Araştırma Makalesi / *Research Article*

Ege Tıp Dergisi /*Ege Journal of Medicine* 2025; 64 (4): 630-642

Meme kanseri tedavisinde 147-DENA monoklonal antikorunun apoptotik etkisinin incelenmesi

Investigation of the apoptotic effect of the 147-DENA monoclonal antibody in breast cancer treatment

Ayşegül Taşkıran Özyazıcı[1] Ilgın Kımız-Geboloğlu[2,3] Saime İsmet Deliloğlu-Gürhan[2,4] Gülperi Öktem[1*]

[1]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

[2]Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

[3]Ege Üniversitesi, İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi, İzmir, Türkiye

[4]Sabancı Üniversitesi, Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türü olup geniş bir moleküler heterojenite sergilemektedir. Bu çalışma, onkogelişimsel antijen olan deaminonöraminik aside karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikorun iki farklı meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksisite, apoptoz, morfolojik değişiklikler ve gen ekspresyonu modülasyonu yönünden etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır.

Gereç ve Yöntem: Meme kanseri hücreleri MCF-7 ve MDA-MB-231 ile normal meme epitel hücre hattı olan MCF-10A, standart koşullar altında kültüre edilmiştir. Hücrelere 147-DENA monoklonal antikorunun çeşitli konsantrasyonları uygulanarak WST-1 testi ile IC50 değeri belirlenmiştir. Ardından, apoptoz analizi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein seviyelerinin immün floresan boyama yöntemiyle incelenmesi sonucu doğrulanmıştır. Hücre morfolojisi, apoptoza özgü yapısal değişikliklerin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücre metabolizması ve apoptozla ilişkili gen ekspresyon değişiklikleri ise RT-PCR analizi ile incelenmiştir.

Bulgular: Monoklonal antikor 147-DENA, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etki gösterirken, non-tümorijenik epitel hücre hattı olan MCF-10A üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmamıştır. Daha ileri analizler, 147-DENA uygulamasının pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırırken anti-apoptotik protein seviyelerini azalttığını ve bu durumun belirgin bir pro-apoptotik eğilime işaret ettiğini ortaya koymuştur. Morfolojik olarak hücrelerde, hücre büzülmesi ve membran kabarcıklanması gibi apoptozun karakteristik özellikleri gözlenmiştir. Buna ek olarak, apoptoz ve hücre metabolizması ile ilişkili genlerdeki ekspresyon değişiklikleri, 147-DENA'nın terapötik potansiyelini vurgulamaktadır.

Sonuç: 147-DENA, apoptozu indükleyerek meme kanseri hücrelerini seçici olarak hedef alırken, normal epitel hücrelere zarar vermemiştir. Kritik apoptotik yolakları ve gen ekspresyonunu modüle edebilme yeteneği, 147-DENA'nın özellikle yüksek derecede heterojen tümör profillerinde meme kanseri için hedefe yönelik bir tedavi stratejisi olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Monoklonal antikor, meme kanseri, apoptoz, sitotoksisite

Sorumlu yazar: Gülperi Öktem
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
E-mail: *gulperi.oktem@ege.edu.tr*
Başvuru tarihi: 21.04.2025 Kabul tarihi: 06.08.2025

ABSTRACT

Aim: *Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer type in women worldwide and displays extensive molecular heterogeneity. This study aimed to evaluate the effects of 147-DENA, a monoclonal antibody developed against the oncodevelopmental antigen diamino neuraminic acid, on two distinct breast cancer cell lines regarding cytotoxicity, apoptosis, morphological changes, and gene expression modulation.*

Materials and Methods: *Breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231, along with the normal breast epithelial cell line MCF-10A, were cultured under standard conditions. Various concentrations of the 147-DENA monoclonal antibody were applied to the cells, and the IC50 value was determined using the WST-1 assay. Subsequently, apoptosis analysis was confirmed by examining the levels of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins using the immunofluorescence staining method. Cell morphology was evaluated using scanning electron microscopy to identify apoptosis-specific structural changes. Changes in gene expression related to cell metabolism and apoptosis were analyzed using RT-PCR.*

Results: *The monoclonal antibody 147-DENA induced cytotoxic effects in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells while sparing the non-tumorigenic epithelial MCF-10A cell line. Further analysis revealed that 147-DENA treatment led to an increased expression of apoptotic proteins and decreased levels of anti-apoptotic proteins, indicating a clear pro-apoptotic shift. Morphologically, the cells exhibited characteristic features of apoptosis, including cellular shrinkage and membrane blebbing. Additionally, altered expression patterns in genes associated with apoptosis and cell metabolism highlighted the therapeutic potential of 147-DENA.*

Conclusion: *147-DENA selectively targets breast cancer cells by inducing apoptosis without damaging normal epithelial cells. Its capability to modulate crucial apoptotic pathways and gene expression highlights its potential as a targeted therapeutic strategy for breast cancer, especially in highly heterogeneous tumor profiles.*

Keywords: *Monoclonal antibody, breast cancer, apoptosis, cytotoxicity*

GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeli taşıması nedeniyle günümüzde küresel ölçekte en önemli sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir (1). Özellikle meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup insidans ve mortalite oranlarının giderek artacağı öngörülmektedir (2). Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemleri tümör hücrelerini hedef alırken aynı zamanda sağlıklı dokulara da zarar verebilmekte; bu da tedavi etkinliğini sınırlayarak ciddi yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle, sadece tümör hücrelerini hedef alarak istenmeyen etkiyi en aza indiren, daha spesifik ve hedefe yönelik yeni nesil tedaviler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır (3,4).

Monoklonal antikorlar (mAb), belirli antijenleri tanıyıp bağlanabilme özellikleri sayesinde kanser immünoterapisinde öne çıkan biyolojik ajanlardır (3,4). 1975 yılında Köhler ve Milstein tarafından geliştirilen fare hibridoma teknolojisi, spesifik antijenlere karşı monoklonal antikor üreten hibridoma hücre hatlarının elde edilmesine olanak sağlamış ve bu yenilik, hedefe yönelik kanser tedavilerinin temelini atmıştır (5). Günümüzde mAb'ler, çok sayıda kanser türünde klinik kullanıma girmiş olup, tedavinin etkinliğini artırmak amacıyla sürekli olarak geliştirilmekte ve çeşitli kombinasyon tedavileri içinde yer almaktadır (6).

Meme kanseri, farklı histolojik ve moleküler alt tipler barındıran heterojen bir hastalık olup, tümör hücrelerinin yüzey glikozilasyon paternlerinde önemli değişiklikler gözlenmektedir. Bu değişikliklerden özellikle hipersialilasyon, tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz potansiyelini artıran kritik bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Sialik asitler (Sia), hücre yüzeyindeki glikokonjugatların terminal monosakkaritleri olarak hücreler arası etkileşimlerde ve tümör progresyonunda önemli roller üstlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinde belirli bir sialik asit türevi olan deaminonöraminik asit (DENA) ekspresyonunun arttığı ve bu yükselişin kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (7,8). Bu nedenle, DENA'nın tümör-gelişimsel bir belirteç olarak kullanılması ve tedavide hedeflenmesi, önemli ve gelecek vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, DENA antijenine özgü geliştirilen monoklonal antikorun (147-DENA mAb) meme kanserindeki terapötik potansiyelini değerlendirmek amacıyla, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde in vitro incelemeler gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında, 147-DENA mAb'nin sitotoksik etkisi, apoptoz indüksiyonu ve buna bağlı gen ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Elde edilen verilerin, DENA hedefli monoklonal antikor tedavilerinin meme kanserinde kullanılabilirliği ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarına katkısı bakımından önemli bir kaynak oluşturması hedeflenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

İmmünizasyon, Hücre Füzyonu ve Hibridoma Klon Seçimi

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup, 2015-023 onay numarası ile yürütülmüştür. Özel patojenlerden arındırılmış altı aylık, iki dişi Yeni Zelanda beyaz tavşanı (2 - 2,5 kg), T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Ag8-Ege2 (Ag8) fare miyeloma hücre hattı, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü ana hücre stoklarından alınmıştır. Kültürler, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 gentamisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37°C'de ve %5 CO_2 nemlendirilmiş inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Aşılama çalışmaları, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma ve Uygulama Merkezi (ARGEFAR) preklinik geliştirme biriminde yapılmıştır. Tavşanlara, ketodesoksinonulosonik asit (KDN, Sigma, 60714) antijeni enjekte edilerek anti-KDN monoklonal antikor (mAb) üreten hibridoma klonlarının elde edilmesi hedeflenmiştir. Aşılama her iki haftada bir yapılmış; KDN antijeni steril PBS tamponunda çözülerek, ilk iki enjeksiyon subkutan (SC), sonraki enjeksiyonlar intraperitoneal (IP) yolla uygulanmıştır. İlk bağışıklamada Freund Komplet Adjuvanı (FCA, Sigma, F5881), sonraki aşılarda Freund İnkomplet Adjuvanı (FICA, Sigma, F5506) kullanılmıştır. Üçüncü bağışıklamadan sonra, tavşanın kulak toplardamarından kan alınarak ELISA yöntemi ile mAb titresi belirlenmiştir. Antikor titresi artışı gözlemlendiğinde, tavşan anestezi edilip kalbinden tam kan alımı yapılmış ve hayvan feda edilmiştir. Periton açılarak dalak çıkarılmış ve %2 gentamisin ile %1 penisilin/streptomisin içeren, serum içermeyen RPMI-1640 besiyerine aktarılmıştır. Yağ gibi atıklar temizlendikten sonra dalak, enjektör kullanılarak tamamen parçalanmış ve serum içermeyen ortamda üç kez 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Splenositler, %10 serum içeren besiyerinde süspanse edilip sayılmıştır. Füzyon işlemi için, splenositler ve kültüre edilmiş Ag8 hücreleri 10:1 oranında karıştırılarak santrifüj edilmiştir. Pellet serum içermeyen ortamla homojenize edildikten sonra, $3x10^8$ hücre karışımına yavaşça 1,5 mL PEG (Roche PEG 1500, 104556100) eklenmiştir. 37°C'de 1 dakika inkübe edildikten sonra, toplam 20 mL serum içermeyen ortam birer dakika arayla; ilkinde 1 mL, ikincisinde 3 mL ve üçüncüsünde 16 mL olacak şekilde eklenmiştir. Santrifüj sonrası, HAT ortamı (RPMI-1640 + %20 FBS + %1 L-glutamin + %1 100X HAT (Sigma, H0262) + %1 $NaHCO_3$ + %0,1 gentamisin + %1 penisilin/streptomisin + %2,5 hibridoma füzyon ve klonlama katkısı (Sigma, 11-363-735-001)) 24 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 10^6 hücre/1,5 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Klon seçimi için, füzyondan 14 gün sonra tüm kuyucuklara ELISA yapılmış ve pozitif kuyucuklar yeni plakalara aktarılıp %1 HT (Sigma, H0137) içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hibridoma hücrelerinin oluşumu her gün mikroskopla gözlemlenmiştir. Her yedi günde bir ELISA yapılmış ve pozitif ELISA kuyucukları yeni 96 kuyucuklu plaklara klonlanarak hibridoma klonları elde edilmiştir. Seçilen klonlar 37°C inkübatörde kültüre edilmiş ve sonraki çalışmalar için sıvı azotta saklanmıştır.

Anti-KDN Antikor Titresinin Belirlenmesi için Dolaylı ELISA

Anti-KDN mAb titresini belirlemek için çalışma grubu tarafından optimize edilen dolaylı ELISA yöntemi kullanılmıştır (Gülçe-İz ve ark., 2018). Kısaca; 96 kuyucuklu plaklar, 175 ng KDN antijeni ile kaplanarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün, kuyucuklar %0,5 (a/a) BSA içeren 0,1 M PBS ile 1 saat oda sıcaklığında bloke edilmiştir. Ardından, TPBS (0,1 M PBS + %0,1 (v/v) Tween-20) ile üç kez, her biri 5 dakika süren yıkama yapılmıştır. 100 µL örnekler ve kontroller, birincil antikor olarak eklenip 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yıkama sonrası, TPBS içinde %0,1 (v/v) HRP-konjuge anti-tavşan KDN IgG (Sigma, A9169) eklenmiş ve karanlıkta 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra, substrat çözeltisi (30 mg OPD (Sigma, P8412), 75 mL 0,05 M fosfat-sitrat tamponu içinde çözülmüş) eklenmiş ve karanlıkta

30 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans, mikroplaka okuyucusu (SpectraMax 190, VersaMax) ile 450 nm'de ölçülmüştür.

Anti-KDN Antikorunun Konsantrasyonu

ELISA ile anti-KDN mAb üretimi belirlenen ve şişe ölçeğinde büyütülen klonlardan elde edilen kültür süpernatantları, hacmi azaltılarak saflaştırma öncesinde konsantre edilmiştir. Öncelikle, süpernatantlar 4°C'de 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek hücre artıkları ve makropartiküller uzaklaştırılmış, ardından sırasıyla 0,45 µm ve 0,22 µm filtrelerden süzülmüştür. Elde edilen filtrat, 25°C'de 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek 100 kDa MWCO polieter sülfon (PES) membranlı santrifüj tüplerinde (Vivaspin20, Sartorius) konsantre edilmiştir. Elde edilen retentat, +4°C'de saflaştırma işlemine kadar muhafaza edilmiştir.

Protein-A Kolonuyla Anti-KDN Antikorunun Saflaştırılması

Anti-KDN mAb içeren konsantre retentat, AKTA Prime Plus kromatografi sistemine bağlı HiTrap MAbSelect SuRe Protein-A kolonundan (Cytiva, 29049104) geçirilerek saflaştırılmıştır. İşlem boyunca akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır. İlk olarak, kolon 25 mM di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat, 300 mM sodyum klorür, pH 7,5 içeren bağlanma tamponu ile 30 dakika koşullandırılmıştır. Retentat ve bağlanma tamponu 1:1 oranında karıştırılarak kolona yüklenmiştir. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için bağlanma tamponu geçirilmiş ve numune sıvısı görülmeyene kadar devam edilmiştir. Daha sonra, kolon 10 mM glisin, 300 mM sodyum klorür, pH 3,0 içeren elüsyon tamponuna maruz bırakılarak 30 dakika çalıştırılmıştır. Pik gözlemlendiğinde, saflaştırılan antikorlar önceden 1 M Tris-HCl (pH 9,0) içeren tüplere toplanmıştır. Kolon, bağlanma tamponu ile tekrar dengelenmiş ve uzun süreli depolama için etanol geçirilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırılan antikorlar, ileri karakterizasyon analizleri için -20°C'de saklanmıştır.

Hücre Kültürü

MCF-10A meme epitel hücre hattı, %5 fetal sığır serumu (Gibco, 10270106), 20 ng/mL insan epidermal büyüme faktörü (Merck, E9644), 5 µg/mL hidrokortizon (Merck, H0888), 10 µg/mL insülin (Merck, I4512) ve %1 penisilin-streptomisin (Thermo Fisher, SV30010) eklenmiş DMEM-F12 besiyerinde (Sigma, D5796) kültüre edilmiştir. Meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin eklenmiş RPMI-1640 ortamında (Thermo Fisher, 52400025) kültürlenmiştir. Hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında, %0,05 tripsin-EDTA kullanılarak pasajlama işlemi yapılmıştır. Tüm hücre hatları, %5 CO_2 37°C'de inkübe edilmiştir.

WST-1 Toksisite Analizi

mAb'nin sitotoksik etkileri, WST-1 reaktifi (Roche, İsviçre) kullanılarak IC_{50} değerinin belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiştir. mAb'nin seri dilüsyonları (1/10, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 ve 1/1000) uygulanmış ve hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, her kuyuya 10 µL WST-1 reaktifi eklenmiş ve plakalar 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Absorbans, 450 nm'de ölçülmüştür.

Annexin V Apoptoz Analizi

Apoptotik hücre ölümü Muse Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, MCH100105) kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücreler altı kuyulu plakalara ekilmiş ve WST-1 sitotoksisite analiziyle belirlenen dozlar ve inkübasyon süreleriyle inkübe edilmiştir. Hücreler, karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 100 µL Muse Annexin V & Dead Cell Reagent ile boyanmıştır. Canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre popülasyonları Muse™ Cell Analyzer cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

İmmünofloresan Boyama

Kaspaz-8, kaspaz-3 ve Bcl-2'nin ifade seviyeleri, mAb tedavisinin apoptotik etkilerini değerlendirmek için immünofloresan boyama ile değerlendirilmiştir. Hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edilmiş, %0,25 Triton X-100 ile permeabilize edilmiş ve %1 BSA ile bloke edilmiştir. Primer antikorlarla (1:100, Santa Cruz Biotechnology) +4°C'de bir gece inkübe edilmiş, FITC konjuge edilmiş sekonder antikorla (1:200, Santa Cruz Biotechnology) +4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Nükleer boyama, DAPI (sc-24941, Santa Cruz Biotechnology) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Floresan görüntüleme Olympus BX-51 immünofloresan mikroskobu (Olympus, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskopisi

Hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edilmiş, PBS ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Hava ile kurutulan

hücreler 6 nm'lik altın-paladyum nanopartikül tabakası ile kaplanmıştır. Görüntüleme, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) modunda bir Thermo Scientific Apreo S taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Gen Ekspresyon Analizi

Toplam RNA, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, #74134, Almanya) kullanılarak hücrelerden çıkarılmıştır. cDNA sentezi, RT² First Strand Kit (Qiagen, #330401, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifadesi değişiklikleri, SYBR Green içeren RT² Profiler PCR Array (Qiagen, PAHS-141Z) ve RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, #330502) kullanılarak değerlendirilmiştir. Analizler, LightCycler 480 Instrument II (Roche) ile gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin bağıl ifadesi, doğruluğu sağlamak için ACTB, B2M ve GAPDH housekeeping genlerine normalizasyonla karşılaştırmalı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Veri analizi, gen ifadesindeki katlanma değişimlerinin belirlenmesine olanak sağlayan LightCycler 480 Kantifikasyon Yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

147-DENA mAb'nin Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri

147 DENA mAb tedavisinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında çeşitli konsantrasyonlarda (1/10, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000 seyreltme) ve zaman noktalarında (24, 48 ve 72 saat) değerlendirilmiştir. Sağlıklı meme epitel hücreleri MCF-10A'da, tüm konsantrasyonlarda ve zaman noktalarında hücre canlılığında önemli bir azalma olmamış ve bu da tedavinin minimal veya hiç sitotoksik etkisi olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatları, hücre canlılığında doza ve zamana bağlı bir azalma göstermiş ve yüksek konsantrasyonlarda ve daha uzun inkübasyon sürelerinde daha belirgin etkiler gözlemlenmiştir. IC50 değeri, MCF-7 hücreleri için 48 saatlik inkübasyonla 1/1000 dilüsyon ve MDA-MB-231 hücreleri için 48 saatlik inkübasyonla 1/100 dilüsyon olarak hesaplanmıştır (Şekil-1A). Bu sonuçlar, sağlıklı epitel hücrelerini korurken kanser hücrelerinde mAb tedavisinin seçici sitotoksisitesini göstermiştir.

Annexin V testi, tedavi edilen hücrelerde tedavi edilmeyen gruplara kıyasla belirgin bir apoptozis indüksiyonu ortaya koymuştur (Şekil-1B). mAb tedavisi olmayan MCF-10A epitel hücrelerinde, canlı hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve ölü hücre yüzdeleri sırasıyla %93,21, %6,59, %0,20 ve %0. mAb tedavisinden sonra, bu değerler %93,90, %6,00, %0,10 ve %0 olup önemli bir apoptotik etki olmadığını göstermiştir. MCF-7 kanser hücre hattında, tedavi edilmeyen grup %93,13 canlı hücre, %6,34 erken apoptotik hücre, %0,11 geç apoptotik hücre ve %0,43 ölü hücre göstermiştir. Ancak mAb ile tedavi edilen grupta oranlar önemli ölçüde %58,96 canlı hücre, %34,19 erken apoptotik hücre, %6,57 geç apoptotik hücre ve %0,29 ölü hücre olarak değişmiştir. Benzer şekilde, MDA-MB-231 kanser hücre hattında, tedavi edilmeyen grup %92,40 canlı hücre, %7,45 erken apoptotik hücre, %0,15 geç apoptotik hücre ve %0 ölü hücre göstermiş, mAb tedavisinden sonra bu değerler %59,59 canlı hücre, %37,45 erken apoptotik hücre, %2,77 geç apoptotik hücre ve %0,18 ölü hücre olarak yükselmiştir. Bu sonuçlar tedaviyle indüklenen önemli apoptotik aktiviteyi göstermiştir.

MCF-10A hücrelerinde hem tedavi edilen hem de tedavi edilmeyen gruplar hücre canlılığı sonuçlarıyla tutarlı olarak minimal apoptotik hücre popülasyonları göstermiştir. Ancak, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, mAb tedavisi erken ve geç apoptotik hücre yüzdelerini önemli ölçüde artırmıştır. Özellikle, tedavi edilen MCF-7 hücreleri daha yüksek apoptotik popülasyonlara doğru kaymış (%41,05 toplam apoptoz), MDA-MB-231 hücreleri ise daha belirgin apoptotik değişiklikler göstermiştir (%40,4 toplam apoptoz) (Şekil-1C). Bu, mAb tedavisinin kanser hücrelerinde apoptozu etkili bir şekilde indüklediğini ancak kanserli olmayan hücreler üzerinde ihmal edilebilir etkileri olduğunu göstermektedir. İstatistiksel analizler, DENA mAb uygulamasının meme epitel hücrelerinde önemli apoptotik değişikliklere neden olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Ancak, meme kanseri hücrelerinin erken ve geç apoptotik popülasyonlarında önemli değişikliklere neden olmuştur (***$p<0,001$ ve **$p<0,01$). Bu bulgular ayrıca mAb tedavisinin kanserli hücrelerdeki seçici apoptotik aktivitesini desteklemektedir.

147-DENA mAb'nin Kaspaz-8, Kaspaz-3 ve Bcl-2 ekspresyonları üzerindeki etkileri

Kaspaz-8 (ekstrinsik apoptozun temel göstergesi), kaspaz-3 (apoptozisin temel uygulayıcısı) ve Bcl-2 (anti-apoptotik bir protein) ifadeleri mAb tedavisinin apoptotik etkilerini değerlendirmek için analiz edilmiştir (Şekil-2). MCF-10A hücrelerinde, kontrol ve mAb ile tedavi edilen gruplar arasında

kaspaz-8 aktivasyonunun ortalama floresan yoğunluğunda (mean fluorescence intensity=MFI) anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05), bu da tümör oluşturmayan epitel hücrelerinde apoptoz indüksiyonu olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücreleri, ilgili kontrollerine kıyasla mAb tedavisinden sonra anlamlı derecede artmış kaspaz-8 aktivasyonu sergilemiştir. Kantitatif analiz, MCF-7 (p<0,0001) ve MDA-MB-231 hücrelerinde (p<0,0001) MFI'de oldukça anlamlı artışlar ortaya koymuş ve her iki kanser hücre hattında da güçlü apoptozis indüksiyonunu göstermiştir (Şekil-2A). MCF-10A hücrelerinde, kaspaz-3 aktivasyonu kontrol ve mAb ile tedavi edilen gruplar arasında değişmeden kalmıştır (p>0,05), bu da tümör oluşturmayan epitel hücrelerinde apoptotik yanıtın eksikliğini daha da desteklemektedir. Kanser hücrelerinde, mAb tedavisi kaspaz-3 aktivasyonunu anlamlı şekilde artırmıştır. MCF-7 hücreleri MFI'de oldukça anlamlı bir artış (p<0,0001) gösterirken, MDA-MB-231 hücreleri orta düzeyde ancak anlamlı bir artış (p<0,01) sergilemiştir. Bu sonuçlar, her iki kanser hücre hattında da kaspaz-3 aracılı apoptozis indüksiyonunu doğrulamaktadır (Şekil 2B). MCF-10A hücrelerinde, Bcl-2 ekspresyonu kontrol ve tedavi edilen gruplar arasında düşük ve değişmeden kalmıştır (p>0,05), bu da hücre sağkalım mekanizmaları üzerinde hiçbir etki olmadığını göstermektedir. Aksine, mAb tedavisi her iki kanser hücre hattında da Bcl-2 ekspresyonunu önemli ölçüde aşağı düzenlemiştir. MCF-7 hücreleri MFI'da dramatik bir azalma göstermiş (p<0,0001), MDA-MB-231 hücreleri ise orta düzeyde ancak önemli bir azalma göstermiştir (p<0,01) (Şekil-2C). Bu bulgular, mAb tedavisinin kanser hücrelerinde anti-apoptotik savunmaları bozarak apoptoza katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Sonuçlar, mAb tedavisinin meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) Bcl-2 ekspresyonunu azaltırken seçici olarak kaspaz-8 ve kaspaz-3'ü aktive ettiğini, ancak tümör oluşturmayan MCF-10A epitel hücrelerini önemli ölçüde etkilemediğini göstermiştir. Bu, mAb'nin spesifik olarak apoptozis yürütme fazını tetiklediğini ve kanser hücrelerinde ekstrinsik apoptotik yolağı aktive ettiğini göstermiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde, kaspaz-8 aktivasyonu daha belirgindir, buna karşın kaspaz-3 aktivasyonu MCF-7 hücrelerindekinden daha az yoğundur. Ek olarak, Bcl-2 aşağı regülasyonu MCF-7 hücrelerinde daha önemli bulunmuştur, bu da mAb'nin meme kanseri hücrelerinde anti-apoptotik mekanizmalarını bozarak apoptozu indükleyebileceğini düşündürmektedir.

147-DENA mAb uygulaması ile indüklenen morfolojik etkilerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi

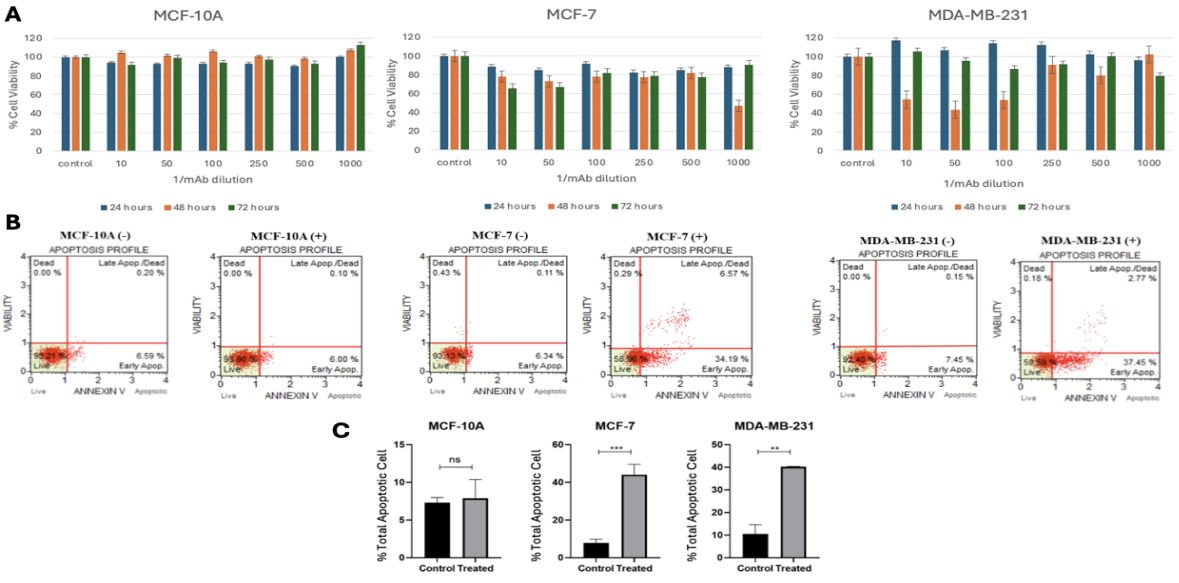
SEM analizi, mAb tedavisinin MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde belirgin morfolojik etkiler ortaya koymuştur (Şekil-3 A-C). MCF-10A epitel hücrelerinde hem kontrol hem de tedavi gruplarında, yapısal bütünlük korunmuş, pürüzsüz, sağlam membranlar sergilenmiştir. Anlamlı bir morfolojik değişiklik veya apoptoz indüksiyonu olmadığını göstermiştir. Buna karşılık, mAb tedavisi meme kanseri hücrelerinde belirgin değişikliklere neden olmuştur. MCF-7 hücreleri, kontrol grubunda gözlemlenen pürüzsüz morfolojiye kıyasla membran düzensizlikleri, yüzey bozulmaları ve kabarcıklanma gibi apoptotik özellikler göstermiştir. Benzer şekilde, kontrol grubunda iğ benzeri bir morfoloji sergileyen MDA-MB-231 hücreleri, mAb tedavisi sonrasında hücre büzülmesi, membran buruşması ve apoptotik kabarcıklanma dahil olmak üzere önemli morfolojik değişiklikler göstermiştir. Bu gözlemler, mAb tedavisinin meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) seçici olarak apoptozla ilişkili morfolojik değişiklikleri indüklediğini ve sağlıklı epitel MCF-10A hücrelerini koruduğunu doğrulamaktadır.

Isı haritası, mAb tedavisini takiben apoptozis, hücre döngüsü ve sinyal yolaklarında yer alan anahtar genlerin farklı ekspresyonlarını göstermektedir. Yukarı düzenlenmiş ifadeye sahip genler kırmızıyla, aşağı düzenlenmiş genler yeşille ve ifadenin büyüklüğü renk gradyanı ile gösterilmiştir (Şekil-4 A, C). BMP4 ve MAP3K1 gibi genlerde önemli yukarı düzenleme gözlemlenirken, hücre sağ kalımı ve proliferasyon yolaklarının anahtar bileşenleri olan PIK3CD, ATR ve AKT1 için güçlü aşağı düzenleme not edilmiştir (Şekil-4A). Sağ kalımla ilişkili genlerde gözlemlenen aşağı düzenleme, mAb tedavisiyle kanser teşvik edici yolların bozulduğunu göstermektedir (Tablo-1, Tablo-2). PPI ağı, tanımlanmış genler arasındaki etkileşimleri göstererek işlevsel ilişkilerini vurgulamaktadır (Şekil-4 B, D). AKT1, PIK3CD ve ATR dahil olmak üzere anahtar merkez proteinler, hücre sağ kalımı, DNA onarımı ve apoptozisteki temel rollerini yansıtarak ağın merkezinde yer almışlardır. AKT1 ve PIK3CD'nin aşağı düzenlenmesi, MAP3K1'in yukarı düzenlenmesiyle birleştiğinde, apoptoza ve

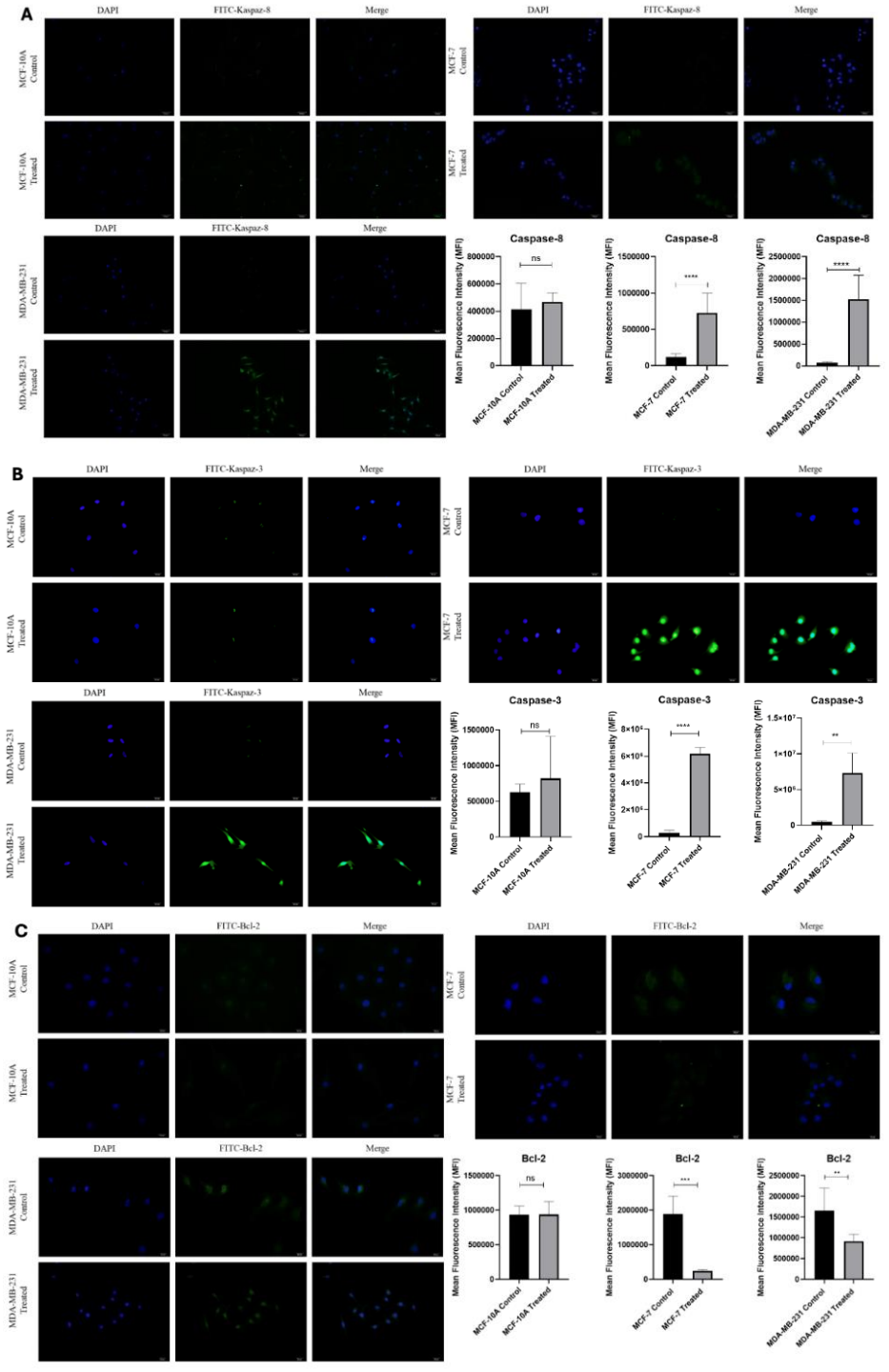
proliferatif sinyallemenin baskılanmasına doğru bir kaymayı vurgulamıştır.

Ek olarak, HSP90AA1 ve diğer bileşenler arasındaki etkileşimler, stres tepkisi yollarının dahil olduğunu göstermektedir (Şekil-4B). Gen ifadesi (Tablo-1, Tablo-2) ve protein-protein etkileşimlerinin birleşik analizi, mAb tedavisinin apoptoz, hücre döngüsü düzenlemesi ve sağ kalımda rol oynayan anahtar genleri ve yolları önemli ölçüde düzenlediğini göstermektedir. AKT1 gibi sağ kalımla ilişkili genlerin baskılanması ve BMP4 gibi apoptozu teşvik eden genlerin yukarı düzenlenmesi, mAb tedavisinin pro-apoptotik ve anti-tümorijenik etkilerini desteklemektedir. Bu bulgular, 147-DENA mAb'nin meme kanseri hücrelerinde kritik moleküler yolları hedefleme potansiyelini vurgulamaktadır.

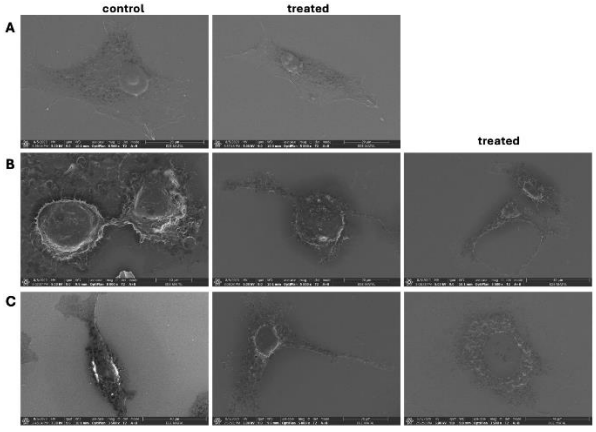
BMP4 ve MAP3K1 gibi genler önemli ölçüde yukarı düzenlenmiştir ve bu da pro-apoptotik ve stres tepkisi yolaklarının aktivasyonunu göstermektedir. Bunun tersine, AKT1, PIK3CD ve ATR gibi önemli hayatta kalma ve proliferasyon genleri güçlü bir şekilde aşağı düzenlenmiştir ve bu da hücre hayatta kalma ve DNA onarım mekanizmalarının baskılandığını göstermektedir (Şekil-4C). VEGFA, ATR ve HSP90AA1 gibi merkezi proteinler, hücresel yanıtları düzenlemede önemli rollerini gösteren kapsamlı etkileşimler göstermektedir. PI3K/AKT yolunun temel bileşenleri olan AKT1 ve PIK3CD'nin aşağı düzenlenmesi hayatta kalma sinyallemesini bozarken, MMP2 ve MAPK8'in yukarı düzenlenmesi stres ve apoptozla ilişkili yolların aktivasyonunu göstermektedir. VEGFA, ROCK1 ve HSP90AA1 gibi proteinler arasındaki bağlantılar, stres yanıtının ve hücre dışı matris yeniden şekillendirme yollarının katılımını daha da vurgulamaktadır (Şekil-4D). AKT1 ve PIK3CD gibi sağ kalımla ilişkili genlerin baskılanması ve BMP4 ve MAPK8 gibi apoptozis destekleyici genlerin yukarı düzenlenmesi, mAb'nin meme kanseri hücrelerinde kritik yolları hedeflemedeki terapötik potansiyelini vurgulamaktadır. Bu sonuçlar, mAb'nin kanser hücresi sağ kalımını bozarken apoptozu seçici olarak aktive etme kapasitesinin altını çizmektedir.



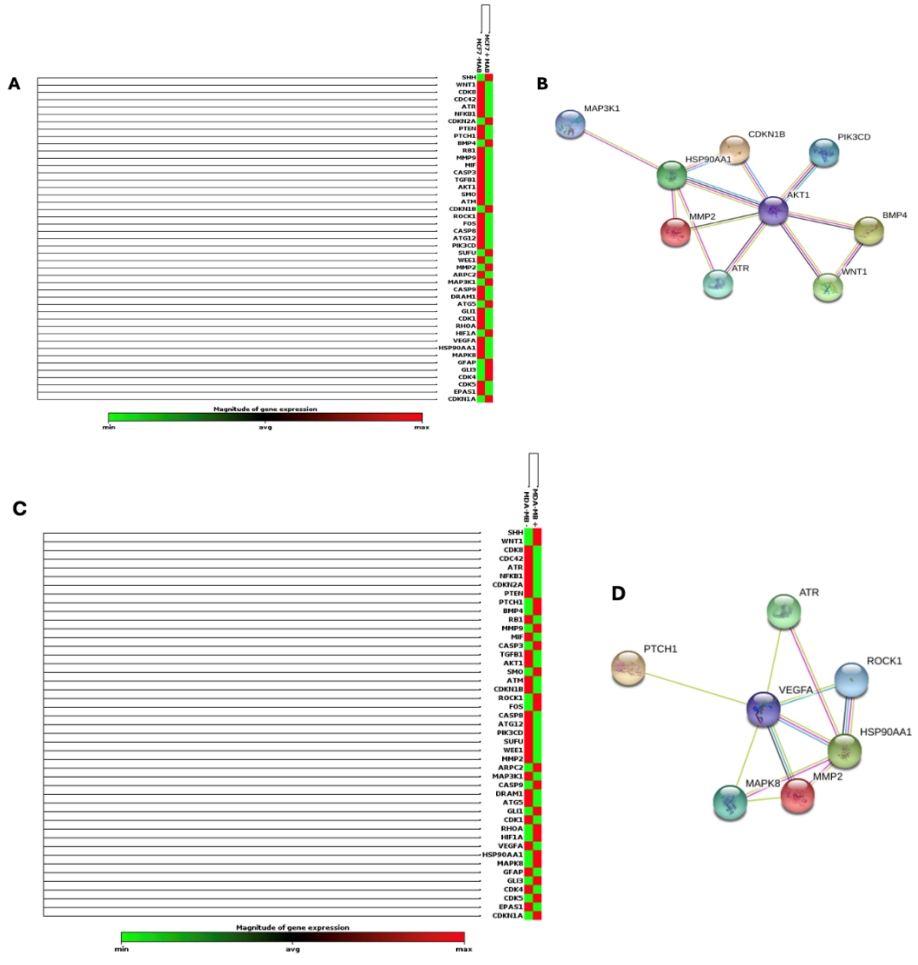
Şekil-1. MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde mAb uygulaması öncesi (control) ve sonrası (treated) hücre canlılığı ve apoptozun değerlendirilmesi.
(A) Hücre canlılığı, MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 1/mAb'nin değişen dilüsyonları ile tedaviden 24, 48 ve 72 saat sonra WST-1 testi kullanılarak ölçülmüştür. (B) Apoptoz, Muse® Annexin V & Dead Cell Kit ve Muse® Cell Analyzer kullanılarak değerlendirilmiştir. Tedavi uygulanmamış (kontrol, "-") ve uygulanmış ("+") koşullarda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre oranlarını göstermektedir. (C) MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için tedavi öncesi ve sonrası gruplarda toplam apoptotik hücrelerin (erken ve geç apoptotik popülasyonları birleştirerek) kantifikasyonu. İstatistiksel analiz, ***p<0,001 ve **p<0,01'in kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar gösterdiği two-tailed Student t-test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NS: anlamlı değil.



Şekil-2. Tedavi uygulanmış ve uygulanmamış MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Kaspaz-8 (A), Kaspaz-3 (B) ve Bcl-2'nin (C) immünofloresan boyaması.
Kaspaz-8, Kaspaz-3 ve Bcl-2 ekspresyonu primer antikorlar ve FITC etiketli sekonder antikor (yeşil) kullanılarak tespit edilmiştir. Çekirdekler DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Bar grafikleri ortalama floresan yoğunluklarını temsil etmektedir. Ölçek: (A) 50 µm (20X), (B) 20 µm (40X) ve (C) 20 µm (40X). İstatistiksel analiz two-tailed Student t-testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ***p<0,001, **p<0,01, ****p<0,0001, ns (anlamlı değil).



Şekil-3. mAb uygulamasından sonra MCF-10A (A), MCF-7 (B) ve MDA-MB-231 (C) hücrelerinin SEM analizi**.** (A) Her iki MCF-10A hücre grubunun (kontrol ve tedavi) SEM görüntüleri, düzgün hücre zarları ve sağlam yapısal bütünlük ile normal morfolojiyi göstermektedir. (B,C) Tedavi edilen gruplarda hücresel büzülme, membran kıvrılması ve yapısal bütünlüğün kaybı gibi belirgin morfolojik değişiklikler görülmektedir.



Şekil-4. MCF7 (A ve B) ve MDA-MB-231 (C ve D) hücrelerinde ifade edilen genlerin ısı haritası (A ve C) ve protein-protein etkileşim ağı analizi (B ve D).

Tablo-1. MCF-7 hücrelerinde tedaviye yanıt olarak gen ekspresyonlarının düzenlemesini yönünü (yukarı veya aşağı) gösteren PCR analizi.

Gene Symbol	Fold Regulation	Regulation
SHH	1,29	Up
WNT1	-2,21	Down
CDK8	-1,00	Down
CDC42	-1,18	Down
ATR	-9,60	Down
NFKB1	-1,00	Down
CDKN2A	1,26	Up
PTEN	-1,16	Down
PTCH1	-1,00	Down
BMP4	4,22	Up
RB1	-1,00	Down
MMP9	-1,32	Down
MIF	-1,00	Down
CASP3	-1,10	Down
TGFB1	-1,00	Down
AKT1	-2,38	Down
SMO	-1,00	Down
ATM	-1,00	Down
CDKN1B	3,31	Up
ROCK1	-1,00	Down
FOS	-1,09	Down
CASP8	-1,41	Down
ATG12	-1,10	Down
PIK3CD	-7,64	Down
SUFU	1,81	Up
WEE1	-1,00	Down
MMP2	3,05	Up
ARPC2	-1,23	Down
MAP3K1	2,24	Up
CASP9	-1,21	Down
DRAM1	-1,88	Down
ATG5	1,44	Up
GLI1	-1,05	Down
CDK1	-1,17	Down
RHOA	-1,12	Down
HIF1A	1,02	Up
VEGFA	-1,94	Down
HSP90AA1	-2,66	Down
MAPK8	-1,19	Down
GFAP	1,12	Up
GLI3	1,87	Up
CDK4	1,34	Up
CDK5	-1,09	Down
EPAS1	-1,00	Down
CDKN1A	1,82	Up
ACTB	1,47	Up
GAPDH	-1,43	Down
RPLP0	-1,03	Down

Tablo-2. MDA-MB-231 hücrelerinde tedaviye yanıt olarak gen ekspresyonlarının düzenlemesini yönünü (yukarı veya aşağı) gösteren PCR analizi.

Gene Symbol	Fold Regulation	Regulation
SHH	1,15	Up
WNT1	1,58	Up
CDK8	-1,10	Down
CDC42	-1,23	Down
ATR	-34,14	Down
NFKB1	-1,10	Down
CDKN2A	-1,29	Down
PTEN	-1,33	Down
PTCH1	2,90	Up
BMP4	1,29	Up
RB1	-1,10	Down
MMP9	1,17	Up
MIF	-1,10	Down
CASP3	1,54	Up
TGFB1	-1,10	Down
AKT1	-1,36	Down
SMO	1,11	Up
ATM	-1,34	Down
CDKN1B	-1,10	Down
ROCK1	10,31	Up
FOS	1,15	Up
CASP8	-1,45	Down
ATG12	-1,39	Down
PIK3CD	-1,56	Down
SUFU	-1,59	Down
WEE1	-1,10	Down
MMP2	-2246,30	Down
ARPC2	1,21	Up
MAP3K1	-1,27	Down
CASP9	1,30	Up
DRAM1	-1,18	Down
ATG5	-1,42	Down
GLI1	1,19	Up
CDK1	-1,45	Down
RHOA	1,73	Up
HIF1A	1,55	Up
VEGFA	-2,32	Down
HSP90AA1	2,41	Up
MAPK8	2,67	Up
GFAP	-1,26	Down
GLI3	1,44	Up
CDK4	-1,43	Down
CDK5	1,15	Up
EPAS1	-1,10	Down
CDKN1A	1,01	Up
ACTB	1,05	Up
GAPDH	-1,53	Down
RPLP0	1,46	Up

TARTIŞMA

Meme kanseri, erken evrede tedavi edilebilir bir hastalık olarak kabul edilmekle birlikte, tedavi stratejileri son yıllarda önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Mevcut yaklaşımlar arasında endokrin tedavi, anti-HER2 hedefleme ve kemoterapi ön plana çıkmaktadır (9). Bu yöntemlerin doğru şekilde seçilmesi, aşırı veya yetersiz tedavi uygulanmasını engellemeyi amaçlar. Farklı moleküler alt tiplere yönelik hedefe yönelik tedaviler, özellikle sitotoksik kemoterapinin temelini oluşturur ve normal dokulara minimal zarar verirken kanser hücrelerine spesifik etki sağlar (10–12). Günümüzde, mAb'ler gibi hedefe yönelik tedaviler olmadan kanser tedavisini düşünmek güçtür. Bu mAb'ler, kanser hücrelerine bağlanarak doğrudan apoptozu tetikleyebilir ya da immün sistemin efektör mekanizmalarını aktive ederek dolaylı bir etki gösterebilir (13). Apoptoz süreçlerindeki bozuklukların tümör gelişimi ve direnç kazanımında önemli rol oynaması, mAb'lerin kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri ve apoptoz inhibitörleri gibi molekülleri hedeflemesini, kanser tedavisindeki temel mekanizmalardan biri haline getirmektedir (14).

Bu çalışmada, terapötik potansiyeli yüksek bir monoklonal antikorun meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi araştırılmıştır. KDN, sialik asit ailesinin farklı bir üyesi olup hücre yüzeyinde bulunan glikolipit ve glikoproteinlerin terminal şeker yapılarında yer alır. Normal hücrelerde çok düşük seviyelerde bulunan bu molekül, kanser hücrelerinde yoğun olarak saptanmaktadır (15). Çalışma kapsamında, 147-DENA adlı hedefe yönelik monoklonal antikorun olası etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Öncelikle 147-DENA'nın çeşitli dozları, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile MCF-10A normal meme epitel hücrelerine uygulanarak WST-1 testiyle sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Normal hücrelerde herhangi bir dozda sitotoksik etki görülmezken, kanser hücrelerinde farklı düzeylerde sitotoksisite tespit edilmiştir. Daha sonra, belirlenen dozlarda mAb uygulaması sonrasında Annexin V testiyle hücre canlılığı ve apoptoz analizi yapılmıştır. Kanser hücrelerinin büyük çoğunluğunun 48 saatlik inkübasyon sonunda erken apoptotik faza geçtiği, bir kısmının ise geç apoptotik/ölü evrede olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, normal hücrelerde geç apoptotik evreye rastlanmamış ve yalnızca çok az sayıda erken apoptotik hücre tespit edilmiştir. Bu düşük apoptotik etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Genel olarak, WST-1 ve Annexin V bulguları, 147-DENA'nın meme kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyerek sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Apoptoz, kaspaz ailesinden proteazlar tarafından yönetilen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Başlatıcı (kaspaz-2, -8, -9, -10) ve efektör (kaspaz-3, -6, -7) kaspazlardan oluşan bu yolak, ekstrinsik veya intrinsik sinyallerle aktive olabilir (16). Mitokondri kaynaklı intrinsik uyarımlarda, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri aktifleşirken anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) baskılanır; bu da mitokondriden sitozole protein salınarak hücre ölümünü tetikler (17). Bu çalışmada, 147-DENA mAb uygulaması sonrasında Kaspaz-8, Kaspaz-3 ve Bcl-2 proteinleri immünofloresan yöntemiyle değerlendirilmiştir. Normal meme epiteli MCF-10A hücrelerinde anlamlı bir farklılık görülmezken, MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde 147-DENA mAb, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 seviyelerini yükseltmiş Bcl-2 ifadesini düşürmüştür. Böylece 147-DENA mAb normal hücrelere zarar vermeden meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyebileceğini göstermiştir.

Apoptoz, hücrede küçülme ve deformasyon, membran bütünlüğünün bozulması, yüzey çıkıntılarının kaybı veya oluşması, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, mitokondri vakuolizasyonu ve komşu hücrelerden ayrılma gibi belirgin morfolojik değişikliklerle tanımlanır (18,19). 147-DENA monoklonal antikorunun meme kanseri hücrelerinde neden olduğu bu değişiklikler SEM kullanılarak incelenmiş ve literatürle uyumlu bulgular elde edilmiştir. Normal epitel hücreleri bu antikordan etkilenmezken, kanser hücrelerinde membran bütünlüğünde bozulma, por oluşumu, yüzey çıkıntılarının azalması ve hücre şeklinin değişmesi gözlenmiştir. Ayrıca 147-DENA mAb uygulaması sonrası yapılan gen ekspresyon analizlerinde, apoptoz ve hücre metabolizmasında yer alan çeşitli genlerin artan veya azalan düzeylerde regülasyona uğradığı tespit edilmiştir. STRING analizi, bu genlerin birbirleriyle etkileşim halinde olduğunu göstermiştir.

CDKN1B, hücre döngüsü inhibitörü p27Kip1'i kodlayan ve insan kanserlerinde sıkça inaktive edilen bir tümör baskılayıcı gendir. p27, yalnızca hücre proliferasyonunun kontrolünde değil; aynı zamanda hücre hareketliliği, metastaz, otofaji ve mitoz gibi süreçlerde de kritik roller üstlenir

(20,21). Bu çalışmada, mAb tedavisinin, kanser hücrelerinde CDKN1B geninin ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, anormal Wnt/β-katenin sinyal yolağının kanser oluşumu ve progresyonunda önemli etkilere sahip olduğu literatürde iyi bilinmektedir (22). Bu yolakta etkili olan Wnt1 seviyesinin, antikor tedavisi sonrası önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Öte yandan, meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde AKT izoformları (AKT1, AKT2, AKT3) farklı fonksiyonlar gösterir. AKT1, lokal tümör büyümesini desteklerken, AKT2 uzak metastaz sürecinde rol alır (23). Onkojenik olarak tanımlanan bu izoformlar, tümörün başlangıç ve ilerleyiş aşamalarında pozitif etkiye sahiptir (24). Çalışmada, mAb uygulaması sonucunda özellikle AKT1'in ekspresyonunun baskılandığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, anjiyogenezin kilit düzenleyicilerinden biri olan VEGFA da (25) antikorla muamele edilen örneklerde belirgin şekilde düşüş göstermiştir. Toplu olarak, elde edilen bulgular 147-DENA mAb'nin birden fazla sinyal yolunu etkileyerek meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve böylece tümör gelişimini baskıladığını göstermiştir. Deaminonöraminik asidi hedef alan bu yaklaşımın, kanser tedavisi alanında yeni ve etkili bir seçenek sunabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma, literatüre katkı sağlayarak 147-DENA mAb'nin potansiyel terapötik önemini vurgulamakta ve sialik asit ailesinden deaminonöraminik aside yönelik araştırmalara ışık tutmaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak, 147-DENA monoklonal antikoru, meme kanseri hücrelerinde çeşitli sinyal yolaklarını etkileyerek apoptozu indüklerken, normal epitel hücrelere zarar vermemiştir. Bulgular, CDKN1B, Wnt1, AKT1 ve VEGFA gibi önemli genlerdeki düzenlemelerle tümör gelişiminin baskılandığını göstermiştir. Bu da sialik asit ailesinden deaminonöraminik aside özgü 147-DENA'nın potansiyel bir terapötik seçenek olabileceğini vurgular. Böylece çalışma, özellikle hedefe yönelik kanser tedavilerine katkı sağlayacak yeni ve önemli bulgular sunmaktadır.

Çıkar çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Teşekkür: Çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi TYL-2019-20885 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Jokhadze N, Das A and Dizon DS: Global cancer statistics: A healthy population relies on population health. CA Cancer J Clin 74: 224–226, 2024.
2. Bray Bsc F, Laversanne | Mathieu, Hyuna |, *et al.*: Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 74: 229–263, 2024.
3. Baldo BA: Monoclonal Antibodies Approved for Cancer Therapy. In: Safety of Biologics Therapy. Springer International Publishing, Cham, pp57–140, 2016.
4. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J and Wu H-C: Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. J Biomed Sci 27: 1, 2020.
5. KÖHLER G and MILSTEIN C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495–497, 1975.
6. Quinteros DA, Bermúdez JM, Ravetti S, Cid A, Allemandi DA and Palma SD: Therapeutic use of monoclonal antibodies: general aspects and challenges for drug delivery. In: Nanostructures for Drug Delivery. Elsevier, pp807–833, 2017.
7. Qu B, Ziak M, Zuber C and Roth J: Poly (alpha 2,8-deaminoneuraminic acid) is expressed in lung on a single 150-kDa glycoprotein and is an oncodevelopmental antigen. Proceedings of the National Academy of Sciences 93: 8995–8998, 1996.
8. Inoue S, Kitajima K and Inoue Y: Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells. Journal of Biological Chemistry 271: 24341–24344, 1996.
9. Harbeck N and Gnant M: Breast cancer. The Lancet 389: 1134–1150, 2017.
10. Baudino T: Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. Curr Drug Discov Technol 12: 3–20, 2015.

11. Pérez-Herrero E and Fernández-Medarde A: Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 93: 52–79, 2015.
12. Weiss J, Glode A, Messersmith WA and Diamond J: Sacituzumab govitecan: breakthrough targeted therapy for triple-negative breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther 19: 673–679, 2019.
13. Gül N and van Egmond M: Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. Cancer Res 75: 5008–5013, 2015.
14. Lee YT, Tan YJ and Oon CE: Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. Eur J Pharmacol 834: 188–196, 2018.
15. Inoue S, Kitajima K, Sato C and Go S: Human KDN (Deaminated Neuraminic Acid) and Its Elevated Expression in Cancer Cells: Mechanism and Significance. pp669–678, 2011.
16. Pistritto G, Trisciuoglio D, Ceci C, Garufi A and D'Orazi G: Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging 8: 603–619, 2016.
17. D'Arcy MS: Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biol Int 43: 582–592, 2019.
18. Li J, Yang Z, Li Y, *et al.*: Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. Oncotarget 7: 44763–44778, 2016.
19. Ramirez MLG and Salvesen GS: A primer on caspase mechanisms. Semin Cell Dev Biol 82: 79–85, 2018.
20. Sharma SS and Pledger WJ: The non-canonical functions of p27 ^{Kip1} in normal and tumor biology. Cell Cycle 15: 1189–1201, 2016.
21. Bencivenga D, Stampone E, Azhar J, *et al.*: p27Kip1 and Tumors: Characterization of CDKN1B Variants Identified in MEN4 and Breast Cancer. Cells 14: 188, 2025.
22. Liu J, Xiao Q, Xiao J, *et al.*: Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. Signal Transduct Target Ther 7: 3, 2022.
23. Hinz N, Baranowsky A, Horn M, *et al.*: Knockdown of AKT3 Activates HER2 and DDR Kinases in Bone-Seeking Breast Cancer Cells, Promotes Metastasis In Vivo and Attenuates the TGFβ/CTGF Axis. Cells 10: 430, 2021.
24. Hinz N and Jücker M: Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. Cell Communication and Signaling 17: 154, 2019.
25. Ghalehbandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI and Pourgholami MH: The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. Eur J Pharmacol 949: 175586, 2023.