yasui vd., 2011). Astaksantin ana kaynaklarından biri olan *Haematococcus pluvialis* özütüyle yapılan başka bir çalışmada, ATK'nın hücre döngüsü ilerlemesini inhibe

ederek hücreleri apoptoz yolağına soktuğı ve böylece kolon kanseri hücrelerinin gelişimini engellediğı gösterilmiştir (Palozza vd., 2009).



Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışması kapsamında, karotenoid türevlerinden Astaksantin hücre proliferasyonunu geciktirici etkilerinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, özellikle gıda takviyesi olarak en yaygın kullanılan karotenoidlerden biri olan astaksantin doğal bileşiğinin, CDK7 üzerindeki potansiyel inhibitör etkilerinin belirlenmesi ve hücre bölünmesini durdurma potansiyeline ilişkin moleküler mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Moleküler Docking Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında potansiyel inhibitör molekül olan Astaksantin hedef protein CDK7'ye moleküler yerleştirmesi MGLTools (Molecular Graphic Laboratory) AutoDock 4.0 (<https://autodock.scripps.edu/>) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

İlk etapta FDA onaylı ve klinik denemelere konu CDK7 inhibitörleri literatür taramaları neticesinde belirlenmiştir. Belirlenmiş her bir CDK7 inhibitörüne ait sdf, dosyaları NIH PubChem ara yüzünden elde edilmiştir. Ardından, ATK doğal bileşiğinin ve diğer inhibitörlerin pdb dosyası pdbqt dosyasına dönüştürülerek Gasteiger yükleri ile yüklenmiş ve hareketli bağları belirlenerek pdbqt dosyası şeklinde kaydedilmiştir. CDK7 3 boyutlu (3D) yapıları (monomerik CDK7 yapısı PDB ID: 1UA2 ve CAT kompleksine ait CDK7 kompleks yapısı PDB ID: 6XD3) RCSB PDB (Protein Data Bank)'den çekilmiş, her biri üzerindeki su molekülleri ve ligand bileşikler uzaklaştırılmış, polar Hidrojen ilaveleri gerçekleştirilerek Kollman yükleri ile yüklendikten sonra enerji minimizasyonlarını takiben pdbqt dosyaları, moleküler yerleştirme çalışmaları öncesinde hazırlanarak kaydedilmiştir.

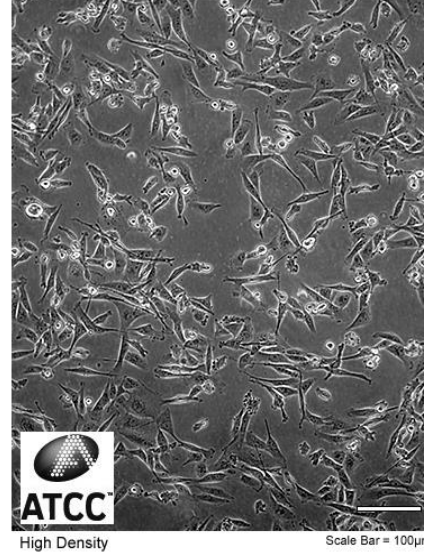
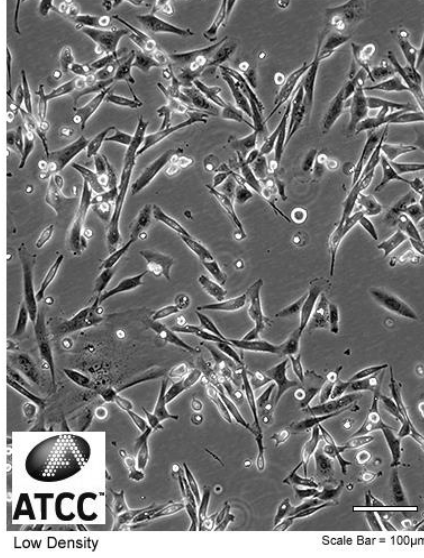
Olası yanılgıların önüne geçebilmek ve *in silico* verilerin güvenilirliğini artırmak ve ATK in gerçekten güçlü bir CDK7 inhibitörü olduğuna dair bulguları güçlendirmek amacıyla, ATK ve ilgili bilinen ligandların hem monomerik CDK7 proteinine hem de transkripsiyon regülasyonunda yer alan ve 3 proteinin bir araya gelmesiyle fonksiyonel hale dönüşen CAT kompleksine olan bağlanma afiniteleri, moleküler yerleştirme çalışmaları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında kullanılan hücreler, MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri (ATCC, HTB-26) ve MCF10A insan fibroblastik meme hücreleri (ATCC, CRL-10317)'dir (Şekil 7 ve Şekil 8). MDA-MB-231 hücreleri %89 RPMI medyasına ilave %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (PS) içeren medyada kültür edildi. MCF10A hücreleri ise %89 DMEM medyasına ilave %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren medyada kültür edildi. Hazırlanan kültür medyaları 0,22

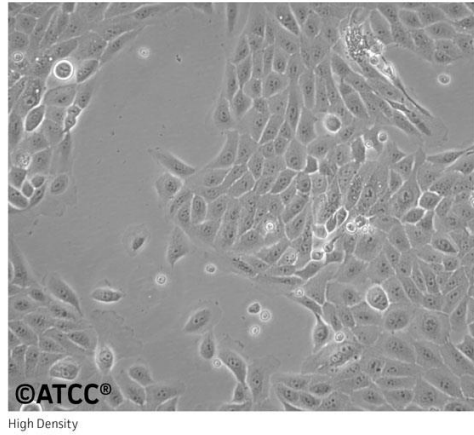
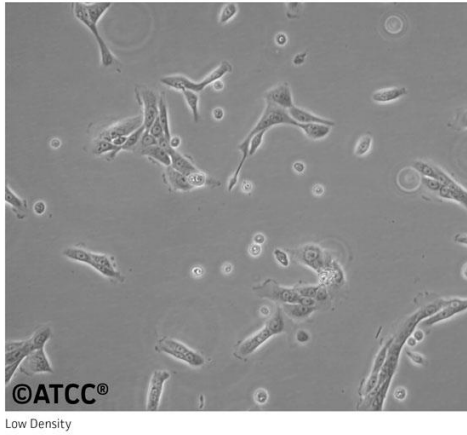
μm por genişliğine sahip filtrelerden geçirilerek steril edildi. Kùltürler 37°C 'de ve %5 CO_2 içeren etüvlerde inkübe edildi. Kùltür edilen hücreler konfluentlik durumlarına göre yaklaşık 3-5 günde bir pasajlanarak çoğaltıldı. Hücreler pasajlanırken öncelikle tripsin ile muamele edilerek flasktan kaldırıldı. Tüm hücreler $230\times g$ 'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Hücre canlılığı her pasajda tripan mavisi yöntemi ile ölçüldü.

ATCC Number: **HTB-26**™
Designation: **MDA-MB-231**



Şekil 7. MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri (ATCC, HTB-26)'nin düşük ve yüksek hücre yoğunluğunda mikroskop görüntüleri

ATCC Number: **CRL-10317**
Designation: **MCF-10A**



Şekil 8. MCF10A insan fibroblastik meme hücreleri (ATCC, CRL-10317)'nin düşük ve yüksek hücre yoğunluğunda mikroskop görüntüleri

2.2.1. Hücrelerin Dondurulması

Tez çalışmaları sırasında kullanılacak hücreler istenilen pasaj numarasına ulaştığında MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri için sırasıyla %10 DMSO ve %7.5 DMSO içeren kültür medyasında dondurularak önce -80 °C’de bir gece bekletildi. Ardından hücreler -196 °C’deki sıvı azot tankında saklandı. Tez çalışmalarında deneyler sıvı azot tankında stoklanan bu hücreler çözülerek yapıldı. Tüm tez boyunca kullanılan hücelere ait pasaj numaraları MDA-MB-231 için 12 ve MCF10A için 9’dur.

2.2.2. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi

Dondurulan hücreler çözülürken, tanktan alınan tüpler 37 °C’deki su banyosunda 2-3 dakika çözülmesi için inkübe edildi. Çözünen hücreler taze kültür medyası içerisine aktarıldıktan sonra santrifüj edilerek DMSO’dan uzaklaştırıldı.

2.3. Astaksantin Molekülü İçin Ana Stok Hazırlanması

Tez çalışmalarında kullanılan Astaksantin (ATK) molekülü (SML0982-50MG) Sigma-Aldrich’ten satın alındı. Kullanılan Astaksantin $\geq 97\%$ HPCL saflığına sahiptir ve *Blakeslea trispora*’dan elde edilmiştir. Astaksantin DMSO içerisindeki çözünürlüğü 1 mg/ml’dir. Deneylerde kullanmak üzere 1 mM ATK hazırlandı, alikotlandı ve kullanıma kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2.4. Astaksantin Muamelesi Sonrası MTT ile Sitotoksisite Tayini

Astaksantin 0, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M dozlarında sitotoksisite deneyleri MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2-5-diphenyltetrazolium bromür, 5 mg/ml) metoduyla yapılmıştır. Deney 24, 48 ve 72 olmak üzere 3 farklı saat için düzenlendi. Her bir doz için en az üç deney içi tekrar hazırlandı. Her bir deney bağımsız olarak üç kere tekrar edildi.

- Hücreler, 96 gözlü plakalara, her kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 37 °C etüvde %75 konfluent oluncaya dek inkübe edildi.
- Hücreler istenilen konfluentliğe ulaştığında 0, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M dozlarında ATK ile muamele edildi ve 37 °C’de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

- İnkübasyonlardan sonra, kuyucuklardaki ATK içeren medya uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 10 µL MTT içeren taze medya ilave edildi.
- Hücreler 4 saat boyunca 37 °C’de %5 CO₂’de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi ve gece boyunca oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından renk değişimi önce mikroskop altında gözlemlendi, ardından mikropipla okuyucu kullanılarak 570 nm’de absorbans ölçüldü.

2.5. SPSS Analizi

ATK muamelesinden sonra belirlenen doz ve zaman sonuçlarına ait absorbans değerleri tek bir Excel dosyası altında birleştirildi. Hücre canlılıkları kontrole göre bağıl olarak hesaplandı ve çizilen canlılık grafiği üzerinden IC₅₀ değerleri hesaplandı. Hücre canlılığına ait veriler SPSS programına aktarıldı ve istatistiksel olarak hangi doz ve zamanın anlamlı olduğunu belirleyebilmek için UNIANOVA testi uygulandı.

2.6. Astaksantin Hücre Siklusu Üzerindeki Etkisinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Hücre döngüsü analizi MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin ATK belirlenen konsantrasyonlarıyla muamele edildikten sonra propidyum iyodür (PI) (Sigma Cat #P4170) ile boyanmasıyla analiz edildi. Hücre döngüsü analizindeki metot, hücrelerin G2/M fazında içerdiği DNA miktarının, G1 fazındakinden 2 katı fazı olmasına dayanır. PI ile boyanan hücreler, G2/M fazında, G1 fazında verdiğinin iki katı fazla ışıma verirler. Deneyde Astaksantin 0, 5 ve 10 µM dozları kullanıldı ve deney 48 saat için düzenlendi. Analiz BD Biosciences, Accuri C6 akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

- Hücreler 5x10⁵ olacak şekilde T-25 flasklara ekildi ve 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ sahip kültür ortamında inkübe edildi.
- 24 saat sonra hücreler üzerindeki kirli medya içeriği atıldı ve hücreler 4’er mL PBS ile yıkandı.
- Hücrelere astaksantin son konsantrasyonu 5 ve 10 µM olacak şekilde muamele yapıldı ve hücreler 48 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ sahip kültür ortamında inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrasında hücreler üzerindeki ilaç içeren kirli medya uzaklaştırıldı ve flasklar 4'er mL PBS ile yıkandıktan sonra hücreler ile muamele edildi.
- Tripsinizasyon işlemi 37°C ve %5 CO₂ içeren etüvde 5 dakika uygulandı. 5 dakika muamele sonrasında tripsin aktivitesini inhibe etmek için flasklara taze medya eklendi.
- Tüm hücre ve medya içeriği 15 mL'lik falkonlara aktarıldı ve 230xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile 3 kez yıkandı. Her bir yıkamada hücreler 230xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Son yıkama sonrasında hücreler 1:1 oranında tripan mavisini ile boyanarak otomatik sayıcıda hücre sayımı gerçekleştirildi.
- Hücre sayımı sonrasında her bir doza ve saate ait 1.0x10⁶ hücre, hücre döngüsü analizi için fikse edilmek üzere 1.5 mL'lik ependorflara aktarıldı. Ayrıca 1.0x10⁶ hücre de qPCR çalışmalarında kullanılmak üzere RNA izolasyonu için aynı bir ependorfta toplandı.
- Pellet 300 µL soğuk PBS ile iyice çözüldükten sonra, her bir ependorfun üzerine önceden -20°C'de soğutulmuş %100 EtOH eklendi ve hücreler +4°C'de gece boyu fikse edildi.
- Gece boyu fikse edilen hücreler 850xg'de 5 dakika santrifüj edilerek üzerindeki etanol ve PBS içeriğinden temizlendi.
- Hücre pelleti 50 µL RNaz (100 µg/mL) ile 15 dakika boyunca 37°C'de muamele edildi. RNaz muamelesinden sonra 230xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Her bir hücre pelletinin üzerine 200 µL PI (50 µg/mL) eklendi ve hücrelerin boyanması için 30 dakika +4°C'de bekletildi.
- PI ile boyanan hücreler 230xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra akım sitometrisinde analiz edilmek üzere 500 µL PBS içerisine alındı.
- Akım sitometrisinde her okumada 40.000 hücre sayıldı.

3. BULGULAR

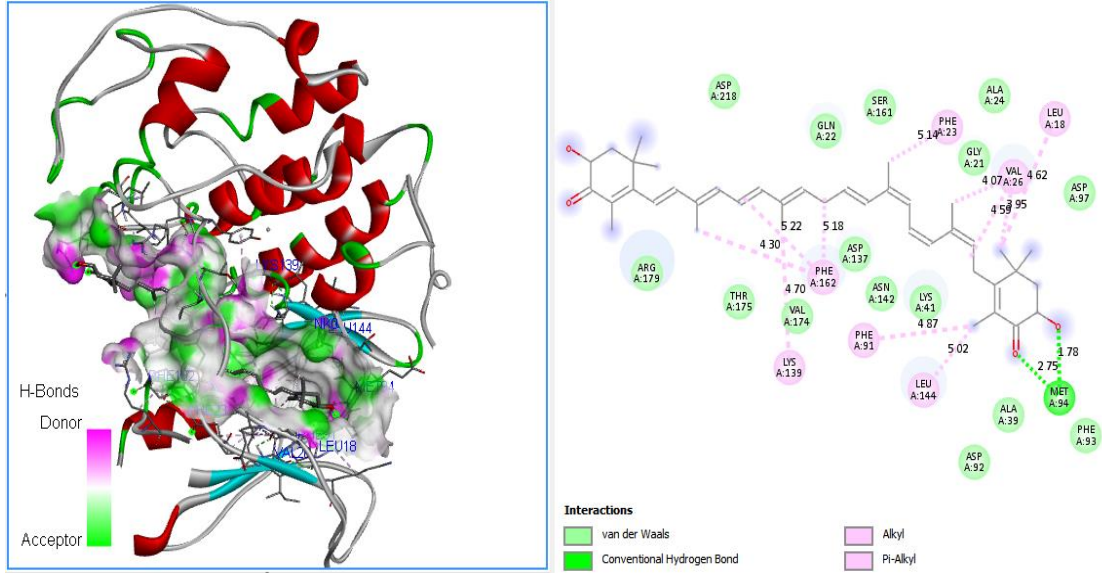
3.1. Moleküler Docking Çalışmaları

Tablo 1. FDA onaylı CDK7 inhibitörlerinin ve Astaksantin'in CDK7'yi inhibe etme potansiyellerinin bağlanma enerjilerinin AutoDock4.0 programı ile moleküler yerleştirme sonucunda karşılaştırmalı listesi

İnhibitör Moleküller	1UA2 Bağlanma Enerjisi (Kcal/Mol)	Hidrojen Bağı Sayısı	6XD3 Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Hidrojen Bağı Sayısı
LY34051505	-9,2	2	-7,5	1
LDC4297	-9,6	3	-8,4	5
BS181-HCL	-7,8	3	-8,4	3
Samuraciclib	-9	3	-8,3	1
THZ1	-10,2	4	-10	1
THZ1-HCL	-10,2	4	-9,6	1
THZ2	-9,8	2	-9,2	1
YKL-5-124	-9,4	2	-9,1	2
Astaksantin	-9,1	2	-9,6	2

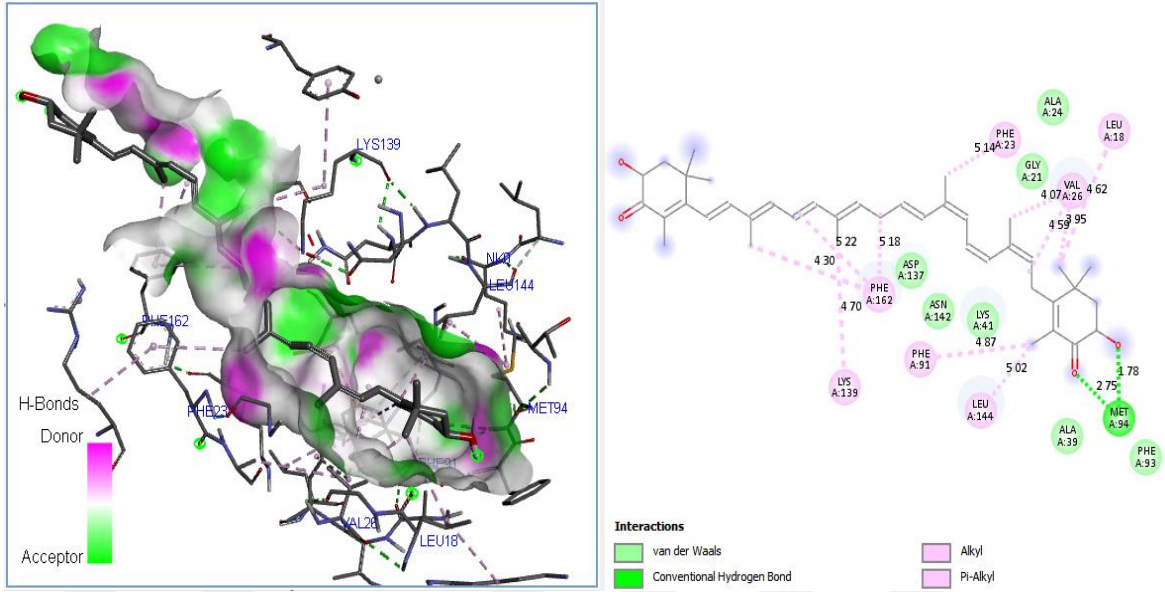
Yapılan karşılaştırmalı değerlendirmeler neticesinde; ATK bileşiğinin 1UA2 ve 6XD3 3D yapıları üzerinde ATP bağlanma bölgesine düşük bağlanma enerjileri varlığında sırasıyla

-9,1 ve -9,6 kcal/mol yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği ve ATK'nın güçlü bir CDK7 inhibitörü olma potansiyelinde olduğu tespit edilmiştir. Docking ile yapılan moleküler yerleştirme sonucu astaksantin CDK7 üzerindeki inhibisyon potansiyeli BIOVIA Discovery Studio programı kullanılarak görselleştirilmiştir. CDK7'nin 1UA2 monomerik yapısına ATK'nın moleküler yerleştirme ile hedeflenmesi sonucunda elde edilmiş sonuçlara dair ilgili görseller Şekil 9'da verilmiştir.



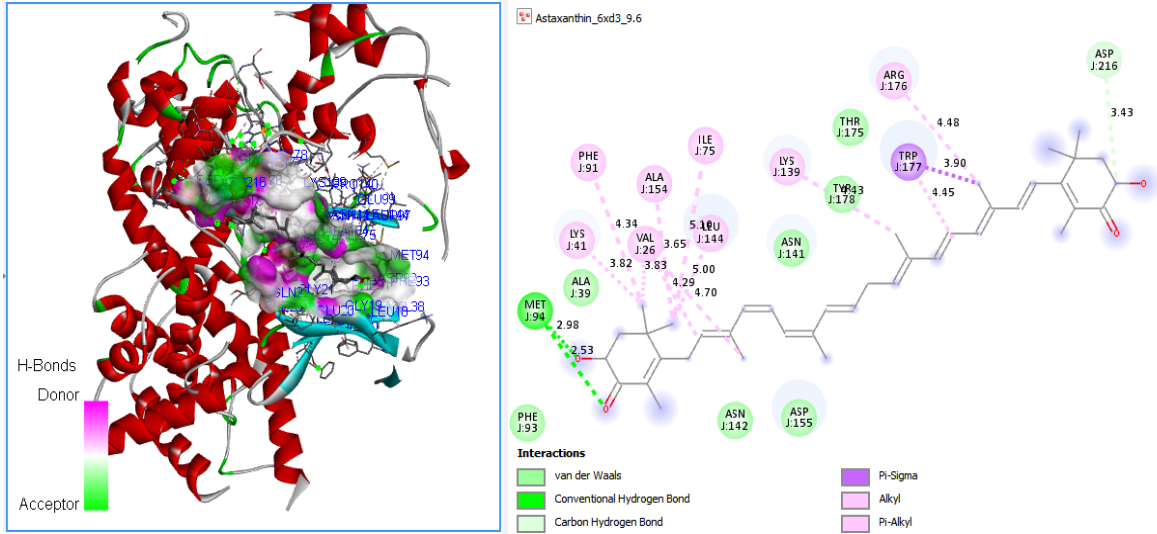
Şekil 9. AutoDock4.0 tabanlı moleküler docking çalışmaları sonunda belirlenmiş 1UA2 (CDK7)-ATK kompleksine ait moleküler yerleştirme

Bu etkileşim esnasında oluşması muhtemel biyokimyasal enzim-ligand etkileşimlerinin şematize edilmiş 2 boyutlu görseli Şekil 11'de verilmiştir. Astaksantin bileşiğinin CDK7 apoprotein yapısında etkileşime girdiği amino asit rezidüleri, Şekil 10 üzerinde etiketlenmiştir. 2 boyutlu görseli üzerinden yapılan incelemelerde, Astaksantin eksternal oksijeni ile Hidroksil grubunun Met94 rezidüsü ile 2 hidrojen bağı oluşturma yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir.

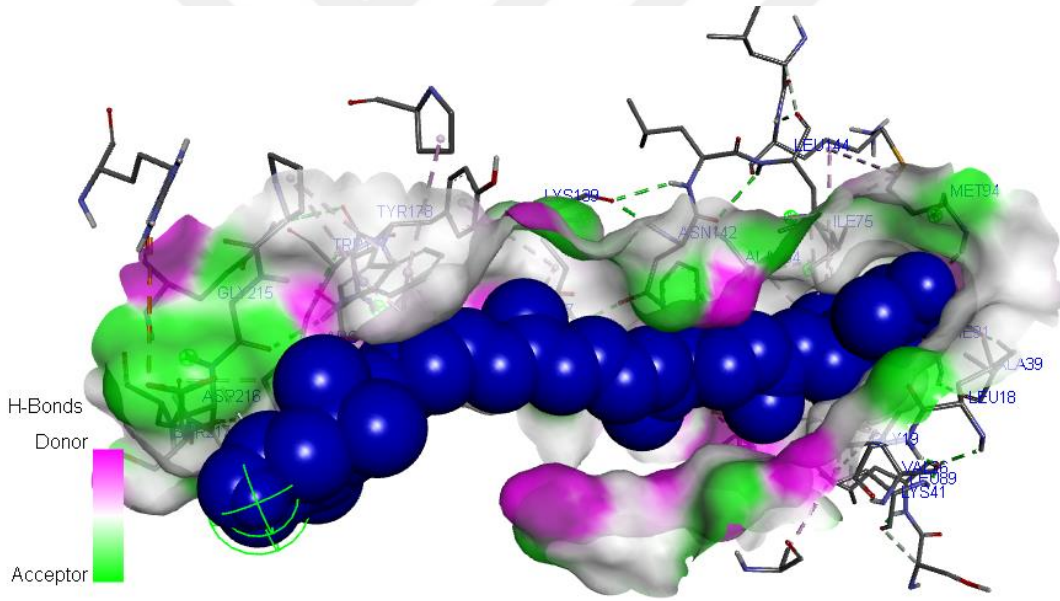


Şekil 10. 1UA2-ATK Enzim-ligand kompleksine ait biyokimyasal etkileşimlerin şematize edilmiş 2 boyutlu görseli

Yapılan moleküler yerleştirme sonucu bu etkileşim esnasında oluşması muhtemel biyokimyasal enzim (6XD3)-ligand etkileşimlerinin şematize edilmiş 2 boyutlu görseli Şekil 11’de verilmiştir. Astaksantin bileşiğinin CDK7 apoprotein yapısında etkileşime girdiği amino asit rezidüleri, şekil üzerinde etiketlenmiştir. Astaksantin ligandının CAT kompleksinin aktif bölgesindeki yerleşimi ve eksternal oksijeni ile Hidroksil grubunun aktif bölgede konumlu Met94 rezidüsü ile 2 hidrojen bağı oluşturma yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11).



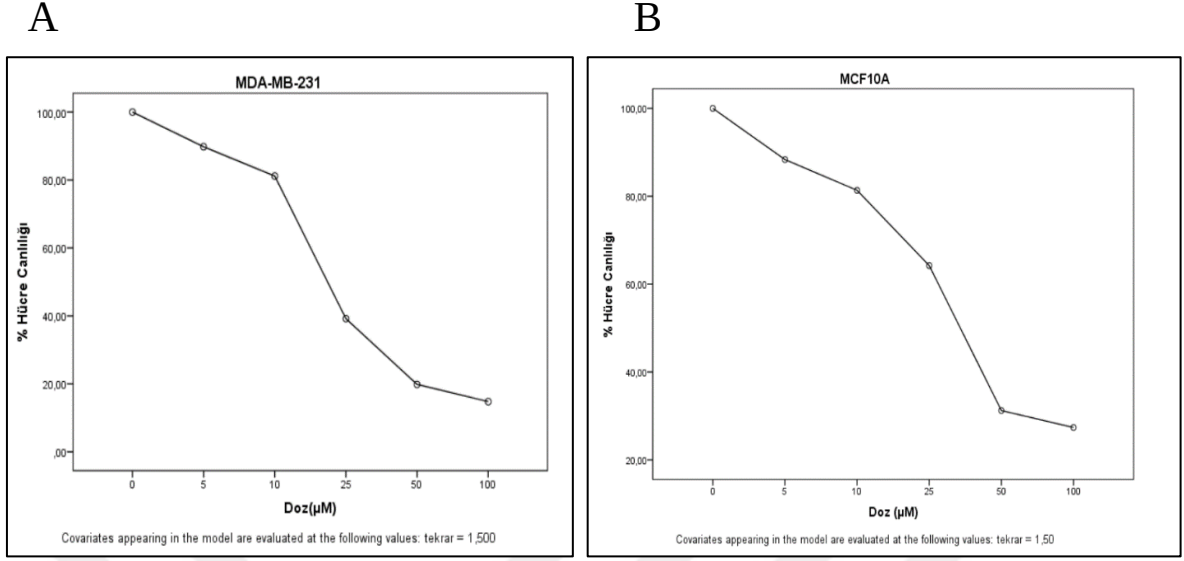
Şekil 11. AutoDock4.0 tabanlı moleküler docking çalışmaları sonunda belirlenmiş 6XD3 (CDK7)-Astaksantin kompleksine ait moleküler yerleştirme görseli



Şekil 12. 6XD3-ATK Enzim-ligand kompleksine ait biyokimyasal etkileşimlerin şematize edilmiş 2 boyutlu görseli

3.2. MTT ile Sitotoksosite Tayini Deneyi ve SPSS Analizi

Astaksantin MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerindeki sitotoksik etkisi daha önce Bölüm 2.4 (Astaksantin Muamelesi Sonrası MTT ile Sitotoksosite Tayini)'de detaylıca açıklanan MTT analizi ile değerlendirildi. MDA-MB-231 (Şekil 13A) ve MCF10A (Şekil



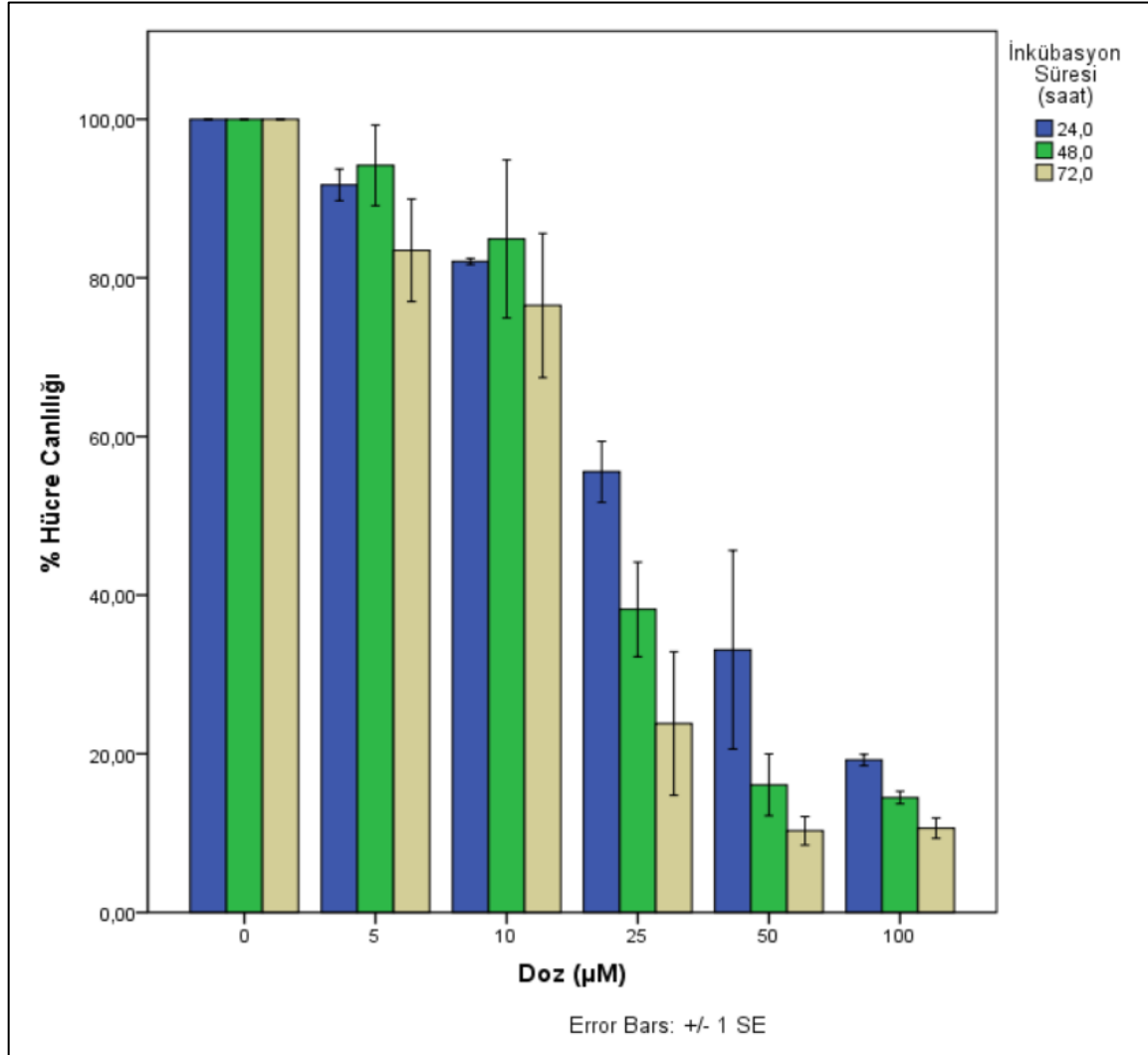
13B) hücrelerinin canlılığında astaksantin muamelesinden sonra gözlenen düşüş IC_{50} değeri ile ifade edildi.

Şekil 13. Astaksantinın meme kanseri hücreleri (A) ve normal hücreler (B) üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren % hücre canlılığı grafiği

MDA-MB-231 hücresinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri için IC_{50} değeri sırasıyla 18.21 μ M, 12.50 μ M ve 9.89 μ M olarak hesaplandı. MCF10A hücrelerine ise IC_{50} değeri 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri için 25.56 μ M, 15.22 μ M ve 12.92 μ M olarak hesaplandı. Bu sonuçlar neticesinde astaksantinın meme kanseri hücrelerini, sağlıklı meme hücrelerine kıyasla daha düşük bir konsantrasyonda öldürdüğü selektif indeks (SI) parametresi ile yapılan analizler ile ortaya konmuştur. Selektif indeks IC_{50} , normal hücre / IC_{50} kanser hücresi formülü ile hesaplanmaktadır. Bu formüle göre MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri için SI değeri 24 saat inkübasyon süresi için 1.40 ($MCF10A\ IC_{50}=25.56 / MDA-MB-231\ IC_{50}=18.21$), 48 saat inkübasyon süresi için 1.21 ($MCF10A\ IC_{50}=15.22 / MDA-MB-231\ IC_{50}=12.50$) ve 72 saat inkübasyon süresi için 1.30 ($MCF10A\ IC_{50}=12.92 / MDA-MB-231\ IC_{50}=9.89$) olarak hesaplanmıştır.

Her iki hücre için astaksantinle yapılan 2 tekrarlık MTT sonuçlarına ait absorbans ölçümleri tek bir Excel dosyasında birleştirildikten sonra hücre canlılığı belirlendi. Belirlenen hücre canlılıkları SPSS programı ile analiz edildi. Şekil 14’de meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231’e artan konsantrasyonlarda astaksantin muamelesinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerindeki hücre canlılığının SPSS analizlerine ait grafik verilmiştir. Bu analizlere göre astaksantinın tüm inkübasyon süreleri için 25 μ M konsantrasyonun

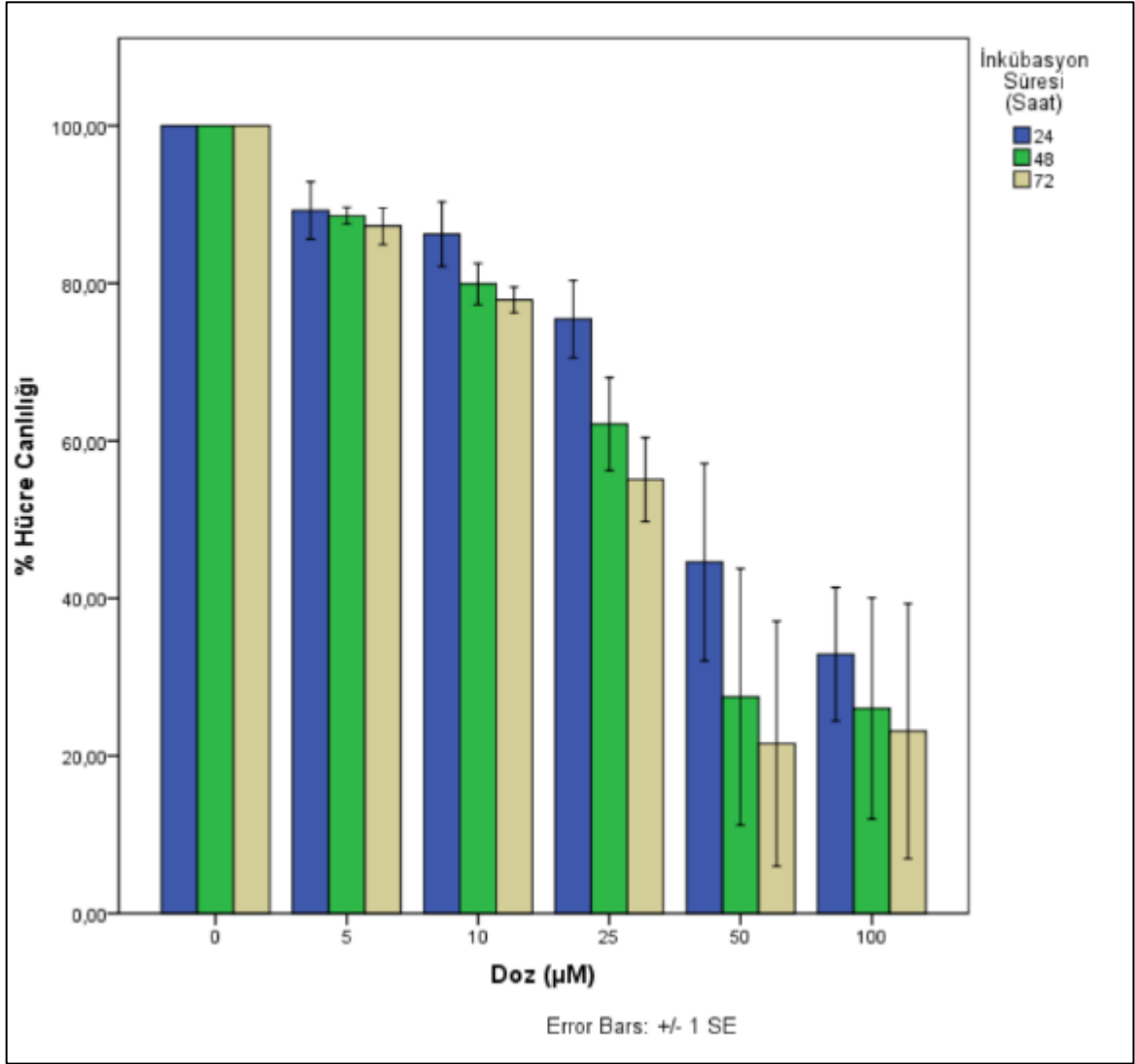
MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etki yarattığı belirlenirken, 10 μ M konsantrasyonunda hücrelerin canlılığını koruduğu ancak artan dozlarda hücrelerin giderek ölmeye başladığı görülmüştür.



Şekil 14. Astaksantin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimini gösteren grafik

Sağlıklı meme hücre hattı MCF10A'ya artan konsantrasyonlarda astaksantin muamelesinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerindeki hücre canlılığının SPSS analizlerine ait grafik Şekil 15'de verilmiştir. Bu analizlere göre astaksantin tüm inkübasyon süreleri için 50 μ M konsantrasyonun MCF10A sağlıklı meme hücrelerinde sitotoksik etki yarattığı belirlenirken, 25 μ M konsantrasyonda hücrelerin canlılığını koruduğu 50 μ M'dan sonraki dozlarda hücrelerin ölmeye başladığı görülmüştür. Neticede

astaksantinin sağlıklı hücelere kıyasla kanser hüceleri üzerinde seçici sitotoksositeye sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 15. Astaksantin MDA-MB-231 meme kanseri hücelerinde hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimini gösteren grafik

MDA-MB-231 hücre hattının astaksantin ile muamelesi sonucu SPSS istatistiksel analiz veri sonuçları Şekil 16'da verilmiştir. Yapılan analiz sonucu seçilen ATK doz konsantrasyonu ve saati doğrulamıştır.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: canlılık

LSD

(I) doz	(J) doz	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	5	10,2150*	4,56810	,038	,6178	19,8122
	10	18,8367*	4,56810	,001	9,2394	28,4339
	25	60,8100*	4,56810	,000	51,2128	70,4072
	50	80,1617*	4,56810	,000	70,5644	89,7589
	100	85,2217*	4,56810	,000	75,6244	94,8189
5	0	-10,2150*	4,56810	,038	-19,8122	-,6178
	10	8,6217	4,56810	,075	-,9756	18,2189
	25	50,5950*	4,56810	,000	40,9978	60,1922
	50	69,9467*	4,56810	,000	60,3494	79,5439
	100	75,0067*	4,56810	,000	65,4094	84,6039
10	0	-18,8367*	4,56810	,001	-28,4339	-9,2394
	5	-8,6217	4,56810	,075	-18,2189	,9756
	25	41,9733*	4,56810	,000	32,3761	51,5706
	50	61,3250*	4,56810	,000	51,7278	70,9222
	100	66,3850*	4,56810	,000	56,7878	75,9822
25	0	-60,8100*	4,56810	,000	-70,4072	-51,2128
	5	-50,5950*	4,56810	,000	-60,1922	-40,9978
	10	-41,9733*	4,56810	,000	-51,5706	-32,3761
	50	19,3517*	4,56810	,000	9,7544	28,9489
	100	24,4117*	4,56810	,000	14,8144	34,0089
50	0	-80,1617*	4,56810	,000	-89,7589	-70,5644
	5	-69,9467*	4,56810	,000	-79,5439	-60,3494
	10	-61,3250*	4,56810	,000	-70,9222	-51,7278
	25	-19,3517*	4,56810	,000	-28,9489	-9,7544
	100	5,0600	4,56810	,283	-4,5372	14,6572
100	0	-85,2217*	4,56810	,000	-94,8189	-75,6244
	5	-75,0067*	4,56810	,000	-84,6039	-65,4094
	10	-66,3850*	4,56810	,000	-75,9822	-56,7878
	25	-24,4117*	4,56810	,000	-34,0089	-14,8144
	50	-5,0600	4,56810	,283	-14,6572	4,5372

*p<0.05

Şekil 16. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına astaksantin muamelesi sonucu SPSS istatistiksel analizi veri sonuçları

MCF10A hücre hattının astaksantin ile muamelesi sonucu SPSS istatistiksel analiz veri sonuçları Şekil 17’de verilmiştir. Yapılan analiz sonucu seçilen ATK doz konsantrasyonu ve saati doğrulamıştır.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: canlılık

LSD

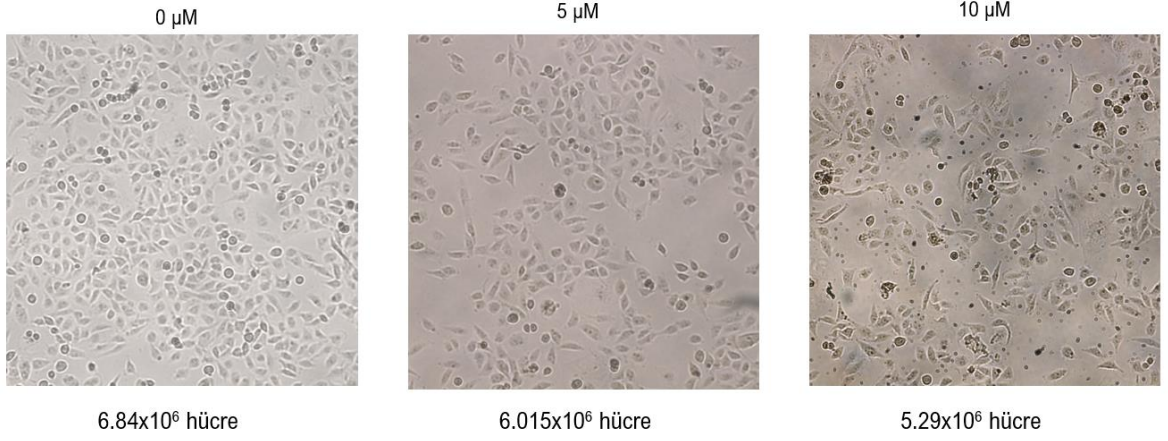
(I) doz	(J) doz	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	5	11,6550	7,01304	,114	-3,0789	26,3889
	10	18,6567*	7,01304	,016	3,9228	33,3905
	25	35,7817*	7,01304	,000	21,0478	50,5155
	50	68,7750*	7,01304	,000	54,0411	83,5089
	100	72,6300*	7,01304	,000	57,8961	87,3639
5	0	-11,6550	7,01304	,114	-26,3889	3,0789
	10	7,0017	7,01304	,331	-7,7322	21,7355
	25	24,1267*	7,01304	,003	9,3928	38,8605
	50	57,1200*	7,01304	,000	42,3861	71,8539
	100	60,9750*	7,01304	,000	46,2411	75,7089
10	0	-18,6567*	7,01304	,016	-33,3905	-3,9228
	5	-7,0017	7,01304	,331	-21,7355	7,7322
	25	17,1250*	7,01304	,025	2,3911	31,8589
	50	50,1183*	7,01304	,000	35,3845	64,8522
	100	53,9733*	7,01304	,000	39,2395	68,7072
25	0	-35,7817*	7,01304	,000	-50,5155	-21,0478
	5	-24,1267*	7,01304	,003	-38,8605	-9,3928
	10	-17,1250*	7,01304	,025	-31,8589	-2,3911
	50	32,9933*	7,01304	,000	18,2595	47,7272
	100	36,8483*	7,01304	,000	22,1145	51,5822
50	0	-68,7750*	7,01304	,000	-83,5089	-54,0411
	5	-57,1200*	7,01304	,000	-71,8539	-42,3861
	10	-50,1183*	7,01304	,000	-64,8522	-35,3845
	25	-32,9933*	7,01304	,000	-47,7272	-18,2595
	100	3,8550	7,01304	,589	-10,8789	18,5889
100	0	-72,6300*	7,01304	,000	-87,3639	-57,8961
	5	-60,9750*	7,01304	,000	-75,7089	-46,2411
	10	-53,9733*	7,01304	,000	-68,7072	-39,2395
	25	-36,8483*	7,01304	,000	-51,5822	-22,1145
	50	-3,8550	7,01304	,589	-18,5889	10,8789

*p<0.05

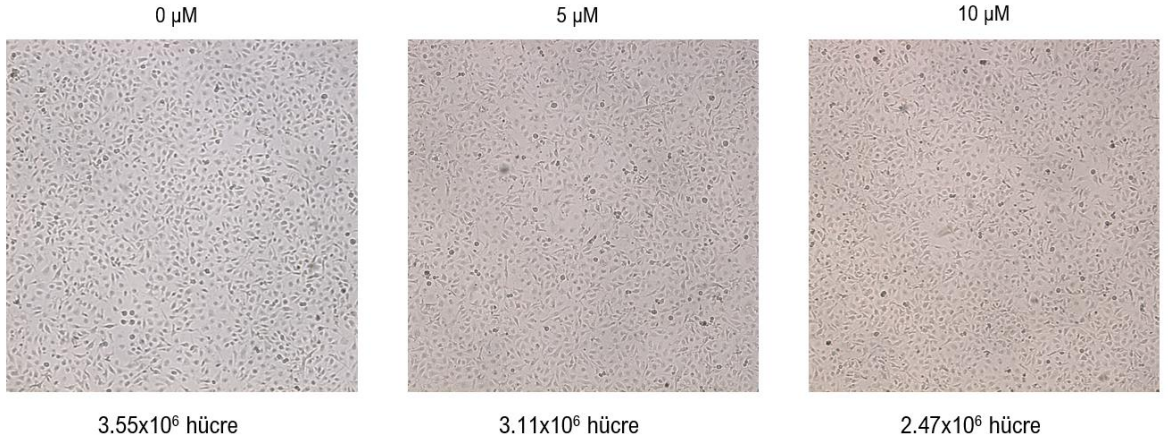
Şekil 17.MCF10A meme kanseri hücre hattına astaksantin muamelesi sonucu SPSS istatistiksel analizi veri sonuçları

3.3. Astaksantin Hücre Siklusu  zerindeki Etkisinin Akım Sitometrisi ile Belirlenmesi

Astaksantin MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarında, hücre döngüsü üzerindeki etkisi yapılan akım sitometrisi analizi ile belirlendi. Deneyde kontrol grubuna ek astaksantin 5 μ M ve 10 μ M dozları kullanıldı ve inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlendi. Inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerine ait mikroskop görüntüleri Şekil 18’de, MCF10A hücrelerine ait mikroskop görüntüleri ise Şekil 19’da verilmiştir.



Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinin ATK’nın 0, 5 ve 10 μ M artan dozları ile 48 saat inkübasyonu sonrası mikroskop görüntüleri



Şekil 19. MCF10A hücrelerinin ATK’nın 0, 5 ve 10 μ M artan dozları ile 48 saat inkübasyonu sonrası mikroskop görüntüleri

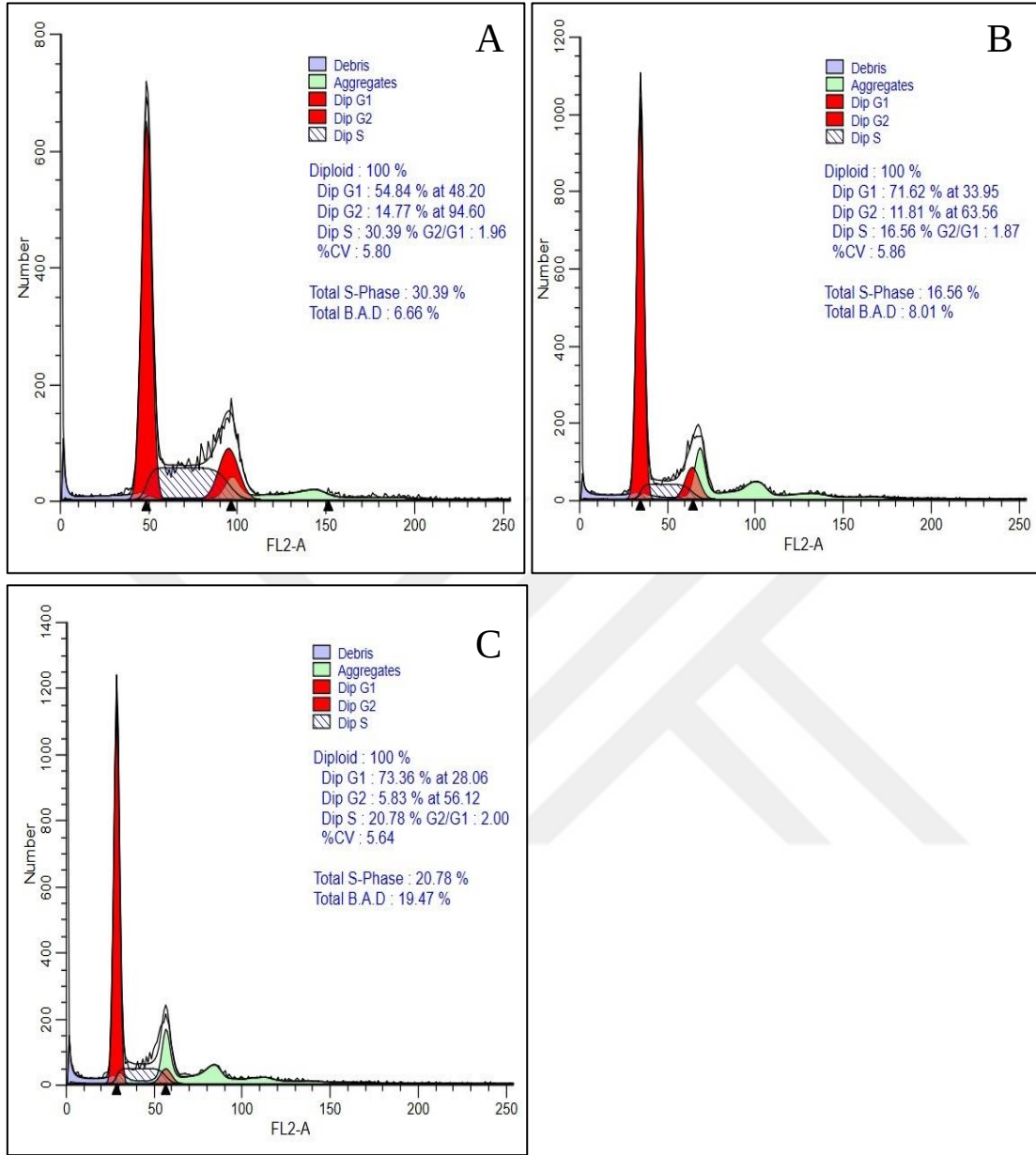
Hücrelere ait sonuçlar ModFit 3.0 Verity yazılımı kullanılarak analiz edildi ve analiz sonuçları Şekil 20 ve Şekil 21’de verildi. Hücre döngüsünün akım sitometresi ile analizi sonucuna ait veriler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin astaksantin ile 48 saat muamelesi sonrası hücre döngüsü analizi sonuçları

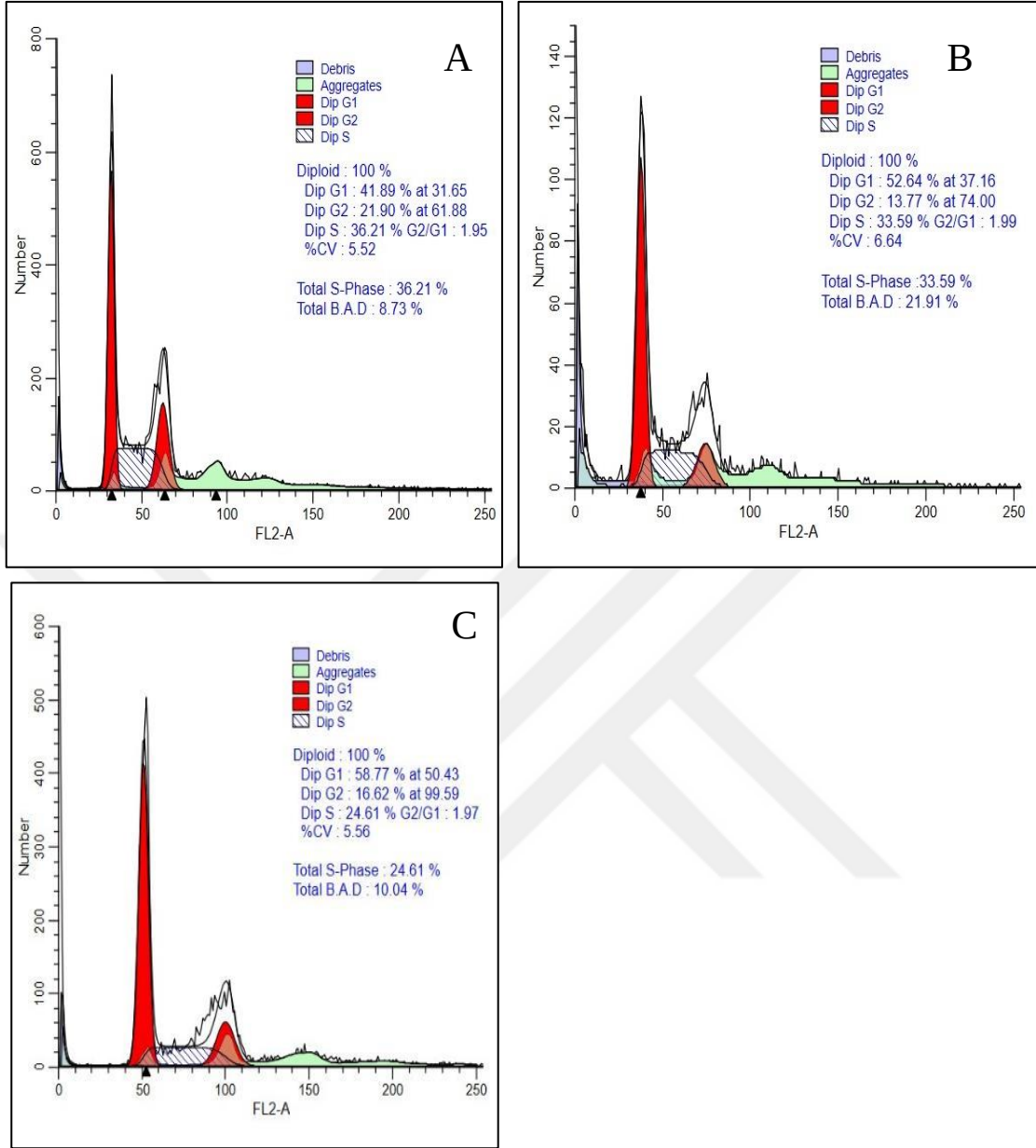
		Kontrol	5 μ M	10 μ M
MDA-MB-231	G0/1 Evresi	54.84 %	71.62 %	73.36 %
	S Evresi	30.39 %	16.56 %	20.78 %
	G2/M Evresi	17.77 %	11.81 %	5.83 %
MCF10A	G0/1 Evresi	41.89 %	52.64 %	58.77 %
	S Evresi	36.21 %	33.59 %	24.61 %
	G2/M Evresi	21.90 %	13.77 %	16.62 %

Akım sitometrisinden elde edilen yukarıdaki sonuçlar gösterdi ki; MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde (5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda) test edilmiş ATK muamelesi, G0/G1 fazındaki hücrelerde artışa, S ve G2/M fazlarındaki hücre popülasyonunda azalmanın eşlik ettiğini göstermiştir (Tablo 2). Bu sonuçlar ATK’in G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına neden olduğunu ve hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirdiğini göstermiştir. Bu durum, ATK’nın kanser hücrelerinin bölünmesini CDK7 inhibisyonu üzerinden yavaşlattığını bu sayede antitümör etkisini bu yolak üzerinden de gerçekleştirdiğine işaret etmektedir (Şekil 20).

Benzer şekilde; MCF10A sağlıklı hücre hattı üzerinde iki farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ATX muamelesinin, hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında duraksamalarını sağlamış ve bir sonraki hücre siklusuna geçişlerini geciktirdiği anlaşılmıştır (Şekil 21).



Şekil 20. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının ATK bileşiği ile 48 saat muamelesi sonrası hücre döngüsü analizi A) Kontrol grubu B) 5 μ M ve C) 10 μ M ATK



Şekil 21. MCF10A hücre hattının ATK bileşiği ile 48 saat muamelesi sonrası hücre döngüsü analizi A) Kontrol grubu B) 5 μ M ve C) 10 μ M ATK

Hücre döngüsü deney verileri değerlendirildiğinde, Astaksantin'in hem kanser hücrelerinde hem de sağlıklı hücrelerde G1 fazındaki hücre popülasyonunu arttırdığı belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarla; bilinen en yüksek antioksidan potansiyeline sahip karotenoidlerin bir türevi olan Astaksantin, meme kanseri üzerindeki potansiyel anti-proliferatif etkisi ortaya koyulmuştur. Yapılan *in silico* analizlerle, ATK'nın test edilmiş 2 farklı CDK7 kristal yapısına düşük bağlanma serbest enerjisi varlığında yüksek afinite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda Astaksantin ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinin hücre döngüsünün G1 fazında önemli ölçüde duraklatıldığı da doğrulanmıştır. Deneysel analiz bulguları, ATK'nın CDK7 üzerindeki anti-proliferatif etkisine dair öncü teorik çalışmalarla belirlenmiş umut verici sonuçları destekleyici deneysel veriler sağlamıştır.

Tez çalışması kapsamında hem sağlıklı meme hattı MCF10A hem de meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231, Astaksantin artan dozlarıyla muamele edilerek analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışma ile elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

1. Yapılan hücre canlılık deneyleri (MTT testleri) sonucunda, astaksantin meme kanseri hücresi MDA-MB-231 üzerinde MCF10A sağlıklı meme hücrelerine kıyasla seçici sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Daha önce bir CDK7 inhibitörü olan THZ1'in 100'den fazla kanser türünde yapılan inhibisyon çalışmalarında IC₅₀ değerlerinin 200 nM altında olduğu ortaya konmuşken ATK'nın hem MDA-MB-231 hem de MCF10A hücre hatlarındaki IC₅₀ değerinin 9.89 µM ve 12.92 µM'a kadar düştüğü belirlenmiştir (Kwiatkowski vd., 2014).
2. MTT hücre canlılık deneyleri sonrası elde edilen verilen SPSS programı kullanılarak istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur ve bu analizler sonrasında hem meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hem de sağlıklı hücre hattı MCF10A için astaksantin proliferasyonu durduran fakat hücreler için sitotoksik olmayan dozu ve inkübasyon saati belirlenmiştir. Sonuçta, 25 µM'dan yüksek dozlardaki ATK muamelesinin meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki yarattığı görülmüştür.
3. İstatistiksel olarak analiz edilen ve proliferasyonu durdurduğu düşünülen inkübasyon süresi ve dozlarda bir deney tasarımı yapılarak hücre döngüsü analizi

gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda kontrole kıyasla, 5 ve 10 μ M dozları hücre döngüsü analizi için etkili dozlar olarak seçilmiştir.

4. Hücre döngüsü analizi sonucunda Astaksantin artan dozlarda hem meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde hem de sağlıklı hücre hattı MCF10A üzerinde proliferasyonu durduran etkisi ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir.
5. ATK'nın hem meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde hem de sağlıklı hücre hattı MCF10A üzerinde G1 evresindeki hücre popülasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir akım sitometrisi deneyi ile belirlenmiştir. ATK'nın bu şekilde hücreleri duraksatıp bir sonraki hücre döngüsü fazına girişini aksattığı belirlenmiştir. Daha önce pan-CDK inhibitörleri olan Alvocidib ve Seliciclib ile yapılan çalışmalardakine benzer olarak hücre döngüsünde duraklama meydana geldiği sonucuna ulaşılmıştır (Whittaker vd., 2017). CDK7, diğer CDK proteinlerinin aktivasyonu yoluyla hücre döngüsünün ilerlemesini yönettiği için, CDK7 inhibitörlerinin hücre döngüsündeki CDK'lerin fosforilasyonunu azalttığı ve dolayısıyla hücre döngüsü duraklamasına neden olduğu şaşırtıcı bir sonuç değildir. YKL-5-124 inhibitörüyle yapılan çalışmada, hücre döngüsünün G1 fazında duraklamasına neden olduğu ve CDK2 fosforilasyonunda azalma gözlemlenmiştir (Olson vd., 2019). THZ1 ile yapılan bir başka çalışmada ise hücre döngüsünün G2/M fazında duraklatıldığı sonucuna varılmıştır (Chipumuro vd., 2014).
6. Elde edilen tüm sonuçlara bakıldığında Astaksantin yüksek potansiyelli bir inhibitör olabileceği hem hücre canlılık deneyleri hem de hücre döngüsü deneyleri ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ATK karotenoidinin bilinen insan sağlığını destekleyici anti-lipid peroksidasyonu, anti-inflamatuar, kardiyovasküler hastalıkları önleme, anti-diyabetik ve antikanser etkilerine ilave olarak yeni bir fonksiyonu daha bu çalışma kapsamında tanımlanmış oldu. Bu bağlamda, mevcut çalışma ATK'nın hücre döngüsünü yavaşlatma/geciktirme ve hücre bölünmesini duraklatma potansiyelini kısmen ortaya koyan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

5. ÖNERİLER

1. CDK7'nin ATK tabanlı inhibisyonu ve yaşlanma geciktirici potansiyellerine ilişkin mevcut bulgular, CDK7 bağımlı aşağı yolak genlerinin ATK muamelesi sonrası ekspresyon seviyelerinin analizi içinden yapılacak kantitatif PZR (qRT-PCR) analizlerinden elde edilecek bulgularla desteklenebilir.
2. ATK'nın CDK7 CAT kompleksi üzerindeki inhibe edici potansiyellerinin daha kantitatif olarak ifade edilebilmesi için, bir CDK7 inhibisyon tarama kiti tedarik edilebilir ve CDK7-ATK etkileşimi sonrası inhibisyon verileri daha net olarak elde edilebilir.
3. ATK-CDK7 kompleksinin X-ray kristalografi analizi gerçekleştirilerek, deneysel inhibisyon verilerine ilişkin yapı dinamikleri bilgisi ve ATK'nın CDK7 bağlanma modu ve biyokimyasal etkileşimleri daha sağlıklı olarak ortaya konabilir.
4. ATK'nın embriyonik gelişim evreleri üzerine etkisi test edilerek, ATK'nın hücresel siklusu yavaşlatma potansiyellerine ilişkin hayvan deneyleri gerçekleştirilebilir ve bu bağlamda ilk canlı deneyleri ile ATK'nın yaşlanma geciktirici potansiyeli net bir şekilde ortaya konabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abelson, R. P. (1997). A retrospective on the significance test ban of 1999 (If there were no significance tests, they would be invented). L. L. Harlow, S. A. Mulaik, & J. H. Steiger (Dü) içinde, *What if there were no significance tests?* (s. 117-141). New Jersey, Mahwah: Erlbaum.
- Altın Yavuz, A. (2021). İlerleyen Sansürlü Örneklemelere Dayalı Olarak Weibull Dağılımının Şekil Parametresinin Sağlam Tahmin Edicileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(2), 410-418.
- Anderson, T. (1962). On the distribution of the two-sample Cramer-von Mises criterion. *The Annals of Mathematical Statistics*, 33(3), 1148-1159.
- Anderson, T., & Darling, D. (1952). Asymptotic theory of certain goodness of fit criteria based on stochastic processes. *The Annals of Mathematical Statistics*, 23(2), 193-212.
- Anderson, T., & Darling, D. (1954). A test of goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 49(268), 765-769.
- Angus, J. (1994). The probability integral transform and related results. *SIAM review*, 36(4), 652-654.
- Arizono, I., & Ohta, H. (1989). A test for normality based on Kullback—Leibler information. *The American Statistician*, 43(1), 20-22.
- Arshad, M., Rasool, M., & Ahmad, M. (2003). Anderson Darling and modified Anderson Darling tests for generalized Pareto distribution. *Pakistan Journal of Applied Sciences*, 3(2), 85-88.
- Bain, L., & Engelhardt, M. (1987). *Introduction to probability and mathematical statistics*. Brooks/Cole.
- Balakrishnan, N., & Nevzorov, V. (2004). *A primer on statistical distributions*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Balakrishnan, N., Voinov, V., & Nikulin, M. (2013). *Chi-squared goodness of fit tests with applications*. United States of America: Elsevier.
- Baringhaus, L., & Henze, N. (1988). A consistent test for multivariate normality based on the empirical characteristic function. *Metrika*, 35(1), 339-348.
- Batsidis, A., Economou, P., & Bar-Lev, S. (2022). A Comparative Study of Goodness-of-Fit Tests for the Laplace Distribution. *Austrian Journal of Statistics*, 51(2), 91-123.
- Bayoud, H. (2021). Tests of normality: new test and comparative study. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 78(1), 1-22.

- Bera, A., & Jarque, C. (1981). Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals: Monte Carlo evidence. *Economics Letters*, 7(4), 313-318.
- Bonett, D., & Seier, E. (2002). A test of normality with high uniform power. *Computational Statistics & Data Analysis*, 40(3), 435-445.
- Bontemps, C., & Meddahi, N. (2005). Testing normality: a GMM approach. *Journal of Econometrics*, 124(1), 149-186.
- Brys, G., Hubert, M., & Struyf, A. (2008). Goodness-of-fit tests based on a robust measure of skewness. *Computational statistics*, 23(3), 429-442.
- Brys, G., Hubert, M., & Struyf, A. (2008). Goodness-of-fit tests based on a robust measure of skewness. *Computational Statistics*, 23(3), 429-442.
- Cabaña, A., & Cabaña, E. (2003). Tests of normality based on transformed empirical processes. *Methodology and Computing in Applied Probability*, 5(3), 309-335.
- Chaichatschwal, R., & Budsaba, K. (2007). A power comparison of goodness-of-fit tests for normality based on the likelihood ratio and the non-likelihood ratio. *Thailand Statistician*, 5(2007), 57-68.
- Chen, L., & Shapiro, S. (1995). An alternative test for normality based on normalized spacings. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 53(3-4), 269-287.
- Cochran, W. (1952). The χ^2 test of goodness of fit. *The Annals of Mathematical Statistics*, 23(3), 315-345.
- Coin, D. (2008). A goodness-of-fit test for normality based on polynomial regression. *Computational Statistics & Data Analysis*, 52(4), 2185-2198.
- Cox, D. (1961). Tests of separate families of hypotheses. J. Neyman (Dü.), *Proceedings of the fourth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability*. içinde 1, s. 105-123. University of California Press.
- Cox, D. (1962). Further results on tests of separate families of hypotheses. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 24(2), 406-424.
- Cramér, H. (1928). On the composition of elementary errors. *Scandinavian Actuarial Journal*, 1928(1), 13-74. doi:10.1080/03461238.1928.10416862
- Crzcgorzewski, P., & Wirczorkowski, R. (1999). Entropy-based goodness-of-fit test for exponentiality. *Communications in Statistics-Theory and Methods*, 28(5), 1183-1202.
- D'Agostino, R., & Stephens, M. (1986). *Goodness-of-Fit Techniques*. Marcel Dekker Inc., New York.
- D'Agostino, R. B. (1971). An omnibus test of normality for moderate and large size samples. *Biometrika*, 58(2), 341-348.

- D'agostino, R., & Pearson, E. (1973). Tests for departure from normality. Empirical results for the distributions of b^2 and $\sqrt{b}$. *Biometrika*, 60(3), 613-622.
- Dekking, F., Kraaikamp, C., Lopuhaä, H., & Meester, L. (2005). *A Modern Introduction to Probability and Statistics: Understanding why and how* (Cilt 488). Delft, Netherlands: Springer.
- del Barrio, E., Cuesta-Albertos, J. A., Matrán, C., & Rodríguez-Rodríguez, J. M. (1999). Tests of goodness of fit based on the L2-Wasserstein distance. *Annals of Statistics*, 27(4), 1230-1239.
- Dodge, Y. (2006). *The Oxford dictionary of statistical terms*. New York: Oxford University Press .
- Domanski, C., & Szczepocki, P. (2020). Comparison of selected tests for univariate normality based on measures of moments. *Statistics in Transition New Series*, 21(5), 151-179.
- Dong, L., & Giles, D. (2007). An empirical likelihood ratio test for normality. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 36(1), 197-215.
- Doornik, J., & Hansen, H. (2008). An omnibus test for univariate and multivariate normality. *Oxford Bulletin of Economics and Statistics*, 70(1), 927-939.
- Dudewicz, E. J., van der Meulen, E. C., SriRam, M. G., & Teoh, N. K. (1995). Entropy-based random number evaluation. *American Journal of Mathematical and Management Sciences*, 15(1-2), 115-153.
- Epps, T. (2005). Tests for location-scale families based on the empirical characteristic function. *Metrika*, 62(1), 99-114.
- Epps, T., & Pulley, L. (1983). A test for normality based on the empirical characteristic function. *Biometrika*, 70(3), 723-726.
- Epps, T., Singleton, K., & Pulley, L. (1982). A test of separate families of distributions based on the empirical moment generating function. *Biometrika*, 69(2), 391-399.
- Ersan, E., & Mersin, S. (2023). Kaynakça Nasıl Yazılır. *Fen Bilimleri Tez Dergisi*, 12(5), s. 123-135.
- Esteban, M. D., Marhuenda, Y., Morales, D., & Sanchez, A. (2007). New goodness-of-fit tests based on sample quantiles. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 36(3), 631-642.
- Esteban, M., Castellanos, M., Morales, D., & Vajda, I. (2001). Monte Carlo comparison of four normality tests using different entropy estimates. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 30(4), 761-785.
- Evren, A., & Tuna, E. (2012). On some properties of goodness of fit measures based on statistical entropy. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 13(1), 192-205.

- Fan, J. (1996). Test of significance based on wavelet thresholding and Neyman's truncation. *Journal of the American Statistical Association*, 91(434), 674-688.
- Fan, Y. (1997). Goodness-of-fit tests for a multivariate distribution by the empirical characteristic function. *Journal of Multivariate Analysis*, 62(1), 36-63.
- Fan, Y. (1998). Goodness-of-fit tests based on kernel density estimators with fixed smoothing parameters. *Econometric Theory*, 14(5), 604-621.
- Filliben, J. (1975). The probability plot correlation coefficient test for normality. *Technometrics*, 17(1), 111-117.
- Forbes, C., Evans, M., Hastings, N., & Peacock, B. (2011). *Statistical distributions* (Fourth Edition b.). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Fortiana, J., & Grané, A. (2003). Goodness-of-fit tests based on maximum correlations and their orthogonal decompositions. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 65(1), 115-126.
- Freeman, M., & Tukey, J. (1950). Transformations related to the angular and the square root. *The Annals of Mathematical Statistics*, 21(4), 607-611.
- Frosini, B. V. (1987). On the distribution and power of a goodness-of-fit statistic with parametric and nonparametric applications. P. Revesz, K. Sarkadi, & P. K. Sen (Dü) içinde, *Goodness-of-fit* (s. 133-154). Amsterdam: North Holland Publishing Company.
- Gel, Y., & Gastwirth, J. (2008). A robust modification of the Jarque-Bera test of normality. *Economics Letters*, 99(1), 30-32.
- Glen, A., Leemis, L., & Barr, D. (2001). Order statistics in goodness-of-fit testing. *IEEE Transactions on Reliability*, 50(2), 209-213.
- Gokhale, D. (1983). On entropy-based goodness-of-fit tests. *Computational Statistics & Data Analysis*, 1, 157-165.
- Grané, A. (2012). Exact goodness-of-fit tests for censored data. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics*, 64(6), 1187-1203.
- Hegazy, Y., & Green, J. (1975). Some New Goodness-Of-Fit Tests Using Order Statistics. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 24(3), 299-308.
- Heyde, C. (1975). A supplement to the strong law of large numbers. *Journal of Applied Probability*, 12(1), 173-175.
- Hosking, J. (1990). L-moments: Analysis and estimation of distributions using linear combinations of order statistics. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 52(1), 105-124.
- Hubbard, R., & Lindsay, R. (2008). Why P values are not a useful measure of evidence in statistical significance testing. *Theory & Psychology*, 18(1), 69-88.

- Jarque, C., & Bera, A. (1980). Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals. *Economics letters*, 6(3), 255-259.
- Johnson, N. L., Kotz, S., & Balakrishnan, N. (2019). Genesis. N. Balakrishnan, & A. P. Basu (Dü) içinde, *Exponential Distribution: Theory, Methods and Applications* (s. 1-4). New York: Taylor & Francis Group.
- Johnson, N., Kotz, S., & Balakrishnan, N. (1995). *Continuous univariate distributions, volume 2* (Second Edition b., Cilt 289). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Khinchin, A. I. (1957). *Mathematical foundations of information theory*. (R. A. Silverman, & M. D. Friedman, Çev.) New York: Dover Publication Inc.
- Kobayashi, H., Mark, B., & Turin, W. (2012). *Probability, random processes, and statistical analysis*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Kolmogorov, A. (1933). *Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung*. Berlin: Julius Springer.
- Kuiper, N. (1960). Tests concerning random points on a circle. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen: Series A*, 63, s. 38-47.
- Kullback, S., & Leibler, R. (1951). On information and sufficiency. *The Annals of Mathematical Statistics*, 22(1), 79-86.
- Laio, F. (2004). Cramer-von Mises and Anderson-Darling goodness of fit tests for extreme value distributions with unknown parameters. *Water Resources Research*, 40(9).
- Ledwina, T. (1994). Data-driven version of Neyman's smooth test of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 89(427), 1000-1005.
- Lilliefors, H. (1967). On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown. *Journal of the American Statistical Association*, 62(318), 399-402.
- Mardia, K. V. (1972). *Statistics of Directional Data*. London, England: Academic Press.
- Marques de Sá, J. (2007). *Applied statistics using SPSS, statistica, Matlab and R*. USA: Springer Company.
- Massey Jr, F. J. (1951). The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46(253), 68-78.
- Matsui, M., & Takemura, A. (2005). Empirical characteristic function approach to goodness-of-fit tests for the Cauchy distribution with parameters estimated by MLE or EISE. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics*, 57(1), 183-199.
- Mendes, M., & Pala, A. (2003). Type I error rate and power of three normality tests. *Pakistan Journal of Information and Technology*, 2(2), 135-139.

- Nakas, C. (2007). Performance of the One-Sample Goodness-of-Fit P-P-Plot Length Test. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 36(5), 1053-1059.
- Neyman, J. (1949). Contribution to the theory of χ^2 test. J. Neyman (Dü.), *Proceedings of the First Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability* içinde (s. 239-273). University of California Press.
- Noughabi, H., & Arghami, N. (2011). Monte Carlo comparison of seven normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(8), 965-972.
- Onyper, S., Thacher, P., Gilbert, J., & Gradess, S. (2012). Class start times, sleep, and academic performance in college: A path analysis. *Chronobiology International*, 29(3), 318-335.
- Owen, A. (2001). *Empirical likelihood* (1 b.). New York: Chapman and Hall/CRC.
- Park, S. (1999). A goodness-of-fit test for normality based on the sample entropy of order statistics. *Statistics & probability letters*, 44(4), 359-363.
- Pearson, K. (1900). X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 50(302), 157-175.
- Pettitt, A. (1977). Testing the normality of several independent samples using the Anderson-Darling statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 26(2), 156-161.
- Rahman, M., & Govindarajulu, Z. (1997). A modification of the test of Shapiro and Wilk for normality. *Journal of Applied Statistics*, 24(2), 219-236.
- Ramachandran, K., & Tsokos, C. (2015). *Mathematical Statistics with Applications in R* (Second Edition b.). Academic Press.
- Ramachandran, K., & Tsokos, C. (2021). *Mathematical statistics with applications in R* (Third Edition b.). Academic Press.
- Razali, N., & Yap, B. W. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.
- Reschenhofer, E., & Bomze, I. (1991). Length tests for goodness of fit. *Biometrika*, 78(1), 207-216.
- Romao, X., Delgado, R., & Costa, A. (2010). An empirical power comparison of univariate goodness-of-fit tests for normality. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 80(5), 545-591.
- Rosenblatt, M. (1956). A central limit theorem and a strong mixing condition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42(1), 43-47.

- Rosin, P., & Rammler, E. (1933). Laws governing the fineness of a powdered coal. *Journal of Institute of Fuel*, 7, 29-36.
- Saksena, R. S. (1980). *A Handbook of Statistics* (Cilt 1). (P. R. Krishnaiah, Dü.) Motilal Banarsidass Publishe.
- Seier, E. (2002). Comparison of tests for univariate normality. *InterStat Statistical Journal*, 1(2002), 1-17.
- Shan, G., Vexler, A., Wilding, G., & Hutson, A. (2010). Simple and exact empirical likelihood ratio tests for normality based on moment relations. *Communications in Statistics—Simulation and Computation*, 40(1), 129-146.
- Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423.
- Shapiro, S. S., & Francia, R. S. (1972). An approximate analysis of variance test for normality. *Journal of the American Statistical Association*, 67(337), 215-216.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Shapiro, S., Wilk, M., & Chen, H. (1968). A comparative study of various tests for normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63(324), 1343-1372.
- Siraj-Ud-Doula, M. (2019). A Comparison among Twenty-Seven Normality Tests. *Research & Reviews: Journal of Statistics*, 8(3), 41-59.
- Smirnov, N. (1939). Estimate of deviation between empirical distribution functions in two independent samples. *Bulletin Moscow University*, 2(2), 3-16.
- Song, K.-S. (2002). Goodness-of-fit tests based on Kullback-Leibler discrimination information. *IEEE Transactions on Information Theory*, 48(5), 1103-1117.
- Stephens, M. (1974). EDF statistics for goodness of fit and some comparisons. *Journal of the American Statistical Association*, 69(347), 730-737.
- Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 1(6), 1-25. doi:<https://doi.org/10.2307/2331554>
- Sullivan, G., & Feinn, R. (2012). Using effect size-or why the P value is not enough. *Journal of Graduate Medical Education*, 4(3), 279-282.
- Tolikas, K., & Heravi, S. (2008). The Anderson-Darling goodness-of-fit test statistic for the three-parameter lognormal distribution. *Communications in Statistics—Theory and Methods*, 37(19), 3135-3143.
- Torabi, H., Montazeri, N., & Grané, A. (2016). A test for normality based on the empirical distribution function. *Statistics and Operations Research Transactions*, 40(1), 55-88.

- Towhidi, M., & Salmanpour, M. (2007). A new goodness-of-fit test based on the empirical characteristic function. *Communications in Statistics—Theory and Methods*, 36(15), 2777-2785.
- Uhm, T., & Yi, S. (2021). A comparison of normality testing methods by empirical power and distribution of P-values. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 1-14.
- Uyanto, S. (2022). An Extensive Comparisons of 50 Univariate Goodness-of-fit Tests for Normality. *Austrian Journal of Statistics*, 51(3), 45-97.
- van Zyl, J. (2018). The performance of univariate goodness-of-fit tests for normality based on the empirical characteristic function in large samples. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 47(4), 1146-1156.
- Vasicek, O. (1976). A test for normality based on sample entropy. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 38(1), 54-59.
- von Plato, J. (2005). AN Kolmogorov, Grundbegriffe der wahrscheinlichkeitsrechnung (1933). I. G. Guinness (Dü.) içinde, *Landmark Writings in Western Mathematics 1640-1940* (s. 960-969). Elsevier.
- Wang, J. (2012). Sample distribution function based goodness-of-fit test for complex surveys. *Computational Statistics & Data Analysis*, 56(3), 664-679.
- Watson, G. (1961). Goodness-of-fit tests on a circle. *Biometrika*, 48(1/2), 109-114.
- Watson, G. (1962). Goodness-of-fit tests on a circle. II. *Biometrika*, 49(1/2), 57-63.
- Weibull, W. (1939). A statistical theory of the strength of material. *Ingeniors Vetenskapa Acadamiens Handligar*, 151, 5-45.
- Weibull, W. (1951). A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 18, 192-297.
- Wijekularathna, D., Manage, A., & Scariano, S. (2019). Power analysis of several normality tests: A Monte Carlo simulation study. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 51(3), 757-773.
- Wilks, S. S. (1935). The likelihood test of independence in contingency tables. *The Annals of Mathematical Statistics*, 6(4), 190-196.
- Yap, B., & Sim, C. (2011). Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 81(12), 2141-2155.
- Yazici, B., & Yolacan, S. (2007). A comparison of various tests of normality. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 77(2), 175-183.
- Yıldırım, N., & Gökpınar, F. (2012). Bazı Normallik Testlerinin 1. Tip Hataları ve Güçleri Bakımından Kıyaslanması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16(1), 109-115.

- Zghoul, A. (2010). A goodness of fit test for normality based on the empirical moment generating function. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 39(6), 1292-1304.
- Zhang, J. (2002). Powerful goodness-of-fit tests based on the likelihood ratio. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 64(2), 281-294.
- Zhang, J., & Wu, Y. (2005). Likelihood-ratio tests for normality. *Computational Statistics & Data Analysis*, 49(3), 709-721.
- Zhang, P. (1999). Omnibus test of normality using the Q statistic. *Journal of Applied Statistics*, 26(4), 519-528.



ÖZGEÇMİŞ

Ceren Elif YETİM, Gazi Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2017 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2021 yılında mezun oldu. Mezuniyetinin ardından aynı yıl, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

