

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE
ELİMUSERTİB ATR İNHİBİTÖRÜNÜN
ANTİ-KANSER ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayten HACİEFENDİ

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER

TEMMUZ-2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE
ELİMUSERTİB ATR İNHİBİTÖRÜNÜN
ANTİ-KANSER ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayten HACİEFENDİ

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji

“Bu tez 18/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Oybirliği ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ	KANAATİ	İMZA

BEYAN

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

18/07/2022

İmza

Ayten HACIEFENDİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yol gösterici, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER başta olmak üzere, eğitimime katkı sağlayan bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD’da görev alan değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini daima hissettiren, sevgilerini, sabırlarını ve yardımlarını üzerimden eksik etmeyen, başta sevgili annem Necmiye HACİEFENDİ ve babam Ziya HACİEFENDİ olmak üzere kardeşlerime ve eşlerime, yeğenlerime teşekkür ederim. Ayrıca tezimin yapım aşamasında bilgisi ve tecrübeleriyle, tavsiye ve yönlendirmelerinden dolayı Ersin ESKİLER’e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. [Proje Numarası:2022-7-24-28].

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
KISALTMA VE SİMGELER.....	V
ŞEKİLLER	VII
TABLolar	X
ÖZET.....	XI
SUMMARY	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MEME KANSERİ	3
2.1.1. Triple Negative Meme Kanseri (TNMK)	5
2.1.1.1. Klinik Özellikleri	6
2.1.1.2 TNMK potansiyel risk faktörleri	6
2.1.1.3 TNMK'nın Moleküler Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	7
2.2. TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	10
2.3. TNMK TEDAVİSİNDE HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ STRATEJİLERİ.....	11
2.3.1 PARP inhibitörleri	11
2.3.2 PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri	12
2.3.3. Antikor-ilaç konjugatları.....	13
2.3.4 AR antagonistleri	13
2.3.5 İmmünoterapi.....	14
2.3.6. EGFR ve VEGFR İnhibitörleri	14
2.2. DNA HASAR YANITI.....	15
2.2.1. ATM ve ATR'nin yapısı ve özellikleri.....	16
2.2.2. ATR-Chk1 yolu	17
2.2.3. ATR-CHK1-WEE1 Yolağının Hücre Döngüsündeki Rolü.....	18
2.2.4. Kanser tedavisinde ATR inhibisyonunun terapötik önemi.....	20
2.2.5. ATR İnhibitörleri	21
2.2.5.1.Elimusertib	22

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. GEREÇ	27
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	27
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	28
3. 2. YÖNTEM	29
3.2.1. Hücre Kültürü	29
3.2.2. WST-1 Canlılık Analizi	29
3.2.3. Annexin V Analizi	30
3.2.4. Hücre Siklusu Analizi	30
3.2.5. Akridin Oranj/ Propidyum iyodür Boyaması.....	31
3.2.6. Oksidatif stres analizi.....	31
3.2.7. Mitotracker Boyaması.....	32
3.2.8. Western blot analizi	32
3.2.9. İstatistiksel analiz.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. ELİMUSERTİB’İN ANTİ-KANSER ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	36
4.2. ELİMUSERTİB’İN APOPTOTİK ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	40
4.3. ELİMUSERTİB’İN HÜCRE SIKLUSU ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	44
4.4. ELİMUSERTİB’İN HÜCRE MORFOLOJİSİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	49
4.5. ELİMUSERTİB’İN İNTRASELÜLER ROS SEVİYESİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	51
4.6. MİTOKONDİRİ MORFOLOJİSİNDE DEĞİŞİMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	56
4.7. ELİMUSERTİB’İN DNA HASAR YANITINDA ETKİSİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	78

KISALTMA VE SİMGELER

TNMK	:Triple Negatif Meme Kanseri
BL1	:Bazal benzeri 1
BL2	:Bazal benzeri 2
IM	:İmmünomodülatör mezenkimal
M	:Mezenkimal
MSL	:Mezenkimal kök benzeri
LAR	:Luminal androjen reseptörü
ER	:Östrojen reseptörü
PR	:Progesteron reseptörü
HER2	:İnsan epidermal büyüme faktörü 2
AR	:Androjen Reseptörü
EGFR	:Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FGFR2	:Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2
PARP	:Poli (ADP Riboz) Polimeraz
VEGF	:Vasküler endotelyal büyüme faktörleri
ADC	:Antikor-ilaç konjugatları
CTLA-4	:İmmünoterapide sitotoksik T-lenfosit antijeni 4
PD-1	:Programlanmış hücre ölümü proteini 1
VEGFR	:Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü
pCR	:Patolojik tam yanıt
IR	:İyonize Radyasyon
PI3K	:Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PTEN	:Fosfataz-tensin homologu
HR	:Homog rekombinasyon
BER	:Baz kesip-çıkarma
NER	:Nükleotid kesip-çıkarma
MMR	:Yanlış eşleşme onarımı
NHEJ	:Homolog olmayan uç birleştirme
ATM	:Ataksi-telanjipektazi mutasyona uğramış
DNA-PKcs	:DNA'ya bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi

ATR	:Ataksi telenjektazi ve Rad3 ile ilgili
ATRIP	:ATR-etkileşimli protein
Chk1	:Kontrol noktası kinaz 1
RPA	:Replikasyon proteini A
H2AX	:H2A histon varyantı X
PIKK	:Fosfatidilinositol-3 kinazla ilişkili kinaz ailesi
Cdk	:Siklin bağımlı kinaz
BRCA1/2	:Meme kanseri geni 1/2
Rb	:Retinablastoma



ŞEKİLLER

Şekil 1: Hormon reseptör ekspresyon düzeyine göre meme kanserinin sınıflandırılması (Januškevičienė and Petrikaitė 2019).....	4
Şekil 2: TNMK' nin moleküler tiplerinin sınıflandırılmasında ilerleme ve Burstein dört alt tipi/FUSCC sınıflandırması (Yin, Duan, Bian and Yu 2020).....	9
Şekil 3: TNMK' nin tedavisinde kullanılan güncel tedaviler ve yeni tedavi hedefleri (Maqbool, Bekele and Fekadu 2022).....	11
Şekil 4: ATM ve ATR'nin protein yapısı (Barnieh, Loadman and Falconer 2021)..	16
Şekil 5: Replikasyon stresi temelli ATR-Chk1 yolağının aktivitesi (Mei et al 2019).	18
Şekil 6: DNA hasarına yanıt olarak ATR temelli sinyal ve hücre siklusunda etkisi (Smith et al 2020).....	20
Şekil 7: Gerçekleştirilen deneylerin görsel sunumu (Created with BioRender.com).	35
Şekil 8: Elimusertib'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde anti-kanser etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$).	38
Şekil 9: Elimusertib'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde inverted mikroskop görüntüleri. (a) Kontrol, 72 saat boyunca (b) 6 nM ve (c) 8 nM, 96 saat boyunca (d) 6 nM ve (e) 8 nM Elimusertib uygulanan hücreler.	39
Şekil 10: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesinde Annexin V analizi histogramları (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ölüm yüzdelerinin değerlendirilmesi.	41
Şekil 11: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesinde Annexin V analizi histogramları (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ölüm yüzdelerinin değerlendirilmesi.	42
Şekil 12: Elimusertib'in neden olduğu toplam apoptotik ölümün istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).....	43
Şekil 13: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde neden olduğu hücre siklusu etkisinin değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve	

(c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda G0/G1, S ve G2/M fazlarında biriken yüzde hücre değerleri.	45
Şekil 14: Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre siklusunda etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).	46
Şekil 15: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde neden olduğu hücre siklusu etkisinin değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda G0/G1, S ve G2/M fazlarında biriken yüzde hücre değerleri.	47
Şekil 16: Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde hücre siklusunda etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).	48
Şekil 17: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre morfolojisinde değişimlerin görüntülenmesi (a) Kontrol, 72 saat boyunca (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması ve 96 saat boyunca (d) 6 nM Elimusertib ve (e) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda hücre morfolojisinde değişimler.	50
Şekil 18: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarının değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda ROS(-) ve ROS(+) yüzdelerinde değişimler.	52
Şekil 19: Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarında etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).	53
Şekil 20: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MCF-10A hücrelerinde intraselüler ROS miktarının değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda ROS(-) ve ROS(+) yüzdelerinde değişimler.	54
Şekil 21: Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarında etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).	55

Şekil 22: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde mitokondriyal hasarın görüntülenmesi (a) Kontrol, 72 saat boyunca (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması ve 96 saat boyunca (d) 6 nM Elimusertib ve (e) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda mitokondriyal hasar. ..	57
Şekil 23: 72 ve 96 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde kontrol grubuna göre DNA hasar yanıtında ve apoptozda rol alan proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler.	59



TABLÖLAR

Tablo 1. DNA hasar yanıtında rol alan DNA-PKc, ATR ve ATR inhibitörlerinin meme ve prostat kanserinde klinik çalışmaları (Wengner, Scholz and Haendler 2020).....22

Tablo 2. Western blot analizinde kullanılan antikor bilgileri.....33



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Triple negatif meme kanseri (TNMK) heterojen yapıda diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif klinik seyre sahip ve bu nedenle mevcut tedavi seçeneklerine dirençli meme kanseri alt tipidir. Kanser hücrelerinde genomik kararsızlığı DNA hasar yanıtı ve onarım mekanizmalarının aktivitesine bağlıdır. Bu nedenle son yıllarda kanser tedavisinde Ataksi telenjiyektazi ve Rad3 ile ilgili (ATR) inhibisyonunu hedef alan yeni tedavi yaklaşımları dikkat çekmektedir. Mevcut tez çalışmasında ilk kez MDA-MB231 TNMK ve kontrol hücrelerinde bir ATR inhibitörü olan Elimusertib' in anti-kanser etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Elimusertib'in MDA-MB-231 TNMK ve MCF-10A kontrol hücrelerindeki sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile belirlendikten sonra, Annexin V, hücre siklusu analizleri ve akridin oranj/ propidyum iyodür boyaması ile apoptozda etkisi analiz edildi. Mitotracker boyaması ve intraselüler reaktif oksijen türlerinin miktarının belirlenmesi ile mitokondriyal hasar değerlendirildi. Ayrıca, western blot analizi ile ATR-Chk1 DNA hasar yanıtında ve apoptotik ölüme etkisi moleküler düzeyinde aydınlatıldı.

BULGULAR: MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Elimusertib'in doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0.05$). Elimusertib'in TNMK hücrelerinde erken ve geç apoptotik ölüme, G0/G1 fazında tutulmaya ve mitokondriyal hasara neden olduğu belirlendi. Ayrıca, Elimusertib'in TNMK hücrelerinde ATR temelli DNA hasar yanıtını baskılayarak apoptotik ölüme neden olduğu protein düzeyinde analiz edildi.

SONUÇ: Bu çalışmada ilk kez ATR inhibitörü olarak Elimusertib'in TNMK hücrelerinde anti-kanser etkisi belirlenmiştir. Bulgular, Elimusertib'in TNMK hücrelerinde ATR temelli Chk1 yolağını etkin bir şekilde inhibe ettiğini ve özellikle p53 mutant TNMK hastalarında yenilikçi bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA hasar yanıtı, ATR, Hücre siklusu, Apoptoz, Triple negatif meme kanseri.

SUMMARY

Determination of Anti-Cancer Effect of Elimusertib ATR Inhibitor on Triple-Negative Breast Cancer

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Triple-negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous breast cancer subtype with a more aggressive clinical behavior than other breast cancer subtypes, and therefore resistant to current treatment options. Genomic instability in cancer cells is dependent on the activity of DNA damage response and repair mechanisms. For this reason, new treatment approaches targeting Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) inhibition in cancer treatment have attracted attention in recent years. In the current thesis, it is aimed for the first time to determine the anti-cancer effect of Elimusertib, an ATR inhibitor, on MDA-MB231 TNBC and control cells.

MATERIALS AND METHODS: After the cytotoxic effect of Elimusertib on MDA-MB231 TNBC and MCF-10A control cells was determined by WST-1 analysis, its effect on apoptosis was analyzed with Annexin V, cell cycle analyzes and acridine orange/propidium iodide staining. Mitochondrial damage was assessed by Mitotracker staining and the quantification of intracellular reactive oxygen species. Additionally, its effect on ATR-Chk1 DNA damage response and apoptotic death was elucidated by western blot analysis at the molecular level.

RESULTS: Elimusertib significantly decreased the viability of MDA-MB-231 and MCF-10A cells, dose and time dependently ($p < 0.05$). It was determined that Elimusertib caused early and late apoptotic death, arrest in G0/G1 phase and mitochondrial damage in TNBC cells. Additionally, Elimusertib mediated apoptotic death by suppressing the ATR-based DNA damage response in TNBC cells was analyzed at the protein level.

CONCLUSION: In this study, the anti-cancer effect of Elimusertib as an ATR inhibitor was determined for the first time on TNBC cells. The findings show that Elimusertib effectively inhibits the ATR-based Chk1 pathway in TNBC cells and may be an innovative treatment option, especially in *p53* mutant TNBC patients.

Keywords: DNA damage response, ATR, Cell cycle, Apoptosis, Triple negative breast cancer.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Triple negatif meme kanseri (TNMK) meme kanserleri olgularının %15-20' sini oluşturmakta ve diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha agresif klinik özelliklere sahiptir. TNMK kolay metastaz yapma eğilimindedir ve tedavi sonrası üç yıl içerisinde nüks, beş yıl içerisinde mortalite oranı diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha yüksektir (Chang-Qing et al 2020, Bou Zerdan et al 2022). TNMK kendi içinde genomik transkriptomik profillemesine göre bazal benzeri1 (BL1), bazal benzeri2 (BL2), luminal androjen reseptörleri (LAR), mezenkimal (M) olmak üzere dört alt tip oluşturacak şekilde sınıflandırılmaktadır (Lehman et al 2016). TNMK tedavisinde cerrahi ve sistemik kemoterapi ana tedavi yöntemlerini oluşturmaktadır. Ancak, TNMK tümörlerinin östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptör (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) genlerini eksprese etmemesi ve heterojen yapıda olması diğer meme kanserleri tedavisinde kullanılan endokrin tedavi ve moleküler hedefli tedavilere karşı yanıt oranının düşük olmasına neden olmaktadır (Chang-Qing et al 2020, Shen et al 2020). Bu nedenle, TNMK hastalarının tedavisinde hedeflenebilir yenilikçi tedavi stratejilerine gerek duyulmaktadır.

TNMK tümörlerinin %50'sinden fazlasında p53 sinyali aktif değildir ve yaklaşık %50'sinde Retinoblastoma (RB) kaybı etkin olmayan bir G1/S kontrol noktasına neden olmaktadır. Onkogen aktivasyonu ve G1/S kontrol noktasının işlevsel bozukluğu, aşırı tek zincir DNA kırıklarının oluşumunu indükleyerek hücrelerin biriken DNA hasarı ile S fazına geçmesi indüklemektedir. Bu nedenle, TNMK hücreleri hayatta kalmak için Ataksi telenjiyektazi ve Rad3 ile ilgili protein (ATR)-Chk1 temelli DNA hasar yanıtına ihtiyaç duymaktadır (Italiano 2015, Synnott et al 2017, Witkiewicz et al 2018, Jin et al 2021).

ATR aktivitesi, kanser hücrelerinde kalıcı replikasyon stresi altında, *ATM* veya *P53* mutasyonları nedeniyle DNA onarımında kullanılan temel DNA hasar yolağıdır. Bu nedenle, G1 kontrol noktası kaybı olan kanser hücrelerinde artan replikasyon stresinden yararlanmak için ATR-Chk1 yolağının hedeflenmesi yenilikçi bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir (Lodovichi et al 2020, Smith et al 2020).

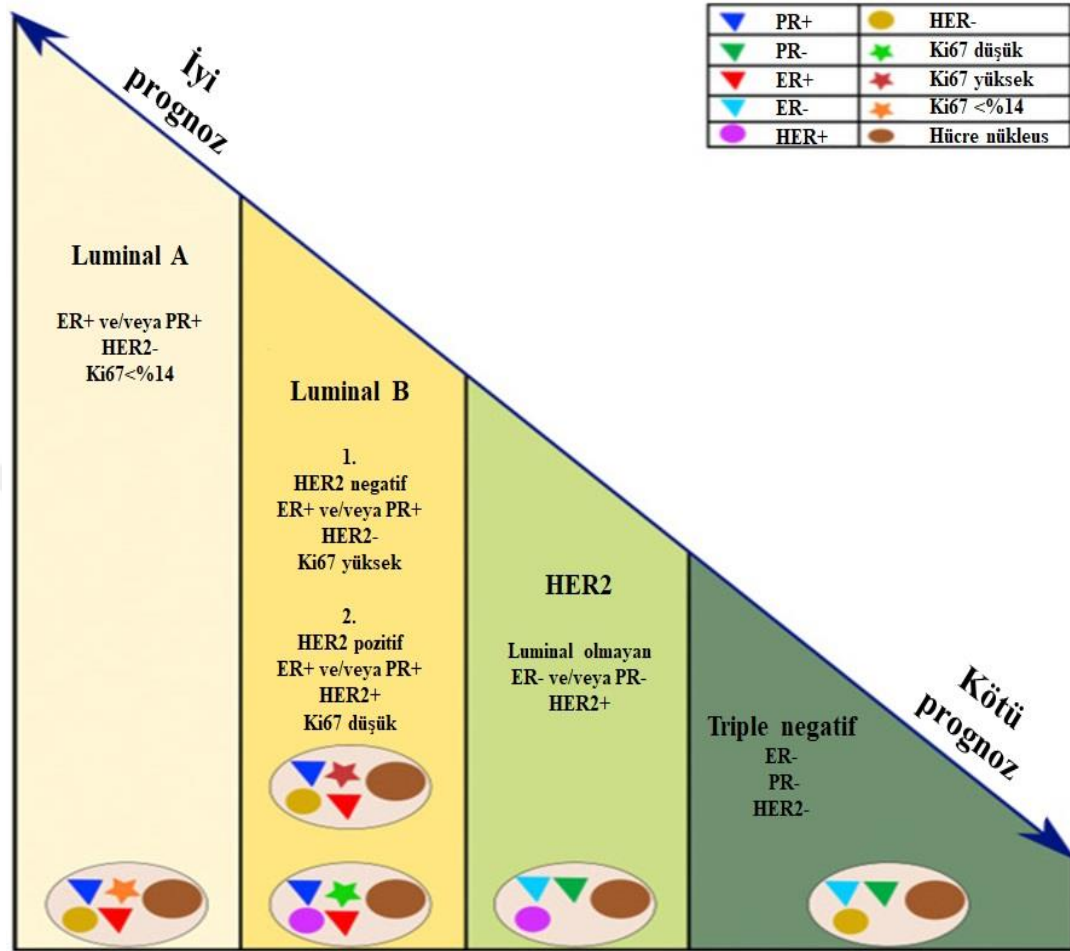
Bugüne kadar, farklı kanser tiplerinin tedavisinde ATR inhibitörleri olarak Berzosertib (M6620, VX-970, VE-822), M4344(VX-803), Ceralasertib (AZD6738) ve Elimusertib (BAY-1895344)'in klinik faz çalışmaları devam etmektedir (Wengner, Scholz and Haendler 2020; Wegner et al 2020). BAY1895344, DNA hasar yanıtı kusurları veya onkojenik mutasyonlara sahip prostat, kolorektal ve lenfoma dahil olmak üzere farklı kanser tiplerinde preklinik çalışmalarda tek ajan olarak yüksek düzeyde antitümör aktivitesi belirlenen bir ATR kinaz inhibitörüdür (Barnier, Loadman and Falconer 2021; Wegner et al 2020). Ancak, TNMK tedavisinde Elimusertib'in terapötik etkisi ve ATR temelli DNA hasar yanıtında moleküler düzeyde etkisine dair kapsamlı bir araştırma ilgili alan yazında bulunmamaktadır.

Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında ATR inhibitörü olarak Elimusertib (BAY1895344)'in TNMK hücrelerinde anti-kanser etkisinin belirlenmesi ve Elimusertib'in ATR/Chk1 temelli DNA hasar yanıtında ve hücre siklusunda terapötik öneminin ortaya konması amaçlanmaktadır. Böylece, TNMK hastalarında hedefe yönelik yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen ikinci nedenini oluşturmaktadır (Januškevičienė and Petrikaitė 2019). GLOBOCAN 2020 yılı verilerine göre yaklaşık olarak 2,3 milyon (%11,7) kadına meme kanseri tanısı konulması ve yaklaşık 685,000 (%6,9) kişinin meme kanserinden hayatını kaybettiği bildirilmektedir (Sung et al 2021). Meme tümörlerinin heterojen yapısı hastalarda kötü prognoza neden olmakta ve tümörün agresif özelliklerinin temelini oluşturmaktadır. Bu kapsamda, heterojenite benzer tipteki tümörler arasında veya aynı tipteki tümörlerde bulunmakta ve meme kanseri farklı alt tiplerinin oluşmasına neden olmaktadır. Meme kanseri alt tipleri moleküler profillemeye, morfoloji ve östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptör (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi ekspresyon düzeyleri değerlendirilerek belirlenmektedir. Ayrıca hücresel proliferasyon belirteci olarak Ki67 düzeyi de moleküler alt tiplerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Cejalvo et al 2017, Januškevičienė and Petrikaitė 2019). Buna göre meme kanserinin iki ER pozitif (Luminal A ve Luminal B) ve üç ER negatif (Normal benzeri, HER2 pozitif ve triple negatif meme kanseri (TNMK)/bazal benzeri) olmak üzere beş farklı alt sınıfı tanımlanmıştır (Şekil 1). Bu sınıflandırmada meme kanseri prognozu ER pozitiften ER negatife doğru gittikçe kötüleşmekte ve hormonal tedaviler etkisiz kalmaktadır (Perou et al 2000, Januškevičienė and Petrikaitė 2019).



Şekil 1: Hormon reseptör ekspresyon düzeyine göre meme kanserinin sınıflandırılması (Januškevičienė and Petrikaitė 2019).

Meme kanseri kemik, akciğer, karaciğer ve beyin dahil olmak üzere farklı organlara metastatik yapma eğilimi göstermektedir. Hastaların %20-30'unda tanıdan sonra veya primer tümör tedavisinden sonra metastaz gelişebileceği bildirilmektedir. Meme kanserine bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ı metastazdan sonra gerçekleşmektedir. Metastaz olmayan meme kanseri hastalarının 5 yıllık genel sağ kalım oranı %80'den fazla olmasına rağmen, uzak organlara metastaz olma durumunda 5 yıllık sağ kalım süresi yaklaşık %25'e düşebilmektedir (Valastyan and Weinberg 2011, Liang, Zhang, Song and Yang 2020).

Meme kanserinin prevalansı etnik kökene, genetik yatkınlık veya aile öyküsüne, hormonal değişiklikler ve yaşam tarzına (obezite, fiziksel hareketsizlik, alkol ve sigara kullanımı, diyet) bağlı olarak değişmektedir. Özellikle meme kanserinin ortaya çıkmasında *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde meydana gelen germ mutasyonlar yaklaşık olarak %70 oranında katkı sağlamaktadır. *BRCA1/2* genlerine ek olarak *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD51C*, *BARD1* ve *TP53* gen mutasyonları da meme kanseri gelişiminde risk oluşturmaktadır (Dorling et al 2021). Ayrıca gen mutasyonlarına paralel olarak hastalıktan etkilenen birinci derece akraba varsa meme kanseri oluşma riskini iki kat ve genç yaşta etkilenen akraba varsa meme kanseri oluşma riski beş kat daha yüksek olabilmektedir (Cortesi, Rugo and Jackisch 2021).

Meme kanseri tanısı almış bireylerde hedefe yönelik tedavi, hormonal tedavi, radyasyon tedavisi, cerrahi ve kemoterapi gibi farklı tedavi stratejileri uygulanmaktadır (Akram, Iqbal and Khan 2017). 1980'lerin başlarından itibaren meme kanserinin tedavisinde sistematik terapide yeni ajanlar (taksanlar, antrasiklinler, aromataz inhibitörleri ve trastuzumab) ve tamoksifen temelli endokrin tedaviler kullanılmaktadır (Ponde, Zardavas and Piccart 2019). Ancak meme kanserinin heterojen yapısından dolayı her bir alt tipe özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yönelik araştırmalar devam etmektedir (Sledge et al 2014).

2.1.1. Triple Negative Meme Kanseri (TNMK)

Meme kanserlerinin alt tipini oluşturan TNMK ER, PR ve HER2 gen ekspresyonunun olmaması ile karakterize edilmektedir. Bu ortak özellikleri sergilemesine rağmen TNMK klinik, histopatolojik ve moleküler profiline göre kendi içinde farklı alt gruplar barındıran heterojen bir hastalıktır. Ayrıca diğer meme kanseri alt tiplerine göre yüksek nüks ve kötü prognoz ile daha agresif klinik seyre sahiptir (Lehman and Pietenpol 2014, Sporikova, Koudelakova, Trojanec and Hajduch 2018). TNMK hastaları meme kanseri tanısı alan vakaların yaklaşık olarak %15-20'sini oluşturmaktadır. TNMK tanısı alan hastaların %20'sinde *BRCA1* gen mutasyonları belirlenmekle birlikte özellikle 40 yaş altı genç kadınlarda ve siyahi ırk kadınlarında daha sık rastlanmaktadır (Li et al 2017, Guney Eskiler, Cecener, Egeli and Tunca 2018). Ayrıca, TNMK hastalarının %25'inde rekürrens görülmekle birlikte ileri evre TNMK hastalarında tanıdan sonra ilk 5 yıl içinde ölüm oranı yaklaşık olarak %40'tır

ve hastaların %45'inde beyin ve/veya iç organlara uzak metastaz gelişmektedir (Bou Zerdan et al 2022). TNMK tedavisinin temelini taksan ve antrasiklin temelli kemoterapiler oluşturmaya rağmen, uzun süreli tedavilerde hastalarda bu kemoterapötiklere karşı zamanla direnç gelişmektedir. Ayrıca, hormon reseptörlerinin eksikliğine bağlı olarak endokrin veya moleküler hedefli tedavilerden sınırlı oranda klinik yarar sağlanması TNMK hastalarında kötü prognoza neden olmaktadır. Bu kapsamda TNMK tedavisinde mevcut kemoterapik rejimlerinin optimize edilmesine ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Wahba and El-Hadaad 2015, Collignon, Lousberg, Schroeder and Jerusalem 2016).

2.1.1.1. Klinik Özellikleri

TNMK genellikle genç yaştaki kadınlarda ortaya çıkmaktadır ve agresif histopatolojik özelliklere sahiptir. Tanı anında daha yüksek bir tümör derecesi (genellikle derece üç), büyük tümör boyutu ve lenf pozitifliği ile ortaya çıkan TNMK tümörlerinin yaklaşık %90'nı invaziv duktal karsinomlardan oluşmaktadır. Geri kalan kısmı ise medular, sekretuar, apokrin/histiyositoid, adenoid kistik, metaplastik, invaziv lobüler karsinomlar ve mikroglandüler adenosisden kaynaklanan karsinomlardan oluşmaktadır (Brouckaert et al 2012, Montagna et al 2013, Kumar and Aggarwal 2016). TNMK hormon reseptör pozitif meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında yüksek oranda visseral relaps ve metastaz gelişiminden sonra kısa sağ kalım oranı ile seyretmektedir. Metastatik TNMK hastalarında sağ kalım süresi 12-18 ay olmakla birlikte uzak nüks tanıdan sonraki ilk iki yılda en yüksektir ve beş yıldan sonra nadir görülmektedir (Sharma 2016).

Klinik kanser genetiğinde tümör baskılayıcı genler olarak *BRCA1/2* genlerinde mutasyonlar ile kalıtsal meme ve over kanseri arasındaki ilişkinin belirlenmesi tedavide poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri ile birlikte yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açmıştır (Geenen et al 2018, Guney Eskiler 2019, Cocco et al 2020).

2.1.1.2 TNMK potansiyel risk faktörleri

TNMK'nın ortaya çıkmasına neden olan potansiyel risk faktörleri değiştirilmeyen (yaş, cinsiyet, genetik mutasyonlar, ırk, meme dokusunun yoğunluğu) ve değiştirilebilen (ilaçlar, vücut kitle indeksi, fiziksel aktivite, alkol ve sigara kullanımı,

işlenmiş gıda/diyet) etkenler şeklinde sınıflandırılabilir (Almansour 2022) Ayrıca, meme kanseri alt tiplerinin yaş ile ilişkisi de bulunmaktadır. TNMK prevalansı daha çok 40 yaş altı kadınlarda belirlenmesine rağmen, 70 yaş üstü hastalarda luminal A alt tipi daha sık görülmektedir. Ayrıca erkek ve kadınlarda farklı cinsiyet hormonlarının uyarılması nedeniyle kadınlar TNMK için daha yüksek riskli grup olarak kabul edilmektedir. Erkeklerde ise ileri yaş, genetik geçmiş, radyasyona maruz kalma, *BRCA1/2* gen mutasyonları ve artmış östrojen miktarı TNMK gelişiminde risk faktörleri olarak belirtilmektedir (Łukasiewicz et al 2021, Almansour 2022). *BRCA1* geninde mutasyon taşıyan menapoz öncesi kadınların yaklaşık %70'ine TNMK tanısı konmakta ve bu hastaların yaşam boyu TNMK insidansı %18 olarak bildirilmektedir. Ayrıca *BRCA* mutasyonlarının yanı sıra *BARD1*, *RAD51C/D* ve *PALB2* gibi genlerdeki mutasyonlarda TNMK gelişimine yol açmaktadır (Dorling et al 2021, Howard and Olopade 2021). Diğer yandan, çoğu çalışmada TNMK prevalansında ırksal/etnik gruplar içinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki siyahi kadınlarda gerçekleştirilen araştırmada TNMK prevalansının ABD doğumlu kadınlarla karşılaştırıldığında Doğu Afrika ülkelerinde doğumlu kadınlarda %47, Batı Afrika doğumlu siyahi kadınlarda ise %8 daha düşük olduğu analiz edilmiştir. Buna karşılık, beyazlar (1,900,000'de 19) ile karşılaştırıldığında TNMK insidans oranının siyahi kadınlarda (100,000'de 38) yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Gomez et al 2014, DeSantis 2019).

2.1.1.3 TNMK'nın Moleküler Özellikleri ve Sınıflandırılması

TNMK'nın moleküler heterojenitesi, kötü prognozu ve hedefe yönelik terapötik tedavi stratejilerin eksikliği TNMK'nın moleküler düzeyde sınıflandırılması gereksinimini ortaya koymaktadır (Garmis et al 2020). Şekil 2'de özetlendiği şekilde, hastalığın tipik olduğunu gösteren bazal belirteçlerin (keratin 5, EGFR, laminin gibi) gen ekspresyon profilleri temel alındığında TNMK'nın sınıflandırılmasında farklı yaklaşımlar öne sürülmüştür (Denkert, Liedtke and Von Minckwitz 2017, Yin, Duan, Bian and Yu 2020).

Lehmann ve ark. 2011 yılında 587 TNMK tümöründen 21 gen ekspresyon veri tabanı analizinde TNMK'nın altı farklı alt tipini tanımlamıştır. Bu alt tipler; Bazal benzeri 1

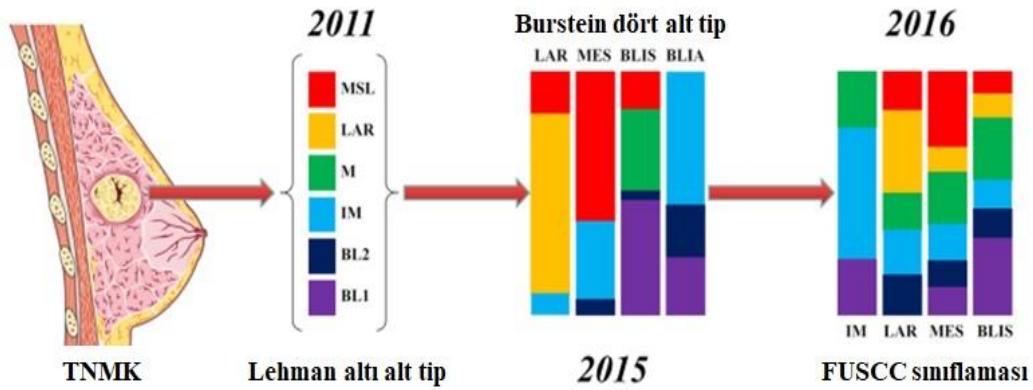
(BL1), bazal benzeri 2 (BL2), immünomodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal kök benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR)'dır (Lehman et al 2011). TNMK tümör örneklerinin gen ekspresyon profili analizi sonucunda BL1 alt tipinde hücre döngüsü düzenleyicileri ve DNA onarım yolları ile ilgili genlerin anormal ekspresyonları tespit edilmiştir. BL2 alt tipi EGFR, MET, NGF, Wnt/ β -katenin ve IGF-1R sinyal yollarının aşırı aktivitesine sahiptir. M alt tipi ise, aktin tarafından düzenlenen yüksek düzeyde aktive edilmiş hücre göçü ile ilgili sinyal yollarına, hücre dışı matris-reseptör etkileşim yollarına ve farklılaşma yollarına (Wnt yolu, anaplastik lenfoma kinaz yolu, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β sinyal yolağı) sahiptir ve bu nedenle metaplastik meme kanseri olarak da adlandırılmaktadır. MSL alt tipi M alt tipi ile karşılaştırıldığında, hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin düşük seviyelerini ve mezenkimal kök hücreye özgü genleri yüksek seviyelerini eksprese etmektedir. IM alt tipi, Th1/Th2 yolu, NK hücre yolu, B hücresi reseptörü sinyal yolu, dendritik hücre (DC) yolu, T hücresi reseptörü sinyalizasyonu, interlökin (IL) gibi bağışıklık hücresiyle ilişkili genleri ve sinyal iletim yolları ile ilişkilidir. Bu nedenle, IM alt tipi memenin medüller karsinomuna oldukça benzerdir. LAR alt tipi ise, diğer TNMK alt tiplerinden önemli ölçüde farklı bir gen ekspresyon profiline sahiptir. LAR alt tipi ER negatif olmasına rağmen yüksek düzeyde aktive edilmiş hormonal ilişkili sinyal yollarına (steroid sentezi, porfirin metabolizması ve androjen/östrojen metabolizması vb) sahiptir (Lehman et al 2011, Marra, Trapani, Viale, Criscitiello and Curigliano 2020, Yin et al 2020).

Diğer yandan, Lehman ve ark. (2014) çalışmalarında PAM50 intrinsik alt tipleri ve TNMK moleküller alt tipleri arasındaki ilişki 374 TNMK örneğinde 2441 meme kanseri gen ekspresyon ifade profilini içeren 14 veri setinden TNMK alt tiplerini karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda LAR ve MSL alt tipleri dışındaki tüm TNMK alt tiplerinin BL1 [%99], BL2 [%95], IM [%84] ve M [%97] temel olarak bazal benzeri olduğu tespit edilmiştir (Lehman and Pietenpol 2014).

Buna karşılık, MSL TNMK'ların ~%50 bazal benzeri ve geri kalan normal benzeri (%28), luminal B'den (%14) oluşmaktadır. İlginç bir şekilde, LAR alt tipi, PAM50 intrinsik alt tiplerine ile HER2 (%74) ve Luminal B (%14) olarak sınıflandırılmıştır. Bir başka çalışmada Burstein ve ark. TNMK' de mRNA ekspresyon analizi ve DNA

profili ile TNMK'nın luminal/androjen reseptörü (LAR), mezenkimal (MES), bazal benzeri immün baskılanmış (BLIS), bazal benzeri immün aktive edilmiş alt tip (BLIA) olarak 4 alt tipe ayırmıştır (Garmpis et al 2020).

Bunu takip eden yıllarda Lehmann ve ark. (2016) TNMK'nin alt gruplarını yeniden değerlendirerek TNMK'nın BL1, BL2, M ve LAR olmak üzere 4 farklı alt tipi olduğunu belirtmiştir. Çünkü IM olarak adlandırılan alt tipin gen ekspresyonu verilerinin, tümöre özgü bir göstergeden ziyade daha çok tümör çevresinde bağışıklık sistemi hücreleri ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. MSL alt grubun özelliklerinin ise tümör çevresindeki stromal mezenkimal doku ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lehman et al 2016). Bu kapsamda, TNMK tedavisi için devam eden moleküler çalışmalar ile her bir TNMK alt tipini karakterize eden genetik belirteçlerin anlaşılması prognostik ve terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde önem arz etmektedir



Şekil 2: TNMK'nin moleküler tiplerinin sınıflandırılmasında ilerleme ve Burstein dört alt tipi/FUSCC sınıflandırması (Yin, Duan, Bian and Yu 2020).

TNMK'nın transkripsiyonel heterojenliğin yanı sıra yüksek genetik kararsızlık, kopya sayısı değişiklikleri ve kromozomal düzenlemeler göz önüne alındığında karmaşık genomlarla karakterize edilmektedir. *TP53* ve fosfataz-tensin homologu (*PTEN*) gibi tümör baskılayıcı genlerdeki somatik mutasyonlar TNMK tümörlerinde tanımlanmış olup *PIK3CA* ve fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)/AKT yolağında rol alan genlerde değişiklikler TNMK hastalarının %10' unda belirlenmiştir (Marra et al 2020).

Bareche ve ark. (2018) yapmış olduğu çalışmada her TNMK alt tipinin karakteristik genom değişiklikleri içerdiği bildirilmiştir. Örneğin BL1 tümörleri yüksek

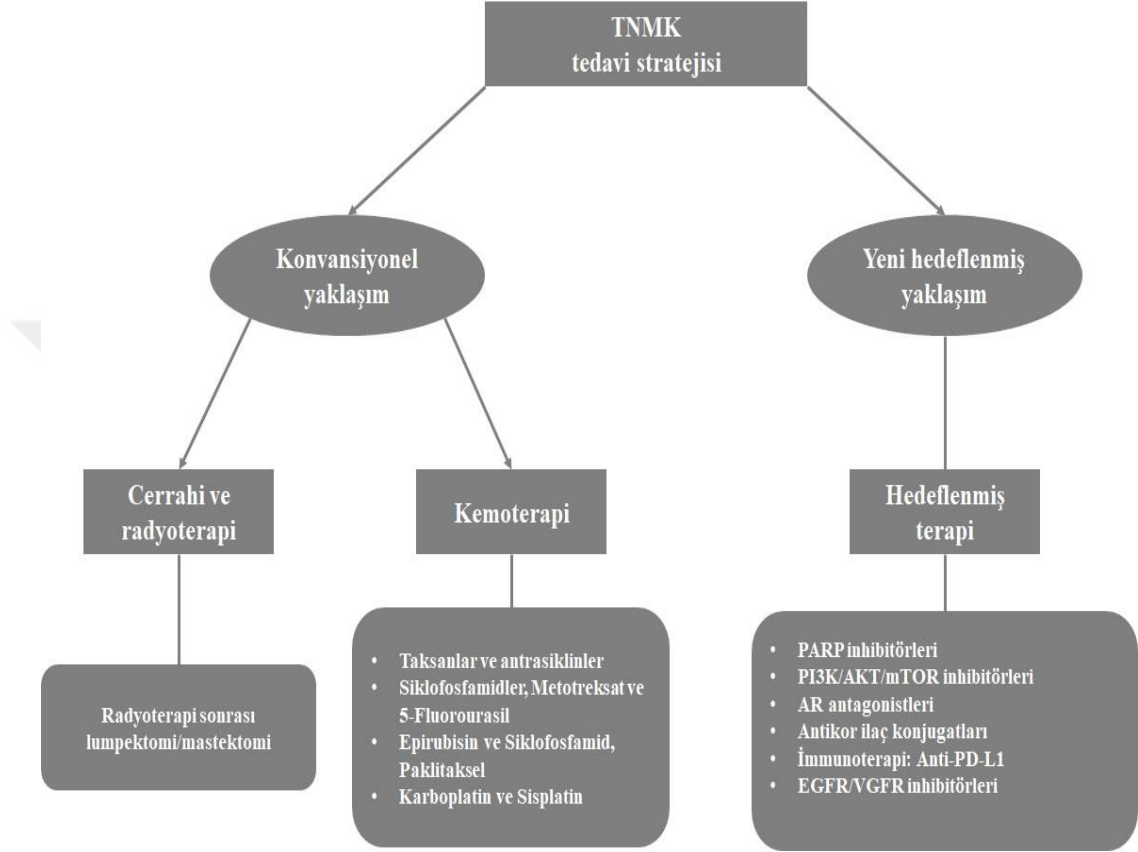
oranda *TP53* mutasyonlarına, *PI3KCA* ve *AKT2'nin* kopya sayısı değişikliklerine ve DNA onarım mekanizmalarında yer alan genlerde delesyonlara sahip iken LAR alt tipinde *PI3KCA*, *AKT1* ve *CDH1* mutasyonları ile karakterize edilmiştir (Bareche et al 2018).

Sonuç olarak, TNMK'nın alt sınıflandırılmasında gen ekspresyon analizi, immün belirteçler, androjen-reseptör biyolojisi, mezankimal fenotip, kök hücre belirteçleri ve bazal belirteçler birlikte değerlendirilmesi her bir alt tipe özgü biyobelirteçlerin belirlenmesinde ve hedefe yönelik klinik çalışmaların gerçekleştirilmesinde önemlidir (Denkert et al 2017).

2.2. TEDAVİ YÖNTEMLERİ

TNMK hastaları için standart tedavi kemoterapi, tek başına veya cerrahi ve/veya radyoterapi ile kombinasyon halinde rutinde uygulanmaktadır. Diğer meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında TNMK tümörlerinde ER, PR ve HER2 gen ekspresyonlarının olmaması endokrin tedavileri etkisiz hale getirmektedir (Yao et al 2017). TNMK hastaların tedavisinde kemoterapi temel yaklaşım haline gelmiş olup son yıllarda yapılan çalışmalar neoadjuvan kemoterapi rejimlerinin kullanımının, hormon reseptörü pozitif meme kanserine göre daha yüksek patolojik remisyona oranına sahip olduğunu ve TNMK hastalarının prognozunu önemli ölçüde iyileştirebileceğini göstermiştir (Yi et al 2020, Maqbool, Bekele and Fekadu 2022). TNMK tedavisinde standart neoadjuvan kemoterapi rejimi olarak Adriamisin, siklofosfamid ve paklitaksel kombinasyonları uygulanmakta olup hastalarda patolojik tam yanıtta (pCR) %35-45 olarak belirtilmektedir. Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) kılavuzları tarafından TNMK tedavisinde sistemik kemoterapi rejimleri olarak Dosetaksel ve Siklofosfamid (TC), Taksel/Dosetaksel, Adriamisin ve Siklofosfamid (TAC), Adriamisin ve Siklofosfamid (AC), Siklofosfamid, Metotreksat ve Florourasil (CMF), Siklofosfamid, Adriamisin ve Florourasil (CAF) ve Siklofosfamid, Epirubisin, Florourasil ve Paklitaksel/Dosetaksel (CEF-T) belirtilmektedir. Uygun kemoterapi ilaçlarının seçimi ve kemoterapi rejimlerinin optimizasyonu, TNMK hastalarının prognozunda önemlidir (Şekil 3). Ayrıca, metastatik olmayan TNMK hastaları metastatik TNMK hastalarına göre kemoterapiye

daha iyi yanıt vermesine rağmen, TNMK alt tiplerinde pCR farklılıklar göstermektedir. pCR oranı BL1 tümörlerinde en yüksek orana sahip iken, BL2 ve LAR tümörler en düşük pCR oranı göstermektedir (Bou et al 2020, Yin et al 2020, Maqbool, Bekele and Fekadu 2022).



Şekil 3: TNMK’ nın tedavisinde kullanılan güncel tedaviler ve yeni tedavi hedefleri (Maqbool, Bekele and Fekadu 2022).

2.3. TNMK TEDAVİSİNDE HEDEFE YÖNELİK TEDAVİ STRATEJİLERİ

2.3.1 PARP inhibitörleri

BRCA1/2 genlerindeki mutasyonlardan dolayı bu genlerdeki fonksiyon kaybının yüksek oranda TNMK riski oluşturduğu bilinmektedir. TNMK hastalarında yaklaşık olarak %19,5 germline *BRCA1/2* mutasyonları rastlanmaktadır. *BRCA1/2* genlerinde fonksiyon kaybı normal hücrelerde DNA’da çift zincir kırıklarının tamirini engelleyerek genetik hasara ve kromozomal anomalilerin birikmesine yol açmaktadır (Guney Eskiler, Cecener, Egeli and Tunca 2018). PARP inhibitörleri PARP’ın aktivitesini inhibe ettiğinden dolayı DNA’da tek zincir kırıklarının ve sonrasında çift

zincir kırıklarının birikmesine yol açmaktadır. *BRCA1/2* genlerinde mutasyon taşıyan tümörlerde DNA'da çift zincir kırıkları tamir edilemediğinden dolayı PARP inhibitörleri sentetik letaliteye neden olmaktadır (Bou Zerdan 2021, Hossain Majumder, David, Miele 2021). OlympiAD ve EMBRACA olmak üzere iki farklı faz III klinik denemesi ile PARP inhibitörleri olarak Olaparib ve Talazoparib'in meme kanseri tedavisinde etkinliği kanıtlanmış ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından Olaparib'in 2022 yılında zararlı veya şüpheli zararlı germline BRCA mutasyonu belirlenen HER2 negatif meme kanseri hastalarında adjuvan tedavi olarak kullanılması onaylanmıştır. Talazoparib'in 2018 yılında FDA tarafından zararlı veya şüpheli zararlı germline BRCA mutasyonu belirlenen HER2 negatif lokal ileri veya metastatik meme kanseri tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (Guney Eskiler 2019, Ge, Zuo, Chen and Yu 2022).

2.3.2 PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri

Kanserde PI3K/AKT/mTOR yolağının aşırı aktivitesi temel onkolojik yolak olarak rol aldığı bilinmektedir. PI3K/AKT/mTOR yolağında *PIK3CA*, *AKT1/2* ve *mTOR* onkogenlerin aşırı aktivitesi veya *PTEN* ve *INPP4B* vb. gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivitesi meme kanseri gelişimine yol açmaktadır (Maqbool et al 2022). The Cancer Genome Atlas meme kanseri veri setinde TNMK tümörlerinin %7'sinde *PIK3CA* mutasyonları, %35'inde *PTEN* ve %30 unda *INPP4B* geninde değişimler belirlenmiştir. Ayrıca, TNMK tümörlerinin %50'sinde PI3K/AKT/mTOR yolağında değişimlerin meydana geldiği ve bu nedenle TNMK tümörlerinin PI3K inhibitörlerine karşı duyarlı olabileceği belirtilmektedir (Hossain Majumder, David, Miele 2021, Bianchini, Angelis, Licata and Gianni 2022). Bu kapsamda FDA tarafından onaylanmış olan mTORC1 inhibitörü olarak Everolimus' un karboplatin ile kombinasyonu metastatik TNMK hastalarının tedavisinde etkili bir tedavi olarak önerilmektedir Ayrıca, LOTUS klinik denemesinde İpatasertib (Akt inhibitörü)ve paklitaksel alan TNMK hastalarında, sadece paklitaksel ile tedavisi uygulanan hastalara göre daha uzun progresyonsuz sağ kalım süresi belirlenmiştir (Hossain et al 2021, Ge et al 2022). Diğer yandan, PI3Ka-seçici inhibitörü olarak Alpelisib'in fulvestran ile birlikte hormon reseptörü pozitif HER2 negatif ileri evre veya metastatik *PIK3CA* mutasyonu belirlenen meme kanseri hastalarında 2019 yılında FDA

tarafından kullanımı onaylanmıştır. Diğer bir Faz III çalışmasında EPIK-B3 PIK3CA mutasyonları veya PTEN kaybı (NCT04251533) olan metastatik TNMK hastalarında etkinliğini değerlendirmektedir (Bianchini et al 2022). Bu kapsamda aşırı aktivitesi belirlenen PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı TNMK tedavisinde umut vadedicidir. Ancak, bu sinyal yolağını hedef alan ilaçların etkinliğinin kanıtlanması ve toksisitesinin belirlenerek ez aza indirilmesi ile ilgili daha fazla araştırmalara ihtiyaç vardır (Yin et al 2020, Ge et al 2022).

2.3.3. Antikor-ilaç konjugatları

Antikor-ilaç konjugatları (ADC'ler), bir monoklonal antikor ve bir sitotoksik ilaç kombinasyonundan oluşmaktadır ve ileri evre meme kanseri tedavisinde kullanılan bir yöntemdir (Bou Zerdan et al 2022). Bu tür immünokonjugatlar, malign olmayan dokularda toksisiteyi en aza indirirken, antijen eksprese eden kanser hücrelerine sitotoksik yüklerin seçici olarak verilmesini sağlar. Bir antikor-ilaç konjugatı olarak Sacituzumab govitecan metastatik TNMK hastalarının tedavisinde kullanımı 2020 yılında FDA onayı almıştır (Landry, Sumbly, and Vest, 2022). Faz III ASCENT çalışmasında ise ADC tedavisi uygulanan TNMK hastalarında paklitaksele göre genel sağ kalım oran ve progresyonsuz sağ kalım süresinde istatistiksel ve klinik olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Bianchini et al 2022).

2.3.4 AR antagonistleri

TNMK tümörlerinin %10-15'ini oluşturan androjen reseptörü (AR)-pozitif (AR+), tümörler düşük proliferasyon oranı ve lümen benzeri gen ekspresyon profili ile karakterize edilmektedir ve bu nedenle mevcutta kullanılan kemoterak ilaçlara karşı dirençlidir (Marra et al 2020). AR pozitifliği TNMK hastalarının tedavisi için hedef olarak tanımlanmıştır ve anti-androjen moleküllerinin klinik olarak uygulanmasına yol açmıştır. Farklı anti androjen ilaçlarının (Bikalutamid, Enzalutamid, Seviteronel) monoterapi veya CDK4/6 inhibitörleri ile kombin etkisine dair klinik çalışmalar devam etmesine rağmen, AR eksprese eden TNMK hastalarında AR-hedefli tedavinin etkin bir tedavi stratejisi olup olmadığı henüz sonuçlanmamıştır (Hwang, Park and Kwon 2019).

2.3.5 İmmünoterapi

İmmünolojik özellikleri temel alındığında TNMK immünoterapi için farklı sistematik seçeneklerle umut verici tedavi stratejilerini arasında yer almaktadır. Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1), PD-L1 veya PD-L2 ligandları ile etkileşime girdiğinde T hücresi aktivasyonunu düzenleyen bağışıklık kontrol noktası reseptörü olarak görev almaktadır. PD-L1, TNMK hastalarının yaklaşık %20'sinde eksprese edildiğinden dolayı anti-PD-L1 tedavisinin etkinliği farklı çalışmalarda belirlenmiştir (Ge et al 2022). Ayrıca, immünoterapide sitotoksik T-lenfosit antijeni 4 (CTLA-4) ve PD-1 gibi immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğine dair çalışmalarda devam etmektedir (Clark and Yang 2021). Bu kapsamda pembrolizumab, emiplimab, nivolumab, atezolizumab ve durvalumab gibi IgG1k ve IgG4k tipi monoklonal antikorlar TNMK tedavisinde immünoterapide prelinik ve klinik çalışmalarda dikkat çekmektedir (Cao, Chen, Tao, Lin and Wang 2021). Bu antikorlar içerisinde Atezolizumab'ın 2019 yılında PD-L1 pozitif, çıkarılamayan, lokal ileri veya metastatik TNMK tedavisinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır (Clark et al 2021). Ayrıca, TNMK tedavisinde özellikle immünoterapi ile birlikte kombin tedavi stratejileri immün sistemi kontrol eden DNA hasar kusurlarından, yüksek tümör mutasyon yükünden ve anti-tümör bağışıklığından dolayı önem kazanmaktadır (Cao et al 2021).

2.3.6. EGFR ve VEGFR İnhibitörleri

HER transmembran reseptör ailesine ait Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), hücre zarının yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir. TNMK'da EGFR aşırı eksprese edilmekte ve tümör progresyonu ile yakından ilişkilidir. Bu kapsamda, TNMK tedavisinde EGFR, monoklonal antikorlar (Setuksimab ve Panitumumab) ve tirozin kinaz inhibitörleri tarafından hedeflenmesine yönelik klinik çalışmalar yürütülmektedir. MD Anderson Kanseri Merkezi'nden yapılan bir klinik öncesi çalışmada, TNMK hastalarında EGFR tirozin kinaz inhibitörü olarak Erlotinib'in, tümör büyümesini ve metastazı inhibe ettiğini gösterilmiştir (Li, Zhan, Yin, Fu and Deng 2021). Diğer bir randomize faz II çalışmasında TNMK hastalarında Setuksimab tedavisine yanıt oranlarının %6'dan az olduğu belirlenmekle birlikte Setuksimab ve Karboplatin kombin tedavisine yanıt oranı %17 olarak belirtilmiştir (Yin et al 2020). Bu nedenle, TNMK tedavisinde EGFR tirozin kinaz inhibitörleri ve anti-EGFR

monoklonal antikörlerinin tek başına ve kemoterapi ile kombin tedavi uygulamalarına dair henüz etkin sonuçlar elde edilememiştir (Yin et al 2020, Sukumar, Gast, Quiroga, Lustberg and Williams 2021).

Vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF) TNMK tümörlerinin yaklaşık olarak %30-60'ında eksprese edilmektedir. VEGF-A'yı hedefleyen bir monoklonal antikör olan Bevacizumab'ın neoadjuvan tedavi alan TNMK hastalarında patolojik tam yanıt oranında artış sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca, faz III çalışmasında metastatik meme kanseri hastalarında birinci veya ikinci basamak kemoterapi ile Bevacizumab kombin tedavisinin progresyonsuz sağ kalım süresini arttırdığı belirlenmiştir. Ancak VEGFR inhibitörlerinin TNMK tedavisinde etkinliğine dair klinik çalışmalar devam etmektedir (Zhu and Zhou 2015, Li et al 2021).

2.2. DNA HASAR YANITI

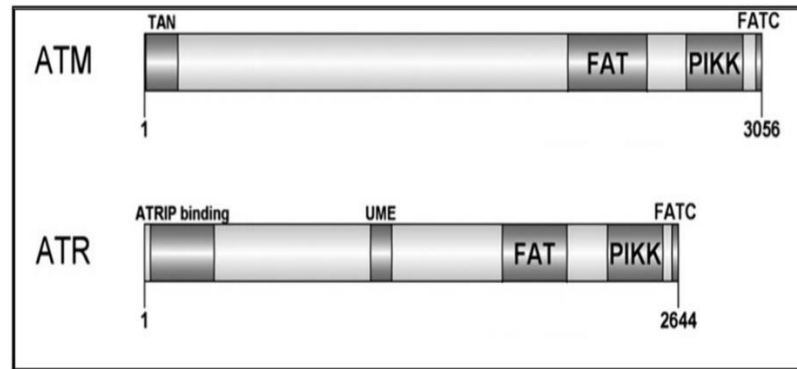
Hücrelerin yaşamasında ve çoğalmasında genomik stabilitenin korunması önem arz etmektedir. Genetik yapıda meydana gelebilecek herhangi bir anormal değişiklikler hücresel süreçleri bozarak hücresel işlevleri engelleyebilir, karsinogenezi tetikleyebilir veya hücre ölümünü indükleyebilmektedir (Huang and Zhou 2021). DNA sürekli olarak farklı nedenler dolaylı hasara uğrayabilmektedir. Bu hasarlar DNA replikasyonu sırasında ortaya çıkan baz eşleşme hataları, baz eklenmesi, baz eksiklikleri veya DNA'da meydana gelen tek ve çift zincir kırıkları şeklinde olabilmektedir. Bu kapsamda, DNA'da meydana gelen hasarın/hasarların tanınması ve onarılmasını için DNA hasar yanıtı ve onarım mekanizmaları önem arz etmektedir (Blackford and Jackson 2017).

DNA oluşan hasarın tipine ve hücre siklusunda etkisine bağlı olarak DNA onarım mekanizmalarının aktivitesi ile hasar tamir edilmektedir. Bu kapsamda, genomik stabilitenin sürdürülmesinde DNA'da oluşan tek zincir kırıklarının tamirinde kesip-çıkarma (BER), nükleotid kesip-çıkarma (NER), yanlış eşleşme onarımı (MMR) ve çift zincir kırıklarının tamirinde homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) mekanizmaları rol almaktadır. Hücrede DNA hasarı olduğunda DNA hasarının tanınması ve hücre döngüsünü durdurulması için DNA hasar kontrol noktaları etkinleşerek hücreye hatanın onarılması yeterli zaman sağlamakta veya

onarılamayacak düzeyde hata varsa hücrede programlı hücre ölümünün gerçekleşmesi için çeşitli proteinlerin aktivitesini sağlamaktadır (Torgovnick and Schumacher 2015, Lodovichi, Cervelli, Pellicoli and Galli 2020). DNA’da tek ve/veya çift zincir kırıkları meydana geldiğinde H2A histon varyantı X’in (γ H2AX) fosforilasyonu ile DNA hasar yanıt aktivasyonu başlatılmakta ve DNA hasar yanıtının ana bileşenleri Fosfatidilinositol-3 kinazla ilişkili kinaz (PIKK) ailesi olan Ataksi-telanjektazi mutasyona uğramış (ATM), DNA'ya bağımlı protein kinaz katalitik alt birimi (DNA-PKcs) ve Ataksi telenjektazi ve Rad3 ile ilgili (ATR) aktive olmaktadır (Weber and Ryan 2015, Carusillo and Mussolino, 2020).

2.2.1. ATM ve ATR’nin yapısı ve özellikleri

ATM ve ATR serin ve treonin kalıntıları ve ardından glutamini fosforile ederek N - terminal alanlarının düşük dizi homolojisi paylaşan ve PIKK ailesinin üyelerinin farklı düzenleyici ile etkileşime giren kinazlardır (Bradbury, Hall, Curtin and Drew 2020). Şekil 4’te özetlendiği şekilde, ATR'nin N-terminali ayrıca replikasyon stresi ve DNA hasarı bölgelerine lokalizasyonunu düzenlemekte ve ATR sinyalizasyonu için gerekli olan ATR-etkileşimli protein (ATRIP) için bağlanma bölgesini içermektedir (Weber and Ryan 2015, Bradbury, Hall, Curtin and Drew 2020, Barnieh, Loadman and Falconer 2021).



Şekil 4: ATM ve ATR’nin protein yapısı (Barnieh, Loadman and Falconer 2021).

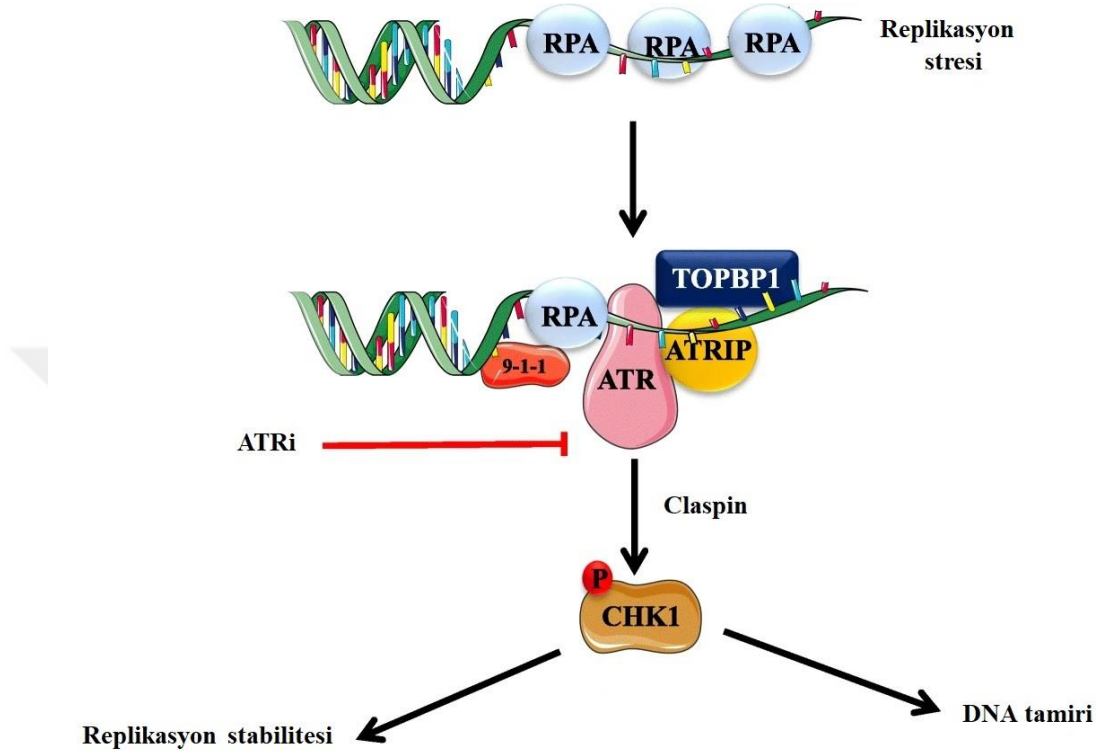
ATM, ATR ve DNA-PKcs protein kinazları DNA hasar yanıtı, replikasyon çatalı stabilitesinin korunması, hücrenin hayatta kalması, çoğalması, metabolizması ve farklılaşması gibi farklı hücresel süreçlerde rol almaktadır (Weber and Ryan 2015, Blackford and Jackson 2017). PI3K benzeri protein kinaz olarak ATM temelde

DNA’da meydana gelen çift zincir kırıkları sonucu aktive olmasına rağmen, ATR farklı DNA hasarları ve DNA replikasyon çatalında hatalar sonucunda aktive olmaktadır (Hanawalt 2015, Karnitz and Zou 2015, Blackford and Jackson 2017). Çift sarmallı DNA’da tek zincir kırıkları sonucu ATR aktive edildiğinde, kontrol noktası kinaz 1 (Chk1)’in fosforilasyonu sinyalleşme kaskadını başlatır ve S fazı ve G2/M fazı kontrol noktalarının hücre döngüsünün durdurulması, replikasyon çatalının stabilizasyonu ve DNA hasarının onarımı dahil olmak üzere temel hücre fonksiyonlarını düzenlemektedir (Hanawalt 2015, Blackford and Jackson 2017, Italiano 2021).

2.2.2. ATR-Chk1 yolu

DNA’da oluşan çift zincir kırıkları sonucu aktive olan ATM ve DNA-PKcs’nin aksine ATR çok daha geniş bir genotoksik stres tarafından aktive olmaktadır (Blackford and Jackson 2017). ATR, replikasyon proteini A (RPA) tarafından DNA’da tek zincir kırıklarına neden olan farklı lezyonlar örneğin uç rezeksiyondan sonra DNA’da oluşan çift zincir kırıkları, NER tarafından hasarlı zincir kesildiğinde oluşan lezyonlar veya çift zincir açıldığında oluşan replikasyon çatalı hataları vb. tanınmaktadır. Ayrıca, UV tarafından indüklenen DNA hasarlarının tanınmasında da ATR önemli bir role sahiptir (Falck, Coates and Jackson 2005, Lodovichi et al 2020). Şekil 5’te özetlendiği şekilde, ATRIP, doğrudan RPA’ya bağlanarak ATR-ATRIP kompleksinin DNA hasar bölgelerinde veya stresli replikasyon çatalında RPA tarafından sarılan DNA’da oluşan tek zincir kırıklarının tanınmasına olanak sağlar. Rad17 kompleksi, Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) kompleksi ve RIHNO dahil olmak üzere ATR’nin diğer birçok düzenleyicisi, RPA sarılı DNA tek zincir ve çift zincir kırıkları tanımakta ve TopBP1’in ATR-ATRIP kinaz aktivitesini uyarmaktadır. Böylece, claspin gibi aracı proteinlerin yardımıyla ATR, Chk1’i tanır ve fosforile ederek ATR-Chk1 yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır (Karnitz et al 2015, Mei, Zhang, He and Zhang 2019). ATR tarafından aktive olan Chk1, Cdc25a/c’nin inaktivasyonuna neden olan fosforilasyona neden olur ve sırasıyla Cdk2 ve Cdk1 üzerindeki inaktive edici fosforilasyonun kalkmasını engellemektedir (Smith, Souhgate, Tweddle and Curtin 2020). Bu sinyalleşme kaskadı hücre içi S fazı ve G2-M fazı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün

durmasını replikasyon çatallarının stabilitesini ve DNA hasarının onarımı dahil olmak üzere temel hücre fonksiyonlarını düzenlemektedir (Italiano 2021).



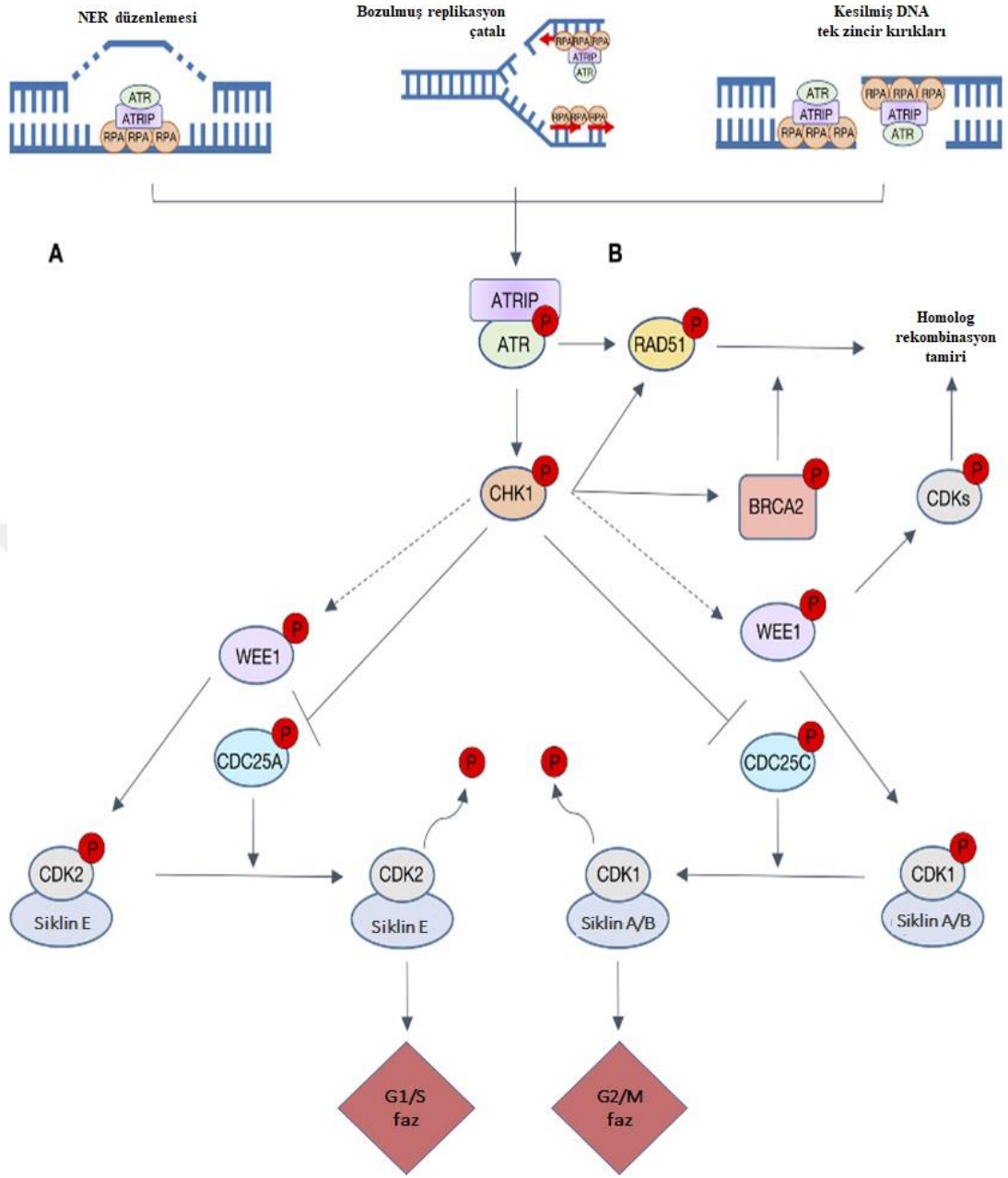
Şekil 5: Replikasyon stresi temelli ATR-Chk1 yolağının aktivitesi (Mei et al 2019).

2.2.3. ATR-CHK1-WEE1 Yolağının Hücre Döngüsündeki Rolü

Hücre siklusunda mitozun başlaması için aktif Siklin B-Cdk1 kompleksi oluşması gerekmektedir. Hücre siklusunun düzenlenmesinde G1/S, G2/M ve intra-M kontrol noktaları rol almaktadır. Şekil 6 özetlendiği şekilde, normal bir hücrede DNA hasarına yanıt olarak ATR aracılığıyla fosforile olan Chk1/Wee1 aktivitesi, Siklin B/Cdk1 kompleksinin inhibisyonuna ve böylece hücre siklusunun G2/M fazına ilerlemesini engellemektedir. Aynı zamanda Chk1, Cdc25 fosfatazların aktivitesini düzenlemektedir (Jin, Tao, Cao, Li and Hu 2021, Kciuk, Gielecińska, Mujwar and Kontek 2022). Aktive olan Chk1, Cdc25a ve Cdc25c'yi fosforile ederek inhibe etmektedir. Aktivitesi azalan Cdc25a ve Cdc25c hücre siklusunun S fazı ve G2/M fazına ilerlemesini engellemektedir. Böylece DNA replikasyonu tamamlanmadan önce hasarlı DNA olan hücrelerin M fazına geçmesi engellenerek hücre döngüsünün

durdurulması ve replikasyon stresini azaltılarak DNA hasar onarımının başlatılmasına veya apoptoz veya hücre yaşlanmasının indüklenmesine yol açmaktadır (Smith et al 2020, Barnieh et al 2021). Diğer yandan, G1/S kontrol noktasında hasarlı DNA'nın replikasyonunu engellemektedir. G1 evresinden S evresine geçiş doğrudan siklin E tarafından indüklenen artan CDK2 aktivitesi ile düzenlenmektedir. Öncelikle G1/S kontrol noktasında Cdc25a'nın degradasyonu ile başlamakta ve CDK2'nin aktivitesini inhibe etmektedir. Eğer DNA hasarı kalıcı ise p53 temelli p21'in upregülasyonu G1/S fazında tutulmaya neden olmaktadır. Bu kapsamda ATR/Chk1 yerine, ATM/Chk2 G1/S fazı geçişinde DNA hasar yanıtının temel düzenleyicisi olarak rol almaktadır (Smith et al 2020, Gorecki et al 2021,).





Şekil 6: DNA hasarına yanıt olarak ATR temelli sinyal ve hücre siklusunda etkisi (Smith et al 2020).

2.2.4. Kanser tedavisinde ATR inhibisyonunun terapötik önemi

Genomik kararsızlık, DNA hasar yanıtı mekanizmalarının işlevsizliği ve/veya düzensizliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkan kanser hücrelerinin yaygın olarak bilinen bir özelliğidir (Barnieh et al 2021). ATR aktivitesinin birçok tümör hücresinde, normal hücrelerde olduğundan daha fazla etkin olduğu bilinmektedir. Yapılan bazı

çalışmalarda, ATR inhibisyonunun yüksek düzeyde onkojen kaynaklı replikasyon stresi olan hücrelerde toksik olduğu belirtilmiş olup, aşırı ATR aktivitesinin kanser hücrelerinin hayatta kalması için kritik önemi olduğu belirtilmektedir (Lecona and Fernandez-Capetillo 2018). Kanser hücrelerinde genellikle p53 ve Rb tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlardan dolayı hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında tutulamaması DNA'da çift zincir kırıklarının tamirinde hücre siklusunda G2/M kontrol noktasının önemini göstermektedir (Lodovichi et al 2020). Replikasyon stresi ATR-Chk1-Wee1 sinyal yolağının aktivitesinde önemli rol almaktadır. Bu nedenle, kanser hücrelerinde G1 kontrol noktasının kaybından dolayı ATR-Chk1-Wee1 yolunu hedefleyen terapötik yaklaşımlar önem arz etmektedir. Ayrıca, ATR-Chk1-Wee1 yolağının S ve G2/M hücre döngüsü kontrol noktalarındaki rolünün yanı sıra HR mekanizmasının düzenlenmesinde de rol almaktadır. Bu nedenle, ATR inhibisyonu, HR kusurlu kanser hücrelerinin kemoterapiklere karşı duyarlı hale gelmesinde terapötik potansiyele sahiptir (Hanahan and Weinberg 2000, Mak, Man, Ma and Poon 2014, Smith et al 2020). Ayrıca, G1 kontrol noktasının kaybı, replikasyon stresi ve HR tamir mekanizmasındaki eksikliklerden dolayı heterojen yapıya sahip TNMK patogenezinde ATR yolağı temelli DNA tamirine bağımlılığı arttırmaktadır. Böylece, TNMK hücrelerini DNA hasar yanıtını hedef alan ilaçlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Curtin 2012, Fedele et al 2019, Ding et al 2020).

2.2.5. ATR İnhibitörleri

ATR, DNA replikasyon stresine karşı çok yönlü DNA hasar yanıtını düzenlemektedir (Wengner et al 2020). Literatürde, *ATM* mutasyonu veya fonksiyon kaybı olan kanser hücrelerinin hayatta kalması için ATR'ye bağımlılığının arttığı belirlenmiştir. Bu nedenle, ATR inhibisyonu hedef alan inhibitörler kanserin tedavisinde potansiyel bir hedef olarak son on yılda dikkat çekici hale gelmiştir (Wengner et al 2020, Chen et al 2022). Kanser hücrelerinde ATR inhibisyonunun etkinliği siRNA veya ksenograft modellerde gösterilmekle birlikte, ATR inhibitörlerinin geliştirilmesinde aktif ATR proteinin elde edilmesinde zorluklar, ATR proteinin büyük boyutu, allosterik bağlanma bölgelerinde bilgi eksiklikleri ve ATR inhibisyonunda standartlaştırılmış analizlerin eksikliği yeni ajanların geliştirilmesinde kısıtlamalara neden olmaktadır (Fokas et al 2014, Lecona and Fernandez-Capetillo 2018). Bugüne kadar, farklı

ATR inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinin tedavisinde klinik denemeleri devam etmektedir. ATR inhibitörleri olarak Berzosertib (M6620, VX-970, VE-822), M4344(VX-803), Ceralasertib (AZD6738) ve Elimusertib (BAY-1895344) klinik faz çalışmaları devam etmektedir (Wengner, Scholz and Haendler 2020, Chen et al 2022).

Tablo 3: DNA hasar yanıtında rol alan DNA-PKc, ATR ve ATR inhibitörlerinin meme ve prostat kanserinde klinik çalışmaları (Wengner, Scholz and Haendler 2020).

İlaç	Hedefi	Kombin Tedavi	Kanser	Faz
Nedisertib	DNA-PKc	Radyum-223 Avelumab	Metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri	1/2
AZD7648	DNA-PKc	Doksorubisin Olaparib	İleri kanserler	1/2
VX-984	DNA-PKc	Kemoterapi	İleri katı tümörler	1
CC-115	DNA-PKc	Enzulatamid	kastrasyon dirençli prostat kanseri	1
Berzosertib	ATR	Radyoterapi	Meme kanseri	1
Berzosertib	ATR	Karboplatin	Metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri	2
Ceralasertib	ATR	Olaparib	Metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri	2
Ceralasertib	ATR	Olaparib	TNМК	2
Ceralasertib	ATR	Olaparib	İleri meme kanseri	2
M4344	ATR	Kemoterapi	İleri katı tümörler	1
Elimusertib	ATR		İleri katı tümörler ve lenfoma	1
Elimusertib	ATR	Kemoterapi	İleri katı tümörler	1
Elimusertib	ATR	Niraparib	İleri katı tümörler	1
Elimusertib	ATR	Pembrolizumab Olaparib	İleri katı tümörler	1
AZD0156	ATM	İrinotekan Florourasil Folinik asit	İleri kanserler	1
M3541	ATM	Radyoterapi	Katı tümörler	1

2.2.5.1.Elimusertib

Elimusertib Bayer AG tarafından geliştirilen oral klinikte faz I çalışmaları (NCT03188965) devam eden seçici oral yolla kullanılan bir ATR inhibitörüdür. Elimusertib'in hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda yapılan analizler ile ATR homologları üzerinde [ATM (>200 kat), DNA-PK (>40 kat), mTOR (6 kat) ve PI3K (>400 kat)] cell-free ($IC_{50} = 7$ nM) ve hücresel ($IC_{50} = 36$ nM) yüksek seçicilikte tek

ajan olarak güçlü anti-kanser etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Wegner et al 2020, Barnier, Loadman and Falconer 2021).

İn vitro yapılan çalışmalarda DNA hasar yanıtı kusurları olan over, prostat, kolorektal ve lenfoma dahil olmak kanser hücre panellerinde Elimusertib'in tek ajan olarak güçlü anti-kanser etkisi gösterilmiş ve özellikle sisplatin, bleomisin gibi DNA hasarına neden olan ajanlar ve DNA hasar yanıtında rol alan ATM, CHK1, DNA-PK, WEE1 ve PARP inhibitörleri ile güçlü sinerjistik etkisi gösterilmiştir. Ayrıca, ATM yolağının inaktif olduğu kanser hücrelerinin Elimusertib'e duyarlı olduğu da belirlenmiştir. Benzer şekilde, in vivo çalışmalarda Elimusertib'in monoterapi ve olaparib, radyoterapi ve hormon tedavi ile kombin şekilde over, prostat, kolorektal ve lenfoma tümör modellerinde tümör gelişimini önemli derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, insan lenfome ksenograft modellerinde M6620 ve AZD6738 ATR inhibitörleri ile karşılaştırıldığında aynı konsantrasyonda daha üstün anti-kanser etkiye sahip olduğuda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Elimusertib'in M6620 ve AZD6738'e göre farmakokinetik özelliklerinin daha üstün olduğunu ve bu nedenle monoterapi olarak daha etkin olduğunu ortaya koymaktadır (Wegner et al 2020, Barnier, Loadman and Falconer 2021).

Elde edilen önemli prelinik veriler, Elimusertib'in özellikle ileri katı tümörlerde ve lenfoma tedavisinde monoterapi olarak 2017 yılında klinik çalışmasının (NCT03188965) başlamasına neden olmuştur. Diğer bir çalışmada ise Elimusertib ile PD-1 inhibitörü olarak Pembrolizumab'ın ileri katı tümörlerde kombin etkisi araştırılmaktadır (NCT04095273). Ayrıca prelinik verilerle uyumlu bir şekilde ATM protein ekspresyon kaybı ve/veya *ATM* geninde patojenik mutasyona sahip tüm hastaların Elimusertib'e yanıt verdiği belirlenmiştir (Wegner et al 2020, Barnier, Loadman and Falconer 2021).

Literatürde Elimusertib'in anti-kanser etkisinin araştırılmasına dair sınırlı sayıda prelinik çalışma mevcuttur. Wickstroem ve ark. (2019) çalışmalarında fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2 (FGFR2) hedefli toryum-227 konjuge FGFR2 antikorunun (FGFR2-TTC) monoterapi ve BAY-1895344 kombin etkisini KATO III ve SNU-16 mide, NCI-H716 kolon, SUM52-PE meme ve MFM-223 TNMK hücrelerinde sitotoksik etkisi ve DNA'da çift zincir kırıklarının belirlenmesinde rol alan γ H2AX ve

hücre siklusunda etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, FGFR2-TTC ile ATR inhibitörü kombinasyonunun γ H2AX seviyesinde artışa neden olduğu ve özellikle MFM-223 tümör ksenograft modelinde tek ajanın etkili olmadığı dozlarda kombin etkinin tümör büyümesinde önemli düzeyde azalışa neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle FGFR2 pozitif tümörlerde FGFR2-TTC ile ATR inhibitörünün yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceği belirtilmiştir (Wickstroem et al 2019). Wengner ve ark. (2020) DNA hasar yanıtı eksikliği bulunan kanser ksenograft modellerinde Elimusertib'in güçlü monoterapi ajanı olarak etkin olduğu ve kemoterapi ve eksternal radyoterapi ile birlikte güçlü sinerjistik etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, ATR inhibitörlerinin steroidol olmayan AR antagonisti darolutamid ile hormon bağımlı prostat kanserinde güçlü anti-tümör yanıtı sahip olduğu ve etkinliğinin eksternal radyoterapi ile kombin tedavi şeklinde arttığını tespit edilmiştir (Wengner et al 2020). Goncalves ve ark. (2020) tarafından ise, 8 telomerlerin alternatif uzaması (ALT) pozitif (ALT+) ve 9 ALT negatif (ALT-) osteosarkom hücrelerinde 3 farklı ATR inhibitörünün etkinliğini araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, kısa telomeraz uzunluğuna sahip ALT- hücrelerin uzun telomeraz uzunluğuna ALT- veya ALT+ hücrelere göre ATR inhibitörlerine yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve ATR inhibisyonunun kısa telomeraz sahip hücrelerde kromozom kırıklarına ve hücre ölümüne neden olduğu için kromozom stabilitesinde ATR'nin aktivitesinin önemli olduğu tespit edilmiştir (Goncalves et al 2020). Bowler ve ark. (2020) tarafından özofagus kanser hücrelerinde ATR inhibisyonu ile otofaji arasında ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında p62 birikiminin ATR bağımsız bir şekilde geliştiğini ve ATR inhibitörlerinin hedefi olmadığı belirtilmektedir. ATR inhibitörleri olarak VE-821, AZD6738 ve BAY-1895344 uygulanan OE21 hücrelerde LC3 seviyesinde herhangi bir değişim olmadığı ve farklı konsantrasyonlarda AZD6738 ve BAY-1895344 uygulanan hücrelerde VX970 ve VE-821 aksine p62 seviyesinde bir birikim olmadığı tespit edilmiştir (Bowler et al 2020). Rafiei ve ark. (2020) CRISPR/Cas9 teknolojisi ile ATM defektif DU145, 22Rv1, and LNCaP hücrelerinde izogenik hücrelerinde ATM kaybının DNA hasar yanıtını değiştirmesine rağmen, homolog rekombinasyon mekanizmasında doğrudan etkili olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, ATM kaybının PARP inhibisyonuna duyarlılıkta doğrudan etkili olmamasına rağmen, özellikle VX-970 (M6620) ATR inhibitörüne yanıtı önemli derecede arttırdığı tespit

edilmiştir (Rafiei et al 2020). Neeb ve ark. (2021) ATM kaybı olan ileri prostat kanseri hastalarında ve hücre hatlarında gerçekleştirdikleri çalışmalarında, ATM kaybı olan prostat kanseri hücrelerinin ATR inhibisyonuna duyarlı olduğu ve CP50C organoid ve hasta kaynaklı ksenograft modelinde PARP inhibitörü olaparib ile birlikte güçlü sinerjistik etkisi tespit edilmiştir (Neeb et al 2020). Sule ve ark. (2021) IDH1/2 mutasyonunun U87, HCT116 ve LN229 kanser hücrelerinde ve HCT116 IDH1 mutant ve HT1080 fibrosarkoma in vivo ksenograft modelinde AZD6738, ATRIN175 VE-822 ve BAY-1895344 ATR inhibitörlerine duyarlılıkta etkili olduğunu ve bir PARP inhibitörü olarak olaparib ile AZD6738 ATR inhibitörünün IDH1 mutant kanser hücrelerinde güçlü sinerjistik etkisinin olduğunu gösterilmiştir (Sule et al 2021). Tang ve ark. (2021) prostat kanseri hücrelerinde BAY-1895344 doğrudan ATR-Chk1 sinyalini Cdk1-SPOP eksenini ile baskıladığı ve PD-L1 proteininin destabilizasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, RM-1-BM sinjenik fare prostat kanser modelinde ATR inhibitörleri ile PD-L1 inhibitörlerinin güçlü kombin etkisi olduğu belirlenmiştir (Tang et al 2021). Szydzik ve ark. (2021) tarafından CLB-BAR, CLB-GE, CLB-GAR anaplastik lenfoma kinaz (ALK) bağımlı ve SK-N-AS ve IMR-32 ALK bağımsız nöroblastoma hücrelerinde 2, 4 ve 6 gün boyunca uygulanan Elimusertib'in sitotoksik ve apoptotik etkisi belirlenmiş ve özellikle ALK+ hücrelerde ve ksenograft modelde potansiyel anti-kanser etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, krizotinib veya lorlatinib ALK inhibitörleri ile Elimusertib'in ALK+ ksenograft modellerde kombin etkisi ortaya konmuştur (Szydzik et al 2021). Ganesa ve ark. (2022) çalışmalarında yanlış eşleme onarımı (MMR) proteinlerinin knockdown yapıldığı insan glioblastoma LN229 MGMT- ve MGMT+ hücrelerinde MSH2, MSH6, MLH1 ve PMS2 proteinlerinin temozolomid tedavisi sonrasında ATR aktivasyonuna neden olduğu ve ATR inhibitörleri ile kombin tedavinin MMR- eksik hücrelerinde terapötik yaklaşım olabileceği belirtilmiştir (Ganesa, Sule, Sundaram and Bindra 2022).

Sonuç olarak, Elimusertib'in preklinik çalışmalarda farklı kanser tiplerinde monoterapi veya DNA hasarı indükleyen veya DNA onarımının doğru gerçekleşmediği DNA hasar yanıtı eksikliği olan kanser tiplerinde farklı ilaçlarla kombin uygulamasının potansiyel terapötik bir tedavi seçeneği olabileceği

belirtilmiştir. Ancak, Elimusertib'in TNMK tedavisinde DNA hasar yanıtında etkisine dair detaylı bir çalışma henüz literatürde mevcut değildir.

Bu kapsamda mevcut tez çalışmanın amacı Elimusertib'in kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak TNMK hücrelerinde potansiyel anti-kanser etkisinin belirlenmesi ve DNA hasar yanıtında moleküler düzeyde etkinliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- -80°C derin dondurucu (Haier, Çin)
- Buzdolabı (Regal, Türkiye)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Stuart, Birleşik Krallık)
- Distile su cihazı (Nüve, Türkiye)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Orbital çalkalayıcı (Hangzhou Allsheng, Çin)
- Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)
- Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- CO₂ inkübatör (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- İnverted mikroskop (BestScope, Çin)
- Countees hücre sayım cihazı (Invitrogen, ABD)
- Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD)
- EVOS Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, ABD)
- Mini jel tank sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- iBlot 2 jel transfer sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- iBind Flex (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Kemoliminesans görüntüleme sistemi (Synege. Birleşik Krallık)

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck Milipore, Almanya)
- Elimusertib (Selleck Chemicals, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Trypsin/EDTA (%0.25) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) reaktifi (Biovision, ABD)
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Luminex Corporation, ABD)
- Muse™ Cell Cycle Kiti (Luminex Corporation, ABD)
- Akridin oranj (Sigma Aldrich, ABD)
- Etanol (Merck Millipore, Almanya)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- DAPI (Sigma Aldrich, ABD)
- MitoTracker Red CMXRos (Cell Signaling Technology, ABD)
- NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- NuPAGE™ Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Bolt™ 4 -12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gels (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- iBlot™ Transfer Stack, nitrocellulose, regular size (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- iBind Flex Card (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3. 2. YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen yöntemler aşağıda başlıklar halinde açıklanmış ve Şekil 7’de görsel olarak şematize edilmiştir.

3.2.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 triple negatif meme kanseri ve MCF-10A meme epitel hücre hatları ticari olarak Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)’den satın alındı. MDA-MB-231 hücreleri %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM besiyerinde ve MCF-10A hücre hattı %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, 100 mg/mL EGF, 1 mg/mL hidrokortizon ve 10 mg/mL insülin ilavesiyle DMEM/F12 besiyerinde 37°C’de %5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde kültüre edildi. -80°C’den çıkarılan hücre stokları hazırlanan besiyeri içerisine eklenerek 25 cm² filtreli flasklara ekildi. İnverted mikroskop ile hücrelerin çoğalması her gün kontrol edilerek besiyerleri yenilendi. Hücreler flaskta yeterli hücre yoğunluğuna ulaştığında besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler flaskta 1 kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin flasktan kaldırılması için Tripsin-EDTA (%0.25) eklenerek CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Sonrasında hücreler steril falkona alınarak 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında elde edilen hücre pelletleri 1 mL taze besiyerinde süspanse edildi. 10 µL hücre süspansiyonu 10 µL tripan mavisini ile pipetlenerek hücreler hücre sayım cihazında (Countess Invitrogen, ABD) sayıldı. Hücrelerin stoklanması için ise hücre pelleti besiyeri ile süspanse edilerek kryotüplere aktarıldı ve üzerine DMSO eklenen hücreler -80°C’de muhafaza edildi.

3.2.2. WST-1 Canlılık Analizi

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatları üzerindeki Elimusertib’in sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacı ile 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum (WST-1) boyası kullanıldı. Çalışma prensibi ise mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri ile reaksiyona girmesi sonucunda formazan oluşumuna dayanmaktadır. (Ngamwongsatit, Banada, Panbangred and Bhunia 2008).

96 kuyulu plakalara her kuyuya 2x10⁴ hücre olacak şekilde MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri ekildi ve 24, 48, 72, 96 inkübasyon süreleri için dört ayrı deney

kurularak 37°C CO₂ inkübatörde hücreler inkübe edildi. Sonrasında, hücelere 1, 2, 4, 6, 8, 10 nM Elimusertib uygulanarak sitotoksik etki 24, 48, 72 ve 96 saat için değerlendirildi. Belirlenen süreler sonunda her bir kuyuya 10 µL WST-1 reaktifi eklenerek 37°C 45 dakika inkübe edildi. Sonrasında, plakalar 450 nm dalga boyunda absorbans okuyucu cihazda (Allsheng, Çin) ölçümü yapıldı. Elimusertib uygulanmayan kontrol hücreleri %100 canlı olarak kabul edildi. Deney hücre gruplarının canlılık oranları kontrole kıyasla % olarak ifade edildi. Her deney grubu 3 kez tekrar edildi.

3.2.3. Annexin V Analizi

Hücre apoptoza gittiği takdirde hücre zarının iç yüzeyine yerleşmiş olan fosfatidilserinler hücre zarının dış yüzeyine geçmekte ve böylece floresan ışımaya yapan Annexin V boyası tarafından işaretlenerek hücrelerde apoptotik ölüm miktarı akış sitometri cihazında belirlenmektedir. Nekrotik hücrelerin belirlenmesinde ise ikinci bir boya olarak propidyum iyodür veya 7-AAD kullanılmaktadır (Güleş ve Eren, 2008).

WST-1 analizi sonucuna göre etkin olduğu belirlenen dozlar (6 ve 8 nM) ve inkübasyon sürelerinde (72 ve 96 saat) hücelere Elimusertib uygulanarak Annexin V analiziyle apoptotik ölüm belirlendi. 6 kuyulu plakalara hücreler (1×10^5) ekildikten sonra, WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. Ardından Tripsin-EDTA ile hücreler 6 kuyulu plakalardan kaldırılarak 1,5 mL ependorf tüplere alınmış ve 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Elde edilen hücre süpernatantları uzaklaştırılarak hücre pelletleri iki kez PBS ile yıkandı ve sonrasında hücreler 100 µL Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit ile 30 dakika karanlıkta inkübe edilerek boyandı. Inkübasyon sonunda deneylerin analizi Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD) cihazında gerçekleştirildi ve tüm deneyler üç kez tekrar edildi.

3.2.4. Hücre Siklusu Analizi

Elimusertib'in hücre döngüsündeki G0/G1, S ve G2/M fazlarında neden olduğu DNA miktarında değişimlerin kantitatif ölçümünü için Muse™ Cell Cycle Kiti hücrelerin belirlemektedir. 6 kuyucuklu plakalara hücreler (5×10^5) besiyeri ile ekildikten sonra WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanarak 72

ve 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler endorf tüplere alınarak PBS ile iki kez yıkandı. Ardından endorf tüp içinde 1 mL %70 etanol ile hücreler -20°C en az 3 saat boyunca fiks edildi. Sonrasında, her bir tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen pelletler 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama sonrasında her bir tüpteki hücreler 200 μL Muse™ Cell Cycle Kit ile boyanarak Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD) cihazında analizi gerçekleştirildi ve tüm deneyler üç kez tekrar edildi.

3.2.5. Akridin Oranj/ Propidyum iyodür Boyaması

Akridin oranj (AO) boyası DNA veya RNA'ya bağlanabilen bir boyadır. AO DNA'da çift zincir kırıklarına bağlandığında yeşil renkte görülmesine rağmen, RNA veya DNA'da tek zincir kırıklarına bağlandığında kırmızı görüntülenmektedir. Ayrıca katyonik bir boya olduğu için lizozom gibi asidik bileşenlerde düşük pH'dan dolayı turuncu renkte gözlemlenmektedir. Propididyum iyodür (PI), kırmızı floresan bir boyadır ve canlı hücrelere geçemediğinden ölü hücrelerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nafisi et al 2007).

MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerindeki apoptotik etkisinin görüntülenmesi amacıyla, 6 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 5×10^5 hücre ekildikten sonra, WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. Sonrasında hücrelere paraformaldehit (%4) eklenerek 30 dakika orbital çalkalayıcıda fiks edildi. Ardından, her bir kuyu 3 kez PBS ile yıkanarak, 1 mL AO/PI boyası ile 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Son olarak, her bir kuyucuk 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra EVOS Hücre Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) görüntülendi.

3.2.6. Oksidatif stres analizi

Muse® Oxidative Stress kiti oksidatif strese giren hücrelerde intraselüler süper oksit radikallerinin ölçülmesine olanak sağlayan analizdir. Bu kit reaktif hücre popülasyonunda ROS miktarının belirlenmesinde kullanılan dihidroetidyum reaktifini temel almaktadır.

Bu analiz kapsamında, MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri (5×10^5) 6 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, hücrelere WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. Ardından, Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler tüplere alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernetant uzaklaştırılarak 3 kez PBS ile yıkanandı. Süspansiyon halindeki hücre gruplarının her bir tüpüne 190 μ L Muse® Oxidative Stress çalışma solüsyonu eklendi ve 37 C°'de 30 dakika inkübe edildi. Boyama sonrasında hücreler Muse™ Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD) cihazında analiz edildi ve tüm deneyler üç kez tekrar edildi.

3.2.7. Mitotracker Boyaması

MitoTracker® Red CMXRos boyası hafif tiyol reaktif klorometil kısımları içeren hücre zarından geçerek aktif mitokondrilerde biriken floresans bir boyadır. Bu amaçla MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri (5×10^5) 6 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, hücrelere WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda MitoTracker Red CMXRos boyası içeren solüsyon her bir kuyuya ilave edilerek 45 dakika 37 C°'de inkübe edildi. Ardından her bir kuyu 3 kez PBS ile yıkandı ve 1 mL paraformaldehit (%4) eklenerek 30 dakika orbital çalkalayıcıda fiksle edildi. Fiksasyon sonrasında her bir kuyu 3 kez PBS ile yıkanarak EVOS Hücre Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) görüntülendi.

3.2.8. Western blot analizi

Elimusertib' in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki DNA hasar yanıtı ile ilişkili olarak ATR, γ -H2AX, p-Chk1, p-Cdc2, Siklin B, p-Rb, Siklin D ve apoptotik ölüm ile ilişkili PARP, Kaspaz-9, Kaspaz-3, c-Kaspaz-3 proteinlerin ekspresyon düzeyindeki değişimler western blot analizi ile değerlendirildi.

Öncelikle, her bir hücre 1×10^6 olacak şekilde flasklara ekildikten sonra hücreler WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerden RİPA lizis tamponu ile protein izolasyonu yapılarak protein miktarı Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazında belirlendi. 30 μ g protein olacak şekilde NuPAGE™ LDS Sample Buffer

(4X) ve NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) karışımı ile hazırlanan 40 µL örnekler 90 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra 1 dakika buza alındı. Sonrasında hazırlanan örnekler Bolt™ 4 -12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gels jelle yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jeller Mini jel tank sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) 200 V 22 dakika boyunca yürütüldü. Sonrasında iBlot™ Transfer Stack, nitrocellulose, regular size ile iBlot 2 jel transfer sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak transfer işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında her bir primer ve sekonder antikor (Tablo 2) uygun dilüsyon oranlarında hazırlanarak iBind Flex (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında iBind Flex Card ile birlikte en az 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak kemoluminesans görüntüleme sisteminde (Syngene, Birleşik Krallık) görüntülendi. Kontrol olarak GAPDH kullanıldı.

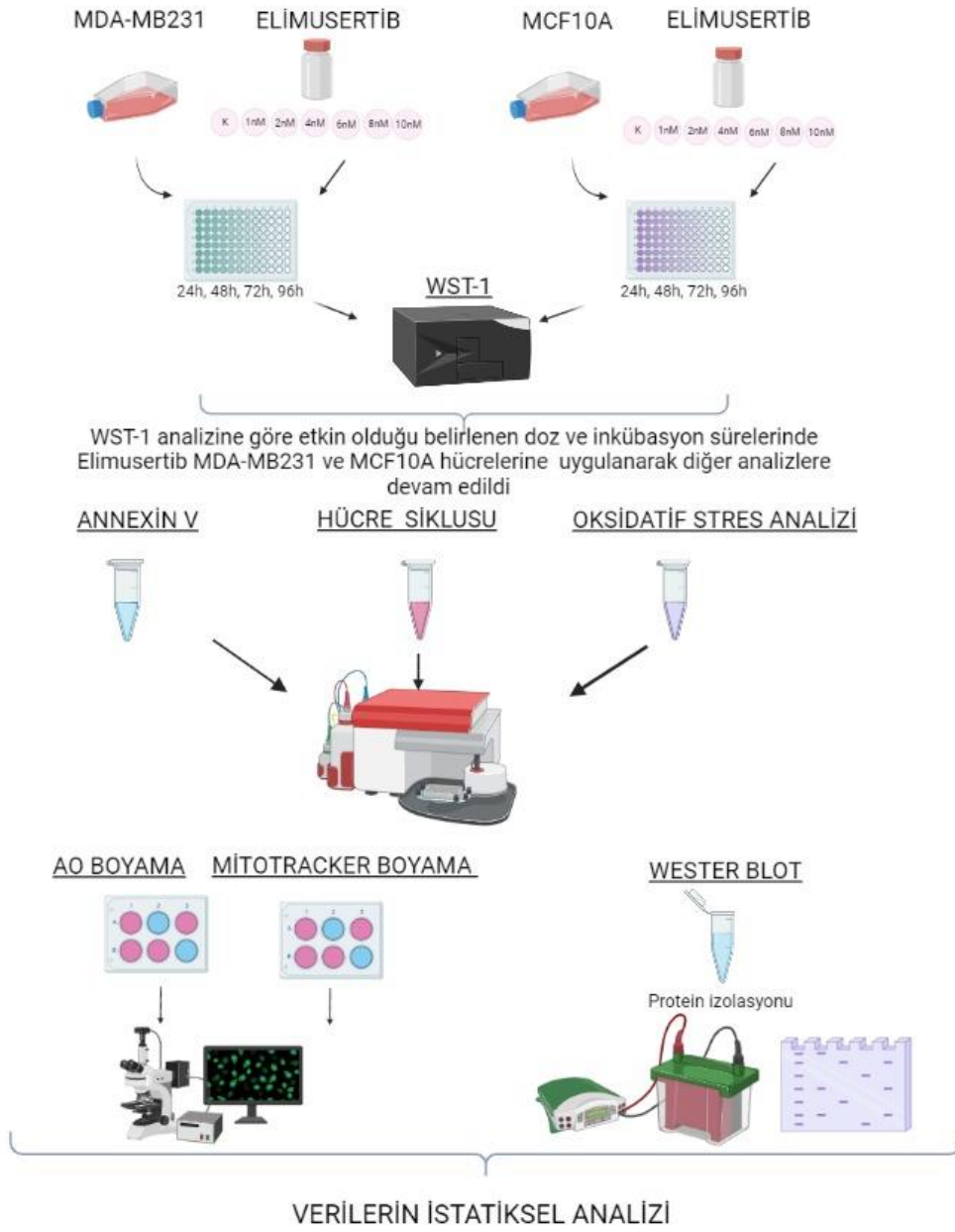
Tablo 4: Western blot analizinde kullanılan antikor bilgileri

Antikorlar	Dilüsyon oranları	Kodları
Mouse Anti-ATR	1:1000	NB100-308 (Novus Biologicals, Birleşik Krallık)
Mouse anti-γH2AX	1:500	ab26350 (Abcam, Birleşik Krallık)
Rabbit Anti-p-Chk1 (S317)	1 µg/mL	AF2054 (Novus Biologicals, Birleşik Krallık)
Rabbit Anti-p-Cdc-2/Cdk1 (pTyr15)	0.2 µg/mL	AF888 (Novus Biologicals, Birleşik Krallık)
Rabbit Anti-Siklin B1	1:500	NBP2-67640 (Novus Biologicals, Birleşik Krallık)
Mouse Anti-p-Rb	1:250	sc-271930 (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
Mouse Anti-Siklin D	1:250	sc-8396 (Santa Cruz Biotechnology, ABD)
Mouse Anti-PARP	1 µg/mL	436400 (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Rabbit Anti-Kaspaz-9	1:1000	NB100-56118 (Novus Biologicals, Birleşik Krallık)
Rabbit Anti-Kaspaz-3	1:100	NB600-1235 (Novus Biologicals, Birleşik Krallık)
Rabbit-Anti-GAPDH	1:1000	AF-7020 (Affinity Biosciences,Avustralya)
Goat Anti Mouse IgG (H+L) Sekonder antikor HRP	1:10000	31430 (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Sekonder antikor HRP	1:10000	31460 (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.2.9. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler GraphPad Prism 6.0 kullanılarak değerlendirildi. Verilere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma olarak verildi. Çoklu gruplar arası farklılar tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) Posthoc Tukey testi ile analiz edildi. $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.





Şekil 7: Gerçekleştirilen deneylerin görsel sunumu (Created with BioRender.com).

4. BULGULAR

4.1. ELİMUSERTİB’İN ANTİ-KANSER ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elimusertib’in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde anti-kanser etkisinin belirlenmesi amacıyla WST-1 analizi yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 8’de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre, Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde uygulanan doza bağlı canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

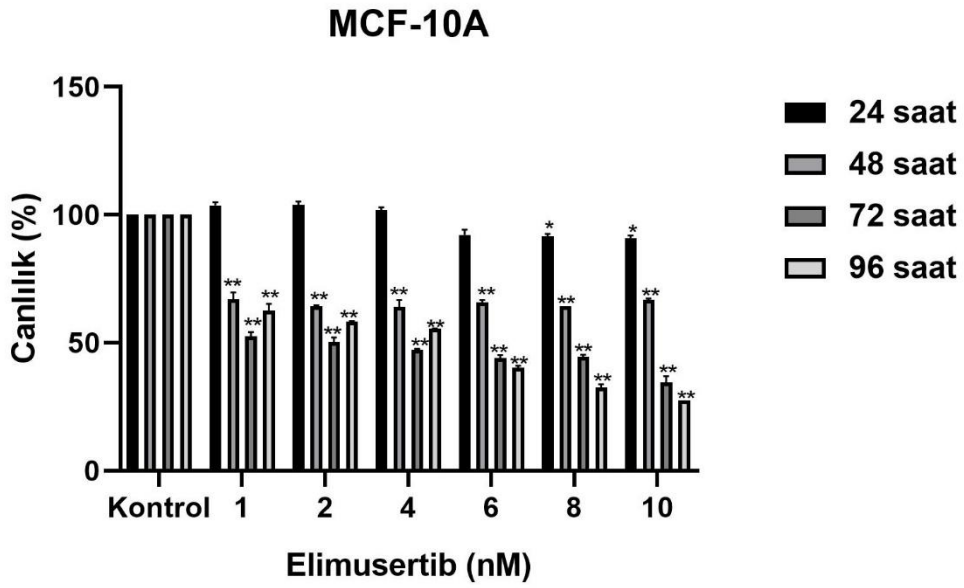
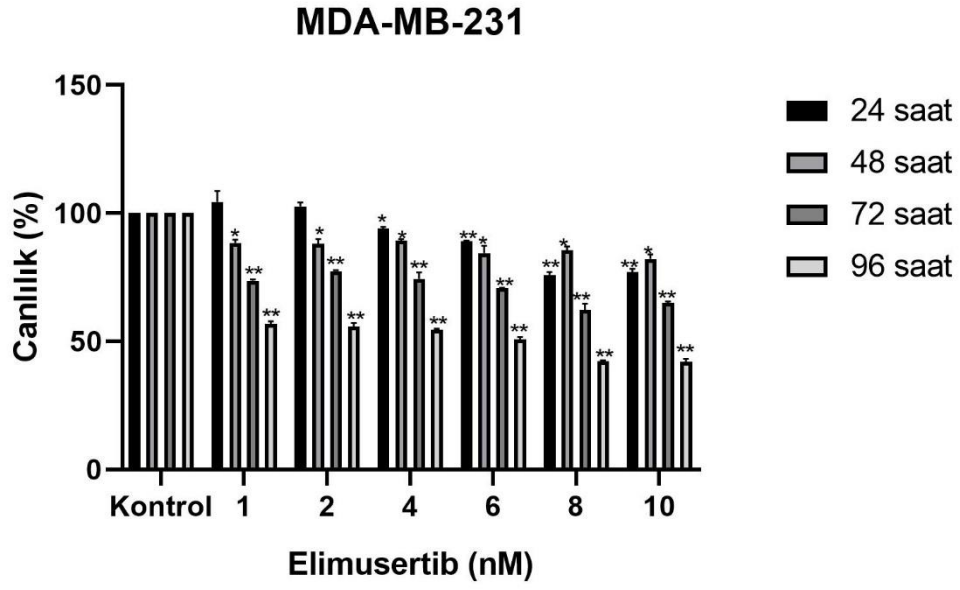
24 saat boyunca 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranı sırasıyla $104,4 \pm 4,2$, $102,7 \pm 1,5$, $94,1 \pm 0,6$, $89,0 \pm 0,3$, $75,9 \pm 1,2$ ve $77,0 \pm 1,2$ olarak belirlenmesine rağmen, 48 saat süresince uygulandığında sırasıyla $88,4 \pm 1,3$, $88,1 \pm 1,8$, $89,3 \pm 0,6$, $84,4 \pm 2,9$, $85,6 \pm 1,5$ ve $82,2 \pm 1,7$ ’e azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak, 72 saat boyunca 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 nM Elimusertib uygulanan hücrelerde canlılık oranının sırasıyla $73,7 \pm 0,5$, $77,4 \pm 0,4$, $74,5 \pm 2,5$, $70,8 \pm 0,2$, $62,2 \pm 2,5$ ve $65,1 \pm 0,5$ istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmekle birlikte, 96 saat süresince canlılık yüzdeleri sırasıyla $56,8 \pm 1,0$, $55,7 \pm 1,5$, $54,4 \pm 0,5$, $50,8 \pm 0,9$, $42,2 \pm 0,3$ ve $42,0 \pm 1,2$ olarak analiz edildi (Şekil 8, $p<0,01$).

Ayrıca, Elimusertib uygulanan MCF-10A kontrol hücrelerinde artan doza bağlı olarak hücrelerde anlamlı derecede toksik etki sergilediği belirlenmiştir. 24 saat boyunca 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 nM Elimusertib uygulanan MCF-10A hücrelerinde canlılık oranı sırasıyla $103,7 \pm 1,3$, $103,8 \pm 1,4$, $101,8 \pm 1,2$, $92,2 \pm 2,0$, $91,6 \pm 1,0$ ve $91,0 \pm 1,0$ olarak tespit edilmesine rağmen, 48 saat süresince uygulandığında sırasıyla $67,0 \pm 2,6$, $64,3 \pm 0,4$, $64,1 \pm 2,6$, $65,8 \pm 0,9$, $64,3 \pm 0,1$ ve $66,7 \pm 0,6$ ’ya azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Ayrıca, 72 saat boyunca 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 nM Elimusertib uygulanan hücrelerde canlılık oranının sırasıyla $52,5 \pm 1,7$, $50,1 \pm 1,9$, $47,3 \pm 0,4$, $44,0 \pm 1,2$, $44,5 \pm 0,9$ ve $34,5 \pm 2,5$ olarak belirlenmesine rağmen, 96 saat süresince canlılık yüzdeleri sırasıyla $62,6 \pm 2,6$, $58,3 \pm 0,1$, $55,5 \pm 0,1$, $40,2 \pm 0,8$, $32,5 \pm 1,4$ ve $27,4 \pm 0,1$ ’e istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 8, $p<0,01$).

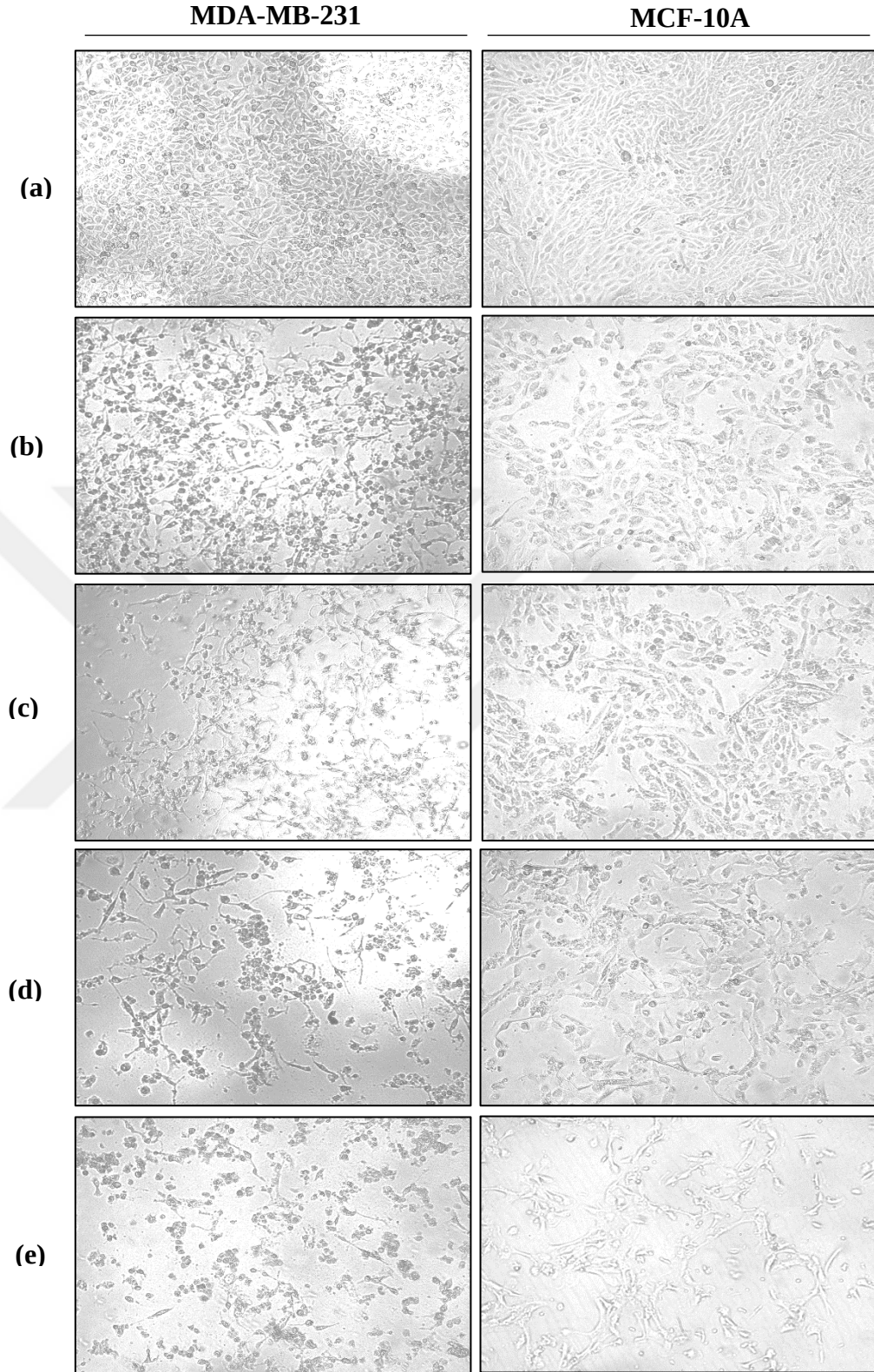
Ayrıca MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde morfolojik değişimler inverted mikroskop ile görüntülenmiştir. Şekil 9’da sunulduğu üzere Elimusertib’in hücrelerde adhezyon bağlantılarda azalmaya neden olarak hücrede hasara neden olduğu görüntülenmiştir.

Sonuç olarak, Elimusertib’in MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde artan doza ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı bir anti-kanser etkiye sahip olduğu belirlenmekle birlikte özellikle 96 saat uygulama süresinde MCF-10A hücrelerinde toksik etkiye neden olduğu tespit edilmiştir.





Şekil 8: Elimusertib'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde anti-kanser etkisinin WST-1 analizi ile değerlendirilmesi ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).



Şekil 9: Elimusertib'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde inverted mikroskop görüntüleri. (a) Kontrol, 72 saat boyunca (b) 6 nM ve (c) 8 nM, 96 saat boyunca (d) 6 nM ve (e) 8 nM Elimusertib uygulanan hücreler.

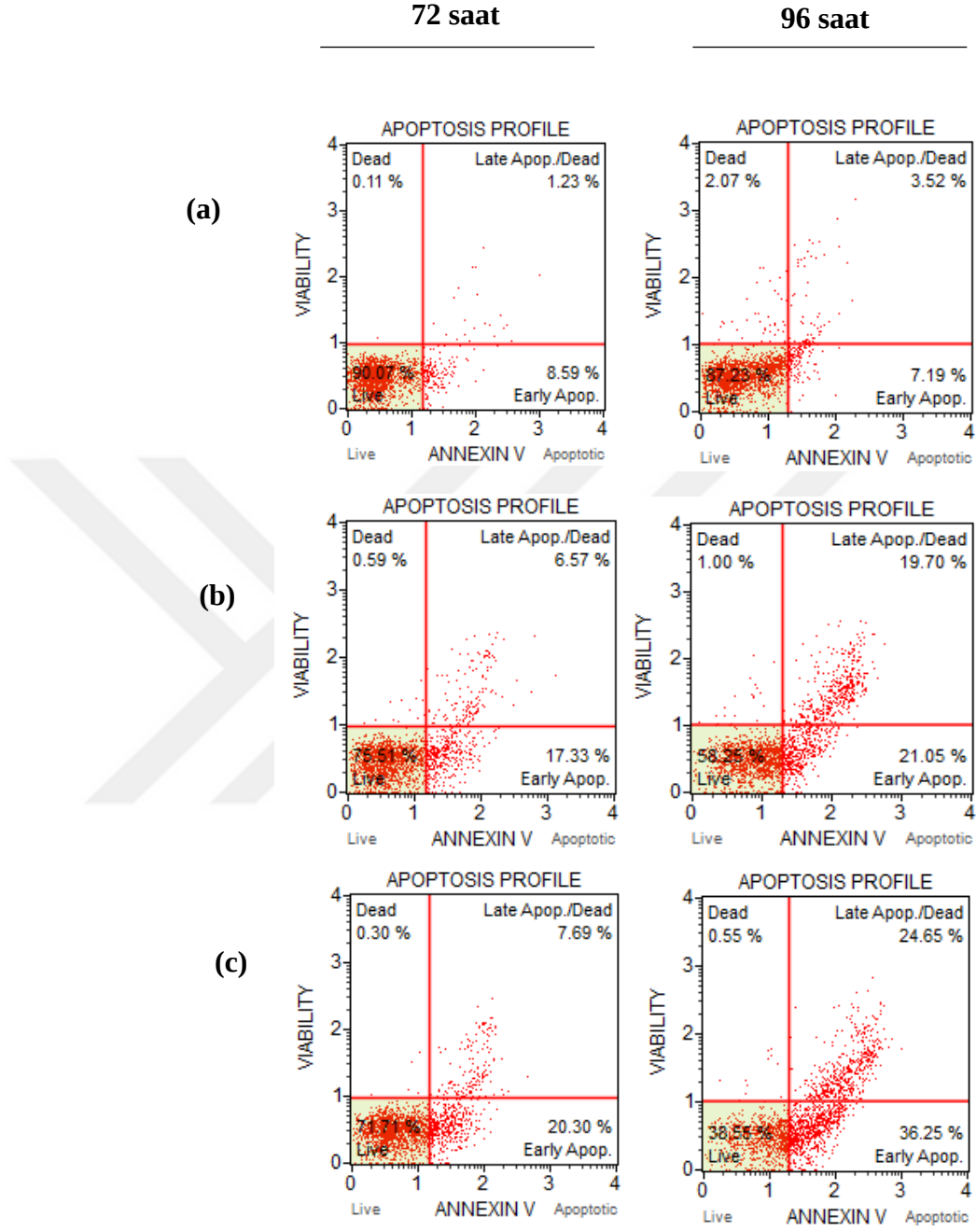
4.2. ELİMUSERTİB’İN APOPTOTİK ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde WST-1 analizine göre etkin olduğu belirlenen dozlarda (6 ve 8 nM) ve uygulama sürelerinde (72 ve 96 saat) karşılaştırmalı olarak Elimusertib’in apoptotik etkisinin değerlendirilmesi için Annexin V analizi gerçekleştirilmiş olup, elde edilen veriler Şekil 10-12’de sunulmuştur. Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubuna kıyasla Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerde toplam apoptotik hücre ölüm miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı analiz edildi ($p<0,01$).

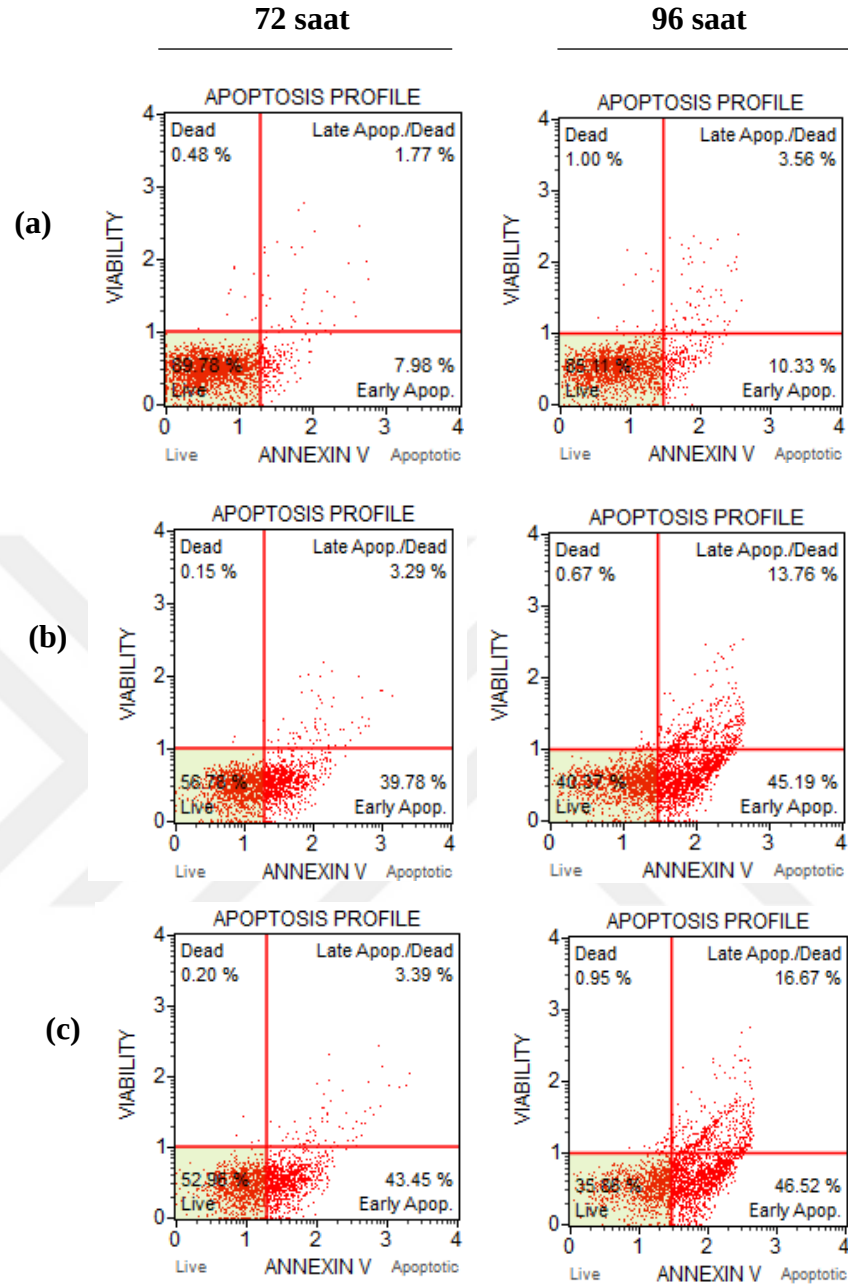
72 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde toplam apoptotik hücre miktarı kontrol grubuna göre ($9,8 \pm 0,4$) karşılaştırıldığında sırasıyla $25,1 \pm 2,2$ ve $28,1 \pm 2,2$ iken, 96 saat süresince Elimusertib uygulandığında sırasıyla $40,9 \pm 1,7$ ve $61,7 \pm 1,2$ ’ye istatistiksel olarak arttığı analiz edildi (Şekil 10 ve 12, $p<0,01$).

MCF-10A hücrelerinde 72 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulandığında ise toplam apoptotik hücre miktarı kontrol grubuna göre ($9,8 \pm 0,1$) karşılaştırıldığında sırasıyla $43,4 \pm 0,5$ ve $47,0 \pm 0,2$ azaldığı tespit edilmesi ile birlikte 96 saat uygulama süresinde kontrol grubuna göre ($13,6 \pm 0,4$) sırasıyla $59,5 \pm 0,8$ ve $63,7 \pm 0,7$ olarak belirlendi (Şekil 11 ve 12, $p<0,01$).

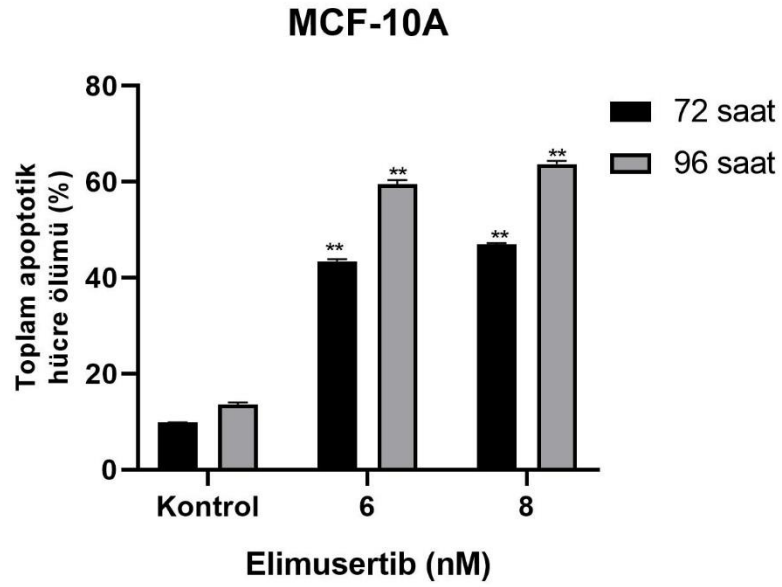
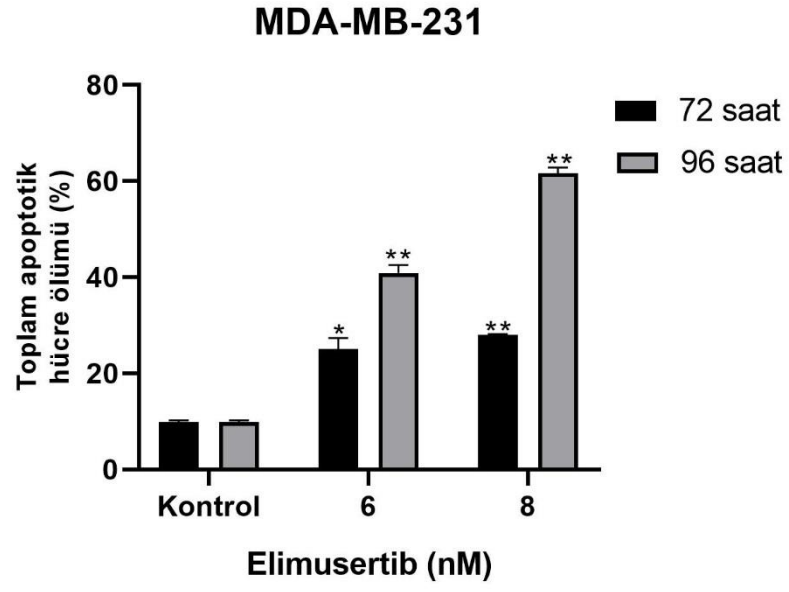
Sonuç olarak, Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkinin doza ve uygulama süresine bağlı olarak arttığı ve hücrelerde hem erken hemde geç apoptotik yüzde oranlarında anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 10: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesinde Annexin V analizi histogramları (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ölüm yüzdelerinin değerlendirilmesi.



Şekil 11: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MCF-10A hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesinde Annexin V analizi histogramları (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ölüm yüzdelerinin değerlendirilmesi.



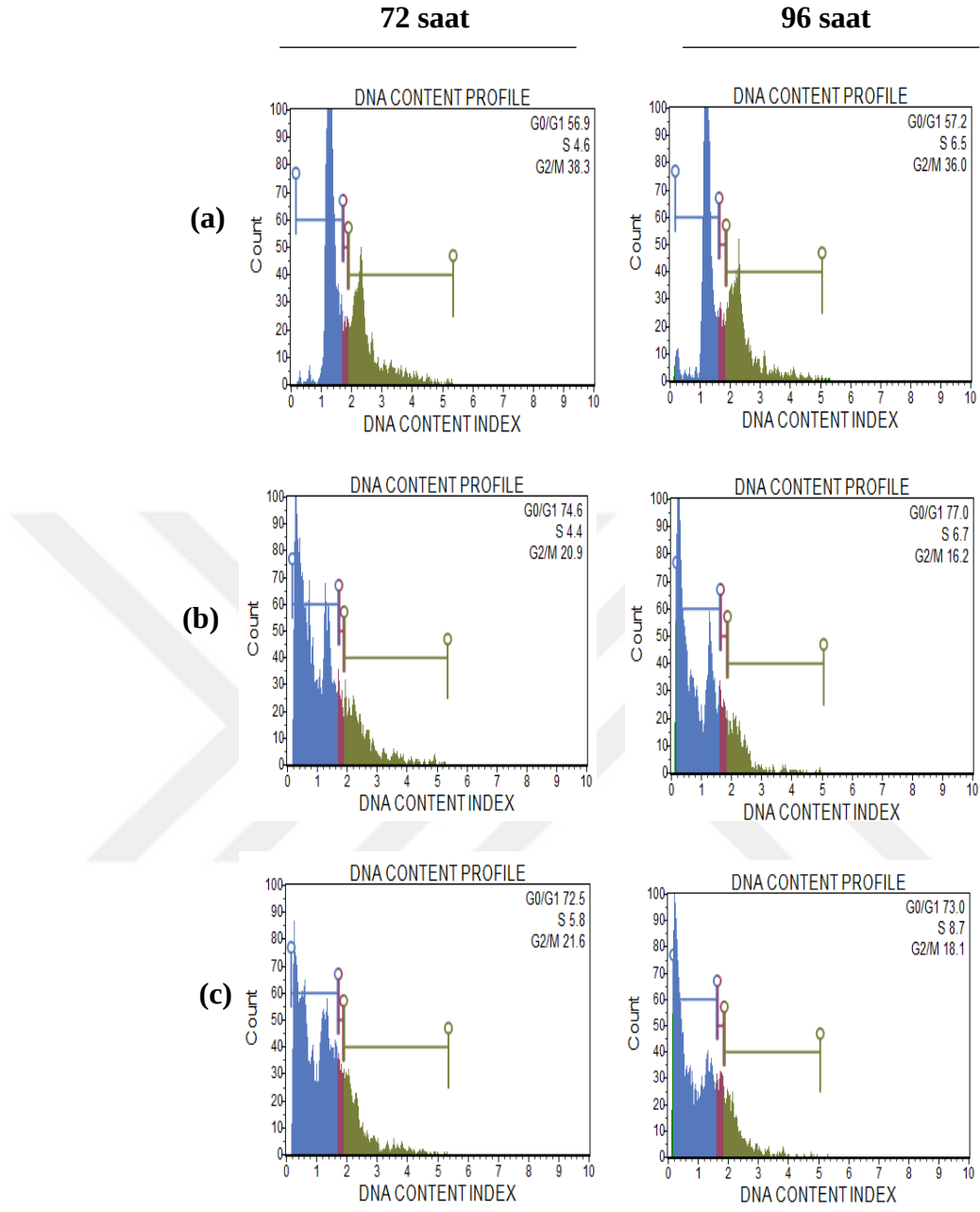
Şekil 12: Elimusertib'in neden olduğu toplam apoptotik ölümün istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$)

4.3. ELİMUSERTİB'İN HÜCRE SIKLUSU ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

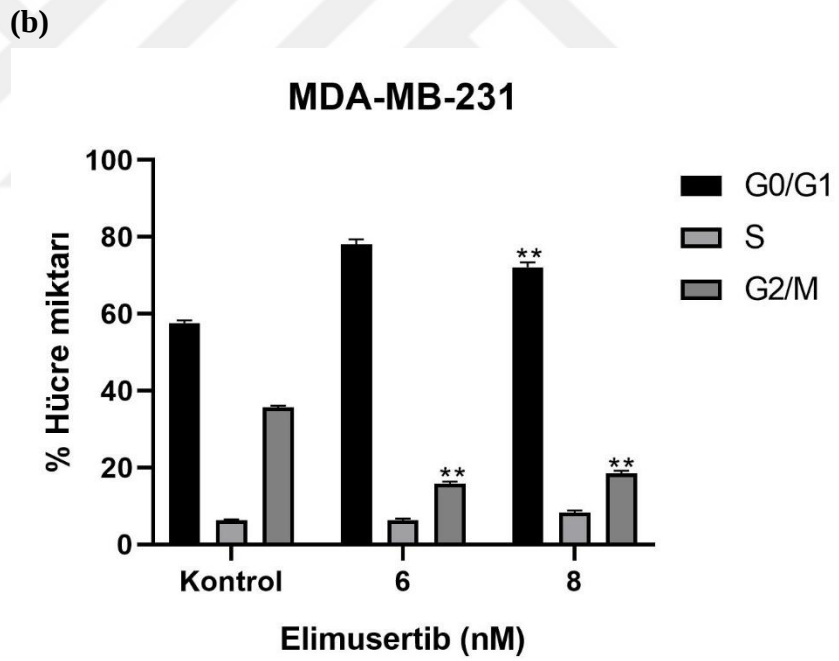
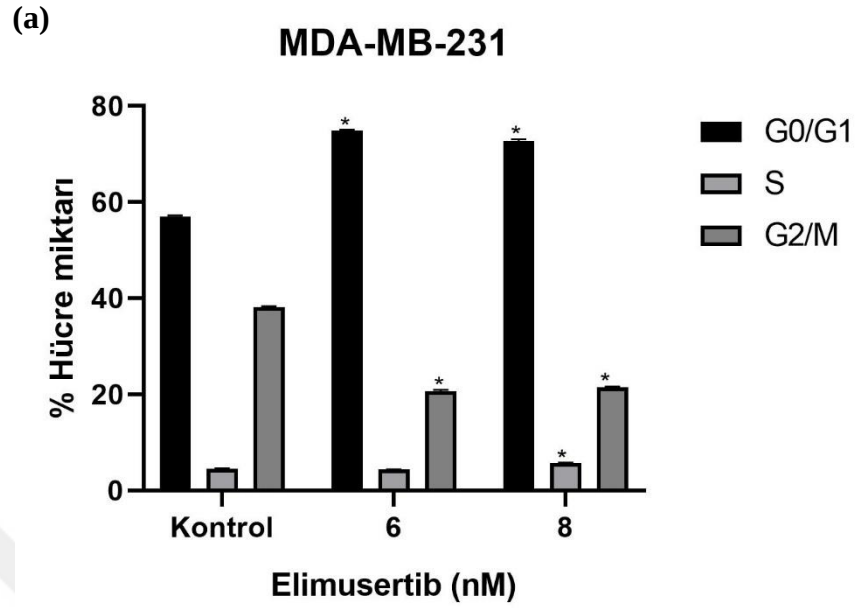
Elimusertib'in hücre siklusunda etkisinin değerlendirilmesi amacıyla hücre siklusu analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 13-16'da sunulduğu üzere, Elimusertib'in TNMK ve kontrol hücrelerinde G0/G1 fazında tutulmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

72 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna göre (G0/G1: $57,1 \pm 0,1$; S: $4,5 \pm 0,1$; G2/M: $38,2 \pm 0,2$) G0/G1 fazında hücre miktarı sırasıyla $74,8 \pm 0,3$ ve $72,8 \pm 0,4$ istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmesine rağmen ($p < 0,01$), S fazının sırasıyla $4,4 \pm 0,1$ ve $5,7 \pm 0,1$ 'e ve G2/M fazının sırasıyla $20,7 \pm 0,3$ ve $21,5 \pm 0,1$ 'e azaldığı tespit edildi (Şekil 13 ve 14). Ayrıca, 96 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulandığında ise kontrol grubuna göre (G0/G1: $57,7 \pm 0,6$; S: $6,4 \pm 0,2$; G2/M: $35,7 \pm 0,4$) G0/G1 fazında hücre miktarı sırasıyla $78,0 \pm 1,4$ ve $72,1 \pm 1,3$ istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı analiz edilmesine rağmen ($p < 0,01$), S fazının sırasıyla $6,4 \pm 0,4$ ve $8,3 \pm 0,6$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde G2/M fazının sırasıyla $15,8 \pm 0,6$ ve $18,6 \pm 0,6$ 'e azaldığı tespit edildi (Şekil 13 ve 14).

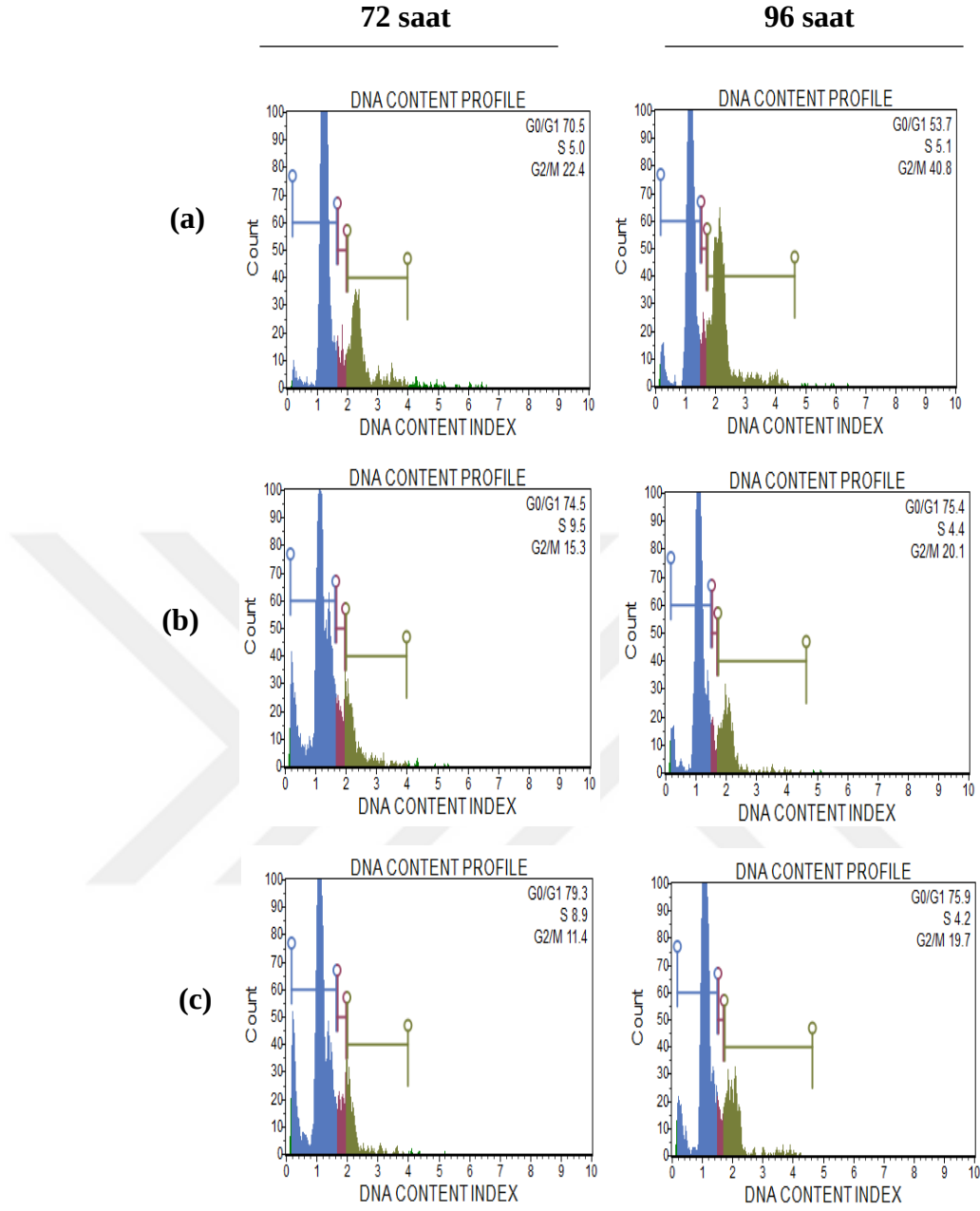
MCF-10A hücrelerinde ise 72 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulandığında kontrol grubuna göre (G0/G1: $70,4 \pm 0,2$; S: $5,1 \pm 0,1$; G2/M: $22,2 \pm 0,4$) G0/G1 fazında hücre miktarı sırasıyla $74,8 \pm 0,4$ ve $79,4 \pm 0,1$ istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmekle birlikte ($p < 0,01$), S fazının sırasıyla $9,3 \pm 0,3$ ve $8,7 \pm 0,3$ 'e arttığı analiz edildi. Ayrıca, G2/M fazının sırasıyla $15,1 \pm 0,3$ ve $11,2 \pm 0,4$ 'e azaldığı tespit edildi (Şekil 15 ve 16). Diğer yandan, 96 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre (G0/G1: $54,1 \pm 0,6$; S: $5,0 \pm 0,2$; G2/M: $40,2 \pm 0,9$) G0/G1 fazında hücre miktarı sırasıyla $75,2 \pm 0,3$ ve $75,7 \pm 0,3$ istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı analiz edilmesine rağmen ($p < 0,01$), S fazının sırasıyla $4,5 \pm 0,1$ ve $4,3 \pm 0,1$ ve G2/M fazının sırasıyla $20,3 \pm 0,3$ ve $19,9 \pm 0,2$ 'e azaldığı tespit edildi (Şekil 15 ve 16).



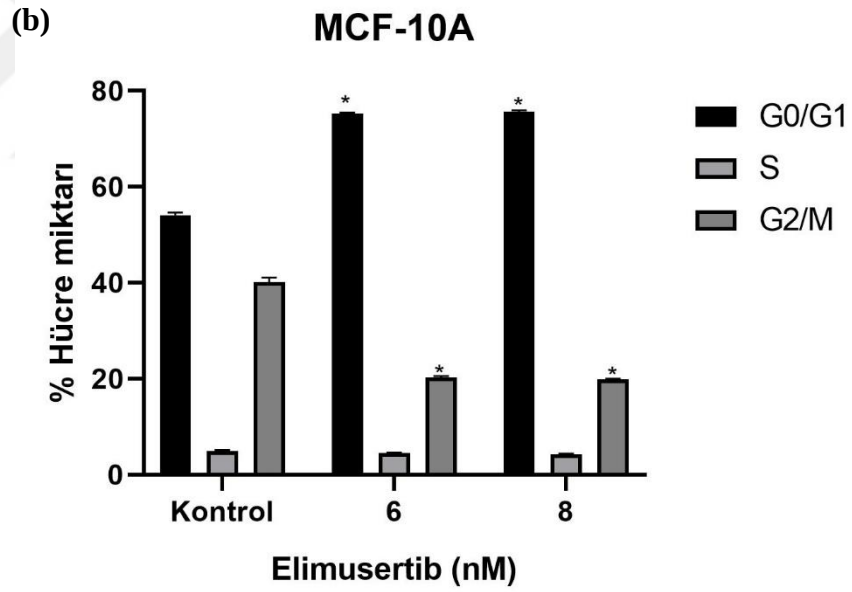
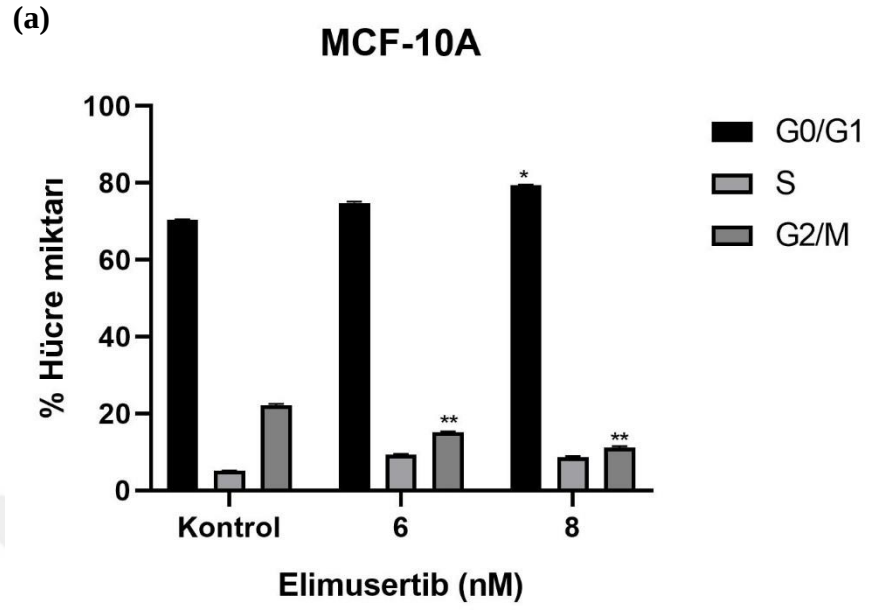
Şekil 13: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde neden olduğu hücre siklusu etkisinin değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda G0/G1, S ve G2/M fazlarında biriken yüzde hücre değerleri.



Şekil 14: Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre siklusunda etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).



Şekil 15: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde neden olduğu hücre siklusu etkisinin değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda G0/G1, S ve G2/M fazlarında biriken yüzde hücre değerleri.



Şekil 16: Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde hücre siklusunda etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).

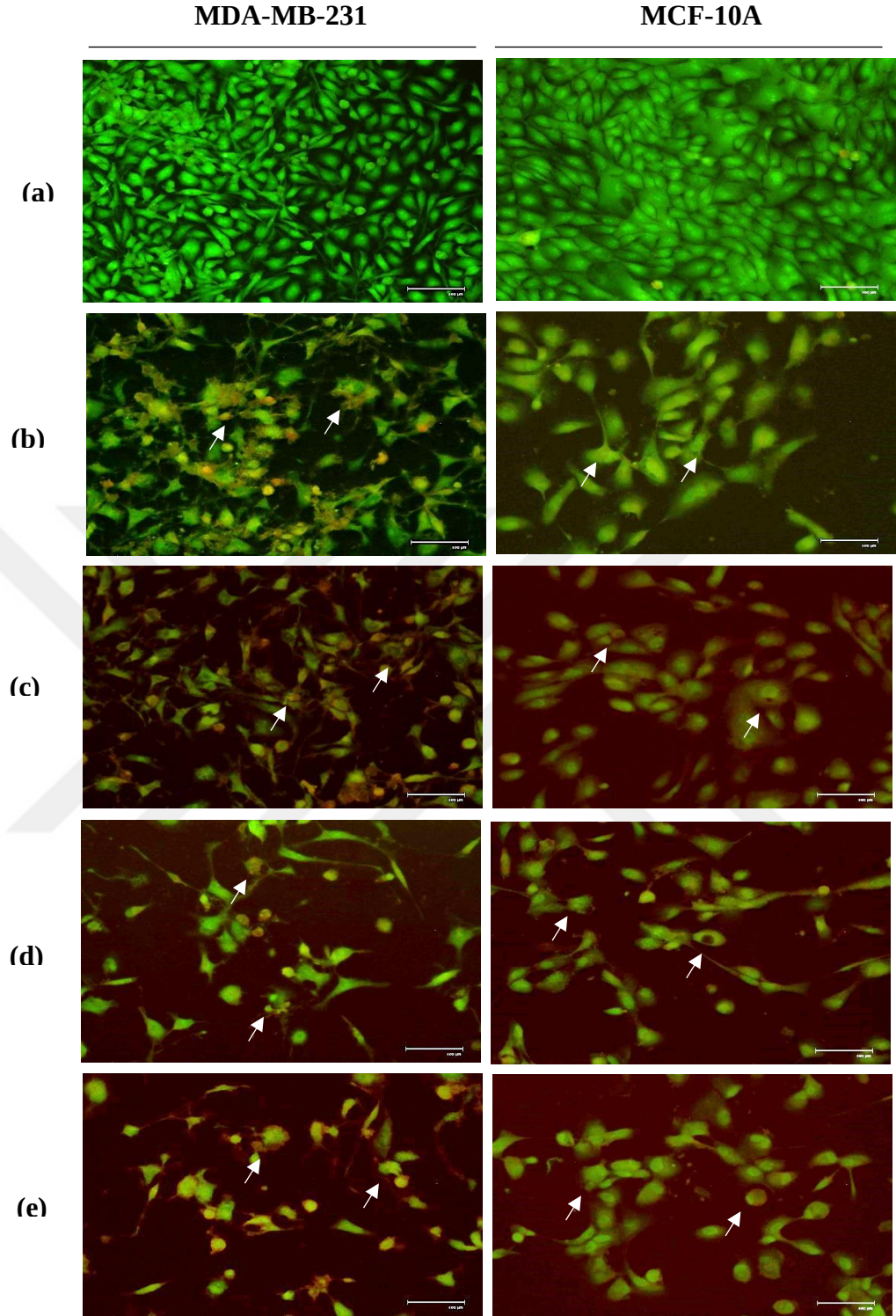
4.4. ELİMUSERTİB’İN HÜCRE MORFOLOJİSİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elimusertib’in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler AO boyaması ile görüntülenerek elde edilen görüntüler Şekil 17’de sunulmuştur.

Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubu daha mekiksi veya iğsi yapıda normal morfolojide görüntülenmesine rağmen, Elimusertib’in artan konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücrelerde DNA fragmentasyonu, sitoplazmik büzülme ve hücre membranında tomurcuklanmalar görüntülendi.

MCF-10A hücrelerinde ise kontrol grubuna göre Elimusertib uygulandığında artan konsantrasyona bağlı olarak nükleer parçalanma ve hücre membranında tomurcuklanmalar görüntülendi.

Sonuç olarak, Elimusertib’in MDA-MB-231 hücrelerinde erken ve geç apoptotik ölüme neden olduğu belirlenmekle birlikte, toksik etkisinden dolayı MCF-10A hücrelerinde ciddi nükleer hasara neden olduğu görüntülendi.



Şekil 17: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre morfolojisinde değişimlerin görüntülenmesi (a) Kontrol, 72 saat boyunca (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması ve 96 saat boyunca (d) 6 nM Elimusertib ve (e) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda hücre morfolojisinde değişimler.

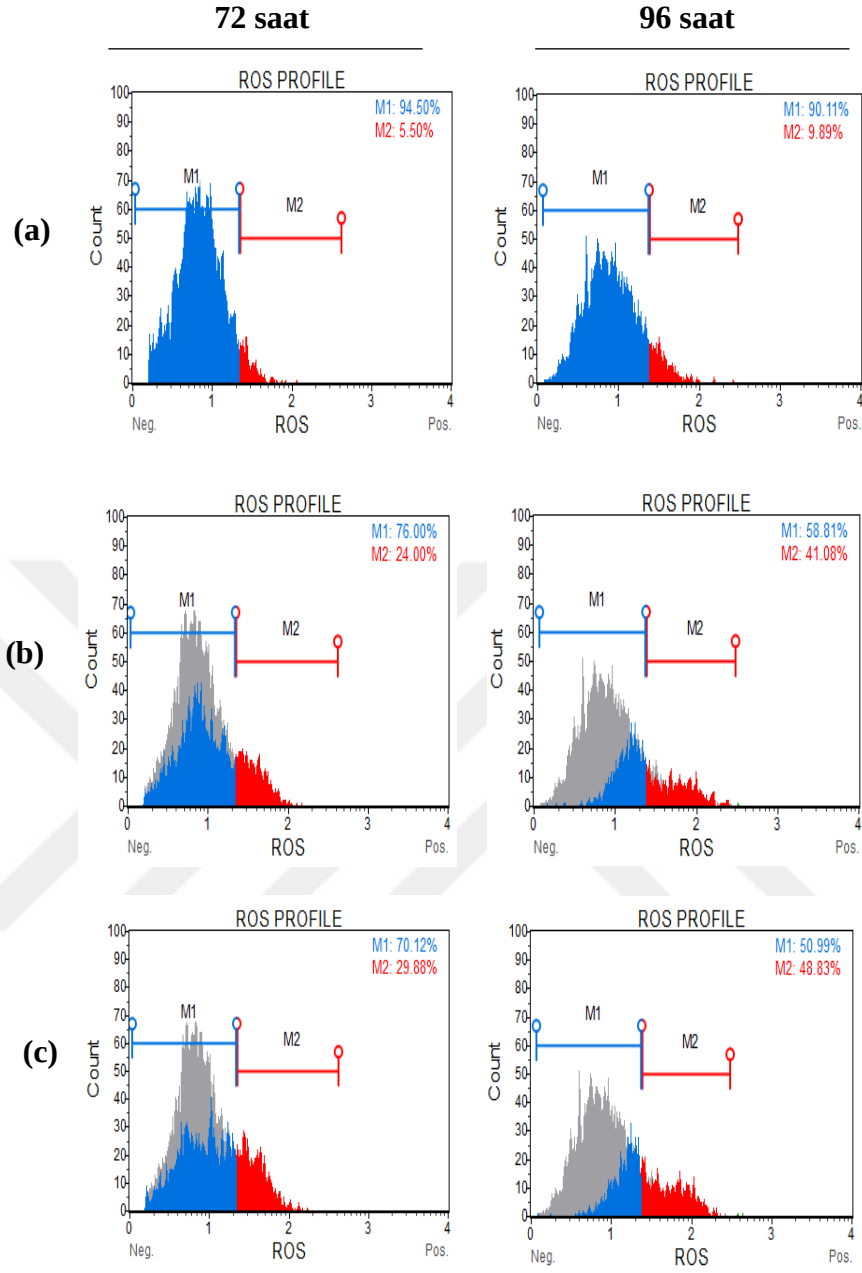
4.5. ELİMUSERTİB’İN İNTRASELÜLER ROS SEVİYESİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Elimusertib’in neden olduğu intraselüler ROS miktarında değişimlerin belirlenmesi için Oksidatif stres kiti kullanılmış olup, elde edilen veriler Şekil 18-21’de sunulmuştur.

72 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarı kontrol grubuna (ROS(+): $5,3 \pm 0,4$) göre sırasıyla $23,7 \pm 0,5$ ve $29,4 \pm 0,6$ ’a arttığı belirlenmekle birlikte 96 saat inkübasyon sonunda ROS (+) miktarının sırasıyla $42,0 \pm 1,4$ ve $50,4 \pm 2,2$ ’ye istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı analiz edildi (Şekil 18 ve 19, $p < 0,01$).

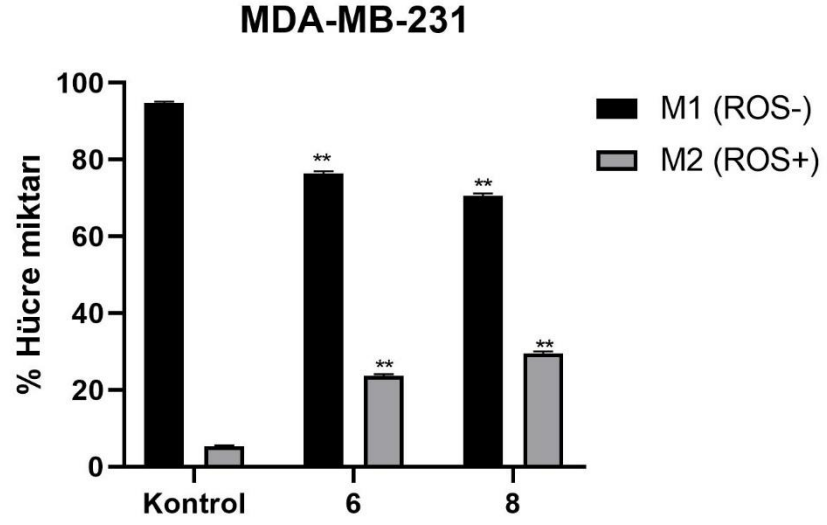
Ayrıca, MCF-10A hücrelerinde Elimusertib uygulandığında intraselüler ROS miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi ($p < 0,01$). 72 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan hücrelerde ROS(+) miktarı sırasıyla $37,9 \pm 1,3$ ve $39,8 \pm 1,1$ iken, 96 saat inkübasyon sonunda sırasıyla $48,4 \pm 0,6$ ve $49,3 \pm 0,4$ olarak analiz edildi (Şekil 19 ve 20).

Sonuç olarak, Elimusertib’in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde intraselüler ROS miktarında artışa neden olduğu analiz edildi.

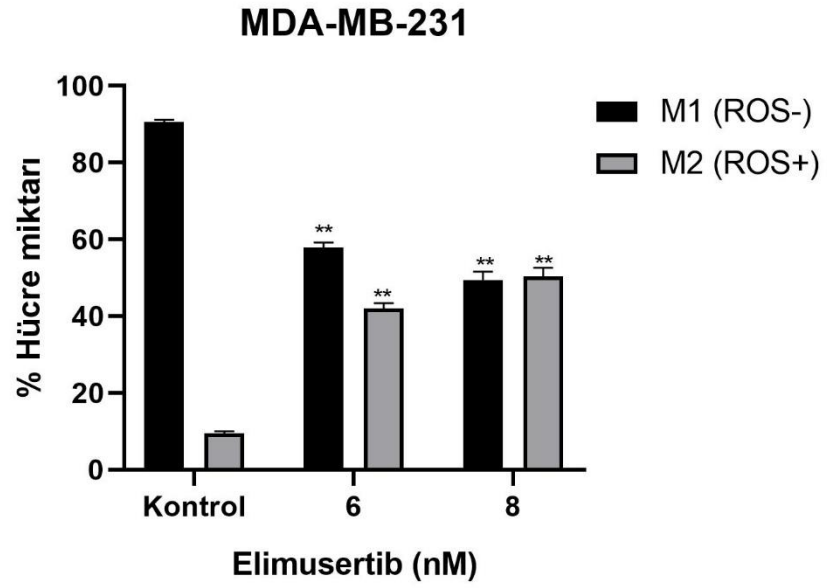


Şekil 18: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarının değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda ROS(-) ve ROS(+) yüzdelерinde değışimler.

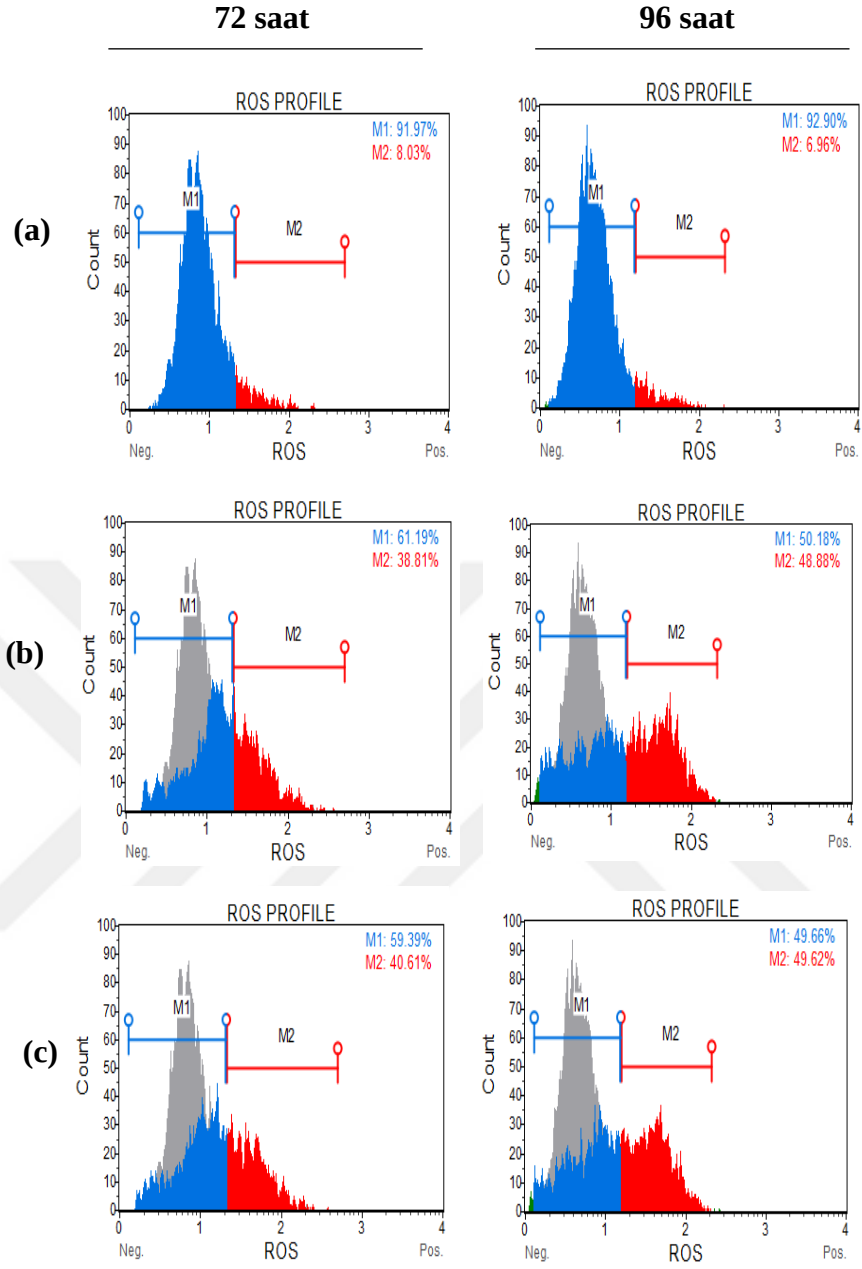
(a)



(b)

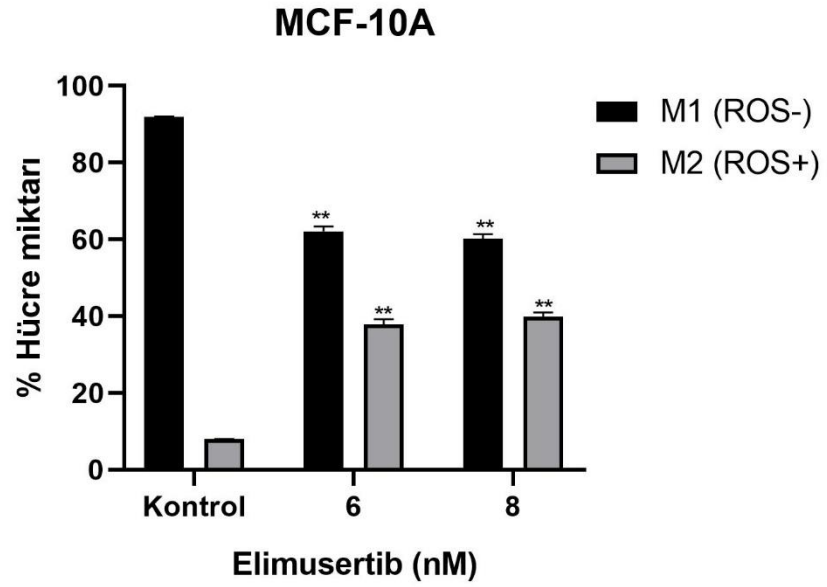


Şekil 19: Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarında etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

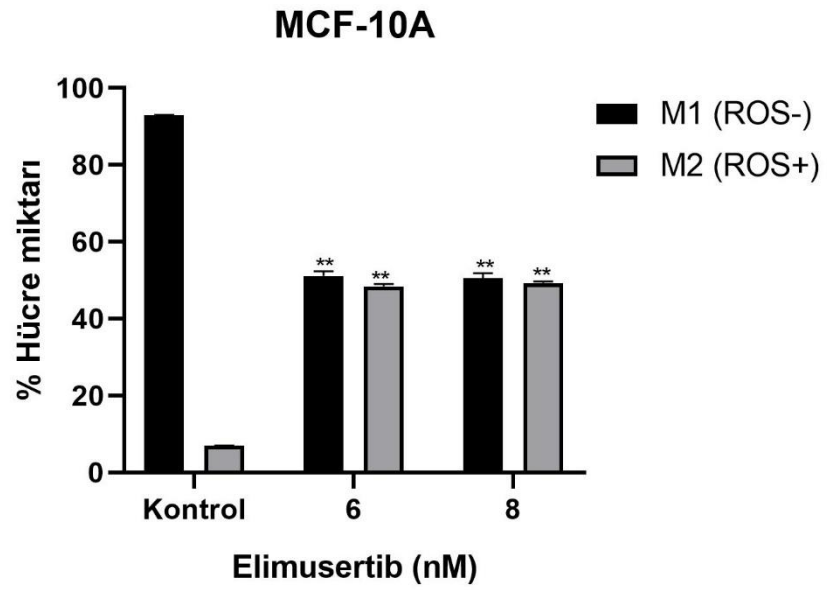


Şekil 20: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MCF-10A hücrelerinde intraselüler ROS miktarının değerlendirilmesi (a) Kontrol, (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda ROS(-) ve ROS(+) yüzdelerinde değişimler.

(a)



(b)

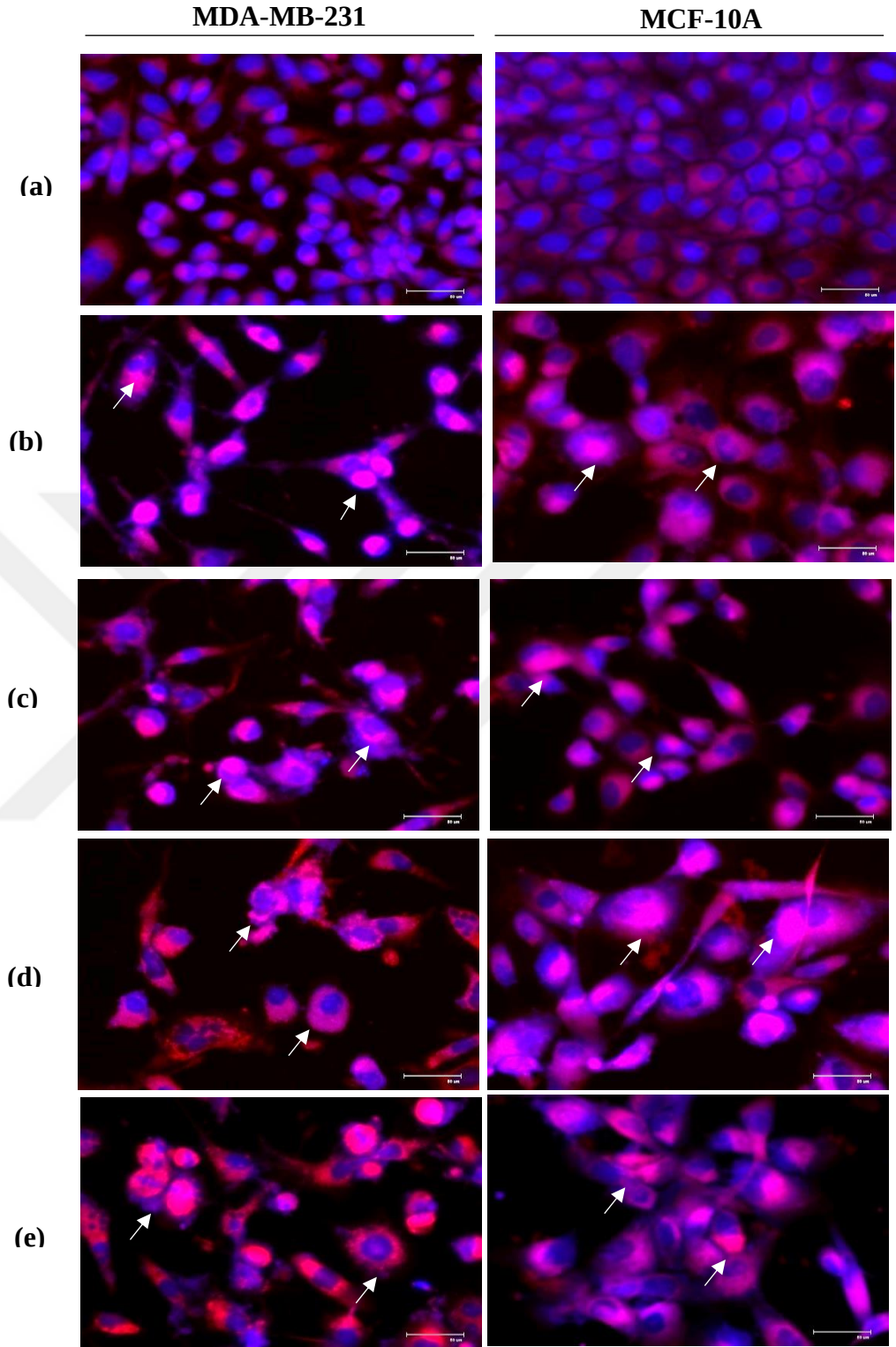


Şekil 21: Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde intraselüler ROS miktarında etkisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon sonunda Elimusertib'in etkisi ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.6. MİTOKONDİRİ MORFOLOJİSİNDE DEĞİŞİMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde mitokondriyel hasarın görüntülenmesi için MitoTracker Red boyası kullanılmış ve elde edilen görüntüler Şekil 22’de sunulmuştur. Kontrol gruplarında hücrelerin tüm alanlarına uzanan düşük floresans yoğunlukta mitokondri morfolojileri gözlemlemesine rağmen, Elimusertib’in artan konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı, hücrelerde artmış mitokondriyal floresans yoğunluk görüntülendi. Ayrıca, özellikle 96 saat boyunca 8 nM Elimusertib uygulanan hücrelerde çok sayıda yuvarlak ve parçalanmış perinükleer mitokondriler gözlemlendi.

Sonuç olarak, özellikle 96 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde artan mitokondriyal kütleden dolayı çok sayıda mitokondriyal floresans kümelenme alanları görüntülenmiş ve bu nedenle mitokondriyal fisyon/füzyon düzensizliğini göstermektedir.



Şekil 22: 72 ve 96 saat boyunca Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde mitokondriyal hasarın görüntülenmesi (a) Kontrol, 72 saat boyunca (b) 6 nM Elimusertib ve (c) 8 nM Elimusertib uygulaması ve 96 saat boyunca (d) 6 nM Elimusertib ve (e) 8 nM Elimusertib uygulaması sonucunda mitokondriyal hasar.

4.7. ELİMUSERTİB’İN DNA HASAR YANITINDA ETKİSİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Elimusertib’in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde DNA hasar yanıtında etkisinin değerlendirilmesi için ATR, γ -H2AX, p-Chk1, p-Cdc2, Siklin B, p-Rb ve Siklin D protein düzeyleri western blot analizi ile değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 23’te sunulmuştur. Ayrıca Elimusertib’in hücrelerde neden olduğu apoptotik ölüm PAPP, Kaspaz-9, Kaspaz-3 ve c-Kaspaz-3 protein düzeylerinde değişimlerin belirlenmesi ile desteklenmiştir.

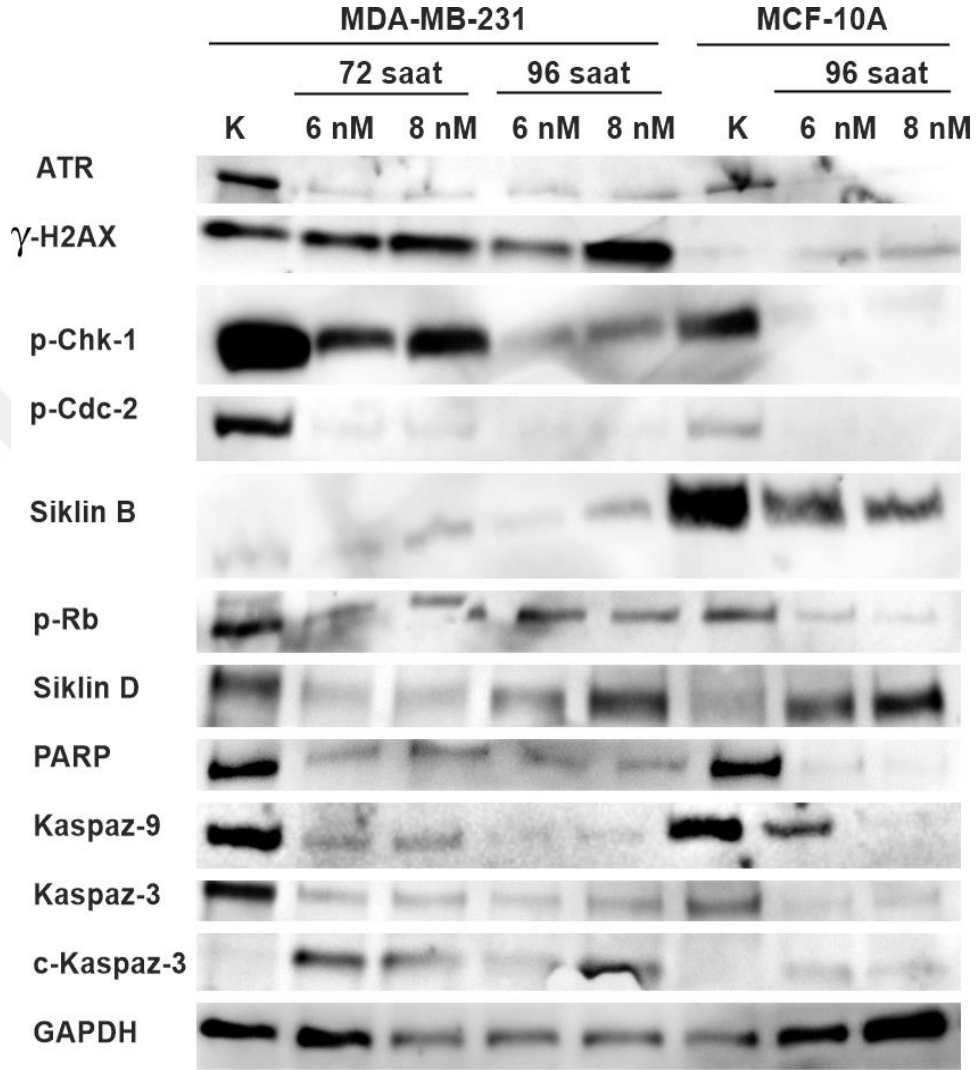
MDA-MB-231 hücrelerinde Elimusertib’in artan uygulama süresi ve dozuna bağlı olarak kontrol grubuna göre ATR, p-Chk1 ve p-Cdc2 protein ekspresyon düzeylerinin azaldığı görüntülenmesine rağmen, artan DNA kırıklarından dolayı γ -H2AX ve Siklin B protein düzeylerinin arttığı tespit edildi. Ayrıca, G0/G1 fazında geçişte rol alan p-Rb’nin protein düzeyi Elimusertib uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre azalmakla birlikte, Siklin D protein seviyesinin özellikle 96 saat boyunca 8 nM Elimusertib uygulanan hücrelerde arttığı görüntülendi.

MCF-10A hücrelerinde ise Elimusertib’in artan dozuna bağlı olarak kontrol grubuna göre ATR, p-Chk1, p-Cdc2 ve Siklin B protein ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirlenmesi ile birlikte, ATR inhibisyonuna bağlı olarak γ -H2AX protein düzeyinin arttığı tespit edildi. Ayrıca, Elimusertib’in MCF-10A hücrelerinde G0/G1 fazında hücre birikmesine neden olmasından dolayı, kontrol grubuna göre p-Rb protein ekspresyon düzeyinde Elimusertib’in artan dozuna bağlı olarak azaldığı ve Siklin D protein düzeyinin arttığı analiz edildi.

Elimusertib’in hücrelerde apoptotik etkisi değerlendirildiğinde ise, Elimusertib’in artan dozuna bağlı olarak kontrol grubuna göre hücrelerde toplam PARP, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmesi ile birlikte, apoptoz belirteci olarak c-Kaspaz-3 protein düzeyinin arttığı belirlendi.

Sonuç olarak, ATR inhibitörü olarak Elimusertib’in MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde etkin bir şekilde ATR temelli DNA hasar yanıtında rol alan proteinlerin ekspresyon düzeyini baskıladığı ve hücrelerde apoptotik ölüme neden olduğu protein

düzeyinde belirlenmiştir. Ayrıca, MCF-10A hücrelerinde Elimusertib'in ATR inhibisyonuna bağlı olarak hücre siklusunda ve apoptotik ölümden etkisi protein düzeyinde görüntülenmiştir.



Şekil 23: 72 ve 96 saat boyunca 6 ve 8 nM Elimusertib uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde kontrol grubuna göre DNA hasar yanıtında ve apoptozda rol alan proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışmada, ilk kez Elimusertib'in MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde antikanser etkisi moleküler seviyede ortaya konmuştur. Bulgular, Elimusertib'in artan konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak, TNMK hücrelerinde apoptoza, G0/G1 fazında tutulmaya, artan ROS miktarına ve mitokondriyal hasara neden olduğu belirlenmiştir. Elimusertib uygulanan hücrelerde ATR inhibisyonuna bağlı olarak azalan ATR, Chk1, Cdc2 ve p-Rb ve artan DNA kırıklarından dolayı γ H2AX, Siklin B ve Siklin D protein ekspresyon düzeylerinin arttığı analiz edilmiştir. Ayrıca, Elimusertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde azalan toplam PARP, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 protein düzeyleri ile birlikte hücrelerde apoptotik ölüme neden olduğu hem kantitatif hem de kalitatif olarak tespit edilmiştir. Diğer yandan, Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde toksik etkisinden dolayı, apoptotik ölüme, G0/G1 fazında artışa, ATR, Chk-1, Cdc-2 ve p-Rb proteinlerin ekspresyon düzeylerinde azalışa ve artan Siklin B ve Siklin D protein ekspresyon düzeylerine neden olduğu tespit edilmiştir.

ATR inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinde terapötik etkisine dair literatürde sınırlı sayıda prelinik çalışma mevcuttur. Gerçekleştirilen çalışmalarda VE-821, AZD6738, M4344, M6620 ve BAY-1895344 ATR inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinde (prostat, over, glioblastoma, meme, nöroblastoma, osteosarkoma vb.) sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Jo ve ark. (2021) farklı tiplerde kanser hücrelerinde (H82, H446, H146, H209, A549, DMS114, SAOS-2, H1299, K562, HCT116, CCRFCM, MOLT-4, SK-OV-3, DU-145 ve U2OS) ve hasta türevli organoid ksenograft LuCaP 145.2, LuCaP 173.1 ve MB155 prostat kanseri modellerinde M4344 (VX-803), BAY1895344, berzosertib (M6620/VX-970) ve AZD6738 etkisini araştırmışlardır. Özellikle 72 saat boyunca 0.5-5 μ M ATR inhibitörleri uygulanan DU-145 hücrelerinde VE-821, M6620 ve AZD6738'e göre daha düşük konsantrasyonlarda BAY1895344 ve M4344 daha etkin olduğu belirlenmiştir. M4344'ün replikasyon katastrofuna, hücre döngüsünde yıkıma ve tamir edilemeyen DNA hasarına neden olarak diğer ATR inhibitörlerine göre daha etkin olduğu belirlenmiştir (Jo et al 2021). Suzuki ve ark. (2022) HT29, SW480, HCT116 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde ve ksenograft modellerde

AZD6738 (0,5 μ M) ve 5-FU (5 μ M) kombinasyonunun sadece 5-FU'ya göre daha fazla sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu ve 72 saat uygulama süresinde sadece 5-FU'ya göre hücrelerde S fazında artışa neden olarak AZD6738'in 5-FU temelli G2 kontrol noktası aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Suzuki et al 2022). Tu ve ark. (2018) tarafından ise VX-970 (80 nM) ATR inhibitörü ile birlikte radyoterapinin MDA-MB-231, BT549 ve HCC1806 meme kanseri ve MCF-10A normal meme hücresi sitotoksik etkisi analiz edilmiş ve ATR inhibitörünün radyoterapinin TNMK hücrelerinde etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir (Tu et al 2018).

Ayrıca Elimusertib'in farklı kanser tiplerinde potansiyel terapötik etkisinin belirlendiği sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Wickstroem ve ark. (2019) çalışmalarında MFM-223, KATO III ve SUM 52-PE mide kanseri hücrelerinde 10 nM sadece BAY 1895344 ve FGFR2-TTC ile karşılaştırmalı olarak kombin etkisinin daha fazla sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Sadece 10 nM BAY 1895344 uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre canlılık düzeylerinde anlamlı bir azalış olmadığı belirlenmiştir (Wickstroem et al 2019). Ayrıca, Wegner ve ark. (2020) bir dizi kanser hücre hattında BAY 1895344 IC₅₀ değeri 9-490 nmol/L aralığında olduğu ve özellikle ATM yolağını etkileyen mutasyon taşıyan hücrelerin çoğunluğunun BAY 1895344'e daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Wegner et al 2020). Tang ve ark. (2021) RM-9, RM-1, RM-1-BM, C4-2b ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde BAY1895344 veya VX-970 ve olaparibin kombin sitotoksik ve DNA hasarında etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ATR inhibitörlerinin olaparibe göre daha etkili olduğu ve olaparibin neden olduğu G2/M fazında hücre birikmesini azaltarak G1 fazında hücre birikmesine neden olduğu belirlenmiştir (Tang et al 2021). Sule ve ark. (2021) tarafından AZD6738, VE-822, ATRIN-175 ve BAY 1895344 U87, HCT116 ve LN229 glioblastoma hücrelerinde sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve BAY 1895344 hücreler için sırasıyla IDH1 mutasyonuna göre duyarlılıkları 6.78, 1.97 ve 1.63-kat olarak tespit edilmiştir (Sule et al 2021). Szydzik ve ark. (2021) tarafından ise 0-1000 nM BAY 1895344 uygulamasının CLB-BAR (IC₅₀=51,24 $\pm$ 3,66 nM) ve CLB-GE BAR (IC₅₀= 47,57 $\pm$ 1,44 nM) nöroblastoma hücrelerinde sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve hücrelerde G2/M fazında tutulmaya neden olduğu belirlenmiştir (Szydzik et al 2021).

Mevcut tez çalışmasında, MDA-MB-231 hücrelerinde Elimusertib'in özellikle 96 saat inkübasyon sonunda canlılık oranında anlamlı bir azalışa neden olduğu belirlenmiş olup, IC₅₀ konsantrasyonu 72 saat için $11,08 \pm 1,46$ nM ve 96 saat için $6,26 \pm 0,25$ nM olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda, Elimusertib'in ilk kez MDA-MB-231 hücrelerinde antikanser etkinliği ortaya konmuştur. Ayrıca, gerçekleştirilen Annexin V analizi sonucunda Elimusertib'in artan konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Szydzik ve ark. (2021) CLB-BAR ve CLB-GE nöroblastoma hücrelerinde artan kesilmiş PARP ve Kaspaz-3 miktarı ile birlikte kritoizinib ile BAY-1895344 kombin uygulamasının apoptotik etkiye neden olduğunu belirlemişlerdir. Sule ve ark. (2021) AZD6738 ATR inhibitörü ile ATR inhibisyonu sonucunda özellikle IDH1 mutant kanser hücrelerinde S fazı kontrol noktasını geçerek DNA'da çift zincir kırıklarının oluşması sonucunda olgunlaşmamış mitotik geçiş ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir. Bu kapsamda, mevcut tez çalışmasında Elimusertib'in TNMK hücrelerinde apoptotik etkisi hem Annexin V analizi hemde AO boyaması ile ilk kez değerlendirilmiştir. Diğer yandan, Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde özellikle 96 saat inkübasyon sonrasında toksik etkiye sahip olduğu ve apoptotik ölüme neden olduğuda tespit edilmiştir. Tu ve ark. (2018) çalışmalarında MCF-10A hücrelerinde VX-970'in radyoterapi ile birlikte uygulandığında radyoterapinin neden olduğu toksisiteyi arttırmadığı belirlenmiştir (Tu et al 2018). Bu nedenle, MCF-10A hücrelerinde Elimusertib'in toksisitesini azaltabilecek yenilikçi formülasyonların veya kombin tedavi stratejilerinde toksisitesinin belirlenmesine yönelik ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ATR inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinde hücre siklusunda G0/G1, S ve G2/M fazlarında tutulmaya neden olduğu belirlenmiştir. ATR'nin inhibisyonu kanser hücrelerinde DNA tamirinin engellenmesinin yanı sıra hücre siklusu kontrol noktalarının inhibe edilmesine yol açmaktadır. Nghiem ve ark. (2001), U2OS p53 normal osteosarkom hücrelerinde G1 kontrol noktası kaybının ATR inhibisyonu ile hücrelerde seçici bir şekilde erken kromatin yoğunlaşmasına duyarlılığı arttırdığını ve bu nedenle ATR inhibisyonunun kanser hücrelerinde terapötik potansiyele sahip olabileceğini belirtilmiştir (Nghiem et al 2001). Hafsi ve ark. (2018) ise, AZD6738 ATR inhibitörü ve KU-0060648 DNA-PK inhibitörü kombin uygulaması yapılan baş

ve boyun kanseri hücrelerinde p53 mutasyonu durumundan bağımsız bir şekilde radyoterapi duyarlılığının arttığını, hücrelerde G1 fazında ve γ H2AX seviyesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Hafsi et al 2018). Ditano ve ark. (2021) çalışmalarında 2008 insan kanser hücre paneli içerisinde ATR inhibitörlerine duyarlı, kısmen duyarlı ve dirençli insan kanser hücre panelinde (UACC62, HCT116, SF268, IGROV, OVCAR8, OVCAR4, NCI H522, U251, CAPAN1, TK10 ve NCI H23) ATM fonksiyon kaybı yerine ATM mutasyonlarının ATR inhibitörlerine yanıtı arttırarak hücrelerde S fazında tutulmaya neden olduğunu belirlemiştir (Ditano et al 2021). Ayrıca, SN38 topoizomera I inhibitörü ile birlikte AZD6738 ATR inhibitörü uygulanan kanser hücrelerinde hücre siklusunun S fazında tutulduğu ve 24 saat boyunca SN38 uygulandıktan sonra 24-30 saat boyunca ATR inhibitörü uygulanan hücrelerde hücre siklusunun G2/M fazında hücre birikmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Ditano et al 2021). Luserna Di Rora ve ark. (2021) tarafından T hücresi (RPMI-8402), Philadelphia pozitif B hücresi (SUP-B15), and Philadelphia negatif B cell (REH) lösemi hücrelerinde Doksorubisin, VE-821 ATR inhibitörü ve Prexasertib CHK1 inhibitörü kombin etkisini araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre, tüm lösemi hücrelerinin doksorubisin uygulandığında G2/M kontrol noktasını aktive ettiği, Dox uygulaması ile birlikte VE-821 ve Prexasertib uygulandığında ise Doksorubisin sitotoksik etkisini arttırarak pCDK1 ve Siklin B protein ekspresyon düzeyinde azalmaya neden olarak apoptotik ölümü indüklediği belirlenmiştir (Luserna Di Rora et al 2021).

Kanser hücrelerinde G0 veya G1 fazında minimum gecikme hücre siklusunda iki mekanizma ile düzenlenmektedir. (i) Rb/p16 yolağında mutasyonlar kanser hücrelerini büyüme faktörü bağımsız bir şekilde çoğalmalarını sağlamaktadır. (ii) p53 yolağında mutasyonlar ise DNA hasarından sonra hücre siklusunun G1 fazında tutulmasını engellemektedir. Bu değişimler kanser hücrelerinin S fazında daha fazla zaman harcamalarına ve normal hücrelere göre daha fazla DNA hasarı ile G0/G1 fazından S fazına geçiş yapmalarına olanak sağlamaktadır (Hanahan and Weinberg 2000). Bu kapsamda G1 kontrol noktası kaybı olan kanser hücreleri ATR inhibitörlerine karşı daha duyarlıdır. Mevcut tez çalışmasında da p53 geninde mutasyona sahip MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde Elimusertib tarafından ATR inhibisyonunun sağlanması hücre siklusunda anlamlı derecede G0/G1 fazında artışa neden olmuştur. TNMK

yüksek sıklıkta p53 mutasyonları, artan MDM2 ve Rb1 kaybı ile karakterizedir (Synnott et al 2017, Witkiewicz et al 2018). Bu değişimler G1 kontrol noktasında eksikliklere ve sonucunda mitotik katastrof ve erken mitozaya geçişi engellemek için ATR temelli G2/M kontrol noktasına bağımlılığı arttırmaktadır. Bu kapsamda, Tu ve ark. (2018) çalışmalarında radyoterapiden 1 saat önce TNMK hücrelerine VX-970 uygulaması yaptıklarında radyoterapi tarafından indüklenen G2/M fazında hücre tutulmasının özellikle MDA-MB-231 hücrelerinde diğer TNMK hücrelere göre daha belirgin düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle ATR inhibitörleri radyoterapiye duyarlılığı arttırmaktadır (Tu et al 2018).

Hücre içi artan ROS miktarı DNA hasarını uyarmakta ve dolayısıyla DNA hasar yanıtını düzenlemektedir. ROS endojen olarak mitokondri, hücre membranına bağlı bir enzim olarak NADPH oksidaz ve peroksizom tarafından üretilmektedir. ROS üretimi kemoterapi ve radyoterapi yanıtını hücrenin hayatta kalma ve ölüm sinyal kaskadı aracılığıyla düzenlemektedir (Sai Srinivas et al 2019). DNA'da tek zincir kırıklarının tanınmasında rol alan ATM/ATR ve DNA-PK sensör proteinlerinin kaybı artan ROS seviyesine neden olmaktadır (Blackford and Jackson 2017, Sai Srinivas et al 2019, Sullivan, Palaniappan, Espinosa 2015). ATM kaybının anormal mitokondrilerde artışa ve dolayısıyla ROS artışına neden olduğu belirtilmektedir. ATM eksik hücrelerde hücrel stres durumunda antioksidan proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen NRF2 kusurundan dolayı ROS miktarı artmaktadır (Zhou, Shao, Zhang and Liang 2013). Ayrıca, H₂O₂ tarafından indüklenen oksidatif stresin γ H2AX birikimini, DNA hasarı yanıtını ve ATR bağımlı Chk1 fosforilasyonunu başlatması için ATR gereklidir (Katsube et al 2014). Bunun yanı sıra, ROS artışı DNA-PKcs aktivitesini engelleyerek KU70/80 kompleksi ile etkileşimini değiştirmektedir (Li et al 2014, Wang et al 2018). Bu nedenle DNA hasar yanıtı sensör kinazları ROS artışını önleyerek genomik bütünlüğün korunmasını sağlamaktadır (Sai Srinivas et al 2019). Bu kapsamda mevcut tez çalışmasında Elimusertib'in artan dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak ATR inhibisyonundan dolayı TNMK hücrelerinde intraselüler ROS miktarında artışa ve önemli düzeyde mitokondriyal hasara neden olduğu tespit edilmiştir.

Fosforile CHK1 ve Ser-139 kalıntısından fosforillenen γ H2AX kanser tedavisinde ATR inhibisyonunun farmakolojik biyobelirteçleri olarak yer almaktadır (Rawlinson and Massey 2014). Literatürde yapılan çalışmalarda farklı ATR inhibitörlerinin DNA hasar yanıtında etkisi moleküler düzeyde aydınlatılmıştır. Örneğin; Ditona ve ark. (2021) tarafından farklı kanser hücrelerinin ATR inhibitörlerine CHK1 inhibitörlerden daha duyarlı olduğu ve duyarlılığın γ H2AX miktarı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, tek ajan olarak ATR ve CHK1 inhibitörlerine duyarlılığın erken CDK2'nin aşırı aktivasyonu tarafından düzenlendiği ortaya konmuştur (Ditano et al 2021). Suzuki ve ark. (2022) tarafından ATR inhibitörü ile 5-FU kombin uygulamasının tek başına ilaç uygulamalarına göre p-Chk1 protein ekspresyonunda azalmaya ve γ H2AX ve c-Kaspaz-3 protein düzeylerinde daha fazla artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Suzuki et al 2022). Bunun yanı sıra, VX-970 ve AZ6738 ATR inhibitörleri uygulanan TNMK ve kolon hücre hatlarında p-Chk1 ve Cdc25A protein ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir (Suzuki et al 2022, Tu et al 2018). Tang ve ark. (2021) fare RM-1BM ve insan C4-2b ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde BAY1895344 ATR inhibitörünün p-ATR/toplam ATR, p-Chk1/Toplam Chk1, Siklin B ve Cdk1 protein düzeylerini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, BAY1895344 uygulamasının prostat kanseri hücrelerinde c-Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 protein düzeylerinin artışa neden olarak apoptotik ölümü indüklediği belirlenmiştir (Tang et al 2021). Sule ve ark. (2021) IDH1 mutant hücrelerde AZD6738 ATR inhibitörü ile olaparib kombin uygulamasının tek başına ilaç uygulamasına göre c-PARP ve c-Kaspaz-3 protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Sule et al 2021). Diğer taraftan, nöroblastoma hücrelerinde 50 ve 100 nM BAY1895344'ın pATR düzeyini azalttığı belirlenmekle birlikte c-PARP, p53 ve p21 protein ekspresyon düzeylerinin arttırdığı görüntülenmiştir (Szydzik et al 2021). Bu çerçevede, ATR inhibitörlerinin ATR-Chk1 DNA hasar yanıtını inhibe ettiği ve hücrelerde apoptotik ölümüne neden olduğu protein düzeyinde belirlenmiştir. Mevcut tez çalışmasında, Elimusertib'i ilk kez MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde ATR-Chk1 hasar yanıtını etkin bir şekilde baskıladığı protein düzeyinde aydınlatılmıştır. Ayrıca, hücrelerde neden olduğu apoptotik ölüm azalan PARP, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 protein düzeyleri ile de desteklenmiştir.

Sonuç olarak, ATR inhibitörü olarak Elimusertib'in MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde anti-kanser etkinliği ilk kez ortaya konmuştur. Elimusertib uygulanan TNMK hücrelerinde G0/G1 fazında tutulma, kromatin yoğunlaşması, artan DNA kırıkları, azalan PARP, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri ve mitokondriyal hasar tespit edilerek, hücrelerde apoptotik ölümü indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca, Elimusertib uygulanan TNMK hücrelerinde ATR temelli Chk1 DNA hasar yanıtının baskılandığı moleküler düzeyde aydınlatılmıştır. Bunun yanı sıra, ATR inhibisyonunun p53 mutant TNMK hücrelerinde sentetik lethal etkili olabileceği ve bu nedenle p53 mutasyonuna sahip TNMK hastalarında yenilikçi bir tedavi stratejisi olabileceği öngörülmektedir. Ancak, Elimusertib'in MCF-10A hücrelerinde belirlenen toksik etkisinden dolayı, Elimusertib ile radyoterapi, kemoterapi veya DNA hasar yanıtında rol alan proteinleri hedefleyen inhibitörlerin kombin etkisinin araştırılmasına ve Elimusertib'in farmakolojik özelliklerinin geliştirilmesine yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, TNMK gelişiminde rol alan sinyal yolları ile ATR temelli DNA hasar yanıtı inhibisyonunun ilişkisine dair ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1):1-23.
- Almansour N. (2022). Triple-negative breast cancer: A brief review about epidemiology, risk factors, signaling pathways, treatment and role of artificial intelligence. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 25(9).
- Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, Sotiriou C. (2018). Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of oncology*, 29(4):895-902.
- Barnieh FM, Loadman PM, Falconer RA. (2021). Progress towards a clinically-successful ATR inhibitor for cancer therapy. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 2(2021)100017.
- Bianchini G, De Angelis C, Licata L, Gianni L. (2022). Treatment landscape of triple-negative breast cancer-Expanded options, evolving needs. *Nature reviews Clinical oncology*, 19(2):91-113.
- Blackford AN and Jackson SP. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Molecular cell*, 66(6), 801-817.
- Bou Zerdan M, Ghorayeb T, Saliba F, Allam, S, Bou Zerdan M, Yaghi M, Bilani N, Jaafar R, Nahleh Z. (2022). Triple negative breast cancer: Updates on classification and treatment in 2021. *Cancers*, 14:1253.
- Bowler E, Skwarska A, Wilson JD, Ramachandran S, Bolland H, Easton A, Ostheimer C, Hwang M-S, Leszczynska KB, Conway SJ, Hammond EM. (2020). Pharmacological inhibition of ATR can block autophagy through an ATR-independent mechanism. *Iscience*, 23(11):101668.
- Bradbury A, Hall S, Curtin N, Drew Y. (2020). Targeting ATR as cancer therapy: A new era for synthetic lethality and synergistic combinations? *Pharmacology & Therapeutics*, 207:107450.
- Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P. (2012). Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *International journal of women's health*, 4, 511.

- Cao Y, Chen C, Tao Y, Lin W, Wang P. (2021). Immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Pharmaceutics*, 13(12):2003.
- Carusillo A and Mussolino C. (2020). DNA damage: from threat to treatment. *Cells*, 9(7), 1665.
- Cejalvo JM, Martínez de Dueñas E, Galván P, García-Recio S, Burgués Gasió O, Paré L, Antolín S, Martinello R, Blancas I, Adamo B, Guerrero-Zotano Á, Muñoz M, Nucíforo P, Vidal M, Pérez RM, Chacón López-Muniz JI, Caballero R, Peg V, Carrasco E, Rojo F, Perou CM, Cortés J, Adamo V, Albanell J, Gomis RR, Lluch A, Prat A. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017 May 1;77(9):2213-2221.
- Chang-Qing Y, Jie L, Shi-Qi Z, Kun Z, Zi-Qian G, Ran X, Hui-Meng L, Ren-Bin Z, Gang Z, Da-Chuan Y, Chen-Yan Z. (2020). Recent treatment progress of triple negative breast cancer. *Progress in biophysics and molecular biology*, 151:40-53.
- Chen P, Bin H, Jiao Y, Lin G, Zhang Y, Xia A, Pan Z, Qiao J, Guo Y, Liu J, Zhou Y, Li L. (2022). Discovery of 6, 7-dihydro-5H-pyrrolo [3, 4-d] pyrimidine derivatives as a new class of ATR inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 63:128651.
- Clark CA, Yang ES. (2021). Harnessing DNA repair defects to augment immune-based therapies in triple-negative breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 3580.
- Cocco S, Piezzo M, Calabrese A, Cianniello D, Caputo R, Di Lauro V, Fusco G, Gioia G, Licenziato M, De Laurentiis M. (2020). Biomarkers in triple-negative breast cancer: State-of-the-art and future perspectives. *International journal of molecular Sciences*, 21(13):4579.
- Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. (2016). Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 8, 93.
- Cortesi L, Rugo HS, Jackisch C. (2021). An overview of PARP inhibitors for the treatment of breast cancer. *Targeted oncology*, 16(3):255-282.
- Curtin NJ. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, 12(12):801-817.

- De Bono JS, Tan DSP, Caldwell R, Terbuch A, Goh BC, Heong V, Haris N, Bashir S, Drew Y, Hong DS, Meric-Bernstam F, Wilkinson G, Hreiki J, Wengner AM, Bladt F, Schlicker A, Ludwig M, Zhou Y, Liu L, Bordia S, Plummer R, Lagkadinou E, Yap TA. (2019). First-in-human trial of the oral ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) inhibitor BAY 1895344 in patients (pts) with advanced solid tumors. *Cancer Discovery*, 11(1):80-91.
- Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *The Lancet*, 389(10087):2430-2442.
- DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, Jemal A, Siegel RL. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: A cancer journal for clinicians*, 69(6):438-451.
- Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(6):1960.
- Ditano JP, Donahue KL, Tafe LJ, McCleery CF, Eastman A. (2021). Sensitivity of cells to ATR and CHK1 inhibitors requires hyperactivation of CDK2 rather than endogenous replication stress or ATM dysfunction. *Scientific reports*, 11(1):1-16.
- Dorling L, Carvalho S, Allen J, Gonzalez-Neira A, Luccarini C, Wahlström C, ... Rookus MA. (2021). Breast Cancer Risk Genes-Association Analysis in More than 113,000 Women. *The New England journal of medicine*, 384(5):428-439.
- Eskiler, GG. (2019). Talazoparib to treat BRCA-positive breast cancer. *Drugs of today* (Barcelona, Spain: 1998), 55(7), 459-467.
- Falck J, Coates J and Jackson SP. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434(7033), 605-611.
- Fedele P, Sanna V, Fancellu A, Cinieri S. (2019). A clinical evaluation of treatments that target cell cycle machinery in breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(18):2305-2315.

- Fokas E, Prevo R, Hammond EM, Brunner TB, McKenna WG, Muschel RJ. (2014). Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. *Cancer treatment reviews*, 40(1):109-117.
- Ganesa S, Sule A, Sundaram RK, Bindra RS. (2022). Mismatch repair proteins play a role in ATR activation upon temozolomide treatment in MGMT-methylated glioblastoma. *Scientific Reports*, 12(1):1-15.
- Garmpis N, Damaskos C, Garmpi A, Nikolettos K, Dimitroulis D, Diamantis E, Farmaki P, Patsouras A, Voutyritsa E, Syllaios A, Zografos CG, Antoniou EA, Nikolettos N, Kostakis A, Kontzoglou K, Schizas D, Nonni A. (2020). Molecular classification and future therapeutic challenges of triple-negative breast cancer. *In vivo*, 34(4):1715-1727.
- Ge J, Zuo W, Chen Y, Shao Z, Yu K. (2022). The advance of adjuvant treatment for triple-negative breast cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 19(2):187.
- Geenen JJ, Linn SC, Beijnen JH, Schellens JH. (2018). PARP inhibitors in the treatment of triple-negative breast cancer. *Clinical pharmacokinetics*, 57(4), 427-437.
- Ghelli Luserna Di Rorà A, Ghetti M, Ledda L, Ferrari A, Bocconcelli M, Padella A, Napolitano R, Fontana MC, Liverani C, Imbrogno E, Bochicchio MT, Paganelli M, Robustelli V, Sanogo S, Cerchione C, Fumagalli M, Rondoni M, Imovilli A, Musuraca G, Martinelli G, Simonetti G. (2021). Exploring the ATR-CHK1 pathway in the response of doxorubicin-induced DNA damages in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Biology and Toxicology*, 1-17.
- Gomez SL, Glaser SL, Horn-Ross PL, Cheng I, Quach T, Clarke CA, Reynolds P, Shariff-Marco S, Yang J, Lee MM, Satariano WA, Hsing AW. (2014). Cancer research in Asian American, Native Hawaiian, and Pacific Islander populations: accelerating cancer knowledge by acknowledging and leveraging heterogeneity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(11), 2202-2205.
- Goncalves T, Zoumpoulidou G, Alvarez-Mendoza C, Mancusi C, Collopy LC, Strauss SJ, Mitnacht S, Tomita K. (2020). Selective elimination of osteosarcoma cell lines with short telomeres by ataxia telangiectasia and

- Rad3-related inhibitors. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 3(6):1253-1264.
- Gorecki L, Andrs M, Korabecny J. (2021). Clinical candidates targeting the ATR–CHK1–WEE1 axis in cancer. *Cancers*, 13(4):795.
- Guney Eskiler G, Cecener G, Egeli U, Tunca B. (2018). Triple negative breast cancer: new therapeutic approaches and BRCA status. *Apmis*, 126(5), 371-379.
- Güleş Ö, Eren U. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2):73-78.
- Hafsi H, Dillon MT, Barker HE, Kyula JN, Schick U, Paget JT, Smith HG, Pedersen M, McLaughlin M, Harrington KJ. (2018). Combined ATR and DNA-PK inhibition radiosensitizes tumor cells independently of their p53 status. *Frontiers in oncology*, 8:245.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- Hanawalt PC. (2015). Historical perspective on the DNA damage response. *DNA repair*, 36, 2-7.
- Hossain F, Majumder S, David J, Miele L. (2021). Precision medicine and triple-negative breast cancer: Current landscape and future directions. *Cancers*, 13(15), 3739.
- Howard FM, Olopade OI. (2021). Epidemiology of triple-negative breast cancer: A review. *The Cancer Journal*, 27(1):8-16.
- Huang R, Zhou PK. (2021). DNA damage repair: Historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1):1-35.
- Hwang SY, Park S, Kwon Y. (2019). Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 199:30-57.
- Italiano A. (2021). ATR inhibition as an attractive therapeutic resource against cancer. *Cancer Discovery*, 11(1), 14-16.
- Januškevičienė I, Petrikaitė V. (2019). Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sciences*, 239:117009.

- Jin J, Tao Z, Cao J, Li T, Hu X. (2021). DNA damage response inhibitors: An avenue for TNBC treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1875(2):188521.
- Jo U, Senatorov I, Zimmermann A, Saha LK, Murai Y, Kim SH, Rajapakse VN, Elloumi F, Takahashi N, Schultz CW, Thomas A, Zenke FT, Pommier Y. (2021). Novel and highly potent ATR inhibitor M4344 kills cancer cells with replication stress and enhances the chemotherapeutic activity of widely used DNA damaging agents. *Cancer Research*, 81(13_Supplement):1055-1055.
- Karnitz LM, Zou L. (2015). Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy Targeting ATR in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 21(21):4780-4785.
- Katsube T, Mori M, Tsuji H, Shiomi T, Wang B, Liu Q, Neno M, Onoda M. (2014). Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *The Journal of Biochemistry*, 156(2):85-95.
- Kumar P, Aggarwal R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(2):247-269.
- Landry I, Sumbly V, Vest M. (2022). Advancements in the treatment of triple-negative breast cancer: A narrative review of the literature. *Cureus*, 14(2).
- Lecona E, Fernandez-Capetillo O. (2018). Targeting ATR in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(9):586-595.
- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7):2750-2767.
- Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, Moses HL, Sanders ME, Pietenpol JA. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for neoadjuvant chemotherapy selection. *PLoS One*. 2016 Jun 16;11(6):e0157368.
- Lehmann BD, Pietenpol JA. (2014). Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *The Journal of Pathology*, 232(2):142-150.

- Li M, Lin YF, Palchik GA, Matsunaga S, Wang D, Chen BP. (2014). The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase is required for cellular resistance to oxidative stress independent of DNA double-strand break repair. *Free Radical Biology and Medicine*, 76:278-285.
- Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, O'Regan R, Torres MA, Meisel JL. (2017). Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 161(2):279-287.
- Li Y, Zhan Z, Yin X, Fu S, Deng X. (2021). Targeted therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 4517.
- Liang Y, Zhang H, Song X, Yang Q. (2020). Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*, 60:14-27.
- Lodovichi S, Cervelli T, Pelliccioli A, Galli A. (2020). Inhibition of DNA repair in cancer therapy: Toward a multi-target approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18):6684.
- Łukasiewicz S, Czeczulewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, 13(17), 4287.
- Mak JP, Man WY, Ma HT, Poon RY. (2014). Pharmacological targeting the ATR–CHK1–WEE1 axis involves balancing cell growth stimulation and apoptosis. *Oncotarget*, 5(21), 10546.
- Maqbool M, Bekele F, Fekadu G. (2022). Treatment strategies against triple-negative breast cancer: An updated review. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 14:15.
- Marra A, Trapani D, Viale G, Criscitiello C, Curigliano G. (2020). Practical classification of triple-negative breast cancer: Intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *NPJ Breast Cancer*, 6(1):1-16.

- Mei L, Zhang J, He K, Zhang J. (2019). Ataxia telangiectasia and Rad3-related inhibitors and cancer therapy: Where we stand. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1):1-8.
- Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, Canello G, Iorfida M, Balduzzi A, Galimberti V, Veronesi P, Luini A, Proneri G, Bottiglieri L, Mastropasqua MG, Goldhirsch A, Viale G, Colleoni M. (2013). Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. *Clinical breast cancer*, 13(1), 31-39.
- Nafisi S, Saboury AA, Keramat N, Neault JF, Tajmir-Riahi HA. (2007). Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 827(1-3):35-43.
- Neeb A, Herranz N, Arce-Gallego S, Miranda S, Buroni L, Yuan W, Athie A, Casals T, Carmichael J, Rodrigues DN, Gurel B, Rescigno P,.....de Bono JS. (2021). Advanced prostate cancer with ATM loss: PARP and ATR inhibitors. *European Urology*, 79(2):200-211.
- Nghiem P, Park PK, Kim YS, Vaziri C, Schreiber SL. (2001). ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16):9092-9097.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnson H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale A, Brown PO, Botstein D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406:747-752.
- Pondé NF, Zardavas D, Piccart M. (2019). Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(1):27-44.
- Rafiei S, Fitzpatrick K, Liu D, Cai MY, Elmarakeby HA, Park J, Ricker C, Kochupurakkal BS, Choudhury AD, Hahn WC, Balk SP, Hwang E, Mouw KW. (2020). ATM loss confers greater sensitivity to ATR inhibition than PARP inhibition in prostate cancer. *Cancer Research*, 80(11):2094-2100.
- Rawlinson R, Massey AJ. (2014). γ H2AX and Chk1 phosphorylation as predictive pharmacodynamic biomarkers of Chk1 inhibitor-chemotherapy combination treatments. *BMC Cancer*, 14(1):1-13.

- Sharma P. (2016). Biology and management of patients with triple-negative breast cancer. *The Oncologist*, 21(9):1050-1062.
- Shen M, Pan H, Chen Y, Xu YH, Yang W, Wu Z. (2020). A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy. *Open Medicine*, 15(1):1143-1149.
- Sledge GW, Mamounas EP, Hortobagyi GN, Burstein HJ, Goodwin PJ, Wolff AC. (2014). Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 32(19):1979.
- Smith HL, Southgate H, Tweddle DA, Curtin NJ. (2020). DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 22.
- Sporikova Z, Koudelakova V, Trojanec R, Hajdich M. (2018). Genetic markers in triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 18(5):e841-e850.
- Srinivas US, Tan BW, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25:101084.
- Sukumar J, Gast K, Quiroga D, Lustberg M, Williams N. (2021). Triple-negative breast cancer: Promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(2):135-148.
- Sule A, Van Doorn J, Sundaram RK, Ganesa S, Vasquez JC, Bindra RS. (2021). Targeting IDH1/2 mutant cancers with combinations of ATR and PARP inhibitors. *NAR Cancer*, 3(2):zcab018.
- Sullivan KD, Palaniappan VV, Espinosa JM. (2015). ATM regulates cell fate choice upon p53 activation by modulating mitochondrial turnover and ROS levels. *Cell Cycle*, 14(1):56-63.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3):209-249.
- Suzuki T, Hirokawa T, Maeda A, Harata S, Watanabe K, Yanagita T, Ushigome H, Nakai N, Maeda Y, Shiga K, Ogawa R, Mitsui A, Kimura M, Matsuo Y, Takahashi H, Takiguchi S. (2022). ATR inhibitor AZD6738 increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by inhibiting repair of DNA damage. *Oncology Reports*, 47(4):1-9.

- Synnott NC, Murray A, McGowan PM, Kiely M, Kiely PA, O'donovan N, O'Connor DP, Gallagher WM, Crown J, Duffy MJ. (2017). Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple- negative breast cancer?. *International Journal of Cancer*, 140(1):234-246.
- Szydzik J, Lind DE, Arefin B, Kurhe Y, Umapathy G, Siaw JT, Claeys A, Gabre JL, Eynden JV, Hallberg B, Palmer RH. (2021). ATR inhibition enables complete tumour regression in ALK-driven NB mouse models. *Nature Communications*, 12(1):1-18.
- Tang Z, Pilié PG, Geng C, Manyam GC, Yang G, Park S, Wang D, Peng S, Wu C, Peng G, Yap TA, Corn PG, Broom BM, Thompson TC. (2021). ATR Inhibition Induces CDK1–SPOP Signaling and Enhances Anti–PD-L1 Cytotoxicity in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(17):4898-4909.
- Torgovnick A and Schumacher B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in genetics*, 6, 157.
- Tu X, Kahila MM, Zhou Q, Yu J, Kalari KR, Wang L, Harmsen WS, Yuan J, Boughey JC, Goetz MP, Sarkaria JN, Lou Z, Mutter RW. (2018). ATR inhibition is a promising radiosensitizing strategy for triple-negative breast cancer. ATR inhibition and radiotherapy overcomes resistance in TNBC. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(11):2462-2472.
- Valastyan S, Weinberg RA. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.
- Wahba HA, El-Hadaad HA. (2015). Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer biology & medicine*, 12(2), 106.
- Wang Y, Xu H, Liu T, Huang M, Butter PP, Li C, Zhang L, Kao GD, Gong Y, Maity A, Koumenis C, Fan Y. (2018). Temporal DNA-PK activation drives genomic instability and therapy resistance in glioma stem cells. *JCI Insight*, 3(3).
- Weber AM, Ryan AJ. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 149:124-138.

- Wengner AM, Scholz A, Haendler B. (2020). Targeting DNA damage response in prostate and breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21):8273.
- Wengner AM, Siemeister G, Lücking U, Lefranc J, Wortmann L, Lienau P, Bader B, Bömer U, Moosmayer D, Eberspacher U, Golfier S, Schatz CA, Baumgart SJ, Haendler B, Lejeune P, Schlicker A, Nussbaum F, Brands M, Ziegelbauer K, Mumberg D. (2020). The novel ATR inhibitor BAY 1895344 is efficacious as monotherapy and combined with DNA damage-inducing or repair-compromising therapies in preclinical cancer models antitumor effects of ATR Inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(1):26-38.
- Wickstroem K, Hagemann UB, Kristian A, Ellingsen C, Sommer A, Ellinger-Ziegelbauer H, Wirnitzer U, Hagelin E, Larsen A, Smeets R, Bjerke RM, Karlsson J, Ryan OB, Wengner AM, Linden L, Mumberg D, Cuthbertson AS. (2019). Preclinical combination studies of an FGFR2 targeted thorium-227 conjugate and the ATR inhibitor BAY 1895344. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 105(2):410-422.
- Witkiewicz AK, Chung S, Brough R, Vail P, Franco J, Lord CJ, Knudsen ES. (2018). Targeting the vulnerability of RB tumor suppressor loss in triple-negative breast cancer. *Cell Reports*, 22(5):1185-1199.
- Yao H, He G, Yan S, Chen C, Song L, Rosol TJ, Deng X. (2017). Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget*, 8(1):1913.
- Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1):1-13.
- Zhou S, Ye W, Shao Q, Zhang M, Liang J. (2013). Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(3):706-715.
- Zhu X and Zhou W. (2015). The emerging regulation of VEGFR-2 in triple-negative breast cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 159.