

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE EMODİNİN NLK-İLİŞKİLİ SİNYAL
YOLAKLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hanadi LABABIDI

2300000862

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN

EYLÜL 2025

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE EMODİNİN NLK-İLİŞKİLİ SİNYAL
YOLAKLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hanadi LABABIDI

2300000862

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK

EYLÜL 2025

ÖNSÖZ

Hayatımın en önemli ve emek dolu dönemlerinden biri olan bu yüksek lisans sürecinde, desteklerini esirgemeyen tüm kıymetli insanlara içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

Öncelikle, çalışmamın her aşamasında bilgisiyle, hoşgörüsüyle ve yönlendirmeleriyle bana ışık tutan, sabırla yol gösteren değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Burcu Ayhan ŞAHİN'e en derin şükranlarımı sunuyorum. Onun rehberliği olmadan bu çalışmayı tamamlamak mümkün olmazdı.

Akademik hayatım süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım kıymetli hocalarım Prof. Dr. SEYHAN ALTUN'a, Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Özge RENCÜZOĞULLARI'na, Dr. Öğr. Üyesi ALP AYAN'a teşekkürlerimi sunarım. Akademik süreç boyunca bilgi ve destekleriyle yanımda olan Araştırma Görevlileri Buse Özden ve Enes Bal'a içten teşekkür ederim.

Her koşulda yanımda olan sevgili aileme minnettarım. Beni her zaman yüreklendiren, sevgisiyle sarmalayan, en karanlık anlarımda ışığım olan annem IMAN ALANI'ye... Bu başarımın arkasındaki en güçlü el sensin. Merhum babam AHMAD LABABIDI'ye, hayatıma kattığın değerler ve bugünlere ulaşmamda bıraktığın izler için minnettarım. Mekânın cennet olsun.

Hayatıma anlam katan, her gülüşüyle yorgunluğumu alan, umudumu tazeleyen sevgili çocuklarım TASNEEM ve ALI ALSUKKAR... bu yolculukta attığım her adımda, sizlere örnek olma isteği bana en büyük motivasyon oldu. Sizler için güçlü kaldım, sizler için başardım.

Sevgili kardeşlerim HADI, HANI, HADIL LABABIDI, zor zamanlarda yanımda oldunuz, güzel anlarda mutluluğumu paylaştınız. Sevginiz, güveniniz ve desteğiniz olmasa bu yolculuk çok daha zor olurdu. İyi ki varsınız.

Sevgili anneannem Um MAMOUN, sınırsız sevgisi ve merhametiyle kalbimde her zaman özel bir yere sahip oldu. Varlığın ve duaların benim için tarifsiz bir huzur kaynağı.

Bu süreçte yanımda olan değerli arkadaşlarım MAISOUN FATTAL, AYL A HABBAL, NOUR MOHAMMAD ve AMAL SALLOUM; ne zaman ihtiyacım olsa bir tebessüm, bir destek ve içten bir dostluk sundunuz.

Hayat yolculuğumun bu özel döneminde, birlikte geçirdiğimiz her an hafızamda unutulmaz izler bıraktı. Sevgili yol arkadaşlarım HANEEN Shamsheer Ali ve NASMA ELABBADY, varlığınıza bu süreci hem anlamlı hem de neşeli kıldınız; her desteğiniz için minnettarım. SAFA, HATICE, GÜNEL, MERYAM, KIMIA, NEGAR, ATİFE ve NEJDA... Sizlerle paylaştığım anlar, bu yolculuğun en değerli hatıralarını oluşturdu ve güzelliğini kat kat artırdı.

Kalbinde ve hayatımda daima sevgiyle yer alan tüm sevdiklerime, en içten duygularıyla
teşekkürlerimi sunuyorum.

Eylül 2025

Hanadi LABABIDI



İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------|
| ÖNSÖZ..... | i |
| KISALTMALAR VE SİMGELER | vi |
| TABLO LİSTESİ | viii |
| ŞEKİL LİSTESİ | ix |
| TÜRKÇE ÖZET..... | xi |
| YABANCI DİL ÖZET | xiii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 1.1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.2. AMAÇ | 2 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Kanser | 3 |
| 2.1.1. Meme Kanseri | 3 |
| 2.1.1.1. Meme kanserinin etiyolojisi..... | 5 |
| 2.1.1.2. Meme kanserinde önemli risk faktörleri | 5 |
| 2.1.2. Meme Kanserinin Evreleri | 7 |
| 2.1.3. Meme Kanserlerin Sınıflandırılması | 7 |
| 2.1.3.1. Patolojiye Dayalı Sınıflandırılma..... | 8 |
| 2.1.3.2. Moleküler Sınıflandırma..... | 9 |
| 2.1.4. Meme Kanseri Teşhisi Yöntemleri | 10 |
| 2.1.4.1. Mamografi..... | 11 |
| 2.1.4.2. MRI (Manyetik Rezonans Görüntüleme)..... | 11 |
| 2.1.4.3. Dinamik Kontrastlı MRI (DCE-MRI) | 11 |
| 2.1.4.4. Difüzyon Ağırlıklı Görüntüleme | 12 |
| 2.1.4.5. İnce İğne Aspirasyonu | 12 |
| 2.1.4.6. Ultrason | 12 |
| 2.1.4.7. Serum Tümör Biyomarkerlar..... | 13 |
| 2.1.4.8. MikroRNA'lar..... | 13 |
| 2.1.5. Meme Kanserinin Tedavisinde Yöntemler | 13 |
| 2.1.5.1. Anti-Östrojen..... | 15 |
| 2.1.5.2. LH-RH Analogları..... | 16 |
| 2.1.5.3. mTOR/PI3K/AKT Yol İnhibitörleri | 16 |
| 2.1.5.4. CDK4/6 İnhibitörleri | 17 |
| 2.1.5.5. HER2 Pozitif Meme Kanseri İçin Yeni Stratejik Tedaviler: | 17 |
| 2.2. Östrojen Reseptörü | 19 |
| 2.2.1. Meme Kanserinde Östrojen Sinyali | 20 |
| 2.2.1.1. MAPK Sinyal Yolu..... | 22 |
| 2.2.1.2. ER α ve MAPK Arasındaki Cross-Talk | 25 |
| 2.2.1.3. Nemo-Like Kinase (NLK)..... | 26 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.1.4. | Meme Kanserinde MAPK ve Nemo-Like Kinaz'ın Rollerini..... | 29 |
| 2.3. | Emodin..... | 30 |
| 2.3.1. | Emodin'in Kanserlerdeki Rolü..... | 31 |
| 2.3.2. | Emodin'in Meme Kanserindeki Rolü..... | 33 |
| 2.4. | mikroRNA (miRNA)..... | 34 |
| 2.4.1. | Kanserde MikroRNA'ların Rolü..... | 36 |
| 2.4.2. | miR- 208a..... | 37 |
| 3. | MATERYAL VE METOD..... | 40 |
| 3.1. | Materyaller..... | 40 |
| 3.1.1. | Kullanılan Hücreler ve Özellikleri..... | 40 |
| 3.1.2. | Çalışmada Kullanılan Cihazlar..... | 41 |
| 3.1.3. | Hücre Kültürü Donanımları..... | 41 |
| 3.1.4. | Çalışmada Kullanılan Kimyasallar..... | 41 |
| 3.1.5. | Çalışmada Kullanılan Çözeltiler..... | 42 |
| 3.1.6. | Kullanılan Antikorlar ve miRNA Molekülleri listesi..... | 42 |
| 3.2. | Metodlar..... | 42 |
| 3.2.1. | Hücre Kültürü..... | 42 |
| 3.2.2. | Hücre Dondurma..... | 42 |
| 3.2.3. | Hücrelerin Açılması..... | 43 |
| 3.2.4. | Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)..... | 43 |
| 3.2.5. | Koloni Formasyon Analizi..... | 44 |
| 3.2.6. | Tripin mavisi hücre sağ kalım testi (Growth assay)..... | 44 |
| 3.2.7. | Floresan Boyama Analizi..... | 45 |
| 3.2.8. | Asılı Damla (Hanging Drop) Deneyi..... | 45 |
| 3.2.9. | PI (Propidium İyodür) Hücre Akış Sitometrisi Testi..... | 46 |
| 3.2.10. | Protein İzolasyonu..... | 46 |
| 3.2.11. | Bradford Protein Miktar Tayini..... | 47 |
| 3.2.12. | İmmünoyotlama Yöntemi..... | 47 |
| 3.2.13. | miR-208a Transfeksiyonu..... | 48 |
| 3.2.14. | miRNA İzolasyonu..... | 49 |
| 3.2.15. | cDNA Sentezi..... | 49 |
| 3.2.16. | Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 49 |
| 3.2.17. | İstatiksel Analiz..... | 50 |
| 4. | SONUÇLAR..... | 51 |
| 4.1. | Meme Kanseri Hücrelerine Emodin Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi..... | 51 |
| 4.2. | Meme kanseri hücrelerinde Emodin'in hücre sağ kalımına etkisinin belirlenmesi | 53 |
| 4.3. | Emodin'in Meme Kanseri Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi..... | 55 |
| 4.4. | Meme Kanseri Hücrelerinde Emodin'in Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşmasına Etkisinin Gösterilmesi..... | 57 |

| | |
|---|------------|
| 4.5. Emodin Uygulamasının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü ve Canlılık Üzerine Etkisinin Floresan Boyama ile Gösterilmesi | 58 |
| 4.6. Emodin Uygulamasının MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü ve Canlılık Üzerine Etkisinin Floresan Boyama ile Gösterilmesi | 60 |
| 4.7. Meme Kanseri Hücrelerinde Emodin'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin İncelenmesi | 63 |
| 4.8. Meme Kanseri Hücrelerinde Emodin'in Östrojen Reseptör ve ERK1/2 Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi | 66 |
| 4.9. AntimiR-208a Transfeksiyonu Yapılan Meme Kanseri Hücrelerinde miR-208a İfadesinin İncelenmesi | 67 |
| 4.10. Meme Kanseri Hücrelerinde AntimiR-208a ve Emodin'in NLK Proteininin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi | 68 |
| 4.11. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Anti-miR-208a ve Emodinin MAPK Sinyal Yolağı Proteinlerinin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin Analizi..... | 69 |
| 4.12. Meme Kanseri Hücrelerinde Anti-miR-208a ve Emodin'in Östrojen Reseptör Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi..... | 72 |
| 4.13. Meme Kanseri Hücrelerinde AntimiR-208a ve Emodinin Nükleer c-MYC Proteininin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi..... | 72 |
| 5. TARTIŞMA..... | 74 |
| 6. KAYNAKLAR | 86 |
| 7. EKLER | 103 |

KISALTMALAR VE SİMGELER

| | |
|------------------|--|
| 3D | Üç Boyutlu |
| AhR | Aril Hidrokarbon Reseptörü |
| BAX | Bcl-2 İlişkili X Protein |
| Bcl-2 | B-hücreli Lenfoma 2 |
| BRCA | BReast CAncer gene (Meme Kanseri Geni) |
| CDK | Siklin Bağımlı Kinaz |
| c-MYB | Hücrel Myeloblastozis Onkojeni |
| c-MYC | Cellular Myelocytomatosis (Hücrel Myelositomatozis) |
| Cyclin D1 | Siklin D1 |
| DCIS | Duktal Karsinoma in situ |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| ER α | Östrojen Reseptörü Alfa |
| ERK | Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz |
| Fosfo-ERK (pERK) | Fosforile Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz |
| Fosfo-JNK (pJNK) | Fosforile c-Jun N-terminal Kinaz |
| Fosfo-P38 (pP38) | Fosforile p38 Kinaz |
| GRB2 | Büyüme Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 2 |
| HER2+ | İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 Pozitif |
| IDC | İnvaziv Duktal Karsinom |
| IGF-1R | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 Reseptörü |
| ILC | İnvaziv Lobüler Karsinom |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinaz |
| LEF1 | Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 |
| MAPK | Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz |
| MCF-7 | Michigan Cancer Foundation-7 (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı) |
| MDA-MB-231 | M. D. Anderson Mammary/Breast (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı) |
| miR-208a | Mikro RNA-208a |
| mTOR | Rapamisinin Memeli Hedefi |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| NF- κ B | Nükleer Faktör Kappa B |
| NLK | Nemo-like Kinase (Nemo Benzeri Kinaz) |
| NSCLC | Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri |

| | |
|------|--|
| P38 | p38 Kinaz |
| PI | Propidyum İyodür |
| PI3K | Fosfatidilinozitol-3 Kinaz |
| PR | Progesteron Reseptörü |
| RAF | Hızla İlerleyen Fibrosarkom (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) |
| RAS | Rat Sarkoma |
| RISC | RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri |
| RTK | Reseptör Tirozin Kinaz |
| SERD | Seçici Östrojen Reseptörü Degradatörü |
| TCF1 | T Hücre Faktörü (T Cell Factor 1) |
| TNBC | Üçlü Negatif Meme Kanseri |
| Wnt | Wingless Int-1 |

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|-----|
| Tablo 2-1 Meme kanseri risk faktörleri (Peairs vd., 2017) | 6 |
| Tablo 2-2 Meme kanserinin farklı tiplerinin tedavisinde kullanılan tedavi edici ilaçların listesi ve durumları (Bhushan vd., 2021c) | 18 |
| Tablo 7-1 Çalışma Süresince Kullanılan Cihazların Listesi | 103 |
| Tablo 7-2 Çalışma Süresince Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller | 103 |
| Tablo 7-3 Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Listesi | 104 |
| Tablo 7-4 Kullanılan Antikorlar ve miRNA Molekülleri listesi | 105 |
| Tablo 7-5 Kullanılan Primer Dizileri | 105 |
| Tablo 7-6 %12'lik Alt Jel hazırlama (Seperating Gel) | 105 |
| Tablo 7-7 % 4'lük Üst Jel hazırlama (Stacking Gel) | 105 |
| Tablo 7-8 Kullanılan Çözeltiler | 106 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1 2020 yılında Kadınlarda kanser insidans ve ölüm oranları..... | 4 |
| Şekil 2.2 Duktal meme kanseri gelişim süreci..... | 9 |
| Şekil 2.3 Meme kanseri teşhisi yöntemleri | 10 |
| Şekil 2.4 Meme kanserinde hedefe yönelik tedavi yaklaşımları..... | 14 |
| Şekil 2.5 Östrojen reseptörünün (ER) yapısal ve işlevsel bölgeleri..... | 20 |
| Şekil 2.6 Meme kanserinde östrojen reseptörlerinin etki mekanizmaları | 21 |
| Şekil 2.7 Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunun şematik gösterimi. | 22 |
| Şekil 2.8 Konvansiyonel ve atipik MAPK'lar arasındaki yapısal farklılıklar (Cargnello & Roux, 2011b)..... | 23 |
| Şekil 2.9 MAPK sinyal yolu (<i>MAPK signaling pathway</i> - Cusabio, t.y.)..... | 25 |
| Şekil 2.10 NLK proteinin çeşitli kanser türlerindeki rolleri | 28 |
| Şekil 2.11 Emodinin kimyasal yapısı (X. Dong vd., 2016) | 30 |
| Şekil 2.12 Emodinin antikanser aktivitesinde rol oynayan moleküler yollar (Zheng vd., 2021b) | 32 |
| Şekil 2.13 MikroRNA biyogenezinin 'doğrusal' kanonik yolu (Vrijens vd., 2015)..... | 35 |
| Şekil 2.14 miR-208a, miR-208b ve miR-499'un gen yapısı, ifade örüntüsü ve faredeki konak genleri..... | 38 |
| Şekil 3.1 MCF-7 hücre hattının mikroskopik görünümü | 40 |
| Şekil 3.2 MDA-MB-231 hücre hattının mikroskopik görünümü..... | 41 |
| Şekil 4.1 Emodin'in meme kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi..... | 52 |
| Şekil 4.2 Emodinin meme kanseri hücrelerinin sağkalımına etkisinin değerlendirilmesi | 54 |
| Şekil 4.3 Emodin uygulamasının MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki doza bağlı etkisinin gösterilmesi | 55 |
| Şekil 4.4 Emodin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki doza bağlı etkisinin gösterilmesi | 56 |
| Şekil 4.5 Emodin uygulamasının MCF-7 hücrelerinde sferoid oluşumuna etkisi | 57 |
| Şekil 4.6 Emodin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde sferoid oluşumuna etkisi | 58 |
| Şekil 4.7 Emodinin MCF-7 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeline etkisi | 59 |
| Şekil 4.8 Emodinin MCF-7 hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkileri..... | 60 |
| Şekil 4.9 Emodinin MCF-7 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeline etkisi | 61 |
| Şekil 4.10 Emodinin MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkileri | 62 |
| Şekil 4.11 Emodin'in MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelenmesi..... | 64 |
| Şekil 4.12 Emodin'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelenmesi..... | 65 |
| Şekil 4.13 MCF-7 hücrelerinde Emodin'in ER- α protein ekspresyon düzeyine etkisinin incelenmesi..... | 66 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.14 MCF-7 hücrelerinde Emodin'in ERK1/2 protein ekspresyon düzeyine etkisinin incelenmesi..... | 67 |
| Şekil 4.15 miR-208a seviyelerinin qPCR ile gösterilmesi..... | 68 |
| Şekil 4.16 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin ve anti-miR-208a'nın NLK protein düzeylerine etkisi | 69 |
| Şekil 4.17 MCF-7 hücrelerinde Emodin ve miR-208a'nın MAPK yolak proteinlerinin seviyelerine etkilerinin incelenmesi..... | 70 |
| Şekil 4.18 MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin ve miR-208a'nın MAPK yolak proteinlerinin seviyelerine etkilerinin incelenmesi | 71 |
| Şekil 4.19 MCF-7 hücrelerinde Emodin ve miR-208a uygulamasının ER α protein seviyesine etkilerinin incelenmesi..... | 72 |
| Şekil 4.20 Emodin ve miR-208a'nın c-MYC protein seviyesine etkisinin araştırılması . | 73 |



TÜRKÇE ÖZET

Enstitü : Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN
Tez Türü ve Tarih : Yüksek Lisans – Eylül 2025

KISA ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE EMODİNİN NLK-İLİŞKİLİ SİNYAL YOLAKLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hanadi LABABIDI

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen malignitelerden biridir. Bazı alt tiplerde tedaviye direnç gelişmesi, yeni tedavi edici ajanların araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Doğal olarak bulunan ve antikanser özellikleri literatürde tanımlanmış bir bileşik olan Emodin'in, özellikle östrojen reseptörü (ER) ve MAPK sinyal yolları ile etkileşimi açısından, meme kanseri üzerindeki moleküler etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, Emodin'in östrojen reseptörü pozitif (MCF7) ve üçlü negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonu, canlılığı ve hücre ölümüne etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığı ve proliferasyonu; MTT analizi, sağkalım testi, koloni oluşum testi ve asılı damla yöntemi ile değerlendirilmiş ve her iki hücre hattında da doza bağlı olarak anlamlı bir canlılık inhibisyonu saptanmıştır. Bu etkinin, MCF7 hücrelerinde daha belirgin olduğu görülmüştür. Hücre ölümünün indüksiyonu, PI ve DiOC₆ boyaları kullanılarak yapılan floresan analizlerle doğrulanmış, tedavi sonrası ölü hücre oranında artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, propidyum iyodür (PI) ile yapılan hücre döngüsü analizi, hücrelerin belirli döngü fazlarında duraksadığını ortaya koymuş ve antiproliferatif etkiyi desteklemiştir. Emodin'in bu etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaları incelemek amacıyla, temel sinyal proteinlerinin ekspresyon ve fosforilasyon düzeyleri immunoblotlama yöntemi ile analiz edilmiştir. Tedavi sonucunda östrojen reseptör alfa (ER α) düzeyinde azalma ve MAPK yollarına ait ERK (pERK), JNK (pJNK) ve P38 (pp38) proteinlerinin fosforilasyon durumlarında değişiklikler gözlemlenmiştir. Ayrıca, birçok sinyal yolakta görev alan serin/treonin kinazlardan biri olan Nemo-like kinazın (NLK) ekspresyonunun, miR-208a aracılığıyla düzenlendiği ve bu durumun Emodin'in antikanser etkileriyle

ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, Emodin'in antitümör etkisini ER sinyal yolunu hedefleyerek ve MAPK sinyal yollarını modüle ederek gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, miR-208a/NLK aksının bu mekanizmada rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma, Emodin'in moleküler etkilerine dair önemli veriler sunmakta ve meme kanseri alt tipleri için kombine tedavi yaklaşımlarında potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.



Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Emodin, Östrojen reseptörü ($ER\alpha$), MAPK, miR-208a, Nemo-benzeri kinaz (NLK)

Bilim Dalı Sayısal Kodu: 20610

YABANCI DİL ÖZET

Institute : Institute of Graduate Studies
Department : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Burcu AYHAN ŞAHİN
Degree Awarded and Date : Master's Degree – September 2025

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF EMODIN ON NLK-RELATED SIGNALING PATHWAYS IN BREAST CANCER CELLS

Hanadi LABABIDI

Globally, breast cancer ranks among the most prevalent and significant malignancies affecting women. The emergence of treatment resistance in certain subtypes underscores the urgent need to explore novel therapeutic agents. Emodin, a naturally derived compound known for its anticancer potential, remains insufficiently explored regarding its molecular mechanisms in breast cancer, particularly its involvement in estrogen receptor (ER) regulation and MAPK signaling pathways. This study evaluated the impact of Emodin on cell proliferation, viability, and cell death in estrogen receptor-positive (MCF-7) and triple-negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. Cell viability and proliferation were analyzed using MTT assays, survival analysis, colony formation, and hanging drop methods. The results demonstrated a significant, dose-dependent inhibition of cell growth in both cell lines, with a more pronounced effect observed in MCF-7 cells. The induction of cell death was confirmed through fluorescence-based analysis using PI and DiOC₆ staining, which demonstrated an increased proportion of non-viable cells following treatment. Additionally, cell cycle analysis using propidium iodide (PI) provided evidence of phase-specific arrest, further supporting Emodin's antiproliferative activity. To investigate the molecular mechanisms underlying these effects, immunoblotting was performed to analyze the expression and phosphorylation status of key signaling proteins. Emodin treatment resulted in the downregulation of estrogen

receptor alpha ($ER\alpha$) and modulation of MAPK pathway components, including changes in phosphorylated ERK (pERK), JNK (pJNK), and P38 (pp38). Furthermore, Nemo-like kinase (NLK), a serine/threonine kinase involved in multiple signaling pathways, was shown to be regulated by miR-208a, which correlates with enhanced anticancer effects. These findings indicate that Emodin exerts its antitumor activity in breast cancer by targeting estrogen receptor (ER) signaling and modulating the MAPK pathway, with the miR-208a/NLK axis potentially playing a key role. Overall, this study provides valuable insights into the molecular mechanisms of Emodin and supports its potential application in combination therapies for different breast cancer subtypes.



Keywords: Breast cancer, Emodin, Estrogen receptor ($ER\alpha$), MAPK, miR-208a, Nemo-like kinase (NLK)

Science Code: 20610

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. GİRİŞ

Dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen kanser türlerinden biri olan meme kanseri, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bu durum hem birey sağlığı hem de toplum sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Ginsburg vd., 2017). Meme kanserine bağlı mortalite oranlarının azaltılmasında erken tanı ve etkili tedavi stratejileri belirleyici bir rol oynamaktadır (Y. N. Zhang vd., 2021). Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler gibi tanı ve tedavi stratejilerindeki ilerlemelere rağmen, ilaç direncinin gelişmesi ve olumsuz yan etkilerin ortaya çıkması, yeni tedavi yaklaşımlarının sürekli olarak araştırılmasını gerekli kılmaktadır (Masoud & Pagès, 2017). Bu bağlamda, östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanseri modelleri, yeni terapötik ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde kritik bir öneme sahiptir. MCF-7 hücre hattı, ER⁺ meme kanseri için iyi karakterize edilmiş ve yaygın olarak kullanılan bir prelinik model olup, potansiyel antikanser ajanların moleküler etkilerini araştırmada önemli bir araçtır (Hopkinson vd., 2017). MDA-MB-231 hücre hattı ise agresif bir fenotip olan üçlü negatif meme kanseri (triple negative breast cancer, TNBC) modelidir ve tüm meme kanseri tipleri arasında en tehlikelisi olarak kabul edilir (Z. Huang vd., 2020). Son yıllarda, doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler, özellikle bitkisel kökenli fitokimyasallar, kanser tedavisinde alternatif veya destekleyici ajanlar olarak dikkat çekmektedir. Bu doğal bileşiklerden biri olan Emodin (1,3,8-trihidroksi-6-metilantrakinon), başta Rheum palmatum ve Polygonum cuspidatum gibi bitkiler olmak üzere çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan bir antrakinon türevidir. Yapılan prelinik çalışmalar, Emodin'in hücre proliferasyonunu inhibe etme, apoptozu indüklemeye, metastazı baskılama ve tümörle ilişkili sinyal yollarını modüle etme gibi çok yönlü antikanser etkilere sahip olduğunu göstermektedir (W. Liu vd., 2024). Ancak, Emodin'in özellikle meme kanseri üzerindeki etkileri ve bu etkilerin hangi moleküler hedefler aracılığıyla gerçekleştiği konusundaki mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Özellikle son dönem çalışmalarda dikkat çeken bir hedef ise Nemo-benzeri kinaz (NLK)'dir. Serin/treonin kinaz ailesine ait olan NLK, hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerde rol alan önemli bir düzenleyici olarak tanımlanmaktadır. NLK, MAPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) sinyal yolunun bir bileşeni olup, organ büyüklüğünün kontrolü ve tümör oluşumu gibi süreçlerde kritik görevler üstlenmektedir (S. Z. Li vd., 2022) (Y. Huang vd., 2015a).

NLK aktivitesindeki düzensizlik, özellikle meme kanseri gibi solid tümörlerde hücre proliferasyonu ve hayatta kalma mekanizmalarının değişmesine neden olabilmekte ve bu durum, NLK'nin bazı durumlarda bir onkogen gibi davranabileceğini düşündürmektedir (Y. Huang vd., 2015a) (Dahm vd., 2025).

Bu nedenle, NLK'nin meme kanseri patogenezindeki rolünü anlamak ve Emodin gibi doğal bileşiklerin NLK, ER α ve MAPK yolları üzerindeki etkilerini incelemek, yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

1.2. AMAÇ

Bu çalışma, doğal bir antikanser bileşik olan Emodin'in ve anti-miR-208a aracılığıyla NLK ekspresyonunun modülasyonunun, östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerindeki etkilerini kapsamlı biçimde değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Çalışmanın temel hipotezi, Emodin ve anti-miR-208a'nın birlikte uygulanmasının, tek başlarına oluşturdukları antikanser etkileri sinerjik biçimde güçlendirebileceği yönündedir. Bu doğrultuda, iki hücre hattında hücre canlılığı (MTT, sağkalım testi), koloni oluşturma kapasitesi, üç boyutlu (3D) sferoid gelişimi, hücre döngüsü dağılımı ve apoptoz oranları gibi temel hücresel parametrelerin incelenmesinin yanı sıra, Emodin ve anti-miR-208a'nın MAPK (ERK1/2, JNK, p38), ER α , NLK ve c-MYC gibi kritik sinyal yolak proteinleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilecek bulguların, Emodin'in antikanser etkilerinin moleküler mekanizmalarının ve miR-208a/NLK aksının meme kanseri patogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması; böylece alt tip-spesifik farklılıkları da göz önünde bulundurarak, yeni kombinasyon terapötik stratejilerinin geliştirilmesine bilimsel zemin oluşturması hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ve metastatik özellikler kazanmasıyla karakterize edilen kompleks bir hastalıktır. Çoğu durumda, onkogenlerin aşırı fazla aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybı, hücre döngüsünün denetimsiz ilerlemesine ve apoptotik mekanizmaların baskılanmasına neden olmaktadır (Sarkar vd., 2013). Moleküler biyoloji yöntemlerindeki ilerlemeler, bu durumun ortaya çıkmasında bir dizi sürücü mutasyonun etkili olduğunu göstermiştir (Brown vd., 2023).

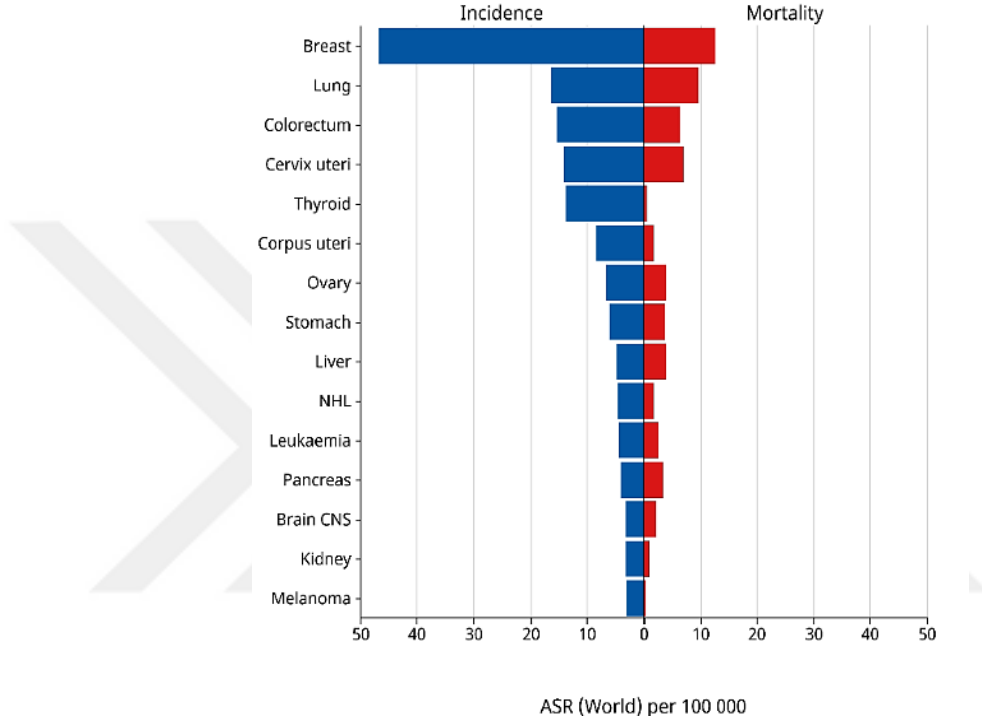
2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser ilişkili ölüm bildirilmiştir. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en yaygın ölüm nedenidir ve hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı açısından önemli bir yük oluşturmaktadır. İnsidans oranları ülkeler ve bölgeler arasında farklılık gösterse de yaşam süresinin uzaması, kentleşme ve yaşam tarzı değişiklikleriyle birlikte küresel kanser yükünün giderek arttığı bildirilmektedir. 2040 yılına kadar, yalnızca nüfus artışı ve yaşlanmaya bağlı olarak, yıllık yeni kanser vakalarının 28 milyonu aşacağı öngörülmektedir (Arnold vd., 2022).

2020 yılı verilerine göre, yaşa göre standardize edilmiş oranlar (*ASR, Age-Standardized Rate*) temel alındığında, dünya genelinde kadınlarda insidans ve mortalite açısından en sık görülen kanser türleri arasında meme, akciğer, kolorektal, mide ve karaciğer kanserleri yer almaktadır (Şekil 2-1).

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri (MK), küresel düzeyde sağlık sistemleri üzerinde ciddi bir yük oluşturmaya devam eden önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya genelinde kadınlarda en yaygın kanser türü olarak en sık teşhis edilen malign neoplazmlar arasında yer almaktadır (Sha vd., 2024) . Son otuz yıl içerisinde erken tanı yöntemleri, tedavi stratejileri ve toplumsal

farkındalıkta sağlanan ilerlemeler, meme kanserine ilişkin insidans, mortalite ve sağkalım oranlarında belirgin değişimlere yol açmıştır. 2021 DSÖ istatistiklerine göre MK dünyada en sık görülen kanser haline gelmiş olup, kadınlarda teşhis edilen tüm kanserlerin %30'dan fazlasını oluşturabileceği öngörülmektedir (Iacopetta vd., 2023).



Şekil 2.1 2020 yılında Kadınlarda kanser insidans ve ölüm oranları
Dünya genelinde her 100.000 kadında kanser insidansı ve ölüm oranlarında en yüksek oranlar meme kanseri için görülmektedir. ASR, Yaşa Göre Standardize-Oran

Kadınlarda meme kanseri mortalitesi, 1989 yılında en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Bunu izleyen dönemde mamografi taramalarıyla erken tanı olanağının artması, farkındalık kampanyaları ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmeler sayesinde mortalite oranlarında belirgin bir azalma gözlenmiştir. 2020 yılına gelindiğinde, mortalite oranları 1989'a kıyasla yaklaşık %43 azalmıştır. Ancak son yıllarda bu azalma hızında bir yavaşlama dikkat çekmektedir: 1990'lı ve 2000'li yıllarda mortalitede yıllık ortalama %2–3 oranında düşüş izlenirken, 2011–2020 döneminde bu oran yaklaşık %1'e gerilemiştir (Siegel vd., 2023).

2.1.1.1. Meme kanserinin etiyojisi

Kadınlarda meme kanseri gelişme riski; yaş, cinsiyet ve aile öyküsünün yanı sıra, seks hormonlarına maruz kalma süresiyle ilişkili üreme faktörlerinden de etkilenmektedir. Özellikle erken yaşta menarş, geç menopo ve hiç doğum yapmamış olmak riski artırırken; çok sayıda doğum yapmak ve emzirmek (laktasyon) riski azaltmaktadır. Ayrıca, menopo sonrası dönemde kombine hormon tedavisi (HT) kullanan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (Anderson vd., 2014).

Epidemiyolojik kanıtlar, meme kanseri riskini düzenlemede yaşam tarzı ve davranış faktörlerinin rolünü güçlü bir şekilde desteklemektedir. Meme kanseri insidansındaki küresel değişimler, ülkelerdeki zaman içindeki değişimlerle birlikte, genetik olmayan, değiştirilebilir risk faktörlerinin (özellikle sağlık davranışlarıyla ilişkili olanlar) hastalık prevalansında kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Dünya çapında meme kanseri vakalarının yaklaşık %25'i aşırı kilo, obezite ve fiziksel hareketsizliğe atfedilebilir ve bu faktörlerin halk sağlığı stratejilerinde önemini vurgulamaktadır (McTiernan, 2003) (Xu & Xu, 2023).

2.1.1.2. Meme kanserinde önemli risk faktörleri

Meme kanseri gelişiminde hem genetik hem de çevresel etkenler rol oynamaktadır. Bu risk faktörleri genel olarak değiştirilebilir (modifiye edilebilir) ve değiştirilemeyen (modifiye edilemeyen) olmak üzere iki grupta incelenir. Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında yaş, aile öyküsü, genetik mutasyonlar (özellikle *BRCA1* ve *BRCA2*), erken menarş, geç menopo ve ileri yaşta ilk doğum yer alırken; değiştirilebilir risk faktörleri arasında menopo sonrası obezite, hormon tedavisi, alkol kullanımı, sigara, fiziksel inaktivite ve emzirmeme bulunmaktadır (Tablo 2-1).

Meme kanserlerinin yaklaşık %5–10'u kalıtsal genetik mutasyonlarla ilişkilidir. En yaygın nedenler arasında *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar yer almaktadır. *BRCA1* mutasyonu taşıyan kadınlarda yaşam boyu meme kanseri riski %55–65, *BRCA2* mutasyonu olanlarda ise yaklaşık %45'tir. Ortalama olarak, bu mutasyonlardan birine sahip kadınların 80 yaşına kadar meme kanserine yakalanma olasılığı yaklaşık %70'tir. Erkeklerde *BRCA1* mutasyonları daha nadir görülürken, *BRCA2* mutasyonları yaşam

boyu meme kanseri riskini yaklaşık %6,8 oranında artırmaktadır (S. Chen & Parmigiani, 2007).

Tablo 2-1 Meme kanseri risk faktörleri (Peairs vd., 2017) .

| Modifiye Edilebilir Risk Faktörleri | | | |
|--|---|---|--|
| Faktör | Risk Oranı | Etiyoloji / Karsinojen | Açıklama |
| Menopoz sonrası obezite | 1.2 (≥ 80 . persentil yaş <55, ≥ 20 . persentil) | Adipoz doku biyoaktif östrojen kaynağıdır; insülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri artar | Yüksek BMI, premenopozal meme kanseri için daha düşük riskle ilişkilidir; mekanizması belirsizdir |
| Östrojen/progesteron hormon tedavisi | 1.3 (≥ 5 yıl kullanım) | Hormonlara maruziyet | Özellikle ≥ 5 yıl kullanımda risk artar. Östrojen + progesteron birlikte alındığında risk daha da artar |
| Alkol tüketimi | 1.2 (≥ 2 içki/gün vs. içmeyen) | Kararsız; DNA tamirini azaltır | Alkol tüketimi arttıkça risk artar |
| Sigara | 1.1 | Kararsız | Maruziyet süresi ile risk artar |
| Emzirme | 1.3 (≥ 16 ay emzirme) | Hücre farklılaşması; geç gebelik ve emzirme ile oluşur | Emzirmeme halinde risk artar |
| Fiziksel inaktivite | RR ~0.88 (aktif olmayan vs. aktif) | İnsülin, IGF ve östrojen seviyelerini azaltabilir | Fiziksel aktivite meme kanseri riskini azaltabilir |
| Modifiye Edilemeyen Risk Faktörleri | | | |
| Faktör | Risk Oranı | Etiyoloji / Karsinojen | Açıklama |
| Yaş ≥ 65 | 5.8 | Multifaktöriyel; DNA hasarı | Risk yaşla birlikte artar; çoğu meme kanseri 50 yaşından sonra tanı alır |
| Aile öyküsü | 1.8–3.6 | - | Anne veya baba tarafından birinci derece akrabalarda meme kanseri olması riski artırır |
| Menarş < 12 yaş | 1.3 (< 12 vs. > 15 yaş) | Hormonlara daha uzun maruz kalma | Daha uzun hormon maruziyeti ile ilişkilidir |
| Menopoz < 55 yaş | 1.2–1.5 (< 45 yaş) | Hormonlara daha uzun maruz kalma | - |
| İlk gebelik > 30 yaş | 1.7–1.9 (ilk çocuk > 20 yaş) | Hücre farklılaşması geç oluşabilir | Tam dönem gebelik yapmamak da riski artırır |
| Mamografide yoğun meme dokusu | 4–5 kat ($\geq 75\%$) | Glandüler doku artışı | Görüntüleme zorluklarına rağmen risk artar |
| Bazı kanseröz olmayan meme hastalıkları | 1.5–3.3 (atipi veya hiperplazi) | Proliferatif hücreler | Kanser riskini artırabilir |
| Over/Endometrial kanser öyküsü | Değişken risk | Germline mutasyonları ile ilişkili | - |
| BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları | 15–200 (BRCA1 ile) | DNA tamir genlerinde otozomal dominant mutasyon | Yüksek riskli genetik faktör |
| Kemik yoğunluğu (yüksek BMD) | 1.6–1.8 | Estrojenin etkisi olabilir | Yüksek kemik yoğunluğu ile ilişkilidir |
| Radyasyon terapisi öyküsü | 5.2 (Hodgkin tedavisi) | DNA hasarı | 30 yaş öncesi tedavide risk daha fazladır |

| | | | |
|---------------------|---|------------------------------------|---|
| İrk | - | Tanı yaşı ve evreye bağlı olabilir | Siyah kadınlar daha düşük sağkalım oranlarına sahiptir; sosyoekonomik durumla ilişkili olabilir |
| Etnik köken | - | Genetik ve çevresel | Asyalı, Hispanik, Kızılderili kadınlarda risk daha düşüktür |
| Sosyoekonomik durum | - | Multifaktöriyel | Düşük gelirli bölgelerde sağkalım daha kötüdür |

2.1.2. Meme Kanserinin Evreleri

Meme kanseri evrelemesi, hastalığın yayılım derecesini ve prognozunu belirlemek amacıyla yapılır. Klinik ve patolojik bulgulara dayanan evreleme, genellikle TNM sistemi (T: primer tümörün boyutu, N: bölgesel lenf nodu tutulumu, M: uzak metastaz varlığı) temel alınarak gerçekleştirilir. Bu sistem, Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanserle Savaş Birliği (UICC) tarafından düzenli olarak güncellenmektedir.

Bu evreleme sistemine göre, invazyon göstermeyen, sadece süt kanallarında veya lobüllerde sınırlı olan evre Evre 0 (Karsinoma in situ) olarak tanımlanır. Evre I'de Tümör boyutu ≤ 2 cm olup lenf tutulumu olmayan veya mikrometastaz düzeyinde olan grup belirtilir. Evre II'de tümör 2-5 cm arasındadır ve/veya sınırlı sayıda aksiller lenf nodu metastazı vardır. Evre III'te tümör >5 cm olup daha geniş lenf nodu tutulumu veya göğüs duvarı/deri invazyonu mevcuttur. Evre IV'te ise uzak organ metastazı (örneğin kemik, akciğer, karaciğer veya beyin) mevcuttur.

2018 yılında revize edilen 8. AJCC evreleme sistemi, klasik anatomik parametrelere ek olarak biyolojik belirteçleri (östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), HER2 durumu ve tümör derecesi) de içerecek şekilde genişletilmiştir. Bu güncelleme, tümörün biyolojik davranışını da dikkate alarak prognozunu daha doğru tahmin edilmesini sağlamıştır. Ayrıca lenf düğümlerine bölgesel metastazların boyutu, sayısı, yeri ve tespit yöntemine ilişkin ayrıntılar da sistemdeki önemli değişiklikler arasındadır (Singletary & Connolly, 2006).

2.1.3. Meme Kanserlerin Sınıflandırılması

Kanser sınıflandırması, hastalığın doğru teşhisini koymayı ve tümör davranışını tahmin etmeyi amaçlayarak onkolojik karar alma sürecini kolaylaştırır. Geleneksel meme kanseri sınıflandırması, esas olarak klinikopatolojik özelliklere ve rutin biyomarkerlerin

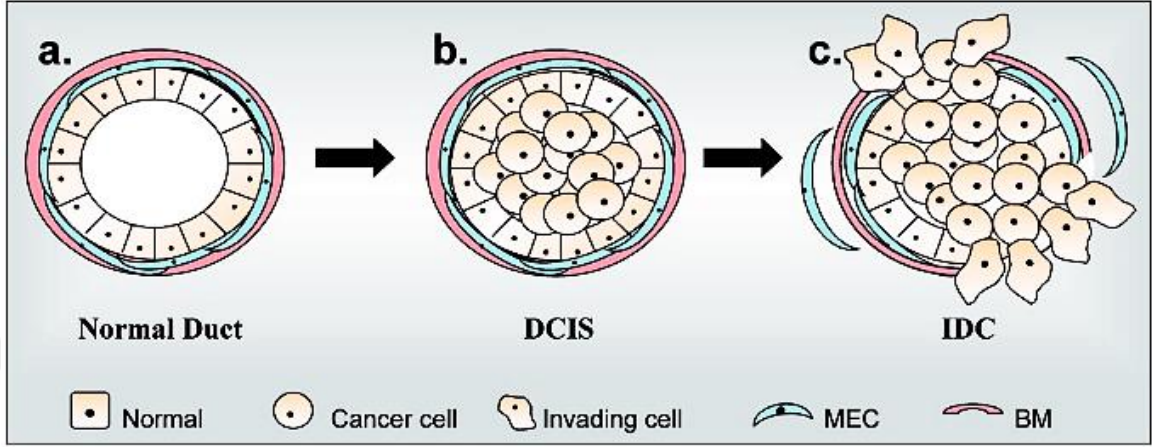
değerlendirilmesine dayanmasına rağmen, bireysel meme kanserlerinin farklı klinik seyirlerini tam olarak yansıtamayabilir (Tsang & Tse, 2020).

2.1.3.1. Patolojiye Dayalı Sınıflandırılma

Patolojiye dayalı sınıflandırmada meme kanserleri invaziv olmayan ve invaziv meme kanserleri olmak üzere iki ana sınıf bulunur. İnvaziv Olmayan (in situ) meme kanserleri kendi içinde iki grupta incelenir. Birincisi, Duktal karsinoma in situ (DCIS), intraduktal karsinom olarak da bilinir ve meme kanserinin en sık görülen alt tiplerinden biridir. DCIS, invaziv olmayan veya pre-invaziv bir meme kanseri formu olup, normal süt kanallarının içinde gelişim göstermektedir. Her ne kadar DCIS doğrudan invaziv bir özellik taşıyor olsa da bu lezyonların ilerleyerek invaziv meme kanserine dönüşme riski yüksektir. Bu nedenle erken tanı ve uygun tedavi yaklaşımları, hastalığın ilerlemesini önlemede kritik bir rol oynamaktadır. İkinci grup ise, Lobüler karsinoma in situ (LKIS), meme lobüllerinde gelişen, ancak çevre dokuya invazyon göstermeyen neoplastik bir lezyondur (van Seijen vd., 2019) (Feng et al., 2018).

İnvaziv (infiltrate edici) meme kanseri, normal meme lobülleri ve kanallarını istila eden ve bu yapıların dışına çıkarak çevredeki meme stromal dokusuna doğru ilerleyen hücreler ile karakterizedir. Bu tip meme kanseri en sık 55 yaş ve üzeri kadınlarda teşhis edilmektedir. İnvaziv karsinomlar, lenf düğümleri, kemik, akciğer veya diğer organlara yayılabilme potansiyeline sahip oldukları için metastatik meme kanserleri kategorisinde değerlendirilir. İlgili doku ve hücre tipine bağlı olarak, invaziv meme kanserleri temel olarak iki ana alt tipe ayrılmaktadır. İnvaziv Duktal Karsinom (IDC), en yaygın meme kanseri türüdür ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturur. IDC sınıflaması, birkaç alt tipi içerir: meme tüberküler karsinomu, meme medüller karsinomu, meme müsinöz karsinomu, meme papiller karsinomu ve meme kribriform karsinomu. Meme dokusunda IDC gelişimi, duktal hücrelerin bazal membranı aşarak çevredeki stromal dokulara invazyonu ile karakterizedir (Şekil 2-2). İnvaziv Lobüler Karsinom (ILC) ise meme kanserleri arasında en sık görülen ikinci tip olup, tüm olguların yaklaşık %10–15'ini oluşturmaktadır. Her yaş grubundaki kadınlarda görülebilse de özellikle ileri yaşlarda daha yaygındır. IDC ile karşılaştırıldığında ILC'nin genellikle daha geç yaşlarda

ortaya çıktığı rapor edilmiştir. IDC çoğunlukla 55 yaş ve üzerinde görülürken, ILC daha çok 60'lı yaşların başlarında teşhis edilmektedir (Shea vd., 2020) (Feng et al., 2018).



Şekil 2.2 Duktal meme kanseri gelişim süreci.

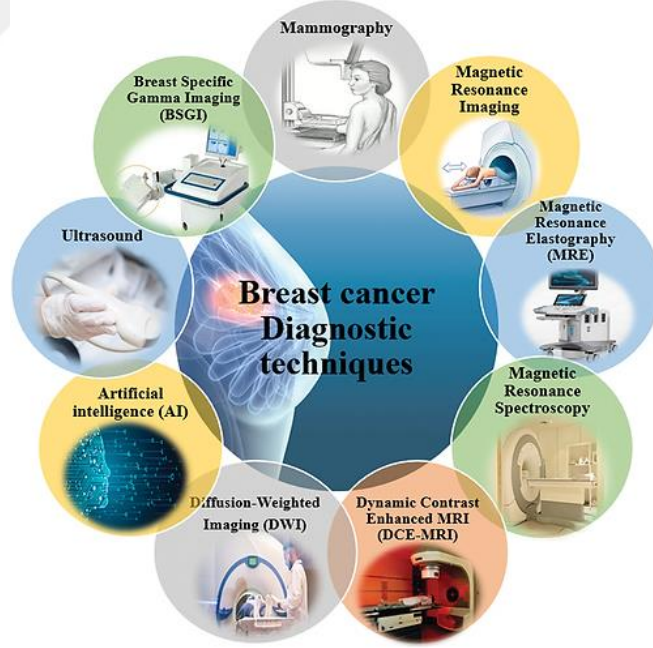
(a), Normal duktus bazal membran (BM) sağlamdır (b), (DCIS) Kanser hücreleri süt kanalı lümeninde birikerek proliferasyon gösterir, ancak bazal membran bütünlüğü korunmuştur (c), (IDC), Miyoeptelyal hücre tabakası ve bazal membran bozulmuştur (McSherry vd., 2007) .

2.1.3.2. Moleküler Sınıflandırma

Meme kanseri genellikle, tümör hücreleri tarafından eksprese edilen reseptörlerin varlığına veya yokluğuna göre beş ana alt tipe ayrılır: luminal A (LumA), luminal B (LumB), HER2-overeksprese (veya HER2-zenginleştirilmiş ya da HER2⁺), üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ve bazal-benzeri ile normal-benzeri (veya normal meme dokusu-benzeri). Luminal A, B ve HER2⁺ alt tipleri hormon reseptörleri (HR'ler), yani östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) açısından pozitifdir. Luminal B ve HER2⁺ alt tiplerinde ayrıca HER2 overekspresyonu da gözlemlenir (Orrantia-Borunda vd., 2022). Meme tümörlerinin çoğunluğu (%60–70) luminal A ve B alt tipleri tarafından temsil edilir. İnvaziv meme kanserlerinin %10–15'ini oluşturan HER2⁺ meme kanseri alt tipi, *HER2* geninin amplifikasyonu/aktivasyonu ile karakterizedir ve bu durum meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde HER2 reseptörünün overeksprese edilmesine neden olur. TNBC, üç moleküler belirteçten (ER, PR ve HER2) hiçbirinin eksprese edilmemesi nedeniyle “üçlü negatif” olarak adlandırılmıştır ve en agresif, prognozu en kötü olan alt tiptir. Genellikle genç kadınlarda görülür ve tüm meme kanserlerinin %15–20'sini oluşturur (Lau vd., 2022) (Iacopetta vd., 2023).

2.1.4. Meme Kanseri Teşhisi Yöntemleri

Meme kanseri tanısında kullanılan görüntüleme teknikleri, maliyet, duyarlılık ve özgüllük açısından sınırlamalara sahiptir; bu da yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. HER2 ve Ki-67 gibi proteinler, *ERα* ve *ERβ* gibi mRNA'lar, CEA gibi enzimler ve mikroRNA'lar dahil olmak üzere bu biyomarkerler, meme kanserinin moleküler yollarının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak daha etkili tedavi ve izleme yöntemlerine katkıda bulunabilir. Bir tirozin kinaz reseptörü olan HER2, hücre büyümesinde rol oynar ve bazı meme kanseri türlerinde overeksprese edilir; bu da onu öngörücü bir biyomarker haline getirir. Ki-67, hücre proliferasyon hızını gösteren bir biyobelirteçtir ve yüksek düzeyleri, meme kanserinde nüks olasılığının artışıyla ilişkilidir (Feeley vd., 2014). Östrojen reseptörleri (ER), özellikle *ERα*, östrojene bağımlı meme kanserlerinde rol oynar ve hücre çoğalması ile metastazı etkilerken, *ERβ* tümör baskılayıcı işlevlere sahip olabilir. Her iki ER alt tipi de potansiyel prediktif biyomarkerlerdir (Jafari vd., 2018).



Şekil 2.3 Meme kanseri teşhisi yöntemleri

Meme kanseri mammografi, manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri gibi yöntemlerle teşhis edilebilir (Ibrahim vd., 2024)

2.1.4.1. Mamografi

Mamografi, memenin röntgen teknolojisi kullanılarak görüntülenmesini sağlayan bir yöntemdir. Günümüzde bazı meme tarama merkezlerinde, geleneksel film tabanlı mamografinin yerini dijital mamografi almıştır. Dijital mamografinin başlıca avantajları arasında; bilgisayar destekli tespit sistemleri, mamogramdaki olası anormallikler konusunda radyologları uyaran algoritma tabanlı yazılımlar ve merkezi film okuma kolaylığı yer almaktadır. Bununla birlikte, mamografinin sık kullanımı potansiyel radyasyon risklerinin dikkatle değerlendirilmesini gerektirir. Ayrıca, yanlış pozitif sonuçlar ek görüntüleme ihtiyacına veya histopatolojik incelemelere, özellikle de perkütan meme biyopsisine yol açabilmektedir (Kerlikowske vd., 2011).

2.1.4.2. MRI (Manyetik Rezonans Görüntüleme)

Manyetik rezonans görüntüleme, proton yoğunluğunu kullanan yüksek çözünürlüklü bir görüntüleme tekniğidir. Seçicilikteki sınırlamalar ve kontrast maddelere bağımlılık nedeniyle meme kanseri teşhisi için rutin olarak kullanılmaz. Erken teşhis için yüksek hassasiyete sahip olsa da özellikle gadolinyum ile ilişkili toksisitelere sahip olan kontrast geliştirme gerektirir. Araştırma, lipozomal nanopartiküller ve kontrast madde etkinliğini ve güvenliğini iyileştirmek için hedefleme teknikleri gibi yeni taşıyıcı sistemleri geliştirmeye odaklanmıştır. Örnekler arasında nükleolin hedefli nanopartiküller, folat hedefli gadolinyum yüklü lipozomlar ve mikro damar karakterizasyonu için ultra küçük süperparamanyetik demir oksit parçacıkları bulunur. Demir oksit parçacıkları içeren manyetolipozomlar, görüntüleme, hedefleme ve hipertermi için araştırılmaktadır. Demir oksit nanopartikülleri ayrıca proliferatif olmayan kanser hücrelerini tespit etmek için de umut vaat etmektedir ve giyilebilir teşhis cihazlarında kullanım için araştırılmaktadır (Nounou vd., 2015).

2.1.4.3. Dinamik Kontrastlı MRI (DCE-MRI)

Dinamik kontrast madde destekli meme MRI, paramanyetik kontrast maddenin intravenöz enjeksiyonundan sonra bir dokunun zamansal iyileştirme örüntüsünü analiz ederek çalışır. Bu invaziv olmayan görüntüleme tekniği, doku vaskülerizasyonunun, interstisyel boşluk kompozisyonunun ve lezyonların farklılaşmasının kapsamını nicel olarak belirler. Sonuç

olarak, meme kanserinde daha fazla anjiyogenez nedeniyle oluşan lenf nodu metastazı da bu görüntüleme modeli kullanılarak tahmin edilebilir. Doku analizi gibi bilgisayar destekli bir tanı teknolojisiyle birleştirildiğinde DCE-MRI, östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanseri alt tiplerini tanımlamak için de kullanılabilir (Bhushan vd., 2021a).

2.1.4.4. Difüzyon Ağırlıklı Görüntüleme

Difüzyon ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme (DW-MRI), su parçacıklarının canlıdaki hareketini ölçen ve mikroskobik doku yapısını analiz eden kontrastsız bir işlemdir. DW-MRI, kontrast madde enjeksiyonuna gerek kalmadan mikroskobik hücresel ortamdaki değişikliklere karşı oldukça hassastır. Kısa bir edinim süresine ve kolay işleme sahiptir. Hastalığın kapsamının belirlenmesine, tedavi yanıtının izlenmesine ve tahmin edilmesine, prognoz tahmin edilmesine ve uygun koşullarda biyopsi rehberliğine yardımcı olabilir (Durur-Subasi, 2019).

2.1.4.5. İnce İğne Aspirasyonu

İnce iğne aspirasyonu (FNA) 1930'da tanıtılmış ve meme lezyonları için birinci basamak tanı prosedürü olarak yaygın olarak kabul edilmiştir. Yıllar geçtikçe, teknik yüksek duyarlılık, yüksek özgüllük ve yüksek pozitif öngörü değeri göstermiştir. Doku bazlı tekniklere göre avantajları arasında minimal invazivlik, maliyet etkinliği ve hızlı geri dönüş süresi, iyi huylu lezyonları olan hastalar için bir konfor yer alır. FNA ayrıca ameliyat edilemez veya tekrarlayan meme kanserinin tanısında da faydalıdır (Chaiwun & Thorner, 2007).

2.1.4.6. Ultrason

Ultrason, yoğun meme dokusunda özellikle yararlı bir tanı yöntemidir ve genellikle mamografide gizlenen meme kanserlerini tespit eder. Meme ultrasonunun, memedeki elle tutulabilen anormallikleri görüntülemek için olağanüstü etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Kistik kitleleri katı kitlelerden ayırır ve katı kitlelerin kitleyi şüpheli ve biyopsiyi gerektiren özelliklerini gösterir. Ultrason yaygın olarak bulunur, bakımı kolaydır, ekonomiktir, dayanıklıdır ve kolayca taşınabilir (Sood vd., 2019).

2.1.4.7. Serum Tümör Biyomarkerlar

Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO), meme tümörü belirteci olabilecek 13 kategoriye değerlendirerek, meme kanserinin önlenmesi, taranması, tedavisi ve gözetiminde tümör belirteçlerinin kullanımına ilişkin önerilerini güncellemiştir. Klinik fayda kanıtı gösteren ve pratikte kullanılması önerilen tümör belirteçleri arasında CA 15-3, CA 27.29, Karsinoembriyonik antijen (CEA), Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR), İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), Ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA), Plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1) ve gen ifadesi için çok parametrelili analizler yer almaktadır. Bununla birlikte, meme kanserinin taranmasında p53, katepsin D, siklin E ve nestin de dahil olmak üzere başka kategoriler de kullanılmaktadır ancak bunlar klinik pratikte rutin kullanımını destekleyen yeterli kanıt göstermemiştir (Kabel, 2017).

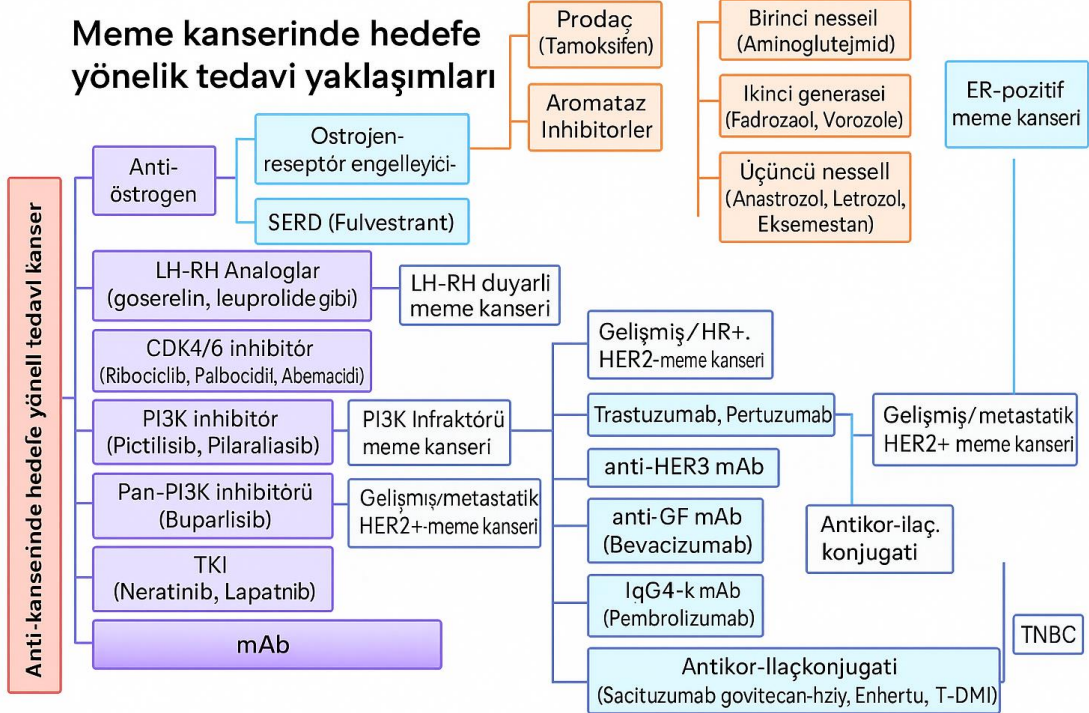
2.1.4.8. MikroRNA'lar

(miRNA'lar), gen ifadesini düzenleyen ve çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynayan küçük kodlama yapmayan RNA'lardır. miRNA'ların düzensizliği, tümör agresifliğini, tedavi yanıtını ve hasta sonuçlarını etkileyerek meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynar. Farklı meme kanseri alt tipleri, onları potansiyel tanı ve izleme araçları haline getiren belirgin miRNA ifade profilleri sergiler. Çalışmalar, miR-1280, miR-1260 ve miR-720 gibi dolaşımdaki miRNA seviyelerinin meme kanseri hastalarında değiştirilebileceğini ve tedavi yanıtıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir. miR-200 ailesindekiler gibi belirli miRNA'lar, kök hücre düzenlemesi ve metastaz gibi süreçlerde yer alır. Hücrelerel sinyalleri taşıyan nano-veziküller olan ekzosomlar da miRNA'ları taşır ve miR-21 ve miR-1246 gibi bu ekzosomal miRNA'lar, tanı belirteçleri olarak umut vadetmektedir. Ekzosomal miR-10b'nin metastazla bağlantısı olduğu belirtilirken, ekzosomal Del-1'in erken evre meme kanseri için potansiyel bir tanı biyobelirteci olduğu gösterilmiştir (Jafari vd., 2018).

2.1.5. Meme Kanserinin Tedavisinde Yöntemler

Son yıllarda, meme kanseriyle ilgili araştırmalar, hastalığın anlaşılmasında olağanüstü ilerlemelere yol açmış ve daha etkili ve daha az toksik tedavilerin geliştirilmesini

sağlamıştır. Tedavideki en büyük zorluklardan biri, terapötik seçenekleri belirleyen heterojen yapısıdır. Meme kanseri için kemoterapideki ilerlemelerle birlikte, son on yılda meme kanserine bağlı ölüm oranı azalmaktadır. Östrojen reseptörünü (ER) hedef almak, hormon reseptörü pozitif (HR⁺) meme kanserine karşı en güçlü tedavi yöntemlerinden biri olarak kanıtlanmıştır. Ayrıca, anti-HER2 monoklonal antikor gibi biyolojik ilaçların başarısı, meme kanseri tedavisinde moleküler hedefleme yaklaşımının uygulanabilirliğini ve önemini vurgulamıştır. Bu durum, PARP, CDK4/6, PI3K/AKT/mTOR, çoklu kinazlar veya immün kontrol noktası inhibitörleri gibi yeni hedefe yönelik ajanların geliştirilmesini teşvik etmiş ve meme kanserinin belirli moleküler alt tiplerinin tedavisi için önemli bir adım olmuştur (Tablo 2-2) (Tong vd., 2018).



Şekil 2.4 Meme kanserinde hedefe yönelik tedavi yaklaşımları.

Anti-östrojen tedaviler (SERD, aromataz inhibitörleri, LH-RH analogları) ve tirozin kinaz inhibitörleri, hormon reseptör pozitif (HR⁺) ve HER2⁺ alt tiplerde kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar (mAb) ve antikor-ilaç konjugatları (ADC'ler), özellikle ileri evre ve metastatik HER2⁺ veya üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olgularında etkinlik göstermektedir (Bhushan et al., 2021).

2.1.5.1. Anti-Östrojen

Endokrin tedavi (ET), östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanseri için köklü bir tedavi yöntemidir. Bu tümörler östrojen reseptörü alfa (ER α) ekspresyonu gösterir ve büyüme için östrojen kaynaklı sinyal yollarına ihtiyaç duyar. ET, dolaşımdaki östrojen seviyelerini düşürerek, östrojen reseptörünü (ER) doğrudan bloke ederek veya bozarak ya da bu mekanizmaların bir kombinasyonunu kullanarak etkisini gösterir (Lloyd vd., 2022). Şu anda meme kanserinin tedavisinde kullanılan birkaç FDA onaylı ilaç bulunmaktadır.

Prodrug tamoksifen (ticari adı: Nolvadex), östrojen reseptörüne (ER) bağlanarak östrojenin reseptör aracılı alımını kısmen engelleyen bir agonisttir (Meiser vd., 2017). Tamoksifen yüksek riskli kadınlarda meme kanserini etkili bir şekilde önlerken, kullanımı önemli yan etkiler nedeniyle sınırlıdır. Bunlar arasında, NSABP P-1 denemesinde gösterildiği gibi, özellikle 50 yaş üstü kadınlarda endometriyal kanser riskinin artması yer alır. Tamoksifen ayrıca derin ven trombozu ve yaşlı kadınlarda daha yaygın olan pulmoner emboli riskini de artırır. Potansiyel kalp krizi, felç ve kan pıhtılarından ölüm gibi bu riskler, bazı kadınların tamoksifen almaktan çekinmesine neden olur (Nazarali & Narod, 2014).

Aromataz inhibitörlerinin (AI) meme kanserinin önlenmesi ve tedavisi için kullanımı işlevsel yumurtalıkları olmayan hastalarla sınırlıdır. Menopoz öncesi kadınlarda aromataz inhibisyonu östrojen üretimini yetersiz şekilde baskılar. Üç nesil AI geliştirilmiştir. Birinci nesil (örn. aminoglutetimid) ve ikinci nesil AI'ler (örn. fadrozol ve vorozol) aromataza ek olarak kortizol ve aldosteron üretiminin azalmasıyla daha az seçicidir. Ayrıca sınırlı klinik etkinlikle zayıf tolere edilirler. Öte yandan, üçüncü nesil AI'ler (örn. anastrozol (marka adı: Arimidex), letrozol (marka adı: Femara) ve eksemestan (marka adı: Aromasin)) aromataz enzimi için oldukça seçicidir ve oldukça iyi tolere edilirler. Sonuç olarak, HR⁺ metastatik meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlarda birinci basamak tedavi olarak tamoksifeni mükemmel yanıt oranları ve gecikmiş ilerleme ile geride bırakmışlardır. AI'lerin ayrıca hastalısız sağ kalımda kademeli iyileşme, daha düşük lokal ve metastatik tekrarlama oranları ve tamoksifen ile karşılaştırıldığında daha düşük kontralateral meme kanseri insidansı gösterdiği görülmüştür (Schneider vd., 2011).

Seçici bir östrojen reseptörü degradatörü (SERD) Fulvestrant, önceki hormonal tedaviye dirençli meme kanseri hastalarında kullanılır. ER α 'yı degradasyona uğratır, agonistik etkisi yoktur ve tamoksifen dirençli modellerde etkilidir. Fulvestrant, ER α ekspresyonunu azaltır ve ER'ye yanıt veren genleri inhibe eder, estradiolün G proteinine bağlı östrojen reseptörü 1 (GPER) üzerindeki genomik olmayan etkilerini engeller (tamoksifen direnciyle bağlantılıdır) ve tamoksifen dirençli hatlarda bile ER⁺ meme kanseri hücre çoğalmasını önler. Çalışmalar, fulvestrantın tamoksifen veya östrojen çekilmesinden daha etkili olduğunu göstermektedir. Kombinasyon endokrin tedavisi, endokrin tedavisine naif veya yüksek endokrin duyarlı tümörleri olan hastalara fayda sağlayabilir, ancak sonuçlar karışıktır (Rocca vd., 2018).

2.1.5.2. LH-RH Analogları

Luteinize edici hormon salgılatıcı hormon (LH-RH) analogları, östrojen üretimini baskılayarak hormon duyarlı meme kanserlerinde tedavi amacıyla kullanılan ilaçlardır. Bu ajanlar, hipofiz bezindeki LH-RH reseptörlerini sürekli uyararak zamanla bu reseptörlerin duyarsızlaşmasına neden olur ve böylece yumurtalıklardan östrojen salınımını azaltır. Goserelin ve Leuprolide en yaygın kullanılan LH-RH analoglarıdır. Bu ilaçlar, özellikle premenopozal kadınlarda östrojen düzeylerinin düşürülmesiyle tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatır. Ayrıca bazı çalışmalarda, bu ajanların yalnızca hormonal etkiyle sınırlı kalmayıp doğrudan antikanser özellikler de gösterebildiği bildirilmiştir. LH-RH analogları genellikle adjuvan hormon tedavisi olarak anti-östrojen ilaçlarla (örneğin tamoksifen) birlikte veya tek başına kullanılabilir. Uygulama genellikle deri altı enjeksiyon şeklindedir ve tedavi süresi hastanın menopoz durumu ile tümörün hormon reseptör pozitifliğine bağlı olarak değişir. (Wolff vd., 2007).

2.1.5.3. mTOR/PI3K/AKT Yol İnhibitörleri

Meme kanserinde bulunan en yaygın genetik değişikliklerden biri, PI3K'nın p110a alt birimini kodlayan *PIK3CA* genindeki mutasyonlardır. İlerlemiş ER⁺ meme kanserlerinin yaklaşık %30-40'ında aktive edici bir *PIK3CA* mutasyonu bulunur. Uzun süreli östrojen yoksunluğundan sonra insan meme kanseri hücre hatları, mTOR substratlarının yanı sıra PI3K substratı AKT'nin fosforilasyonunda artış gösterdi. mTOR ve PI3K'nin inhibisyonu bu hücrelerde apoptozu indükledi ve hormondan bağımsız hücrelerin ortaya çıkmasını

engelledi. Hem ER hem de PI3K'nin inhibisyonunun, ER⁺/PIK3CA mutant ksenograflara karşı sinerjistik etkileri vardı (Nunnery vd., 2020).

2.1.5.4. CDK4/6 İnhibitörleri

Palbosiklib, Ribosiklib ve Abemaciclib, HR⁺/HER2⁻ metastatik meme kanseri için onaylanmıştır. Birinci basamak tedavi, aromataz inhibitörleri (AI'ler) ile birlikte kullanıldığında ilerlemesiz sağkalımı önemli ölçüde iyileştirir. İkinci basamak tedavi, Fulvestrant ile birlikte kullanıldığında, endokrin tedaviden sonra hastalık ilerlemesi olan hastalarda ilerlemesiz hayatta kalımı iyileştirir.(Burguin vd., 2021).

2.1.5.5. HER2 Pozitif Meme Kanseri İçin Yeni Stratejik Tedaviler:

HER2 pozitif meme kanserinde klasik hedefe yönelik tedaviler (Trastuzumab ve Pertuzumab gibi monoklonal antikorlar) birçok hastada etkinlik gösterse de tedaviye direnç gelişmesi ve metastatik olgularda sınırlı yanıt oranları yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Son yıllarda bu alanda çeşitli yenilikçi yaklaşımlar öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri antikor-ilaç konjugatlarıdır (ADC'ler). Trastuzumab-derukstekan ve Trastuzumab-duokarmsin gibi antikor-ilaç konjugatları, hem HER2'yi yüksek düzeyde eksprese eden hem de düşük düzeyde ifade eden tümörlerde belirgin antitümör etkinlik göstermektedir. Özellikle T-DM1 tedavisine dirençli olgularda dahi umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Bir başka yaklaşım, kimerik antikorlardır. Margetuximab gibi yeni nesil kimerik antikorlar, bağışıklık sisteminin antitümör yanıtını güçlendirerek antikor aracılı hücrel sitotoksiteyi (ADCC) artırır. Klinik çalışmalarda, bu ajanların progresyonsuz sağkalımı anlamlı düzeyde iyileştirdiği bildirilmiştir. Çift Spesifik Antikorlar (Bispesifik Antikorlar, BsAb'ler) birden fazla reseptör veya epitopu aynı anda hedefleyerek tümör hücrelerinde daha etkili inhibisyon sağlar. MCLA-128, ZW25 ve TCB gibi bu moleküller erken faz klinik çalışmalarda cesaret verici sonuçlar ortaya koymuştur. E75, GP2 ve AE37 gibi HER2 türevli peptit aşılı, HER2'ye karşı özgül bağışıklık yanıtını uyararak tümör hücrelerinin tanınmasını ve ortadan kaldırılmasını amaçlamaktadır. Klinik çalışmalarda değişken düzeylerde etkinlik bildirilmiş olsa da, bu yaklaşımlar immünoterapinin gelecekteki potansiyelini göstermektedir (Burguin vd., 2021). Tukatinib ve Poziotinib gibi yeni nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler), HER2'ye karşı daha seçici etki gösterir ve özellikle beyin metastazı

bulunan hastalarda daha iyi klinik sonuçlar ve daha yüksek tedaviye tolerans sağlamaktadır. Bu yenilikçi tedavi stratejileri, HER2 pozitif meme kanserinde tedaviye direnç sorununu azaltmayı, yaşam süresini uzatmayı ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının etkinliğini artırmayı hedeflemektedir.

Tablo 2-2 Meme kanserinin farklı tiplerinin tedavisinde kullanılan tedavi edici ilaçların listesi ve durumları (Bhushan vd., 2021c)

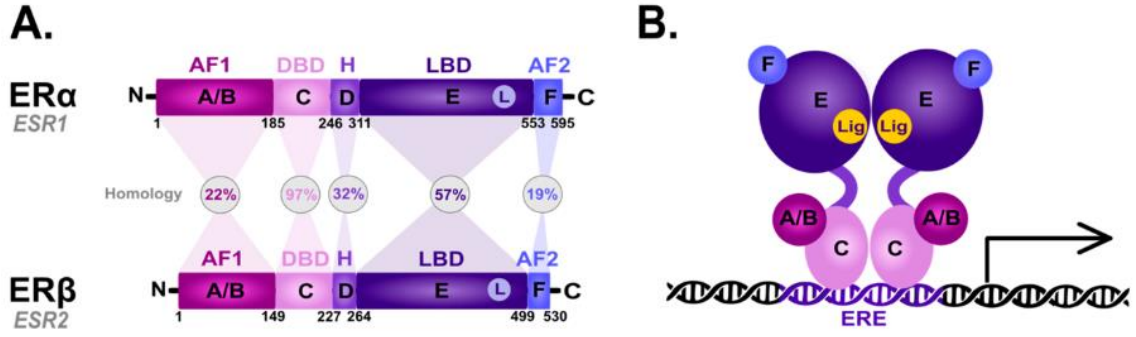
| İlaç (Ticari Adı) | Etki Mekanizması / Sınıf | Tedavi Edilen Meme Kanseri Alt Türü |
|---|--------------------------------|---|
| Tamoxifen (Nolvadex) | Anti-östrojen | ER pozitif meme kanseri |
| Aminoglutethimide, Fadrozole ve Vorozole | Birinci ve ikinci nesil AI'ler | ER pozitif meme kanseri |
| Anastrozole (Arimidex) | Üçüncü nesil AI'ler | ER pozitif meme kanseri |
| Letrozole (Femara) | | |
| Exemestane (Aromasin) | | |
| Goserelin ve Leuprolide | - | LH-RH duyarlı meme kanseri |
| Fulvestrant | SERD Degrader | Meme kanseri |
| Ribociclib (LEE011) | CDK4/6 inhibitörü | Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2-negatif ileri veya metastatik meme kanseri |
| Palbociclib (PD0332991) | | |
| Abemaciclib (LY2835219) | | |
| Buparlisib | pan-PI3Ki | (HER2)-negatif, PIK3CA-mutasyon, ileri veya metastatik meme kanseri |
| Pictilisib | PI3K inhibitörü | HR+/HER- ileri meme kanseri |
| Pilaralisib (XL147) | | |
| Voxtalısib | | |
| Trastuzumab (Herceptin) | mAb | HER2-overekspresye meme kanseri |
| Pertuzumab | | |
| Neratinib | TKI | İleri veya metastatik HER2+ meme kanseri |
| Patritumab | anti-HER3 mAb | HER2+ ileri meme kanseri |
| Bevacizumab | anti-GF mAb | Germline mutasyonları/HER2 negatif meme kanseri olan TNBC hastaları |
| Sacituzumab govitecan-hziy | Antikor-ilaç konjugatı | Nükseden veya dirençli metastatik TNBC |
| T-DM1 (Kadcyla) | Antikor-ilaç konjugatı | HER-2 metastatik reçeteli adjuvan tedavi, hasta trastuzumab (Herceptin) ve bir taksan ile neoadjuvan tedavi almışsa |
| Enhertu | Antibody–drug conjugate | HER-2 metastazı tekrar ortaya çıkmış ve cerrahi olarak çıkarılamıyor |
| Pembrolizumab (Keytruda) | IgG4-κ mAb | metastatik TNBC veya tekrar ortaya çıkan ve cerrahi olarak çıkarılamayan TNBC |
| Atezolizumab ve nab-paclitaxel | mAb | PD-L1+ TNBC |

2.2. Östrojen Reseptörü

Östrojenler (C_{18} steroidler), erkeklik hormonu öncülleri olan androjenlerin (C_{19} steroidler) demetilasyonu ile oluşur. Aromataz, androjenin östrojene aromatazasyonundan sorumludur. Meme kanseri, polikistik over sendromu (PCOS), endometriozis, osteoporoz, yumurtalık kanseri, mide kanseri, hipofiz kanseri, Alzheimer hastalığı, şizofreni, erkek hipogonadizmi gibi östrojen bozulmasının neden olduğu rahatsızlıkların çoğu ve transseksüel sorunlar da aromataz bozukluklarıyla bağlantılıdır (Blakemore & Naftolin, 2016). Östrojen (17 beta-östradiol), bir tür transkripsiyon faktörü olan nükleer hormon reseptör proteinine bağlanarak çeşitli işlevlerini yerine getirir (Lee vd., 2012).

Nükleer reseptör (NR) süper ailesi, yapısal olarak korunmuş fonksiyonel domainleri paylaşan çeşitli ligand-bağımlı transkripsiyon faktörlerinden oluşur. Bu reseptörler, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alan transkripsiyonel düzenleyiciler olarak işlev görür. Her bir nükleer reseptör, genellikle iki ana yapısal bölge içerir: DNA bağlanma domaini (DBD) – iki çinko parmağından oluşur ve NR ailesi üyeleri arasında yüksek düzeyde korunmuştur. Ligand bağlanma domaini (LBD) – reseptörün C-terminalinde yer alır ve ligand tanıma ile aktivasyonun temelini oluşturur. LBD, aynı zamanda aktivasyon fonksiyonu bölgeleri (Activation Function, AF) olarak adlandırılan iki alt bölge içerir: AF-1 ve AF-2. AF-1, reseptörün N-terminal kısmında yer alır ve ligandan bağımsız transkripsiyonel aktiviteyi düzenler. AF-2 ise C-terminalde, LBD'nin 12. heliksinde lokalizedir ve ligand-bağımlı transkripsiyonel aktivitenin kontrolünden sorumludur.

Östrojen reseptörleri (ER'ler), bu domainler aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenler (Şekil 2.5). Östrojenik ligandlar, AF-1 ve AF-2 bölgelerinin etkileşimini değiştirerek ER-aracılı transkripsiyonun aktivasyonunu veya baskılanmasını sağlar (P. Huang vd., 2010) (Arao & Korach, 2021). Östrojen reseptörleri (ER), hücrelerin nükleusunda, sitoplazmasında ve mitokondrisinde bulunur ve transkriptlerin alternatif splicinginin bir sonucu olarak çeşitli tiplerde olabilirler. İki baskın tip, birden fazla izoformda ortaya çıkan alfa ve beta'dır. İlk olarak alfa tipi ER ($ER\alpha$), ardından oldukça yeni bir beta tipi ER ($ER\beta$) keşfedilmiştir (Patel vd., 2018).

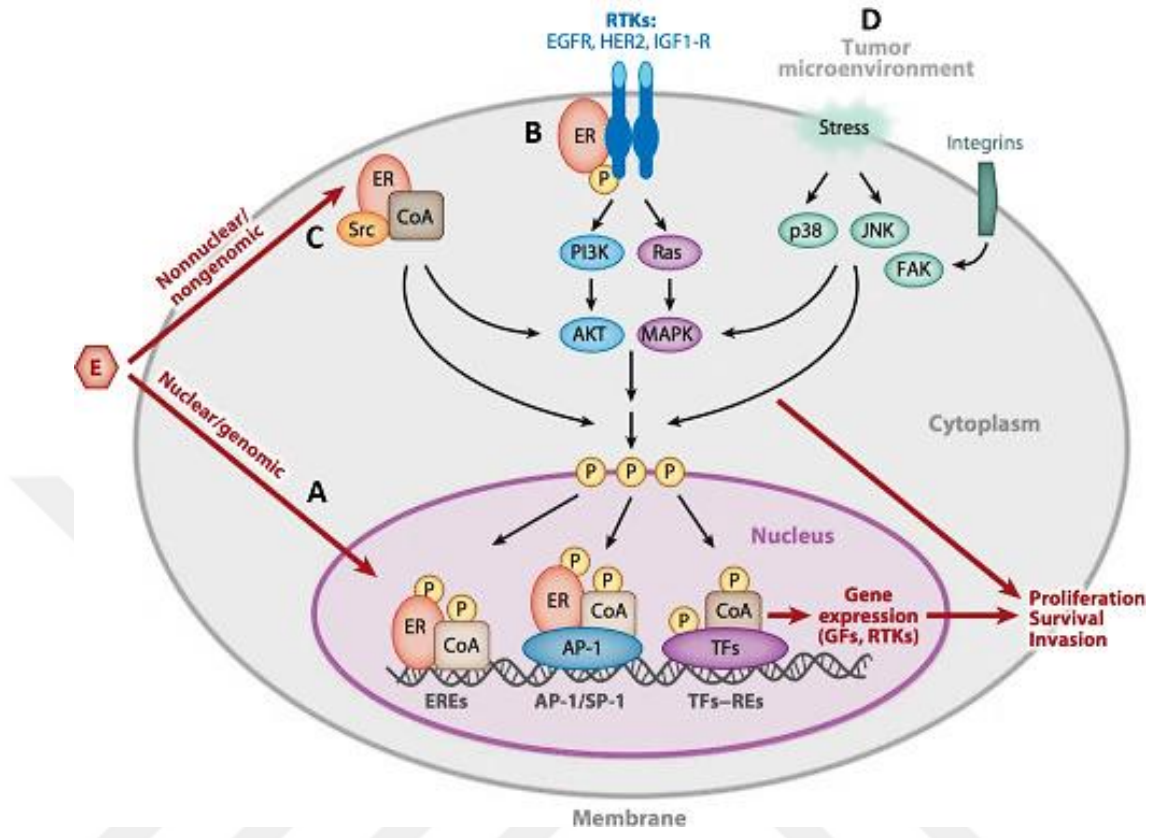


Şekil 2.5 Östrojen reseptörünün (ER) yapısal ve işlevsel bölgeleri

- (A) ER α ve ER β izoformlarının domain topolojilerinin karşılaştırılması: AF-1 (Activation Function-1), DBD (DNA-Binding Domain), H (Hinge), LBD (Ligand-Binding Domain) ve AF-2 (Activation Function-2). (B) Ligand bağlanması sonrası ER dimerinin östrojen cevap elementlerine (ERE) bağlanarak gen transkripsiyonunu başlatması (Miziak vd., 2023a)

2.2.1. Meme Kanserinde Östrojen Sinyali

ER'ler östrojenler tarafından aktive edilir ve özellikle meme kanseri gibi çeşitli kanserlerin gelişiminde önemli roller oynar (Şekil 2.6) (Yue vd., 2010). Östrojenin üreme, beyin gelişimi ve cinsel steroid hormonların ek koruyucu etkileri gibi normal biyolojik rolleri olsa da uzun süreli maruz kalma, yüksek hormon seviyeleriyle birleştiğinde, ağırlıklı olarak metabolizma ve hücre döngüsü düzenlemesinde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu yapısal olarak aktive ederek MK riskini artırır. ER aracılı gen düzenleme mekanizmaları iyi tanımlanmıştır. ER'ler, transkripsiyonel reseptör ailesine ait olan ve yüzlerce hedef genin transkripsiyonel başlatılmasını kolaylaştırmak için spesifik bir DNA konsensus dizisini tanıyan ve ona bağlanan iki izoform (ER α ve ER β) olarak mevcuttur (Hervouet vd., 2013). *ESR1* geni, hücre büyümesi ve bölünmesi de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik sürecin temel düzenleyicisi olan östrojen reseptörü alfa (ER α) kodlar. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda *ESR1* mutasyonlarının meme kanseri gelişiminin erken evrelerinde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, kanser hastalığı ilerledikçe tümör hücrelerinde görülme sıklığı da giderek artmaktadır. ER, ER eksprese eden meme kanserinin gelişiminde, ilerlemesinde ve invazyonunda önemli bir rol oynar. ER-pozitif tümörler diğer MK tiplerine göre daha olumlu prognoza sahiptir ve genellikle hormonal tedaviye yanıt verir (Miziak vd., 2023b).



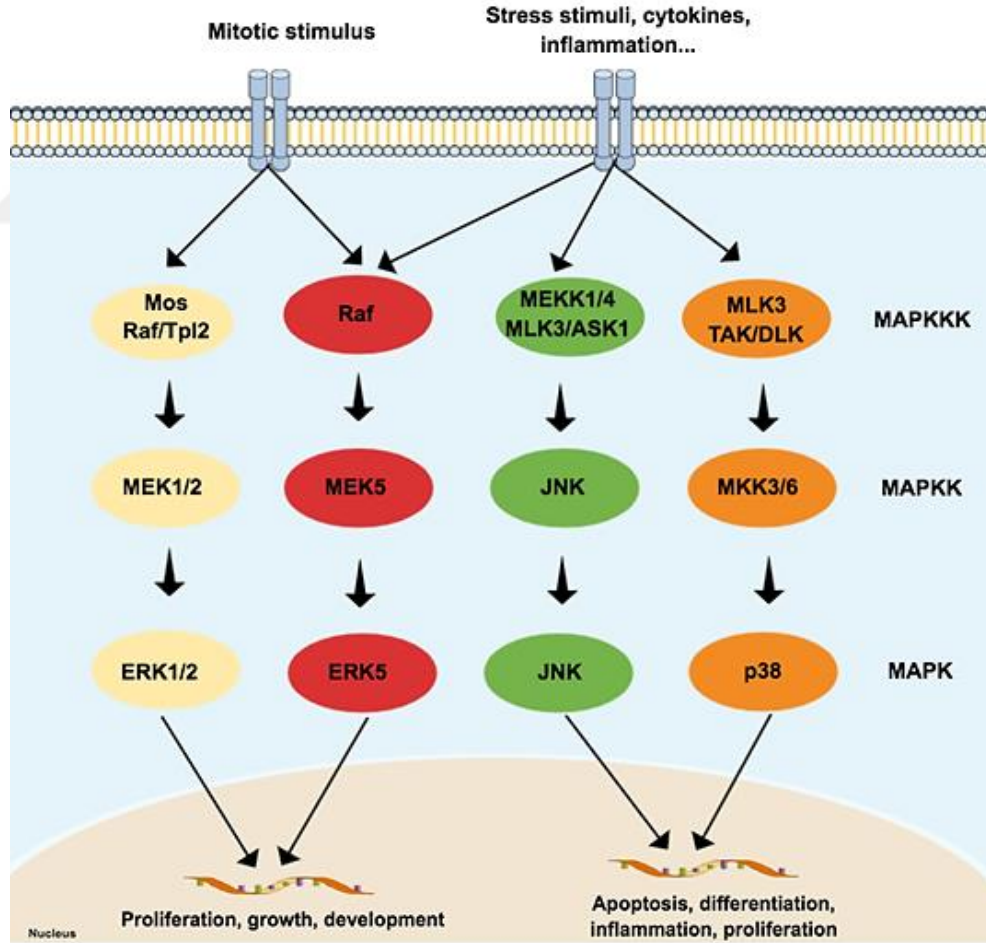
Şekil 2.6 Meme kanserinde östrojen reseptörlerinin etki mekanizmaları

Östrojen reseptörleri (ER), hem genomik (A) hem de genomik olmayan (C) yollarla hücresel yanıtları düzenler. Genomik yol, nükleusta östrojen reseptörünün ko-aktivator (CoA) proteinleriyle birlikte östrojen cevap elementlerine (ERE) bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlemesiyle gerçekleşir. Genomik olmayan yol ise, hücre zarında yer alan ER ve reseptör tirozin kinazların (RTK: EGFR, HER2, IGF1-R) etkileşimiyle PI3K/AKT ve MAPK kaskadlarını aktive eder; bu da hücre proliferasyonu, sağkalımı ve invazyonunu artırır (Radhi, 2016a)

Onkogen aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı gen susturulmasına yol açan genetik mutasyonların neden olduğu gen ekspresyonundaki değişiklikler, meme kanserin etiolojisinde araştırılmış ve yakın zamanda yapılan bir meta-analizde meme kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Son yirmi yılda, genetik bozukluklar dışındaki hastalıklarda gen ekspresyonunun epigenetik kontrolü fikri ortaya çıkmıştır. Bu durum, tümör oluşumunun başlatılması ve ilerlemesinde rol oynayan genlerin anormal biçimde aktive olması veya baskılanmasının ortadan kalkması ile ilişkilidir. Genetik ve epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak, hücre proliferasyonu ve/veya hücre ölümünün kontrolünde görev alan genlerde aşırı ekspresyon (overekspresyon) ya da susturulma (inaktivasyon) meydana gelebilir (Hervouet vd., 2013).

2.2.1.1. MAPK Sinyal Yolu

MAPK'lar (Mitogen-aktive protein kinazlar), hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, anjiyogenez ve tümör metastazı gibi biyolojik süreçlerde merkezi role sahip serin-treonin protein kinazlarıdır (Pearson vd., 2001). Ökaryotik hücrelerde ERK, JNK/stresle aktive olan protein kinaz, p38 MAPK ve ERK5 olmak üzere dört ana MAPK kaskadı tanımlanmıştır. Literatürde, JNK ve p38 MAPK yollarının hücrelerin strese ve apoptoza yanıt mekanizmalarıyla ilişkili olduğu, ERK/MAPK yolunun ise özellikle hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde belirleyici olduğu ve hücrel sinyal ağında merkezi bir konuma sahip olduğu bildirilmektedir (Plotnikov vd., 2011) (Y. Guo et al., 2020).



Şekil 2.7 Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunun şematik gösterimi. ERK1/2 mitotik uyarılarla proliferasyonu düzenlerken, JNK ve p38 stres yanıtı ve apoptozda, ERK5 ise hem proliferasyon hem de hücre sağkalımında rol oynar.(Rehfeldt vd., 2020)

Bu dört alt aile, ökaryotik organizmalarda yüksek oranda korunan klasik üç basamaklı sinyal yoluna uyar. Bu sistemde, MAP3K çeşitli uyarıları algılar ve sinyali downstreamde yer alan MAPK kinazına (MAP2K) aktarır; MAP2K ise MAPK'ı fosforile ederek aktive eder (E. K. Kim & Choi, 2015). Tüm ökaryotik hücreler, gen ekspresyonunu, mitozu, metabolizmayı, hareketliliği, hayatta kalmayı, apoptozu ve farklılaşmayı birlikte düzenleyen birden fazla MAPK yoluna sahiptir. Memelilerde, 14 MAPK proteini tanımlanmış olup yedi gruba ayrılmıştır (Cargnello & Roux, 2011a).

MAP kinazlar geleneksel olarak konvansiyonel ve atipik tiplere ayrılır ve öncelikle fosforilasyon gereksinimleri ve MAP kinaz kinazlarını (MAPKK'ler) içeren aktivasyon mekanizmalarıyla ayırt edilir. Prolin yönlendirmeli bir serin/treonin kinazı olan Nemo benzeri kinaz (NLK), atipik MAP kinaz kategorisine girer ve aktivitesi fosforilasyon yoluyla kontrol edilir (Coulombe & Meloche, 2007).

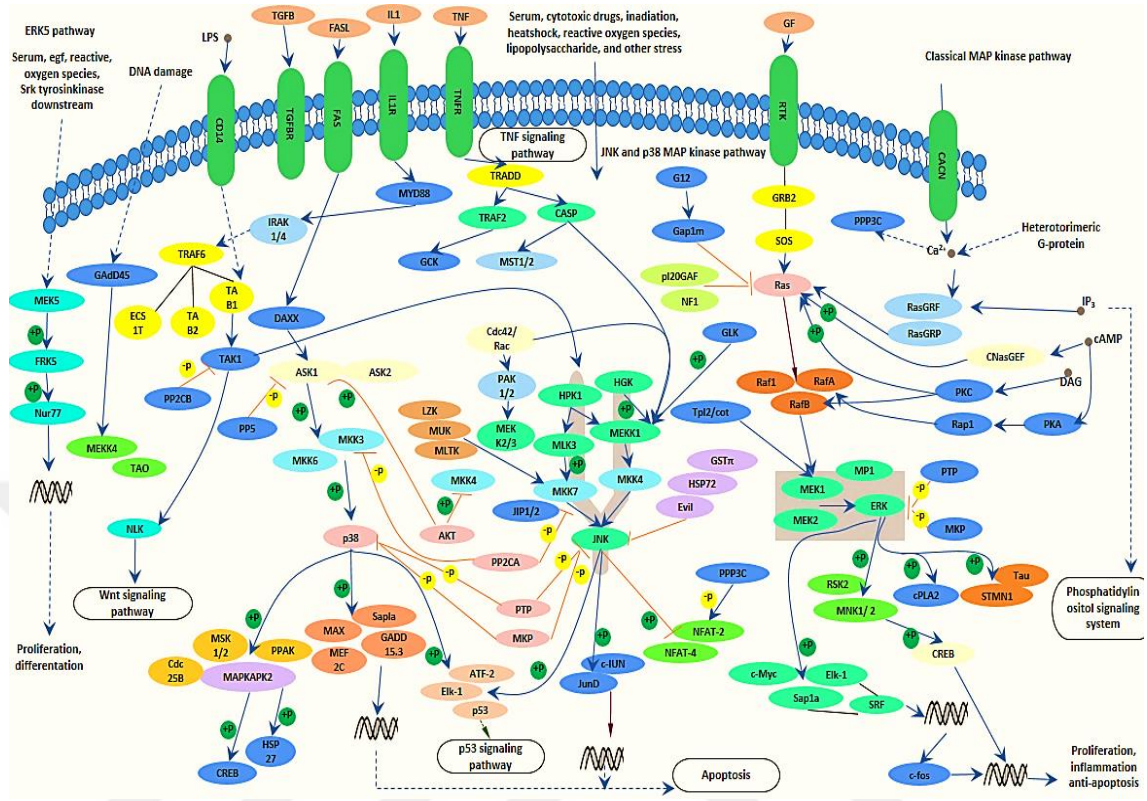


Şekil 2.8 Konvansiyonel ve atipik MAPK'lar arasındaki yapısal farklılıklar (Cargnello & Roux, 2011b).

Konvansiyonel ve atipik MAPK'lar, farklı uzunluklardaki N- ve C-terminal bölgeleri arasında konumlanmış bir Ser/Thr kinaz domaininden oluşan bir çekirdek yapıyı paylaşır. Bazı MAPK'lar ayrıca bir transaktivasyon domaini (TAD), bir nükleer lokalizasyon dizisi (NLS), C34 bölgesi (ERK3/4'te korunmuştur) ve bir Ala/His/Glu-zengin (AHQR) domaini gibi ek domainlere de sahiptir. Her MAPK için downstream MAPK ile aktive edilen protein kinazlar (MAPKAPK'lar) Şekil 2.8'de açık gri ile gösterilmiştir. p38'in γ ve δ izoformlarının etrafındaki parantezler, MAPKAPK aktivasyonunu teşvik etmedeki rollerinin gösterilmediğini belirtir (Cargnello & Roux, 2011b).

MAPK yolunun aktivasyonu, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) gibi büyüme faktörlerinin hücre yüzeyindeki reseptörlere, özellikle EGFR gibi tirozin kinaz reseptörlerine (RTK'ler) bağlanmasıyla başlar. Bu etkileşim, RTK'nin dimerizasyonunu ve trans-fosforilasyonunu tetikler. Büyüme faktörlerinin bağlanması, SHC (SH2 içeren protein), GRB2 (büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2) ve GAB (GRB2 ile ilişkili bağlanma proteini) gibi adaptör proteinleri içeren reseptör komplekslerinin oluşumuna ve aktivasyonuna yol açar. Bu proteinler arasında, SH2 domainine sahip olanlar belirli fosfotirozin rezidülerine yönlendirilir. Bu proteinlerden biri olan GRB2, RAS aktivatörü SOS'a sürekli olarak bağlıdır. Adaptör proteinler, RTK tarafından fosforile edilmiş hücre içi bölgelerle etkileşime girerek guanin nükleotid değişim faktörlerinin (GEF'ler) hücre membranına alınmasını kolaylaştırır ve böylece RAS-GTP seviyelerini artırır. RAS-GTP doğrudan RAF'a bağlanarak onu sitoplazmadan hücre membranına taşır ve RAF'ın aktif bir kinaz haline gelmesini sağlar. Aktivasyonun ardından RAF, MEK ve ERK gibi alt hedeflerini aktive eden bir fosforilasyon zinciri başlatarak kanonik MAPK yolunun aktivasyonunu sağlar (F. Liu vd., 2018) (Bahar vd., 2023).

MAPK sinyal iletim kaskadı, insan kanser hücrelerinin hayatta kalması, yayılması ve ilaç direnci için hayati önem taşır. MAPK/ERK yolu, metabolik stres ve DNA hasarı gibi içsel faktörlerden, büyüme faktörleri ve hücre-matris etkileşimleri gibi dışsal uyarılara kadar birçok sinyalin entegre olduğu merkezi bir sinyal iletim noktası olarak işlev görür. MAPK kaskadının temel bir bileşeni olan hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolu sıklıkla aşırı aktive olur ve kontrolsüz hücre büyümesine ve metastaza katkıda bulunur (Atanaskova vd., 2002a) (Hong vd., 2018).



Şekil 2.9 MAPK sinyal yolu (MAPK signaling pathway - Cusabio, t.y.)

Hücre kaderi, genom bütünlüğü ve hayatta kalmayı düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, protein amplifikasyonuna yol açabilir ve tümör mikroçevresini değiştirerek yolun aşırı aktivasyonuna neden olabilir. Bu mutasyonlar, amiloid reseptör genlerinde (örneğin, EGFR), sinyal taşıyıcılarında (örneğin, RAS), düzenleyici partnerlerde (örneğin, Sprouty) ve MAPK/ERK yolunun alt kinazlarında (örneğin, BRAF) meydana gelebilir. MAPK/ERK yolunda birçok insan kanserinde tanımlanmış mutasyonlar, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli terapötik odak noktaları haline gelmiştir (Burotto vd., 2014).

2.2.1.2. ER α ve MAPK Arasındaki Cross-Talk

ER α ve ERK2 arasındaki cross-talk, östrojen sinyalinin güçlendirilerek gen ekspresyonunun artmasına ve meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun hızlanmasına katkıda bulunan bir mekanizmayı vurgulamaktadır (S. Kato, 2001) (Radhi, 2016). Özellikle, MAPK kaskadının temel bir bileşeni olan hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz

(ERK) yolu sıklıkla aşırı aktive olur ve kontrolsüz hücre büyümesine ve metastaza katkıda bulunur. Dahası, meme kanseri ilerlemesinin merkezi bir itici gücü olan östrojen reseptörü (ER), MAPK yoluyla etkileşime girerek tümör büyümesini destekleyen karmaşık bir sinyal ağı oluşturur. Veriler, MAPK/ER cross-talk'unun ER α aracılı sinyalizasyonu artırdığını ve anti-östrojenlerin inhibitör etkilerine olan duyarlılığı azaltmadan estradiol (E2) bağımlı tümör büyümesini hızlandırdığını göstermektedir. Bu etkileşimin anlaşılması, hormon bağımlı meme kanseri progresyonunun moleküler temellerine dair önemli bilgiler sağlayarak, bu sinyal iletim eksenini hedef alarak bozmayı amaçlayan tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir (Atanaskova et al., 2002)(Ahmad vd., 2016).

2.2.1.3. Nemo-Like Kinase (NLK)

1994 yılında, *Drosophila*'da bulunan *nemo* geninin, sinek gözünde ommatidia morfogenezinin gelişim süreci sırasında fotoreseptör hücrelerinin doğru dönme yönelimi için gerekli olduğu tanımlandı (Choi & Benzer, 1994) .*Nemo* geni, MAP kinazlarla benzerlikler paylaşan bir serin/treonin kinazı kodlayan gen olarak tanımlandı. Dört yıl sonra, Nemo'nun fare homologu, MAP kinaz ailesindeki korunan dizilerden tasarlanan genel primerleri kullanarak izole edildi (Brott vd., 1998).

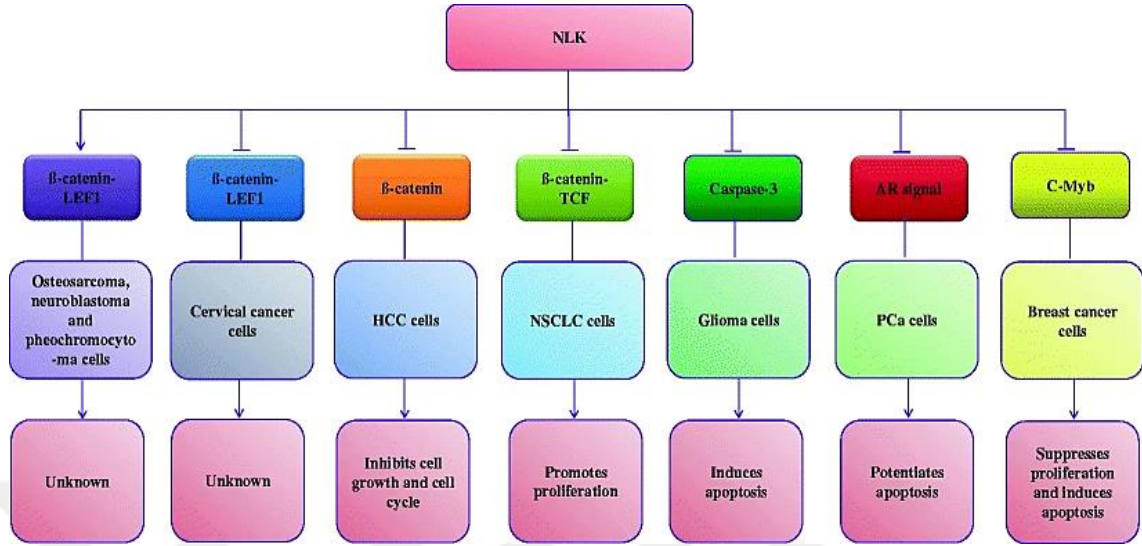
Filogenetik analizlere göre omurgalılarda bulunan nemo-benzeri kinazlar (NLK) tip-I ve tip-II olmak üzere iki gruba ayrılır. Amfibiler ve balıklar her iki izoforma da sahipken, memeliler ve tavuklar yalnızca tip-II NLK eksprese eder. Farelerde, tip-II NLK'nin amino asit dizisi fare MAPK1/ERK2'ye %54,5 benzerlik ve %41,7 özdeşlik gösterir (Ota et al., 2012). Nemo benzeri kinaz beyinde yüksek ekspresyon seviyeleri gösterirken, kalp, böbrekler, karaciğer ve akciğerlerde minimal ekspresyon gözlenir (Brott et al., 1998). Yapılan çalışmalar, NLK'nin yalnızca çeşitli sinyal yollarının modülasyonu yoluyla sinir sisteminin gelişimi ve patolojisinde değil, aynı zamanda çeşitli insan kanserlerinin ilerlemesinde de önemli bir düzenleyici olarak önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır (Ishitani & Ishitani, 2013). Kanıtlar, NLK'nin spesifik organ veya hücre tipine bağlı olarak bir onkogen veya bir tümör baskılayıcı olarak etki edebileceğini göstermektedir (Y. Huang vd., 2015b).

Jung ve diğeri, Nemo benzeri kinazın insan hepatosellüler karsinomunda (HCC) rolünü araştırmış ve HCC dokularında normal karaciğer dokularına kıyasla NLK ekspresyonunun upregüle olduğunu göstermiştir. Dahası, NLK ekspresyonunun bozulması, hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynayan temel proteinler olan siklin D1 ve CDK2'nin inhibisyonu yoluyla HCC hücrelerinin büyümesini baskılamıştır. Bu bulgular, NLK'nın HCC hücre büyümesinde önemli bir rol oynadığını ve potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir (Jung et al., 2010).

Araştırmacılar nükleusta NLK proteininin overekspresyonunun safra kesesi kanseri (GBC) dokularında sıklıkla gözlemlendiği ve NLK'nın bu overekspresyonunun histolojik derece, TNM evresi ve perinöral invazyonla önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir. Yüksek NLK ekspresyonu GBC hastalarının daha kötü prognozuyla ilişkilendirilmiş ve bağımsız bir prognostik faktör olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar, NLK overekspresyonunun GBC ilerlemesiyle ilişkili olduğunu ve GBC hastaları için potansiyel bir prognostik belirteç olarak hizmet edebileceğini önermektedir (Tan vd., 2012), (M. Li vd., 2013).

Prostat kanseri hastalarıyla yapılan bir çalışmada, NLK ekspresyonunun prostat kanseri (PCa) metastazlarında normal prostat dokusu ve primer PCa'ya göre azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, PCa hücrelerinde NLK'nın overekspresyonu artan apoptoza ve androjen reseptörü (AR) sinyalizasyonunda azalmaya yol açmıştır. Bu durum, NLK'nın AR sinyalizasyonunun düzenlenmesinde yer aldığını ve prostat kanserinin ilerlemesini etkileyebileceğini düşündürmektedir (Emami vd., 2009).

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kolorektal kanser (CRC) dokularında NLK ekspresyonunun kanserli olmayan dokulara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve artan NLK ekspresyonunun tümör invazyonu, lenf nodu metastazı ve düşük hasta sağkalımı dahil olmak üzere CRC'nin çeşitli klinikopatolojik özellikleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (J. Chen vd., 2015).



Şekil 2.10 NLK proteinin çeşitli kanser türlerindeki rolleri

NLK, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde hücre büyümesini ve hücre döngüsünü inhibe eder, glioma ve meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükler (Y. Huang et al., 2015)

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun insan karsinogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. Bir serin/treonin kinazı olan NLK, β -katenin/T hücre faktörü TCF ve LEF1'i fosforile etmek üzere aktive edilmesi, Wnt sinyal yolunun baskılanmasına yardımcı olarak hücre çoğalmasını ve tümör büyümesini azaltacaktır ki bu da kanser tedavisi için faydalı bir sonuçtur (Ke vd., 2016).

Kolon kanseri hücreleriyle yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar, NLK'nin hücre büyümesi ve canlılığı üzerindeki etkisini analiz etmek için DLD-1 insan kolon kanseri hücrelerinde tetrasiklinle indüklenebilir NLK ve kinaz negatif mutant ifadesini kullanmışlardır. NLK'nin bu hücrelerde hücre büyümesini baskıladığını ve apoptozu indüklediğini, kinaz negatif mutantın ise bunu yapmadığını bulmuşlardır. Çalışma, NLK'nin insan kolon karsinomu hücrelerinde apoptozu indüklemek için TCF'den başka hedefleri olabileceğini öne sürmektedir (Yasuda vd., 2003).

Akciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, NLK'nin RNA interferansı ile baskılanması durumunda A549 hücrelerinde β -katenin/TCF'nin transkripsiyon aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Bu artış, NLK'nin Wnt sinyal yolunu düzenleyerek küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinin proliferasyonunu etkilediğini düşündürmektedir (Lv vd., 2014).

Yasuda ve arkadaşları, NLK'nin NF- κ B sinyalizasyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak rolünü vurgulamış, IKK β 'ye rekabetçi bir şekilde bağlanarak ve böylece TAK1 tarafından aktivasyonunu inhibe ederek hareket etliğini göstermiştir. Bu düzenleyici mekanizma, NLK'nın aşırı inflamasyon sinyalizasyonunu sınırlayarak homeostatik bir işlev görebileceğini ve hücre içi sinyal yollarının kontrolüne değerli bir katkı sağlayabileceğini ileri sürmektedir (Yasuda vd., 2004).

Nemo benzeri kinaz ayrıca Notch aktivitesini azaltmak için çalışır. Bunu, Notch'a bağlı gen aktivasyonu için gerekli olan üçlü bir protein kompleksinin düzgün oluşumuna müdahale ederek yapar (Ishitani vd., 2010).

2.2.1.4. Meme Kanserinde MAPK ve Nemo-Like Kinaz'ın Rollerini

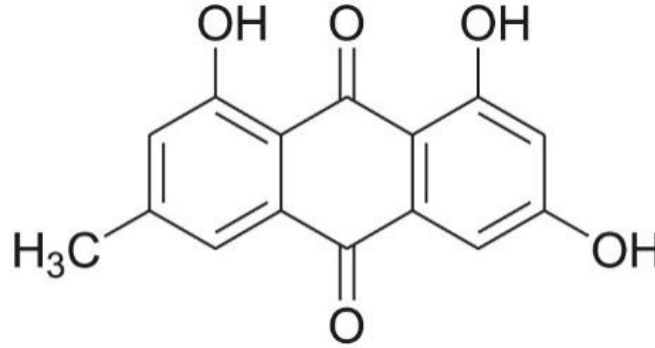
Meme kanseri hücrelerinde NLK'nın overekspresyonu hücre çoğalmasını baskıladı ve apoptozu indükledi, özellikle transkripsiyon faktörü c-Myb ile etkileşimine odaklandı. NLK, c-Myb'nin proteazom bağımlı bozunmasını teşvik etti, bu da c-myc ve bcl-2 dahil olmak üzere c-Myb hedef genlerini aşağı düzenledi. Wnt sinyalleşmesinde rol oynayan bir serin/treonin kinaz olan NLK'nın, bitişik normal dokulara kıyasla meme kanseri dokularında önemli ölçüde downregüle edildiği bulundu (Y. Huang vd., 2013a).

Wang ve diğerleri, Nemo benzeri kinazı endokrin dirençli östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanserinde yeni ve uygulanabilir bir hedef olarak tanımladılar. NLK aşırı ekspresyonu, özellikle daha yüksek nüks oranlarıyla bilinen lüминаl B alt tiplerinde, tamoksifen ile tedavi edilen hastalarda kötü prognozla ilişkilidir. NLK, ER α ve onun koaktivatörü SRC-3'ü fosforile ederek endokrin direncini artırır ve böylece tamoksifen tedavisi altında bile östrojen reseptörü sinyalleşmesini sürdürür. Önemlisi, NLK'nın susturulması hücre canlılığını azalttı ve hem birincil hem de edinilmiş endokrin dirençli meme kanseri hücre hatlarını tamoksifene karşı duyarlı hale getirerek onkojenik işlevini doğruladı. VX-702, hem p38 MAPK hem de NLK enzimlerini hedefleyen ikili bir küçük molekül inhibitördür. mTOR inhibitörleriyle birlikte kullanıldığında, hem hücre hattında hem de hasta-kaynaklı ksenograft modellerinde belirgin antitümör etkileri göstermiştir. NLK, endokrin direnci tedavisinde rol oynar ve meme kanserinde hormon tedavisine direncin üstesinden gelebilir (X. Wang vd., 2021a).

NLK, kanserli olmayan meme epitel hücrelerinde sitozolde lokalize olurken meme kanseri hücrelerinde baskın olarak nükleusta lokalize olduğu bulundu. NLK'nin bu nükleer birikimi, Heat shock protein 27 (HSP27) ile doğrudan etkileşim yoluyla aracılık edilir. Özellikle, çekirdekteki bu NLK-HSP27 kompleks oluşumu, meme kanseri hücrelerinde apoptoza karşı koruma sağlar. Bu nedenle, nükleer HSP27'nin NLK'ye bağlanması, meme kanserinde NLK kaynaklı programlanmış hücre ölümünü engellemek için yeni bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır (Shaw-Hallgren vd., 2014).

2.3. Emodin

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone) *Rheum palmatum* L. bitkisinin kökünde bulunan bir doğal bir antrakinon aglikon bileşiktir. Birçok Çin bitkisinin birincil aktif maddesidir (X. Dong vd., 2016). Emodin, birçok müshil antrakinon türevinin temelini oluşturur ve antik çağlardan beri popüler bir müshil olmuştur. Memelilerde, emodin glikozitleri emilmeden kalın bağırsağa gider. Orada, bağırsak bakterileri bunları aktif aglikonlara metabolize eder. Bu aktif form daha sonra epitel hücrelerine zarar vererek müshil etkisine neden olur ve bu da kalın bağırsağın atıkları emme, salgılama ve taşıma yeteneğini değiştirir (Izhaki, 2002).



Şekil 2.11 Emodinin kimyasal yapısı (X. Dong vd., 2016)

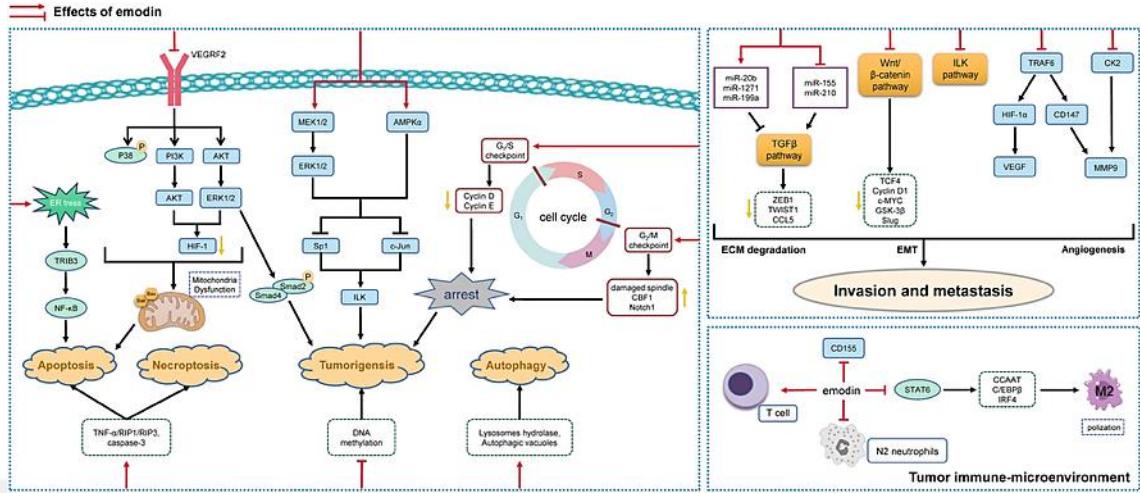
Son araştırmalar, emodin'in antioksidan, anti-inflamatuar, nöroprotektif ve antikanser gibi farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir (CUI vd., 2020) (Sharifi-Rad vd., 2022). Emodin, $O_2^{\bullet-}$ ve $\bullet NO$ radikallerini etkili bir şekilde temizleme yeteneğine sahip güçlü bir antioksidandır ve nöroprotektif ve anti-inflamatuar özelliklerine katkıda

bulunur. Son araştırmalar, antioksidan etkisinin π - π etkileşimleri ve serbest radikalleri n6tralize etme yeteneğini artıran elektron transfer s6reçleri tarafından y6nlendirildiğini vurgulamaktadır (Rossi vd., 2020). Emodin, NF- κ B ve MAPK gibi temel sinyal yollarını inhibe ederek 6nemli anti-inflamatuar etkiler g6sterir. Pro-inflamatuar sitokinleri (TNF- α , IL-6) baskılar, TLR aracılı sinyallemeyi (TLR4, TLR5) d6zenler ve NF- κ B p65'in n6kleer translokasyonunu azaltarak çeşitli inflamatuvar durumlara karşı korumaya katkıda bulunur (Zhu vd., 2016) (W. Zhang vd., 2017).

Bu terap6tik 6zellikler, emodinin kabızlık, astım, atopik dermatit, osteoartrit, diyabet ve komplikasyonları, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı (AD), karaciğer hastalığı ve pankreas, meme, hepatosel6ler ve akciğer karsinomu gibi çeşitli kanserler dahil olmak 6zere çeşitli durumların 6nlenmesi ve y6netilmesi için umut verici bir tedavi olabileceğini d6ř6nd6rmektedir (X. Dong vd., 2016).

2.3.1. Emodin'in Kanserlerdeki Rol6

alışmalar, Emodin'in çeşitli kanser h6crelerinde h6cre b6y6mesini engellediğini ve h6cre apoptozu, onkogenezi, h6cre çoğalması, kanser h6creyi invazyonu ve metastazının kontrol6yle ilgili genleri d6zenlediğini g6stermiştir. Bu yeni bulgular, hedefli kanser tedavisi ve Emodin'in gelecekteki klinik kullanımı için 6nemli çıkarımlara sahip olabilir (Fang vd., 2019a). Emodin, p38MAPK, AKT, ERK ve ILK gibi temel prosurvival sinyal yollarını baskılayarak antikanser etkilerini g6sterir ve h6cre d6ng6s6 durmasına ve apoptoza yol açar. Ayrıca, TGF- β , Wnt/ β -Katenin, ILK, VEGF ve MMP9 dahil olmak 6zere epitel-mezenkimal geçiş ve anjiyogenezi ile ilişkili yolları hedefleyerek kanser h6creyi istilasını ve metastazını engeller. Ek olarak, emodinin kanserle m6cadelede bağışıklık sistemini harekete geçirdiği g6sterilmiştir (Zheng vd., 2021a) .



Şekil 2.12 Emodinin antikanser aktivitesinde rol oynayan moleküler yollar (Zheng vd., 2021b)

Araştırmalar, Emodinin NF-κB aktivasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve bunun da pankreas kanseri hücrelerinin *in vitro* çoğalmasını ve metastazını baskıladığını ortaya koymaktadır. Emodin, NF-κB'ye bağlı sağkalım ve metastazla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu downregüle eder ve böylece kanser hücrelerinin apoptozdan kaçma ve metastaz yeteneğini bozar (A. Liu vd., 2011).

Emodin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) TRIB3/NF-κB aracılı ER stresini aktive etme (Su vd., 2017), hepatosellüler karsinomda (HCC) PI3K/AKT'yi inhibe etme ve p38 sinyal yolunu aktive etme (Lin vd., 2016) (Cui vd., 2016a) ve HepG2 hücrelerinde mitokondriyal işlevi bozma gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla çeşitli kanser tiplerinde apoptozu teşvik eder (L. Zhang vd., 2017). Ayrıca, kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemek için BCL-2 ailesi proteinlerini düzenler (Ashkenazi vd., 2017) ve kolon ve servikal kanserlerde ROS aracılı otofajiye bağlı hücre ölümünü başlatır (Y. Wang vd., 2018). Dahası, emodin aynı anda kaspaz-3 ve TNF-α/RIP1/RIP3 yolları aracılığıyla glioma hücrelerinde apoptozu ve nekroptozu tetikler (Zhou vd., 2020). Emodin, G2/M hücre döngüsünün durmasına neden olur ve karaciğer kanserinde çeşitli genlerin ifadesini değiştirir (Hsu vd., 2010). Emodin ayrıca HepG2 hücrelerinde hücre döngüsünün G1 fazında durmasına ve apoptozu neden olur; bu durum, artmış sitokrom c salınımı, artmış p53 düzeyleri ve azalmış NF-κB/p65 düzeyleri ile ilişkilidir (J. Q. Yu vd., 2013).

2.3.2. Emodin'in Meme Kanserindeki Rolü

Emodin, apoptozu teşvik ederek ve kritik sinyal yollarını baskılayarak meme kanserinde dikkate değer antikanser aktivite gösterir. Cheema ve arkadaşları, ipek fibroin kaplı lipozomların, PI3K ve MAPK yollarını inhibe ederek ve fosforile edilmiş Her2/neu seviyelerini azaltarak Her2/neu overeksprese meme kanseri hücrelerinde emodinün iletimini ve etkinliğini iyileştirdiğini buldu (Cheema vd., 2007). Huang ve arkadaşları, emodinün, Bcl-2/Bax oranının azalması, sitokrom c seviyelerinin yükselmesi ve p53 ile IGF-2 yolları arasındaki olası etkileşim ile karakterize edilen mitokondriyal yolun bozulması yoluyla BCap-37 hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirdi (Z. Huang vd., 2008a). Dahası, Wang ve arkadaşları, Emodin yüklü katı lipit nanopartiküllerinin (E-SLN'ler) MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkileri arttırdığını ve hücre döngüsü durmasını ve apoptozu tetiklediğini, normal MCF-10A hücrelerine ise minimal toksisite gösterdiğini göstererek meme kanseri tedavisi için umut vadeden hedefli bir uygulama yöntemi olduğunu vurguladı (S. Wang vd., 2012).

ER α -pozitif MCF-7 hücrelerinde, emodin estradiol (E2) ile uyarılan proliferasyonu etkili bir şekilde bastırır, G0/G1 faz hücre döngüsü tutulmasını başlatır ve apoptotik tepkileri artırır. Moleküler düzeyde, emodin ER α ekspresyonunu azaltır ve transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder, böylece hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz inhibisyonu için gerekli olan Siklin D1 ve Bcl-2 gibi önemli ER α hedef genlerini downregüle eder. Ek olarak, emodin E2 tarafından aktive edilen PI3K/Akt ve MAPK/Erk1/2 yollarının fosforilasyonunu zayıflatarak genomik olmayan sinyalizasyonu engeller. Bu bulgular, emodin'in ER α -pozitif meme kanserinde birden fazla östrojen kaynaklı onkogenik mekanizmayı hedefleyebilen doğal bir bileşik olarak terapötik potansiyelini vurgular ve onu tamamlayıcı veya alternatif anti-östrojen terapileri için uygun bir aday olarak sunar (Sui vd., 2014).

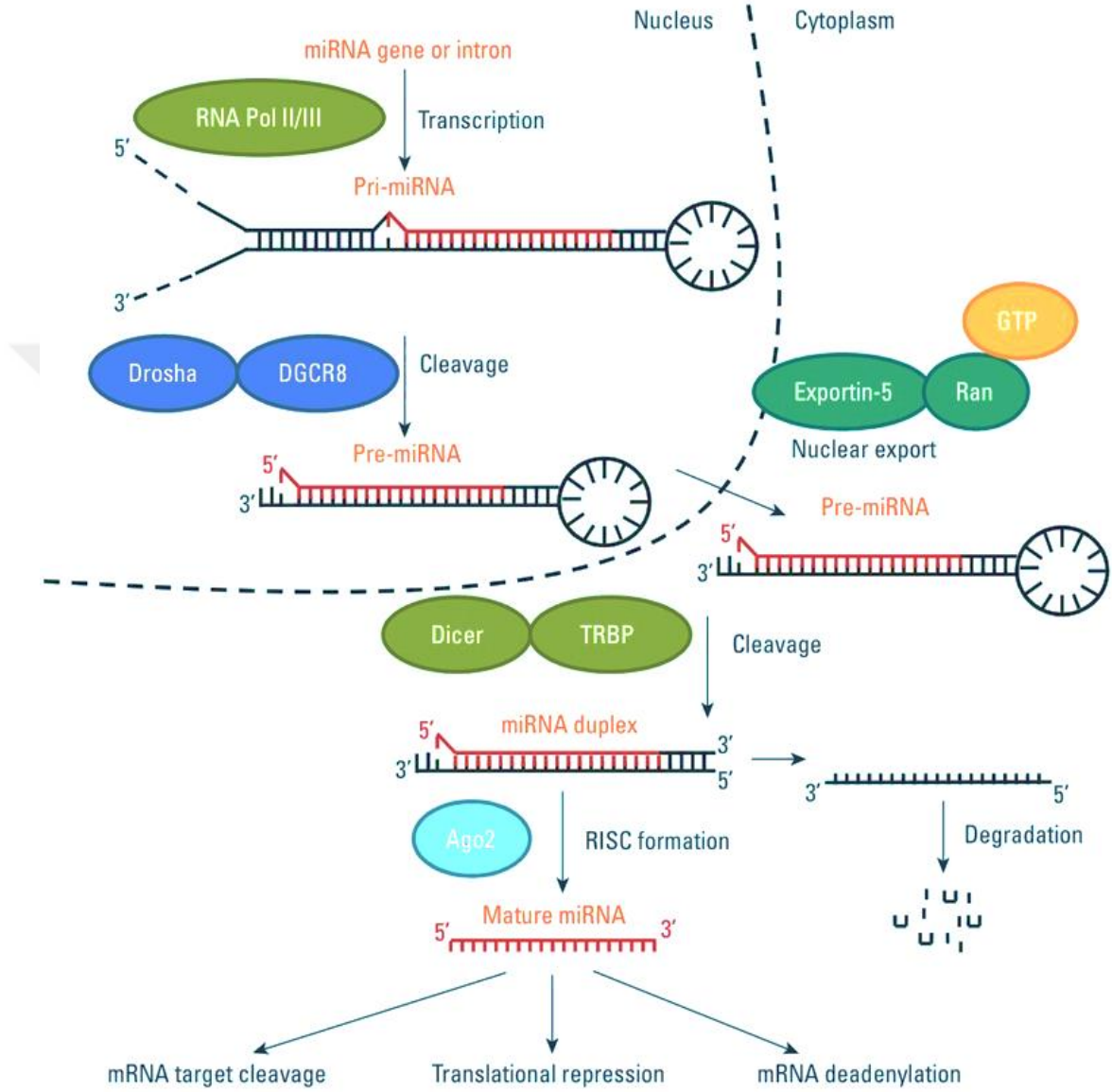
Emodin, hem ER $^{+}$ hem de ER $^{-}$ meme kanseri hücrelerine karşı geniş antikanser aktivitesi gösterir. ER $^{+}$ MCF-7 hücrelerinde, FOXO1-aracılı yol Emodin mekanizmasının merkezindedir. ER $^{-}$ MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin'in temel etkisi, mitotik iğ kontrol noktası (spindle assembly checkpoint, SAC) proteinlerinin baskılanması yoluyla

hücre döngüsü düzeninin bozulması şeklinde gerçekleşmektedir. (Sakalli-Tecim vd., 2022).

Emodin, aril hidrokarbon reseptörü (AhR) sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla ER-pozitif MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkiler gösterir ve bu da apoptozun artmasına ve AhR ile CYP1A1 ekspresyonunun artmasına neden olur (N. Zhang vd., 2021a).

2.4. mikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde temel roller oynayan, tipik olarak 20 ila 24 nükleotid arasında değişen küçük, kodlamayan RNA dizileridir (Schickel vd., 2008a) (Reddy, 2015). Translasyonu inhibe ederek veya hedef mRNA'ların degradasyonunu teşvik ederek hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz, migrasyon ve metabolik düzenleme dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik süreci etkilerler. Önemli sayıda miRNA, sıklıkla kanserle bağlantılı olan kromozomal kırılmalı bölgelerde yer alır. Yapılan çalışmalar, miRNA'ların hedeflerine bağlı olarak onkogenler (onkomiR'ler) veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebileceğini göstermektedir (Esquela-Kerscher & Slack, 2006) (Medina & Slack, 2008). Kanserde anormal miRNA ekspresyonu, amplifikasyon, delesyon veya mutasyon gibi genetik değişikliklerin yanı sıra promotör metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalardan da kaynaklanabilir. Ek olarak, miRNA biyogenezindeki aksaklıklar tümör gelişiminde rol oynamaktadır. Kanser başlangıcı ve ilerlemesindeki rolleri nedeniyle, miRNA'lar giderek artan bir şekilde kanser teşhisi ve prognozu için değerli biyobelirteçler ve ayrıca terapötik müdahale için potansiyel hedefler olarak kabul edilmektedir (Garzon vd., 2009) (Jansson & Lund, 2012).



Şekil 2.13 MikroRNA biyogenezinin 'doğrusal' kanonik yolu (Vrijens vd., 2015)

MikroRNA (miRNA) biyogenezini, nükleusta başlayan ve sitoplazmada işlevsel bir RNA-ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) oluşumuyla sonuçlanan oldukça düzenlenmiş, çok adımlı bir süreçtir. Çoğu miRNA, RNA polimeraz II tarafından uzun primer transkriptler (pri-miRNA'lar) olarak transkripte edilir; bunlar tipik olarak 1 kilobaz uzunluğundadır ve 5'-cap ve 3' poliadenile edilmiş kuyruk ile karakterize edilir. Bu pri-miRNA'lar, daha fazla işleme için kritik olan bir saç tokası yapısına sahiptir. Nükleusta,

RNase III enzimi Drosha, kofaktörü DGCR8 ile pri-miRNA'yı tanır ve keserek karakteristik 2-nükleotid 3' çıkıntısı olan yaklaşık 70-100 nükleotidlik bir öncü miRNA (pre-miRNA) üretir. Bu pre-miRNA daha sonra Ran-GTP'ye bağlı bir işlemle, eksport reseptörü Exportin-5 (XPO5) tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya girdiğinde, pre-miRNA, ortak proteini TRBP ile birlikte RNase III enzimi Dicer tarafından çift sarmallı bir miRNA dupleksine daha fazla işlenir. Bu dupleksin bir ipliği, kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır, Argonaute (AGO) proteinleri, özellikle AGO2 ve GW182 gibi ek kofaktörleri içeren RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) dahil edilir (M. Kato & Slack, 2008) (Reddy, 2015).

Olgun miRNA, RISC kompleksini hedef mRNA'larındaki kısmen komplementer dizilere yönlendirir. Hedef mRNA bağlanma bölgeleri çoğunlukla 3' transle edilmemiş bölge (3'UTR) içinde olmakla birlikte 5'UTR veya kodlama bölgelerinde de meydana gelebilmektedir. Bu bağlanma yoluyla, miRNA'lar translasyon baskılaması veya mRNA degradasyonu yoluyla transkripsiyon sonrası gen susturulmasına aracılık eder. Özellikle, mükemmel dizi komplementeritesi şart değildir, tek bir miRNA'nın birden fazla hedefi (bazen yüzlerce) düzenlemesine ve böylece çok çeşitli hücreyel yolları etkilemesine olanak tanır. Bu kapsamlı düzenleyici kapasite göz önüne alındığında, genetik değişikliklerden, epigenetik değişikliklerden veya biyogenez bileşenlerinin düzensizliğinden kaynaklanan miRNA ifadesindeki sapmalar gen ağlarını önemli ölçüde bozabilir ve sıklıkla çeşitli kanserlerin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynar (Munker & Calin, 2011). miRNA'lar hem tümör baskılayıcı hem de onkogen (onkomir) olarak işlev görür ve ifade profilleri giderek artan bir şekilde kanser teşhisi, prognozu ve potansiyel terapötik müdahale için değerli biyomarkerler olarak kabul edilmektedir (Croce, 2009).

2.4.1. Kanserde MikroRNA'ların Rolü

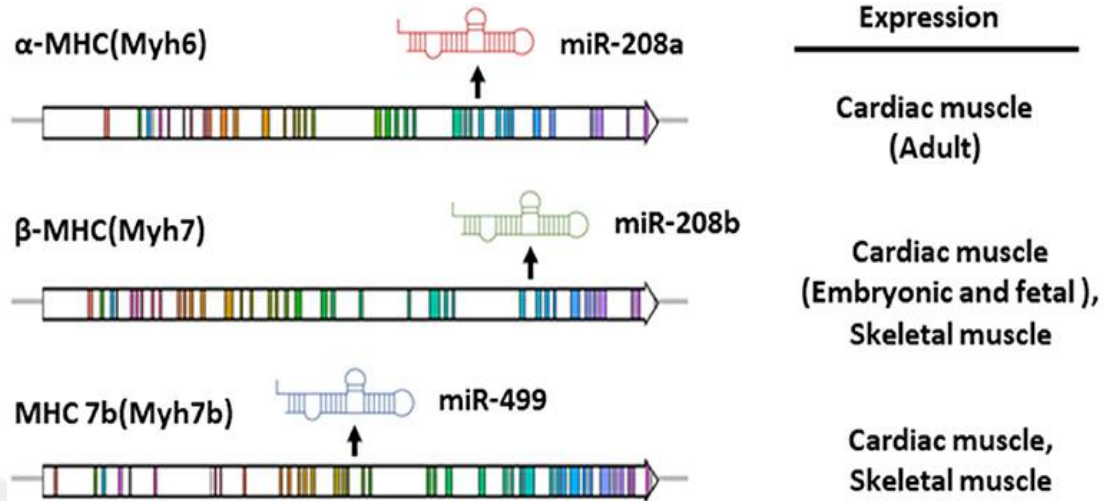
MikroRNA'lar, kanser gelişiminde tümör baskılayıcılar veya onkogenler olarak hareket eden, gen ifadesinin kritik düzenleyicileridir; toplu olarak "onkomiR" olarak bilinirler. miRNA'ların anormal ifadesi, genetik değişiklikler, epigenetik modifikasyonlar veya miRNA biyogenez mekanizmasındaki bozulmalar tarafından yönlendirilen çeşitli kanser tiplerinde ortak bir özelliktir. miRNA'ların global downregülasyonu tümör dokularında sürekli olarak gözlemlenmiştir ve bu, hücreyel farklılaşmayı ve kimliği korumadaki

rollerini göstermektedir (Mishra vd., 2016). Spesifik tümör baskılayıcı miRNA'ların kaybı, dediferansiyasyona ve malignant transformasyona yol açabilirken, miR-21, miR-155 ve miR-17-92 kümesi gibi onkogenik miRNA'ların overekspresyonu, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü ve proliferasyonda yer alan temel düzenleyici genleri hedef alarak tümör ilerlemesini teşvik eder (Schickel vd., 2008b) (Jansson & Lund, 2012).

Özellikle, lenfomalarda ve solid tümörlerde sıklıkla çoğaltılan miR-17-92 kümesi, hücresel bağlam ve dahil olan hedef genlere bağlı olarak hem bir onkogen hem de bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir (Zhao vd., 2022) . Benzer şekilde, miR-155 fare modellerinde doğrudan lenfomagenezle ilişkilendirilmiştir ve bu da tümör başlangıcındaki rolünü vurgulamaktadır (Witten & Slack, 2020). Dicer, Drosha, DGCR8 ve DDX5 ve DDX17 gibi helikazlar gibi miRNA işleme bileşenlerindeki bozulma da tümör baskılayıcı miRNA'ların olgunlaşmasını bozarak tümör oluşumuna katkıda bulunur. Dahası, dokuya bağlı miRNA ekspresyon paternleri, downregüle edilmiş miRNA'ların onkogenlerin baskılanmasını hafifletebildiği, upregüle edilmiş miRNA'ların ise tümör baskılayıcı genleri susturabildiği çok sayıda onkogenik yolu etkiler (Ludwig vd., 2016). Bu bulgular, miRNAların kanser biyolojisindeki işlevlerini ve onkolojide tanısal, prognostik ve terapötik hedefler olarak potansiyel rollerini vurgulamaktadır.

2.4.2. miR- 208a

miR-208a, miR-208b ve miR-499'u da içeren miRNA ailesine aittir (X. H. Huang vd., 2021). α -kardiyak kas miyozin ağır zincir geninin (*Myh6*) bir intronundan kodlanır ve yalnızca kardiyak dokuda eksprese edilir. Paralogu miR-208b, β -kardiyak kas miyozin ağır zincir geninde (*Myh7*) bulunur. Hem miR-208a hem de miR-208b, kardiyak gelişim ve fizyolojinin ayrılmaz bir parçasıdır ve miR-208a, stres kaynaklı kardiyak büyümede kritik bir rol oynar (Callis vd., 2009) (Kakimoto vd., 2016). Özellikle, miR-208a'nın düzensizliği, aşırı ekspresyonunun kalbin hipertrofik büyümesine neden olduğu kardiyak hipertrofi ve aritmi gibi patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Mohammadi vd., 2021)(Mohammadi vd., 2021). Akut miyokard enfarktüsü (AMI) sırasında dolaşımda mikroRNA-208a'nın geçici varlığı, erken AMI tanısı için yenilikçi bir belirteç olarak önemli potansiyeli olduğunu göstermektedir (Białek vd., 2015)(Białek vd., 2015).



Şekil 2.14 miR-208a, miR-208b ve miR-499'un gen yapısı, ifade örüntüsü ve faredeki konak genleri İtronik miR-208a, miR-208b ve miR-499, konak genleri Myh6, Myh7 ve Myh7b ile birlikte transkripsiyona uğrar.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada miR-208a'nın miyokard enfarktüsü (MI) bağlamında bilinen bir anti-apoptotik düzenleyici olan nemo benzeri kinaz (NLK) üzerindeki etkisi araştırıldı. Bir sıçan MI modeli ve *in vitro* analizler kullanılarak araştırmacılar, miR-208a ekspresyonunun MI'dan sonra önemli ölçüde upregüle edildiğini ve buna karşılık gelen *NLK* mRNA ve protein seviyelerinde bir azalmanın eşlik ettiğini buldular. *In situ* hibridizasyon, MI sonrası kardiyomiyositlerde yükselmiş sitoplazmik miR-208a'yı doğruladı (Yan vd., 2016a). Fonksiyonel analizler, miR-208a aşırı ekspresyonunun, NLK'yi ve onun downstream efektörü olan anti-apoptotik protein Bcl-2'yi baskılayarak H9C2 kardiyomiyoblast hücrelerinde Anjiyotensin II (Ang II) kaynaklı apoptozu artırdığını ortaya koydu. Tersine, miR-208a'nın inhibisyonu bu etkileri zayıflatarak apoptozu azalttı. Bu bulgular, miR-208a'nın NLK'yi doğrudan downregüle ederek kardiyomiyosit apoptozunu desteklediğini göstermektedir (Y. Huang vd., 2016a). Artan miR-208 ekspresyonu, *NLK* mRNA'sının bozunmasını teşvik ederek NLK protein seviyelerinde bir azalmaya yol açar, bu da ribozom yetersizliğini hafifletir ve eritroid genişlemeyi destekler (Wilkes vd., 2021). Kardiyovasküler biyolojideki rolünün ötesinde, miR-208a ayrıca onkogeneze de rol oynamıştır ve çeşitli malignitelerde anormal ekspresyon bildirilmiştir. miR-208'in CDKN1A'ya bağlanarak ekspresyonunu bastırdığı ve prostat kansinom hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulundu (H. Guo vd., 2015). Hepatosit kansinomda miR-208a önemli ölçüde upregüle edilir ve inhibisyonunun hücre

çoğalmasını ve invazyonunu *in vitro*, tümör oluşumunu ise *in vivo* olarak baskıladığı gösterilmiştir (P. Yu vd., 2015).

Özofageal skuamöz hücreli karsinom (ESCC) hücrelerinde miR-208'in aşırı ekspresyonu, SOX6 proteininin downregülasyonu yoluyla hücre çoğalmasını, tümör oluşumunu ve hücre döngüsü ilerlemesini artırdı, bu da p21'in downregülasyonu, siklin D1'in upregülasyonu ve Rb'nin fosforilasyonu ile sonuçlandı (H. Li vd., 2014). Ayrıca, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC), miR-208a doğrudan SRCIN1'i (SRC kinaz sinyalleme inhibitörü 1) hedef alarak tümör ilerlemesini destekler. SRCIN1 ekspresyonunun susturulması, miR-208a baskılanmasının inhibitör etkilerini hafifletir ve miR-208a'nın onkogenik aktivitesinin temel aracısı olarak rolünü doğrular. Ek olarak, miR-208a'nın SRCIN1 regülasyonu yoluyla NSCLC'deki ERK sinyal yolunu modüle ettiği gösterilmiştir ve bu da akciğer kanserinde terapötik bir hedef olarak potansiyelini vurgular (L. Liu vd., 2019).

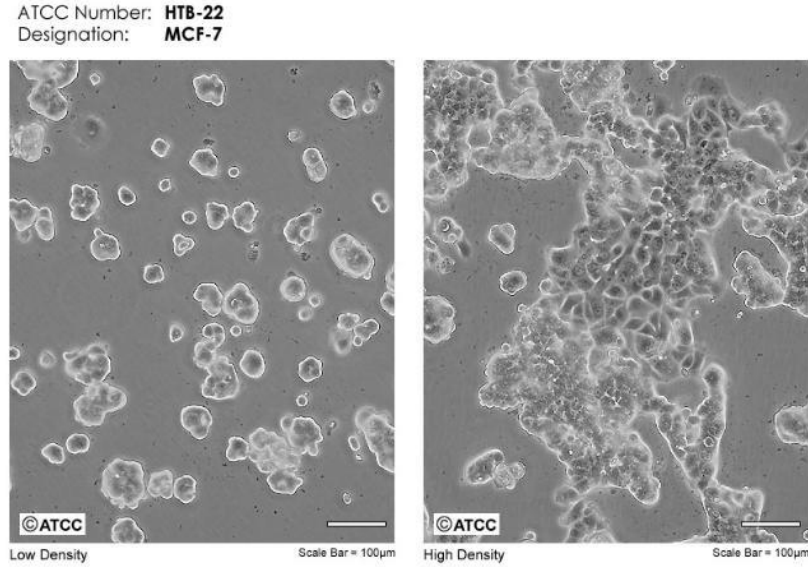
Araştırmacılar miR-208a'nın meme kanseri kök benzeri hücrelerinde (BrCSC'ler) SOX2 ve β -katenin aracılığıyla LIN28'i indüklediğini gösterdi. SOX2 veya β -katenin inhibisyonu miR-208a'nın etkilerini kısmen azaltırken, her ikisinin birlikte inhibisyonu LIN28 ekspresyonunu ve ALDH1 pozitif hücrelerin oranını daha önemli ölçüde azalttı. Bu bulgular miR-208a'nın meme kanseri kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesini artırarak tümör ilerlemesine katkıda bulunduğunu ve bu süreçte SOX2, β -katenin, LIN28 ve let-7a gibi önemli düzenleyici moleküllerle etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu nedenle miR-208a meme kanseri tedavisi için potansiyel bir hedef olarak düşünülebilir (Bertoli vd., 2015).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

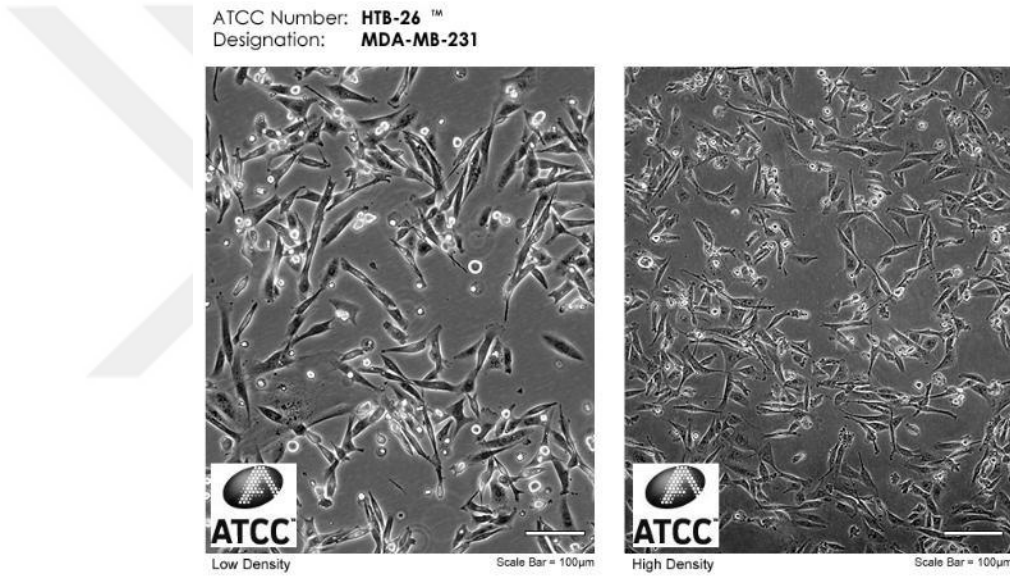
3.1.1. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

MCF7 (ATCC HTB-22) meme kanseri hücre hattı, östrojen reseptörü (ER) pozitif, progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir (Şekil 3.1). Bu nedenle lüminal alt tip meme kanserleri altında sınıflandırılır. MCF7 hücreleri, sitoplazmik östrojen reseptörleri aracılığıyla östradiolü işleme yeteneği ve kubbe oluşturma yeteneği dahil olmak üzere farklılaşmış meme epitelinin birkaç özelliğini korur. Hücreler *WNT7B* onkogenini ifade eder. MCF7 hücrelerinin büyümesi, tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa) tarafından engellenir. IGFBP'lerin (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler) salgılanması, anti-östrojen tedavisiyle düzenlenebilmektedir (*MCF7 - HTB-22 | ATCC, t.y.*).



Şekil 3.1 MCF-7 hücre hattının mikroskopik görünümü
Az yoğun kültürde (sol görsel) hücreler küme hâlinde dağılmışken, yüksek yoğunlukta (sağ görsel) hücreler sıkı koloniler oluşturmuştur (*MCF7 - HTB-22 | ATCC, t.y.*)

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), insan meme adenokarsinomu hücre hattıdır ve östrojen reseptörü (ER) negatif, progesteron reseptörü (PR) negatif ve HER2 negatiftir; üçlü negatif meme kanseri alt tipini temsil eder (Şekil 3.2). Bu hücreler oldukça invaziv ve metastatiktir ve genellikle agresif meme kanseri için bir model olarak kullanılır. MDA-MB-231 hücreleri yüksek düzeyde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ifade eder ve epitel-mezenkimal dönüşüm (EMT) özellikleri sergiler; bu da onların göç edici ve invaziv özelliklerine katkıda bulunur. Tümör metastazı ve ilaç direnci ile ilgili araştırmalarda yaygın olarak kullanılırlar (*MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC, t.y.*).



Şekil 3.2 MDA-MB-231 hücre hattının mikroskopik görünümü
Az yoğun kültürde (sol görsel), yüksek yoğunlukta (sağ görsel) (*MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC, t.y.*)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 7-1’de verilmiştir.

3.1.3. Hücre Kültürü Donanımları

Çalışmada hücre kültüründe kullanılan materyaller Tablo 7-2’de verilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi Tablo 7-3’te verilmiştir.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Çalışma süresince kullanılan çözeltiler Tablo 7-4'te verilmiştir.

3.1.6. Kullanılan Antikorlar ve miRNA Molekülleri listesi

Çalışma süresince kullanılan antikor ve miRNA'lar Tablo 7-5'te verilmiştir.

3.2. Metodlar

3.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 (ATCC® HTB-22™) ve MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) hücre hattı, ATCC (American Type Culture Collection)'den temin edilmiştir. Bu meme kanseri hücre hatları, %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 penisilin/streptomisin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri ile kültüre edilmiştir. Hücreler, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde T25 ya da T75 hücre kültür kaplarında büyütülmüştür. Her iki hücre hattı da adherent özellik göstermekte olup, kültür yüzeyinde %70–80 konfluens seviyesine ulaştıklarında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasajlama işlemi için, öncelikle kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücreler 37 °C'de yaklaşık 3–5 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler yüzeyden tamamen ayrıldıktan sonra, eşit hacimde DMEM besiyeri ilave edilerek tripsin etkisi sonlandırılmıştır. Daha sonra hücreler 2500 × g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz dikkatlice uzaklaştırılmış, elde edilen hücre pelleti besiyeri içerisinde pipetaj yapılarak resüspanse edilmiştir. Son olarak hücreler Neubauer hemositometresi kullanılarak sayılmış ve uygun yoğunlukta olacak şekilde yeni kültür kaplarına aktarılmıştır.

3.2.2. Hücre Dondurma

Hücreleri %70–80 konfluens seviyesine ulaştığında, hücre dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kültür medyası uzaklaştırılan hücreler 1X PBS ile yıkanmış, ardından %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 37 °C'de yaklaşık 3–5 dakika inkübe edilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine eşit hacimde 1:1 DMEM besiyeri eklenerek tripsin

inaktivasyonu sağlanmış ve hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril falkon tüplere aktarılmıştır. Hücreler $2500 \times g$ 'de 4 dakika santrifüjlenmiş, üstteki süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelletine %90 FBS ve %10 DMSO içeren kriyoprotektan dondurma medyası eklenerek homojen bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hazırlanan süspansiyon, önceden etiketlenmiş kriyoviyal tüplere aktarılmış ve -80°C 'de izopropanol içeren kriyo kutuda 24 saat bekletilmiştir. Ardından uzun süreli saklama için sıvı azot tankına (-196°C) transfer edilmiştir.

3.2.3. Hücrelerin Açılması

Hücre açılması için iki farklı yöntem uygulanmaktadır. İlk yöntemde -80°C 'de kriyo tüplerinde, FBS-DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş hücre hatları, DMSO'nun hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkisini en aza indirmek amacıyla hızlı bir şekilde çözülmüştür. Ardından hücreler, önceden 1:1 oranında taze DMEM besiyeri eklenmiş 15 mL'lik Falcon tüplerine aktarılmış ve $2500 \times g$ 'de 4 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmış ve pellet, taze besiyeri ile çözülmüştür. Elde edilen hücre süspansiyonu, kullanılacak olan 25 cm²'lik flasklara 3 ml besiyeri eklenerek ekilmiştir. İkinci yöntemde ise, petri kaplarına 1 ml besiyeri eklenmiştir. Kriyotüp içerisinde FBS-DMSO içeren besiyeri ile saklanan hücreler, çözdürüldükten sonra kriyotüpten 1 ml petri kaplarına ekilmiştir. Petriler, %5 CO₂ içeren 37°C 'lik inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler 2 saat sonra kontrol edilmiş ve üstüne 1 ml besiyeri eklenmiştir.

3.2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C 'lik inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelere, farklı konsantrasyonlarda (10-60 μM) Emodin uygulanmış ve yeniden 24 - 48 - 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürelerin sonunda her bir kuyuya 10 μL MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) reaktifi eklenmiş ve plakalar 4 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası, medyum dikkatlice uzaklaştırılmış ve her kuyuya 100 μL DMSO ilave edilerek kristaller çözüldürülmüştür. Plaka, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dakika bekletildikten sonra, absorbans değerleri 570 nm ve 655 nm dalga

boyalarında mikropilaka okuyucusu ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler, GraphPad Prism kullanılarak analiz edildi ve kontrol grubuna göre hücre canlılığı yüzde olarak hesaplandı.

3.2.5. Koloni Formasyon Analizi

Hücreler, düşük yoğunlukta olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına her bir kuyuya 1×10^3 hücre olacak biçimde ekildi. Hücreler, ekim sonrası 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde inkübe edildi. Ardından farklı konsantrasyonlarda Emodin (10, 20, 30 ve 40 µM) uygulanarak 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, hücrelerin üzerindeki ilaçlı besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine taze besiyeri eklendi. Hücreler, koloni oluşumuna izin vermek amacıyla yaklaşık 7–14 gün boyunca inkübe edildi. Deney, kontrol grubunda her bir koloninin yaklaşık 50 veya daha fazla hücre içerecek şekilde belirgin hale gelmesiyle sonlandırıldı. Deney sonunda hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra metanol:asetik asit (3:1) karışımı ile 5–10 dakika fikse edildi. Koloniler, % 0,5 kristal viyole çözeltisiyle 20–30 dakika boyunca boyandı. Fazla boya distile su ile uzaklaştırıldıktan sonra plakalar oda sıcaklığında kurutuldu. Koloni oluşumları invert mikroskop altında gözlemlendi. Koloni sayısı ve büyüklüğü, "ImageJ" kullanılarak sayısal olarak analiz edildi. Elde edilen veriler, kontrol grubuna göre farklı Emodin konsantrasyon grupları arasında karşılaştırıldı ve istatistiksel analizler GraphPad Prism programı kullanılarak yapıldı.

3.2.6. Tripan mavisi hücre sağ kalım testi (Growth assay)

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında Emodinin hücre sağ kalımı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla sağ kalım testi gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara 1 ml hacminde hücre süspansiyonu ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışabilmesi amacıyla gece boyunca 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Ardından hücrelere artan dozlarda Emodin (10, 20, 30, 40 µM) uygulanmıştır. İlaç uygulamasından 24, 48, 72 saat sonra her bir kuyu 1X PBS ile yıkanmış, ardından hücreler tripsin-EDTA ile uzaklaştırılarak toplanmıştır. Hücre süspansiyonları mikro santrifüj tüplerine aktarılmış, 2500 × g'de 4 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantlar atılmıştır. Hücre pellet'i yeniden PBS içinde çözülmüş, %0,4 Trypan Blue çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak bu karışımdan 10 µl çekilerek Neubauer

hemositometresi ile sayılmıştır. Her grupta Emodin'in doza ve zamana bağlı hücre sağ kalımı üzerindeki etkisi sayısal olarak analiz edilmiştir.

3.2.7. Floresan Boyama Analizi

Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığı ve ölümü üzerine zamana ve doza bağlı etkilerini değerlendirmek amacıyla floresan boyama analizi gerçekleştirilmiştir. %70–80 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanarak hemositometre yardımıyla sayılmış ve her bir kuyuya 4×10^4 hücre düşecek şekilde 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücelere 10, 20, 30, 40 μM Emodin konsantrasyonları uygulanmış; kontrol gruplarına ise taze besiyeri eklenmiştir. İlaç uygulamasından 24, 48 veya 72 saat sonra floresan boyama işlemleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Propidium İyodür (PI) Boyaması: Kuyulara 20 μM Propidium İyodür (PI) eklenmiş ve hücreler 37°C 'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Görüntüleme işlemi, floresan ataçmanlı invert mikroskop (IX71-Olympus) kullanılarak, yeşil filtre üzerinden 536 nm eksitasyon ve 617 nm emisyon dalga boylarında gerçekleştirilmiştir.

DiOC₆(3) Boyaması: Kuyulara 4 nM DiOC₆ (3,3'-diheksiloksakarbosiyanin iyodür) uygulanmıştır. Hücreler 37°C 'de 15 dakika inkübe edildikten sonra, floresan ataçmanlı invert mikroskop (IX71-Olympus) kullanılarak mavi filtre üzerinden 350 nm eksitasyon ve 470 nm emisyon dalga boylarında görüntülenmiştir.

3.2.8. Asılı Damla (Hanging Drop) Deneyi

Hücrelerin üç boyutlu (3B) kültür ortamında agregasyon ve sferoid oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla hanging drop yöntemi uygulanmıştır. Hücre sayımı hemisitometre ile yapılmış, her bir 30 μL 'lik damlada 2500 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Deney grupları için Emodin 10, 20, 30 ve 40 μM konsantrasyonları hazırlanarak hücre süspansiyonuna eklenmiştir. Hazırlanan 30 μL 'lik damlalar, 60 mm'lik petri kabı kapağının iç yüzeyine aralıklarla yerleştirilmiş ve damlaların birbirine temas etmemesine dikkat edilmiştir. Petri kabının tabanına 1X PBS eklenmiş, bu sayede nemli bir ortam sağlanarak hücre damlalarının kurumaması önlenmiştir.

Kapak dikkatlice kapatılmış ve petri kabı ters çevrilerek hücre damlalarının kapaktan asılı kalması sağlanmıştır. Petri kabı, 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda, oluşan sferoidlerin çap ölçümleri invert mikroskop altında gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.2.9. PI (Propidium İyodür) Hücre Akış Sitometrisi Testi

Bu deneyde, hücre döngüsü fazlarının belirlenmesi amacıyla Propidyum İyodür (PI) boyası kullanılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, 6 kuyucuklu kültür kaplarına 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C’lik inkübatörde tutularak ortama adapte olmaları sağlanmıştır. Ardından hücrelere 10, 20, 30 ve 40 µM konsantrasyonlarında Emodin uygulanmış ve hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler tripsin ile toplanmış, santrifüjlenmiş ve %70 soğuk etanol içinde +4°C’de 1–2 gün süreyle fikse edilmiştir. Daha sonra etanol uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS içinde PI ve RNaz A içeren çözeltiyle 37°C’de 30 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra hücreler akış sitometrisi (BD Accuri™ C6, BD Biosciences) cihazında FL2 filtresi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analizde hücre popülasyonlarının G₁, S ve G₂/M faz dağılımları ile sub-G₁ hücre oranları belirlenmiştir. Elde edilen veriler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.10. . Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu işlemleri, deney grubu olarak Emodin uygulanan hücreler ile kontrol grubu hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 60 mm’lik petri kaplarına yaklaşık 5×10^5 hücre içerecek şekilde ekilmiş ve 24 saat boyunca 37°C’de, %5 CO₂ içeren koşullarda inkübe edilmiştir. Daha sonra deney gruplarına 10 µM Emodin (MCF-7 hücre için) ve 20 µM Emodin (MDA-MB-231 hücre için) uygulanmış, kontrol gruplarına ise taze besiyeri eklenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda, hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Her iki grup hücresi de soğuk 1X PBS ile yıkanmış, ardından hücreler mekanik kazıma yöntemiyle toplanmıştır. Kazınan hücreler mikro santrifüj tüplerine alınarak 2 dakika boyunca $2500 \times g$ ’de santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelletleri miktarına göre, 1X proteaz inhibitörü içeren Hücre Lizis

Çözeltisi (M-PER™, Thermo Fisher) yaklaşık 50 µL eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika süreyle çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ardından örnekler +4°C’de 14 000 × g’de 10 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant yeni 1,5 mL’lik mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen protein lizati, uzun süreli analizlerde kullanılmak üzere –20°C’de saklanmıştır.

3.2.11. Bradford Protein Miktar Tayini

Protein izolasyonu sonrasında örneklerdeki toplam protein miktarını belirlemek amacıyla Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, 1,5 µg/µL konsantrasyona sahip sıgır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Standart eğrinin oluşturulabilmesi için 1,5, 3, 4,5, 6, 7,5 µg BSA kuyucuklara eklenmiştir. Her bir kuyucuğa ayrıca 200 µl Bradford reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250) ilave edilmiştir. Kontrol (blank) kuyucuğuna ise yalnızca 200 µl Bradford reaktifi konulmuştur. Protein miktarı bilinmeyen örneklerden her birine 1 µl eklenmiş ve Bradford reaktifi ile karıştırılmıştır. Tüm örnekler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından Microplate Reader cihazı 595 nm dalga boyuna ayarlanarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler Excel programı kullanılarak değerlendirilmiş, standart eğri oluşturulmuş ve bu eğri yardımıyla bilinmeyen örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.12. İmmüno blotlama Yöntemi

Bu deneyde protein ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla immüno blotlama (Western Blot) tekniği uygulanmıştır. Elektroforez sisteminde %10-12 oranında poliakrilamid ayırma (separating) jeli (Tablo 7-6) ve üzerine %4-6 oranında üst (stacking) jel (Tablo 7-7) hazırlanmıştır. Jel polimerizasyonunu takiben tarak yerleştirilmiş ve jelin tamamen donması beklenmiştir. Protein örnekleri, 5X Laemmli yükleme tamponu ile 1:4 oranında homojenize edilmiş ve ardından 95 °C’de 5 dakika boyunca ısıtılarak denatürasyonu sağlanmıştır. 30-50 µg protein içeren örnekler SDS-PAGE jeline her kuyucuğa maksimum 25 µl olacak şekilde protein yüklemesi yapılmıştır. Örnekleri stacking jeli boyunca 70V’ta, separating jeli boyunca ise 90V’ta dikey elektroforez sisteminde yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, dikkatlice cam plakalarından ayrılmıştır. Transfer işlemi için PVDF membranlar metanolde 30 saniye aktive edildikten sonra transfer tamponuna alınmıştır. Transfer düzeneği katottan anoda

doğru sünger tabaka, filtre kâğıdı, jel, PVDF membran, filtre kâğıdı ve sünger tabaka sırasıyla hazırlanmıştır. Her bir katman arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmiştir. Transfer işlemi, protein büyüklüklerine bağlı olarak 300 mA akımda 45-60 dakika arasında gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrası membranlar, non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla %5 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T özeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır. Bloklama işleminin ardından, membranlar primer antikorlar (örneğin ERK1/2, ERa, P38, JNK, NLK, β -Actin, β -Tubulin, GAPDH) ile +4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Primer antikorlar, %5 yağsız süt içeren TBS-T içerisinde 1:1000 oranında seyreltilmiştir. İnkübasyon sonrasında membranlar, TBS-T ile üç kez 10’ar dakika yıkanmıştır. Ardından, 1:3000–1:5000 oranında seyreltilmiş HRP-konjuge sekonder antikorlar (anti-mouse/rabbit, Cell Signaling Technology) ile membranlar oda sıcaklığında 2 saat veya tercihe bağlı olarak 4 °C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikor inkübasyonunun ardından membranlar, TBS-T ile üç kez 10’ar dakika ve son olarak TBS ile bir kez 5 dakika yıkanarak kemilüminesans tabanlı sinyal tespiti için hazırlanmıştır.

ECL (enhanced chemiluminescence) özeltisi, A ve B solüsyonlarının 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır (Tablo 7-8). Bu özelti içinde 2 dakika karanlıkta inkübe edilen membranlar, ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (BioRad) kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntüleme sonrası bant yoğunlukları ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir. Her bir proteinin relatif ekspresyon seviyesi, houskeeping protein yoğunluğuna normalize edilerek kontrol grubuna göre karıştırılmıştır.

3.2.13. miR-208a Transfeksiyonu

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine antimiR-208a molekülünün transfeksiyonu, Canfast™ Transfection Reagent (Cat. N° T0083) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyuya yaklaşık 500.000 hücre olacak şekilde 6-well plaklar hazırlanmış ve 24 saat sonra transfeksiyon işlemine geçilmiştir. Kit’teki (doku kültürü plakası, RNA ve Transfeksiyon Reaktifi) tablosuna göre antimiR-208a solüsyonu ve CANFAST solüsyonu serumsuz ortamda hazırlanmıştır. Transfeksiyon karışımını oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplerin içerikleri birleştirilerek homojen bir karışım elde edilmiştir. Transfeksiyon karışımını her bir kuyucuğa damla damla hücrelerin üzerine

ilave edilmiştir. Plakayı hafifçe sallayıp ve hücreler 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından, miRNA izolasyon yapmıştır.

3.2.14. miRNA İzolasyonu

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ile anti-miR-208a ile transfekte edilmiş hücrelerdeki miR-208a seviyelerinin belirlenmesi amacıyla, miRNA izolasyonu miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Cat. No: 217004) üretici protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Hücreler üzerine QIAzol lizis reaktifi eklenerek parçalanmaları sağlandı. Ardından kloroform ilave edilip karıştırıldı ve $12000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz alınarak %100 etanol eklendi ve yeniden karıştırıldı. Elde edilen karışım spin kolondan geçirildi ve $8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon, RWT ve RPE tamponları ile yıkama adımlarından geçirildikten sonra yeni bir RNaz-içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. miRNA'nın elüsyonu için RNaz-içermeyen su eklendi ve $8000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. İzole edilen miRNA konsantrasyonları Implen Nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen miRNA örnekleri -80°C 'de saklandı

3.2.15. cDNA Sentezi

İzole edilen miRNA örneklerinin cDNA'ya çevrilmesi işlemi, miScript II RT Kit (Qiagen, Kat. No: 218161) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her örnek için hazırlanan reaksiyon karışımında, 4 μl 5X iScript Mix, 1 μl revers transkriptaz, 500 ng RNA ve nükleaz içermeyen su kullanılarak toplam 20 μl hacminde reaksiyon oluşturulmuştur. Hazırlanan karışımlar, revers transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için termal döngü cihazına yerleştirildi ve 25°C 'de 5 dakika, 46°C 'de 20 dakika, 95°C 'de 1 dakika inkübe edildikten sonra elde edilen cDNA örnekleri -20°C 'de saklandı.

3.2.16. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen cDNA'lar, miR-208a ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Deneylerde miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Kat. No: 218073) kullanılmış, özgül olarak miR-208a primeri ve endojen kontrol olarak RNU6 primeri tercih edilmiştir (kullanılan primer dizileri Tablo 7.5'de verilmiştir). qPCR işlemleri CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) cihazında yürütülmüş ve 40 döngüden oluşan bir protokol

uygulanmıştır. Reaksiyon döngüsü şu şekilde ayarlanmıştır: 95°C'de 15 dakika, 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 70°C'de 30 saniye uzama. Veri analizi, Pfaffl yöntemiyle miRNA ekspresyonlarındaki kat değişimleri hesaplandı.

3.2.17. İstatiksel Analiz

Deneylerden elde edilen tüm veriler, üç bağımsız biyolojik tekrarın ortalaması \pm standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 8 yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA yöntemi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel testlerde $p < 0.05$ değeri anlamlılık kriteri olarak kabul edilmiştir.

4.SONUÇLAR

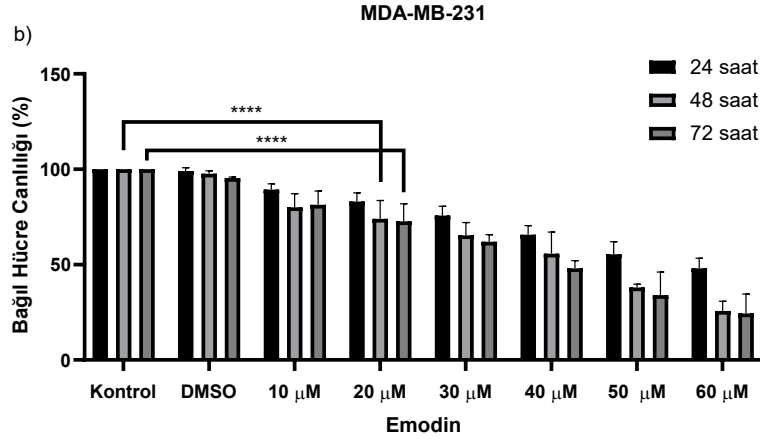
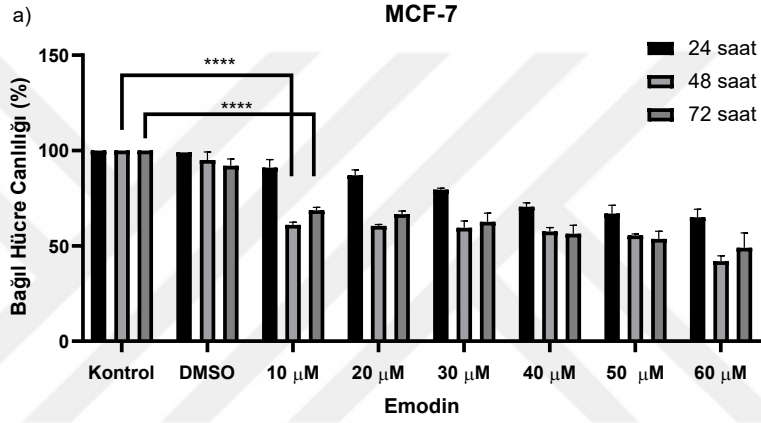
4.1. Meme Kanseri Hücrelerine Emodin Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gösterilmesi amacıyla, hücelere 24, 48 ve 72 saat boyunca 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 μM konsantrasyonlarda Emodin uygulanarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre, Emodin uygulamasının MCF-7 hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığını göstermektedir. Kontrol grubunda hücre canlılığı %100 olarak kabul edilirken, DMSO kontrolünde benzer şekilde canlılık gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

MCF-7 hücrede 24 saatlik uygulamada, Emodin 10, 20, 30, 40 ve 50 μM dozlarında hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe neden olmamıştır ($p > 0.05$). Ancak 60 μM dozunda canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). 48 saatlik uygulamada, Emodinin hücre canlılığına olan etkisi daha belirgin hale gelmiştir. 10 μM dozundan itibaren hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düşüşler kaydedilmiştir (10 μM için **** $p < 0.0001$). Canlılık, 10 μM 'de kontrol grubuna kıyasla %32 civarına düşerken, 60 μM 'de yaklaşık %43'e kadar gerilemiştir. 72 saatlik uygulamada ise, Emodinin etkisi zamanla artış göstermiştir. 10 μM dozundan itibaren tüm Emodin dozlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir (10 μM için **** $p < 0.0001$) (Şekil 4-1 a).

MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saatlik uygulamada, Emodin'in 10, 20, 30, 40 ve 50 μM dozlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Ancak 60 μM dozunda hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşmüştür ($p < 0.05$). 48 saatlik uygulamada, Emodin'in antiproliferatif etkisi belirginleşmiştir. 20 μM dozundan itibaren tüm dozlarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düşüşler kaydedilmiştir (20 μM için **** $p < 0.0001$). Bu sürede canlılık,

20 μM 'de kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %39'a, 60 μM 'de ise %46'ya kadar gerilemiştir. 72 saatlik uygulamada ise, Emodin'in sitotoksik etkisi zamanla daha da artmıştır. 20 μM dozundan itibaren tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı azalma saptanmıştır (20 μM için **** $p < 0.0001$). En yüksek doz olan 60 μM 'de canlılık %50'nin altına inmiştir. Bu bulgular, Emodin'in MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak güçlü bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 4-1 b).



Şekil 4.1 Emodin'in meme kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisinin gösterilmesi

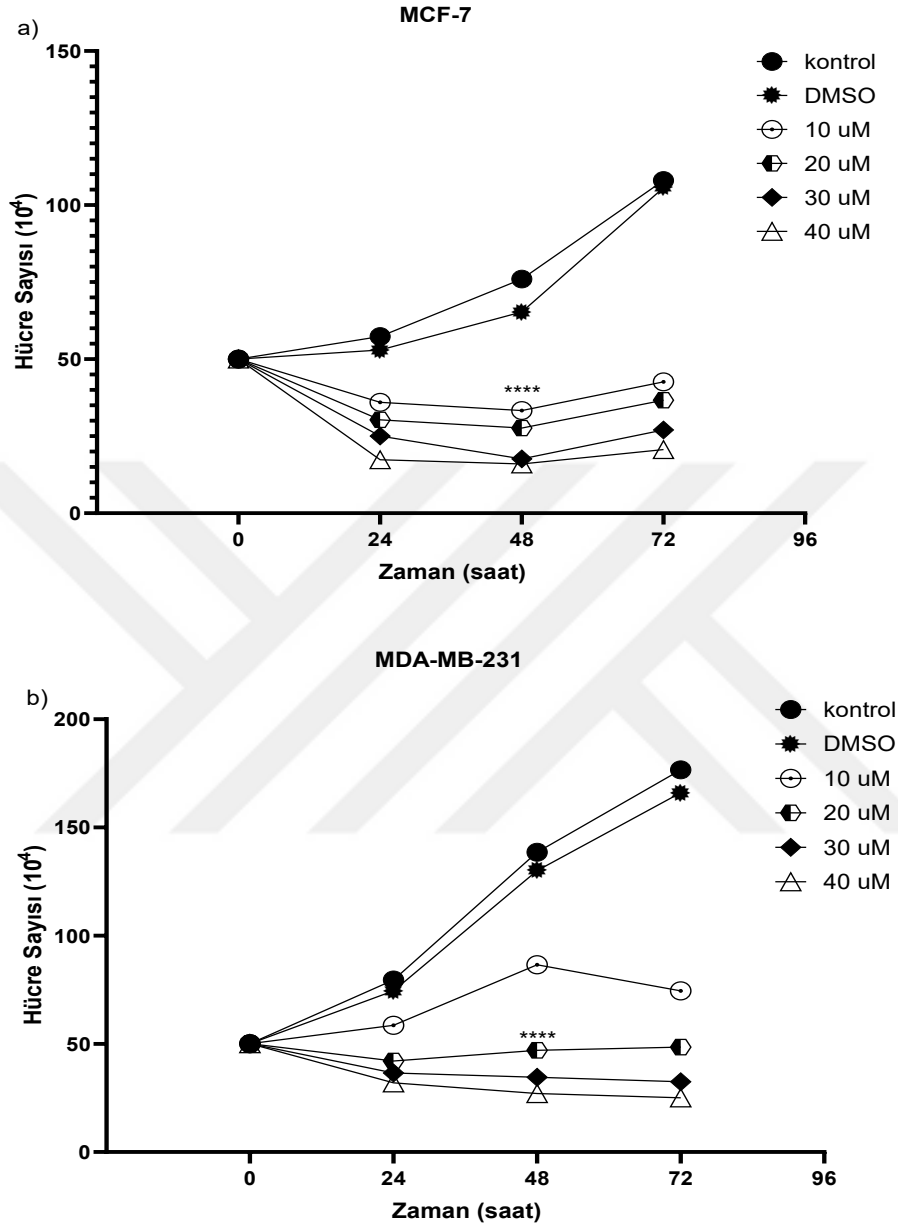
a) MCF-7 ve b) MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin'in (10–60 μM) hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkileri gösterilmektedir. Hücreler, belirtilen konsantrasyonlarla 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılıkları MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin beş teknik tekrarının ortalaması olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık, Two-way ANOVA ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiş olup, anlamlılık düzeyi $p < 0.0001$ 'dir.

4.2. Meme kanseri hücrelerinde Emodin'in hücre sağ kalımına etkisinin belirlenmesi

Emodinün hücre sağ kalımı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, Tripan mavisi testi uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre, Emodin uygulamasının canlı MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin sayısını doza ve zamana bağlı olarak önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Deney başlangıcında tüm gruplara eşit hücre yoğunluğu (5×10^4 hücre) eklenmiştir. Kontrol ve DMSO gruplarında zamanla canlı hücre sayısında artış gözlenirken, Emodin uygulanan gruplarda bu artış daha sınırlı kalmıştır.

Emodin uygulamasıyla birlikte canlı MCF-7 hücre sayılarında doza ve zamana bağlı olarak kademeli bir azalma gözlenmiştir. 24 saatlik uygulamada, MCF-7 hücrelerinde Emodinin 10 μ M dozunda hücre sayısında anlamlı bir düşüş (*p= 0.0113) kaydedilmiştir. 48 saatlik uygulamada, Emodinin canlı hücre sayısını azaltıcı etkisi daha belirgin hale gelmiştir. 10 μ M dozundan itibaren canlı hücre sayılarında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı düşüşler kaydedilmiştir (10 μ M için ****p <0.0001). 72 saatlik uygulamada, Emodinin hücre proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi zamanla artmıştır ve en yüksek etki bu zaman noktasında gözlenmiştir. 10 μ M dozundan itibaren tüm Emodin dozlarında hücre sayılarında istatistiksel olarak en yüksek düzeyde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M ve 40 μ M dozları için ****p<0.0001) (Şekil 4-2 a).

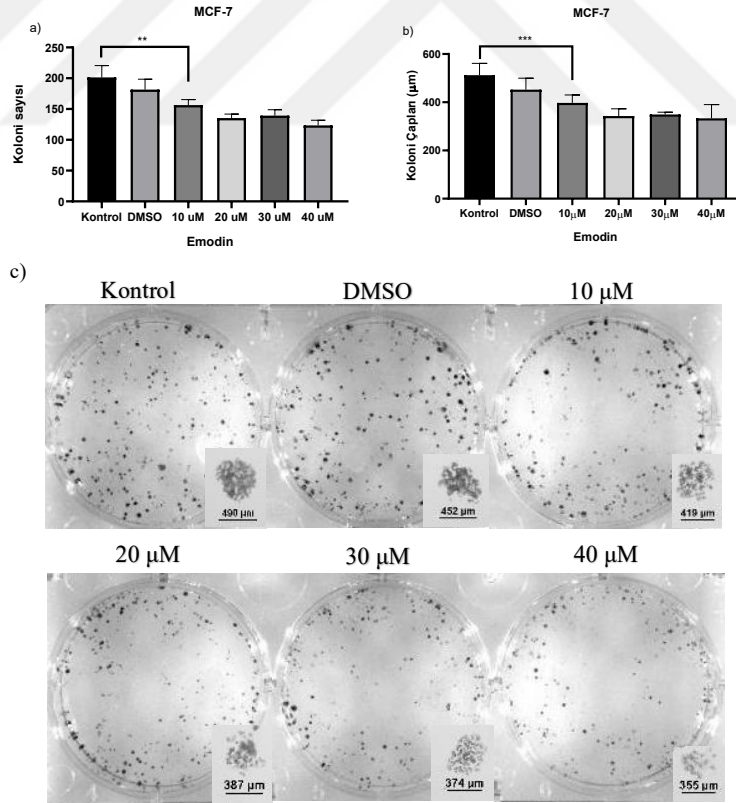
Emodin uygulamasıyla birlikte canlı MDA-MB-231 hücre sayılarında doza ve zamana bağlı olarak kademeli bir azalma gözlenmiştir. 24 saatlik uygulamada, MDA-MB-231 hücrelerinde Emodinin 20 μ M dozunda hücre sayısında anlamlı bir düşüş (**p= 0.0010) kaydedilmiştir. 48 saatlik uygulamada, 20 μ M dozundan itibaren canlı hücre sayılarında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı düşüşler kaydedilmiştir (20 μ M için ****p <0.0001). 72 saatlik uygulamada, 20 μ M dozundan itibaren tüm Emodin dozlarında hücre sayılarında istatistiksel olarak en yüksek düzeyde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir (20 μ M, 30 μ M ve 40 μ M dozları için ****p<0.0001) (Şekil 4-2 b).



Şekil 4.2 Emodinin meme kanseri hücrelerinin sağkalımına etkisinin değerlendirilmesi Emodin uygulamasının a) MCF-7 ve b) MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki doza ve zamana bağlı etkisini göstermektedir. Hücreler, farklı emodin konsantrasyonları (10, 20, 30, 40 μ M) ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra hücre sayısı belirlenmiştir. Yapılan deney grupları 3 farklı deneyin ortalamasıdır. İstatistiksel anlamlılık iki yönlü ANOVA (Two-way ANOVA) ve ardından Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. GraphPad Prism ile grafikler oluşturuldu (****p < 0.0001).

4.3. Emodinin Meme Kanseri Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

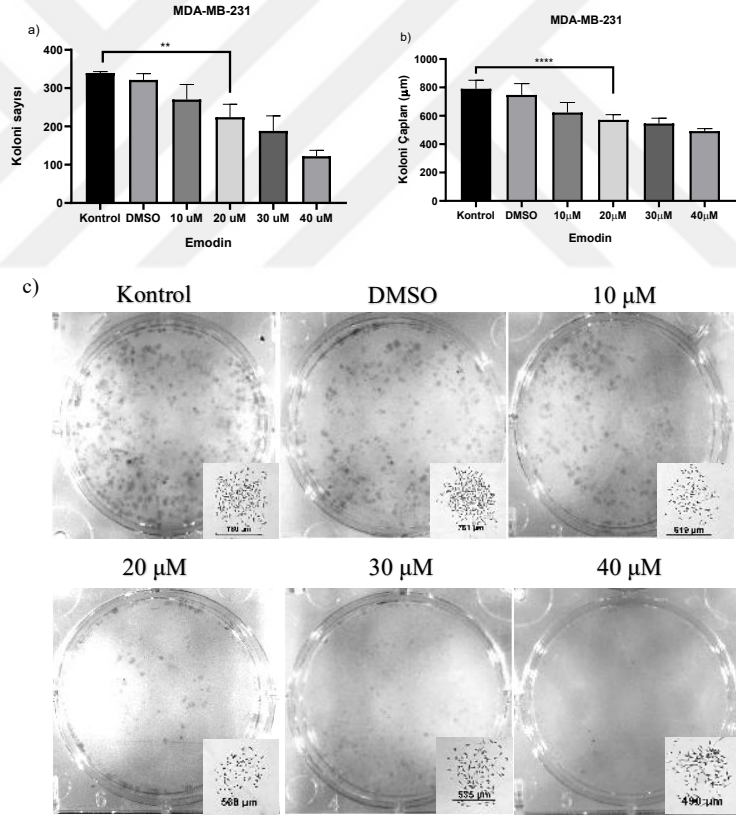
Koloni oluşum testi sonuçları, MCF7 hücrelerinde emodin uygulamasının hem koloni boyutunu hem de koloni sayısını doza bağlı olarak azalttığını göstermektedir. Kontrol grubunda ortalama 201 koloni ve 512 µm koloni çapı gözlenirken, DMSO kontrolünde benzer şekilde 181 koloni ve 453 µm çap ölçülmüş ve kontrol grubuyla DMSO kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Emodin uygulamasıyla birlikte bu değerlerde kademeli bir azalma gözlenmiştir. Ortalama koloni sayıları 10, 20, 30 ve 40 µM dozlarında sırasıyla 156, 135, 139 ve 123'e düşerken; ortalama koloni çapları da sırasıyla 397 µm, 342 µm, 349 µm ve 333 µm olmuştur. MCF-7 hücrelerinde özellikle 10 µM dozlarında koloni çapındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($***p < 0.001$) (Şekil 4-4).



Şekil 4.3 Emodin uygulamasının MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki doza bağlı etkisinin gösterilmesi

a) Koloni sayısı, b) Koloni çapı, c) Kolonilerin petri görüntüsü. 3 farklı deneyin ortalamasıdır. İki yönlü ANOVA (Two-way ANOVA) ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$)

MDA-MB-231 hücrelerinde de emodin uygulaması hem koloni boyutunu hem de koloni sayısını doza bağlı olarak azaltmıştır. Kontrol grubunda ortalama 340 koloni ve 790 µm koloni çapı gözlenirken, DMSO kontrolünde benzer şekilde 322 koloni ve 747 µm çap ölçülmüş; ve kontrol gruplarıyla DMSO kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). Emodin uygulamasıyla birlikte bu değerlerde kademeli bir azalma gözlenmiştir. Ortalama koloni sayıları 10, 20, 30 ve 40 µM dozlarında sırasıyla 270, 224, 188 ve 122'ye düşerken; ortalama koloni çapları da sırasıyla 623 µm, 571 µm, 545 µm ve 492 µm olmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde özellikle 20 µM dozlarında koloni çapındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**** $p < 0.0001$) (Şekil 4-4).

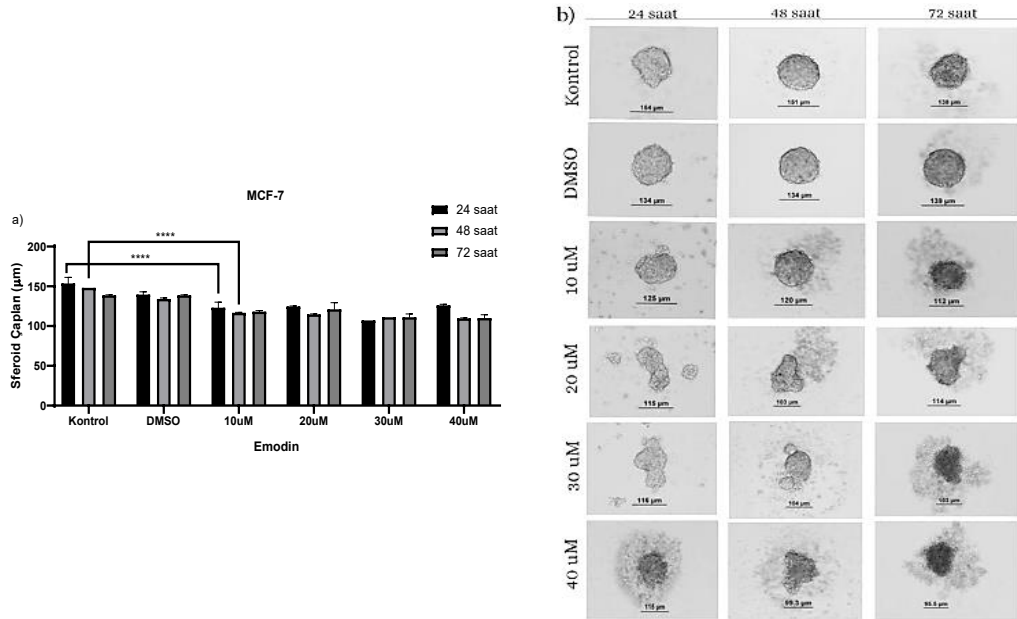


Şekil 4.4 Emodin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki doza bağlı etkisinin gösterilmesi

a) Koloni sayısı, b) Koloni çapı, c) Kolonilerin petri görüntüsü. 3 farklı deneyin ortalamasıdır. İki yönlü ANOVA (Two-way ANOVA) ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

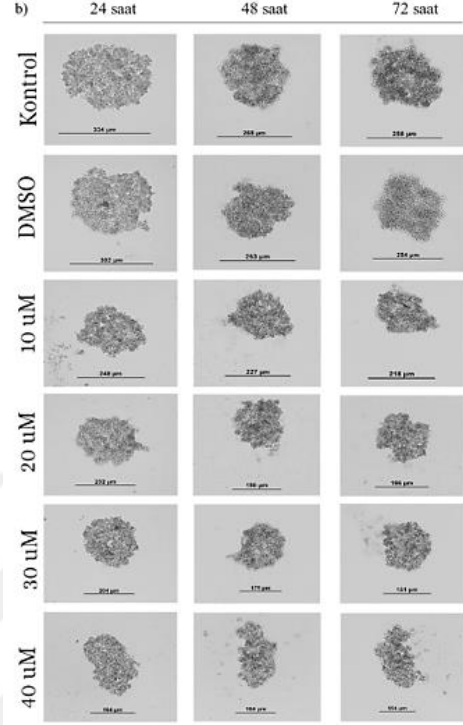
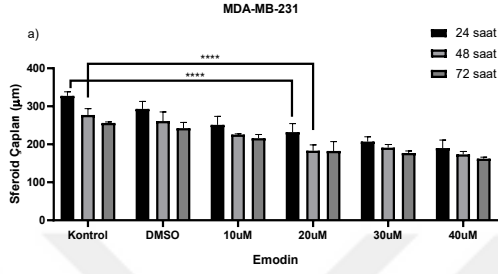
4.4. Meme Kanseri Hücrelerinde Emodin'in Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşmasına Etkisinin Gösterilmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında Emodin'in sferoid oluşumu üzerindeki etkisi, 10, 20, 30 ve 40 μM konsantrasyonlarında ve 24, 48, 72 saatlik zaman dilimlerinde incelenmiştir. Sferoid çapları ölçülmüş ve istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir (Şekil 4-5 ve Şekil 4-6). Kontrol gruplarında sferoid çaplarının zamanla artış gösterdiği, DMSO grubunda ise kontrole karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.9999$) belirlenmiştir. Ancak Emodin uygulanan gruplarda sferoid çaplarında belirgin bir küçülme tespit edilmiştir. Bu etki, doz ve zamanla birlikte artmıştır. 24 saatlik uygulamada 10 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda sferoid çaplarında anlamlı azalmalar gözlenmiştir (**** $p < 0.0001$). 48 ve 72 saatlik uygulamalarda bu küçülme etkisi daha belirgin hale gelmiştir. 10 μM üzeri tüm dozlarda sferoid çaplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde küçülme tespit edilmiştir (**** $p < 0.0001$). Sonuç olarak, Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak sferoid yapıların çaplarının anlamlı derecede azalmasıyla ortaya konmuştur.



Şekil 4.5 Emodin uygulamasının MCF-7 hücrelerinde sferoid oluşumuna etkisi

a) Emodin uygulaması ve sferoid çaplarını gösteren grafikler b) mikroskop ile görüntüleri. Sonuçlar 3 farklı deneyin ortalamasıdır. İki yönlü ANOVA ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. (**** $p < 0.0001$).

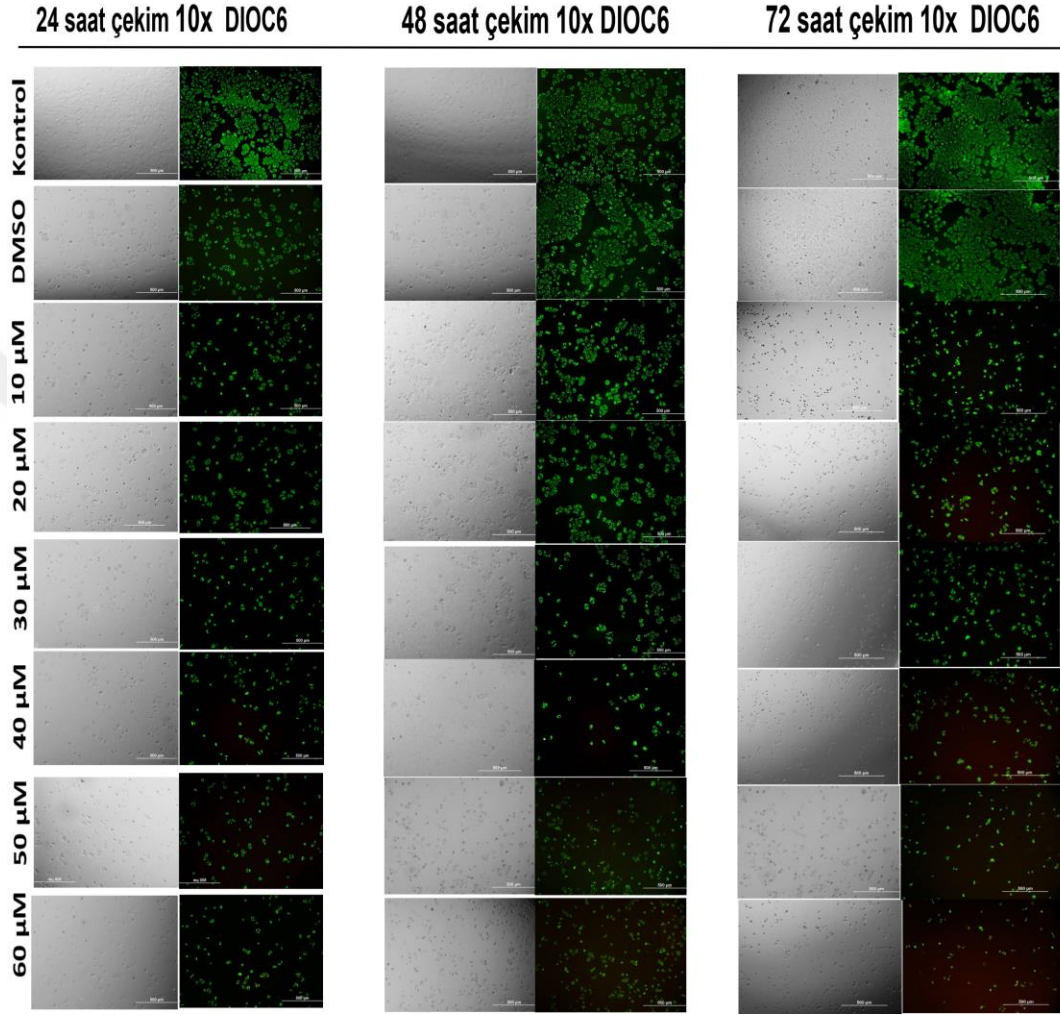


Şekil 4.6 Emodin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde sferoid oluşumuna etkisi a) Emodin uygulaması ve sferoid çaplarını gösteren grafikler b) mikroskop ile görüntüleri. Sonuçlar 3 farklı deneyin ortalamasıdır. İki yönlü ANOVA ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. (***p < 0.0001).

4.5. Emodin Uygulamasının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü ve Canlılık Üzerine Etkisinin Floresan Boyama ile Gösterilmesi

MCF-7 meme kanseri hücre hattında Emodin'in 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ M konsantrasyonlarında hücre ölümünü ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) değişikliklerini incelemek amacıyla floresan boyama testleri gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) üzerindeki etkisi, DiOC₆ floresan boyası kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve DMSO gruplarında floresan yoğunluğu yüksek düzeyde korunmuştur; bu durum mitokondriyal membran potansiyelinin stabil kaldığını göstermektedir. Emodin uygulanan gruplarda ise floresan sinyalinde doza ve zamana bağlı olarak belirgin bir azalma saptanmıştır. 24 saatlik uygulamalarda düşük dozlarda (10 μ M) hafif düzeyde azalma izlenirken, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda özellikle 30 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda floresan yoğunluğu anlamlı biçimde azalmıştır. Bu bulgular, Emodin'in MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran

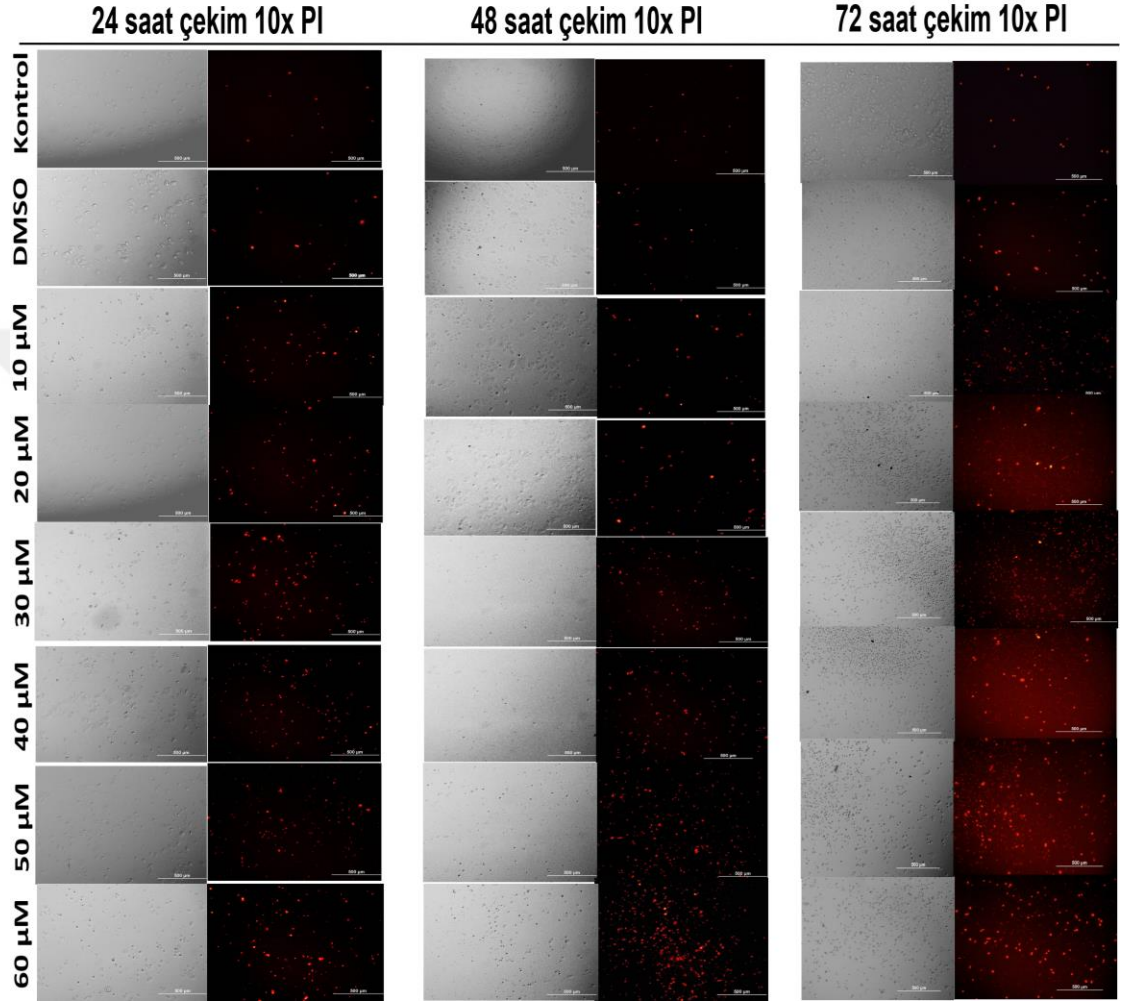
potansiyelini bozarak membran geçirgenliğini artırdığını ve bunun hücre canlılığında azalma ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (Şekil 4-7).



Şekil 4.7 Emodinin MCF-7 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeline etkisi

Emodin'in MCF-7 hücrelerinde hücre ölümünü indükleyip indüklediğini değerlendirmek amacıyla PI boyası kullanılmıştır. Kontrol ve DMSO gruplarında PI pozitif hücreler oldukça düşük düzeyde gözlenmiştir. Emodin uygulanan gruplarda ise PI pozitif hücre oranı, doza ve zamana bağlı olarak kademeli şekilde artmıştır. 24 saatlik uygulamalarda düşük dozlarda sınırlı artış izlenirken, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda, özellikle 30 µM ve üzeri konsantrasyonlarda PI pozitif hücrelerin oranında belirgin bir yükselme tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, Emodin'in artan konsantrasyonlarda

hücre membran bütünlüğünü bozarak membran geçirgenliğinde artışa ve buna bağlı hücre ölümünde yükselmeye yol açtığını göstermektedir (Şekil 4-8).

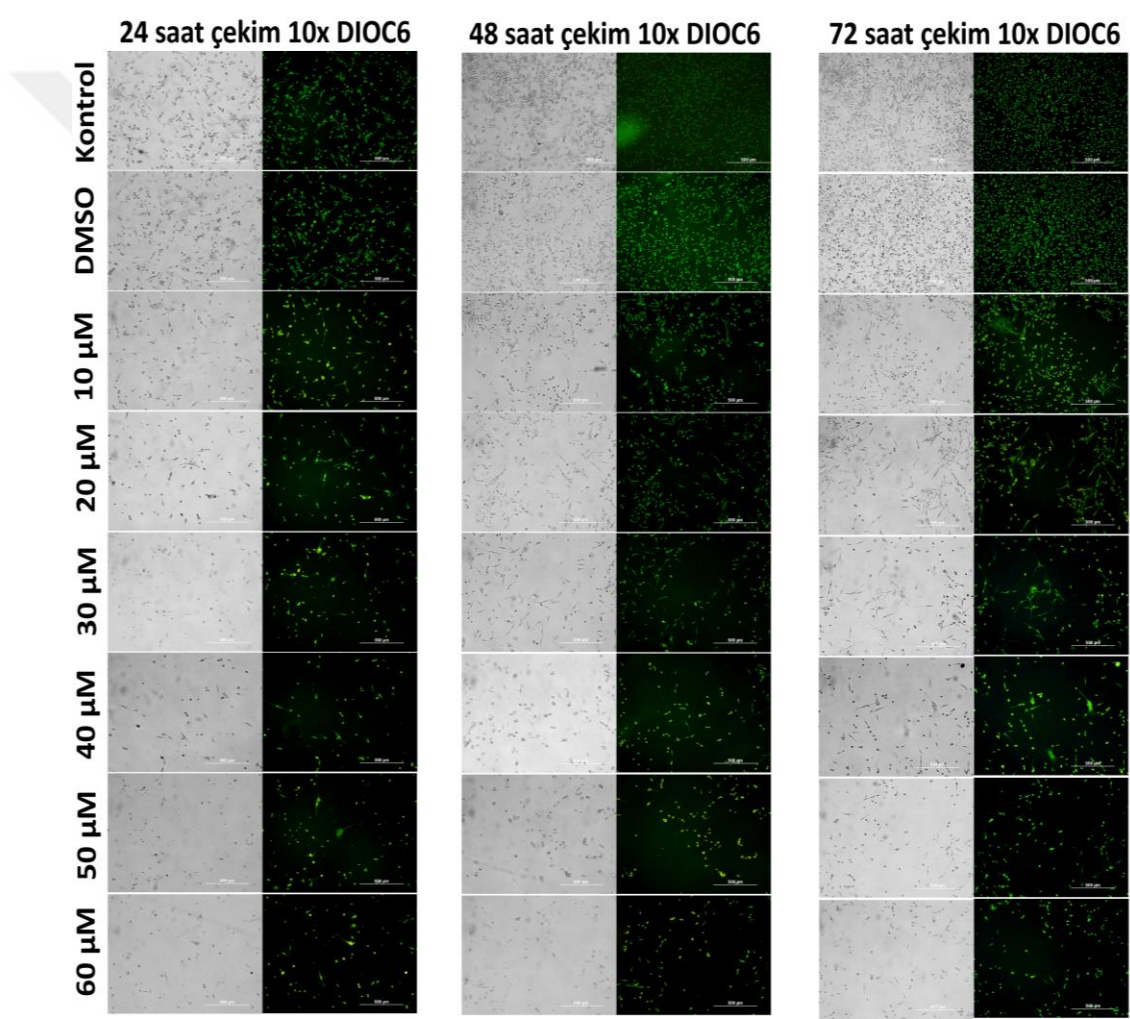


Şekil 4.8 Emodinin MCF-7 hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkileri

4.6. Emodin Uygulamasının MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölümü ve Canlılık Üzerine Etkisinin Floresan Boyama ile Gösterilmesi

Emodin'in MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) üzerindeki etkisi, DiOC₆ floresan boyası kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda, Emodin uygulanmayan hücrelerin floresan sinyalinin yüksek düzeyde kaldığı ve mitokondriyal bütünlüğün korunduğu görülmüştür. Benzer şekilde, DMSO kontrol grubunda da belirgin bir değişim saptanmamıştır. Emodin uygulanan hücrelerde ise floresan sinyali doza ve zamana bağlı olarak azalmıştır. 24

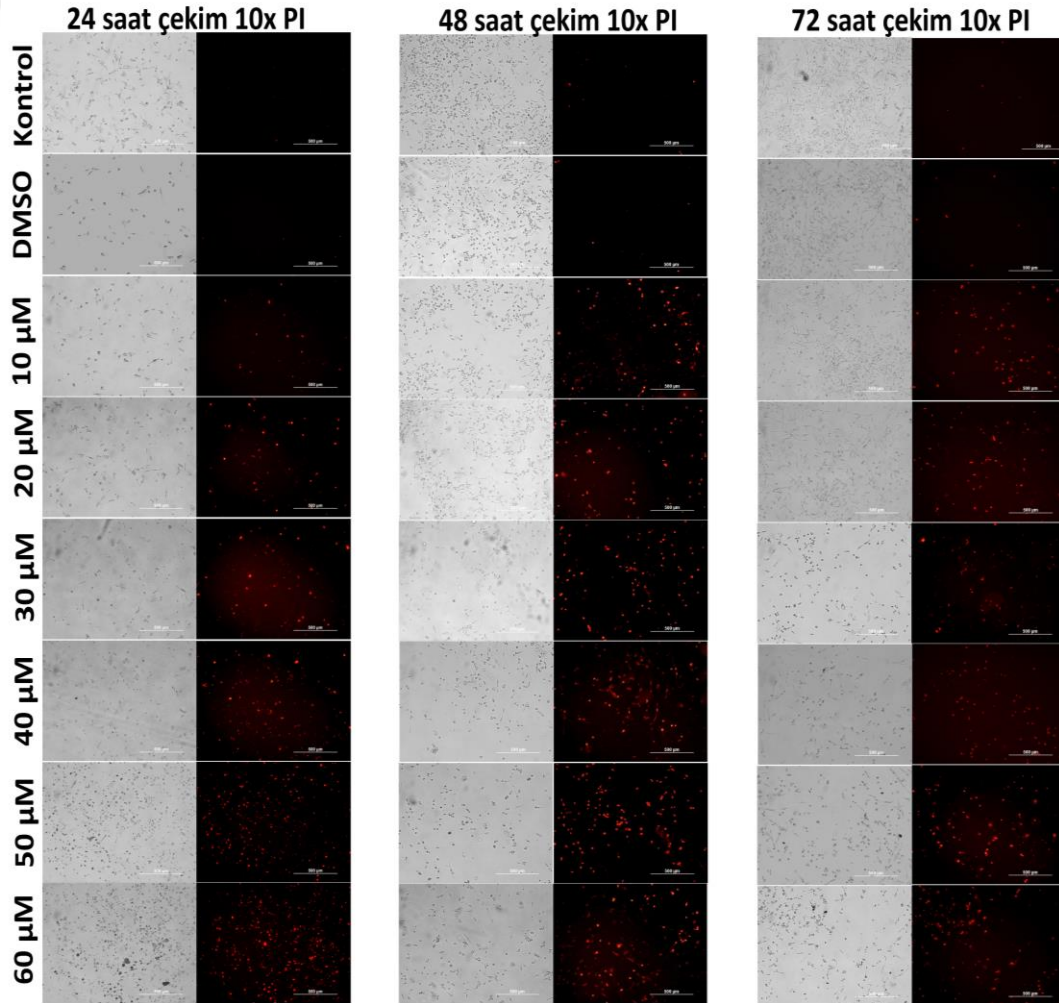
saatlik uygulamalarda düşük dozlarda (20 μ M) hafif bir azalma izlenirken, 48 saatlik uygulamalarda bu azalma daha belirgin hale gelmiştir. 72 saatlik uygulamalarda, özellikle yüksek konsantrasyonlarda (40–60 μ M) DiOC₆ ışımalarının büyük ölçüde azaldığı ve mitokondriyal membran potansiyelinin ciddi şekilde bozulduğu gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, Emodin'in MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini doza ve zamana bağımlı olarak azalttığını, dolayısıyla mitokondriyal fonksiyon kaybının hücre canlılığının azalmasıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir (Şekil 4-9).



Şekil 4.9 Emodinin MCF-7 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeline etkisi

Emodin'in MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkisi, Propidium İyodür (PI) floresan boyası kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve DMSO gruplarında PI pozitif hücre sayısında anlamlı bir değişim saptanmamış. Emodin

uygulanan hücrelerde ise PI pozitif hücre oranında belirgin bir artış saptanmış ve bu artışın hem doza hem de zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Düşük doz ve kısa süreli (24 saat) uygulamalarda minimal düzeyde PI boyanması gözlenirken, 48 saatlik uygulamalarda bu artış daha belirgin hale gelmiştir. 72 saatlik yüksek doz uygulamalarında (40–60 μM) ise PI floresan sinyal yoğunluğu anlamlı şekilde yükselmiş ve hücre popülasyonunun büyük bir kısmında zara geçirgenlik artışı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, Emodin'in MDA-MB-231 hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre zar bütünlüğünü bozduğunu, bunun sonucunda hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir (Şekil 4-10).



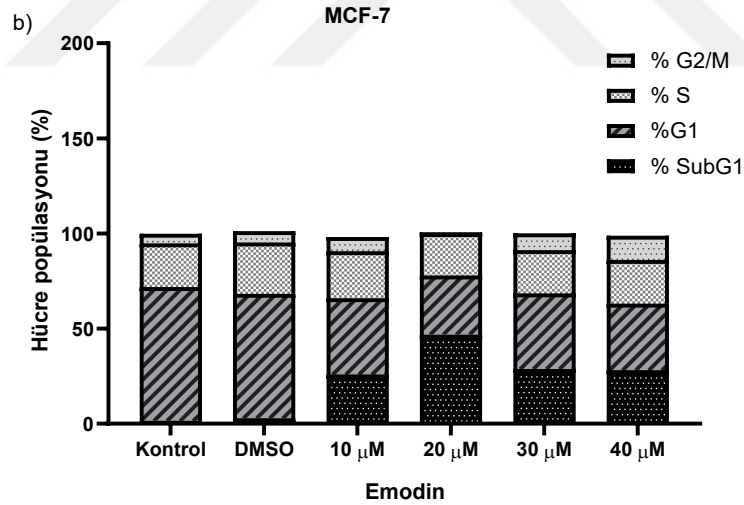
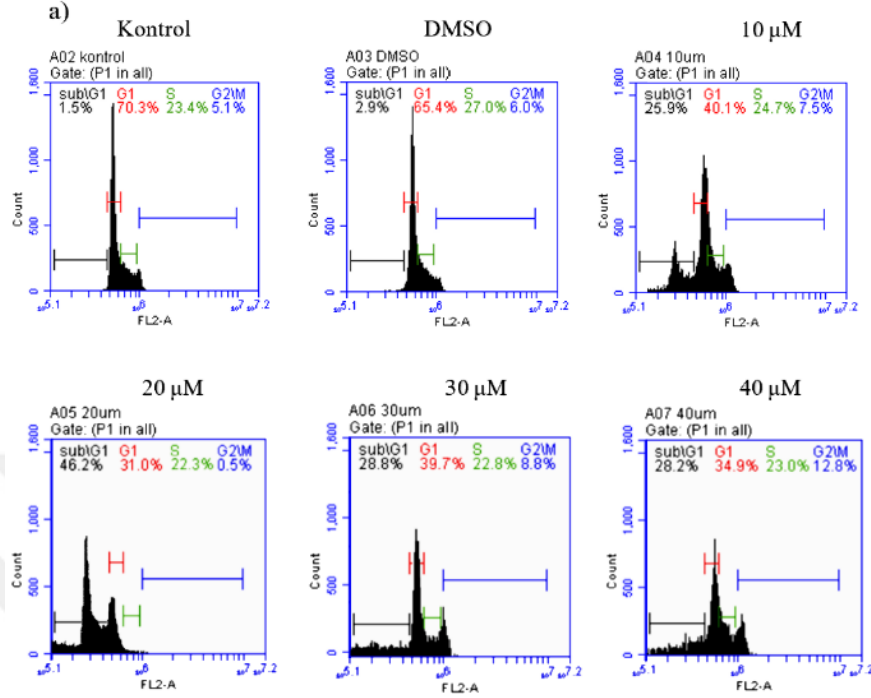
Şekil 4.10 Emodinin MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkileri

4.7. Meme Kanseri Hücrelerinde Emodin'in Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin İncelenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında Emodin'in hücre döngüsü üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla propidyum iyodür (PI) boyaması ile hücre akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Hücreler, farklı Emodin konsantrasyonlarında (10, 20, 30, 40 μ M) 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra fiksasyon ve PI boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, hücre popülasyonlarının hücre döngüsünün farklı fazlarındaki dağılımını (SubG1, G1, S, G2/M) göstermektedir (Şekil 4-11 ve 4-12). Deney sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, 48 saatlik Emodin uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinin hücre döngüsünde belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Kontrol grubunda SubG1 fazı %1,5 iken, G1 fazı %70,3, S fazı %23,4 ve G2/M fazı %5,1 olarak belirlenmiştir. DMSO kontrol grubunda, hücre döngüsü faz dağılımı kontrol grubuna benzerlik göstermiştir.

Emodin uygulanan gruplarda, SubG1 fazındaki hücre oranında konsantrasyona bağlı olarak belirgin bir artış saptanmıştır. Özellikle 10 μ M Emodin dozunda SubG1 oranı %25,9'a yükselmiştir. Bu artış, Emodin'in hücrelerde apoptotik süreci uyararak DNA fragmantasyonu ve nükleer bozulma ile karakterize SubG1 popülasyonunu artırdığını düşündürmektedir. G1 fazında, Emodin uygulamasına bağlı olarak hücre oranlarında doza bağımlı bir azalma gözlenmiş; 10 μ M Emodin dozunda G1 fazı %40,0'a düşmüştür. Bu azalma, G1'den sonraki fazlara geçişin hızlandığını veya G1 fazında ilerlemenin engellendiğini işaret edebilir. S fazındaki hücre oranı, 10 μ M Emodin dozunda %24,7'ye yükselerek hafif bir artış göstermiştir. G2/M fazında ise konsantrasyon artışıyla birlikte anlamlı bir birikim eğilimi saptanmıştır; 10 μ M Emodin dozunda G2/M oranı %7,5 iken 40 μ M'de %12,8'e ulaşmıştır. Bu durum, Emodin'in hücre döngüsünün geç mitoz evrelerinde ilerlemeyi kısmen engelleyebileceğini göstermektedir.

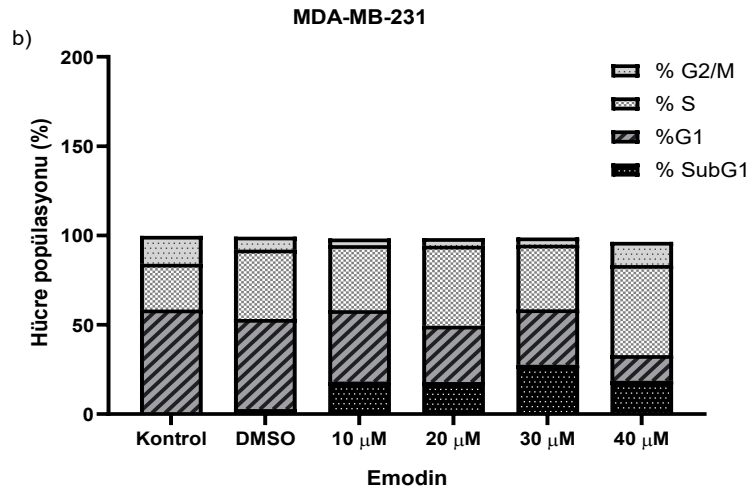
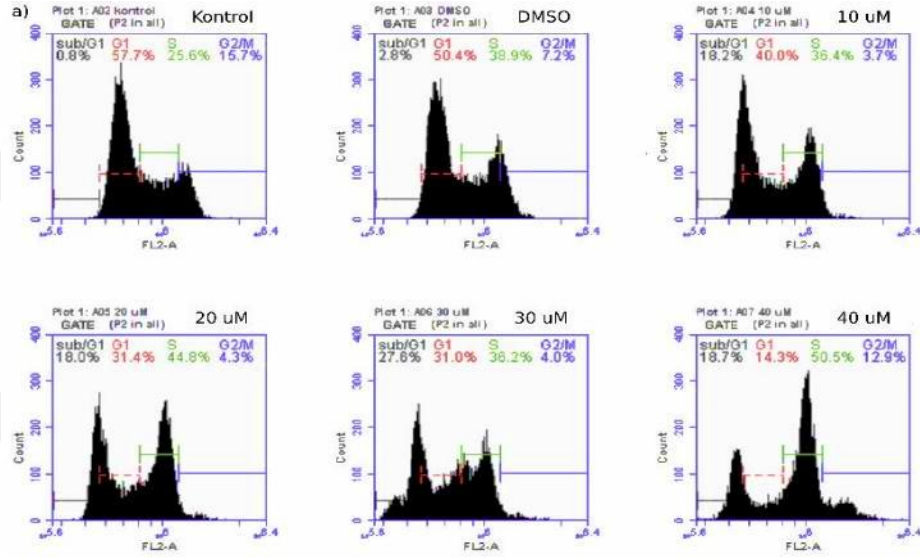
Genel olarak değerlendirildiğinde, SubG1 popülasyonundaki belirgin artış Emodin'in apoptozu indüklediğini, G2/M'deki kısmi birikimin ise hücre döngüsü progresyonunun yüksek dozlarda yavaşladığını göstermektedir.



Şekil 4.11 Emodin'in MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelenmesi
Elde edilen veriler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak sütun grafikleri halinde sunulmuştur

MDA-MB-231 hücrelerinde PI Analizi deney sonucunda elde ettiğimiz verilere göre, 48 saatlik Emodin uygulaması sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsünde belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Kontrol grubunda hücreler ağırlıklı olarak G1 fazında (%57,7) bulunmuş, SubG1 %0,8, S fazı %25,6 ve G2/M fazı %15,7 olarak belirlenmiştir. DMSO kontrol grubunda benzer değerler elde edilmiş. Emodin uygulamasıyla birlikte SubG1 popülasyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir; bu artışın doza bağımlı olması

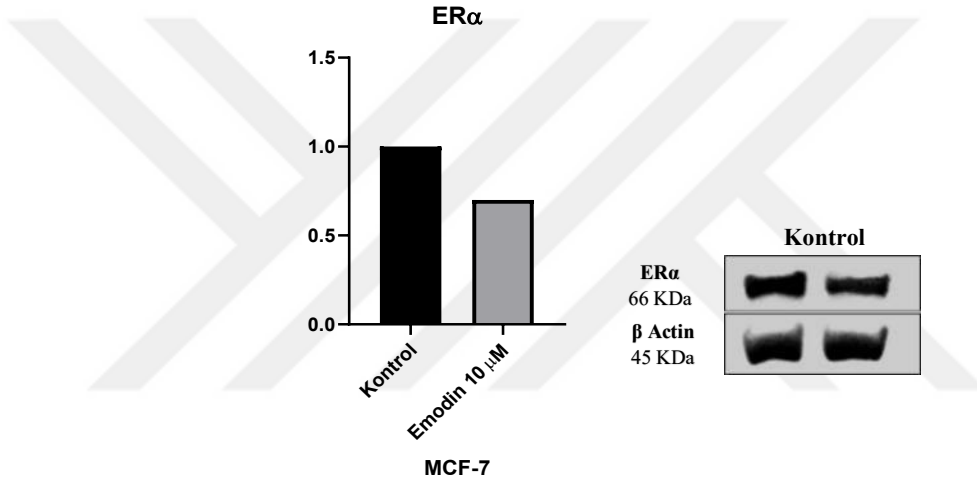
göstermektedir. 20 μM Emodin’de SubG1 oranı %18,0’a, 30 μM ’de %27,6’ya yükselmiştir. G1 fazındaki hücre oranı doz artışına paralel olarak azalmış; 20 μM ’de %31,4’e, 40 μM ’de %14,3’e düşmüştür. S fazında 20 μM Emodin uygulamasında anlamlı bir artış (%44,8) izlenmiş, bu da Emodin’in DNA replikasyon evresinde kısmi bir yığılmaya neden olabileceğini göstermiştir. G2/M fazında ise özellikle yüksek dozlarda belirgin bir birikim saptanmıştır; 10 μM ’de %15,7 olan oran, 40 μM Emodin uygulamasında %19,2’ye yükselmiştir.



Şekil 4.12 Emodin’in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelenmesi
Elde edilen veriler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak sütun grafikleri halinde sunulmuştur

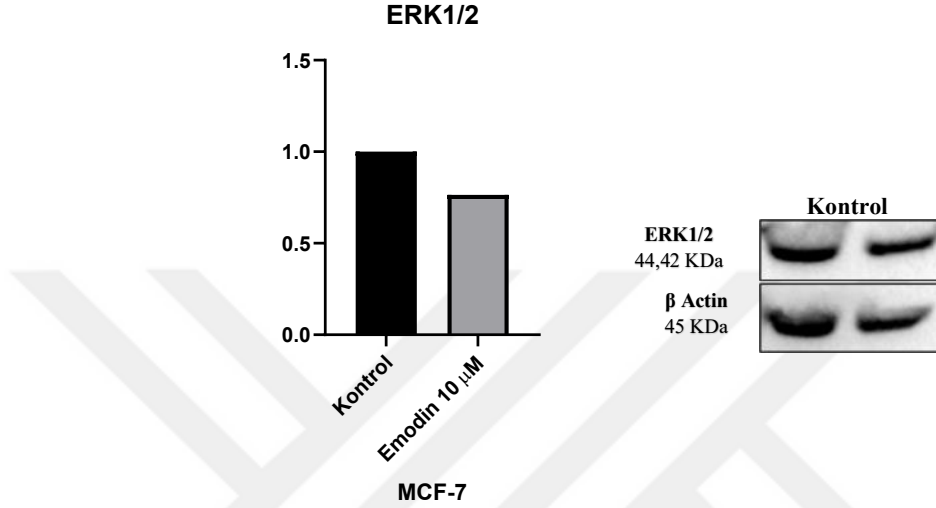
4.8. Meme Kanseri Hücrelerinde Emodin'in Östrojen Reseptör ve ERK1/2 Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4-13'te, 48 saatlik 10 μ M Emodin uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinde östrojen reseptörü alfa ($ER\alpha$) protein düzeylerinde meydana gelen değişim gösterilmektedir. Western blot analizinde, kontrol grubuna kıyasla Emodin uygulanan hücrelerde $ER\alpha$ bant yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın yaklaşık %40 oranında olduğunu ortaya koymuştur.



Şekil 4.13 MCF-7 hücrelerinde Emodin'in $ER-\alpha$ protein ekspresyon düzeyine etkisinin incelenmesi 40 μ g protein alınarak %12'lik SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmış, ardından hedef proteinler uygun antikorlarla problanmıştır. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmış, elde edilen sonuçlar ise GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla sütun grafikleri şeklinde görselleştirilmiştir.

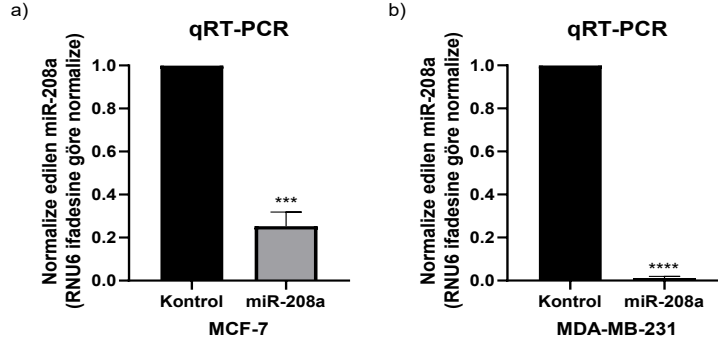
Şekil 4-14'te görüldüğü üzere, 10 µM Emodin uygulaması MCF-7 hücrelerinde ERK1/2 protein düzeyini belirgin şekilde azaltmıştır. Western blot sonuçları, kontrol grubuna kıyasla bant yoğunluğunda azalma olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14 MCF-7 hücrelerinde Emodin'in ERK1/2 protein ekspresyon düzeyine etkisinin incelenmesi 40 µg protein alınarak %12'lik SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmış, ardından hedef proteinler uygun antikorlarla problanmıştır. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmış, elde edilen sonuçlar ise GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla sütun grafikleri şeklinde görselleştirilmiştir.

4.9. AntimiR-208a Transfeksiyonu Yapılan Meme Kanseri Hücrelerinde miR-208a İfadesinin İncelenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine, anti-miR-208a transfekte edildikten sonra hücrelerdeki miR-208a seviyesindeki değişiklikler qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları, anti-miR-208a uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde miR-208a ekspresyonunun, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını göstermiştir (Şekil 4-15).

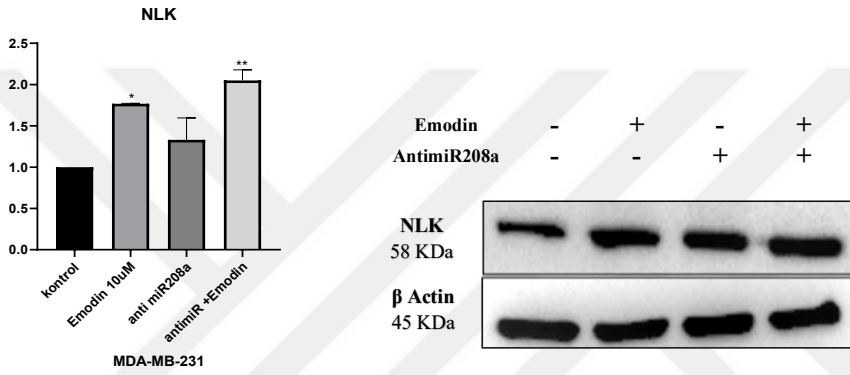
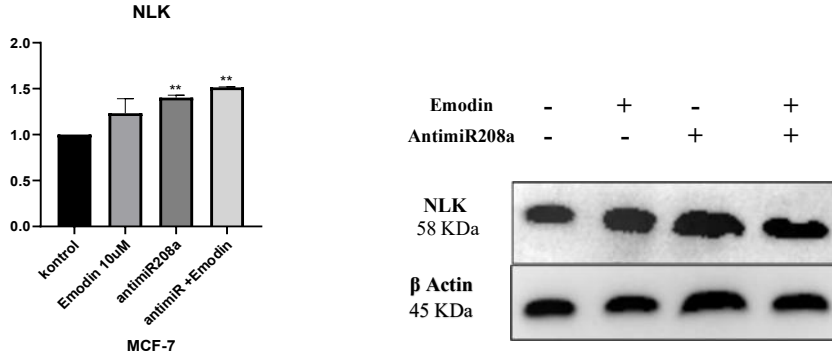


Şekil 4.15 miR-208a seviyelerinin qPCR ile gösterilmesi
a) MCF-7 hücrelerindeki b) MDA-MB-231 hücrelerindeki miR-208a ekspresyon seviyeleri PFAFFL yöntemiyle değerlendirilmiştir. Veriler RNU6 referansına göre normalize edilmiş ve GraphPad Prism kullanılarak analiz edilmiştir (**p < 0.001 ****p<0.0001).

4.10. Meme Kanseri Hücrelerinde AntimiR-208a ve Emodin'in NLK Proteininin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi

Şekil 4-16'te görüldüğü üzere, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin (10–20 µM) ve anti-miR-208a uygulamalarının NLK protein düzeyleri üzerindeki etkileri Western blot analiziyle değerlendirilmiştir. MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna göre Emodin uygulaması NLK düzeyinde hafif bir artış oluşturmuş (~1,2 kat), anti-miR-208a ise bu ekspresyonu anlamlı biçimde yükseltmiştir (~1,3 kat; p < 0,01). Her iki etkenin birlikte uygulanmasıyla NLK artışı korunarak yaklaşık 1,5 kata ulaşmıştır (p < 0,01).

MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna göre Emodin NLK düzeyini ~1,4 kat artırmış (p < 0,05), anti-miR-208a tek başına anlamlı etki göstermemiştir. Ancak Emodin'in anti-miR-208a ile birlikte uygulanması, NLK ekspresyonunun yaklaşık 2 kat artış göstermesiyle sonuçlanmıştır (p < 0,01).



Şekil 4.16 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin ve anti-miR-208a'nın NLK protein düzeylerine etkisi

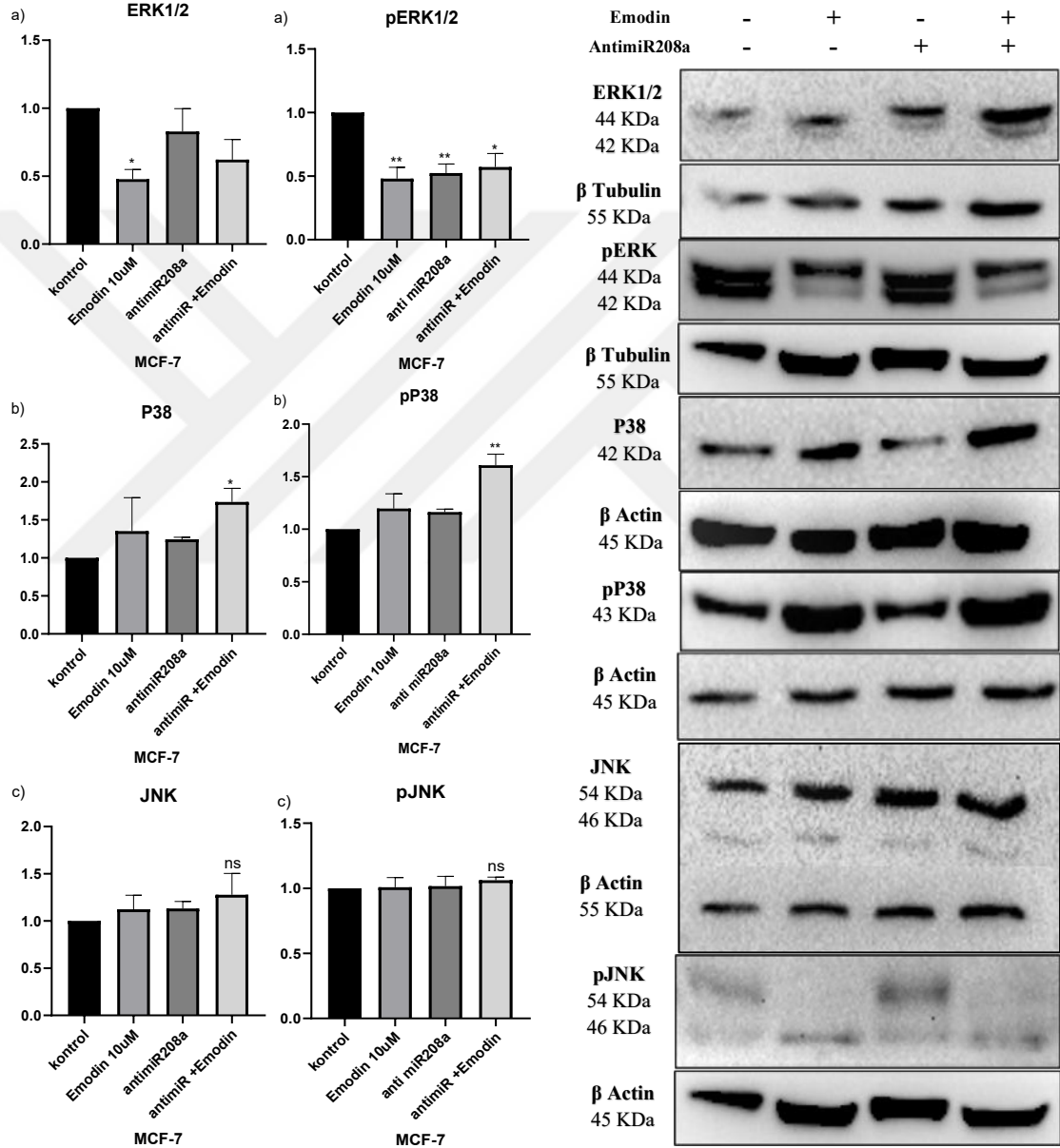
Hücre lizatlarından izole edilen proteinler Western blot ile incelenmiş, temsili NLK ve β-Aktin bantları ile normalize edilmiş kantitatif analiz sonuçları sunulmuştur.

4.11. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Anti-miR-208a ve Emodinin MAPK Sinyal Yolağı Proteinlerinin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin Analizi

Şekil 4-17 ve 4-18'de görüldüğü üzere, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin (10–20 µM) ve anti-miR-208a uygulamalarının ERK1/2, p38 ve JNK proteinlerinin toplam ve fosforile formları üzerindeki etkileri Western blot analiziyle incelenmiştir.

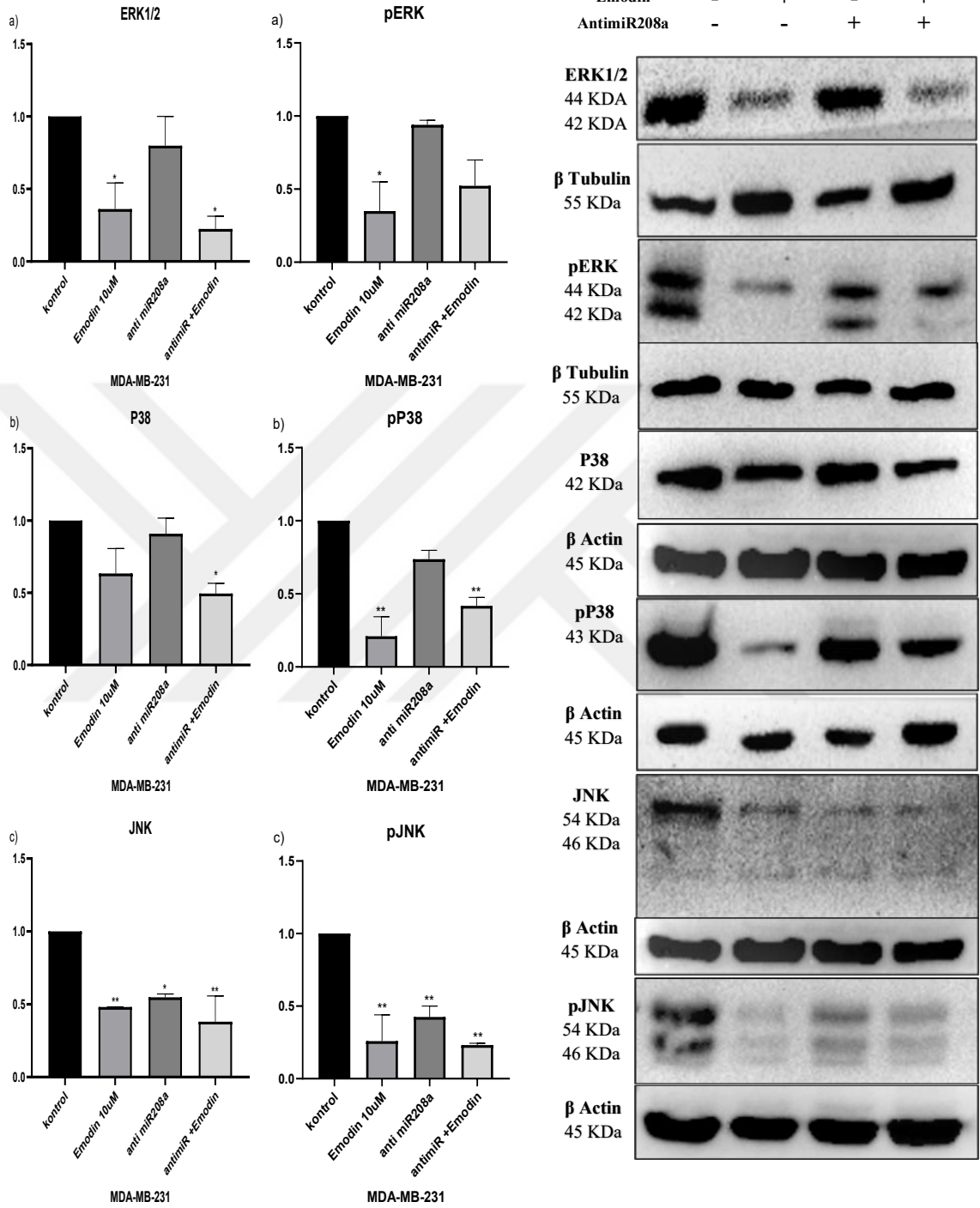
MCF-7 hücrelerinde, Emodin uygulaması ERK1/2 ve p-ERK düzeylerinde belirgin bir azalmaya yol açmıştır ($p < 0.05$), bu da MAPK/ERK yolunun baskılandığını göstermektedir. Anti-miR-208a tek başına da benzer şekilde p-ERK seviyesini düşürmüş, ancak Emodin ile birlikte uygulandığında bu azalma korunmuştur. Buna karşın p38 proteininde anlamlı bir artış gözlenmiş ($p < 0.05$), p-p38 düzeyinin ise özellikle birlikte uygulamada en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). JNK ve p-JNK düzeylerinde ise anlamlı değişim saptanmamıştır (Şekil 4-17).

MDA-MB-231 hücrelerinde, Emodin uygulaması ERK1/2, p-ERK, p38, p-p38, JNK ve p-JNK düzeylerinde genel bir azalmaya neden olmuştur ($p < 0.05$). Anti-miR-208a uygulaması tek başına ERK1/2 fosforilasyonunu azaltmış, ancak Emodin ile birlikte uygulandığında bu azalma daha da belirginleşmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 4-18).



Şekil 4.17 MCF-7 hücrelerinde Emodin ve miR-208a'nın MAPK yolak proteinlerinin seviyelerine etkilerinin incelenmesi

a)ERK1/2, pERK1/2, b)P38, Pp38, ve c)JNK, pJNK protein ekspresyon seviyeleri immünoyotlama ile değerlendirilmiştir. İzole edilen proteinlerden 40 µg'lık örnekler %12'lik SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmış, hedef proteinler spesifik antikorlarla problanmış. Yükleme kontrolü için β-Actin ve β-Tubulin kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla sütun grafiği formatında görselleştirilmiştir (** $p < 0.01$ * $p < 0.1$)

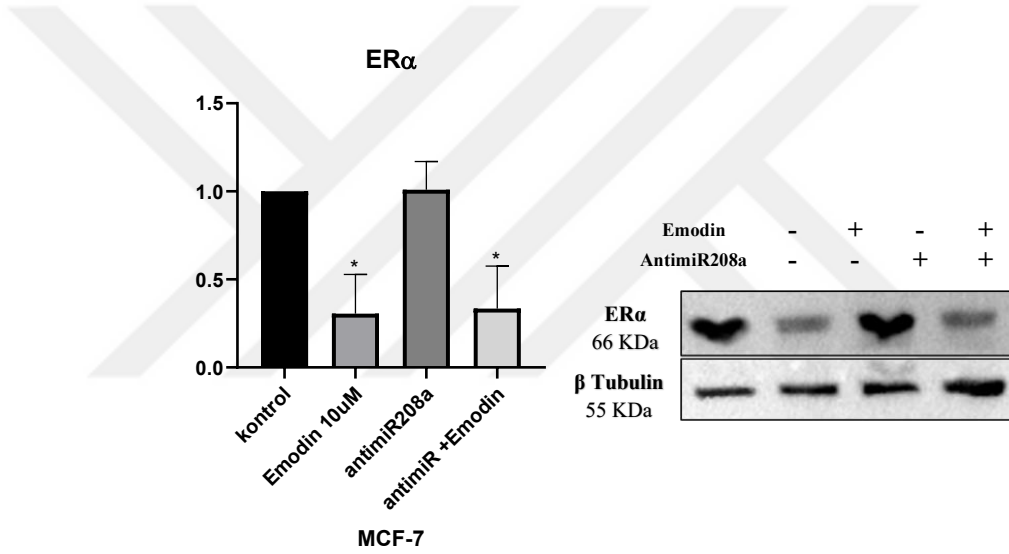


Şekil 4.18 MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin ve miR-208a'nın MAPK yolak proteinlerinin seviyelerine etkilerinin incelenmesi

a)ERK1/2, pERK1/2, b)P38, Pp38, ve c)JNK, pJNK protein ekspresyon seviyeleri immünoiblotlama ile değerlendirilmiştir. İzole edilen proteinlerden 40 µg'lık örnekler %12'lik SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmış, hedef proteinler spesifik antikorlarla prolanmıştır. Yükleme kontrolü için β-Actin ve β-Tubulin kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla sütun grafiği formatında görselleştirilmiştir (**p<0.01 *p<0.1).

4.12. Meme Kanseri Hücrelerinde Anti-miR-208a ve Emodin'in Östrojen Reseptör Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

Kontrol grubuna kıyasla, 10 μ M Emodin uygulaması MCF-7 hücrelerinde ER α protein düzeyini anlamlı biçimde azaltmıştır (*p<0.05). Anti-miR-208a transfeksiyonu tek başına ER α ekspresyonunda belirgin bir değişim oluşturmamış, ancak Emodin ile birlikte uygulandığında ER α düzeyindeki azalma korunmuştur. Bu sonuç, Emodin'in östrojen reseptörü aracılı proliferatif sinyalleşmeyi baskıladığını ve anti-miR-208a'nın bu baskılayıcı etkiyi değiştirmediğini göstermektedir (Şekil 4.19).



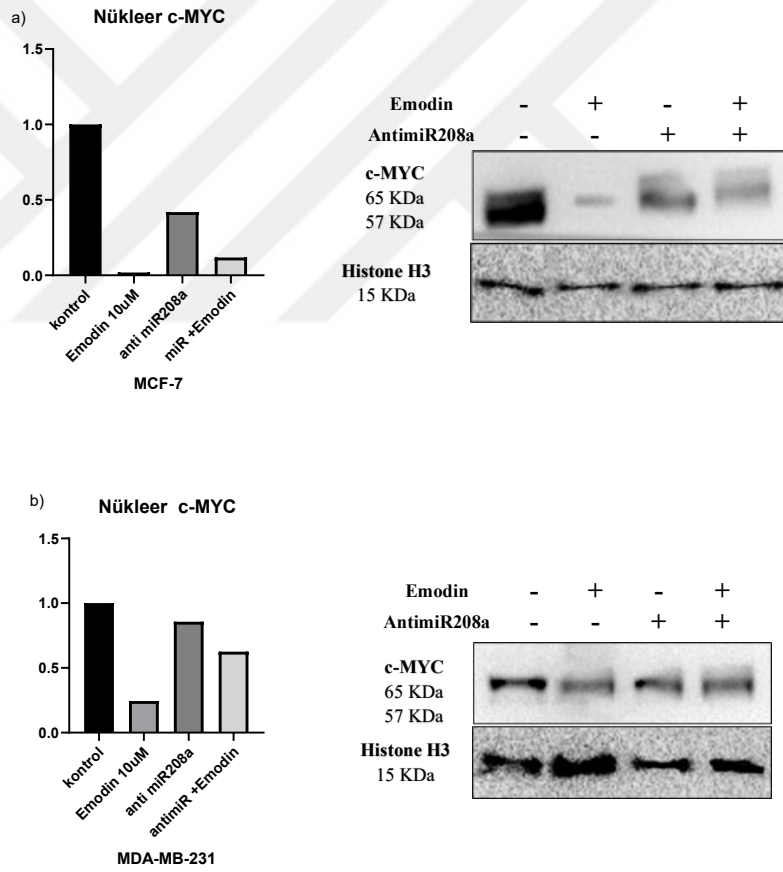
Şekil 4.19 MCF-7 hücrelerinde Emodin ve miR-208a uygulamasının ER α protein seviyesine etkilerinin incelenmesi

İzole edilen proteinlerden 40 μ g'lık örnekler %12'lik SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmış, hedef proteinler spesifik antikorlarla prolanmıştır. Yükleme kontrolü için β -Tubulin kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar GraphPad Prism yazılımı aracılığıyla sütun grafiği formatında görselleştirilmiştir (*p<0.1).

4.13. Meme Kanseri Hücrelerinde AntimiR-208a ve Emodinin Nükleer c-MYC Proteininin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin İncelenmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Emodin (MCF-7 için 10 μ M, MDA-MB-231 için 20 μ M) ve anti-miR-208a'nın tek başına veya kombine uygulamalarının nükleer c-MYC protein düzeylerine etkisi Western blot (immüno blotlama) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Nükleer fraksiyondan izole edilen proteinler incelenmiş, Histon H3 yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Temsili blot

görüntüleri ve normalize edilmiş kantitatif analiz sonuçları Şekil 4-20’de sunulmuştur. Şekilde görüldüğü üzere, 10 µM Emodin uygulaması MCF-7 hücrelerinde nükleer c-MYC protein düzeyini belirgin şekilde azaltmıştır. Anti-miR-208a tek başına uygulandığında c-MYC ekspresyonunda anlamlı bir değişim saptanmamış; ancak Emodin ile birlikte uygulanması, bu azalmayı koruyarak c-MYC seviyesini indirmişti. MDA-MB-231 hücrelerinde ise Emodin uygulaması c-MYC ekspresyonunu azaltmış, anti-miR-208a ile birlikte uygulandığında bu baskılayıcı etki sürmüştür. Bu bulgular, Emodin’in nükleer c-MYC düzeyini düşürerek hücre proliferasyonunu baskıladığını ve anti-miR-208a’nın bu etkiyi güçlendirmeden, ancak yönünü değiştirmeden sürdürdüğünü göstermektedir.



Şekil 4.20 Emodin ve miR-208a’nın c-MYC protein seviyesine etkisinin araştırılması
a) MCF-7 ve b)MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin ve anti-miR-208a’nın tek başına ve kombine uygulamalarının c-MYC protein düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Hücrelerden izole edilen proteinler Western blot ile incelenmiş, temsili c-MYC ve Histon H3 bantları ile normalize edilmiş kantitatif analiz sonuçları sunulmuştur

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam ederken ve mevcut tedavi yöntemleri bazı hasta gruplarında sınırlı etki gösterirken, tedaviye direnç gelişimi gibi problemler, alternatif ve daha etkili tedavi ajanlarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu tez çalışmasında, doğal bir antrakinon türevi olan Emodin'in, östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerindeki anti-kanser etkileri değerlendirilmiştir. Bulgularımız, Emodin'in uygulandığında, hücre canlılığı, proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü düzenlenmesi ve koloni oluşumu gibi temel hücresel süreçleri anlamlı şekilde modüle ettiğini göstermektedir. Ayrıca, Emodin'in ve Nemo-Like kinazın MAPK ve ER α gibi anahtar sinyal yolları üzerinde düzenleyici etkiler gösterdiği saptanmıştır. Emodin ile ilişkili NLK etkisini değerlendirmek ve NLK ekspresyonunu artırmak amacıyla miR-208a inhibitörü (anti-miR-208a) uygulandı (Y. Huang vd., 2016b)(Yan vd., 2016b). Bu bulgular, Emodin'in ve antimiR-208a'nın hedeflenmesinin, meme kanseri tedavisinde potansiyel yeni bir yaklaşım olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada gerçekleştirilen MTT ve growth assay, Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığını ve proliferasyonu inhibe ettiğini tutarlı biçimde ortaya koymuştur (Şekil 4-1). MTT analizi sonuçları, Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücre sağkalımını anlamlı biçimde azalttığını göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde, 10–60 μ M aralığındaki Emodin uygulamaları 24. saatten itibaren canlılıkta kademeli bir düşüşe yol açmıştır; özellikle 48 ve 72. saatlerde bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). Canlılık oranı 10 μ M'de yaklaşık %80'e, 30 μ M ve üzeri dozlarda ise %50'nin altına düşmüştür. Bu sonuç, Emodin'in ER α -pozitif hücrelerde metabolik aktiviteyi ve sağkalımı baskılayarak antikanser etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinde ise Emodin'in etkisi daha belirgin ve doza daha duyarlı seyretmiştir. 20 µM ve üzeri konsantrasyonlarda sağkalım oranı 48. saatte %50'nin altına düşmüş, 60 µM'de %30 civarına kadar gerilemiştir. Bu durum, Emodin'in üçlü negatif fenotipe sahip hücrelerde de yüksek sitotoksik potansiyel taşıdığını göstermektedir. Sonuç olarak MTT analizi, Emodin'in her iki hücre hattında da mitokondriyal aktiviteyi baskılayarak metabolik canlılığı azalttığını ve bu etkinin zamanla güçlenen bir sitotoksik yanıt oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Growth assay sonuçları (Şekil 4-2)'da, Emodin'in hem MCF-7 hem MDA-MB-231 hücrelerinde hücre büyüme hızını ve sağkalım oranını belirgin biçimde azalttığını göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde, kontrol ve DMSO gruplarında 72. saate kadar hücre sayısında düzenli bir artış gözlenirken, 10–40 µM Emodin uygulaması bu artışı anlamlı biçimde engellemiştir. Özellikle 48. saatte 10 µM Emodin grubunda hücre sayısı başlangıç değerinin yaklaşık yarısına düşmüş, 30–40 µM dozlarında bu azalma daha da belirginleşmiştir ($p < 0.0001$). Bu durum, Emodin'in hücre büyümesini yavaşlatarak sağkalımını azalttığını göstermektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde de benzer bir eğilim izlenmiş, ancak büyüme üzerindeki baskılayıcı etki daha erken ve güçlü biçimde ortaya çıkmıştır. 20–40 µM Emodin uygulamalarında 48. saatte hücre sayısı belirgin biçimde azalmış, 72. saatte kontrol grubunun yalnızca %30'u düzeyinde kalmıştır. Bu bulgular, Emodin'in doz ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini ve sağkalımını baskıladığını, bu etkinin özellikle üçlü negatif fenotipe sahip hücrelerde (MDA-MB-231) daha belirgin olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu bulgular, Emodin'in hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde hücre büyümesini ve sağkalımını baskıladığına dair önceki raporlarla uyumludur. Fang ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında, MCF-7 hücrelerinde 20–40 µM Emodin uygulamasının doza bağlı olarak hücre çoğalmasını azalttığı ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Benzer şekilde Zhang ve arkadaşları (2021), Emodin'in MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını ve koloni oluşum kapasitesini azalttığını rapor etmişlerdir. (Fang vd., 2019b) (N. Zhang vd., 2021b). Dolayısıyla bu çalışma, literatürde bildirilen Emodin'in antiproliferatif ve hücre sağkalımını azaltıcı etkilerini doğrulamakta; ayrıca

farklı moleküler alt tiplerde (ER α -pozitif ve üçlü negatif) benzer yönelimlerin bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Koloni oluşum analizi, Emodin'in her iki hücre hattında da klonojenik kapasiteyi doza bağlı olarak azalttığını göstermiştir (Şekil 4-3, 4-4). MCF-7 hücrelerinde 10–40 μ M Emodin uygulamasıyla koloni sayısı ve ortalama koloni çapında anlamlı azalma saptanmıştır ($p < 0.01$ – 0.001). Kontrol ve DMSO gruplarında hücreler daha büyük ve yoğun koloniler oluştururken, Emodin uygulamasıyla koloniler küçülmüş ve sayıca azalmıştır. Benzer biçimde, MDA-MB-231 hücrelerinde de Emodin uygulaması klonojenik potansiyeli belirgin biçimde düşürmüştür. 20–40 μ M dozlarında hem koloni sayısı hem çapı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış ($p < 0.0001$), bu da Emodin'in üçlü negatif hücrelerde daha güçlü bir baskılayıcı etki oluşturduğunu göstermektedir.

Bu bulgular, Emodin'in kanser hücrelerinin uzun dönemli yaşama ve koloni oluşturma potansiyelini baskılayarak klonojenik büyümeyi inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. Nitekim Liu ve arkadaşlarının (2023) çalışmasında da, Emodin uygulamasının (20–40 μ M) meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu anlamlı biçimde azalttığı ve bu etkinin doz bağımlı sitotoksosite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (X. Liu vd., 2023). Bizim sonuçlarımız da literatürde bildirilen bu verilerle uyumlu olup, Emodin'in hem ER α -pozitif (MCF-7) hem üçlü negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinde benzer biçimde klonojenik aktiviteyi baskıladığını göstermektedir.

Üç boyutlu (3D) sferoid kültürleri, Emodin tedavisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde sferoid oluşumu ve büyüme boyutunu anlamlı biçimde azalttığını göstermiştir (Şekil 4-5 ve Şekil 4-6). 3D kültür modelleri, hücrelerin in vivo koşullara daha yakın davranışlar sergilemesini sağlar ve bu yönüyle çalışma bulgularının klinik uygulamalara uyarlanması açısından daha güvenilir bir temel sunar. Buna karşın, iki boyutlu (2D) hücre kültürlerinde yapılan ilaç testleri genellikle sınırlı bilgi sağlamakta ve hücre-hücre etkileşimlerini tam olarak yansıtmamaktadır. Oysa 3D çok hücreli modeller, geleneksel in vitro ve hayvan modelleri arasındaki biyolojik farkı kapatarak ilaç etkinliğinin daha doğru değerlendirilmesine olanak tanımaktadır (Ravi vd., 2015). Bu sonuçlar, Emodin'in yalnızca 2D sistemlerde değil, aynı zamanda 3D kültür ortamlarında da tümör büyümesini baskılayabileceğini ortaya koymaktadır (Tofani vd., 2020).

Elde edilen veriler, meme kanseri hücrelerinde Emodin'in sitotoksik etkileri, özellikle mitokondriyal disfonksiyon ve hücre zarı bütünlüğündeki değişiklikler açısından floresan mikroskopi teknikleri (DiOC₆ ve PI boyama) kullanılarak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen morfolojik ve kantitatif veriler (Şekil 4-7, 4-8, 4-9 ve 4-10), Emodin'in hücre ölümünü indüklemesindeki potansiyel mekanizmalarına dair önemli bilgiler sunmaktadır. DiOC₆ boyaması, sağlıklı mitokondrinin varlığını ve MMP'nin korunmasını yansıtan parlak yeşil floresans ile karakterize edilmektedir. Kontrol ve DMSO gruplarında gözlemlenen homojen ve yoğun yeşil ışımaya, bu hücre popülasyonlarının sağlıklı bir mitokondriyal fonksiyona sahip olduğunu ve deneysel koşulların başlangıçta hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını doğrulamaktadır. Ancak, Emodin uygulamasının ardından gözlemlenen doza ve zamana bağımlı DiOC₆ floresansındaki belirgin azalma, Emodin'in meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini bozduğunu açıkça göstermektedir. MMP'deki bu düşüş, apoptozun erken evrelerinden biri olarak kabul edilen kritik bir olaydır. Apoptozda, mitokondriyal dış membran permeabilitesinin artması (MOMP), mitokondriyal intermembran boşluğundan sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin salınımına yol açar. Bu durum, kaspaz kaskadının aktivasyonu için temel bir adımdır. Dolayısıyla, DiOC₆ floresansındaki azalma, Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz sinyal yolağını mitokondriyal düzeyde aktive ettiğini düşündürmektedir.

Propidyum İyodür (PI) boyaması, hücre zarı bütünlüğü bozulmuş olan ölü veya ölmekte olan hücreleri belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PI'nın hücre zarına nüfuz etmesi ve DNA'ya bağlanması, hücre ölümünün geç evrelerini veya nekrotik süreçleri gösterir. Kontrol ve DMSO gruplarında minimal veya hiç PI floresansı gözlenmemesi, bu gruptaki hücrelerin zar bütünlüğünün korunduğunu ve doğal olarak düşük bir hücre ölüm oranına sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, Emodin konsantrasyonu ve inkübasyon süresi arttıkça, kırmızı PI pozitif hücre popülasyonunda dramatik bir artış izlenmiştir. Bu bulgu, Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre ölümünü indüklediğini ve bu hücrelerin artan permeabiliteye sahip hücre zarları nedeniyle boyayı alabildiğini ortaya koymaktadır. DiOC₆ sonuçlarıyla birleştirildiğinde, PI pozitifliğindeki artış, Emodin'in neden olduğu mitokondriyal disfonksiyonun

nihayetinde hücre ölümüne yol açtığını ve bu ölümün önemli bir kısmının apoptoz mekanizması üzerinden ilerlediğini desteklemektedir.

Floresan mikroskobu görüntülerinde gözlemlenen hücre morfolojisindeki değişiklikler (büzülme, yuvarlaklaşma, substrattan ayrılma), Emodin'in sitotoksik etkisine paralel seyretmektedir. Bu morfolojik özellikler, apoptozun karakteristik belirtileriyle uyumludur. Apoptoza giren hücreler büzülür, Apoptoz sırasında kromatin yoğun bir şekilde yoğunlaşır ve nükleer membranın çevresine doğru göç eder, bu da nükleusun küçülmesine ve parçalanmasına yol açar. Aynı anda hücre zarı, karakteristik blebbing (tomurcuklanma) gösterir ve bunun sonucunda apoptotik cisimcikler oluşur. Bu apoptotik cisimcikler fagositler tarafından etkin bir şekilde temizlenir ve bu süreç iltihabi bir yanıt tetiklemeden gerçekleşir. Yüksek Emodin dozlarında ve uzun inkübasyon sürelerinde bu morfolojik değişikliklerin belirginleşmesi, Emodin'in apoptozu zamanla ve doza bağlı olarak ilerlettiğini göstermektedir. Bu bulgular, önceki çalışmalarla da uyumludur; örneğin, Zhang ve ark. (2021) ile Chen ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmalarda Emodin'in meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal yol üzerinden apoptozu indüklediği ve hücre morfolojisinde benzer değişiklikler oluşturduğu bildirilmiştir (N. Zhang vd., 2021c; Q. Zhang vd., 2022). Elde edilen bu veriler, Emodin'in meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyerek anti-kanser potansiyelini desteklemekte ve klinik öncesi çalışmalarda meme kanseri tedavisinde potansiyel bir aday olarak değerlendirilmesini güçlendirmektedir. Gelecekteki çalışmalar, Emodin'in bu mitokondriyal yolları hangi spesifik moleküler hedefler aracılığıyla etkilediğini (Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspaz aktivasyonu) daha detaylı inceleyerek, bu doğal bileşiğin anti-kanser mekanizmalarına dair daha derinlemesine bir anlayış sağlayabilir (X. Dong vd., 2018).

Hücre döngüsü tutuklanması, kanser hücrelerinin çoğalmasının baskılanması için güçlü bir mekanizmadır. Birkaç antikanser ilacının antikanser aktivitesi, hücre döngüsü tutuklanmasının indüklenmesine atfedilmiştir (Ma vd., 2018).

Deneyler sonucunda, Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisini mekanistik düzeyde anlamak amacıyla, 48 saatlik Emodin (10, 20, 30, 40 μ M) uygulaması sonrası hücre döngüsü dağılımları propidyum iyodür (PI) boyaması ve hücre akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Elde edilen

sonuçlar (Şekil 4-11 ve 4-12), Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsü progresyonunu etkileyerek antiproliferatif etkisini gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Emodin uygulanan MCF-7 hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla Sub-G1 popülasyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış, özellikle 30 μ M ve 40 μ M dozlarında belirginleşmiş olup, Emodin'in hücre döngüsünde apoptoza yönelim oluşturduğunu göstermektedir. G1 fazındaki hücre oranı doza bağlı olarak azalmış, bu da G1'den çıkışın durdurulması yerine hücrelerin programlı hücre ölümüne (apoptoza) yönlendiğini düşündürmektedir. Kontrol grubunda G1 fazındaki hücre oranı %70.3 iken, Emodin uygulanan gruplarda doza bağlı olarak G1 fazında belirgin bir azalma gözlenmiştir. 10 μ M Emodin'de G1 %40.1'e düşerken, 20 μ M'de %31.0 gibi çok düşük bir seviyeye inmiştir. 30 μ M ve 40 μ M'de sırasıyla %39.7 ve %34.9 olarak kaydedilen G1 popülasyonu, hücrelerin S veya G2/M fazlarına geçişinin engellendiğini veya G1'den doğrudan hücre ölümüne yönlendiğini düşündürmektedir. S fazı (DNA sentezi), tüm dozlarla hafif bir artış veya sabit kalıyor. G2/M fazı, özellikle 30 ve 40 μ M'de %8.8 ve %12.8'e kadar artmıştır. Bu, G2/M kontrol noktasında duruş (checkpoint arrest) olduğunu gösterir. DNA hasarını onarmak için zaman kazandırmak amacıyla tetiklenir.

Bu PI hücre döngüsü analizi sonuçları, Emodin'in MDA-MB-231 hücrelerinde 48 saatlik uygulama sonrasında hem hücre ölümü indüksiyonu (SubG1 artışı) hem de yüksek dozlarda hücre döngüsü arresti özellikle S fazında birikim (40%) yoluyla antiproliferatif aktivite gösterdiğini kanıtlamaktadır. S fazındaki bu tutuklama, Emodin'in siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar) gibi hücre döngüsü düzenleyici proteinleri etkileyerek hücre döngüsü kontrol noktalarını hedef aldığını düşündürmektedir. Emodin'in MCF-7 hücrelerinde ER α -MAPK sinyal yolları üzerinden antiproliferatif etki gösterdiğini raporlamıştır (Cui vd., 2016b). Tang ve ark. (2017), Emodin'in PPAR γ aktivitesini artırdığını ve bu etkinin MEK/ERK inhibitörleriyle bloke edilebildiğini göstermiştir. Bu mekanizma, kanser hücrelerinde hücre döngüsü arrestine neden olmaktadır (Tang vd., 2017) . SubG1 popülasyonundaki artışla birlikte değerlendirildiğinde, Emodin'in hem hücrelerin çoğalmasını engelleyici hem de mevcut hücreleri ölüme sürükleyici çift yönlü bir etki mekanizmasına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Emodin'in anti-proliferatif

etkileri, apoptoz indüksiyonu ve hücre döngüsü duraklaması ile açıklanabilir. PI hücre döngüsü analizi sonuçları, Emodin'in uygulandığında Hücre döngüsü fazındaki değişikliği belirtin, sub-G1 fazındaki hücre oranında artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu durum, Emodin'in hücrelerin DNA sentezi ve mitoz fazına geçişini engellediğini veya apoptoza yönlendirdiğini düşündürmektedir (W. Y. Li vd., 2013) . ER pozitif meme kanseri hücre hatlarında ve üçlü negatif hücre hatlarında, Emodin doza ve zamana bağlı apoptozu indükler. Emodin pro-apoptotik belirteçleri upregüle eder. Bu değişiklikler içsel (mitokondriyal) apoptotik yolun aktivasyonunu düşündürmektedir (Zu vd., 2015). Bhattacharjee ve ark. (2020), Emodin'in meme kanseri hücrelerinde doza bağlı sitotoksiste gösterdiğini ve anti-apoptotik protein Bcl-2'yi azaltarak apoptotik hücre ölümünü indüklediğini rapor etmiştir (Bhattacharjee vd., 2020). Emodin'in, kaspaz aktivasyonu ve Bcl-2/BAX oranının pro-apoptotik yönde modülasyonu yoluyla meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini kuvvetle desteklemektedir (Z. Huang vd., 2008b) .

Bu çalışmada, Emodin'in NLK ile ilişkili sinyal yolları üzerindeki etkisini daha ayrıntılı inceleyebilmek amacıyla, NLK ekspresyonunu artırmak için anti-miR-208a molekülü hücrelere transfekte edilmiştir. Anti-miR-208a, endojen miR-208a'nın NLK üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırarak NLK sentezinin artmasını sağlamaktadır. Transfeksiyonun verimliliğini doğrulamak amacıyla kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları, anti-miR-208a uygulamasının hücrelerde miR-208a ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskıladığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, NLK ekspresyonunun artışı için gerekli olan transkripsiyonel ön koşulun başarıyla sağlandığını göstermektedir (Şekil 4-15).

Elde edilen bulgular, Emodin'in MCF-7 hücrelerinde NLK ekspresyonunu artırma eğiliminde olduğunu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığını göstermektedir. anti-miR-208a transfeksiyonu ile NLK düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmesi, miR-208a'nın NLK üzerindeki baskılayıcı rolünü doğrulamaktadır. Emodin ve anti-miR-208a'nın birlikte uygulanması ise NLK ekspresyonundaki artışı daha belirgin hale getirerek, bu iki etkenin potansiyel sinerjik etkileşimini işaret etmektedir.

Benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin uygulaması NLK düzeylerini artırmış; bu etkinin kombinasyon grubunda en yüksek seviyeye ulaşması, NLK'nin hem Emodin aracılı sinyal modülasyonuna hem de miR-208a'nın baskılanmasına duyarlı olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, NLK'nin Emodin'in antikanser etkilerinde önemli bir aracılık rolü oynayabileceğini desteklemektedir.

Bu bulgular, Emodin'in her iki hücre hattında da NLK ekspresyonunu yükselttiğini ve özellikle triple-negatif MDA-MB-231 hücrelerinde anti-miR-208a ile birlikte uygulandığında sinerjik bir artış sağladığını göstermektedir. Literatürde NLK'nin Wnt/ β -katenin sinyalinin negatif düzenleyicisi olduğu ve NF- κ B gibi yollar üzerinden de hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz süreçlerinde görev aldığı bildirilmektedir. Dolayısıyla, Emodin ve anti-miR-208a'nın NLK üzerindeki bu etkisi, meme kanseri hücrelerinde proliferatif sinyallerin baskılanması ve tümör baskılayıcı mekanizmaların güçlendirilmesine katkı sağlayabilecek bir etki mekanizmasına işaret etmektedir (X. Wang vd., 2021b).

Emodin'in MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile anti-miR-208a transfekte edilmiş hücrelerde, MCF-7 için 48 saatlik 10 μ M Emodin uygulaması sonrası MAPK (Mitogen-Aktifleşen Protein Kinaz) yolağı ERK1/2 (pERK) , JNK (pJNK), P38 (pP38) ve Östrojen Reseptörü Alfa (ER α) proteinlerinin ekspresyon seviyeleri Western blot ile değerlendirilmiştir. MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattında Emodin (20 μ M) ve anti-miR-208a tedavilerinin, MAPK ailesine ait p38, ERK1/2, JNK ve NLK proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ile fosforilasyon durumları üzerindeki etkileri Western blot analizi ile incelenmiştir (Şekil 4-11, Şekil 4-19). Protein yükleme kontrolü olarak β -Tubulin, β -Aktin kullanılmış olup, tüm şeritlerde benzer yüklemenin sağlandığı teyit edilmiştir. Bu analiz, Emodin'in anti-kanser aktivitesinin moleküler mekanizmalarına ışık tutmayı amaçlamıştır.

MAPK yolunun önemli bir bileşeni olan ERK1/2, genellikle hücre proliferasyonu, farklılaşma ve sağkalımında kritik roller üstlenir. Analizlerimiz, 48 saatlik 10 μ M Emodin uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla MCF-7 hücrelerinde ERK1/2 protein düzeylerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (~0.5 kat; p<0.05). Anti-miR-208a tek başına anlamlı bir değişim oluşturmazken, kombinasyon grubunda düşük ekspresyon

seviyesi korunmuştur. Fosforile ERK (pERK) düzeyleri de benzer şekilde azalmış, bu durum Emodin'in ERK sinyalinin baskılayıcı etkisini göstermektedir (Şekil 4-14 a).

MDA-MB-231 hücrelerinde hem total ERK1/2 hem de pERK proteinlerinde 48 saatlik 20 µM Emodin uygulaması ekspresyonları belirgin şekilde azaltırken, anti-miR-208a uygulaması kontrol seviyelerine yakın veya üzerinde ekspresyon göstermiştir. ERK/MAPK yolunun hücre proliferasyonu ve metastazdaki rolü iyi bilinmektedir (Y. C. Liu vd., 2025). Bu azalma, Emodin'in antiproliferatif etkisini ERK1/2 sinyalinin baskılayarak gösterdiğine dair önceki hücre canlılığı ve hücre döngüsü bulgularımızı desteklemektedir. MAPK ayrıca anjiyogenezin düzenlenmesinde de önemli bir role sahiptir. ERK, hücre döngüsünün pozitif bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır ve hücre döngüsünün ilerlemesi için gerekli olan siklik bağımlı kinazları - siklin D kompleksini uyarır. Birkaç çalışma, aktive edilmiş ERK'nin (pERK) birikmesinin genomik instabiliteye yol açabileceğini ve tümör oluşumunu teşvik edebileceğini ortaya koymuştur. ERK ayrıca tümör baskılayıcı yolların uyarılmasında da rol oynar (Ko vd., 2010).

P38 MAPK, hücrel strese, inflamasyona, hücre döngüsü arrestine ve apoptoza yanıt veren bir başka önemli sinyal molekülüdür. Bu çalışmada, Emodin'in 10 µM konsantrasyonda 48 saatlik uygulamasının MCF-7 hücrelerinde P38 protein ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna kıyasla artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4-14 b). MCF-7 hücrelerinde pP38 (aktif formu) ekspresyon seviyelerinde belirgin bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. P38'in kanser hücrelerinde hem pro-apoptotik hem de pro-invaziv/pro-metastatik roller üstlenebildiği literatürde gösterilmiştir (Wagner & Nebreda, 2009). Emodin'in P38 total protein seviyesini artırması, P38'in hücre sağkalımını veya proliferasyonunu destekleyen fonksiyonlarını baskılayarak antikanser etkisine katkıda bulunabilir. Buna karşın anti-miR-208a tek başına p38 ekspresyonunu belirgin şekilde düşürdü. İlginç olarak, kombinasyon (anti-miR-208a + Emodin) koşulunda p38 düzeyleri tekrar yüksek seviyelere ulaştı. Bu sonuç, Emodin'in p38 aracılığıyla stres yanıtı ve intrinsik apoptoz yolunu aktive edebileceğini; anti-miR-208a'nın ise NLK ekspresyonunu artırarak p38 üzerindeki düzenleyici etkiyi dolaylı biçimde modüle edebileceğini düşündürmektedir. Literatürde p38'in, özellikle ER-pozitif meme kanseri hücrelerinde

apoptotik süreci kolaylaştıran bir kinaz olarak işlev gördüğü ve fosforilasyonunun Sub-G1 artışı, DNA parçalanması ve mitokondriyal membran potansiyel kaybı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Assefa vd., 2000). Ayrıca Emodin'in farklı kanser hücrelerinde p38 aktivasyonunu artırarak hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir (Cui vd., 2016c).

MDA-MB-231 hücrelerinde p38 ve fosforile p38 (p-p38) düzeylerinde, kontrol grubuna kıyasla Emodin tedavisi belirgin bir azalma göstermiştir. Anti-miR-208a uygulaması, p38 düzeylerinde kısmi bir azalma sağlarken, p-p38 düzeylerinde Emodin'e göre daha yüksek, ancak kontrole göre düşük bir seviyede bulunmuştur. p38 MAPK sinyal yolunun birçok çalışmada migrasyon ve invazyonu destekleyici bir rol oynadığı bildirildiği için, bizim sistemimizde de p38 düzeyindeki azalmalar migrasyon/invazyonu baskılayabilir (Koul vd., 2013). Ancak bu etkinin kesinliği hücre hattı, sinyal ağı ve diğer paralel yolların durumuna bağlıdır, dolayısıyla Emodin'in bu yoldaki baskılayıcı etkisi anti-tümör mekanizmalardan biri olabilir. P38 üzerinden sinyalleme, ATF-2 ve MAPKAPK-2 gibi mediatörler aracılığıyla proliferatif yolları aktive etmeye devam eder ve hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre proliferasyonunu uyarır (L. Chen vd., 2009). Dolayısıyla, Emodin'in p38 sinyal yolunu inhibe etmesi, kanser hücrelerinin büyümesini engelleyerek potansiyel bir antikanser mekanizma olarak değerlendirilmektedir.

Emodin'in 10 µM konsantrasyonda 48 saatlik uygulamasının MCF-7 hücrelerinde ve/veya anti-miR-208a uygulamalarında JNK ve fosforile JNK (pJNK) düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde Emodin (20 µM) ve anti-miR-208a uygulamaları JNK ve pJNK ekspresyonlarını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşürmüştür (p<0.01). Literatürde JNK aktivitesinin göç ve invazyonu desteklediği; JNK inhibitörlerinin bu özellikleri baskılayabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Jemaà vd., 2018). Bu bulgular, Emodin'in meme kanseri tedavisinde, özellikle MAPK sinyal yolağını hedef alarak, etkili bir terapötik strateji olarak değerlendirilmesi için sağlam moleküler temel sağlamaktadır.

Östrojen Reseptörü Alfa (ERα), meme kanserinin önemli bir alt tipi olan ER pozitif meme kanserinde kilit bir hedef proteindir ve hücre büyümesi ile sağkalımında merkezi bir rol oynar. Çalışmamızda, 48 saatlik 10 µM Emodin uygulamasının MCF-7 hücrelerinde ERα protein ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna kıyasla azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil

4-16) . Bu bulgu, Emodin'in ER pozitif meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkisini kısmen ER α ekspresyonunu modüle ederek gösterebileceğini düşündürmektedir. ER α seviyesindeki bu düşüş, östrojen bağımlı büyüme sinyallerinin zayıflamasına yol açarak hücre proliferasyonunu baskılayabilir. MCF-7 hücreleri ER-pozitif meme kanseri hücre hatlarıdır, yani östrojen reseptörü alfa (ER α) ifade ederler. Bu tip tümörler tipik olarak ER α sinyallemesini bloke eden tamoksifen veya aktif metaboliti endoksifen gibi anti-östrojen tedavileriyle tedavi edilir. Emodin, ER α üzerinde negatif etki gösterir ve bu da ER⁺ meme kanseri için etkili bir tedavi olduğunu gösterir (Y. G. Kim vd., 2019).

MCF-7 Hücrelerinde, Kontrol grubunda yüksek seviyede olan nükleer c-MYC, 10 μ M Emodin uygulaması sonrası belirgin şekilde azalmıştır. AntimiR-208a tek başına da c-MYC düzeyini düşürmüştür. Kombinasyon (Emodin + antimiR-208a) koşulunda en düşük c-MYC seviyesi gözlenmiştir. Bu bulgu, Emodin'in ve miR-208a inhibisyonunun c-MYC ekspresyonunu baskıladığını ve bu etkinin eklemeli (additive) olabileceğini göstermektedir. MDA-MB-231 Hücrelerinde Farklı Yanıt, kontrol gruplarında c-MYC yüksek seviyededir. Emodin uygulaması, c-MYC düzeyini önemli ölçüde azaltmıştır. AntimiR-208a tek başına, c-MYC seviyesini düşürmüştür. Kombinasyon koşulunda c-MYC düzeyi yine düşmüş ancak emodinin tek başına etkisinden daha düşüktür. Elde edilen veriler, Emodin ve NLK, hem MCF-7 (ER⁺) hem de MDA-MB-231 (TNBC) meme kanseri hücrelerinde nükleer c-MYC protein ifadesini etkilediği gösterilmiştir. c-MYC, tümör gelişiminde kritik rol oynayan bir proto-onkogendir ve birçok sinyal yolakla ilişkilidir (Y. Dong vd., 2020). Literatürde NLK'nın, MCF-7 hücrelerinde c-Myb'yi degrade ederek ve c-MYC azaltarak proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Y. Huang vd., 2013b).

Bu tez çalışması, doğal bir bileşik olan Emodin'in, hem ER α -pozitif MCF-7 hem de üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde güçlü antikanser etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Emodin, hücre canlılığını azaltmış, proliferasyonu baskılamış, koloni oluşumunu ve 3D sferoid gelişimini sınırlamış, ayrıca hücre döngüsünde duraklama ve apoptoz artışı ile içsel apoptotik yolları aktive etmiştir. Moleküler analizler, Emodin'in MAPK sinyal yollarını alt tip-spesifik şekilde düzenlediğini göstermiştir: MCF-7'de ERK1/2 ve JNK azalırken p38 artmış, MDA-MB-231'de ise ERK1/2, p38 ve JNK

baskılanmıştır. Bu değişimler, nükleer c-MYC düzeylerindeki azalma ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca Emodin, her iki hücre hattında da NLK ekspresyonunu artırmış, anti-miR-208a ile kombine edildiğinde bu etki güçlenmiş ve miR-208a'nın NLK üzerinde baskılayıcı rolü doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular Emodin'in, MAPK yeniden programlaması ve NLK aracılı sinyal düzenlemesi yoluyla c-MYC ve ER α gibi onkogenik hedefleri baskıladığını; böylece meme kanseri tedavisinde, özellikle kombinasyon stratejilerinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

- Ahmad, D. A. J., Negm, O. H., Alabdullah, M. L., Mirza, S., Hamed, M. R., Band, V., Green, A. R., Ellis, I. O., & Rakha, E. A. (2016). Clinicopathological and prognostic significance of mitogen-activated protein kinases (MAPK) in breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, *159*(3), 457-467. <https://doi.org/10.1007/S10549-016-3967-9/FIGURES/3>
- Anderson, K. N., Schwab, R. B., & Martinez, M. E. (2014). Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Research and Treatment* *2014 144:1*, *144*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/S10549-014-2852-7>
- Arao, Y., & Korach, K. S. (2021). The physiological role of estrogen receptor functional domains. *Essays in biochemistry*, *65*(6), 867. <https://doi.org/10.1042/EBC20200167>
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, *66*, 15-23. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2022.08.010>
- Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Leverson, J. D., & Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(4), 273-284. <https://doi.org/10.1038/NRD.2016.253>
- Assefa, Z., Vantieghem, A., Garmyn, M., Declercq, W., Vandenamee, P., Vandenneede, J. R., Bouillon, R., Merlevede, W., & Agostinis, P. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(28), 21416-21421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002634200>
- Atanaskova, N., Keshamouni, V. G., Krueger, J. S., Schwartz, J. A., Miller, F., & Reddy, K. B. (2002a). MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene*, *21*(25), 4000-4008. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1205506>
- Atanaskova, N., Keshamouni, V. G., Krueger, J. S., Schwartz, J. A., Miller, F., & Reddy, K. B. (2002b). MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* *2002 21:25*, *21*(25), 4000-4008. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205506>
- Bahar, M. E., Kim, H. J., & Kim, D. R. (2023). Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2023 8:1*, *8*(1), 1-38. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01705-z>

- Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I. (2015). MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*, 5(10), 1122. <https://doi.org/10.7150/THNO.11543>
- Bhattacharjee, M., Upadhyay, P., Sarker, S., Basu, A., Das, S., Ghosh, A., Ghosh, S., & Adhikary, A. (2020). Combinatorial therapy of Thymoquinone and Emodin synergistically enhances apoptosis, attenuates cell migration and reduces stemness efficiently in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1864(11), 129695. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2020.129695>
- Bhushan, A., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2021a). Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 723, 13(5)*, 723. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13050723>
- Bhushan, A., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2021b). Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 723, 13(5)*, 723. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13050723>
- Bhushan, A., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2021c). Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 723, 13(5)*, 723. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13050723>
- Białek, S., Górko, D., Zajkowska, A., Kołtowski, Ł., Grabowski, M., Stachurska, A., Kochman, J., Sygitowicz, G., Małeck, M., Opolski, G., & Sitkiewicz, D. (2015). Release kinetics of circulating miRNA-208a in the early phase of myocardial infarction. *Polish Heart Journal (Kardiologia Polska)*, 73(8), 613-619. <https://doi.org/10.5603/KP.A2015.0067>
- Blakemore, J., & Naftolin, F. (2016). Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 31(4), 258-269. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00054.2015>
- Brott, B. K., Pinsky, B. A., & Erikson, R. L. (1998). Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 963-968. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.3.963/ASSET/EB3E01FF-A6D9-46C5-872C-4222A787A079/ASSETS/GRAPHIC/PQ0384041004.JPEG>
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
- Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of Personalized Medicine 2021, Vol. 11, Page 808, 11(8)*, 808. <https://doi.org/10.3390/JPM11080808>
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., & Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*, 120(22), 3446-3456. <https://doi.org/10.1002/CNCR.28864>

- Callis, T. E., Pandya, K., Hee, Y. S., Tang, R. H., Tatsuguchi, M., Huang, Z. P., Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H., & Wang, D. Z. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(9), 2772-2786. <https://doi.org/10.1172/JCI36154>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011a). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *75*(1), 50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011b). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *75*(1), 50-83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Chaiwun, B., & Thorner, P. (2007). Fine needle aspiration for evaluation of breast masses. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *19*(1), 48-55. <https://doi.org/10.1097/GCO.0B013E328011F9AE>
- Cheema, S. K., Gobin, A. S., Rhea, R., Lopez-Berestein, G., Newman, R. A., & Mathur, A. B. (2007). Silk fibroin mediated delivery of liposomal emodin to breast cancer cells. *International journal of pharmaceutics*, *341*(1-2), 221-229. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2007.03.043>
- Chen, J., Han, Y., Zhao, X., Yang, M., Liu, B., Xi, X., Xu, X., Liang, T., & Xia, L. (2015). Nemo-like kinase expression predicts poor survival in colorectal cancer. *Molecular medicine reports*, *11*(2), 1181-1187. <https://doi.org/10.3892/MMR.2014.2851>
- Chen, L., Mayer, J. A., Krisko, T. I., Speers, C. W., Wang, T., Hilsenbeck, S. G., & Brown, P. H. (2009). Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Research*, *69*(23), 8853-8861. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1636/655435/P/INHIBITION-OF-THE-P38-KINASE-SUPPRESSES-THE>
- Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(11), 1329-1333. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.1066>
- Choi, K. W., & Benzer, S. (1994). Rotation of photoreceptor clusters in the developing drosophila eye requires the nemo gene. *Cell*, *78*(1), 125-136. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90579-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90579-7)
- Coulombe, P., & Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1773*(8), 1376-1387. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.11.001>
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics* *2009* *10:10*, *10*(10), 704-714. <https://doi.org/10.1038/nrg2634>

- CUI, Y., CHEN, L. J., HUANG, T., YING, J. Q., & LI, J. (2020). The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18(6), 425-435. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)30050-9](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)30050-9)
- Cui, Y., Lu, P., Song, G., Liu, Q., Zhu, D., & Liu, X. (2016a). Involvement of PI3K/Akt, ERK and p38 signaling pathways in emodin-mediated extrinsic and intrinsic human hepatoblastoma cell apoptosis. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 92, 26-37. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.03.013>
- Cui, Y., Lu, P., Song, G., Liu, Q., Zhu, D., & Liu, X. (2016b). Involvement of PI3K/Akt, ERK and p38 signaling pathways in emodin-mediated extrinsic and intrinsic human hepatoblastoma cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 26-37. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.03.013>
- Cui, Y., Lu, P., Song, G., Liu, Q., Zhu, D., & Liu, X. (2016c). Involvement of PI3K/Akt, ERK and p38 signaling pathways in emodin-mediated extrinsic and intrinsic human hepatoblastoma cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 26-37. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.03.013>
- Dahm, K., Vijayarangakannan, P., Wollscheid, H. P., Schild, H., & Rajalingam, K. (2025). Atypical MAPKs in cancer. *The FEBS Journal*, 292(9), 2173-2188. <https://doi.org/10.1111/FEBS.17283>
- Dong, X., Fu, J., Yin, X., Cao, S., Li, X., Lin, L., & Ni, J. (2016). Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1207-1218. <https://doi.org/10.1002/PTR.5631>
- Dong, X., Ni, B., Fu, J., Yin, X., You, L., Leng, X., Liang, X., & Ni, J. (2018). Emodin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepaRG cells via the mitochondrial caspase-dependent pathway. *Oncology Reports*, 40(4), 1985. <https://doi.org/10.3892/OR.2018.6620>
- Dong, Y., Tu, R., Liu, H., & Qing, G. (2020). Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00235-2;SUBJMETA>
- Durur-Subasi, I. (2019). DW-MRI of the breast: a pictorial review. *Insights into imaging*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13244-019-0745-3>
- Emami, K. H., Brown, L. G., Pitts, T. E. M., Sun, X., Vessella, R. L., & Corey, E. (2009). Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *The Prostate*, 69(14), 1481-1492. <https://doi.org/10.1002/PROS.20998>
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:4, 6(4), 259-269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>

- Fang, L., Zhao, F., Iwanowycz, S., Wang, J., Yin, S., Wang, Y., & Fan, D. (2019a). Anticancer activity of emodin is associated with downregulation of CD155. *International Immunopharmacology*, 75, 105763. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2019.105763>
- Fang, L., Zhao, F., Iwanowycz, S., Wang, J., Yin, S., Wang, Y., & Fan, D. (2019b). Anticancer activity of emodin is associated with downregulation of CD155. *International Immunopharmacology*, 75, 105763. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2019.105763>
- Feeley, L. P., Mulligan, A. M., Pinnaduwege, D., Bull, S. B., & Andrulis, I. L. (2014). Distinguishing luminal breast cancer subtypes by Ki67, progesterone receptor or TP53 status provides prognostic information. *Modern Pathology*, 27(4), 554-561. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.2013.153>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77-106. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2018.05.001>
- Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Medicine*, 60(Volume 60, 2009), 167-179. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.59.053006.104707/CITE/REFWORKS>
- Ginsburg, O., Bray, F., Coleman, M. P., Vanderpuye, V., Eniu, A., Kotha, S. R., Sarker, M., Huong, T. T., Allemani, C., Dvaladze, A., Gralow, J., Yeates, K., Taylor, C., Oomman, N., Krishnan, S., Sullivan, R., Kombe, D., Blas, M. M., Parham, G., ... Conteh, L. (2017). The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *The Lancet*, 389(10071), 847-860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31392-7/ASSET/1D94D0F5-D81B-4CA9-9EA1-63764035D6D0/MAIN.ASSETS/GR5.JPG](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31392-7/ASSET/1D94D0F5-D81B-4CA9-9EA1-63764035D6D0/MAIN.ASSETS/GR5.JPG)
- Guo, H., Xu, Y., & Fu, Q. (2015). RETRACTED ARTICLE:Curcumin inhibits growth of prostate carcinoma via miR-208-mediated CDKN1A activation. *Tumor Biology*, 36(11), 8511-8517. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-3592-Y/FIGURES/5>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997-2007. <https://doi.org/10.3892/ETM.2020.8454>
- Hervouet, E., Cartron, P. F., Jouvenot, M., & Delage-Mourroux, R. (2013). Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics*, 8(3), 237. <https://doi.org/10.4161/EPI.23790>
- Hong, L., Wang, Y., Chen, W., & Yang, S. (2018). MicroRNA-508 suppresses epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of ovarian cancer cells through the MAPK1/ERK signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 119(9), 7431-7440. <https://doi.org/10.1002/JCB.27052>

- Hopkinson, B. M., Klitgaard, M. C., Petersen, O. W., Villadsen, R., Rønnev-Jessen, L., & Kim, J. (2017). Establishment of a normal-derived estrogen receptor-positive cell line comparable to the prevailing human breast cancer subtype. *Oncotarget*, 8(6), 10580. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14554>
- Hsu, C. M., Hsu, Y. A., Tsai, Y., Shieh, F. K., Huang, S. H., Wan, L., & Tsai, F. J. (2010). Emodin inhibits the growth of hepatoma cells: Finding the common anti-cancer pathway using Huh7, Hep3B, and HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 392(4), 473-478. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.10.153>
- Huang, P., Chandra, V., & Rastinejad, F. (2010). Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annual review of physiology*, 72, 247. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021909-135917>
- Huang, X. H., Li, J. L., Li, X. Y., Wang, S. X., Jiao, Z. H., Li, S. Q., Liu, J., & Ding, J. (2021). miR-208a in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 773314. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2021.773314/BIBTEX>
- Huang, Y., Jiang, Y., Lu, W., & Zhang, Y. (2013a). Nemo-like kinase associated with proliferation and apoptosis by c-Myb degradation in breast cancer. *PLoS one*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0069148>
- Huang, Y., Jiang, Y., Lu, W., & Zhang, Y. (2013b). Nemo-Like Kinase Associated with Proliferation and Apoptosis by c-Myb Degradation in Breast Cancer. *PLOS ONE*, 8(7), e69148. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0069148>
- Huang, Y., Yang, Y., He, Y., Huang, C., Meng, X., & Li, J. (2016). MicroRNA-208a Potentiates Angiotensin II-triggered Cardiac Myoblasts Apoptosis via Inhibiting Nemo-like Kinase (NLK). *Current Pharmaceutical Design*, 22(31), 4868-4875. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160210143047>
- Huang, Y., Yang, Y., He, Y., & Li, J. (2015a). The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(12), 9147-9152. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-4159-7>
- Huang, Y., Yang, Y., He, Y., & Li, J. (2015b). The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers. *Tumor Biology*, 36(12), 9147-9152. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-4159-7/TABLES/1>
- Huang, Y., Yang, Y., He, Y., & Li, J. (2015c). The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers. *Tumor Biology*, 36(12), 9147-9152. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-4159-7/TABLES/1>
- Huang, Z., Chen, G., & Shi, P. (2008a). Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway. *Archives of pharmacal research*, 31(6), 742-748. <https://doi.org/10.1007/S12272-001-1221-6>

- Huang, Z., Chen, G., & Shi, P. (2008b). Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway. *Archives of pharmacal research*, 31(6), 742-748. <https://doi.org/10.1007/S12272-001-1221-6>
- Huang, Z., Yu, P., & Tang, J. (2020). Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. *OncoTargets and Therapy*, 13, 5395-5405. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>
- Iacopetta, D., Ceramella, J., Baldino, N., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2023). Targeting Breast Cancer: An Overlook on Current Strategies. *International Journal of Molecular Sciences 2023*, Vol. 24, Page 3643, 24(4), 3643. <https://doi.org/10.3390/IJMS24043643>
- Ibrahim, M., Fathalla, Z., Fatease, A. Al, Alamri, A. H., & Abdelkader, H. (2024). Breast cancer epidemiology, diagnostic barriers, and contemporary trends in breast nanotheranostics and mechanisms of targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1080/17425247.2024.2412823>
- Ishitani, T., Hirao, T., Suzuki, M., Isoda, M., Ishitani, S., Harigaya, K., Kitagawa, M., Matsumoto, K., & Itoh, M. (2010). Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nature cell biology*, 12(3), 278-285. <https://doi.org/10.1038/NCB2028>
- Ishitani, T., & Ishitani, S. (2013). Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator. *Cellular signalling*, 25(1), 190-197. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2012.09.017>
- Izhaki, I. (2002). Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205-217. <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2002.00459.X>
- Jafari, S. H., Saadatpour, Z., Salmaninejad, A., Momeni, F., Mokhtari, M., Nahand, J. S., Rahmati, M., Mirzaei, H., & Kianmehr, M. (2018). Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), 5200-5213. <https://doi.org/10.1002/JCP.26379>
- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*, 6(6), 590-610. <https://doi.org/10.1016/J.MOLONC.2012.09.006>
- Jemaà, M., Abassi, Y., Kifagi, C., Fezai, M., Daams, R., Lang, F., & Massoumi, R. (2018). Reversine inhibits Colon Carcinoma Cell Migration by Targeting JNK1. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-30251-W>;TECHMETA
- Jung, K. H., Kim, J. K., Noh, J. H., Eun, J. W., Bae, H. J., Xie, H. J., Ahn, Y. M., Park, W. S., Lee, J. Y., & Nam, S. W. (2010). Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma. *Journal of cellular biochemistry*, 110(3), 687-696. <https://doi.org/10.1002/JCB.22579>
- Kabel, A. M. (2017). Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences*, 3(1), 5-11. <https://doi.org/10.1016/J.JONS.2017.01.001>

- Kakimoto, Y., Tanaka, M., Kamiguchi, H., Hayashi, H., Ochiai, E., & Osawa, M. (2016). MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart. *International Journal of Cardiology*, 211, 43-48. <https://doi.org/10.1016/J.IJCARD.2016.02.145>
- Kato, M., & Slack, F. J. (2008). microRNAs: small molecules with big roles –C. elegans to human cancer. *Biology of the Cell*, 100(2), 71-81. <https://doi.org/10.1042/BC20070078>
- Kato, S. (2001). Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 8(1), 3-9. <https://doi.org/10.1007/BF02967472>
- Ke, H., Masoumi, K. C., Ahlqvist, K., Seckl, M. J., Rydell-Tormanen, K., & Massoumi, R. (2016). Nemo-like kinase regulates the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in alveolar epithelial cells. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep23987>
- Kerlikowske, K., Hubbard, R. A., Miglioretti, D. L., Geller, B. M., Yankaskas, B. C., Lehman, C. D., Taplin, S. H., & Sickles, E. A. (2011). Comparative effectiveness of digital versus film-screen mammography in community practice in the United States: a cohort study. *Annals of internal medicine*, 155(8), 493-502. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00005>
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of Toxicology*, 89(6), 867-882. <https://doi.org/10.1007/S00204-015-1472-2/FIGURES/2>
- Kim, Y. G., Park, Y. H., Yang, E. Y., Park, W. S., & Park, K. S. (2019). Inhibition of tamoxifen's therapeutic effects by emodin in estrogen receptor-positive breast cancer cell lines. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 97(5), 230-238. <https://doi.org/10.4174/ASTR.2019.97.5.230>
- Ko, J. C., Su, Y. J., Lin, S. T., Jhan, J. Y., Ciou, S. C., Cheng, C. M., Chiu, Y. F., Kuo, Y. H., Tsai, M. S., & Lin, Y. W. (2010). Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2. *Lung Cancer*, 69(2), 155-164. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2009.10.013>
- Koul, H. K., Pal, M., & Koul, S. (2013). Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes & Cancer*, 4(9-10), 342. <https://doi.org/10.1177/1947601913507951>
- Lau, K. H. ;, Tan, A. M. ;, Shi, Y., Lau, K. H., Tan, A. M., & Shi, Y. (2022). New and Emerging Targeted Therapies for Advanced Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 2288*, 23(4), 2288. <https://doi.org/10.3390/IJMS23042288>
- Lee, H.-R., Kim, T.-H., & Choi, K.-C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Laboratory animal research*, 28(2), 71. <https://doi.org/10.5625/LAR.2012.28.2.71>

- Li, H., Zheng, D., Zhang, B., Liu, L., Ou, J., Chen, W., Xiong, S., Gu, Y., & Yang, J. (2014). Mir-208 promotes cell proliferation by repressing SOX6 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of translational medicine*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-196>
- Li, M., Zhang, S., Wang, Z., Zhang, B., Wu, X., Weng, H., Ding, Q., Tan, Z., Zhang, N., Mu, J., Yang, J., Shu, Y., Bao, R., Ding, Q., Wu, W., Cao, Y., & Liu, Y. (2013). Prognostic significance of nemo-like kinase (NLK) expression in patients with gallbladder cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *34*(6), 3995-4000. <https://doi.org/10.1007/S13277-013-0988-4>
- Li, S. Z., Zhang, Z. Y., Chen, J., Dong, M. Y., Du, X. H., Gao, J., Shu, Q. P., Li, C., Liang, X. Y., Ding, Z. H., Du, R. L., Wang, J., & Zhang, X. D. (2022). NLK is required for Ras/ERK/SRF/ELK signaling to tune skeletal muscle development by phosphorylating SRF and antagonizing the SRF/MKL pathway. *Cell Death Discovery 2021 8:1*, *8*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00774-9>
- Li, W. Y., Chan, R. Y. K., Yu, P. H. F., & Chan, S. W. (2013). Emodin induces cytotoxic effect in human breast carcinoma MCF-7 cell through modulating the expression of apoptosis-related genes. *Pharmaceutical Biology*, *51*(9), 1175-1181. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.782322>
- Lin, W., Zhong, M., Yin, H., Chen, Y., Cao, Q., Wang, C., & Ling, C. (2016). Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in vitro and in vivo. *Oncology reports*, *36*(2), 961-967. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.4861>
- Liu, A., Chen, H., Wei, W., Ye, S., Liao, W., Gong, J., Jiang, Z., Wang, L., & Lin, S. (2011). Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer. *Oncology Reports*, *26*(1), 81-89. <https://doi.org/10.3892/OR.2011.1257/HTML>
- Liu, F., Yang, X., Geng, M., & Huang, M. (2018). Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *8*(4), 552. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2018.01.008>
- Liu, L., Wang, W., Gao, S., & Wang, X. (2019). MicroRNA-208a directly targets Src kinase signaling inhibitor 1 to facilitate cell proliferation and invasion in non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*, *20*(4), 3140. <https://doi.org/10.3892/MMR.2019.10542>
- Liu, W., Wang, Y., Xia, L., & Li, J. (2024). Research Progress of Plant-Derived Natural Products against Drug-Resistant Cancer. *Nutrients 2024, Vol. 16, Page 797, 16*(6), 797. <https://doi.org/10.3390/NU16060797>
- Liu, X., Wei, W., Wu, Y. Z., Wang, Y., Zhang, W. W., Wang, Y. P., Dong, X. P., & Shi, Q. (2023). Emodin treatment of papillary thyroid cancer cell lines in vitro inhibits proliferation and enhances apoptosis via downregulation of NF-κB and its upstream

- TLR4 signaling. *Oncology Letters*, 26(6), 1-10.
<https://doi.org/10.3892/OL.2023.14101/HTML>
- Liu, Y. C., Lin, T. J., Chong, K. Y., Chen, G. Y., Kuo, C. Y., Lin, Y. Y., Chang, C. W., Hsiao, T. F., Wang, C. L., Shih, Y. C., & Yu, C. J. (2025). Targeting the ERK1/2 and p38 MAPK pathways attenuates Golgi tethering factor golgin-97 depletion-induced cancer progression in breast cancer. *Cell Communication and Signaling*, 23(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/S12964-024-02010-0/FIGURES/6>
- Lloyd, M. R., Wander, S. A., Hamilton, E., Razavi, P., & Bardia, A. (2022). Next-generation selective estrogen receptor degraders and other novel endocrine therapies for management of metastatic hormone receptor-positive breast cancer: current and emerging role. İçinde *Therapeutic Advances in Medical Oncology* (C. 14). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/17588359221113694>
- Ludwig, N., Leidinger, P., Becker, K., Backes, C., Fehlmann, T., Pallasch, C., Rheinheimer, S., Meder, B., Stähler, C., Meese, E., & Keller, A. (2016). Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Research*, 44(8), 3865-3877. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW116>
- Lv, L., Wan, C., Chen, B., Li, M., Liu, Y., Ni, T., Yang, Y., Liu, Y., Cong, X., Mao, G., & Xue, Q. (2014). Nemo-like kinase (NLK) inhibits the progression of NSCLC via negatively modulating WNT signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 115(1), 81-92. <https://doi.org/10.1002/JCB.24635>
- Ma, Q., Ding, Y., Wu, Z., & Li, Y. (2018). Antitumor effects of emodin in CACO-2 human colon carcinoma cells are mediated via apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of PI3K/AKT signalling pathway. *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 23(3), 587-591. <https://europepmc.org/article/med/30003723>
- MAPK signaling pathway - Cusabio.* (t.y.). Geliş tarihi 27 Mayıs 2025, gönderen <https://www.cusabio.com/pathway/MAPK-signaling-pathway.html>
- Masoud, V., & Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World Journal of Clinical Oncology*, 8(2), 120. <https://doi.org/10.5306/WJCO.V8.I2.120>
- MCF7 - HTB-22 | ATCC.* (t.y.). Geliş tarihi 26 Mayıs 2025, gönderen <https://www.atcc.org/products/htb-22#required-products>
- McSherry, E. A., Donatello, S., Hopkins, A. M., & McDonnell, S. (2007). Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(24), 3201-3218. <https://doi.org/10.1007/S00018-007-7388-0/METRICS>
- McTiernan, A. (2003). Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *The oncologist*, 8(4), 326-334. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.8-4-326>
- MDA-MB-231 - HTB-26 | ATCC.* (t.y.). Geliş tarihi 09 Ağustos 2025, gönderen <https://www.atcc.org/products/htb-26>

- Medina, P. P., & Slack, F. J. (2008). MicroRNAs and cancer: An overview. *Cell Cycle*, 7(16), 2485-2492. <https://doi.org/10.4161/CC.7.16.6453>
- Meiser, B., Wong, W. K. T., Peate, M., Julian-Reynier, C., Kirk, J., & Mitchell, G. (2017). Motivators and barriers of tamoxifen use as risk-reducing medication amongst women at increased breast cancer risk: a systematic literature review. *Hereditary cancer in clinical practice*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S13053-017-0075-8>
- Mishra, S., Yadav, T., & Rani, V. (2016). Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 98, 12-23. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2015.10.003>
- Miziak, P., Baran, M., Błaszczak, E., Przybyszewska-Podstawka, A., Kałafut, J., Smok-Kalwat, J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Kielbus, M., & Stepulak, A. (2023a). Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers 2023*, Vol. 15, Page 4689, 15(19), 4689. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15194689>
- Miziak, P., Baran, M., Błaszczak, E., Przybyszewska-Podstawka, A., Kałafut, J., Smok-Kalwat, J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Kielbus, M., & Stepulak, A. (2023b). Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers 2023*, Vol. 15, Page 4689, 15(19), 4689. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15194689>
- Mohammadi, A., Karami, A. R. B., Mashtani, V. D., Sahraei, T., Tarashoki, Z. B., Khattavian, E., Mobarak, S., Kazerouni, H. M., & Radmanesh, E. (2021). Evaluation of Oxidative Stress, Apoptosis, and Expression of MicroRNA-208a and MicroRNA-1 in Cardiovascular Patients. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 10(2), 183. <https://doi.org/10.52547/RBMB.10.2.183>
- Munker, R., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA profiling in cancer. *Clinical Science*, 121(4), 141-158. <https://doi.org/10.1042/CS20110005>
- Nazarali, S. A., & Narod, S. A. (2014). Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 6, 29-36. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S43763>
- Nounou, M. I., Elamrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., & Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies supplementary issue: Targeted therapies in breast cancer treatment. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9, 17-34. https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29420/ASSET/IMAGES/LARGE/10.4137_BCB CR.S29420-FIG3.JPG
- Nunnery, S. E., Mayer, I. A., & Org, I. M. (2020). Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hormone-Positive Breast Cancer. 80, 1685-1697. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01394-w>
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer*, 31-42. <https://doi.org/10.36255/EXON-PUBLICATIONS-BREAST-CANCER-SUBTYPES>

- Ota, S., Ishitani, S., Shimizu, N., Matsumoto, K., Itoh, M., & Ishitani, T. (2012). NLK positively regulates Wnt/ β -catenin signalling by phosphorylating LEF1 in neural progenitor cells. *EMBO Journal*, *31*(8), 1904-1915. https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2012.46/SUPPL_FILE/EMBJ201246.REVIEWER_COMMENTS.PDF
- Patel, S., Homaei, A., Raju, A. B., & Meher, B. R. (2018). Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *102*, 403-411. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.03.078>
- Peairs, K. S., Choi, Y., Stewart, R. W., & Sateia, H. F. (2017). Screening for breast cancer. *Seminars in oncology*, *44*(1), 60-72. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2017.02.004>
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocrine Reviews*, *22*(2), 153-183. <https://doi.org/10.1210/EDRV.22.2.0428>,
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1813*(9), 1619-1633. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.12.012>
- Radhi, S. (2016a). Molecular Changes During Breast Cancer and Mechanisms of Endocrine Therapy Resistance. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *144*, 539-562. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2016.09.009>
- Radhi, S. (2016b). Molecular Changes During Breast Cancer and Mechanisms of Endocrine Therapy Resistance. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *144*, 539-562. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2016.09.009>
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Paul Solomon, F. D. (2015). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, *230*(1), 16-26. <https://doi.org/10.1002/JCP.24683>
- Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, *15*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/S12935-015-0185-1/FIGURES/1>
- Rehfeldt, S. C. H., Majolo, F., Goettert, M. I., & Laufer, S. (2020). C-jun n-terminal kinase inhibitors as potential leads for new therapeutics for alzheimer's diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 1-33. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249677>
- Rocca, A., Maltoni, R., Bravaccini, S., Donati, C., & Andreis, D. (2018). Clinical utility of fulvestrant in the treatment of breast cancer: A report on the emerging clinical evidence. *Cancer Management and Research*, *10*, 3083-3099. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S137772>

- Rossi, M., Wen, K., Caruso, F., & Belli, S. (2020). Emodin Scavenging of Superoxide Radical Includes π - π Interaction. X-Ray Crystal Structure, Hydrodynamic Voltammetry and Theoretical Studies. *Antioxidants*, 9(3), 194. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9030194>
- Sakalli-Tecim, E., Uyar-Arpaci, P., & Guray, N. T. (2022). Identification of Potential Therapeutic Genes and Pathways in Phytoestrogen Emodin Treated Breast Cancer Cell Lines via Network Biology Approaches. *Nutrition and cancer*, 74(2), 592-604. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1889622>
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087. <https://doi.org/10.3390/IJMS141021087>
- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S. M., & Peter, M. E. (2008a). MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008 27:45, 27(45), 5959-5974. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.274>
- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S. M., & Peter, M. E. (2008b). MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008 27:45, 27(45), 5959-5974. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.274>
- Schneider, R. E., Barakat, A., Phippen, J., & Osborne, C. (2011). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in post-menopausal female patients: An update. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 3, 113-125. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S22905>
- Sha, R., Kong, X. M., Li, X. Y., & Wang, Y. B. (2024). Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2021: results from the Global Burden of Disease Study 2021. *Biomarker Research*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/S40364-024-00631-8/FIGURES/6>
- Sharifi-Rad, J., Herrera-Bravo, J., Kamiloglu, S., Petroni, K., Mishra, A. P., Monserrat-Mesquida, M., Sureda, A., Martorell, M., Aidarbekovna, D. S., Yessimsitova, Z., Ydyrys, A., Hano, C., Calina, D., & Cho, W. C. (2022). Recent advances in the therapeutic potential of emodin for human health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113555. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113555>
- Shaw-Hallgren, G., Masoumi, K. C., Zarrizi, R., Hellman, U., Karlsson, P., Helou, K., & Massoumi, R. (2014). Association of nuclear-localized Nemo-like kinase with heat-shock protein 27 inhibits apoptosis in human breast cancer cells. *PLoS one*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0096506>
- Shea, E. K. H., Koh, V. C. Y., & Tan, P. H. (2020). Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathology International*, 70(5), 242-252. <https://doi.org/10.1111/PIN.12910>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21763>

- Singletary, S. E., & Connolly, J. L. (2006). Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 56(1), 37-47. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.56.1.37>
- Sood, R., Rositch, A. F., Shakoob, D., Ambinder, E., Pool, K. L., Pollack, E., Mollura, D. J., Mullen, L. A., & Harvey, S. C. (2019). Ultrasound for breast cancer detection globally: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Oncology*, 2019(5), 1-17. <https://doi.org/10.1200/JGO.19.00127/ASSET/D1AA675A-F8AB-4208-AD26-EA15E52321CF/ASSETS/IMAGES/LARGE/JGO.19.00127T3.JPG>
- Su, J., Yan, Y., Qu, J., Xue, X., Liu, Z., & Cai, H. (2017). Emodin induces apoptosis of lung cancer cells through ER stress and the TRIB3/NF- κ B pathway. *Oncology reports*, 37(3), 1565-1572. <https://doi.org/10.3892/OR.2017.5428>
- Sui, J. Q., Xie, K. P., Zou, W., & Xie, M. J. (2014). Emodin inhibits breast cancer cell proliferation through the ER α -MAPK/Akt-cyclin D1/Bcl-2 signaling pathway. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 15(15), 6247-6251. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.15.6247>
- Tan, Z., Li, M., Wu, W., Zhang, L., Ding, Q., Wu, X., Mu, J., & Liu, Y. (2012). NLK is a key regulator of proliferation and migration in gallbladder carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 369(1-2), 27-33. <https://doi.org/10.1007/S11010-012-1365-0/FIGURES/4>
- Tang, Q., Wu, J. J., Zheng, F., Chen, Y. Q., & Hann, S. S. (2017). Emodin Increases Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 through Activation of MEK/ERK/AMPK α and Interaction of PPAR γ and Sp1 in Lung Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(1), 339-357. <https://doi.org/10.1159/000456281>
- Tofani, L. B., Abriata, J. P., Luiz, M. T., Marchetti, J. M., & Swiech, K. (2020). Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. *Biotechnology Progress*, 36(6), e3034. <https://doi.org/10.1002/BTPR.3034>
- Tong, C. W. S., Wu, M., Cho, W. C. S., & To, K. K. W. (2018). Recent advances in the treatment of breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 8(JUN), 381990. <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00227/TEXT>
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27-35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- van Seijen, M., Lips, E. H., Thompson, A. M., Nik-Zainal, S., Futreal, A., Hwang, E. S., Verschuur, E., Lane, J., Jonkers, J., Rea, D. W., & Wesseling, J. (2019). Ductal carcinoma in situ: to treat or not to treat, that is the question. *British Journal of Cancer* 2019 121:4, 121(4), 285-292. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0478-6>
- Vrijens, K., Bollati, V., & Nawrot, T. S. (2015). MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: A systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 399-411.

<https://doi.org/10.1289/EHP.1408459/ASSET/B1291BAD-5EC1-43F3-802F-BFD1D02D6D96/ASSETS/GRAPHIC/EHP.1408459.G005.JPG>

- Wagner, E. F., & Nebreda, Á. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537-549. <https://doi.org/10.1038/NRC2694;KWRD>
- Wang, S., Chen, T., Chen, R., Hu, Y., Chen, M., & Wang, Y. (2012). Emodin loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterization and antitumor activity studies. *International journal of pharmaceutics*, 430(1-2), 238-246. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2012.03.027>
- Wang, X., Veeraraghavan, J., Liu, C. C., Cao, X., Qin, L., Kim, J. A., Tan, Y., Loo, S. K., Hu, Y., Lin, L., Lee, S., Shea, M. J., Mitchell, T., Li, S., Ellis, M. J., Hilsenbeck, S. G., Schiff, R., & Wang, X. S. (2021a). Therapeutic targeting of nemo-like kinase in primary and acquired endocrine-resistant breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(9), 2648-2662. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2961/78576/AM/THERAPEUTIC-TARGETING-OF-NEMO-LIKE-KINASE-IN>
- Wang, X., Veeraraghavan, J., Liu, C. C., Cao, X., Qin, L., Kim, J. A., Tan, Y., Loo, S. K., Hu, Y., Lin, L., Lee, S., Shea, M. J., Mitchell, T., Li, S., Ellis, M. J., Hilsenbeck, S. G., Schiff, R., & Wang, X. S. (2021b). Therapeutic targeting of nemo-like kinase in primary and acquired endocrine-resistant breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(9), 2648-2662. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2961/78576/AM/THERAPEUTIC-TARGETING-OF-NEMO-LIKE-KINASE-IN>
- Wang, Y., Luo, Q., He, X., Wei, H., Wang, T., Shao, J., & Jiang, X. (2018). Emodin Induces Apoptosis of Colon Cancer Cells via Induction of Autophagy in a ROS-Dependent Manner. *Oncology research*, 26(6), 889-899. <https://doi.org/10.3727/096504017X15009419625178>
- Wilkes, M. C., Jung, K., Lee, B. E., Saxena, M., Sathianathen, R. S., Mercado, J. D., Perez, C., Flygare, J., Narla, A., Glader, B., & Sakamoto, K. M. (2021). The active component of ginseng, ginsenoside Rb1, improves erythropoiesis in models of Diamond-Blackfan anemia by targeting Nemo-like kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 297(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100988>
- Witten, L., & Slack, F. J. (2020). miR-155 as a novel clinical target for hematological malignancies. *Carcinogenesis*, 41(1), 2-7. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGZ183>
- Wolff, A. C., Kimmel, S., & Tan, H. (2007). Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists in Premenopausal Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Sing. *Clinical Breast Cancer*, 7(6), 455-464. <https://doi.org/10.3816/CBC.2007.n.002>
- Xu, H., & Xu, B. (2023). Breast cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese Journal of Cancer Research*, 35(6), 565. <https://doi.org/10.21147/J.ISSN.1000-9604.2023.06.02>
- Yan, X., Liu, J., Wu, H., Liu, Y., Zheng, S., Zhang, C., & Yang, C. (2016a). Impact of miR-208 and its Target Gene Nemo-Like Kinase on the Protective Effect of

- Ginsenoside Rb1 in Hypoxia/Ischemia Injured Cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(3), 1187-1195. <https://doi.org/10.1159/000447825>
- Yan, X., Liu, J., Wu, H., Liu, Y., Zheng, S., Zhang, C., & Yang, C. (2016b). Impact of miR-208 and its Target Gene Nemo-Like Kinase on the Protective Effect of Ginsenoside Rb1 in Hypoxia/Ischemia Injured Cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(3), 1187-1195. <https://doi.org/10.1159/000447825>
- Yasuda, J., Tsuchiya, A., Yamada, T., Sakamoto, M., Sekiya, T., & Hirohashi, S. (2003). Nemo-like kinase induces apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(2), 227-233. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01343-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01343-3)
- Yasuda, J., Yokoo, H., Yamada, T., Kitabayashi, I., Sekiya, T., & Ichikawa, H. (2004). Nemo-like kinase suppresses a wide range of transcription factors, including nuclear factor-kB. *Cancer Science*, 95(1), 52-57. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2004.TB03170.X>
- Yu, J. Q., Bao, W., & Lei, J. C. (2013). Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells. *Phytotherapy research: PTR*, 27(2), 251-257. <https://doi.org/10.1002/PTR.4703>
- Yu, P., Wu, D., You, Y., Sun, J., Lu, L., Tan, J., & Bie, P. (2015). miR-208-3p promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through regulating ARID2 expression. *Experimental Cell Research*, 336(2), 232. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2015.07.008>
- Yue, W., Wang, J. P., Li, Y., Fan, P., Liu, G., Zhang, N., Conaway, M., Wang, H., Korach, K. S., Bocchinfuso, W., & Santen, R. (2010). Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *International journal of cancer*, 127(8), 1748-1757. <https://doi.org/10.1002/IJC.25207>
- Zhang, L., He, D., Li, K., Liu, H., Wang, B., Zheng, L., & Li, J. (2017). Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 90, 222-228. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.03.046>
- Zhang, N., Wang, J., Sheng, A., Huang, S., Tang, Y., Ma, S., & Hong, G. (2021a). Emodin Inhibits the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Through Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). *Frontiers in Pharmacology*, 11, 622046. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.622046/BIBTEX>
- Zhang, N., Wang, J., Sheng, A., Huang, S., Tang, Y., Ma, S., & Hong, G. (2021b). Emodin Inhibits the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Through Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). *Frontiers in Pharmacology*, 11, 622046. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.622046>
- Zhang, N., Wang, J., Sheng, A., Huang, S., Tang, Y., Ma, S., & Hong, G. (2021c). Emodin Inhibits the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Through Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). *Frontiers in Pharmacology*, 11, 622046. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.622046/BIBTEX>

- Zhang, Q., Chen, W. W., Sun, X., Qian, D., Tang, D. D., Zhang, L. L., Li, M. Y., Wang, L. Y., Wu, C. J., & Peng, W. (2022). The versatile emodin: A natural easily acquired anthraquinone possesses promising anticancer properties against a variety of cancers. *International journal of biological sciences*, 18(8), 3498-3527. <https://doi.org/10.7150/IJBS.70447>
- Zhang, W., Lu, X., Wang, W., Ding, Z., Fu, Y., Zhou, X., Zhang, N., & Cao, Y. (2017). Inhibitory Effects of Emodin, Thymol, and Astragaloside on Leptospira interrogans-Induced Inflammatory Response in the Uterine and Endometrium Epithelial Cells of Mice. *Inflammation*, 40(2), 666-675. <https://doi.org/10.1007/S10753-017-0513-9>
- Zhang, Y. N., Xia, K. R., Li, C. Y., Wei, B. L., & Zhang, B. (2021). Review of Breast Cancer Pathological Image Processing. *BioMed Research International*, 2021(1), 1994764. <https://doi.org/10.1155/2021/1994764>
- Zhao, W., Gupta, A., Krawczyk, J., & Gupta, S. (2022). The miR-17-92 cluster: Yin and Yang in human cancers. *Cancer Treatment and Research Communications*, 33, 100647. <https://doi.org/10.1016/J.CTARC.2022.100647>
- Zheng, Q., Li, S., Li, X., & Liu, R. (2021a). Advances in the study of emodin: an update on pharmacological properties and mechanistic basis. *Chinese Medicine* 2021 16:1, 16(1), 1-24. <https://doi.org/10.1186/S13020-021-00509-Z>
- Zheng, Q., Li, S., Li, X., & Liu, R. (2021b). Advances in the study of emodin: an update on pharmacological properties and mechanistic basis. *Chinese Medicine* 2021 16:1, 16(1), 1-24. <https://doi.org/10.1186/S13020-021-00509-Z>
- Zhou, J., Li, G., Han, G., Feng, S., Liu, Y., Chen, J., Liu, C., Zhao, L., & Jin, F. (2020). Emodin induced necroptosis in the glioma cell line U251 via the TNF- α /RIP1/RIP3 pathway. *Investigational new drugs*, 38(1), 50-59. <https://doi.org/10.1007/S10637-019-00764-W>
- Zhu, T., Zhang, W., Feng, S. J., & Yu, H. P. (2016). Emodin suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through a PPAR γ -dependent pathway. *International immunopharmacology*, 34, 16-24. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2016.02.014>
- Zu, C., Zhang, M., Xue, H., Cai, X., Zhao, L., He, A., Qin, G., Yang, C., & Zheng, X. (2015). Emodin induces apoptosis of human breast cancer cells by modulating the expression of apoptosis-related genes. *Oncology Letters*, 10(5), 2919. <https://doi.org/10.3892/OL.2015.3646>

7. EKLER

Tablo 7-1 Çalışma Süresince Kullanılan Cihazların Listesi

| ÜRÜN ADI | ÜRÜN KODU | FİRMANIN ADI |
|------------------------------------|---|----------------------------------|
| CO ₂ inkübatörü | 50116047 | Thermo Fsiher Scientific |
| Distile Su Cihazı | PE/Milipore | Labor-Teknik |
| Derin Dondurucu | ULT Freezer | ARCTIKO |
| Dondurucu Cihazı | Ultra Low Temperature Freezer Innova U725 | New Brunswick Scientific |
| Spektrofotometre | IMPLEN NanoPhotometer | BO-GA |
| Floresan Mikroskopu | IX71 | Olympus |
| PCR Stripler | AB-0783 | Thermo Scientific |
| Termal Döngüleyici | MyCycler Thermal Cycler | BioRad |
| QRT-PCR Cihazı | CFX Connect | Bio-Rad |
| Buz Makinası | AF80 | Scotsman |
| Manyetik Karıştırıcı | SB162 | Stuart |
| Dikey Jel Elektrofrezisi Sistemi | M-P Tetra Cell | Bio-Rad |
| Mikropipetler | | CAPP |
| Bio-Rad Voltaj | 164-5050 | Bio-Rad PowerPac™ Basic |
| Proteinlerin Ayrıştırılması Cihazı | 165-8004 | Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell |
| Santrifüj | NF 200 | Nüve |
| Mini Santrifüj Cihazı | CR-1512 | CAPP |
| Hemositometre | Neubauer | Assistent-Germany |
| Laminar Flow | HERASAFE KS | Thermo Scientific |
| İnvert Mikroskop | XDS-1B | SOIF |
| Optik Mikroskop | TH4-200 | Olympus |
| Mikroplaka Reader | iMark | Bio-Rad |
| Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı | ChemiDoc 1708280 | Bio-Rad |
| Sıvı Azot Tankı | Arpege 40 | Air Liquid |
| PVDF Membran 0,45 µm | 10600023 | GE Healthcare |
| Akış sitometrisi cihazı | 660517 | BD Accuri C6 Flow Cytometer |
| Otoklav | GR60SA | ALWAY |

Tablo 7-2 Çalışma Süresince Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller

| ÜRÜN ADI | ÜRÜN KODU | FİRMANIN ADI |
|--------------------------|------------|----------------------|
| MCF-7 | HTB-22 | ATCC |
| MDA-MB-231 | HTB-26 | ATCC |
| 96 Kuyucuklu Hücre plate | 92096 | TPP |
| Kriyoviyal | 607001 | NEST |
| DMEM | 41966-029 | gibco |
| DMEM/yüksek glukoz | SH30243.01 | HyClone |
| FBS Fetal Sığır Serumumu | FBS-HI-11A | Capricorn Scientific |

| | | |
|--|------------|---------------------|
| FBS Fetal Sığır Serumu | 10270-106 | gibco |
| Penisilin/Streptomisin | P06-07100 | PAN Biotech |
| Emodin | BD6309 | BLD PHARMATECH GmbH |
| 0.25% Trypsin-EDTA 1X | SH40003.01 | HyClone |
| Hücre Büyütme Kapları 25 cm ² | 90026 | TPP |
| Hücre Büyütme Kapları 60 mm | 93060 | TPP |
| 15'lik Santrifüj Tüpleri | 5100015 | CAPP |
| 50'lik Santrifüj Tüpleri | 430828 | CORNING |

Tablo 7-3 Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Listesi

| ÜRÜN ADI | ÜRÜN KODU | FIRMANIN ADI |
|--|--|--------------------------|
| Trypsin 0.25% 1X | SH40003.01 | HyClone |
| Yağsız Süt Tozu | SK1400.1 | Bio-Shop |
| Kristal Viyole | FN1048735 | MERCK |
| DIMETHYL SULFOXIDE | DMS555.1 | Bio-Shop |
| Transfeksiyon Reaktif | T0083 | Canfast |
| Etanol | TK.200650 | Teksoll |
| iScript cDNA Sentez Kit | 1708891 | BioRad |
| Rnase A, Dnase, Protease free | EN0531 | Thermo scientific |
| İzopropanol | 1096342500 | MERCK |
| miRNeasy-Mini Kit | 175024182 | Qiagen |
| miScript II-RT Kit | 218161 | Qiagen |
| miScript SYBR Green PCR Kit | 218073 | Qiagen |
| GOTaq MasterMix | A600A | Promega |
| Kloroform | 1024452500 | MERCK |
| Ekstraksiyon Reaktifi NE-PER | 78835 | Thermo scientific |
| Akrilamid/Bis- Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1) | A0011 | BIOBASIC |
| Ammonium Persulfate | A2941 | AppliChem |
| Asetik Asit(AA) | 901.013 | ISOLAB |
| Coomassie Brilliant Blue | 1610436 | Bio Rad |
| Glisin | 800-045-LG | MULTICELL |
| Hidrojen-Peroksit %35 | 1086001000 | MERCK |
| Metanol | 34860 | Honeywell |
| MTT reagent | BD18787 | BLD pharm |
| Luminol | A2185 | Appli Chem |
| Ekstraksiyon Reaktifi M-PER | 78505 | Thermo Fisher Scientific |
| Kumarik Asit | C9008-1G | Sigma-Aldrich |
| Ponceau S Solüsyonu | A2935 | Appllichem |
| Proteaz İnhibitör Tablet | A32955 | Thermo Fisher Scientific |
| Protein Marker Western blot | PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619 | Thermo Scientific |
| Sodyum Dodesil Sülfat | A600188 | Sangon Biotech |
| TEMED (Tetrametiletildiamin) | 8027ML100 | BIO-FROXX |
| Tris-HCL | 648317 | CALBIOCHEM |
| Tween 20 | A600560-0500 | Sangon Biotech |

Tablo 7-4 Kullanılan Antikorlar ve miRNA Molekülleri listesi

| Antikor Adı | Katalog Numarası | Firma Adı |
|-----------------------------|------------------|----------------|
| Inhibitor HSA-MIR-208A-5P | YI04106432-ADA | QIAGEN |
| IgG Anti-rabbit HRP-konjuge | 7074P2 | CST |
| IgG Anti-mouse HRP- konjuge | 7076P2 | CST |
| β - Aktin | 664804 | Bio Legend |
| β - Tubulin | 2128T | CST |
| GAPDH | 5346 | CST |
| ERa | 8644 | CST |
| ERK1/2 | 9102 | CST |
| pERK1/2 | 9101 | CST |
| P38 α /SAPK2a | 9218 | BD Biosciences |
| pP38 | 9211 | CST |
| NLK | 94350 | CST |
| JNK | 9252 | CST |
| pJNK | 9251 | CST |
| c-MYC | 9402 | CST |

Tablo 7-5 Kullanılan Primer Dizileri

| Primer adı | | Hedeflenen insan miRNA dizisi |
|--|-------------------------------|---|
| hsa-miR-208a-5p | (Qiagen, Kat. No: MS00045829) | hsa-miR-208a: AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU |
| Universal primer | | 5'-GCATAGACCTGAATGGCGGTA-3 |
| RNU6 Housekeeping gene (Reference gene) | 20230927/2 YP02119464 | Forward: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' Reverse :5'-AACGCTTCACGAATTTG-3' |

Tablo 7-6 %12'lik Alt Jel hazırlama (Seperating Gel)

| Malzeme | Hacim (1 Jel) |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Distile Su | 1.7 mL |
| 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 | 1.25 mL |
| %10 SDS | 0.05 mL (50 μ L) |
| %30 Acrylamide/Bis (%0.8 w/v) | 2.0 mL |
| %10 (w/v) Amonyum Persulfat (APS) | 0.025 mL (25 μ L) |
| TEMED | 0.005 mL (5 μ L) |

Tablo 7-7 % 4'lük Üst Jel hazırlama (Stacking Gel)

| Malzeme | Hacim (1 Jel) |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Distile Su | 1.5375 mL |
| Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 | 0.625 mL |
| %10 SDS | 0.025 mL (25 μ L) |
| Acrylamid/bisacry (%30, %0.8 w/v) | 0.335 mL |
| %10 (w/v) Ammonium Persulphate (APS) | 0.0125 mL (12.5 μ L) |
| TEMED | 0.25 (2.5 μ L) |

Tablo 7-8 Kullanılan Çözeltiler

| | |
|--|--|
| Hücre Besiyeri | 500 mL DMEM bazlı besiyeri hazırlanırken, içerisine %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin eklenmiştir. Karışım, sterilizasyon amacıyla 0,22 µm por çaplı filtre yardımıyla süzölmüş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan besiyeri, 50 mL santrifüj tüplerinde bölünerek +4 °C’de saklanmıştır |
| Hücre Dondurma Medyası (Freezing Media) | 9 mL fetal bovin serumu (FBS) ve 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) karıştırılarak hazırlanmış, ardından 0,22 µm por çaplı filtre kullanılarak süzölmüştür. Elde edilen medya, kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır |
| MTT Reaktifi | 0,05 g MTT tartılarak 10 mL 1X PBS içerisinde çözöndürölmüş, hazırlanan çözeltili 0,22 µm filtre ile süzölerek sterilize edilmiş ve -20°C’de depolanmıştır |
| Trypan Blue Çözeltilisi | %0,4 (w/v) tripan mavisi çözeltilisi, 0,4 g tripan mavisi tartılarak 100 mL 1X PBS içerisinde çözümlenerek hazırlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır |
| Bradford Reaktifi | 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250), 50 mL %95 etanol ve 100 mL %85 fosforik asit eklenerek 1 L distile su içerisinde çözülmüş, 0,22 µm filtre ile süzölüp alüminyum folyo ile kaplanarak +4 °C’de saklanmıştır |
| BSA (1,5 µg/mL, 10 mL) | 0,015 g BSA, 10 mL distile su içerisinde çözümlenip 0,22 µm filtre ile süzölmüş, alikotlanarak +4 °C’de depolanmıştır |
| Ponceau S (500 mL) | 25 mL glasiyal asetik asit ve 400 mL distile su karıştırılmış, üzerine 0,5 g Ponceau S tetrasodyum tuzu eklenip çözümlene kadar karıştırılmış, ardından son hacim 500 mL’ye tamamlanmıştır |
| %70 Etanol Çözeltilisi | 500 mL’lik çözeltili hazırlanırken, 350 mL saf etanol üzerine 150 mL distile su eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir |
| Luminol Çözeltilisi | 0,44 g Luminol, 10 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözümlenerek hazırlanmış, ışık hassasiyetinden korunması için alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C’de saklanmıştır |
| Mild Strip | 1 L’lik tampon için, 15 g glisin, 1 g SDS ve 10 mL Tween-20, 800 mL distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülmüş, pH 2,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Son olarak, distile su ile hacim 1000 mL’ye tamamlanarak hazır hale getirilmiştir |
| Amonyum Persülfat (%10) | 1 g tartılan APS 10 ml distile su ile çözdürölür. Hazırlanan çözeltili -20°C’de saklanmıştır |
| %5 Bloklama Sütü | 50 mL’lik bloklama çözeltilisi için 2,5 g yağsız süt tozu, TBS-T (TBS + Tween-20) çözeltilisi ile tamamlanarak hazırlanmış ve manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözülmüştür |
| Kemilüminesans Membran Görüntöleme (ECL) | Görüntöleme amacıyla A ve B olmak üzere iki ayrı çözeltili hazırlanmıştır. A çözeltilisi, 9 mL distile su, 1 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,5), 80 µL kumarik asit ve 200 µL luminol eklenerek oluşturulmuştur. B çözeltilisi ise 9 mL distile su, 1 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,5) ve 10 µL hidrojen peroksit eklenerek hazırlanmıştır |
| Koomassie Brilliant Blue Çözeltilisi | 10g Koomassie Brilliant Blue G-250 tartılmış, ardından 225 mL etanol, 50 mL asetik asit ve 225 mL distile su içinde tamamen çözümlenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir |
| Kristal Viyole Çözeltilisi | 0,25 g kristal viyole, 12,5 mL %25’lik metanol içerisine eklenmiş ve distile su ilavesiyle son hacim 50 mL’ye tamamlanmıştır |
| Kumarik Asit Çözeltilisi | 0,15 g kumarik asit, 10 mL etanol içerisinde çözümlenerek hazırlanmış ve +4 °C’de saklanmıştır |
| Laemmlı (5X) Yükleme Tamponu | 10 mL için; 2mL Tris-Cl çözeltilisi (1,5 M, pH 6,8) , 0,5 mL %1 bromofenol mavisi, 5mL gliserol, 2,5 mL β-merkaptoetanol ve 1,0 g SDS içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon +4 °C’de saklanmıştır |
| Memeli Hücre Lizis Tamponu (CLB) | 10 mL M-PER™ memeli protein ekstraksiyon çözeltilisine, 1X seyreltilmiş proteaz inhibitör kokteyli eklenerek hazırlanan hücre lizis tamponu +4 °C’de muhafaza edilmiştir |
| p-CLB hazırlığı | 10 mL M-PER™ Memeli Protein Ekstraksiyon Solüsyonu içerisine bir tablet Roche PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli ve bir tablet Roche proteaz inhibitör (PI) kokteyli eklenmiştir. Çözeltili, her biri 1 mL olacak şekilde Eppendorf tüplerine alikotlanmış p-CLB örnekleri +4 °C’de saklanmıştır |

| | |
|------------------------|--|
| 10X TBS çözeltisi | 5,6 g Tris-baz, 88 g NaCl ve 24 g Tris-HCl yaklaşık 900 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür. pH değeri 5 M HCl ve 5 M NaOH kullanılarak 7,6'ya ayarlanır ve son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanır. Elde edilen 10X TBS, deneylerde kullanılmak üzere distile su ile seyreltilerek 1X TBS çözeltisine dönüştürülür |
| 1X TBS-T çözeltisi | 10X stoktan seyreltilmiş 1X TBS üzerine Tween-20 ilave edilerek hazırlanır |
| Transfer tamponu (10X) | 1 L stok çözelti hazırlamak için 30,3 g Tris-baz ve 144 g Glisin tartılır, 800 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı ile çözülür. pH değeri 8,0-9,0 aralığına ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanır. 1X transfer tamponu hazırlanırken, 100 ml 10X stok üzerine 700 ml distile su ve 200 ml metanol eklenerek 1 L'ye tamamlanır |
| Yürütme tamponu (10X) | 1 L stok çözeltisi için 30,3 g Tris-baz, 144 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak 800 ml distile su içerisinde çözülür. pH değeri 8,0-9,0 aralığına ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanır. Kullanım sırasında stok çözelti distile su ile 1X yürütme tamponuna seyreltilir |
| %10 SDS çözeltisi | 1 g SDS tartılarak 10 ml distile su içerisinde tamamen çözülerek hazırlanmıştır |