



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



Yüksek Lisans Tezi

**GLİOTOKSİN'İN FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE
HATLARINDAKİ KİNETİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Göksu AKKÜLAH ŞENOL

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL**

Haziran, 2020

İSTANBUL

Bu çalışma, Tarih girmek için burayı tıkladın. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gül ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Sevcin AYDIN
Nişantaşı Üniversitesi
Mühendislik Mimarlık Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2019-33569 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Bir kadın ve aynı zamanda bir anne olarak, meme kanserinden yaşamını kaybetmiş tüm hem cinslerime adanmış olan bu çalışmada meme kanserinin en yaygın türü olan Luminal A meme kanseri ile tedavisi en zor olan üçlü negatif meme kanserinde yeni tedavi yöntemlerine katkıda bulunulmaya çalışılmıştır.

Yıllar sonra karşıma çıkan bu fırsatı değerlendirmem ve bilimin ışığında insanlığa karşı duyduğum faydalı olma gereksinimimi gerçekleştirerek gelişimime destek veren Değerli Hocalarım Sayın Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN'a ve Sayın Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL'a, ayrıca tanıdığım için kendimi şanslı hissettiğim ve tez çalışmamı en başından beri sonsuz özveri ve sabırla destekleyen, en az benim kadar sahiplenene çok değerli bilim kadını Dr. İdil ÇETİN'e, ruhlarındaki neşeli müzik tınısının hiç dinmemesi dileğiyle teşekkürlerimi sunuyorum.

Öncelikle yaşama duyduğum bağlılığı artırdığı ve kendim olma yolumda attığım adımları sağlamlaştırdığı, cesaretin insanın içinden geldiğini ve kahkaha atmanın tüm yaraları iyileştirdiğini öğreten ve her şeyden önemlisi ruhumu aydınlatan bir güneş ve içimi serinleten bir bahar olduğu için kızlarım Zehra ŞENOL ve Zeynep ŞENOL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatın sakinlik ve sükûnet içinde geçebileceğine, yeterliliğin ise sadece gerçek sevgi ve bağlılık ile sağlanacağına duyduğum inancı artıran sevgili yaşam yoldaşım Ahmet Şenol'a.

Beni her zaman destekleyen ve sevgisini esirgemeyen annem Neriman Akkûlah, babam Ali Rıza Akkûlah, kardeşlerim Yasin ve Fulya Akkûlah'a, oğlum Ali Akkûlah'a teşekkürü borç bilirim.

Haziran 2020

Göksu AKKÜLAH ŞENOL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. KANSER.....	4
2.2. MEME.....	4
2.2.1. Memenin Anatomik Yapısı	4
2.3. MEME KANSERİ	6
2.3.1. BRCA1 Geni:	8
2.3.2. BRCA2 Geni:	8
2.3.3. TP53 Geni ve p53 Proteini	9
2.4. MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER ALT TİPLERİ	9
2.4.1. Luminal A.....	10
2.4.2. Luminal B.....	10
2.4.3. HER-2 Pozitif Meme Kanseri	10
2.4.4. Üçlü Negatif Meme Kanseri.....	11
2.5. UBİKÜİTİN-PROTEAZOM SİSTEMİ.....	12
2.6. 26 S PROTEAZOM	12
2.6.1. İlaç Hedefi Olarak Proteazomlar	13
2.7. GLİOTOKSİN.....	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	16
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU	16
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	16
3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ	16
3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI	17

3.5. MİTOTİK İNDEKS, İŞARETLENME İNDEKSİ VE APOPTOTİK İNDEKS İÇİN PREPARATLARIN HAZIRLANMASI.....	17
3.6. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ.....	17
3.6.1. Çoğalma Hızı: Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Tayini	17
3.6.2. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi	18
3.6.3. Mitotik İndeks	19
3.6.4. Apoptotik İndeks	20
3.6.5. BrdU Protokol	20
3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. GLİOTOKSİN'İN MDA-MB-231 VE MCF-7 HÜCRELERİNE ETKİLERİ ÇOĞALMA HIZI.....	22
4.2. GLİOTOKSİN'İN MDA-MB-231 VE MCF-7 HÜCRELERİNE ETKİLERİ.....	25
4.2.1. %BrdU Değerleri.....	25
4.3. XCELLIGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE HÜCRE İNDEKSİ	27
4.4. MİTOTİK İNDEKS	29
4.5. APOPTOTİK İNDEKS	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR.....	38
EKLER	55
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: <i>Aspergillus fumigatus</i>	3
Şekil 2.1: Memenin anatomik yapısı (Hartmann, 1991)	6
Şekil 2.2: 26 S Proteazom yapısı (Murata ve diğ., 2009).	13
Şekil 2.3: Gliotoksin'in yapısı	14
Şekil 3.1: xCELLigence DP cihazı ve E-Plate.....	19
Şekil 4.1: 24 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	22
Şekil 4.2: 24 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).....	23
Şekil 4.3: 24 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).....	24
Şekil 4.4: 24 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	25
Şekil 4.5: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MCF-7 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	26
Şekil 4.6: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	27
Şekil 4.7: 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM dozlarında Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği.....	28
Şekil 4.8: 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM dozlarında Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği	28
Şekil 4.9: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % Mitoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	29
Şekil 4.10: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % Mitoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).....	30

Şekil 4.11: 0-72 saat süresince 1,5625 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % Apoptoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	32
Şekil 4.12: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % Apoptoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı p<0.01).	32



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Guiu ve diğ., 2012).....	7
Tablo 2.2: Meme kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (İlvan Ş., 2006).....	8
Tablo 4.1: 24 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin MCF-7 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	23
Tablo 4.2: 24 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	23
Tablo 4.3: 24 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	24
Tablo 4.4: 24 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).	25
Tablo 4.5: 72 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % BrdU değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	26
Tablo 4.6: 72 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).	27
Tablo 4.7: 0-72 saat süresince 1,5625 μ M Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	30
Tablo 4.8: 0-72 saat süresince 1,5625 μ M Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	30
Tablo 4.9: 0-72 saat süresince 1,5625 μ M Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait apoptotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	31
Tablo 4.10: 0-72 saat süresince 1,5625 μ M Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait apoptotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).....	31

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

°C	: Santigrat
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	: Dimetil sulfoksit
DNA	: Deoksiribo nukleik asit
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Fetal dana serumu
HCl	: Hidroklorik asit
MTT	: 3-[4,5 dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
PBS	: Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PR	: Progesteron reseptörü
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
RTCA	: Gerçek zamanlı hücre analizi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİOTOKSİN'İN FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAKİ KİNETİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Göksu AKKÜLAH ŞENOL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

II. Danışman: Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL

Bu çalışmada Luminal A meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerine Gliotoksin'in antiproliferatif etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Araştırmamızda Luminal A meme kanseri modeli olarak da MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Deneylerde hücre kinetiği parametreleri olarak çoğalma hızı, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden elde edilen hücre indeksi değerleri, %BrDU değerleri, mitotik indeks ve apoptotik indeks değerlendirilmiştir.

Deneylerde her iki hücre hattı için 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin konsantrasyonları uygulanarak 1,5625 μ M'lık Gliotoksin konsantrasyonu IC₅₀ dozu olarak belirlenmiştir. 1,5625 μ M Gliotoksin konsantrasyonu uygulanması sonucunda her iki hücre hattına ait apoptotik indeks değerlerinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği görülmektedir. 1,5625 μ M'lık Gliotoksin konsantrasyonunda hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatlarına ait mitotik indeks değerleri zamana bağlı olarak 24. saatten itibaren anlamlı ölçüde düşmüştür. 1,5625 μ M'lık Gliotoksin konsantrasyonunda hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatlarına ait %BrdU değerlerinde de zamana bağlı anlamlı bir azalma görülmüştür.

Tüm uygulamalar sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde her iki hücre hattında zamana bağlı olarak çoğalma hızı, hücre indeksi ve mitotik indeks değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenirken, apoptotik indeks değerlerinde anlamlı bir yükseliş gözlenmiştir.

Haziran 2020, 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: Gliotoksin, Luminal A Meme Kanseri, Üçlü Negatif Meme Kanseri, Hücre Kinetiği, xCELLigence



SUMMARY

M.Sc. THESIS

EVALUATION OF KINETIC EFFECTS OF GLIOTOXIN IN DIFFERENT BREAST CANCER CELL LINES

Goksu AKKULAH SENOL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Mahmut CALISKAN

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mehmet. R. TOPCUL

In this study the effects of Gliotoxin on Luminal A breast cancer and triple negative breast cancer cells were explored. In our investigation MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were used as Luminal A breast cancer and triple negative breast cancer model respectively. Growth rate, cell index values obtained from xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) System, mitotic index, labelling index and apoptotic index were evaluated in experiments.

In experiments, 1.5625 μ M, 3.125 μ M and 6.25 μ M Gliotoxin concentrations were applied for both cell lines, and the concentration of 1.5625 μ M was determined as the IC50 dose. As a result of the application of 1.5625 μ M Gliotoxin concentration, it is seen that apoptotic index values of both cell lines increase depending on time. Mitotic index values of both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines at a concentration of 1.5625 μ M Gliotoxin decreased significantly from the 24th hour. A significant time-dependent decrease in% BrdU values of both MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines was observed in the Gliotoxin concentration of 1,5625 μ M.

When the data obtained from all applications that examined, a significant decrease was observed in the apoptotic index values, while a significant decrease in the rate of proliferation, cell index and mitotic index was observed in both cell lines with time.

June 2020, 70. pages.

Keywords: Gliotoxin, Luminal A Breast Cancer, Triple Negative Breast Cancer, Cell Kinetics, xCELLigence



1. GİRİŞ

Kanser, hücrenin yaşam döngüsünde kontrolsüz büyüme ve diferansiasyon gibi olayları etkileyen mutasyonların bir araya gelmesi ile oluşur. Değişik organlarda, köken aldıkları hücrenin fenotipine bağlı olarak kontrolsüz çoğalır ve çevre dokulara yayılım eğilimi gösterirler (McCormick, 1999).

Dünyada kadınlar arasında, meme kanseri en sık görülen malignite olup, kadınlarda görülen tüm kanser çeşitlerinin %30'unu oluşturmaktadır (Topuz ve diğ., 2003). Bu vakaların yaklaşık %20'lik kısmı 'üçlü negatif' alt tipinde görülür. Ayrıca, insan epidermal büyüme faktörü, progesteron reseptörü ve östrojen reseptörü için negatif olup, lokal başarısızlığı daha agresiftir (Chen ve diğ., 2017). ABD'de akciğer kanserinden sonra meme kanseri kadınlar arasında kanserle ilişkili ölümler arasında en sık tanı konulan kanser türü olarak bildirilmiştir (Zeichner ve diğ., 2016).

Avrupa ülkeleri gibi Asya, Latin Amerika ve Afrika ülkelerinde de meme kanseri görülme sıklığı artmakta olup, gelişmiş ülkelerin tarihsel insidansı göz önünde bulundurulduğunda doğurganlık yaşının gecikmesi, emzirme süresinin azlığı, beslenme bozukluğu ile birlikte gelişen obezite ve fiziksel hareketliliğin azlığı gibi nedenlere bağlıdır (Lukong, 2017).

Türkiye'de ise 2015 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı araştırmaya göre 35 yaş ve üzerindeki kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Ayrıca meme kanseri ülkemizde her 4 kadın kanserinden 1'inde görülür ve en sık görülen kanser çeşididir (T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015)

Meme kanseri, hücresel köken, histoloji, mutasyonlar, metastaz, klinik öykü, aile öyküsü vb. ile ilgili yüksek düzeyde karmaşıklık gösteren heterojen kanser türlerinden biridir (Beiki ve diğ., 2012). Hastalığın seyri ise meme kanseri tanısı konmuş hastalarda değişiklik gösterdiği için prognostik faktörlere kesin tanı koymada başvurulmaktadır. Günümüzde hastaların biyolojik ve klinik farklılıklarını, meme kanserinin hızla gelişebileceği yüksek risk altında olan kişileri belirlemek için, aksiller lenf nod metastazları, tümör çapı, tümör proliferasyon hızı, hormon reseptörleri, tümör tipi ve histolojik değerlendirme ve moleküler prognostik faktörler kullanılır (Guiu ve diğ., 2012).

Olguların %5-10'u otozomal dominant bir allelin iletilmesiyle miras alınır (Claus ve diğ., 1991; Newman ve diğ., 1988). BRCA1 ve BRCA2 kadınlarda meme ve yumurtalık karsinomu riskinin artmasından sorumlu olan büyük tümör baskılayıcı genlerdir (Miki ve diğ., 1994; Tavtigian ve diğ., 1996; Wooster ve diğ., 1995). Östrojen, düzenlenmiş genler alanındaki nükleer reseptörlere ve kısa DNA dizilerine veya östrojene duyarlı elemanlara bağlanarak mutajenezi indükler (Tsai ve O'Malley, 1994). Menopoz sonrası hormon replasmanı gibi tedavilerde uzun süreli östrojene maruziyet riski artırır (Hebert, 2009).

Meme kanserinin beş farklı moleküler alt tipi olduğu belirlenmiştir. Bunlar, transkriptomun dizilimi ve meme kanseri genomu sonucunda klauzin, luminal A, luminal B, insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) zengin ve bazal benzeridir (Xu ve diğ., 2017).

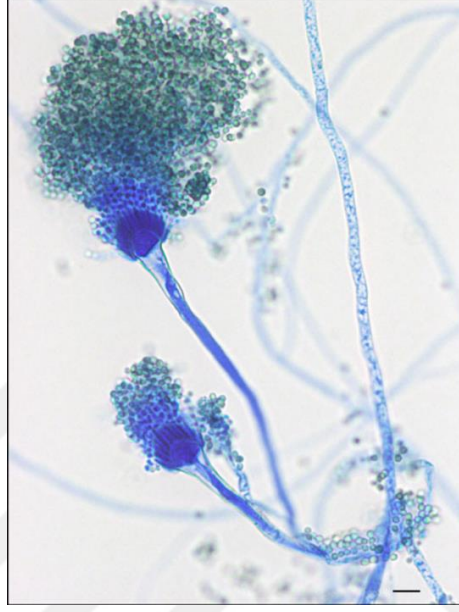
Dünya çapında her yıl meme kanseri tanısının tahmini %17'lik bir oranı üçlü negatif fenotipi barındırmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri ile BRCA mutasyonları arasında pozitif bir bağlantı bulunur. Üçlü negatif meme kanseri, metastaz için farklı eğilimli ve kemosensitivite gösteren, meme kanserinin alt tiplerinden biri olan bazal benzeri alt tip olarak da bilinen heterojenik bir kanser türüdür. (Le Du ve Ueno, 2015)

Son yıllarda antikanser ilaçların doğal kaynaklardan geliştirilmesi, yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesinde en önemli stratejilerden biridir. Geniş biyolojik çeşitliliği nedeniyle, deniz canlıları muazzam bir biyoaktif bileşik kütüphanesini temsil etmektedir. Deniz kaynaklı bileşikler antikanser ajanlar olarak büyük ilgi görmektedir (Simmons ve diğ., 2005).

Gliotoksin (GTX), deniz kaynaklı mantar *Aspergillus fumigatus*'tan izole edilen ikincil bir metabolittir. Bir piperazin halkası boyunca bir disülfür köprüsü ile karakterize edilen bir epipoliyodiyoksopiperazindir (Gardiner ve diğ., 2005). GTX, antifungal (Reilly ve diğ., 1945), antiviral (McDougall, 1969), anti-inflamatuar (López-Franco ve diğ., 2002) ve farklı hücre hatlarındaki antitümör aktiviteleri (Chen ve diğ., 2015; Nguyen ve diğ., 2013) dahil olmak üzere birçok biyolojik etki göstermektedir. Antikanser aktivitesi açısından, GTX nörojenik lokus notch homolog protein 2 (NOTCH2), Wnt / β -katenin yolu, farnesiltransferaz ve geraniltgeraniltransferaz I'i hedefleme konusunda büyük bir potansiyel göstermiştir (Hubmann ve diğ., 2013; Hubmann ve diğ., 2017; Vigushin ve diğ., 2004).

Bu tez çalışmasında; çeşitli kanser türlerinde in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan *Aspergillus fumigatus*'tan izole edilen ve ikincil bir metabolit olan Gliotoksin'in östrojen

reseptörü pozitif olan meme kanseri hücreleri MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 üzerinde meydana getireceği etkilerin çeşitli hücre kinetiği parametreleri kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1.1: *Aspergillus fumigatus*¹

¹ <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/aspergillus-fumigatus>

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser, genlerin yönetimi ile gerçekleşen hücre farklılaşması ile sonuçlanan biyolojik bir sürecin sonucunda gerçekleşen ve bu hücrelerin klonal yayılımı ile oluşan somatik genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve en komplike olanıdır. (Futreal ve diğ., 2001). Kanser türlerinin tamamı, DNA dizilimindeki anormalliklerle oluşur. Bunlardan %10-15'lik kısmının aileden genlerle aktarıldığı, geriye kalanın %85-90'lık kısmın ise canlının DNA'sının çevresel koşullarla mutajenlere maruz kalması sonucu hücre DNA'sında replikasyonda hatalar ve progresif değişiklikler ile oluştuğu düşünülmektedir. Oluşan bu mutasyonlar bazen içinde bulunduğu hücrenin büyümesine ve bu hücreden başlayarak kanser klonunun oluşmasına neden olur. Kanserın nedenleri, multifaktöriyel sebepler; bakteri ve virüs gibi mikroorganizmalar, radyasyon, çevresel faktörler, kimyasallara maruz kalma, beslenme alışkanlıkları ve ailesel faktörler olabilir (Williams 2001a; Williams 1979b; Williams 1985c; Williams 1987d; Williams1987e; Williams 1992F). 100'den fazla kanser tipinin insan vücudunu etkilediği bilinmektedir (Fitzmaurice ve diğ., 2015; Pavlopoulou ve diğ., 2015).

2.2. MEME

Meme, insan vücudunda bilateral yerleşimli bir organ olup, kadınlarda ergenlik, gebelik, emzirme ve menopoz gibi hormonal değişikliklerle fonksiyon, boyut ve şekil değişiklikleri gösterebilir (Russo ve Russo, 1998a; Russo ve Russo, 1987b).

Laktasyon dönemi içerisinde olmayan bireylerin meme ağırlıkları 150-225 g iken laktasyon dönemi içerisinde olan bireylerin meme ağırlıkları artış gösterir. Yetişkinlik dönemindeki kadınların memesi lateralinde, anterior ya da mid-aksiller çizgi, medialinde sternumun lateral sınırı yer alır. Ayrıca inferiorda altıncı ya da yedinci kaburgalar seviyesinden, superiorda ikinci ya da üçüncü kaburgalar seviyesindeki meme altı kıvrımına kadar uzanır. Spence, memenin aksiller kuyruğunun aldığı isimdir ve anterior aksiler kıvrıma kadar uzanmaktadır.

2.2.1. Memenin Anatomik Yapısı

Meme kadınlarda süt verme organı olmasının yanı sıra hormon kontrolü altında gelişimini sağlayan ve görev yapan ikincil cinsiyet organı olarak da bilinmektedir. Ektoderm olarak

gelişmiş olan meme, ileri düzeyde özelleşmiş deri bezlerinden oluşur. Yapısında bulunan 1520 lob süt sağlama ve kendi bağımsız boşaltma kanallarına sahiptir. Ductili lactiferi diğer adıyla meme başına yönelen kanallar, meme başı civarında genişleme gösterirken meme başı civarında tekrar daralarak meme başına açılırlar. Çok sayıda lenfatik ve kan damarına sahip bir yapıdır (Sabiston D. Temel Cerrahi, 1997; Bland ve ark., 2005).

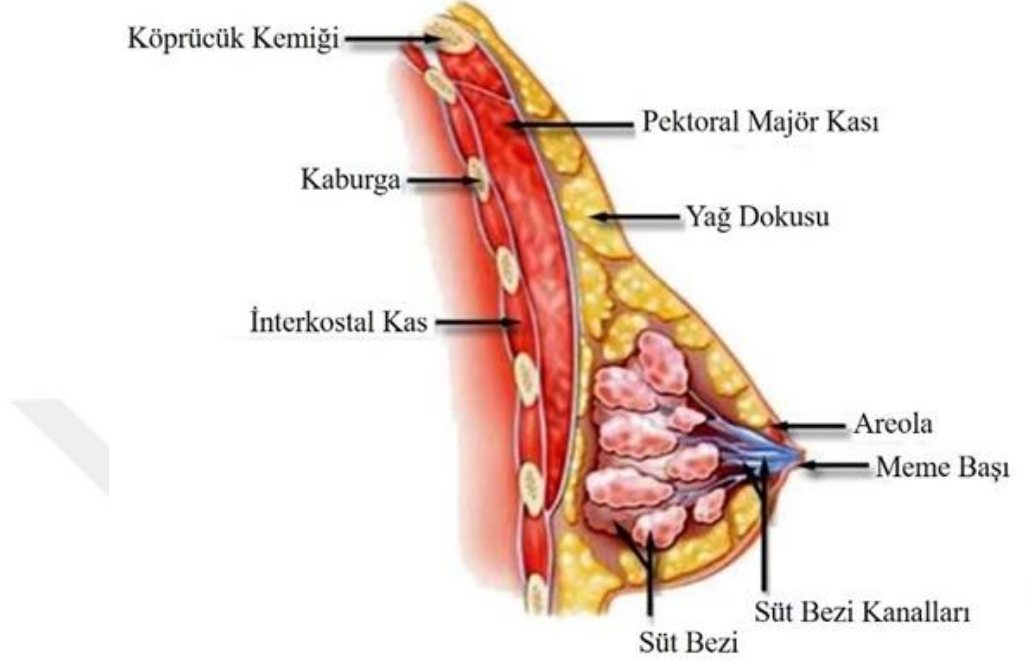
Memenin lenf damarları, ductus lactiferi çevresinde ve septum interlobulare'de bulunan lenf ağından başlar (Moore ve ark., 1992) Aynı zamanda 20-30 adet lenf nodüllerinin de bulunduğu meme, bunları birbirine bağlayan lenf damarları ile birlikte bir ağ görünümündedir (Arıncı ve Elhan, 2001).

Erişkin bir kadında memenin şekli koni benzeridir. Memelerdeki şekil ve büyüklük farkı, içerdikleri yağ dokusunun miktarından dolayı farklılık gösterir (Haagensen, C.D., 1986). Bir bireyde memeler arasındaki büyüklük farkı oldukça sık görülen bir durumdur. Birçok kadında menstruasyon başlamadan önce memelerin büyüklüğünde, yoğunluğunda ve nodüleritesinde bir artma gözlenir. Bu artıştaki en önemli nedeni memelerde sıvı birikimidir. Toplam meme hacmi menstrüel siklusun 6. ve 15. günleri arasında en düşük düzeyde bulunur. Bir memenin ortalama çapı 10-12 cm ve santral bölgede maksimum kalınlığı yaklaşık 5-7 cm'dir (Ross ve diğ., 1986).

Modifiye ter bezleri olan meme bezleri anterior toraks duvarının süperfisyel fasyası üzerinde yerleşim gösteren tubuloalveolar tipte ekzokrin bir bezdir. Meme bezi 15-20 lobdan oluşmaktadır. Loblar, destek görevi yapan fibröz bağ dokusu ve boşlukları dolduran yağ dokusu ile birbirinden ayrılmaktadır. Cilt altı bağ dokusu, tüm glandı çevreleyerek loblar ve lobüller arasına septa şeklinde uzanımlar göstermektedir. İnterlobuler aralık yağ dokusundan zengin iken intralobüler aralıkta ise bağ dokusu daha fazla bulunmaktadır. Süperfisyel fasyanın yüzeyel tabakasından, yani hipodermisten meme parenkimine doğru uzanan fibröz bağ doku kalınlaşmalarına Cooper ligamanları adı verilmektedir. Bu ligamanlar dermise bağlanarak meme dokusuna destek görevi görmektedir (Topuz ve diğ., 1989).

Meme, glandular (salgı) ve adipoz (yağ) dokudan oluşmaktadır, Cooper ligamanları olarak adlandırılan fibröz bağ doku tarafından desteklenmektedir. Meme anatomisinin geleneksel tanımı; glandular dokuyu yaklaşık 0,2 mm çapında olan 10-100 alveol içeren lobüllerden oluşan 15-20 lobdan oluşan bir doku olarak tanımlamaktadır (Hartmann, 1991) (Şekil 2.1). Her lobun

boyutu son derece değişkendir ve bazı loblar 20-30 kat farklılık gösterebilmektedir (Moffat ve diğ., 1996).



Şekil 2.1: Memenin anatomik yapısı (Hartmann, 1991)

2.3. MEME KANSERİ

Meme kanseri, 30 yaşı altı kadınlarda daha az görülen (Çakır ve diğ., 2016) yaygın bir hastalık olup, görülme sıklığı dünya çapında artış göstermektedir. (Kamangar ve diğ., 2006). Ancak, gelişmiş ülkelerde bir dizi önlem alınması ile birlikte mortalite oranlarında düşüş gözlemlenmiştir (Peto ve diğ., 2000). Mortalite oranlarındaki düşüşün en önemli nedenleri, taramaların yapılması (Berry ve diğ., 2005), meme kanserinde erken tanı yöntemleri (Overgaard ve diğ., 1999) ve en önemlisi adjuvan sistemin tedavi yöntemlerine başlanmasıdır (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005).

Meme kanseri oluşma nedenleri meme kanseri epidemiyolojik ve insidansı çalışmaları dikkate alınarak incelendiğinde, birden fazla risk faktörün sorumlu olduğu görülmektedir. (Erhan Y, 2014) Risk faktörleri arasında, bireyin yaşı, ırk özelliklerine bağlı değişkenler; ilk regl görülme yaşı, ilk doğum yaptığı yaşı ve canlı doğum adeti, menopoz yaşını da içeren reproduktüf hikayesi; aile hikayesi, meme kanseri ile ilişkili olduğu bilinen genlerin bireyin DNA diziliminde varlığı, 30 yaşı öncesinde toraks bölgesine uygulanan radyoterapi, hormon

replasmanı tedavisi, alkol kullanımı, meme biyopsi sayısı, yoğun meme dokusu, atipik hiperplazi ve vücut kitle indeksi sayılabilir (Koçak ve diğ., 2010).

Meme karsinomlarında moleküler (Tablo 1) ve histolojik (Tablo 2) sınıflandırma oldukça önem kazanmıştır. (İlvan Ş. Sempozyum, 2006) Klinik olarak da anlamlı alt gruplarda sınıflandırılan kanserler, klinikopatolojik, histolojik derece, lenf nodu metastaz varlığı ve prognostik, parametrelerine dayanır. Ayrıca koruyucu ve öngörücü biyobelirteçlerin (İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), Progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve Östrojen reseptörü (ER)) klinik bulguların yanı sıra değerlendirilmesinin yararlı olduğu ispatlanmıştır (Guiu ve diğ., 2012).

Meme kanserinin farklı moleküler özelliklere sahip heterojenik bir kanser olması ve dört farklı intrinsik alt tiplerinin tanımlanmasıyla çalışmalar luminal A ve luminal B'ye ayrılmıştır (Parker ve diğ., 2009).

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Guiu ve diğ., 2012)

İntrinsik Alt Tipler (GEP)	IHC Sınıflandırması (St.Gallen)	IHC/GEP'in Uyumu
Luminal A	'Luminal A' ER ve/veya PR pozitif HER2 negatif Ki67<14%	73%-100%
Luminal B	'Luminal B (HER2 negatif)' ER ve/veya PR pozitif HER2 negatif Ki67≥14% 'Luminal B (HER2 pozitif)' ER ve/veya PR pozitif Ki67 yok HER2 over-eksprese veya amplifiye	73%-100%
HER2	'HER2 pozitif (non-luminal)' HER2 over-eksprese veya amplifiye ER ve PR yok	41%-69%
Bazal	'Üçlü negatif' ER ve PR yok HER2 negatif	80%

Tablo 2.2: Meme kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (İlvan Ş., 2006)

1. İN SİTU KARSİNOM	
İn situ lobüler karsinom	İn situ duktal karsinom
2. İNVAZİV KARSİNOM	
İnvaziv duktal karsinom	İnvaziv mikropapiller karsinom
İnvaziv lobüler karsinom	Apokrin karsinom
Medüller karsinom	Metaplastik karsinom
İnvaziv papiller karsinom	İnflamatuvar karsinom
Müsinöz karsinom	Nöroendokrin karsinom
Tübüler karsinom	Sekretuar (juvenil) karsinom
İnvaziv kribriform karsinom	Adenoid kistik karsinom

DNA onarımında görevli proteinleri kodlayan, Meme kanseri A1 geni (BRCA1), meme kanseri A2 geni (BRCA2) ve Tümör protein 53 (TP53) gibi genlerdeki mutasyonlar hastaları meme karsinomu oluşum riski ile karşı karşıya bırakmaktadır. Bu mutasyonlar ve genlerin normal dışı oluşu kişinin meme kanseri değerlendirmesinde riskli olduğunu gösterir ve düzenli taramalarla takibi yapılmalıdır (Kamel ve Al-Amodi, 2017).

2.3.1. BRCA1 Geni:

BRCA1 genindeki mutasyon esnasında DNA onarımının kaybı önemli bir noktadır. Bunun yanı sıra BRCA1 proteini çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Bu molekül meme kanseri hücrelerinin invazyonundaki kontrol mekanizmasında görev alır. BRCA1 geninin hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, kemoterapiye direnç, DNA çift zincirli kırık onarımı ve transkripsiyonel regülasyon ile alakalı olduğu bildirilmiştir (Concolino ve diğ., 2018). Bu gendeki mutasyonların ailesel aktarımlarla alakalı olduğu bilinmekte ve %50-60 oranında meme kanseri görülme riskini artırmaktadır. Membran protein kompleksi içerisinde bulunan Moesin, Ezrin ve Radiksin'i regüle ettiği bilinmektedir. Bu proteinlerin metastazı kolaylaştırdığı düşünüldüğünde hastalığın bir bölgeden diğer bölgeye geçişini yani invazyonunu kolaylaştırarak diğer bir deyişle hastalığın metastazını, agresifliğini ve derecesini temsil ettiği de söylenebilir (Sengodan ve diğ., 2018).

2.3.2. BRCA2 Geni:

BRCA1 geninde olduğu gibi BRCA2 geni de DNA hasarlarını önleyici tümör baskılayıcı bir gendir (Narod ve Salmena, 2011). Yaşı 70'in altında olan ve her iki BRCA geninde mutasyon

taşıyan kadınlarda kanser görülme riski yaklaşık olarak %80 olarak saptanmıştır (Gökbulut ve diğ., 2011). %35-40 kalıtsal kökenli kanserlerin sorumlusu olarak belirtilmiştir (Erhan Y., 2014).

2.3.3. TP53 Geni ve p53 Proteini

TP53 geni, p53 tümör supressör proteinini kodlayan birçok kanser türü ve meme kanserinde en sık görülen mutasyona uğramış gendir. Erken evre kanserlerde, %30-35'in belirlenen mutasyonlarıdır (Duffy ve Synnott, 2018). DNA hasarı sonrası hücrede artışı gözlemlenen TP53, hücre döngüsünün durmasını veya apoptozu uyaran bir proteindir (Atmaca ve Karaca, 2011).

Üçlü negatif meme kanseri hastalarının %80'inde saptandığı ve TP53 genindeki mutasyonların tüm karsinomlu hastaların %30'unda görüldüğü rapor edilmiştir (Yamaguchi ve diğ., 2018).

2.4. MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER ALT TİPLERİ

Meme kanserinin farklı moleküler alt tipleri bulunduğu ve heterojenik yapıda olduğu bilinmektedir. Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler bu alt tiplerin karakterize edilmesinde ve buna bağlı olarak uygun tedavi yöntemlerinin etkili bir şekilde karakterize edildiği alt tipe göre stratejiler ile uygulanmasına olanak vermektedir (Topçul ve Çetin, 2015; Gonzalez ve diğ., 2007; Leong ve Zhuang, 2011).

Meme tümörlerindeki genlerin incelenmesi sonucunda bu genlerin ekspresyonlarına göre 5 farklı alt tipi olduğu gözlemlenmiştir (Perou ve diğ., 2000; Sorlie ve diğ., 2001; Hu ve diğ., 2006). Bunlar geleneksel hormon reseptörü pozitif'in en sık rastlanan moleküler alt tipleri luminal A ve luminal B grupları ve hormon reseptörü negatif'in HER-2 ve bazal benzeri gruplar moleküler alt tipleri olarak belirlenmiştir. Normal meme benzeri gibi moleküler alt tipler yine bazı çalışmalarda belirlenmiştir (Sotiriou ve Pusztai, 2009; Sorlie ve diğ., 2001; Sorlie ve diğ., 2003; Brenton ve diğ., 2005; Rakha ve diğ., 2008; Parker ve diğ., 2009; Geyer ve Resi-Filho; 2008).

Üçlü negatif meme kanseri, moleküler alt tiplerden bazal benzeri meme kanseri olarak da bilinmektedir. Kötü bir prognoz ile seyreden ve İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

2'nin (HER-2) aşırı ekspresyonunun, progesterone reseptörü (PR) ve estrojen reseptörü (ER) yokluğu ile karakterize edilen üçlü negatif meme kanserleridir (Cetin ve Topcul, 2014).

2.4.1. Luminal A

Tüm meme kanserleri incelendiğinde Luminal A'nın %50-60 oranla, en sık görülen alt tip olduğu bilinmektedir (Carey, 2006). Diğer bir deyişle, en yüksek prevelansa sahip Luminal A grubu histolojik derecesi, proliferatif aktivitesi ve mitoz oranı düşük Her2 negatif tümörleri kapsar. Metastazlar genellikle kemiklerle sınırlı kalarak hastanın prognoz seyri oldukça iyidir (Moasser, 2007; Kesse-Adu ve Shousha, 2004). İmmünohistokimyasal olarak düşük Ki67 indeksi ve negatif HER-2 ile PR-pozitif ve/veya ER-pozitif olarak tanımlanan Luminal A, proliferasyon ilişkili genlerin daha düşük seviyeleri ve daha yüksek ER seviyeleri ile karakterize edilmektedir (Carey ve diğ., 2006; Carey, 2010). İlaça rezistans gösteren kanserli kök hücrelerin belirmesinde ters sistemik toksisite, edinilmiş tümör direnci ve bununla birlikte terapötik etkinliği tehlikeye atması ile alakalı olduğu gösterilmiştir (Telang ve diğ., 2017).

2.4.2. Luminal B

Luminal B tümörleri yüksek proliferasyon hızına sahip ve agresif seyirli yayılım gösterme eğilimindedir. İmmünohistokimyasal olarak %14'ünden azının nükleer Ki67 ekspresyonu göstermesi Luminal A'ya göre temel farklarından biri olarak kabul edilir. Ayrıca, immünohistokimyasal olarak Luminal B fenotipi, Her2-pozitif tümörlerin yaklaşık %30'luk kısmını oluşturur (Moasser, 2007; Gutierrez ve diğ., 2011; Tsutsui ve diğ., 2003; Diniz ve diğ., 2015; Anderson ve diğ., 2014; Wesolowski ve diğ., 2011; Putti ve diğ. 2011; Kesse-Adu ve Shousha, 2004).

2.4.3. HER-2 Pozitif Meme Kanseri

İyi karakterize edilmiş dört epidermal büyüme faktörü reseptörlerinden olan HER-2, epiteliyal hücre farklılaşması ve hücre büyümesi, muhtemel anjiyogenezi kontrol altına alan hücre içi sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonu ile karışan (Klapper ve diğ., 1999; Karunagaran ve diğ. 1996; Petit ve diğ., 1997; Giatromanolaki ve diğ., 2004), hücre içi (intracellular) tirozin kinaz etkinliği olan 185 kDa transmembran glikoprotein reseptörüdür (King ve diğ., 1985). Epidermal büyüme faktörü ailesinin diğer reseptörleri EGFR (HER1), HER3 ve HER4'tür. Bir proto-onkogen olan c-erb-B2 geni tarafından setenzlenen ve 17. Kromozomun uzun kolunda

bulanan HER2 proteini'dir. İşlev görmesi için Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesine ait proteinler ligandın bağlanması sonucunda HER2 ile heterodimer yapıda reseptörler oluşturması gerekir. Hücre içindeki sinyal ileti yolları etkinleşerek hücrenin proliferasyonu ve diferansiyasyonuna HER2 reseptörleri aktif hale gelerek neden olur (Perou ve diğ., 2000; Sorlie ve diğ., 2001; Sorlie ve diğ., 2003). Tüm meme kanserli hastaların %20-25'ini oluşturan HER2 pozitif meme kanserinde yayılımı agresif olup, prognoz açısından kötü bir seyir gözlemlenir. HER2 pozitif meme kanserinde hormon reseptörleri negatif iken genellikle çoğalma ve grad hızı yüksektir. Bu hasta gruplarında lenf bezi pozitifliği, viseral ve santral sinir sistemi metastazları daha sık iken tümör boyutları daha büyüktür. Hastaların yaşamda kalma süreleri tüm bunlara bağlı olarak daha kısadır. HER2 pozitif meme kanseri hücrelerine sahip olan hastaların tedavi yöntemlerinden olan kemoterapi ve hormon tedavisine yanıtları diğer meme kanseri hastalarından farklıdır. CMF protokolüne dirençli yanıt verirken topoizomeras-IIa geninin c-erb-B2 geni ile aynı amplikonda bulunması bunun nedeni ile antrasiklinlere iyi yanıt alınmaktadır. Taksanlar ve aromataz inhibitörleriyle ilgili henüz yeterli veri yokken tamoksifene karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Burge ve diğ., 2006). HER-2 pozitif meme kanserleri tedaviden yoksun bırakıldığında iç organlar ve beyine metastaz eğiliminde olup prognozu kötüleşmektedir (Ross ve diğ., 2003; Gabos ve diğ., 2006).

2.4.4. Üçlü Negatif Meme Kanseri

Diğer kanser türlerine göre hastaların daha genç yaşlarda karşılaştığı bir kanser türüdür. Yüksek gradlı tümörleri, ortalamanın üzerinde seyreden tümör boyutları ve bazen de daha yüksek oranlı nod pozitifliği ile diğer kanser türlerinden ayrıştırılabilir (Dent ve diğ., 2007). Apokrin, metaplastik ve adenoid kistik karsinomlar gibi agresif fenotipler, üçlü negatif meme kanserinin ayırt edici histolojik özellikleri olarak gösterilebilir (Reis-Filho ve diğ., 2010).

Üçlü negatif meme kanseri hastalarında hastalığın biyolojik olarak agresif seyirli olması ve yaşamda kalma açısından yüksek risk içermeleri özel terapötik ajanların yetersiz olması ile ilişkilendirilebilir. (43G) Bunun yanı sıra teşhis edilen hasta grupları incelendiğinde hastalığın birinci ve üçüncü yıllarında metastaz ile birlikte nükslerin ortaya çıktığı da gözlemlenmiştir (Dent ve diğ., 2007). Hastalığın agresif prognozunun en temel nedenleri; aile öyküsünde benzer kanser türlerinin olması, daha genç yaşta hasta profilleri, yüksek histolojik derece, yüksek orandaki lenf nodu metastazı, daha büyük tümörler, metastaz, erken nüks etme durumu ve hedefe duyarlı olmayan özelliklere sahip olmasıdır (Qui ve diğ., 2016).

Üçlü negatif meme kanserinin görüldüğü hasta grupları Afrikalı, Hispanik ve Amerikalı genç BRCA1 geni taşıyanlardır. %39'unu 50 yaşın altındaki Afrikalı ve Amerikalı kadınlar oluştururken %16'sını aynı yaştaki beyaz kadın ırkı oluşturmaktadır (Yao ve diğ.,2017).

Yapılan bir çalışmada üçlü negatif meme kanseri benzer fenotip özelliği göstermelerine rağmen farklı prognozlara sahip olması neticesinde alt tipler tanımlanmıştır (Mendes ve diğ., 2015). Bunlar; bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), mezenkimal benzeri (ML), immünomodilatör (IM) mezenkimal kök benzeri (MSL) ve lümen androjen reseptörüdür (Mendes ve diğ., 2015).

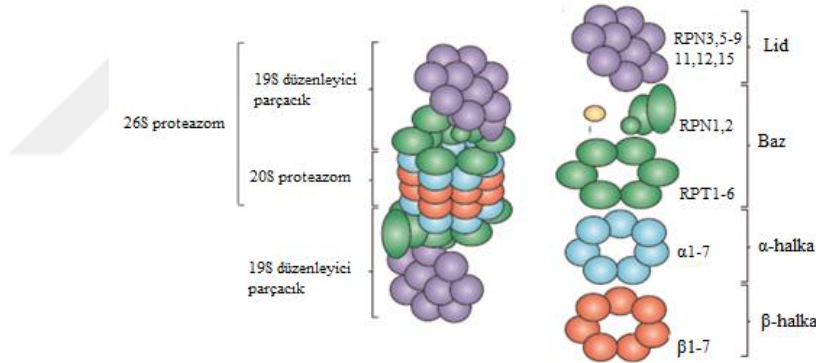
2.5. UBİKÜİTİN-PROTEAZOM SİSTEMİ

Ubikuitin-proteazom yolu, ökaryotik hücrelerde oldukça kısa ömürlü proteinlerin hedeflenen bozulması için gerekli korunmuş bir yoldur (Sá-Moura ve diğ., 2013; Keil ve diğ., 2010). Bu yolun ana hedefleri, zamanında bozunması kontrollü hücre bölünmesi için gerekli olan hücre döngüsü düzenleyici proteinler ve endoplazmik retikulum içindeki yanlış katlanmış proteindir (Yang ve diğ., 2014; Masoumi ve diğ., 2011; Egozi ve diğ., 2007). Hücresel proteinlerin proteolizi oldukça karmaşık, geçici olarak kontrol edilebilir ve temel hücresel süreçlerin düzenlenmesi için gerekli olan bir süreçtir (Bacquin ve diğ., 2013; Gora ve diğ., 2013). Hücresel proteinlerin proteazom yolu ile proteolizine, substratlarına karşı oldukça spesifik olan kompleks bir enzim dizisi aracılık etmektedir (Sen ve Snyder, 2011; Besche ve diğ., 2014). Bu substratlar arasında hücre döngüsü ve büyüme düzenleyicileri, sinyal iletim yollarının bileşenleri, oda temizliği enzimleri ve hücreye özgü metabolik yollar, yanlış katlanmış, mutasyona uğramış veya hasar görmüş proteinler bulunmaktadır (Yang ve diğ., 2014; Masoumi ve diğ., 2011; Egozi ve diğ., 2007). Bir proteinin ubikitin-proteazom yolağı tarafından bozulmasına, çoklu ubikitin moleküllerinin hedef proteine kovalent olarak bağlanması ve ardından etiketli proteinin degradasyonu dahil olmak üzere iki ayrı ve ardışık adım aracılık etmektedir (Wu ve diğ., 2010). Ubikuitin proteolitik sistem, kanser dahil olmak üzere birçok biyolojik ve patolojik sürecin düzenlenmesinde temel bir rol oynamaktadır (Lui ve diğ., 2011; Shrestha ve diğ., 2014).

2.6. 26 S PROTEAZOM

26S veya konstitütif proteazom, tüm ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında bulunmaktadır. İki 19S yapısı ile kaplı bir 20S çekirdek parçacığından oluşmaktadır. 20S katalitik çekirdek, dört tane istiflenmiş halka halinde düzenlenmiş 28 alt ünitelerden oluşmakta ve

proteolizin meydana geldiği merkezi bir hazne oluşturmaktadır. İki dış halka, baskın olarak yapısal olan 7 farklı alfa alt biriminden ve iki iç halka, en az üçü katalitik bölgeler içeren 7 farklı β alt birimden oluşmaktadır (Groll et al. 1997). Proteazomun katalitik aktiviteleri, belirli bir amino asit kalıntısından sonra bir peptit bağının yarılması tercihinine bağlı olarak üç ana kategoride sınıflandırılmaktadır. Bu aktiviteler kimotripsin benzeri (CT-L), tripsin benzeri (T-L) ve kaspaz benzeri (C-L) olarak adlandırılmakta ve sırasıyla $\beta 5$, $\beta 2$ ve $\beta 1$ alt birimleri ile ilişkilendirilmektedir. CT-L aktivitesi hidrofobik kalıntılardan sonra, T-L aktivitesi bazik kalıntılardan sonra ve C-L aktivitesi ise asidik kalıntılardan sonra parçalanmaktadır (Groll et al. 1999; Heinemeyer et al. 1997). Substratlar, 20S proteazomunun her iki ucundaki 19S düzenleyici parçacığına bağlanarak proteolitik bölmeye erişmektedir. Poliubikuitin etiketli proteinler, ubikuitinin parçalandığı, geri dönüştürüldüğü, hedef proteinin katlandığı ve 20S katalitik bölmesine beslendiği 19S partikülü tarafından tanınmaktadır (Groll et al. 2000a, b; Navon and Goldberg 2001).



Şekil 2.2: 26 S Proteazom yapısı (Murata ve diğ., 2009).

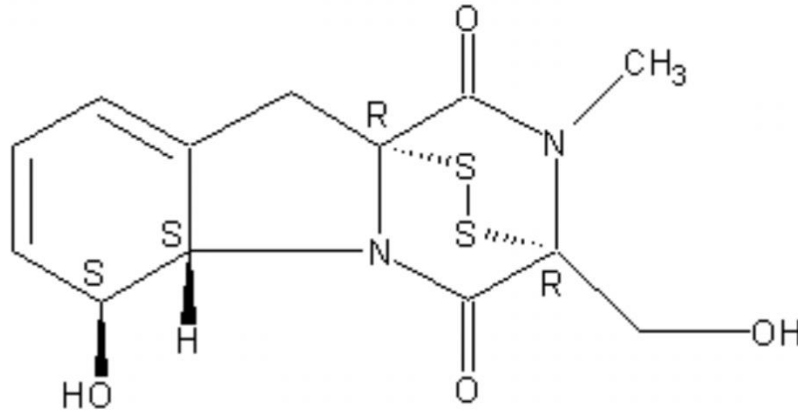
2.6.1. İlaç Hedefi Olarak Proteazomlar

Proteazom inhibitörleri başlangıçta proteazomun katalitik aktivitesinin işlevini araştırmak amacıyla *in vitro* proplar olarak sentezlenmiştir. Proteazomun hücre fonksiyonundaki temel rolü çözüldüğünden, proteazom inhibitörlerinin tedavi edici ajanlar olarak potansiyele sahip olma olasılığı dikkate alınmıştır. İlk çalışmalar, proteazom inhibitörlerinin lösemik hücre hatlarında apoptozu indüklediğini ve Burkitt lenfomanının *in vivo* bir modelinde aktif olduğunu göstermiştir (Imajoh-Ohmi ve diğ., 1995; Shinohara ve diğ., 1996; Drexler, 1997; Orlowski ve diğ., 1998). Ayrıca *in vitro* araştırmalar, proteazom inhibitörlerinin hematolojik ve solid

tümörlere karşı geniş spektrumlu bir anti-proliferatif ve pro-apoptotik aktivite sergilediğini göstermiştir. Bu çalışmalar, anti-kanser ajanları olarak proteazom inhibitörlerinin potansiyelini ortaya koysa da, mevcut bileşiklerin çoğu, göreceli bir güç, özgüllük veya stabilite eksikliğinden dolayı laboratuvar çalışmaları ile sınırlı kalmıştır. Bu durum, daha güçlü ve seçici aktiviteye sahip yeni inhibitörlerin tasarımına yol açmıştır (Crawford ve diğ., 2011).

2.7. GLİOTOKSİN

Disülfür bağı içeren heterosiklik bir çekirdek ile karakterize edilen mantar epipolitiyodioksopiperazin metaboliti gliotoksin, başlangıçta güçlü bir makrofagositik apoptoz indükleyicisi ve NF-KB aktivasyonunun bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Elledge ve Harper, 1998; Waring ve diğ., 1988; Pahl ve diğ., 1996). Son zamanlarda gliotoksinin proteazomu alışılmadık bir mekanizma ile inhibe ettiği bildirilmiştir (Kroll ve diğ., 1999).



Şekil 2.3: Gliotoksin'in yapısı

Bilinen tüm inhibitörler proteazomun katalitik bölgelerine bağlanmasına karşın gliotoksin, CT-L aktivitesinin rekabetçi olmayan bir inhibitörüdür ve muhtemelen tanımlanamayan bir katalitik olmayan bölgeye bağlanmaktadır. Fizyolojik etkilerinin çoğu için gerekli olduğu gösterilen gliotoksinin disülfür köprüsü, proteazom inhibisyonunda da rol oynamaktadır. Bu da gliotoksinin, CT-L aktif bölgesinde veya yakınında karışık disülfür bağlarını içeren geri dönüşümlü kovalent modifikasyonla proteazomu hedefleyebileceğini göstermektedir. Gliotoksin, saflaştırılmış proteazomun CT-L aktivitesini, mononükleer hücrelerde proteazom substratlarının birikmesini sağlayan bir konsantrasyon olan yaklaşık 10 mikrom IC₅₀ değeri ile inhibe etmektedir. Bununla birlikte, NF-KB aktivasyonunun inhibisyonunun 100 nM kadar

düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu gözlemlenmiş ve proteazomun *in vivo* gliotoksinin ana hedefi olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir (Pahl ve diğ., 1996).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU

Bu araştırmada üçlü negatif meme kanseri modeli olarak Kafkas kökenli bir kadının pleural efüzyonundan izole edilen MDA-MB-231 ve luminal A meme kanseri modeli olarak yine aynı şekilde Kafkas kökenli bir kadının pleural efüzyonundan izole edilen MCF-7 hücre soyları kullanılmıştır. Bu hücreler laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen hücrelerdir. MDA-MB-231 hücreleri, 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amphotericine B (Sigma), %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco lab.) içeren pH'sı % 4.4' lük NaHCO_3 ile 7.2' ye ayarlanabilen yüksek glikozlu DMEM doku kültürü besiyerinde, MCF-7 hücreleri ise 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amphotericine B (Sigma), %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco lab.) içeren pH'sı % 4.4' lük NaHCO_3 ile 7.2' ye ayarlanabilen RPMI-1640 doku kültürü besiyerinde yaşatılmaktadır.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Pasaj işlemi, hücrelerin yetişmiş oldukları kültür kaplarında tek tabaka haline geldiklerinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yetiştirildikleri kültür kabı içinden kaldırılabilmesi için % 0.25'lik tripsin eriyiği (Gibco Lab.) kullanılmış ve süspanse edilerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu işlemten sonra 2 ml besiyeri eklenerek tripsin inaktif hale getirilmiş ve 500 g dönme hızında 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış, pellet üzerine kuyucuk başına ekilecek olan hücre sayısı hesaplanarak sulandırma yapılmış ve ekim işlemine geçilmiştir.

3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ

Çoğalma hızı analizi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 3×10^4 hücre/ml besiyeri olacak şekilde ekim yapılmıştır. Mitoz indeksi ve işaretlenme indeksi parametreleri için 24 kuyucuklu steril kültür kaplarının her bir kuyucuğu içerisine önceden steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş ve her bir kuyucuk başına $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler lamellere yapıştıktan sonra her kuyucuğa birer ml besiyeri eklenmiştir. Apoptoz indeksi için 6 kuyucuklu kültür kapları kullanılmış ve her bir kuyucukta 100000 hücre olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

24 saatlik süre boyunca, 37 °C'de %95 hava ve %5 CO₂ karışımında inkübasyona devam edilerek hücreler deneye hazır hale getirilmiştir.

3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Uygulanan ilaç konsantrasyonları *in vitro* ve klinik çalışmalar temel alınarak saptanmıştır (Vigushin ve diğ., 2004). Deneyler Gliotoksin'in tek başına ve birlikte uygulandığı konsantrasyon ve zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir.

3.5. MİTOTİK İNDEKS VE APOPTOTİK İNDEKS İÇİN PREPARATLARIN HAZIRLANMASI

Kontrol ve deney gruplarındaki hücrelerin ilaç uygulama süreleri tamamlandığında, mitoz indeksi ve işaretlenme indeksi işlemleri için ayrılan lameller kuyucuklardan çıkarılmıştır. Havada kurutulduktan sonra şeffaf oje ile lamlara yapıştırılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar hava ile kurutulduktan sonra, Carnoy fiksativ [glasiyal asetik asit: %96 etanol (1:3 v/v)] ile 10 dakika fikse edilmiş ve iki kez 5'er dakika %70 etanol ile yıkanmıştır. Preparatlar daha sonraki hidroliz ve boyama işlemleri için kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır.

Apoptoz indeksi tespiti için, ilaçların uygulama süreleri sonunda hücreler %0.25'lik tripsin ile yüzeyden kaldırılmış ve steril tüplere alınmıştır. 500 g hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilecek ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin fiksasyonu için pellet üzerine 1 ml metanol: PBS (1:1 v/v) konulmuş ve 500 g hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra pellet üzerine 1 ml metanol eklenmiş ve pipetaj ile süspanse edilip 4 °C'de saklanmıştır. Preparat hazırlanması için kullanılacak lamalar temizlenmek üzere etanol: HCl (1:1 v/v) ile 4°C'de 24 saat bekletilmiş daha sonra 24 saat akarsu altında bırakılmıştır. Distile suda tekrar durulanan lamalar preparat yapılmak üzere 4°C'de saklanmıştır.

3.6. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ

3.6.1. Çoğalma Hızı: Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Tayini

Gliotoksin, üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan MDA-MB-231 ve luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan MCF-7 hücre soyları üzerinde meydana getirdiği sitotoksiste, MTT testi ile değerlendirilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz

enzimleri MTT'yi dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözünebilen ancak suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgemektedir ve bu deney mitokondriyal aktivite bozukluğunu göstermektedir.

Hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde bekletilmiş ve sırasıyla farklı konsantrasyonlardaki Gliotoksin uygulanmıştır. Deney sürelerinin sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak ve 40 µl MTT (5mg/ml) eklenmiştir. Yaklaşık 4 saat beklendikten sonra MTT bulunan kuyucuklara 160 µl DMSO eklenerek çalkalayıcılı etüvde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristallerinin 1 saatlik inkübasyon süresince çözünmesinin ardından oluşturulan deney gruplarının absorbans değerleri, 570 nm'de spektrofotometre ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir (µQuant, Bio-Tek Instruments INC.) (Topçul M.R. ve Çetin İ, 2015).

3.6.2. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümlerinin belirlenmesindeki geleneksel yöntemler, kültüre hücrelerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak bunlar üzerinde biyokimyasal ölçümler yapılmasını içermektedir. Günümüzde çok yeni olarak bu amaçla kullanılmaya başlayan sistemler, kültüre hücrelerdeki çoğalma ve ölümleri, gerçek zamanlı ve devamlı bir şekilde, hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin belirlenmesiyle gerçekleştirmektedirler. Bu sistemlerden biri de xCELLigence RTCA-DP sistemidir. xCELLigence RTCA-DP sisteminin temel ilkesi, alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan E-Plate yüzeyine yapışan hücre miktarı arttıkça akıma karşı oluşan direncin artması, yüzeye yapışan hücre miktarı azaldıkça, direncin de buna bağlı olarak azalması olgusuna dayanmaktadır. xCELLigence RTCA-DP sistemi aracılığıyla hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gerçek zamanlı ve sürekli olarak kaydedilebilmekte ve kaydedilen veriler grafikler halinde bilgisayar ekranına aktarılmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: xCELLigence DP cihazı ve E-Plate.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence DP kullanılarak elde edilecek hücre indeksi parametresinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu E-Plate kullanılmıştır. Öncelikle E-Plate'in her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklenmiş ve xCELLigence DP cihazında background ölçümleri alınmıştır. Daha sonra MDA-MB-231 hücreleri için 100 µl besiyerinde 5×10^3 hücre, MCF-7 hücreleri için ise 100 µl besiyerinde 1×10^4 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapılmıştır. Ekim işleminin ardından E-Plate'ler 20 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve daha sonra xCELLigence DP cihazındaki yerlerine yerleştirilerek 37°C ve %5 CO₂ ortam şartlarında inkübasyona devam edilmiştir. E-Plate'lere hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra xCELLigence DP cihazına her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verilmiştir. Hücre ekiminde yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde E-Plate'lerdeki besiyeri ajanlı besiyeri ile değiştirilerek 72 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edilmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağımlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler bilgisayar ekranına aktarılmıştır (Topçul M.R. ve Çetin İ, 2015).

3.6.3. Mitotik İndeks

Deney gruplarına göre hazırlanan preparatlar önce oda sıcaklığındaki 1 N HCl ile 1 dakika daha sonra 60 °C deki 1 N HCl ile 10 dakika hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminden sonra preparatlara 1 saat süresince Feulgen metodu uygulanmıştır. Bu preparatlar daha sonra Feulgen metoduna özel yıkama solüsyonu ile 2'şer dakikadan 3 kez yıkanmış ve havada kurutulmuştur.

Preparatlar kurutulduktan sonra, 2 dakika süre ile Giemsa boyası ile boyanarak sayım için hazır duruma getirilmiştir. Bu preparatlardan mitoz indeksi (MI) değerlerini saptamak amacı ile geç profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sayılmıştır. Erken profaz evresi interfaz grubundaki hücrelere morfolojik olarak benzerlik gösterdiğinden bu evre ile birlikte değerlendirilmiştir. Uygulanan her bir ilaç konsantrasyonu ve süre için üçer preparat değerlendirilmiş ve her bir preparattan ortalama 3000 hücre sayılarak, mitoz indeksi değerleri saptanmıştır (Topçul M.R. ve Çetin İ, 2015).

3.6.4. Apoptotik İndeks

4°C’de bekletilen hücreler 500 g hızda 5 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve tekrar 1 ml taze metanol ile süspanse edilmiştir. Hazırlanan bu hücre süspanسیونundan daha önce temizlenen lamlar üzerine, tüm lam yüzeyi kaplanacak şekilde 100 µl damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutmanın ardından örneklerin DAPI ile muameleleri gerçekleştirilmiştir. Preparatlara boyama kaplarında, ışık almayan bir ortamda 20 dakika boyunca oda sıcaklığında DAPI uygulanmıştır. Bu süre sonunda boyama kabından alınan preparatlar 20 dakika boyunca PBS’de bekletilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından preparatların üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskopta (Leitz, Wetzlar Ortholux) (λ_{exc} 364 nm; λ_{em} 454 nm) sayımları gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlarda DAPI uygulanan hücreler, normal ve apoptotik nükleus olarak belirlenmiş ve AI değerleri hesaplanmıştır. Her deney grubu için en az 30 alanda yaklaşık 100 hücre sayılmış ve her alan için apoptotik hücrelerin toplam hücrelere olan yüzde oranları hesaplanmıştır (Martinez-Serra, J ve diğ., 2014).

3.6.5. BrdU Protokol

96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 200.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yayılması için 24 saat inkübasyondan sonra total hacim 200 µl olacak şekilde istenilen konsantrasyonda test reaktifi eklenmiştir. Test reaktifi eklendikten 3-4 saat sonra BrdU eklenmiştir süresi devam ederek, bu işlem her deney süresi için ayrı ayrı gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla öncelikle kit içerisindeki 500 x BrdU’nun 1:500 oranında seyreltik solüsyonu hazırlanarak stoktan 8 µl BrdU çekilmiş ve 3992 µl besiyerine eklenerek seyreltilmiştir. Bu seyreltilmiş BrdU’dan 20 µl alınarak deney gruplarının bulunduğu kuyulara eklenmiştir. 24 saat inkübasyona devam edilmiştir. Kuyulardaki medium uzaklaştırılarak her

bir kuyuya 200 µl sabitleme solüsyonu uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dak inkübe edilerek bu sürenin sonunda sabitleme solüsyonu tamamen uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamasında kit içerisinde yer alan 50 x Wash Buffer, 1:50 oranında seyreltilerek 3 kez yıkama yapılmış, son yıkamadan sonra Wash Buffer kuyulardan iyice uzaklaştırılmıştır. Her kuyuya 100 µl Anti-BrdU antikoru eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. 2000 x Goat anti-mouse IgG, Peroksidaz konjugatı 1:2000 oranında seyreltilerek ve milipor filtreden geçirilerek her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek 30 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Her kuyuya 100 µl TMB Peroksidaz Substrat eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dak inkübe edilmiştir. Kit içerisinde yer alan anti-stop solüsyonundan her kuyuya 100 µl eklenecek ve 450-550 nm çift dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (Uslu ve diğ., 2015).

3.7. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm deney gruplarında uygulanan konsantrasyon ve zamana göre saptanan hücre kinetiği parametreleri değerleri kontrole ve birbirlerine göre değerlendirilmiş ve bu amaçla tüm deney gruplarından saptanan değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır. Grupların kontrole göre anlamlılıkları DUNNETT'S testi ile grupların birbirleri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0.05$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, disülfür bağı içeren heterosiklik bir çekirdek ile karakterize edilen mantar epipolitiyodioksopiperazin metaboliti gliotoksin kullanılmıştır. *In vitro* koşullarda östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücreleri MCF-7 ile östrojen, progesteron reseptörü ve HER-2 gen anlatımı negatif olan üçlü negatif meme kanseri hücreleri MDA-MB-231 üzerine bu ajan, değişik süre ve konsantrasyonlarda tek başına uygulanmış; çoğalma hızı, hücre indeksi, mitotik indeks ve apoptotik indeks verilerinin değerlendirmeleri yapılarak luminal A ve triple negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde meydana getirdiği antiproliferatif etkiler araştırılmıştır.

4.1. GLİOTOKSİN'İN MDA-MB-231 VE MCF-7 HÜCRELERİNE ETKİLERİ ÇOĞALMA HIZI

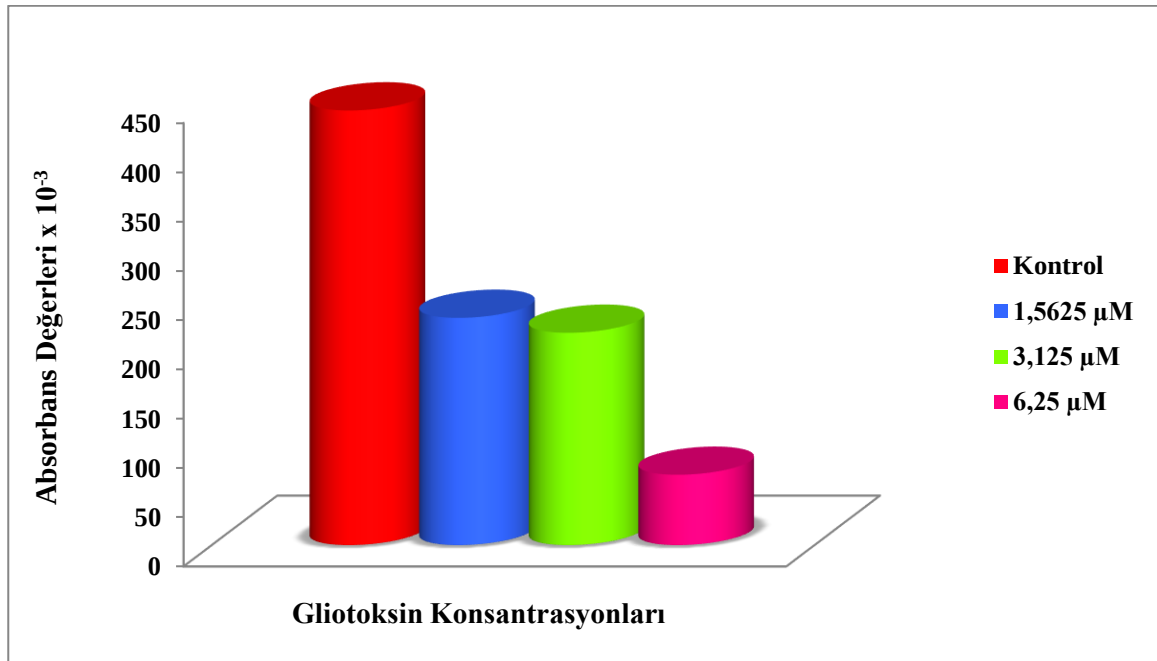
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine Gliotoksin'in uygulanması sonucunda hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla, kültüre edilen hücelere 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda Gliotoksin uygulanmıştır. Her iki hücre hattı için 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin konsantrasyonları kullanılmıştır.



Şekil 4.1: 24 saat süresince 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M Gliotoksin MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

Tablo 4.1: 24 saat süresince 1,5625 μM , 3,125 μM ve 6,25 μM Gliotoksin MCF-7 uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

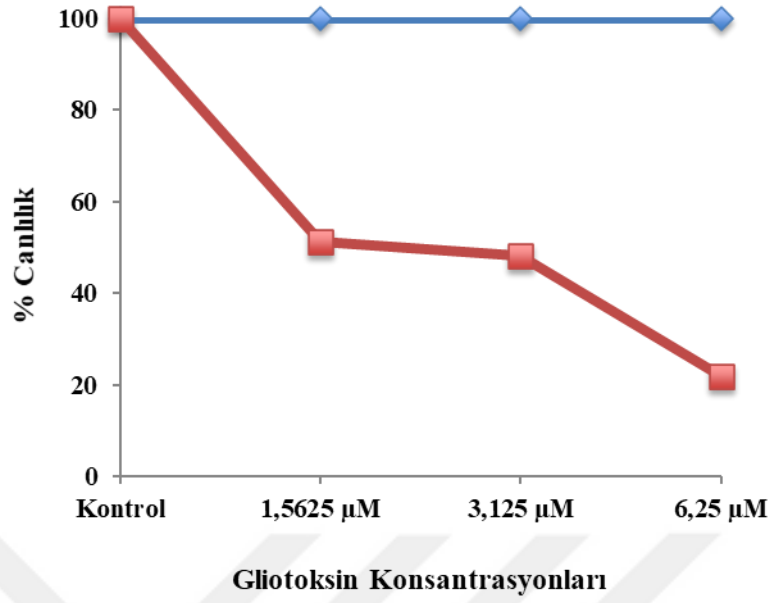
MCF-7 HÜCRELERİ				
Deney Grupları	Kontrol	1,5625 μM	3,125 μM	6,25 μM
Absorbans Değerleri $\times 10^{-3}$ (450-690nm)	410,5	210,8	198,12	89,286



Şekil 4.2: 24 saat süresince 1,5625 μM , 3,125 μM ve 6,25 μM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

Tablo 4.2: 24 saat süresince 1,5625 μM , 3,125 μM ve 6,25 μM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

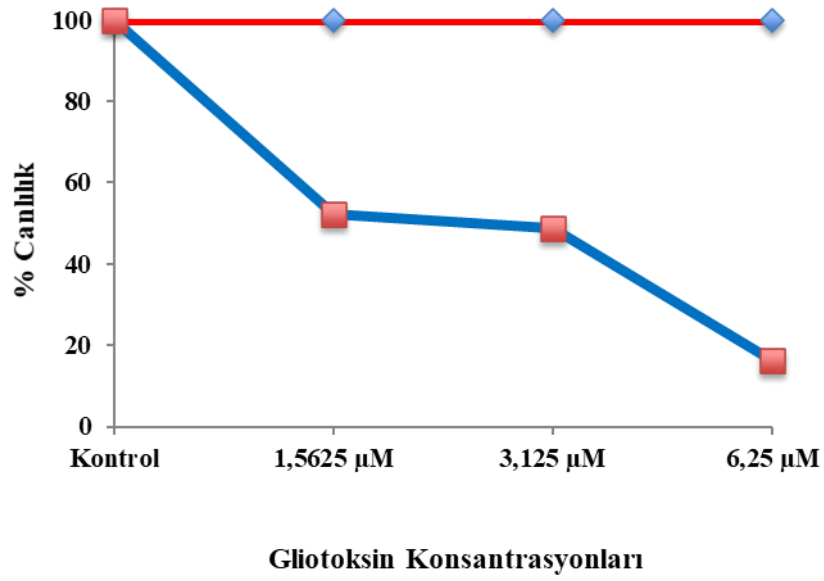
MDA-MB-231 HÜCRELERİ				
Deney Grupları	Kontrol	1,5625 μM	3,125 μM	6,25 μM
Absorbans Değerleri $\times 10^{-3}$	441,25	230,96	215,8	71,5



Şekil 4.3: 24 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

Tablo 4.3: 24 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

MCF-7 HÜCRELERİ				
Deney Grupları	Kontrol	1,5625 µM	3,125 µM	6,25 µM
% Canlılık Değerleri	100	51,35	48,26	21,75



Şekil 4.4: 24 saat süresince 1,5625 μM , 3,125 μM ve 6,25 μM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).

Tablo 4.4: 24 saat süresince 1,5625 μM , 3,125 μM ve 6,25 μM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).

Deney Grupları	MDA-MB-231			
	Kontrol	1,5625 μM	3,125 μM	6,25 μM
% Canlılık Değerleri	100	100	100	100
	100	52,34	48,9	16,2

Bu absorbans değerleri incelendiğinde MCF-7 hücreleri için %100 kabul edilen kontrol grubuna göre; 1,5625 $\mu\text{g/ml}$ Gliotoksin konsantrasyonunun hücrelerinin canlılığını %51,35'e, 3,125 $\mu\text{g/ml}$ ilaç konsantrasyonunun hücre canlılığını %48,26'ya ve 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ilaç konsantrasyonunun ise %21,75'e düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.3; Tablo 4.3).

Bu absorbans değerleri incelendiğinde MDA-MB-231 hücreleri için %100 kabul edilen kontrol grubuna göre; 1,5625 $\mu\text{g/ml}$ Gliotoksin konsantrasyonunun hücrelerinin canlılığını %52,34'e, 3,125 $\mu\text{g/ml}$ ilaç konsantrasyonunun hücre canlılığını %48,9'a ve 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ilaç konsantrasyonunun ise %16,2'ye düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.4; Tablo 4.4).

Elde edilen veriler doğrultusunda her iki hücre soyu için 1,5625 $\mu\text{g/ml}$ 'lik Gliotoksin konsantrasyonunun hücrelerin yarısının ölümüne neden olan IC_{50} dozu olduğu görülmektedir. Elde edilen verilerin kontrole göre istatistiksel açıdan $p<0.01$ seviyesinde anlamlı olduğu belirlenmiştir.

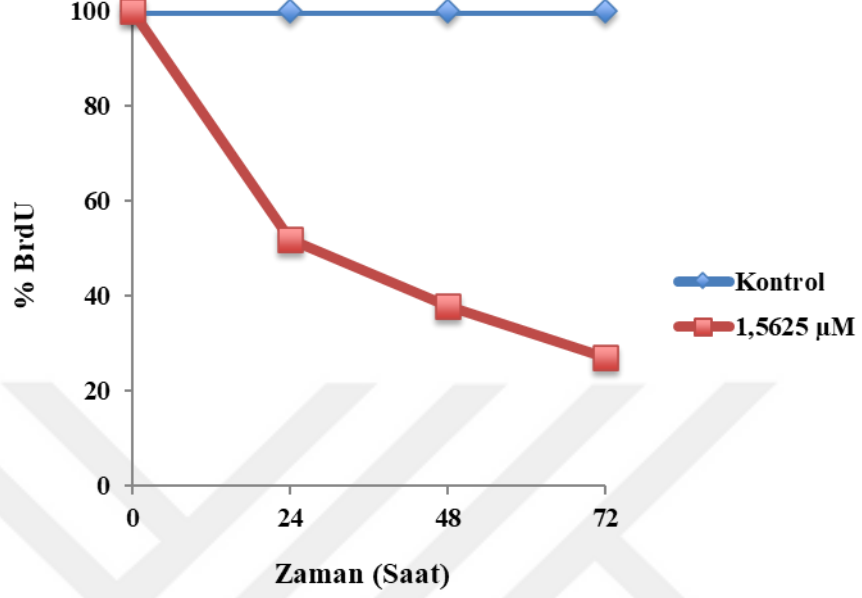
4.2. GLİOTOKSİN'İN MDA-MB-231 VE MCF-7 HÜCRELERİNE ETKİLERİ

4.2.1. %BrdU Değerleri

Hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatları için belirlenmiş olan 1,5625 $\mu\text{g/ml}$ 'lik Gliotoksin konsantrasyonun 0-72 saat süresince uygulanması sonucunda elde edilmiş olan %BrdU değerleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

0-72 sa boyunca 24 saatlik aralıklarla yapılan %BrdU değerlerine her iki hücre tipi için bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol hücreleri ile yapılan karşılaştırmada MCF-7 hücreleri için %BrdU değeri 24 saatte %52, 48 saatte %38 ve 72 saatte %27 olarak belirtilmiştir.

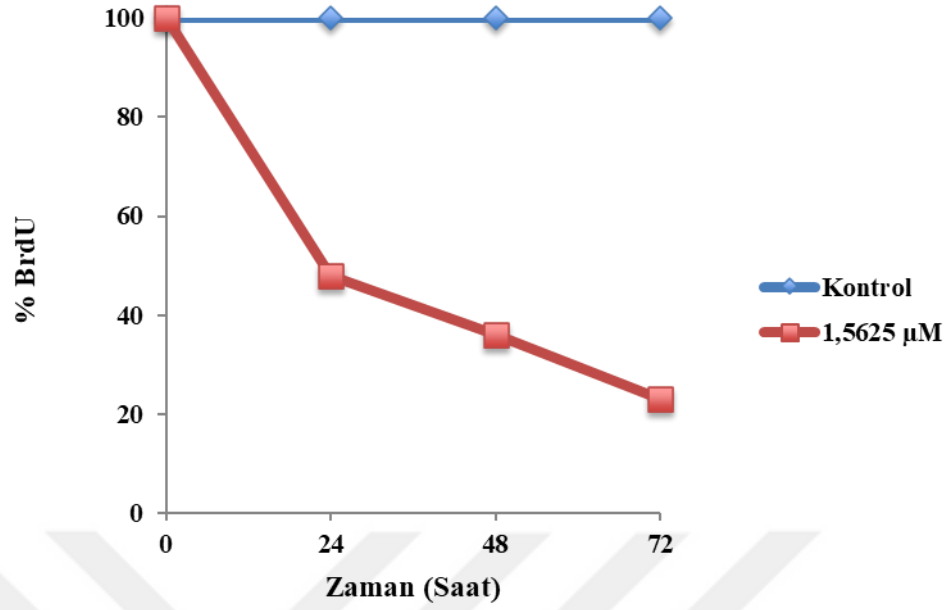
(Şekil 4.5) Kontrol hücreleri ile yapılan karşılaştırmada MDA-MB-231 hücreleri için %BrdU değeri 24 saatte %48, 48 saatte %36 ve 72 saatte %23 olarak belirtilmiştir. (Şekil 4.6)



Şekil 4.5: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MCF-7 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

Tablo 4.5: 72 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % BrdU değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

MCF-7				
	% BrdU			
Zaman (Saat)	0	24	48	72
Kontrol	100	100	100	100
1,5625 µM	100	52	38	27



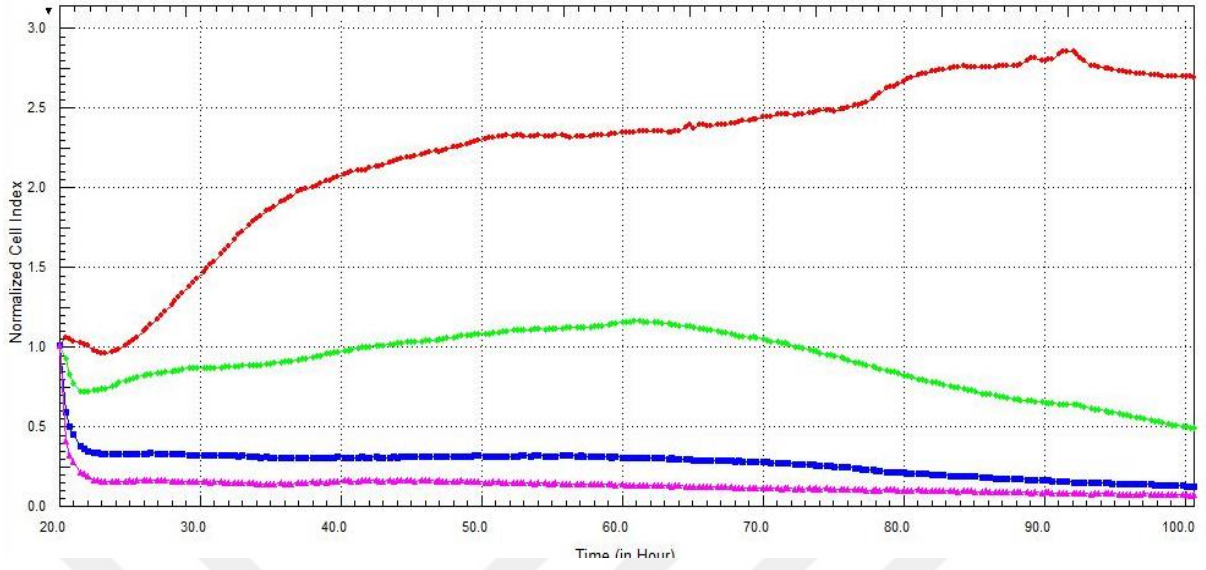
Şekil 4.6: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

Tablo 4.6: 72 saat süresince 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % canlılık değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

MDA-MB-231				
	% BrdU			
Zaman (Saat)	0	24	48	72
Kontrol	100	100	100	100
1,5625 µM	100	48	36	23

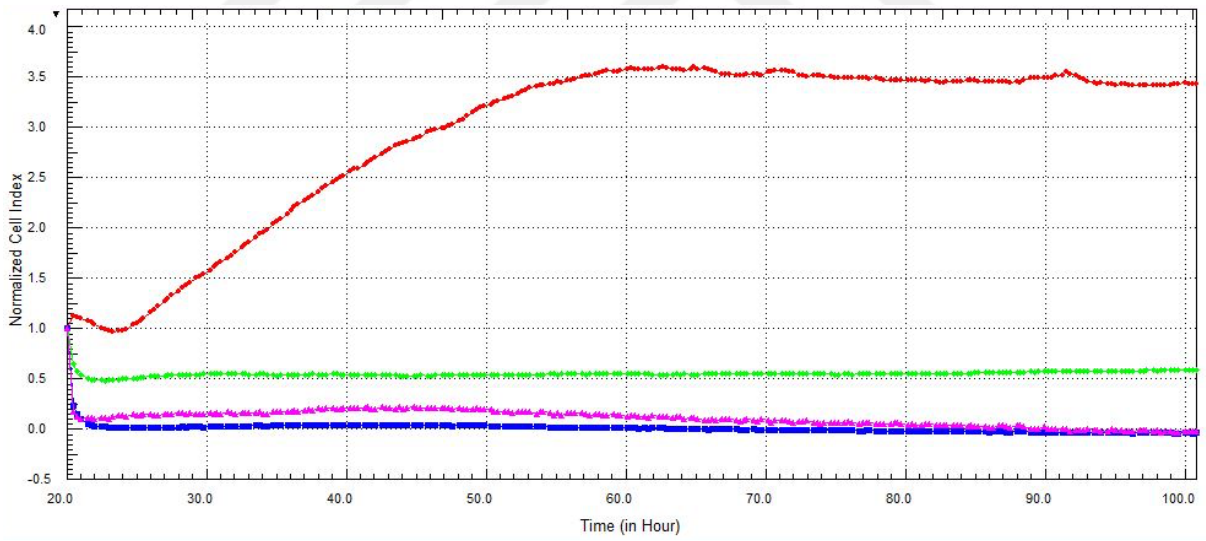
4.3. XCELLIGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE HÜCRE İNDEKSİ

Gliotoksin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına 1,5625 µM, 3,125 µM ve 6,25 µM konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda gerçek zamanlı hücre analiz sisteminden elde edilen hücre indeksi değerleri incelendiğinde; ajanın hücreler üzerinde antiproliferatif etkilerinin olduğu görülmektedir. Hücre indeksi değerlerine ait grafiğin eğrileri, kullanılan standart eğriler ile karşılaştırıldığında, uygulanan tüm Gliotoksin konsantrasyonlarının her iki hücre hattında da DNA'ya hasar verici etki meydana getirdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.7: 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M dozlarında Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği

(--Kontrol, --1,5625 μ M, --3,125 μ M, --6,25 μ M)

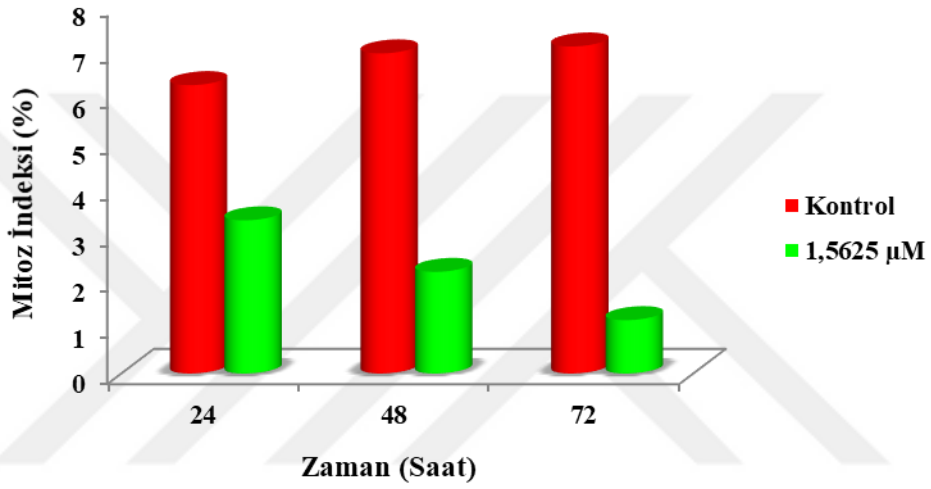


Şekil 4.8: 1,5625 μ M, 3,125 μ M ve 6,25 μ M dozlarında Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği

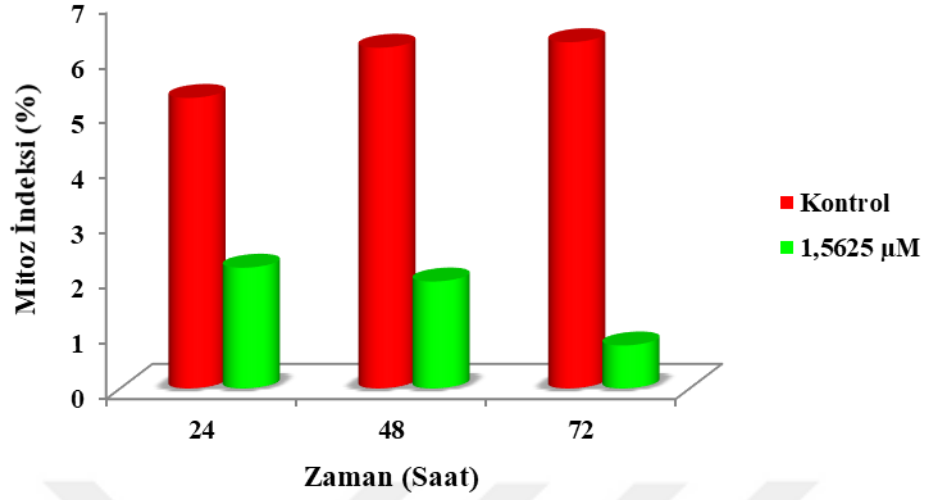
(--Kontrol, --1,5625 μ M, --3,125 μ M, --6,25 μ M)

4.4. MİTOTİK İNDEKS

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine Gliotoksin'in uygulanması sonucunda mitotik indeks değerleri, 0-72 saat süresince kültüre edilen her iki hücre hattına 1,5625 μ M'lık Gliotoksin konsantrasyonu uygulanarak saptanmıştır. Ajan uygulanmayan kontrol grubu ile paralel yürütülen deney serilerinden elde edilen mitotik indeks değerleri belirlenmiştir. Bu değerler Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'da belirtilmiştir.



Şekil 4.9: 0-72 saat süresince 1,5625 μ M uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % Mitoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).



Şekil 4.10: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % Mitoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

Tablo 4.7: 0-72 saat süresince 1,5625 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

MCF-7	
Mitoz İndeks	
Kontrol	1,5625 µM
6,27	3,33
6,96	2,21
7,11	1,16

Tablo 4.8: 0-72 saat süresince 1,5625 µM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait mitotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.01$).

MDA-MB-231		
Zaman (Saat)	Mitoz İndeks	
	Kontrol	1,5625 µM
24	5,27	2,19
48	6,18	1,94
72	6,28	0,78

Şekil 4.9 ve 4.10’da görüldüğü gibi 1,5625 µM’lık Gliotoksin konsantrasyonunda hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatlarına ait mitotik indeks değerleri zamana bağlı olarak 24.

saatten itibaren anlamlı ölçüde düşmüştür. Meydana gelen bu düşüşün her iki hücre soyunda da istatistiksel olarak anlamlılığı $p<0.01$ seviyesinde saptanmıştır.

4.5. APOPTOTİK İNDEKS

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine Gliotoksin'in uygulanması sonucunda hücrelerin apoptotik indeks değerleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla 0-72 saat süresince kültüre edilen her iki hücre hattına da 1,5625 μM konsantrasyonda Gliotoksin uygulanmıştır. Ajan uygulanmayan kontrol grubu ile paralel yürütülen deney serilerinden elde edilen apoptotik indeks değerleri Tablo 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.

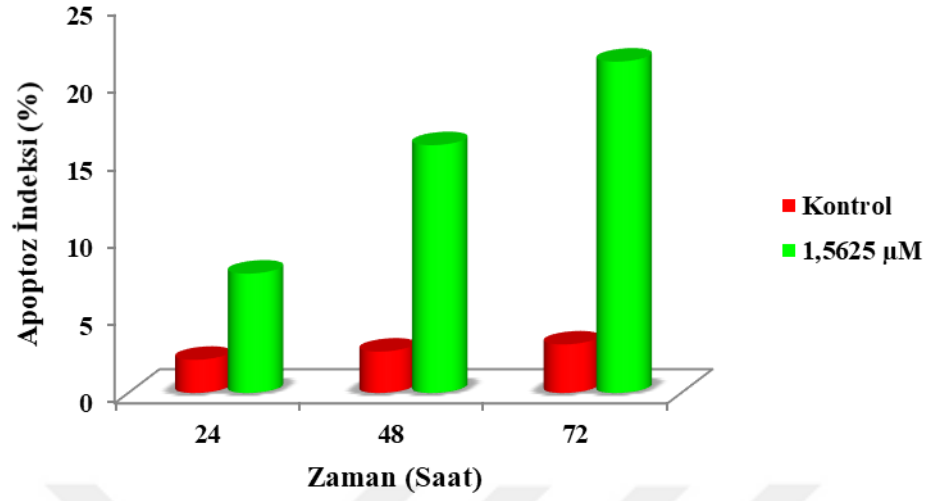
Tablo 4.9: 0-72 saat süresince 1,5625 μM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait apoptotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).

MCF-7		
Zaman	Apoptotik Indeks (%)	
(Saat)	Kontrol	1,5625 μM
24	2,14	7,69
48	2,67	15,96
72	3,13	21,34

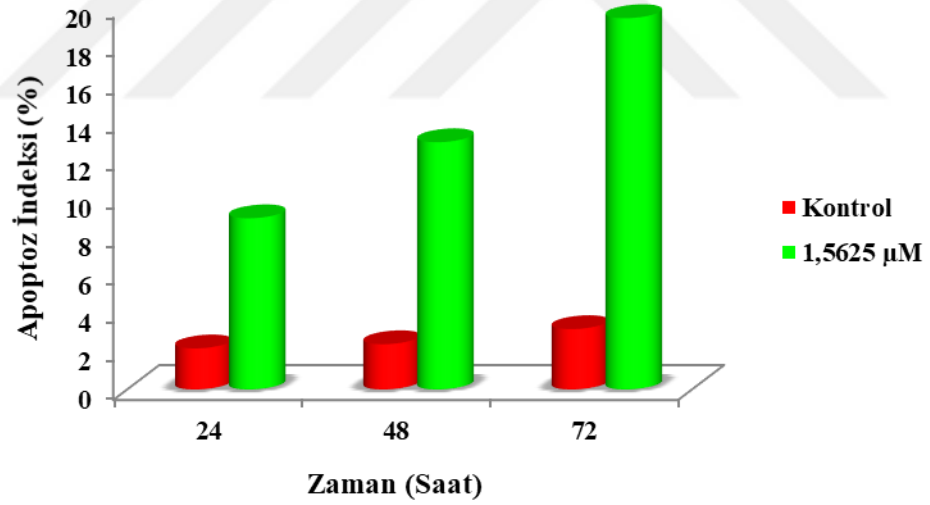
Tablo 4.10: 0-72 saat süresince 1,5625 μM Gliotoksin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait apoptotik indeks değerleri (* Kontrole göre anlamlı $p<0.01$).

MDA-MB-231		
Zaman	Apoptotik Indeks (%)	
(Saat)	Kontrol	1,5625 μM
24	2,15	8,96
48	2,37	12,94
72	3,16	19,43

Şekil 4.11 ve 4.12 incelendiğinde 1,5625 μM Gliotoksin konsantrasyonu uygulanması sonucunda her iki hücre hattına ait apoptotik indeks değerlerinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği görülmektedir. Deneylerden elde edilen veriler incelendiğinde, hücrelerin apoptotik indeks değerlerindeki zamana bağlı artışın kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).



Şekil 4.11: 0-72 saat süresince 1,5625 µM Gliotoksin uygulanan MCF-7 hücrelerine ait % Apoptoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0.01$).



Şekil 4.12: 0-72 saat süresince 1,5625 µM uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait % Apoptoz İndeksi değerleri (570 nm) (* Kontrolle göre anlamlı $p < 0.01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çürümüş organik maddelerde, toprakta ve nemli ortamlarda bulunan *Aspergillus* cinsi mantarlar tüm dünyada yaygın olarak bulunan saprofitik filamentöz mantarlardır (Mandell GL, ve diğ. 2005). Hücre duvarı yapıları incelendiğinde sert bir katman olan yapı, mantar hücresinin biyolojik, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı bütünlüğünün ve şeklinin korunmasında önemli rol oynarlar. Bazı hücre duvar bileşenlerinin immün modülatör veya antijenik etkileri gözlemlenmiştir (Sentandreu, R, ve diğ. 2004). *Aspergillus* türleri toksik olarak kabul edilen ikincil metabolitler üretmektedir. Bunlar; Aflotoksin, gliotoksin, okratoksin A ve fumagilindir. Bu metabolitler arasında en fazla çalışma yapılan gliotoksindir. Bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisi vardır ve akut toksisiteye neden olur (Christin ve diğ. 1998). Bunun yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalarda antimikrobiyal etkisi de dikkat çekmiştir (Johnson ve diğ. 1943; Bruce ve diğ. 1944; Fridrichsons ve diğ. 1967). *In vivo* çalışmalarda gliotoksinin B ve T-Lenfositleri üzerindeki güçlü immunosüpresan etkileri, makrofajlarda, periferik lenfositlerde ve timositlerde apoptoz indüksiyonu; geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite, immün yetmezliği olan aspergilloz ve diğer fırsatçı enfeksiyonların patogeneğinde olası bir etiyolojik rol olduğunu düşündürmektedir (Mullbacher ve Eichner, 1984; Sutton ve diğ., 1994; Sutton ve diğ., 1995; Waring ve diğ., 1988; Waring ve diğ., 1994).

Günümüzde kansere çare bulmak için yapılan çalışmalarda doğal kaynaklı ilaçların geliştirilmesinin önem kazanan stratejiler arasında olduğunu gözlemliyoruz. Deniz kaynaklı canlıların geniş aralıktaki biyolojik çeşitliliği bilim insanlarına yine geniş aralıkta çeşitliliği olan biyoaktif bileşenleri sunmaktadır (Simmons ve diğ., 2005).

Doğal deniz kaynaklı biyoaktif bileşenlerin keşfi ile gliotoksin doğal bir mikotoksin olmakla birlikte immunosuppressive ve antimikrobiyal aktivitesi üzerine yoğunlaşan çalışmalar bulunmaktadır. Wnt sinyal yolu birçok kanserli insan hücresinde istenmeyen bir aktivasyondur (Polakis, 2017; Clevers ve Nusse, 2012).

Gliotoksin ve bazı analoglarının, bir deniz mantarı olan *Neosartorya pseufofischeri*'nin ikincil metabolitlerinin Wnt sinyal yolunun inhibitörleri olarak gördükleri tespit edilmiştir. Buna ek olarak Gliotoksin'in kolorektal kanser hücrelerindeki adenomatöz polipozis koli (APC) inaktive edici mutasyonları, β -katenin düzeylerini veya β -katenin mutasyonlarını aktive ederek regülasyonunu azalttığı bulunmuştur. Ayrıca Gliotoksin'in Wnt sinyal yolunun mutasyonları

ile çoklu kolorektal kanser hücre dizilerinde büyüme inhibisyonuna ve apoptoza neden olduğu gösterilmektedir (Junxiong ve diğ., 2015).

2004 yılında yapılan kanser çalışmalarından birinde, gliotoksinin meme kanseri kültür hücrelerinde protein izoprenilasyonunu ve meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe eden ikili FTI-GGTI olarak aktivitesini ve kanserojen kaynaklı sıçan meme karsinom modelinde anti-tümör etkinliğini ve *in vivo* sınırlı toksisitesinin raporlandığını görmekteyiz (Vigushin ve diğ., 2004).

Kanser tedavisinde süreci olumsuz etkileyen bir engel olarak bilinen edinilmiş ilaç direncine ve tedaviye dirençli kanser hücrelerine karşı çözüm bulma çabaları hala devam etmektedir (Tsvetkova ve Goss., 2012). Doğal kaynak olarak denizde yaşayan canlıların ikincil metabolitlerinden elde edilen ve kansere karşı geliştirilen ajanlar umut verici niteliktedir. Yapılan çalışmada deniz kaynaklı *Aspergillus fumigatus*tan izole edilen ikincil bir metabolit olan Gliotoksin'in, Adriamisin (ADR) dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hatları A549 / ADR'nin büyümesini inhibe edip etmediği incelenmiştir.

Bu tez çalışmamda da doğal olarak denizde yaşayan *Aspergillus fumigatus* canlısından ikincil metabolit olarak elde edilen Gliotoksin'in tedaviye dirençli Luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan ve MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hatları üzerine kanseri inhibe edici etkisi araştırılmış ve umut vaad eden destekleyici sonuçlara erişilmiştir.

Gliotoksin, A549 / ADR hücre canlılığı üzerindeki etkilerini, tedavi edilen A549 / ADR hücrelerinde 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) testi ve apoptoz indüksiyonu ile araştırılmıştır. Floresanla aktive edilen hücre sıralama analizi, Hoechst boyama, annexin V / propidium iyodür boyama, tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1) boyama ve western blotlama yoluyla incelenmiştir. Gliotoksin'in, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak ve p53'ü aktive ettiği, mitokondriya bağlı yol boyunca A549 / ADR hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve böylece p21 ekspresyon seviyelerini artırarak p21, p53'ün yukarı regüle edilmiş apoptoz modülatörü (PUMA), Bax, bölünmüş poli (ADP- riboz) polimeraz (PARP) ve bölünmüş kaspaz-9 üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Daha da önemlisi, Gliotoksin'in A549 / ADR hücreleri üzerinde kombinasyonel etkiler uygulamak için ADR ile birlikte çalıştığı keşfedilmiştir. Sonuç olarak, Gliotoksin'in mitokondriya bağlı

apoptozu indükleyerek ve ADR ile sıralı tedavinin kombine etkileri yoluyla ADR'ye dirençli NSCLC hücreleri üzerinde umut verici etkilere sahip olabileceğini düşündüren sonuçlara ulaşılmaktadır (Hung ve diğ., 2018)

Bu tez çalışmasında; IC50 dozu olarak belirlenen 1,5625 μ M'lık Gliotoksin'in konsantrasyonunu her iki hücre hattı için 24. saatte anlamlı bir düşüş gösterirken, 48. ve 72. saatlerde sifıra yaklaşmıştır. Bu veriler yukarıda bahsedilen diğer çalışmalarda olduğu gibi mitotik katastrof ve mitotik tutuklanma fikrini desteklemektedir.

Başka bir çalışmada Gliotoksin'in hücrelerin canlılığına olan etkisi, *in vitro* olarak ve melanom ksenograft fare modelinde değerlendirilmiştir. NOTCH reseptörleri, farklılaşma oluşan hücreleri ölümsüzleştirerek tümör oluşumunu başlatan onkogenler olarak hareket ettiği saptanmıştır (Espinoza ve Miele, 2013; Andersson ve Lendahl, 2014).

Gliotoksin'in canlı hücrelerde immünoşüpresif olarak aktivite sergilediği saptanmıştır. Timositler, splenositler ve mezenterik lenf nodu hücrelerinde apoptozu indükler ve olgun lenfositlerin kemik iliğini seçici olarak tüketebilir. Gliotoksinin bu etkileri uyguladığı moleküler mekanizma bilinmemektedir (Pahl ve diğ., 1996). Yapmış olduğum tez çalışmamda elde ettiğimiz sonuçlar; Luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan ve MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hatları üzerine Gliotoksin'in benzer etkisini destekleyici yöndedir.

Melanom (518A2), hepatosellüler karsinom (SNU398, HCC-3, Hep3B) ve pankreas karsinomundan (PANC1) türetilen hücre hatları yüksek miktarda nükleer NOTCH2 ifade eder. Bu hücre dizilerinde Gliotoksin'in etkisi değerlendirildiğinde apoptozu indüklerken GSI DAPT etkisiz bıraktığı gösterilmektedir.

İnsan fibrosarkoma hücre (HT 1080) çalışmasında ise deniz fungusu olan *Aspergillus fumigatus*'tan elde edilen Gliotoksin'in proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmektedir (Kim ve Park, 2016). Mevcut çalışmamda elde ettiğimiz sonuçlar da Gliotoksin'in proliferasyonu inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini doğrular niteliktedir.

Biri laboratuvarıda üretilen diğeri ise standart kaynaktan alınan iki farklı örnek olarak Gliotoksin tercih edilmektedir. Bu iki örneğin 25, 50, 100 ve 200 ng/ ml olmak üzere farklı konsantrasyonlarının insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkileri metiltiyazol tetrazolyum

(MTT) biyoessey tekniği ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, saf numunelerde farklı konsantrasyonlarda büyümenin %21, 39.10, 61.99 ve 87.45 ve standart satın alınan numunede ise sırasıyla %17,89; 34,92; 58,34 ve 85,22 oranında önlendiğini göstermiştir. Lenfositlerden DNA ekstraksiyonu yapılmış ve %1'lik agaroz jel üzerinde elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Gliotoksin'in DNA'ya hasar verme ya da bozma yeteneği gibi etkileri gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, insan lenfositlerinin hem büyüme inhibisyonunun hem de DNA hasarının, artan toksin konsantrasyonları ile lineer olarak arttığını gösterilmektedir (Nouri ve diğ., 2015).

Farilsiltransferazın (IC₅₀ 80 uM) ve geraniltgeraniltransferaz I'nin (IC₅₀ 17 uM) inhibisyonu, bu epiditiyodioksopiperazinin potansiyel antitümör aktivitesine ilgiyi uyandırmaktadır. N-metil-N-nitrosourea sıçan meme karsinomu modelini kullanan randomize kontrollü çalışmalarda, gliotoksin, 10 kontrole kıyasla haftada 4 kez 10 mg / kg subkutan enjeksiyon yoluyla 10 hayvana uygulandığında antitümör aktivitesini in vitro ve az sistemik toksisite belirginleştirmiştir. 25 mg / kg'a kadar olan tekli dozlar iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Mevcut çalışmada gliotoksinin, antitümör aktivitesi ve meme kanserine karşı in vitro ve in vivo uygun toksisite profili olan farnesiltransferaz ve geraniltgefiltransferaz I'nin çift bir inhibitörü olduğunu doğrulamaktadır. Gliotoksin, ortalama $\pm$ SD IC₅₀ 289 $\pm$ 328 μ M (38-985 μ M aralığı) ile kültürde altı meme kanseri hücre soyunun proliferasyonunu inhibe ettiği; Lamin B'nin hücre içi farnillenmesi ve Rap1A'nın geraniltgeranilasyonu doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmektedir (Vigushin ve diğ., 2004).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında; Luminal A meme kanseri modeli olarak kullanılan ve MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri modeli olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hatları üzerine Gliotoksin'in etkisi hücre canlılığı, hücre indeksi, mitotik indeks ve apoptotik indeks gibi hücre kinetiği parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler hücre canlılığı, hücre indeksi, mitotik indeks değerlerinde zamana bağlı olarak anlamlı bir düşüşün, apoptotik indeks değerlerinde ise anlamlı ($p < 0.01$) bir yükselişin olduğunu gösterilmektedir. Her iki hücre hattında da benzer sonuçların açığa çıkması, tüm kanser türlerinde etkili olabileceğini gösterebilir.

Elde edilen bu veriler ışığında; Gliotoksin'in farklı meme kanseri hücreleri üzerine uygulanması ile hücre kinetiği parametrelerindeki değişiklikler doğrultusunda, kanser

tedavisine yönelik olumlu katkılarının olacağı ve gelecekte hayvan deneyleri ile yapılacak çalışmalarla desteklenerek, klinik kullanımda başarılı sonuçlar vereceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Anders, C. K., & Carey, L. A., 2009, Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer, *Clinical breast cancer*, 9, S73-S81.
- Andersson, E. R., & Lendahl, U., 2014, Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet?, *Nature reviews Drug discovery*, 13(5), 357-378.
- Arıncı A, Elhan A., 2001, *Anatomi*, 2.cilt.
- Atmaca H., Karaca B., 2011, *Meme Kanserinde Genetik ve Moleküler Prediktif Faktörler*, Meme Kanserinde Moleküler ve Genetik Yaklaşım, In: Haydaroğlu A, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 251-312.
- Bacquin, A., Pouvelle, C., Siaud, N., Perderiset, M., Salome-Desnoulez, S., Tellier-Lebegue, C., ... & Kannouche, P. L., 2013, The helicase FBH1 is tightly regulated by PCNA via CRL4 (Cdt2)-mediated proteolysis in human cells, *Nucleic acids research*, 41(13), 6501-6513.
- Beiki, O., Hall, P., Ekbom, A., & Moradi, T., 2012, Breast cancer incidence and case fatality among 4.7 million women in relation to social and ethnic background: a population-based cohort study, *Breast Cancer Research*, 14(1), R5.
- Berry, D. A., Cronin, K. A., Plevritis, S. K., Fryback, D. G., Clarke, L., Zelen, M., ... & Feuer, E. J., 2005, Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 353(17), 1784-1792.
- Besche, H. C., Sha, Z., Kukushkin, N. V., Peth, A., Hock, E. M., Kim, W., ... & Goldberg, A. L., 2014, Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates, *The EMBO journal*, 33(10), 1159-1176.
- Bland KI. Beenken SW, Copeland 3 EM. 2005, *Schwartz's Principles of Surgery*, eight edition, McGraw-Hill Companies, p. 453 – 493.

- Brenton, J.D., Carey, L.A., Ahmed, A. A., Caldas, C., 2005, Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application, *Journal of Clinical Oncology*, 23 (29), 7350-7360.
- Bruce, W. F., Dutcher, J. D., Johnson, J. R., & Miller, L. L., 1944, Gliotoxin, the Antibiotic Principle of *Gliocladium fimbriatum*. II. General Chemical Behavior and Crystalline Derivatives¹, *Journal of the American Chemical Society*, 66(4), 614-616.
- Burge, C. N., Chang, H. R., & Apple, S. K., 2006, Do the histologic features and results of breast cancer biomarker studies differ between core biopsy and surgical excision specimens?, *The Breast*, 15(2), 167-172.
- Carey, L.A., 2010, Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000–2010, *Clinical Breast Cancer*, 10 (3), 188-195.
- Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., Millikan, R.C., 2006, Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study, *JAMA*, 295(21), 2492-2502.
- Cetin, I., Topcul, M., 2014, Triple negative breast cancer, *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (6), 2427-2431.
- Chen, J., Wang, C., Lan, W., Huang, C., Lin, M., Wang, Z., ... & Liu, H., 2015, Gliotoxin inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells, *Marine drugs*, 13(10), 6259-6273.
- Chen, J., Wang, C., Lan, W., Huang, C., Lin, M., Wang, Z., ... & Liu, H., 2015, Gliotoxin inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells, *Marine drugs*, 13(10), 6259-6273.
- Chen, V. E., Gillespie, E. F., Zakeri, K., Murphy, J. D., Yashar, C. M., Lu, S., & Einck, J. P. 2017. Pathologic response after neoadjuvant chemotherapy predicts locoregional control in patients with triple negative breast cancer. *Advances in radiation oncology*, 2(2), 105-109.

- Christin, L., Wysong, D. R., Meshulam, T., Hastey, R., Simons, E. R., & Diamond, R. D., 1998, Human platelets damage *Aspergillus fumigatus* hyphae and may supplement killing by neutrophils, *Infection and immunity*, 66(3), 1181-1189.
- Claus, E. B., Risch, N., & Thompson, W. D., 1991, Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study, *American journal of human genetics*, 48(2), 232.
- Clevers, H., & Nusse, R., 2012, Wnt/ β -catenin signaling and disease, *Cell*, 149(6), 1192-1205.
- Concolino A, Olivo E, Tammè L, Fiumara CV, De Angelis MT, Quaresima B, Agosti V, Costanzo FS, Cuda G, Scumaci D., 2018, Proteomics Analysis to Assess the Role of Mitochondria in BRCA1-Mediated Breast Tumorigenesis, *Proteomes*, 6(2), 16.
- Crawford, L. J., Walker, B., & Irvine, A. E., 2011, Proteasome inhibitors in cancer therapy, *Journal of cell communication and signaling*, 5(2), 101-110.
- Çakır S, Kafadar MT, Arslan ŞN, Türkan A, Kara B, İnan A., 2016, Meme kanseri tanısı konmuş kadınlarda risk faktörlerinin güncel veriler ışığında gözden geçirilmesi, *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 2(3), 186-194.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... & Narod, S. A. , 2007, Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence, *Clinical cancer research*, 13(15), 4429-4434.
- Diniz, G., Irkkan, Ç., Kelten, C., & Özekinci, S., 2015, HER2 değerlendirmesindeki ipucu ve tuzaklar.
- Drexler, H. C., 1997, Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 855-860.
- Duffy MJ, Synnott NC, Crown J., 2018, Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker, *Breast cancer research and treatment*, 1-7.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group., 2005, Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 365(9472), 1687-1717.

- Egozi, D., Shapira, M., Paor, G., Ben-Izhak, O., Skorecki, K., & Hershko, D. D., 2007, Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells, *The FASEB Journal*, 21(11), 2807-2817.
- Elledge, S.J.; Harper, J.W. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1377, M61.
- Erhan Y., 2014, Meme Kanseri. Tuzlalı S., Güllüoğlu M., Çevikbaş U. (Çeviri Ed), Robbins, *Temel Patoloji*, 9th ed. 723-739, Nobel Kitabevleri, İstanbul.
- Espinoza, I., & Miele, L. ,2013, Notch inhibitors for cancer treatment, *Pharmacology & therapeutics*, 139(2), 95-110.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... & Hamadeh, R. R. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA oncology*, 1(4), 505-527.
- Fridrichsons, J., & McL Mathieson, A., 1967, The crystal structure of gliotoxin, *Acta crystallographica*, 23(3), 439-448.
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R., 2001, Cancer and genomics, *Nature*, 409(6822), 850-852.
- Gabos, Z., Sinha, R., Hanson, J., Chauhan, N., Hugh, J., Mackey, J. R., & Abdulkarim, B., 2006, Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 24(36), 5658-5663.
- Gardiner, D. M., Waring, P., & Howlett, B. J., 2005, The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis, *Microbiology*, 151(4), 1021-1032.
- Geyer, F.C., Reis-Filho, J.S., 2009, Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet, *International Journal of Surgical Pathology*, 17 (4), 285-302.

- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Simopoulos, C., Polychronidis, A., Gatter, K. C., Harris, A. L., & Sivridis, E., 2004, c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1 α dependent, *Clinical cancer research*, 10(23), 7972-7977.
- Gonzalez-Angulo, A.M., Morales-Vasquez, F., Hortobagyi, G.N., 2007, Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer, *Adv Exp Med Biol*, 608, 1-22.
- Gora, K. G., Cantin, A., Wohlever, M., Joshi, K. K., Perchuk, B. S., Chien, P., & Laub, M. T., 2013, Regulated proteolysis of a transcription factor complex is critical to cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*, *Molecular microbiology*, 87(6), 1277-1289.
- Gökbulut AA, Kartal M, Baran Y, 2011, *Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi*, Meme Kanserinde Moleküler ve Genetik Yaklaşım, In: Haydaroğlu A., Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 193-247.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., ... & Finley, D., 2000, A gated channel into the proteasome core particle, *Nature structural biology*, 7(11), 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., & Huber, R., 1997, Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature*, 386(6624), 463-471.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jäger, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H., & Huber, R., 1999, The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 10976-10983.
- Groll, M., Kim, K. B., Kairies, N., Huber, R., & Crews, C. M., 2000, Crystal structure of epoxomicin: 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of α ' , β ' -epoxyketone proteasome inhibitors, *Journal of the American Chemical Society*, 122(6), 1237-1238.
- Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessey BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner R, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, ReisFilho JS., 2012, Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement, *Annals of Oncology*, 23(12), 2997-3006.

- Guiu, S., Michiels, S., Andre, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., ... & Van de Vijver, M., 2012, Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement, *Annals of Oncology*, 23(12), 2997-3006.
- Gutierrez, C., & Schiff, R., 2011, HER2: biology, detection, and clinical implications, *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(1), 55-62.
- Haagensen, C.D., 1986, *Diseases of the Breast*, Saunders Co, London.
- Hartmann, P.E., 1991, *Scientific Foundations of Obstetrics and Gynaecology*, Butterworth Heinemann, Oxford.
- Hebert, J. R., 2009, Epidemiology: identifying cancer's causes. In 'The biology and treatment of cancer', Eds. Pardee AB, Stein GS.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., & Wolf, D. H., 1997, The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing, *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 25200-25209.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M.G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., Dreher, D., Palazzo, J.P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J.F., Ellis, M.J., Olopade, O.I., Bernard, P.S., Perou, C.M., 2006, The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms, *BMC Genomics*, 7 (1), 96.
- Hubmann, R., Hilgarth, M., Schnabl, S., Ponath, E., Reiter, M., Demirtas, D., ... & Shehata, M., 2013, Gliotoxin is a potent NOTCH 2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells, *British journal of haematology*, 160(5), 618-629.
- Hubmann, R., Sieghart, W., Schnabl, S., Araghi, M., Hilgarth, M., Reiter, M., ... & Shehata, M., 2017, Gliotoxin targets nuclear NOTCH2 in human solid tumor derived cell lines in vitro and inhibits melanoma growth in xenograft mouse model, *Frontiers in pharmacology*, 8, 319.

- Hubmann, R., Sieghart, W., Schnabl, S., Araghi, M., Hilgarth, M., Reiter, M., ... & Shehata, M., 2017, Gliotoxin targets nuclear NOTCH2 in human solid tumor derived cell lines in vitro and inhibits melanoma growth in xenograft mouse model, *Frontiers in pharmacology*, 8, 319.
- Hung, M., Van, L., Song, Y. W., & Cho, S. K., 2018, Effects of the combination of gliotoxin and adriamycin on the adriamycin-resistant non-small-cell lung cancer A549 cell line, *Marine drugs*, 16(4), 105.
- Imajohohmi, S., Kawaguchi, T., Sugiyama, S., Tanaka, K., Omura, S., & Kikuchi, H., 1995, Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 217(3), 1070-1077.
- İlvan Ş., 2006, Meme Karsinomu Patolojisi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No:54, 65-71.
- Jasinski-Bergner, S., Mandelboim, O., & Seliger, B., 2014, The role of microRNAs in the control of innate immune response in cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 106(10), dju257.
- Johnson, J. R., Bruce, W. F., & Dutcher, J. D., 1943, Gliotoxin, The Antibiotic Principle of *Gliocladium fimbriatum*. I. Production, Physical and Biological Properties1, *Journal of the American Chemical Society*, 65(10), 2005-2009.
- Kamangar, F., Dores, G. M., & Anderson, W. F. 2006, Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the World, *Journal of clinical oncology*, 24(14), 2137-2150.
- Kamel HFM, Al-Amodi HSAB., 2017, Exploitation of gene expression and cancer biomarkers in paving the path to era of personalized medicine, *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(4), 220-235.
- Karunagaran, D., Tzahar, E., Beerli, R. R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B. J., ... & Yarden, Y., 1996, ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer, *The EMBO journal*, 15(2), 254-264.

- Keil, J. M., Shen, Z., Briggs, S. P., & Patrick, G. N., 2010, Regulation of STIM1 and SOCE by the ubiquitin-proteasome system (UPS), *PLoS One*, 5(10).
- Kesse-Adu, R., & Shousha, S., 2004, Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma, *Modern pathology*, 17(6), 646-652.
- Kim, Y. S., & Park, S. J., 2016, Gliotoxin from the marine fungus *Aspergillus fumigatus* induces apoptosis in HT1080 fibrosarcoma cells by downregulating NF- κ B, *Fisheries and aquatic sciences*, 19(1), 35.
- King, C. R., Kraus, M. H., & Aaronson, S. A., 1985, Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma, *Science*, 229(4717), 974-976.
- Klapper, L. N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N. E., Andrews, G. C., Sela, M., & Yarden, Y., 1999, The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 4995-5000.
- Koçak S, Çelik L, Özbaş S, Sak SD, Tükün A, Yalçın B., 2011, Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu, *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 7(2).
- Kroll, M., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., Thomas, D., Friguet, B., & Conconi, M., 1999, The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome, *Chemistry & biology*, 6(10), 689-698.
- Le Du, F., Ueno, N.T., 2015, Targeted therapies in triple-negative breast cancer: failure and future, *Womens Health*, 11(1), 1–5.
- Leong, A.Y., Zhuang, Z., 2011, The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment, *Pathobiology*, 78 (2), 99-114.
- López-Franco, O., Suzuki, Y., Sanjuán, G., Blanco, J., Hernández-Vargas, P., Yo, Y., ... & Gómez-Guerrero, C., 2002, Nuclear factor- κ B inhibitors as potential novel anti-

inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis, *The American journal of pathology*, 161(4), 1497-1505.

Lui, T. T., Lacroix, C., Ahmed, S. M., Goldenberg, S. J., Leach, C. A., Daulat, A. M., & Angers, S., 2011, The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/ β -catenin signaling, *Molecular and cellular biology*, 31(10), 2053-2065.

Lukong, K. E., 2017, Understanding breast cancer–The long and winding road, *BBA clinical*, 7, 64-77.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), 2005, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2958-2973.

Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Muñoz-Capó, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J.C., Lopez, B., Marcus, T.F., Fueyo, L., Suquia, A.G., Gines, J., Rubio, F., Ramos, R., Besalduch, J., 2014, xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies, *Onco Targets Ther*, 7, 985-994.

Masoumi, K. C., Shaw-Hallgren, G., & Massoumi, R., 2011, Tumor suppressor function of CYLD in nonmelanoma skin cancer, *Journal of skin cancer*, 2011.

McCormick, F., 1999, Signalling networks that cause cancer. *Trends in Genetics*, 15(12), M53-M56.

McDougall, J. K., 1969, Antiviral action of gliotoxin. *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, 27(2/4), 255-67.

Mendes, D., Alves, C., Afonso, N., Cardoso, F., Passos-Coelho, J. L., Costa, L., ... & Batel-Marques, F., 2015, The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer—a systematic review, *Breast Cancer Research*, 17(1), 140.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., ... & Bell, R., 1994, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 66-71.

- Moasser, M. M., 2007, The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis, *Oncogene*, 26(45), 6469-6487.
- Moffat, D.F., Going, J.J., 1996, Three dimensional anatomy of complete duct systems in human breast: pathological and developmental implications, *Journal of Clinical Pathology*, 49 (1), 48-52.
- Moore KL, 1992, *Clinically Oriented Anatomy*, 3rd Edition, Baltimore, Williams & Wilkins.
- Murata, S., Yashiroda, H., & Tanaka, K., 2009, Molecular mechanisms of proteasome assembly, *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(2), 104-115.
- Müllbacher, A., & Eichner, R. D., 1984, Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(12), 3835-3837.
- Narod SA, Salmena L., 2011, BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer, *Discovery medicine*, 12(66), 445-453.
- Navon, A., & Goldberg, A. L., 2001, Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome, *Molecular cell*, 8(6), 1339-1349.
- Newman, B., Austin, M. A., Lee, M., & King, M. C., 1988, Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), 3044-3048.
- Nguyen, V. T., Lee, J. S., Qian, Z. J., Li, Y. X., Kim, K. N., Heo, S. J., ... & Jung, W. K., 2014, Gliotoxin isolated from marine fungus *Aspergillus* sp. induces apoptosis of human cervical cancer and chondrosarcoma cells, *Marine drugs*, 12(1), 69-87.
- Nouri, M. A., Al-Halbosiy, M. M., Dheeb, B. I., & Hashim, A. J., 2015, Cytotoxicity and genotoxicity of gliotoxin on human lymphocytes in vitro, *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 193-197.
- Orlowski, R. Z., Eswara, J. R., Lafond-Walker, A., Grever, M. R., Orlowski, M., & Dang, C. V., 1998, Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor, *Cancer research*, 58(19), 4342-4348.

- Overgaard, M., Jensen, M. B., Overgaard, J., Hansen, P. S., Rose, C., Andersson, M., ... & Blichert-Toft, M., 1999, Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial, *The Lancet*, 353(9165), 1641-1648.
- Pahl, H. L., Krauss, B., Schulze-Osthoff, K., Decker, T., Traenckner, E. B. M., Vogt, M., ... & Czernilofsky, A. P., 1996, The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB, *The Journal of experimental medicine*, 183(4), 1829-1840.
- Pahl, H.L.; Krauss, B.; Schulze-Osthoff, K.; Decker, T.; Traenckner, E.B.; Vogt, M.; Myers, C.; Parks, T.; Warring, P.; Muhlbacher, A.; Czernilofsky, A.P.; Baeuerle, P.A. J. Exp. Med., 1996, 183, 1829.
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., ... & Quackenbush, J. F., 2009, Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes, *Journal of clinical oncology*, 27(8), 1160.
- Parker, J.S., Prat, A., Cheang, M.C.U., Lenburg, M.E., Paik, S., Perou, C., 2009, Breast cancer molecular subtypes predict response to anthracycline/taxane-based chemotherapy, *Cancer Res*, 69, 598s
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., & Michalopoulos, I., 2015, Human cancer databases, *Oncology reports*, 33(1), 3-18.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Fluge, Ø., 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406(6797), 747-752.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein D., 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406 (6797), 747-752.
- Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., & Kerbel, R. S., 1997, Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor

cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors, *The American journal of pathology*, 151(6), 1523.

Peto, R., Boreham, J., Clarke, M., Davies, C., & Beral, V., 2000, UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years., *Lancet*, 355(9217), 1822.

Polakis, P., 2007, The many ways of Wnt in cancer, *Current opinion in genetics & development*, 17(1), 45-51.

Putti, T. C., El-Rehim, D. M. A., Rakha, E. A., Paish, C. E., Lee, A. H., Pinder, S. E., & Ellis, I. O., 2005, Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis, *Modern Pathology*, 18(1), 26-35.

Qiu, J., Xue, X., Hu, C., Xu, H., Kou, D., Li, R., & Li, M., 2016, Comparison of clinicopathological features and prognosis in triple-negative and non-triple negative breast cancer, *Journal of cancer*, 7(2), 167.

Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Ellis, I.O., 2008, Basal-like breast cancer: a critical review, *Journal of Clinical Oncology*, 26 (15), 2568-2581.

Reilly, H. C., Schatz, A., & Waksman, S. A., 1945, Antifungal properties of antibiotic substances, *Journal of bacteriology*, 49(6), 585.

Reis-Filho, J. S., Weigelt, B., Fumagalli, D., & Sotiriou, C., 2010, Molecular profiling: moving away from tumor philately, *Science translational medicine*, 2(47), 47ps43-47ps43.

Ross, J. S., Fletcher, J. A., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., ... & Bloom, K. J., 2003, The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy, *The oncologist*, 8(4), 307-325.

Ross, M.H., Reith, E.J., Romrell, L.J., 1989, *Histology. A Text and Atlas*, Williams and Wilkins, Baltimore.

Russo J, Russo, I.H., 1987, Development of the human mammary gland, *The Mammary Gland*, 67-93.

Russo, J., Russo, I.H., 1998, Development of the human breast, *Maturitas*, 49 (1), 2-15.

Sabiston D., 1977, *Temel Cerrahi*, Cilt:2, Güven Kitabevi,

Sá-Moura, B., Funakoshi, M., Tomko, R. J., Dohmen, R. J., Wu, Z., Peng, J., & Hochstrasser, M. (2013). A conserved protein with AN1 zinc finger and ubiquitin-like domains modulates Cdc48 (p97) function in the ubiquitin-proteasome pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33682-33696.

Sen, N., & Snyder, S. H., 2011, Neurotrophin-mediated degradation of histone methyltransferase by S-nitrosylation cascade regulates neuronal differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20178-20183.

Sengodan SK, Sreelatha KH, Nadhan R, Srinivas P., 2018, Regulation of epithelial to mesenchymal transition by BRCA1 in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 123, 74-82.

Sentandreu, R, Elorza MV, Valentin E, Ruiz-Herrera J., 2004, *The structure and composition of the fungal cell wall*, Pathogenic Fungi, Structural Biology and Taxonomy, In: San-Blas G, Calderone RA (eds), Caister Academic Press, Norfolk, 3-39

Shinohara, K., Tomioka, M., Nakano, H., Toné, S., Ito, H., & KAWASHIMA, S., 1996, Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition, *Biochemical Journal*, 317(2), 385-388.

Shrestha, R. K., Ronau, J. A., Davies, C. W., Guenette, R. G., Strieter, E. R., Paul, L. N., & Das, C., 2014, Insights into the mechanism of deubiquitination by JAMM deubiquitinases from cocrystal structures of the enzyme with the substrate and product, *Biochemistry*, 53(19), 3199-3217.

Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. H., 2005, Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333-342.

Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. H., 2005, Marine natural products as anticancer drugs, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333-342.

- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., ... & Thorsen, T., 2001, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10869-10874.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P., Borresen-Dale, A.L., 2001, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (19), 10869-10874.
- Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., ... & Demeter, J., 2003, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(14), 8418-8423.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L., Botstein, D., 2003, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (14), 8418-8423.
- Sotiriou, C., Pusztai, L., 2009, Gene-expression signatures in breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 360 (8), 790-800.
- Sutton, P., Beaver, J., & Waring, P., 1995, Evidence that gliotoxin enhances lymphocyte activation and induces apoptosis by effects on cyclic AMP levels, *Biochemical pharmacology*, 50(12), 2009-2014.
- Sutton, P., Newcombe, N. R., Waring, P., & Müllbacher, A., 1994. In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi, *Infection and immunity*, 62(4), 1192-1198.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015, (Ed. İlter, H., Keskinçilic, B.).
- Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., ... & Belanger, C., 1996, The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature genetics*, 12(3), 333-337.

- Telang, N. T., Li, G., Katdare, M., Sepkovic, D. W., Bradlow, H. L., & Wong, G. Y., 2017, The nutritional herb *Epimedium grandiflorum* inhibits the growth in a model for the Luminal A molecular subtype of breast cancer, *Oncology letters*, 13(4), 2477-2482.
- Topçul M.R., Çetin İ., 2015, Breast Cancer, Cancer: Disease of the age, In: El-Sharkawy, A.M. (ed), Chapter 19, OMICS Group eBooks, Foster City, 20 pages.
- Topçul, M.R., Çetin, İ., 2015, Effects of metformin on cell kinetic parameters of MCF-7 breast cancer cells *in vitro*, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 2351-2354.
- Topuz, E., Aydinler, A., & Dinçer, M., 2003, Meme Kanseri İstanbul. *Nobel Tıp Kitabevi*, 1-12.
- Topuz, E., Aydinler, A., Dinçer, M., 2003, *Meme Kanseri*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 975-420-269-9.
- Tsai, M. J., & O'Malley, B. W., 1994, Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members, *Annual review of biochemistry*, 63(1), 451-486.
- Tsutsui, S., Ohno, S., Murakami, S., Kataoka, A., Kinoshita, J., & Hachitanda, Y., 2003, Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer, *The American journal of surgery*, 185(2), 165-167.
- Uslu B, Biltekin B, Denir S, et al. Effects of different forms of chitosan on intercellular junctions of mouse fibroblasts in vitro. *Biotech Histochem*. 2016;91(1):20-29. doi:10.3109/10520295.2015.1064998
- Vigushin, D. M., Mirsaidi, N., Brooke, G., Sun, C., Pace, P., Inman, L., ... & Coombes, R. C., 2004, Gliotoxin is a dual inhibitor of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I with antitumor activity against breast cancer in vivo, *Medical oncology*, 21(1), 21-30.
- Vigushin, D. M., Mirsaidi, N., Brooke, G., Sun, C., Pace, P., Inman, L., ... & Coombes, R. C., 2004, Gliotoxin is a dual inhibitor of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I with antitumor activity against breast cancer in vivo, *Medical oncology*, 21(1), 21-30.
- Waring, P., Eichner, R. D., & Müllbacher, A., 1988, The chemistry and biology of the immunomodulating agent gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines, *Medicinal research reviews*, 8(4), 499-524.

- Waring, P.; Eichner, R.D.; Mullbacher, A.; Sjaarda, A. J. Biol. Chem., 1988, 263, 18493.
- Wesolowski, R., & Ramaswamy, B., 2011, Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management, *Gene Expression The Journal of Liver Research*, 15(3), 105-115.
- Williams GM., 2001, Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment, *Toxicology*, 14:166 (1- 2):3-10.
- Williams, G. M., 1979, Review of in vitro test systems using DNA damage and repair for screening of chemical carcinogens, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(4), 857-863.
- Williams, G. M., 1985, Genotoxic and epigenetic carcinogens, *Safety Evaluation and Regulation of Chemicals*, 2, 251-256.
- Williams, G. M., 1987, Definition of a human cancer hazard. In *Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis* (Vol. 25, pp. 367-380). Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Williams, G. M., 1987, DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*, 1, 113-27.
- Williams, G. M., 1992, DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 44(8), 457-463.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., ... & Barfoot, R., 1995, Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378(6559), 789-792.
- Wu, K., Kovacev, J., & Pan, Z. Q., 2010, Priming and extending: a UbcH5/Cdc34 E2 handoff mechanism for polyubiquitination on a SCF substrate, *Molecular cell*, 37(6), 784-796.
- Xu, H., Yu, S., Liu, Q., Yuan, X., Mani, S., et al., 2017, Recent advances of highly selective CDK4/6 inhibitors in breast cancer, *Journal of Hematology & Oncology*, 10 (97), 1-12.

- Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, Izumi Y, Nozaki Y, Nomizu T, Kakugawa Y, Ishida T, Ohuchi N, Ishioka C, Kato S., 2018, Molecular and clinical features of the TP53 signature gene expression profile in early-stage breast cancer, *Oncotarget*, 9(18), 14193
- Yang, Q., Ou, C., Liu, M., Xiao, W., Wen, C., & Sun, F., 2014, NRAGE promotes cell proliferation by stabilizing PCNA in a ubiquitin–proteasome pathway in esophageal carcinomas, *Carcinogenesis*, 35(7), 1643-1651.
- Yao, H., He, G., Yan, S., Chen, C., Song, L., Rosol, T. J., & Deng, X., 2017, Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon?, *Oncotarget*, 8(1), 1913.
- Zeichner, S. B., Terawaki, H., & Gogineni, K., 2016, A review of systemic treatment in metastatic triple-negative breast cancer, *Breast cancer: basic and clinical research*, 10, BCBCR-S32783.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Göksu Akkūlah Şenol
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	18.08.1986
Uyruđu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	+90 555 292 47 68
E-Posta Adresi	goksusenol@gmail.com
Web Adresi	www.goksusenol.com

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Fatih Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat
Bölümü	Biyoloji(İngilizce)
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Biyoloji

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	