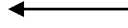


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**“FLAVONOİD KOKTEYLİ VERİLMİŞ MCF-7
HÜCRELERİNDE AURORA KİNAZIN PROTEİN
DÜZEYİNDE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”**

AYŞE BEGÜM CEVİZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. OĞUZ ÖZTÜRK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Yüksek Lisans öğrencisi **Ayşe Begüm CEVİZ**'in tarafından **Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK**'ün danışmanlığında hazırlanan "**Flavonoid Kokteyli Verilmiş MCF-7 Hücrelerinde Aurora Kinazın Protein Düzeyinde Etkisinin Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06/03/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

(Danışman)
Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Hülya YILMAZ
AYDOĞAN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Murat KARTAL
Bezmialem Vakıf Univ. Ecz. Fak.
Farmakognozi A.D.

Jüri

Doç. Dr. Tülin ÖZTÜRK
İ.Ü. Cerrahpaşa CTF Patoloji
A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayşe Begüm CEVİZ (İmza)



İTHAF

Sevgili **aileme** ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans dönemim boyunca engin bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan gerekli adımları atabilmem için bana her zaman destek olan ve güvenen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Oğuz Öztürk'e,

Tüm yoğunluğuna rağmen değerli vaktini bana ayıran, başım sıkıştığı her an kendimi yanında bulduğum yardımlarını benden esirgemeyen en az danışmanım kadar üzerimde emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan'a

Hayallerimi gerçekleştirebilmem için maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman eksik etmeyen sevgili babam Yaşar Ceviz ile canım ablam Betül Ceviz'e ve yanımda olamasa da varlığını tüm kalbimle hissettiğim bana güç veren sevgili annem Y. Gül Ceviz'e

Çocukluğumdan beri daima yanımda olan, her zaman olduğu gibi bu zorlu süreçte de beni hep dinleyen her konuda yardımcı olan manevi destekçim Büşra İzgi'ye

Laboratuvardaki üstün bilgi ve deneyimini benimle paylaşan ve hücre kültürü adına ne öğrendiysem ondan öğrendim diyebileceğim hem öğreten hem güldüren sevgili arkadaşım Dr. Öğretim Üyesi Fatih Seyhan'a

Uzun süre laboratuvarında birlikte çalıştığım, yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen ve daima destek olan sevgili arkadaşım Msc. Allison Pınar Eronat'a,

Yüksek lisans başlangıcı döneminde birlikte çalışma fırsatı bulduğum bana her zaman destek olan değerli hocam Doç. Dr. Güldal İnal Gültekin'e

Tezimin yazım ve yapım aşamasında yardım ve destekleri için sevgili arkadaşlarım Gonca Candan, Efsane Müge İsmailoğlu, Gülçin Özkara, Ayça Diren, Kubilay Kınöğlu, ve Funda Pehlevan'a

Western Blotlama deneylerim süresince tüm yoğunluğuna rağmen bana yardımcı olan ve bilgi birikimini benimle paylaşan çok değerli Dr. Beyza Göncü'ye

Her zaman bizleri motive ederek daha iyiye teşvik eden titizliği ve çalışma prensibini kendime örnek aldığım Dr. Mete Bora Tüzüner'e

Analim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İlhan Yaylın ve tüm AD. Öğretim üyelerimize teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22859



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hücre Siklusu ve Hücre Bölünmesi.....	3
2.1.1. Hücre Siklusunun Aşamaları	3
2.1.2. Hücre Siklusunun Kontrol Noktaları	5
2.1.3. Hücre Siklusunun hücre büyümesi ve ekstraselüler sinyaller ile düzenlemesi ..	7
2.2. Hücre Siklusundaki Problemler ve Kanseri Oluşumu	10
2.3. Meme Kanseri	12
2.3.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	12
2.3.2. Meme Kanseri Alt tipleri.....	13
2.3.2.1. Luminal A.....	14
2.3.2.2. Luminal B	14
2.3.2.3. HER-2 Pozitif.....	15
2.3.2.4. Bazal Benzeri	15
2.4. Aurora Kinazlar	17
2.4.1. Aurora Kinaz A.....	17
2.4.2. Aurora Kinaz B.....	20
2.4.3. Aurora Kinaz C.....	21
2.5. Hücre Döngüsü-Hedefli Kanseri Tedavileri	21
2.5.1. G1 hedefli Terapiler	21

2.5.2. S hedefli Terapiler.....	22
2.5.3. G2 M hedefli Terapiler.....	23
2.6. Aurora Kinaz İnhibitörleri.....	24
2.7. Fenolik Bileşikler	26
2.7.1. Flavonoidler	27
2.8. Protein Kinazlar ve Flavonoidler.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Gereçler	31
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeleri ve Kitler	31
3.1.1.1. Hücre Kültürü	31
3.1.1.2. Western Blotlama	31
3.1.1.3. Hücre Siklusu Analizi.....	32
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	32
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1. Hücre Kültürü	32
3.2.2. Flavonoid Kokteyli Hazırlanması	33
3.2.3. Hücrelerin Sayılması, Flavonoid Kokteyli Uygulanması.....	33
3.2.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi	33
3.2.5. Hücre Morfolojisi.....	34
3.2.6. Hücre Siklusu Analizi	34
3.2.6.1. Hücrelerin Ekilmesi Dozlanması ve Örneklerin Fiksasyonu.....	34
3.2.6.2. Fikse edilen Hücrelerin boyanma Protokolü	35
3.2.7. Western Blotlama.....	35
3.2.7.1. Protein Ekstraksiyonu.....	35
3.2.7.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü ve SDS PAGE için Örneklerin hazırlanması.....	36
3.2.7.3. Yarı Islak Transfer İşlemi	37
3.2.7.4. Bloklama	37
3.2.7.5. Primer Antikor Uygulanması.....	37
3.2.7.6. Sekonder Antikor Uygulanması.....	38
3.2.7.7. Kemüliminesan Görüntüleme	38
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39

4.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi	39
4.2. Hücre Morfolojisi	41
4.3. Hücre Siklusu Analizi	42
4.4. Aurora Kinaz A ve Aurora Kinaz B proteinlerinin Western Blotlama ile Ekpresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	44
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	54
HAM VERİLER.....	69
FORMLAR	70
ETİK KURUL KARARI	71
PATENT HAKKI İZNİ	72
TELİF HAKKI İZNİ	73
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4-1 : Flavonoid kokteyli uygulanmış MCF7 hücre hattında WST-1 Analizi ile doz ve saate bağlı hücre canlılığı verileri.....	40
Tablo 4-2: Hücre siklusu analizi istatistiksel verileri.....	44
Tablo 4-3: Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF 7 hücrelerinde Aurora kinaz A (AURK A) ve B (AURK B) protein ekspresyonlarının istatistiksel analizi	47



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2 1: Hücre siklusunun aşamaları (Hochegger ve ark 2008).....	4
Şekil 2-2: G1 kontrol noktası.....	5
Şekil 2-3: Hücre Siklusu kontrol noktaları	6
Şekil 2-4: Literatürde memelilerde en çok çalışılmış cdk ailesi üyeleri ve onların siklin partnerleri (Satyanarayana ve Kaldis 2009).....	7
Şekil 2-5: Hücre siklusu kontrolünde Cdk ve siklinler (Bai ve ark 2017)	8
Şekil 2-6: Aurora Kinazları temsil eden şematik diagram (Kollareddy ve ark. 2008)....	17
Şekil 2-7: Aurora kinaz A'nın Geç G2 ve Mitoz fazlarındaki fonksiyonu (Lens ve ark. 2010).....	19
Şekil 2-8: Normal insan dokularındaki AURKA (AUR2) ve AURKB (AUR1) mRNA ekspresyonları (Bischoff ve ark. 1998).....	19
Şekil 2-9: Farklı kanser hücre hatlarındaki AURKA (AUR2) mRNA ekspresyonları (Bischoff ve ark 1998).....	20
Şekil 2-10: Flavonoidlerin alt grupları (Aherne ve O'Brien, 2002).....	28
Şekil 4-1: Flavonoid kokteylinin MCF7 hücre Hattı üzerine etkisi.....	39
Şekil 4-2: Flavonoid Kokteyli ile muamele edilen malign MCF7 hücrelerinin morfolojik değişimi	42
Şekil 4-3: Kontrol grubu MCF7 hücrelerinin hücre siklusu analizi.....	43
Şekil 4-4: %35 dozunda Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinin 3.s hücre siklusu analizi.....	43
Şekil 4-5: %10 oranında Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinin 24.s hücre siklusu analizi.....	43
Şekil 4-6: %10 oranında Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinin 48.s hücre siklusu analizi.....	44
Şekil 4-7: GAPDH protein ekspresyonları.....	45
Şekil 4-8: AURK A protein ekspresyonları.....	46
Şekil 4-9: AURK B protein ekspresyonları.....	46
Şekil 4-10: Farklı doz ve saatlerde Flavonoid Kokteyli uygulanan hücrelerde AURK A ve AURK B proteinlerinin güven aralığı grafiği.....	47

Şekil 5-1: Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF 7 hücrelerinde Aurora kinaz A (AURK A) ve B (AURK B) protein ekspresyonlarının kontrole kıyasla kat değişimi histogram grafiği	52
---	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

G1	Gap 1
S	Sentez
G2	Gap 2
M	Mitoz
DNA	Deoksiribonükleik asit
RB	Retinoblastoma
ORC	Oricin Replication Complex
MCM	Mini Chromosome Maintenance
P53	Tümör Protein 53
CDK	Siklin bağımlı kinaz
INK4	INHibitors of CDK4
CKİ	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
APC	Anaphase promoting complex
MAD	mitotic arrest deficient gene
BUB	Budding uninhibited by benzimidazoles 1
PLK	Polo Like Kinase
AK	Aurora Kinaz
AURKA	Aurora Kinaz Protein A
AURKB	Aurora Kinaz Protein B
LATS1	Large tumor suppressor kinase 1
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptörü

PARP	Poly ADP ribose polymerase
BORA	Aurora Kinase A Activator
TPX2	Targeting protein for Xklp2
INCENP	Inner Centromere Protein
RPA	Replikasyon proteini A
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
CPC	Chrosomal passenger complex
CHK1	Checkpoint kinase 1
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
MEGM	Meme epitel büyüme medyumu
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Etanol
FBS	Fetal Bovine Serum
DMSO	Dimetil sülfoksit
PBS	Fosfat tuz tampon (Phosphated Buffered Saline)
WST-1	Suda çözünür tetrazolyum tuzu 1(Water soluble tetrazolium salt1)
PI	Propidium iyot
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	Tris Buffer Saline-Tween 20
PVDF	Polyvinylidene difluoride
ECL	Enhanced Chemiluminescence

ÖZET

Ceviz, AB. Flavonoid Kokteyli verilmiş MCF-7 Hücrelerinde Aurora Kinazın Protein Düzeyinde Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

Anahtar Kelimeler : Hücre Siklusu, Meme Kanseri, Flavonoidler, Aurora Kinazlar, Aurora Kinaz inhibitörü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22859

Tüm kadın kanserlerinin %18'ini oluşturan meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir. Yapılan çalışmalar tümörlerde hücre döngüsü düzenleyicilerinin sıklıkla ekspresyon seviyelerinin değiştiğini göstermiştir, bu durum hücre döngüsünün doğru işleyişinin kanserin önlenmesindeki önemini ortaya koymaktadır. Hücre siklusunda görevli Aurora kinazların(AK) kanserlerde aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden AK'ın kanser tedavisinde moleküler hedef olabileceği düşünülmüş ve inhibitörler geliştirilmiştir. Preklinik çalışmalarda bu inhibitörlerin antitümör özelliklerinin olduğu belirtilse de ciddi yan etkilere sebep olmuştur. Bu sebeple doğal AK inhibitörlerinin araştırılmasına odaklanılmış ve flavonoidler önemli adaylardan olmuştur. Bu tez çalışmasında MCF7 Luminal A tip meme kanserini modelleyen hücre hattı belirli dozlarda ve saatlerde Flavonoid kokteyli (FK) ile muamele edilmiştir. FK muamelesi ardından WST-1 yöntemi ile sitotoksosite, Cell Cycle kiti ile hücre siklusu analizi ve Western blot yöntemi kullanılarak AURKA ve B proteinlerinin ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. WST-1 hücre proliferasyon analizi sonucunda en etkin dozun %10 olduğu belirlenmiştir. %35 oranında FK uygulanan hücrelerde 24.h'de neredeyse canlı hücre kalmamıştır. Hücre siklusu analizi ile FK uygulanmayan MCF7 hücre hattında hücrelerin %70'inin G2/M fazında olduğu görülürken %10doz FK uygulanması ile MCF7 hücrelerinin ilk 24.h'te S fazında, 48.h'te ise önemli bir çoğunluğunun G0/G1 fazında tutulduğu tespit edilmiştir. Western blotlama sonucunda %10 oranında FK uygulanmış MCF7 hücrelerinde 48.h'te AURKA'da anlamlı bir azalma görülmüştür($p<0.005$). %35 dozu uygulanan hücrelerde AURKB'de anlamlı bir ekspresyon azalması tespit edilmiştir. Flavonoidlerin çoklu biyolojik mekanizmaları düzenleme kabiliyetleri nedeniyle kanser tedavisinde önemli kaynak olabileceği öngörülmektedir. Bu kapsamda gelecekteki araştırmalar yan etkisi minimum düzeydeki bu doğal bileşiklerin özellikle kombinasyonları ile kansere etkili ve uygun fiyatlı terapötik yaklaşımlar oluşturmaya yönelik olmalıdır.

ABSTRACT

Ceviz, A.B. (2019). Evaluation of Aurora Kinase Protein Level Alterations in Flavonoid Mixture treated MCF7 cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Master Thesis. İstanbul.

Key Words: Cell Cycle, Breast Cancer, Flavonoids, Aurora Kinases, Aurora Kinase inhibitor

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 22859

Breast cancer is the main cause of cancer-related deaths in women. Expression levels of the cell cycle regulators are frequently altered in tumors. Aurora kinases(AKs) have several functions in the cell cycle and are shown to be overexpressed in various cancers including breast. In pre-clinical studies, AK-inhibitors were shown to have antitumoral properties, however, they also had serious side effects. Lately, the focus has been on natural AK-inhibiting compounds. In this thesis, the cell line modeling Luminal-A type breast cancer, MCF7, was treated with a Flavonoid cocktail(FC) at specific doses and times. Following the treatment, WST-1 method, Cell Cycle kit and Western blotting methods were used to evaluate the cytotoxic effect, to perform cell cycle analysis and to evaluate the expression levels of AURKA and B proteins, respectively. The most effective dose was found to be 10%. There were almost no remaining cells with 35% at the 24thhour. Of the untreated MCF7 cells 70% were in the G2/M phase, while cells treated with 10% were in the S phase following the 24thhour and at the 48thhour major amount were in the G0/G1 phase. Treatment of 10% induced a significant decrease in AURKA protein expression at the 48thhour($p<0.005$). Moreover, a significant down-regulation AURKB expression was observed with 35%. Since, flavonoids act on multiple targets and mechanisms, they may be favorable agents in cancer prevention and treatment. Future investigations should aim to establish safe, effective and affordable therapeutic approaches to cancer with particular combinations of these natural compounds with minimal side effects.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olan kanser; çevresel kimyasallar, UV, iyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlar , bakteri ve virüs gibi çeşitli biyolojik ajanlara maruziyet gibi birçok biyokimyasal ve fizyolojik süreç sonucunda gelişmektedir. Güncel kanser tedavilerinin pahalı olmasının yanı sıra günlük hayatı olumsuz etkileyen birçok yan etkilerinin olması araştırmacıları alternatif tedavi şekilleri arayışına sokmuş ve çalışmalar toksisitesi daha az olan doğal ürünlerin tedavi edici özelliklerinin araştırılması yönüne doğru kaymıştır. Bu kapsamda son çalışmalarda flavanoidlerle yapılan araştırma sonuçları dikkat çekicidir.

Flavonoidler birçok meyve ve sebze de bulunan polifenolik bitki sekonder metabolitleridir. Fenil benzopiron ortak yapısına sahip olan bu bileşikler heterosiklik-C halkası varyasyonlarına göre; flavon, flavonol, flavanon, flavanol, antosiyanin, izoflavon ve kalkan şeklinde sınıflandırılmaktadır. Fenolik hidroksil gruplarından elektron vericisi olarak görev alan flavonoidlerin hücrelerde phosphoinositol(PI)-3-kinaz, Akt/protein kinaz-B (PKB), tirozin kinaz, protein kinaz-C (PKC) ve Mitojen-aktif protein (MAP) kinaz sinyal kaskadlarında sinyal değiştirici molekül olarak da rol oynadığı rapor edilmiştir. Yine en çok bilinen flavanoidlerden Kuersetin ile yapılan bir çalışmada Kuersetinin janus kinaz, Siklin bağımlı kinaz-benzeri kinaz (CLK) -1 ve -4 ile Aurora kinazlar (AK) gibi birçok kinaz grubu için de inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Ekibimiz tarafından ilk olarak İSTKA destekli “Bal ve Diğer Arı Ürünleri ile Sağlıklı Yaşam Platformu” kapsamında Bal ve flavanoid içeriği zengin Propolis Etkisinin Meme Kanseri Hücre Soylarında miRNA Profili ve Genomik Ekspresyon Üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ardından propolis biyoaktif içeriklerine yoğunlaşmış MCF7 Meme Kanseri ve MCF10A Normal Epitel Hücre Soyunda Propolisin içeriklerinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkinliği bireysel (İ.Ü.BAP-Proje No:28304) ve belirli dozlarda flavanoid kokteyli hazırlanarak kombine olarak (ProjeNo:28301) incelenmiştir. Bu araştırmalardan elde ettiğimiz bulgularımız fenolik/flavanoid kokteylin özellikle hücre döngüsü, mitoz, sitokinez gibi önemli aşamaları içeren hücre bölünmesinden sorumlu ve aralarında AK’ların da yer aldığı çok sayıda genin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir down regülasyona neden olduğunu göstermiştir. Flavanoidlerin

kanser patojenezinde hücrede mRNA seviyesindeki etkilerinin protein ve yollar üzerinde de doğrulanması amaçlanmış ve literatür araştırmamızda bu tarz çoklu flavanoid karışımlarının meme kanseri hücrelerinde AK'lar üzerindeki etkilerini protein seviyesinde irdeleyen bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Buradan yola çıkarak tez projemiz kapsamında daha önceki çalışmalarımızda flavanoid kokteyli muamelesi ile RNA seviyesinde down-regüle olduğunu gözlemlediğimiz hücre bölünmesi sürecinde görevli

kinaz A ve B'nin meme kanseri hücre hattında flavanoid kokteyli muamelesiyle protein seviyesinde incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Siklusu ve Hücre Bölünmesi

Birçok hücrede hücre siklusu hücrenin tüm komponentlerinin duplikasyonu demek olup bölünmeler arası geçen süre hücrenin kendi kütlesini ikiye çıkarması için geçen süre ile aynıdır (Csikász-Nagy ve ark. 2006; Rupeš, 2002; Sveiczzer ve ark. 1996).

Hücre bölünmesi çoğu hücrede 4 aşamalı bir süreçtir: hücre büyümesi (G1), DNA replikasyonu (S), bölünmeye hazırlık (G2), duplike olmuş kromozomların yavru hücrelere dağılımı ve sitoplazma bölünmesi (sitokinez) (M) (Cooper 2000; Johnson ve Walker, 1999; Hartwell ve ark. 1974; Pardee 1974). Hücre bölünmesi genel olarak mitoz olarak adlandırılrsa da teknik olarak mitoz çekirdek bölünmesi, sitokinez ise sitoplazma bölünmesidir. Hücre büyümesi devamlı bir süreçtir, DNA hücre siklusunun sadece bir fazında sentez olur ve daha sonra replikasyona uğramış kromozomlar hücre bölünmesi adı verilen bir dizi kompleks olayla yavru hücrelere dağıtılır. Hücre siklusunda fazların ilerleyişi evrimsel olarak korunmuş çeşitli düzenleyiciler ile kontrol edilir ve bu düzenleyiciler hücre siklusundaki farklı olayları organize etikleri gibi hücre siklusu ile ekstrasellüler sinyalleri birbirine bağlayarak hücre proliferasyonunu kontrol eder (Cooper, 2000).

2.1.1. Hücre Siklusunun Aşamaları

Kültürdeki tipik bir insan ökaryotik hücresi, yaklaşık olarak 24 saatte bir bölünür. Mikroskopta görüldüğü kadarıyla hücre siklusu 2 temel aşamada gerçekleşir: mitoz ve interfaz. Mitoz ve sitoplazmik bölünme (sitokinez) sadece 1 saat kadar sürerken, hücre siklusunun %95'i interfaz aşamasından oluşmaktadır. İnterfaz sırasında kromozomlar dekonpanse olur ve nükleus içerisine dağılır ve nükleus morfolojik olarak uniform görülür. Moleküler seviyede interfaz, hücrenin bölünmeye hazırlanması için hem hücre büyümesinin hem de DNA replikasyonunun gerçekleştiği aşamadır. Ökaryotik hücrelerde hücre siklusu 4 aşamada gerçekleşir (şekil 2-1) (Hochegger ve ark 2008).

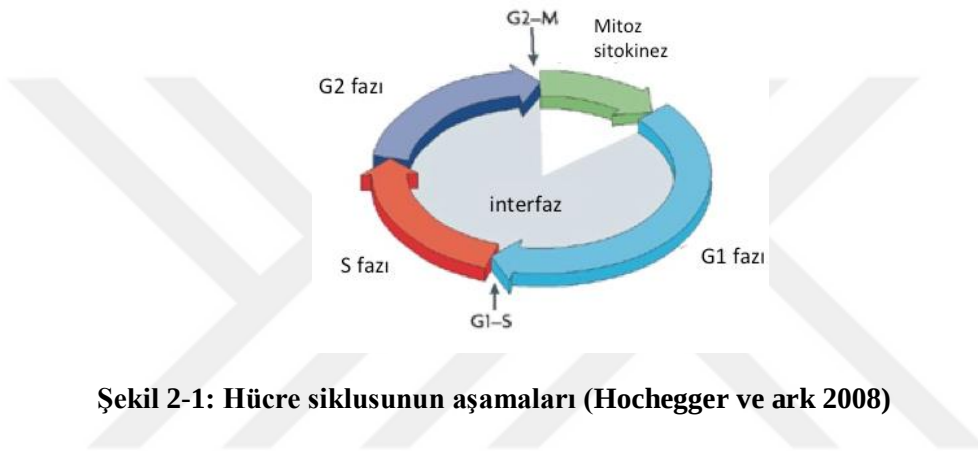
-G1 fazı (gap 1): Mitoz ve DNA replikasyonunun başlaması arasında geçen süreçtir. Bu aşamada hücre metabolik olarak aktif olup DNA replikasyonu olmadan büyümeye

devam eder. Hücre mitojenik sinyaller ve büyüme engelleyici sinyaller ile etkileşimde olup hücre siklusuna devam edip etmeme kararını verir (Cooper, 2000; Johnson ve Walker, 1999; Hartwell ve ark. 1974; Pardee, 1974).

-S fazı: DNA sentezinin gerçekleştiği fazdır.

-G2 (gap 2): Bu fazda hücre büyümeye devam eder ve mitoz bölünme için gerekli proteinler sentez edilir.

-M fazı (mitoz): Mitoz bölünme ve bunu takip eden sitokinezi ifade eder (Cooper, 2000).



Şekil 2-1: Hücre siklusunun aşamaları (Hochegger ve ark 2008)

Genellikle kütlenin ikiye çıkarılması süreci S fazı ve M fazı arasında G1 ve G2 fazları gibi boşluklar mevcut olduğundan hücre siklusu yavaştır (Csikász-Nagy ve ark. 2006; Nurse, 1994). Farklı hücre tiplerine göre hücre siklusu fazlarının süreleri değişir. Hızlı çoğalan tipik bir insan hücresi için hücre siklusu G1 fazı 11, S fazı 8 ve G2 fazı 4 saat olmak üzere ortalama 24 saat sürer (Cooper, 2000).

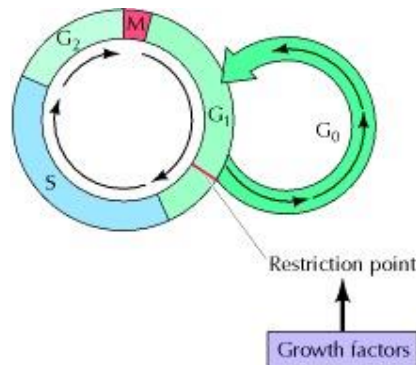
Hızlı bölünen embriyonik hücrelerin aksine bazı hücreler hücre ölümü veya hasar sonrası hücrelerin yenilenmesi gerektiğinde (deri fibroblastları, böbrek, karaciğer, akciğer gibi) bölünür. Bu tarz hücreler G1 fazını atlayarak G0 adı verilen metabolik olarak aktif, uygun ekstrasellüler sinyal gelene kadar proliferasyon olmayacakları bir faza (quiescence = sessiz) girerler (Cooper, 2000). Besin yetersizliği vs. gibi nedenlerle birçok hücrede hücre siklusu ve proliferasyon durur. Hücreler boyut olarak belirli bir sınıra ulaştıklarında hücre siklusunun ilerleyişi genelde G1/G0 arasında durmaktadır. Büyüme engellendiğinde hücrelerin bölünmesi de engellenir ancak aksi gerçerli değildir. Retinoblastoma (Rb) gibi hücre büyüme ve proliferasyonunun

engellenmesinde rol alan tümör süpresör genlerde meydana gelen mutasyonlar kanserle ilişkilendirilmiştir (O'Farrell, 2011; Clarke ve ark. 192, Lee ve ark. 1992).

2.1.2. Hücre Siklusunun Kontrol Noktaları

G1 ve G2 fazlarında hücre hacim olarak büyüyerek bölünmeye hazırlanır (Csikász-Nagy ve ark. 2006; Nurse, 1994). Kontrol noktalarında hücre büyümesinin ve DNA sentezinin olması gerekenden fazla veya az olması durumları, DNA hasarı ve tamiri, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi öncesi kromozomların metafaz plağına doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği kontrol edilir (Csikász-Nagy ve ark. 2006; Kastan ve Bartek, 2004).

En önemli hücre siklusu düzenleyici nokta birçok hücrede G1'den S aşamasına ilerlemeyi sağlayan G1 kontrol noktasıdır (restriction point) (şekil 2-2). Uygun büyüme faktörlerinin varlığında hücre siklusu bu kontrol noktasını geçerek S fazına ilerler. Şartların uygun olmaması durumunda hücre metabolik olarak aktif olduğu fakat hücre büyümesini ve protein sentezini azalttığı G0 fazına girer. Örneğin yaralanma sonucu kan trombositlerinden (platelet) salınan platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), hasarlı dokuda deri fibroblastlarının hücre bölünmesini uyarır (Cooper, 2000). G1 kontrol noktası için önemli tümör süpresör genlerden biri olan Rb geninde mutasyon olması hücrenin G1'den S fazına ilerleyişini durdurabilir (O'Farrell, 2011; Lipinski ve ark. 2001). DNA replikasyonunun S fazında sadece bir kez gerçekleşmesini replikasyon orjinine ORC (origin replication complex) proteinleri ile birlikte bağlı olan MCM (Minichromosome maintenance) proteinleri sağlar (Cooper, 2000).



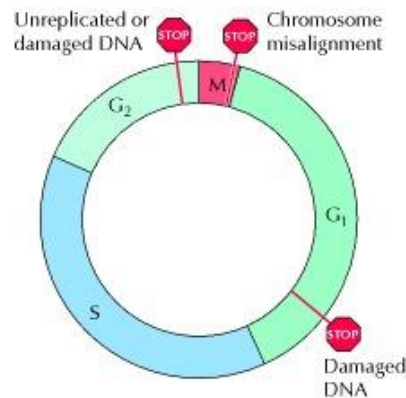
Şekil 2-2: G1 kontrol noktası

G1 fazındaki tutulum hasarlı DNA'nın S fazına girerek replike olmasını engeller ve onarılmasını sağlar. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasında tutulum DNA hasarı

ile hızlıca uyarılan p53 proteini aracılığıyla sağlanır. Kansere hücrelerinde p53 proteinini kodlayan gende mutasyon olduğunda hücreler G1 kontrol noktasında tutulamaz ve hasarlı DNA tamir edilemeden replikasyona uğrayarak kardeş hücrelere geçer, böylece mutasyonların sıklığında artış ve hücre genomunun stabilitesinde kayıp meydana gelir (Cooper, 2000). p53 geni kanserlerde en çok mutasyona uğrayan gendir (Johnson ve Walker, 1999; Kamb, 1998; El-Deiry, 1998).

Pek çok hücrenin proliferasyonu G1 fazında kontrol edilmesine rağmen bazı hücrelerde (oositler) bu kontrol G2 fazında olmaktadır. İnsanlarda oositler uzun süreler boyunca G2'de tutulur, hormonal stimülasyon ile M fazına ilerleyiş gerçekleşir (Cooper, 2000).

Hücre genomunun replikasyonu tamamlanincaya kadar mitoz bölünme başlamaz. Birçok hücrede siklusun farklı fazları arasındaki koordinasyon kontrol noktalarına ve devam eden fazdaki olayların tamamlanmadan bir sonraki faza geçişine izin vermeyen geri besleme kontrol mekanizmalarına bağlıdır. Böylece tamamlanmamış ve hasarlı kromozomların replikasyona uğrayıp kardeş hücrelere geçişi engellenir (şekil 2-3). Örneğin G2 kontrol noktası DNA replikasyonu tamamlanincaya kadar (S fazı) mitozun (M fazı) başlamasına izin vermez. DNA'nın replikasyonunun tamamlanmaması veya radyasyon vs. gibi sebeplerle hasarlı olması durumunda hücre G2 fazında tutulur. DNA hasarı hücreyi G2 fazında tutmakla kalmaz hücrenin S fazında ilerleyişini de yavaşlatır (Cooper, 2000).

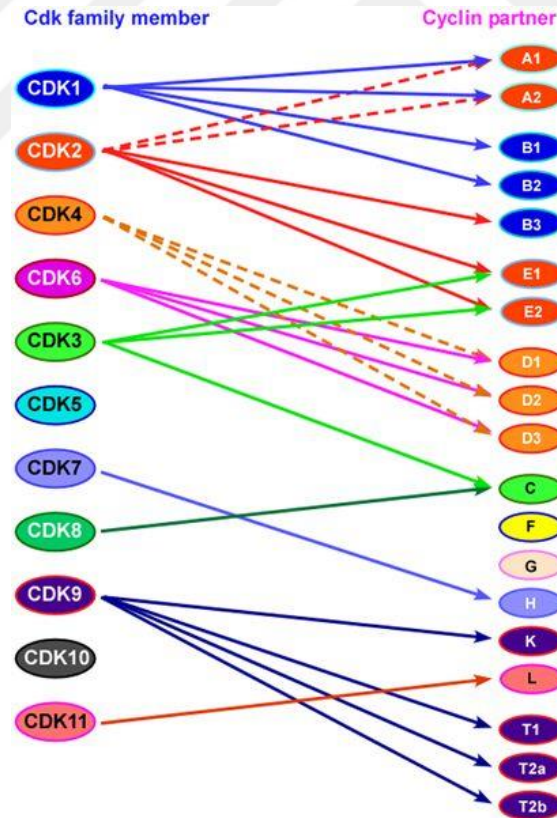


Şekil 2-3: Hücre Siklusu kontrol noktaları

M fazındaki diğer bir kontrol noktası ise kardeş kromozomların mitotik iplikçikler (spindle) üzerinde düzgün bir şekilde dağılmaması durumunda M fazının ilerlemesinin durdurulmasıdır. Kromozomlar her bir kardeş hücreye eşit şekilde ayrılana kadar bu fazda tutulur (Cooper, 2000).

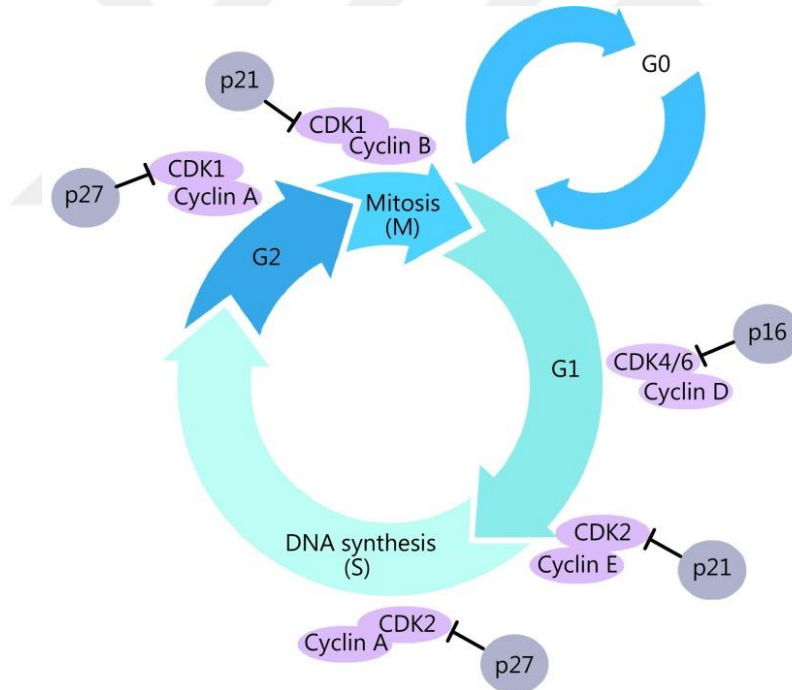
2.1.3. Hücre Siklusunun hücre büyümesi ve ekstraselüler sinyaller ile düzenlemesi

Hücre siklusunun düzenlenmesinde sitokinler (büyüme faktörleri) (Cooper, 2000; Güneş, 1999), bir çeşit serin/treonin kinazlardan olan siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve onların partneri olan siklinler, cdk inhibitörleri (p21 ve p16) (Johnson ve Walker, 1999; Satyanarayana ve Kaldis, 2009) gibi faktörler rol oynar. Hücre siklusunun kontrolü cdk proteinleri ve siklinler arasındaki kompleks iletişim ile sağlanır. Yirmiden fazla cdk proteini tamamlanmış olup literatürde en çok çalışılanları şekil 2-4'te gösterilmiştir (Satyanarayana ve Kaldis, 2009).



Şekil 2-4: Literatürde memelilerde en çok çalışılmış cdk ailesi üyeleri ve onların siklin partnerleri (Satyanarayana ve Kaldis 2009)

Geçmişte klasik hücre siklusu regülasyonunda Cdk4, Cdk6, Cdk2 ve Cdk1 kompleksinin faz spesifik olarak hücre siklusunun başlangıç ve ilerleyişini düzenlediğine inanılırdı. Ancak 2008 ve sonrası literatürde birçok Cdk ve siklinlerin hücre siklusu regülasyonunda tüm fazlara dağıldıklarını ve Cdk1'in yalnız başına minimum sayıda siklin ile kompleks oluşturarak hücreyi siklusun farklı fazlarına doğru ilerlettiği ve diğer Cdk3, Cdk7 ve Cdk11 gibi Cdk'ların da hücre siklusu regülasyonuna katılabileceği öne sürülmüştür (şekil 2-5) (Satyanarayana ve Kaldis, 2009). Cdk2'nin hücre siklusu kontrolünde olmasının gerekmediği ama mayoz bölünme kontrolünde yaşamsal öneme sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Satyanarayana ve Kaldis, 2009; Berthet ve ark.2003; Ortega ve ark. 2003). Ayrıca fare çalışmalarında Cdk1 susturulmuş farelerin erken embriyonik dönemde öldüğü gösterilmiştir (Satyanarayana ve Kaldis, 2009; Berthet ve ark. 2006; Santamaria ve ark. 2007).



Şekil 2-5: Hücre siklusu kontrolünde Cdk ve siklinler (Bai ve ark 2017)

Cdk subünitelerinin fosforilasyonu hücre siklusu kontrolünde pozitif veya negatif etkili olabilir (Johnson ve Walker, 1999; Arellano ve Moreno, 1997). Ubiquitin

aracılı proteoliz siklinleri ve diğer regülatörleri hedef alarak hücre siklusu regülasyonunda dolaylı yoldan etkili olabilir (Johnson ve Walker, 1999; King ve ark. 1996; Pagano, 1997). Cdk inhibitörleri (INK4 ailesi; p16, p15, p18, p19 ve Cip/Kip protein ailesi; p21, p27, p57) Cdk'ların pozitif veya negatif yönde düzenlenmesinde rol alabilir (Johnson ve Walker, 1999; LaBaer ve ark. 1997).

Ekspresyonu p53 tarafından uyarılan ve yaşlanmış hücrelerde ekspresyonunun arttığı tespit edilmiş olan p21 geni bir Cdk inhibitörüdür (Johnson ve Walker, 1999; Noda ve ark. 1994; El-Deiry ve ark. 1993). P21, hücre siklusunu Cdk-siklin kompleksine bağlanarak veya DNA polimeraz δ için elongasyon faktörü olan PCNA ile etkileşime girip DNA sentezini inhibe ederek düzenler (Johnson ve Walker, 1999; Li ve ark. 1994). Diğer bir Cdk inhibitörü ise Rb geninin ekspresyonunu azaltan p16 genidir (Johnson ve Walker, 1999; Li ve ark. 1994; Tam ve ark. 1994). Hücre siklusunu bu kompleks düzenleyicilerinin ekspresyon seviyelerini etkileyen değişimler kansere yol açmaktadır. Birçok kanser tipinde Cdk'ların ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Örneğin siklin D1'in (Bcl1 onkogeni) B-hücreli lenfoma, meme, özofagus, mesane, akciğer gibi kanser tiplerinde, (Johnson ve Walker, 1999; Bodrug ve ark. 1994; Lovec ve ark. 1994; Wang ve ark. 1994) siklin E'nin meme, kolon ve lösemilerde (Johnson ve Walker, 1999; Leach ve ark. 1993; Keyomarsi ev ark. 1995), siklin A'nın karaciğer kanserinde ekspresyon seviyelerinde arttığı tespit edilmiştir (Johnson ve Walker, 1999; Wang ve ark. 1990). INK4 ailesi üyelerinin delesyon, mutasyon ya da metilasyon ile inaktive olması Cdk4 ve Cdk6 gibi kinazların ekspresyon seviyeleri arttırarak Rb geninin inaktivasyonuna ve bunun bağlı olduğu transkripsiyon faktörü E2F genlerinin negatif regülasyonunun bozulmasına neden olur (Johnson ve Walker, 1999; Johnson, 1995; Shao ve Robbins, 1995). E2F aktivasyonu ise kontrolsüz hücre çoğalması ve ektopik hücre bölünmelerine yol açar (Johnson ve ark. 2016; Chen ve ark. 2009).

Sitokinler G1 kontrol noktasında hücrelerin bölünmeye devam edip etmeyeceği veya G0 fazında bölünmeden kalıp kalmayacağını belirler. Çoğu kez hücre bölünmesinin devamı için birden fazla sitokine ihtiyaç duyulur. Sitokinlerin normal insan melonositleri ve malin melanoma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, bFGF ve HGF'nün normal insan melonositlerinin bölünmesini arttırdığı ve melanoma hücrelerinin EGF, TGF-a ve NGF tarafından stimüle edildiği

gözlenmiştir. TNF-a, TGF-b ve IL-6 melanosit hücrelerinin ise büyümesinde inhibitör olarak rol oynadığı belirtilmiştir (Güneş, 1999; Karagakis ve ark. 1995). Hücrelerin bölünmeye başlamasında bir çok protoonkogenin ekspresyonu büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Örneğin, hücrelerin PDG-F'e bir kaç dakika maruz kalması fos ve myc proto-onkogenlerini aktive etmektedir. Bu genler transkripsiyon faktörü olan c-fos ve c-myc proteinlerini kodlar. Bu proteinler hücre bölünmesini kontrol eden diğer G1 siklinlerini ve Cdk'ların ekspresyonuna yol açar (Güneş, 1999; Bishop, 1991). Sitokinlerin bazıları (IFN-a/b, TGF-b, TNF) diğer büyüme faktörlerinin hücre bölünmesi için aktive ettiği mekanizmaları inhibe ederler. Sitokinler hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp sinyal iletimi olaylarını başlatarak hücre bölünmesini pozitif veya negatif yönde etkiler. Bir hücrenin yüzeyinde bulunan reseptörler de bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirler. Böylece pozitif veya negatif sitokinlerin seviyesinde veya hücre yüzeyindeki reseptörlerin düzenlenmesinde meydana gelen dengesizlikler, hücre siklusu regülasyonunun kaybına yol açarak kanser gelişimine neden olabilirler (Güneş, 1999).

2.2. Hücre Siklusundaki Problemler ve Kanser Oluşumu

Yapılan çalışmalar insan tümörlerinde hücre döngüsü düzenleyicilerinin sıklıkla mutasyona uğradığını göstermiştir, bu da hücre döngüsünün doğru işleyişinin kanserin önlenmesinde ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak, siklinler, CDK'lar, CKI'leri ve RB regülatörlerinin ekspresyonundaki değişiklikler tümör oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Siklin D1 veya CDK4'nın amplifikasyonu, CDK6 translokasyonu, INK4 proteinleri ve RB'nin delesyonu veya INK4 ile RB promotörlerinin metilasyonu sonucu epigenetik inaktivasyondan kaynaklanmaktadır. (Wolfel ve ark. 1995; Easton ve ark. 1998).

CDK2 ya da regülatörlerinin genetik ya da epigenetik değişimleri insan tümörlerinde nadiren tanımlanmıştır, ancak CDKN1B'nin (insanlarda KIP1'i kodlayan gen) ifadesi kaybı ve siklin E1'in aşırı ifadesi sıklıkla meydana gelir ve kötü prognozla korelasyon gösterir. Tümör hücrelerinde KIP1 ve siklin-E1 ekspresyonunun nasıl değiştiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. KIP1 yıkımına kısmen SKP2 (SCF

kompleksinin F-box proteini) aracılık eder. SKP2 onkojenik özelliklere sahip ve bazı tümör hücrelerinde ekspresyonu değişmiştir (Latres ve ark. 2001; Gstaiger ve ark. 2001).

Benzer şekilde, siklin-E1 degradasyonundan sorumlu olan F-box proteini bazı kanser hücre soylarında inaktive olur (Moberg ve ark. 2001; Strohmaier ve ark. 2001). Alternatif olarak, kanserle ilişkili siklin-E aşırı ifadesi, düzensiz CDK4/6 aktivitesinin aracılık ettiği RB inaktivasyonu ile açıklanabilir. Kısa bir süre önce Cables olarak adlandırılan, CDK2'nin WEE1'e bağlı fosforilasyonunu arttıran yeni bir hücre döngüsü inhibe eden proteinin, kolon ile baş ve boyun kanserlerinin % 50-60'ında inaktive olduğu bildirilmiştir (Wu ve ark. 2001).

RB'nin kaybı veya inaktivasyonu, insan tümörlerinde sık görülen bir olaydır. Bununla birlikte, p130 daha az kaybedilir ve p107 inaktivasyonu bildirilmemiştir (Paggi ve ark. 2001). Bu gözlemler, p107 ve p130'un, gen hedefli fareler ile elde edilen sonuçlar ile desteklenmekte ve proliferasyondan öte farklılaşma için önemli olabileceğini göstermektedir. İnsan tümörlerinde E2F transkripsiyon faktörü ailesinde mutasyonlar gözlenmemiştir.

Son zamanlarda, hücre büyümesini veya hücre çoğalmasını etkilemeyen hücre döngüsü düzenleyicilerindeki mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar, mitoz sırasında kardeş-kromatid ayrışmasının kontrolünde rol oynayan mekanizmalarda görülür ve muhtemelen, anöploidi indüklemeye potansiyeline sahiptir.

Hücre bölünmesi sırasında gerçekleşen olayların kontrolünü kaybetmek, insan kanserinin ilerlemesinde önemli bir adım gibi görünmektedir. Bununla birlikte, diğer hücre döngüsü olaylarının yanlış düzenlenmesi de neoplaziye neden olabilir. Sonuçta, kromozomal instabilite ve anöploidi, kusurlu M fazı kontrol noktalarının iki belirgin sonucu, kanser hücrelerinin önemli bir belirticidir. Kromozomların doğru dağılımı, iğ ipliği kontrol noktası tarafından metafazdan anafaz geçişinde kontrol edilir. (Shah ve Cleveland 2000; Nigg 2001)

Bu kontrol noktasının denetleyicisi, CDC20 ile degradasyon için securin gibi proteinleri hedefleyen multisubunit ubiquitin ligaz olan anafaz destekleyici komplekstir (anaphase promoting complex; APC). Kinetokorlar iğ ipliğine doğru şekilde bağlanmışsa, APC aktive edilir ve securin degrade olur. Aktive olan APC, kardeş kromatidler arasındaki kohezin moleküllerinin ayırmalarını sağlayan separin proteazı aktive eder. Bununla birlikte, eğer kinetokorlar iğ ipliği üzerine doğru bir şekilde takılmamışsa, APC inaktif bir durumda tutulmakta ve metafazda hücreler tutulmaktadır.

APC aktivitesi, esas olarak, kinetokoralara mikrotübül bağlanmasını algılayan MAD2 tarafından düzenlenir. MAD2 aktivitesini düzenleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılmamasına rağmen, BUB kinaz ailesine dahil edilmişlerdir. BUB'in kolon kanseri hücre hatlarında mutasyona uğramış olduğu bulunmuştur.

Benzer şekilde, Mad2 heterozigot fareler uzun süre sonra akciğer tümörleri gelişmiştir fakat bu durum insanda gözlenmemiştir (Michelve ark 2001). İğ ipliği kontrol noktasında yer alan polo benzeri kinaz 1 (PLK1) ve AK ailesinin iki üyesini içeren proteinlerdeki değişimler de kanser oluşumuna dahil edilmiştir. (Nigg 2001; Smizu ve ark 2000; Giet ve ark. 1999)

Son olarak, mitozun temel bir regülatörü olan CDK1'in yanlış düzenlenmesi de tümör gelişiminde rol oynayabilir. Lats1 Cdk1'e doğrudan bağlanan ve negatif yönde düzenleyici olan bu protein, farelerde bir tümör baskılayıcıdır (108). Lats1 eksikliği olan fareler yumuşak doku sarkomları, yumurtalık tümörleri geliştirir ve hipofiz displazisi gösterir. Bu sonuçlar Lats1'in bir Cdk1 inhibitörü olarak hareket edebileceğini ve kaybolmasının kontrolsüz proliferasyona yol açabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, kritik M fazı kontrol noktalarındaki hataların kromozomal anormalliklerle sonuçlanabilme olasılığı, kanser araştırmacılarının ilgisini çekmektedir (Tao ve ark 1999).

2.3. Meme Kanseri

2.3.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Tüm kadın kanserlerinin %18' ini oluşturan meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir (Coleman ve ark. 2008, Han ve ark. 2013) (Fitzmaurice ve ark. 2015). Yapılan GLOBOCAN istatistiklerinde, 2012 yılında kadınlarda 1.67 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş ve yaklaşık 500.000'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Ferlay ve ark. 2015). Dünyada meme kanseri teşhisi alan hastaların hayatta kalma oranlarında büyük bir fark olduğu görülmüştür. Gelişmiş ülkelerde 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %80 iken gelişmekte olan ülkelere bu oran %40'ın altına kadar düşmektedir. Bunun sebebi gelişmekte olan ülkelerin tanı ve teşhiste kısıtlı olanaklara sahip olmasıdır. Dünya sağlık örgütünün 2015'de yayınladığı bildiriye göre meme kanserinin Doğu Afrika'da görülme sıklığı

19,4/100,000 iken, Batı Avrupa'da 89,7/100.000' dir. Artan insidans ve geliştirilen tedavilerle dünyada meme kanseri olan hastaların prevalansının arttığı görülmüştür (WHO, 2015). Tüm dünyada kadın meme kanseri insidansının 2050 yılına kadar yılda yaklaşık 3.2 milyon yeni vakaya ulaşacağı tahmin edilmektedir (Hortobagyi ve ark. 2005). Yine Amerika Birleşik Devletleri'nde 1975'lerden 2000'li yıllara kadar meme kanserine bağlı ölümlerdeki önemli azalmanın sebebinin kadınların mamografi ile meme taraması sonucunda erken tanıdaki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir (Berry ve ark. 2005). Hayatta kalım süresini uzatmak için erken teşhisin önemi meme kanseri regülasyonlarının temeli olmaya devam etmektedir.

2.3.2. Meme Kanseri Altıipleri

Literatürde, meme kanserinin kaç moleküler alt tipi olduğu hakkında birçok tartışma vardır. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ayırıcı klinik sonuçlar için önemli ve belirleyici bir faktördür (Yang ark. 2007).

Bazen iyi bir prognozla yavaş büyüme gösteren meme kanseri bazen de oldukça agresif bir klinik seyir göstermektedir. Klinik tabloların bu denli farklı olmasının altında yatan sebep meme kanserinin farklı histolojik alt tiplerden oluşan heterojen bir hastalık olmasıdır (Verma ve ark. 2012).

Meme kanserinin farklı gen ekspresyonu gösteren birçok alt tipi olmasına rağmen immünohistokimyasal değerlendirmelerde tümör hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlerin varlığına göre genel olarak 4 alt tipe ayrılmaktadır; Luminal A, Luminal B, Her-2 pozitif ve bazal benzeri (Goldhirsch ve ark. 2013).

Östrojen reseptörleri (ER), tümör hücrelerinin yüzeyindedir ve östrojen hormonu reseptöre bağlandığında hücre içindeki birçok yolağı aktive eder. Bu yolaklar hücrenin büyüme ve bölünmesini uyarmasından dolayı tümör büyümesini teşvik eder. ER'ni veya östrojen sentezini engelleyen ilaçların verilmesi tümör büyümesini durdurabilir.

HER-2, meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sinde aşırı eksprese edilen bir tirozin kinaz reseptörüdür. HER-2'nun aşırı ekspresyonu, hücreye proliferatif sinyaller sağlayarak kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesine bağlı tümör gelişimine sebep olurken progresyonu belirlemede önemli bir etkidir. HER-2'nun aşırı ifadesi olan meme kanseri tipinde hedefe yönelik tedavi olan monoklonal antikor geliştirilmiş ve trastuzumab (Herceptin) adı verilen bu ligaman reseptörleri bloke ederek tümörü kontrol altına alır (Krishnamurti ve Silverman 2014).

Ki67, tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesini gösteren faktördür. Ki67 hücre döngüsünün S fazı ve mitotik aktivitesi ile ilişkilidir. Normal bir meme hücresi %3'lük bir proliferatif aktiviteye sahipken daha yüksek Ki67 indeksi daha büyük tümörler, pozitif lenf nodları, negatif ER ve pozitif HER-2 reseptörleri ile ilişkilidir (Inic ve ark 2014). Bununla birlikte %20'den daha yüksek bir aktivite, kötü prognoza sahip agresif tümörleri ve daha kısa genel sağkalımı göstermektedir (Inic ve ark. 2014).

Meme kanserini bu şekilde alt tiplere ayırmak hastalığın prognozunu tahmin etmek ve tedaviyi planlamak açısından önem taşımaktadır.

2.3.2.1. Luminal A

Meme kanseri olan kadınların yaklaşık %50-70'i gibi yüksek bir oranında bu tip görülür. Luminal A en düşük proliferatif indeks, iyi diferansiyasyon, en düşük lokal nükse sahiptir (Van Diest ve ark 2004, Williams ve ark 2015). Klinik açıdan luminal A alt tipi genellikle yüksek sağkalım oranlarıyla koreledir (Yang ark. 2007). Luminal A tipi tümörler östrojen reseptörünün ve birlikte eksprese edilen genlerin yüksek ekspresyonuna sahiptir. Bu genlerin ekspresyonu genellikle luminal epitelde bulunur (Sørli ve ark. 2006).

Luminal farklılaşmayı etkileyen önemli faktörlerde (PI3K, MAP3K1, GATA3, FOXA1 ve TBX3) ve hormon reseptör sinyalleşmesini sağlayan faktörlerde (GATA3, FOXA1 ve TBX3) farklı mutasyonlara sahiptirler. Özellikle GATA3 ve FOXA1 en önemlileridir; çünkü GATA3'ün lümen progenitor hücrelerin terminal farklılaşmasındaki rolü yadsınamaz. Aynı zamanda FOXA1 de ER'ye bağlı transkripsiyonlarda önemli bir faktördür (Skibinski ve Kuperwasser, 2015)

Bu hastalar için önerilen tedavi postmenopozal olan ve olmayan kadınlarda değişen şekilde üçüncü nesil aromataz inhibitörleri, Tamoksifen ve Fulvestrant gibi östrojen reseptör modulatorleri kullanılmaktadır (Liedtke ve Kiesel, 2012).

2.3.2.2. Luminal B

Luminal B alt tipi pozitif östrojen reseptörü ve pozitif veya negatif HER2 reseptörleri ile karakterizedir. Her iki tipte de Luminal A ya göre daha kötü prognoz görülür (Cheang ve ark. 2009).

Meme kanseri olan hastaların yaklaşık %10-20'sinde Luminal B tipi görülmektedir. Luminal B alt tipi, Luminal A alt tipine göre daha agresif ve Ki67 indeksi daha yüksektir. Immünohistokimyasal analizle Luminal A'yı Luminal B alt tipinden ayırırken kullanılan anahtar faktörler, hormonal reseptör-pozitif hastalık içerisindeki proliferasyona bağlı marker olan Ki-67 nin kantitatif ekspresyonu ile kantitatif progesteron ekspresyonudur (Prat ve ark. 2012).

Ayrıca kötü diferansiasyon, daha sık kemik metastazı ve daha kötü prognoz ile karakterizedir. Literatürde bu alt tip daha genç yaşta görülme, daha büyük tümörler ve, lenf nodülü pozitifliği ile ilişkilendirilmiştir. Önerilen tedavi tamoksifen ile birlikte neoadjuvan ve adjuvan kemoterapidir (Cheang ve ark. 2009)

2.3.2.3. HER-2 Pozitif

HER-2 pozitif alt tip, hastaların %15-20'sinde görülür. HER2 ile ilgili genlerin yüksek ekspresyonu nedeniyle onkojenik bir sinyal yolağının oluştuğu moleküler alt tiptir (Skibinski ve Kuperwaser, 2015). Bu alt tip, hastaların çoğunda yüksek proliferatif indeks ve kötü diferensiyasyon ile karakterizedir. p53 mutasyonları sıklıkla tespit edilir. ER/PR negatif olması nedeniyle zayıf sağkalım oranı ile ilişkilendirilmektedirler (Yang ve ark. 2007).

Hastaların sadece % 12'sinin 10 yıl hayatta kaldığı bu tip için önerilen tedavi, prognozu değiştiren monoklonal antijen trastuzumab (Herceptin) ile HER-2 hedefli tedavi gerektirir. Bu tedavi, neoadjuvan ve adjuvan protokolde kemoterapi ile birleştirilmelidir (Krishnamurti ve Silverman 2014).

2.3.2.4. Bazal Benzeri

Bazal benzeri (üçlü negatif), alttipi daha büyük tümörler, kötü diferensiyasyon, yüksek mitotik indeks ve tümör nekrozu ile karakterizedir. Bu tip, meme kanseri hastalarının %10-20'sinde bulunur. Kimi araştırmacılar tarafından bazal benzeri yanında Claudin-low alt tipi de tanımlanmıştır. Bu grupta, tight junction proteinleri ve epitelyal hücre adezyon proteinlerinin (Claudin 3,4,7 ve E-kadherin) ekspresyonları düşüktür. Buna ek olarak, lüminal epitelyal genlerinin ekspresyonlarını düşüken, lenfosit ve endotel hücre belirteçlerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda immün infiltrasyon, kök hücre özellikleri ve epitelyal-mezenkimal geçişi söz konusudur ve

hastaların % 7-14'ünde bulunur (Dias ve ark. 2017). Her iki alt grupta da kötü prognoz, kötü farklılaşma ve yüksek mitotik indeks vardır. Klinik açıdan bakıldığında bazal benzeri alt tip genellikle düşük sağkalım oranı ile koreledir (Gautam ve ark. 2010). Sıklıkla viseral organlarda ve akciğerlerde metastaz ile ilk üç yılda nüks ve çoğunda da p53 mutasyonu görülür. (van Diest ve ark. 2004).

Bazal benzeri tümör alt tipinde hücre döngüsü regülasyonu ile ilgili olan genlerin yüksek ifadesi görülmektedir. Ayrıca bazal epitel işaretleyicilerin (KRT5, KRT17 ve laminin) ve BRCA1 mutasyonlarındaki sitokeratinlerin (CK5 / 6 ve CK17) yüksek ekspresyonları da bazal benzeri tümör alt tipinde gözlenmektedir (Sorlie ve ark. 2006).

Önerilen tedavi kemoterapidir, fakat aynı zamanda BRCA1 veya BRCA2 mutasyonlarında oluparib gibi PARP inhibitörleri kullanılabilir (van Diest ve ark. 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hücre siklusunda görevli protein kinazlardan AK'ların da meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde eksprese olduğu gösterilmiştir (Bischoff ve ark. 1998).

Lenf nodu negatif meme kanseri hastalarında, Aurora Kinaz A (AURKA) ekspresyonu, ER+/HER2- moleküler alt tipinde kötü prognoz ile ilişkiliyken, ER-/HER2- veya HER2+ karsinomlarında böyle bir ilişki kurulmamıştır (Siggelkow ve ark. 2012).

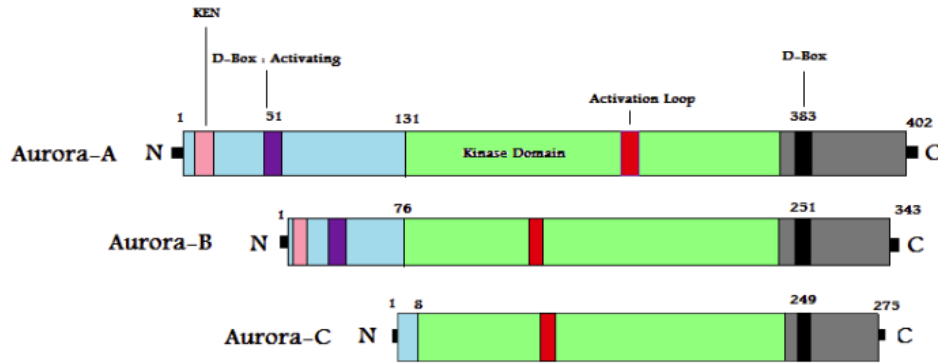
Ayrıca AURK A, Ki 67'yi de içeren diğer proliferasyon markerları ile kıyaslandığında, AURK A'nın ER pozitif meme kanseri hastalarında meme kanserine özgü sağkalım için bağımsız bir belirteç olarak daha üstün olduğu belirtilmiş ve rutin klinik uygulamalarda potansiyel kullanımı öne sürülmüştür (Ali ve ark 2012). Bu veriler ER ve AURK A sinyal yolları arasındaki potansiyel etkileşimleri göstermektedir. Ayrıca, AURK A'nın nükleer ekspresyonu, meme kanserinde hem östrojen hem de progesteron reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkilidir (Das ve ark 2010).

Zhang ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı diğer bir çalışmada Aurora Kinaz B'nin (AURKB) immünohistokimyasal değerlendirmesinde invaziv meme kanseri hastalarının dokularındaki yüksek AURKB ekspresyonunu, kemorezistans ve kötü sağkalımla ilişkilendirilmiş, ayrıca AURKB ekspresyonunun lenf nodu metastazı ve histolojik grade ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Zhang ve ark 2015).

Tüm bu bilgiler ışığında AK'ların meme kanseri tedavisinde moleküler hedef olabileceği düşünülmüştür.

2.4. Aurora Kinazlar

Bir hücrenin normal bir şekilde büyümesi ve gelişmesi için ilk koşul hücrenin düzgün bölünebilmesidir ve bu süreç hücrede sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Mitotik kinazlar olarak bilinen serin/treonin kinaz ailesinden AK'lar hücre bölünmesinin farklı aşamalarında önemli rol oynamaktadır (Nair ve ark. 2009; Vader ve Lens, 2008). A, B ve C tiplerinden oluşan AK'lar, 309-403 arasında değişen bir amino asit dizisi uzunluğuna sahiptir. Her üçü de N-terminal, C-terminal ve protein kinaz bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 2-3) (Bolanos-Garcia, 2004; Kollareddy ve ark. 2008). Bu enzimler evrimsel süreçte hem yapısal hem fonksiyonel açıdan iyi korunmuştur ve ana hücreden yavru hücrelere genetik materyalin doğru ve eşit geçişi için gereklidir (Adams, 2001). AK'lar hücre döngüsünde önemli rol oynarlar ve işlevlerinin çoğunu mitozda gerçekleştirirler.



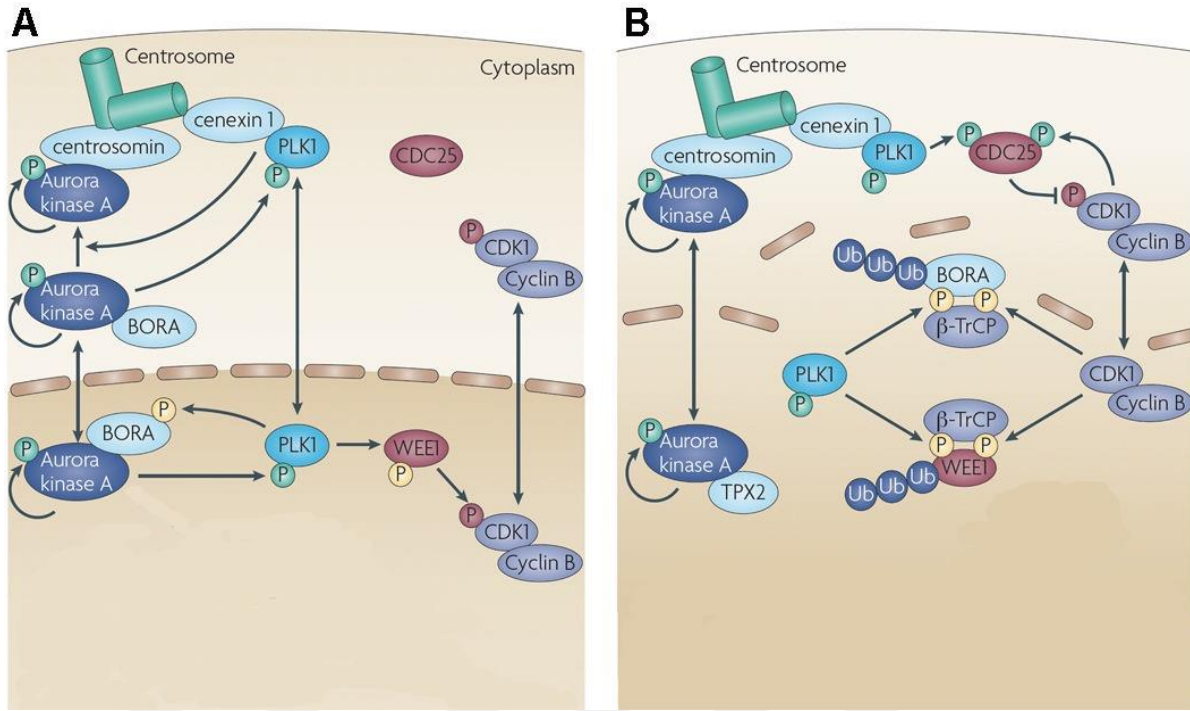
Şekil 2-6: Aurora Kinazları temsil eden şematik diagram
(Kollareddy ve ark. 2008)

2.4.1. Aurora Kinaz A

20q13.2 kromozom bölgesinde konumlanan Aurora Kinaz A (AURKA)'nın ekspresyonu sürekli'dir. Sentrozom olgunlaşması (Berdnik ve Knoblich, 2002), mitotik

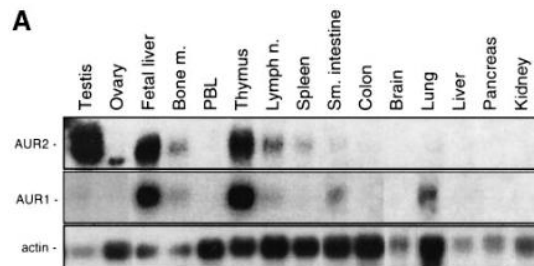
giriş (Hirota ve ark. 2003; Dutertre ve ark. 2004), sentrozom ayrışması (Marumoto ve ark. 2003), iki kutuplu iğ iplikçiği toplanması (Kufer ve ark. 2002; Eysers ve ark. 2003), metafazda kromozomların hizalanması (Kunitoku ve ark. 2003), sitokinez (Marumoto ve ark. 2003), ve mitozdan çıkışı içeren birçok olayı düzenlemektedir.

AURKA'nın seviyesi ve aktivitesi G1'de düşüktür. S fazından G2 ye girerken AURKA seviyeleri artar. G2'nin sonunda, AURKA otofosforile olur ve PLK1'i aktive eder. PLK1, cenexin 1 tarafından sentrozom'a eklenir. AURKA'nın aktivitesi, BORA ve TPX2 gibi proteinler tarafından arttırılır. BORA, PLK1'in AURKA kaynaklı fosforilasyonunun aktivasyonu için gereklidir (Macurek ve ark. 2008). Aktif PLK1, siklinB-CDK1 komplekslerini negatif olarak düzenleyen bir kinaz olan WEE1'i fosforile eder. WEE1'i antagonize eden CDC25 G2'de etkisizdir. Sentrozomda, AURKA ve PLK1, CDC25B' nin aktivasyonunu başlatır ve bu da siklin B-CDK1'i aktive eder. Siklin B-CDK1 kompleksleri, daha sonra WEE1 ve BORA'nın fosforile edilmesini sağlar, bunlar daha sonra F-BOX proteinini içeren bir p-transdusin tekrarı (β -TrCP) tarafından algılanır (β -TrCP) ve bu da WEE 1 ve BORA'nın poliubikitinasyonu ve degradasyonunu destekler. BORA'nın serbest bırakılmasıyla, AURKA daha sonra TPX2 ile etkileşime girebilir, böylece iğ ipliği toplanması kinazın rolünü kolaylaştırır. (Lens ve ark. 2010) (şekil 2-7).

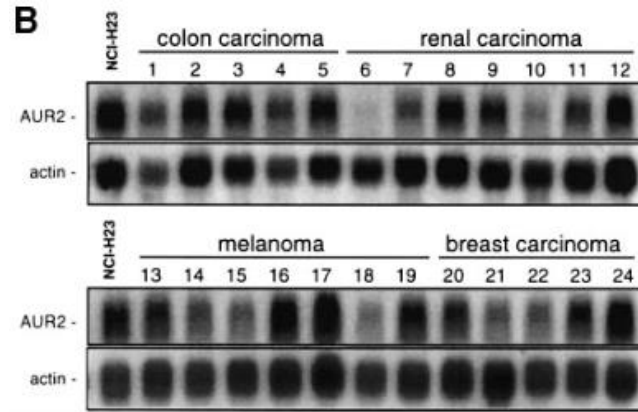


Şekil 2-7: Aurora kinaz A'nın Geç G2 ve Mitoz fazlarındaki fonksiyonu (Lens ve ark. 2010)

Bischoff ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı çalışmada yetişkin normal insan dokularından izole edilen mRNA'nın Northern blot analizi sonucunda AURKA (AUR2) ekspresyonunun testis, timus ve fetal karaciğerde yüksek düzeyde, kemik iliği, lenf düğümü ve dalakta çok zayıf ve diğer normal dokularda ise hiç eksprese olmadığını tespit etmiştir (şekil 2-8). Ayrıca kolon kanseri, meme kanseri, renal kanser ve melanoma hücre hatları gibi hızlı bölünen tüm hücrelerde yüksek düzeyde AURKA eksprese edildiği gösterilmiştir (şekil 2-9).



Şekil 2-8: Normal insan dokularındaki AURKA (AUR2) ve AURKB (AUR1) mRNA ekspresyonları (Bischoff ve ark. 1998)



Şekil 2-9: Farklı kanser hücre hatlarındaki AURKA (AUR2) mRNA ekspresyonları (Bischoff ve ark 1998)

2.4.2. Aurora Kinaz B

Kromozomun 17p13.1 bölgesinde konumlanan Aurora B (AURKB) kromozom kondensasyonu, iğ ipliği kontrol noktası, ve sitokinezi düzenlemektedir (Vader ve Lens, 2008). AURKB, çoğalan dokularda ve özellikle G2/M geçişinde eksprese edilen INCENP (**iç sentromer protein**), survivin ve borealin proteinleri ile kompleks oluşturan kromozomal geçiş kompleksinin (chrosomal passenger complex, CPC) katalitik alt birimidir. (Gassmann ve ark. 2004). Mitoz, histon modifikasyonu ve sitokinez sırasında kromatitlerin doğru ayrılmasında rol oynar (Lens ve ark. 2006). AURKB kromatinin histon H3'teki belli bir bölgesini fosforile ederek hücre bölünmesine yardımcı olur (Giet ve ark. 2005). AURKB'nin ekspresyonu ve aktivitesi G1'de düşüktür ve G2 / M geçişinde artar, mitoz sırasında maksimal aktiviteye ulaşılır (Bischoff ve ark. 1998) AURKB, G2'nin sonlarında kromatin üzerinde, profazda, kromozomlar ve iç sentromer bölgesinde metafaz ise sadece iç sentromer bölgesinde bulunur. Anafaz ve telofazda sitokinezi düzenlemek merkezi iğ ipliği ve midbody üzerinde yerleşir (Carmena ve Earnshaw, 2003). G2 ve erken profazda AURKB kromatinin histon H3'teki Ser10 ve Ser28'de fosforile ederek hücre bölünmesine yardımcı olur (Giet ve ark. 2005).

Bischoff ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı çalışmada AURKB (AUR1)'nin normal timüs ve fetal karaciğerde çok yüksek seviyede eksprese olurken, ince barsak ve akciğerde orta derecede eksprese olduğunu tespit etmiştir (şekil 2-8).

AURKB insan malignitelerinde tipik olarak gen seviyesinde amplifiye olmamasına rağmen kolorektal kanserlerde mRNA ve protein seviyelerinde sıklıkla artış olduğu görülmüştür (Tatsuka ve ark. 1998). Standart kriterlere göre bir onkogen olarak belirlenmemiş olmasına rağmen AURKB' nin ekzojen olarak Çin hamster embriyo hücrelerine verilmesi sonucunda sırasıyla mitoz boyunca kromozom seperasyonu defektlerinde ve tümör invazifliğinde artış olması AURKB' nin tümörögenezde rolü olduğunu göstermiştir (Ota ve ark. 2002).

2.4.3. Aurora Kinaz C

Aurora kinaz C (AURKC), germ hücrelerde bulunur ve fonksiyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Başlangıçta görevlerinin testis dokusunda mayoz bölünme ile sınırlı olduğu düşünülen AURKC' nin de mitozda AURKB ile örtüşen işlevleri olduğu belirlenmiştir (Sasai ve ark. 2004; Yan ve ark. 2005)

Son yıllarda hücre döngüsü-hedefli kanser tedavilerinde AK'lar da yer almıştır.

2.5. Hücre Döngüsü-Hedefli Kanser Tedavileri

2.5.1. G1 hedefli Terapiler

Erken kuşak pan-CDK inhibitörleri kanser hücrelerine karşı güçlü bir terapötik etki gösterememiş ve klinikte kabul edilemeyen toksik etkileri olmuştur. Fakat son yıllarda CDK4 ve CDK6'nın oral yolla alınan güçlü ve spesifik kimyasal inhibitörleri kanserde hedefe yönelik ilaçlar olarak ortaya çıkmıştır (Asghar ve ark. 2015). Bu CDK4 ve inhibitörleri tümör hücrelerini G1 fazında tutar. Bununla birlikte fonksiyonel RB eksikliği olan tümörler, tedaviye dirençlidir ve tedaviye olan direnci p27^{INK4A}'e benzemektedir. Palbociclib (Pfizer) (Fry ve ark. 2004; Toogood ve ark. 2005), östrojen reseptörü pozitif, HER2 negatif meme kanseri tedavisi için FDA tarafından 2015 yılında onaylanmış bir ilaçtır. Aşırı toksisiteye yol açmadan ilerlemiş hastalığı olan kadınların progresyonsuz sağkalım süresini önemli ölçüde uzatmıştır (Finn ve ark. 2015; VanArsdale ve ark. 2015). Özellikle, palbociclib terapisinin tek başına kullanımda sınırlı aktivite göstermesinden dolayı bir aromataz inhibitörü olan letrozol (Novartis) ile birlikte kullanımı sinerjistik etki gösterdiğinden daha etkili olduğu görülmüştür (Finn ve ark. 2015).

Bu CDK'lar hücrede hayati fonksiyonlar için gerekli olmadığından dolayı CDK4 ve 6'nın inhibisyonu hücre içinde tolare edilebilmektedir (Malumbres ark. 2004).

2.5.2. S hedefli Terapiler

DNA hasarı, S fazı boyunca normal hücrelerde diğer hücre döngüsü fazlarından daha sık görülür ve her bölünme döngüsü sırasında ortaya çıkan binlerce farklı hatayı tanımak ve onarmak için karmaşık protein makinesiyle hatalar tanınarak tamir edilmektedir. Hücrelerin bölünmesinde doğru DNA replikasyonu, insan genomunun bütünlüğünü korumak için çok önemlidir. DNA replikasyonunun doğruluğunu sağlamak için, çeşitli hücre döngüsü kontrol noktalarının aracılık ettiği DNA hasar tepkisi DNA onarım sistemini aktive eder veya DNA hasarı ortaya çıktığında hücresel apoptoza neden olur. Onkogenik bir aktivasyon veya tümör baskılayıcıların etkisini kaybetmesinden dolayı DNA hasar cevabında bir hata olduğunda, DNA replikasyonu, onarılamayan DNA bölgelerinin varlığına rağmen proliferasyon taleplerini karşılamaya devam edebilir, bu da kanser hücrelerine özgü olan hatasız DNA replikasyonunun bozulmasına ve DNA sentezinin yavaşlaması olarak tanımlanan replikasyon stresine yol açar.

Geleneksel sitotoksik tedavilerde, DNA replikasyonu ve tamir mekanizmaları başarısız olduğunda hücre ölümüne neden olan S ve M-faz hücre döngüsü kontrol noktaları hedeflenmektedir. (Goldstein ve Kastan 2015). DNA replikasyonu için yeterli miktarda metabolik alt yapı oluşumundan önce S fazına hızlı bir giriş olabilir. Bu durumda, nükleozit trifosfat havuzlarını azaltan ve replikasyon stresini arttıran kemoterapötik nükleozid analogları kullanılmaktadır (Beck ve ark. 2012).

Replikatif stres ile replikasyon çatalı durarak tek zincirli DNA (ssDNA) birikir ssDNA, replikasyon proteini A (RPA) gibi ssDNA bağlayıcı proteinler ile hızlı bir şekilde kaplanır, bu daha sonra Chk1 kinazın fosforilasyonuna yol açan ATR sinyal yolunu aktive eder (Berti ve Vindigni 2016). Bu yolun etkinliği, durdurulmuş çatalları stabilize etmek ve çoğaltılmamış DNA varlığında mitoz içine girişi sınırlandırmak amacıyla hücre döngüsü S-M kontrol noktalarını aktive etmek için çok önemlidir (Eykelenboom ve ark. 2013). Bununla birlikte, ATR ve Chk1'in yokluğunda replikasyon stresini arttıran koşullar altında, durgun çatallar replikasyona devam edebilir ve diğer replikasyon orijinlerini tetikleyebilir, bu da deoksiribo nükleotit tri fosfat (dNTP) havuzlarının tükenmesine ve replikasyon stresinin şiddetlenmesine sebep olur. SsDNA

miktarı mevcut RPA miktarını aştığında, çatalar DNA çift iplik kopmalarınayol açar . Bu hücrelerin mitozaya girilmesine izin verildiğinde, çoğaltılmamış kromozomlar mitotik felaketle hücre ölümünü tetiklemektedir (Toledo ve ark. 2013). Normalde, replikasyon stresi genomik instabiliteyi indüklemesine ve tümörjenezini beslemesine rağmen, çalışmalar bunun sadece replikatif stresin düşük ila hafif seviyelerdeyken gerçekleşen bir durum olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, yüksek düzeyde replikatif stres, mitotik felaket yoluyla kanser hücresi ölümüne neden olabilmekte ve bu nedenle kanser ilerlemesini önlemektedir (Gaillard ve ark 2015; Berti ve Vindigni 2016).

Bu nedenle kanser hücrelerinin, yüksek düzeyde tekrarlayıcı stresle başa çıkabilmek için ATR-Chk1 yolu gibi yetkin bir yanıt sistemini sürdürmeleri gerekir (Canman 2001). Ek olarak Chk1, S evresi sırasında replikasyon kaynaklarının düzenli aktivasyonunu güvence altına almak için CDK aktivitesini baskılar (Zhao ve ark 2002). Bu nedenle replikatif stresi daha da arttırmak için ATR-Chk1 sinyalini hedefleyen inhibitörlerin kullanılmaktadır. Çalışmalar, Chk1'in inhibisyonu veya yokluğu ile, DNA replikasyonunun uygun olmayan bir şekilde, çoklu replikasyon faktörlerinin tükenmesine ve replikasyon çatalını durdurma ve çökmesine yol açarak başladığını göstermiştir (Syljuasen ve ark 2005; Petermann ve ark 2010). Bu yüzden Chk1 inhibitörleri faz I ve II klinik çalışmalarında hala değerlendirilmektedir (Hong ve ark 2016).

2.5.3. G2 M hedefli Terapiler

G1/S geçişinde indüklenen siklin A, prometafazda parçalanırken siklin B, siklin A'dan sonra S / G2'de birikir ve daha sonra anafaz sırasında parçalanır. *CCNB1*'i indükleyen transkripsiyon faktörleri CDK aktivitesi ile aktive edilir (Fung ve ark. 2007).

G2 fazı sırasında artan siklin B ve CDK1 kompleksleri, WEE1 inhibitör eşığının üstesinden gelir. Daha sonra WEE1'in kendisi CDK1 aracılı fosforilasyon ile pasifleştirilir ve CDC25C aktive edilir. Bu süreç, hücreler mitozaya girdiğinde ani CDK1 aktivitesini tetikler (Perry ve Kornbluth 2007).

G2 sırasında DNA hasarı, CDC25 izoformlarının fosforilasyonuna ve inhibisyonuna, CDK1 inhibisyonuna ve G2 hücre döngüsünün tutulumuna yol açan ATR/CHK1 sinyal yolunu aktive eder. Eğer DNA hasarı sonradan tamir edilirse tutulum hali tersine çevrilebilir. PLK1 ve AURKA dahil olmak üzere diğer kinazlar,

kontrol noktasını ters yöne çevirmeye ve mitotik girişe katkıda bulunur (Aarts ve ark. 2013; Dominguez-Brauer ve ark. 2015; Keen ve Taylor, 2004; Nigg, 2001; Strebhardt ve Ullrich, 2006). Örneğin PLK1, AURKA aracılı fosforilasyon ile aktive edilir. Buna karşılık, CDK1 fosforilasyonu, PLK1'in mekanizmaya katılmasına ve WEE1'in fosforile edilerek bozunmasına ve CDC25'in paralel reaktivasyonuna aracılık eder. WEE1, PLK1 veya AK'ın kimyasal inhibisyonu, hali hazırda DNA hasarı bulunan kanser hücrelerini erken mitotik sürükler ve böylece hücre ölümünü tetikleyeceği öngörülmektedir. (Jackson ve ark. 2007). Bununla birlikte, yoğun çabalara rağmen, AK ve PLK'lerin gelişmiş inhibitörleri, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt edememelerinden dolayı ciddi yan etkilere neden olmuştur ve solid tümörlerde terapötik klinik aktivite göstermemiştir (Huang ark. 2009; Dominguez-Brauer ve ark. 2015).

2.6. Aurora Kinaz İnhibitörleri

Bölünmede görevli olan AK'ların disregülasyonu tümörögenез ile ilişkilendirilmiştir. Malignitelerde AURKA bölgesinin sık olarak amplifiye olup melanoma, meme, kolon, pankreas, ovaryum, mesane, karaciğer ve mide kanserlerine sebep olduğu gösterilmiştir. AK'ların aşırı ekspresyonunun tümörögenезle olan ilişkisi göz önüne alındığında kanser terapisi için hedef olarak seçilebileceği düşünülmüş ve bunun sonucunda AK inhibitörleri geliştirilmiştir. Yapılan pre klinik çalışmalarda bu inhibitörlerin antitümör özelliklerinin olduğu gösterilmiştir.

Merck tarafından geliştirilen Tozasertib (MK-0457), klinik çalışmalarda test edilen ilk AK inhibitörüdür. Bir pirimidin türevi olan ilacın tüm AK tipleri için farklı düzeylerde afiniteye sahip olduğu görülmüştür (Harrington ve ark. 2004) ve ön klinik çalışmalarda, Tozasertib'in AURKA ve AURKB kinaz aktivitesini inhibe ettiği doğrulanmıştır (Tyler ve ark. 2007). Yapılan in-vitro çalışmalarda prostat (Lee ve ark. 2006), tiroid (Arlot-Bonnemains ve ark. 2008) ve over (Lin ve ark 2008) kanserlerine karşı aktivitesi bildirilmiştir. Tozasertib uygulanan hücreler, sitokinezin başarısız olmasından dolayı 4N DNA içeriğine sahip olup p53 fonksiyonu olan hücrelerde apoptoza geçerler (Gizatullin ve ark. 2006). İleri evre solid tümörlü hastalarda asemptomatik nötropeniye sebep olduğu bildirilmiştir (Rubin ve ark. 2006).

PHA-739358 AURKA, AURKB ve AURKC' ye karşı kuvvetli aktiviteye sahip küçük molekül bir 3-aminopirazol türevidir (Carpinelli ve ark. 2007). İmatinib

dirençli hücre hatları da dahil olmak üzere BCR-ABL-pozitif lösemi hücre hatlarına karşı oldukça etkilidir (Gontarewicz ve ark. 2008). Ayrıca kolon, meme, over ve prostat dahil olmak üzere birçok karsinomda etkilidir (Carpinelli ve ark. 2007). İlk klinik faz 1 çalışmalarında, Doz sınırlayıcı toksisite (DLT) grade 3 ve 4 nötropeni ve lenfositopenidir. ikinci bir klinik çalışmada en sık gözlenen yan etki olarak grade I / II anoreksi, bulantı, yorgunluk ve ishal ve nötropeni raporlanmıştır (De Jonge ve ark. 2008).

Merck ve Rigel Pharmaceuticals tarafından geliştirilen AS703569 (R763), AURKA, AURKB ve AURKC'nin oral olarak mevcut bir ATP-yarışmalı inhibitörüdür. İleri hematolojik maligniteleri olan hastalarda yapılan faz 1 çalışmasında, grade 3 diyare doz sınırlayıcı toksisite olarak belirlenmiştir. Uygulanan diğer doz rejiminde grade 3 ve yüksek dereceli toksisiteler arasında enfeksiyonlar, nötropeni, trombositopeni, anemi ve gastrointestinal bozukluklar ile grade 4 mukozit gözlemlenmiştir (Sonet ve ark. 2008).

AT9283, AURKA ve AURKB'ye karşı güçlü aktivitesi olan çok hedefli bir kinaz inhibitörüdür (Howard S ve ark. 2009). Yirmi dokuz hastada infüzyon ile uygulanan 162 mg / m² / gün dozunda grade 4 serum aminotransferazların yükseldiği ve bir hastanın ise A T9283 infüzyonunun tamamlanmasından kısa bir süre sonra miyokard infarktüsden öldüğü bildirilmiştir. İkinci bir faz I çalışmasında otuz üç hastanın hepsinde nötropeni görülmüştür.

AZD1152 pirazolo quinazoline AK inhibitörünün dihidrojen fosfat ön-ilacıdır ve plazmada aktif parçaya hızla dönüştürülür (Mortlock ve ark. 2007). AZD1152-HQPA, AURKB'nin güçlü ve seçici bir inhibitörüdür ve diğer 50 kinaz paneli üzerinde yüksek bir özgülüğe sahiptir. AZD1152, prelinik çalışmalarda insan kolon ve promyelositik lösemi tümör ksenogreftlerinin büyümesini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (Wilkinson ve ark 2007). Ayrıca, çeşitli lösemi hücre hatlarında büyümenin durması ve apoptozu tetiklemesi, AZD1152'nin lösemi olan bireylerin tedavisi için umut verici yeni bir ajan olduğunu düşündürmektedir (Yang ve ark. 2007).

Yukarıda bahsedilen sentetik AK inhibitörlerinin yan etkileri nedeniyle son yıllarda doğal AK inhibitor etkili bileşiklerin araştırılmasına odaklanılmıştır (Hoang ve ark. 2016). Bunlar arasında fenolik bileşikler en önemli adaylar arasındadır.

2.7. Fenolik Bileşikler

Dünyada 300.000'in üzerinde kaydedilmiş yüksek bitki bulunmakta ve bu bitkiler çeşitli yapı ve sınıftan 200.000 kadar farklı kimyasal sentezlemektedir. Bu moleküller primer ve sekonder metabolitler olarak gruplandırılabilir. Primer metabolitler bitkinin büyümesi ve gelişimi ile ilgili olan ve tamamında ortak olarak sentezlenen karbohidratlar, yağlar, nükleik asitler vb. olarak tanımlanır. Sekonder metabolitler ise daha özelleşmiş hücrelerde bulunan ve direkt olarak temel fotosentez veya solunum sistemi ile ilgili olmayan fakat bitkinin bulunduğu ekosistemde varlığını sürdürebilmesini sağlayan moleküllerdir (Lattanzio, 2013). Sekonder metabolitlerin yoğunluğu ve çeşitleri gelişim dönemleri, türler ve bireyler arasında farklılık gösterir, fakat sağkalım ve üreme ile ilgili organlar en yüksek oranlarda içermektedir. Bitkiler gelişim sürecinde bu primer yolaklarda çeşitli stres belirteçlerine cevap olarak on binlerce farklı kimyasal üretebilir. Bu sekonder metabolitlerin birikimi de çoğunlukla bitkilerin gelişim sürecinde geçecekleri evreleri belirlemektedir. Gelişim evreleri ve sirkadyen ritm ile kontrol edilen gen ekspresyonları sekonder metabolitlerin önemli regülatörleridir (Wink ve ark. 1999; Tauber ve ark. 2004; Broun, 2005).

Moleküler anlamda çok daha çeşitli olan bu grup, bitkinin böcek, mikrop, virüs ve rekabet ettiği diğer bitkilere veya ultraviyole radyasyon ve oksidanlara karşı savunmaya ek olarak polen ve tohum yayılımı yapan hayvanları çekmeye yönelik sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır (Hattenschwiler ve Vitousek, 2000; Kutchan, 2001). Örneğin, antosiyaninler çoğu kırmızı ve mavi bitki organlarının pigmentleridir. Çiçeklerde ve olgun meyvelerde tozlaşma ve tohum yayılımı amacıyla üretilir. Ayrıca genç yapraklarda zararlı böcekleri uzak tutmak için bulunur (Gould, 2010). Flavonoller ise bitki dokularını UV ışınlarına karşı korur (Winkel-Shirley, 2002).

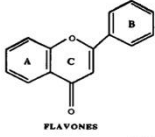
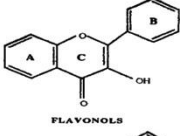
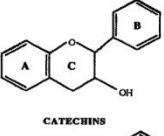
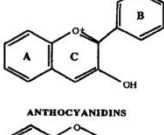
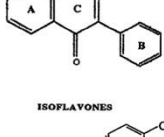
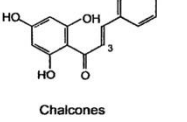
Biyosferdeki organik karbonun ortalama %40'ına karşılık gelen fenolik bileşikler şikimik asit veya malonat/asetat yolağı ve ilişkili yolları üzerinden sentezlenirler. Biyodegradasyon sırasında karbondioksit geri dönüşümleri biyolojik karbonun geri dönüşümünün hız sınırlayıcı basamağıdır (Chapman ve Regan, 1980; Croteau ve ark. 2000).

Sekonder metabolitler biyosentetik yolları ve yapısal özellikleri ile bazı alt gruplara sınıflandırılır (Kutchan, 2001; Lattanzio ve ark. 2008; Wink, 2003). Ancak, fenolik bileşikler arasında fenolik asitler, flavonoidler ve taninler ana besinsel fenolik bileşikler olarak sayılmaktadır (King ve Young, 1999).

2.7.1. Flavonoidler

Fenolik bileşikler arasındaki en önemli grubu flavan (2 fenol benzohidropiran) türevleri olarak flavonoidler oluşturur. Flavonoid ailesi içerisinde günümüze kadar 8.000'in üzerinde molekül belirlenmiştir ve devam etmektedir (Andersen ve Markham, 2006). Hücre içinde veya çeşitli bitki organlarının yüzeyinde olmak üzere birçok bitki dokusunda bulunurlar. Bu sınıftaki moleküllerin kimyasal yapısı C6-C3-C6 difenil propan iskeletidir. Fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü oksijenle halka oluşturur (Flavan halkası). Benzopiran (kroman) kısmının aromatik halka ile bağlanma pozisyonuna göre bu sınıf moleküller 3 gruba ayrılır; flavonoidler (2-fenilbenzopiran), izoflavonoidler (3-benzopiran) ve neo flavonoidler (4-benzopiran). Ayrıca kimyasal yapıları heteroaromatik halka C doymuşluğu ve genel hidroksilasyon düzenine göre farklılık gösterebilir. Tüm bu gruplarda genellikle bir ortak kalkan öncülü bulunduğundan biyogenetik ve yapısal olarak bağlantılıdır. Flavanoidler hidroksil gruplarının hidroksilasyonu, metoksilasyonu ve O-glikozilasyonu ile veya doğrudan flavonoid iskeletindeki C atomunun C-glikozilasyonu ile modifiye edilebilir. Alkil grupları flavonoid kısım ile kovalent bağlanabilir ve bazen ek halkalar flavonoid çekirdeğin temel iskeletine de bağlanabilir. Substitüsyon paterni ve heterosiklik C halkasındaki oksidasyon ve saturasyon varlığına bağlı olarak çeşitli flavonoid alt grupları sınıflandırılmıştır.

Yapısal olarak flavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler, flavonoller, kateşinler (flavanoller), izoflavonoidler olmak üzere altı gruba ayrılırlar (Stafford, 1991; Andersen ve Markham, 2006; Vermerris ve Nicholson, 2006).

Ana yapı	Flavonoidler	Kimyasal yapı	Örnekler
$C_6C_3C_6$	Flavones		Cinencetin, nobiletin, tangeritin, isocinencitin, luteolin, apigenin
	Flanonols		Quercetin, kaempferol
	Flavanones		Hesperidin, naringenin
	Flanonols (catechins)		(+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin
	Anthocyanins		Peonidin, delphinidin, petunidin, cyanidin
	Isoflavones		Daidzein, genistein
	Chalcones		Phloretin, arbutin, chalconaringenin

Şekil 2-10: Flavonoidlerin alt grupları (Aherne ve O'Brien, 2002)

Flavonoidlerin başta antioksidan etkileri olmak üzere insan vücudunda çeşitli faydalı etkileri bulunmaktadır. Örneğin, soğan, elma, yeşilçay gibi bir çok bitkide bulunan ve bir flavonol olan kuersetin maddesinin anti-karsinojenik, anti-enflamatuvar, anti-viral etkilerine ek olarak lipid peroksidasyonunu, platelet agregasyonu ve kapiler permeabiliteyi azalttığı ve anti-hipertansif etkileri olduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2016; Marunaka ve ark. 2017). Maydanoz, kereviz ve papatya çayında bolca bulunan apigenin, cilt kanserinde kemopreventif ajan olarak öne çıkmaktadır ve anti-proliferatif, anti-enflamatuvar ve anti-metastatik özellikleri ile bilinen bir flavondur (Choi ve ark. 2016). Bakla, soya fasülyesi ve kahve gibi birçok bitkide bulunan ve bir izoflavon olan

genistein ise anjiyogenez inhibitörü ve bir fitoöstrojendir. Metabolik hastalıklarda ve çeşitli kanserlerde etkileri gösterilmiştir (Jaiswal ve ark. 2018; Mukund ve ark. 2017; Sureda ve ark. 2017).

2.8. Protein Kinazlar ve Flavonoidler

Sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunan ve doğal bir ürün olan flavonoidler, antioksidan ve antienflamatuar etkileri ile diyabet, osteoporoz ve serbest radikal hasarının neden olduğu kanser gibi kronik hastalıkların önlenmesinde fayda sağlamaktadır (Boam 2015, Vidak ve ark. 2015, Turati ve ark. 2015). Son zamanlarda literatürde fenolik bileşiklerin hücre içerisindeki birçok protein kinaza etki ettiği gösterilmiş ve bu flavonoidlerin yukarıda belirtilen hastalıklarla ilişkili protein kinazların (PK) hedefi olarak PK inhibitörleri olduğu tanımlanmıştır (Yokoyama ve ark. 2015, Kim ve ark. 2015). Spesifik olarak flavonoidlerin, fosfonositol inositol 3-kinaz (PI3K) (Matter ve ark. 1992), Akt/protein kinaz B (Akt/PKB) (Spencer ve ark. 2003), protein kinaz C (PKC) (Gamet-Payrastra ve ark. 1999) ve mitojen aktive edici protein Kinaz'lara (MAPK) (Kong ve ark. 2000) doğrudan bağlandığı tespit edilmiştir. Bu etkileşimle flavonoidler, çoklu sinyal yollarını düzenlemek için PK fosforilasyon durumunu değiştirir. Protein kinazların aktiviteleri, homeostazi sistemlerinde sıkı bir şekilde düzenlenir. Bununla birlikte, protein kinazlar patolojik koşullar altında serbest bırakılabilir, bu da protein kinaz aracılı hücre sinyal yollarının bozulmasına neden olur ve kanser, diyabet ve inflamasyon da dahil olmak üzere çeşitli rahatsızlıklara sebep olabilir (Shchemelinin ve ark. 2006). Yapılan başka bir çalışmada, özellikle azot içeren flavonlar ve kalkonların CDK1 inhibitörleri olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2008, Liu ve ark. 2007). Bu bileşikler, hem G1 hem de G2 fazlarında hücre döngüsü durmasını indükleyerek CDK 1, 2, 4 ve 6'nın güçlü bir yarışmalı ATP inhibitörü olduğu belirtilmiştir.

Quercetin'in Raf1 ve MEK1 ex vivo ve in vitro olarak doğrudan bağlandığı bulunmuştur. Bununla birlikte quercetin, MEK1'in kinaz aktivitesinde güçlü bir inhibisyon göstermiştir (Lee ve ark. 2008). Kafeik asidin, hücre yüzeyi alıcılarından alınan sinyallerin sitoplazmik sinyal iletim basamaklarına iletilmesinde rol oynayan reseptör olmayan tirozin kinaz Fyn'ye ATP ile rekabetsiz bir şekilde doğrudan bağlandığını ve aktivitesini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Kang ve ark. 2009).

Flavonoidlerin hücre siklusunda önemli görevleri olan ve birçok tümerde aşırı ekprese edilen, serin treonin kinazlardan AK üzerindeki etkisi de birçok çalışmada gösterilmiştir. Kalkonlarla yapılan bir çalışmada AURKA proteini ve çoklu ilaç direnci proteini (MDR) miktarının meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve BT-20’de doza bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. (Komoto ve ark. 2018). Akciğer kanseri hücre hattı A 549 ile yapılan bir çalışmada Kuersetin ile muamelesi sonucunda birçok kanserde tümör oluşumu ve ilerlemesiyle ilişkilendirilmiş AURKB’nin kuersetine doğrudan bağlandığı ve tümör dokularındaki AURKB hedeflerinden olan ve AURKB azalmasına bağlı olarak histon 3’ün fosforilasyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (Xingyu ve ark 2016). Hela hücre hattı ile yapılan başka bir çalışmada 3-hidroksiflavonun yüksek çıktılı tarama sisteminde AURKB’nin yeni inhibitörü olduğu tespit edilmiş ve AURKB ile 3-hidroksiflavonun yüksek affinite ile birbirine bağlandığı saptanmıştır. Ayrıca yine AURKB aktivitesi baskılanmış ve kanser hücrelerinin hızlı büyümesinin inhibe edici etkisi gösterilmiştir (Lang ve ark. 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi BAP tarafından desteklenen 22859 numaralı “Flavonoid Kokteyli verilmiş MCF-7 Hücrelerinde Aurora Kinazın Protein Düzeyinde Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez projemizde MCF7 meme kanseri hücre hattı kültüre edilerek belirli dozlarda ve saatlerde Flavonoid kokteyli ile muamele edilmiştir. Flavonoid muamelesinin Western blot yöntemi kullanılarak hücre siklusünde görevli AURKA ve AURKB proteinleri düzeyindeki etkisini ve Flow sitometri sistemi ile hücre siklusundaki etkileri araştırılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeleri ve Kitler

3.1.1.1. Hücre Kültürü

DMEM (Gibco), Fetal Bovin Serum (Biochrome), Tripsin/EDTA %0,25 (Gibco), Penisilin/Streptomisin (Gibco), L-glutamin, Vi-Cell Reagents (Beckman Coulter), Dimetil sülfoksit (Applichem), Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche), PBS tabletleri (VWR life science), Distile su (invitrogen) 96 well plates (Sarstedt), 6 well plates (Sarstedt), Hücre kültürü flaskları 75 cm² ve 25 cm² (Greiner). 5ml, 10ml, 25ml serolojik pipet, pipetör, 10,100,1000 ul pipet ucu, mikropipet seti, 15 ml ve 50 ml hacimli santrifüj tüpü, 1,5 ml hacimli mikrosantrifüj tüpü

3.1.1.2. Western Blotlama

10,100,1000 ul pipet uçları, mikropipet seti, RIPA buffer (VWR life science), Proteaz inhibitör kokteyli (VWR life science), Qubit protein kiti (invitrogen), 4x Laemmli buffer (BioRAD), %4-20 Mini-PROTEAN TGX Precast Protein jeli, 10X TBS (BioRAD), distile su, metanol (Sigma-Aldrich), 0.2 µm PVDF membran (BioRAD), yağsız süt tozu (Applichem) GAPDH, AURKA, AURKB antikorları (Proteintech), 5X Transfer buffer (TB) (BioRAD), Tris-Glisin-SDS, Tween20 (Sigma-Aldrich), Anti-fare, anti-tavşan antikor (Cell signaling), western ECL substrate kiti (BioRAD)

3.1.1.3. Hücre Siklusu Analizi

Muse Cell Cycle kiti (Merck), 10,100,1000 ul pipet ucu, mikropipet seti, %70 etanol, soğuk PBS, Muse System Check Kiti

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (Thermo Multiskan SPECTRUM),
- Santrifüj (Hettich, rotina 38)
- İnverted Işık mikroskobu (Olympus CKX41),
- Laminar flow kabin
- Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter Vi Cell XR)
- CO₂ İnkübatörü (Thermo electro corporation)
- Sıvı azot tankı (-196 °C)
- -80 °C derin dondurucu
- Vorteks (Velp scientifica)
- Sıcak su banyosu
- + 4°C ve -20 °C Buzdolabı (Bosh)
- Yatay Çalkalayıcı (Benchmark)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
- Muse Cell analyzer (Merck)
- Mini Protean Tetra System (BioRad)
- Trans Blot turbo Transfer sistemi (BioRad)
- PowerPac Basic Güç kaynağı (BioRad)
- Fusion FX7 kemüliminesan görüntüleme sistemi (Vilber)
- Qubit Fluorometer protein konsantrasyon ölçüm cihazı

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

ATCC'den temin edilerek çoğaltılmış ve -196°C sıvı azotta stoklanmış MCF7 hücre hattı stoktan çıkartılarak %10 Fetal Bovin Serum, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde 37°C ve %5 CO₂ koşulunu sağlayan inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.2.2. Flavonoid Kokteyli Hazırlanması

Karışım içerisinde bulunan apigenin, krisin, kuersetin, pinostrobin gibi (patent aşamasında) tüm fenolik bileşenler hassas terazide tartılmış ve ana stok konsantrasyonu 500 µg/ml olacak şekilde, taze %60'lık EtOH' de çözündürülerek hazırlanmış ve kullanılıncaya dek -20°C de saklanmıştır. Deney aşamasında her biri taze olarak daha önceden belirlenen konsantrasyonda karıştırılıp %100'lük flavonoid karışımı oluşturulmuş ve %3 FBS içeren besi ortamı ile dilüe edilerek %1,5, %5 %7 %10 %35 konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Sayılması, Flavonoid Kokteyli Uygulanması

%10 FBS içeren DMEM'de devamlılığı sağlanan MCF7 hücre hattı üzerindeki besi yeri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 3 ml PBS ile yıkama işleminden sonra hücreler t₂₅ için 2 ml t₇₅ flasklar için 4 ml tripsin ile flask yüzeyinden kaldırılmış ve ardından uygulanan tripsin miktarının en az 2 katı kadar besiyeri ile tripsin aktivitesi inhibe edilmiştir. Hücreler pipetör yardımıyla toplanarak falkona aktarılmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek falkon dibinde hücre pelleti oluşturulmuştur. Üzerindeki süpernatant döküldükten sonra pellet halindeki hücreler %3 FBS içeren besiyeri ile mikropipet yardımıyla süspanse edilmiş ve 400 ul taze besi yeri ile 100 ul hücre süspansiyonu vi-cell sayım cihazı vialine eklenmiştir. Vialler hücre sayısı belirlenmesi için tripan mavisi prensibi ile çalışan Vi-Cell Otomatik Hücre Sayım cihazına yüklenmiş ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayılan canlı hücre sayısına göre %3 FBS içeren besi ortamı ile gerekli dilüsyonlar yapılarak 100 ul'sinde 1x10⁴ sayıda hücre 96 kuyulu platelere 4 tekrarklı olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin tutunması için 1 gün beklenmiştir. Ertesi gün hücreler %1,5, %5, %7, %10, %15 ve %35 konsantrasyonlarında taze olarak hazırlanmış flavonoid karışımı ve negatif kontrol olarak sadece besi ortamı ile muamele edilmiştir. Flavonoid kokteylinin MCF7 hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkileri 3 gün boyunca WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi

Hücre canlılığı "WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi" ile saptanmıştır. Bir tetrazolyum tuzu olan WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt) canlı hücrelerin mitokondrilerinde yer alan mitokondriyal dehidrojenazlarla reaksiyona girerek sarı renkli formazan kristaline dönüşürler. Böylece ne kadar canlı hücre varsa ona orantılı olarak o kadar sarı renk

oluşmakta ve formazan oluşumundaki bu değişim spektrofotometrik olarak 450nm dalga boyunda ölçülebilmektedir. Bunun için %1,5, %5, %7, %10, %15 ve %35 konsantrasyonlarında doz verilen hücrelere 24., 48. ve 72. saatlerin spektrofotometrik ölçümünden 3 saat önce kuyu başına 10 ul WST-1 verilerek inkübasyona bırakılmış ve 24., 48. ve 72. saatlerde 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

3.2.5. Hücre Morfolojisi

MCF7 hücreleri, T₂₅ kültür flaskları içine flask başına 2×10^6 sayıda hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin flaska tutunup farklılaşması için 1 gün 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler mikroskop altında kontrol edildikten sonra deney grubu 4 ml hacimde %10 ve %35 konsantrasyonlarında Flavonoid kokteyli ile kontrol grubu ise besi ortamı ile muamele edilmiştir 0., 3., 24., ve 48. saatlerdeki hücrelerde meydana gelen morfolojik değişim, İnverted Faz Kontrast Mikroskobu (Zeiss Mikroskoplar) kullanılarak görüntülenmiş ve fotoğraflar ProgRes Capture Pro Yazılımı kullanılarak kaydedilmiştir.

3.2.6. Hücre Siklusu Analizi

Muse Hücre Döngüsü Kiti, Muse cell analyzer ile hücre döngüsünün G0 / G1, S ve G2 / M fazlarındaki hücre yüzdesinin kolay ve hızlı kantitatif ölçümlerini sağlar. Propidyum iyodür (PI) boyası, farklı DNA içeriklerine dayanarak hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreleri birbirinden ayırır. Siklusa girmemiş olan hücrelerde (G0 / G1), her bir kromozomun iki kopyası bulunur. Hücreler siklusa girmeye başladıkça, kromozomal DNA'yı sentezlerler (S fazı). Tüm kromozomal DNA iki katına çıkana kadar PI' in floresan yoğunluğu artar (G2 / M fazı). Bu aşamada, G2/M hücreleri G0/G1 popülasyonunun iki katı yoğunlukta floresan ışıma yapar. G2/M hücreleri sonunda iki hücreye bölünür. Böylece hücre siklusunun her fazındaki (G0/G1, S ve G2/M) hücrelerin yüzdesi hücrelerin DNA içeriğininin PI bazlı boyanmasıyla ayırt edilir.

3.2.6.1. Hücrelerin Ekilmesi Dozlanması ve Örneklerin Fiksasyonu

%70'lik etanol deneyden önce taze olarak hazırlanarak -20°C' ye kaldırılmıştır. MCF7 hücreleri tripsinizasyon işlemi ile plate yüzeyinden kaldırılıp Vi-cell sayım cihazında sayılarak 6-well platelere kuyu başına 1×10^6 sayıda ekilmiştir. Plate tabanına tutunması için 1 gün beklenen hücreler üzerine Flavonoid mixi %10 ve %35 dozlarında hazırlanarak verilmiş ve hücreler 3. 24. ve 48. saatlerde toplanmıştır. Bunun için

belirlenen zamanlarda hücreler üzerinden medium falkonlara toplanmış ardından PBS ile yıkanmış falkona toplanmış ve 1 ml tripsin eklenerek hücrelerin plate yüzeyinden kalkması için 5 dk CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. Hücrelerin plate yüzeyinden kalktığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra üzerlerine 2 ml besi ortamı eklenerek tripsinin aktivitesi inaktive edilmiş ve falkonlara eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant boşaltılmış ve 1 ml soğuk PBS ile yıkanarak tekrar santrifüj edilmiş süpernatant boşaltılmıştır. 1 ml -20°C'den çıkarılan soğuk %70 oranında etanol damla damla eklenerek hücre siklusu analizine hazır hale getirilmiştir.

3.2.6.2. Fikse edilen Hücrelerin boyanma Protokolü

Fikse edildikten sonra en az 3 saat -20 de bekletilen örnekler boyama aşamasına hazır hale gelmiştir. Bunun için örneklerden 200 ul çekilerek yeni 12 x 75 mm'lik polistiren tüpleri içerisine aktarılmış ve 1500 rpmde santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 250 ul PBS ile yeniden süspanse hale getirilmiş ve yine 5 dk 1500 rpmde santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. Her bir örneğin üzerine 200 ul Cell Cycle reagent'ı eklenmiş ve karanlıkta oda sıcaklığında yarım saat inkübasyon ardından Muse Cell Analyzer cihazında her örnek okutulmaya başlanmıştır.

3.2.7. Western Blotlama

MCF7 hücreleri, T₂₅ kültür flaskları içine flask başına 3x10⁶ sayıda hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin flaskta tutunup farklılaşması için 1 gün 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler mikroskop altında kontrol edildikten sonra deney grubu 5 ml hacimde %10 ve %35 ve %75 konsantrasyonlarında Flavonoid kokteyli ile muamele edilmiş, kontrol grubuna ise besi ortamı eklenmiştir. 0., 3., 24., ve 48. saatlerdeki GAPDH, AURKA, AURKB proteinlerinin ekspresyon düzeyleri Western Blotlama yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.7.1. Protein Ekstraksiyonu

MCF7 hücreleri, T₂₅ kültür flaskları içine flask başına 3x10⁶ sayıda hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin flaskta tutunup farklılaşması için 1 gün 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün hücreler mikroskop altında kontrol edildikten sonra deney grubu 5 ml hacimde %10 ve %35 konsantrasyonlarında Flavonoid

kokteyli ile muamele edilmiş, kontrol grubuna ise besi ortamı eklenmiştir. Proteinlerin 3., 24., ve 48. saatlerdeki ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla proteinler ekstrakte edilmiştir. Bunun için flasklar içerisinden medium ve dozlar aspire edilerek uzaklaştırılmış ardından 4 ml soğuk PBS ile 2 kez flask yüzeyi yıkanmış ardından canlı hücre yoğunluğuna göre 300 ila 500 ul arasında değişen hacimde Proteaz inhibitör kokteyli içeren RİPA buffer eklenmiştir. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. RİPA buffer tüm yüzeye dağıtıldıktan sonra kazıyıcı ile yüzey tamamen kazınmış ve soğutulmuş 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplanmış ve kullanılmaya dek -80°C' de bekletilmiştir.

3.2.7.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü ve SDS PAGE için Örneklerin hazırlanması

-80°C' de bekleyen proteinler buz üzerinde çözündürülmüştür. Çözünen proteinler yine buz üzerinde 1'e 10 dilüsyon yapılarak Qubit cihazında konsantrasyonları belirlenmiştir.

Bunun için her bir örnekten 2ul alınıp üzerine 18 ul otoklavlanmış distile su eklenmiştir. Ardından örnek sayısına göre çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. n örnek sayısı için 199.n ul buffer ve 1.n ul boya karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanır. Sonrasında standartlar için Qubit tüplerine 190 ul çalışma solüsyonu 10 ul sırasıyla standartlar eklenmiş, örnekler için ise 195 ul çalışma solüsyonu 5 ul dilüe edilmiş protein eklenmiştir. 15 dakika karanlıkta inkübasyon ardından önce standartlar Qubit cihazında ölçülmüş sonrasında örneklerimizin konsantrasyonları okutulmuştur.

Proteinlerin konsantrasyonları belirlendikten sonra örnek hazırlama safhasına geçilmiştir. Bir kuyuda 50 ug/ml örnek yüklemek için gerekli hesaplamalar yapılmış ve konulan örnek miktarının 3 katı kadar beta merkaptioethanol içeren 4X laemmli buffer eklenmiştir (100 ul laemmli buffer içerisinde 5 ul merkaptactanol oranında).

Distile su ile 10X Tris-Glisin-SDS (running buffer)' den 1X hazırlanmış ve kullanılmaya kadar +4°C de bekletilmiştir. Buz üzerinde hazırlanan örnekler 95°C' de 5 dakika inkübe edilmiş, buz üzerinde tekrar soğutulmuştur. Tanka yerleştirilen jelin kaseti içerisine soğutulmuş 1X Tris-Glisin-SDS eklenmiştir. Jelin kuyuları 1X TGS ile yıkanmış ve örnekler sırayla %4–20 Mini-PROTEAN TGX Precast Protein jeline yüklenmiştir. Örnekler 120 V'da 100 dakika yürütülmüştür. Jel kasetleri tanktan

çıkarılarak distile sudan geçirilmiş ve kırma aparatı ile kırılarak jel transfere hazır hale getirilmiştir.

3.2.7.3. Yarı Islak Transfer İşlemi

Transfer için 0.2 µm PVDF membran tercih edilmiştir. Transfer işlemi için gerekli olan transfer buffer hazırlanmıştır. BioRad'dan temin edilen 5X transfer bufferdan 1X transfer buffer hazırlanması için 20 ml 5X transfer buffer üzerine 15 ml metanol eklenmiş ve otoklavlanış distile su ile 100 ml ye tamamlayarak transfer buffer hazır hale getirilmiştir. Transfer Buffer hazırlandıktan sonra PVDF membran aktive edilmek için 2 dakika MeOH'de 2 dakika otoklavlanmış distile su ve 2 dakika 1X Transfer bufferda bekletilmiştir. Transfer çekmecesine önce transfer buffer ile ıslatılmış filtre kağıtları ardından aktive edilmiş PVDF membran ve üzerine jel konulmuş ve tekrardan Transfer Buffer ile ıslatılmış filtre kağıtları üzerine konularak transfere hazır hale getirilmiştir. Transfer çekmecesinin kapağı kapatılarak BioRad Trans Blot turbo Transfer sisteminde Mixed Molecular weight seçeneği seçilmiş ve 7 dakikada transfer gerçekleştirilmiştir. Transferden sonra membran sırasıyla 2'şer dk Transfer buffer, distile su ve TBST' ye geçirilmiştir.

3.2.7.4. Bloklama

Bloklama için ilk olarak 10X TBS'den distile su ile 1X TBS hazırlanmıştır. Ve içerisine %0.2 oranında Tween20 eklenerek 1XTBST hazırlanmıştır. İçerisine %5 oranında yağsız süt tozu eklenerek bloklama solüsyonu hazır hale gelmiştir. Membran TBST'den kapaklı plastik bir kaba alınarak spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklama solüsyonuna alınmış +4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

3.2.7.5. Primer Antikor Uygulaması

1 saatlik bloklama işlemi ardından membran 5 ml 1X TBST'den geçirilmiş ve primer antikor uygulaması için hazır hale gelmiştir. Proteintech firmasından temin edilen housekeeping monoklonal fare antikorü GAPDH ile poliklonal tavşan antikorü AURKA ve monoklonal fare antikorü AURKB proteinleri %5 yağsız süt tozu ile hazırlanan 1X TBST ile sırasıyla 1:2500, 1:600, 1:600 oranında hazırlanmıştır. 10'ar ml %5 yağsız süt tozu ile hazırlanan 1X TBST bulunan falkonların içerisine sırasıyla 4 ul GAPDH, 16,67 ul AURKA ve 16,67 ul AURKB antikorları eklenmiştir. Membranlar üzerinden 1X TBST uzaklaştırılıp primer antikorlar eklenmiş ve 20°C'de 1 saat inkübe

edilmiştir. Primer antikor uygulamasından sonra çalkayıcıda 5 kez 5'er dakika 1X TBST ile yıkanmıştır.

3.2.7.6. Sekonder Antikor Uygulaması

Sekonder antikorları hazırlamak için Cell Signaling marka anti tavşan ve anti fare antikor 1:3000 oranında 1X TBST ile dilue edilmiştir. 10'ar ml 1X TBST içerisine 3.33 ul anti tavşan ve 3,33 ul anti fare antikor eklenmiştir. Primer antikor uygulamasından sonra TBST ile yıkanan membranlar primerlere uygun sekonder antikorlar ile 20°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Uygulama ardından çalkayıcıda 5 kez 5'er dakika 1X TBST ile yıkanmıştır ve görüntüleme aşamasına hazır hale gelmiştir.

3.2.7.7. Kemüliminesan Görüntüleme

Vilber Fusion FX7 kemüliminesan görüntüleme sistemi açılarak cihazın hazır hale gelmesi beklenmiştir. Bu sırada 1'e 1 oranında Peroxide ve Luminol/Enhancer ajanları 1'er ml falkon tüpe konarak vortekslenmiştir. Membran asetat kağıdı üzerine alınıp üzerine ECL karışımı eklenerek karanlıkta 3 dk inkübe edilmiş ve cihaza yerleştirilerek çeşitli zaman dilimlerinde görüntü alınmış ve görüntüler kaydedilmiştir

3.2.8. İstatistiksel Analiz

MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı, hücre siklusu analizi GraphPad Prism 6 paket programı kullanılarak çoklu student T testi ile analiz edilmiştir. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Western blotlama analizinde Image J ve GraphPad Prism 6 paket programları kullanılmış ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

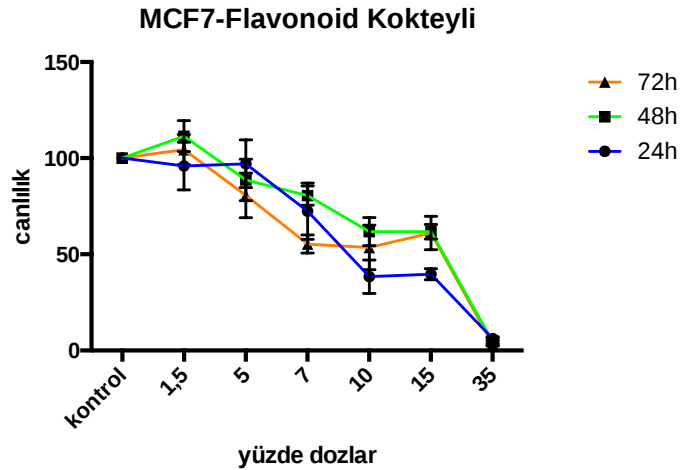
4. BULGULAR

4.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Analizi

Flavanoid kokteyli olarak adlandırdığımız bu karışım, propolis içerisinde bulunan ve daha önce herbirini tek tek hücrelere uygulayarak etkin dozlarını belirlediğimiz ve bu verilerimize istinaden CAPE, Kuersetin, Rutin, Pinostrobin, Pinosembrin, Luteolin Kafeik asit Pinobaksin gibi flavonoid grubu bileşiklerini içeren herbirinin belirli oranlarda bulunduğu bir kokteyldir. Bu karışım patent sürecinde olduğu için hazırlanışı hakkında bilgi verilememektedir.

Flavanoid kokteylinin MCF7 sitotoksik etkisi WST-1 yöntemi ile belirlenmiş ve uygulanan flavonoid kokteylinin MCF7 hücre hattı üzerindeki doza bağımlı hücre canlılığı/toksisite grafiği Şekil 4-1’de verilmiştir

MCF 7 hücrelerinde %5 dozundan itibaren doz artışı ile korele bir şekilde her 3 saatte de anlamlı sitotoksik etki gözlemlenmiştir ($p<0,0001$). %35 dozu her 3 saatte de hücrelerin canlılığında ciddi bir düşüşe sebep olmuştur. 24,48, ve 72. Saatlerdeki doza bağımlı sitotoksik etkinin istatistiksel analizleri tablo 4-1’ de verilmiştir.



Şekil 4-1: Flavonoid kokteylinin MCF7 hücre Hattı üzerine etkisi

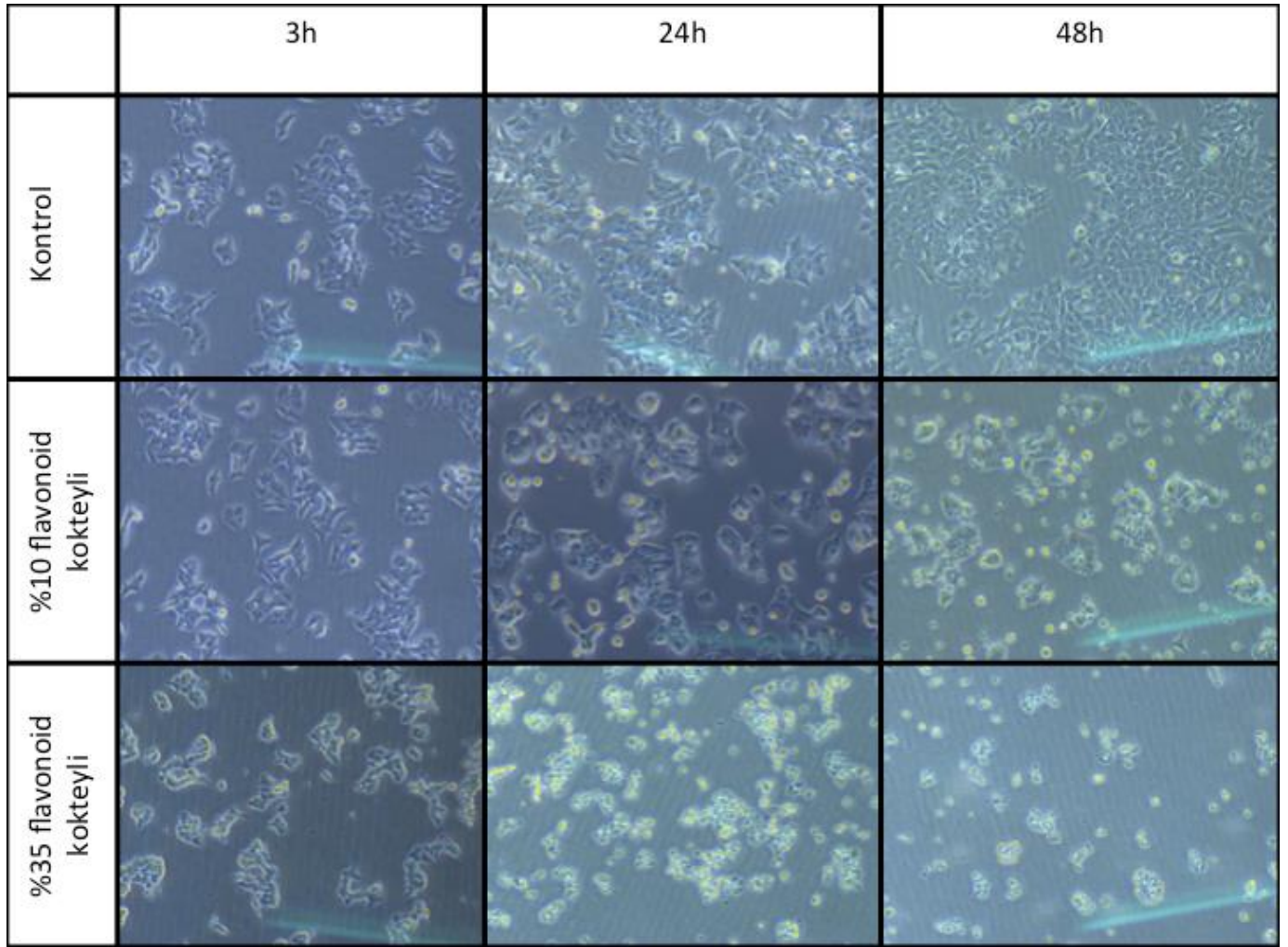
Tablo 4-1 : Flavonoid kokteyli uygulanmış MCF7 hücre hattında WST-1 Analizi ile doz ve saate bağlı hücre canlılığı verileri

	Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi	X±SD	P değeri
24 saat	Kontrol vs. %1,5 FK	95,88±12,38	0,9603
	kontrol vs. %5 FK	97,08±12,44	0,9893
	kontrol vs. %7 FK	72,40±14,62	< 0,0001
	kontrol vs. %10 FK	38,39±8,67	< 0,0001
	kontrol vs. %15 FK	39,69±2,91	< 0,0001
	kontrol vs. %35 FK	6,18±0,97	< 0,0001
48. saat	kontrol vs. %1,5 FK	111,49±8,01	0,1780
	kontrol vs. %5 FK	88,68±10,78	0,1898
	kontrol vs. %7 FK	80,57±4,97	0,0047
	kontrol vs. %10 FK	61,83±7,31	< 0,0001
	kontrol vs. %15 FK	61,76±3,79	< 0,0001
	kontrol vs. %35 FK	4,61±1,79	< 0,0001
72. saat	kontrol vs. %1,5 FK	104,46±7,79	0,9213
	kontrol vs. %5 FK	80,64±11,53	0,0049
	kontrol vs. %7 FK	55,35±4,67	< 0,0001
	kontrol vs. %10 FK	53,62±11,57	< 0,0001
	kontrol vs. %15 FK	61,09±8,67	< 0,0001
	kontrol vs. %35 FK	3,15±0,71	< 0,0001

Doz verilmemiş MCF7 hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış ve Gruplara ait değerler ortalama±standart hata ($X \pm SE$) olarak verilmiştir. Her grup 4 tekrardan oluşmaktadır.

4.2. Hücre Morfolojisi

MCF7 hücrelerine flavonoid kokteyli ile muamele sonrasında flavonoid kokteylinin hücrelerin morfolojisinde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığının belirlenmesi için hücreler farklı konsantrasyonlarda ve çeşitli saatlerde gözlemlenmiştir. Hiç bir doz uygulanmayan MCF 7 kontrol grubu, %10 ve %35 dozlarında Flavonoid kokteyli ile 48 saat süreyle muamele edilen hücreler karşılaştırıldığında önemli etkilere sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 4-3). MCF-7 hücreleri, kontrolle kıyaslandığında konsantrasyona ve saate bağlı olarak orijinal morfolojisini kaybetmişlerdir. Bununla birlikte Flavonoid kokteyli ile kültüre edilen hücrelerin sayısında önemli bir azalma olduğu da gözlemlenmiştir. Hücrelerin sayısı, şekli ve yapısındaki en belirgin değişiklik kontrol grubu ile %35 konsantrasyonunda flavonoid kokteyli uygulanan hücre grupları arasında görülmüştür. %35 flavonoid kokteyli verilen hücreler daha çok erken saatlerde morfolojik değişikliğe gitmiştir. %35 flavonoid kokteyli verilen hücrelerde 24. ve 48. saatlerde deforme olmuş zar bütünlüğü gözlemlenmiş, hücrelerin yuvarlak şekil aldığı ve 48. saatte ve kültür plağından tamamen ayrıldığı görülmüştür.



Şekil 4-2: Flavonoid Kokteyli ile muamele edilen malign MCF7 hücrelerinin morfolojik değişimi

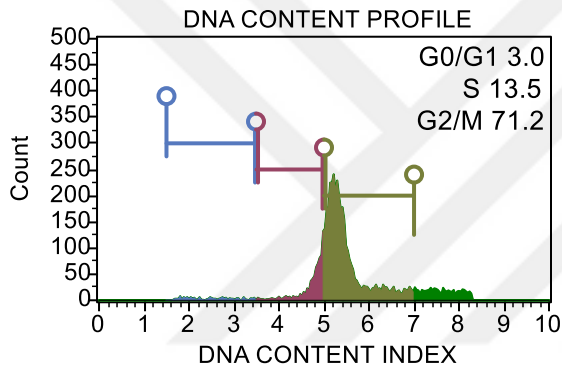
4.3. Hücre Siklusu Analizi

Hücre siklusunun aşamaları, Muse Cell Analyzer cihazı ile belirlenmiş olup sonuçlar DNA içerikleri frekansı histogramları şeklinde verilmiştir. Flavonoid kokteyli uygulanmamış kontrol grubu MCF7 hücrelerinin %71.2'sinin G2/M fazı, %13,5 'inin S fazı ve %3'ünün G0/G1 fazında olduğu tespit edilmiştir (şekil 4-3).

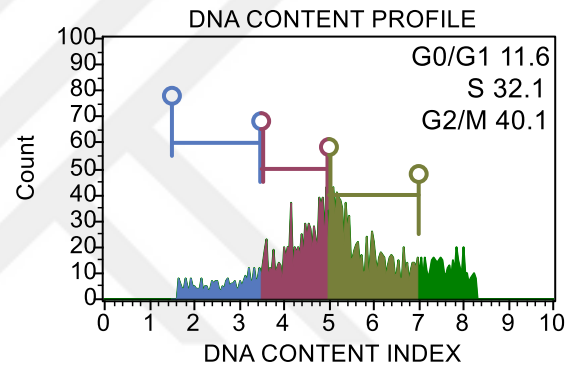
%35 oranında Flavonoid kokteyli uygulanan hücreler 24. saatte yüksek sitotoksik etki göstermesi nedeniyle 3. saatte toplanmış ve analiz edilmiştir (şekil 4-4). Doz uygulandıktan hemen 3 saat sonra hücrelerin G2/M fazındaki oranı %40 a düşmüş ve S fazındaki hücre popülasyonu oranı %32 ye çıkmıştır. %10 oranında Flavonoid kokteyli ile muamele edilen MCF 7 hücrelerinin 24. saatteki davranışı %35 oranında

FK uygulanan hücrelerin erken saat etkisi ile benzer özellik göstermiş olup G2/M, S ve G0/G1 fazlarındaki oranları sırasıyla 33.6, 42, 10.4 şeklindedir (şekil 4-5).

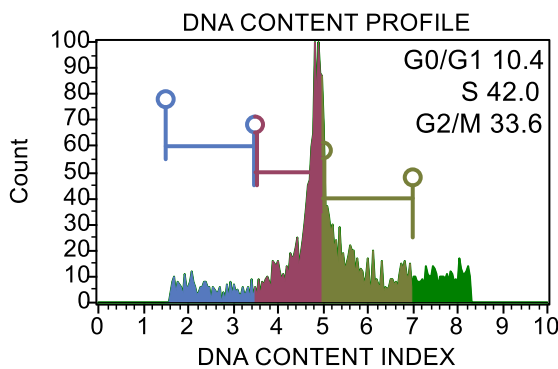
48. saatte %10 oranında Flavonoid kokteyli ile muamele edilen MCF 7 hücrelerinin G2/M fazındaki popülasyonu kontrole oranla G0/G1 fazındaki tutulumuna bağlı olarak neredeyse yarıyariya azalmıştır. 48 saat sonra G0/G1'de zamana bağlı önemli bir artış olmuş ve Flavonoid kokteyli muamele edilmiş hücreler kontrole kıyaslandığında G0/G1 fazındaki tutulum %3'ten %61.7'ye kadar yükselmiştir (şekil 4-6). Sonuç olarak, Flavonoid kokteylinin %10 dozu, MCF7 hücrelerinde belirgin olarak 48. saatte G0/G1 hücre siklusu durdurmasını uyurabildiğini göstermektedir (tablo 4-2).



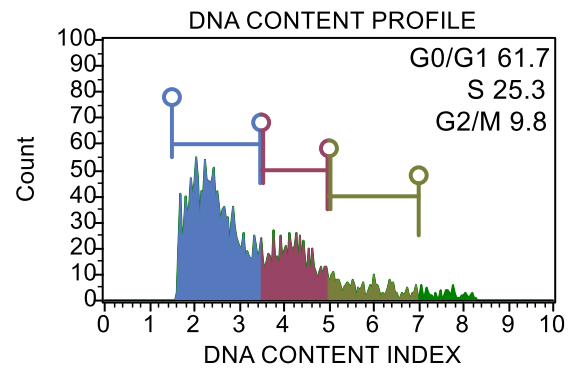
Şekil 4-3: Kontrol grubu MCF7 hücrelerinin hücre siklusu analizi



Şekil 4-4: %35 dozunda Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinin 3.s hücre siklusu analizi



Şekil 4-5: %10 oranında Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinin 24.s hücre siklusu analizi



Şekil 4-6: %10 oranında Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinin 48.s hücre siklusu analizi

Tablo 4-2: Hücre siklusu analizi istatistiksel verileri

	Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi	X±SE	P değeri
G0-G1 FAZI	Kontrol vs	7,33±2,38	0,9506
	%10FK 24s	4,533±2,95	
	Kontrol vs	7,33±2,38	< 0.0001
	%10FK 48s	57,80±1,95	
	Kontrol vs.	7,33±2,38	0,3365
	%35FK 3s	17,17±8,58	
S FAZI	Kontrol vs.	25,17±6,01	0,0300
	%10FK 24s	43,70±1,01	
	Kontrol vs.	25,17±6,01	0,9677
	%10FK 48s	27,57±1,36	
	Kontrol vs.	25,17±6,01	0,5095
	%35FK 3s	33,00±2,72	
G2-M FAZI	Kontrol vs.	63,10±8,15	0,0031
	%10FK 24s	37,63±2,04	
	Kontrol vs.	63,10±8,15	< 0.0001
	%10FK 48s	11,20±1,14	
	Kontrol vs.	63,10±8,15	0,0023
	%35FK 3s	36,73±7,72	

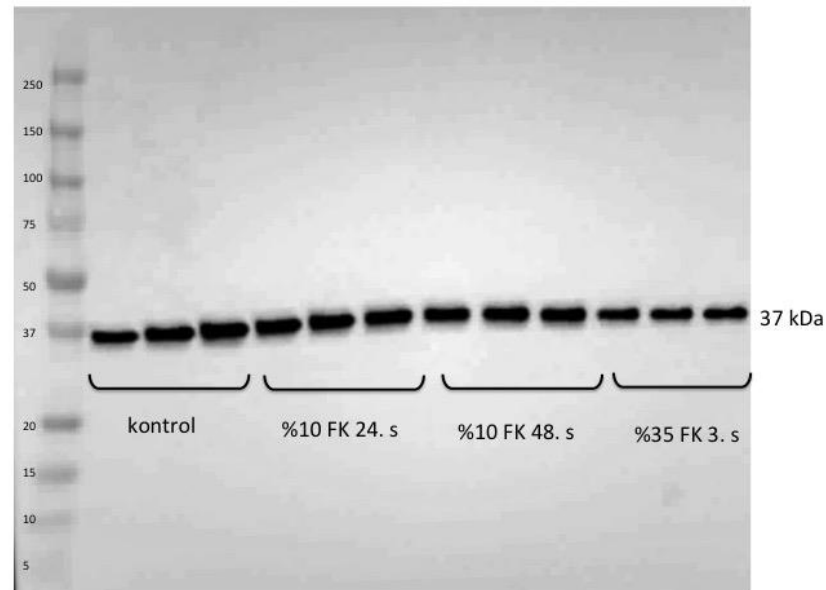
Gruplar arası karşılaştırma two-way Anova testi ile yapılmıştır. Gruplara ait değerler ortalama± standart hata (X±SE) olarak verilmiştir. Her grup 3 tekrardan oluşmaktadır.

4.4. Aurora Kinaz A ve Aurora Kinaz B proteinlerinin Western Blotlama ile Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

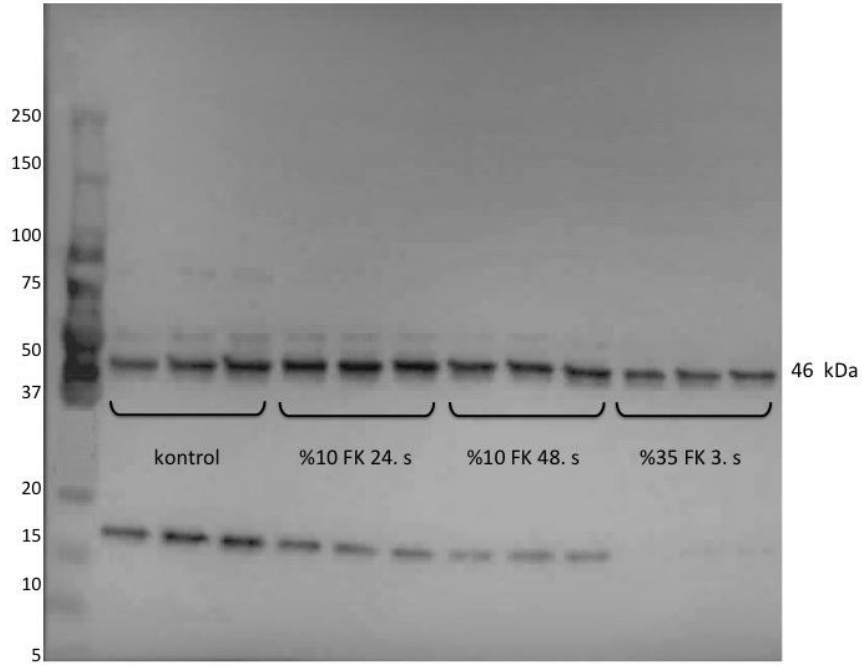
Yaptığımız western blotlama tekniği ile %10 ile %35 dozlarında Flavonoid kokteyli uygulanmış GAPDH AURKA ve AURKB proteinlerinin ekspresyonları sırasıyla şekil 4-7, şekil 4-8 ve şekil 4-9 da verilmiştir. İlk bulgularımız doz

uygulanmamış MCF 7 hücrelerinde AURKA protein ekspresyonunun AURKB protein ekspresyonundan daha yüksek olduğunu göstermiştir. %10 oranında FK uygulanmış MCF7 hücrelerinde 24. saatteki AURKA proteini ekspresyonunda kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. 48. saatte ise AURKA'da anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0.005$). %35 oranında FK ile dozlanmış hücrelerin 3. saatteki AURKA ekspresyonları kontrolle kıyaslanışında anlamlı bir down regülasyon tespit edilmiştir (tablo 4-3).

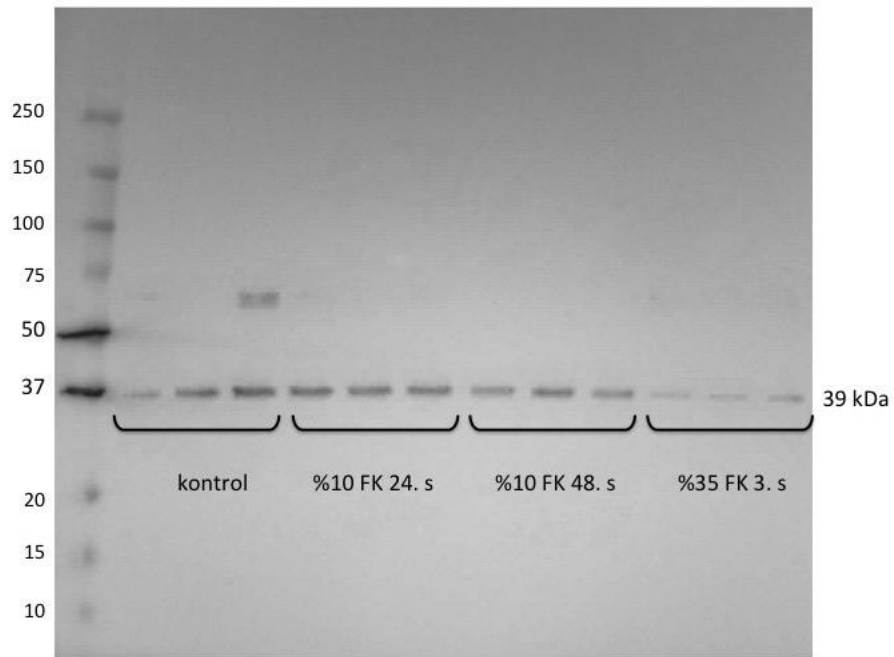
AURKB proteini için kontrole kıyasla %10 doz uygulanan MCF7 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan minör bir azalma gözlemlenmiştir. Buna karşın %35 dozu uygulanan hücrelerde AURKB'de istatistiksel olarak güçlü anlamlı bir ekspresyon azalması görülmüştür (şekil 4-10).



Şekil 4-5: GAPDH protein ekspresyonları



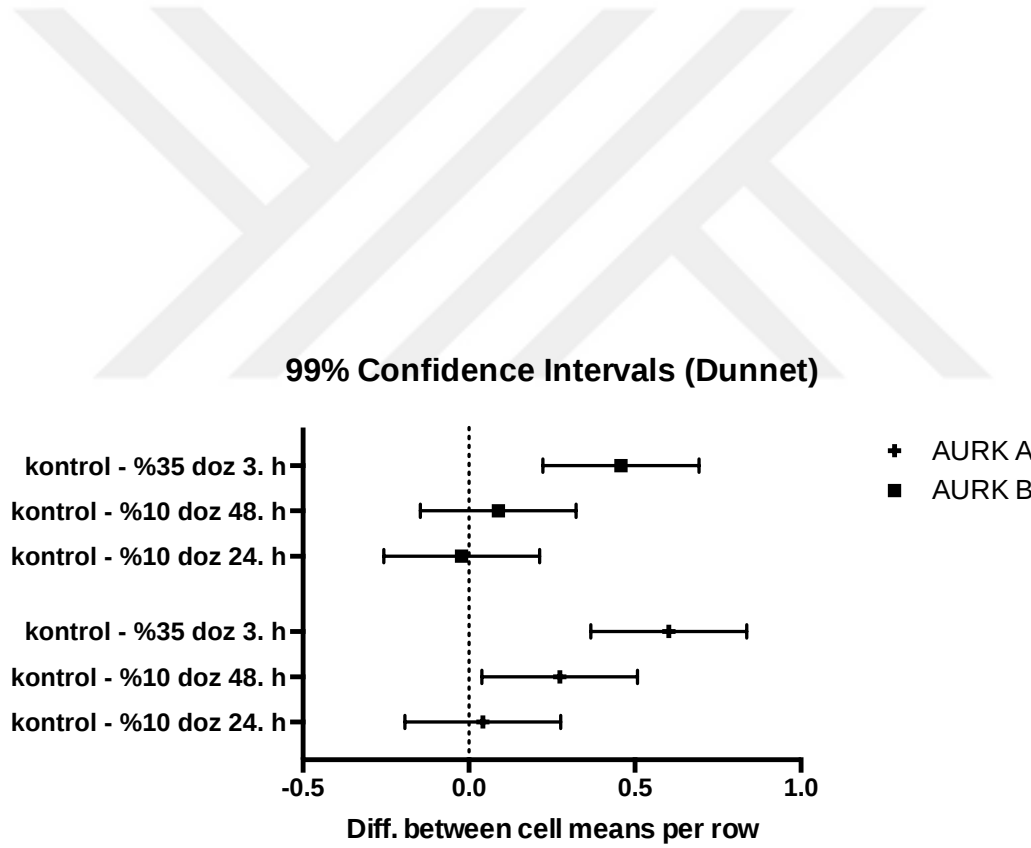
Şekil 4-6: AURK A protein ekspresyonları



Şekil 4-7: AURK B protein ekspresyon seviyeleri

Tablo 4-3: Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF 7 hücrelerinde Aurora kinaz A (AURK A) ve B (AURK B) protein ekspresyonlarının istatistiksel analizi

	AURKA		AURKB	
Doz/Zaman	X±SD	p	X±SD	p
kontrol	1,32±0,16		0,89±0,16	
%10 doz 24h vs kontrol	1,28±0,03	0,870	0,91±0,027	0,977
%10 doz 48h vs kontrol	1,05±0,06	0,003	0,80±0,07	0,444
%35 doz 3h vs kontrol	0,72±0,04	0,0001	0,43±0,01	0,0001



Şekil 4-8: Farklı doz ve saatlerde Flavonoid Kokteyli uygulanan hücrelerde AURKA ve AURKB proteinlerinin güven aralığı grafiği

5. TARTIŞMA

Mitoz bölünme, çoğaltılan genomun iğ iplikleri aracılığıyla iki yavru hücreye dağıtıldığı karmaşık fakat muazzam işleyen bir biyolojik süreçtir. Bir hücrenin hayatta kalmasının mitozun doğruluğuna bağlı olduğu düşünüldüğünde, bu sürecin zamansal ve mekansal koordinasyonunu sağlamak için birçok kontrol mekanizması gelişmiştir (Lengauer ve ark. 1998).

Hücre döngüsü, interfaz ve mitoz ile ardından gelen sitokinez olarak tanımlanabilir. Bölünmeye hazırlık olan interfaz, G1, S ve G2 fazlarından oluşmaktadır (Cooper 2000). Döngünün en uzun fazı olan G1, mitoz sonrası hücrenin büyümeye devam ettiği ve DNA replikasyonu için gerekli mRNA ve proteinlerin sentezlendiği ilk hazırlık aşamasıdır. G1 fazının sonunda yer alan kontrol noktasında hücrenin sentez aşamasına geçmeye hazır olup olmadığı değerlendirilir. Eğer hücre hazır değilse veya büyüme faktörü uyarısı olmadığı durumda, metabolik olarak aktif ancak sentezin az olduğu G0 fazına geçer. Eğer DNA hasarı varsa, replikasyon doğru gerçekleşmeyeceğinden hasarın onarılması gibi aşamalar bu sırada gerçekleşir. S fazı veya sentez fazı, DNA replikasyonunun gerçekleştiği aşamadır. Replikasyonun ardından gelen G2 ise bölünme için gerekli proteinlerin sentezlendiği fazdır. Burada bulunan G2 kontrol noktasında DNA replikasyonunun doğruluğu, DNA hasarı ve hücrenin mitozla geçmeye hazır olup olmadığı kontrol edilir. Bu nedenle DNA replikasyonunda hata veya hasar mevcutsa G2 fazında tutulum görülür. M fazı, replike olan DNA'nın ve hücresel komponentlerin iki yavru hücreye ayrıldığı bölünme fazıdır. Yine burada yer alan iğ ipliği kontrol noktası veya mitotik kontrol noktasında, kromozomların iğ iplikleri üzerinde doğru ve eşit dağılımı değerlendirilir ve bu sağlanıncaya kadar bu fazda bölünme tutulur (Hochegger ve ark 2008).

Siklin bağımlı kinazlar (CDK), kontrol noktası kinazlar (CHK), AK'lar ve polo benzeri kinazlar (PLK) hücre döngüsü ilerlemesi ve hücre bölünmesini regüle eden önemli protein kinazlar gruplarıdır (Cao ve ark. 2011). Protein kinazlar, hücre evresinin farklı aşamaları ve kontrol noktaları arasındaki geçişleri teşvik etmede veya geciktirmede önemli roller oynarlar (Nigg ve ark. 1996). Hücre döngüsünün farklı noktalarında yer alan kontrol noktalarındaki bu protein kinazların miktarları ve fosforilasyon seviyeleri hücrenin bir sonraki evreye geçebilme kararını verir. Sıklıkla

hücre döngüsü kontrolü ve hücre bölünmesinin düzensizliği, anormal büyümeye ve kanser oluşumuna bağlanmaktadır (Wolfel ve ark. 1995; Easton ve ark. 1998).

İnsanda, mitozun önemli düzenleyicileri olarak tanımlanan serin/treonin kinazlardan AK'lar (Adams ve ark. 2001) kolon, meme, yumurtalık, mide ve pankreas gibi tümörlerde sıklıkla aşırı ifade edildikleri gösterilmiştir (Sen ve ark 1997; Bischoff ve ark. 1998). Kanserlerde görülen anormal ekspresyonları sebebiyle potansiyel onkogenik protein olarak düşünülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar AURKA'nın aşırı ekspresyonunun; proliferasyon (Rong ve ark 2007) epitelyal-mezankimal geçiş ve metastazda (Noh ve ark. 2015), görevli olduğunu gösterirken; AURKB'nin amplifikasyonu ya da aşırı ekspresyonunun hücre siklusunu ilerletme ve kanser hücrelerinin sağ kalımını desteklediğini (Guise ve ark. 2012, Wang ve ark 2016) göstermiştir. Bu sebeple AK'lar kanser terapilerinde hedef moleküller olarak ilgi çeken protein kinazlardan olmuştur.

Bitkilerin sekonder metabolitleri olan flavanoidlerin birçok hücresel yolağa etki ederek antioksidan, antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antikanser gibi biyolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Brito ve ark 2015; Gao ve ark 2016; Vasanthi ve ark 2012).

2018 yılında Seyhan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada propolis içeriğinde bulunan Galangin, Kafeik asit, Apigenin ve Kuersetin flavonoidlerinin agresif olmayan meme kanseri tipini modelleyen MCF7 hücre hattında sitotoksik etkisi gösterilmiştir (Seyhan ve ark. 2018). Ayrıca her birinin tek başına uygulanmasıyla farklı bir çok biyokimyasal mekanizmayı aktive eden bu doğal bileşiklerin kombine olarak kullanıldığı çalışmalar da yapılmış ve sinerjistik etkileri ortaya konmuştur (Hsieh ve Wu 2008; 2009). Bu tez çalışmasında da propolis içerisinde varolan flavanoidlerin oluşturduğu ve Flavanoid kokteyli olarak adlandırdığımız bu karışım en yaygın meme kanseri tipi Luminal A'yı temsil eden MCF-7 hücre hattına uygulanmış ve hücre döngüsünde önemli yere sahip AURK A ve B'nin protein seviyesindeki değişimleri incelenmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak flavonoid kokteylinin MCF-7 hücre hatlarına sitotoksik etkisi WST-1 hücre proliferasyon analizi ile saptanmıştır. Analiz sonucunda doza bağımlı olarak sitotoksik etkinin arttığı ve en etkin dozun %10 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca %35 oranında flavonoid kokteyli uygulanan hücrelerde erken saatlerden itibaren

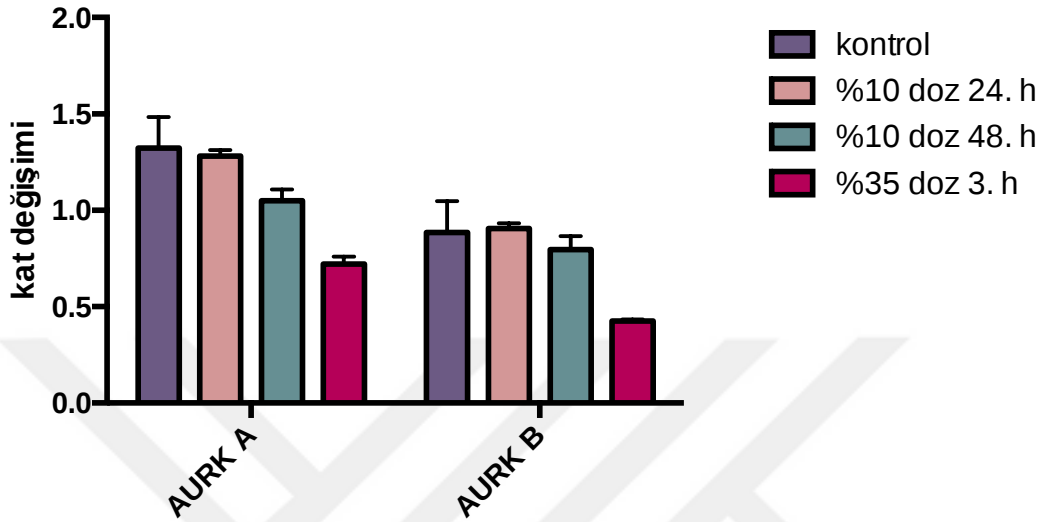
sitotoksik etki görülmüş ve 24. Saatte neredeyse hiç canlı hücre kalmamıştır. %10 oranında Flavanoid kokteyline maruz kalan MCF7 hücrelerinin zamanla yüzey bağlantılarının koptuğunu ve apoptoza giren hücrelerde görülen apoptotik cisimcikler olduğu gözlenmiştir. Belirli toksik ajanlara maruz kalan hücrelerde morfolojik olarak değişiklikler görülebilir (Larsen ve ark. 2015). Ayrıca çalışmamızda FK uygulanan hücrelerin kendi morfolojisini kaybederek yuvarlak şekil aldığı gözlenmiştir. %35 oranında doz uygulanan hücrelerde ise bu etki 3. Saatten itibaren gözlenmeye başlanmış ve 48. Saat sonunda neredeyse tüm hücrelerin yüzeyden ayrıldığı tespit edilmiştir.

Bilindiği üzere kanser hücrelerinin en önemli özelliği hücre döngüsünün farklı kontrol noktalarından kaçmasıdır. Flavonoidlerin uygulandığı pek çok in vitro çalışmada bu maddelerin, hücreleri hücre döngüsünün farklı safhalarında etkilemekte olduğu bilinmektedir (Choi ve ark. 2001; Ujiki ve ark. 2006). Apigenin flavonoidinin oral skuamöz hücreli karsinoma hücrelerinde hücre siklusunun hem G1/G0 hem de G2/M fazında tutuluma sebep olduğu gösterilmiştir (Maggioni ve ark. 2013). Yine başka bir çalışmada Apigeninin, siklin B ile ilişkili cdc2 aktivitesini ve G2/M tutulumunu baskılayarak pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Ujiki ve ark. 2006). Başka bir biyoflavonoid kuersetinin uygulandığı MCF 7 hücre hattında geçici M fazı birikimi ve ardından G2 tutulumu ile hücre döngüsü ilerlemesinin inhibe edildiği ve apoptozun indüklendiği belirtilmiştir (Choi ve ark. 2001). Bu tez çalışmasında da flavonoid kokteyli uygulanmayan MCF7 hücre hattında hücrelerin %70 inin G2/M fazında olduğu görülürken %10 dozunda Flavonoid Kokteyli uygulanması ile MCF7 hücrelerinin ilk 24. saatte S fazında, 48. saatte ise canlı kalan hücrelerin önemli bir çoğunluğunun G0/G1 fazında tutulduğu tespit edilmiştir. Daha önceki veriler göz önüne alındığında MCF7 hücrelerine Flavonoid Kokteyli uygulanması ardından 48 saat sonraki mRNA ekspresyon seviyelerinin mikroarray yöntemi ile tayin edildiği çalışmada CDKN2A, CDKN2C, RBL-1 (p107), siklin B1 ve E2F1 gibi hücre siklusunda önemli rolleri olan genlerin mRNA düzeyinde down regülasyonu saptanmıştır (İÜ BAP Proje No:28301). Bu veriler Flavonoid kokteyli verilen MCF7 hücrelerinin G1/G0 fazındaki tutulumunu doğrular niteliktedir. Tümör supresör protein olan RB'nin hücre siklusundaki önemli bir görevi hücre bölünmeye hazır olana kadar hücre siklusunun ilerlemesini durdurmaktır. Hücre bölünmeye hazır olunca CDK 4 ve 6, siklin D ile etkileşime girerek pRB'yi fosforiller ve inaktif hale dönüştürür. Böylece hiperfosforile RB, E2F transkripsiyon faktörünün DNA'ya

bağlanmasını inhibe edemez. DNA'ya bağlanan E2F transkripsiyon faktörü, S fazı için gerekli genlerin aktifleşmesini sağlayarak hücre siklusunun ilerlemesine izin verir. Bu yüzden E2F1'in mRNA düzeyindeki down regülasyonu daha az E2F1 proteini üretimine sebep olur ve böylece hücrenin G1'den S fazına geçişi engellenir (Johnson ve ark. 2016).

Hücre siklusu regülasyonunda önemli yere sahip AK proteinlerinin önemi gün geçtikçe artmış ve çeşitli kanserlerde yüksek ekspresyon göstermesi sebebiyle bu proteinlerin inhibitörleri üretilerek kanser tedavisinde uygulanan bir yaklaşım olmuştur. Yapılan pre klinik çalışmalarda bu inhibitörlerin antitümör özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Sonet ve ark. 2008, Wilkinson ve ark. 2007, Carpinelli ve ark. 2007). İnhibitörlerin kullanılmasıyla hücrelerde sitokinezin gerçekleşmesi engellenerek 4N DNA içeriğine sahip hücreler meydana gelmiş ve p53 fonksiyonuna sahip hücrelerde apoptoz gerçekleşmiştir (Gizatullin ve ark. 2006). Tüm bu etkilerine rağmen geliştirilen AK inhibitörleri kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt edememelerinden dolayı ciddi yan etkilere neden olmuştur. Yüksek gradelerde nötropeni, lenfositopeni, trombositopeni gibi yan etkiler bunlar arasındadır (Sonet ve ark. 2008, De Jonge ve ark. 2008). Bu yüzden son yıllarda yapılan çalışmalar, daha güvenilir daha az toksik ve AK'ların aktivasyonunu inhibe edecek doğal bileşik arayışına kaymıştır (Salmela ve ark. 2009;Lang ve ark. 2010). Bu doğal bileşiklerin en önemli grubu da fenolik bileşiklerin flavonoid alt grubu olmuştur.

Bitkilerin sekonder metabolitlerinden fenolik bileşikler alt grubunda yer alan flavonoidlerin hücre siklusundaki önemli protein kinazların inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Bunlar arasında PLKlar ve AK'lar da yer almaktadır. Çeşitli flavonoidlerin AK'ları hem kinaz aktivitesini bir ligand gibi görev yaparak inhibe ettiğini hem de transkripsiyon düzeyinde inhibisyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Yine daha önce yapılan İÜ BAP Proje No:28301 çalışmasında flavonoid kokteyli ile muamele edilen AURKA proteinin 2.9 kat AURKB proteinin ise 4.4 kat down regülasyonu gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında da %10 ve %35 oranında flavonoid kokteyli uygulanmış MCF7 hücrelerinde transkripsiyonel düzeyde AURKA ve B proteinlerinin anlamlı olarak baskılandığı gösterilmiştir (şekil 5-1).



Şekil 5-1: Flavonoid Kokteyli uygulanmış MCF 7 hücrelerinde Aurora kinaz A (AURKA) ve B (AURKB) protein ekspresyonlarının kontrole kıyasla kat değişimi histogram grafiği

Lang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3- hidroksiflavonun AURKB aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiş ve bu inhibisyon ile Histon H3'ün fosforilasyonun inhibisyonuna gözlemlenmiştir (Lang ve ark. 2010). Tüm bu sonuçlar kendi verilerimizle örtüşmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda hücre siklusunda birçok kanser tipinde fazla ekspresyona sahip AK'ların birden fazla flavonoid içeren kokteyl ile muamele edilmesi sonucunda hem AURKA hem de AURKB proteinlerinde anlamlı bir down regülasyonu gözlenmiş ve ER PR pozitif meme kanseri hücrelerinin zaman ve doza bağlı olarak hücre siklusunun farklı aşamalarında tutulumu saptanmıştır.

Çok sayıda hücresel sinyalleşme yolundaki değişiklikler kanser hücrelerinde sıklıkla görülmektedir. Kanser tedavisi için onaylanan ilk protein kinaz inhibitörü olan Trastuzumabın (Piccart–Gebhart ve ark 2005) HER2 reseptörü ligandı olarak kanser tedavisinde sadece bir yolu hedef alan spesifik inhibitör uygulamaları tedavide başarısız olma nedeni olabilir (Aggarwal ve ark 2007, Aggarwal ve Shishodia 2006). Bununla

birlikte, diğer tüm kinaz inhibitörleri, meme kanseri olan hastaların sadece küçük bir yüzdesinde anlamlı sonuç verir. Bu nedenle, çoklu hücrel sinyal yollarını baskılayabilen bileşikler, kanser kemoprevensiyonu ve tedavisinde büyük potansiyele sahip olacaktır. Flavonoidlerin çoklu hedeflere etki etmesi ve çoklu biyolojik mekanizmaları düzenleme kabiliyetleri nedeniyle, invazyon, metastaz ve kanser direncini azaltmada önemli ve iyi birer kaynak olabileceği öngörülmektedir (Aggarwal ve ark 2007, Aggarwal ve Shishodia 2006). Tüm bu bilgiler ışığında gelecekteki araştırmalar yan etkisi minimum düzeydeki bu doğal bileşiklerin özellikle kombinasyonları ile kansere güvenli, etkili ve ekonomik terapötik yaklaşımlar oluşturmaya yönelik olmalıdır.



KAYNAKLAR

- Aarts M, Linardopoulos S, Turner NC. 2013. Tumour selective targeting of cell cycle kinases for cancer treatment. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13:529–35
- Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001;11:49–54.
- Aggarwal BB and Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71: 1397–1421, 2006.
- Aggarwal BB, Sethi G, Baladandayuthapani V, Krishnan S, and Shishodia S. Targeting cell signaling pathways for drug discovery: An old lock needs a new key. *J Cell Biochem* 102: 580–592, 2007.
- Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1),75-81.
- Ali, H. R., et al. "Aurora kinase A outperforms Ki67 as a prognostic marker in ER-positive breast cancer." *British journal of cancer* 106.11 (2012): 1798.
- Andersen O, Markham K (2006) *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, Boca Raton
- Andersen OM, Markham KR (2006) *Flavonoids—chemistry, biochemistry and applications*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton
- Arellano M, Moreno S. 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:559–73.
- Arlot-Bonnemains Y, Baldini E, Martin B et al. Effects of the Aurora kinase inhibitor VX-680 on anaplastic thyroid cancer-derived cell lines. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:559–568.
- Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. 2015. The history and future of targeting cyclin- dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:130–46
- Attila Csikász-Nagy, Dorjsuren Battogtokh, Katherine C. Chen, Béla Novák, and John J. Tyson. Analysis of a Generic Model of Eukaryotic Cell-Cycle Regulation. *Biophys J.* 2006 Jun 15; 90(12): 4361–4379.
- B. Kastan, J. Bartek. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432 (2004), pp. 316-323.
- Bai, Jingwen, Yaochen Li, and Guojun Zhang. "Cell cycle regulation and anticancer drug discovery." *Cancer biology & medicine* 14.4 (2017): 348.
- Beck H, Nahse-Kumpf V, Larsen MS, O'Hanlon KA, Patzke S, et al. 2012. Cyclin-dependent kinase suppression by WEE1 kinase protects the genome through control of

replication initiation and nucleotide consumption. *Mol. Cell. Biol.* 32:4226–36

Berdnik D, Knoblich JA. *Drosophila* Aurora-A is required for centrosome maturation and actin- dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol* 2002;12:640-7.

Berry D, Cronin K, Plevritis S, Fryback D, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1784–92. [L]
[SEP]

Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 13: 1775–1785.

Berthet C, Klarmann KD, Hilton MB, Suh HC, Keller JR, Kiyokawa H et al. (2006). Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev Cell* 10: 563–573.

Berti, M.; Vindigni, A. Replication stress: Getting back on track. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016, 23, 103–109.

Bischoff J.R., Anderson L., Zhu Y., Mossie K., Ng L., B. Souza et al., A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancer. *EMBO J.* 17, 3052–3065 (1998) [L]
[SEP]

Bishop, J.M., Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248, 1991.

Boam T. Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Ecancermedicalsecience.* 2015; 9: 585.

Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. 1994. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with myc gene. *EMBO J.* 13:2124–30.

Bolanos-Garcia M. Aurora Kinases. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 2004; 37:1572-7.

Broun P (2005) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* 8:272–279

Canman, C.E. Replication checkpoint: Preventing mitotic catastrophe. *Curr. Biol.* 2001, 11, R121–R124.

Cao, C., M. Kuang, and W. Xu. "Mini Review Article." (2011).

Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:842–854. [PubMed: 14625535]

Carpinelli P, Ceruti R, Giorgini ML et al. PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer. *Mol Cancer Ther* 2007;6:3158 –3168.

Chapman DJ, Regan MA (1980) Evolution of a biochemical pathway: evidence from

comparative biochemistry. *Annu Rev Plant Physiol* 31:639–645

Cheang, Maggie CU, et al. "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 101.10 (2009): 736-750.

Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature reviews Cancer*. 2009;9:785–797.

Choi S, Youn J, Kim K et al. Apigenin inhibits UVA-induced cytotoxicity in vitro and prevents signs of skin aging in vivo. *Int J Mol Med*. 2016 Aug;38(2):627-34.

Choi, Jung-A., et al. "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin." *International journal of oncology* 19.4 (2001): 837-844.

Clarke A. R., Maandag E. R., van Roon M., van der Lugt N. M., van der Valk M., Hooper M. L., Berns A., te Rielef H. 1992. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328–330.1038/359328a0

Coleman M, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in ve continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*. 2008;9:730–56. [SEP]

Cooper G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, pp 1250–1318

Das K, Lorena PD, Ng LK, Shen L, Lim D, Siow WY, Narasimhan K, Teh M, Choolani M, Putti TC, Salto-Tellez M. Aurora-A expression, hormone receptor status and clinical outcome in hormone related cancers. *Pathology* 2010;42(6):540–546.

De Jonge M, Steeghs N, Verweij J et al. Phase I study of the aurora kinases (AKs) inhibitor PHA-739358 administered as a 6 and 3-h IV infusion on days 1, 8, 15 every 4 wks in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008;26:Abstract 3507.

Dias, Kay, et al. "Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics." *PloS one* 12.1 (2017): e0168669.

Dominguez-Brauer C, Thu KL, Mason JM, Blaser H, Bray MR, et al. 2015. Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. *Mol. Cell* 60:524–36

Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, et al. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 2004; 117:2523-31.

Easton, J., Wei, T., Lahti, J. M. & Kidd, V. J. Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Res*. 58, 2624–2632 (1998).

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, et al. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817–25.

El-Deiry WS. 1998. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. See Ref. 119, pp. 121–37.

Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol* 2003;13:691-7.

Eykelenboom, J.K.; Harte, E.C.; Canavan, L.; Pastor-Pedro, A.; Calvo-Asensio, I.; Llorens-Agost, M.; Lowndes, N.F. ATR activates the S-M checkpoint during unperturbed growth to ensure sufficient replication prior to mitotic onset. *Cell Rep*. 2013, 5, 1095–1107.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:359–86.

Filipa Brito, Ana, et al. "Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics?." *Current medicinal chemistry* 22.26 (2015): 3025-3039.

Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, et al. 2015. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 16:25–35

Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al (2015). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*, 1, 505-27.

Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, et al. 2004. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther*. 3:1427–38

Fung TK, Ma HT, Poon RY. 2007. Specialized roles of the two mitotic cyclins in somatic cells: cyclin A as an activator of M phase-promoting factor. *Mol. Biol. Cell* 18:1861–73

Gaillard, H.; Garcia-Muse, T.; Aguilera, A. Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 276–289.

Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastre B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol*. 1999; 32: 279–286. PMID: 10211581

Gao, Mei, Hui Wang, and LiJuan Zhu. "Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant *Candida albicans* in in vitro and in vivo antifungal managements of vulvovaginal candidiasis." *Cellular Physiology and Biochemistry* 40.3-4 (2016): 727-742.

Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., Gerloff, D.L., Earnshaw, W.C., 2004. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol*. 166, 179–191.

Gautam K. Malhotra, Xiangshan Zhao, Hamid Band & Vimla Band (2010) Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers, *Cancer Biology & Therapy*, 10:10, 955-960

Giet, R., Petretti, C., Prigent, C., 2005. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol.* 15, 241–250. [SEP]

Gizatullin F, Yao Y, Kung V et al. The Aurora kinase inhibitor VX-680 induces endoreduplication and apoptosis preferentially in cells with compromised p53-dependent postmitotic checkpoint function. *Cancer Res* 2006;66:7668 –7677.

Goldhirsch, Aron, et al. "Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013." *Annals of oncology* 24.9 (2013): 2206-2223.

Goldstein M, Kastan MB. 2015. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu. Rev. Med.* 66:129–43

Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G et al. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA- 739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* 2008;111:4355– 4364.

Gould KS (2010) Muriel wheldale Onslow and the rediscovery of anthocyanin function in plants. In: Santos-Buelga C, Escribano-Bailon MT, Lattanzio V (eds) *Recent advances in polyphenol research*, vol 2. Blackwell, London, pp 206–225

Guisse AJ, Greco TM, Zhang IY, Yu F, Cristea IM. Aurora B-dependent regulation of class IIa histone deacetylases by mitotic nuclear localization signal phosphorylation. *Mol Cell Proteomics.* 2012; 11:1220–29.

Han S, Guo Q, Wang T. Prognostic significance of interactions between [SEP]ER alpha and ER beta and lymph node status in breast cancer cases. [SEP]Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14:6081–4. [SEP]

Harrington EA, Bebbington D, Moore J et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med* 2004;10:262–267.

Hartwell LH, Culotti J, Pringle J, Reid BJ. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46–51.

Hatice Güneş. Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri. *Tr. J. of Biology.* 23 (1999) 283–292 © TÜBİTAK.

Hattenschwiler S, Vitousek PM (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol Evol* 15:238–243

Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, et al. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells [see comment]. *Cell* 2003;114:585 - 98.

- Hoang, Nhung Thi My, et al. "In vitro Characterization of Derrone as an Aurora Kinase Inhibitor." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 39.6 (2016): 935-945.
- Hochegger, H., Takeda, S., & Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 910-916 (2008).
- Hong, D.; Infante, J.; Janku, F.; Jones, S.; Nguyen, L.M.; Burris, H.; Naing, A.; Bauer, T.M.; Piha-Paul, S.; Johnson, F.M.; et al. Phase I study of LY2606368, a checkpoint kinase 1 inhibitor, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 2016, 34, 1764–1771.
- Hortobagyi, G. N., De La Garza Salazar, J., Pritchard, K., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C. A., et al. (2005). The global breast cancer burden: Variations in epidemiology and survival. *Clinical Breast Cancer*, 6, 391–401. ^[1]_{SEP}
- Howard S, Berdini V, Boulstridge JA et al. Fragment-based discovery of the pyrazol-4-yl urea (AT9283), a multitargeted kinase inhibitor with potent aurora kinase activity. *J Med Chem* 2009;52:379–388.
- Hsieh, T.C.; Wu, J.M. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2008, 33, 851–859.
- Hsieh, T.C.; Wu, J.M. Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals, EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Res.* 2009, 29, 4025–4032.
- Huang HC, Shi J, Orth JD, Mitchison TJ. 2009. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer Cell* 16:347–58
- Inic, Zorka, et al. "Difference between luminal A and luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information." *Clinical Medicine Insights: Oncology* 8 (2014): CMO-S18006.
- Ivan Rupeš. Checking cell size in yeast. *TRENDS in Genetics* Vol.18 No.9 September 2002.
- Jackie Johnson, Bram Thijssen, Ultan McDermott, Mathew Garnett, Lodewyk F.A. Wessels, and René Bernards. Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*. 2016 September 15; 35(37): 4829–4835.
- Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. 2007. Targeted anti-mitotic therapies: Can we improve on tubulin agents? *Nat. Rev. Cancer* 7:107–17
- Jaiswal N, Akhtar J, Singh SP et al. An Overview on Genistein and its Various Formulations. *Drug Res (Stuttg)*. 2018 Dec 5.
- Johnson D. G. and Walker C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999. 39:295–312.
- Johnson DG. 1995. Regulation of E2F1 gene expression by p130(Rb2) and D-type

cyclin kinase activity. *Oncogene* 11:1685–92

Kamb A. 1998. Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. See Ref. 119, pp. 139–47.

Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung SK, Hwang MK, Bode AM, Heo YS, Lee HJ, and Dong Z. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 30: 321–330, 2009.

Karagakos, K., Garbe C., Zouboulis C.C., Orfanus C.E., Growth control of melanoma cells and melanocytes by cytokines. *Recent Results in Cancer Research* 139: 169-182, 1995.

Katayama H, Brinkley WR, Sen S (2003) The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 22:451–464.

Keen N, Taylor S. 2004. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 4:927–36

Keyomarsi KD, Conte J, Toyofuku W, Fox MP. 1995. Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* 11:941–50.

Kim K, Choe H, Jeong Y, Lee JH, Hong S. Ru(II)-Catalyzed Site-Selective Hydroxylation of Flavone and Chromone Derivatives: The Importance of the 5-Hydroxyl Motif for the Inhibition of Aurora Kinases. *Org Lett*. 2015; 17: 2550–2553.

Kim Nasmyth. Putting the Cell Cycle in Order. *Science, New Series*, Vol. 274, No. 5293 (Dec. 6, 1996), pp. 1643-1645.

King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc*. 1999;99:213–218.

King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652– 59.

Kollareddy M, Dzubak P, Zheleva D, Hajduch M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008;152:27–33.

Komoto, Tatiana, et al. "Chalcones Repressed the AURKA and MDR Proteins Involved in Metastasis and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer Cell Lines." *Molecules* 23.8 (2018).

Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res*. 2000; 23: 1–16. PMID: 10728649

Krishnamurti, Uma, and Jan F. Silverman. "HER2 in breast cancer: a review and update." *Advances in anatomic pathology* 21.2 (2014): 100-107.

Kufer TA, Sillje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol* 2002; 158:617 - 23.

Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, et al. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell* 2003;5:853-64.

Kutchan TM (2001) Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiol* 125:58–60

LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, et al. 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11:847–62.

Lang Q, Zhang H, Li J, Xie F, Zhang Y, Wan B, Yu L. 3-Hydroxyflavone inhibits endogenous Aurora B and induces growth inhibition of cancer cell line. *Mol Biol Rep.* 2010 Mar;37(3):1577-83

Larsen SL, Yde CW, Laenkholm AV, Rasmussen BB, Duun-Henriksen AK, Bak M, Lykkesfeldt AE, Kirkegaard T. Aurora kinase B is important for antiestrogen resistant cell growth and a potential biomarker for tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer.* 2015;8;15:239

Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D (2008) Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions. In: Daayf F, Lattanzio V (eds) *Recent advances in polyphenol research*, vol 1. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 1–35

Lattanzio V. (2013) Phenolic Compounds: Introduction. In: Ramawat K., Mérillon JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg

Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JKV, Markowitz S, et al. 1993. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 53:1986– 89.

Lee E. Y., Chang C. Y., Hu N., Wang Y. C., Lai C. C., Herrup K., Lee W.-H., Bradley A. 1992. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288–294. 10.1038/359288a0

Lee EC, Frolov A, Li R et al. Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:4996 –5002.

Lee KW, Kang NJ, Heo YS, Rogozin EA, Pugliese A, Hwang MK, Bowden GT, Bode AM, Lee HJ, and Dong Z. Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine. *Cancer Res* 68: 946–955, 2008.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643–649.

Lens SM, Voest EE, Medema RH. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10:825–841.

LH Hartwell, TA Weinert. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 03 Nov 1989: Vol. 246, Issue 4930, pp. 629-634.

Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA dependent DNA replication and repair. *Nature* 371:534–37.

Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. 1994. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res.* 54:6078–82

Li Y, Yao J, Han C et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients.* 2016 Mar 15;8(3):167.

Liedtke, Cornelia, and Ludwig Kiesel. "Breast cancer molecular subtypes—modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity." *Maturitas* 73.4 (2012): 288-294.

Lin YG, Immaneni A, Merritt WM et al. Targeting aurora kinase with MK-0457 inhibits ovarian cancer growth. *Clin Cancer Res* 2008;14:5437– 5446.

Lipinski M. M., Macleod K. F., Williams B. O., Mullaney T. L., Crowley D., Jacks T. 2001. Cell-autonomous and non-cell-autonomous functions of the Rb tumor suppressor in developing central nervous system. *EMBO J.* 20, 3402–3413. [10.1093/emboj/20.13.3402](https://doi.org/10.1093/emboj/20.13.3402).

Liu T, Xu Z, He Q, Chen Y, Yang B, Hu Y. Nitrogen-containing flavonoids as CDK1/Cyclin B inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17: 278–281.

Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski M-B, Moroy T. 1994. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 13:3487–95.

Macurek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompmaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medema RH. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature.* 2008; 455:119–123

Maggioni D., Garavello W., Rigolio R., Pignataro L., Gaini R., Nicolini G., Apigenin impairs oral squamous cell carcinoma growth in vitro inducing cell cycle arrest and apoptosis, *Int. J. Oncol.* 43 (2013) 1675–“1682,

Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, et al. 2004. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118:493–504

Marumoto T, Honda S, Hara T, et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 2003;278:51786- 95.

Marunaka Y, Marunaka R, Sun H et al. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules.* 2017 Jan 29;22(2). pii: E209.

Matter WF, Brown RF, Vlahos CJ. The inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by quercetin and analogs. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 186: 624–631.

Mortlock AA, Foote KM, Heron NM et al. Discovery, synthesis, and in vivo activity of a new class of pyrazoloquinazolines as selective inhibitors of aurora B kinase. *J Med Chem* 2007;50:2213–2224.

Mukund V, Mukund D, Sharma V et al. Genistein: Its role in metabolic diseases and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Nov;119:13-22.

Nair JS, Ho AL, Tse AN, Coward J, Cheema H, Ambrosini G, Keen N, Schwartz GK (2009) Aurora B kinase regulates the postmitotic endoreduplication checkpoint via phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 780. *Mol Biol Cell* 20(8):2218–2228.

Nigg EA, Blangy A, Lane HA (1996) Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* 229:174–180.

Nigg EA. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:21–32

Noda A, Ning Y, Venable SF, Perira SO, Smith JR. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell. Res.* 211:90–98

Noh EM, Lee YR, Hong OY, Jung SH, Youn HJ, Kim JS. Aurora kinases are essential for PKC-induced invasion and matrix metalloproteinase-9 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2015; 34:803–10.

Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R et al. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35: 25–31.

Ota T, Suto S, Katayama H, et al. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 2002;62: 5168-77.

Pagano M. 1997. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J.* 11: 1067–75.

Pardee A. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1286–90.

Patrick H. O'Farrell. Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Dec 27; 366(1584): 3498–3507.

Patrick H. O'Farrell. Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Dec 27; 366(1584): 3498–3507.

Paul Nurse. Ordering S Phase and M Phase in the C&l Cycle. *Cell*, Vol. 79, 547-550, November 18, 1994.

Perry JA, Kornbluth S. 2007. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div.* 2:12

Petermann, E.; Woodcock, M.; Helleday, T. Chk1 promotes replication fork progression

by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 16090–16095.

Piccart–Gebhart MJ, Procter M, Leyland–Jones B, Gold- hirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greaorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, and Gelber RD. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659–1672, 2005.

Prat, Aleix, et al. "Prognostic significance of progesterone receptor–positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer." *Journal of clinical oncology* 31.2 (2013): 203.

R Vasanthi, H., N. ShriShriMal, and D. K Das. "Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease." *Current medicinal chemistry* 19.14 (2012): 2242-2251.

Rong R, Jiang LY, Sheikh MS, Huang Y. Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene*. 2007; 26:7700–08.

Rubin EH, Shapiro GI, Stein MN et al. A phase I clinical and pharmaco- kinetic (PK) trial of the aurora kinase (AK) inhibitor MK-0457 in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:Abstract 3009.

Rushmore TH, King RG, Paulson KE, Pickett CB. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expres- sion by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 3826–3830. PMID: 2160079

Salmela AL, Pouwels J, Varis A, Kukkonen AM, Toivonen P, Halonen PK, Perälä M, Kallioniemi O, Gorbsky GJ, Kallio MJ. Dietary flavonoid fisetin induces a forced exit from mitosis by targeting the mitotic spindle checkpoint. *Carcinogenesis*. 2009 Jun;30(6):1032-40.

Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K et al. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 811–815.

Sasai K, Katayama H, Stenoiien DL, Fujii S, Honda R, Kimura M, Okano Y, Tatsuka M, Suzuki F, Nigg EA, Earnshaw WC, Brinkley WR, Sen S. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004; 59:249–263. [PubMed: 15499654]

Satyanarayana A and Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* (2009) 28, 2925–2939.

Satyanarayana and P Kaldis. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* (2009) 28, 2925–2939.

Sen S, Zhou H, White RA (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14:2195–2200.

Seyhan, Mehmet Fatih, et al. "Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent." *IUBMB life* (2018).

Shao Z, Robbins PD. 1995. Differential regulation of E2F and SP1-mediated transcription by G1 cyclins. *Oncogene* 10:221–28.

Shchemelinin I, Šefc L, and Necas E. Protein kinases, their functions and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol (Praha)* 52: 81–101, 2006.

Siggelkow W, Boehm D, Gebhard S, Battista M, Sicking I, Lebrecht A, Solbach C, Hellwig B, Rahnenfuhrer J, Koelbl H, Gehrmann M, Marchan R, Cadenas C, Hengstler JG, Schmidt M. Expression of Aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* 2012;12:562.

Skibinski, A., & Kuperwasser, C. (2015). The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*, 34(42), 5309.

Sonet A, Graux C, Maertens J et al. Phase I, dose-escalation study of 2 dosing regimens of AS703569, an inhibitor of aurora and other kinases, administered orally in patients with advanced hematological malignancies. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008;112:Abstract 2963.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869–10874.

Sorlie, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R. R., & Børresen-Dale, A. L. (2006). Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*, 7(1), 127.

Spencer JPE, Rice-Evans C, Williams RJ. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. *J Biol Chem*. 2003; 278: 34783–34793.

Stafford HA (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol* 96:680–685

Strebhardt K, Ullrich A. 2006. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 6:321–30

Sureda A, Sanches Silva A, Sánchez-Machado DI et al. Hypotensive effects of genistein: From chemistry to medicine. *Chem Biol Interact*. 2017 Apr 25;268:37-46.

Sveiczer, B. Novak, and J. M. Mitchison. The size control of fission yeast revisited. *Journal of Cell Science* 109, 2947-2957 (1996).

Syljuasen, R.G.; Sorensen, C.S.; Hansen, L.T.; Fugger, K.; Lundin, C.; Johansson, F.; Helleday, T.; Sehested, M.; Lukas, J.; Bartek, J. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol. Cell. Biol*. 2005, 25, 3553–3562.

Tam SW, Shay JW, Pagano M. 1994. Differential expression and cell cycle regulation

of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16INK4. *Cancer Res.* 54:5816–20.

Tatsuka M, Katayama H, Ota T, et al. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the Aurora and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:4811-6.

Tauber E, Last KS, Olive PJ, Kyriacou CP (2004) Clock gene evolution and functional divergence. *J Biol Rhythms* 19:445–458

Toledo, L.I.; Altmeyer, M.; Rask, M.B.; Lukas, C.; Larsen, D.H.; Povlsen, L.K.; Bekker-Jensen, S.; Mailand, N.; Bartek, J.; Lukas, J. ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* 2013, 155, 1088–1103.

Toogood PL, Harvey PJ, Repine JT, Sheehan DJ, VanderWel SN, et al. 2005. Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J. Med. Chem.* 48:2388–406

Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *Br J Nutr.* 2015; 113 Suppl 2: S102–110.

Tyler RK, Shpiro N, Marquez R et al. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. *Cell Cycle* 2007;6:2846 –2854

Ujiki MB, Ding XZ, Salabat MR, Bentrem DJ, Golkar L, Milam B, *et al.* Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Mol Cancer* 2006;5:76.

Vader G, Lens SMA (2008) The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1786(1):60–72.

van Diest, Paul J., Elsken van der Wall, and Jan PA Baak. "Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review." *Journal of clinical pathology* 57.7 (2004): 675-681.

VanArsdale T, Boshoff C, Arndt KT, Abraham RT. 2015. Molecular pathways: targeting the cyclin D–CDK4/6 axis for cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* 21:2905–10

Verma, R., Bowen, R. L., Slater, S. E., Mihaimeed, F., & Jones, J. L. (2012). Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. *British Medical Bulletin*, 103, 129–145.

Vermerris W, Nicholson R (2006) Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht

Vidak M, Rozman D, Komel R. Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells. *Mol Basel Switz.* 2015; 20: 19406–19432.

Wang C, Chen J, Cao W, Sun L, Sun H, Liu Y. Aurora-B and HDAC synergistically regulate survival and proliferation of lymphoma cell via AKT, mTOR and Notch pathways. *Eur J Pharmacol.* 2016; 779:1–7.

- Wang J, Chenivesse Z, Henglein B, Brechot C. 1990. Hepatitis B virus intergration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 343:555–57.
- Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. 1994. Mammary hyperplasia and carcioma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369:669–71
- WHO, (2015). Breast cancer: prevention and control [Online]. Available: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html#4/1/2015>].
- Wilkinson RW, Odedra R, Heaton SP et al. AZD1152, a selective inhibitor of Aurora B kinase, inhibits human tumor xenograft growth by inducing apoptosis. *Clin Cancer Res* 2007;13:3682–3688.
- Williams, K. E., et al. "Molecular phenotypes of DCIS predict overall and invasive recurrence." *Annals of Oncology* 26.5 (2015): 1019-1025.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3–19
- Wink M(1999) *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Sheffield Academic Press/UK/ CRC Press, Sheffield/Boca Raton
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opinion Plant Biol* 5:218–223
- Wolfel, T. *et al.* A p16Ink4a-insensitive Cdk4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281–1284 (1995).^[1]_{SEP}
- Xingyu, Zhu, et al. "Quercetin suppresses lung cancer growth by targeting Aurora B kinase." *Cancer medicine* 5.11 (2016): 3156-3165.
- Yan X, Wu Y, Li Q, Cao L, Liu X, Saiyin H, Yu L. Cloning and characterization of a novel human Aurora C splicing variant. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328:353–361. [PubMed: 15670791]
- Yang J, Ikezoe T, Nishioka C et al. AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2007;110:2034 –2040
- Yang, X. R., Sherman, M. E., Rimm, D. L., Lissowska, J., Brinton, L. A., Peplonska, B., ... & Zatonski, W. (2007). Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 16(3), 439-443.
- Yokoyama T, Kosaka Y, Mizuguchi M. Structural Insight into the Interactions between Death-Associ- ated Protein Kinase 1 and Natural Flavonoids. *J Med Chem.* 2015; 58: 7400–7408.
- Zhang S, Ma J, Bao Y, Yang P, Zou L, Li K, et al. Nitrogen-containing flavonoid analogues as CDK1/ cyclin B inhibitors: synthesis, SAR analysis, and biological activity. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16: 7127– 7132.

Zhang, Yiqian, et al. "Elevated Aurora B expression contributes to chemoresistance and poor prognosis in breast cancer." *International journal of clinical and experimental pathology* 8.1 (2015): 751.

Zhao, H.; Watkins, J.L.; Piwnica-Worms, H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 14795–14800.



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZNİ

Flavonoid Kokteyli verilmiş MCF-7 Hücrelerinde Aurora Kinazın Protein Düzeyinde Etkisinin Araştırılması

ORIJINALLIK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**2**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

journals.tubitak.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

2

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

istanbulsaglik.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

www.science.gov

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

www.annualreviews.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

aves.istanbul.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

issuu.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

"Abstracts", Journal of Thoracic Oncology,
2009

Yayın

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe Begüm	Soyadı	Ceviz
Doğ. Yeri	Üsküdar	Doğ. Tar.	19.04.1992
Uyruğu	Türk	TC Kim No	10814388508
Email	begum.ceviz@gmail.com	Tel	0546 588 95 41

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Çengelköy Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Klinik Araştırma Saha Koordinatörü	MyCRO	2016-2017
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	orta	iyi	68,75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	73,08		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

- Seyhan MF, Yılmaz E., Timirci-Kahraman O., Saygılı N., Kısakesen HI., Bilgiç Gazioglu S., Gören AC., Eronat AP., **Ceviz AB.**, Ozturk T., Yılmaz-Aydoğan H., Öztürk O. Different propolis samples, phenolic content and breast cancer cell

lines: Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent
DOI:10.1002/iub.1996, **IUBMB Life (accepted)**

- Coban D., Eronat AP., **Ceviz AB.**, Coskunpinar E., Bugra Z., Yilmaz-Aydoğan H., Ozturk O. Effects of Common INSIG-2 and SCAP Gene Variants on Metabolic Parameters in Coronary Artery Disease. *Folia Biologica*, Volume 65, Number 4, December 2017, pp. 213-221(9)
- Seyhan MF, Yılmaz E, Timirci-Kahraman Ö, Saygılı N, Kısakesen Hİ, Eronat AP, **Ceviz AB**, Bilgiç Gazioğlu S, Yılmaz-Aydoğan H, Öztürk O. Anatolian honey is not only sweet but can also protect from breast cancer: Elixir for women from artemis to present. *IUBMB Life*. 2017 Jul 10. doi: 10.1002/iub.1652.
- Özel Cavlak G., **Ceviz AB.**, Eronat AP., Yılmaz Aydoğan H., Öztürk O. Young Sudden Cardiac Death Importance of Genomic Technologies in Turkey Clinics. *J Med Genet-Special Topics* 2016;1(2):90-6

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Fotoğraf çekmek, bitki yetiştirmek, dünya mutfakları