

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

**CURCUMİNİN OTOKRİN BÜYÜME HORMONU (BH) ANLATIMI
KAZANDIRILMIŞ MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES VE OTOFAJİK YOLAKLAR
ÜZERİNE ETKİSİNİN İRDELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Merve KARATAŞ
(1002060031)**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

-NİSAN 2019-

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CURCUMİNİN OTOKRİN BÜYÜME HORMONU (BH) ANLATIMI
KAZANDIRILMIŞ MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES VE OTOFAJİK YOLAKLAR
ÜZERİNE ETKİSİNİN İRDELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MERVE KARATAŞ
(1002060031)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 29 Nisan 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 2 Nisan 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri : Prof. Dr Elif Damla ARISAN

Doç. Dr Gizem DİNLER DOĞANAY

- NİSAN 2019 -

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖNSÖZ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
SEMBOL LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.1. 2. Meme Kanseri	5
2.1. 2. 1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	5
2.1.2.2. Meme Kanseri Patogenezi.....	6
2. 1. 2. 3. Meme Kanseri risk faktörleri	7
2.1.2.3.1. Meme Kanseri İlişkili Gen 1/2 (BRCA 1/2).....	8
2.1.2.3.2. İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2).....	9
2.1.2.3.3. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)	9
2.1.2.3.4. Ras	9
2.1.2.3.5. c-Myc.....	9
2.1.2.3.6. Östrojen	10
2.1.2.3.7. Yaş ve Ailesel Geçmiş	10
2.1.2.3.8. Üreme Faktörleri	10
2.1.2.3.9. Yaşam Tarzı	11
2.1.2.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri ve Önlemleri	11
2.2. Büyüme Hormonu (BH)	13
2.2.1. Otokrin Büyüme Hormonu ve Meme Kanseri.....	15
2.3. Curcumin	16

2.3.1. Curcumin ve Meme Kanseri	18
2.4. Hücre Ölümü	18
2.4.1. Otofaji	19
2.4.1.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması	20
2.4.1.2. Otofaji Kontrol Mekanizmaları	22
2.5. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi	22
2.5.1. ER stres ve otofaji	24
BÖLÜM III. MATERYAL VE METOT	25
3. 1. KULLANILAN MATERYALLER	25
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	25
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları	25
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	25
3.1.4. Kullanılan Tamponlar	25
3.1.4.1. Yürütme Jelinin Hazırlanması	25
3.2. YÖNTEMLER	25
3.2.1. Hücre Kültürü	25
3.2.2. Transfeksiyon	26
3.2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	27
3.2.4. Hücre Sağkalım Analizi	27
3.2.5. Floresans Boyama	27
3.2.5.1. 3,3' Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC ₆) Boyama	27
3.2.5.2. Propidyum iyodür (PI) boyama	28
3.2.5.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama	28
3.2.5.4. MitoTracker /DAPI Boyaması	28
3.2.5.5. Akridine Oranj (AO) Boyaması	29
3.2.6. Total Protein İzolasyonu	29
3.2.7. Bradford Protein Miktar Tayini	29
3.2.8. İmmunoblotlama Yöntemi	29
3.2.8.1. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE' de Yürütülmesi	29
3.2.8.2. Membrana Transfer ve Bloklama	30
3.2.8.3. Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri ve Bantların Görüntülenmesi	30

3.2.9. Asılı Damla Deneyi (3D Kültürü Deneyi)	31
3.2.10. İstatistiksel Analiz	31
BÖLÜM IV. SONUÇLAR	32
4.1. Zamana bağlı curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin Mitotracker-DAPI boyaması ile gösterilmesi	32
4.2. Zamana bağlı curcumin uygulamasının asılı damla deneyi ile MCF-7 meme kanseri kültüründe koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi	33
4.3. Curcuminin hücre ölümü üzerine etkisinin zamana bağlı MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	35
4.4. Zamana bağlı olarak curcumin'nin otofaji sinyalinde etkisinin irdelenmesi	36
4.5. Zamana bağlı curcumin uygulamasının tetiklediği ER stres anahtar moleküllerin anlatım değişikliklerinin irdelenmesi	37
4.6. Otofaji inhibisyonu durumunda curcuminin hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile gösterilmesi	38
4.7. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofaji inhibisyonuyla Curcumin'in hücre üzerindeki etkisinin gösterilmesi	39
4.8. Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının zamana bağlı olarak etkisinin asılı damla modeli ile gösterilmesi	41
4.9. Bafilomisin ile birlikte curcumin uygulanmasında otofajik vakuol oluşumuna etkisinin gösterilmesi	43
4.10. Curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin otofaji inhibitörüyle MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	44
4.11. Curcumin'in ER strese bağlı CHOP aktivasyonun plazmit aracılı MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	45
4.12. Bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde otofaji ve ER stres molekülleri üzerindeki etkisinin irdelenmesi	46
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKÇA	54
EKLER	66

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, manevi olarak her konuda desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen, engin bilgilerini ve akademik tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Narçin PALAVAN ÜNSAL, Doç. Dr. Elif Damla ARISAN ve Doç. Dr. Pınar OBAKAN'a

Tez çalışmam süresince her konuda fikir danışabildiğim Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ ve Araş. Gör. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI'na

Tez çalışmam süresince manevi olarak desteğini hissettiğim sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez çalışmamda kullandığım otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MCF-7 meme kanserini TÜBİTAK 113Z791 nolu proje kapsamında üreten İKÜ yüksek lisans mezunu Merve ÇELİK'e

Hayatım boyunca her konuda desteklerini benden esirgemeyen sevgileri, fedakarlıkları ve bugüne kadar attığım her adımda hep yanımda ve arkamda duran, minnet duyduğum annem Hatice KARATAŞ'a, abim Cüneyt KARATAŞ'a ve ablam Zennube KARATAŞ'a

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için deneysel çalışmalarda İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarına vermiş olduğu destek ve olanklar için teşekkürlerimi sunarım.

Merhum babam İsmet KARATAŞ'a ithafen...

KISALTMALAR

AIF:	Apoptozu indükleyen faktör
Ambra1:	Beclin-1 ile düzenlenmiş otofajiyi aktive edici protein
APS:	Amonyum persülfat
Atg:	Otofaji ilişkili genler
ATP:	Adenozin tri fosfat
Bad:	Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü
Baf:	Bafilomisin A1
Bak:	Bcl-2 homoloğu antagonist
Bax:	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2:	B-hücre lenfoma 2
Beklin1:	Bcl-2 etkileşim proteini
Bid:	BH3 etki alanı domaini ölüm agonisti
BH:	Büyüme hormonu
BRCA1:	Meme kanseri 1 geni
BRCA2:	Meme kanseri 2 geni
BSA:	Bovin serum albumin
CA:	Coumerik asit
Ca²⁺:	Kalsiyum iyonu
cDNA:	Komplementer DNA
CHECK2:	Döngü kontrol noktası kinaz-2
CLB:	Hücre lizis tampon
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol

DFCP1:	FYVE domaini içeren protein 1
DiOC₆:	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DR 5:	Ölüm resptörü 5
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
ER :	Endoplazmik retikulum
ER:	Östrojen Reseptörü
FBS:	Fetal bovin serum
FIP200:	200 kDa etkileşimli protein ailesi
GH:	Büyüme Hormonu
GHR:	Büyüme hormonu reseptörü
GHRH:	Büyüme hormonu salgılayan hormon
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü 2
IGF-II:	İnsülin benzeri büyüme faktörü II
JAK2:	Janus Kinaz 2 Tirozin Kinaz
kDa:	Kilodalton
LAMP-2:	Lizozom ilişkili membran glikoprotein 2A
LC3:	Hafif zincir 3
mTOR:	Rapamisinini memelilerdeki hedefi
MTT:	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
p53:	Tümör protein (TP53)
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz

PAS:	Otofaji oluşum merkezi
PBS:	Fosfat tamponlu tuz özeltisi
PE:	Fosfotidilmetanoamin
PI:	Propidyum iyodür
PI3P:	Sınıf III fosfotidilinositol-3-fosfat
PR:	Progesteron reseptörü
PRL:	Prolaktin
PRLR:	Prolaktin reseptörü
PTEN:	Fosfataz ve tensin homolog gen 10
PVDF:	Poliviniliden fluorid
RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Smac:	Apoptotik yolakta etkili olan kaspazları aktifleştiren protein
STAT-5:	JAK2-sinyal transduser ve transkripsiyon aktivatörü 5
TBS:	Tris tamponlu tuz özeltisi
TEMED:	Tetrametletilendiamin
TNF :	Tümör nekroz faktör
TRAIL:	TNF-İlişkili apoptoz indükleyen ligand)-R1
Tripsin-EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
ULK 1/2:	Unc-51 benzeri kinaz 1/2
ZN₂⁺:	Çinko iyonu

SEMBOL LİSTESİ

mM: Milimolar

μ M: Mikromolar

μ l: Mikrolitre

gr: Gram

nM: Nanomolar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kansere neden olan hücrelerde değişikliklerin şematik gösterimi [12].....	4
Şekil 2. Meme kanseri başlaması ve ilerlemesinde ki teorilerin şematik gösterimi. (A) Bütün tümör tipleri aynı kök hücreden veya projenitör hücrelerden oluşur. (B) Her tümör tipi tek bir hücre tipinden oluşur. Rastgele mutasyonlar, herhangi bir meme kanserinde zamanla mutasyon biriktirerek tümör hücrelerine dönüşür [1].....	7
Şekil 3. BRCA1 geni [30].	8
Şekil 4. İnsan büyüme hormonu (121).	13
Şekil 5. Büyüme hormonu salınımının düzenlenmesi [68].	14
Şekil 6. (A) İnsan büyüme hormonu ve (B) prolaktinin moleküler olarak gösterimi [79].	15
Şekil 7. Curcumin'in moleküler formülü.	17
Şekil 8. Otofaji türleri [101].	20
Şekil 9. Memeli hücrelerinde otofajinin moleküler mekanizması. PE: fosfotidilmetanoamin [111].	21
Şekil 4.1. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin (20 µM) hücre canlılığın etkisi mitotracker boyaması ve DAPI boyaması ile gösterimi.	32
Şekil 4.2. Zamana bağlı 20 µM curcumin uygulamasının 3D boyutlu MCF-7 doğal tip ve BH + meme kanseri kültüründe etkisinin 6 gün boyunca gösterilmesi.	34
Şekil 4.3. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin otofajik vakuol oluşumuna etkisinin gösterilmesi.	35
Şekil 4.4. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin zamana bağlı etkisinin otofaji anahtar moleküllerinin immunoblotlama yöntemiyle gösterilmesi.	36
Şekil 4.5. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin zamana bağlı etkisinin ER stres anahtar moleküllerinin immunoblotlama yöntemiyle gösterilmesi.	37

Şekil 4.6. MCF-7 doğal tip ve otkrin BH anlatımı arttırılan meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001.....	38
Şekil 4.7. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde bafilomisin curcumin ile uygulanmasının hücre ölümü üzerine etkisinin DAPI, PI ve Dioc6 boyamalarıyla gösterilmesi. Büyütme: 10X ve 40X.	40
Şekil 4.8. 3D hücre kültürü sisteminde MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile curcumin uygulamasının zamana bağlı koloni büyümesine etkisinin gösterilmesi.....	42
Şekil 4.9. MCF-7 doğal tip ve otkrin BH anlatımının arttırıldığı meme kanseri hücrelerinde otofajik vakuol oluşumunun akridin oranj boyaması ile gösterimi.....	43
Şekil 4.10. MCF-7 doğal tip ve GH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde curcumin bafilomisin ile uygulandığında otofajik vakuol oluşumuna etkisinin gösterilmesi.....	44
Şekil 4.11. MCF-7 doğal tip ve otkrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında ER strese bağlı CHOP aktivasyonunun plazmit aracılı hücre akış sitometresinde gösterilmesi.	45
Şekil 4.12. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin otofaji ve ER stres anahtar molekülleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi.....	47

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi	66
Tablo 2. Hücre kültürü donanımları.....	67
Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi	68
Tablo 4. Kullanılan tamponlar ve içerikleri.....	70
Tablo 5. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği.....	71

ÖZET

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık saptanan neoplastik bir hastalık olup, yüksek mortalite ve mobilite nedeni olarak görülmektedir. Meme kanseri, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. Meme kanseri araştırmalarında çoğu ilaç teropatik ajan olma potansiyelinde irdelenmektedir. Doğu Hindistan bitkisi olan *Curcuma longa* bitki kökünden elde edilen bir bileşik olan curcumin'nin anti-enflamatuar, anti-tümörjenik, anti-septik ve anti-oksidan özellikleri kolon, melanoma, servikal ve meme kanseri üzerinde gösterilmiştir. Büyüme hormonu (BH) anterior hipofiz tarafından salgılanan bir hormon olup, lipid, karbonhidrat ve protein metabolizması üzerinde etkileri göstermiştir. Meme kanseri hücre biyopsilerinde BH anlatımının varlığı ve akromegali gibi BH'n fazla salgılandığı kişilerde malign profilin görülmesi meme kanseri ile BH arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Otokrin BH sinyaline sahip meme kanseri *in vitro* ve *in vivo* modellerde metastaz, invazyon, karsinojenik etkinin arttığı ve ilaca direnç mekanizmasının aktive olduğu gösterilmiştir. Endoplazmik Retikulum (ER) stresi, ER'de protein katlanmasının bozulduğu patolojik ve fizyolojik süreçlerden kaynaklanmaktadır. ER stres oluşumunun ilk basamağında katlanmamış proteinlerden kaynaklı programlı hücre ölüm yolları olan apoptoz ve otofajik ölüm yolağı gibi birçok sağkalım yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız, otokrin BH anlatımı olan MCF-7 meme kanseri hücre hattında curcuminin endoplazmik retikulum stresi/otofaji ve apoptotik ölüm yolları üzerine etkisinin irdelenmesidir. Otokrin BH anlatımı olan MCF-7 meme kanseri hücre hattında zamana bağlı curcumin uygulanması sonucunda, otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı ve hücre büyümesi üzerinde ket vurucu etki göstermiştir. Otolizozom inhibitörü olan Bafilomisin A1 ile ön muamele yapılması sonucu BH+ olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde curcuminin hücre canlılığına ket vurma potansiyelini arttırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, otokrin BH sinyali MCF-7 meme kanseri hücrelerinde curcumine direnç mekanizmasını otofaji ve ER stres anahtar molekülleri üzerinde etki ederek gerçekleştirse de otolizozom inhibitörü ile curcuminin kombine uygulamasının curcumine bağlı hücre ölümünü arttırdığı BH sinyali anlatımı kazandırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Büyüme Hormonu, Curcumin, ER stres, Otofaji, Apoptoz

SUMMARY

Breast cancer is the most common neoplastic disease in women with high mobility and mortality rate. Breast cancer constitutes about one-fourth of all cancers seen among women. Generally, in breast cancer research, most drugs are investigated for their therapeutic potential. Curcumin is a compound derived from the roots of this plant and is called *Curcuma longa*, an East Indian plant. Anti-inflammatory, antitumorigenic, antiseptic and antioxidant properties have been demonstrated on colon, melanoma, cervical and breast cancer. Growth hormone (GH) is a hormone secreted by the anterior pituitary. GH is affected lipid, carbohydrate and protein metabolism. Increased GH in breast cancer cell biopsies and it has been found that malignancy is the common profile in acromegalic patients who have excess GH secretion after puberty. Metastasis, invasion and carcinogenic effects and also drug resistance are also determined in autocrine GH secreting breast cancer cell lines. Endoplasmic Reticulum (ER) stress is caused by pathological and physiological processes in which protein folding in ER is impaired. It has been shown that in the first step of ER stress formation, many survival pathways such as apoptosis and autophagic death pathway, which are programmed cell death pathways originating from unfolded proteins, are activated. Our aim in this study is to investigate the effect of curcumin on endoplasmic reticulum stress/autophagy and apoptotic death pathways in autocrine GH expression MCF-7 breast cancer cell line. The application of time-dependent curcumin in MCF-7 breast carcinoma cell line, which autocrine GH expression, has shown a handicapping effect on cell viability and cell growth in MCF-7 breast cancer cells that have been GH-expressing. Pretreatment with an autolysosome inhibitor, Bafilomycin A1, showed that curcumin increases the potential for inhibition of cell viability in MCF-7 GH+ breast cancer cells. In conclusion, although autocrine GH signal MCF-7 effected the curcumine resistance mechanism on autophagy and ER stress key molecules in breast cancer cells, it was shown in the MCF-7 breast cancer cells that were dedicated GH signal expression in which the combined application of autolysosome inhibitor and curcumin increased curcumine dependent cell death.

Key words: Breast Cancer, Growth Hormone, Curcumin, Endoplasmic reticulum stress, Autophagy

BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında yaygın olarak görülen hastalıklardan biri de meme kanseri olup, kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme kanseri olarak ifade edilmektedir. Dünyada her yıl 1,5 milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konulduğu bilinmektedir. Meme kanseri metastatik bir kanser olup, diğer organlara geçebilmektedir. Mamografi ve çeşitli yöntemlerle erken teşhis edilmesi önemli ve sağ kalımı arttırmak rol almaktadır [1]. Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de kadınlarda meme kanseri en sık görülen kanser türüdür. Son on yılda Türkiye’de meme kanseri insidansının giderek arttığı gözlenmiştir ve bu insidansının bölgeden bölgeye yaşam şartlarıyla değiştiği belirtilmiştir. Türk kadınlarında %31 oranında 41-50 yaş arası, %40 oranında 51-70 yaş arası, %8 oranında ise %70 yaş üzerinde meme kanseri riski olduğu tespit edilmiştir [2].

Meme kanseri oluşmasında ve gelişmesinde yaşam tarzı, genetik etkiler (hormonlar gibi), yaş, üreme faktörleri, ailesel kanser geçmişi, onkogenler (HER2 gibi), tümör baskıyacı genlerin (p53, Retinoblastoma gibi) fazla ekspresyonu olması, meme kanseri ilişkili genlerinde (BRCA 1/2) mutasyon gibi birçok risk faktörü vardır. Ayrıca hormonal regülasyon meme kanseri gelişimi ve ilaç direnç mekanizmasında önem arz etmektedir. Östrojen, progesteron gibi hormonların meme kanseri patogeneziinde rolü olduğu ve bu hormon reseptörlerinin anlatım profiline göre ilaç rejimlerinin etkinliği hakkında bilgi sahibi olunduğu bilinmektedir. Yakın zamanda, pubertal meme gelişiminde rol alan Prolaktin (PRL) ve büyüme hormonu (BH) gibi hipofiz bezi kaynaklı hormonların etkisi üzerinde durulmaktadır. BH, ön hipofiz bezinden salgılanan ve insanda, büyüme gelişme; aynı zamanda meme hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında rol oynayan bir hormondur [3]. BH’ın fazla salgılanması sonucu devlik, az salgılanması sonucu cücelik (akromegali) görülmektedir ve akromegali kadınlarda normal kadınlara kıyasla meme kanseri riskinin daha çok arttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak insülin benzeri büyüme faktörü I’in (IGF-I) salgınmasına etki etmekte ve BH ile IGF-I’in salgınmasının olmamasıyla meme kanserinin azaldığı belirtilmiştir [4]. Meme kanserinin tedavisinde yapılan araştırmalarda birçok kemoterapötik ajanın etkinliği üzerinde durulmakta yeni jenerasyon ajanların meme kanseri tedavisinde etkinliği ön plana çıkmaktadır. Ancak klinik aşamada etkin meme kanseri tedavisinde ilaç olma potansiyeli az olduğu için yeni ilaçların potansiyel etkinliği meme kanseri patogeneziinde rol alan ajanları hedef alan stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu bakış açısına göre; zencefil ailesinin üyesi olan

Curcuma longa bitkisinin köklerinden elde edilen curcumin'nin anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve anti-kanserojen etkisiyle tedavi edici olduğu araştırmalarla kanıtlanmıştır [5]. Ayrıca curcumin'in bir çok kanser türünde etkisi olduğu ve hücrel ölüm yolaklarına etkileriyle ilgili bir çok araştırma yapılmıştır. Meme kanserinde tümör hücreleri östrojen/progesteron reseptörünü eksprese etmektedir. Curcumin hem östrojen pozitif hem de östrojen negatif hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [6]. Aynı zamanda endoplazmik retikulum (ER) stresini indükleyerek apoptotik ve otofajik ölüme neden olduğu gösterilmiştir [7].

Hücrel ölüm yollarından biri olan otofaji kanser, metabolik ve nörodejeneratik bozuluklar gibi hastalıklarda rol almakta olan hücrel bir süreç olarak ifade edilmektedir [8]. Otofaji hücreleri besin açlığında çevresel etkilere karşı hücreyi koruyan bir moleküler mekanizma olarak çıkabildiği gibi viral kaynaklı hücrel saldırılarda hücre savunma mekanizması olarak ifade edilmektedir. Ayrıca otofajik süreç hücrel organellerin yaşlı, zarar görmüş hücrel yok edilmesini sağlayan bir sağ kalma hücrel cevabı olarak ifade edilmektedir. Özellikle kanser ilaçlarının kanser hücrelerinde apoptotik etkinliği yanında otofajik süreci aktive ederek hücre sağ kalım ve ölüm mekanizmasını tetiklediği ortaya konulmuştur [9].

AMAÇ

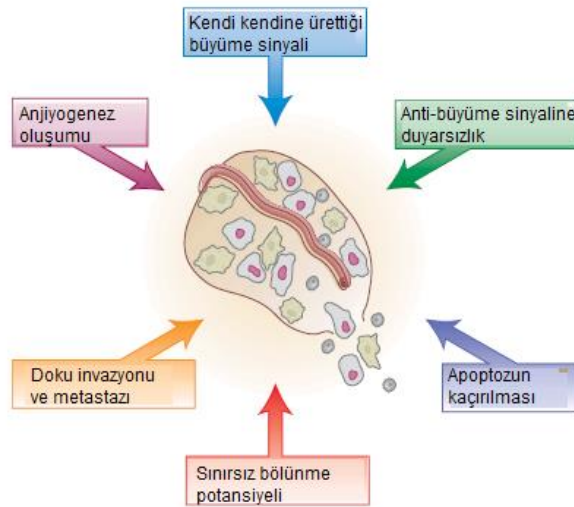
Literatürdeki bu bilgiler ışığında meme kanserinde apoptotik etkinliği otofajik-ER stres süreçleri ile zamana bağlı *in vitro* ve *in vivo*'da çalışılan, anti-inflammatuvar, anti-oksidan, anti-karsinojenik etkileri neden ile potansiyel kemoterapötik ajan olarak gösterilen curcumin'in anti-hormonal etkiside ifade edilmiştir. Ayrıca curcuminin faz çalışmalarında stabilite kaynaklı etkinliğinin düşük olması neden ile etkin NF-κB inhibitörü olarak ifade edilen curcumin'in kombine ilaç uygulamalarının daha etkin olduğu ifade edilmiştir. Bu tez ile amacımız; otokrin BH sinyali ile invaziv profili artmış, kolonileşme açısından agresif hal alan MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine curcuminin BH varlığında ER stres ve otofaji üzerine etkisinin zamana bağlı gösterilmesi yanında curcuminin apoptotik etkinliğinin otolizozom inhibitörü olan Bafilomisin A1 ile beraber MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde artma potansiyelinin irdelenmesi de amaçlanmıştır.

BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser mısırlılar zamanından beri bilinen ancak on yedinci yüzyıla kadar herhangi bir çalışma ya da araştırma belgelenmemiştir. Kanser normal hücrelerin moleküler olarak anormal hale gelmeleri ve kontrolsüz olarak bölünmeleriyle oluşan genetik mutasyonlar, çevresel risk faktörleri ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Biriken mutasyonlar, hormonal düzensizlikleri ve proliferasyon kapasiteleri artarak, invaziv ve metastatik özellik kazanmaları söz konusu olarak primer karsinojenik dokudan lenf dolaşımı ve kan yoluyla sekonder metastatik alanlara inoküle olabilmeye potansiyeline sahip hücre topluluğu olarak ifade edilmektedir. Kanserler oluşmaya başladıkları dokuya/organa göre veya mikroskop altındaki görüntülerine göre sınıflandırılırlar. Her kanser tipinin kendine has bir büyüme hızı vardır ve farklı şekilde yayılırlar bu yüzden tedavi süreçleri ve yöntemleri de farklılık göstermektedir [10], [11].

Kanser vakalarının birçoğu ya da tümüne genetik hasarlardan kaynaklı hücresel regülasyon kayıpları neden olmaktadır (Şekil 1). Proto-onkogenler ve tümör supresör genler olmak üzere iki farklı gen sınıfı kanserin başlamasında rol oynamaktadır. Protoonkogenler, genin büyüme ve gelişmesinde aşırı derece aktifleşerek mutasyona neden olmasıyla onkogenlere dönüşürler. Tümör supresör genler, büyümeyi engellerler dolayısıyla bu genlerin susturulması kontrolsüz büyümeyi teşvik eder. Her sınıftaki genlerin bir çoğu apoptoz ile hücre döngüsünün başlaması ve ilerlemesi veya hücre ölümünü düzenleyen proteinleri kodlar, diğerleri de DNA'yı tamir eden proteinleri kodlamaktadırlar [12].



Şekil 1. Kansere neden olan hücrelerde değişikliklerin şematik gösterimi [12].

Genel olarak kanserler, tek bir hücrede mutasyonel bir olayla başlar; daha sonra bölünerek o hücrenin kendini çoğaltması ve diğer mutasyonların kazanılmasıyla birden fazla aşamalar halinde gerçekleşir. Mutasyon, bir kanser hücresinin önemli bir gen/protein inaktivasyonu veya aktivasyonunun yanı sıra, kromatin yapısını değiştiren epigenetik faktörler tarafından da ortaya çıkabileceğinden nesiller boyu aktarılabilir. Yetişkin bir insanın hücrelerinde meydana gelen genetik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler göz önüne alındığında teorik olarak bir kanser hücresi haline gelebilirler. DNA replikasyonu ve sentezi sırasında hata payı çok fazla olabileceği için kansere neden olan mutasyonların olma olasılığı da çok fazladır. Ayrıca yaşlanma ve apoptoz gibi süreçlerde besin azlığı, büyüme ve hücreyel onarım gibi olayları dengelemek için koruma mekanizması olan antikanser mekanizmaların varlığı da kanser oluşumunu engelleyen olaylar olarak bilinmektedir [13].

2.1. 2. Meme Kanseri

Meme kanseri, menopoza yakın kadınlarda en sık saptanan neoplastik bir hastalıktır ve bu kadınların günlük yaşamlarında normal olarak işlev görme yeteneğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. Ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde görülme oranı daha fazla olarak tespit edilmiştir. Meme kanseri hem genetik hem de çevresel kaynaklı ortaya çıkabilmekte, cDNA ekspresyon profillemelerini yaparak erken teşhis etmek günümüzde daha kolay hale gelmiştir [14]. Kanserlerin büyük çoğunluğu epitel hücrelerden kökenlenip, karsinom olarak isimlendirilirler. Meme kanserleri ise salgı dokularından kökenlenir ve adenokarsinom olarak adlandırılmaktadır. Adenokarsinomlar ve memenin salgı yapan lobular bölgesinden kaynaklı olduğu bilinmektedir. Meme karsinomları çok çeşitli morfolojik fenotip göstermektedir [14], [15].

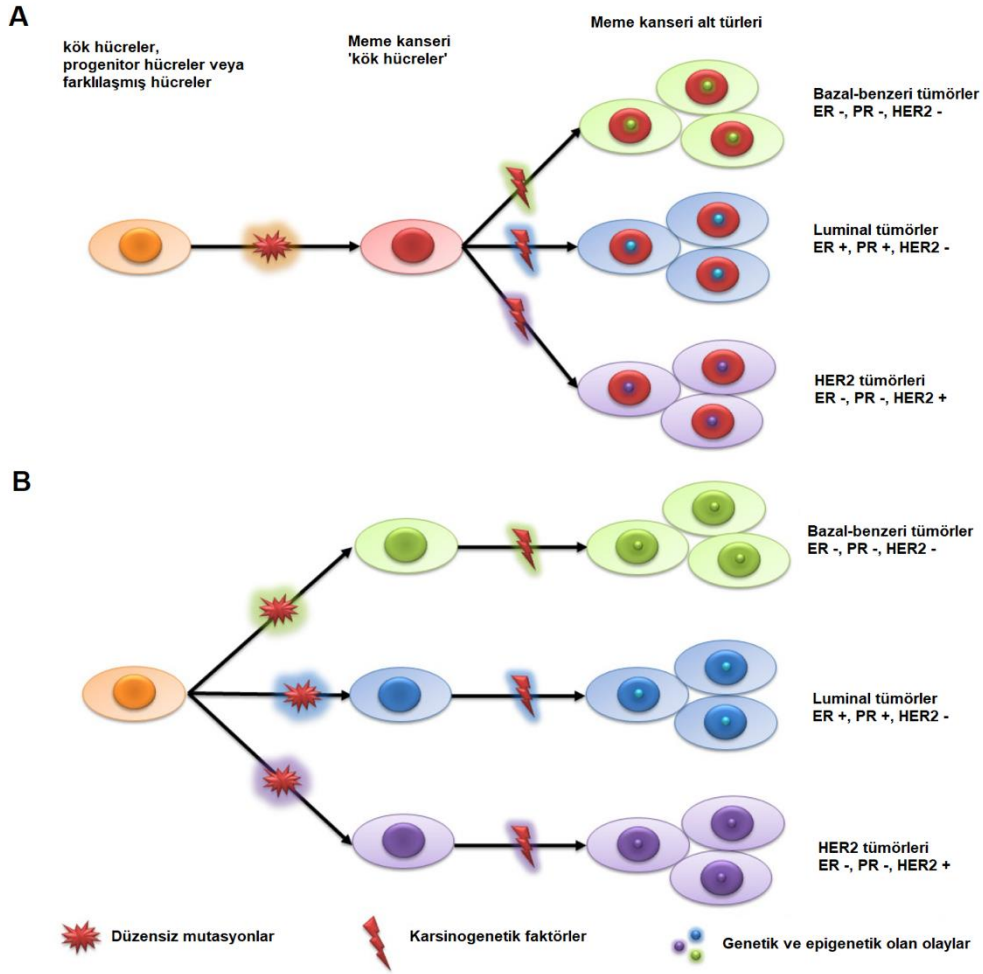
2.1. 2. 1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri dünyada kadınlarda teşhis edilen en yaygın malign tümör olan kanser çeşididir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülme sıklığı, diğer bölgelere oranla daha fazladır. 2012 yılında teşhis edilen yaklaşık 1.67 milyon yeni kanser vakası olan kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. 2012 verilerine göre kadınlarda meme kanseri 3,853 kişinin ölümüne neden olmuştur. En etkili risk faktörü obezitedir [16]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) meme kanserinin kontrol programındaki temel hedefi; ulusal sağlık programlarıyla insanları bilinçlendirmek ve hastaların teşhisinin erken yapılıp tedaviye erken başlanmasıdır [17].

Yapılan araştırmalarda meme kanserinin ölüm oranının en yüksek olduğu ülkeler Hollanda, İngiltere, Yeni Zellanda ve Uruguay iken en düşük olduğu ülkeler de asyanın doğusu ve Latin Amerika olduğu gözlenmiştir [18]. Türkiye’de de kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Ulusal kanser istatistiklerine göre de son on yılda meme kanseri insdansı giderek artmaktadır. Bu insidansın artmasında Türkiye’de coğrafik, ekonomik, kültürel, eğitimsel ve sosyal faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Türkiye’nin doğusu ve batısında meme kanserinin tanı evresi ve tedavilerinde büyük farklılıklar vardır. Meme kanserinin erken tanısı ve tedavisi yaşam süresinin uzaması için önem arz ettiği bilinmektedir [17].

2.1.2.2. Meme Kanseri Patogenezi

Meme kanseri genel olarak duktal hiperproliferasyon ile başlar ve çeşitli kansorejen faktörlerin uyarmasıyla iyi huylu veya metastatik karsinomalara dönüşür. Tümör mikroçevresi meme kanserinin başlaması ve ilerlemesinde hayati rol oynamaktadır. Makrofajlar; anjiyogenezi arttırabilir ve kanser hücrelerinin immün sistemden kaçarak mutajeneik inflamatuvar bir çevre oluşturmaya sebep olabilmektedir [19], [20]. Tümörün ve normal bir hücrenin mikroçevreleri arasında gözlemlenen farklılıklar sayesinde epigenetik modifikasyonlarla karsinogenezi desteklemektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda yeni bir malign hücrelerin alt sınıfı olarak tanımlanan kanser kök hücreleri olduğu gözlenmiştir. Tümör başlangıcında, kaçışında ve nüksetmesinde işlevseldir. Normal dokulardaki kök hücreler veya prjenitör hücrelerden gelişerek kendi hücre popülasyonlarını oluşturma ve kendini yenileyebilme yeteneği göstermektedirler. Kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerine karşı dirençlidirler. Meme kanseri kök hücrelerinde bazal kök hücrelerden ziyade lüminal epitelyal projenitörlerden kaynaklı olduğu gözlenmiştir. Wnt, Notch, Hedgehog, p53, PI3K ve HIF sinyal yolakları meme kanseri kök hücrelerinin kendini yenilemesi, çoğaltması ve metaztazında etkili yolaklardır. Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesini gösteren iki tane teori vardır bunlardan birincisi kanser kök hücre teorisi, diğeri ise sitokastik teoridir. Kanser kök hücre teorisinde, bütün tümör tipleri aynı kök hücre veya projenitör hücrelerden kaynaklı olduğu düşünölmektedir (Şekil 2 A). Stokastik teori ise bütün tümörlerinin tek bir hücreden oluştuduğu düşünölmektedir (Şekil 2 B). Rastgele gerçekleşen mutasyonlarda meme hücrelerinin kanserleşebilecek kadar mutasyon biriktirmesiyle tümör hücrelerine dönüşmesine neden olur. Böyle teoriler olsa bile kesin olarak meme kanserinin neyden kaynaklandığı kesin olarak bilinmemektedir [1].



Şekil 2. Meme kanseri başlaması ve ilerlemesinde ki teorilerin şematik gösterimi. (A) Bütün tümör tipleri aynı kök hücreden veya progenitor hücrelerden oluşur. (B) Her tümör tipi tek bir hücre tipinden oluşur. Rastgele mutasyonlar, herhangi bir meme kanserinde zamanla mutasyon biriktirerek tümör hücrelerine dönüşür [1].

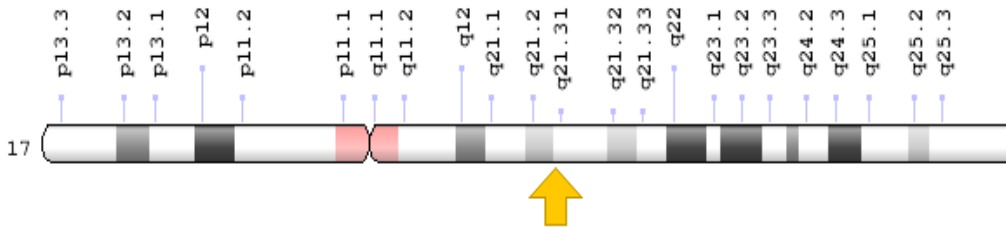
2. 1. 2. 3. Meme Kanseri risk faktörleri

Yirminci yüzyılın başlarından bu yana meme kanserinin risk faktörleri hakkında birçok bilgiye ve kanıta ulaşılmıştır. Meme kanseri gelişimde obezite, geç doğum, yaş, çevresel faktör, erken veya geç menapoz, alkol, sigara, fazla radyasyona maruz kalma, kalıtsal nedenler ve hormon terapisi gibi birçok risk faktörü vardır. Kadınlarda meme gelişimi ve doku farklılaşması östrojen hormonunun salınmasına yanıt olarak ergenlik döneminde başlar ve gebelik, hamilelik, emzirme dönemlerinden menopoza kadar devam etmektedir. Gebelik ve laktasyon sona erdiğinde bunların yanı sıra menopoz da gerçekleştiğinde meme dokusunda farklılaşma azaldığı ifade edilmektedir. Bağ doku meme hücrelerinin hem normal hem de anormal şekilde büyümesine ve işlevinin düzenlenmesinde rol alır. Aynı zamanda meme de fibroblastlar, adipositler, makrofajlar ve lenfositler bulunur. Bu hücreler östrojen hormonunun

ve diğer düzenleyici faktörlerin üretilmesini ve bunlara yanıt oluşturulmasında görevli oldukları belirlenmiştir. Meme dokusundaki bu yapılarda ve işleyişlerindeki herhangi bir değişiklikte meme kanseri olma riski görülebilir [21]. Meme kanseriyle ilgili birçok gen tanımlanmıştır. Onkogenlerin ve anti onkogenlerin mutasyonlar sonucu anormal amplifikasyonları tümörün oluşmasında ve başlamasında önemli olarak ifade edilmektedir.

2.1.2.3.1. Meme Kanseri İlişkili Gen 1/2 (BRCA 1/2)

Meme kanseri ilişkili gen 1/2 (BRCA 1/2) meme kanserin için önemli onkogenlerdir. BRCA 1 geni kromozomun 17q21 (Şekil 3), BRCA 2 geni kromozomun 13q12 kolunda konumlanmıştır [22], [23]. Homolojileri birbirinden farklıdır fakat bazı fonksiyonel özellikleri benzerdir. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteinleri kodlamaktadır. BRCA 1 geni bir tümör sporesör protein gibi davranarak protein yapımını teşvik eder. BRCA 1'in eksikliğinde hücre döngüsü kontrol noktasında düzensizlik, anormal sentrozom duplikasyonu ve genetik instabiliteyle apoptoza yol açmaktadır [24], [25]. BRCA 1'in ekspresyonu; p130, p107 ve retinoblastoma (Rb) gibi proteinler tarafından E2F'ye bağlı şekilde baskılanır. BRCA 1 geni kendi promotör, intron ve terminatör bölgeleriyle etkileşerek düzenlenmektedir. BRCA2, mitoz ve mayoz bölünmesinde iki zincir kırığını onarır ve homolog rekombinasyonda rol oynar. BRCA 2 ilişkili meme kanserinin invaziv duktal karsinom olma olasılığı diğer olasılıklara göre daha yüksektir [26]–[28]. Bir kişi BRCA 1 ve BRCA 2 genlerinden birinde herhangi zararlı bir mutasyon geçirir ise meme kanseri olma riski önemli düzeyde artmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonlarda ikinci allel normal olsa dahi otozomal dominant olarak kalıtsal şekilde aktarılmaktadır. Kalıtsal meme kanserinin yaklaşık %20-25'i BRCA1/2 genlerindeki mutasyonal neden olmaktadır [29].



Şekil 3. BRCA1 geni [30].

2.1.2.3.2. İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER2)

İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), 17. kromozmun uzun kolunda bulunur ve önemli bir onkogendir. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sinin patogeneğinde rol oynamaktadır. Her geninin ekspresyonu, gen amplifikasyonu ve yeniden düzenlenme yoluyla aktive edilir. İlk olarak sıçanların nöroblastoma hücrelerinde Neu olarak tanımlanmıştır [31]. Her2 protein tirozin kinaz ailesinin epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR) ve çeşitli sinyal yollarını aktive eder [32]. Sıçanlarda HER2'nin nakavt edilmesi normal meme kanalı oluşumunu bozmaktadır. HER2'nin aşırı ekspresyonu PTEN/Akt/mTORC1 sinyal yolağıyla kanser kök hücrelerinin sayısını arttırmaktadır [33].

2.1.2.3.3. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü (EGFR), 7. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. Tirozin kinaz ailesinin hücre yüzey glikoproteinidir. PI3K, ras/raf/MAPK ve JNK sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonu, hücre invazyonu, anjiyogenezi teşvik eder. Aynı zamanda hücrelerin apoptoza gitmesinin de engellemektedir [34], [35]. İnflamatuvar meme kanserinde EGFR'nin aşırı anlatımının olduğu görülmüştür. Bunların yanı sıra östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) negatif olduğunda ve HER2'nin aşırı ekspresyonu olmadığında EGFR'nin de aşırı anlatımı olduğu gözlenmiştir [21], [36].

2.1.2.3.4. Ras

Ras genleri sırası ile insanın 1, 11 ve 12. kromozomda konumlanan N-Ras, H-Ras ve k-Ras'tır. Bu genler tarafından guanozin trifosfa (GTP) bağlayan protein (G proteini) süper ailesine ait proteinlerdir. İnsanlarda kanser üç Ras geninde mutasyonlar sonucu aşırı ekspresyonu gerçekleşir ve bir çoğu GTP bağlama bölgesindeki yanlış mutasyonlar sonucu oluşmaktadır [37]. Meme kanserinde Ras mutasyonlarına çok sık rastlanmasa da Ras sinyalindeki anormalliklerine hem iyi huylu hem de kötü huylu meme kanseri yollarında rastlanmaktadır [38]. H-Ras meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu, invazyonu ve apoptozu inhibe etmede etkili olduğu gözlenmiştir. Hem primer hem de ilerleyen meme kanseri hastalarında H-Ras'ın fazla ekspresyonu kötü prognoz olduğunu gösterir [39], [40].

2.1.2.3.5. c-Myc

İnsanda 8. kromozmun uzun kolunda bulunmaktadır. Myc proteini kodlayarak heliks-loop-heliks lösün fermuar domaini içeren protoonkogen olan bir transkripsiyon faktörüdür. Ekspresyonu büyüme emriyle artmaktadır. Meme kanseri başlamasında ve ilerlemesinde c-Myc önemli rol oynamaktadır. c-Myc'nin fazla ekspresyonu ilerlemiş meme kanserinin

invazyonunda gözlenmiştir fakat iyi huylu dokularda c-Myc amplifiksyonuna rastlanmamıştır [41], [42], [43].

2.1.2.3.6. Östrojen

Östrojen, meme kanserinde önemli bir rol oynayan bir hormondur. Meme tümörlerinin yaklaşık % 70-80'i östrojen reseptörünü (ER) eksprese etmektedir. Östrojen; meme kanseri gelişimini iki ana yolla destekler: hormonun metabolitleri ve doğrudan veya serbest radikallerin oluşumuyla mutasyonlara neden olabilir. Ayrıca östrojen, meme hücrelerinin proliferasyonunu sürdürebilmesi için doğal bir yeteneğe sahiptir, dolayısıyla tümör gelişmesine yardımcı olmaktadır [21]. Buna ek olarak, endojen ve eksojen östrojenlerin ikisinde meme kanseri riski oluşmasında etkilidir. Endojen östrojenler menopoza öncesinde kadınlarda yumurtalıkta üretilir ve meme kanseri riskini azaltabilir. Eksojen östrojenlerin temel kaynağı doğum kontrol hapları ve hormon destek tedavisidir (HDT). Doğum kontrol hapları 1960'lardan bu yana kullanılmaktadır, 10 yıldan uzun süre doğum kontrol hapı kullanmayan kadınlarda meme kanseri riski azalmaktadır. HDT menopoza ve postmenopoza olan kadınlarda eksojen veya diğer hormonları kullanılmasıdır. Yapılan çalışmalarda HDT uygulanan kadınlarda meme kanseri riski artmıştır ayrıca kullanmayı bırakan kadınlarda iki yıl sonrasında meme kanseri riski azalmıştır [44], [45], [46].

2.1.2.3.7. Yaş ve Ailesel Geçmiş

Yaş ve ailesel geçmiş meme kanseri oluşmasında çok önemli risk faktörlerindedir. Meme kanseri insidansı yaşla ilişkili olarak artmaktadır. Bu yüzden kırk yaşının üzerindeki kadınlar düzenli şekilde mamografi taraması yaptırmalıdır [47]. Ailesel geçmiş hikayesinde kanser olan birinde kanser olma riski olmayanlara kıyasla daha fazladır hatta annesi veya kız kardeşi meme kanseri olan bireyler daha çok risk altındadır. Yapılan bir çalışmada birinci derece akrabaları meme kanseri olan kadınların olmayanlara kıyasla 1,75 kat daha yüksek riskli oldukları bulunmuştur. Buna ek olarak yakın akrabalarından biri meme kanseri olan kişilerle olmayan kişiler karşılaştırıldığında, olanların 2,5 kat daha fazla risk altında oldukları görülmüştür. Meme kanserine kalıtsal olarak yatkınlık BRCA1 ve BRCA2 genlerinde olan mutasyonlarla ilgilidir [48].

2.1.2.3.8. Üreme Faktörleri

Menapoza geç girmek, erken menarş dönemi, ilk gebeliğin geç olması gibi faktörler meme kanseri riskini artırabilir. Menapozun gecikmesiyle meme kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir. Geç menarş olan ve erken doğum yapan kadınlarında meme kanseri riskinin

azaldığı gözlenmiştir. Üreme faktörlerinin östrojen (ER) hormonuyla da ilişkili olduğu bulunmuştur. ER+ ve ER- meme kanseri arasında kanser olma riskine bakıldığında ilk doğumun 25 yaş altı olduğu bir durumda kanser olma ihtimali daha düşükken iken 30 yaş üstü doğum yapan bir kadının meme kanseri olma riski daha yüksektir [48].

2.1.2.3.9. Yaşam Tarzı

Meme kanseri riskini arttıran bir diğer faktör ise yaşam tarzı olarak ifade edilmektedir. Aşırı alkol tüketimi, sigara kullanımı, fazla yağ alımı, obezite gibi yaşam tarzı edinenlerin meme kanserine yakalanma riski daha çok artmaktadır. Alkol tüketimi kanda bulunan östrojen ile ilişkili hormonların seviyesini yükseltebilir ve östrojen reseptör yollarının aktifleşmesini tetikleyebilir. Yapılan bir araştırmada günde 35 ile 44 gram arası alkol alan bir bireyin meme kanserine yakalanma riski artmaktadır ve günlük 10 gram alkol alımındaki artış bu riski %7'lik oranda arttırdığı bulunmuştur. Doymuş yağ alımı meme kanseri riskini ve kötü prognozu arttırmaktadır [49]. Sigara kullanımı emzirmeyen ve hamile olmayan kadınların meme sıvıları incelendiğinde sigara dumanında bulunan mutajenlere rastlanmıştır ve bu da meme kanseri riskini arttırmaktadır. Erken yaşlarda sigara kullanımına başlamanın meme kanseri oluşmasında etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir [50], [51].

2.1.2.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri ve Önlemleri

Meme kanseriyle ilgili birçok teorik ve klinik çalışmalar yapılmış ve hala yapılmaktadır. Meme kanserinin erken teşhisi önemlidir. Çeşitli taramalar, kemopreferanslar ve biyolojik bir takım önlemler alınarak meme kanserinin mortalitesi azaltılabilir. Fakat günümüzde hala kadınlarda ölüm oranı en yüksek olan kanser türü meme kanseridir. Meme kanserinin %90'dan fazlası primer tümör yerine tümör metastazı sonucu gerçekleşmiştir. Kanser primer tümör veya metastazın erken evresinde teşhis edilirse meme tümörü ameliyetle çıkarılır ve kemoterapi tedavisiyle sağkalım artırılabilir. Düşük X-ışınlarıyla çekilen mamaografi taraması 30 yaş üstü her kadının yaptırması gereken bir taramadır. Amerika'da yapılan bir araştırmada 50-74 yaş arası olan kadınlara her iki yılda bir mamografi taraması yapılmıştır ve meme kanserinin mortalitesinin düştüğü gözlenmiştir [52], [53]. Meme kanseri tedavisinde kullanılan bir yöntem olan kemoterapinin amacı karsinogenezi başlatan DNA hasarını veya var olan tümöre yatkın hücrelerin çoğalmasını durdurarak ya da etkisini ters çevirerek invaziv meme kanser gelişmesini farmakolojik veya doğal ajanlarla engellemektir [49]. Meme kanseri için en önemli kemoterapotik hedef östrojen reseptörüdür (ER), çünkü meme kanserinin %70'den fazlası ER+ meme kanseridir. Seçici östrojen reseptör modlatörleri (SERM) ve

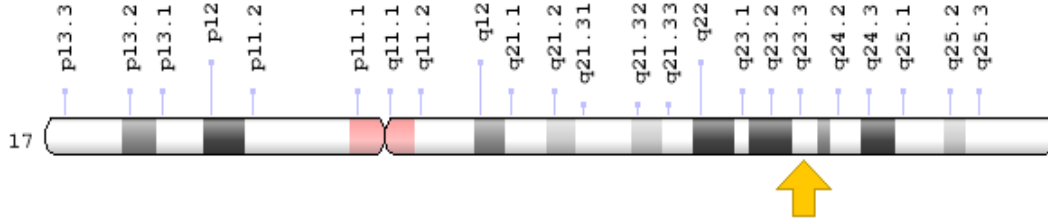
aromataz inhibitörleri (AI) önemli iki antiöstrojen ilaç sınıfıdır. Tamoksifen uzun yıllardır kullanılan bir SERM'dir ve meme kanserinin bütün aşmalarında tedavi amaçlı kullanılır [54]. Tamoksifen ile ilgili yapılan çalışmalarda 5 yıl tedavi edilen hastalarda ER+ meme kanserinde %30'dan fazla azalma olduğu gözlenmiştir. Bir diğer SERM Raloksifendir. Postmenapoz olan kadınlarda invaziv meme kanser tedavisinde kullanılmaktadır [55]. Postmenapoz kadınlarda SERM yerine AI'larda kullanılmaktadır, AI'lar sadece postmenapozal kadınlarda kullanılmalıdır. AI'lar androjen östrojen biyosentezini katalize eden aromatazi inhibe ederek östrojenleri plazma seviyesine azaltır. Steroid ve steroid olmayan inhibitörler olmak üzere AI'lar iki sınıf ayrılır. AI'lar ile ilgili yapılan araştırmalarda meme kanseri insidansını azalttığı ve hatta tamoksifene kıyasla daha etkin olduğu gözlenmiştir [56], [57].

Meme kanseri hastalarının yaşam kalitesini arttırmak için biyolojik önemlere bakıldığında monoklonal antikorların ana hedefi olan HER2 üzerine yoğunlaşmıştır. Meme kanseri vakalarının yaklaşık olarak %20-30'u HER2 proteinini aşırı eksprese edilmesiyle veya gen amplifikasyonunun çok olması sonucu olduğu gözlenmiştir. Monoklonal antikor olan Transtazumab (Herceptin) HER2'yi hedefleyen FDA tarafından onaylanmış ilk ilaçtır. Transtazumab, HER2'nin hücre dışındaki domain IV'ün C-terminal ucuyla etkileşime girebilir [58], [59]. Bazı mekanizmalarda transtazumab MAPK ve PI3K/Akt yollarını veya antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksikite mekanizmasını inhibe ederek bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı aktifleştirerek, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve büyümesini engelleyebilir [58]. Transtazumab ilk olarak metastatik meme kanserinde kullanılmıştır ve etkili olduğu gözlenmiştir. *In vitro* deneylerle birlikte diğer antitümör ilaçlarla kombine tedavilerde de etkili olduğu gözlenmiştir [60]. Bir başka monoklonal antikor olan ve meme kanserinde kullanılan ilaç pertuzumabdır. Transtazumab gibi etki eder fakat bağlanma bölgesi farklıdır. Transtazumab ile kombine tedavide kullanılan pertuzumab HER2 + meme kanserinde sağ kalımı arttırdığı gözlenmiştir [61].

Günümüzde immünoterapi alanında önemli gelişmeler olmuştur. Programlı hücre ölümlerinde bağışıklık sistemi bloke edilerek spesifik bir ligand tarafından bağlanabilen çeşitli bağışıklık hücrelerinde eksprese edilen zar proteinleri üretilmektedir. Nivolumab ilacı programlı hücre ölümü inhibitörü olup, pembrolizumab metastatik melanoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde gibi tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır [62].

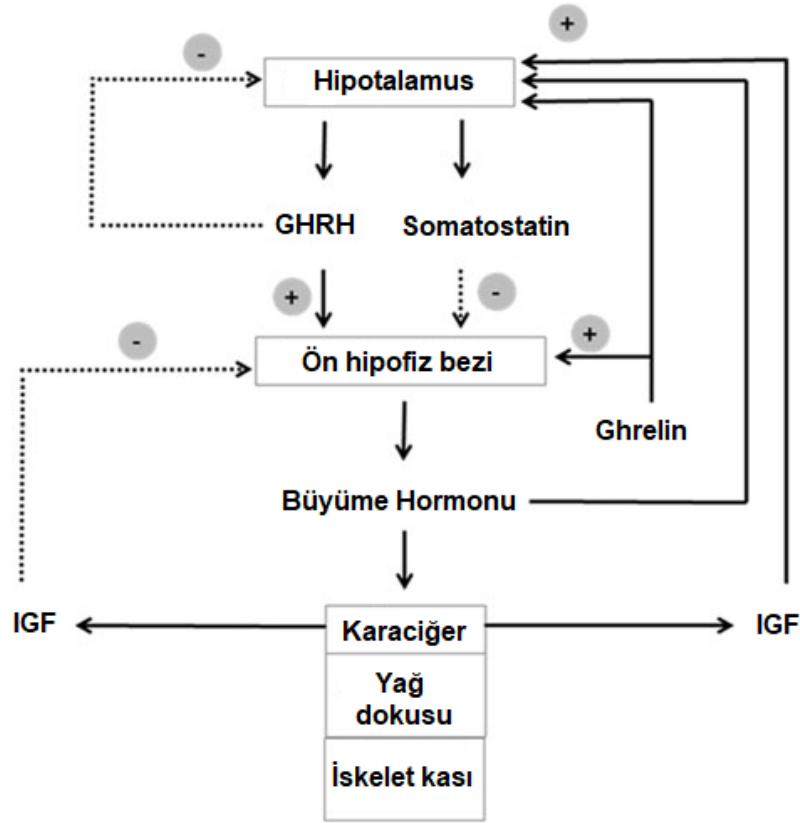
2.2. Büyüme Hormonu (BH)

Büyüme hormonu (BH), 22 kilodalton (kDa) büyüklüğünde, 191 amino asit içeren bir proteindir. 17. kromozomun 17q23.3 pozisyonundaki uzun (q) kolunda konumlanır (Şekil 4). İnsanlarda büyüme, gelişme, metabolik olayları düzenleyen, emzirme, azot birikmesi, diyabetik ve insülin benzeri etkiler gibi çok çeşitli biyolojik etkileri ortaya çıkaran, anterior hipofiz tarafından salınan bir hormon olarak bilinmektedir.



Şekil 4. İnsan büyüme hormonu (121).

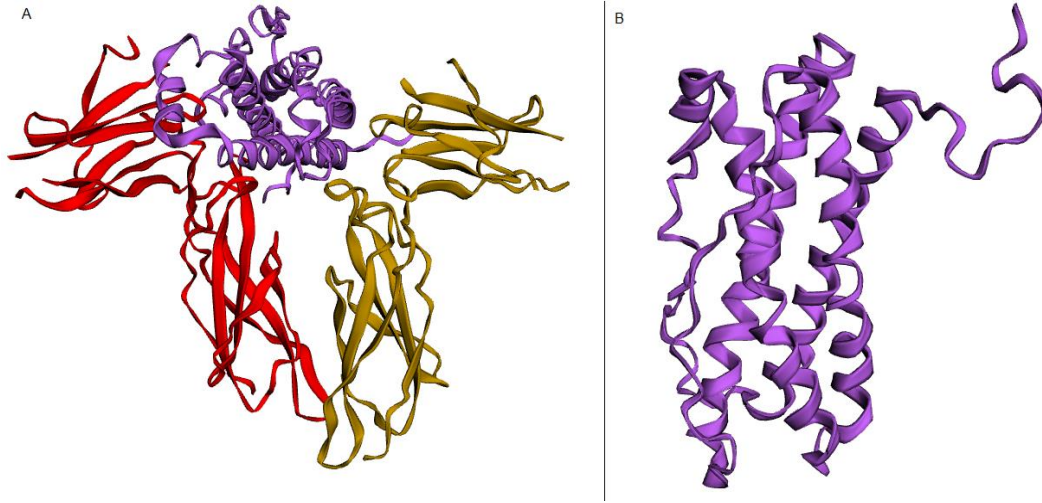
BH salgılanması, iki antagonistik sistem olan, büyüme hormonu salgılayan hormon (GHRH) ve somatostatin tarafından kontrol edilir. GHRH ve somatostatin hipotalamus tarafından salgılanır. Hipofizyal portal sistemini geçtikten sonra somatotrof hücreleri üzerinde bulunan ilgili reseptörlerine bağlanır. BH salgılanmasının düzenlenmesine birçok hormonal ve merkezi sinir sistemi sinyalleri aracılık etmektedir. GHRH, BH biyosentezini uyarır ve hipofizden salınmasını kontrol ederken; BH kendi salgısını inhibe etmek için beynin ortanca yerinde nöronlardan salınan somatostatin nöronlarının aktifleşmesini uyararak BH salınımını inhibe eder (Şekil 5). Sadece somatostatin değil her GH salınımını uyarmak için hipotalamik GHRH de gereklidir [63], [64]. Steroid ve tiroid hormonları ile birlikte insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) ve insülin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II) gibi periferik hormonlar da BH sekresyonunun kontrolüne katılırlar. GHRH; BH hematopoetik sistem de dahil olmak üzere diğer birçok doku içinde sentezlenir aynı zamanda memede de bulunur ve meme gelişiminde de etkinliği belirtilmiştir [65], [66], [67].



Şekil 5. Büyüme hormonu salınımının düzenlenmesi [68].

BH, ilk olarak 10 yıllık bir yaşam süresinde artar, ergenlik döneminde maksimum salgı seviyelerine ulaşır ve daha sonra salgı ve kan seviyeleri yaşla birlikte yavaş yavaş azalır. Çocuklarda BH eksikliği cücelikle ve hipofiz tümörlerine bağlı fazla salgılanması akromegali (çocuklarda devlik) ile sonuçlanır [69]. 1988'de yapılan tedavi araştırmalarında birçok çocuğun terapötik olarak GH aldıktan sonra lösemi seviyelerinde ilerleme olduğu zaman BH'nın tümörojenik etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır [64], [70]. Kültürlenmiş çeşitli tümör hücre hatları, BH eyleminin gerçekleşmesinde rolü olan IGF-I reseptörlerine sahiptir ve bazı kanser hücre hatları çevrelerindeki normal hücrelerden daha fazla IGF-I bağlanması gerçekleştirmektedir. Pekonen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, aynı hastalardan alınan normal meme dokularıyla kanserli meme dokularının IGF-I bağlama potansiyelleri karşılaştırıldığında, kanserli dokunun daha fazla IGF-I bağladığı gözlenmiştir [71]. IGF-I'in kültürlenmiş hücrelere eklenmesiyle DNA sentezi ve hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Akromegali olan kişilerde malignitenin yaygın olan ikinci ölüm nedeni olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, maligniteden ölüm oranının genel popülasyondan iki kat daha fazla olduğu gözlenmiştir [72], [73].

BH reseptörü (GHR) ve prolaktin (PRL) (Şekil 6) reseptörü (PRLR), türler arasında yüksek oranda korunan yapısal olarak benzer sitokin reseptörü süper ailesi üyeleridir. BH, insanlar da dahil olmak üzere omurgalılardaki çeşitli dokularda büyümeyi hızlandıran ve metabolik olayları düzenler [74], [75], [76]. Memelilerde laktasyonun düzenlenmesi için ise PRL gereklidir. İnsan BH ve insan PRL biyolojisinin önemli özelliklerinden biri, insan PRL'nin sadece insan PRLR ile etkileşmesine rağmen, insan BH'nin hem insan GHR hem de insan PRLR'ye iyi bağlanmasıdır. Meme kanseri hücreleri fazla miktarda GHR ve PRL eksprese etmektedir. BH gibi, PRL esas olarak anterior hipofizden yayılır, ancak ekspresyonu meme hücrelerinde olmaktadır. PRL'nin birçok etkisi vardır ama özellikle meme gelişimi ve emzirme döneminde önemli rolleri vardır. Ayrıca PRL, insan meme kanserinde endokrin, otokrin veya parakrin etkilerde rol oynayabilir. PRL sinyalleme özellikleri Janus Kinaz 2 Tirozin Kinaz/JAK2-sinyal transduser ve transkripsiyon aktivatörü 5 (JAK2/STAT5) yolaklarının kullanımı dahil olmak üzere BH sinyalleme özelliği göstermektedir. Bunlar kendi reseptörleri arasındaki etkileşimlerle ilişkilidir [76], [77], [78].



Şekil 6. (A) İnsan büyüme hormonu ve (B) prolaktinin moleküler olarak gösterimi [79].

2.2.1. Otokrin Büyüme Hormonu ve Meme Kanseri

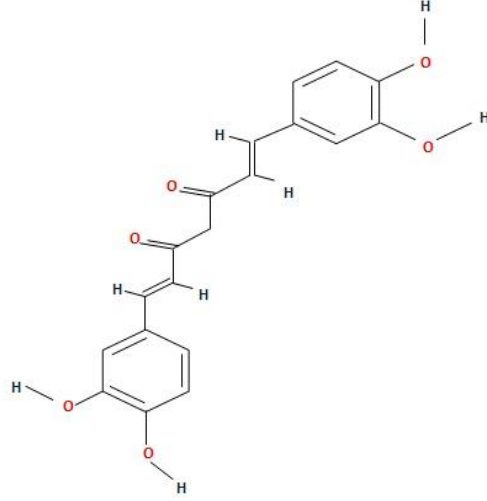
Meme kanserinde mortalite ve bu süreci destekleyen faktörlerin rolü önem arz etmektedir. Östrojenin meme kanserinde önemli bir rolü vardır ve prognozun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda östrojen reseptörünün negatif olduğu hastalarda HER2/Neu ekspresyonunun ve metastaz olma olasılığının arttığı gözlenmiştir. HER2'nin paraloğu olan heregulin, epidermal büyüme faktörü ve östrojen meme bezi gelişim faktörler

olarak belirtilmiştir. Meme bezinin gelişmesinde rol alan diğer hormonlar ve büyüme faktörleri meme kanseri gelişiminde rol alabilmektedir [80], [81]. Örneğin BH, memede duktal uzama ve duktal epitelyum terminal uç tomurcuklanması ve farklılaşmasında önemli role sahiptir. Bunun yanı sıra prolaktin de hücre proliferasyonu için gereklidir. Hem prolaktin hem de BH insanlarda prolaktin reseptörünü aktive edebilir ve benzer sinyal yollarını aktive ederek tümör oluşumuna etki eder. Reseptörlerin aktifleştirdiği yollar JAK2/STAT5, Src ailesi kinazlar ve bunların aktifleşmesiyle PI-3 kinaz yolağı aktifleşmektedir. Bu yolların hepsi hücre proliferasyonu, hücreyel sağkalım ve metastazda rol almaktadır [82], [77].

Meme kanseri insidansı ve progresyonunda prolaktin ve BH seviyeleri arasında düşük bir ilişki vardır fakat akromegali hastalıklarında artan bir meme kanseri insidansı bulunmaktadır. Akromegali hastalarında hücrede serbest IGF-1'in somatotrofik etkisi incelendiğinde meme kanserini tetiklediği ve meme kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir [72]. 2002 yılında Raccurt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insanlarda meme dokusunda BH ekspresyonunun arttığını ve epitelyal hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğunu ayrıca metastatik meme karsinomunda da BH ekspresyonunun çok fazla seviyede olduğunu göstermişlerdir [83]. Mukhina ve arkadaşları da BH'nin otokrin olarak salınımının meme karsinom hücrelerinde invazif bir görünüm sağladığını göstermiştir [80].

2.3. Curcumin

Curcumin Doğu Hindistan bitkisi olan *Curcuma longa*'dan ismini alan ve bu bitkinin köklerinden elde edilen bir bileşiktir. *Curcuma longa*, Zingiberaceae (zencefil) ailesinin bir üyesidir. Curcumin bir curcuminoid olup yaklaşık % 2-5 oranında zerdeçal içerir [84], [85]. Zerdeçala sarı rengini vermesinin yanı sıra terapötik etkilerinin çoğundan da sorumludur. Anti-inflammatuar, anti-tümörijenik, anti-septik ve anti-oksidan özellikleri nedeniyle alternatif tıptak kullanılması ön görülmektedir. Kimyasal formülü $C_{21}H_{20}O_6$ (Şekil 7) olan curcumin lipofilik bir polifenoldür bu yüzden suda çözünmez ama aseton, etanol ve dimetilsülfoksit gibi organik çözücülerde çözünebilir [5], [86], [87].



Şekil 7. Curcumin'in moleküler formülü.

Curcumin'in 1970'lerde yapılan araştırmalarda anti-diyabetik, anti-inflamatuar ve anti-oksidadn özellikleri keşfedilmiştir. 1980'lerde ise in vivo ve in vitro araştırmalar da anti-kanser etkisinin de olduğu keşfedilmiştir [88], [89]. Curcumin moleküler düzeyde birçok sinyal molekülüyle ilişkili olduğu görülmüştür. Curcumin transkripsiyon faktörleri, enzimler, ilaca dirençli proteinler, büyüme faktörleri, reseptörler, hücre sağ kalım proteinleri gibi birçok hedef moleköl ve hücresel içeriğe bağlı olarak up-regölasyon veya down-regölasyon olabilir. Aynı zamanda curcumin'in çoklu sinyal yollarını baskıladığı ve hücre proliferasyonunu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez inhibe ettiği gösterilmiştir [88], [90], [91].

Curcumin ile ilgili yapılan araştırmalarda birçok kanser türüne etkisi olduğu gözlenmiştir. İnsanlarda meme tümör hücreleri östrojen/progesteron reseptörünü (ER) eksprese ederek tümörün ilerlemesinde önemli rol oynar. Curcumin hem ER-pozitif hem de ER-negatif hücrelerde proliferasyonu inhibe etmektedir [92]. Meme ve birçok kanser türünde de fazla eksprese olan HER-2 curcumin ile baskılanmıştır. Ayrıca PARP-1 radyasyon ve östrojen kaynaklı DNA hasarlarına karşı hücresel olarak korumada önemli bir rol oynadığı görülmüştür [93]. Curcuminin, kaspaz-3 aktivasyonu ile DNA hasarı, endoplazmik retikulum (ER) stresin indüklediği apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [7].

2.3.1. Curcumin ve Meme Kanseri

Curcuminin yapılan araştırmalarda endotel hücreleri, lenfoist, hepatosit ve memeli epitel hücrelerinde değişik etkileri olduğu gösterilmiştir. Çeşitli kanserlerde anti-kanser, kemopreventif ve antioksidan özellikleri olduğu aynı zamanda hücrelerin büyümesi, apoptotik ve otofajik süreçlerini hücrese olarak düzenlediği gösterilmiştir [91]. Çeşitli transkripsiyon faktörleri, hücrese sinyalde görevli proteinlerin, onkogenlerin, tümör büyümesi ve metastazındaki DNA mutasyonlarında görev almaktadır. Birçok kanserde kemoteropatik olarak kullanıldığı için önemlidir. Curcuminin tümör hücreleri üzerinde glutatyon seviyesi normal hücrelere kıyasla daha düşüktür, bu da tümör hücrelerinin curcumine daha fazla duyarlı olduğu anlamına gelmektedir. Düşük konsantrasyonlarda lipit peroksidasyonunu ve sitokrom c salınımının azaldığı, yüksek konsantrasyonda ise glutatyonun azalmasıyla kaspaz 3 aktivasyonuna sebep olduğu gözlenmiştir [94]. Meme kanserinde fazla ekspresyonu olan HER2'nin curcumin uygulamasıyla ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Kunnumakkara ve ark. yaptığı çalışmada, meme kanseri olan çıplak farelerde 58-60 gün sonra inokülasyon gerçekleştirilmiş ve daha sonrasında curcumin diyeti uygulanarak tümörün akciğere metastaz etme insidansının azaldığı tespit edilmiştir. Tedavi edilmeyen gruptaki farelerde ise akciğer metastazı gözlenmiştir [90], [86], [95]. Östrojen reseptörü meme kanserinde tümör gelişmesinde önemlidir. Meme kanserinin yaklaşık üçte birinde gerekli reseptörleri eksprese etmektedir. Östrojen tedaviler için önemli bir hedefdir. 1998 yılında Verma ve ark çalışmasında curcuminin ER+ ve ER- hücre proliferasyonlarını inibe ettiği gözlenmiştir [92], [96]. Curcuminin aynı zamanda hücre nükleer antijeni (PCNA) ve p53 mRNA'larının ekspresyonunu inhbie ettiği [97] hücre döngüsünün G1 fazında biriken hücreler curcumin uygulamasıyla MAPK yolağınıdaki temel elemanlarının uyarılmasıyla kanser hücrelerinin çoğalmasını pozitif yönde etkileyen EZH2 gen ifadesinin bastırıldığı [98], Wnt/ β -katenin yolağının anormal aktive olması meme kanseri gelişimini tetiklemektedir ve curcumin ile meme kanseri hücrelerinde siklin D1 ve β -katenin ifadesinin azadığı tespit edilmiştir [99].

2.4. Hücre Ölümi

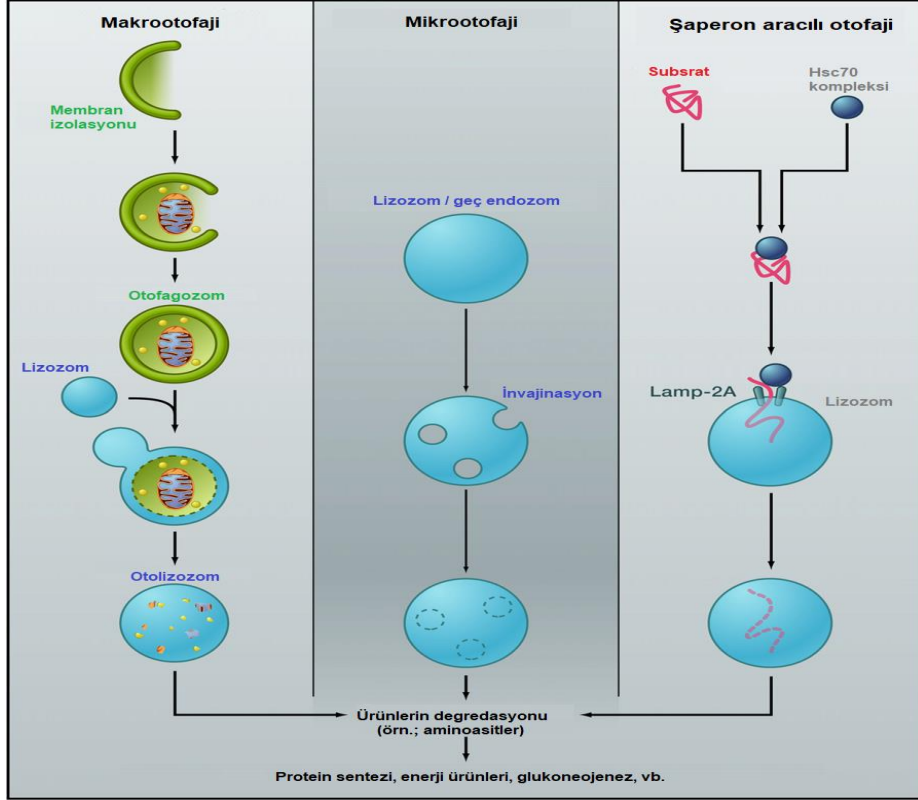
Hücre ölümi, hücrenin temel yaşamsal fonksiyonlarını sürdüremediği zaman gerçekleşen biyolojik bir olaydır. Bu biyolojik olay; normal hücrelerin değiştirilmesi, hastalık veya lokalize yaralanma gibi faktörlerin sonucunda hücrese sorunlara karşı koruma mekanizması olarak gelişen bir durumdur. Hücre ölümi, apoptotik ve nekrotik olmak üzere morfolojik görünüme, farklı proteazların dahil olduğu veya olmadan gerçekleşen enzimolojik kriterler ve immünolojik veya immünolojik olmayan özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Programlı hücre

ölümü ise fizyolojik ve evrimsel açıdan korunan bir süreçtir. Çok hücreli organizmalar başta olmak üzere embriyolojik gelişim, doku oluşumu ve sağlığı gibi birçok olayda önemlidir [100]. Programlı hücre ölümleri yıllarca apoptoz ve nekroz olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarla ve gelişen teknolojiyle birlikte başka bir programlı hücre ölümü yolağı olan otofajik hücre ölümü de eklenmiştir.

2.4.1. Otofaji

Otofaji Yunancada kendi anlamındaki ‘auto’ ve yemek anlamındaki ‘phagien’ anlamındaki kelimelerden türemiş olup hücrenin kendi komponentlerini lizozomal aktivasyon ile degrade ettiği hücrenel bir ölüm çeşididir. Sitoplazmik komponentler, organeller tek başına ve lizozom/vakuol lümeninin içerisine hareket ederler. Otofajinin kanser, metabolik ve nörodejeneratif bozukluklar gibi hastalıklarda rolü olduğu ifade edilmiştir. Hücrenel otofajik aktivite genellikle bazal koşullar altında düşük olduğu ancak besin açlığı, hipoksi veya enerji tükenmesi, hormonal uyarım veya farmasötik ajanlarda hücrede otofajiyi artırabilir. Otofaji ölmekte olan hücrelerde gözlemlenen yaygın bir morfolojidir, bu özelliğinden dolayı hücre ölüm yolağı olarak düşünülmüştür. Ancak son araştırmalarda ana işlevinin hücreyi ölüme götürerek stresli koşullarda hücreyi canlı tutmak olduğu düşünülmektedir [101], [102].

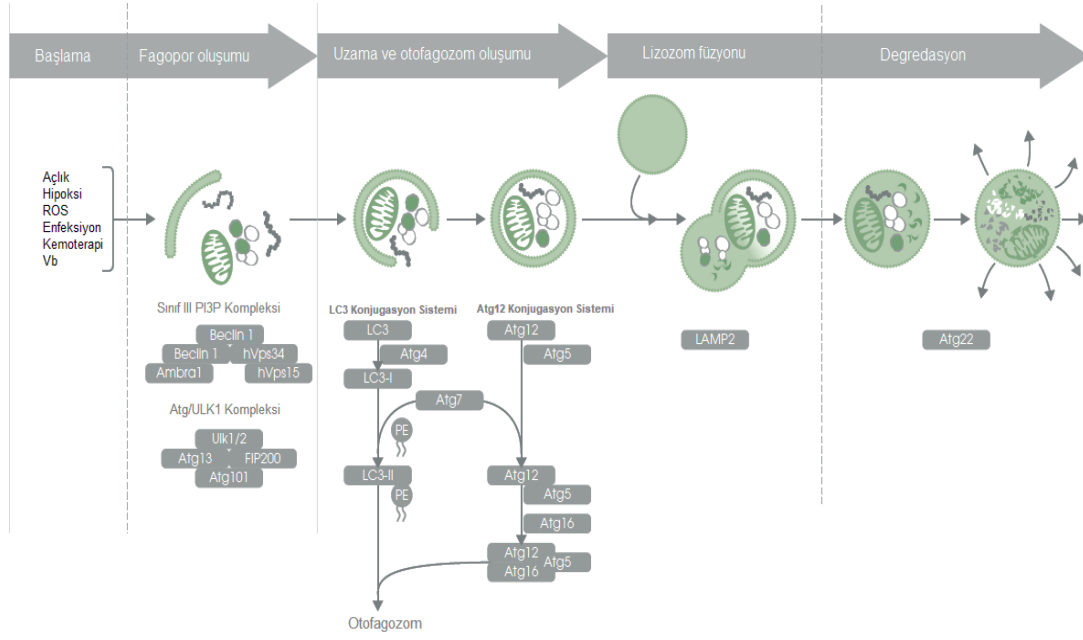
Günümüzde memeli hücrelerinde otofajinin 3 farklı mekanizması ifade edilmiştir: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji. Her üçünde de hücrelerin içeriğı lizozomlar tarafından yıkılmaktadır fakat üçünün de biyolojik özellikleri birbirinden farklıdır. Genellikle üstünde en çok durulan makrotofaji ana otofajik yoldur. Makrotofaji; yıkılacak hedef molekülleri çevrelerinde bulunana diğer sitoplazmik içeriklerden ayıran çift katlı membran sistemi olan otofagozom yapılarını oluşturur. Protein, karbonhidrat, lipit, mitokondri, RNA ve peroksizom gibi organeller otofagozomların içerisinde tutularak lizozomlara taşınarak otofagozomları oluşturur ve burada lizozomal enzimler sayesinde parçalanır [103]. Mikrotofaji; küçük sitoplazmik içeriklerin doğrudan lizozomlar tarafından pinositozla alınmasıdır. Şaperon aracılı otofaji; KFERQ benzeri bir pentapeptit sekansı içeren substrat proteinlerinin sitosolik Hsc70 kompleksi tarafından tanınmasıyla başlar. Daha sonra bu kompleks lizozomal lizozom ilişkili membran glikoprotein 2A (Lamp-2A) ile bağlandıktan sonra lizozomal lümene translokasyonu gerçekleşir. Üç tipteki otofajiden sonra ortaya çıkan bozunma ürünleri; yeni protein sentezi, enerji üretimi ve glukoneojenez gibi farklı amaçlar için kullanılabilir (Şekil 8) [101], [104].



Şekil 8. Otofaji türleri [101].

2.4.1.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji mekanizmasında rol oynayan proteinler; 1992 yılında Oshumi ve arkadaşlarının mayalar üzerinde yaptığı çalışmalarla 'otofaji ile ilişkili genler' ya da kısaca ATG proteinleri olarak tanımlanmıştır. Hücrelerin besin veya büyüme faktörü yoksunluğu, hipoksi, reaktif oksijen türleri (ROS), DNA hasarı veya hücre içi patojenler gibi çoklu stres koşullarına karşı hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır [105]. Otofaji süreci; hücrede otofaji oluşum merkezi (PAS) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi arasında olduğu düşünülen bölgelerde otofagozomların oluştuğu gözlenmiştir. Sitozol ve mitokondri gibi bütün organeller fagopor olarak bilinen çift membranlı vakuol yapısının genişlemesiyle başladığı, çift membranlı otofagozom yapısının oluşmasını takiben, otofagozom yapısının oluşumu tamamlandığında dış membranı bir lizozom ile birleşerek otolizozom yapısı oluşturmaktadır. Lizozomun, lizozomal enzimleri otofagozom içerisine bırakmasıyla birlikte yıkım işlemi başlar. Hücreler otofaji sayesinde kendi organel ve proteinlerini enerji üretimi için kullanıp kendilerini metabolik stresten koruyarak canlı kalabilirler [105], [106] (Şekil 9).



Şekil 9. Memeli hücrelerinde otofajinin moleküler mekanizması. PE: fosfotidilmetanoamin [111].

Otofajinin moleküler mekanizması birkaç tane korunmuş ATG proteini içermektedir. Başlatma basamağında iki protein kompleksi bulunur. Bunlar; sınıf III fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) kinaz (Beclin1/Atg14L/hVps34/Ambra1/hVps15) kompleksi ve Atg/ULK1 (Atg13/FIP200/ Atg101/ULK1/2) kompleksidir. Atg proteinlerinden mayalardaki Atg6 proteini, memelilerdeki Beclin-1 proteini otofajinin ilk basamağını oluşturmaktadır. PI3P otofajide önemli rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını kendisine bağlar ve bu kompleksi PAS bölgesine yönlendirir. Fagopör uzaması ve otofagozom tanımlanması olayları Atg7 tarafından katalize edilen LC3 konjugasyon sistemi ve Atg12 konjugasyon sistemi olmak üzere iki tane ubikuitin benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir. Memelilerde bu sistemde yer alan Atg12'ye bağlanmış olan Atg5 daha sonra Atg16'ya bağlanır. Daha sonra bu kompleks otofagozom yapısına bağlanmaktadır. Diğerinde ise memelilerde LC3 proteini Atg4 tarafından proteolitik olarak yarılr ve yağ molekülü olan fosfotidilmetanoamin (PE) molekülüne bağlanarak; LC3-I yapısındaki LC3'ün, LC3-II yapısına konformasyonel olarak değişimini sağlamaktadır. Daha sonra LC3-II ve Atg16-Atg5-Atg12 kompleksleri birbirine bağlanarak otofagozom yapısının lizozom ile füzyonu için hazır hale gelir. Füzyon olayından sonra lizozomal olarak degradasyon gerçekleşir (Şekil 9) [107], [108], [109], [110].

2.4.1.2. Otofaji Kontrol Mekanizmaları

Otofaji oluşumunda birden fazla önemli sinyal yolları bulunmaktadır. Sınıf III PI3P kinaz otofajik vesikül oluşumundan sorumludur. Sınıf I PI3P/ protein kinaz B (Akt/PKB) mitojenik uyarılarla aktive edilerek hücrenin büyümesini uyararak sinyal yollarından biridir. Sınıf I PI3P, Akt/PKB yolağının aktivasyonuna sebep olur. PI3P/protein kinaz B/Akt yolağı otofajiyi baskılamaktadır. Bunun sebebi de aktif olan Akt otofajinin inhibisyonunda rol alan rapamisinini memelilerdeki hedefi olan (mTOR) protein kompleksini aktifleştirmesidir. Memeli hücrelerinde rapamisin hedefi (mTOR) besin açısından zengin olan koşullarda otofajiyi baskılayan sinyale aracılık eder. Otofajinin mTOR tarafından kontrol edilmesi memelilerde ULK1/2 ve ilişkili oldukları Atg13'ü fosforile ederek inhibisyonlarına neden olmaktadır. ULK'un aktive olması otofajinin başlamasında önemli bir adımdır. ULK, Atg13 ve FIF200 (Atg17) kompleksi oluşur ve Atg17'ler ULK tarafından fosforlanır. ULK kinazlar Beclin-1 kompleksini uyarır ve otofagozom oluşumunda yer alan Atg5-12-16 membran fragmentlerini oluşturur [112], [113], [107].

Calpain-1, Atg12-Atg5 kompleksinin miktarını azaltarak otofajiyi kontrol altında tutar, aynı zamanda bu kompleks otofajinin artmasında anahtar olan sinyal molekülüdür; hücre içi Ca^{2+} seviyesi de otofajiyi düzenler, Ca^{2+} 'nin inhibisyonu otofajiyi indüklemektedir. Aynı zamanda hücre içindeki Ca^{2+} 'nin azalması, Atg12-Atg5 kompleksinden Atg-5'in ayrılmasını önler. Atg12-Atg5 sinyal molekülü, memeli hücrelerinde besin bakımından zengin koşullarda otofaji seviyeleri Calpain-1 tarafından düzenlenir. Calpain-1 inhibisyonu otofajiyi indükler ve yanlış katlanmış proteinlerin birikimini azaltır. Ayrıca flusprililen ile tedavi edilen hücrelerde Atg12-Atg5 kompleksinin seviyeleri artarak LC3-II ve Atg5 seviyelerinde artış olarak otofajiyi indüklemektedir. Otofaji normal memeli hücrelerinde düşük seviyede olmasına rağmen intraselüler patojenler tarafından açlık veya invazyon olduğunda dakikalar içerisinde hızlı bir şekilde indüklenebilmektedir [109], [114].

2.5. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi

Ökaryotik hücrelerin hepsinde endoplazmik retikulum (ER) bulunmaktadır ve hücrenin toplam membran sisteminin yarısından fazlasını oluşturmaktadır. ER membranının yüzeyinde ve sitozolünde ribozomlar bulunmaktadır. Bu ribozomlar farklı proteinler tarafından sentezlenir. Hücresel biyosentezde ER'in önemli bir rolü vardır. ER membranıyla birlikte golgi kompleksi, lizozom ve plazma membranında bulunan transmembran protein ve lipidlerin sentezi, ayrıca mitokondri ve peroksizomların zar yapılarını oluşturan lipidlerin birçoğunun sentezi başlar. ER salgılanan proteinlerin sentezlenmesi ve hücre dışı matrisin oluşmasında rol

oynamaktadır. Bunların yanı sıra, yeni sentezlenip katlanmayan proteinlerin birçoğu golgi kompleksi ve lizozom yapılarını oluşturmadan önce ER lümenine giderek katlanırlar. Şaperon olan Hsc70 proteinleri ve disüfit izomerazlar yeniden katlanmayı kataliz etmektedirler [115], [116]. ER'nin başka önemli fonksiyonlarından birisi ise otofagozom yapısının oluşmasında görev almasıdır. Otofagozom oluşmasında ER ve golgi zarında yer alan sistein açısından zengin olan Zn²⁺ bağlayan çift FYVE domaini içeren protein 1 (DFCP1) görev alır. Bu protein iki tane FYVE domaini içerir ve ER'de dinamik olarak bağlı olan PI3P'yi bağlar. PI3P, ER'ye dinamik olarak bağlanmıştır. Bu olay, otofagozomal proteinlerin birikmesi ve otofagozomal membranın genişleyip oluşması için ortam sağlayan Vsp34 içeren keseciklere yakın gerçekleşmektedir [110].

ER stresi, ER'de protein katlanmasının bozulduğu patolojik ve fizyolojik süreçlerden kaynaklanmaktadır. Ökaryotik hücreler; besin veya büyüme faktörü yokluğunda, hipoksik koşullarda, reaktif oksijen türleri oluşumunda, DNA hasarı, protein birikmesi ve hasarlı hücre organelleri gibi birçok farklı hücrel strese maruz kalmaktadır. Bunların yanı sıra; ultraviyole ışın, sıcaklık, pH, oksijen miktarı, redoks potansiyelleri, iyon konsantrasyonları, sitokinler, hormonlar ve nörotransmitterler gibi parametrelere uyum sağlamalıdır. ER stres oluşumunun ilk basamağında katlanmamış proteinlerden kaynaklı birçok sağkalım yolu aktive olmaktadır. Katlanmamış protein oluşunca ER kendi protein katlama potansiyelini düzenler ve bu bilgiyi hücrenin çekirdeğine ileterek hücrel homestaziyi transkripsiyonel yollarla sağlamaya çalışır [117], [118]. Yapılan çalışmalarda katlanmamış proteinler ER'nin genişlemesine ve otofagozom oluşumuna katkıda bulunmuştur. ER'ye özgü olan otofaji genleri katlanmamış proteinler tarafından aktive edilmiştir. Bu sağkalım mekanizmasında ER, katlanmamış protein sentezini de bloke eder, şaperon ER proteinlerinin ekspresyonunu artırır ve ER'nin protein katlama kapasitesini artırır [119].

Pro-apoptotik faktörler mitokondriyal transmembran porlarından katlanmamış proteinlerin geçirgenliğini artırabilir. Apoptozun başlamasında önemli olan kaspazlar aktive olur. Ayrıca, anti-apoptotik gen olan Bcl-2'nin çok eksprese edilmesi de hücrenin sağ kalımında pozitif etki yapmaktadır [120], [121]. Katlanmamış proteinlerin cevabı ile ER stresinin ortadan kaldırılması hücrelerin kanser, diyabeti kardiyovasküler ve nerodejeneratif hastalıklardan korunmasını sağlamaktadır.

2.5.1. ER stres ve otofaji

Otofaji gibi ER stresinde hem ölüm hem de sağ kalım fonksiyonlarında görevi bulunduğu gösterilmiştir. ER’de sentezlenen proteinlerin sadece doğru katlanıp katlanmaması proteinlerin gerekli hedeflerine taşınması için bir kalite kontrol mekanizması oluşturmaktadır. ER’ye yerleşmiş şaperon proteinler yanlış katlanan proteinleri ve ER redüktazları, proteozom tarafından parçalandıkları yere taşınmasında yardımcı olurlar [115], [122]. Yanlış katlanan proteinlerin ER ilişkili degradasyonun olması için parçalanması için katlanmamış protein cevabı için otofajiyi aktive ettiği gösterilmiştir. ER’ye bağlı otofaji sırasında ER ve protein agregatları otofajozom olarak adlandırılan çift membranlı yapılara girer ve degradasyon için lizozomlara iletilir. Fogapor yapısı oluşur. ER’ stresi sırasında, ER lümeninde sitozole Ca^{+2} akışının aktifleşmesi gerçekleşir [123]. Bunun yanı sıra otofajiyi farklı indükasyonları da gerçekleştirir. Katlanmamış proteinlerin PERK ve IRE1 α proteinlerinin düzenlenmesinde de rol oynadığı, PERK bağımlı olan transkripsiyon faktörleri ATF4 ve CHOP’un ve Atg5’in transkripsiyonel aktivasyonu indüklediğini gösterilmiştir [122], [124].

BÖLÜM III. MATERYAL VE METOT

3. 1. KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’de sunulmuştur.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’te sunulmuştur.

3.1.4. Kullanılan Tamponlar

Çalışma sürecinde kullanılan tamponlar ve içerikleri ekler bölümünde Tablo 4’te sunulmuştur.

3.1.4.1. Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinler %12’ lik SDS poliakrilamid jelde ağırlıklarına göre ayırmak için yürütüldü. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo 4’te sunulmuştur.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 (ER+ ve PR+) doğal tip meme kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection’dan temin edilmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattına tez danışmanı (Doç. Dr Ajda Çoker Gürkan) yürütücülüğünde gerçekleştirilen TÜBİTAK 1001-113Z791 Numaralı Proje’si kapsamında yüksek lisans öğrencisi (Merve Çelik) tarafından PC3.1 vektörü içine klonlanan insan BH geni lipozomal ajan ile transfekte edilmiş ve neomisin (G418) ile seçilerek stabil BH anlatımı yapan MCF-7 meme kanseri hücre hattı üretilmiştir. Doğal tip ve BH anlatımı olan hücreler %10 sığır fetal serum (FBS) ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren DMEM besiyeri içerisinde %5 CO₂ içeren 37°C olan etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri hücre kültürü ile uyumlu 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml’lik falkon tüplerde +4°C’de saklanmıştır.

Hücreler 25 ve 75 cm²’lik hücre kültürü petrilerinde büyütülmüştür. Protein izolasyonu ve RNA izolasyonu için 60 ve 100 mm’lik, hücre Akış Sitometresi deneyleri için 6 kuyucuklu, floresan mikroskobu çalışmaları için 12 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilerine ekimler

yapılmıştır. Hücreler bir gece boyunca hücre kültürü petrilere yapıştıktan sonra kullanılan ilaç (curcumin, 20 µM) belirlenen sürelerde uygulanmıştır ve %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir.

Hücre ekimleri, gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda pasajlama işlemi yapılmıştır. Bu işlem için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 mm²'lik hücre kültürü petrisi 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılmıştır. Petri kabı içerisine 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (%0,25) eklenerek CO₂ içeren etüvde 2 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1 ml taze besiyeri eklenmiştir. Pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımı için hazırlanmıştır.

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10⁴ ile çarpılmıştır. 1.5x10⁶ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Transfeksiyon

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisine 10x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyunca hücre kültürü petrisine yapışmaları beklenmiştir. İki ayrı mikrofüj tüpü içerisine 100 µl hacimde negatif DMEM (FBS içermeyen) konulmuştur. Transfeksiyon oranı 1:6 olacak şekilde GFP-LC3 ve CHOP promotör (-649/+136) pmCherry-1 plazmitlerinin her biri için lipozomal ajan olan FuGENE transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. İki ayrı mikrofüj tüpüne hazırlanan plazmitler ve transfeksiyon ajanı 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında iki mikrofüj tüpü birleştirilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bir gece önceden ekimi gerçekleştirilmiş olan hücreler üzerine hazırlanan süspansiyon damla damla olacak şekilde verilmiştir. Transfeksiyondan sonraki inkübasyon süresi 24 saat olarak gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonu takiben hücrelere seçili curcumin uygulaması yapılmasını takiben kaldırılıp 1XPBS içinde suspanse edilen hücreler Accuri hücre akış sitometresinde floresan ışımının uygun filtresine göre analiz edilmiştir.

3.2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücresi 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine ekim gerçekleştirilmiştir. Bir gece inkübasyonu gerçekleştirildikten hücelere curcumin ($20 \mu\text{M}$) ile 24 saat boyunca ve/veya otofaji inhibitörü (Bafilomisin; 50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılarak inkübe edilmiştir. İnhibitörlerin ve ilacın uygulaması gerçekleştirilen hücelere MTT ajanı uygulanarak 4 saat inkübe edilmiştir ve dimetil sülfoksit (DMSO) ile formazan tuzları çözündürülüp, absorbans değeri ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm ' de mikropilaka okuyucusunda ölçülmüştür.

3.2.4. Hücre Sağkalım Analizi

MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin sitostatik etkisini belirlemek için hücre sağkalım analizi gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece hücrelerin yapışması için inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yapışan hücelere curcumin ($20 \mu\text{M}$) 24 saat boyunca ve/veya otofaji inhibitörleri (Bafilomisin; 50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar sonunda her bir kuyucuktaki hücreler tripsin ile kaldırılarak 2000 rpm ' de 5 dakika boyunca santrifüjle çöktürülmüştür. Hücre pelleti $50 \mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}$ ile homojenize edildikten sonra $50 \mu\text{l}$ Tripkan mavisi boyası eklenerek hücre sayıcı alet yardımıyla sayımlar yapılmıştır.

3.2.5. Floresans Boyama

3.2.5.1. 3,3' Diheksiloksakarboziyanin İyodür (DiOC₆) Boyama

Curcuminin otolizozom inhibitörü (Bafilomisin A1) varlığında MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla DiOC₆ boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücelere otofaji inhibitörü (Bafilomisin; 50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılarak beklenmiş ve sonrasında curcumin ($20 \mu\text{M}$) ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DiOC₆ (ana stok: 4 mM) 10 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir.

3.2.5.2. Propidyum iyodür (PI) boyama

Otolizozom inhibitörü uygulamasının curcumin kaynaklı hücre ölümü üzerine etkisini MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde belirlemek amacıyla PI boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce otofaji inhibitörü (Bafilomisin A1; 50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra 20 μ M curcumin uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 2 μ g/ml PI (ana stok: 50 mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir.

3.2.5.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

Curcuminin MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce otofaji inhibitörü (Bafilomisin; 50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra 20 μ M curcumin uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1 μ l/ml DAPI (ana stok: 1mM) boyası 30 dakika uygulanmıştır.

3.2.5.4. MitoTracker /DAPI Boyaması

Curcuminin MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde mitokondri zar potansiyeline bağlı canlılığı belirlemek amacıyla mitotracker (100 nM) boyaması yapılmıştır. Hücreye nüfuz eden mitokondri problemleri canlı hücrelere girdiğinde mitokondriyumdaki tiyol gruplarına bağlanarak mitokondri içerisinde tutulmuştur. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten 20 μ M curcumin uygulanarak 0-3-6-9-12 ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 0,8 μ l/ml Mitotracker Red (ana stok: 10 mM) boyası 30 dakika uygulanmıştır. Yeşil filtrede görüntüler çekilmiştir.

3.2.5.5. Akridine Oranj (AO) Boyaması

Curcuminin MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla AO boyaması yapılmıştır. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20 μM curcumin 0-3-6-9-12 ve 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sürelerini takiben DAPI ana stoğu 1:10 oranında DMEM ile dilüe edilerek her bir kuyucuğa 1ul/ml olacak şekilde uygulanıp 10 dakika inkübe edilmiştir. Mavi filtrede görüntüler çekilmiştir.

3.2.6. Total Protein İzolasyonu

60 mm'lik hücre kültürü petrilere 1×10^6 ve 100 mm'lik hücre kültürü perilerine $1,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra hücrelere önce otofaji inhibitörü (Bafilomisin; 50 nM) ile 1 saat boyunca ön muamele yapılmış daha sonra 20 μM curcumin 24 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 1X PBS içerisinde kazıyıcı yardımıyla kazınarak toplandıktan sonra 2 dakika 13200 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki bütün hücreler toplanana kadar tekrarlanmıştır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere lizis tamponu eklenmiştir. Örnekler 20 dakika oda sıcaklığında çalkalıyıcıda inkübe edildikten sonra 20 dakika 13200 rpm de +4 °C de santrifüj yapılmıştır. Üst faz yeni ependorfa alınarak protein miktar tayini yapılmıştır.

3.2.7. Bradford Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin miktar tayinini yapabilmek amacıyla Bradford tekniği kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olan sığır serum albumini (BSA) kullanılarak önce bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde oluşturulmuştur: 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA'nın üzerine 200 μl Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ alınarak aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.8. İmmunoblotlama Yöntemi

3.2.8.1. Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi

İmmunoblotlama yöntemi için 30 μg protein ile Laemli tamponu (5X) 1:4 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. %4'lük yükleme jeli ve %10/12/15'lik ayırma jeli SDS-PAGE hazırlanarak, sistemde ilk kuyuda protein belirteci

olacak şekilde proteinler bu jele yüklenmiştir. Jel, yürütme tamponu içerisinde 80 voltta 4 saat boyunca yürütülmüştür.

3.2.8.2. Membrana Transfer ve Bloklama

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli büyüklüğünde poliviniliden florid (PVDF) membran jelin altına koyulmuştur. Membranın altına ve jelin üstüne transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıtları olacak şekilde hazırlanan bu sistem transfer kasetine yerleştirilmiştir. 2.5 mili amper 25 voltta transferler gerçekleştirilmiştir. Büyük kilodalton proteinler 5-15 dakika arası, küçük kilodalton proteinler ise 1-4 dakika arasında olacak şekilde transferler yapılmıştır. Transfer işlemi sonunda membranlar %5'lik yağsız süt (%0.1 Tween20 içeren 1X TBS) içerisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.3. Primer ve Sekonder Antikor İşaretleme ve Bantların Görüntülenmesi

%5'lik yağsız süt içerisinde alınan membranlar primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Süt içerisinde alınan membranlar, 1X BS-tween ile 5 dakika olacak şekilde 3 kez yıkandıktan sonra primer antikorlarla gece boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilusyonlarda uygulanmışlardır: β -aktin, PERK, BIP, IRE1 α , CHOP, ATF-4, kaspaz-3, Calnexin, Beclin-1, Atg-3, Atg-7, Atg-5, Atg-12, Atg-16L1, p62, LC 3A/B, mTOR, pmTOR, Raptor, Rictor, ULK1, AMPK α . Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:250-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:3000 aralığında çalışılmıştır (Cell Signaling Technology (CST)). Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 5'er dakika boyunca oda sıcaklığında 3 kez 1X TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda, membranlar anti-tavşan, ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 2 kere 8'er dakika 1X TBS-Tween ve 1 kere 8 dakika 1X TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tamponu (ECL) (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 3 dakika muamele edilmiştir. Membranlar kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenmiştir.

3.2.9. Asılı Damla Deneyi (3D Kùltürü Deneyi)

Curcuminin MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde mortalitesini incelemek amacıyla 3D kùltürü deneyi yapılmıştır. Hücreler 60 mm'lik petri kaplarınının kapağına her bir drop 10 µl olacak ve her 10 µl içerisinde 2.5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Her 60 mm'lik petrilerin kapağında 15 drop ekilir ve tabanına 5 ml 1xPBS eklenerek etüve kaldırılır. 6 gün boyunca hücrelerin çaplarının büyüklüğü floresan mikroskopuyla çekilir.

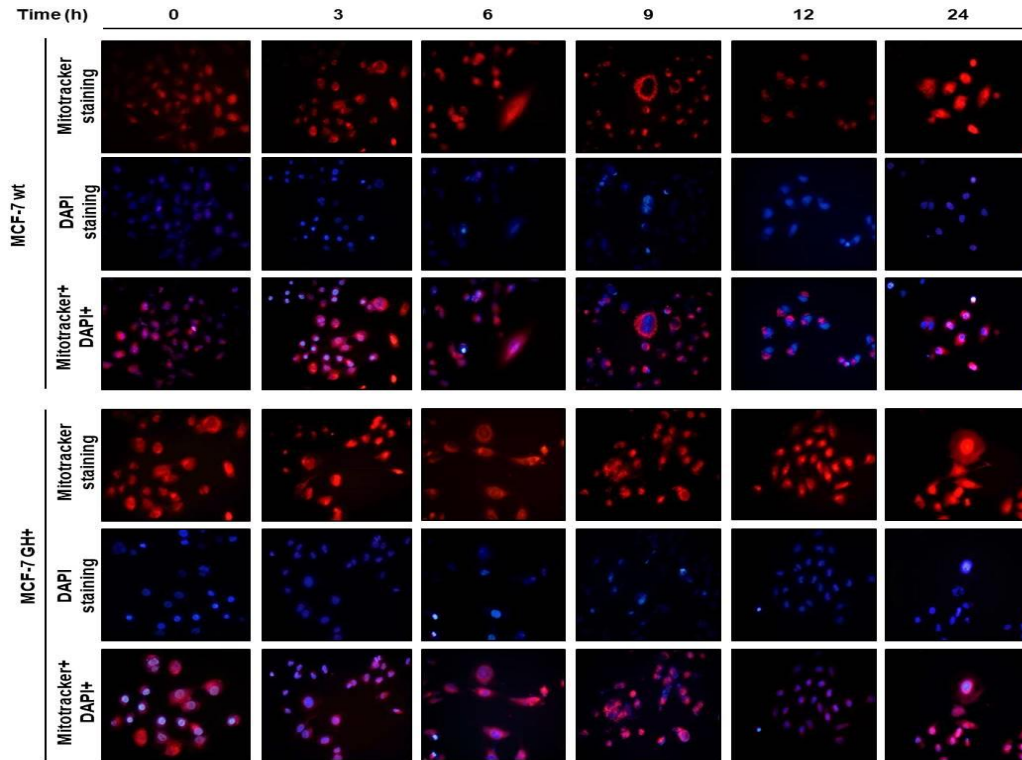
3.2.10. İstatistiksel Analiz

Tüm taz boyunca gerçekleştirilen MTT hücre canlılık testi, asılı damla modeli analizi, PI, Annexin V/PI analizi gibi deneylerden elde edilen sayısal veriler GraphPad Prism 6 kullanılarak grafik haline dönüştürülmüş ve istatistiksel olarak analizleri bu program sayesinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen p değerleri sırasıyla * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ olarak verildi. MTT hücre canlılığı analizi üç kez tekrarlanan deney ortalamasına göre belirlendi. Tüm immünoablottama sonuçları en az iki kez tekrarlanmış ve bant yoğunluklarını hesaplamak için Image J programı uygulanmıştır.

BÖLÜM IV. SONUÇLAR

4.1. Zamana bağlı curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin Mitotracker-DAPI boyaması ile gösterilmesi

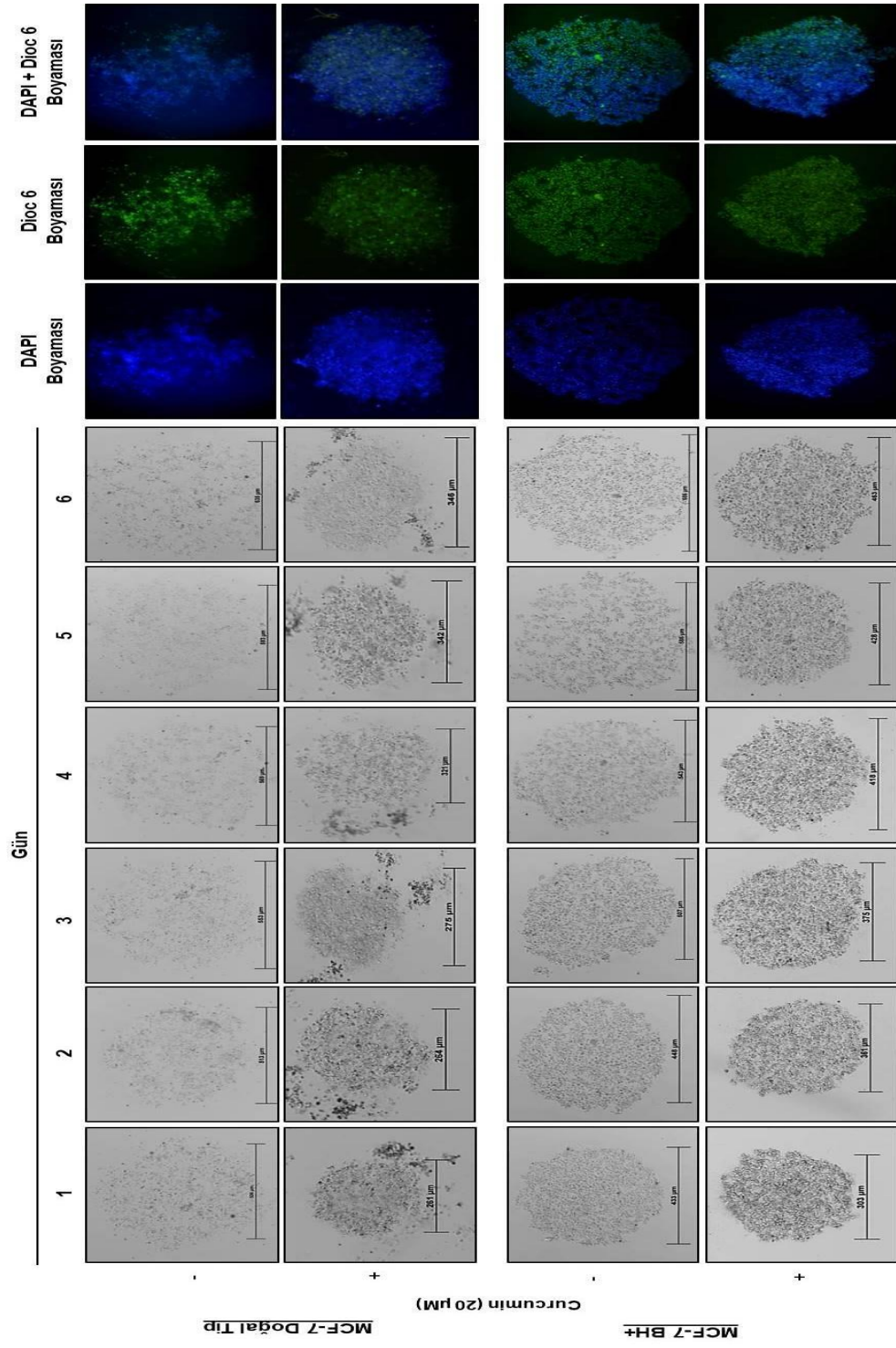
Curcumin uygulamasının zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin hem MCF-7 doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi için mitotracker ve DAPI boyamaları gerçekleştirilmiştir. Mitotracker boyaması hücre canlılığını, DAPI boyaması ise hücre ölümünü göstermektedir. Floresans boyamalara göre zamana bağlı olarak curcumin uygulaması (20 μ M) MCF-7 doğal tip hücrelerinde mitotracker boyamasını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde ket vurucu etkisi görülse de bu etki tüm ilaç uygulamasında doğal tipe kıyasla dirençli olarak görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin (20 μ M) hücre canlılığın etkisi mitotracker boyaması ve DAPI boyaması ile gösterimi.

4.2. Zamana bağlı curcumin uygulamasının asılı damla deneyi ile MCF-7 meme kanseri kültüründe koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi

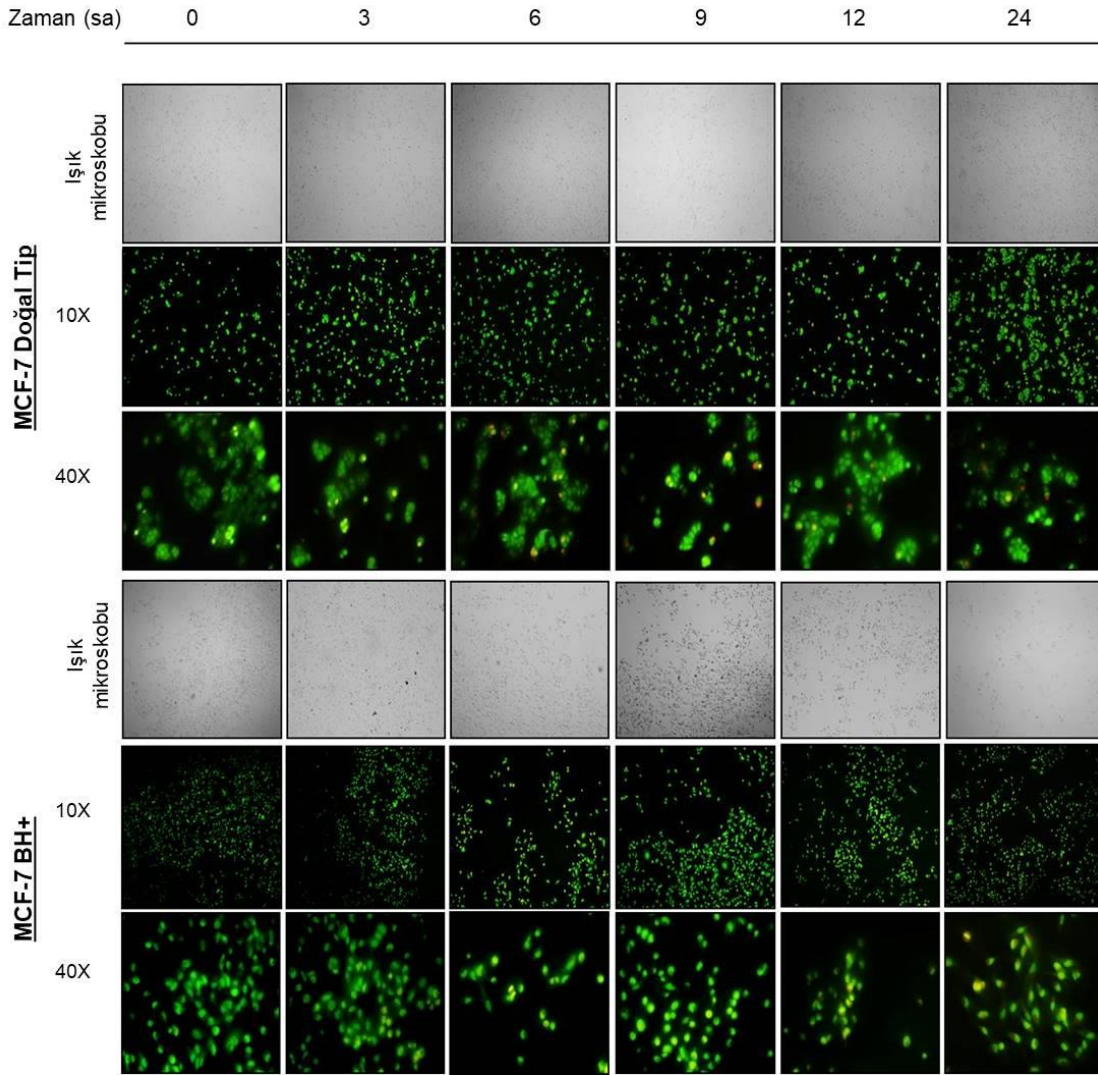
Curcuminin MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinin 3D hücre kültürü modellerinde koloni oluşumu üzerine etkisi gösterilmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücresinde, 6 gün devam eden ve curcumin uygulanmayan 3D kültüründe kolonilerin büyüklükleri 635 μm 'ye çıkmıştır. 1. gün 20 μm curcumin uygulaması ile ilaç uygulanmayan MCF-7 doğal tip hücreleri kıyaslandığında 3D kltrdeki kolonilerin çapı 346 μm olmuştur. Aynı model sistem otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde incelendiğinde ilaç uygulanmayan 3D kültüründe 6 gün sonunda koloni çapı 686 μm olduğu; curcumin uygulaması ile koloni çapının 463 μm 'ye kadar arttığı gözlenmiştir. 6. gün sonunda curucumin uygulamasının MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu kltğ buna kıyasla otokrin BH anlatımı kazandırılmasıyla curcumine karşı direnç mekanizmasını aktive ettiği gösterilmiştir (şekil 4.2).



Şekil 4.2. Zamana bağlı 20 µM curcumin uygulamasının 3D boyutlu MCF-7 doğal tip ve BH + meme kanseri kültüründe etkisinin 6 gün boyunca gösterilmesi.

4.3. Curcuminin hücre ölümü üzerine etkisinin zamana bağlı MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

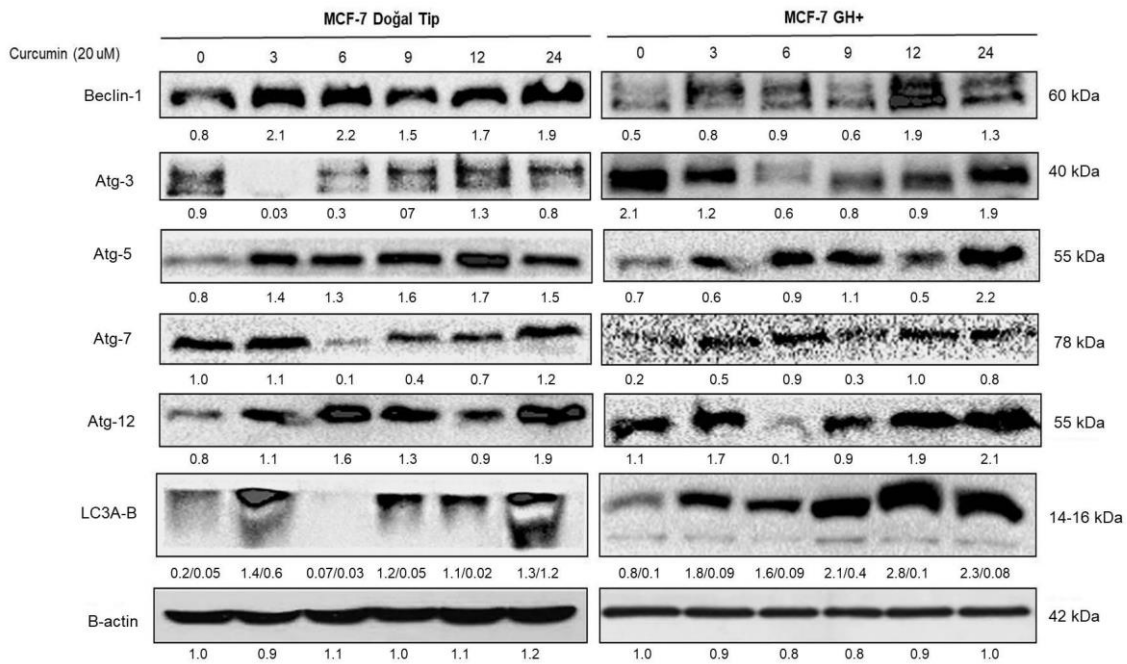
Otofajik vakuol oluşumunu görüntülemek için AO boyaması zamana bağlı curcumin uygulamasını takiben gerçekleştirilmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde otofajinin belirgin olarak 9 saatte arttığı, BH anlatımı arttırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 12 ve 24 saat sonunda en yüksek olduğu gözlenmiştir. Curcumin uygulamasının zamana bağlı olarak MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajik vakuol oluşumu ilaca karşı dirençli olduğundan dolayı geç saatte belirgin şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcuminin otofajik vakuol oluşumuna etkisinin gösterilmesi.

4.4. Zamana bağılı olarak curcumin'in otofaji sinyalinde etkisinin irdelenmesi

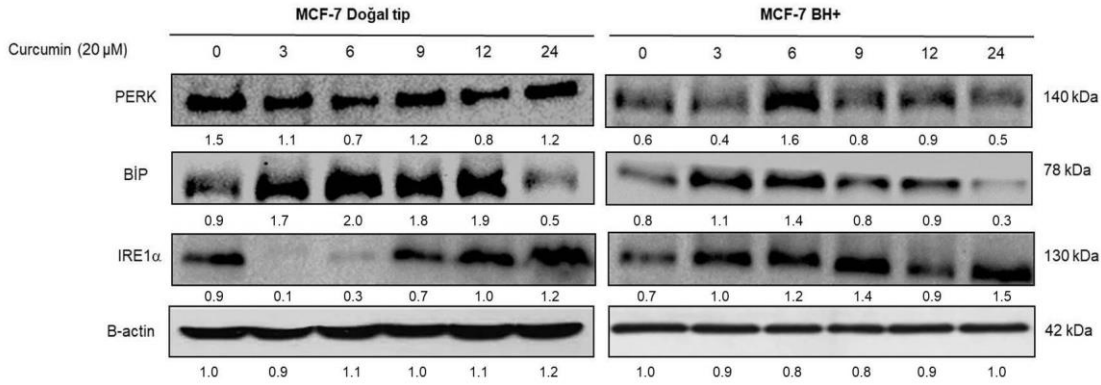
MCF-7 doğal tip ve otokrin BH+ anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde curcumin'in otofaji anahtar moleküllerinde zamana bağılı etkisi immünoiblotlama tekniğiyle gösterilmiştir. Beclin, Atg-5 ve Atg-12 gibi otofajinin temel proteinleri üzerindeki etkisine baktığımızda MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde sadece 3 saat curcumin tedavisinde belirgin bir şekilde anlatımının arttığı gözlenmiştir. BH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Beclin-1, Atg-5 ve Atg-12 moleküllerinin ekspresyonları 12 saat curcumin uygulaması sonucunda arttığı tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra diğer otofaji moleküllerinden Atg-3 ve Atg-7'nin anlatımının MCF-7 doğal tip meme kanserinde 9 saat sonunda arttığına, otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde bu saatin 12 saat olduğu gözlenmiştir. Otofajik vakuol oluşumuna katılan LC-3A-B molekülünün anlatımı MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde 3. saatte ilk cevap anlatımda artış ile gösterilirken, otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde ise bu cevabın 9 saat zaman zarfında başladığı ve 12-24 saate kadar devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Böylece curcumin'in MCF-7 doğal tip hücrelerde 3. Saatten itibaren erken cevap olarak otofajiyi indüklediği görülürken, MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin otofajik indüklemesi 9. saat kadar ötelenmiş olduğu gösterilmiştir. Buda BH sinyalinin otofajik süreci öteleyerek curcumine direnç mekanizmasını indüklediği şeklinde görülmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin zamana bağılı etkisinin otofaji anahtar moleküllerinin immünoiblotlama yöntemiyle gösterilmesi.

4.5. Zamana bağılı curcumin uygulamasının tetiklediği ER stres anahtar moleküllerin anlatım değişikliklerinin irdelenmesi

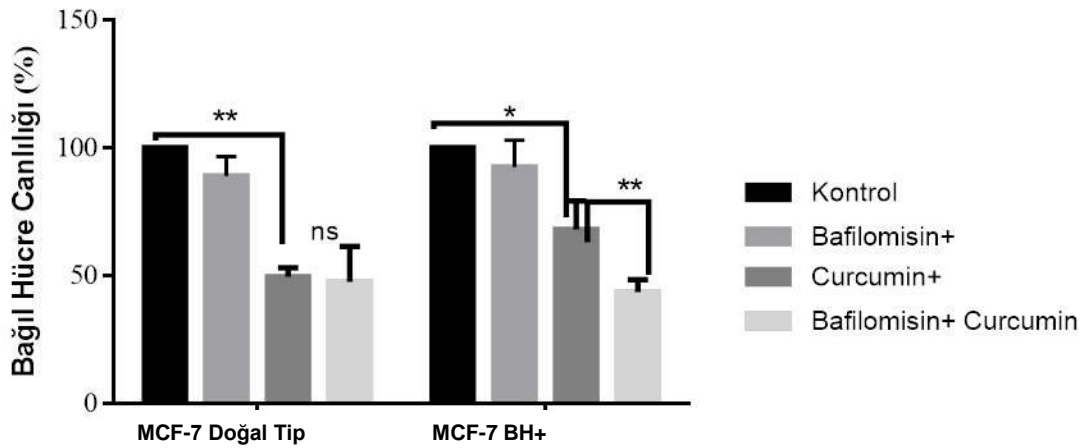
MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde ER stres yolu üzerinde curcuminin zaman bağılı anlatımındaki değişimler immunoblotlama yöntemiyle incelenmiştir. ER stres anahtar moleküllerinin ekspresyon profillerine baktığımızda PERK anlatımı, MCF-7 doğal tip hücrelerinde 9 saat curcumin uygulamasından sonra anlatımında belirgin bir artma gözlenmiş ancak BH+ meme kanseri hücrelerinde 6 saat sonrasında curcumin uygulamasının PERK anlatımını belirgin şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca BiP anlatım profili irdelendiğinde MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde 3. saatten itibaren bazal anlatıma kıyasla artış gösterdiği ama en yüksek anlatımında 6. saat sonunda olduğu fark edilmiştir. Benzer şekilde BH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde BiP anlatım profilinin 3. ve 6. saate yükseldiği görülmektedir. Ancak bu etkinin doğal tip hücrelere kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Uzun süreli curcumin uygulanmasında doğal tip MCF-7 meme kanseri hücrelerinde IRE1- α ekspresyonu tetiklenmiştir. Ancak erken IRE1- α cevabı MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde daha net gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin zamana bağılı etkisinin ER stres anahtar moleküllerinin immunoblotlama yöntemiyle gösterilmesi.

4.6. Otofaji inhibisyonu durumunda curcuminin hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile gösterilmesi

MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanser hücre hattında yalnız curcumin ve curcumin ile beraber otofaji inhibitörü bafilomisin uygulandığında hücre canlılığı üzerinde etkisi MTT tekniği kullanılarak incelenmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında 24 saat 20 µM curcumin uygulaması hücre canlılığını % 50 oranında azaltırken BH anlatımı arttırılan meme kanseri hücrelerinde % 40 hücre canlılığına ket vurduğu görülmüştür. MCF-7 doğal tip hücrelerde yalnız curcumin uygulaması hücre canlılığını %50 azaltırken bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasında hücre canlılığını %40 oranında düşürmüştür (n.s.; $p>0.05$). Otokrin BH anlatımı olan MCF-7 meme kanseri hücre hattında ilaç uygulanmayan kontrol hücrelere kıyasla sadece curcumin uygulaması hücre canlılığını %40 oranında düşürürken, bafilomisin ile birlikte curcumin uygulandığında bu oranın %53 olduğu gözlenmiştir (** $p<0.01$). MTT sonuçlarına göre curcuminin BH sinyaline bağlı otofajik düzenlenmenin geç ilaç uygulanmasına bağlı curcumin direncinin olması nedeni ile bafilomisin uygulaması ile curcuminin hücre canlılığı üzerine etkisi otofajinin baskılanması ile arttığı yönünde olduğunu göstermektedir. Ancak doğal tip hücrelerde otofajik sürecin 3. saatten itibaren başlaması ve 24. saatte otofajinin yerini apoptotik ölüme bırakma durumuna bağlı olarak otofajinin bafilomisin ile baskılanmasının curcuminin hücre canlılığı üzerine etkisini arttırmadığı yönünde sonuç vermektedir (Şekil 4.6).



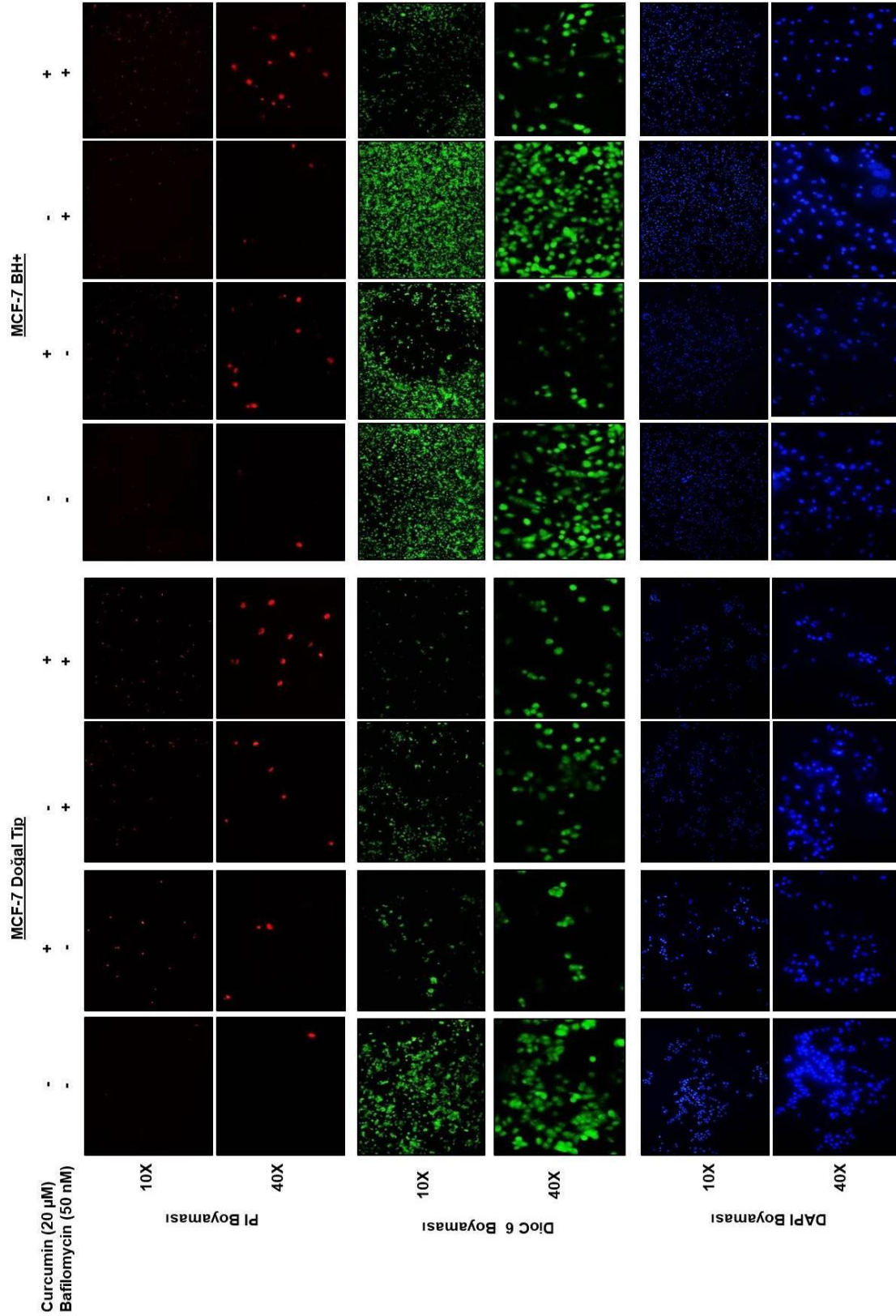
Şekil 4.6. MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılan meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisinin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$

4.7. MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofaji inhibisyonuyla Curcumin'in hücre üzerindeki etkisinin gösterilmesi

Curcumin ve bafilomisin uygulamasının MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre ölümü, mitokondriyal membran potansiyel değişikliği ve nükleer kondenzasyon üzerine etkisinin gösterilmesi PI (kırmızı), Dioc6 (yeşil) ve DAPI (mavi) floresan boyamalarıyla gösterilmiştir. PI floresan boyaması uygulanarak ölü hücreler boyanır ve görünür kılınmıştır. PI boyaması ile; MCF-7 hücre hattında curcumin uygulamasıyla hücre ölümünün arttığı bunun yanı sıra bafilomisin uygulamasının daha fazla etkili olduğu görülmektedir. MCF-7 doğal tip hücre hattında ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde hemen hemen yakın miktarda ölüm gözlenmiştir. Bafilomisin uygulamasıyla doğal tip ve BH+ hücre hattında curcumin ile birlikte sadece curcumin uygulamasına kıyasla daha fazla hücre ölümünün olduğu gözlenmiştir. Curcumin ve bafilomisin beraber uygulandığında; doğal tip meme kanseri hücre hattına kıyasla BH anlatımı arttırılmış meme kanser hücre hattında daha fazla hücre ölümü olduğu PI boyaması ile MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir.

DiOC6 floresan boyamasında, hücrelerdeki mitokondri membran potansiyeli floresan mikroskopunda gösterilmiştir. DiOC6 boyaması ile MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla mitokondri membran potansiyelinin belirgin olarak düştüğü gözlenmiştir. Curcumin ile birlikte bafilomisin uygulamasının ise MCF-7 meme kanseri hücrelerinde özellikle BH+ hücrelerinin direncinin kırıldığı ve sadece curcumine kıyasla mitokondri membran potansiyelinde düşme tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra sadece bafilomisin uygulamasında hem doğal tip hem de otokrin BH+ meme kanseri hücrelerinde mitokondri membran potansiyelinde ilaç uygulanmayan hücreler ile kıyaslandığında herhangi bir belirgin farkın olmadığı da tespit edilmiştir.

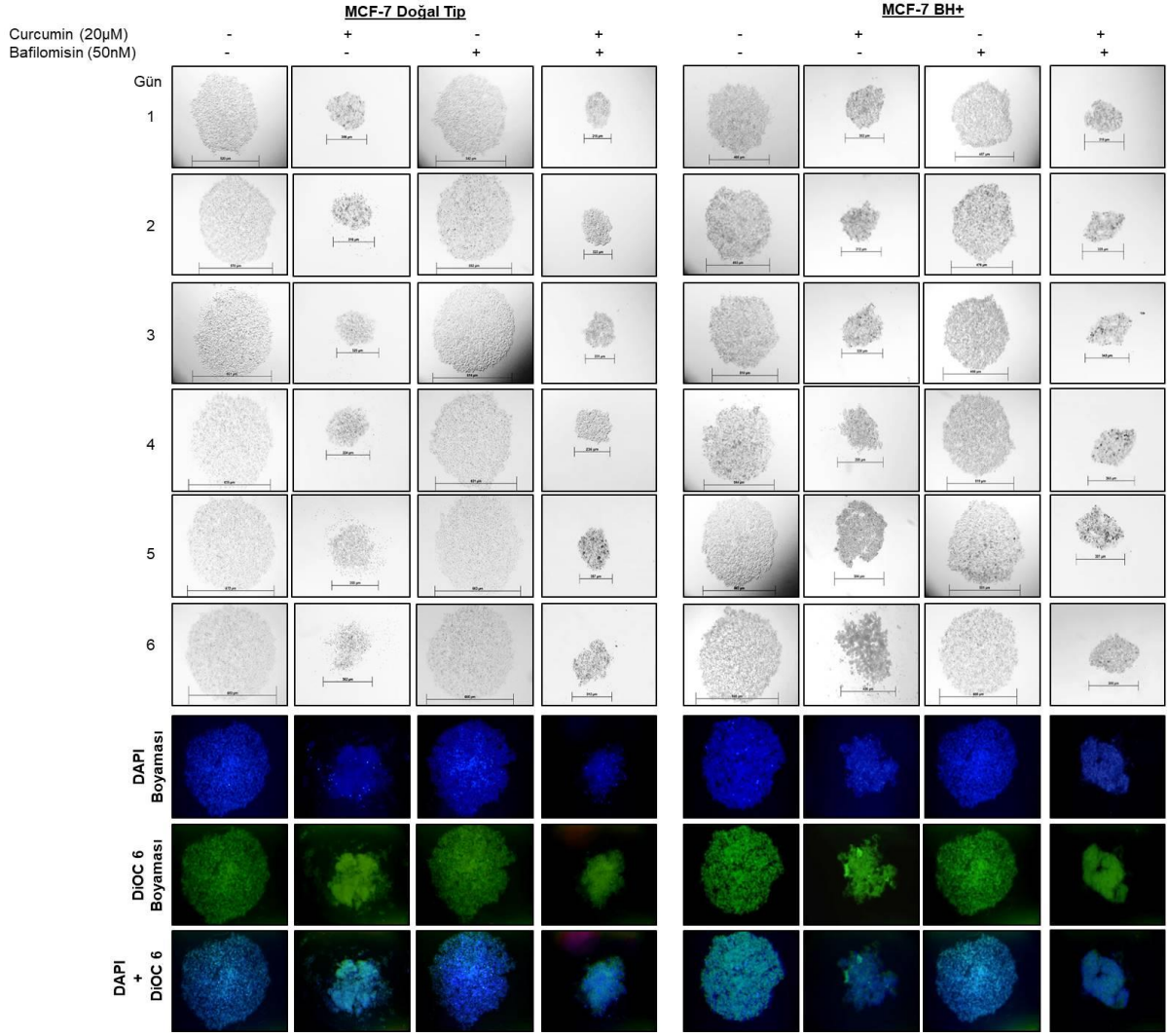
DAPI floresan boyamasında hücre ölümü ile nükleer kondenzasyon gerçekleştiren hücrelerin nükleusları parlak mavi olarak boyanmıştır. DAPI boyaması ile MCF-7 hücre hattında curcumin uygulamasıyla hücre ölümünün arttığı gözlenmiştir. Bafilomisin ile curcuminin beraber uygulanmasında sadece curcumin uygulamasına kıyasladığımızda doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde DAPI boyamasıyla hücre ölümünün arttığı gözlenmiştir. Ayrıca sadece bafilomisin uygulamasında hem doğal tip hem de BH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bafilomisin A1'in tek başına hücre ölümüne önemli bir etki etmediği de tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde bafilomisinin curcumin ile uygulanmasının hücre ölümü üzerine etkisinin DAPI, PI ve Dioc6 boyamalarıyla gösterilmesi. Büyütme: 10X ve 40X.

4.8. Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının zamana bağlı olarak etkisinin asılı damla modeli ile gösterilmesi

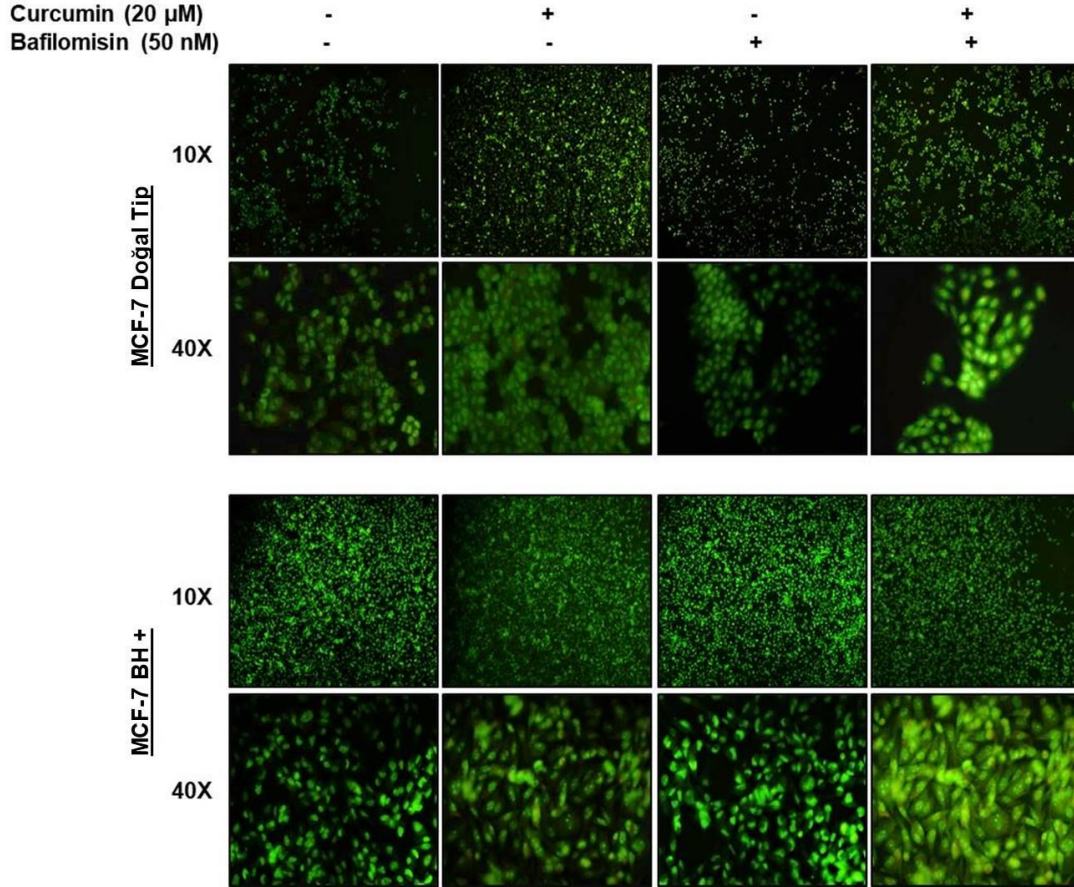
MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerinde otofaji inhibitörü bafilomisin ile curcuminin 3D hücre kültürü modellerinde koloni oluşumu üzerine etkisi gösterilmiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücresinde, 6 gün devam eden ve sadece curcumin uygulanan 3D kültüründe kolonilerin büyüklükleri 1. günden 6. güne sırayla 306 μm , 316 μm , 325 μm , 334 μm , 355 μm , 382 μm olmuştur. Sadece curcumin uygulanmış otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7 meme kanseri hücre hattının 1. günden 6. güne 3D koloni çapı sırayla 302 μm , 312 μm , 320 μm , 355 μm , 384 μm , 426 μm olarak gözlenmiştir. Curcumin ile bafilomisin uygulamasının beraber yapıldığı hem MCF-7 doğal tip hem de otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücre hattında 3D hücre kültüründe koloni çaplarının sadece curcumin uygulamasına göre daha yavaş büyüdüğü ve ölü hücrelerin artmasıyla koloni şekillerinin 1. günden 6. güne kadar irdelendiğinde bozulduğu gözlenmiştir. Burada otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücre hattına curcumin ile bafilomisin uygulaması yapıldığında 6. gün sonunda kolonilerin büyüme hızına ket vurduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu etki curcuminin ile bafilomisin'in beraber uygulanması ile curcuminin etkinliğinin özellikle BH sinyali aktif olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde daha da arttığı görölmektedir (şekil 4.8).



Şekil 4.8. 3D hücre kültürü sisteminde MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile curcumin uygulamasının zamana bağlı koloni büyümesine etkisinin gösterilmesi.

4.9. Bafilomisin ile birlikte curcumin uygulanmasında otofajik vakuol oluşumuna etkisinin gösterilmesi

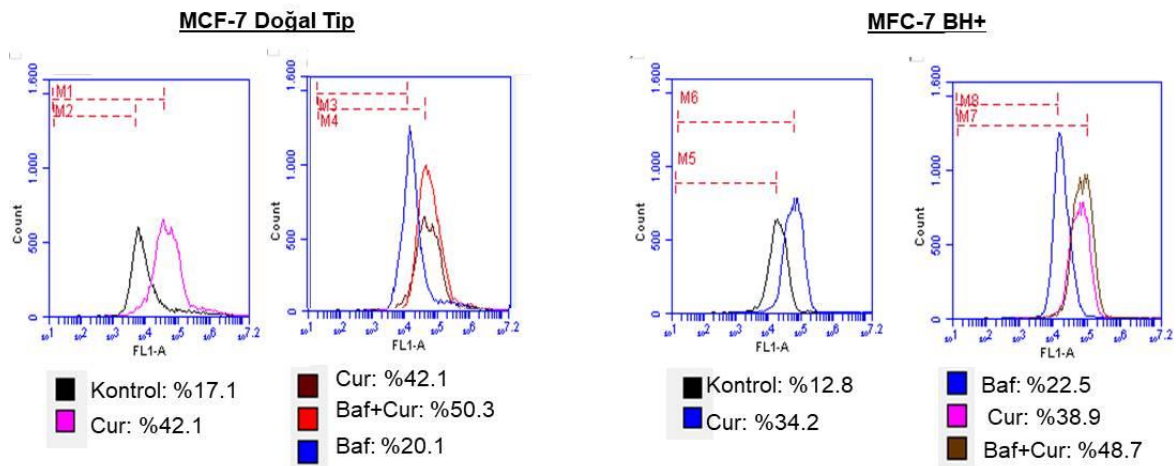
Akridin oranj boyamasına göre; curcumin uygulamasının MCF-7 doğal tip hücrelere kıyasla BH+ hücrelerde belirgin otofajik indüklemenin olduğu görülmüştür. Ayrıca bafilomisin ile beraber curcumin beraber uygulamasının doğal tip hücrelerde sadece curcumin uygulamasının otofajik süreç üzerine etkisinin olmaması neden ile BH+ hücrelerde bu etkinin belirgin olduğu görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımının arttırıldığı meme kanseri hücrelerinde otofajik vakuol oluşumunun akridin oranj boyaması ile gösterimi.

4.10. Curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin otofaji inhibitörüyle MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

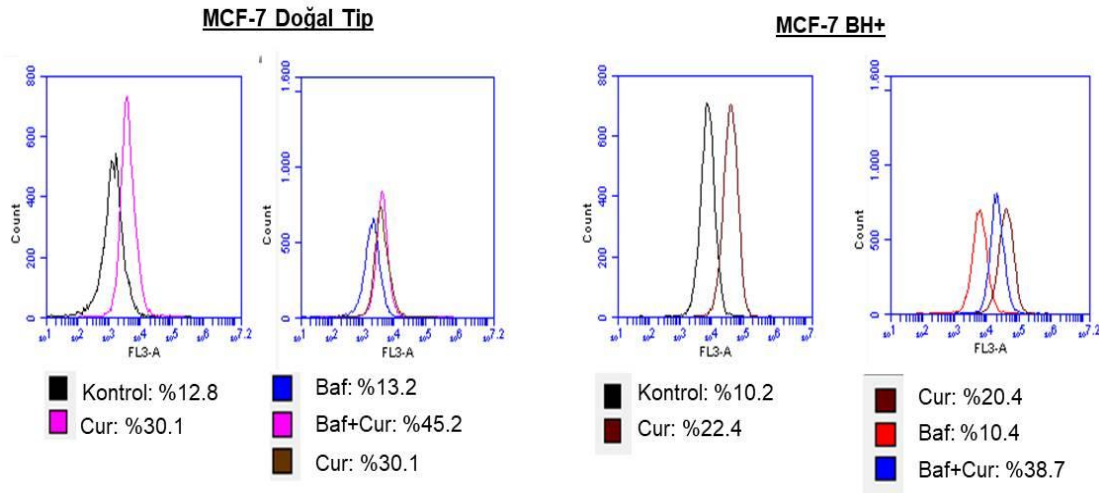
MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış olan meme kanseri hücrelerinde curcuminin ve bafilomisin otofajik vesikül oluşumu üzerine etkisi GFP-LC3 plazmit transfeksiyonu ile hücre akış sitometrisinde gösterilmiştir. Doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış MCF-7 meme kanseri hücre hattında curcumin otofajik vakuol oluşumunu indüklemiştir. MCF-7 doğal tip meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasında yaklaşık % 42.1 oranında LC-3 kırılımına bağlı GFP sinyal görülmüşken, bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasında % 50.3 oranına arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca otokrin BH anlatımı olan MCF-7 meme kanseri hücre hattında ise sadece curcumin uygulamasında % 34.2 LC-3II oluşumuna bağlı floresan ışımaya gözlenirken, bafilomisin ile curcumin beraber uygulamasında %48.7 değerinde olduğu görülmüştür. Curcuminin otokrin BH anlatımı arttırılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde otofajik vakuol oluşumu ile ilişkili LC-3II kırılımını ifade eden bafilomisin ile birlikte uygulandığında daha fazla olduğu ve curcuminin daha etkin olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. MCF-7 doğal tip ve GH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde curcuminin bafilomisin ile uygulandığında otofajik vakuol oluşumuna etkisinin gösterilmesi.

4.11. Curcumin'in ER strese bağılı CHOP aktivasyonunun plazmit aracılı MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

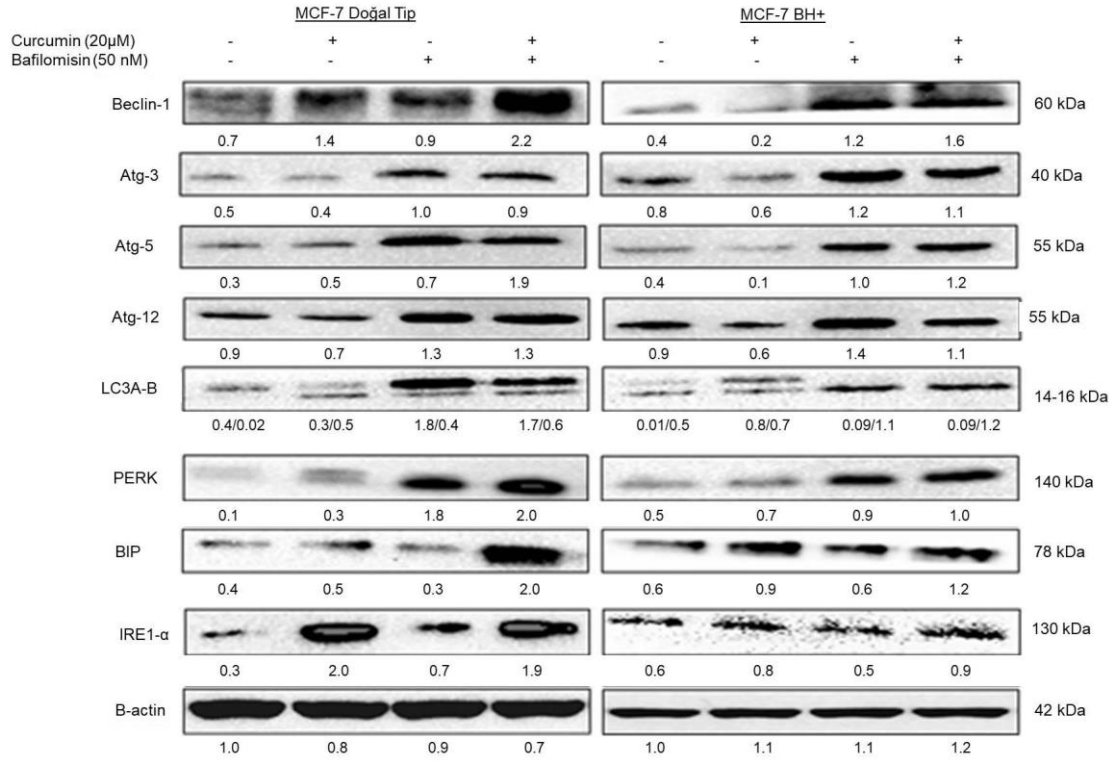
MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin (20 μ M) ER strese bağılı CHOP aktivasyonu, CHOP bağlanma promotör bölgesi bulunan plazmit aracılı transfeksiyonu takiben hücre akış sitometrisi analizi ile irdelenmiştir. MCF-7 doğal tip ile BH+ meme kanseri hücre hatlarında CHOP aktivasyonu MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde sadece curcumin uygulaması ile % 30.1, otofaji inhibitörü bafilomisin A1 ile ön muamele gördüğünde % 45.2'e CHOP aktivasyonun olduğu görülmüştür. MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde sadece curcumin uygulamasında CHOP aktivasyonu % 22.4, bafilomisin A1 ve curcuminin birlikte uygulanması sonucu CHOP aktivasyonu % 38.7 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11). Curcuminin BH sinyaline bağılı ilaç direnç mekanizmasının moleküler mekanizmasında GFP-LCII gibi CHOP aktivasyonuna bağılı otofaji-ER stres üzerindeki etkisi MCF-7 hücrelerinde plazmit aracılı gösterilmesinin yanında zamana bağılı curcuminin bu etkisinin bafilomisin ile otolizozom inhibe edildiğinde hem otofajik hem de ER stres üzerinde aktivasyonuna neden olduğunu ifade etmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı artırılmış meme kanseri hücre hattında ER strese bağılı CHOP aktivasyonunun plazmit aracılı hücre akış sitometresinde gösterilmesi.

4.12. Bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde otofaji ve ER stres molekülleri üzerindeki etkisinin irdelenmesi

MCF-7 doğal tip meme kanseri BH anlatımı olan meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisinin otofaji ve ER stres anahtar molekülleri üzerindeki etkisi immünoyotlama tekniğine gösterilmiştir. Beclin, Atg-3, Atg-5, Atg-12 ve LC3A/B gibi otofajinin temel proteinleri üzerindeki etkisine baktığımızda MCF-7 doğal tip meme kanseri hücrelerinde sadece curcumin tedavisinde belirgin bir şekilde anlatımının arttığı gözlenmiştir. Fakat bu anlatımın bafilomisin ve curcuminin beraber uygulanmasında daha fazla olduğu gösterilmiştir. BH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Beclin-1, Atg-3, Atg-5, Atg-12 ve LC3A/B moleküllerinin anlatım profilleri sadece curcumin uygulamasının yanı sıra curcumin ve bafilomisinin beraber uygulanması sonucunda otofaji moleküllerinin anlatımının daha fazla arttığı bununda curcuminin etkinliğinin arttıp, BH+ meme kanseri hücrelerinin direncine ket vurulduğu gösterilmiştir. MCF-7 doğal tip ve otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücrelerinde ER stres anahtar moleküllerinin ekspresyon profillerine baktığımızda PERK anlatımı, MCF-7 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde sadece curcumin uygulamasıyla bafilomisinin beraber uygulanmasını karşılaştırdığımızda, PERK, BiP ve IRE1- α moleküllerinin anlatımı bafilomisin ve curcuminin beraber uygulanmasında belirgin şekilde arttığını gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MCF-7 doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin'in otofaji veER stres anahtar molekülleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık görülen ikinci kanser tipi olup, kansere bağlı ölümün beşinci sebeplerindendir. Meme kanseri etiyojisinin yapılan araştırmalara göre meme kanseri gelişiminde genetik ve çevresel olmak üzere birçok faktöre bağlı olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda gelişiminde genetik faktörler olarak BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar önem teşkil etmektedir. Bu genlerde olan mutasyonların % 80 ile % 85 arasında kadınlarda oluşan meme kanserinin sebebi olduğu gözlenmiştir [125]. Ayrıca meme kanserinin %10'unun otozomal dominant kalıtıma bağlı BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyon kaynaklı olduğu gözlenmiştir [126], [127]. Meme kanseri genetik faktörlerin yanı sıra menapoz, emzirme, elektromanyetik alan, ailede kanser öyküsü, yaşam tarzı gibi bir çok etkene de bağlı olarak belirlenmiştir [128]. Meme kanserinin terapötik etkilerinin araştırılmasında meme kanseri patogeneğinde östrojen, progesteron gibi hormonların rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca ER ve PR gibi anlatım profillerine göre sınıflandırılan meme kanserinin terapötik etkinlik üzerinde rolünün önemi bilinmektedir [160].

Yakın zamandaki meme kanseri etiyojisi üzerinde etkisi ortaya konmaya çalışılan büyüme faktörleri ve hormonların *in vitro* ve *in vivo* meme kanseri modellerindeki çalışmalar, agresif meme kanseri profili ile ilaç direnç mekanizması üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kapsamda, pubertal meme gelişimi üzerinde rolü olan PRL ve GH'nin meme kanseri *in vitro* ve *in vivo* modellerde invazyon, metastazı indüklediği ve ilaca direnç mekanizmasına neden olduğu gösterilmiştir [161]. Ön hipofiz bezinden salgılanan ve meme gelişiminde önemli bir hormon olan PRL'nin etkisinin incelendiği çalışmalar sonucunda onkogen olan c-myc'in STAT5 molekülü üzerinde koaktivatör olarak görev aldığı gözlenmiştir [154, 155]. PRL ve STAT5 yolağının etkisiyle ilgili yapılan başka bir araştırmada prolaktinin ilk başlama evresinde etkili olduğu fakat meme kanserinin ilerlemesinde fazla etkisi olmadığı gözlenmiştir. PRL-STAT5 yolağında, prolaktin hücre döngüsünün inhibisyonunda BRCA1'in tümör baskılayıcı etkisine engel olduğunu gözlemlemişlerdir. Bunların yanı sıra PRL ile VEGF'nin indüklenebildiği ve JAK2 ve MAP kinaz ile ilişkili olarak bu olayların gerçekleştiği bulunmuştur [156,157].

Benzer şekilde meme gelişiminde rolü olduğu ifade edilen, PRL ile yüksek homoloji gösteren, hipofiz bezinin ön lobundan salınan BH'nin büyümeyi teşvik ettiği gösterilmiştir [162]. BH'nin kendine özgü olan BHR membran reseptörü aracılı JAK/STAT sinyalini indükleyerek hücre proliferasyon, farklılaşma gibi pek çok hücresel olayı düzenlemektedir [129]. BH'nin salınması için öncelikle BHRH salınır, BHRH salındıktan sonra BH anlatımı ve salınımı hücrede artarken, BH salınımını inhibe eden SST hormonunda kandaki BH salınımını

kontrol ederek dengede tutmaktadır [130]. Hücrede salınan BH dolaşım sistemiyle birlikte karaciğerdeki IGF-1 salınımını da tetiklemektedir. Meme bezi ve epitel hücrelerinin farklılaşım gelişmesinde rol alır. Yapılan araştırmalarda yüksek düzeyde BH salınımı ile ilişkili olan akromegali hastalarında meme kanserine yakalanma riskinin fazla olduğu tespit edilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde de BH salınımının olduğu gözlenmiştir [131]. Yapılan araştırmalarda BH anlatımı kazandırılmış MCF-10A meme kanseri hücrelerinde metastaz ve invazyonun indüklendiği ve BH seviyesinin arttığı gözlenmiştir [132]. Büyüme hormonuyla ilgili yapılan araştırmalarda, büyüme hormonunun anlatımının meme kanseri hücrelerinde arttığı aynı zamanda EMT'yi uyardığı, invazyon ve metastazı tetiklediği bunların yanı sıra insan meme kanserinde JAK2 bağımlı olan büyümeyi tetiklediği gözlenmiştir [158, 159]. Bunun yanı sıra otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7, MCF-10A meme kanseri hücrelerinde Bcl-2, siklin-D1 ve c-myc anlatımlarını arttırarak proliferasyon, metastaz ve invazyonun indüklenmesi fare modellemelerinde gösterilmiştir [133]. Ayrıca otokrin BH anlatımın kazandırıldığı meme kanseri hücrelerinde doksorubusin [134], tamoksifen [135] ve mitocymine c [136] gibi bazı kemoteropatik ajanlara karşı dirençli olduğu *in vitro* hücre hatlarında gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında laboratuvarımızda otokrin BH anlatımı stabil olarak gerçekleştirilen MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde yaratılmış ve anti-hormonal etkisi bilinen doğal bir ajan olan curcumin'in terapötik etkinliği irdelenmiştir [163-164]. Ayrıca, laboratuvarımızda gerçekleştirilen hormona bağlı ilaç direnç mekanizması yaratılmış MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 gibi meme kanseri hücrelerinde (farklı ER, PR anlatım profiline sahip) invazyon, metastaz, proliferasyon ve koloni oluşumunun indüklendiği, arttırılmış BH sinyalinin bu meme kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı curcumin uygulaması ile ilaç direnç mekanizmasının NF- κ B sinyali başta olmak üzere etki ederek kırıldığı gösterilmiştir [163-164]. Bu öncül verilerden yola çıkarak curcumin'nin etki ettiği moleküler hedefler dışında kanser hücrelerinde genelde hücre sel sağ kalım olarak ifade edilen otofajinin indüklediği meme, prostat, kolon kanserinde gösterilmiştir [165]. Ancak literatürde bu zamana kadar otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri modellerinde curcuminin ilaç direnç mekanizmasının doza ve zamana bağlı kırıldığını gösteren laboratuvarımızdan çıkan yayınlar dışında herhangi bir çalışmaya rastlanmaması söz konusudur. Ayrıca curcuminin ER stres, otofajik düzenlenme üzerinde kanser hücrelerinde etkisi belirlenmiş olsa da otokrin BH sinyalinin aktif olduğu meme kanseri hücrelerinde curcumin'in apoptotik etkisinin doğal tip hücrelere kıyasla az olmasının otofajik süreç ile ilişkisi bildirilmemiştir. Bu bilgiler ışığında bu tez ile amacımız BH sinyaline bağlı agresif profilin ve curcumine direnç mekanizmasının zamana bağlı hücre canlılığı ve otofaji üzerine etkisinin gösterilmesi şeklinde olmuştur. Bu amaç doğrultusunda tez

kapsamında gerçekleştirilen zamana bağlı immunoblotlama sonuçlarına göre curcumin 3. saat zaman zarfında otofajik süreci Beclin-1, Atg-5, Atg-12 gibi otofaji anahtar molekülleri üzerinden gerçekleştirdiği doğal tip MCF-7 hücrelerinde gösterilmiştir. Ayrıca bu etkinin en fazla anlatım üzerinde etkisi 6. saate daha belirgin olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca benzer sonuçlar literatürde pekçok kanser hücresinde akciğer, prostat, meme ve kolon kanserinde tespit edilmiştir [166]. Ancak bu tez ile ilk defa curcuminin otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Beclin-1, Atg-5, Atg-12 gibi otofaji anahtar molekülleri üzerinde anlatımı indüklemeye potansiyelinin 9. saatten sonra gerçekleştiği ve 12. saate belirgin olduğu gösterilmiştir. Böylece tez kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar ışığında curcuminin otofajik etkisinin otokrin BH sinyali ile agresif meme kanseri modeli yaratılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doğal tip hücrelere kıyasla daha ileri saatlere ötelendiği ilk defa gösterilmiştir. Benzer şekilde LC-3II anlatım profilinin BH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 12. - 24. saatlerde belirgin anlatımının arttığı tespit edilmesi yanında GFP-LC3II kırılımının hücre akış sitometresi ile doğal tipe kıyasla daha belirgin artış gösterdiği de ilk defa ortaya konulan bir sonuçtur.

Otofaji hücrenin kendi komponentlerini lizozomal aktivasyon ile degrade ettiği hücrel bir ölüm çeşidi olarak tanımlanmıştır [144]. Son zamanlarda fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda otofaji hücrenin ölümü veya sağ kalım, açlık koşullarına adaptasyonu, gelişme ve mikroorganizma eliminasyonu gibi farklı işlevsel etkileri olduğu gösterilmiştir [114], [145]. Katlanmamış proteinler veya hasarlı organeller otofaji ilişkili genler (Atg) ve otofajinin anahtar molekülü olan Beclin-1'in anlatımlarının artmasıyla sitoplazmik membran tarafından yutularak otofajik yolak aktifleştiği bilinmektedir. Otofajinin kanser hücrelerinde ilaca direnç mekanizmasında bir savunma mekanizması olarak hücre sağkalımı üzerinden hayatta kalma tercihi olarak ifade edildiği için çeşitli otofagozom (3-MA, LY294002) ve otolizozom (bafilomisin) inhibitörleri ile otofajinin baskılandığı durumda hücre ölümünün arttığı ifade edilmiştir [146], [147]. Bu bilgiler ışığında bu çalışma ile elde edilen veriler sayesinde otokrin BH anlatımı arttırılmış MCF-7 meme kanseri hücre hattında zamana bağlı curcumin uygulamasının otofajik hücre ölümü yolağını doğal tip meme kanseri hücrelerine kıyasla ötelediği için curcumine direnç mekanizmasının olduğu ifade edilir.

Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen, anti-enflamatuar, anti-tümörjenik, anti-septik ve anti-oksidan özellikleri nedeniyle alternatif tıpta da kullanılmaktadır [137]. Meme, kolon, karaciğer ve akciğer gibi kanserlerde karsinogenezinin baskılandığı gözlenmiştir [138]. Anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-karsinojenik özellikte olan curcumin bazı kanserlerde hücre döngüsünü kontrol etmektedir [139]. Ayrıca aktif olan STAT3'ü inhibe ederek hücrenin

büyümesini engeller ve kaspaza bağlı olan apoptozu tetikler [140]. *In vitro* ve *in vivo* curcumin çalışmalarında prostat, meme, melanoma gibi kanserlerde hücre lümünü tetiklediği ve NF-κB inhibitörü olduğu gözlenmiştir [141] [142]. Curcumin pre-klinik kanser çalışmalarında güçlü bir anti kanser etkisi göstermektedir ve umut verici bir teröpatik ajandır. *In vitro* deney sonuçlarının devamı olarak gerçekleştirilen faz denemelerinde curcumin uygulamasının günlük 8000 mg olsa bile toksik olmadığı ve anti-karsinojenik etkisinin olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir [142], [143]. Fakat insanlar üzerinde faz I/II denemeleri bazı stabilite çalışmalarından kaynaklı kesin yeterli bir bilgi vermemektedir. Bu yüzden kemoteröpatik ilaçlar ile birlikte kullanılması NF-κB gibi kanserojen moleküller üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı tercih edilmektedir [143]. Bu çalışma ile bir diğer amacımız zamana bağlı curcumin uygulamasının otöfajik markırların anlatımı üzerinde farklı etki göstermesinin irdelenmesi yanında otolizozom inhibitörü olan bafilomisin A1 ile kombine etkisinin hücre sağkalım ve ölüm üzerine etkisinin BH anlatımı arttırılmış MCF-7 meme kanseri hücrelerinde modellenmesidir.

Bafilomisin A1 vakul tip H⁺ ATPaz'a (V-ATPaz) seçici olarak inbibe eder ve bu enzimi içeren organellerin asitlenmesini önleyen bir makrolid antibiyotik olup, lizozomlar, asidifikasyon bozulması ve otolizozomlar arasındaki füzyonu inbibe ederek, otöfajik vesikül olgunlaşmasını önlediği gösterilmiştir [146]. Yapılan çalışmalarda bafilomsin gibi lizozomal inhibitörlerin kullanılması otolizozom oluşumunu otöfagozomal içeriğin degradasyonunun bloke edilmesiyle otöfajinin inbibe ettiği gösterilmiştir [146]. Kanser terapi araştırmalarında bafilomisin tedavisinin hipoksik koşullarda bir tümör modelinde apoptozu arttırabileceği gözlenmiştir [147]. Bu tez ile literatürde ilk defa bafilomisin ile curcumin beraber uygulamasında otokrin BH sinyali arttırılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi gösterilmiştir. MTT hücre canlılık testine göre 24 saat zaman zarfında otolizozom oluşumu baskılanan otokrin BH anlatımı artmış MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki curcumin uygulamasının sadece curcumin uygulamasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede hücre canlılığına ket vurduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde otokrin BH sinyaline bağlı curcumin direncinin bafilomisin ve curcuminin birlikte uygulanmasıyla koloni oluşumu, hücre canlılığına ket vurma profili ilk defa bu tez kapsamında tespit edilmiştir.

Otöfajinin yanı sıra, endoplazmik retikulum (ER) stresi de kanser hücrelerinde ilaca bağlı hücre ölümünde önemli role sahip olduğu literatürde pek çok çalışma ile ifade edilmiştir. Endoplazmik retikulum hücre içinde katlanma, olgunlaşma, translokasyon ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi fonksiyonel protein düzenlenmesinden sorumlu önemli bir organeldir [148]. ER homeostazı GRP78/BIP, PERK, IRE-1α ve ATF-6 moleküllerin ER

reseptörleriyle ilişkisine bağlıdır. Katlanmamış protein birikmesi veya ilaca maruz kalma sonucunda reseptörlerden salınan GRP78/BIP katlanmamış proteinlerin yanıtını aktive etmektedir. PERK, ER lümeninde yeni sentezlenmiş proteinlerin birikmesini önleyen eIF2 α 'yı fosforile ederek transkripsiyonu düzenler. Başka bir ER membran reseptörü olan IRE1 α , XBP1 mRNA'ya ve stresi düzenleyen proteinlere bağlanarak bazı pro-apoptotik proteinlerin anlatımlarının artmasına neden olabilir [149], [150]. Yapılan bazı araştırmalarda farklı kanser tedavilerinde, tümör hücrelerinde otofajiyi aktive ettiği gözlenmiştir. Bu da kanser hücrelerinin ölümünü hızlandırmasıyla ya da kemoterapötik direnç oluşturduğunu göstermiştir [148], [151]. ER tarafından başlatılan hücre ölümleri terapatik açıdan son dönemlerde önem kazanmıştır. Farelerde yapılan çalışmalarda CHOP aktivasyonunu inhibe ederek ER stres sensörlerini kapatıldığında hücre ölümüne karşı duyarlılıkları azaltıldığı gösterilmiştir [151]. Ökaryotik hücrelerde proteinlerin çoğu ribozomlar üzerinde ya da ER'ye bağlı olan ribozomlar üzerinden sentezlenmektedir. Yanlış katlanan sitozolik ve nükleer proteinler ubiquitin ile etkileşir ve proteozom yoluyla bozulmaktadır [152]. Yanlış katlanan proteinlerin ER'de birikmesiyle katlanmayan protein tepkisi oluşur bu durumda katlanma katalizörleri olarak işlev gören şaperonlar gibi görev yaparlar. Yapılan bazı çalışmalarda otofaji ve ER fonksiyonu arasında bir bağlantılı olduğu ve ilaç direnç mekanizmasında irdelenmesi gereken bir süreç olduğu ifade edilmiştir [153]. Bu tez kapsamında otokrin BH sinyali kaynaklı curcumine karşı direnç mekanizmasında otofaji yanında ER stres anahtar moleküllerindeki anlatım değişimlerini, curcuminin zamana bağlı uygulanması ile değiştiği ilk defa gösterilmiştir. BiP gibi major ER stres elemanı olarak ifade edilen protein anlatımının hem doğal tip hem de BH+ MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 3. saatten sonra belirgin arttığı ve bu etkinin 6. saatte daha belirgin görüldüğü tespit edilmiştir. Ancak doğal tip hücrelerinde curcumine karşı BiP anlatımının BH+ hücrelerinde daha düşük olarak etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. ER membran yüzeyinde bulunan reseptör özellikli PERK'in [151] anlatım profili irdelendiğinde 6. saate belirgin curcumine bağlı indüklemenin görüldüğü tespit edilmiştir. Özellikle ER stres ile otofaji arasında konuşmada rol alan IRE1 alfanın anlatım profilinin BH+ MCF-7 hücrelerinde erken curcumin (3. saat) uygulaması ile başlayan indüklemenin geç saatlere kadar (9. saat) devam ettiği görülerek curcumin kaynaklı otofajik indüklemenin otokrin BH sinyali olan meme kanseri hücrelerinde ER stres üzerinden otofajik indükleme ile ilaç direncine neden olduğu ilk defa bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

Otokrin BH sinyalinin invazyon ve metastazı indüklemesi otokrin BH anlatımı kazandırılan MCF-10A meme epitel hücrelerinde gösterilmiştir [132]. Bunun yanı sıra otokrin BH anlatımı kazandırılmış MCF-7, MCF-10A meme kanseri hücrelerinde Bcl-2, siklin-D1 ve c-myc

anlatımlarını arttırarak proliferasyon, metastaz ve invazyonun indüklenmesi fare modellemelerinde gösterilmiştir [133]. Ayrıca otokrin BH anlatımın kazandırıldığı meme kanseri hücrelerinde doksorubusin [134], tamoksifen [135] ve mitocymine c [136], curcumin [164, 165] gibi bazı kemoteropatik ajanlara karşı dirençli olduğu *in vitro* hücre hatlarında gösterilmiştir. Laboratuvarımızda içinde bulunduğu literatürdeki bu bilgiler ışığında otokrin BH sinyali kaynaklı ilaç direnç mekanizması (curcumine karşı) altında yatan moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik olarak ilk defa bu tez çalışması ile otofajik düzenlenmenin aktif BH sinyali olan MCF-7 hücrelerinde doğal tipe kıyasla apoptotik ölümün öncesinde ilaç direnç mekanizması olarak ortaya çıktığı ve ER stres ile IRE-1 alfa ve BiP gibi anahtar moleküller üzerinde konuşma potansiyelinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca otolizozom inhibitörü olan bafilomisin ile otofajinin inhibe edildiği durumda curcumin uygulamasının özellikle MCF-7 BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığına ket vurarak, apoptotik süreci arttırdığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak otokrin BH anlatımı arttırılmış olan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde curcumin direncinin zamana bağlı olarak hücre canlılığı ve hücre büyümesi üzerine ket vurucu etkisi yanında otofajik ve ER stres mekanizmalarını da anahtar molekülleri aktive ederek etki gösterilmiştir. Bu tez curcuminin terapötik etkinliğini arttırma yönünde bafilomisin A1 gibi inhibitörleri ile beraber etkinliğini arttırma yönünde yapılacak *in vivo* ve/veya prelinik çalışmalara yön verme niteliğindedir.

KAYNAKÇA

- [1] Y. S. Sun *et al.*, “Risk factors and preventions of breast cancer,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, no. 11, pp. 1387–1397, 2017.
- [2] A. Özsoy *et al.*, “The Relationship Between Breast Cancer and Risk Factors : A Single-Center Study,” no. November 2013, pp. 145–149, 2017.
- [3] R. Subramani, S. B. Nandy, D. A. Pedroza, and R. Lakshmanaswamy, “Role of growth hormone in breast cancer,” *Endocrinology*, vol. 158, no. 6, pp. 1543–1555, 2017.
- [4] M. J. Waters and B. L. Conway-campbell, “The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 42, pp. 14992–14993, 2004.
- [5] B. Aggarwal, A. Kumar, and A. C. Bharti, “Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies,” *Anticancer Res.*, no. November, pp. 363–398, 2003.
- [6] S. P. Verma, B. R. Goldin, and P. S. Lin, “The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides and Environmental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids,” vol. 106, no. 12, 1998.
- [7] R. Wilken, M. S. Veena, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, “Curcumin : A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma,” *Mol. Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 12, 2011.
- [8] N. Mizushima, T. Yoshimori, and B. Levine, “Methods in Mammalian Autophagy Research,” *Cell*, vol. 140, no. 3, pp. 313–326, 2010.
- [9] J. J. Lum *et al.*, “Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis,” *Cell*, vol. 120, no. 2, pp. 237–248, 2005.
- [10] S. Pelengaris and M. Khan, *The molecular biology of cancer*, Blackwell, 2006 .
- [11] B. Alberts *et al.*, *Molecular biology of the cell*, Sixth. Garland Science, 2015.
- [12] H. Lodish *et al.*, *Molecular Cell Biology*, Fifth. W. H. Freeman, 2003.
- [13] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [14] International Academy of Pathology (IAP), *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press, 2003.
- [15] C. M. Perou, “Systems Biology and Genomics of Breast Cancer,” pp. 1–17, 2011.
- [16] [Http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp](http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp), “No Title.” .

- [17] B. O. Anderson and R. Jakesz, “Breast Cancer Issues in Developing Countries: An Overview of the Breast Health Global Initiative,” *World J. Surg.*, vol. 32, no. 12, pp. 2578–2585, 2008.
- [18] L. V. C. Levi F , Lucchini F, “Worldwide patterns of cancer mortality,” *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 3, no. 2, pp. 109–143, 1994.
- [19] K. Polyak, “Breast cancer : origins and evolution Find the latest version : Science in medicine Breast cancer : origins and evolution,” vol. 117, no. 11, pp. 3155–3163, 2007.
- [20] M. Arock, “The increasing roles of epigenetics in breast cancer : Implications for pathogenicity , biomarkers , prevention and treatment,” vol. 2794, pp. 2785–2794, 2015.
- [21] A. L. C. Approach, “Breast Cancer and the Environment.”
- [22] C. Deng, “BRCA1 : cell cycle checkpoint , genetic instability , DNA damage response and cancer evolution,” vol. 34, no. 5, pp. 1416–1426, 2006.
- [23] L. Wang and L. Di, “BRCA1 And Estrogen / Estrogen Receptor In Breast Cancer : Where They BRCA1 And Estrogen / Estrogen Receptor In Breast Cancer : Where They Interact ?,” no. May, 2014.
- [24] V. K. A. A. N. F. J. Aster, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition*, 8th ed. Saunders, 2009.
- [25] Y. Hu, “BRCA1 , Hormone , and Tissue-Specific Tumor Suppression,” vol. 5, no. 1, pp. 20–27, 2009.
- [26] S. M. Tan-wong, J. D. French, N. J. Proudfoot, and M. A. Brown, “Dynamic interactions between the promoter and terminator regions of the mammalian BRCA1 gene,” 2008.
- [27] D. Campisi, Y. Lu, G. C. Stachelek, M. E. Crosby, R. S. Bindra, and P. M. Glazer, “regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130,” vol. 107, no. 5, pp. 2201–2206, 2010.
- [28] O. F. Bane AL, Beck JC, Bleiweiss I, Buys SS, Catalano E, Daly MB, Giles G, Godwin AK, Hibshoosh H, Hopper JL, John EM, Layfield L, Longacre T, Miron A, Senie R, Southey MC, West DW, Whittemore AS, Wu H, Andrulis IL, “BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays.,” *Am J Surg Pathol.*, vol. 31, no. 1, pp. 121–8, 2007.
- [29] F. Cardoso, C. Sessa, J. Balmana, M. J. Cardoso, F. Gilbert, and E. Senkus, “clinical practice guidelines Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast / ovarian hereditary cancer syndromes : ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention clinical practice guidelines,” vol. 27, no. Supplement 5, 2016.

- [30] "<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRCA1#location>."
- [31] W. R. Shih C, Padhy LC, Murray M, "Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts.," *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 290(5803):261-4., 1981.
- [32] N. Harbeck and M. Gnant, "Breast cancer," *Lancet*, vol. 389, no. 10074, pp. 1134–1150, 2016.
- [33] N. M. Davis *et al.*, "Deregulation of the EGFR / PI3K / PTEN / Akt / mTORC1 pathway in breast cancer : possibilities for therapeutic intervention," vol. 5, no. 13.
- [34] A. Bennisroune, "Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion," vol. 6, no. November, pp. 1–10, 2015.
- [35] R. Ali and M. K. Wendt, "The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 2, no. December 2016, pp. 1–7, 2017.
- [36] I. O. Alanazi and Z. Khan, "MINI-REVIEW Understanding EGFR Signaling in Breast Cancer and Breast Cancer Stem Cells : Overexpression and Therapeutic Implications," vol. 17, 2016.
- [37] Y. Pylyayeva-gupta, E. Grabocka, and D. Bar-sagi, "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 11, no. 11, pp. 761–774, 2011.
- [38] L. L. S. Van Reesema *et al.*, "HHS Public Access," pp. 18–23, 2017.
- [39] A. Fernández-medarde and E. Santos, "Ras in Cancer and Developmental Diseases," pp. 344–358, 2011.
- [40] A. Ray and B. K. Ray, "Induction of Ras by SAF-1/MAZ through a feed-forward loop promotes angiogenesis in breast cancer", vol. 4, no. 2, pp. 224-234, *Cancer Medicine*, 2014.
- [41] A. R. Green *et al.*, "MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours," vol. 114, no. 8, pp. 917–928, 2016.
- [42] C. J. Poole and J. Van Riggelen, "MYC—Master Regulator of the Cancer Epigenome and Transcriptome," 2017.
- [43] M. Jung *et al.*, "A Myc Activity Signature Predicts Poor Clinical Outcomes in Myc-Associated Cancers," pp. 17–19, 2017.
- [44] A. Soroush, N. Farshchian, S. Komasi, N. Izadi, N. Amirifard, and A. Shahmohammadi, "The Role of Oral Contraceptive Pills on Increased Risk of Breast Cancer in Iranian Populations ;," vol. 21, no. 4, pp. 294–301, 2016.
- [45] T. N. Bethea *et al.*, "A case – control analysis of oral contraceptive use and breast

- cancer subtypes in the African American Breast Cancer Epidemiology and Risk Consortium,” 2015.
- [46] S. A. Narod, “Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 8, pp. 669–676, 2011.
- [47] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer Statistics , 2017,” vol. 67, no. 1, pp. 7–30, 2017.
- [48] H. R. Brewer, M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth, and A. J. Swerdlow, “Family history and risk of breast cancer : an analysis accounting for family structure,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 165, no. 1, pp. 193–200, 2017.
- [49] M. B. Sporn, “Approaches to Prevention of Epithelial Cancer during the Preneoplastic Period ’,” no. July, pp. 2699–2702, 1976.
- [50] J. A. Knight *et al.*, “Alcohol consumption and cigarette smoking in combination : A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study,” vol. 924, pp. 916–924, 2017.
- [51] C. Catsburg, A. B. Miller, and T. E. Rohan, “Active cigarette smoking and risk of breast cancer,” vol. 2209, pp. 2204–2209, 2015.
- [52] M. W. Report, “Cancer Screening — United States , 2010,” vol. 61, no. 3, pp. 2009–2010, 2012.
- [53] I. U. P. on B. C. Screening, “The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review,” *Lancet*, vol. 380, no. 9855, pp. 1778–1786, 2012.
- [54] I. Bozovic and P. Dinh, “Chemoprevention of breast cancer,” no. June, 2012.
- [55] J. Cuzick *et al.*, “Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer : an updated meta-analysis of individual participant data,” *Lancet*, vol. 381, no. 9880, pp. 1827–1834, 2013.
- [56] M. Dowsett *et al.*, “Meta-Analysis of Breast Cancer Outcomes in Adjuvant Trials of Aromatase Inhibitors Versus Tamoxifen,” vol. 28, no. 3, pp. 509–518, 2018.
- [57] A. or in C. (ATAC) T. G. The Arimidex, Tamoxifen, “Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial,” *Lancet*, vol. 9, no. 1, pp. 45–53, 2008.
- [58] D. W. D. J. & D. J. L. Hyun-Soo Cho, Karen Mason, Kasra X. Ramyar, Ann Marie Stanley, Sandra B. Gabelli, “Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab,” *Nature*, vol. 421, pp. 756–760, 2003.
- [59] C. K. Dorte Lisbet Nielsen’Correspondence information about the author Dorte Lisbet NielsenEmail the author Dorte Lisbet Nielsen, Michael Andersson, “HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors,”

- elsevier*, vol. 35, no. 2, pp. 121–136, 2009.
- [60] Z. F. YunYanga, Rui Guob, Xiaoting Tianc, Ziheng Zhanga, Pengfei Zhanga , Chang zhengLia, “Synergistic anti-tumor activity of Nimotuzumab in combination with Trastuzumab in HER2-positive breast cancer,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 489, no. 4, pp. 523–527, 2017.
- [61] O. Article, “Dual HER2-blockade with pertuzumab and trastuzumab in HER2-positive early breast cancer : a subanalysis of data from the randomized phase III GeparSepto trial Original article,” no. November 2016, pp. 497–504, 2017.
- [62] X. Hu, W. Huang, and M. Fan, “Emerging therapies for breast cancer,” vol. 1, pp. 1–17, 2017.
- [63] H. Ras, “Autocrine / Paracrine Regulation of Breast Cancer Cell Proliferation by Growth Hormone Releasing,” vol. 20, no. May 2018, pp. 2010–2019, 2019.
- [64] H. M. Thorner MO1, Chapman IM, Gaylinn BD, Pezzoli SS, “Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging.,” *Recent Prog Horm Res.*, vol. 52, pp. 215–44, 1997.
- [65] S. Eden and J. Jansson, “MODE OF ACTION OF PITUITARY GROWTH HORMONE ON TARGET CELLS Olle,” pp. 483–499, 1985.
- [66] J. F. Bazan, “Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily,” vol. 87, no. September, pp. 6934–6938, 1990.
- [67] J. Xu *et al.*, “Growth Hormone Signaling in Human T47D Breast Cancer Cells: Potential Role for a Growth Hormone Receptor-Prolactin Receptor Complex,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 4, pp. 597–610, 2011.
- [68] V. E. Chaves *et al.*, “The metabolic effects of growth hormone in adipose tissue,” *Endocrine*, 2013.
- [69] S. Chappel, W. Murphy, S. Corp, L. Circle, and P. O. B. B, “Growth Hormone,” 2000.
- [70] A. Zekri *et al.*, “Molecular and Cellular Endocrinology Autocrine human growth hormone increases sensitivity of mammary carcinoma cell to arsenic trioxide-induced apoptosis,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 377, no. 1–2, pp. 84–92, 2013.
- [71] K. Voudouri, A. Berdiaki, M. Tzardi, G. N. Tzanakakis, and D. Nikitovic, “Insulin-Like Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer Cell Growth : Focus on Endocrine Resistant Disease,” vol. 2015, 2015.
- [72] J. K. Perry, Z. Wu, H. C. Mertani, T. Zhu, and P. E. Lobie, “Review Tumour-Derived Human Growth Hormone As a Therapeutic Target in Oncology,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 28, no. 8, pp. 587–596, 2017.

- [73] "Growth Hormone," p. 2004, 2004.
- [74] Z. Nouhi, N. Chughtai, S. Hartley, E. Cocolakis, J. Lebrun, and S. Ali, "Defining the Role of Prolactin as an Invasion Suppressor Hormone in Breast Cancer Cells," no. 3, pp. 1824–1833, 2006.
- [75] Ê. Wennbo and J. To, "The role of prolactin and growth hormone in breast cancer," pp. 1072–1076, 2000.
- [76] C. V Clevenger, P. A. Furth, S. E. Hankinson, and L. A. Schuler, "The Role of Prolactin in Mammary Carcinoma," vol. 24, no. 1, pp. 1–27, 2003.
- [77] G. S. Campbell, L. S. Argetsinger, J. N. Ihlet, P. A. Kelly, J. A. Rillemat, and C. Carter-su, "Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants," vol. 91, no. June, pp. 5232–5236, 1994.
- [78] Y. Huang, X. Li, J. Jiang, and S. J. Frank, "Prolactin modulates phosphorylation , signaling and trafficking of epidermal growth factor receptor in human T47D breast cancer cells," vol. 2, pp. 7565–7576, 2006.
- [79] "https://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=f1BL2AQIjK2R&input_page_show_search=on."
- [80] S. Mukhina, H. C. Mertani, K. Guo, K. Lee, P. D. Gluckman, and P. E. Lobie, "Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone," 2004.
- [81] C. W. Welsch and H. Nagasawa, "Prolactin and Murine Mammary Tumorigenesis : A Review," vol. 48824, no. APRIL, pp. 951–963, 1977.
- [82] H. Wennbo, O. G. Isaksson, and J. Törnell, "Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice . Find the latest version :," 1997.
- [83] M. H. Raccurt M1, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, "High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland.," *J Endocrinol.*, vol. 175, no. 2, pp. 307–18, 2002.
- [84] O. T. E. Svny and A. April, *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. 2007.
- [85] M. Miller, S. Chen, J. Woodliff, and S. Kansra, "Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Cell Hormone Levels and Secretion in Pituitary Tumor Cells," vol. 149, no. March, pp. 4158–4167, 2018.
- [86] H. P. T. Ammon and M. A. Wahi, "Pharmacology of Curcuma longa," 1990.
- [87] B. Aggarwal and A. C. Bharti, "Anticancer Potential of Curcumin : Preclinical and Clinical Studies Anticancer Potential of Curcumin : Preclinical and Clinical Studies,"

no. November, 2002.

- [88] R. Wilken, M. S. Veena, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, "Curcumin: A Review of Anti-Cancer Properties and Therapeutic Activity in Head & Neck Squamous Cell Carcinoma," *Mol. Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 12, 2011.
- [89] S. C. Gupta, S. Patchva, W. Koh, and B. B. Aggarwal, "Frontiers in Research : Herbal Bioactive Molecules : The Hidden Jewels for Drug Development Discovery of curcumin , a component of golden spice , and its miraculous biological activities," no. July 2011, pp. 283–299, 2012.
- [90] A. B. Kunnumakkara, P. Anand, and B. B. Aggarwal, "Curcumin inhibits proliferation , invasion , angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins," vol. 269, pp. 199–225, 2008.
- [91] b I. K. P. and B. B. A. Subash C. Gupta, a Sahdeo Prasad, a Ji Hye Kim, a Sridevi Patchva, a Lauren J. Webb, "Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies," *Nat. Prod. Rep.*, no. 12, 2011.
- [92] S. P. Verma, B. R. Goldin, and P. S. Lin, "The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids," *Environ. Health Perspect.*, vol. 106, no. 12, pp. 807–812, 1998.
- [93] D. Liu and Z. Chen, "Breast Cancer The Effect of Curcumin on Breast Cancer Cells," vol. 16, no. 2, pp. 133–137, 2013.
- [94] C. Syng-ai and A. L. Kumari, "Effect of curcumin on normal and tumor cells : Role of glutathione and bcl-2," vol. 3, no. September, pp. 1101–1109, 2004.
- [95] J. Ravindran, S. Prasad, and B. B. Aggarwal, "Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively?," *AAPS J.*, vol. 11, no. 3, pp. 495–510, 2009.
- [96] M. H. Teiten, F. Gaascht, S. Eifes, M. Dicato, and M. Diederich, "Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer," *Genes Nutr.*, vol. 5, no. 1, pp. 61–74, 2010.
- [97] Y. W. Ramachandran C1, "Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin.," vol. 54, no. 3, pp. 269–78, 1999.
- [98] C. S. Beevers, F. Li, L. Liu, and S. Huang, "Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells."
- [99] Y.-J.-J. Wen-FengHua, Yong-ShuiFuab and Yang-ChaoChencYi-XinZengaHsiang-FuKungacDanXiea, "Curcumin induces down-regulation of EZH2 expression through the MAPK pathway in MDA-MB-435 human breast cancer cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 637, no. 1–3, pp. 16–21, 2010.
- [100] D. Gozuacik and A. Kimchi, "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism," pp. 2891–2906, 2004.

- [101] N. Mizushima and M. Komatsu, “Review Autophagy: Renovation of Cells and Tissues,” *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 728–741, 2011.
- [102] A. M. K. Choi, S. W. Ryter, and B. Levine, “Autophagy in Human Health and Disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 7, pp. 651–662, 2013.
- [103] A. Petiot, S. Pattingre, S. Arico, D. Meley, and P. Codogno, “Diversity of Signaling Controls of Macroautophagy in Mammalian Cells,” vol. 441, pp. 431–441, 2002.
- [104] W. L. Jian and L. J. Bao, “Microautophagy: lesser-known self-eating,” pp. 1125–1136, 2012.
- [105] N. Mizushima, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, “The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, pp. 107–132, 2011.
- [106] M. Jin and D. J. Klionsky, “The Core Molecular Machinery of Autophagosome Formation.”
- [107] D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, “Autophagy: cellular and molecular mechanisms,” no. February, pp. 3–12, 2010.
- [108] M. Badadani, “Autophagy Mechanism , Regulation , Functions , and Disorders,” vol. 2012, no. 2, 2012.
- [109] R. Huang and W. Liu, “Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy,” vol. 11, no. 5, pp. 852–853, 2015.
- [110] E. L. Axe *et al.*, “Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum,” vol. 182, no. 4, pp. 685–701, 2008.
- [111] “<https://docs.abcam.com/ebooks/cell-death-ebook.pdf>.” .
- [112] L. Ouyang *et al.*, “Programmed cell death pathways in cancer : a review of apoptosis , autophagy and programmed necrosis,” no. 15, pp. 487–498, 2012.
- [113] A. Manuscript, “NIH Public Access,” vol. 140, no. 3, pp. 313–326, 2010.
- [114] D. Y. Ouyang *et al.*, “Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5,” *Autophagy*, vol. 9, no. 1, pp. 20–32, 2013.
- [115] M. Mclaughlin and K. Vandenbroeck, “The endoplasmic reticulum protein folding factory and its chaperones : new targets for drug discovery ?,” vol. 170, 2010.
- [116] H. O. Rashid, R. K. Yadav, H. R. Kim, and H. J. Chae, “ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection,” *Autophagy*, vol. 11, no. 11, pp. 1956–1977, 2015.
- [117] R. Clarke *et al.*, “Endoplasmic Reticulum Stress, the Unfolded Protein Response, Autophagy, and the Integrated Regulation of Breast Cancer Cell Fate,” *Cancer Res.*,

vol. 1, pp. 1321–1332, 2012.

- [118] G. Kroemer, G. Mariño, and B. Levine, “Autophagy and the Integrated Stress Response,” *Mol. Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 280–293, 2010.
- [119] S. Bernales, K. L. McDonald, and P. Walter, “Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response,” *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 2311–2324, 2006.
- [120] M. Boyce and J. Yuan, “Cellular response to endoplasmic reticulum stress : a matter of life or death Overview : The Endoplasmic Reticulum,” pp. 363–373, 2006.
- [121] M. Moenner, O. Pluquet, M. Bouche-careilh, and E. Chevet, “Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 22, pp. 10631–10634, 2007.
- [122] W. Ding *et al.*, “Linking of Autophagy to Ubiquitin-Proteasome System Is Important for the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Viability,” *Am. J. Pathol.*, vol. 171, no. 2, pp. 513–524, 2007.
- [123] C. Death, “Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium,” pp. 1576–1582, 2007.
- [124] W. Jiang, H. W. V. Iv, D. A. Leib, D. Scheuner, and R. J. Kaufman, “Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 γ kinase signaling pathway,” 2001.
- [125] J. S. Lakind, A. M. Y. A. Wilkins, and M. N. Bates, “Human breast biomonitoring and environmental chemicals : use of breast tissues and fluids in breast cancer etiologic research,” pp. 525–540, 2007.
- [126] Z. Mitri, T. Constantine, and R. O. Regan, “The HER2 Receptor in Breast Cancer : Pathophysiology , Clinical Use , and New Advances in Therapy,” vol. 2012, 2012.
- [127] T. P. Slavin *et al.*, “The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk,” no. February, 2017.
- [128] A.-E. SL and Z. T. Tessari JD, Winn DT, Keefe TJ, Nett TM, “Comparison of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast adipose tissue and serum.” *J Toxicol Env. Heal.*, vol. 52, no. 4, pp. 285–93, 1997.
- [129] S. H. R. & P.-G. S. Jang Hyun Choi, Hyeon Soo Kim, Sun-Hee Kim, Yong Ryoul Yang, Yun Soo Bae, Jong-Soo Chang, H. Moo Kwon, “Phospholipase C γ 1 negatively regulates growth hormone signalling by forming a ternary complex with Jak2 and protein tyrosine phosphatase-1B,” *Nature*, vol. 8, pp. 1389–1397, 2006.
- [130] G. Osterstock *et al.*, “Somatostatin triggers rhythmic electrical firing in hypothalamic GHRH neurons,” *Nat. Publ. Gr.*, no. April, pp. 1–10, 2016.

- [131] M. C. Zatelli *et al.*, “Growth Hormone Excess Promotes Breast Cancer Chemoresistance,” vol. 94, no. May, pp. 3931–3938, 2018.
- [132] T. Zhu *et al.*, “Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone,” *Cancer Res*, vol. 65, no. 1, pp. 317–324, 2005.
- [133] Z. Zhu, S. Mukhina, T. Zhu, H. C. Mertani, K. Lee, and P. E. Lobie, “p44 / 42 MAP kinase-dependent regulation of catalase by autocrine human growth hormone protects human mammary carcinoma cells from oxidative stress-induced apoptosis,” pp. 3774–3785, 2005.
- [134] M. Minoia *et al.*, “Growth Hormone Receptor Blockade Inhibits Growth Hormone-Induced Chemoresistance by Restoring Cytotoxic-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells Independently of Estrogen Receptor Expression,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 6, pp. E907–E916, 2012.
- [135] M. Mojarrad *et al.*, “Autocrine human growth hormone expression leads to resistance of MCF-7 cells to tamoxifen,” *Med. Oncol.*, vol. 27, no. 2, pp. 474–480, 2010.
- [136] N. M. Bougen *et al.*, “Autocrine human GH promotes radioresistance in mammary and endometrial carcinoma cells,” pp. 625–644, 2012.
- [137] B. B. Aggarwal, C. Sundaram, and N. Malani, “CURCUMIN : THE INDIAN SOLID GOLD,” pp. 1–2.
- [138] C. A. Chuang SE, Kuo ML, Hsu CH, Chen CR, Lin JK, Lai GM, Hsieh CY, “Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis,” *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 2, pp. 331–5, 2000.
- [139] S. Uddin *et al.*, “Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma,” pp. 7022–7030, 2005.
- [140] T. Choudhuri, S. Pal, T. Das, and G. Sa, “Curcumin Selectively Induces Apoptosis in Deregulated Cyclin D1-expressed Cells at G 2 Phase of Cell Cycle in a p53-dependent Manner *,” vol. 280, no. 20, pp. 20059–20068, 2005.
- [141] R. K. Maheshwari, A. K. Singh, J. Gaddipati, and R. C. Srimal, “Multiple biological activities of curcumin : A short review,” *Life Sci.*, vol. 78, no. 18, pp. 2081–2087, 2006.
- [142] R. A. Sharma *et al.*, “Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance,” vol. 10, pp. 6847–6854, 2004.
- [143] M. Bayet-Robert *et al.*, “Phase I dose escalation trial of docetaxel plus curcumin in patients with advanced and metastatic breast cancer,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 8–14, 2010.
- [144] N. Mizushima, “Methods for monitoring autophagy,” vol. 36, pp. 2491–2502, 2004.

- [145] S. Abreu, J. Sanchez-wandelmer, and F. Reggiori, "Autophagy and Cancer," no. March, 2013.
- [146] H. Hara, M. Yamamoto, Y. Tagawa, T. Yoshimori, and Y. Moriyama, "Bafilomycin A₁ Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line," vol. 42, pp. 33–42, 1998.
- [147] J. Lim, J. Park, M. Kim, S. Park, R. S. Johnson, and Y. Chun, "Bafilomycin Induces the p21-Mediated Growth Inhibition of Cancer Cells under Hypoxic Conditions by Expressing Hypoxia-Inducible Factor-1 α ," pp. 1856–1865, 2006.
- [148] M. Ogata *et al.*, "Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 24, pp. 9220–9231, 2006.
- [149] J. J. Wolfson, K. L. May, C. M. Thorpe, D. M. Jandhyala, J. C. Paton, and A. W. Paton, "Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways," *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1775–1786, 2008.
- [150] C. Xu, B. Bailly-maitre, J. C. Reed, C. Xu, B. Bailly-maitre, and J. C. Reed, "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions Find the latest version: Review series Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions," vol. 115, no. 10, pp. 2656–2664, 2005.
- [151] T. Yorimitsu, U. Nair, Z. Yang, and D. J. Klionsky, "Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy *," vol. 281, no. 40, pp. 30299–30304, 2006.
- [152] Z. Kostova and D. H. Wolf, "NEW EMBO MEMBER 'S REVIEW For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin \pm proteasome connection," vol. 22, no. 10, pp. 2309–2317, 2003.
- [153] Chris Patil Peter Walter, "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 349–355, 2001.
- [154] Fang, F., et al., Quantification of PRL/Stat5 signaling with a novel pGL4-CISH reporter. *BMC Biotechnol*, 8: p. 11, 2008.
- [155] Fang, F., M.A. Rycyzyn, and C.V. Clevenger, Role of c-Myb during prolactin- induced signal transducer and activator of transcription 5 α signaling in breast cancer cells. *Endocrinology*, 150(4): p. 1597-606, 2009.
- [156] Shemanko, C.S., Prolactin receptor in breast cancer: marker for metastatic risk. *J Mol Endocrinol*. 57(4): p. R153-R165, 2016.
- [157] Goldhar, A.S., et al., Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Mol Cell Endocrinol*, 232(1-2): p. 9-19, 2005.
- [158] Zhu, T., et al., Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by

- autocrine human growth hormone. *Cancer Res*, 65(1): p. 317-24, 2005.
- [159] Mukhina, S., et al., Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(42): p. 15166-71, 2004.
- [160] Soonmyung Paik, Gong Tang, Steven Shak, Chungyeul Kim, Joffre Baker, Wanseop Kim, Maureen Cronin, Frederick L. Baehner, Drew Watson, John Bryant, Joseph P. Costantino, Charles E. Geyer Jr, D. Lawrence Wickerham, and Norman Wolmark, Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 24 (23), 2006.
- [161] Shelley S. Tworoger, Susan E. Hankinson, Prolactin and Breast Cancer Etiology: An Epidemiologic Perspective, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13 (1) 41-53, 2008.
- [162] Hakan Wennbo, Jan Tornell, "The role of prolactin and growth hormone in breast cancer", *Oncogene* , 19, 1072-1076, 2000.
- [163] Ajda Coker-Gurkan, Merve Celik, Merve Ugur, Elif-Damla Arisan, Pinar Obakan-Yerlikaya, Zeynep Begum Durdu, Narcin Palavan-Unsal, Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF- κ B signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells, *Amino Acids*, 50 (8), 1045-1069, 2018.
- [164] Ajda Coker-Gurkan, Derya Bulut, Recep Genc, Elif-Damla Arisan, Pinar Obakan-Yerlikaya, Narcin Palavan-Unsal, Curcumin prevented human autocrine growth hormone (GH) signaling mediated NF- κ B activation and miR-183-96-182 cluster stimulated epithelial mesenchymal transition in T47D breast cancer cells, *Molecular Biology Reports*, 46 (1), 355-369, 2019
- [165] Subash C. Gupta , Gorkem Kismali, Bharat B. Aggarwal, Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy, *BioFactors*, 39 (1), 2013
- [166] F Guan, Y Ding, Y Zhang, Y Zhou, M Li, C Wang, Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through autophagy-dependent Akt degradation, *PLoS One*, 2016

EKLER

Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	A111	Thermo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo
Floraslan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
HPLC Cihazı	120 Infinity Series	Afilent Technologies

Tablo 2. Hücre kültürü donanımları.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
DMEM Medium	41966-029	Gibco
MCF-7 hücreleri	61062004	ATCC

Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptotanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DCFH-DA Boya	C6827	Invitrogen
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	D1306	Thermo Scientific
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (PSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH

Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Appllichem
Curcumin	C1386-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Appllichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H ₂ O ₂ Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK
ExPrime Taq PCR Kiti	G-4000	Genet Bio
Trizol	10296010	Thermo
Tripure	11 667 165 001	Roche
Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	Bio Rad
Human GH ELISA	GR180572-1	Abcam
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK
Neomisin	G8168	SIGMA-ALDRICH
Invasion Chamber	354483	BD Bioscience
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
Ponceau Read Belirteci	A1405	Appllichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Appllichem
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK

Tablo 4. Kullanılan tamponlar ve içerikleri.

Kullanılan Tamponlar	İçerikleri
10X TBS	87,6 gr NaCl 12,11gr Tris-Baz 800 ml distile su pH:8
1X TBS-Tween	500 ml 10X TBS 500 µl Tween-20 500 ml distile su
10X PBS	80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14.4 gr Na ₂ HPO ₄ , 2.4 gr KH ₂ PO ₄ 800 ml distile su pH:7,4
1X PBS	500 µl 10X PBS 500 ml distile su
Full Besi Yeri	450 ml negatif besiyeri 50 ml FBS 5 ml Penisilin-Streptomisin (10,000 U/ml)
Bovine Serum Albumin (BSA)	0,015 gr Albumin, 10 ml distile su
Bradford Reagent	100 mg Comassie Brilliant Blue (6-250), 50 ml %95 etanol, 100 ml %85 Fosforik asit, 1 litreye tamamlanır
Hücre Lizis Tamponu (CLB)	100 µl Proteinaz inhibitörü, 10 ml CLB
HArsH Strip Buffer	200 ml %10'luk SDS, 125 ml Tris-HCl (pH=6,8), 8 ml β-merkaptan etanol 675 ml distile su
Mild Strip Buffer	15 gr glisin, 1 gr SDS, 10 ml Tween-20, 800 ml distile su
% 10 Ammonium Persulphate Solution (APS)	100 mg Ammonium persulfate, 1 ml distile su
Coumaric Acid (CA)	0,15 gr P-Coumaric asit, 10 ml DMSO
Luminol	0,44 gr Luminol, 10 ml DMSO
Yürütme Tamponu	30,3gr Tris-baz, 114 gr Glisin, 1 gr SDS 1 litre distile su

	pH: 8,3
Transfer Tamponu	33,3 gr Tris-base, 144 gr Glisin, 1 litre distile su pH:8,3
Hücre Dondurma Medyası	9 ml FBS, 1 ml DMSO

Tablo 5. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği.

	Alt Jel	Üst Jel
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5ml (1,5M,pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
%10 SDS	0,1 ml	0,05ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025ml
TEMED	0,005ml	0,005ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05ml

ÖZGEÇMİŞ

MERVE KARATAŞ



KİŞİSEL BİLGİLER VE İLETİŞİM

İsim: Merve Karataş

Uyruk: T.C.

Doğum Tarihi: 23.05.1991

Doğum Yeri: Giresun

Medeni Durum: Bekâr

Telefon: +90 533 438 22 77

Adres: Kartaltepe Mah. Baharlı bahçe sokak No:4/18 Bakırköy İstanbul

E-posta: mervekrts@gmail.com

Sürücü Belgesi: B

EĞİTİM BİLGİLERİ

09.2016 – 12.2018 Yüksek Lisans

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi – Moleküler
Biyoloji ve Genetik (%50 Destek Burslu)

12.2014 – 05.2015 Dil Okulu

International Language Academy of Canada (ILAC)

09.2010 – 06.2014 Lisans Eğitimi

İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi – Moleküler
Biyoloji ve Genetik (%50 Destek Burslu)

09.2005 – 06.2009 Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi – Fen Bilimleri

DİL BECERİSİ

İngilizce : Okuma- Yazma- Konuşma - Çok iyi düzeyde

Türk İşaret Dili (TİD) : İyi düzeyde

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

Office Programları : Word – Excel- Power Point - Çok iyi düzeyde

Hobiler

Puzzle yapmak, kitap okumak, yazmak, farklı ülkelerin yemeklerini yapmak, kahve

STAJ

06.2012 – 07.2012 Özel Batı Bahat Hospital – Tüp Bebek Merkezi
Tüp Bebek Laboratuvarında 1 aylık staj programı

SERTİFİKA PROGRAMLARI

- 4-6.03. 2011** İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu
- 9-10.04. 2011** Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu
- 28.04 -1.05.2011** Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bahar Okulu
- 04.2013** İstanbul Kültür Üniversitesi MOBİGEN DNA Okulu
- 05.2013** Arel Üniversitesi Uluslararası Gen-Arel Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi
- 05.2014** İyi Hijyen Uygulamaları (GHP) - Institute of Environmental Management and Assessment (Iema)
- 05.2014** İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) - Institute of Environmental Management and Assessment (Iema)
- 05.2014** İyi Üretim Uygulamaları (GMP) - Institute of Environmental Management and Assessment (Iema)
- 08.2014** PCR – Polimeraz Zincir Reaksiyonu - TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
- 08.2014** ISO 13485 : 2012 Kalite Yönetim Sistemi - TSC Yönetim Sistemleri Akademisi

- 08.2014** OHSAS 18001 : 2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Değerlendirme Sistemi - TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
- 4.2018** Vücudunuz Konuşuyor Kişisel Gelişim Eğitimi – AhmetŞerif İzgören Akademi
- 4.2018** Avucunuzdaki Kelebek Kişisel Gelişim Eğitimi – Ahmet Şerif İzgören Akademi

KONGRELER

- 11.2015** IVEK 2. İlaç ve Eczacılık Kongresi
- 11.2018** 2. Uluslar arası Hücre Ölüm Kongresi

ÇALIŞTAY

- 12.2015** Biyoteknoloji Çalıştayı – Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Fatih Üniversitesi
- 11.2018** Hücre Akış Sitometri Çalıştayı – 2. Uluslararası Hücre Ölümü Kongresi

YAYINLAR

- 11.12.2018** Bafilomycin Prevented Curcumin-Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Autophagy in MCF-7 Growth Hormone Positive (GH+) Breast Cancer Cells. The 2nd International Cell Death Research Congress. Proceedings 2018, 2 (25), 1568. DOI: 10.3390/proceedings2251568.

ÜYELİKLER

- 1999-2006** GİFSAD Dans Klübü
- 2010-2011** T.C Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Klübü
- 2010-2012** T.C İstanbul Kültür Üniversitesi Satranç Klübü
- 2013-halen** Türkiye Eğitim Gönüllüleri Vakfı (TEGV)
- 2017- halen** Dem Derneği Gönüllü