

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE WEE1
İNHİBİSYONUNUN TERAPÖTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rabia Rana DERLİOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER

TEMMUZ - 2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE WEE1
İNHİBİSYONUNUN TERAPÖTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rabia Rana DERLİOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

“Bu tez 03/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ ÜYESİ	KANAATİ	İMZA

BEYAN

Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırladığım tezin bana ait ve özgün olduğunu, çalışmamın her aşamasında hiçbir etik dışı davranışımın olmadığı, tüm süreçlerin yönetmeliğe uygun olduğunu, tezimdaki bütün bilgilerin kaynak gösterilerek etik kurallar dahilinde yazıldığı ve hiçbir telif hakkını ihlal edici davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

.../.../...

Rabia Rana DERLIOĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD’da aldığım yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her zaman bana destek olan değerli ve aynı zamanda danışman hocam olan sevgili Doç. Dr. Gamze Güney ESKİLER başta olmak üzere tüm Sakarya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ABD hocalarıma teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olup, her zaman beni destekleyen ve motive eden en değerlilerim sevgili babam Orhan DERLİOĞLU, sevgili annem Aynur DERLİOĞLU ve sevgili kardeşim Muhammet Taha DERLİOĞLU’na teşekkür ederim. Laboratuvar süreçlerimde ve sonrasında da yanımda olup bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Beyzanur ERK’e teşekkür ederim. Her koşulda yanımda olup, bana her zaman iyi hissettiren ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Sevda AYDIN ve sevgili arkadaşım Fadime KÖSE’ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu tarafından “2023-19-43-14” numaralı proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. MEME KANSERİ.....	2
2.1.1. Triple Negative Meme Kanseri (TNMK).....	3
2.1.2. Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Klinik Özellikleri.....	5
2.1.4. Moleküler Özellikler	6
2.2. TEDAVİ YÖNTEMLERİ	9
2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ	11
2.3.1. DNA Hasarı Kontrol Noktası ve Hücre Döngüsü	13
2.3.2. Hücre Döngüsünde Wee1 Yolağının Rolü	16
2.3.3. Wee1 İnhibitörleri	17
2.3.3.1. Adavosertib	22
2.3.3.2. PD0166285	23
2.3.3.3. Debio 0123	24
2.3.5. Azenosertib.....	25
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.....	28
3.2.1. Hücre Kültürü.....	28

3.2.2. CCK-8 Canlılık Analizi.....	29
3.2.3. Annexin V Analizi	30
3.2.4. Akridin Oranj/Propidyum iyodür (AO/PI) Boyama.....	30
3.2.5. Hücre Döngüsü Analizi	31
3.2.6. Mito Tracker Boyama	31
3.2.7. ROS Analizi	32
3.2.8. Western Blot.....	32
3.2.9. İstatiksel Analiz.....	33
4. BULGULAR	34
4.1. AZENOSERTİB'İN HÜCRELERDE ANTİ-KANSER ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	34
4.2. AZENOSERTİB'İN APOPTOTİK ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	36
4.3. AZENOSERTİB'İN HÜCRE SİKLUSUNA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	38
4.4. AZENOSERTİB'İN TNMK HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİSİNİN GÖZLEMLENMESİ	40
4.5. AZENOSERTİB'İN ROS SEVİYESİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	41
4.6. AZENOSERTİB'İN MİTOKONDİRİ MORFOLOJİSİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	43
4.7. AZENOSERTİB'İN ETKİSİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	61

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

TNMK: Triple Negatif Meme Kanseri

LAR: Luminal androjen reseptörü

BL1: Bazal benzeri 1

BL2: Bazal benzeri 2

M: Mezenkimal

MSL: Mezenkimal kök benzeri

IM: İmmünomodülatör mezenkimal

ER: Östrojen reseptörü

PR: Progesteron reseptörü

AR: Androjen Reseptörü

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü 2

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

BRCA1/2: Meme kanseri geni ½

PI3K: Fosfatidilinositol 3-Kinaz

H2AX: H2A histon varyantı X

Rb: Retinablastoma

PARP: Poli (ADP Riboz) Polimeraz

AO: Akridin oranj

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

FBS: Fetal sığır serumu

ROS: Reaktif oksijen türleri

WHO: Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Meme kanserinde başlangıç ve ilerlemeyle ilgili iki teori (Sun et al 2017)...	2
Şekil 2: Genlerin ekspresyon profiline dayalı olarak TNMK'nın moleküler alt tiplendirilmesi (He et al 2018).	7
Şekil 3: Memeli hücre döngüsünün düzenlenmesi (Suryadinata, Sadowski and Sarcevic 2010).....	13
Şekil 4: Kontrol noktasına bağlı hücre döngüsünün durdurulması ve çıkışı (Matthews et al 2022).....	14
Şekil 5: Wee1'in hücre döngüsünün regülasyonunda işlevi (Elbæk, Petrosius and Sørensen 2020).....	17
Şekil 6: Azenosertib'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde anti-kanser etkisinin CCK-8 analizi ile değerlendirilmesi ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$).....	35
Şekil 7: (A) Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesinde Annexin V analizi histogramları (a) 72 saat (b) 96 saat inkübasyon (B) Azenosertib'in neden olduğu apoptotik ölümün istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).....	37
Şekil 8: (A) Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisine ait histogramlar (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon (B) Azenosertib'in G0/G1, S ve G2/M fazlarında hücre miktarının istatistiksel karşılaştırılması (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).	39
Şekil 9: Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen değişimlerin görüntülenmesi (a) 72 ve (96) saat inkübasyon.	40
Şekil 10: (A) Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde ROS miktarının değerlendirilmesi (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon (B) Azenosertib'in ROS miktarındaki neden olduğu değişimlerin istatistiksel analizi (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).	42
Şekil 11: Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen mitokondri morfolojisindeki değişimlerin görüntülenmesi (a) 72 ve (96) saat inkübasyon.	43

Şekil 12: 72 saat boyunca Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasar yanıtında ve hücre döngüsünde rol alan proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler..... 44



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Wee1 inhibitörlerinin farklı kanser türlerindeki klinik çalışmaları. 18

Tablo 2: Western blot analizinde yararlanılan antikorlar 33



ÖZET

Triple Negatif Meme Kanserinde Wee1 İnhibisyonunun Terapötik Etkisinin Araştırılması

GİRİŞ VE AMAÇ: Hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA’da oluşan hasar varlığında döngünün durdurularak gerekli onarım ve genomik bütünlüğün sağlanabilmesinde temel rol almaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktalarında önemli aktiviteye sahip olan Wee1 kinaz, birçok kanser türünde aşırı eksprese edilmektedir. Bu kapsamda, Wee1 inhibisyonunu hedef alan tedavi stratejileri son zamanlarda oldukça öne çıkmaktadır. Bu çalışmada ilk kez triple negatif meme kanserinde (TNMK) Wee1 inhibitörü olarak Azenosertib’ in potansiyel terapötik etkinliğinin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Azenosertib’in MDA-MB-231 TNMK ve MCF-10A kontrol hücrelerindeki sitotoksik etkisi CCK-8 analizi ile belirlendi. Annexin V analizi, akridin oran/ propidyum iyodür boyamasıyla ve hücre siklusu analizleri ile apoptotik etkisi ve hücre siklusunda etkinliği belirlendi. Azenosertib’in MDA-MB-231 hücrelerinde anti-oksidatif etkisinin belirlenmesi için mitokondri boyaması ve ROS analizi gerçekleştirildi. Son olarak, western blot analizi ile Wee1 inhibisyonunun hücre döngüsündeki etkisi aydınlatıldı.

BULGULAR: Azenosertib’in MDA-MB-231 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p<0.01$). Hücrelerde apoptotik ölüme neden olmakla birlikte Wee1 protein düzeyinde artışa neden olarak inkübasyon süresine göre hücre siklusunda etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, Azenosertib’in TNMK hücrelerinde mitokondriyal hasara ve intraselüler ROS miktarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

SONUÇ: TNMK hücrelerinde ilk kez Azenosertib’in potansiyel antikanser etkinliği moleküler düzeyde belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, Azenosertib’in TNMK hücrelerinde Wee1’i aktivitesini inhibe ederek apoptoza ve oksidatif hasara neden olduğunu göstermektedir. TNMK hücrelerinde ilk kez etkisi gösterilen Azenosertib’in apoptozun yanı sıra farklı ölüm tiplerinde ve diğer kanser türlerindeki terapötik etkinliğinin araştırılmasına yönelik yeni çalışmaların gerçekleştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Wee1, Hücre döngüsü, Azenosertib, Triple negatif meme kanseri, Apoptoz.

ABSTRACT

Azenosertib: Wee1 Inhibitor's Anti-Cancer Effect Determination On Triple Negative Breast Cancer

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Cell cycle checkpoints play a fundamental role in ensuring the necessary repair and genomic integrity by stopping the cycle in the presence of DNA damage. Wee1 kinase, which has significant activity at cell cycle checkpoints, is overexpressed in many types of cancer. In this context, treatments strategies targeting Wee1 inhibition have become prominent recently. This study aims to determine, for the first time, the potential therapeutic efficacy of Azenosertib as a Wee1 inhibitor in triple negative breast cancer (TNBC) at the molecular level.

MATERIALS AND METHODS: The cytotoxic effect of Azenosertib on MDA-MB-231 TNBC and MCF-10A control cells was determined by CCK-8 analysis. Its apoptotic effect and activity in the cell cycle were determined by Annexin V analysis, acridine orange/propidium iodide staining and cell cycle analysis. Mitochondri staining and ROS analysis were conducted to determine the antioxidant effect of Azenosertib on MDA-MB-231 cells. Finally, the effect of Wee1 inhibition on the cell cycle was elucidated by western blot analysis.

RESULTS: Azenosertib significantly reduced MDA-MB-231 cells viability time and concentrations-dependent ($p < 0.01$). Although it caused apoptotic death in cells, its effect on the cell cycle was determined by increasing in Wee1 protein level depending on the incubation time. Additionally, Azenosertib caused mitochondrial damage and an increase in the amount of intracellular ROS in TNBC cells.

CONCLUSION: The potential anticancer activity of Azenosertib in TNBC cells was determined, for the first time, at the molecular level. The findings showed that Azenosertib caused apoptosis and oxidative damage by inhibiting Wee1 activity in TNBC cells. New studies can be carried out to investigate the therapeutic effectiveness of Azenosertib, which was shown to be effective on TNBC cells for the first time, in other types of cancer and different types of death as well as apoptosis.

KEYWORDS: Wee1, Cell cycle, Azenosertib Triple negative breast cancer, Apoptosis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

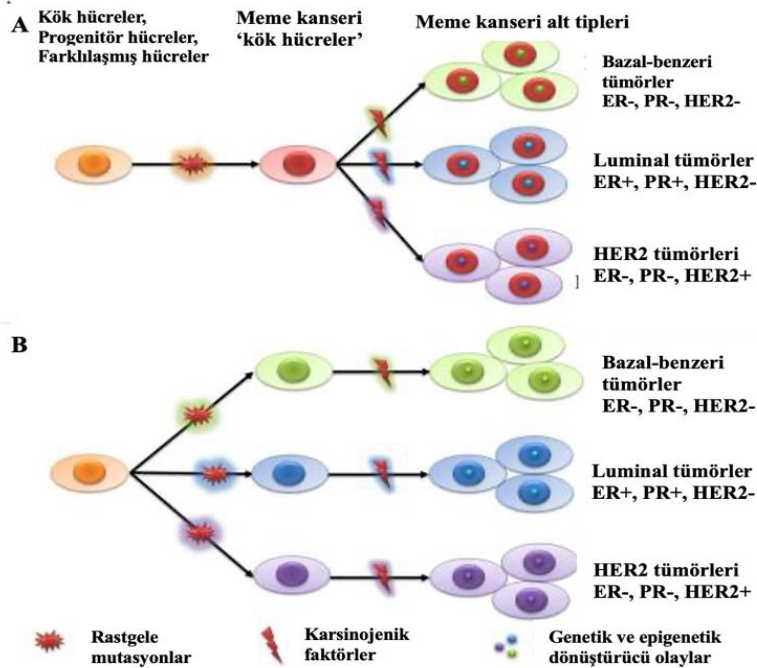
Triple negatif meme kanseri (TNMK), farklı histolojik, genomik ve immünolojik profile sahip ve progesteron, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ve östrojen eksprese etmeyen heterojen bir meme kanseri alt tipidir (Derakhshan and Reis-Filho 2022). Özel fenotipi nedeniyle TNMK, moleküler hedefli tedaviye duyarlı olmayıp ana sistemik tedavisi kemoterapidir (Yin et al 2020). Kemoterapinin amacı, semptomları hafifletmek ve sağkalımı uzatmaktır. Tek ajanlı kemoterapinin yanında kombinasyon tedavileri de hastalara uygulanmasına rağmen, mevcut tedavi seçenekleri yetersiz kalmaktadır (Kumar and Aggarwal, 2016). Bu nedenle yeni tedavilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Matheson, Backos and Reigan 2016, Jin et al 2018). Wee1, CDK1 / 2 fosforilasyonunun regülasyonu ile G2/M kontrol noktasını ve DNA hasar yanıtını kontrol eden bir kinaz olup, meme kanseri, lösemi, over kanseri ve beyin tümörleri gibi çeşitli kanser türlerinde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Hücre siklusunda mitotik girişten önce DNA onarımı için G2/M hücre döngüsü kontrol noktası durdurulması temelde Wee1 kinaza bağlıdır. Serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan Wee1, hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasında döngünün durdurularak DNA hasarının tamir edilmesi için gerekli zamanı sağlamaktadır. Bu kapsamda kanser tedavisinde Wee1 inhibisyonunu sağlayan Wee1 inhibitörleri (Adavosertib, Debio 0123, PD0166285 ve Azenosertib) dikkat çekmektedir. Wee1 inhibisyonu, DNA'ya zarar veren kimyasallara karşı hücresel duyarlılığı artıran replikasyon stresi ve G2/M kontrol noktası inaktivasyonuna neden olarak genomik kararsızlığa neden olmaktadır (Ha et al 2020). Wee1 inhibisyonu G2/M kontrol noktasını inhibe etmekte ve p53 mutasyonlu kanser hücrelerini erken mitotik girişine veya mitotik çıkışın geciktirilmesiyle mitotik katastrof yoluyla DNA'ya zarar veren kemoterapiye duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır (Leijen et al 2016).

Bu tez çalışmasında ilk kez bir Wee1 inhibitörü olarak Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde anti-kanser etkisinin belirlenmesi, hücrelerde neden olduğu ölüm yolağının aydınlatılması, TNMK hücrelerinde anti-oksidatif hasarının tespit edilmesi ve hücre siklusunda etkisinin moleküler düzeyde ortaya konması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignite çeşididir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2020 yılında yeni meme kanseri (MK) vakalarının 2,26 milyondan fazla olduğu ve neredeyse 685.000 ölüm olduğu bildirilmiştir (Gautam, Ramamoorthi, Champion, Han and Czerniecki 2024). Meme kanserinde tanı teknikleri ve tedavi yöntemlerinde önemli gelişmeler olmasına rağmen kadınlarda kanser ölümlerinin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, meme kanseri alt tiplerinin önemli ölçüde heterojenlik gösterdiği gen ekspresyonu analizlerinde belirlenerek meme kanserinin dört temel intrinsik moleküler alt tipi tanımlanmıştır (Zhang, Xia, Li, Wei and Zhang 2021, Criscitiello and Corti 2022). Bunlar; Luminal A ve Luminal B, Normal Meme Benzeri, HER2 ile Zenginleştirilmiş ve Bazal Benzeri gruptur (Børresen-Dale, Sørlie and Kristensen 2010). Moleküler alt tipler meme kanseri hastalarının prognozunu etkilemekle birlikte yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesinde önem arz etmektedir (Fisusi and Akala 2019). Meme kanserinin başlangıç ve ilerlemesine ilişkin teoriler Şekil 1’de gösterilmiştir (Sun et al 2017).



Şekil 1: Meme kanserinde başlangıç ve ilerlemeye ilişkin iki teori (Sun et al 2017).

(A) Aynı progenitör hücreler veya kök hücreler tüm tümör alt tiplerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu alt tipe özgü dönüşüm olayları daha sonra farklı tümör morfolojilerini belirlemektedir. (B) Kök hücre, progenitör hücre veya farklılaşmış hücrelerden tümör alt tipleri oluşabilmektedir. Mutasyonlar rastgele olup herhangi bir meme hücresinde birikip yeterli sayıya ulaştığında bu hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesini sağlayabilmektedir. (Sun et al 2017).

Meme kanserinin klinik tedavi ve prognozu hastalar arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Meme kanseri tedavi seçenekleri genellikle tümör-metastaz evrelerine temel alınmasına rağmen, lentrovasküler yayılım, hormon-reseptör durumu, hastanın yaşı ve menopoz durumu da önemli etkenler arasındadır (Maughan, Lutterbie and Ham 2010, Yin, Duan, Bian and Yu 2020).). Meme kanserini tedavi etmek için cerrahi, radyasyon, neoadjuvan tedavi ve adjuvan tedaviyi içeren multidisipliner tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Meme kanseri tedavisinde minimum düzeyde istenmeyen etkilerin yanı sıra maksimum terapötik etki ile hastalara iyi yaşam kalitesi sağlanması amaçlanmaktadır (Fisusi and Akala 2019).

Son araştırmalarda meme kanseri hastaları için tedavi seçiminde germline *BRCA1/2* mutasyon durumunun terapötik öneminin ortaya çıktığını göstermektedir. Bu tedavilerin DNA onarım yollarını bloke etme kapasitesi, *BRCA* mutasyon durumunun platin bazlı kemoterapiye ve ayrıca poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörlerine yanıtı öngörmesi vurgulanmaktadır. *BRCA1/2*'ye ek olarak, meme kanseri ve over, prostat veya pankreas kanserleri gelişiminde tümör proteini p53 (*TP53*), *BRCA2* lokalizatörü (PALB2), kontrol noktası kinaz 2 (CHEK2), fosfataz ve tensin homologu (*PTEN*), ve mutasyona uğramış ataksi-telanjiyektazi (ATM) gibi diğer yüksek ile orta riskli genlerdeki patojenik varyantlarda tedavi etkinliğinin belirlenmesinde önemlidir (Criscitiello and Corti 2022).

2.1.1. Triple Negative Meme Kanseri (TNMK)

Meme kanserleri tiplerinin yaklaşık %15'ini oluşturan triple negatif meme kanseri (TNMK), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ve östrojen reseptörü (ER)'nin ekspresyonundan yoksun biyolojik ve klinik

heterojenliği nedeniyle tedavi edilmesi en zorlu meme kanseri alt tipidir. TNMK'ların %80'i klinik olarak daha agresif ve kötü diferansiye olan bazal benzeri meme tümörlerini oluşturmaktadır. (Yang et al 2023, Lei et al 2023). Yapılan çalışmalar ile meme kanserinin farklı organlara metastatik heterojenite sergilediği ve bu durumun hastalarda prognoz ve tedaviye yanıtta farklılıklara sebep olduğu gösterilmektedir. Meme kanseri metastazı genellikle kemik, akciğer, karaciğer ve beyine olduğu görölmektedir. Bununla birlikte, meme kanseri metastatik yayılımının heterojenliğini yönlendiren moleküler süreci tam anlamıyla çözümlmek için daha fazla araştırmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır (Liang, Zhang, Song and Yang 2020). TNMK hastaları kötü prognoza, yüksek metastaz oranına sahip olup tanıdan sonra beş yıllık sağ kalım oranı %25 olarak belirtilmektedir (Harbeck et al 2019). Bu nedenle TNMK'nın agresif özelliklerinden dolayı, hastaların hedefli tedavi almasını sağlamak için doğru teşhis önem arz etmektedir (Penault-Llorca and Viale 2012).

2.1.2. Epidemiyolojisi

Meme kanseri için çevresel ve genetik risk faktörleri hakkındaki bilgilere, epidemiyolojik çalışmalar büyük ölçüde katkı sağlamaktadır. Irk, etnik köken, ailede kanser öyküsü, genetik özelliklerin yanı sıra artan alkol tüketimi, fiziksel hareketsizlik, ekzojen hormonlar ve spesifik kadın üreme faktörleri gibi değiştirilebilir risklerin tümü meme kanserinde iyi bilinen risk faktörleri arasındadır. İlk regl döneminde daha genç yaşta olması, doğum sayısı, ileri yaşlarda gebelik ve seks hormonu düzeyindeki değişiklikler meme kanserinde risk faktörlerini etkileyebilmektedir (Coughlin 2019). TNMK tümör biyolojisi ırk ve etnik kökene göre değişiklik göstermekte ve ölüm oranlarındaki farklılıklara neden olmaktadır (Karim et al 2023). Yapılan çalışmalar ile Afrikalı-Amerikalı kadınların diğer ırklara kıyasla prevalansın daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Rhee et al 2008). Beyaz, Hispanik ve Asyalı kadınlarla karşılaştırıldığında, siyah kadınların daha agresif, ileri evre meme kanseri geliştirmeye daha yatkın oldukları bilinmektedir. TNMK hastalarında dört yıllık sağ kalım süresinin %85,5 olduğu bunun yanı sıra TNMK olmayan hastalarda ise bu oranın %94,2 olduğu bildirilmektedir. Ek olarak, TNMK hastalarının diğerlerine kıyasla tümör nüksüne kadar geçen sürenin 1,2 yıl kadar daha

kısa olduğu belirtilmektedir (de Ruijter, Veeck, de Hoon, van Engeland and Tjan Heijnen 2011). Popülasyona dayalı araştırmalarla TNMK'nın hormon reseptör (HR) pozitif ve HER2 negatif tümörlere kıyasla 20-39 yaşları arasındaki kadınlarda daha yaygın olduğu gösterilmektedir. Başka bir çalışmada, daha genç yaşta menarş bazal benzeri meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir (John et al 2020). Gülbahçe ve ark.'nın (2018) yaptığı çalışmaya göre, bazal benzeri tümörler genç kadınlarda TNMK'nın daha büyük bir kısmını oluştururken, bazal olmayan alt tipler 65 yaş üstü kadınlarda TNMK'nın yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (Gulbahce et al 2018). TNMK hastalarının aile geçmişlerine bakıldığında çoğunlukla over ve/veya meme kanseri olduğu görülmektedir. Bu hastalarda erken başlangıç gözlenmesi hastalığın genetik faktörlerle bağlantılı olduğunu da göstermektedir. Bu kapsamda TNMK'nın agresif heterojen yapısına neden olan genomik yapısının bilinmesi ve önemli mutasyonların tanımlanması ile TNMK'ya yönelik spesifik tedavilerin gelişmesine katkı sağlanabilir. Ayrıca, TNMK'ya sebep olabilen hormonal değişiklikler arasında hamilelik de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar ile yaşa (45-60 yaş) ve hamileliğe bağlı olarak (≤ 35) iki yıl içerisinde tanımlanan kanserlerin TNMK olması olasılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Daha erken menarş yaşı, çoğul gebelik, daha büyük bel-kalça oranları, daha düşük emzirme oranları ve yüksek yağlanmanın da TNMK gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Karim et al 2023).

2.1.3. Klinik Özellikleri

TNMK'nın agresif klinik ve patolojik özellikleri arasında, erken yaşta başlangıç, yüksek mitotik indeks, olumsuz histolojilerin daha sık görülmesi ve uzak bölgelere nüks yer almaktadır (Rhee et al 2008). Tanıdan sonraki ilk beş yıl içinde sağkalım oranları zayıf ve nüks olasılığı yüksektir. Farklı TNMK alt tiplerinin çeşitli terapötik yanıt ve prognoz sergilemesine rağmen, klinik görüntülemelerde birçok özelliği hakkında oldukça az şey bilinmektedir. Moleküler ve klinik özellikleri nedeniyle TNMK tümörlerin görüntülemesindeki görünüşleri büyük farklılıklar göstermektedir. TNMK olmayanlarla karşılaştırıldığında, TNMK tümörlerinin mamogramlarda ve ultrasonlarda daha sık kötü huylu görüldüğü bildirilmektedir. Oldukça agresif tümörler tipik olarak hem karşılık gelen histopatolojik mikroskopik görüntülerde hem de klinik görüntülemelerde pürüzsüz ve zorlayıcı sınırlara sahiptir. Ayrıca, TNMK

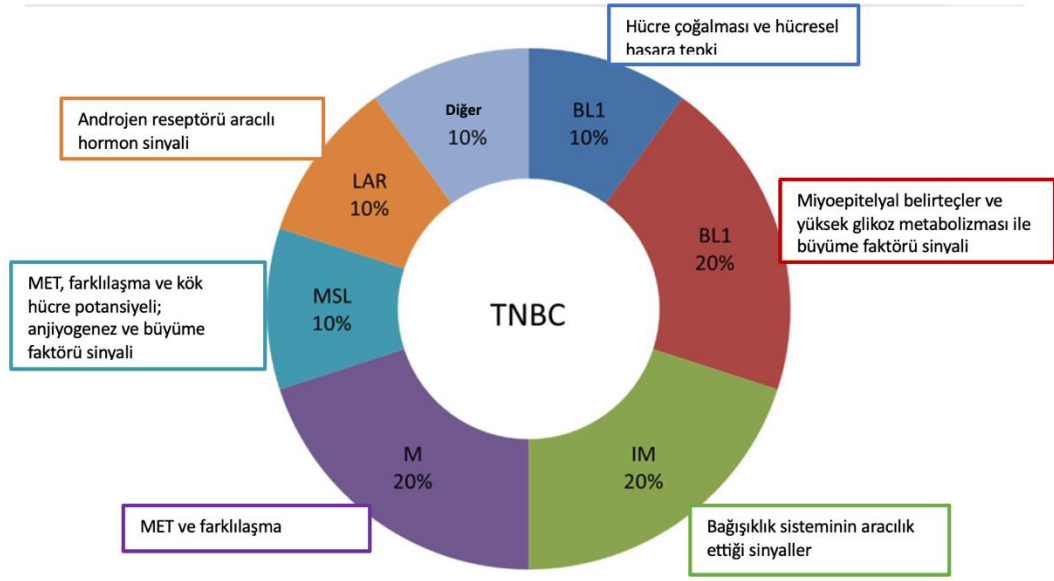
tümörleri ile TNMK olmayan tümörlerin özellikle ultrasonda TNMK'nın değişken paterni nedeniyle sınırlı olabileceği belirtilmektedir (Li et al 2018, Müller et al 2020). Müller ve ark'nın (2020) bulgularında, TNMK tümörlerinin ultrasonografi ve mamografideki görünümünün hem histolojik alt tipten hem de farklılaşma derecesinden etkilendiği gösterilmiştir (Müller et al 2020). Ek olarak, TNMK ile yapılan çalışmalar sonucunda boyutu >20 mm olan tümörler, yüksek aksiller lenf nodu metastazı sıklığı, artan mitotik aktivite gibi morfolojik özellik gösterdiği bildirilmiştir (Reddy, Suresh and Pai 2017).

2.1.4. Moleküler Özellikler

TNMK'nın genomunun karmaşıklığı ve heterojenliği, yeni nesil dizilemedeki (NGS) gelişmelerle ortaya çıkmıştır. TNMK ile ilişkili kansere neden olan genlerin mutasyonel spektrumunda önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Somatik ve germ mutasyonlar TNMK gelişmesine ve yatkınlığına neden olmaktadır. Ek olarak, TNMK ile ilişkili mutasyon spektrumu şaşırtıcı derecede heterojenliğe sahiptir ve bu nedenle TNMK'yı diğer meme kanseri türlerinden farklı kılmaktadır. Çözümlememiş önemli bir konu, TNMK'nın neden olduğu genetik değişikliklerin tedavi olasılıkları için nasıl kullanılacağıdır (Shi, Jin, Ji and Guan 2018).

TNMK, gen ekspresyonu profillemeye çalışması kullanılarak sıklıkla bazal benzeri meme kanserinin (BLMK) bir alt tipi olarak kategorize edilmektedir. TNMK ve BLMK gen ekspresyon profilleri yaklaşık %56 oranında örtüşmektedir. TNMK ile BLMK arasındaki örtüşme oranı %50 ila 90 arasında değişebilirken, TNMK olmayan ve BLMK arasında yalnızca %11,5'tir (Yin et al 2020).

Lehmann ve ark. (2011) tarafından 587 TNMK hastasından alınan tümör örnekleri üzerinde gen ekspresyonu profili çıkarılmıştır ve TNMK'yı altı alt tipe sınıflandırılmıştır: luminal androjen reseptörü (LAR), immünomodülatör (IM), mezenkimal kök benzeri (MSL), mezenkimal (M), bazal benzeri 2 (BL2) ve bazal benzeri 1 (BL1) (Şekil 2) (Yin et al 2020).



Şekil 2: Genlerin ekspresyon profiline dayalı olarak TNMK'nın moleküler alt tiplendirilmesi (He et al 2018).

BL alt türleri oldukça agresif ve proliferatif kanserlerdir (Karim et al 2023). BL1 alt tipinde hücre döngüsü ile bağlantılı genlerin anormal seviyede ekspresyonu ve *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* ve *RB1* gibi DNA onarımı ile ilişkili genlerin sıklıkla homozigot ve heterozigot değişim gözlenmektedir (Yin et al 2020). BL2 alt tipinde büyüme faktörü hücrelerinin anormal seviyede eksprese olmakta NGF, Wnt/ β -katenin, EGFR ve MET sinyal yolları aşırı düzeyde etkinleştirilmektedir. Metaplastik meme kanseri olarak da bilinen M alt tipi, oldukça aktif farklılaşma yollarına (Anaplastik lenfoma kinaz yolu, Wnt yolu ve TGF sinyali), hücre dışı matriks-reseptör etkileşim yollarına ve hücre göçüyle ilişkili sinyal yollarına sahiptir (Yin et al 2020, Karim et al 2023). M ve MSL alt tipleri hücre farklılaşma yolları, hücre dışı matriks ve epitel mezenkimal geçiş (EMT) ile ilgili genlerle karakterize edilmektedir. MSL alt tipi ise proliferasyonla ilgili genleri daha az ifade etmesi ve mezenkimal kök hücrelerle ilgili genlerin aşırı eksprese olması ile karakterizedir (Lehmann and Pietersen 2014). İmmün hücre fonksiyonlarında yer alan genlerin fazlalığı IM alt tipinde ifade edilmektedir. İmmün hücre sinyali, antijen sunumu, sitokin sinyali ve immün sinyal iletim yolu (NF- κ B, JAK/STAT ve tümör nekroz faktörü (TNF) sinyalleme gibi) IM alt tipinin zenginleştirilmiş gen kümeleri

arasındadır. LAR alt tipi ER negatif olmasına karşın zenginleştirilmiş hormon tarafından düzenlenen yolak ile luminal alt tipe benzer bir gen ekspresyon modeli sergilemektedir (Lee, Oh, Go, Han and Choi 2020).

TNMK tümörleri temelde bazal benzeri gen ekspresyonu modeli sergilemesine rağmen, elde edilen verilerde farklılıklar hasta popülasyonunun özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Lee et al 2020). Lehmann ve ark. (2014) PAM50 intrinsik alt tiplendirmesi olarak gerçekleştirdiği çalışmada, LAR ve MSL alt tipleri hariç diğer TNMK alt tiplerinin bazal benzeri alt tiplerden oluştuğu belirlenmiştir (IM [%84], BL1 [%99], M [%97] ve BL2 [%95]) (Yin et al 2020). Çok sayıda araştırma, Lehmann'ın sınıflandırmasından sonra TNMK'nin benzer bir moleküler sınıflandırmasını bildirmiştir. 198 TNMK vakasının gen ekspresyon profilini kullanan Burstein ve ark. (2015) bazal benzeri immün sistemi baskılanmış (BLIA), LAR, mezenkimal (MES), ve bazal benzeri immün sistemi baskılanmış (BLIS) dört moleküler alt grup önermiştir. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA) ve mRNA ifadesiyle eşleştirilmiş 165 TNMK örneğinin sınıflandırma analizinin ardından Liu ve ark. (2016) diğer araştırmalarla karşılaştırılabilecek dört moleküler TNMK alt tipi (LAR, MES, IM ve BLIS) tanımlamıştır (Lee et al 2020, Yin et al 2020). Yi-Zhou Jiang ve ark., 2019 yılında Çin'de TNMK hastalarının RNA dizilimi, ekzom dizilimi ve kopya numarası dizisi analizine ile TNMK'ları luminal androjen reseptör (LAR), immünomodülatör (IM), bazal benzeri (BL) immün baskılanmış ve mezenkimal benzeri (MSL) olmak üzere 4 alt gruba ayırmıştır (Jiang et al 2019).

Ayrıca, Aparicio ve ark. tarafından 100'den fazla TNMK tümöründe *TP53* mutasyonlarının yüksek oranda olduğu belirlenmiştir. Ancak vakaların %12'sinde bilinen herhangi bir "driver" gende somatik mutasyonların bulunmaması primer TNMK tümörlerinin başlangıçtan itibaren mutasyon açısından heterojen yapı sergilediğini göstermiştir (Abramson, Lehmann, Ballinger and Pietenpol 2015).

Denkert (2017) çalışmalarında TNMK, artan proliferatif aktivite, artan bağışıklık hücresi infiltrasyonu, bazal benzeri ve mezenkimal fenotipler, kısmen BRCA1 fonksiyon kaybına bağlı hatalı homolog rekombinasyon ve androjen reseptörlerinin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilmektedir (Li et al 2022).

Bu nedenle, TNMK alt tip özellikleri ve moleküler değişimler hakkında edineceğimiz bilgiler sayesinde, moleküler hedefli ve/veya immünoterapötik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi mümkün olabilir (He et al 2018).

2.2. TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Erken evre TNMK'lı hastaların tedavisinin temel dayanakları cerrahi, kemoterapi ve radyaterapi içermektedir. Bu tedaviler hastalığın klinik kontrolünü ve iyileşme oranını artırmak amacıyla uygulanmaktadır. Son yıllarda kemo-duyarlı TNMK hastaların platin ve rutenyum bazlı ilaçlarla neoadjuvan kemoterapiye olumlu yanıt verdiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, TNMK hastalarının (evre I ve III) %50'den fazlasında yoğun ve kapsamlı tedaviye rağmen nüks görülmekte ve bu hastaların %37'sinden fazlası 5 yıl içinde kaybedilmektedir (Jia et al 2017). TNMK tedavisi için birincil adjuvan tedavi kemoterapidir. Çünkü hormonal veya HER2-hedefli ajanlara TNMK hastalarının yanıtı düşüktür. Bu tümörler antrasiklin ve antrasiklin/taksan bazlı rejimlere yanıt vermektedir. Bununla birlikte, yüksek nüks riskine sahiptirler. Bu kapsamda yenilikçi tedavi seçeneklerine spesifik gen mutasyonlarına odaklanılmaktadır. Bu genler içerisinde, *BRCA1* geninde işlev bozukluğu olan tümörlerde çift zincirli DNA tamiri onarımında rol alan homolog rekombinasyon mekanizması çalışmadığı için platinyum gibi DNA'ya zarar veren kemoterapötiklere karşı duyarlılığın artmasına neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda platin bazlı rejimlerin TNMK tedavisinde etkili olabileceği belirtilmesine rağmen, bunu destekleyen çok fazla klinik kanıt yoktur (Farmer et al 2005, Irvin and Carey 2008). Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri ise son yıllarda FDA tarafından TNMK tedavisinde kullanımı onaylanan diğer yeni nesil bir ilaç grubudur. *BRCA1/2* geninde mutasyon olan ve HR mekanizmasının çalışmadığı TN tümörlerde PARP'ın inhibe edilmesi ile sentetik letaliteye neden olarak TNMK hastalarında etkili bir tedavi olanağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Ek olarak, PARP inhibitörlerinin DNA'yı hedefleyen kemoterapi ajanları ile de sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir (Farmer et al 2005, Irvin and Carey 2008).

TNMK'nın heterojen yapısı göz önüne alındığında, tümöre özgü moleküler değişimlere odaklanan kişiselleştirilmiş tedavi seçenekleri kemoterapiye tam olarak yanıt vermeyen TNMK hastalarının %60-70'inin tedavisinde etkili bir seçenek

olabilir. Bu kapsamda çoğu araştırma, TNMK'da tek ilaç olarak başarıyla hedeflenebilecek veya kemoterapinin doğal direncini aşabilecek moleküler hedeflerin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmaktadır (Bianchini, Balko, Mayer, Sanders and Gianni 2016). Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmalarda bazı moleküler hedeflere özgü spesifik inhibitörlere odaklanılmaktadır. Örneğin; Livasy ve ark.'nın (2006) tarafından bazal benzeri TNMK tümörlerinin %70-78'inin EGFR'yi yüksek seviyelerde ifade ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle EGFR'nin TNMK'da potansiyel bir terapötik hedef olduğu belirtilmiştir. Klinik çalışmalarda, EGFR'nin TNMK hedefli tedavi için umut vaat eden bir hedef olarak öngörülmesini destekleyen klinik öncesi verilere rağmen, TNMK için EGFR hedefli tedavinin ile istenilen etki hastalarda belirlenememiştir (Yin et al 2020). Kemoterapi ile EGFR inhibitörü olarak setuksimabın kombin uygulandığı çalışmada sadece kemoterapiye göre yanıt oranında (RR) az bir artış belirlenmiştir (%28'e karşılık %33). Sisplatin ile yapılan bir çalışmada, setuksimab ile birlikte veya setuksimab olmadan metastatik TNMK hastalarında tedaviye setuksimab eklenmesinin RR'yi %10'dan %20'ye çıkardığı bildirilmiştir. Bu nedenle gerçekleştirilen klinik çalışmalar ile tek başına EGFR hedefli tedavinin anlamlı etkinlik sağlamadığı bildirilmiştir. Lehmann ve ark.'nın yapmış olduğu gen profillemeye analizi çalışmasına dayanarak, BL-2, M ve MSL alt tiplerinde aşağı yönde sinyal iletim inhibitörlerinin (PI3K, MAPK ve Scr inhibitörleri) büyüme faktörü inhibitörleriyle kombin halinde kullanılmasının daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceği belirtilmektedir (Lehmann et al 2014, Yin et al 2020).

Fosfatidilinositol-3 kinazlar veya PI3K'ler olarak bilinen lipid kinaz ailesi, inositol fosfolipitlerde bulunan inositol halkası 3'-OH grubunu fosforile etme özellikleriyle karakterizedir. Akt ise üç izoformdan (Akt1, Akt2 ve Akt3) oluşan bir serin/treonin kinazdır. Hücre döngüsünün ilerlemesi, protein sentezi gibi birçok hücresel süreç için önem teşkil etmektedir (Vara et al 2004, Nitulescu et al 2018). TNMK'da PI3K veya AKT1'deki mutasyonlar sıklıkla görüldüğünden, bu yolak TNMK'da önemli bir hedef haline gelmektedir (Li et al 2022). PI3K yolu yaygın olarak hem M hem de LAR alt tiplerinde aşırı aktivasyona sahiptir (Shi et al 2018). Kanser modellerinde, oldukça seçici pan-AKT inhibitörleri capivasertib ve ipatasertib taksonlarla kombinasyon halinde, özellikle PI3K yolu mutasyonları olan hastalarda sinerjistik

antitümör etkinliği kanıtlanmıştır. Benzer bir çalışmayla capivasertibin antitümör aktivitesi değerlendirilmiş ve klinik kanıtlar çelişkili olmakla birlikte TNMK için PI3K/Akt sinyal yolağının hedeflenmesinin terapötik önemi vurgulanmaktadır (Karim et al 2023).

TNMK tedavisinde bir diğer tedavi seçeneği olarak anti-androjen tedavi dikkat çekmektedir. Hem sağlıklı meme dokuları hem de meme kanseri dokuları AR ekspresyonuna sahip olmasına rağmen, AR ekspresyon düzeylerinin iki tip meme kanseri dokusu arasında belirgin şekilde farklılık gösterdiği belirtilmektedir. TNMK hastalarının %10-15'inde AR ifadesi pozitifdir. LAR alt tipinde TNMK'nın AR pozitif olduğu bilinmektedir. Doane ve ark.'nın 99 meme kanseri hastası ve birbirinden farklı 8 meme kanseri hücre hatları ile yaptığı çalışmada, LAR alt tipi hastalar için AR'yi inhibe etmeye yönelik tedavi stratejisi önerilmiştir. Bir başka çalışmada Gucalp ve ark. LAR alt tipi TNMK hastaları için antiandrojen tedavisinin olumlu sonuçlar verebileceğini bildirmiştir. Seçici bir AR inhibitörü olan bicalutamid'in, AR (+) ve ER ve PR ekspresyonu olmayan meme kanseri hastalarının tedavisi için gerçekleştirilen faz II klinik çalışmasında %19'luk bir klinik fayda oranı (CBR) gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Bicalutamid, AR pozitif tümörleri olan hastalara tek ajan olarak uygulandığında, tedaviden 6 ay sonra hastaların %19'unda klinik iyileşme görülmüştür. Diğer bir ileri evre AR (+) TNMK hastalarında yapılan faz II araştırmasının sonuçlarına göre enzalutamid'in daha etkin bir AR inhibitörü olduğu açıklanmıştır. Ayrıca, Traina ve ark. çalışmalarında AR+ TNMK tümörlerinde AR inhibitörü olan enzalutamidin %25'lik CBR elde etmişlerdir. Tüm bu çalışmalara ek olarak halen preklinik çalışmalara ve AR'nin TNMK karsinogenezindeki rolüne ilişkin daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Bianchini et al 2016, Yin et al 2020).

2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ

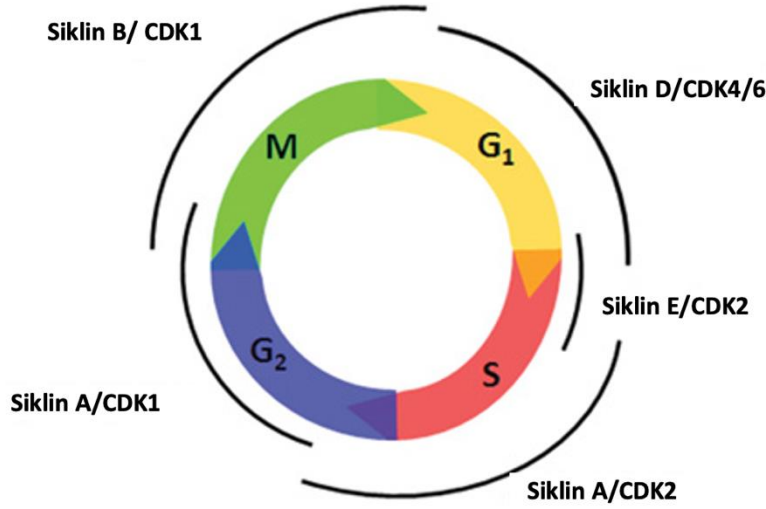
Hücre döngüsü, hücrelerin genetik materyalini kopyalayarak iki yavru hücre oluşmasını sağlayan karmaşık ve etkili bir şekilde kontrol edilen bir süreçtir. G1, S (DNA sentezi), G2/M'den (genetik materyalin kopyalanması ve eşit dağılım) oluşan üç hücre döngüsü aşaması, çok sayıda hücre protein tarafından düzenlenmektedir (Zou and Lin 2021). Hücre döngüsü, üç temel kontrol noktası tarafından düzenlenen

ve geri dönüşü olmayan bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Icard, Fournel, Wu, Alifano and Lincert 2019). İnterfaz ve M fazı, mitotik hücre döngüsünün iki ayrı aşamasıdır. Sonuç olarak, interfaz sırasında hücre materyalinin kopyalanması ve ardından mitoz sırasında genetik olarak aynı iki yavru hücreye bölünmesi sırayla gerçekleşmektedir. Genomik DNA'nın zamanında ve kesin şekilde kopyalanması ve ayrılması, hücre döngüsünü oluşturan karmaşık düzenleyici bileşenler tarafından düzenlenmektedir. S fazı (sentez fazı), DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. Hücre döngüsünün G1 sırasında başlatılması ve G2 sırasında kromozomal segregasyonla sonuçlanan sürecin başlatılmasına ilişkin önemli seçimler, hücre döngüsünün kontrolü için çok önemli olan bu aşamalarda yapılmaktadır (Visconti, Della Monica and Grieco 2016).

Geçtiğimiz birkaç on yıl boyunca yürütülen araştırmalara göre, hücre döngüsü fazlarının geçişi, temel olarak çeşitli hedef proteinlerin sikline bağımlı kinaz (CDK)-siklin kompleksler tarafından fosforilasyon ile düzenlenmektedir (Şekil 3). Maya ve memeli hücrelerinde yapılan kapsamlı çalışmalarda hücre döngüsünü düzenleyen mekanizmalar araştırılmış ve 20'den fazla CDK tanımlanmıştır. CDK'nın düzenleyici alt birimi olan siklinlerin, CDK aktivitesine kuvvetli bir şekilde bağlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca CDK'ların aktivasyonu, siklinlerin sentezine ve parçalanmasına bağlıdır. Siklinlerin aksine sikline bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI'ler) CDK aktivitesini baskılamaktadır. Bu üç yapının çalışması, hücre döngüsü sırasında uygun ilerlemeyi sürdürmek için oldukça önemlidir. Bunlara ek olarak fosforilasyon ve defosforilasyon işlemleri CDK aktivitesini de kontrol etmektedir (Zou et al 2021, Icard et al 2019).

Siklin D1, D2 ve D3, G1 fazına geçişi başlatmak ve CDK4 veya CDK6 ile etkileşime girmek için büyüme faktörleri tarafından aktive edilmektedir. Siklin D-CDK4/6 aktivitesinin artması ile retinoblastoma proteini (RB) fosforillenmekte ve p53 inaktivasyonu gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda pRB-E2F kompleksinden E2F salınımı gerçekleşmektedir. E2F'nin salınması düşük düzeyde besin olması durumunda hücre siklusunda tutulmaya neden olan G1 kontrol noktasının inaktif olmasına neden olmaktadır. Siklin E-CDK2'nin aktivasyonu ile ise S fazına girişteki ihtiyaç duyulan genlerin ifadesi sağlanmaktadır. S fazı ilerlemesi siklin A-CDK2

tarafından yönlendirilmekte, G2 fazı ilerlemesi siklin A-CDK1 tarafından ve G2 fazının sonundan mitoz fazı çıkışına kadar ilerleme ise siklin B-CDK1 kompleksi tarafından düzenlenmektedir. Özellikle Polo benzeri kinaz 1 (PLK1) ve Aurora kinaz A/B dahil olmak üzere diğer kinazlar mitoz, kromozomal ayrılma ve sitokinez yoluyla ilerleme için gereklidir (Icard et al 2019).

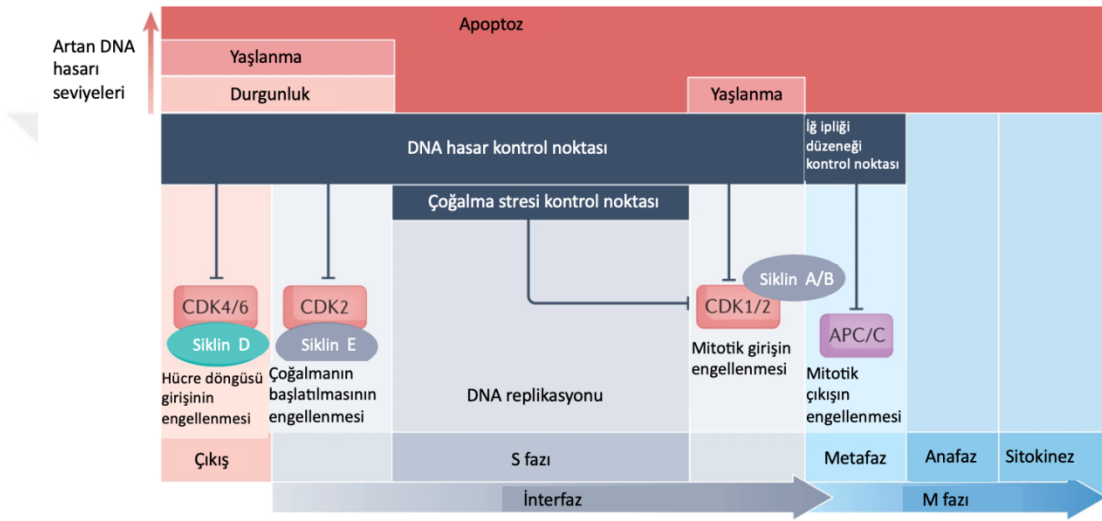


Şekil 3: Memeli hücre döngüsünün düzenlenmesi (Suryadinata, Sadowski and Sarcevic 2010).

2.3.1. DNA Hasarı Kontrol Noktası ve Hücre Döngüsü

Endojen ve eksojen hasarlar sıklıkla hücre bölünmesi mekanizmasını ve genomun stabilitesini tehlike altında bırakmaktadır. Örneğin reaktif oksijen türleri, metabolik olaylar, inflamasyon gibi durumlar kromozomlara zarar verebilmekte ve DNA replikasyonuna ve kromozomların segregasyonuna müdahale edebilmektedir. Hasar durumunda hücre döngüsü ilerlemesini durdurmak, onarımı teşvik etmek veya onarılamaz bir mutasyon varlığında, hasarlı genomun yavru hücrelere transferini önlemek amacıyla hücre ölümünü teşvik etmek için hücre döngüsü kontrol noktaları rol almaktadır (Visconti et al 2016). Hücre bölünmesi sırasında genetik hataların birikimini ve aktarımını önlemek için hücreler, döngüdeki kontrol noktalarına güvenmektedir. Bu kontrol noktaları, interfaz aşamasında DNA hasarından, S fazında replikasyon çatalı bütünlüğünün bozulmasından korunmasında ve M fazı aşamasında metafazdan anafaza geçişi regüle eden sinyal yollarının aktivitesi ile

düzenlenmektedir (Şekil 4) (Matthews, Bertoli and Bruin 2022). Hasar görmüş DNA'ya karşı DNA hasar yanıtı (DDR), hücre döngüsünün ilerlemesini durduran ve onarımı teşvik eden sensör proteinlerinden oluşmaktadır. DNA hasarının geri döndürülemez olmadığı durumlarda bu sinyal yolları aktifleştirilmektedir. Bununla beraber hasar onarılamaz düzeye ulaştığında ise programlanmış hücre ölümü gerçekleşmektedir (Visconti et al 2016, Pedroza- Garcia, Xiang and De Veylder 2022).



Şekil 4: Kontrol noktasına bağlı hücre döngüsünün durdurulması ve çıkışı (Matthews et al 2022).

Hasarlı DNA'yı tanımak, DNA hasarı oluştuğundaki ilk adımdır. Ökaryotik hücreler, çeşitli hasar türlerini tespit eden ve sonunda bu proteinlerden birini aktive edecek farklı sensör protein kompleksleri içermektedir. Her ikisi de fosfatidilinositol 3-kinaz benzeri ailenin üyeleri olan mutasyona uğramış ataksi telenjiyektazi (ATM) ve ATM ve Rad3 ile ilişkili (ATR), bu tür hasarın sinyal dönüştürücüleri olarak görev yapan iki ana kinazdır. ATR genellikle tek sarmallı DNA (ssDNA) ve replikasyon çatallında gerçekleşen hatalar tarafından etkinleştirilirken, çift zincir (dsDNA) kırıkları büyük ölçüde ATM kinazı etkinleştirmektedir (Pedroza- Garcia et al 2022). dsDNA kırıkları tarafından aktive edilen ATM, Kontrol Noktası Kinaz 2'yi (CHK2) fosforile etmekte ve G1 kontrol noktasının uyarılmasını sağlamaktadır. Aktive olan CHK2, CDC25A fosfatazı inhibe ederek, CDC25A, siklin A/CDK2 ve siklin E/CDK2 kompleksleri

üzerindeki inhibe edici fosforilasyonu kaldırma özelliğini kaybetmektedir ve böylece hücrelerin S fazına ilerlemesi engellenmektedir. G1 noktasının p53'e önemli ölçüde bağımlı olduğu göz önüne alındığında ATM kinazın bir diğer önemli görevi dikkat çekmektedir. ATM, p53'ün fosforilasyonunu indükleyerek negatif yönde düzenleyici özelliği olan ubikutin ligaz MDM2'ye olan bağlanma gücünü azaltmaktadır. Böylece p53 stabilizasyonu gerçekleşmektedir (Visconti et al 2016). S fazı girişini önlemek için p53, öncelikle G1'de siklin-CDK komplekslerini inhibe eden CDK inhibitörü p21'i aktive etmektedir (Matthews et al 2022).

S fazı kontrol noktası, durdurulan replikasyon çatallarında veya nükleotid tamir ve eksizyon süreçlerinde S fazında DNA hasarı gerçekleştiğinde replikasyonu önlemek için etkinleştirilmektedir. ATR, hasarı tespit ederek kontrol noktası kinaz 1'i (CHK1) aktive etmekte ve Cdc25A proteozomal yıkımına neden olmaktadır. Böylece, hücrenin S fazına ilerlemesini engellemektedir. Buna ek olarak hasarlı DNA varlığında, ATR ve CHK1 G2/M kontrol noktasını uyararak hücrelerin mitoz girmesini engellemektedir. Mitoz başlangıcı için ana mitotik kinaz siklin B'ye bağımlı kinaz 1'in (CDK1) aktivasyonu gerekmektedir. Kontrol noktası, büyük ölçüde CDC25'in proteazomal degradasyonu ve CHK1'e olan bağımlı fosforilasyon ile beraber Wee1'in bağlanmasını indükleyerek CDK aktivitesini sınırlamaktadır. Sonuç olarak ATR, CDK1 inhibitör kinaz Wee1'i aktive ederek ve CHK aracılığıyla CDC25C'yi inhibe ederek hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin mitozu başlatmasını önlemek için siklin B/CDK1 aktivasyonunu baskılamaktadır (Feijoo et al 2001, Visconti et al 2016, Matthews et al 2022).

ATM ve ATR, DNA hasarına cevap olarak hücre döngüsü ilerlemesini engellemekle birlikte bir dizi başka substratı fosforile ederek DNA onarımını da başlatmaktadır. Hasarın onarılamadığı durumlarda, hücrenin akıbeti ölüm ya da yaşlanma olabilmekte; bu da büyümenin kalıcı olarak durması anlamına gelmektedir. Onarılamayan DNA hasarına sahip hücreler mitoz bölünmeye zorlandığında, kalıcı proliferasyonun duraklamasına veya hücre yok olmasına neden olan mitotik katasrof mekanizması olarak adlandırılan bir mekanizmayla karşılaşmaktadır. Ancak, mitotoik katasrof mekanizmasının detayları hala belirsizliğini korumakla birlikte,

hücreler, ya mitozda ölmekte olup ya da hücre döngüsünün bir sonraki G1 fazına geldiğinde ölmesi ya da yaşlanmasıyla sonuçlanmaktadır (Visconti et al 2016).

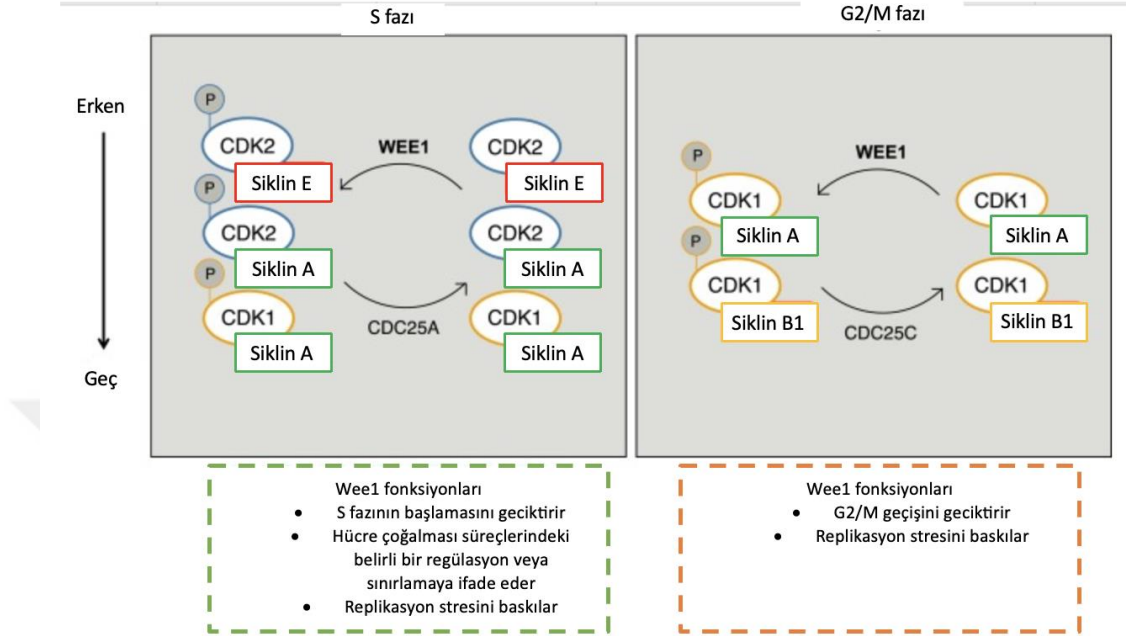
2.3.2. Hücre Döngüsünde Wee1 Yolağının Rolü

Wee1, siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) üzerindeki tirozin rezidülerini fosforilleyerek CDK'yı inaktive edebilen ve G2/M fazı geçişinde hücre döngünün durmasını indükleyen bir serin/treonin kinazdır (Barnaba and LaRocque 2021). Mitotik girişten önce DNA onarımı için G2/M hücre döngüsü kontrol noktasının durdurulmasının önemli bir kısmı, tirozin kinaz Wee1 tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 5) (Zou et al 2021). Bu protein, CHK1 gibi, kanser hücrelerinin, DNA hasarı mevcut olduğunda hücre döngüsünün durdurulmasını indüklemesi için gerekmektedir (Barnaba et al 2021). Wee1, CDK1 ve CDK2'yi fosforile ederek inaktivasyonlarına sebep olmaktadır (Zou et al 2021). Bunun sonucunda mitoz teşvik edici faktör (MPF) olarak da bilinen homodimer siklin B/A-CDK1 kompleksinin G2/M kontrol noktasında inaktif hale gelmesiyle hücre döngüsü durdurulmaktadır. Ayrıca, G1/S kontrol noktasında gelişen inaktif siklin E CDK2 kompleksi tarafından da hücre döngüsü durdurulmaktadır (Alli, Yadav, Suresh and Jadav 2023).

G1/S kontrol noktası ve tümör baskılayıcı *TP53*, kanser hücrelerinin çoğunda aktif değildir. Sonuç olarak, S fazındaki replikasyondan önce hücreler DNA'yı onarma kapasitelerini kaybetmekte, bu da onların mutasyonları barındırmasına olanak tanımaktadır (Alli et al 2023). Sonuç olarak hücrelerin G2/M kontrol noktası, döngünün durdurularak apoptozu atlatacak kadar DNA onarımının gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Bu sebeple G2/M kontrol noktasındaki kısıtlamanın ortadan kaldırılması kanser hücrelerini önemli ölçüde etkileyecektir. Wee1 aynı zamanda G1/S kontrol noktasını da inaktive etme özelliğine sahip olduğundan dsDNA kırıkları bir biyobelirteci olan γ -H2AX (histon ailesi proteini X) seviyesinin artmasına ve mitotik katastrofa neden olmaktadır (Matheson, Backos and Reigan 2016).

Özetle, Wee1'in inhibe edilmesi, Wee1'i aşırı eksprese eden veya Wee1'i eksprese etmek için indüklenen hücreler, mitotik felaketten kaçmak için G2/M kontrol

noktasına bağımlı olduğundan dolayı, Wee1 inhibisyonu kanser tedavisinde dikkat çekmektedir (Esposito, Giuffrida, Raciti, Puglisi and Forte 2021).



Şekil 5: Wee1'in hücre döngüsünün regülasyonunda işlevi (Elbæk, Petrosius and Sørensen 2020).

2.3.3. Wee1 İnhibitörleri

Mitotik evreden önce DNA onarılması için G2/M kontrol noktasının durdurulmasında Wee1 kinaz kritik bir rol oynamaktadır. Hasarlı DNA, G1 evresinde hücrelerin tutulması sırasında normal hücreler tarafından onarılırken, kanser hücreleri çoğunlukla hasarlı DNA'yı onarmak için işlevsel bir G2/M kontrol noktasına bağımlıdır. Wee1 kinaz, melanom, yetişkin ve pediatrik beyin tümörleri, lösemi ve meme maligniteleri dahil bir dizi kanser tipinde yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Bu malignitelerin birçoğu DNA'ya hasar veren ilaçlarla tedavi edildiğinden, Wee1'in inhibe edilmesi ve G2/M kontrol noktasının zayıflatılması tedaviyi geliştirme şansı sunmaktadır (Matheson et al 2016). Wee1 inhibitörleri, kanser hücrelerini G2/M hücre döngüsü kontrol noktasını atlamasında ve mitozaya geçmesinde daha erken girmesini uyararak mitotik katastrofa ve sonucunda hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle Wee1 inhibitörleri aynı zamanda antimitotik inhibitörler olarak rol almaktadır (Kong and Mehanna

2021). Bugüne kadar farklı Wee1 inhibitörleri (Adavosertib, PD0166285, Debio 0123, Azenosertib) ile farklı kanser tiplerinde yapılan klinik faz çalışmaları devam etmekte olup Tablo 1.'de özetlenmiştir. Ayrıca her bir inhibitöre özgü preklinik çalışmalara aşağıdaki tabloda yer verilmiştir. (Tablo 1).

Tablo 1: Wee1 inhibitörlerinin farklı kanser türlerindeki klinik çalışmaları.

ADAVOSERTİB	NCT NUMARASI	DURUMU	HASTA POPÜLASYONU	FAZ
	NCT01748825	Tamamlanmış	Katı Tümörler	Faz I
	NCT01164995	Tamamlanmış	Epitelyal over kanseri	Faz II
	NCT02207010	Tamamlanmış	Gliablastoma	Erken Faz I
	NCT0087241	Tamamlanmış	Daha önce tedavi edilmemiş evre IV skuamöz olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanseri	Faz II
	NCT02037230	Tamamlanmış	Pankreas adenokarsinomu	Faz I Faz II
	NCT02482311	Tamamlanmış	Over kanseri, TNBC, SCLC, diğer katı tümörler	Faz I
	NCT02610075	Tamamlanmış	Lokal ileri düzey katı tümörler, metastatik katı tümörler, over kanseri	Faz I
	NCT03668340	Aktif ve şu anda katılımcı alınmaktadır	Rahim kanseri	Faz II
	NCT02513563	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Akciğer kanseri	Faz II
	NCT02341456	Tamamlanmış	İleri katı tümörler	Faz I
	NCT03718143	Sonlandırılmış	Myelofibrosis, akut myeloid lösemi, miyelodisplastik sendromlar	Faz II
	NCT02585973	Tamamlanmış	Karsinoma, baş ve boyundaki skuamöz hücre	Faz I
	NCT03313557	Tamamlanmış	Katı tümörler	Faz I

	NCT02381548	Sonlandırılmış	Akut miyeloid lösemiler	Faz I
	NCT02593019	Tamamlanmış	Küçük hücreli akciğer kanseri	Faz II
	NCT02511795	Tamamlanmış	Refrakter katı tümörler, tekrarlayan küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC)	Faz I
	NCT02688907	Sonlandırılmış	Küçük hücreli akciğer kanseri	Faz II
	NCT02617277	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	İleri katı tümörler	Faz I
	NCT03012477	Tamamlanmış	Üçlü negatif metastatik meme kanseri	Faz II
	NCT02194829	Tamamlanmış	Metastatik pankreas adenokarsinomları	Faz I Faz II
	NCT02196168	Sonlandırılmış	Karsinoma	Faz II
	NCT02101775	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Over kanserleri	Faz II
	NCT03284385	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Böbrek kansinomları	Faz II
	NCT03253679	Tamamlanmış	İleri malign katı neoplazm, refrakter malign katı neoplazm	Faz II
	NCT02448329	Tamamlanmış	İleri mide adenokarsinom	Faz II
	NCT02087176	Sonlandırılmış	Daha önce tedavi edilmiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	Faz II
	NCT04439227	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	İleri lenfoma, refrakter multipl miyelom	Faz II
	NCT02666950	Tamamlanmış	Kronik miyelomonositik lösemi	Faz II
	NCT03315091	Tamamlanmış	Katı tümörler	Faz I
	NCT02906059	Tamamlanmış	Metastatik kolorektal kanser	Faz I
	NCT02508246	Tamamlanmış	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom	Faz I

	NCT02659241	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Fallop tüpü karsinomları, over karsinomları, periton karsinomları	Erken Faz I
	NCT03028766	Tamamlanmış	Hipofarenks skuamöz hücreli karsinom, ağız boşluğu skuamöz hücreli karsinom, gırtlak kanseri	Faz I
	NCT02791919	Bu çalışma kaydından önce geri çekilmiştir	CNS 2a, CNS 2b, CNS 2c, CNS1, tekrarlayan yetişkin akut miyeloid lösemi, tekrarlayan çocukluk çağı akut miyeloid lösemi	Faz I
	NCT03333824	Tamamlanmış	Katı Tümörler	Faz I
	NCT03579316	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Tekrarlayan fallop tüpü karsinom, tekrarlayan over karsinom, tekrarlayan primer periton karsinom	Faz I
	NCT04462952	Tamamlanmış	İleri katı tümörler	Faz I
	NCT04197713	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	İleri malign katı neoplazm	Faz I
	NCT01922076	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Anaplastik astrositom, anaplastik oligoastrositom, diffüz intrinsik pontin glioma, glioblastoma, gliosarkoma	Faz I
	NCT02095132	Tamamlanmış	Katı tümörler, sarkoma, pineoblastoma, sinir sistemi tümörleri, neoplazma	Faz I Faz II
	NCT02576444	Sonlandırılmış	Kanser	Faz II
	NCT04460937	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Adenokarsinomlar	Faz I
	NCT02546661	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Kas invazif mesane kanseri	Faz I

	NCT01076400	Sonlandırılmış	Rahim ağzı kanseri	Faz I Faz II
	NCT01047007	Sonlandırılmış	Katı tümörler	Faz I
	NCT03345784	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Adenokarinsomlar, uterin kanserleri, vajinal kanserler, servikal kanserler	Faz I
	NCT01849146	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Glioblastoma	Faz I
	NCT01357161	Tamamlanmış	Over kanseri	Faz II
	NCT02937818	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Platin refrakter geniş evre küçük hücreli akciğer karsinom	Faz II
	NCT04590248	Tamamlanmış	Rahim seröz karsinom	Faz II
	NCT03330847	Aktif ve katılımcı almadan devam etmektedir	Metastatik TNBC	Faz II
AZENOSERTİB	NCT04814108	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Rahim seröz karsinom	Faz II
	NCT05128825	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Yüksek dereceli seröz over, fallop tüpü veya primer periton kanseri	Faz II
	NCT05198804	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Over kanserleri, primer periton karsinom, fallop tüpü kanseri	Faz I Faz II
	NCT05368506	Bu çalışma kaydından önce geri çekilmiştir	İleri fallop tüpü karsinomları, ileri over karsinomları, ileri primer periton karsinomları, meme kanserleri	Erken Faz I
	NCT04972422	Durum bilinmemektedir	Katı tümörler	Faz I
	NCT05743036	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Metastatik kolorektal kanser	Faz I Faz II
	NCT04833582	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Osteosarkom	Faz I Faz II
	NCT05431582	Bu çalışma kaydından önce geri çekilmiştir	Tümörler, akciğer kanseri, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri, meme	Faz I

			kanseri	
	NCT04158336	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Katı tümörler	Faz I
	NCT06015659	Bu çalışma henüz katılımcı alımı için açılmamıştır	Pankreas kanserleri	Faz II
	NCT05682170	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Akut miyeloid lösemi	Faz I Faz II
	NCT04516447	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Katı tümörler, fallop tüpü kanseri, epitelyal over kanseri, periton kanseri	Faz I
	NCT06109883	Bu çalışma henüz katılımcı alımı için açılmamıştır	Metastatik kolorektal kanser	Faz I
DEBIO 0123	NCT03968653	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	İleri katı tümörler	Faz I
	NCT05109975	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	İleri katı tümörler	Faz I
	NCT05765812	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Glioblastoma IDH (isositrat dehidrojenaz) tabani tip, astrositom-derece III	Faz I Faz II
	NCT05815160	Bu çalışmaya şu an katılımcı alınmaktadır	Küçük hücreli tekrarlayan akciğer kanseri	Faz I

2.3.3.1. Adavosertib

Adavosertib (AZD-1775, MK-1775), seçici ve oldukça güçlü bilinen ilk Wee1 inhibitörüdür. Adavosertib ile tek ajan ve çeşitli kanserlerde DNA hasarına yol açan ajanlarla birlikte kombin tedavi olarak çalışmaları devam etmektedir (Matheson et al 2016, Ghelli Luserna di Rorà, Cerchione, Martinelli and Simonetti 2020). Etki mekanizmasına bakıldığında Adavosertib, monoterapi olarak uygulandığında kanser türüne bağlı olarak S ve/veya G2/M kontrol noktalarının etkisiz kılınmasını teşvik etmektedir. Adavosertib, hücre döngüsünde bozulmalar ve apoptozun indüklenmesi

ile ilişkili olup hücre döngüsünün Farklı fazlarında hücre siklusunun durmasına neden olmaktadır

- (i) S fazı kontrol noktasının etkisiz hale getirilmesinin sonucu olarak; hasar varlığında dahi kanser hücreleri DNA replikasyonunu başlattığında replikatif katastrof,
- (ii) G2/M fazı kontrol noktasının etkisiz hale getirilmesinin ardından, DNA'da hasar olsa dahi mitozaya giriş sonucu mitotik katastrof gerçekleşmektedir (Ghelli Luserna di Rorà et al 2020).

Ayrıca, Adavosertib kombin tedavi olarak kullanıldığında kemoterapi ve radyasyon tedavisi ajanlarının sitotoksitesini arttırmaktadır. Bu stratejiler apoptotik ölümü uyarak, DNA hasar onarımını engellemekte ve hücre döngüsü kontrol noktalarını inaktivasyonuna neden olmaktadır (Ghelli Luserna di Rorà et al 2020). Örneğin, AZD1775, yüksek dereceli glioma hücre hatlarını radyasyona, NSCLC hücrelerini Ciyonlarına, *p53* eksikliği olan pankreas ve kolon kanseri hücrelerini 5-florourasil dahil olmak üzere çeşitli DNA'ya zarar veren ajanlara ve AML hücrelerini sitarabin'e, medulloblastoma hücre hatlarını sisplatine duyarlı hale getirebilmektedir (Du et al 2020). Ek olarak yapılan çalışmalar ile *P53* eksikliği olan hücrelerde ve *in vivo* olarak, Adavosertib'in, gemsitabin, karboplatin ve sisplatin dahil olmak üzere DNA'ya zarar veren çeşitli kemoterapötik ilaçların etkinliklerini arttırdığı gösterilmiştir (Kong and Mehanna 2021).

AZD1775 ile yapılan prelinik çalışmaların çoğu, nükleosid analogları, platinler veya topoizomera inhibitörleri gibi DNA çapraz bağlanan ilaçlar dahil olmak üzere hücre döngüsü S fazını hedefleyen ajanlar ile kombin uygulandığında kemo-duyarlılığı artırıcı etki gösterdiğini bildirmektedir. Bununla beraber çeşitli tümörlerde AZD1775'in taksanlar gibi anti-mitotik ilaçlarla kombin uygulamasını destekleyen prelinik kanıtlar da mevcuttur (Visconti et al 2015, Kong and Mehanna 2021).

2.3.3.2. PD0166285

Wee1 kinaz inhibitörü olan PD0166285 ile yapılan çalışmalar, bu inhibitörün, kanserli hücrelerdeki G2 kontrol noktasını hasarlı hale getirdiği göstermiştir. Bu, DNA'ya zarar veren hücrelerin çok erken mitozaya girmesine neden olarak katastrof ile

sonuçlanmakta ve hücreleri ölüme karşı daha duyarlı hale getirmektedir (PosthumaDeBoer et al 2011).

PD0166285'in kanser hücreleri üzerindeki etkisi, p53'ün işlevsellik düzeyine bağlıdır. Temozolomid veya radyoterapi ile kombin uygulandığında glioblastoma hücre dizilerinde apoptoza neden olabilmekte ve mikromolar konsantrasyonlarda B16 melanom hücre dizilerinin proliferasyonunu engellediği belirlenmiştir. Ayrıca, normal insan astrositleri veya fibroblastları üzerinde herhangi bir toksik etkisi belirlenmemiştir (Du et al 2020).

Wang ve ark.'nın (2001) yaptığı çalışmada, sekiz kanser hücre hattından (PA-1, HT29, HeLa, HCT8, HCT116, DLD-1, H460, C26) PD0166285, hücresel düzeyde radyasyonun neden olduğu Tyr-15 ve Thr-14'te Cdc2'nin fosforilasyonunu önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir. Floresansla aktiveleşen hücre ayırıcı analizi ve biyokimyasal belirteçlerin her ikisi de PD0166285'in mitotik hücre popülasyonlarını büyük ölçüde artırdığını ve radyoterapinin neden olduğu G2/M fazında hücre tutulmasını tersine çevirerek TP53 mutasyonu olan hücrelerde daha etkin olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, erken mitozu tetikleyerek, G2/M kontrol noktasını ortadan kaldıran ajanlar, geleneksel kanser terapisinde hücre öldürülmesini geliştiren eşsiz bir antikanser ilaç sınıfını oluşturmaktadır (Wang et al 2001).

Bu inhibitör, özellikle geleneksel tedavilerle kanser hücrelerinin ölümünü arttıran yeni bir antikanser ilacı sınıfına ait olmakla birlikte zayıf seçiciliği nedeniyle klinik uygulaması sınırlıdır (Hashimoto et al 2006, Du et al 2020).

2.3.3.3. Debio 0123

Debio 0123, oldukça seçici oral bir Wee1 tirozin kinaz inhibitörüdür. Debio 0123'ün hem *in vivo* hem de *in vitro* tümör modellerinde antikanser etkinliği gösterilmiştir. Debio-0123, histon H3 ve γ H2AX miktarlarındaki doza ve zamana bağlı artışla hedefe dikkate değer bir etkileşim sergilemektedir. İlerlemiş katı tümörlü hastalarda, karboplatin ve aralıklı Debio 0123'ü kombin uygulamasının faz I çalışmasında antikanser etkinliğe ve hastalarda yönetilebilir bir güvenlik profiline sahip olduğunu belirlenmiştir (Papadopoulos et al 2022, Alli et al 2023). Yapılan bir başka araştırmada Debio-0123'ün *in vitro* glioblastoma karşı güçlü bir ilaç olduğu

bulunmuştur. Ayrıca, Debio-0123'ün monoterapi olarak ağız yoluyla uygulanmasının kan-beyin bariyeri penetrasyonunu arttırdığı ve *in vivo* tümör büyümesinin inhibisyonunu neden olduğu belirlendiği için terapötik potansiyeli vurgulanmaktadır (Alli et al 2023).

2.3.5. Azenosertib

Azenosertib olarak da bilinen Zn-C3, monoterapi olarak antikanser etkinliği sergileyen yeni geliştirilmiş oral ve seçici bir Wee1 inhibitörüdür (Liu et al 2023). Azenosertib, çeşitli kanser hücre dizileri üzerinde güçlü anti-proliferatif etkilere sahiptir. Katı tümörler, osteosarkom ve over kanseri dahil olmak üzere farklı kanser tiplerinin tedavisinde Wee1 kinaz inhibisyonunun etkinliğini incelemek için Azenosertib'in çok sayıda klinik çalışması yürütülmektedir. Ayrıca Azenosertib'in, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve over kanseri klinik çalışmalarında tümör gerilemesini indüklediği bildirilmektedir. Azenosertib, AZD1775'ten önemli ölçüde daha düşük dozlarda kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabilen yüksek düzeyde tolere edilebilen doza sahip olma avantajına sahiptir. (Vakili- Samiani et al 2022).

Azenosertib ile ilgili prelinik bir çalışma henüz literatürde yer almamasına rağmen, poster sunumlarında AZD1775 ile karşılaştırıldığında, Azenosertib'in gelişmiş güvenlik profiline ve daha yüksek seçiciliğe sahip olduğu gösterilmiş ve özellikle kombin tedavi için uygun bir ajan olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Azenosertib'in, platine dirençli over kanseri olan hastalarda karboplatin, doksorubisin, paklitaksel ve gemitabin gibi diğer kemoterapötiklerle birlikte klinik olarak test edilmekte olduğu bildirilmiştir (Bukhari, Chan and Gamper 2022).

Bir diğer poster sunumunda, Azenosertib, HER-2 pozitif trastuzumab dirençli meme tümörlerinde, TNMK ve ER pozitif olan meme kanserlerinde değerlendirilmiş ve ER-pozitif MCF-7 meme tek başına ve seçici östrojen reseptör parçalayıcı (SERD) ZN-c5 veya bir CDK4/6 inhibitörü Palbociclib ile kombin uygulandığında antitümör etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca Azenosertib, MDA-MB-436 TNMK ksenograft modelinde hem tek başına hem de PARP inhibitörleri Olaparib veya Niraparib ile kombin sinerjistik etki gösterdiği belirtilmektedir (Li et al 2022). Hastadan türetilmiş

ksenograft (PDX) TNMK tümörlerinde Azenosertib'in hem monoterapi olarak hem de Niraparib ile kombin etkisi bildirilmiştir. Aynı çalışmada PARP inhibitörlerine dirençli meme tümörlerinin ksenograft modellerini oluşturulmuş ve bu dirençli tümör ksenograft modellerde Azenosertib uygulandığında tümör gelişiminde kayda değer bir azalma görüldüğü gösterilmiştir. Bu bulgulara göre Azenosertib'in PARP inhibitör direncinin aşılmasında terapötik önemi vurgulanmaktadır. Son olarak, trastuzumab dirençli HER-2 pozitif meme tümörü ksenograft modelinde (JIMT-1) Azenosertib aktivitesini değerlendirilmiş ve Azenosertib'in hem tek başına hem de trastuzumab ile birlikte anti-tümör aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, bu bulgular Azenosertib'in meme kanseri modellerinde hem tek başına hem de diğer hedefe yönelik ilaçlarla birlikte terapötik potansiyelini göstermektedir. Ayrıca Azenosertib, trastuzumab ve PARP inhibitörüne karşı direncin aşılmasında etkinliği bildirilmiştir. Azenosertib'in şu anda farklı kanser tiplerinde klinik denemeleri devam etmektedir (Li et al 2022).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

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

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- DMEM (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)
- Azenosertib (Selleckchem, ABD)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Merck Milipore, Almanya)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Tripsin/EDTA (%0.25) (Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Gibco ®, Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Raybiotek)
- Akridin oranj (Sigma Aldrich, ABD)
- Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
- Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Luminex Corporation, ABD)
- MitoTracker Red CMXRos (Cell Signaling Technology, ABD)
- Muse Cell Cycle Kiti (Luminex Corporation, ABD)
- NuPAGE Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- iBlot Transfer Stack, nitrocellulose, regular size (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Bolt 4 -12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gels (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- iBind Flex Card (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada TNMK hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri ve kontrol grubu

olarak MCF-10A hücreleri kullanıldı. Hücre kültürü işlemleri laminar hava akımlı kabinde gerçekleştirildi ve hücreler 37°C'de %5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde uygun besiyerleri ile inkübe edildi. -80 °C'de depolanmakta olan hücreler çalışma sırasında alınıp 37°C su banyosunda çözöldü ve uygun besiyerleri bulunan T75 filtreli hücre kültür flasklarına ekildi. MDA-MB-231 hücre hatları %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde eklendikten sonra ve MCF-10A hücreleri %10 FBS, 1 mg/mL hidrokortizon, %1 Penisilin/Streptomisin, 100 mg/mL EGF ve 10 mg/mL insölin içeren DMEM/F12 besiyerinde kültöre edildi. Kültöre edilen hücrelerin çoğalması inverted mikroskop ile kontrol edildi. Flask yüzeyini kaplayan adherent hücreler PBS ile yıkandıktan sonra trypsin-EDTA solösyonu (%0,25 trypsin/ 1mM EDTA) kullanılarak kaldırılmaları sağlandı. Tripsinizasyon işlemleri sonrasında hücreler, steril falkona alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santriföj edildikten sonra 1 mL uygun besiyeri ile süspanse edildi. Tripın Blue (tripın mavisi boyası) ile 1:1 oranında dilöe edilerek toplam 20µl hacim alınarak Smart Slides'a eklendi. Hücre sayım işlemleri, sayım cihazı (Countess II Automated Cell Counter, Thermo Scientific, ABD) ile gerçekleştirildi.

3.2.2. CCK-8 Canlılık Analizi

MDA-MB-231 ve MCF10-A hücre hatlarında Azenosertib'in toksik etkisinin belirlenmesi amacıyla CCK-8 analizi gerçekleştirildi. Mikroplakalardaki tek tabakalı veya süspanسیون hücrelerinin çoğalması ve toksisitesi en iyi şekilde tetrazolyum bazılı analizler kullanılarak değeriendirilmektedir (Lutter vd., 2017). Bu kapsamda konfluent duruma gelen hücre hatları öncelikle 96 kuyucuklu plakalara 2x10⁴ hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve farklı konsantrasyonlarda Azenosertib uygulanarak 24, 48, 72 ve 96 saat aralıklarında 37°C'de %5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelere, 1-10 nM Azenosertib uygulanarak sitotoksik etki, belirlenen inkübasyon sürelerince değeriendirildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 10 µL CCK-8 boyası eklenip 45 dakika inkübe edildi ve 450 nm dalga aralığında mikropate okuyucu (Allsheng, Çin)'da ölçömler yapıldı. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney

hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi. CCK-8 analizi sonrasında gerçekleştirilecek tüm analizlerde Azenosertib'in belirlenen en etkin doz/dozlar ve inkübasyon süresi ileri analizler gerçekleştirildi.

3.2.3. Annexin V Analizi

Azenosertib 'in apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla Annexin V analizi uygulandı. Annexin V analizi, hücre zarının fosfolipid asimetrisinin kaybını hedefleyerek apoptozu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Annexin V, plazma zarının dışındaki fosfatidilserin (PS) ile güçlü ve spesifik etkileşime girmektedir. Bu da hücre tipinden bağımsız olarak apoptozun erken saptanmasında kullanılan yöntemler arasındadır (van Engelans et al 1998) Bu kapsamda öncelikle MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyulu plakalara 1×10^5 hücre ekilerek 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Sonrasında hücelere CCK-8 analizine göre belirlenen 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca 37°C %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi Daha sonra hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve 2 kez PBS ile yıkandı. Her bir tüpe 100 µL Muse Annexin V & Dead Cell Assay kiti eklendi ve 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra hücrelerdeki apoptoz miktarı Muse Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD) cihazı ile analiz edildi.

3.2.4. Akridin Oranj/Propidyum iyodür (AO/PI) Boyama

Akridin Oranj (AO) ve Propidyum İyodür (PI) nükleik asit boyama ajanlarıdır. Bu tip boyamalar, farklı tedavi gruplarında canlı ve ölü hücreleri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Jafarzadeh vd., 2021). 6 kuyucuklu plakaya 5×10^5 hücre ekildikten sonra hücelere CCK-8 analizine göre belirlenen 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücelere %4 paraformaldehit eklenerek 30 dakika boyunca fikse edildi. Sonrasında her bir kuyucuk 3 defa PBS ile yıkanarak 1 mL AO/PI boyası ile 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Son aşamada, kuyular 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile görüntülendi.

3.2.5. Hücre Döngüsü Analizi

Azenosertib hücre siklusunda neden olduğu hasarlı DNA miktarındaki değişiminin ölçülmesi için Muse Cell Cycle Kit (Millipore, Almanya) kullanıldı. Hücreler (5×10^5) öncelikle 6 kuyulu plakalara ekildi ve CCK-8 analizi ile belirlenen 3 ve 4 nM Azenosertib (Zn-C3) uygulanarak 72 ve 96 saat boyunca 37°C %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuk tripsin ile muamele edilerek hücreler kaldırıldı. Ependorf tüplere alınan hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra tüplere 1 mL %70 etanol eklendi ve -20°C 'de minimum 3 saat olacak şekilde fiks edildi. Fiksasyon sonrası tüpler 1500 rpm'de 5 dakika boyunca sentrifüj edildi ve elde edilen pelletler 2 defa soğuk PBS ile yıkandı. Sonrasında her bir hücre 200 μL Muse Cell Cycle Kit ile boyandı ve Muse Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD) cihazı ile analiz gerçekleştirildi.

3.2.6. Mito Tracker Boyama

MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen mitokondriyal hasarın belirlenmesi amacıyla MitoTracker[®] Red CMXRos boyası kullanıldı. Bu boya mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) tespit edilebilmekte ve hücredeki metabolik olarak aktif mitokondriyi kırmızı floresan prob ile hassas bir şekilde etiketleyebilmektedir (Ma et al 2021). Bu kapsamda öncelikle MDA-MB-231 hücreleri (5×10^5) 6 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saatlik inkübasyon ardından CCK-8 analizine göre etkinliği belirlenen 3 ve 4 nM Azenosertib hücrelere uygulandı ve 72 ve 96 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası MitoTracker Red CMXRos boyası kuyucuklara eklendi ve 37°C 'de 45 dakika inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklardaki boya uzaklaştırıldı ve her kuyu 3 defa PBS ile yıkandı. Daha sonra kuyulara 1 mL %4 paraformaldehit eklendi ve orbital çalkalayıcıda 30 dakika fiksasyona bırakıldı. Fiksasyon sonrası kuyular 3 defa PBS ile yıkandı. Nükleuslar DAPI ile boyandıktan sonra EVOS hücre görüntüleme sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile görüntülendi.

3.2.7. ROS Analizi

Hücrelerde meydana gelen ve strese bağlı gelişen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ölçülmesi amacıyla Muse® Oxidative Stress kiti kullanılmıştır. Bu kapsamda ROS miktarının belirlemek için ilk olarak MDA-MB-231 hücreleri her bir kuyuda 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakala ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa CCK-8 analizine göre belirlenen 3 ve 4 nM Azenosertib uygulandı ve 72 ve 96 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler tüplere alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve oluşan supernatant uzaklaştırılarak pellet 3 defa PBS ile yıkandı. Daha sonra her bir tüpe 190 µL Muse® Oxidative Stress solüsyonu eklendi ve 37 C°'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Son aşamada hücreler Muse Cell Analyzer (Luminex Corporation, ABD) cihazında analiz edildi.

3.2.8. Western Blot

Azenosertib uygulanan hücrelerdeki Wee1, p-γH2AX, p-Rb proteinleri ve kontrol olarak aktin beta ekspresyon düzeyleri Western Blot analizi ile belirlendi. İlk olarak konfluens duruma gelen hücreler 1×10^6 olacak şekilde platelere ekildikten sonra CCK-8 analizine göre belirlenen 3 ve 4 nM etkin Azenosertib ile 72 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Inkübasyon sonrası RIPA lizis buffer ile hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı ve protein miktarları Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazında ölçüldü. İzole edilen proteinlerden 30 µg alınarak Sample Reducing Agent (10X) ve Sample Buffer (4X) karışımı ile toplamda 40 µL olan örnekler ilk olarak 90 C°'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası örnekler Mini Blot Module (Thermo Fisher Scientific, ABD) sisteminde 200 V 22 dakika boyunca yürütüldü. Ayırıştırılan proteinler Thermo Fisher Scientific iBlot 2 Dry ile nitroselüloz membrana aktarıldı. Transfer sonrası nitroselüloz membrana aktarılan proteinler iBind Flex Automated Western Systems ile uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan primer ve sekonder antikorlarla inkübasyona bırakıldı. Son aşamada membranlar kemoluminesans görüntüleme sisteminde (Syngene, İngiltere) görüntülendi.

Tablo 2: Western blot analizinde yararlanılan antikorlar

Antikorlar	Dilüsyon Oranları
Rabbit Anti Wee1	0.04-0.4 µg/mL
Mouse anti-γH2AX	1:500
Mouse Anti-p-Rb	1:250
Mouse-Anti-ACTB	1:1000

3.2.9. İstatiksel Analiz

Bu çalışmada istatiksel analiz SPSS 22.0 kullanılarak değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar için One Way ANOVA Post-hoc Tukey testi kullanıldı. Her deney 3 kez tekrar edilerek $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. AZENOSERTİB'İN HÜCRELERDE ANTİ-KANSER ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Azenosertibin MDA-MB-231 TNMK ve MCF-10A kontrol hücrelerinde antikanser etkisinin değerlendirilmesi için CCK-8 analizi yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 6'da sunulmuştur.

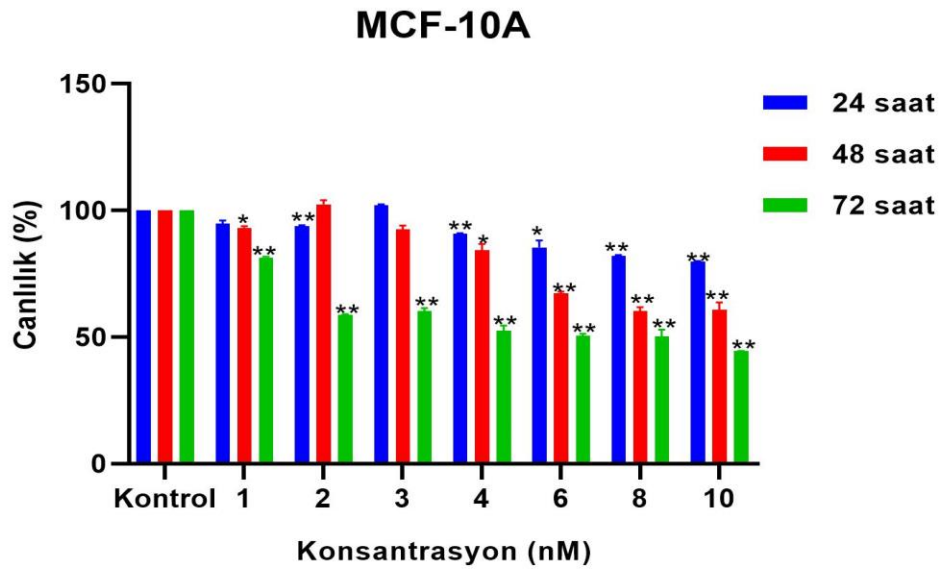
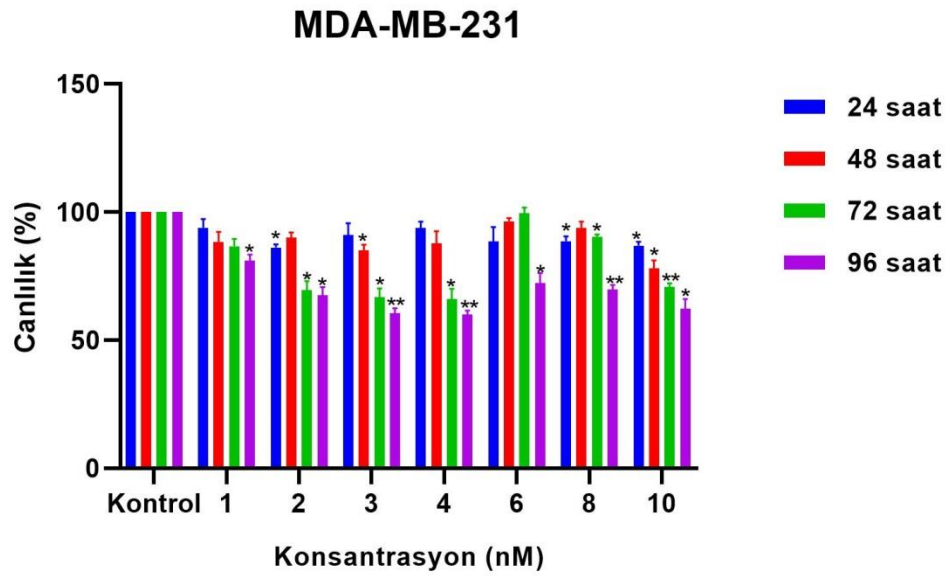
24 saat boyunca 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 nM Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık yüzde değerleri sırasıyla $93,97 \pm 3,36$, $86,13 \pm 1,25$, $91,08 \pm 4,63$, $93,77 \pm 2,60$, $88,52 \pm 5,68$, $88,70 \pm 1,91$ ve $86,92 \pm 1,46$ iken, 48 saat inkübasyon sonunda canlılık değerlerinin sırasıyla $88,45 \pm 3,82$, $90,08 \pm 1,99$, $85,08 \pm 2,24$, $87,76 \pm 4,79$, $96,47 \pm 1,19$, $93,94 \pm 2,42$ ve $77,89 \pm 3,27$ 'ye azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Buna karşılık, 72 saat boyunca 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 nM Azenosertib uygulanan hücrelerde canlılık değerleri sırasıyla $86,68 \pm 2,85$, $69,50 \pm 3,50$, $66,78 \pm 3,38$, $66,07 \pm 4,03$, $99,51 \pm 2,32$, $90,31 \pm 0,98$ ve $70,70 \pm 1,48$ ($p < 0,01$), olarak belirlenirken, 96 saat boyunca canlılık yüzdeleri sırasıyla $81,01 \pm 2,47$, $67,39 \pm 3,31$, $60,44 \pm 2,01$ ($p < 0,01$), $60,07 \pm 1,51$ ($p < 0,01$), $72,27 \pm 3,89$, $69,64 \pm 1,96$ ($p < 0,01$) ve $62,22 \pm 3,87$ istatistiksel olarak anlamlı azaldığı analiz edilmiştir ($p < 0,05$).

Ek olarak Azenosertib'in MCF-10A hücrelerinde 24 saat süresince 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 nM dozlarında canlılık yüzdeleri sırasıyla $94,80 \pm 1,26$, $93,77 \pm 0,43$ ($p < 0,01$), $102,08 \pm 0,41$, $90,96 \pm 0,13$ ($p < 0,01$), $85,41 \pm 2,72$, $82,08 \pm 0,31$ ($p < 0,01$) ve $79,84 \pm 0,16$ ($p < 0,01$) iken, 48 saat süresince uygulandığında sırasıyla $93,14 \pm 0,64$, $102,44 \pm 1,60$, $92,58 \pm 1,49$, $84,27 \pm 2,50$, $67,17 \pm 0,71$ ($p < 0,01$), $60,31 \pm 1,56$ ($p < 0,01$) ve $60,82 \pm 2,91$ ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık 72 saat süresince aynı dozlarda inkübasyon sonrasında canlılık yüzdelerinin sırasıyla $81,42 \pm 0,34$ ($p < 0,01$), $58,79 \pm 0,33$ ($p < 0,01$),

%60,14 $\pm$ 1,35 (p<0,01), %52,41 $\pm$ 2,18 (p<0,01), %50,48 $\pm$ 0,87 (p<0,01), %50,17 $\pm$ 2,76 (p<0,01) ve %44,40 $\pm$ 0,20 (p<0,01)'ye istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 6).

Elde edilen bulgulara göre, MDA-MB-231 hücrelerinde Azenosertibin etkin dozları 72 ve 96 saat süresi için 3 ve 4 nM olarak belirlenmiştir.



Şekil 6: Azenosertib'in MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde anti-kanser etkisinin CCK-8 analizi ile değerlendirilmesi (p<0,05*, p<0,01**).

4.2. AZENOSERTİB'İN APOPTOTİK ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

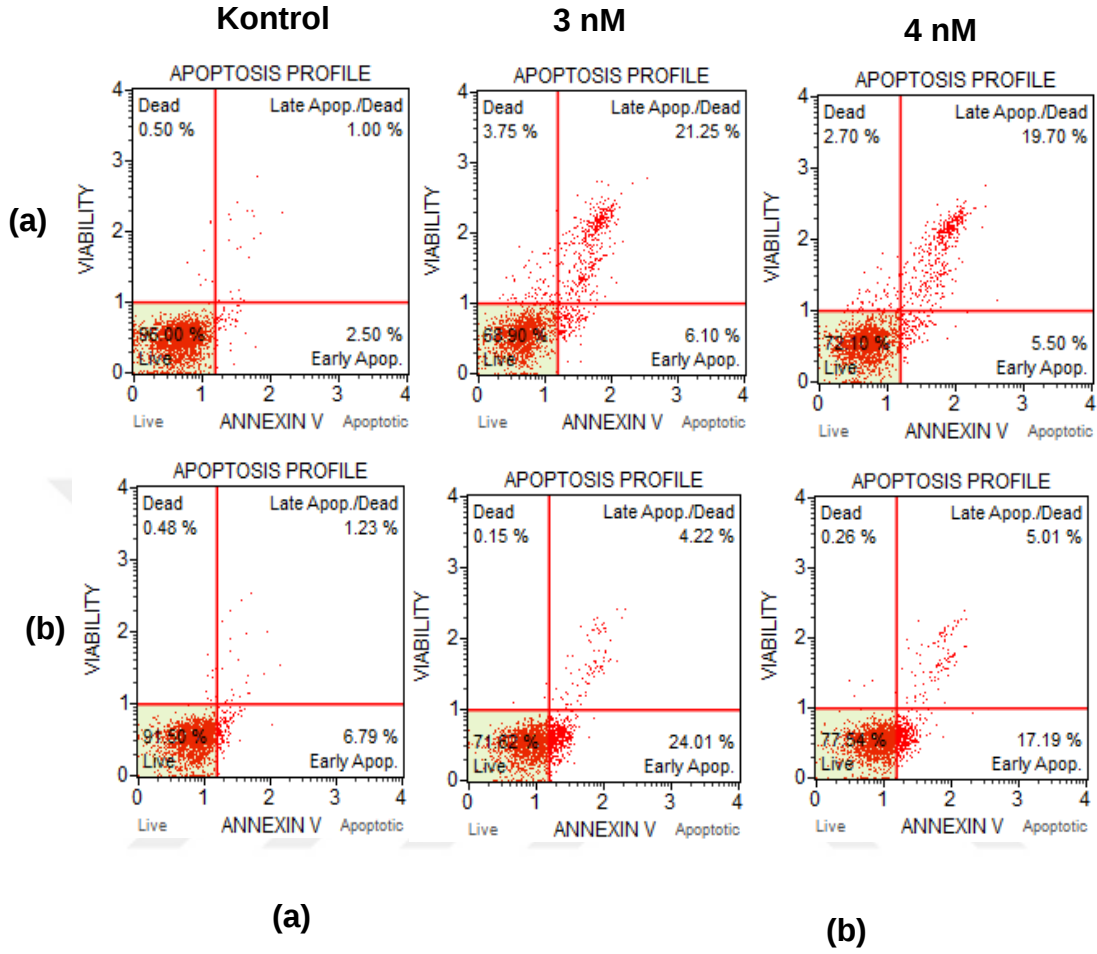
MDA-MB-231 hücrelerinde CCK-8 analizine göre etkin olduğu belirlenen 3 ve 4 nM dozlar ve 72 ve 96 saat uygulama sürelerinde Azenosertib'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla Annexin V analizi gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 7'de sunulmuştur. Annexin V analizi verilerine göre kontrol hücrelerine kıyasla Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.01$).

72 saat boyunca 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla ($2,62 \pm 0,15$) erken apoptotik hücre oranının sırasıyla $6,83 \pm 0,70$ ve $5,75 \pm 0,22$ iken geç apoptotik hücre oranının kontrol grubuna ($1,14 \pm 0,12$) kıyasla sırasıyla $22,25 \pm 0,95$ ve $20,61 \pm 0,81$ 'e arttığı analiz edilmiştir (Şekil 7, $p < 0.01$).

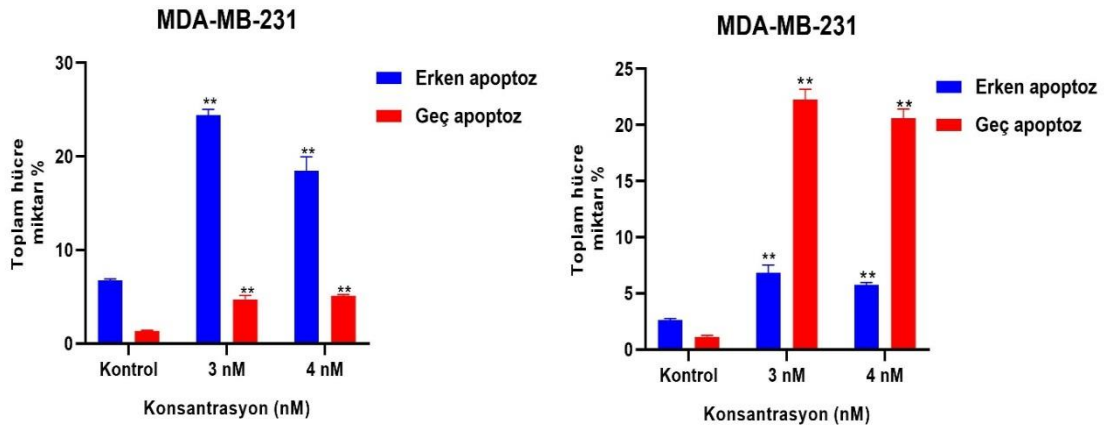
96 saat uygulama süresince 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerindeki erken apoptotik hücre miktarının kontrol hücrelerine ($6,74 \pm 0,17$) kıyasla sırasıyla $24,41 \pm 0,61$ ve $18,48 \pm 1,49$ iken, geç apoptotik hücre miktarının kontrol grubuna ($1,33 \pm 0,09$) kıyasla sırasıyla $4,70 \pm 0,42$ ve $5,12 \pm 0,11$ olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (Şekil 7, $p < 0.01$).

Sonuç olarak elde edilen verilere göre Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde erken ve geç apoptotik hücrelerin doza bağlı arttığı ve 72 saatlik uygulama süresinde erken apoptoz yüzdesinde artış belirlenmesine rağmen, 96 saat inkübasyon sonunda geç apoptotik ölümden artış tespit edilmiştir.

A



B



Şekil 7: (A) Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik etkinin değerlendirilmesinde Annexin V analizi histogramları (a) 72 saat (b) 96 saat inkübasyon **(B)** Azenosertib'in neden olduğu apoptotik ölümün istatistiksel olarak değerlendirilmesi (a) 72 saat ve (b) 96 saat inkübasyon ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.3. AZENOSERTİB'İN HÜCRE SIKLUSUNA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

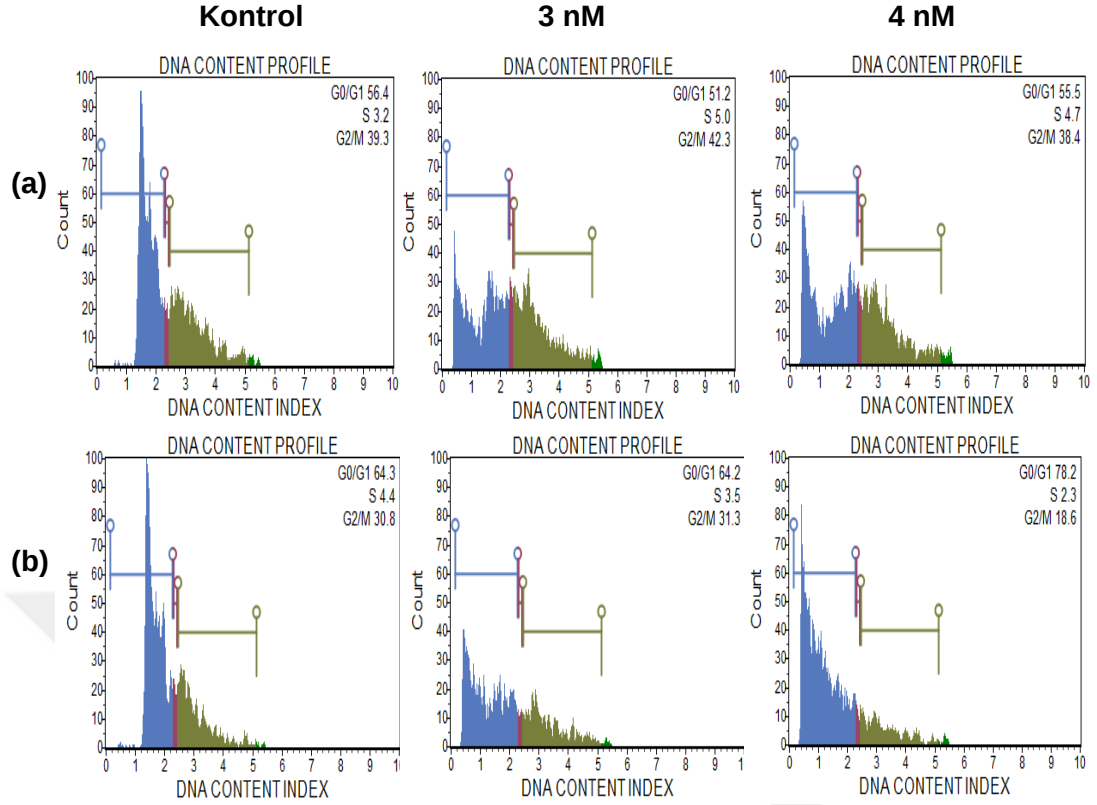
Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde, hücre siklusu üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla hücre siklusu analizi yapılmıştır.

72 saat boyunca 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla (G0/G1: %56,73 $\pm$ 0,31; S: %3,43 $\pm$ 0,21; G2/M: %39,23 $\pm$ 0,31) G0/G1 fazında sırasıyla hücre miktarının %50,83 $\pm$ 0,40 ve %56,50 $\pm$ 1,05'e istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Buna karşılık S fazında sırasıyla %5,17 $\pm$ 0,15 ve %4,80 $\pm$ 0,10' a ve G2/M fazında sırasıyla %47,87 $\pm$ 0,55 ve %38,83 $\pm$ 0,38' e azaldığı belirlenmiştir (Şekil 8, $p < 0,01$).

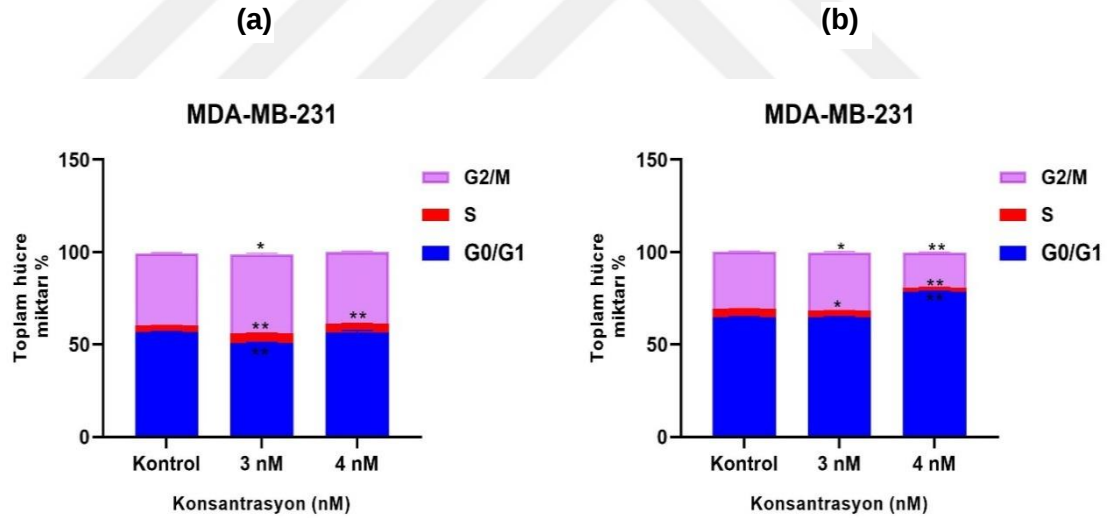
96 saat uygulama süresince 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan TNMK hücrelerinde kontrol hücreleri (G0/G1: %64,70 $\pm$ 0,36; S: %4,53 $\pm$ 0,12; G2/M: %31,07 $\pm$ 0,31) ile karşılaştırıldığında G0/G1 fazında hücre sayısı sırasıyla %64,67 $\pm$ 0,42 ve %78,57 $\pm$ 0,40 ($p < 0,05$) anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmesine karşılık, S fazında hücre miktarının sırasıyla %3,53 $\pm$ 0,15 ve %2,40 $\pm$ 0,10 ve G2/M fazında sırasıyla %31,67 $\pm$ 0,47 ve %18,83 $\pm$ 0,21' e azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 8, $p < 0,01$).

Elde edilen verilere göre Azenosertib'in 72 saat inkübasyon süresi sonunda hücre siklusunda belirgin bir etkisi tespit edilmemesine rağmen, 96 saat inkübasyon sonunda hücrelerde G0/G1 fazında tutulmaya neden olduğu belirlenmiştir.

A



B

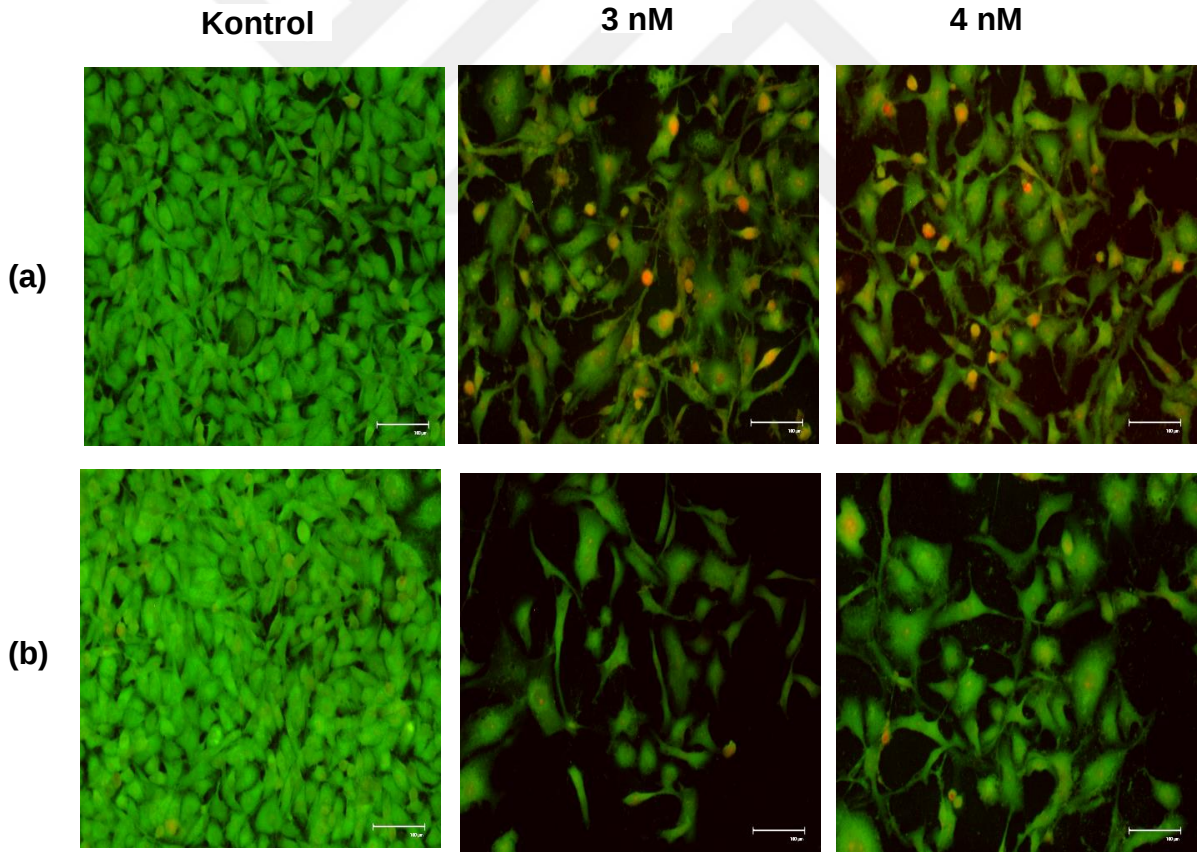


Şekil 8: (A) Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisine ait histogramlar (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon **(B)** Azenosertib'in G0/G1, S ve G2/M fazlarında hücre miktarının istatistiksel karşılaştırılması (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.4. AZENOSERTİB'İN TNMK HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİSİNİN GÖZLEMLENMESİ

Azenosertib'in TNMK hücrelerinde neden olduğu değişimlerin gözlenmesi amacıyla AO/PI boyaması gerçekleştirilmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 9'da sunulmuştur.

3 ve 4 nM dozlarında Azenosertib uygulanan TNMK hücrelerinin kontrol grubuna göre mekiksi yapıdaki normal morfolojilerini kaybettikleri gözlenmiştir. Özellikle 72 saat inkübasyon sonunda DNA fragmentasyonuna ve erken apoptoza neden olduğu gözlenmiştir. 96 saat inkübasyon sonunda ise Azenosertib'in TNMK hücrelerinde kontrol grubuna göre daha büyük morfolojide vakuoler oluşumlara neden olduğu görüntülenmiştir.



Şekil 9: Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen değişimlerin görüntülenmesi (a) 72 ve (96) saat inkübasyon.

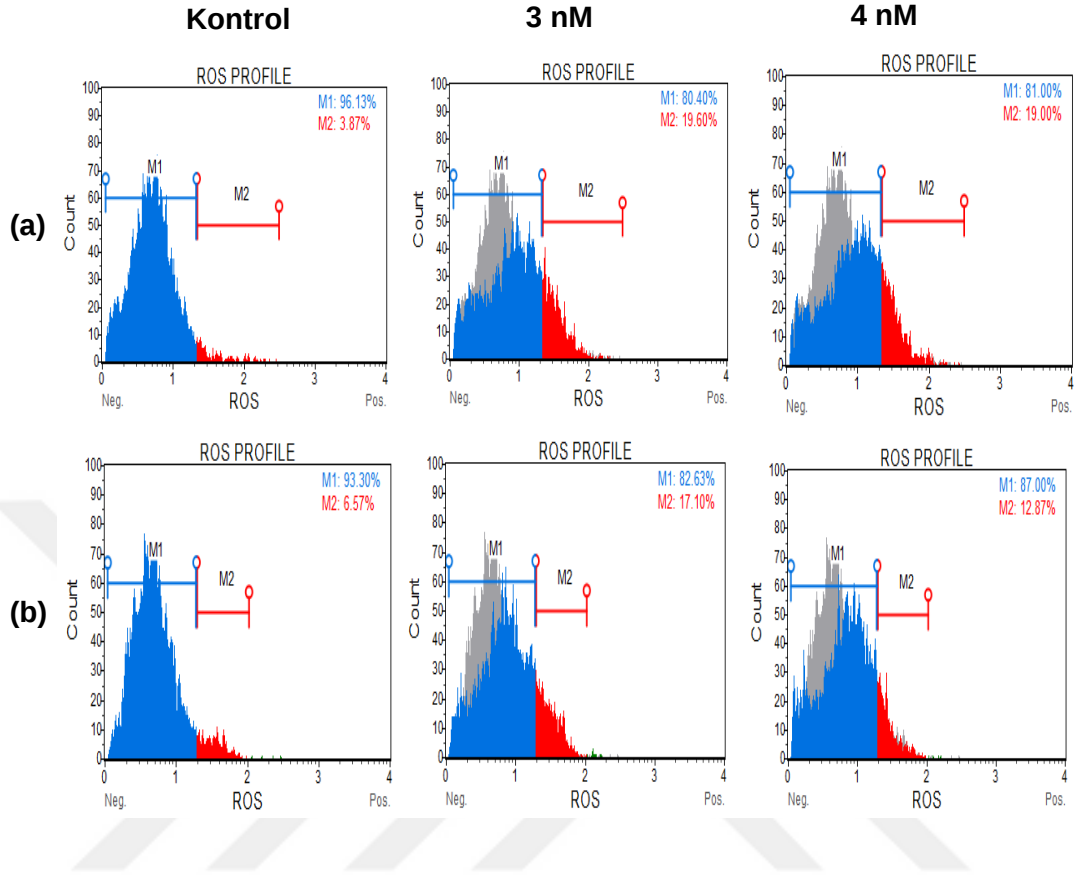
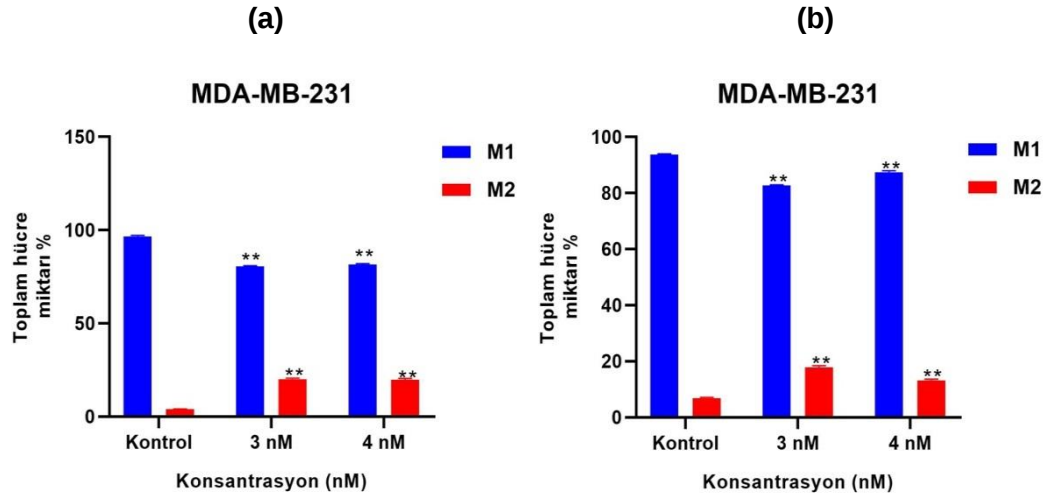
4.5. AZENOSERTİB'İN ROS SEVİYESİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde ROS miktarında neden olduğu değişimler ROS analizi değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 10'da sunulmuştur.

72 saat inkübasyon süresinde 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan TNMK hücrelerinde ROS seviyesi kontrol hücrelerine [ROS(+): $3,95 \pm 0,07$] kıyasla sırasıyla $20,08 \pm 0,45$ ve $19,63 \pm 0,78$ ' e istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, buna karşılık ROS(-) miktarının kontrol grubuna ($96,67 \pm 0,47$) göre sırasıyla $80,55 \pm 0,40$ ve $81,50 \pm 0,50$ 'ye azaldığı belirlenmiştir (Şekil 10, $p < 0,01$).

96 saat boyunca 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ROS seviyesi kontrol grubuna [ROS(+): $6,85 \pm 0,24$] göre sırasıyla $17,83 \pm 0,67$ ve $13,19 \pm 0,45$ ' e yükseldiği, bunun yanı sıra ROS(-) seviyesinin kontrol hücrelerine ($93,70 \pm 0,36$) kıyasla sırasıyla $82,72 \pm 0,24$ ve $87,43 \pm 0,51$ 'e azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 10, $p < 0,01$).

Sonuç olarak Azenosertib'in özellikle 72 saat inkübasyon sonunda MDA-MB-231 hücrelerinde ROS seviyesini arttırdığı belirlenmiştir.

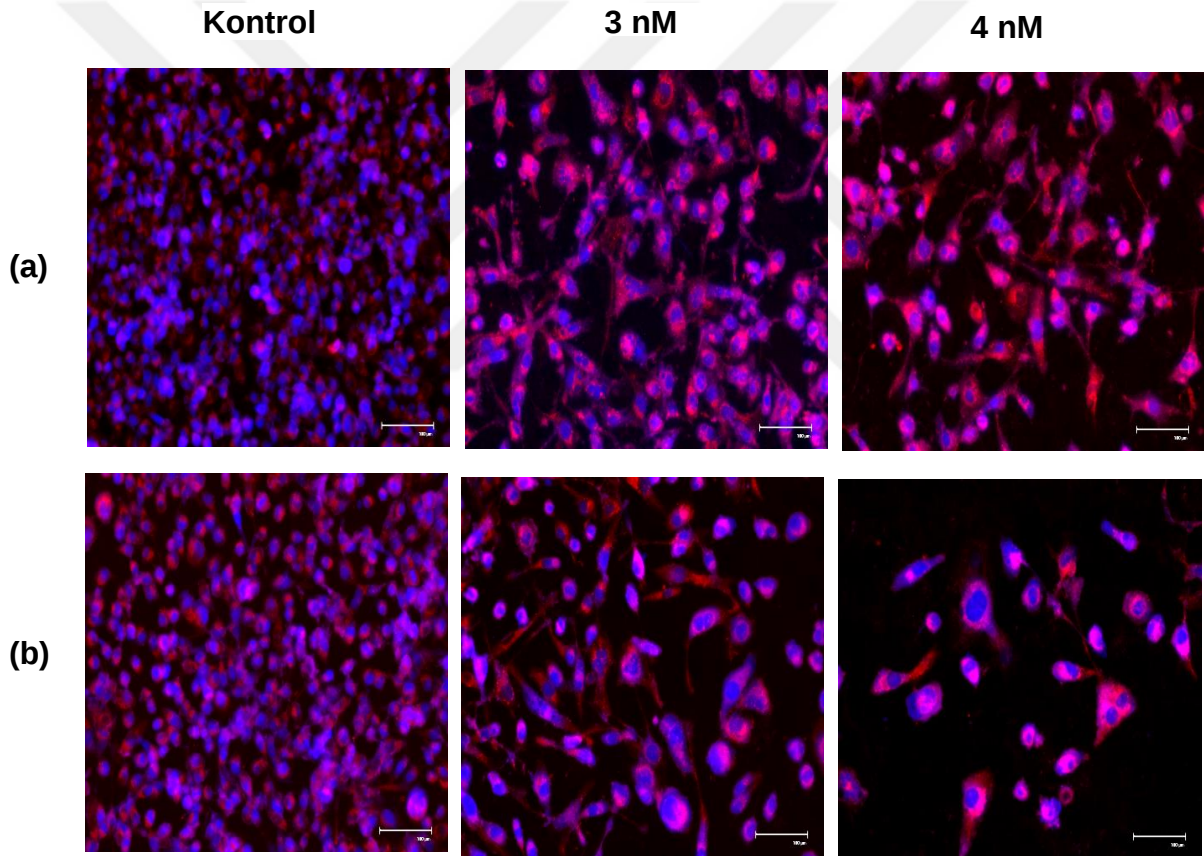
A**B**

Şekil 10: (A) Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde ROS miktarının değerlendirilmesi (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon **(B)** Azenosertib'in ROS miktarındaki neden olduğu değişimlerin istatistiksel analizi (a) 72 ve (b) 96 saat inkübasyon ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

4.6. AZENOSERTİB'İN MİTOKONDİRİ MORFOLOJİSİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Azenosertib'in TNMK hücrelerinde neden olduğu mitokondriyal hasar MitoTracker Red boyası ile görüntülenmiştir (Şekil 11).

72 ve 96 saat sürelerinde 3 ve 4nM Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde özellikle 72 saatte artan floresans yoğunluğuna bağlı olarak mitokondriyal hasar tespit edilmiştir. Hücrelerde mitokondri morfolojilerinde değişimler, fragmente nükleuslar ve özellikle çok sayıda şişmiş mitokondriler gözlenmiştir.



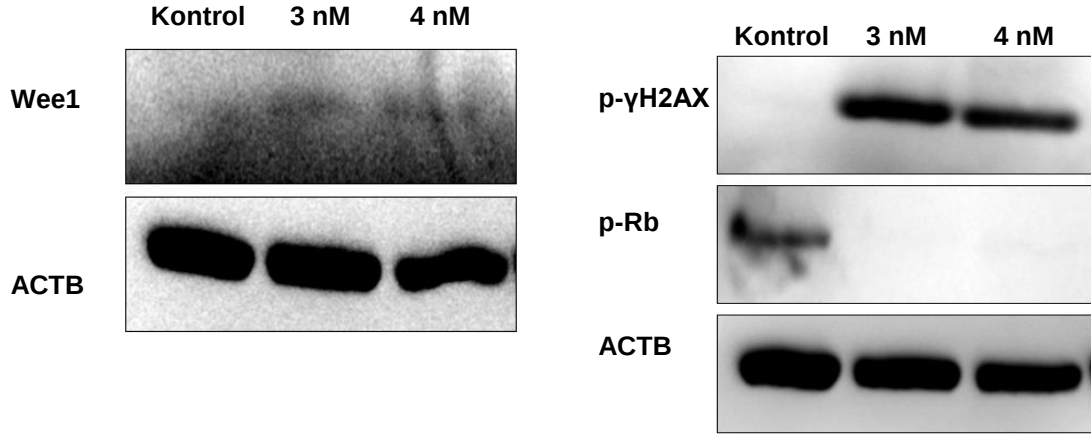
Şekil 11: Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen mitokondri morfolojisindeki değişimlerin görüntülenmesi (a) 72 ve (96) saat inkübasyon.

4.7. AZENOSERTİB'İN ETKİSİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Azenosertib'in MDA-MB-231 hücrelerinde Wee1, p- γ H2AX, p-Rb proteinlerinde neden olduğu değişimlerinin incelenmesi amacıyla Western Blot analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 12'de sunulmuştur.

Kontrol grubuna kıyasla MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde Azenosertib'in artan konsantrasyonuna bağlı olarak Wee1 ekspresyon düzeylerinin arttığı belirlenmesine rağmen, DNA çift sarmalında meydana gelen kırılmalardan dolayı özellikle 3 nM Azenosertib uygulandığında p- γ H2AX ekspresyon düzeyinde belirgin artış tespit edilmiştir. Azenosertib uygulanan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla hücre döngüsünde G0/G1 fazları geçişinde rol oynayan p-Rb'nin ekspresyon düzeyinin de azaldığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak Azenosertib'in TNMK hücrelerinde Wee1 kinaz inhibisyonuna bağlı olarak hücre siklusunda ve DNA hasar yanıtında meydana gelen değişimler protein düzeyinde belirlenmiştir.



Şekil 12: 72 saat boyunca Azenosertib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasar yanıtında ve hücre döngüsünde rol alan proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında ilk kez Azenosertib'in MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde antikanser etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, Azenosertib'in artan doz ve inkübasyon süresine bağlı olarak TNMK hücrelerinde apoptoza, mitokondriyel hasara ve ROS seviyesindeki artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, Azenosertib, TNMK hücrelerinde inkübasyon süresine bağlı olarak G0/G1 fazında tutulmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Azenosertib uygulanan hücrelerde artan Wee1 protein düzeyinin belirlenmesi ile birlikte, p-Rb ekspresyonunda azalma ve p-γH2AX seviyesindeki artış analiz edilmiştir. Sonuç olarak, Azenosertib'in TNMK hücrelerinde Wee1 aktivitesini inhibe ederek hücre siklusunda moleküler düzeyde etkisi ilk kez ortaya konmuştur.

Wee1 inhibitörlerinden AZD-1775'in literatüre kazandırılmış birçok çalışması bulunmaktadır. Kreahlin ve ark. (2012) yaptığı çalışmada farklı sarkom hücre tiplerini (MG63, U20S, SW872, A673, SKUT, MNNG, HT1080 ve SKES) 72 saat boyunca IC₅₀ değeri 100-550 nmol/L aralığında AZD-1775'e uygulandığında p53 mutasyon durumundan bağımsız olarak apoptozun indüklendiği sonucuna varılmıştır (Kreahlin et al 2012). Mevcut tez çalışmasında, Azenosertib'in etkin dozunun 3 ve 4 nM olduğu ve 4 nM uygulamasından sonra hücrelerde antikanser etkisinin azaldığı belirlenmiştir. Bu kapsamda, ileri deneylere antikanser etkinin en yüksek belirlendiği 3 ve 4 nM olan dozlar ile devam edilmiştir. Bi ve ark. (2019) özofagus skuamöz hücreli karsinomu (ESCC) hücre hatlarında (EC109, Het-1A ve KYSE150) yaptığı çalışmada, 72 saat boyunca AZD1775 uygulanan EC109, KYSE150 ve Het-1A hücrelerde canlılık yüzdeleri sırasıyla $0,58 \pm 0,02 \mu\text{M}$, $0,55 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ve $4,51 \pm 0,17 \mu\text{M}$ olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada, 48 saat boyunca AZD1775 (2.0 μM) uygulanan hücrelerde kaspaz-3 ve kırılmış PARP ekspresyonunun artarak yüksek oranda apoptotik ölüme neden olduğu ve mitokondriyal hasarın doza bağlı arttığı bildirilmiştir (Bi et al 2019). Murakami ve ark.'nın yaptığı çalışmada ürotelyal kanser (UC) hücre hatlarında (UMUC3, T24, RT4, J82, TCCSUP, 253J) tek başına Wee1 inhibitörü AZD1775 (MK1775) ve sisplatin (CDDP) kombin etkisi

incelenmiştir. AZD1775 monoterapi uygulaması sonucunda *TP53* durumundan bağımsız olarak UC hücrelerinin proliferasyonunda azalma görülürken, CDDP sinerjistik etkisinin sadece *TP53* mutant UC hücrelerinde olduğu gösterilmiştir. Kaspaz bağımlı apoptoz analizinde kırılmış PARP'ın kombin halinde CDDP ve MK1775 verilen *TP54* mutant UC hücrelerinde artarken, mutant olmayan *TP53* hücrelerinde artmadığı gösterilmiştir. Bu bulgularla uyumlu olarak yaptıkları Annexin V analizinde ise CDDP ve MK1775 kombin verilen TCCSUP hücrelerinde apoptotik hücre sayısının 3 kat arttığını ve RT4 hücrelerinde ise hiçbir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Murakami et al 2021). Kim ve ark. (2016) çalışmasında, mide kanseri hücre hatlarında (SNU-668, SNU-216, SNU-719, SNU-638, SNU-601, KATO III, MKN28, YCC-2 ve AGS) 48 saat boyunca AZD1775 uygulamasının SNU-601, SNU-216, AGS, SNU-638, SNU-719, YCC-2 ve MKN28 hücrelerinde doza bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmesine rağmen, SNU-668 ve KATO III hücrelerinde Wee1 inhibitörüne karşı direnç olduğu analiz edilmiştir. Elde edilen bulguların Wee1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirlenmekle birlikte, Wee1 ifadesi yüksek hücrelerde diğerlerine kıyasla duyarlılığın daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca 0,5 μ M AZD1775 ile tedavi edilen YCC-2 ve AGS hücrelerinde G1/S fazında hücre siklusunda tutulma belirlenmesine rağmen, 1 μ M AZD1775 uygulanan *p53* mutant SNU-601 ve MKN28 hücrelerinde G2/M kontrol noktasının hücre siklusunun durduğu bildirilmiştir. İlginç bir şekilde, Annexin V analizi sonuçlarına göre ilaca maruz bırakılan kanser hücrelerinde 24 saat inkübasyon sonunda erken apoptoz gözlemlenirken, 72 saatlik tedavi sonrasında hücrelerde geç apoptoz olduğu belirlenmiştir (Kim et al 2016). Mevcut tez çalışmasında, Azenosertib uygulanan TNMK hücrelerinde inkübasyon süresine göre 72 saat inkübasyon sonunda hücrelerde erken apoptoz gözlemlenirken, 96 saat inkübasyon sonunda ise geç apoptoz tespit edilmiştir. Ayrıca, 72 saat inkübasyon süresinde kısmen G2/M hücre siklusunda artış belirlenmesine rağmen, 96 saat inkübasyon sonunda hücre siklusunun G0/G1 fazında hücre tutulmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu kapsamda MDA-MB-231 hücrelerinin *TP53* mutant olmasından dolayı hücrelerde Wee1 aktivitesinin inhibe edilmesinin G2/M kontrol noktasının aktivitesini ortadan kaldırarak hücrelerde mitotik katastrofa ve G0/G1 fazında hücre tutulmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, farklı genomik

özelliklere sahip TNMK hücre hatlarında Azenosertib'in etkinliğinin araştırılmasına yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Lescarbeau ve ark. (2016) çalışmasında 48 saat boyunca MK1775 (1 μ mol/L) uygulamasının çeşitli glioblastoma hasta kaynaklı ksenograft (PDX) modellerinde ve üç farklı hattında (GBM38, GBM6 ve GBM36) antikanser etkinliğini belirlemiştir (Lescarbeau et al 2016). Guertin ve ark.'nın (2013) üç farklı hücre hattında (LoVo, HT-29 ve A2058) ile gerçekleştirdiği çalışmada, AZD1775 uygulamasında hücrelerde γ H2AX miktarında artışa (A2058'de %28, HT-29'da %77, LoVo'da %53) neden olduğu tespit edilmiştir (Guertin et al 2013). Yang ve ark. (2020) özafagus kanseri hücre hatlarını (FLO1 ve OE33) kullandıkları çalışmada MK1775(100 nmol/L) ile tedavi edilen hücrelerde monoterapi sonuçlarının γ H2AX ekspresyonunu arttırdığını, bununla beraber radyasyon tedavisi ile kombin çalışmasında, MK1775 inhibisyonunun G2/M kontrol noktasında hücre siklusunun tutulmasını atlatarak radyasyon aracılı DNA hasarını arttırdığı bildirilmiştir (Yang et al 2020). Yang ve ark.'nın yaptığı çalışmada OE33, SK4, FLO1, KYSE30 özofagus kanseri (ESCA) hücre hatları kullanılarak radyasyon terapisi ve Wee1 inhibisyonu kombin etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda AZD1775 tarafından Wee1 inhibisyonunun, CDK1 aktivitesini ve replikasyon stresini artırarak radyasyona bağlı G2/M hücre döngüsü kontrol noktası durmasını tersine çevirdiği sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, Wee1'in güçlü inhibisyonunun radyasyon kaynaklı DNA hasarına rağmen hücre bölünmesini desteklediğini ve *in vivo* deneylerde AZD1775'e karşı belirgin radyoduyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. Hirai ve ark.'nın yaptığı çalışmada kolon kanseri hücre hatları (Ls411N, sW948, COLO205, WiDr) kullanılarak Wee1 inhibitörü MK1775 ve 5-FU kombin etkisi araştırılmıştır. Çalışmada p53 eksikliği olan kanser hücrelerinde MK1775'in 5-FU'nun sitotoksik etkisini arttırdığı ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, 5-FU'nun antitümör etkinliğinin MK-1775 tarafından artırılmasının Wee1 inhibisyonu tarafından sağlandığını doğrulamak için, mitotik girişi temsil eden Y15'te CDC2 ve S28'de Histon H3'ün fosforilasyonlarının western blot analizi ve immünohistokimya ile değerlendirilmesi sonucunda MK1775'in CDC2 fosforilasyonunu inhibe ederken doza bağlı olarak Histon H3 fosforilasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Hirai et al 2010). Jin ve ark.'nın yaptığı çalışmada, MDA-231, Hs578t, MDA-157, BT549, HCC1937,

HCC70, MDA-468, MCF7 ve MCF10A hücre hatlarında AZD1775'in tek ve kombin etkileri araştırılmıştır. IC₅₀ değerlerinin çoğunluğu 1 µM'nin altında olduğundan TNMK hücre hatlarının AZD1775'e oldukça duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, AZD1775'in, γH2AX, pATM, pATR, pCHK1 ve pCHK2 protein ekspresyonlarının zaman ve doza bağlı olarak arttığı ve buna ek olarak pHH3 seviyesinin 1 saat gibi kısa bir sürede önemli miktarda arttığı gösterilmiştir. Bu durum mitotik hücrelerinin oranının arttığını göstermektedir. Wee1 inhibisyonunun DNA hasarını ciddi anlamda indüklemesi ve DNA hasar yanıtını aktive etmesi kanıtlarına dayanarak AZD1775'in kombin çalışmaları araştırıldığında, MDA-231 ve HsT578T hücrelerinde monoterapiye kıyasla kombin tedavinin apoptozu daha fazla indüklediği sonucuna varılmıştır. Bu verilere ek olarak AZD1775 ve AZD6738 kombin uygulamasının, *BRCA* mutasyon durumundan bağımsız olarak TNMK hücre hatlarını sisplatin ve veliparib'e duyarlı hale getirdiği ve *BRCA1* eksikliği olan TNMK hücrelerinde daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır (Jin et al 2018). Ha ve ark.'nın yaptığı çalışmada Wee1 inhibitörü AZD1775'in, altı farklı TNMK (MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC 1143, BT-549 ve Hs578T) hücre hattında etkisi araştırılmış, IC₅₀ değerleri 0,38 ile 0,81 µmol/L aralığında olup <0.5 µmol/L olan MDA-MB-231 ve BT-549 hücre hatları duyarlı iken, IC₅₀ değeri >0.5 olan MDA-MB-468 hücre hatları orta derecede duyarlı olarak belirtilmiştir. Bilinen literatür ile uyumlu bir şekilde CDK1 ve CDK2'nin azalmış fosforilasyon seviyeleri ile AZD1775'in hedef kinazların aktivitesini etkin bir şekilde downregüle ettiği gösterilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda altı farklı TNMK hücre hattında AZD1775 duyarlılığı ile *TP53* mutasyon durumu arasında hiçbir ilişki olmadığı, bu hücre hatlarında AZD1775'in anti-proliferatif etkisinin *p53* mutasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir. Ayrıca AZD1775'in duyarlı hücrelerde çok çekirdekli mitotik hücre sayısında artışa neden olduğu ve bu nedenle Wee1 inhibitörü AZD1775'in mitotik etkilerinin yanı sıra replikasyon başlangıcını da etkilediği sonucuna varılmıştır. (Ha et al 2020). O'Dowd ve ark. (2019), çeşitli hücre hatlarında Debio-0123 ile gerçekleştirilen çalışma sonucu γH2AX ve histon H3 miktarında konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artış tespit edilmiştir (O'Dowd et al 2019). Piggot ve ark. (2022) çalışmasında, Debio-0123 ile etoposid ve karboplatin kombinasyonunun SCLC hücrelerinde apoptoz miktarında önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Piggot et al 2022). Mevcut

tez çalışmasında ilgili literatür ile uyumlu olarak 3 ve 4 nM Azenosertib uygulanan TNMK hücrelerinde 72 saat inkübasyon süresi sonunda p- γ H2AX protein düzeyinin artması ile birlikte, Azenosertib'in artan dozuna bağlı olarak Wee1 protein düzeyinin arttığı analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara, Azenosertib'in Wee1 aktivitesini inhibe ederek hücre siklusunda mitotik felakete ve G0/G1 fazında hücre tutulmasına neden olduğu belirlenmiştir. Ancak MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde özellikle 96 saat inkübasyon süresinde hücre siklusunda etkisi belirlenen Azenosertib'in *TP53* mutant ve mutant olmayan farklı TNMK hücrelerinin yanı sıra farklı alt tipte meme kanseri hücrelerinde etkinliğinin belirlenmesi ve mitotik felaketle ve DNA hasar yanıtında moleküler düzeyde terapötik etkinliğinin araştırılmasına yönelik ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, TNMK hücrelerinde Azenosertib'in 72 ve 96 saat inkübasyon süresi sonrası canlılık yüzdelerinde anlamlı bir azalışa sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 72 saat inkübasyon sonunda Azenosertib'in TNMK hücrelerinde erken apoptoz neden olduğu belirlenmesine rağmen, 96 saat inkübasyon sonunda geç apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca, hücre siklusunda etkisinin inkübasyon süresine göre değiştiği analiz edilmiştir. Bu kapsamda farklı TNMK hücreleri başta olmak üzere Azenosertib'in hücre siklusunda etkisinin aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, Azenosertib'in TNMK hücrelerinde neden olduğu intraselüler ROS miktarında artış ve mitokondriyel hasardan dolayı farklı ölüm tiplerinde etkisine yönelik ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir. Son olarak Azenosertib uygulamasının TNMK hücrelerinde Wee1 aktivitesinde inhibisyonu ilk kez protein düzeyinde tez kapsamında değerlendirilmiş olup, G0/G1 fazları geçişinde rol oynayan p-Rb'nin azalmasına ve DNA'da çift zincir kırıklarının biyobelirteci olarak p- γ H2AX protein düzeyinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Henüz moleküler mekanizması tam olarak bilinmeyen ve mevcut tez çalışması ile TNMK hücrelerindeki antikanser etkisi ilk kez araştırılan Azenosertib'in hücre siklusunda G0/G1 ve G2/M fazında etkinliğinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, farklı kemoterapi ajanları ve radyoterapi ile kombin etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar da gerçekleştirilebilir. Özetle, mevcut tez çalışmasında TNMK hücrelerinde Azenosertib'in antikanser etkinliğine dair ilk

veriler literatüre kazandırılmış olup yenilikçi tedavilere yönelik bakış açısı kazandırılmasına katkı sağlar niteliktedir.



KAYNAKLAR

- Aarts M, Linardopoulos S, & Turner NC. (2013). Tumour selective targeting of cell cycle kinases for cancer treatment. *Current opinion in pharmacology*, 13(4), 529–535
- Alli VJ, Yadav P, Suresh V, & Jadav SS. (2023). Synthetic and Medicinal Chemistry Approaches Toward WEE1 Kinase Inhibitors and Its Degraders. *ACS omega*, 8(23), 20196–20233.
- Barbosa R, Dantonio PM, Guimarães T, de Oliveira MB, Fook Alves VL, Sandes AF, Fernando RC, & Colleoni G. (2019.) ‘Sequential combination of bortezomib and WEE1 inhibitor, MK-1775, induced apoptosis in multiple myeloma cell lines’, *Biochemical and biophysical research communications*, 519(3), 597–604.
- Barnaba N, & LaRocque JR. (2021). Targeting cell cycle regulation via the G2-M checkpoint for synthetic lethality in melanoma. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 20(11), 1041–1051.
- Bi S, Wei Q, Zhao Z, Chen L, Wang C, & Xie S. (2019). Wee1 inhibitor AZD1775 effectively inhibits the malignant phenotypes of esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 459659.
- Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, & Gianni L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13(11), 674–690.
- Bukhari AB, Chan GK, & Gamper AM. (2022). Targeting the DNA damage response for cancer therapy by inhibiting the kinase Wee1. *Frontiers in Oncology*, 12, 828684.
- Børresen-Dale AL, Sørli T, & Kristensen VN. (2010). On the molecular biology of breast cancer. *Molecular oncology*, 4(3), 171-173.
- Coughlin SS. (2019). Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Advances in experimental medicine and biology*, 1152, 9–29

- Criscitiello C, & Corti C. (2022). Breast Cancer Genetics: Diagnostics and Treatment. *Genes*, 13(9), 1593.
- de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, & Tjan-Heijnen VC. (2011). Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137(2), 183–192.
- Derakhshan F, & Reis-Filho JS. (2022). Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annual review of pathology*,
- Du X, Li J, Luo X, Li R, Li F, Zhang Y, Shi J, & He J. (2020). Structure-activity relationships of Wee1 inhibitors: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 203, 112524.
- Elbæk CR, Petrosius V, & Sørensen CS. (2020). WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry. *Mutation research*, 819-820, 111694.
- Esposito F, Giuffrida R, Raciti G, Puglisi C, & Forte S. (2021). Wee1 Kinase: A Potential Target to Overcome Tumor Resistance to Therapy. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10689.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, & Ashworth A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917-921.
- Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, & Smythe C. (2001). Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *The Journal of cell biology*, 154(5), 913–923.
- Fisusi FA, & Akala EO. (2019). Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(1), 3–23.
- Gautam N, Ramamoorthi G, Champion N, Han HS, & Czerniecki BJ. (2024). Reviewing the significance of dendritic cell vaccines in interrupting breast cancer development. *Molecular Aspects of Medicine*, 95, 101239.

- Guertin AD, Li J, Liu Y, Hurd MS, Schuller AG, Long B, & Shumway SD. (2013). Preclinical evaluation of the WEE1 inhibitor MK-1775 as single-agent anticancer therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 12(8), 1442-1452.
- Gulbahce HE, Bernard PS, Weltzien EK, Factor RE, Kushi LH, Caan BJ, & Sweeney C. (2018). Differences in molecular features of triple-negative breast cancers based on the age at diagnosis. *Cancer*, 124(24), 4676-4684.
- Ghelli Luserna di Rorà A, Cerchione C, Martinelli G, & Simonetti G. (2020). A WEE1 family business: regulation of mitosis, cancer progression, and therapeutic target. *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 126.
- Ha DH, Min A, Kim S, Jang H, Kim SH, Kim HJ, Ryu HS, Ku JL, Lee KH, & Im SA. (2020). Antitumor effect of a WEE1 inhibitor and potentiation of olaparib sensitivity by DNA damage response modulation in triple-negative breast cancer. *Scientific reports*, 10(1), 9930.
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, & Cardoso F. (2019). Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), 66.
- Hashimoto O, Shinkawa M, Torimura T, Nakamura T, Selvendiran K, Sakamoto M, Koga H, Ueno T, & Sata M. (2006). Cell cycle regulation by the Wee1 inhibitor PD0166285, pyrido [2,3-d] pyrimidine, in the B16 mouse melanoma cell line. *BMC cancer*, 6, 292.
- Hirai H, Arai T, Okada M, Nishibata T, Kobayashi M, Sakai N, Imagaki K, Ohtani J, Sakai T, Yoshizumi T, Mizuarai S, Iwasawa Y, & Kotani H. (2010). 'MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil', *Cancer biology & therapy*, 9(7), 514–522.
- He MY, Rancoule C, Rehailia-Blanchard A, Espenel S, Trone JC, Bernichon E, Guillaume E, Vallard A, & Magné N. (2018). Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Critical reviews in oncology/hematology*, 131, 96–101.

- Icard P, Fournel L, Wu Z, Alifano M, & Lincet H. (2019). Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. *Trends in biochemical sciences*, 44(6), 490–501.
- Irvin Jr WJ, & Carey LA. (2008). What is triple-negative breast cancer?. *European journal of cancer*, 44(18), 2799-2805.
- Jia H, Truica CI, Wan B., Wang Y, Ren X, Harvey HA, Song J, & Yang JM. (2017). Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Existing challenges and exciting prospects. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 32, 1–15.
- Jiang YZ, Ma D, Suo C, Shi J, Xue M, Hu X, Xiao Y, Yu KD, Liu YR, Yu Y, Zheng Y, Li X, Zhang C, Hu P, Zhang J, Hua Q, Zhang J, Hou W. Ren L, Bao D, Shao ZM. (2019). Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer cell*, 35(3), 428–440.e5.
- Jin J, Fang H, Yang F, Ji W, Guan N, Sun Z, Shi Y, Zhou G, & Guan X. (2018). Combined Inhibition of ATR and WEE1 as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 20(5), 478–488.
- Jin J, Tao Z, Cao J, Li T, & Hu X. (2021). DNA damage response inhibitors: An avenue for TNBC treatment. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1875(2), 188521
- John EM, Phipps AI, Hines LM, Koo J, Ingles SA, Baumgartner KB, Slattery ML, & Wu AH. (2020). Menstrual and reproductive characteristics and breast cancer risk by hormone receptor status and ethnicity: The Breast Cancer Etiology in Minorities study. *International journal of cancer*, 147(7), 1808–1822.
- Karim AM, Eun Kwon J, Ali T, Jang J, Ullah I, Lee YG, Park DW, Park J, Jeang JW, & Kang SC. (2023). Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. *Biochemical pharmacology*, 212, 115545.

- Kim HY, Cho Y, Kang H, Yim YS, Kim SJ, Song J, & Chun KH. (2016). Targeting the WEE1 kinase as a molecular targeted therapy for gastric cancer. *Oncotarget*, 7(31), 49902–49916.
- Kong A, & Mehanna H. (2021). WEE1 Inhibitor: Clinical Development. *Current oncology reports*, 23(9), 107.
- Kumar P, & Aggarwal R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 293(2), 247–269.
- Kreahling JM, Gemmer JY, Reed D, Letson D, Bui M, & Altioek S. (2012). MK1775, a selective Wee1 inhibitor, shows single-agent antitumor activity against sarcoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, 11(1), 174-182.
- Lee YM, Oh MH, Go JH, Han K, & Choi SY. (2020). Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes & genomics*, 42(12), 1381–1387.
- 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.
- Lei J, Pan Y, Gao R et al. (2023). Rutaecarpine induces the differentiation of triple-negative breast cancer cells through inhibiting fumarate hydratase. *J Transl Med* 21, 553
- Leijen S, van Geel RM, Pavlick AC, Tibes R, Rosen L, Razak AR, Lam R, Demuth T, Rose S, Lee MA, Freshwater T, Shumway S. Liang LW, Oza AM, Schellens JH, & Shapiro GI. (2016). ‘Phase I Study Evaluating WEE1 Inhibitor AZD1775 As Monotherapy and in Combination With Gemcitabine, Cisplatin, or Carboplatin in Patients With Advanced Solid Tumors’, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(36), 4371–4380.
- Lescarbeau RS, Lei L, Bakken KK, Sims PA, Sarkaria JN, Canoll P, & White FM. (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals Wee1 kinase as a therapeutic target in a model of proneural glioblastoma. *Molecular cancer therapeutics*, 15(6), 1332-1343.

- Li Y, Zhang H, Merkher Y, Chen L, Liu N, Leonov S, & Chen Y. (2022). Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Journal of hematology & oncology*, 15(1), 121.
- Li J, Boren B, Huang PQ, Bunker KD, Doñate F, & Samatar AA. (2021). Discovery of ZN-c3, a potent Wee-1 inhibitor with a differentiated pharmacologic and kinase selectivity profile. *Cancer Research*, 81(13_Supplement), 1965-1965.
- Li J, Ma J, de Jong PR, Izadi H, Hoang T, Ibrahim N, & Samatar AA. (2022). ZN-c3, a potent and selective Wee-1 inhibitor demonstrates anti-tumor activities in combination with other targeted therapies and overcomes PARP inhibitor resistance. *Cancer Research*, 82(12_Supplement), 2606-2606.
- Li C, Shen Q, Zhang P, Wang T, Liu W, Li R, Ma X, Zeng X, Yin Y, & Tao K. 2021. 'Targeting MUS81 promotes the anticancer effect of WEE1 inhibitor and immune checkpoint blocking combination therapy via activating cGAS/STING signaling in gastric cancer cells', *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 40(1), 315.
- Li JW, Zhang K, Shi ZT, Zhang X, Xie J, Liu JY, & Chang C. (2018). Triple-negative invasive breast carcinoma: the association between the sonographic appearances with clinicopathological feature. *Scientific reports*, 8(1), 9040.
- 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.
- Liu JF, Fu S, Richardson GE, Vranjes Z, Meniawy T, Shannon CM, & Thaker PH. (2023). Correlation of cyclin E1 expression and clinical outcomes in a phase 1b dose-escalation study of azenosertib (ZN-c3), a WEE1 inhibitor, in combination with chemotherapy (CT) in patients (pts) with platinum-resistant or refractory (R/R) epithelial ovarian, peritoneal, or fallopian tube cancer (EOC).
- Ma T, Huang X, Zheng H, Huang G, Li W, Liu X, Liang J, Cao Y, Hu Y, & Huang Y. (2021). SFRP2 Improves Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial

- Biogenesis, Oxidative Stress, and Apoptosis in Diabetic Cardiomyopathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 9265016.
- Matheson CJ, Backos DS, & Reigan P. (2016). Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 37(10), 872–881.
- Matthews HK, Bertoli C, & de Bruin RAM. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 23(1), 74–88.
- Maughan KL, Lutterbie MA, & Ham P. (2010). Treatment of breast cancer. *American family physician*, 81(11), 1339-1346.
- Murakami K, Kita Y, Sakatani T, Hamada A, Mizuno K, Nakamura K, Takada H, Matsumoto K, Sano T, Goto T, Akamatsu S, Saito R, Tsuruyama T, Ogawa O, & Kobayashi T. 2(021). ‘Antitumor effect of WEE1 blockade as monotherapy or in combination with cisplatin in urothelial cancer’, *Cancer science*, 112(9), 3669–3681.
- Müller M, Güth U, Varga Z, Reeve K, Bjelic-Radisic V, Fleisch M, Tausch CJ, & Elfgen C. (2020). Clinical Imaging of the Heterogeneous Group of Triple-negative Breast Cancer. *Anticancer research*, 40(4), 2125–2131.
- Nitulescu GM, Van De Venter M, Nitulescu G, Ungurianu A, Juzenas P, Peng Q, & Margina D. (2018). The Akt pathway in oncology therapy and beyond. *International journal of oncology*, 53(6), 2319-2331.
- O’Dowd C, Gavory G, Burkamp F, Treder A, Boyd C, Harrison T, & Massière F. (2019, July). Antitumor activity of the novel oral highly selective Wee1 inhibitor Debio 0123. In *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* (Vol. 79, p. 4423).
- Papadopoulos KP, Sharma M, Dummer R, Rodrigo Imedio E, Yge ML, Micallef S, & Stathis A. (2022). A phase 1 dose-finding and dose-expansion study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics, and efficacy of a highly selective WEE1 inhibitor (Debio 0123) in adult patients with advanced solid tumors.
- Pedroza-Garcia JA, Xiang Y, & De Veylder L. (2022). Cell cycle checkpoint control in response to DNA damage by environmental stresses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 109(3), 490–507.

- Penault-Llorca F, & Viale G. (2012). Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Annals of oncology*, 23, vi19-vi22.
- Piggott L, Chessex AV, Luong N, Tschumi B, & Vuagniaux G. (2022, June). The WEE1 inhibitor Debio 0123 enhances the efficacy of standard of care DNA damaging agents in lung cancer models. In *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* (Vol. 82, p. 2303).,
- Reddy GM, Suresh PK, & Pai RR. (2017). Clinicopathological Features of Triple Negative Breast Carcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 11(1), EC05–EC08.
- Rhee J, Han SW, Oh DY, Kim JH, Im SA, Han W, Park IA, Noh DY, Bang YJ, & Kim TY. (2008). The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer. *BMC cancer*, 8, 307.
- Seo HR, Nam AR, Bang JH, Oh KS, Kim JM, Yoon J, Kim TY, & Oh DY. (2022). Inhibition of WEE1 Potentiates Sensitivity to PARP Inhibitor in Biliary Tract Cancer. *Cancer research and treatment*, 54(2), 541–553.
- Shi Y, Jin J, Ji W, & Guan X. (2018). Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. *Molecular cancer*, 17(1), 99.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, & Zhu HP. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387–1397.
- Suryadinata R, Sadowski M, & Sarcevic B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience reports*, 30(4), 243–255.
- Takashima Y, Kikuchi E, Kikuchi J, Suzuki M, Kikuchi H, Maeda M, Shoji T, Furuta M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Sakakibara-Konishi J, & Konno S. (2020). Bromodomain and extraterminal domain inhibition synergizes with WEE1-inhibitor AZD1775 effect by impairing nonhomologous end joining

and enhancing DNA damage in nonsmall cell lung cancer. *International journal of cancer*, 146(4), 1114–1124.

Vakili-Samiani S, Khanghah OJ, Gholipour E, Najafi F, Zeinalzadeh E, Samadi P, & Feizi AAH. (2022). Cell cycle involvement in cancer therapy; WEE1 kinase, a potential target as therapeutic strategy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 824, 111776.

Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, & González-Barón M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*, 30(2), 193-204.

Visconti R, Della Monica R, & Grieco D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 35(1), 153.

Visconti R, Della Monica R, Palazzo L, D'Alessio F, Raia M, Improta S, Villa MR., Del Vecchio L, & Grieco D. (2015). The Fcp1-Wee1-Cdk1 axis affects spindle assembly checkpoint robustness and sensitivity to antimicrotubule cancer drugs. *Cell death and differentiation*, 22(9), 1551–1560.

Wang Y, Li J, Booher RN, Kraker A, Lawrence T, Leopold WR, & Sun Y. (2001). Radiosensitization of p53 mutant cells by PD0166285, a novel G(2) checkpoint abrogator. *Cancer research*, 61(22), 8211–8217.

Yang F, Xiao Y, Ding JH, Jin X, Ma D, Li DQ, Shi JX, Huang W, Wang YP, Jiang YZ, & Shao ZM. (2023). Ferroptosis heterogeneity in triple-negative breast cancer reveals an innovative immunotherapy combination strategy. *Cell metabolism*, 35(1), 84–100.e8.

Yang L, Shen C, Pettit CJ, Li T, Hu AJ, Miller ED, Zhang J, Lin SH, & Williams TM. (2020). 'Wee1 Kinase Inhibitor AZD1775 Effectively Sensitizes Esophageal Cancer to Radiotherapy', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(14), 3740–3750.

- Yin L, Duan JJ, Bian XW, & Yu SC. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 61.
- Zhang YN, Xia KR, Li CY, Wei BL, & Zhang B. (2021). Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. *BioMed research international*, 2021, 1994764.
- Zhang Q, Lin X, Jiang K, Deng J, Ke L, Wu Z, & Hu J. (2022). PD0166285 sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to radiotherapy by dual inhibition of WEE1 and PKMYT1. *Frontiers in Oncology*, 12, 1061988.
- Zou T, & Lin Z. (2021). The Involvement of Ubiquitination Machinery in Cell Cycle Regulation and Cancer Progression. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5754.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Rabia Rana DERLİOĞLU

Uyruğu : Türk

Yabancı dili : İngilizce, Türkçe

II- Eğitimi (Tarih Sırasına Göre Yeniden Eskiye Doğru)

2021-2024- Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Tıbbi Biyoloji (Yüksek lisans)

2016- 2020- Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik (Lisans)

III- Bilimsel Etkinlikleri

IV- Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

The ATR inhibition by Elimusertib enhances the radiosensitivity of MDA-MB-231 triple negative breast cancer in vitro
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09553002.2024.2316606> 2024