

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTOKRİN BÜYÜME HORMONU (BH) SİNYALİNİN CURCUMİN'E KARŞI
DİRENÇ MEKANİZMASINDAKİ ROLÜNÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRES VE OTOFAJİK YOLAKLARA BAĞLI OLARAK MDA-MB-231 VE
T47D MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE İRDELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERYA BULUT

1002060013

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

OCAK- 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OTOKRİN BÜYÜME HORMONU (BH) SİNYALİNİN CURCUMİN'E KARŞI
DİRENÇ MEKANİZMASINDAKİ ROLÜNÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRES VE OTOFAJİK YOLAKLARA BAĞLI OLARAK MDA-MB-231 VE
T47D MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE İRDELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERYA BULUT

1002060013

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 1 Şubat 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 4 Ocak 2019

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Doç. Dr. Betül KARADEMİR

OCAK- 2019

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca akademik alanda sahip oldukları bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için deneysel süreçte İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarına vermiş oldukları destek ve olanaklara,

Manevi destekleriyle her daim yanımda olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim çok değerli annem Gülşen BULUT, çok değerli babam Mehmet BULUT ve çok değerli kardeşim Erkan BULUT'a en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2019

Derya BULUT

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
BÖLÜM I.....	1
I.1.GİRİŞ.....	1
I.2. AMAÇ.....	2
BÖLÜM II.....	3
GENEL BİLGİLER.....	3
1.1 KANSER.....	3
1.1.1 Kanser tipleri ve prevalansı	4
1.2 MEME KANSERİ	4
1.2.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi	6
1.2.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	6
1.2.3 Tedavi Yöntemleri	8
1.3 Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması	10
1.3.1 Otokrin Büyüme Hormonu ve Meme Kanseri Arasındaki İlişki	11
1.4 BÜYÜME HORMONU (BH).....	12
1.4.1 Büyüme Hormonu Sinyali	13
1.5 Curcumin	15
1.5.1 Curcumin ve Meme Kanseri	16
1.5.2 Curcuminin Klinik Uygulamaları	16
1.6 APOPTOZ	17
1.6.1 İntrinsik Sinyal Yolağı.....	17
1.6.2 Ekstrinsik Sinyal Yolağı	18
1.7 ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRES.....	20
1.7.1 Endoplazmik Retikulum ve Apoptoz Arasındaki İlişki	21
1.8 OTOFAJİ.....	22
1.8.1 Otofaji Sinyalinin Moleküler Mekanizması.....	25
1.8.2 Otofaji Kontrol Mekanizmaları.....	26
1.8.3 Otofaji ve Apoptoz İlişkisi.....	28
1.8.4 Otofaji ve Kanser	31

1.8.5	Meme Kanseri ve Otofaji.....	32
BÖLÜM III.....		34
MATERYAL VE METOT.....		34
1.9	KULLANILAN MATERYALLER.....	34
1.9.1	Kullanılan Cihazlar	34
1.9.2	Hücre Kültürü Donanımları	34
1.9.3	Kullanılan Kimyasallar	34
1.9.4	Kullanılan Tamponlar	34
YÖNTEMLER		34
1.10	Hücre Kültürü.....	34
1.11	Transfeksiyon	35
1.12	Hücre Canlılığının Belirlenmesi	36
1.13	Floresans Boyama	36
1.13.1	3,3' Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC ₆) Boyama	36
1.13.2	Propidyum iyodür (PI) boyama	36
1.13.3	4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama.....	37
1.13.4	MitoTracker Boyama.....	37
1.13.5	Akridin Oranj (AO) Boyama	37
1.14	Hücre Akış Sitometresinde PI Analizi	38
1.15	Hücre Akış Sitometrisinde ROS Analizi.....	38
1.16	Annexin V/PI Boyama	38
1.17	Total Protein İzolasyonu	39
1.18	Bradford Protein Miktar Tayini.....	39
1.19	İmmünoBlotlama Yöntemi	39
1.19.1	Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi	39
1.19.2	Membrana Transfer ve Bloklama	39
1.19.3	Primer ve Sekonder Antikor İşaretleme ve Bantların Görüntülenmesi.....	40
1.20	Asılı Damla Modeli Tekniği	41
1.21	Koloni Oluşumunun Kristal Viole ile Gösterilmesi	41
1.22	<i>Caenorhabditis elegans</i> Kültürlerinin Devamlılığı ve Stoklanması	42
1.23	<i>C. elegans</i> Senkronizasyonu	43
1.24	<i>C. elegans</i> için OP50 Yetiştirme.....	43
1.25	<i>C. elegans</i> Akridin Oranj Boyama	43
1.26	<i>C. elegans</i> H2DCFDA Boyama	43
1.26.1	%2'lik Agaroz Petri Hazırlanması	44
1.26.2	NGM Hazırlama Protokolü.....	44
1.27	<i>C. elegans</i> Yaşam Eğrisi Deneyi.....	44
1.28	İstatistiksel Analiz.....	44
BÖLÜM IV		45
SONUÇLAR		45
1.29	Zamana bağlı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	45
1.30	Curcumin'in ER strese bağlı CHOP aktivasyonu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre akış sitometresi ile gösterilmesi	47

1.31	Zamana bağılı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde ER stres ve otofaji üzerine etkisinin irdelenmesi	47
1.32	Otofajinin baskılanması durumunda curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi	53
1.33	Bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik ölüm ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin irdelenmesi	55
1.34	Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	59
1.35	Otofajinin engellendiği durumda zamana bağılı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin asılı damla modeli tekniği ile gösterilmesi	60
1.36	Otofajinin baskılandığı durumda curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde akridin oranj boyaması gösterilmesi	64
1.37	Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının Otofajiye bağılı GFP-LC3 aktivasyonu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre akış sitometresi ile gösterilmesi	65
1.38	Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	66
1.39	Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	70
1.40	Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının apoptotik ölüm üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	72
1.41	Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi	74
1.42	Curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant <i>C. elegans</i> modellerinde sağkalım üzerine etkinliğinin yaşam eğrisi deneyi ile gösterilmesi	75
1.43	Doza bağılı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant <i>C. elegans</i> modellerinde ROS üzerine etkisinin H2-DCF-DA boyaması ile gösterilmesi	76
1.44	Doza bağılı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant <i>C. elegans</i> modellerinde otofaji üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi	77
BÖLÜM V		78
TARTIŞMA		78
KAYNAKLAR		92
EKLER		101
ÖZGEÇMİŞ		109

KISALTMALAR

3-MA	: 3-Metiladenin
5-FU	: 5-Florourasil
Akt	: Protein kinaz B
AO	: Akridin Oranj
AP-1	: Aktif protein 1
APS	: Amonyum Persülfat
Atg	: Otofaji ilişkili gen
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bad	: Bcl-2 İlişkili Ölüm Promatör Proteini
Baf	: Bafilomisin
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2
Beklin-1	: Bcl-2 Etkileşim Proteini
BH	: Büyüme Hormonu
BH+	:Büyüme hormonu anlatımı indüklenmiş
BH3	: Bcl-2 Benzeri Domain 3
BHR	: Büyüme hormonu reseptörü
BRCA1/2	: Meme Kanseri Duyarlılık Genleri 1/2
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbondioksit
Cur	: Curcumin
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DiOC₆	: 3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür

DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal bovin serum
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HER2/neu	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
JAK2	: Janus Kinaz 2
JNK	: c-Jun N-Termal Kinaz
kDa	: Kilodalton
KFERQ	: Amino asit dizisi “Lys-Phe-Glu-Arg-Gln”
LC3	: Hafif zincir 3
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
MTT	: Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
NF-κB	: Nuklear Faktör - Kappa B
NGM	: Nematod Büyütme Besiyeri
p53	: Tümör protein (TP53)
PARP	: Poli ADP riboz polimeraz
PAS	: Otofaji oluşum merkezi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PE	: Fosfotidilmetanoamin
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Sınıf I fosfotidilinositol-3-kinaz

PI3P	: Sınıf III fosfatidilinositol-3-fosfat
PKB	: Protein Kinaz B
PR	: Progesteron Reseptörü
PRL	: Prolaktin
PRLR	: Prolaktin reseptörü
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog gen 10
PUMA	: Apotozun p53 Upregüle Modülatörü
PVDF	: Poliviniliden florid
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBS	: Tris tamponlu tuz çözeltisi
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
TNF	: Tümör nekroz faktör
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand-R1
Tripsin-EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ULK 1/2	: Unc-51 benzeri kinaz 1/2
UVRAG	: UV-radyasyon direnci ilişkili gen
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
bç	: Baz çifti
cc	: Santimetre küp
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre kare
IC₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilo Dalton
mA	: Mili amper
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
V	: Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Meme Yapısı, LCIS ve DCIS oluşumu [150]	5
Şekil 2. İnsan büyüme hormonu gen ailesi [208].....	12
Şekil 3. İnsan büyüme hormonu amino asit dizisi [208].....	13
Şekil 4. İnsan büyüme hormonu üç boyutlu yapısı [209]	13
Şekil 5. Büyüme hormonu sinyal yolağı [210]	14
Şekil 6. Curcuminin kimyasal yapısı [211]	15
Şekil 7. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal yolağı [212]	19
Şekil 8. UPR Yolakları [88].....	21
Şekil 9. Otofajinin şematik gösterimi [91]	23
Şekil 10. Otofajinin farklı türlerinin şematik gösterimi [97]	25
Şekil 11. Sağlıklı durumda ya da hastalık ilerlemede otofajinin rolü [116]	31
Şekil 12. Zamana bağlı curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi.....	45
Şekil 13. 24 ve 48 saat curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi.....	46
Şekil 14. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasının ER strese bağlı CHOP aktivasyonu üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.	47
Şekil 15. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının ER stres üzerine etkisinin immünoablota tekniğı ile gösterilmesi.	48
Şekil 16. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının ER stres üzerine etkisinin immünoablota tekniğı ile gösterilmesi.	50
Şekil 17. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının otofaji üzerine etkisinin immünoablota tekniğı ile gösterilmesi.	51
Şekil 18. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının otofaji üzerine etkisinin immünoablota tekniğı ile gösterilmesi. .	52

Şekil 19. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (**p<0.01; K: Kontrol, B: Bafilomisin, C: Curcumin, B+C: Bafilomisin+Curcumin).	54
Şekil 20. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (**p<0.01; K: Kontrol, B: Bafilomisin, C: Curcumin, B+C: Bafilomisin+Curcumin).	55
Şekil 21. Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü, DNA kondenzasyonu, mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.	56
Şekil 22. Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü, DNA kondenzasyonu, mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.	58
Şekil 23. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.	59
Şekil 24. Otofajinin engellendiği durumda zamana bağlı curcumin uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi (****p<0.0001).	61
Şekil 25. Otofajinin engellendiği durumda zamana bağlı curcumin uygulamasının 3D olarak T47D meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi (**p<0.01; ****p<0.0001).	63
Şekil 26. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin akridin oranji boyaması ile gösterilmesi.	65
Şekil 27. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının otofajiye bağlı GFP-LC3 aktivasyonu üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.	66
Şekil 28. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin gösterilmesi.	68
Şekil 29. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin gösterilmesi.	70
Şekil 30. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.	71

- Şekil 31. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi. 72
- Şekil 32. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ve curcumin uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi. 73
- Şekil 33. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ve curcumin uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi. 74
- Şekil 34. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi. 75
- Şekil 35. Curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde sağkalım üzerine etkinliğinin yaşam eğrisi deneyi ile gösterilmesi. 76
- Şekil 36. Doza bağlı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde ROS üzerine etkisinin H2-DCF-DA boyaması ile gösterilmesi. 77
- Şekil 37. Doza bağlı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde otofaji üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi. 77
- Şekil 38. Curcumin ve Bafilomisinin kombin uygulanmasının MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde invazyon ve metastatik profil, ilaç direnci, hücre proliferasyonu, apoptoz ve ROS üretimi üzerine etkisi. 91

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi.....	101
Tablo 2. Hücre kültürü donanımları.....	102
Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi	102
Tablo 4. Kullanılan Tamponların Listesi	105
Tablo 5. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği	108



ÖZET

Meme kanseri kadınlarda kanser kaynaklı ölümler arasında ikinci sırada yer alan ve büyüme faktörleri, hormonal düzenleme ile gelişimi seyreden bir kanserdir. Yakın zamanda, büyüme hormonunun (BH) meme kanseri hücrelerinde anlatımının artırılmasının hücre büyüme, invazyon-metastaz ve ilaç direncine neden olduğu tespit edilmiştir. BH kaynaklı ilaç direncinde bitkisel kökenli curcuminin etkisi zamana ve doza bağlı olarak gösterilmiştir. Ancak curcuminin terapötik potansiyelinin artırılması ve apoptotik etkinliğinin moleküler mekanizmasında ER stres ve otofajinin rolü bilinmemektedir. Bu tez ile amacımız MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri üzerine zamana bağlı curcuminin etkisinin yanında otolizozom inhibitörü olan bafilomisinle kombine tedavisinde apoptotik etkinliğinin ER ve otofaji yolları göz önünde bulundurularak irdelenmiştir. Zamana bağlı curcumin uygulamasının otokrin BH sinyali aracılı direnç mekanizmasının otofajik ve ER stres anahtar molekülleri üzerinden gerçekleştirdiği MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Curcumin direncinin kırılmasına bağlı terapötik etkinliğin irdelenmesi için bafilomisin ile curcuminin beraber uygulamasının ER stres anahtar moleküllerinin anlatımını baskılayarak ve otofaji sürecinde geç aşama olan otolizozomu engelleyerek apoptotik hücre ölümünü indüklediği MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde belirlenmiştir.

Böylece bu tez ile ilk defa otokrin BH sinyali kaynaklı curcumin ilaç direnç mekanizmasının moleküler mekanizmasında ER stres ve otofajinin rolünün aydınlatılması yanında curcuminle beraber bafilomisin uygulamasının curcumine bağlı apoptotik hücre ölümünü indüklediği MDA-MB-231 ve T47D hücrelerinde tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Curcumin, Bafilomisin, Otofaji, Meme Kanseri, Büyüme Hormonu

SUMMARY

Breast cancer is the second most common cancer among cancer-related deaths in women and growth factors and hormonal regulation are involved in breast cancer progression. Recently, it has been found that increasing the expression of growth hormone (GH) in breast cancer cells triggers cell growth, invasion-metastasis and drug resistance. Dose- and time-dependent effect of curcumin (plant-derived compounds) on autocrine GH signaling breast cancer has been reported. However, the molecular machinery of curcumin induced apoptotic cell death regarding the role of ER stress and autophagy pathway has not been demonstrated yet. In this thesis, our aim is to investigate the time dependent effect of curcumin on MDA-MB-231 and T47D wild type and GH+ breast cancer cells and also evaluate the potential additional effect of bafilomycin (autolysosome inhibitor) on autocrine GH mediated curcumin resistance through ER stress and autophagy pathways. The inhibitive effect of time-dependent curcumin exposure on the MDA-MB-231 and T47D breast cancer cells was demonstrated and this might be related with curcumin triggered by key molecules of autophagic and ER stress signaling pathway. Moreover, combination of bafilomycin and curcumin treatment overcome autocrine GH mediated curcumin resistance was determined in MDA-MB-231 and T47D breast cancer cells via inhibiting the expression profile of ER stress key molecules. In addition, we also demonstrate that bafilomycin co-treatment accelerated curcumin-mediated apoptotic cell death through inhibiting breast cancer cells at late stage autolysosome formation.

Thus, in this thesis, the role of ER stress and autophagy has been determined in autocrine GH mediated curcumin resistance in MDA-MB-231 and T47D cells and also additional apoptotic effect of bafilomycin in therapeutic potential of curcumin *in vitro* breast cancer drug resistance breast cancer model.

Key words: Curcumin, Bafilomycin, Autophagy, Breast Cancer, Growth Hormone

BÖLÜM I

I.1.GİRİŞ

Meme kanseri dünyada ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türlerinin başında gelmektedir. Meme kanserinin görülme sıklığı ciddi bir coğrafi değişkenlik izlemekle beraber, gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı daha fazla iken gelişmekte olan ülkelerde ölüm oranının daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra meme kanseri oluşumunu tetikleyen birçok risk faktörleri de bulunmaktadır. Bu risk faktörleri yaş, ailevi geçmiş, üreme ile ilgili faktörler, yaşam tarzı ve çevresel faktörler olarak çeşitli gruplara ayrılmaktadır.

Meme tümörünün oluşumunda, meme dokusunun uzun süre östrojene maruz kalması başlıca faktör olarak gösterilmektedir. Meme kanseri hastalarının %60'ından daha fazlasında östrojen reseptörünün pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu kanser vakalarının çoğuna postmenapozal kadınlarda rastlanılmakta ve yapılan çalışmalar, artmış postmenapozal östrojen seviyeleri ile meme kanseri arasında bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Büyüme hormonu (BH), ön hipofiz bezinden salgılanan, 191 amino asitten oluşan peptid yapılı bir hormon olup, insan epitel hücrelerinin (MCF-10A) proliferasyonunu arttırarak, apoptozu engellediği ve hücre morfolojide değişikliklere neden olarak onkogenik transformasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda otokrin BH insan epitel hücrelerinde siklin D1, c-myc ve Bcl-2 gibi genlerin transkripsiyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda yüksek düzeyde BH anlatımının genetik ve çevresel faktörlerle birlikte meme kanseri gelişimini tetiklediğini ortaya koymuştur. Büyüme hormonunun, meme bezlerinin patolojik proliferasyon kazanmasıyla ve metastatik meme karsinoma hücrelerinin meydana gelmesiyle ilişkili olduğu da saptanmıştır.

Çoğu kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de başlıca tedavi yöntemi kemoterapi ve radyoterapidir. Ayrıca günümüzde pek çok ilaç tasarımı üzerinde

çalışılmakta ve terapötik etkileri araştırılmaktadır. Anti-kanser bir ajan olarak curcuminin etkisi; mide, deri, oral kavite, meme bezleri, özofagus, kolon, bağırsak, karaciğer ve akciğerde tümör oluşumunu baskılayarak hücreleri apoptoza götürdüğü pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca curcuminin anti-oksidan özellik göstermesiyle alkolün, radyasyonun, ilaçların ve ağır metallerin çeşitli organlar üzerinde oluşturduğu hasarı önlediği de saptanmıştır.

Kanser ile otofaji arasındaki ilişkiye bakıldığında yapılan araştırmaların sonucu, büyüme faktörlerinin eksik olduğu durumda tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin otofajiyi ölümden kaçış mekanizması olarak kullandığı ve hücrelerdeki otofaji baskılandığında ise hücrelerin apoptoz ile ölüme gittiği ortaya konulmuştur. Tümörlerde sınırlı anjiyogenezden dolayı, besin eksikliği ve hipoksik (organ ve dokularda oksijen azlığı) ortam bulunmaktadır. Bu çalışmalar ışığında da tümör hücrelerini bu çevresel koşullardan koruyan mekanizmanın otofaji olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Tümörlerde otofaji artışıyla beraber otofajinin tümör büyümesini indüklediği düşünülürse, kanserli hücrelerde otofajinin inhibe edilmesi ile beraber çeşitli kombin tedavilerin uygulanmasının tümör baskılanmasında umut verici olabileceği düşünülmektedir.

I.2. AMAÇ

Bu tezin amacı BH anlatımını kazandırılan MDA-MB-231 (östrojen resptörü negatif) ve T47D (östrojen reseptörü pozitif) meme kanseri hücrelerinde, curcuminin endoplazmik retikulum (ER) stresi, otofajik düzenleme ve hücre sağkalım-ölüm mekanizmaları üzerine etkisinin zamana bağlı olarak modellenmesi ve ayrıca otofaji inhibitörü olan bafilomisin ile birlikte curcuminin beraber uygulanması sonucunda curcuminin etkinliğinin ER stresi, otofajik ve apoptotik ölüm yolları göz önüne alınarak moleküler mekanizmanın gösterilmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

1.1 KANSER

Kanser en yalın haliyle anormal ve kontrolsüz hücre bölünmesi anlamına gelmektedir. Kanser terimi, Yunan fizikçi olan Hippocrates (M.Ö. 460-370) tarafından oluşturulmuş ve tümörleri tanımlamak için kullanılmıştır. Fakat kanserin ilk keşfi Hippocrates tarafından olmamakla beraber daha önceki yıllara dayanmaktadır. Antik Mısır'da M.Ö. 1600 'lü yıllarda insan kemik kanseriyle ilgili el yazmaları ve mumyalar tespit edilmiştir. M.Ö. 1500'lü yıllarda ise meme kanseri vakasıyla ilgili ilk kayıtlar yer almıştır. Kayıtlara bakıldığında kanserin tedavisinde geçici yöntemler kullanıldığı, tedavi edilemediği belirtilmiştir [1].

Günümüzde kanserle yapılan birçok çalışma neticesinde kanser oluşumu ile ilişkili en büyük etkiye sahip olan 3 gen grubunun varlığı tespit edilmiştir. Bunlar tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamir genleridir. Hücre bölünmesini ve çoğalmasını kontrol eden, herhangi bir hasar durumunda DNA tamirini başlatarak onarımı sağlayan, tamirin başarısız olması durumunda da apoptozu tetikleyen gen gruplarına tümör baskılayıcı genler denir. Tümör baskılayıcı genler arasında en çok bilineni ve çalışılanı p53 genidir. Çeşitli nokta mutasyonları, kromozomların düzgün ayrılmaması, delesyonlar, mitotik rekombinasyonlar ve epigenetik susturmalar tümör baskılayıcı gen işlevinde kayba yol açarak hücre döngüsündeki kontrolün kaybolmasına ve sonuçta da kanser oluşumuna neden olurlar. Proto-onkogenler ise çeşitli mutasyon, gen duplikasyonları, artmış gen ifadesi nedeniyle etkin hale geçerek onkogene dönüşebilirler. Onkogenler anormal bir şekilde protein kodlayarak kanser gelişim sürecinin başlamasında rol oynar. DNA tamir genleri ise, hasarlı DNA'yı onarmak üzere gerekli proteinleri o bölgeye çekerek genin işlevinin yeniden kazanılmasını sağlar. DNA tamir genlerinin bir diğer önemli işlevi ise onarımın başarısız olması durumunda hücrenin apoptoz veya nekroz ölüm yoluyla yok

edilmesini sağlamaktadır. Fakat bu gen grubundaki fonksiyon kayıpları hücrenin kanserleşmesinde çoğunlukla karşılaşılan bir sorun olarak tespit edilmiştir [2].

Bunların yanısıra kanserin meydana çıkmasında sigara ve alkol kullanımı, kötü beslenme alışkanlığı, obezite, iyonize radyasyon, mesleki hastalıklar ve çevresel kirleticiler etken olarak gösterilebilir. Ayrıca HPV (İnsan Papilloma Virüsü), Hepatit B ve Hepatit C gibi virüsler kanser oluşumunda çok çalışılan virüsler arasındadır [3].

1.1.1 Kanser tipleri ve prevalansı

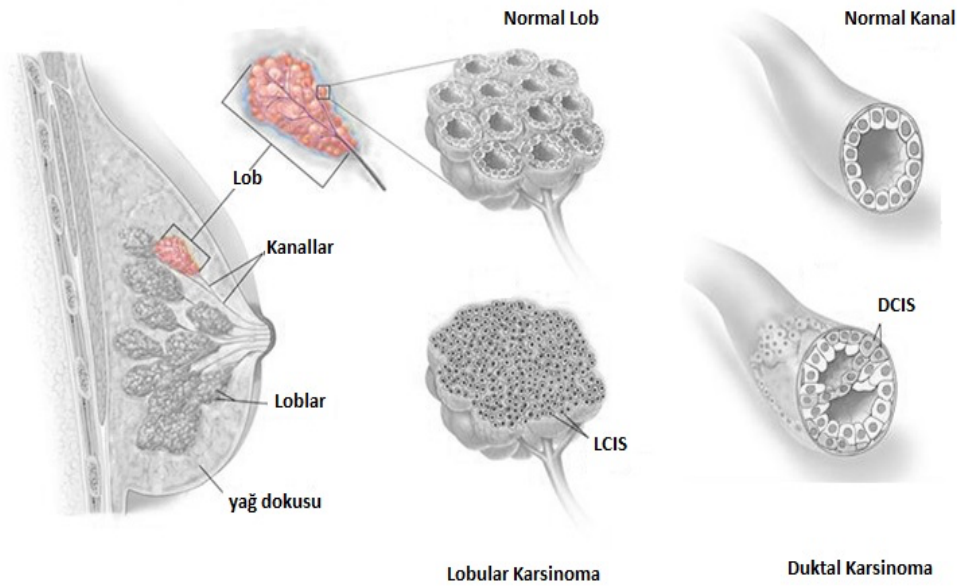
Kanser tipleri oluştuğu doku ve organlara göre isimlendirilip, sınıflandırılırlar. Pek çok kanser tipi var olmakla beraber en sık görülen kanserler akciğer, prostat, meme, deri, mide, mesane, kolon, karaciğer kemik iliği, endometriyum ve ovaryum kanserleridir. Kanser tiplerinin görülme sıklığı hem cinsiyet açısından hem de ırk ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen ve ölüme yol açan kanser tipi akciğer kanseridir. İkinci sırada ise kadınlarda meme kanseri, erkeklerde prostat kanseri yer almaktadır [4]. GLOBOCAN verilerine göre 2012 yılı içerisinde Dünya’da 14,1 milyon yeni kanser oluşumu görülmüş ve 8,2 milyonu ise kansere bağlı ölümlerle sonuçlanmıştır. Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi sonucunda, Dünya nüfusundaki artış ve yaşlanmaya da bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakasının gelişeceği düşünülmektedir. Kanser vakalarının ve kanser nedenli ölümlerin yarısından fazlasının az gelişen ülkelerde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel çalışmalar sonucunda özellikle meme kanserindeki yükselişe dikkat çekilmiş, meme kanseri insidansının önceki verilere göre %20, meme kanseri kaynaklı ölümlerin ise %14 arttığı saptanmıştır [5].

1.2 MEME KANSERİ

Meme kanseri, meme epitelyal dokusunda malign hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile karakterize edilmektedir. Bu hastalık her iki cinsiyeti de etkilemekle beraber kadınlarda görülme sıklığı çok daha fazladır. Kadınlar arasında en sık rastlanan kanser tipi olup her yıl milyonlarca kadın meme kanserinden etkilenmektedir. Meme kanseriyle ilgili raporlara göre 2012 yılına kadar dünya çapında kadınlar arasında kanserle ilgili ölümlerin %29’unu ve tüm kanserle ilgili ölümlerin %14’ünü oluşturmaktadır [6]. Meme kanseri diğer kanser tipleri gibi genetik ve çevresel

faktörler aracılığıyla meydana gelmekte olup hücreleri; anti büyüme sinyallerine karşı direnç, büyüme sinyalleri otonomisi, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezin devamlılığı, doku invazyonu ve metastaz, DNA tamir mekanizmasının bozulması ve metabolik dönüşüm geçirme gibi özelliklerine sahiplerdir [7-9].

Meme kanserinin tanımlanabilmesi ve iyi anlaşılabilmesi için öncelikle meme yapısını kavramak gereklidir. Memede salgı yapan hücreler lobül adı verilen yapıları oluştururlar ve bu lobüller birleşerek lobları oluşturmaktadırlar. Lobüllerin birbirine bağlanması süt kanalları aracılığıyla olur. Meme kanseri ise lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz bölünüp çoğalmasıyla oluşmaktadır. Süt kanallarından kaynaklı oluşan kansere duktal karsinoma, lobüllerden kaynaklı oluşan kansere ise lobüler karsinoma denilmektedir (Şekil 1) [10].



Şekil 1. Meme Yapısı, LCIS ve DCIS oluşumu [150]

Kanserli hücreler türevlendikleri yer ile sınırlı kalıp yayılmazsa in situ, yayılma eğilimi gösterirler ise invaziv meme kanseri olarak isimlendirilirler [11]. İn situ karsinomlarda stromal invazyon görülmezken, invaziv karsinomlarda ise bazal membran aşılı olarak stromal invazyon oluşumu görülmektedir. Bu nedenle invaziv meme karsinomları,

bölgesel lenf nodlarına ve uzak organlara metastaz yapabilmektedirler. Ayrıca meme kanserlerinde %65-80'lik bölüm invaziv meme karsinomlarını teşkil eder [12].

1.2.1 Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir ve kadınlardaki kanserlerin tümünün %23'ünden sorumludur [13]. Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinin arkasından ikinci sırada gelmekte olup, 40-59 yaş arası kadın ölümlerinin başlıca nedenidir. Zaman içerisinde meme kanseri görülme sıklığında artış gerçekleşse de erken tanı ve tedavideki gelişmeler sayesinde ölüm oranlarında düşüş görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidansındaki artış 2001 yılından sonra azalmaya başlamıştır; 2004 yılından sonra ise bu azalma yavaşlayarak devam etmektedir [14]. Sağlık Bakanlığı'nın Türkiye'de araştırmalarına bakıldığında ise, kadınlar arasında meme kanseri insidansının oranının 35/100.000 olduğu tespit edilmiştir [15].

Meme kanseri görülme sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye göre farklılık göstermekte ve en yüksek meme kanseri görülme oranı Kuzey Amerika' da bulunmaktadır (99.4/100.000). Buna karşın en düşük ölüm oranı yine Kuzey Amerika' ya aittir. Çin ve Afrika' da meme kanseri olma oranı çok düşük olmasına rağmen (sırasıyla 11,7 ve 13.64/100.000) yüksek ölüm oranları görülmektedir. Meme kanserine bağlı ölüm az gelişmiş ülkelerde gelişmiş ülkelere oranla daha yüksek görünmektedir. Kanser oluşum riski, yaş ile doğrudan ilişkili olup, yaşın artmasıyla beraber hastalık görülme sıklığı da giderek artmaktadır. Görülme oranı ve ölümdaki bu farklılıkların nedeninin yaş, üreme ve yaşam şekli gibi faktörlerdeki çeşitliliklerin yansımaları olduğu düşünülmektedir [13].

1.2.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri üzerine yapılan pekçok çalışmadan anlaşılacağı üzere oluşum ve gelişim sürecinin farklılıkları söz konusudur. Bu farklılıklar günümüzde bilinen birçok risk faktörü nedeniyle oluşmaktadır. Risk faktörleri içerisinde en önemlileri ise yaş, üreme, aile geçmişi, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerdir [16].

1.2.2.1 Yaş ve Üreme ile İlgili Faktörler

Meme kanserine yakalanmada en etkili olan risk faktörleri incelendiğinde ileri yaşa sahip olmanın önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir [16]. Yapılan bir çok çalışmada menopoz öncesi yaşlarda meme kanseri riskinin giderek arttığı tespit edilmiştir [17]. Dünyada meme kanseri teşhisi konan kadınlar üzerinde yapılan çalışmaların sonucuna bakıldığında %70'inin 50 yaş ve üzerinde olduğu görülmektedir [18]. Sağlık Bakanlığı'nın kadınlar üzerinde yaptığı istatistiksel çalışmalara bakıldığında ise meme kanseri riskinin yaşa bağlı olarak giderek arttığı ve özellikle 45-49 ve 50-54 yaş aralığındaki kadınlarda meme kanseri riskinin daha fazla olduğu anlaşılmaktadır [19]. Meme kanserinin oluşumunda kadınların hamilelik yaşının etkinliği söz konusudur. Bireylerde 30 yaşından önce gerçekleşen gebeliklerde koruyucu etkinin varlığı görülürken, 30 yaşından sonra gerçekleşen gebeliklerde ise meme kanserine yakalanma oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır [20]. Ayrıca kadınlarda erken yaşta menarş ya da ileri yaşta menopoz görülmesi durumunda da meme kanseri riskinin arttığı görülmektedir [21].

1.2.2.2 Ailevi Geçmiş

Aile bireyleri arasında meme kanserine yakalanmış kimsenin bulunması, kişinin meme kanserine yakalanma olasılığını yükselttiği ifade edilmektedir. Özellikle annesi ya da kız kardeşi meme kanserine yakalanan bir kadının, meme kanserine yakalanma riski ciddi önem teşkil etmektedir [22-24]. Meme kanseri oluşumunda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde gerçekleşen mutasyonlar çok önemli rollere sahiptirler. *BRCA1* geni 17. kromozom üzerinde yer alırken, *BRCA2* geni 13. kromozom üzerinde yer almaktadır. Aile bireyleri içerisinde *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonuna sahip olunması durumu meme kanserine yatkınlıkta artış olduğunu göstermektedir. Çünkü kadınlarda var olan meme kanserlerinin %80-85'inde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde gerçekleşen mutasyonların varlığı söz konusudur [24].

1.2.2.3 Yaşam Tarzı

Meme kanserinde diğer bir risk faktörü olarak yaşam tarzını görmekteyiz. Bu risk faktörü içerisinde en önemli olanları ise alkol ve sigara kullanımı olup gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda alkol kullanımındaki artışın meme kanseri oluşum riskini doğrusal bir şekilde %30 arttırdığını görmekteyiz. Alkol kullanımının yanı sıra sigara kullanımı da meme kanseri oluşum riskini yükseltmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu

günümüzde sigara kullanan bireylerin mutasyona yatkınlığının olduğu ve buna bağlı olarak sigara kullanmayan bireylere kıyasla meme kanserine yakalanma riskinin de çok daha fazla olduğu belirlenmiştir [16].

1.2.2.4 Çevresel Faktörler

Meme kanseri gelişiminde çevresel faktörler de önemli rol oynar ve bu faktörler arasında en önde gelen iyonize radyasyondur. Özellikle genç yaştaki kadınların iyonize radyasyona maruz kalması kanser riskini büyük oranda arttırmaktadır. Çünkü erken yaşlarda vücuttaki hücre bölünmesi daha fazladır, radyasyon sonucu açığa çıkan DNA hasarı böylelikle daha çok replike olur ve kanser riski artar. Radyasyona maruz kalma miktarı arttıkça doğru orantılı olarak kanser oluşumu riski de artmaktadır. Ayrıca kullanılan çeşitli kimyasal maddeler ve elektromanyetik radyasyon da mutasyon oluşumunu etkileyeceğinden dolayı meme kanseri oluşum riskini de arttırmış olur [25].

1.2.3 Tedavi Yöntemleri

Meme kanserinde kullanılan pek çok tedavi türü mevcut olmakla birlikte, hangi tedavi yönteminin kullanılacağına belirlenmesinde en önemli etken hastalığın evresidir.

1.2.3.1 Cerrahi Yöntem

Meme kanseri olan bireylerin çoğunun cerrahi operasyon geçirmesi gerekebilir ve bu uygulanan en yaygın tedavi yöntemidir. Sadece memedeki tümörün alındığı ancak memenin alınmadığı cerrahi operasyona bölgesel mastektomi denir. Tümörlü dokular alınırken etraftaki bazı sağlıklı dokular da alınır. Total mastektomi ise tüm meme dokusunun alındığı durumdur. Koltuk altındaki lenf nodüllerinin alınmadığı duruma basit mastektomi denilirken memenin tümünün alındığı, koltuk altındaki lenf nodüllerinin çoğunun ya da tümünün alındığı duruma ise modifiye radikal mastektomi denir [26]. Yapılan çalışmaların çoğunda mastektomi sonrasında alınan memeyi yeniden oluşturmak amacıyla rekonstrüktif cerrahi de uygulanır [27].

1.2.3.2 Radyoterapi

Radyoterapi meme kanseri tedavisinde kullanılan diğer bir yöntem olup kanser hücrelerini öldürmek veya çoğalmalarını engellemek adına yüksek enerjili x-

ışınlarının kullanıldığı bir kanser tedavi türüdür. Radyasyon vücut dışından uygulanabileceği gibi (eksternal radyasyon) tümörün içine radyoaktif madde yerleştirilerek de uygulanabilir (internal radyasyon). Radyoterapi tedavisindeki amaç kanserli dokuyu yok ederken sağlam dokulara minimum düzeyde zarar vermektir. Radyoterapi uygulama yolu, kanserin evresine ve türüne göre değişkenlik göstermektedir. Çoğunlukla mastektomiden sonra o bölgede kalmış olabilecek kanserli hücreleri yok etmek için radyoterapi uygulamaları gerçekleştirilmektedir [28]. Bazı durumlarda ise cerrahi yaklaşım öncesi radyoterapi uygulanarak tümörün küçültülmesi hedeflenmektedir. Tümörün büyük olduğu veya çıkarılmasının güç olduğu durumlarda bu yaklaşım tercih edilmektedir. Ayrıca cerrahi yöntem öncesinde kemoterapi veya hormon tedavisi de uygulanabileceği ifade edilmektedir [29].

1.2.3.3 Kemoterapi

Kemoterapi, kanserli hücrelerin ölümüne neden olan ilaçların damar yoluyla ya da hap şeklinde uygulanması işlemidir. Uygulama sonucunda kan dolaşımına giren ilaçlar tüm vücuda dağılmakta ve yayılan kanserin tedavisi sağlanmaktadır. Fakat kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerini öldürürken bazı normal hücrelere de zarar vermektedir. Bu durumda çeşitli yan etkilere yol açmaktadır. Cerrahi operasyon sonrasında kemoterapi uygulaması, meme kanserinin tekrarlama olasılığını azaltmak amacıyla gerçekleştirilmektedir [30].

1.2.3.4 Hormonal Terapi

Meme kanserinde hormonal tedavi ilaçlarından faydalanabileceğini gösteren iki belirteç, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörüdür (PR). Meme kanseri hücreleri, özellikle östrojen hormonunun etkisiyle giderek kontrolsüz bir şekilde çoğalmakta ve tüm vücuda yayılım göstermektedir. Östrojenin etkilerini engelleyen tamoksifen gibi ilaçlar, vücutta özellikle östrojenle yarışarak tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan östrojen ve progesteron reseptörlerine bağlanmaktadır. Bunun sonucunda östrojenin yaptığı hücre çoğaltıcı etkiye ket vurulmuş olur [36]. Menopozda olan meme kanseri hastalarında aromataz inhibitörleri olarak adlandırılan ve östrojen sinyal yolağının aktivitesini düşüren ilaçların da faydalı olduğunun gösterilmesi sebebiyle tedavide uygulanmaktadır. Ayrıca menopoza henüz girmemiş hastalarda yumurtalıkların fonksiyonu; radyoterapi, cerrahi veya

medikal yöntemlerle engellenerek östrojen üretimi baskılanabilmektedir. Bu yöntemlerin ve ilaçların uygulanabilmesi için kanserli dokudaki hormon reseptörlerinin tespiti yapılmalıdır [31].

1.3 Meme Kanserinin Moleküler Mekanizması

Meme kanseri hücrelerinde p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin ve HER2/neu gibi onkogenlerin aşırı ekspresyonuyla çeşitli moleküler değişiklikler meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonları da meme kanserinde çokça tespit edilmektedir. Meme kanseri oluşumunda büyüme faktörlerinin ve meme gelişiminde rol alan hormonların da önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenik sistemin en önemli uyarıcılarından biri olup damar geçirgenliğini arttırmaktadır. Ayrıca VEGF matriks metalloproteinaz (MMP) salınımını uyarak metastaz ve invazyonu kolaylaştırır.

Ön hipofiz bezinden salınan ve meme gelişimi üzerinde etkisi olan prolactin (PRL) üzerinde yapılan bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlar bir proto-onkogen olan c-Myc'in meme kanseri üzerinde STAT-5 ko-aktivatörü olarak işlev gördüğünü ve gen ekspresyonunu etkin hale getirdiğini göstermektedir [32, 33]. Bunun yanı sıra PRL, JAK2'nin katalitik aktivasyonu ile reseptörünün ubikuitinleşmesini, internalizasyonunu ve degradasyonunu uyarmaktadır. JAK2 aracılı sinyalleşmede prolaktin reseptörü'nün (PRLR) Ser349'da fosforile olmasının da önemli bir olay olduğu görülmektedir [34]. Yapılan bir diğer çalışmalar ise PRL-PRLR-JAK2-STAT5 sinyal yolağının tümör başlangıcında önemli olduğunu ancak daha sonraki ilerlemede önemli olmadığını ortaya koymaktadır. Transformasyondaki bu erken rolü desteklemek amacıyla PRL-STAT5'in, meme kanseri-1'in (*BRCA1*) tümör baskılayıcı fonksiyonuna müdahale ettiği bildirilmiştir. PRL-STAT5 sinyali, PRL varlığında proliferasyona izin verirken, hücre döngüsü inhibisyonunun *BRCA1* tümör baskılayıcı fonksiyonuna müdahale eder. Barcus ve arkadaşları tarafından kolajen matrikslerindeki meme kanseri hücrelerinin, MAPK sinyalinden ziyade JAK2-STAT5 sinyalini aktive ettiğini göstermişlerdir [35]. Ayrıca VEGF'nin de PRL ile indüklenebildiği tespit edilmiş ve bunu PRLR, JAK2 ve MAP kinaza bağlı olarak gerçekleştirdiği ortaya konmuştur [36]. Dolaşımdaki prolaktin konsantrasyonları ve meme kanseri riski arasındaki ilişki iyi çalışılmış olmasına rağmen, PRL veya

prolaktin reseptör (PRLR) genlerindeki genetik polimorfizmlerin PRL seviyelerini, reseptör ekspresyonunu ve sonuçta meme kanseri riskini etkileyip etkilemediği hakkında çok az şey bilinmektedir. Ek olarak, yüksek prolaktin seviyelerinin sadece prolaktin reseptör pozitif meme tümörleri riskini artırabildiğini değerlendiren kesin çalışmalar da mevcut değildir [37].

Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre PRL yanında yine ön hipofiz bezinden salgılanan BH adı verilen hormonunda meme kanseri ile ilişkisinin olduğu ifade edilmiştir. BH, postnatal büyüme ve gelişmeyi sağlayan anabolik bir hormon olması yanında meme hücrelerinde farklılaşma ve çoğalma mekanizmalarında görev almaktadır. Ayrıca büyüme hormonunun fazla salgılanması durumunda, çevresel ve genetik faktörlerle beraber meme kanseri gelişiminin tetiklendiği saptanmıştır [38]. Büyüme hormonu, insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-I) salınımını tetikleyerek birlikte de etki gösterebilmektedir. Meme kanserinin önlenmesine yönelik yapılan çeşitli çalışmalar ise BH ve IGF-I eksikliğinin önemli ölçüde rolünün olduğunu göstermiştir [39].

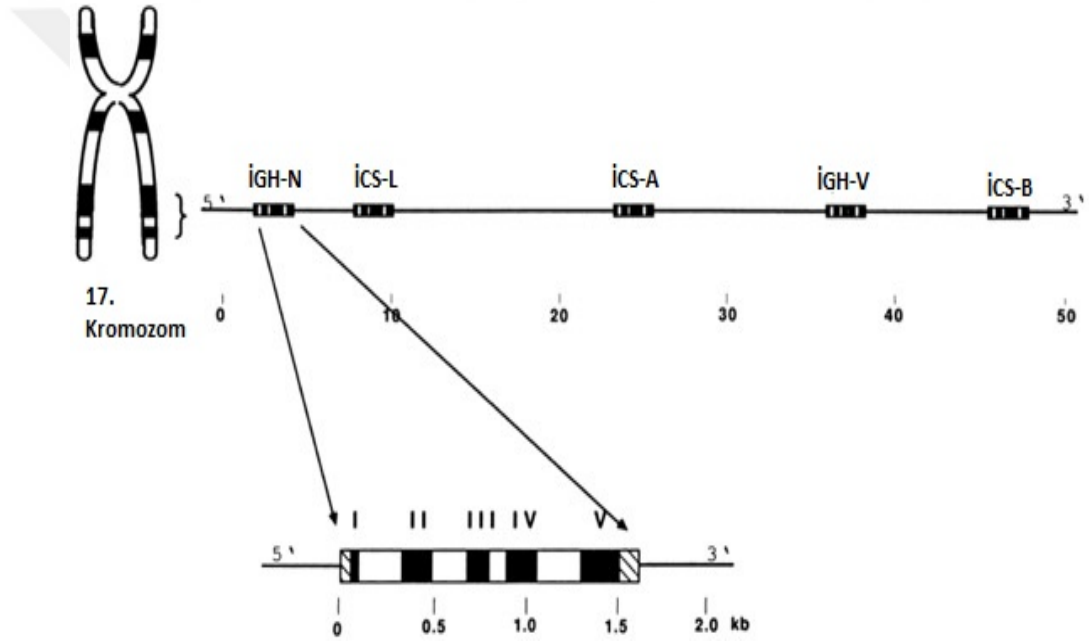
1.3.1 Otokrin Büyüme Hormonu ve Meme Kanseri Arasındaki İlişki

Meme bezlerinin normal gelişimindeki önemli pek çok hormonun ve özellikle BH'ın salınımının kontrolü hipofiz tarafından gerçekleştirilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda BH ve PRL gibi hormonların tümör gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir. Meme kanseri gelişiminde, BH seviyelerinin en önemli faktör olduğuna yönelik araştırmaların güçlü desteği olmamakla birlikte, meme kanseri görülen hastaların serumlarında BH seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir [40]. Büyüme hormonunun, meme karsinom hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı, EMT'yi uyardığı, invazyonu ve metastazı tetiklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [41].

2005 yılında Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma otokrin BH üretiminin insan karsinoma hücrelerinde, JAK2'ye bağlı büyümeyi arttırdığını göstermiştir. Büyüme hormonu, insan epitel hücrelerinin (MCF-10A) proliferasyonunu artırarak, apoptozu azaltarak ve hücre morfolojide değişikliklere neden olarak onkogenik transformasyona neden olmaktadır. Aynı zamanda otokrin büyüme hormonunun insan epitel hücrelerinde siklin D1, c-myc ve Bcl-2 gibi genlerin transkripsiyonunda artışa neden olduğu saptanmıştır [42].

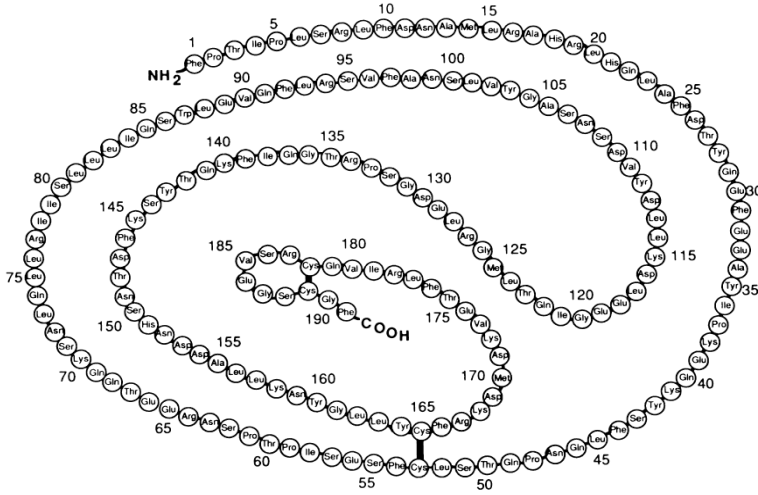
1.4 BÜYÜME HORMONU (BH)

Büyüme hormonu geni insanda 17. kromozom üzerinde yer alan hipofiz bezi kökenli bir hormondur. Ayrıca 17. kromozom üzerinde beş tane büyüme hormonu geni bulunmaktadır ve bu gen ailesi insan büyüme hormonu normal (iBH-N), insan koryonik somatomammotropin L (iCS-L), insan koryonik somatomammotropin A (iCS-A), insan büyüme hormonu varyantı (iBH-V), insan koryonik somatomammotropin B (iCS-B) olarak sırasıyla kromozom üzerinde dizilmiştir. Bunlardan iBH-N ve iBH-V birbirine benzer yapıya sahiptir ve sadece iBH-N hipofiz bezinde, iBH-V plasentada eksprese edilmektedir [151]. Ayrıca iBH-N geni 5 ekzon ve 4 intron bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 2) [43].



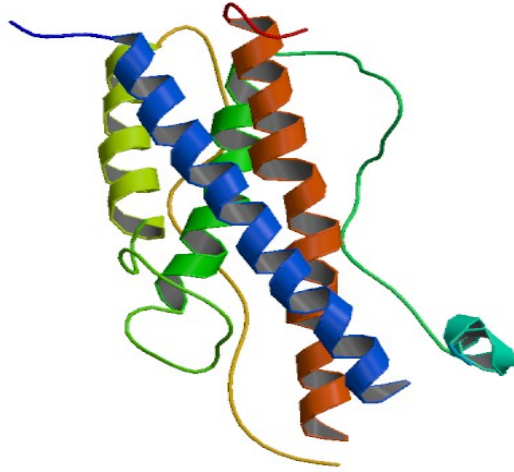
Şekil 2. İnsan büyüme hormonu gen ailesi [210]

BH salınımında görevli hücreler somatotrop olarak adlandırılır ve büyüme hormonu, somatotrop hücrelerden salgılanan, sistein amino asitlerinin arasında kurulan iki disülfid bağı ile üçüncül yapısına kavuşan, 22 kDa molekül ağırlığına sahip polipeptid bir hormondur (Şekil 4).



Şekil 3. İnsan büyüme hormonu amino asit dizisi [210]

Şekil 3 'te insan büyüme hormonu amino asit dizisi yer almaktadır. Plasenta tarafından salgılanan büyüme hormonu ile hipofizden salgılanan büyüme hormonunda 13 farklı aminoasit dizilimi görülmektedir. Ayrıca plasentadan salınan büyüme hormonu, gebeliğin yarısında hipofizden salınan büyüme hormonunun yerini alarak daha fazla laktojen etki yaratılmasına sebep olmaktadır [44].



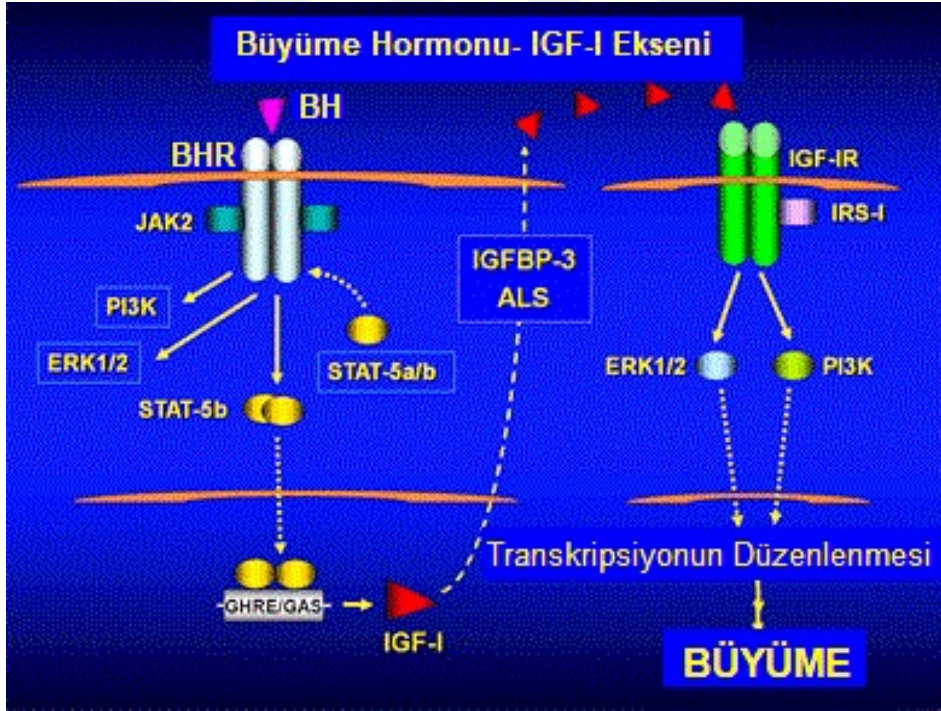
Şekil 4. İnsan büyüme hormonu üç boyutlu yapısı [211]

1.4.1 Büyüme Hormonu Sinyali

Büyüme hormonu (BH) molekülünün hücre membranında ki ardışık iki BHR molekülüne bağlanmasıyla dimerizasyon gerçekleşir ve dimerizasyonun gerçekleşmesiyle JAK-2 aktifleşir. JAK-2 aktifleşme sonucu hem kendisini hem de

tirozin kinaz aktivitesi olmayan BHR'yi fosforiller ve böylece BH sinyal iletimi, çeşitli yollar üzerinden devam ettiği belirlenmiştir. Bunların en iyi tanımlanmış olanları, MAPK, STAT, (sinyal iletili ve transkripsiyonu başlatan) ve PI3 kinaz (fosfatidil inozitol 3-OH kinaz) yollarıdır (Şekil 5). Bu yollar ortak amaç BH'nin etkilerini göstermesini sağlayan genlerin aktifleştirilmesidir [45].

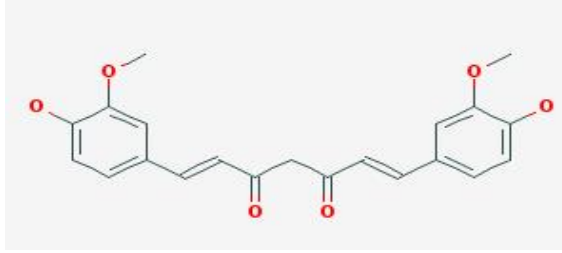
BH'nin en önemli görevi IGF-I'in yapımını uyarmaktır. BH'nin bir çok dokuda BHR'ye bağlanması sonucu IGF-I gen transkripsiyonu başlamasına takiben IGF-I'in salınımı artmaktadır. IGF-I dolaşımında, yapımı yine BH kontrolünde olan IGFBP3'e (İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3) bağlı olarak dolaşır. IGFBP3, IGF-I ve ALS'ye (asite hassas alt birim) bağlanarak bir yapı oluşturur. Böylece dolaşımında IGF-I'in sabit kalması, plazma yarı ömrünün uzaması ve dolaşımında IGF-I deposu oluşması sağlanmış olur. Ayrıca bu taşıma sistemi IGF'lerin kılcal damar duvarından geçişini de düzenlemektedir [46].



Şekil 5. Büyüme hormonu sinyal yolağı [212]

1.5 Curcumin

Curcuma longa, güney ve güneydoğu tropikal Asya'da yaygın olarak yetiştirilen zencefil ailesine ait sarı çiçekli, çok yıllık otsu bir bitkidir. Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin kökünden izole edilen ve insanlar için toksik olmayan, aynı zamanda da halk arasında köri olarak bilinen bir baharattır [47]. Moleküler ağırlığı 368,37 g/mol olan curcuminin erime noktası ise 183°C' dir. Suda çözünmeyen fakat DMSO, etanol ve asetonda çözünebilir bir kimyasal yapıya sahiptir (Şekil 6) [48]. Bazı kanser türlerinde, curcuminin kanserli hücrelerin bölünmesini durdurarak, ölüme götürdüğü saptanmıştır. Anti-kanser bir ajan olarak curcuminin etkisine bakıldığında, pek çok doku ve organlarda tümör oluşumunun baskılandığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [49, 50]. Ayrıca curcuminin antioksidan özelliği sayesinde ise alkolün, radyasyonun, ilaçların ve ağır metallerin çeşitli organlar üzerinde oluşturduğu hasarı önlediği saptanmıştır [50, 51].



Şekil 6. Curcuminin kimyasal yapısı [213]

Epidemiyolojik çalışmalarda, Doğu Hindistan'da kanser insidansının düşük olduğu saptanmış ve bu durumun sebebinin bölgede curcuminin yüksek oranda kullanılmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür [52, 53]. Curcuminin kanser hücreleri üzerinde, kaspaz-8'i aktive ederek Bid üzerinden dış apoptotik yolağı etkilediği; sitokrom-c salınımı, kaspaz- 3, 9 aktivasyonu ve PARP kesilimi ile de iç apoptotik yolağı etkilediği belirlenmiştir [52]. Bunun yanında curcumin, çeşitli hormonların sentezini ve salınımını düşürerek hücre proliferasyonuna ket vurduğu ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir [54, 55]. Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada curcumin ile birlikte meme kanserinin akciğer metastazları insidansında büyük ölçüde azalma görüldüğü belirtilmiştir [56].

1.5.1 Curcumin ve Meme Kanseri

Curcuminin meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalarına bakıldığında doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve hormon negatif hücrelerde p53 anlatımını arttırarak Bax/Bcl-2 ve p21 oranı gibi apoptotik markırları tetikleyerek hücreyi apoptoza götürdüğü belirlenmiştir [57].

Curcuminin pek çok tümörlerde gelişim ve metastaz sürecini baskılayıcı rolde yer aldığını görmekteyiz [58]. Bu anti-karsinojenik etkinliğini ise çeşitli inflammatuar sitokinleri, büyüme hormonlarını, transkripsiyon faktörlerini, protein kinazları ve pek çok onkojenik molekülleri negatif yönde regüle ederek ortaya koymaktadır [59].

1.5.2 Curcuminin Klinik Uygulamaları

Curcumin üzerine yapılan çalışmalar curcuminin anti-karsinojenik, anti-inflammatuar etkinliğini ortaya koymuştur. Bu etkinlik pek çok kanser türünde *in vitro* ortamda ispatlanmış olmasına rağmen *in vivo* ortamda ise fare modelleri üzerinde metastazi engelleyici ve tümör baskılayıcı rolünün olduğunu göstermiştir [60]. Klinik vakaların çoğunda curcuminin günlük 8.000 mg doz uygulamasının tedavi edici etkin bir rolde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca curcuminin günlük ilaç uygulama dozunun 12.000 mg olarak daha etkin olacağı üzerinde çalışmalar da yer almaktadır [61].

Pre-klinik çalışmalarda meme kanseri hastalarına curcumin merhemi uygulanmış ve sonucunda lezyon büyüklüğü, kaşıntı ve ağrılarda meydana gelen anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir [62]. Yapılan bir diğer çalışmada ise curcumin karaciğer kanser hücrelerinde hücre siklusunu durdurarak sitotoksik etki gösterdiği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur. Farelerdeki hepatokarsinoma hücrelerinde curcuminin metastaza karşı etkisi COX ve VEGF'nin anlatımının azalmasına bağlı olarak açıklanmıştır [63]. Ayrıca kötü huylu beyin tümörü (glioblastoma) hücrelerinde curcuminin terapötik etkinliğine bakılmış ve curcuminin bu hücreler üzerinde NF-κB sinyal yolağını inhibe ettiği bulunmuştur [64-66]. Bu kanser türünün ksenograft modelinde; tümör büyümesinin büyük ölçüde inhibe edilmesi ve otofajinin indüklenmesi curcumin tarafından sağlanmıştır. Tedavisi curcumin ile gerçekleştirilen grubun tümör hacimlerinde ise yaklaşık 3 kat düşüş olduğu saptanmıştır [67].

Pankreas kanserine sahip kişilerde curcumin ile yapılan klinik çalışmalarda hastalığı stabil devam eden kişilerin sitokin seviyelerinde (IL-6, IL-8, IL-10 reseptör antagonistleri) anlamlı artışlar görülürken belirgin bir tümör gerilemesi de tespit edilmiştir [68]. Curcuminin lenfomada etkisine bakıldığında, JAK-1 ve STAT3 aktivitesini engelleyerek çoğalmayı inhibe ettiği ve böylece apoptozu indüklediği saptanmıştır [69]. Fare ksenograft modelinde ise oral curcumin (50-200 mg/kg) uygulanmasının lenfoma hücrelerinin gelişimini durdurduğu gösterilmiştir [70]. Akciğer kanserinde ise cis-diamin-dikloroplatin ile curcuminin kombine olarak kullanımı sonucunda lenfatik metastazlı tümör gelişiminin engellendiği saptanmıştır [71].

Sağlıklı hücre üzerine toksik etki göstermemesi, antioksidan ve anti-karsinojen aktivitesinin yüksek olması, düşük molekül ağırlığa sahip olması curcuminin ideal bir kemoterapötik ajan olmasını sağlamaktadır [63]. Ancak düşük biyoyararlanıma sahip olmasından ötürü çeşitli analoglarının sentezlenmesi ya da kombin tedavilere geçilerek etkinliğinin artırılması gerekmektedir. Farmakolojik etkinliği yüksek analoglar, nanopartiküller, ve biyoyararlanımı daha yüksek, toksik etkileri daha az bileşikler elde edilmeye çalışılmalıdır [72].

1.6 APOPTOZ

Apoptoz programlı bir hücre ölümüdür ve normal hücre döngüsünün, bağışıklık sisteminin uygun gelişim ve işleyişinin, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümünün hayati bileşeni olarak kabul edilmektedir [73]. Mitokondriyal sinyal (intrinsik) yolağı ve ekstrinsik sinyal yolağı olmak üzere iki yollak üzerinden gerçekleşen bir mekanizmaya sahiptir.

1.6.1 İntrensik Sinyal Yolağı

İntrensik sinyal yolağı mitokondri üzerinden başlayarak ilerleyen, reseptörlerden bağımsız olarak gerçekleşen bir sinyal yolağıdır. Apoptotik hücre ölümünde ise pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler denilen iki temel protein grubu görevlidir. Bak, Bax, Bim, Bid ve Puma pro-apoptotik protein grubunda yer alırken Bcl-2 ve Bcl-xL anti-apoptotik protein grubundadır. Kaspazlar ise apoptotik hücre ölümünün başlama ve sonlanma aşamalarında görev alan bir diğer protein ailesi grubudur. Başlama

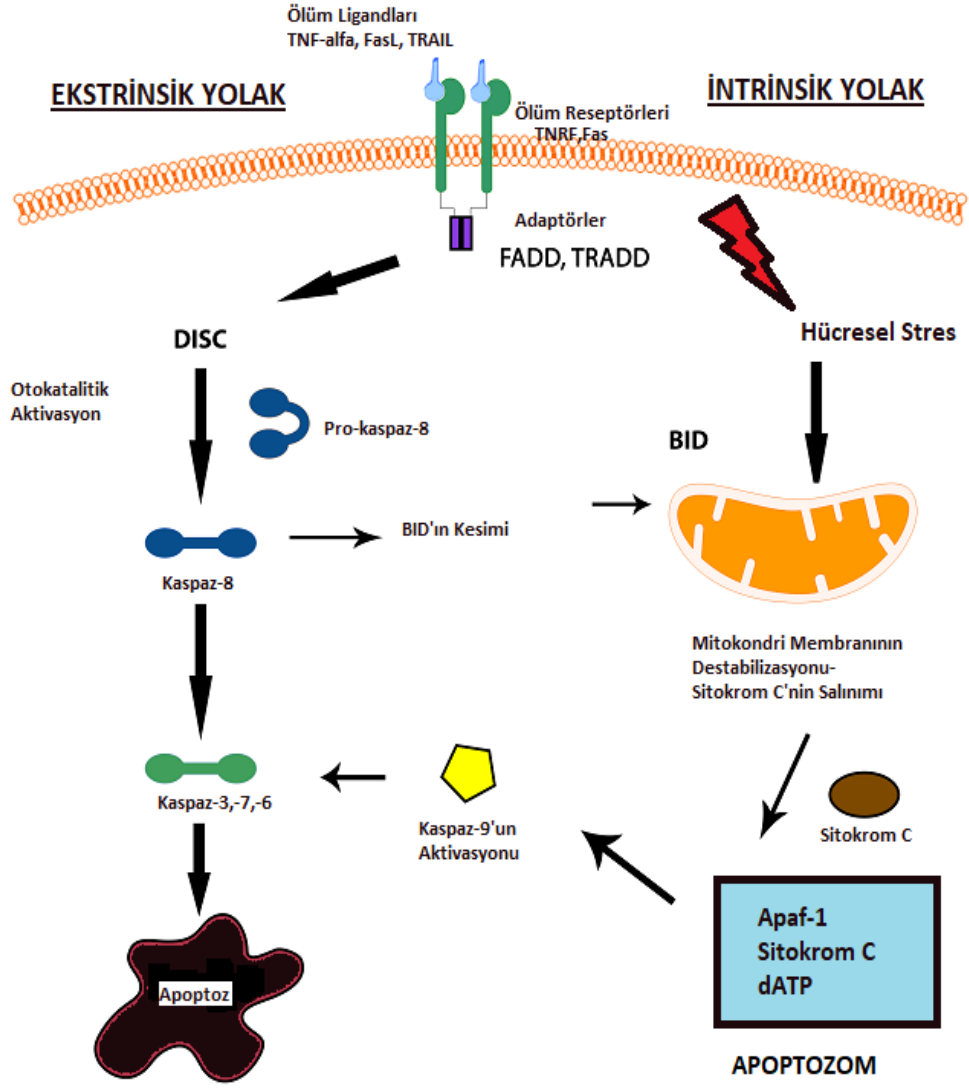
aşamasında görev alan kaspazlar kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 iken sonlanma aşamasında görev alanlar ise kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'dir.

Hücrel stres, DNA hasarı, radyoterapi ve kemoterapi durumunda 2 önemli pro-apoptotik protein (Bak ve Bax) anında aktive olurlar. Aktif olan Bak ve Bax proteinleri mitokondri membranından sitoplazmaya açılan kanallar oluştururlar ve bu kanallardan sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımını gerçekleştirirler. Salınan sitokrom C Apaf-1'e bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur ve böylelikle kaspaz-9 aktif hale gelir. Aktif kaspaz-9 ise kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-6'nın aktivasyonunu sağlayarak apoptotik hücre ölüm sürecini başlatmış olur (Şekil 7) [73].

1.6.2 Ekstrinsik Sinyal Yolağı

Ekstrinsik sinyal yolağı ölüm reseptörleri denilen transmembran reseptörler aracılığıyla olmaktadır. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (TNRF, Fas, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla sinyal aktivasyonu gerçekleşir. Sinyal FADD ve TRADD üzerinden hücre içine aktarılır. Pro-kaspaz-8 kesilerek aktif form oluşur ve aktif kaspaz-8 de Bid kesilimini gerçekleştirir. Ayrıca diğer bir yol olarak aktif kaspaz-8; kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-6'nın aktivasyonunu da gerçekleştirebilir [74, 75].

Her iki sinyal yolağı sonrasında aktif hale gelmiş kaspazlar hücrede apoptotik cisimciklerin oluşumunu sağlar ve böylece programlı bir hücre ölümü gerçekleşmiş olur (Şekil 7).



Şekil 7. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal yolağı [214]

1.7 ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRES

Endoplazmik retikulum membranla çevrili, ağısı bir hücre içi organel olup sentezlenen proteinlerin katlanmasında rol oynar. Çeşitli biyolojik şartlar (aşırı lipit birikimi, hipoksi, toksinlere maruz kalma, açlık vb) endoplazmik retikulum homeostazisinin bozulmasına, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesine ve sonuç olarak ER strese neden olabilir. ER stres oluşum sonrasında etkinin azaltılması için UPR (katlanmamış protein cevabı) uyarılır ve böylece protein sentezini yavaşlatan, protein yıkımını arttıran bir sinyal yolu aktive edilmiş olur [76, 77].

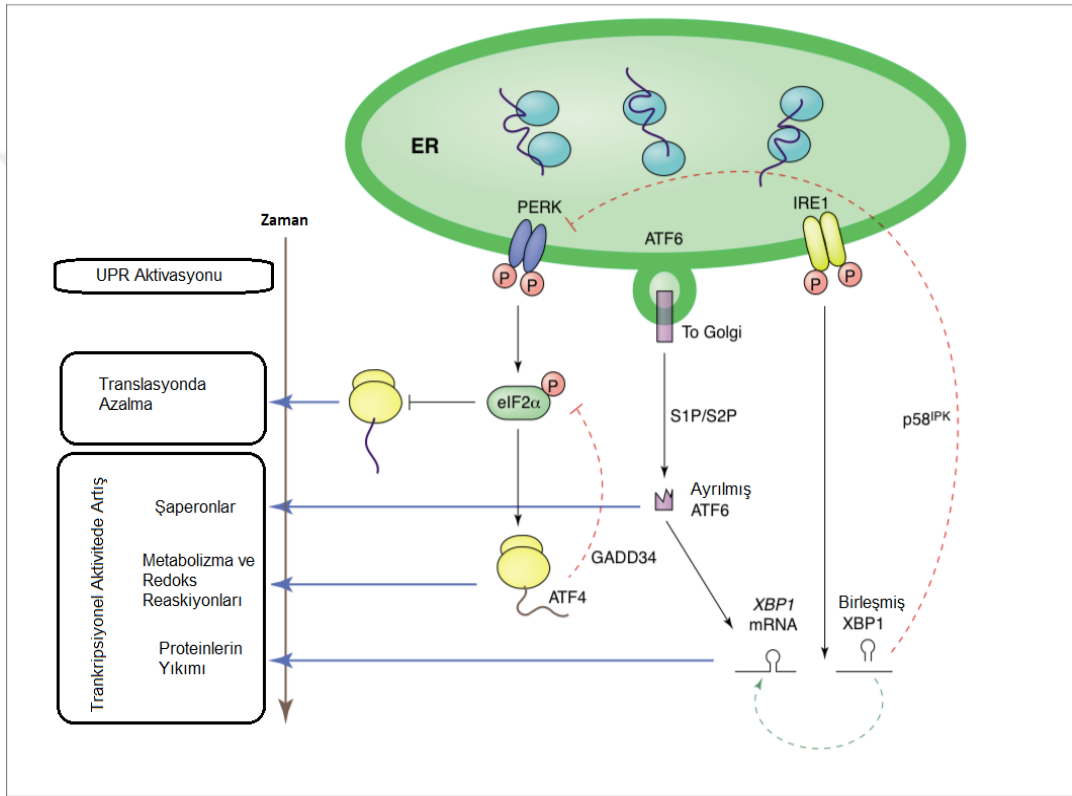
UPR'nin aktivasyonunu düzenleyen 3 farklı transmembran protein mevcuttur ve bunlar; PERK, IRE-1 ve ATF-6'dır. Yanlış katlanan proteinlerin birikmesiyle PERK, IRE-1 ve ATF-6 yolu aracılığıyla strese karşı cevabı oluşturulur (Şekil8). UPR'nin aktivasyonu; protein sentez yükünün azalması, endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinlerin birikmesini engelleme, endoplazmik retikulum şaperonları ve katlanma enzimlerini kodlayan genlerin translasyonunun arttırılması gibi pekçok hücreseel yanıtlara neden olmaktadır [78, 79].

PERK kinaz bağımlı, translasyonu yavaşlatan tip I transmembran proteindir [80]. ER stresinin birincil cevabı, PERK aktivasyonu yolu ile ökaryotik başlama faktörü (eIF2 α) nü fosforilleyerek gerçekleşir. Fosforillenmiş eIF2 α hücre içerisindeki translasyonu durdurur [81]. Fakat ATF4 gibi bazı spesifik mRNA'ların translasyonu devam ederek miktarında artış gözlemlenir. Bunun sonucunda ER strese karşı hücrenin protein yükü azaltılmış olur ve katlanmamış proteinlerin düzeltilmesi sağlanır. ATF4 nukleusa göç ettikten sonra aktive olan CHOP, bir apoptoz sinyalini uyararak programlı hücre ölümüne neden olur. PERK ayrıca Nrf2'yi de fosforillemektedir [78, 80, 82].

IRE-1 hem endonükleaz domaine hem de serin treonin kinaz domainine sahip çift aktiviteli transmembran bir proteindir. İki izoformu mevcuttur ve bunlar IRE-1 α ve IRE-1 β ' dir [83]. IRE-1 Grp78 ile beraberken inaktif formdadır ancak ER stresin başlaması ve Grp78'in ayrılması ile dimerize olarak otofosforillenir. Aktif IRE-1 RNAaz aktivitesiyle XBP'yi (X-box bağlayıcı protein) kırarak oluşan XBP1

translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşür. Böylelikle katlanmaya yardımcı olan enzimlerin up regülasyonuna sebep olur [84].

ATF6, hücre içerisinde ER stresin olmadığı durumlarda Grp78 ile birlikte inaktif formda yer almaktadır. Stres durumunda Grp78 katlanmaya yardımcı olmak amacıyla lümeneye gönderilirken ATF6'da modifikasyona uğrayarak golgiye gönderilir. Önce site 1 proteazla daha sonra site 2 proteaz ile kırılan ATF6 nukleusa göç eder. Daha sonra Grp78, Grp94 gibi şaperonların ekspresyonu artar. Sonuç olarak bu proteinlerin sentezi çoğalır ve strese karşı korunma mekanizması aktif hale gelir [85-87].



Şekil 8. UPR Yolakları [88]

1.7.1 Endoplazmik Retikulum ve Apoptoz Arasındaki İlişki

UPR yolağı ER stresi azaltmak ve hatalı katlanmış proteinleri düzeltmek üzere aktive olur. Fakat stres devam eden UPR uyarımlı mekanizmalar bu ER stresi azaltmayı başaramazlarsa sonucunda programlı hücre ölümü olan apoptoz meydana gelmektedir [78].

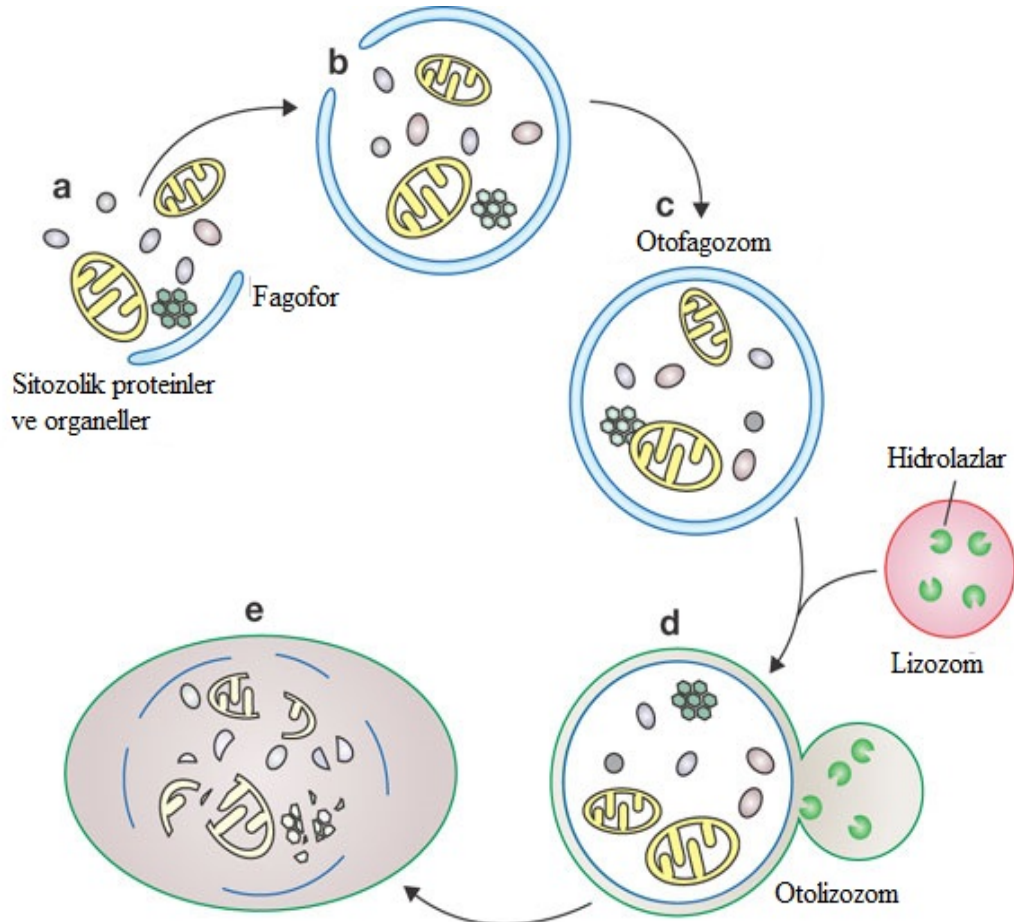
UPR sinyal yolakları olan PERK, ATF-6 ve IRE-1 sadece yaşama ile ilgili işlevleri yerine getiren yolakları aktive etmezler aynı zamanda apoptoz yolaklarını da indüklerler [89]. ER stresi durumunda pro-apoptotik sinyaller tetiklenir ancak direkt olarak hücre

ölümüne neden olmazlar. JNK veya CHOP gibi moleküllerin aktivasyonunu sağlayarak etki gösterirler. ER stres sonucu indüklenmiş apoptoz, Bcl-2 ailesi üyelerinin, JNK gibi kinazların, CHOP gibi transkripsiyon faktörlerinin ve çeşitli kaspazların ilişkili olduğu hücre ölüm yollarından meydana gelmektedir [82].

1.8 OTOFAJİ

Kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelen otofaji hücre biyolojisinde hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal enzim aktivitesiyle yıkılması durumudur. Hücre içerisinde yıkım, yapım ve hücre içi maddelerin geri dönüşümünü dengelemekten sorumlu bir mekanizma olan otofajinin tanımlanması 1960'lı yıllara uzansa da 1990'ların ortalarına kadar genetik temelini kavramaya yönelik çalışmalar yapılmamıştır. 1992'de Ohsumi ve arkadaşları mayalarda yaptıkları çalışmada 30 *ATG* (otofaji ile bağlantılı genler) tanımlamışlardır [90].

Yapılan ilk çalışmaların doğrultusunda otofajinin gereksiz hücreleri, aşırı hasarlı organellerini ve makromoleküllerini yıkan bir olay olduğu bilinmektedir. Otofaji tüm ökaryotik canlılarda gerçekleşen evrimsel olarak korunmuş bir membran trafik yolağıdır. Otofaji esnasında yıkıma uğrayacak organel ve proteinler sitoplazmada oluşturulan preotofagozom adı verilen bir membran sistemiyle çevrelenir. Çift membranlı vesiküller içine hapsedildiğinde ise otofagozom olarak adlandırılırlar. Otofagozom ve lizozomların birleşmesi neticesinde lizozomal enzimlerin aktivitesiyle içerik yıkıma uğratılmaktadır. Yıkıma uğramış olan proteinler enerji ve yeni proteinlerin yapımı için kullanılmıştır (Şekil 9).



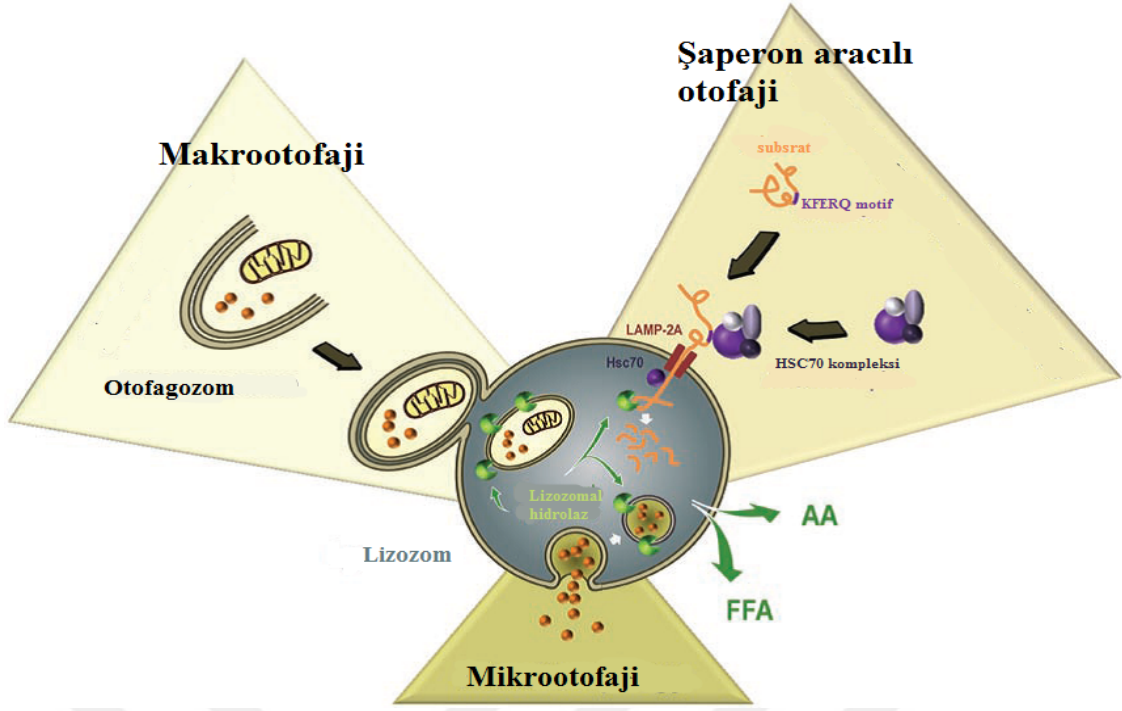
Şekil 9. Otofajinin şematik gösterimi [91]

Otofaji sayesinde hücreler organel ve proteinlerini enerji üretimi için ham madde olarak kullanırlar ve bu da çeşitli stres durumlarında hücrelerin canlı kalabilmelerini sağlamaktadır. Kısacası otofaji besin eksikliğinde ve büyüme faktörü yokluğunda ortaya çıkan metabolik streslere bir adaptasyon yanıtı olmaktadır [92]. Otofaji hasarlı organel ve proteinlerin yıkılmasında etkin bir mekanizma olmasının yanısıra normal hücre içeriğinin yeniden işlenmesinde de görevlidir. Bu nedenle otofaji eksikliğinde ubiquitinlenmiş proteinlerin ve deforme organelerin birikmesi, hücresel dejenerasyona yol açmaktadır [93]. Otofaji, ilk olarak hücrenin hayatta kalımı ile ilgili bir savunma mekanizması olarak ortaya atılmış olsa da, son yıllardaki çalışmalarda otofaji ile hücre canlılığı ve ölümü arasında karmaşık bağlantılar olduğu ortaya konmuştur. Otofaji hücre içinde uzun dönem devam ettiğinde ve apoptoz mekanizmaları hasarlı hücreleri ölüme zorlandığında, otofajinin hücrelerde bir hücre ölüm türü olarak kullanıldığı ileri sürülmüştür [90, 92, 94].

Otofaji kompleks bir süreç olmakla birlikte günümüze kadar temel 3 farklı mekanizması tanımlanmıştır. Bunlar makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofajidir. Her

üçünde de hücre içeriği lizozomlar tarafından yıkıma uğratılsa da, üçünün de farklı biyolojik özellikleri bulunmaktadır. En çok üstünde durulan türü makrotofaji, pekçok hücrede oluşur, protein fragmentlerinin ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli görevi üstlenir. Makrotofaji, yıkıma uğratılacak hedef molekülleri çevrelerindeki diğer sitoplazmik içerikten ayıran çift katlı membran sistemlerinin (otofagozomların) oluşumuyla karakterize edilir. Yıkıma uğratılacak protein, karbonhidrat, lipid, RNA, mitokondri ve peroksisom gibi organeller ofofagozomların içine hapsedilip lizozomlara taşınarak, lizozomal enzimlerle parçalanırlar. Otofagozomlar ER'daki içerik olarak PI3P'den zengin membranlarının bir araya gelmesi, uzaması ve kapanması ile meydana gelmektedir.

Otofagozomlar içeriklerini lizozoma taşıyarak lizozom ile birleştiklerinde otolizozom adını alır, içerikleri asidik lizozomal hidrolazlar ile yıkılır. Mikrotofaji, küçük miktarlardaki sitoplazma içeriğinin doğrudan lizozom tarafından pinositozudur. Sitoplazmik içerik lizozom membranının içe kıvrılmasıyla lizozom içinde hapsedilir. Şaperon aracılı ofofajik ise diğer ofofaji türlerine göre daha seçicidir. Sadece KFERQ benzeri motifleri içeren proteinlerin yıkıma uğratıldığı ofofaji türüdür. HSC70 içeren şaperon kompleksler sitoplazmadaki KFERQ motifi proteinleri tanıyarak, bu proteinlere bağlanırlar ve lizozom membranına taşırlar. Lizozom membranında bulunan LAMP-2 şaperon-KFERQ motifli protein kompleksini tanır ve protein katlantıları açılır. Protein lizozom membranından lizozomal HSC70 yardımıyla geçerek lizozomda yıkıma uğratılır (Şekil 10). Şaperon aracılı ofofajide membran oluşumu ve içeriğin membran sistemi içinde hapsedilmesi gibi basamakların olmadığı tespit edilmiştir [95, 96].



Şekil 10. Otofajinin farklı türlerinin şematik gösterimi [97]

Otofaji mekanizmasında görev alan proteinlerin birçoğu ilk olarak mayada gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda keşfedilmiş ve Atg (otofaji ile bağlantılı proteinler) proteinleri olarak isimlendirilmişlerdir. Bu Atg proteinlerinin çoğu, otofajik zarların oluşumu, uzaması ve kesecik haline gelmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca bu proteinlerin ökaryotlardaki karşılıkları da bilinmektedir [98, 99].

1.8.1 Otofaji Sinyalinin Moleküler Mekanizması

Hücrede “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde Golgi ile ER birleşiminin arasında olduğu düşünülen bölgelerdir. Otofagozomların bu merkezlerde oluşmaya başladıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Otofaji ile bağlantılı proteinlerden ilk basamakta görev yapan Atg6 (memelilerdeki Beklin1) proteindir. Atg6 sınıf III fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) kinaz Vsp34’ün aktivitesini düzenlemektedir. PI3P kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını kendisine bağlayarak otofaji oluşum merkezine yönlendirmektedir. Bu şekilde otofagozom membranının oluşumu başladığı belirlenmiştir.

Otofagozom membranlarının uzaması ve kesecik halini alması ise iki ubikuitin benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar Atg12-Atg5 ve Atg8-fosfatidiletanolamin konjugasyon sistemidir. Bu mekanizmalarda konjugasyona yardımcı ubikuitin sistemindeki E1 ve E2 enzimleri benzeri enzim Atg7 ve E2 benzeri

enzim Atg10 yardımı ile kovalent olarak bağlanmaktadır. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile birleşerek büyük bir protein kompleksi oluşturmakta ve membranının dış yüzeyine bağlanmaktadır. İkinci ubikuitin benzeri sistemde ise Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfotidiletanolamin (PE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanması söz konusudur. Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi, Atg8/LC3'ün PE'ye bağlanması için gereklidir. LC3'ün PE bağlanması ile çözülebilir formda bulunan sitoplazmik formdaki LC3-I, otofagozom ilişkili membrana bağlı formu LC3-II'e dönüşmektedir. PE molekülü, LC3'ün sondan 6. amino asidi olan glisine bağlanmaktadır. Glisin de LC3'ün C-ucundaki beş amino asitin Atg4 proteaz tarafından kesilmesi ile ortaya çıkarılır. Atg8/LC3'ün PE'ye bağlanması, PAS'a membran taşınması ve burada membran uzaması için gerekli bir olaydır. LC3-etanolaminin oluşması sonucunda Atg4 proteaz, E1 benzeri enzim Atg7 ve E2 benzeri enzim Atg3 tarafından aktive edilmektedir. Atg4 de vesikül oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmasını sağlamaktadır. Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargo lizozomal enzimler ile yıkıma uğramaktadır. Kargonun yıkımı ile (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapı taşları (örneğin: amino asitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye geri kazandırılmaktadır [91, 99].

Otofaji mekanizmasında Beklin-1 ve MAP-LC3 (mikrotübül ile uyumlu protein hafif zinciri-3) gibi sıkıca korunmuş genler görev almaktadır. LC3 proteolitik reaksiyonlar sonrasında sitoplazmik lokalizasyonda bulunan LC3-I'e dönüşmektedir. Otofaji süresince LC3-I fosfotidiletanolamin ile konjuge edilerek LC3-II oluşmaktadır. LC3-II otofagozomun iç ve dış membranıyla ilişkiye girerek otofagozom oluşumuna katılmaktadır. LC3-II'nin artmış seviyeleri hücrelerde otofagozom oluşumu ile ilişkilidir. Bu nedenle LC3-II sıklıkla geç otofaji işaretleyicisi olarak kullanılırken, membranların PAS'da toplanması aşamasında kontrol mekanizması olarak görev alan Beklin-1 ise erken otofaji işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır [100].

1.8.2 Otofaji Kontrol Mekanizmaları

Otofajinin kontrolünde 2 önemli sinyal yolağı, sınıf III ve sınıf I fosfotidilinositol-3-fosfat görev almaktadır. Sınıf III fosfotidilinositol-3-fosfat (PI3P) kinaz otofajik vesikülün oluşumunu başlatırken, sınıf I fosfotidilinositol-3-fosfat ise otofajiyi negatif yönde regüle etmektedir.

Sınıf I fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt/PKB), mitojenik uyarılarla aktive edilerek, hücre büyümesini uyaran sinyal yollarından biridir. Sınıf I PI3K, PI(3,4) P2 fosfat ve PI(3,4,5)P3 oluşmasını sağlamakta ve bu ürünler Akt/PKB yolağının aktivasyonuna sebep olmaktadır. Sınıf I fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B/Akt yolağının otofajiyi baskıladığı bilinmektedir. Bunun nedeni aktif durumdaki Akt'nin otofajik aktivitenin inhibisyonunda önemli rol oynayan TOR protein kompleksini aktive etmesidir. *PTEN*, (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı genidir ve bu şekilde hücreleri otofajiye götürmektedir [101].

Hücrelerde protein sentezi ve hücre proliferasyonunu kontrol eden bir kinaz sistemi olan mTOR hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişte önemli olan mRNA'ların transkripsiyonunu sağlayan serin/treonin kinaz sistemi üyesidir. mTOR; protein sentezi, transkripsiyon ve ribozom oluşumu gibi anabolik olayları aktive etmesinin yanısıra RNA yıkımı, otofaji gibi katabolik olayları da inhibe ederek hücre çoğalmasını sağlamaktadır. Açlık, hipoksi ve benzeri stres durumlarında mTOR'un baskılanması ile hücrelerde otofaji aktif hale gelmektedir.

mTOR mayalardaki ATG1'in analogu olan ULK1, ULK2 ve bunların ilişkili proteini Atg13'ü fosforile ederek inhibisyonlarına sebep olmaktadır. ULK'nin aktivasyonu otofajik olayların başlamasında önemli bir basamaktır. ULK, Atg13 ve F1F200(Atg17) kompleks oluşturmakta ve bu komplekste Atg17, ULK'ler tarafından fosforile edilmektedir. ULK kinazlar ile uyarılan Beklin-1 kompleksi, otofagozomların oluşumuna katılan Atg5-12-16, LC3 ve Atg9 için platform oluşturacak PI3P'den membran fragmentlerini oluşturur. Beklin-1-Sınıf III PI3K kompleksi evrimsel olarak korunmuş UVRAG, Atg14/Barkor ve şimdiye kadar omurgasızlarda analogları gösterilmemiş Ambral ve Rubicon gibi kofaktörler ile kontrol edilmektedir. Atg14 ve Ambral'in Sınıf III PI3K aracılı otofagozom oluşumunda, UVRAG ve Rubicon'un ise Sınıf III PI3K aracılı endozomal taşınmada aktif rol oynadığı gösterilmiştir [102].

Otofagozom oluşumunda bir diğer önemli faktör de Bif-1'dir. Bif-1 UVRAG aracılığıyla Beklin-1-Sınıf III PI3K kompleksine bağlanarak membranların kıvrılmalarını sağlar. Bu da Beklin-1-Sınıf III PI3K kompleksinin lipid fosforilasyonu dışında otofagozom uzamasında gerekli olan faktörleri ortama bağlamak gibi görevlerinin olduğunu göstermektedir [102].

1.8.3 Otofaji ve Apoptoz İlişkisi

Tip II programlı hücre ölümü olarak sınıflandırılan otofajik hücre ölümündeki en belirgin değişiklik, iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili sitoplazma ve organel fragmentleri içeren vesiküllerin oluşumudur. Apoptozdan farklı olarak kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimler gibi morfolojik özellikler gözlenmez. Apoptoz ve otofaji arasındaki bu morfolojik farklılıklar otofajik hücre ölümünün ayrı bir ölüm tipi olarak sınıflandırılması gereğini ortaya koymuştur [103]. Ancak otofajiyi kontrol eden mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması nedeniyle, otofajinin apoptotik mekanizmaları sağlam olan hücrelerde aktif olarak ölüme yol açıp açmadığı konusunda farklı görüşler bulunmaktadır.

Birinci görüş otofajinin, apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda, hücreleri ölüme götüren mekanizma olduğudur, yani apoptotik mekanizmalarında sorun olan hücrelerin, otofaji ile doğrudan ya da dolaylı olarak hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu görüşü savunan çalışmalarda otofajinin 3-MA (3-metiladenin) ile inhibisyonu apoptozu geciktirirken; kaspaz inhibitörleri ile apoptoz inhibe edildiğinde hücrelerde otofajinin devam ettiği gözlenmiştir. Xue ve arkadaşları [104] primer sempatik nöronlarla nöral büyüme faktör eksikliği ya da c-Ara tedavisi sonrasında, otofajik aktivitede 30 kat artış gözlemlemişlerdir. Nöronlarda 3-MA ile otofaji inhibisyonundan sonra apoptotik hücre ölümlerinde azalma saptamışlardır. Kaspaz inhibitörleri ile apoptoz inhibisyonu oluşturulduktan sonra hücrelerin kaspazlara bağımsız bir yolak olan otofaji ile öldüğünü göstermişlerdir.

İkinci görüş, otofajinin de apoptozla paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiğini savunmaktadır. Apoptoz ile otofajinin bazı hücrelerde koordine bir şekilde çalışarak hücre ölümünde ortak mekanizmalar olarak rol aldığını savunan görüşler yaygınlaşmaktadır. Bu görüşü destekleyen çalışmalara örnek olarak; Qian ve arkadaşları [105] T-lenfosit lösemisinde arsenik trioksit tedavisi sonrasında Beklin-1 upregülasyonu ile hem otofajik hem de apoptotik hücre ölümünün aktive olduğunu göstererek, tümör gerilemesinde bu iki mekanizmanın beraber çalıştığını ileri sürmüşlerdir. Basciani ve arkadaşları [106], Kaposi sarkomunda tirozin kinaz inhibitörü imatinib tedavisi sonrasında görülen hücre ölümlerinin apoptoz-otofaji iş birliğine dayalı olduğunu göstermişlerdir.

Üçüncü görüş, otofajinin hücre ölümünden kaçış mekanizması olduğudur. Yani otofaji, apoptozu baskılayarak hücrenin sağkalımını arttırmaktadır. Otofaji stres, ilaç,

radasyon gibi etkenlere maruz kalan hücrelerde anormal ve hasarlı hücre elemanlarının yıkımını sağlayarak hücrenin ölüme gitmesini engellemektedir. Diğer yandan otofaji inhibe edildiğinde hücrelerde apoptotik hücre ölümü artmaktadır. Bauvy ve arkadaşları [107] bu görüşü destekler nitelikteki çalışmalarında, HT-29 kolon karsinom hücrelerine sulindak sülfid tedavisi uygulamışlardır. Bu hücrelerde sulindak tedavisine ek olarak otofaji inhibitörleri uygulandığında apoptotik hücre ölümünde belirgin artış saptamışlar ve bunun nedenini mitokondrilerinden sitokrom-c salınımı hızlı olan mutant HT-29 hücrelerinde; otofajinin mitokondrilerini yıkıma uğratarak apoptozu geciktirmesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Dördüncü görüş, otofajinin apoptoz öncesi bulunması gereken ön koşul olduğudur, bu görüşe göre otofaji kendi başına ölüme yol açmamakta, apoptozu yardım etmektedir. Otofaji, hücre zarı tomurcuklanması, apoptoz kompleksinin oluşumu, fosfatidilserinin hücre dışı zarına transferi gibi apoptotik süreçte ATP gereksinimi duyan olaylara besin yokluğunda ATP sağlamaktadır. Espert ve arkadaşları [108], CD4 hücrelerinin HIV ile enfeksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada otofajinin apoptotik kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir.

Son çalışmalarda apoptoz ve otofaji arasında birçok moleküler bağlantı ortaya konulmuştur. Bazı otofaji ile ilişkili proteinlerin apoptozda görülen hücresel olaylarda da rol aldığı gösterilmiştir. Apoptoz ve otofajiyi negatif yönde regüle eden birçok molekül tanımlanmıştır.

Akt/PKB tarafından kontrol edilmekte olan mTOR yolağının aktivasyonu hücrenin çoğalmasını ve hayatta kalmasına, baskılanması ise otofajiye neden olmaktadır. Otofajinin düzenlenmesinde major bir molekül olan mTOR, bir GTP-bağlayıcı küçük protein olan Rheb'in GTP bağlı şekli tarafından aktive edilmektedir. Tsc1 ve Tsc2 (Tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/TSC2) Rheb'i GTP hidroliziyle inaktif duruma getirmektedir. İnaktif durumda bulunan Rheb'de mTOR aktivasyonunu gerçekleştirememektedir. Akt/PKB aktivasyonunun TSC1/TSC2'yi fosforile ederek inaktif duruma getirir. Rheb'in TSC1/TSC2 tarafından inhibisyonunu engelleyerek, mTOR'un Rheb tarafından aktivasyonuna ve otofajinin inhibisyonuna neden olur. Otofajiyi bu şekilde baskıladığı bilinen Akt/PKB yolağının, apoptozu da Bcl-2 proteinlerinde olan Bad'ın Akt tarafından fosforile edilmesi sonucunda baskıladığı gösterilmiştir [102, 109].

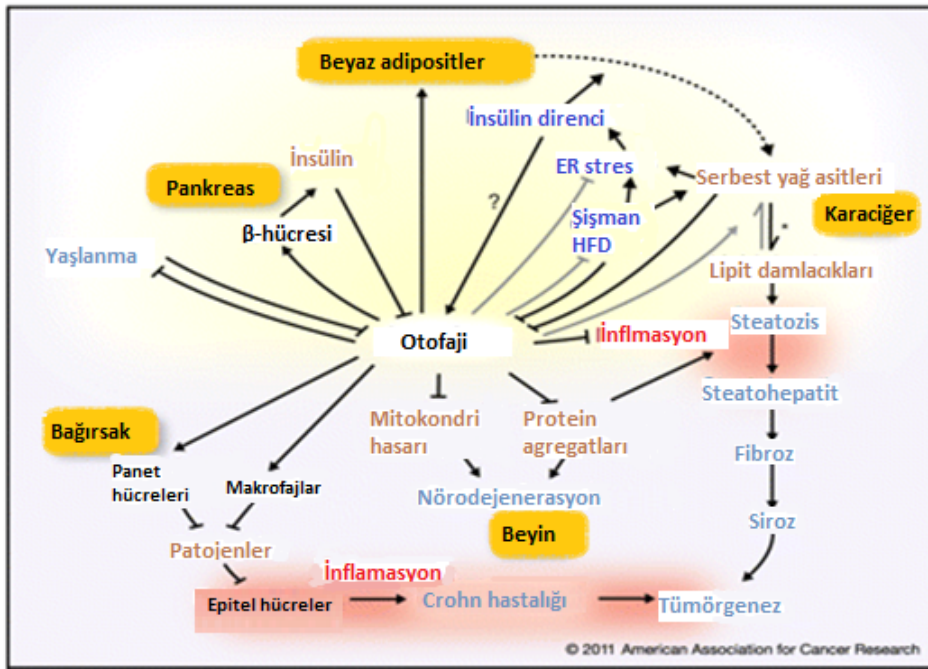
Bcl-2 ailesinin anti apoptotik proteinleri apoptoz gibi otofajiyi de inhibe edebilmektedir. Otofajik vesikülün oluştuğu aşamada görevli olan Beklin-1 anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından inhibe edilmektedir. Bu inhibisyon Bcl-2'nin Beklin-1' de bulunan BH3 domainine bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle birçok pro- ve anti-apoptotik proteinde bulunan BH3 dizisi apoptozun düzenlenmesine spesifik bir lokalizasyon olmamakta, otofajinin indüksiyonunda rol oynamaktadır. Bu veri doğrultusunda sadece BH3 içeren BAD, BNIP3 ve NIX'in hem apoptoz hem otofajide rol oynadığı gösterilmiştir [110].

Atg5, otofajideki önemli rolünün yanı sıra apoptotik yolda da pozitif ve negatif düzenleyici olarak karşımıza çıkmaktadır. Atg5'in pozitif ya da negatif düzenleyici etkisi apoptotik indükleyiciye göre değişmektedir. Atg'in FADD (Fas associated death domain) adlı reseptör tarafından apoptoz aktivasyonu mekanizmalarında rol oynadığı gösterilmiştir [111]. Apoptoz indüksiyonu sırasında Beklin-1, Atg4 ve Atg5 gibi otofaji ile ilişkili proteinlerin yıkıma uğratıldığı bilinmektedir. Bu da otofajinin inhibisyonuna ve hücrelerin apoptozdan otofaji mekanizması ile kaçmasına engel olmaktadır. Bu görüşe zıt olarak Atg5'in kalpain tarafından kesilmesi sonrasında kalan amino kısmının Bcl-XL ile etkileşerek, sitokrom-c salınımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olduğu Yousefi ve arkadaşları [112] tarafından gösterilmiştir.

Bir apoptozun uyarıcı olan p53 otofajiyi iki farklı şekilde düzenleyebilmektedir. Nükleusdaki p53'ün transkripsiyonel etkisi aracılığıyla otofajiyi indüklediği, sitoplazmik p53'ün ise otofajiyi baskıladığı bilinmektedir. p53'ün uyardığı sadece BH3 dizisi içeren PUMA proteini apoptoz bağımlı DNA hasarında görevli temel moleküldür ve otofaji indüksiyonunda da rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi kontrol eden temel moleküllerden bir diğeri de apoptoz regülasyonunda önemli olan birçok proteinin fosforilasyonunu yapan JNK ve DAP kinazlardır. JNK Bcl2/BclXL proteinlerinin Beklin-1'e bağlanmasını engelleyerek otofaji indüksiyonu sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar DAP kinazın Beklin-1'i fosforile ettiğini ve böylece Bcl-2 ailesinin Beklin-1'e bağlanarak otofaji inhibisyonunu ortadan kaldırdığını göstermiştir [113]. Apoptoz ile otofaji arasındaki ilişki otofajinin son evrelerinde dahi devam etmektedir. Otofajide önemli olan lizozomal protein DRAM'ın ekspresyonu pro-apoptotik protein p53 tarafından kontrol edilmektedir [102].

1.8.4 Otofaji ve Kanser

Otofajinin karsinogenezdeki rolü, son yıllarda önemli bir araştırma alanıdır. Kanser ile otofaji arasındaki bağlantıya bakılan pekçok çalışmada, büyüme faktörlerinin eksik olduğu durumda tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin otofajiyi ölümden kaçış mekanizması olarak kullandığı ve hücrelerdeki otofaji baskılandığında ise hücrelerin apoptoz ile öldüğü gözlenmiştir [114, 115]. Bu çalışmalar ışığında tümör hücrelerini çevresel koşullardan koruyan mekanizmanın otofaji olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür (Şekil 11). Solid tümörlerde otofaji artışının tümörün büyümesini sağladığı düşünülürse, hücrelerde otofajinin baskılanması tümör tedavisinde umut verici olmaktadır.



Şekil 11. Sağlıklı durumda ya da hastalık ilerlemesinde otofajinin rolü [116]

Yapılan bazı çalışmalar otofajinin kanser oluşumunu önleyici etkisinin olduğunu göstermiştir. *BECN* geninin aşırı anlatımının tümör oluşumunu baskıladığı bilinmektedir. Otofaji bozuklukları ile kanser oluşumu arasındaki ilişkinin en önemli kanıtları farelerde *BECN1* mutasyonu oluşturduktan sonra hücre proliferasyonunda artış ve sporadik akciğer, karaciğer kanseri oluşumlarının gözlemlenmesidir. Beklin-1 ekspresyonu az gözlenen MCF-7 hücrelerinin *BECN* ile transfeksiyonu sonrasında da hücre proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda otofajik genlerin anlatımlarının kanser hücrelerinde azaldığı ve otofajinin karsinogenezde tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak önemli rol oynadığını savunan görüşler ileri sürülmüştür [117].

Kanser tedavisinde otofajinin tümör hücreleri üzerine etkisi konusunda zıt görüşler bulunmaktadır. Tamoksifen, rapamisin, arsenik trioksit, temozolomide ve histon deasetilaz inhibitörleri, etoposid otofajiye yol açtığı bilinen kemoterapötiklerdir. Ancak bu örneklere rağmen otofajinin tümör hücrelerinin kullanıldığı önemli bir ölüm mekanizması olup olmadığı açıklık kazanmamıştır. Tümör hücrelerinde otofaji görülmesi, onları öldüren mekanizmanın otofaji olduğunu göstermemektedir. Hücrelerin ölmek için kullandıkları bir savunma mekanizması olduğunu savunan görüşler de yer almaktadır. Otofajinin kanser hücrelerini kemoterapötik tedavilere karşı koruduğu ve ilaç kombinasyonlarına otofaji inhibitörlerinin de eklenmesinin daha etkin tedavi yanıtına yol açacağını savunan birçok çalışma bulunmaktadır [118]. Buna karşın apoptoz yolağında sorun olan tümör hücrelerinin kemoterapötik tedaviler sonrasında otofaji ile hücre ölümüne gittiğini savunan araştırmalar da yer almaktadır.

Sonuç olarak, otofajinin kanser gelişiminin önlenmesi ve kanser tedavisinin etkinliğinin artırılmasında yararlı olacağını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak otofajinin hangi koşullarda uyarılıp, hangi koşullarda inhibe edileceği çok önemlidir.

1.8.5 Meme Kanseri ve Otofaji

Meme kanseri kadınlar arasında en sık rastlanan kanser tipi olup her yıl milyonlarca kadın meme kanserinden etkilenmektedir [6, 11]. Meme kanseri diğer kanser türleri gibi genetik ve çevresel etkenler aracılığıyla meydana gelmekte olup hücreleri; anti büyüme sinyallerine direnç, büyüme sinyalleri otonomisi, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezin devamlılığı, doku invazyonu ve metastaz, DNA tamir makinelerinde bozulma ve metabolik dönüşüm geçirme özelliğine sahiplerdir [7-9]. Kanser hücrelerinin bu özellikleri kazanmasını sağlayan mekanizmalarsa halen net olarak anlaşılamamaktadır. 1999 yılında otofaji ve kanser arasındaki ilişki Beklin-1' in Liang ve arkadaşları tarafından keşfiyle ortaya çıkmıştır. Liang ve arkadaşları, Beklin-1'in %40-75 oranında sporadik ovaryum ve meme kanserlerinde mono allelik olarak delesyona uğradığını ispatlamakta ve bu genin olası tümör baskılayıcı yönü üzerinde de durmaktadırlar [119]. Beklin-1 hariç diğer otofajik yapıların kanser üzerindeki etkisinin anlaşılması amacıyla pek çok çalışma yapılmaktadır.

Otofajinin tümör baskılayıcı rolüyle beraber kanser oluşumunda da rolü olabileceği ile ilgili kanıtlar bulunmaktadır [119-122]. Diğer yandan ise otofajinin meme kanseri hücrelerinin sağkalımını baskıladığı, ölüme götürdüğü ve bu şekilde tümör baskılayıcı roller gösterebileceği yönünde sonuçların çıktığı çalışmalar yer almaktadır [123-127].

Otofajinin kanseri baskılayıp baskılamadığı yönündeki soruların cevabının ortaya çıkmasıyla beraber terapötik olarak bu süreci aktive ya da inhibe edebilen tedaviler ortaya çıkabilecek ve yaygın şekilde kullanılabilirlerdir.

Son on yılda yapılan çalışmaların bir kısmı otofajinin tümör baskılayıcı rolü olabileceğini ortaya koymakta ve böylece otofajik süreçte meydana gelen bozulmaların kansere neden olabileceği saptanmaktadır [119, 121, 122, 128]. Bu araştırmalara ek olarak otofajinin düzenlenmesi ve tümör oluşumunda rol alan sinyal yolları arasındaki ilişkiler de saptanmıştır. TOR sinyal yolağının upstream efektörleri ve otofaji tarafından indüklenen yapılar olan PTEN, TSC1 ve TSC2 kanser insidansını azaltan tümör baskılayıcılarıdır [129-131]. Diğer yandan ise TOR tarafından aktive edilen PI3K ve Akt gibi onkogenler otofajiyi inhibe edici role sahip olup kanser oluşumunu tetiklemektedirler [132]. PI3K yolağının meme dokusunda tümörigenezle ilişkili olduğu da büyük çaplı dizileme analizleriyle saptanmaktadır. Son olarak apoptoz kontrol noktası proteini olan p53' ün insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı olduğu ve DNA'sı hasarlanmış hücrelerde otofajiyi düzenlediği de belirtilmektedir [133-135].

Otofajinin otonom bir hücre mekanizması olmasının yanında tümör baskılayıcı fonksiyonu da halen tartışılmaktadır. *İn vitro* ve *in vivo*da Akt aktivesinin engellenmesi ya da Beklin-1'in susturulmasıyla da apoptoz-deficient (apoptoz yapamayan) iBMK nekrotik ölümün gerçekleştiği de kanıtlanmaktadır [136]. Enflamatuar infiltrasyon ve sitokin üretimi nekrotik tümörlerde bulunmaktadır ve bu yapının tümör büyümesini tetiklediği de saptanmıştır [137]. Böylece otofajinin tetiklenmesinin nekroz ve enflamasyonu engelleyebileceği ve tümör baskılayıcı rolünün meme kanseri hastaları için bir umut olabileceği de açıkça görülmektedir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

1.9 KULLANILAN MATERYALLER

1.9.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

1.9.2 Hücre Kültürü Donanımları

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

1.9.3 Kullanılan Kimyasallar

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

1.9.4 Kullanılan Tamponlar

Tüm tez boyunca kullanılan tamponlar ve hazırlanışları ekler bölümünde Tablo 4’de verilmiştir.

YÖNTEMLER

1.10 Hücre Kültürü

MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif, ER-) ve T47D (östrojen reseptörü pozitif, ER+) meme kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection’den temin edilmiştir. Stabil otokrin BH anlatımı kazandırılan MDA-MB-231 hücre hatları İKU-Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Yüksek Lisans mezunu Merve Çelik tarafından ve T47D meme kanseri hücresi ise İKU-Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisans Mezunu Recep Genç tarafından Doç. Dr. Ajda Çoker Gürkan’nın TUBİTAK -113Z791 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında kullanılan tüm 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 petrilерinde 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 petrilерine ekimler yapılmıştır. Hücreler bir gece boyunca hücre kültürü petrilерine yapıştıktan sonra kullanılan ilaç belirlenen sürelerde uygulanmıştır ve %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir.

Gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 mm²'lik hücre kültürü petrisi 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. 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 1ml taze besiyeri eklenmiştir. İyice 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.

1.11 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.

1.12 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığını belirlemek için metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) ajanı kullanılmıştır. MTT ajanı içerisinde bulunan tetrazolium halkası, canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri sayesinde parçalanır ve mor renkli formazan tuzu oluşturur. Sonucunda da kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığı belirlenir.

MDA-MB-231 ve T47D 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 (25-20 μM) ile 24 saat boyunca ve/veya otofaji inhibitörü [(Bafilomisin; 50 nM)] ile ön muamele yapılarak 1 saat boyunca 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 ölçüm yapılmıştır.

1.13 Floresans Boyama

1.13.1 3,3' Diheksiloksakarbosiyanın İyodür (DiOC₆) Boyama

Curcuminin otofaji inhibitörü varlığında MDA-MB-231 ve T47D 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 ön muamele yapılarak 1 saat boyunca beklenmiş ve sonrasında curcumin (25-20 μM) ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DiOC₆ (ana stok: 4mM) 10 dakika boyunca uygulanarak fluoresan mikroskobunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir.

1.13.2 Propidyum iyodür (PI) boyama

Otolizozom inhibitörü uygulamasının curcumin kaynaklı hücre ölümü üzerine etkisini MDA-MB-231 ve T47D 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 hücelere önce otofaji inhibitörü [(Bafilomisin; 50 nM)] ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra curcumin (25-20 μM) uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 2 $\mu\text{g/ml}$ PI (ana stok: 50 mg/ml) uygulanarak 15 dakika etüvde inkübe edildikten sonra yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir.

1.13.3 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

Curcuminin MDA-MB-231 ve T47D 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 curcumin (25-20 μ M) uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1 μ l/ml DAPI (ana stok: 1mM) boyası 30 dakika uygulanmıştır.

1.13.4 MitoTracker Boyama

Curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde mitokondri zar potansiyeline bağlı canlılığı belirlemek amacıyla mitotracker (100 nM) boyaması yapılmıştır. Hücreye nüfuz eden mitokondri probları 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 MDA-MB-231 hücrelerine 25 μ M curcumin uygulanarak 0-3-6-9-12 ve 24 saat boyunca inkübe edilmiş; T47D hücrelerine ise önce otofaji inhibitörü [(Bafilomisin; 50 nM)] ile 1 saat ön muamele yapıp daha sonra 20 μ M curcumin uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 0,8 μ l/ml Mitotracker Red (ana stok: 10 mM) boyası 30 dakika uygulanmıştır. Yeşil filtrede görüntüler çekilmiştir.

1.13.5 Akridin Oranj (AO) Boyama

Curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajik 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 önce otofaji inhibitörü [(Bafilomisin; 50 nM)] ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra curcumin (25-20 μ M) uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sürelerini takiben akridin oranj ana stoğu 1:10 oranında DMEM ile dilüe edilerek her bir kuyucuğa 1 μ l/ml olacak şekilde uygulanıp 10 dakika inkübe edilmiştir. Mavi filtrede görüntüler çekilmiştir.

1.14 Hücre Akış Sitometresinde PI Analizi

Curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometresi analizi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce otofaji inhibitörü olan Bafilomisin (50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra curcumin (25-20 μ M) uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra hücrelere %70 soğuk etanol ile muamele edilip 1 hafta boyunca -20°C 'de inkübe edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda etanol uzaklaştırılarak 1ml 1X PBS içerisinde 1 μ l PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca bekletildikten sonra akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

1.15 Hücre Akış Sitometrisinde ROS Analizi

Curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde reaktif oksijen türevleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla H2DCFDA boyaması sonrasında akış sitometresi analizi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrilere 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce otofaji inhibitörü olan Bafilomisin (50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra curcumin (25-20 μ M) uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak H2DCFDA boyasıyla boyandıktan sonra 30 dakika boyunca 37°C 'de ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

1.16 Annexin V/PI Boyama

MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla FITC annexin V apoptoz belirleyici kit kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 2×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere önce otofaji inhibitörü olan Bafilomisin (50 nM) ile 1 saat ön muamele yapılmış daha sonra curcumin (25-20 μ M) uygulanıp 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak annexin V ve PI floresan boyalarıyla boyandıktan sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda akış sitometresi aletinde okutma yapılmıştır.

1.17 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 olan Bafilomisin (50 mM) ile 1 saat boyunca ön muamele yapılmış daha sonra curcumin (25-20 μ M) 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.

1.18 Bradford Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin miktar tayinini yapabilmek amacıyla Bradford tekniği kullanılmıştır. Konsantrasyonu 1,5 μ g/ μ l olan sığır serum albumini (BSA) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde oluşturulmuştur: 1,5 μ g/ μ l, 3 μ g/ μ l, 4,5 μ g/ μ l, 6 μ g/ μ l, 7,5 μ g/ μ l BSA'nın üzerine 200 μ l Bradford çözeltisi eklenerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen proteinlerden 1 μ g/ μ 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.

1.19 İmmünoBlotlama Yöntemi

1.19.1 Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi

İmmünoBlotlama yöntemi için 30 μ g protein ile Laemli tamponu (5X) 1:4 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. %4'lük yükleme jeli ve %10-15'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.

1.19.2 Membrana Transfer ve Bloklama

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra yükleme jeli kesilerek ortamdaki 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 5-9 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.

1.19.3 Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri ve Bantların Görüntülenmesi

%5'lik yağsız süt içerisinden alınan membranlar primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (% 0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilasyonlarda uygulanmışlardır: β -aktin, GAPDH, PERK, BIP, IRE1 α , CHOP, Calnexin, Calreticulin, ATF-6, ATF-4, CALR, Ero1-L α , p62, Beklin-1, Atg-3, Atg-7, Atg-5, Atg-12, Atg-16L1, LC3A/B, Bax, Bcl2, Kaspaz7, Lamp-1. Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:250-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:3000 aralığında çalışılmıştır (CST). Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 5'şer 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.

A Çözeltisi

9 ml dH₂ O içerisine 1ml 1M Tris-HCl (pH:8,5), 75 μ l kumarik asit ve 150 μ l luminol kimyasalları ilave edilerek hazırlanır.

B Çözeltisi

9 ml dH₂ O içerisine 1ml 1M Tris-HCl (pH:8,5) ve 15 μ l H₂ O₂ kimyasalları ilave edilerek hazırlanır.

Bu her iki çözelti hazırlandıktan sonra karıştırılarak karanlık koşullarda muhafaza edilmiştir.

1.20 Asılı Damla Modeli Tekniği

Curcuminin ve otofaji inhibitörü olan bafilomisininin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde mortaliteye etkisini incelemek amacıyla asılı damla modeli tekniği yapılmıştır. Hücreler 60 mm'lik petri kaplarının kapaklarına her bir damla 10 µl olacak ve her 10 µl içerisinde $2,5 \times 10^3$ hücre olacak şekilde kondüsyonlara göre ekim yapılır. Her 60 mm'lik petrilerin kapağına yaklaşık 15 damla ekilir ve tabanına 5 ml PBS eklenerek etüve kaldırılır. Ekimden 24 saat sonra 1 hafta boyunca her gün hücrelerin çaplarının büyüklüğü ışık mikroskobunda gözlemlenir. 7. gün her bir damla DAPI ve DiOC₆ boyalarıyla boyanarak fluoresan mikroskobunda çekimi gerçekleştirilir.

1.21 Koloni Oluşumunun Kristal Viole ile Gösterilmesi

6 kuyucuklu petriye 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Ertesi gün 24 saatlik ilaç uygulaması gerçekleştirilir. 24 saat ilaç uygulamasının sonunda hücrelerin normal medya ile değişimi yapılır. 10-14 gün sonunda medya uzaklaştırılır. Kuyucuklar 1X PBS ile yıkama yapılır. 3ml %100 metanol, 1ml asetik asit ile 5 dakika inkübe edilir. Kristal viole yüzeyi sarıcağ miktarda eklenip 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. 20 dakika sonunda distile su ile yıkanarak boya uzaklaştırılır. Kolonilerin çekimi gerçekleştirilir.

1.22 *Caenorhabditis elegans* Kültürlerinin Devamlılığı ve Stoklanması

C. elegans suşları University of Minnesota, Collage of Biological Sciences, Caenorhabditis Genetics Center (CGC)' dan alınmıştır. Litresinde 20 g agar, 3 g NaCl, 1 g pepton bulunan 1 mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 25mM KPO₄, 5 µg/ml kolesterol ve 500 µg/ml Ampisilin ile hazırlanan Nematod Büyütme Besiyeri (NGM) üzerinde yetiştirilmişlerdir. *C. elegans* suşlarının beslenebilmeleri için gereken bakteriler University of Minnesota, Collage of Biological Sciences, Caenorhabditis Genetics Center (CGC)' dan alınmıştır. Alınan *E. coli* OP50 suşuna mock pc3.1 vektörü ampisilin direnci sağlaması ve seçim sağlaması amacıyla transforme edilmiştir. Transformasyon için komponent *E. coli* OP50'ler doğal tip *E. coli* OP50 suşu LB besiyerinde OD600 0.4 olacak şekilde çoğaltıldıktan sonra 4000 rpm'de 7 dakika santrifüj yapılarak çöktürülür ve üst faz atılır. Daha sonra üzerine soğuk 12.5 ml 0.1 M MgCl₂ eklendikten sonra 30 dakika bekletilir ve 4000 rpmde 7 dakika santrifüj yapılır ve üst faz atılır. Ardından 10 ml soğuk 0.1 CaCl₂ eklendikten sonra da 30 dakika bekletilerek 4000 rpmde 7 dakika santrifüj edilir ve üst faz atılır. CaCl₂ aşaması bir kez daha tekrarlandıktan sonra bakterilerin üzerine 850 µl 0.1M CaCl₂ ve 150 µl %100 gliserol eklenir ve -80 dereceye kaldırılır. Daha sonra komponentler 500 µg/ml son konsantrasyon olacak şekilde hazırlanan ampisilinli LB agar petrilere yayma preperat halinde ekilirler. Oluşan kolonilerden ampisilin dirençli *E. coli* OP50 suşu bakterileri 500 µg/ml konsantrasyondaki ampisilinli LB besiyerinde alınarak sıvı kültürde saklanırlar. 500 µg/ml ampisilin içeren 300 ml LB besiyerinde çoğaltılan *E. coli* OP50'ler çöktürüldükten sonra 5.85g NaCl, 1g K₂HPO₄ ve 6g KH₂PO₄ bulunan S-basal, 1M potasyum sitrat (pH 6), 1.86 g disodyum EDTA, 0.69g FeSO₄.7H₂O, 0.2g MnCl₂.4H₂O, 0.29g ZnSO₄.7H₂O, 0.025g CuSO₄.5H₂O içeren izmetal solüsyonu ve 1M CaCl₂ eklenerek hazırlanan S-basal tamamlanmış solüsyon ile çözündürülen OP50'ler 100mg/ml stok konsantrasyonda olacak şekilde mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. NGM petrilere üzerine bu stoktan 1:1000 dilüsyon yapılcağı şekilde aktarılmış ve 1 gece petride bakterilerin çoğalması sağlandıktan sonra petrilere UV crosslinker kullanılarak UV sterilizasyonu uğratılmıştır. Bu NGM'lere *C. elegans* suşları aktarılarak deneyler için yetiştirilmişlerdir. Bakteri eklenen NGM petrilere 4°C'de en fazla 1 hafta bekletilebilirler.

1.23 *C. elegans* Senkronizasyonu

Yumurta bakımından yoğun petrilere , ortalama 8 ml M9 ile yıkanır ve 15 ml'lik falkona toplanır. 2200G de 2 dk 20 °C'de santrifüj edilir. Supernatant atılır, yaklaşık 2 ml M9 eklenip pipetaj ile solüsyon yıkanır. Solüsyon bakteriden arındırılana kadar bu yıkamalara devam edilir. En son yıkamadan sonra supernatant atılır , 1 mL bleach solüsyonu eklenir. Ortalama 5-6 dk pipetaj ve vorteks yardımı ile bleach muamalesi yapılır. 5-6 dk sonra bleach reaksiyonunu durdurmak için yaklaşık 8-10 ml ye kadar M9 eklenir. 2200 g'de 2 dk 20 °C de santrifüj edilir. Supernatant atılır, pellet yaklaşık 1 mL M9 da çözülerek ependorfa alınır. 2200 g'de 2 dk 20 °C de santrifüj edilir. Adult kalıntılarında arındırılana kadar yıkamaya devam edilir. Son santrifüj sonrası pellet yaklaşık 500 µL M9 çözülüp yumurtalar M9 içerisinde bakterili NGM ye alınır.

1.24 *C. elegans* için OP50 Yetiştirme

OP50 wt, OP50 p-Bad, OP50 PC.1 suşlarının her birinden özeyle alınıp 5'er ml amfisilinli LB içinde yetiştirilir. (12 saat boyunca 37 °C'de orbital çalkalayıcıda) 12 saat sonunda amfisilinli LB içindeki bakteriler 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Santrifüjden sonra süpernatant atılır. Pellet distile su ile yıkanır. Tekrar santrifüj edilip üst faz atılır. Pellet yoğunluğuna göre 10-15 ml S. complete çözeltisinde çözülür. OD ölçülmek üzere dilüsyonlar hazırlanır. Dilüsyonlar (1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000) takiben OD ölçümü yapıp, OD: 0,4-0,6 arasında olana kadar beklenir.

1.25 *C. elegans* Akridin Oranj Boyama

L4/adult evresindeki *C. elegans*'lara 4 ml M9 ile 3 defa yıkama yapılır (15 ml'lik falkonlara) 2200 g'de 2 dakika santrifüj yapılır. Üst faz atıldıktan sonra 1.5 ml 'lik ependorfa geçirilir. 1 ml M9 eklendikten sonra 2200 g'de 2 dk santrifüj yapılır. Üst faz 300 µl kalana kadar atıldıktan sonra üzerine 1 µl akridin oranj (10 mg/ml) eklenir. 1 saat karanlıkta bekletilir.

1.26 *C. elegans* H2DCFDA Boyama

L4/adult evresindeki *C. elegans*'lara 4 ml M9 ile 3 defa yıkama yapılır. (15 ml'lik falkonlara) 2200 g'de 2 dakika santrifüj yapılır. Üst faz atıldıktan sonra 1.5 ml 'lik ependorfa geçirilir. 1 ml M9 eklendikten sonra 2200 g'de 2 dakika santrifüj yapılır. Üst faz 300 µl kalana kadar atıldıktan sonra üzerine 2 µl H2DCFDA eklenir ve 1 saat karanlıkta bekletilir. 1 saat sonra 250 µl M9 ilave edilir. 45 dakika karanlıkta bekletildikten sonra hazırlanan agaroz petrilere 0.1 ml *C. elegans* – 0.1 ml (10 mM)

Sodyum Azid eklenir. 10 dakika bekledikten sonra (kurtçukların hareketleri yavaşlayınca) floresan mikroskobunda mavi filtre kullanılarak görüntü alınır.

1.26.1 %2'lik Agaroz Petri Hazırlanması

2 gram agaroz hassas terazide tartılarak erlene aktarılır. 98ml distile su agarozun üzerine dökülür. Mikrodalga fırında şeffaf görüntü elde edene kadar ısıtılır. 60 mm'lik ya da 15 mm'lik petrilere dökülür. Hazırlanan agaroz katılaştıktan sonra petrilerin kapakları kapatılır.

1.26.2 NGM Hazırlama Protokolü

3 gr NaCl, 2.5 gr pepton ve 17 gr agar 1 litre distile su tamamlanarak otoklava atılır. Otoklavlandıktan sonra su banyosunda 55°C 'de soğutulur ve sonrasında 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 5 mg/ml kolesterol, 1 ml 1M MgSO₄, 1 ml ampisilin ve 25 ml 1M KPO₄ kimyasalları ilave edilir. NGM donmadan petrilere dökülmelidir.

1.27 *C. elegans* Yaşam Eğrisi Deneyi

Senkronizasyon sonrası bakterili NGM de büyümeye bırakılan *c.elegans*lar L4 seviyesine gelene kadar bekletilir. L4 fazına geldiklerinde , kondüsyon sayısına göre FUDR lu petrilere ağız pipeti ya da öze yardımı ile eşit sayıda hayvan aktarımı yapılır ve deneye başlanır.(ortalama 20-25 hayvan) Kondüsyonlardaki hayvan sayıları her gün kontrol edilip not edilir. Ortalama 2-3 günde bir hayvanlar temiz (yumurtasız) FUDRlu petrilere aktarılır. Bu aktarımın sebebi belli bir zaman dilimi sonrası FUDRun etkisinin geçmesi ve ortamdaki yumurtaların L1 fazına gelmesidir. Hayvan sayısını sabit tutmak amacı ile 2-3 günde bir FuDRlu petri yenilenir. Kondüsyonlardaki son hayvan ölene kadar deneye devam edilir. (ortalama 1,5 – 2 ay)

1.28 İstatistiksel Analiz

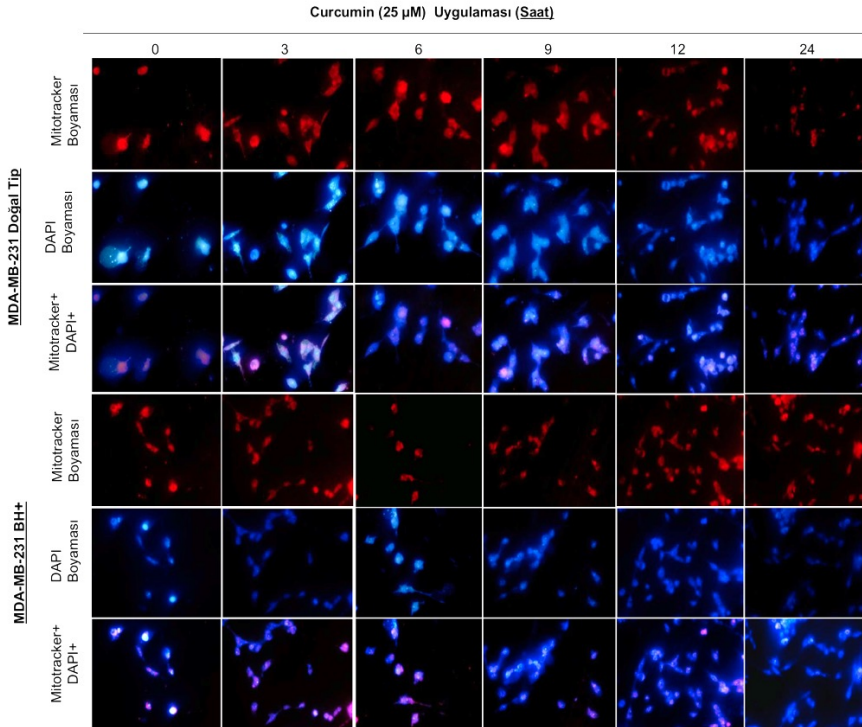
Yapılan mtt, asılı damla modeli analizi ve *C. elegans* sağkalım deneyi GraphPad Prism 6 kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen p değerleri sırasıyla **p<0.01, ****p<0.0001 olarak verildi. MTT hücre canlılığı analizi üç kez tekrarlanan deney ortalamasına göre belirlendi. Tüm immünoblotlama sonuçları en az iki kez tekrarlandı ve bant yoğunluklarını hesaplamak için Image J programı uygulandı. Ayrıca *C. elegans* suşlarında (N2 ve DAF2) ilaç uygulaması sonrasında sağ kalım eğrisini saptamak için Kaplan-Meier analiz yöntemi kullanıldı.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR

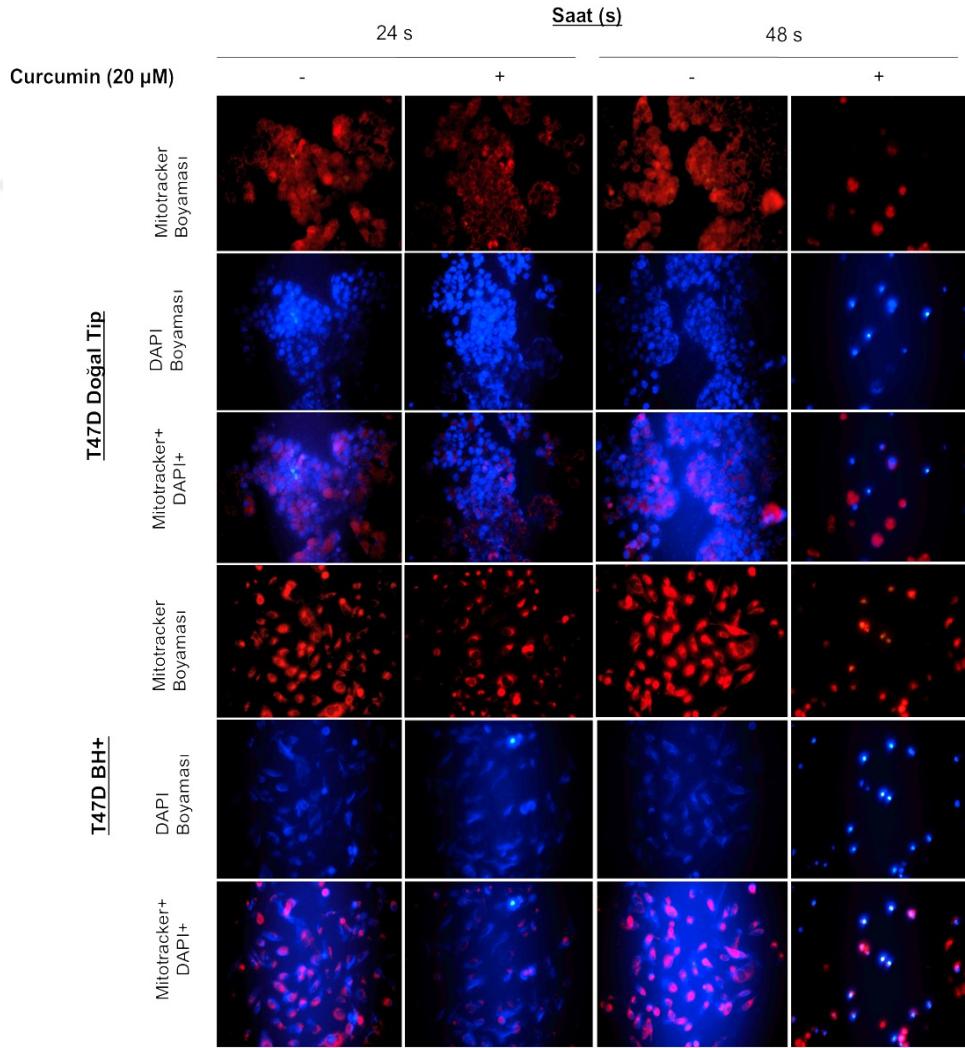
1.29 Zamana bağlı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi

Curcumin uygulamasının zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin hem MDA-MB-231 doğal tip hem de otkrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi için mitotracker ve DAPI ikili boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığını mitotracker boyaması, hücre ölümünü de DAPI boyaması göstermektedir. Floresans boyamalara göre zamana bağlı olarak curcumin uygulaması (25 µM) MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde hücre canlılığı azalttığı mitotracker boyaması ile gösterilmiştir. Ayrıca otkrin BH anlatımı kazandırılmış olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde ket vurucu etkisi görülse de bu etki doğal tipe kıyasla curcumin uygulamasına karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Zamana bağlı curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi.

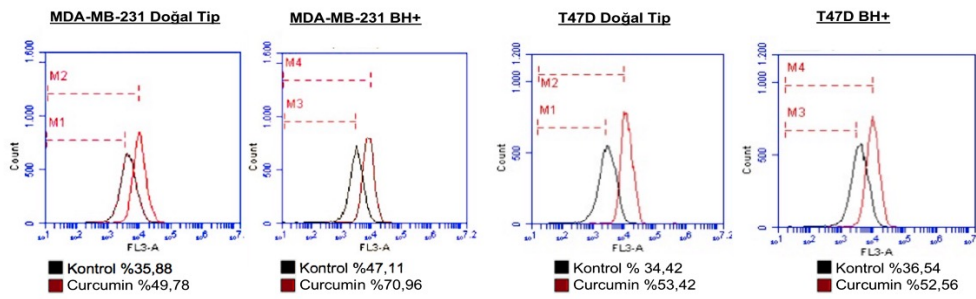
Curcuminin 24 ve 48 saat uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin hem T47D doğal tip hem de otkrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi için mitotracker ve DAPI ikili boyaması gerçekleştirilmiştir. Floresans boyamalara göre zamana bağlı olarak curcumin uygulaması (20 μ M) T47D doğal tip hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı mitotracker boyaması ile gösterilmiştir. Ayrıca otkrin BH anlatımı kazandırılmış olan T47D meme kanseri hücre canlılığı üzerinde ket vurucu etkisi görülse de bu etki doğal tipe kıyasla direnç kazandırdığı saptanmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. 24 ve 48 saat curcumin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisinin T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi.

1.30 Curcumin'in ER strese bağılı CHOP aktivasyonu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre akış sitometresi ile gösterilmesi

MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerine mCherry CHOP (-649/+136) plazmiti transfekte edilmiştir. Daha sonra curcumin uygulamaları gerçekleştirilerek hücre akış sitometresi ile analiz edilmiştir. Hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde 25 μ M curcumin uygulaması sonucu CHOP aktivasyonunun arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde de 20 μ M curcumin uygulaması sonucu CHOP aktivasyonunun arttığı tespit edilmiştir (Şekil 14).

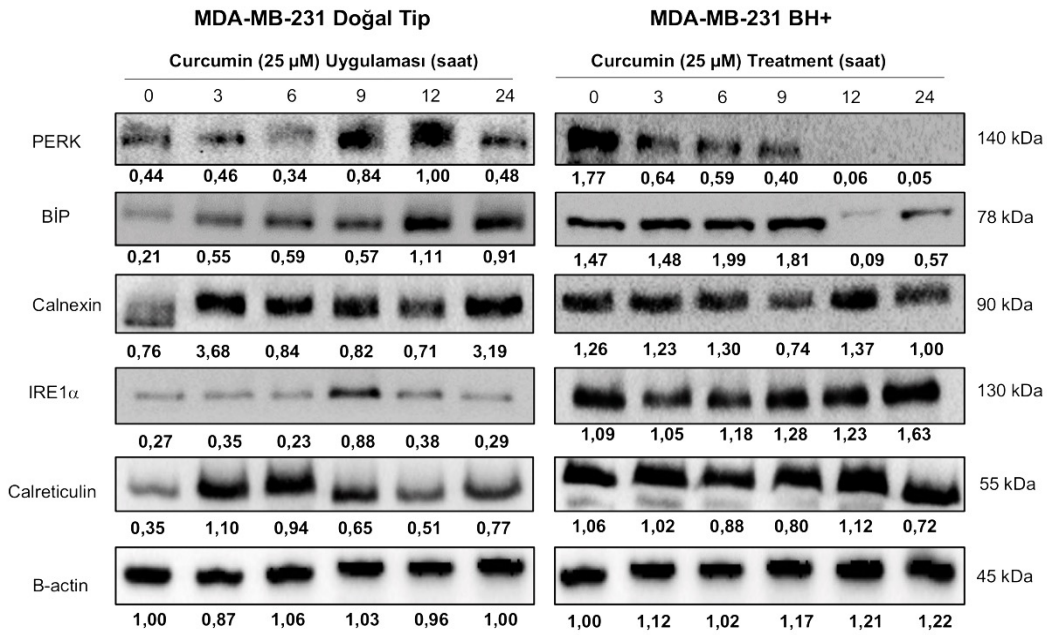


Şekil 14. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasının ER strese bağılı CHOP aktivasyonu üzerine etkisinin hücre akış sitometresi ile gösterilmesi.

1.31 Zamana bağılı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde ER stres ve otofaji üzerine etkisinin irdelenmesi

Zamana bağılı curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında ER stres ve otofaji üzerine etkisini belirlemek amacıyla immünoiblottama tekniği kullanılmıştır. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında ER stres anahtarı olan PERK ve BİP'in anlatımlarının zamana bağılı olarak arttığı görülmektedir. Özellikle 12. saat curcumin (25 μ M) uygulamalarında, PERK ve BİP anlatımlarının bazal anlatımına kıyasla belirgin olarak arttığı belirlenmiştir. Ancak arttırılmış BH anlatımı olan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında, PERK ve BİP'in bazal seviyelerinin parental hücrelere kıyasla anlatımda artışı indüklediği tespit edilmiştir. Curcumin (25 μ M) 0-6 zaman aralığında uygulamasının hem PERK hem de BİP anlatımlarını arttırdığı MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde görülmüştür. Otokrin BH anlatımının calnexin'in bazal seviyesi üzerinde indükleyici etkisi MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde belirlenmiştir. Ancak 25 μ M curcuminin 0-6 zaman

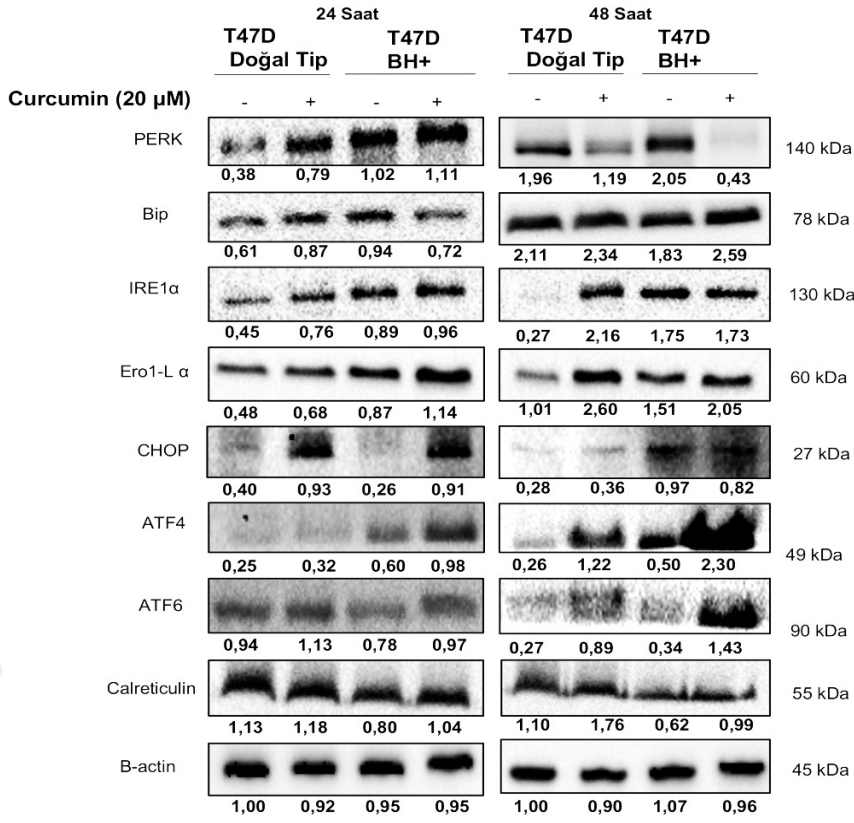
aralığında uygulamasının calnexin anlatımını arttırdığı MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde görülmüş ve 12. saate uzayan curcumin uygulamasının ise otokrin BH anlatımı olan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde indükleyici etkisi tespit edilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde curcumin uygulamasının IRE1 α anlatımını ilaç uygulanmamış kontrol hücrelere kıyasla belirgin olarak arttırdığı 9 saat curcumin uygulaması ile belirlenmiştir. Ayrıca BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerinde, zamana bağlı olarak IRE1 α anlatımının ilaç uygulaması ile doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde Calreticulin'nin bazal anlatımının düşük olduğu ve otokrin BH anlatımı ile calretikulin seviyesinin indüklediği tespit edilmiştir. Curcumin uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde 6. saate kadar calretikulin anlatımını arttırdığı ancak otokrin BH anlatımı ile bu etkinin 12. saate kadar devam ettiği MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının ER stres üzerine etkisinin immüno blotlama tekniği ile gösterilmesi.

T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında ER stres anahtarı olan PERK ve BiP'in anlatımı 24 saat curcumin (20 µM) uygulamasıyla artış göstermiştir. 48 saat curcumin (20 µM) uygulaması sonucunda ise PERK anlatımında azalma görülüp BiP'in anlatımında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. T47D BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerinde ise 24 saat curcumin uygulaması PERK anlatımını indüklerken 48 saat curcumin uygulaması ile bu anlatım seviyesi azalmıştır. Ayrıca T47D BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerinde 24 saat curcumin uygulaması BiP anlatımını azaltırken

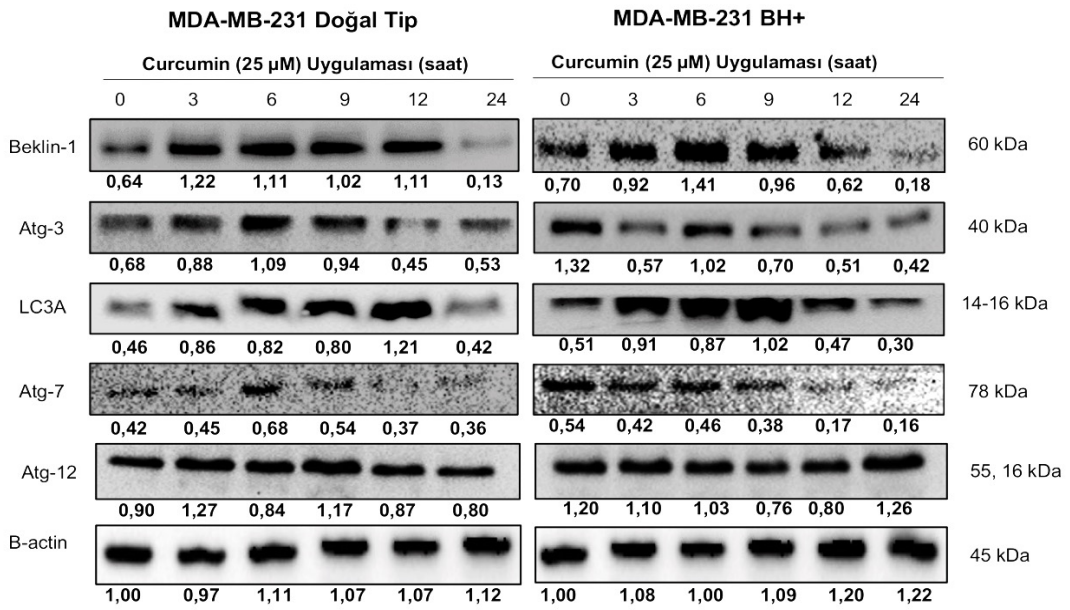
48 saat curcumin uygulaması sonucunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. IRE1 α 'nın bazal seviyede T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde anlatımı BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerine kıyasla daha düşüktür. Zamana bağlı curcumin uygulamasıyla beraber T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde anlatımın indüklendiği görölmektedir. BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerinde ise zamana bağlı curcumin uygulamasıyla beraber IRE1 α 'nın anlatımında belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde Ero1-L α 'nın bazal seviye anlatımı BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerine göre daha düşük seviyededir. Zaman bağlı curcumin uygulamasıyla beraber T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde Ero1-L α anlatımının indüklendiği görölmektedir. BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerinde de curcumin uygulaması Ero1-L α 'nın anlatımını indüklemektedir. Hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde CHOP'un 24 saat bazal seviye anlatımı düşük seviyede görölürken curcumin uygulamasıyla beraber bu anlatımın her iki hücre hattında da indüklendiği belirlenmiştir. 48 saat uygulamayla beraber T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde hem bazal seviyede hem de curcumin uygulamasında CHOP'un anlatım seviyesinde düşüş gözlemlenirken bu durum BH+ meme kanseri hücrelerinde tam tersi şekildedir ve CHOP anlatımının indüklendiği görölmektedir. ATF4'ün bazal seviye anlatımına bakıldığında T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde BH+ meme kanseri hücrelerine kıyasla daha düşüktür. Zamana bağlı curcumin uygulamasıyla hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde ATF4 anlatımının giderek arttığı görölmektedir. ATF6'nın anlatımında T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinin 24 saat curcumin uygulaması sonucu belirgin bir fark görölmezken 48 saat curcumin uygulamasıyla beraber hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde anlatımın indüklendiği tespit edilmiştir. CALR'nin anlatımına bakıldığında ise curcumin uygulamasıyla beraber zamana bağlı olarak çok az da olsa anlatımın indüklendiği görölmektedir (Şekil16).



Şekil 16. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının ER stres üzerine etkisinin immünoiblota tekniği ile gösterilmesi.

MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında Beklin-1'in bazal seviye anlatımının düşük olduğu görülürken zamana bağlı curcumin (25 µM) uygulamasıyla beraber özellikle 3, 6, 9, ve 12. saatte anlatımın indüklendiği 24. saatte ise anlatım seviyesinin tekrar gerilediği görülmektedir. BH+ meme kanseri hücrelerinde ise zamana bağlı curcumin (25 µM) uygulamasıyla özellikle 3, 6 ve 9. saatte anlatımın indüklendiği 12. saat uygulamasıyla beraber anlatım seviyesinin düştüğü görülmektedir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde Atg3'ün bazal anlatımı düşükken curcumin uygulamasıyla birlikte erken saat ilaç uygulamalarında bu anlatımın arttığı geç saat uygulamalarına doğru anlatımın geri çekildiği görülmektedir. BH+ meme kanseri hücrelerinde ise bazal seviyede anlatım zamana bağlı curcumin uygulamalarına kıyasla daha yüksektir. BH+ meme kanseri hücrelerinde Atg3 anlatımının 6. saat curcumin uygulaması sonucu indüklendiği ancak geç saat uygulamalarda bu anlatım seviyesinin düştüğü görülmektedir. LC3A'nın anlatımının MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasıyla beraber 3, 6, 9 ve 12. saatte indüklendiği görülmektedir. BH+ meme kanseri hücrelerinde ise zamana bağlı curcumin uygulanması sonucu 3, 6 ve 9. saatte LC3A'nın anlatımının indüklendiği tespit edilmiştir. Zamana bağlı curcumin uygulaması sonucu MDA-MB-231 doğal tip meme

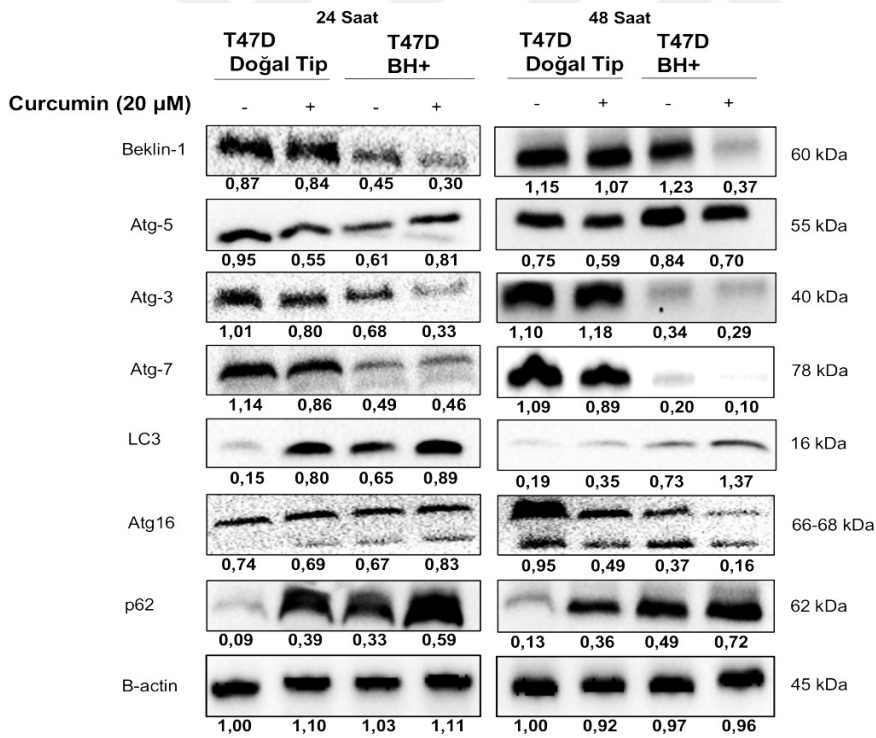
kanseri hücrelerinde Atg7'nin anlatımı özellikle 6. saatte indüklenirken BH+ meme kanseri hücrelerinde ise zamana bağlı olarak azaldığı bazal anlatım seviyesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Atg12'nin anlatımına MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde bakıldığında curcumin uygulamasıyla beraber erken saatlerde anlatımın indüklendiği görülürken BH+ meme kanseri hücrelerinde ise bu anlatımın 9. ve 12. saatte azaldığı ancak 24. saatte tekrar indüklendiği belirlenmiştir. Zamana bağlı curcuminin hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücre hatlarında otofaji üzerine etkisine genel olarak bakıldığında erken saat uygulamalarda indüklenme görülürken geç saat uygulamalarda bu indüklenmenin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının otofaji üzerine etkisinin immünoblotlama tekniği ile gösterilmesi.

T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında Beklin-1'in anlatımında curcumin (20 µM) uygulamasıyla beraber çok az da olsa düşüş görülürken bu anlatım BH+ meme kanseri hücrelerinde daha belirgindir. Atg5'in anlatımının T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla beraber azaldığı hem 24 hemde 48 saatlik uygulama sonucu görülmektedir. BH+ meme kanseri hücrelerinde ise 24 saatlik curcumin (20 µM) uygulaması sonucu anlatımın indüklendiği görülürken 48 saatlik curcumin uygulamasıyla beraber bu anlatım seviyesinin gerilediği görülmektedir. Atg3'ün hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde anlatımı 24 saatlik curcumin uygulamasıyla beraber bazal anlatıma göre düşüş gösterirken 48 saatlik uygulamada belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Atg7'nin T47D doğal tip meme

kanseri hücrelerinde anlatımına bakıldığında curcumin uygulamasıyla beraber hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sonucu düşüş görülmektedir. BH+ meme kanseri hücrelerinde Atg7'nin anlatımı ise 24 saatlik curcumin uygulaması sonucu çok az artış gösterirken 48 saatlik curcumin uygulamasında bu artışın geri çekildiği tespit edilmiştir. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saatlik uygulama sonucu LC3 anlatımına bakıldığında curcumin uygulanmasıyla birlikte anlatım belirgin bir şekilde indüklenmiştir. 48 saatlik uygulama sonucuna bakıldığında ise aynı etkiyi belirgin bir şekilde olmasa da görmekteyiz. Atg16'nın 24 saatlik uygulama sonucu hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde anlatımına bakıldığında bariz bir fark gözlenmezken 48 saatlik uygulama sonucu her iki hücre hattında da curcumin uygulamasıyla beraber anlatım seviyesinin düştüğü belirlenmiştir. p62'nin bazal anlatımı T47D doğal tip meme kanseri hücrelerine kıyasla BH+ meme kanseri hücrelerinde daha yüksektir. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hem 24 hem de 48 saatlik curcumin uygulamasıyla beraber p62 anlatımına bakıldığında ise anlatımın açık bir şekilde indüklendiği görülmüştür (Şekil 18).

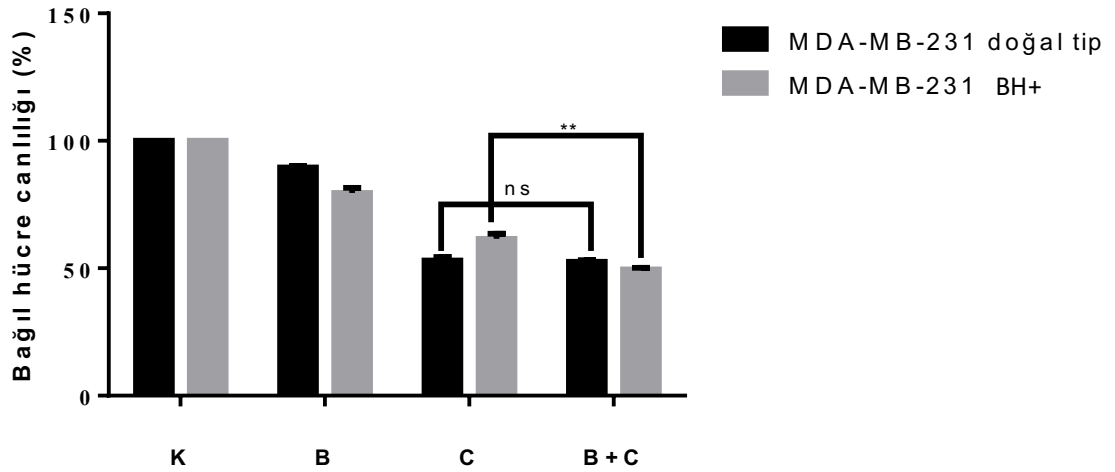


Şekil 18. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı curcumin uygulamasının otofaji üzerine etkisinin immünoblotlama tekniği ile gösterilmesi.

1.32 Otofajinin baskılanması durumunda curcuminin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi

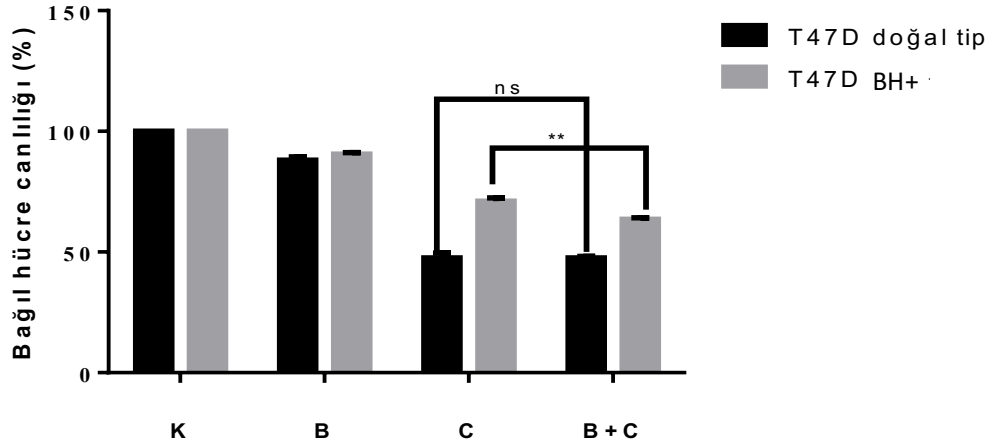
MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hatlarında yalnız curcumin ve curcumin ile beraber bafilomisin uygulandığında hücre canlılığı üzerine etkisi MTT tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında, 24 saat 25 µM curcumin uygulaması hücre canlılığına %52 oranında ket vururken, BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında %58 hücre canlılığı görülmüştür. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerde sadece curcumin uygulaması hücre canlılığına %52 ket vururken, bafilomisinle beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığını %53'e düşürdüğü ve anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında ise sadece curcumin uygulamasında hücre canlılığı %58 iken, bafilomisinle beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığına %45 ket vurduğu tespit edilmiştir. Bafilomisinin MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını kontrol hücrelere kıyasla %92'ye düşürdüğü, otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ise bafilomisin uygulamasının %78'e düşürdüğü tespit edilmiştir. Curcumin uygulanmasının doğal tip hücre hattında, BH anlatımı arttırılmış hücre hattına oranla daha fazla hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Buradan otokrin BH anlatımının curcumin'e karşı bir direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Ancak bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanması MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerindeki yalnız curcumin uygulamasındaki direncin kırılmasını sağlamıştır (Şekil 19).



Şekil 19. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (p<0.01; K: Kontrol, B: Bafilomisin, C: Curcumin, B+C: Bafilomisin+Curcumin).**

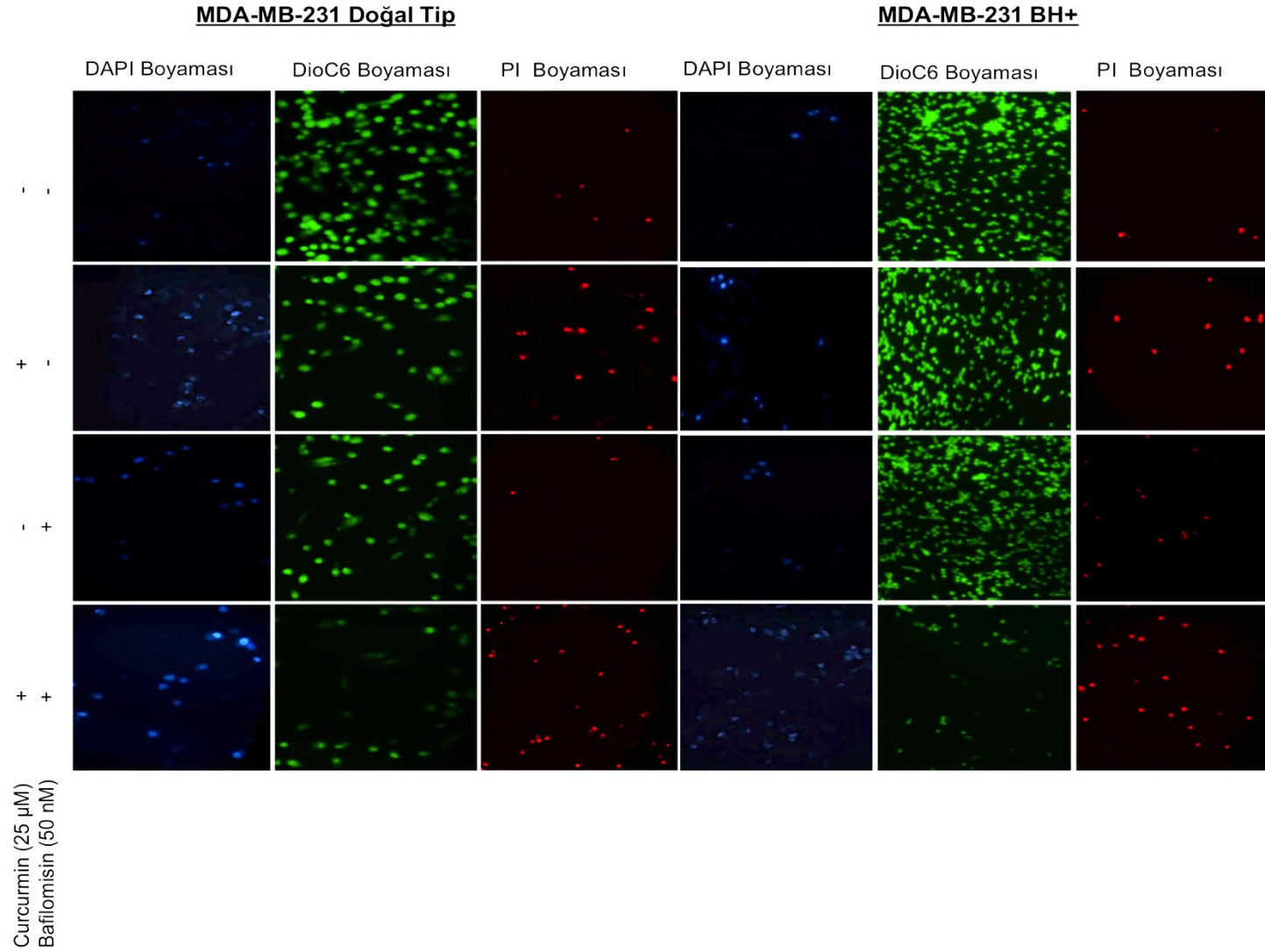
T47D doğal tip meme kanseri hücre hattında, 24 saat 20 µM curcumin uygulaması hücre canlılığına %46 oranında ket vururken, BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında %70 hücre canlılığı görülmüştür. T47D doğal tip hücrelerde sadece curcumin uygulaması hücre canlılığına %46 ket vururken, bafilomisinle beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığını %47'ye düşürdüğü ve anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Otokrin BH anlatımı arttırılmış meme kanseri hücre hattında ise sadece curcumin uygulamasında hücre canlılığı %70 iken, bafilomisinle beraber curcumin uygulamasının hücre canlılığına %64 ket vurduğu tespit edilmiştir. Bafilomisinin T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını kontrol hücrelere kıyasla %87'ye düşürdüğü, otokrin BH anlatımı yapan T47D meme kanseri hücrelerinde ise bafilomisin uygulamasının %91'e düşürdüğü tespit edilmiştir. Curcumin uygulanmasının doğal tip hücre hattında, BH anlatımı arttırılmış hücre hattına oranla daha fazla hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Buradan otokrin BH anlatımının curcumin'e karşı bir direnç geliştirdiği tespit edilmiştir. Ancak bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanması T47D BH+ meme kanseri hücrelerindeki yalnız curcumin uygulamasındaki direncin kırılmasını sağlamıştır (Şekil 20).



Şekil 20. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcumin ve bafilomisin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (** $p < 0.01$; K: Kontrol, B: Bafilomisin, C: Curcumin, B+C: Bafilomisin+Curcumin).

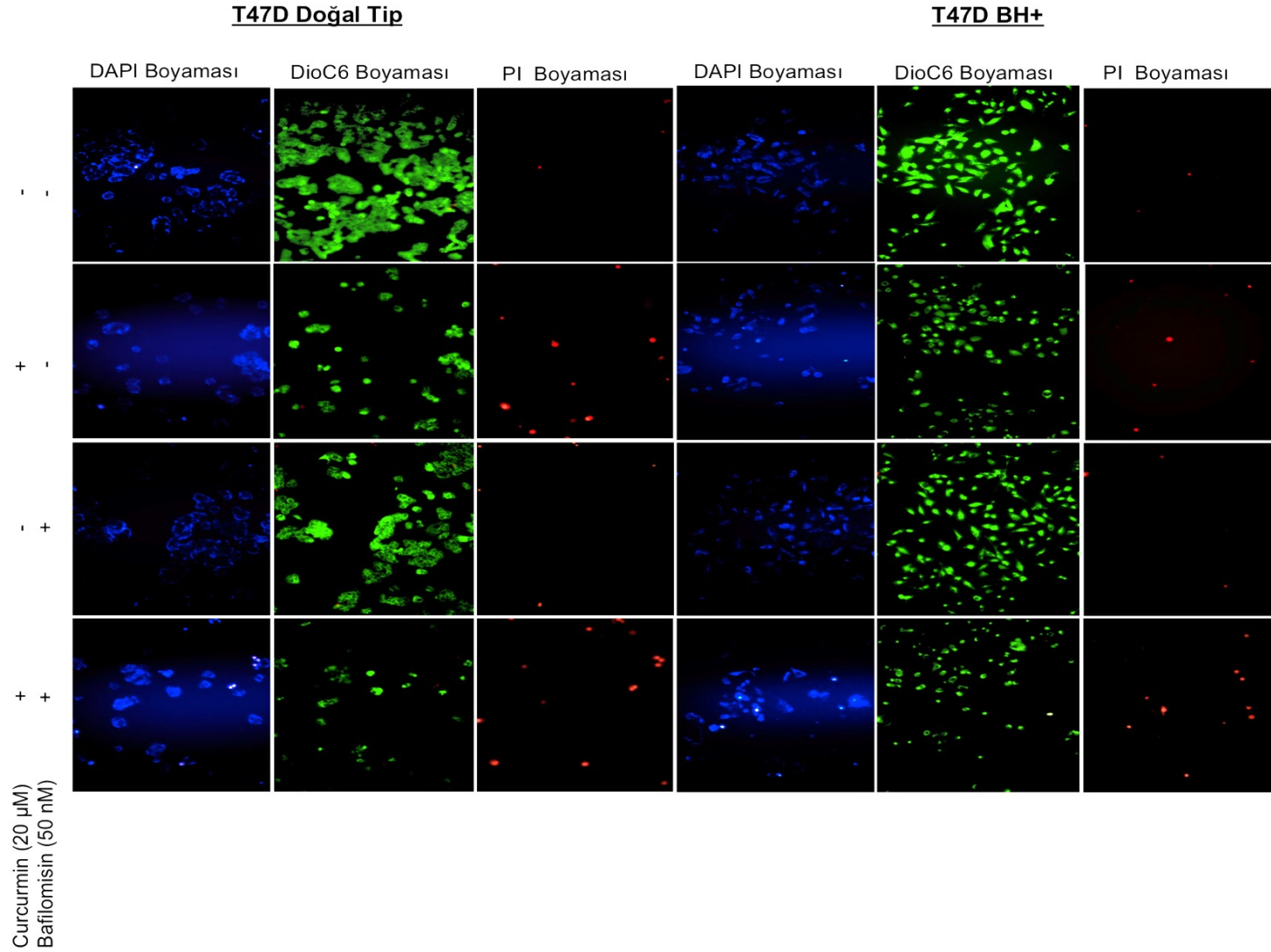
1.33 Bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik ölüm ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin irdelenmesi

Otofajinin bafilomisin ile engellendiği durumda curcumin uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik ölüm ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisi Dioc6, DAPI ve PI floresan boyamaları ile gerçekleştirilmiştir. Curcumin uygulamasının (25 μ M) hem doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı görülürken bu etkinin otokrin BH anlatımı ile MDA-MB-231 hücrelerinde curcumine karşı direnç gösterdiği gözlemlenmektedir. Ancak bafilomisin (50 nM) ile beraber curcumin uygulamasının hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasına kıyasla mitokondriyal membran potansiyelini belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması ile beraber DNA kırıkları artar iken MDA-MB-231 BH+ hücre hattında doğal tipe oranla daha az DNA kırıkları görülmektedir. Curcumin uygulaması sonrasında MDA-MB-231 doğal tip hücre hattında ölü hücre sayısında artış görülmektedir. MDA-MB-231 BH+ hücre hattında ise doğal tipe oranla ölü hücre sayısındaki artış daha az olarak gözlemlenmiştir. Bafilomisin ve curcuminin birlikte uygulanması ile hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli azalırken, DNA kırıklarının ve ölü hücre sayısının artışı söz konusudur (Şekil 21).



Şekil 21. Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümu, DNA kondenzasyonu, mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.

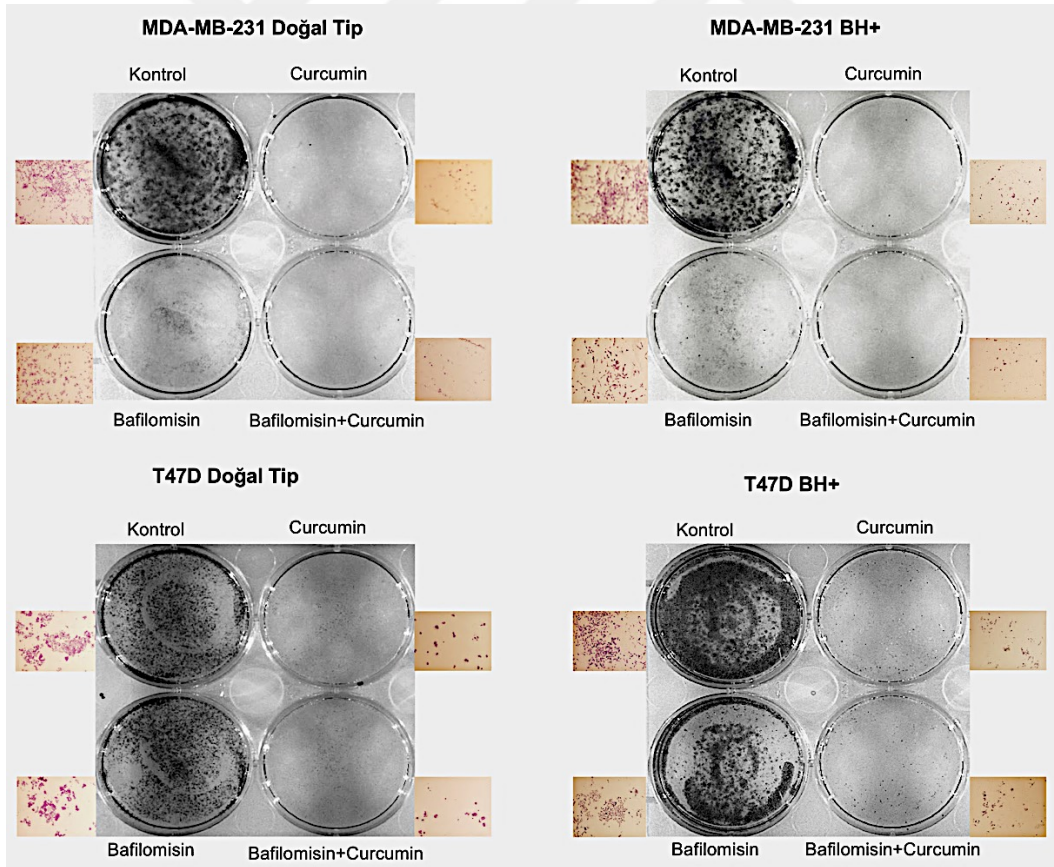
Bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde apoptotik ölüm ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisini gösterebilmek için Dioc6, DAPI ve PI floresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. Curcumin uygulaması (20 μ M) ile birlikte doğal tip hücre hattında mitokondriyal membran potansiyeli azalırken otokrin BH anlatımı gerçekleşen hücre hattında büyük bir değişiklik gözlemlenmemektedir. Ancak bafilomisin (50 nM) ile birlikte curcumin uygulamasının hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücre hattında sadece curcumin uygulamasına kıyasla mitokondriyal membran potansiyelini belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. T47D doğal tip hücre hattında curcumin uygulaması ile birlikte DNA kırıkları artar iken T47D BH+ hücre hattında doğal tipe oranla daha az DNA kırıkları görülmektedir. Curcumin uygulaması sonrasında T47D doğal tip hücre hattında ölü hücre sayısında artış görülmektedir. T47D BH+ hücre hattında ise doğal tipe oranla ölü hücre sayısındaki artış daha az olarak gözlemlenmiştir. Bafilomisin ve curcuminin birlikte uygulanması ile hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyeli azalırken, DNA kırıklarının ve ölü hücre sayısının artışı söz konusudur (Şekil 22).



Şekil 22. Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü, DNA kondenzasyonu, mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyamalar ile gösterilmesi.

1.34 Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

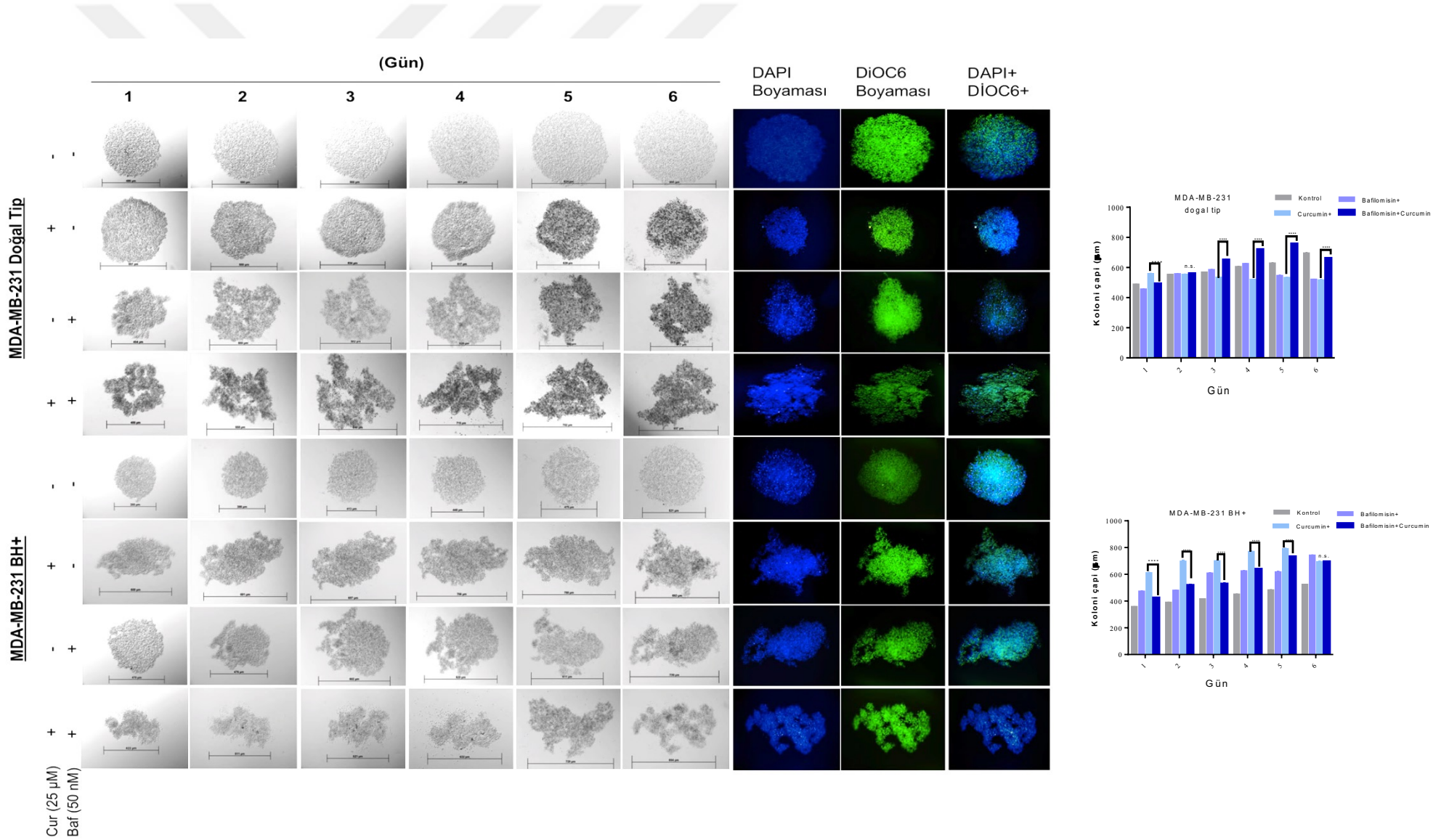
MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek için koloni formasyon tekniği kullanılmıştır. Otokrin BH anlatımının MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücre hattında doğal tip hücrelere kıyasla koloni oluşumunu tetiklediği saptanmıştır. Ayrıca curcuminin koloni oluşumu üzerine baskılayıcı etkisi hem doğal tip hem de BH+ MDA-MB-231 ve T47D meme kanser hücre hatlarında tespit edilmiştir. Bafilomisin (50 nM) uygulaması tek başına koloni oluşumu üzerine azaltıcı etki göstermiş olsa da curcumin ile beraber bafilomisin uygulaması koloni oluşumu üzerine ciddi bir baskılayıcı etki göstererek hücre canlılığını azaltmıştır (Şekil 23).



Şekil 23. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

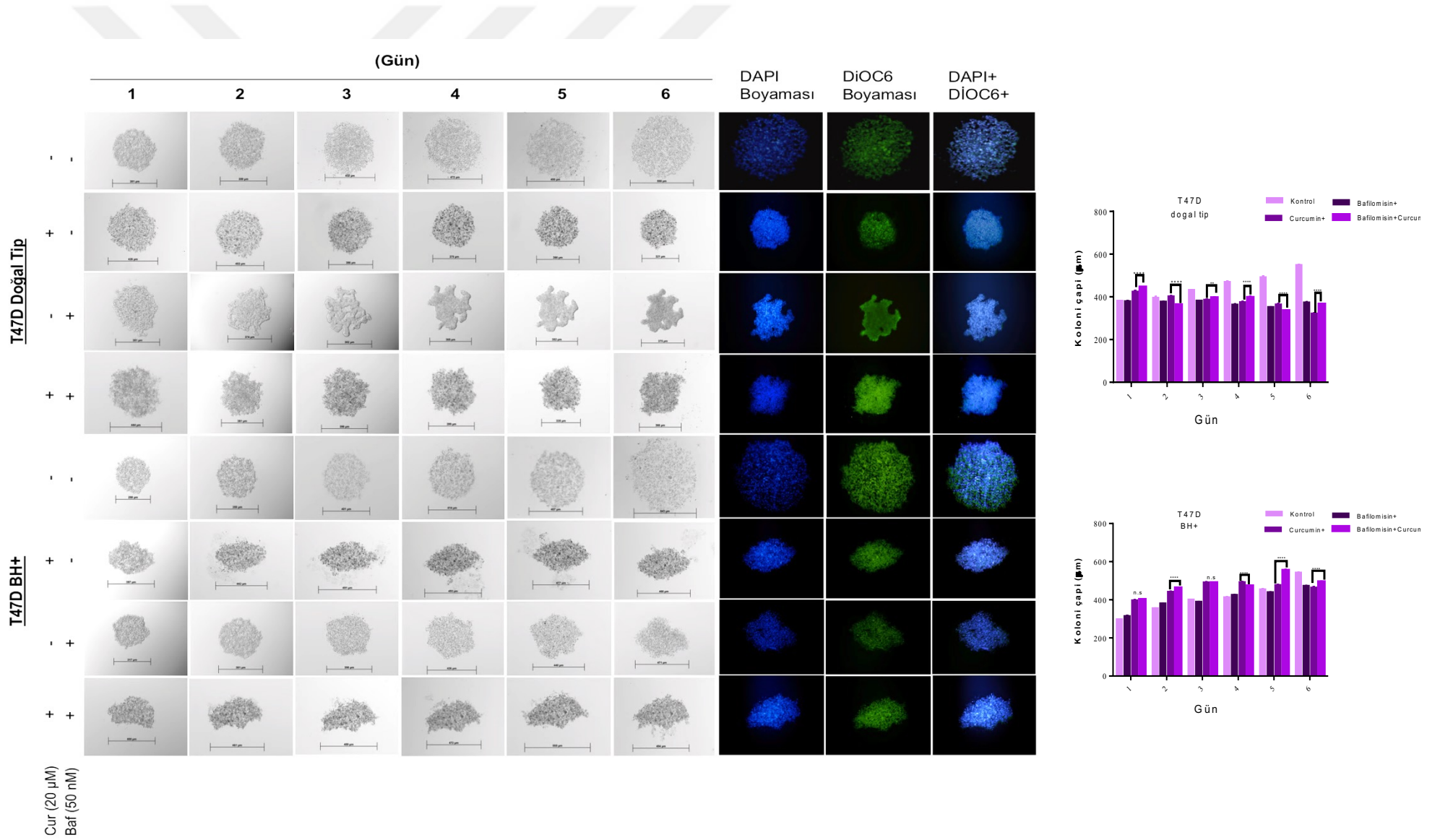
1.35 Otofajinin engellendiği durumda zamana bağlı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücresleri üzerine etkisinin asılı damla modeli tekniği ile gösterilmesi

Otofajinin bafilomisin (50 nm) ile engellendiği durumda curcuminin MDA-MB-231 doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin 3D hücre kültürü modellerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi gerçekteştirilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri asılı damla modeli tekniği ile sağlıklı kontrol hücrelerde 6 gün boyunca kolonilerin çapının 691 μm 'a çıkmış olduğu tespit edilmiştir. Ancak 25 μm curcumin uygulaması ile 4. günden itibaren sağlıklı kontrol hücrelere kıyasla asılı damla modeli ile gerçekteştirilen 3D kültürlerde MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinin çapının 513 μm 'a gerilediği tespit edilmiştir. Otolizozom inhibitörü olan bafilomisin (50 nm) uygulanan hücrelerde ise koloni çapının 6. günün sonunda 517 μm olduğu görülmüştür. Ancak hem curcumin hem de bafilomisinin beraber uygulandığı durumda 6. günün sonunda MDA-MB-231 doğal tip hücrelerin çapının 657 μm 'a ulaşmış olduğu görölse de ikili ilaç uygulamasının koloni oluşumunu dağıttığı ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. Aynı model sistem otokrin BH anlatımı kazandırılmış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde incelendiğinde; sağlıklı kontrol hücrelerde 6. günün sonunda koloni çapının 521 μm 'a çıktığı gözlenmiştir. Ancak 25 μm curcumin uygulaması ile bu etkinin 5. günden itibaren geçtiği tespit edilmiştir. Otolizozom inhibitörü olan bafilomisin (50 nm) uygulanan hücrelerde ise koloni çapının 6. günün sonunda 739 μm 'a ulaştığı görülmüştür. Ancak hem curcumin hem de bafilomisinin beraber uygulandığı durumda ise 6. günün sonunda MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerin çapının 694 μm 'a ulaşmış olduğu görölse de ikili ilaç uygulamasının koloni oluşumunu dağıttığı ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. 6. gün sonunda curcumin uygulaması MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde kolonilerin büyüklüklerine azaltıcı yönde etki yaparken otokrin BH anlatımı kazandırılmış hücreler curcumine karşı direnç mekanizmasını aktive ettiği için koloni çapını 693 μm 'a çıkardığı gösterilmiştir (şekil 24).



Şekil 24. Otofajinin engellendiği durumda zamana bağlı curcumin uygulamasının 3D olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi (** $p < 0.0001$).**

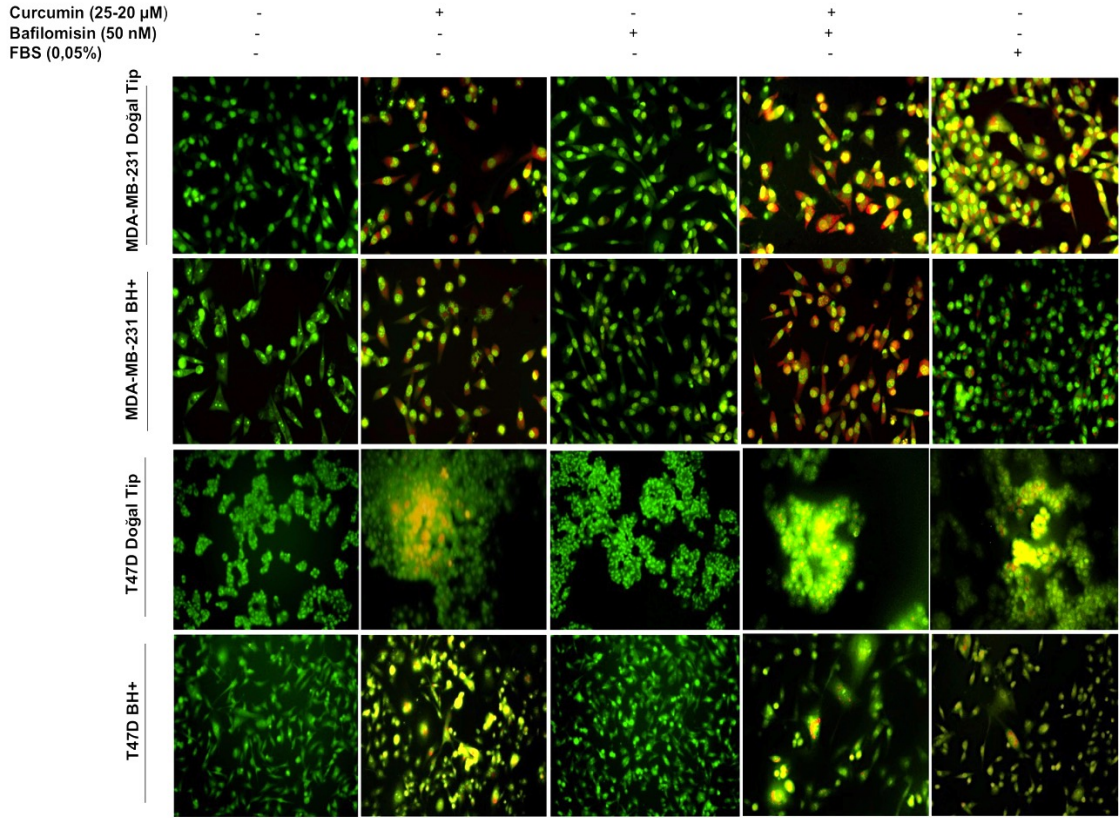
Otofajinin bafilomisin (50 nm) ile engellendiği durumda curcuminin T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış T47D meme kanseri hücrelerinin 3D hücre kültürü modellerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi gerçekleştirilmiştir. T47D doğal tip meme kanseri asılı damla modeli tekniği ile sağlıklı kontrol hücrelerde 6 gün boyunca kolonilerin çapının 550 μm 'a çıkmış olduğu tespit edilmiştir. Ancak 20 μm curcumin uygulaması ile 3. günden itibaren sağlıklı kontrol hücrelere kıyasla asılı damla modeli ile gerçekleştirilen 3D kültürlerde T47D doğal tip hücrelerinin çaplarında düşüş gözlenmiş ve 6. günün sonunda çaplarının 321 μm 'a gerilediği tespit edilmiştir. Otolizozom inhibitörü olan bafilomisin (50 nm) uygulanan hücrelerde koloni çapının 6. günün sonunda 375 μm olduğu görülmüştür. Ancak hem curcumin hem de bafilomisin beraber uygulandığı durumda ise 6. günün sonunda T47D doğal tip hücrelerin çapının 366 μm 'a ulaşmış olduğu ve hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. Aynı model sistem otokrin BH anlatımı kazandırılmış T47D meme kanseri hücrelerinde incelendiğinde; sağlıklı kontrol hücrelerde 6. günün sonunda koloni çapının 543 μm 'a çıktığı gözlenmiştir. Ancak 20 μm curcumin uygulaması ile bu etkinin 5. hünden itibaren geçtiği tespit edilmiştir. Otolizozom inhibitörü olan bafilomisin (50 nm) uygulanan hücrelerde ise koloni çapının 6. günün sonunda 471 μm 'a ulaştığı görülmüştür. Ancak hem curcumin hem de bafilomisin beraber uygulandığı durumlarda ise 6. günün sonunda T47D BH+ meme kanseri hücrelerin çapının 494 μm 'a ulaşmış olduğu hücreleri ölüme yönlendirdiği tespit edilmiştir. 6. gün sonunda curcumin uygulaması T47D doğal tip hücrelerinde kolonilerin büyüklüklerine azaltıcı yönde etki gerçekleştirmiştir. Otokrin BH anlatımı kazandırılmış T47D hücrelerinde de azaltıcı etki söz konusudur ancak bu etki T47D doğal tip hücrelerinde daha fazla görülmektedir (Şekil 25).



Şekil 25. Otofajinin engellendiği durumda zamana bağlı curcumin uygulamasının 3D olarak T47D meme kanseri hücre kültüründe etkisinin gösterilmesi (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

1.36 Otofajinin baskılandığı durumda curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde akridin oranj boyaması gösterilmesi

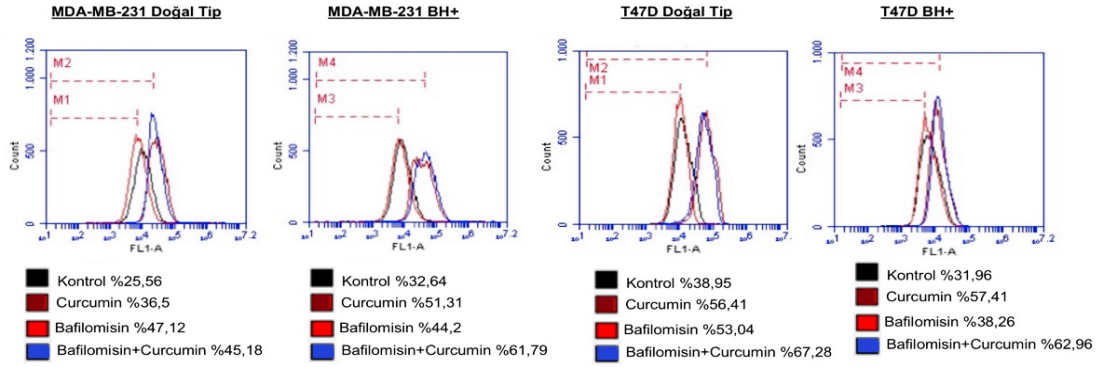
MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulaması ile otofajik vakuol oluşumunu gözlemlemek için akridin oranj floresan boyaması gerçekleştirilmiştir. Hem MDA-MB-231 hem de T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinin ilaç uygulanmayan sağlıklı kontrol hücreler ile sadece bafilomisin (50 nM) uygulanmış hücrelerde otofajik vakuol oluşumu gözlemlenmemiştir. Ancak curcumin uygulamasının hem doğal tip hem de BH anlatımı kazandırılmış hücrelerde otofajik vakuol oluşumunu indüklediği akridin oranj boyaması ile tespit edilmiştir. Ayrıca bafilomisin ile otolizozom oluşumunun engellendiği durumda curcumin (25 µM) uygulamasının MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajik vakuol oluşumlarının artış gösterdiği ve otofagozom oluşumunda hücreleri tuttuğu görülmüştür. Benzer şekilde, T47D meme kanseri hücre hattına 20 µM curcuminin 24 saat uygulamasının otofajik vakuol oluşumunu tetiklediği ve bu etkinin hem doğal tip hem de BH+ hücrelerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Ancak 1 saat bafilomisin (50 nM) uygulaması ile otolizozom oluşumunun engellendiği durumdaki curcumin uygulamasıyla otofajik vakuollerin görünürlülüğü akridin oranj boyaması ile gösterilmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi.

1.37 Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının Otofajiye bağlı GFP-LC3 aktivasyonu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre akış sitometresi ile gösterilmesi

MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve otokrin BH anlatımı kazandırılmış meme kanseri hücrelerine GFP-LC3 plazmiti transfekte edilmiştir. Daha sonra curcumin ve bafilomisin uygulamaları gerçekleştirilerek hücre akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat 25 μ M curcumin ve 1 saat 50 nM bafilomisinin beraber uygulanması sonucunda hem kontrol hücrelerine hem de sadece curcumin uygulamasına kıyasla GFP-LC3 aktivasyonundaki artışın daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat 20 μ M curcumin ve 1 saat 50 nM bafilomisinin beraber uygulanması sonucunda hem kontrol hücrelerine hem de sadece curcumin uygulamasına kıyasla GFP-LC3 aktivasyonundaki artışın daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 27).



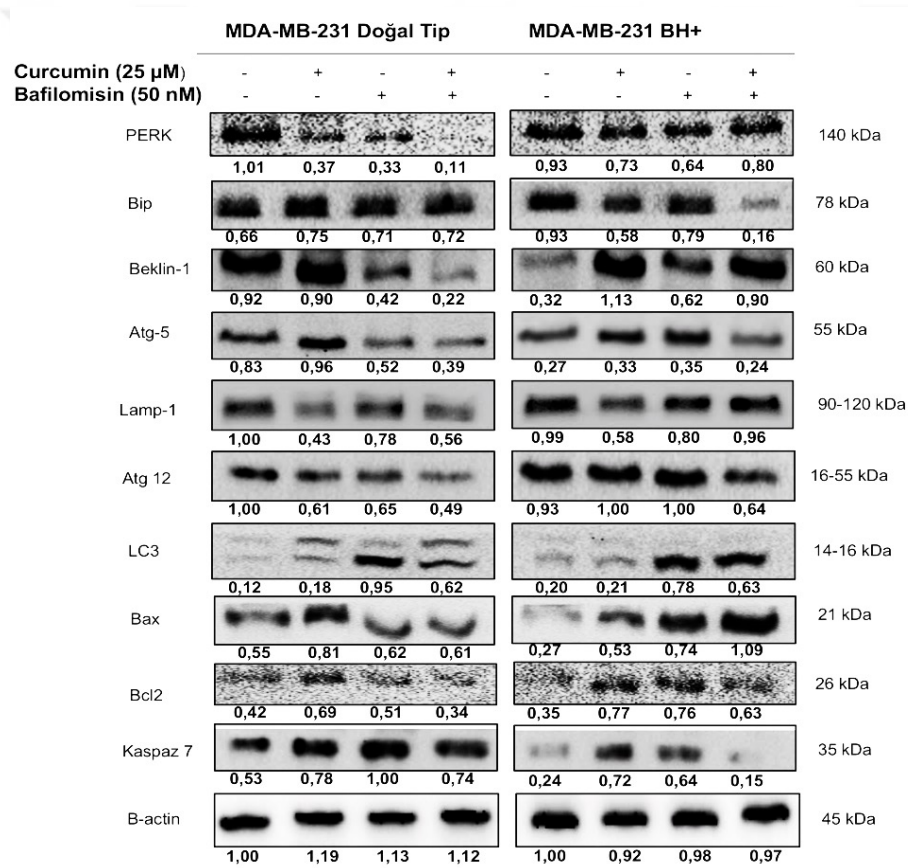
Şekil 27. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının otofajiye bağlı GFP-LC3 aktivasyonu üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.

1.38 Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

Otofajinin bafilomisin ile engellendiği durumda curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisini belirlemek amacıyla immünoiblottama tekniği kullanılmıştır. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında ER stres anahtarı olan PERK ve BİP'in anlatımına bakılmıştır. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde PERK anlatımı curcumin (25 µM) uygulaması ile azalırken bafilomisin (50 nM) ile curcuminin birlikte uygulamasıyla anlatımın tamamen baskılandığı görülmüştür. BH+ meme kanseri hücrelerinde ise curcumin uygulamasıyla PERK anlatımında azalma görülse de bafilomisin ile curcumin birlikte uygulandığında doğal tipteki gibi bir baskılanma söz konusu değildir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde BİP anlatımı curcumin uygulaması ile artarken bafilomisin ile curcuminin birlikte uygulanmasıyla anlatımın baskılandığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde ise curcumin uygulamasıyla BİP anlatımı azalırken bafilomisin ile curcumin birlikte uygulandığında anlatımın belirgin bir şekilde baskılandığı görülmüştür. Apoptotik markırlar olarak Bax, kaspaz- 7 ve anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nun anlatımlarına bakılmıştır. Bax gibi proapoptotik üyeler, kaspaz serbestleşmesini uyarmakta ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-c'yi serbestleştirmekte ve bu şekilde apoptozu indüklemektedir. Bax'ın anlatımı MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin

varlığında indüklenirken bafilomisin ve curcuminin birlikte uygulanması Bax anlatımını geri çekmektedir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde ise curcumin uygulamasıyla beraber Bax anlatımının indüklendiği görülürken bafilomisin ile curcuminin birlikte uygulanması sonucunda bu indüklenmenin daha da artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bcl-2'nin MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin ile birlikte anlatımı indüklenirken bafilomisin ile curcuminin kombin uygulanması bu etkiyi geri çekmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde de Bcl-2 anlatımı için aynı etki görülmüştür. Kaspazlar sistein proteazlardır ve normalde sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunmaktadır. Ancak proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçmektedirler. Bir efektör kaspaz olan kaspaz-7'nin anlatımına bakıldığında; MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla beraber anlatımın indüklendiği görülürken bafilomisin ile curcuminin kombin uygulamasının bu etkiyi geri çektiği tespit edilmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde aynı etki görülerek bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanması sonucu kaspaz-7'nin anlatımının baskılandığı gözlemlenmiştir. Beklin-1'in hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla birlikte anlatımının indüklendiği tespit edilmiştir. Ancak bafilomisin ile curcuminin kombin olarak uygulanması sonucu MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde indüklenen etki baskılanırken, BH+ meme kanseri hücrelerinde bu kombin uygulamanın anlatımı indüklemeye devam ettiği gösterilmiştir. Atg5'in hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla birlikte anlatımının indüklendiği belirlenmiştir. Bafilomisin uygulaması MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde Atg5 anlatımını baskıların, MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde anlatımı indüklemiştir. Bafilomisin ile curcuminin kombin olarak uygulanması sonucu hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde Atg5 anlatımının baskılandığı görülmektedir. Lamp-1'in MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde bazal anlatımı BH+ meme kanseri hücrelerine kıyasla daha düşük seviyededir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla anlatım baskılanmış, bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanmasıyla birlikte bu baskılanma devam etmiştir. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla anlatım baskılanmış fakat bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanmasıyla birlikte bu baskılanma ortadan kalkarak Lamp-1'in anlatımı indüklenmiştir. Atg12'nin MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde bazal anlatımı BH+ meme kanseri hücrelerine kıyasla

daha düşük seviyededir. Curcumin uygulamasıyla beraber MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde Atg12'nin anlatımının baskılandığı görülürken, BH+ meme kanseri hücrelerinde belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulandığı durumda her iki hücre hattında da Atg12'nin anlatımında baskılanma görülmüştür. LC3'nin anlatımının MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması sonucu bazal anlatıma kıyasla indüklendiği tespit edilmiştir. Bafilomisin uygulamasıyla beraber LC3 anlatımı MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde daha çok indüklenmiş, bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanmasıyla bu indüklenen anlatım çok az da olsa geri çekilmiştir. BH+ meme kanseri hücrelerinde ise hem bafilomisin hem de bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulandığı durumda LC3 anlatımının indüklendiği görülmektedir (Şekil 28).

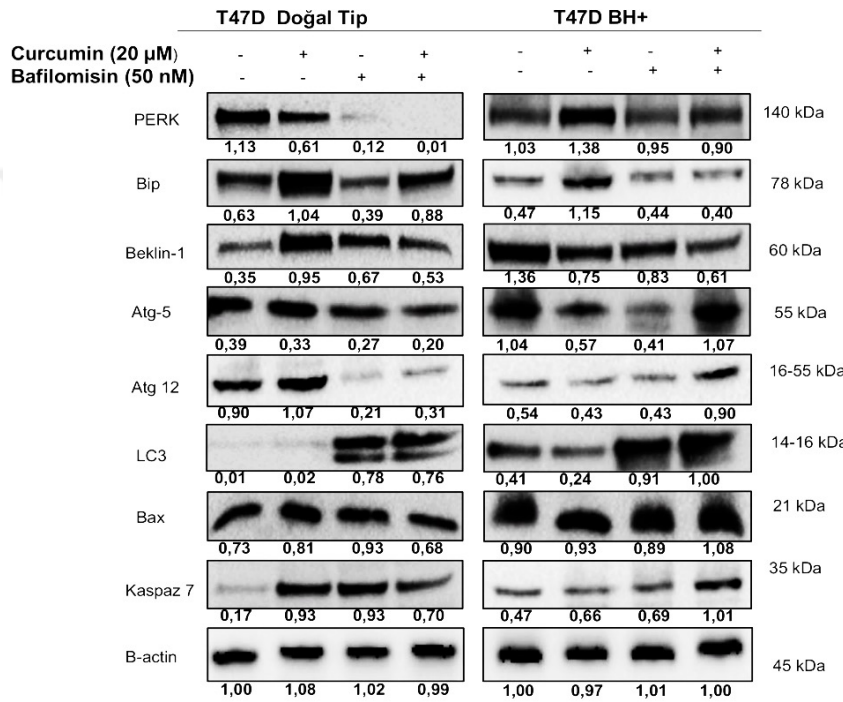


Şekil 28. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin gösterilmesi.

T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde ER stres anahtarı olan PERK ve BİP'in anlatımına bakılmıştır. T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde PERK anlatımı curcumin (20 µM) uygulaması ile azalırken bafilomisin (50 nM) ile curcuminin kombin olarak uygulamasıyla anlatımın tamamen baskılandığı görülmüştür. T47D BH+

meme kanseri hücrelerinde ise curcumin uygulamasıyla PERK anlatımının indüklendiği görülse de bafilomisin ile curcumin kombin olarak uygulanması sonucunda baskılanma söz konusudur. T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde BİP anlatımı curcumin uygulaması ile indüklenirken bafilomisin ile curcuminin kombin uygulanmasıyla beraber anlatımın baskılandığı tespit edilmiştir. T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde ise curcumin uygulamasıyla BİP anlatımı artarken, bafilomisin ile curcuminin kombin uygulanması sonucunda anlatımın belirgin bir şekilde baskılandığı görülmüştür. Bax'ın anlatımı T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin varlığında indüklenirken bafilomisin ve curcuminin birlikte uygulanması Bax anlatımını geri çekmektedir. T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde ise curcumin uygulamasıyla beraber Bax anlatımının indüklendiği görülürken bafilomisin ile curcuminin birlikte uygulanması sonucunda bu indüklenmenin daha da artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kaspaz-7'nin anlatımına bakıldığında; T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla beraber anlatımın indüklendiği görülürken bafilomisin ile curcuminin kombin uygulamasının bu etkiyi baskıladığı saptanmıştır. T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde ise bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanması sonucu kaspaz-7'nin anlatımının indüklendiği gözlemlenmiştir. Beklin-1'in T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla birlikte anlatımı indüklenirken, BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla beraber anlatımın baskılandığı tespit edilmiştir. Ancak bafilomisin ile curcuminin kombin olarak uygulanması sonucu T47D doğal tip hücrelerinde indüklenen etki baskılanırken, BH+ meme kanseri hücrelerinde ise bu kombin uygulamanın anlatımı daha da baskıladığı gösterilmiştir. Atg5'in T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla birlikte anlatımının indüklendiği görülürken BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulaması Atg5 anlatımını baskılamıştır. Bafilomisin uygulamasının hem T47D doğal tip hücrelerinde hem de T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde Atg5 anlatımını baskıladığı tespit edilmiştir. Bafilomisin ile curcuminin kombin olarak uygulanması sonucu T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde Atg5 anlatımının baskılandığı görülürken BH+ meme kanseri hücrelerinde bu anlatımın indüklendiği saptanmıştır. Curcumin uygulamasıyla beraber T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde Atg12'nin anlatımının indüklendiği görülürken, T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulandığı durumda ise T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde Atg12'nin anlatımının baskılandığı görülürken, T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde bu kombin uygulamanın anlatımı

indüklediği tespit edilmiştir. LC3'nin bazal anlatımı T47D doğal tip meme kanseri hücrelerine kıyasla BH+ meme kanseri hücrelerinde daha fazladır. Bafilomisin uygulamasıyla beraber LC3 anlatımı T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde indüklenmiş, bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulanmasıyla bu indüklenme devam etmiştir. T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla beraber anlatımın baskılandığı görülmüştür. Bunun yanısıra BH+ meme kanseri hücrelerinde ise hem bafilomisin hem de bafilomisin ve curcuminin kombin olarak uygulandığı durumda LC3 anlatımının indüklendiği saptanmıştır (Şekil 29).

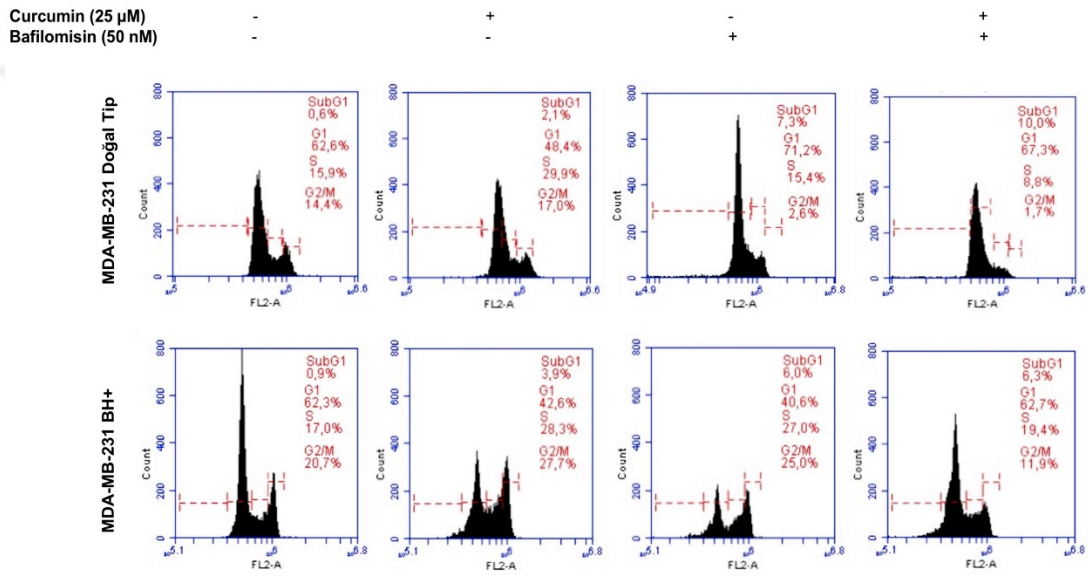


Şekil 29. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ER stres, otofaji ve apoptotik ölüm üzerine etkisinin gösterilmesi.

1.39 Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

Otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü belirlemek amacıyla PI boyaması sonrası akış sitometrisi kullanılarak gösterilmiştir. MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücre hattında curcumin (25 µM) SubG1 popülasyonunu arttırmaktadır. Bununla birlikte G1 popülasyonunda ise düşüşe sebep olmaktadır. MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücre hattında ise aynı şekilde SubG1

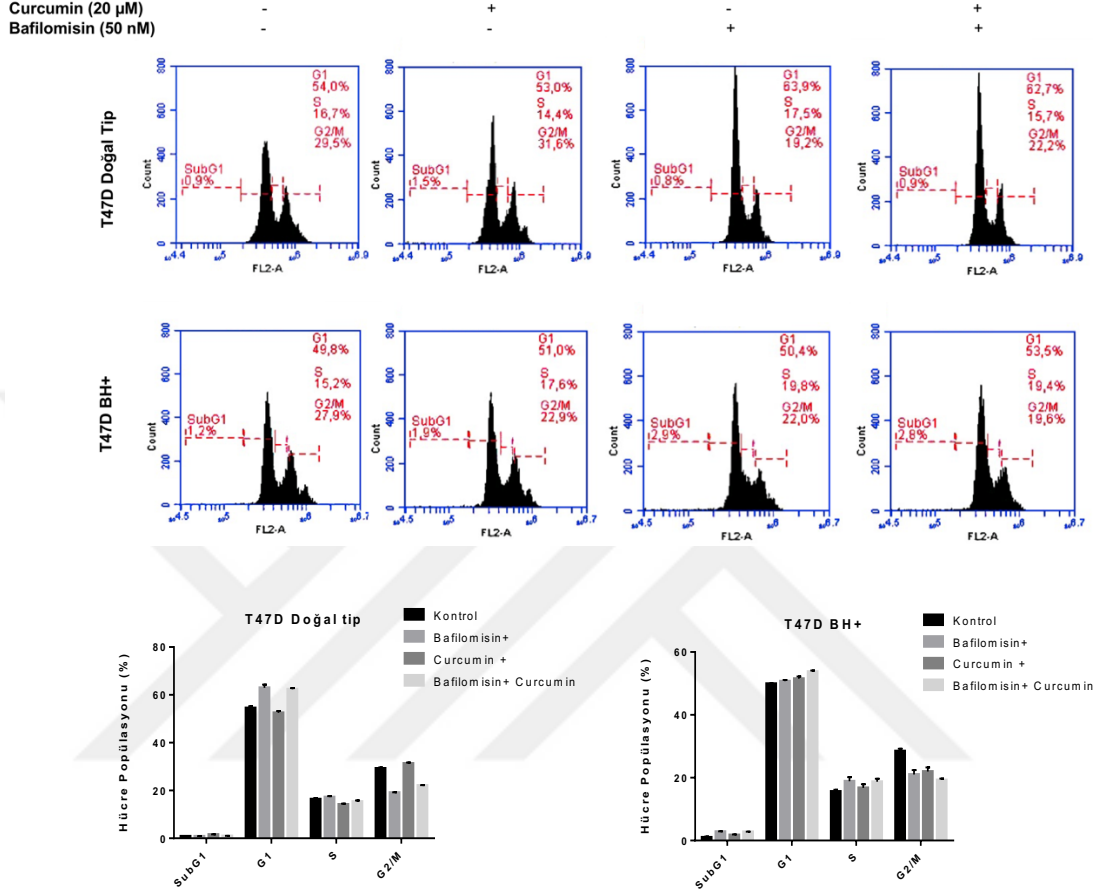
popülasyonunu artırırken G1 popülasyonunu düşürmektedir. Curcumin ile her iki hücre hattında SubG1 popülasyonunun artışı hücre ölümüne sebep olmaktadır. Ayrıca hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasıyla beraber G2/M popülasyonunda artış görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda curcuminin hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde G2/M fazını durdurucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bafilomisin (50 nM) ve curcuminin beraber uygulanması sonucunda ise MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde %10 SubG1 popülasyonu ve %67,3 G1 popülasyonu görülürken, BH+ hücrelerinde %6,3 SubG1 popülasyonu ve %62,7 G1 popülasyonunun varlığı belirlenmiştir (Şekil 30).



Şekil 30. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.

T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücre hattında curcumin (20 µM) SubG1 popülasyonunu arttırmaktadır. Curcumin ile her iki hücre hattında SubG1 popülasyonunun artışı hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bununla birlikte T47D doğal tip kontrol hücrelerinde %54 G1 popülasyonu ve %29,5 G2/M popülasyonu mevcut iken curcumin uygulamasıyla beraber %53 G1 popülasyonu ve %31,6 G2/M popülasyonunun varlığı tespit edilmiştir. T47D BH+ kontrol hücrelerinde ise %49,8 G1 popülasyonu ve %27,9 G2/M popülasyonu mevcut iken curcumin uygulamasıyla beraber %51 G1 popülasyonu ve %22,9 G2/M popülasyonunun varlığı belirlenmiştir. Bafilomisin (50 nM) ve curcuminin beraber uygulanması sonucunda ise T47D doğal tip hücrelerinde %62,7 G1 popülasyonu görülürken, BH+ hücrelerinde %53,5 G1

popülasyonunu mevcuttur. Bu sonuçlar doğrultusunda kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, curcumin ve bafilomisin'in beraber uygulanmasının hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerinde G1 fazında durdurucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 31).



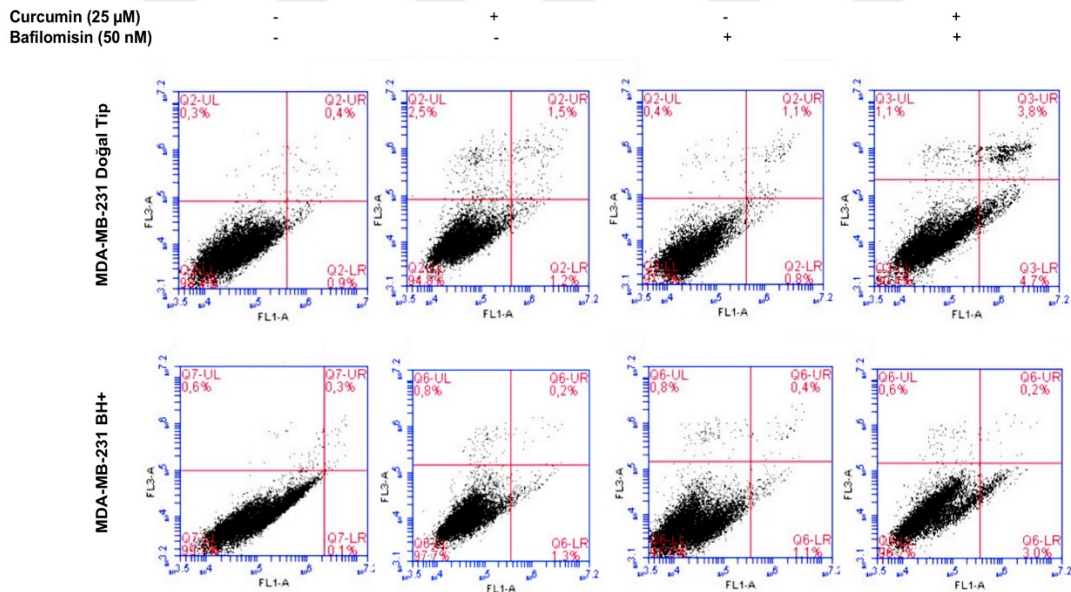
Şekil 31. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.

1.40 Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının apoptotik ölüm üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla Annexin V-FITC Propidyum İyodür boyamaları gerçekleştirilip hücre akış sitometrisi kullanılarak hücre popülasyonları incelenmiştir. Normal şartlarda hücre içi membranda bulunan fosfotidilserinin apoptotik süreçte hücrenin dış membranına geçişi söz konusu olması nedeniyle ancak apoptotik ölüme giden hücreler Annexin V boyası ile fosfotidilserinleri üzerinden bağlanmaktadır. Propidyum iyodür boyası ise ölü

hücrelerde sitoplazmik membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içerisine girebilmekte ve DNA'ya bağlanmaktadır. Böylece otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücreleri üzerinde erken, geç apoptotik ve nekrotik ölüm üzerine etkisi incelenmiştir.

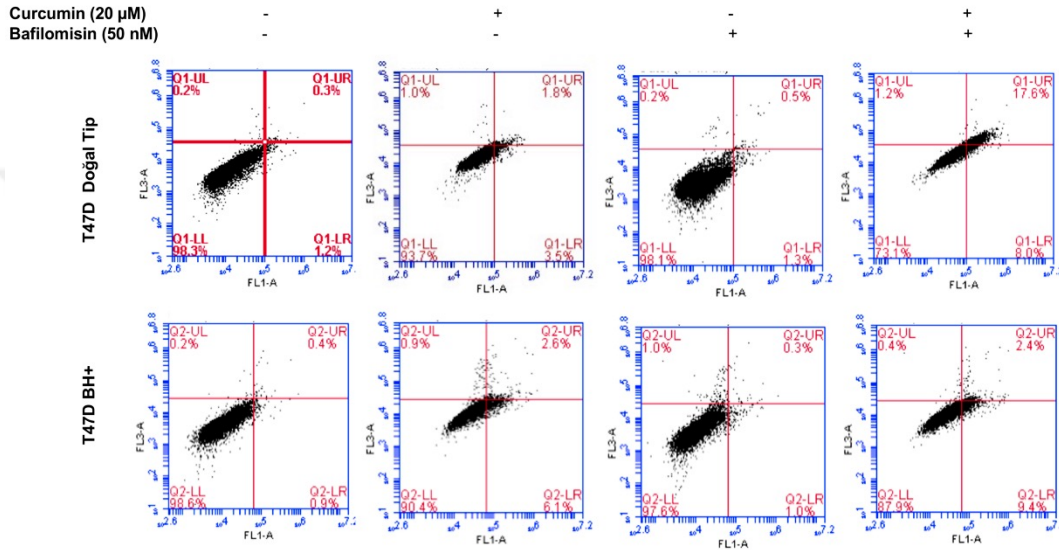
MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin (25 μ M) erken apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde %1,2'lik, BH+ meme kanseri hücrelerinde ise %1,3'lük erken apoptotik hücre popülasyonu görülmektedir. Bununla birlikte MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde %1,5'lik bir hücre popülasyonu da geç apoptotik süreçtir. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında BH geninin kazandırılması, curcumin tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı bir direnç oluşumunu tetiklemiştir. Bafilomisin (50 nM) ve curcumin (25 μ M) uygulamasıyla beraber hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde erken apoptotik yüzdesinin arttığı görülmektedir. Kombin uygulama sonucu MDA-MB-231 doğal tip meme kanseri hücrelerinde %4,7 erken apoptotik ve %3,8 geç apoptotik hücre popülasyonu görülürken, BH+ meme kanseri hücrelerinde ise %3 erken apoptotik ve %0,2 geç apoptotik hücre popülasyonu görülmektedir (Şekil 32).



Şekil 32. MDA-MB-231 doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ve curcumin uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.

T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin (20 μ M) erken apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. T47D doğal tip hücrelerinde %3,5, BH+ meme kanseri hücrelerinde ise %6,1'lik erken apoptotik hücre popülasyonu görülmektedir. Bununla

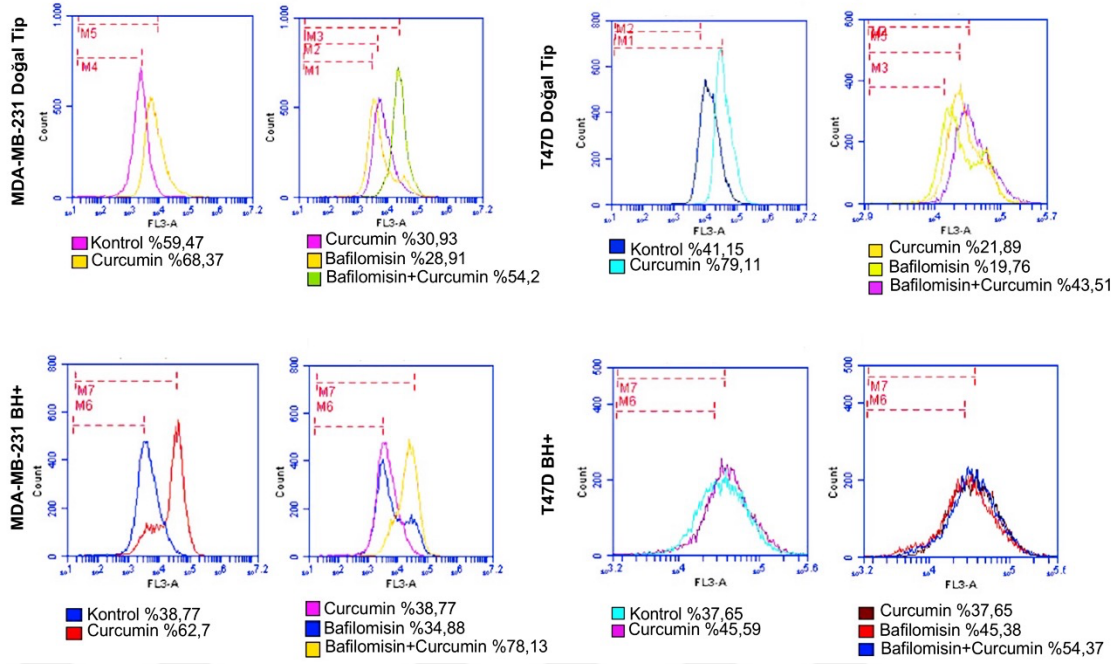
birlikte T47D doğal tip hücrelerinde %1,8'lik bir hücre popülasyonu da geç apoptotik süreçtir. T47D BH+ meme kanseri hücrelerine bakıldığında ise %2,6 bir hücre popülasyonu geç apoptotik süreçtir. Bafilomisin (50 nM) ve curcumin (20 µM) uygulamasıyla beraber hem T47D doğal tip hem de BH+ meme kanseri hücrelerinde erken apoptotik süreç yüzdesinin arttığı görülmektedir. Kombin uygulama sonucu T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde %8 erken apoptotik ve %17,6 geç apoptotik hücre popülasyonu görülürken, BH+ meme kanseri hücrelerinde ise %9,4 erken apoptotik ve %2,4 geç apoptotik hücre popülasyonu görülmektedir (Şekil 33).



Şekil 33. T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde bafilomisin ve curcumin uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin V-PI boyama yöntemi ile gösterilmesi.

1.41 Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde gösterilmesi

MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin engellediği durumda curcumin uygulamasının ROS değişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla H2DCFDA boyama ile akış sitometrisinde analiz gerçekleştirilmiştir. Hem MDA-MB-231 (25 µM) hem de T47D (20 µM) doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde 24 saat boyunca curcumin uygulamasının ROS üretimini indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca bafilomisin (50 nM) ve curcuminin kombin olarak uygulandığı durum ile sadece curcumin uygulanan durum kıyaslandığında, her bir hücre hattı için ROS düzeyinin kombin uygulama sonucunda çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 34).

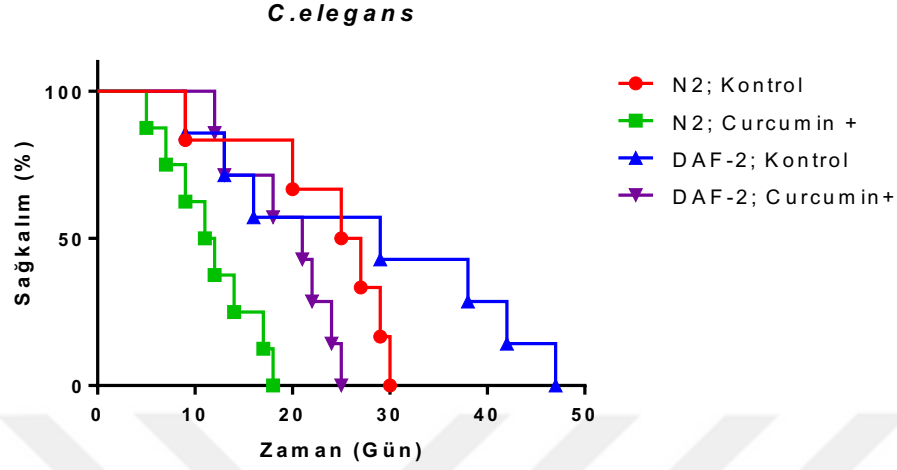


Şekil 34. MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının ROS oluşumu üzerine etkisinin hücre akış sitometrisi ile gösterilmesi.

1.42 Curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde sağkalım üzerine etkinliğinin yaşam eğrisi deneyi ile gösterilmesi

Caenorhabditis elegans'ta DAF-2, uzun ömürlülüğü düzenleyen insülin reseptör benzeri bir genidir. İnsülin benzeri metabolik kontrolü ile yaşam süresi regülasyonunu, kalori kısıtlaması ile indüklenen memeli uzun ömürlülüğü ile benzerlik göstermektedir. N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde curcumin uygulaması sonucu sağkalımı belirlemek amacıyla yaşam eğrisi deneyi gerçekleştirilmiştir. 25 μ M curcumin uygulamasıyla beraber N2 suşunun sağkalım yüzdesi 10. günde %50 düşüş göstermektedir. 18. günde ise 25 μ M curcumin uygulanan N2 suşunun tamamının öldüğü görülmektedir. DAF-2 suşunda ise 25 μ M curcumin uygulamasıyla beraber sağkalım yüzdesinin düştüğü ve 25. günde curcumin uygulanan DAF-2 suşunun tamamının öldüğü belirlenmiştir. Curcumin uygulanmayan N2 suşunda sağkalım 30 gün boyunca devam ederken DAF-2 suşunda ise 47. güne kadar devam ettiği görülmüştür.

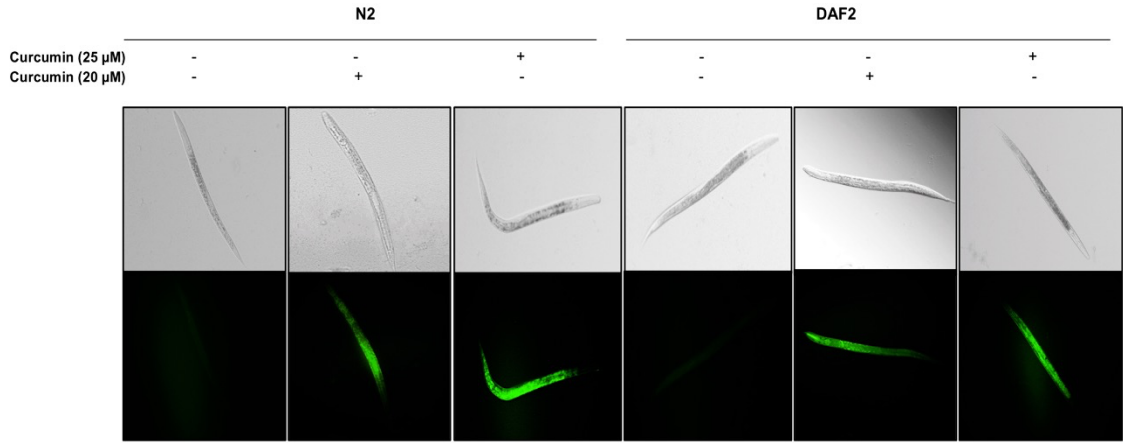
25 μ M curcumin uygulaması sonucunda sağkalım yüzdesinin N2 suşuna kıyasla DAF-2 suşunda zamana bağlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 35).



Şekil 35. Curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde sağkalım üzerine etkinliğinin yaşam eğrisi deneyi ile gösterilmesi.

1.43 Doza bağlı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde ROS üzerine etkisinin H2-DCF-DA boyaması ile gösterilmesi

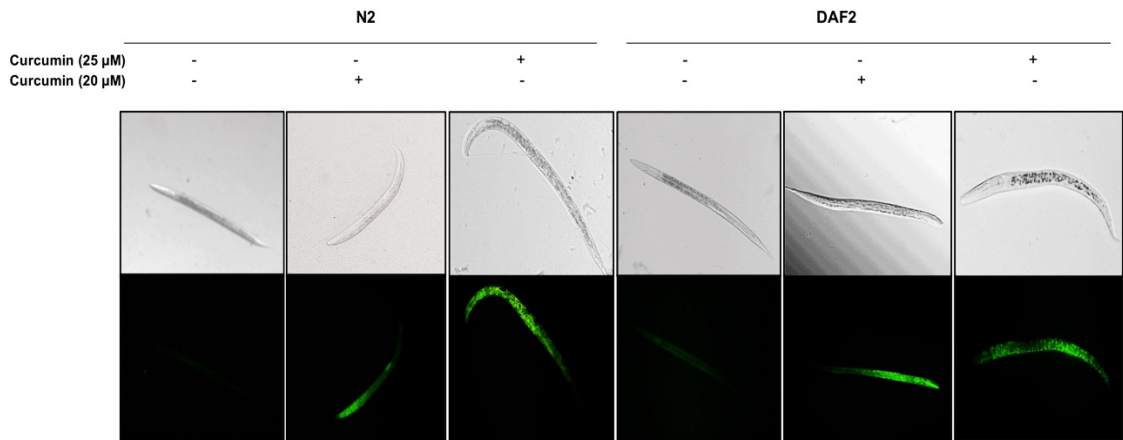
N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde doza bağlı curcumin uygulamasının ROS üzerine etkisini belirlemek amacıyla H2-DCF-DA boyaması gerçekleştirilmiştir. Hem N2 suşunda hem de DAF-2 suşunda 20 ve 25 μ M curcumin uygulaması sonucu ROS üretiminin indüklendiği floresan boyamalarda görülmektedir. Her iki suşta 25 μ M curcumin uygulaması sonucundaki ROS indüklenmesinin 20 μ M curcumin uygulamasına kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır N2 ve DAF-2 kontrol suşlarına bakıldığında ise ROS anlatımının artışı ifade eden ışımının görülmediği belirlenmiştir (Şekil 36).



Şekil 36. Doza bağlı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde ROS üzerine etkisinin H2-DCF-DA boyaması ile gösterilmesi.

1.44 Doza bağlı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde otofaji üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi

N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde doza bağlı curcumin uygulamasının otofaji üzerine etkisini belirlemek amacıyla akridin oranj boyaması gerçekleştirilmiştir. Floresan boyamalara göre doza bağlı olarak curcumin uygulamasının (20-25 μ M) hem N2 hem de DAF-2 suşunda otofajiyi indüklediği tespit edilmiştir. Her iki suşta 25 μ M curcumin uygulaması sonucundaki indüklenmenin 20 μ M curcumin uygulamasına kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır N2 ve DAF-2 kontrol suşlarına bakıldığında ise otofajik anlatım artışı ifade eden ışımaların görülmediği belirlenmiştir (Şekil 37).



Şekil 37. Doza bağlı curcumin uygulamasının N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde otofaji üzerine etkisinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlar arasında dünya çapında 2. sırada yaygınlıkla görülen kanser tipidir ve kanser kaynaklı ölümlerde 5. sırayı teşkil etmektedir [138]. Son dönemde meme kanserinde, pubertide meme gelişiminde rolü olan prolaktinin (PRL) ve postnatal büyüme üzerinde etkisi olan büyüme hormonunun (BH) rolü ortaya konmuştur. PRL'nin meme kanseri hücrelerinde, proto-onkogen olan c-myc'in anlatımını indükleyerek proliferasyon, invazyon ve metastazı tetiklediği gösterilmiştir [32, 33]. Ayrıca PRL, JAK2'nin katalitik aktivasyonu ile reseptörünün ubikuitinleşmesini, internalizasyonunu ve degradasyonunu uyarmaktadır [34]. PRL-STAT5 sinyalinde, PRL varlığında proliferasyon gerçekleşebilirken, hücre döngüsü inhibisyonunun BRCA1 tümör baskılayıcı fonksiyonuna engel olmaktadır. Barcus ve arkadaşları meme kanseri hücrelerinin, MAPK sinyal yolağından ziyade JAK2-STAT5 sinyal yolağını aktive ettiğini saptamaktadırlar [35]. Bunun yanı sıra VEGF'nin de PRL ile indüklenebildiği tespit edilmiş ve bunu PRLR, JAK2 ve MAP kinaza ilişkili olarak gerçekleştirdiği ortaya konmuştur [36].

Son zamanlarda PRL yanında ön hipofiz bezinden salınan ve postnatal büyüme üzerinde etkisi yanında meme gelişimi üzerinde de rolü olan BH ilişkisi üzerinde durulmaktadır. BH sinyalinin meme bez ve epitel hücrelerinde farklılaşmasını ve gelişimini IGF-1 üzerinden gerçekleştirdiği belirlenmiştir [139]. Otokrin BH sinyalinin meme kanseri hücrelerinde invazyonu tetiklediği; ilaç direncine ve agresif tümör oluşumuna neden olduğu görülmüştür [41]. BH anlatımı kazandırılmış meme epitel hücrelerinde (MCF-10) invazyon ve metastazın indüklendiği saptanmıştır [42]. Meme kanseri görülen hastaların serumlarında ise BH seviyelerinin arttığı belirlenmiştir [40]. Yapılan çalışmalar sonucunda BH'nin, meme karsinom hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı, EMT 'yi uyardığı, invazyonu ve metastazı tetiklediği ortaya konmuştur [41]. Otokrin BH üretiminin insan karsinoma hücrelerinde, JAK2'ye bağlı büyümeyi arttırdığı belirtilmiştir. BH'nin, insan epitel hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak, apoptozu azaltarak ve hücre morfolojide değişikliklere neden olarak onkogenik transformasyona neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca otokrin büyüme hormonunun insan

epitel hücrelerinde siklin D1, c-myc ve Bcl-2 gibi genlerin transkripsiyonunda artışa neden olduğu görülmüştür [42]. Bunun yanı sıra BH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücrelerinin bazı kemoterapötik ajanlara karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Tamoksifen [140], doksorubisin [141] ve mitomisin C [142] gibi çeşitli kemoterapötik ilaçlara karşı olan direncin otokrin BH anlatımından kaynaklı olduğu meme kanseri *in vitro* modellerinde tespit edilmiştir. Literatürdeki bu bilgiler ışığında laboratuvarımızda gerçekleştirilen otokrin BH anlatımı stabil olan MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde curcumine karşı ilaç direncinin olduğu ve bu direncin doza ve zamana bağlı olarak ilaç direncinin kırıldığı belirlenmiştir (Merve Çelik Yüksek Lisans ve Recep Genç lisans Tez Çalışmaları). Bu tez ile amacımız otokrin BH salınımına bağlı meme kanseri hücrelerindeki ilaç direncinin otofaji ve ER stres gibi apoptotik ölüm sürecinde rol alan hücre sinyalleriyle ilişkisini irdelemektir. Bu kapsamda öncelikle literatürdeki bilgiler ışığında otofaji ve ER stres sürecinin modellenebilmesi için zamana bağlı curcumin uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi irdelenmiştir. Tez çalışması sonucuna göre otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 hücrelerinde curcuminin hücre canlılığı üzerine ket vurucu etkisi doğal tipe kıyasla 12. saatten sonra belirgin olarak görülmüştür. Bu etki otokrin BH anlatımında curcumine karşı direnç mekanizmasının zamana bağlı olduğunu literatürdeki çalışmalarla paralellik göstererek kanıtlamaktadır [143]. Ayrıca T47D hücrelerinde otokrin BH anlatımının curcumine karşı direnç mekanizmasının 48 saat içerisinde kırıldığı laboratuvarımız tarafından yayınlanan bir önceki çalışmamızda belirtilmektedir [144]. Bu tez kapsamında T47D doğal tip hücrelerinde curcuminin hücre canlılığına ket vurduğu fakat bu durumun otokrin BH+ hücrelerinde 48 saate ötelendiği gösterilmektedir.

Tümör oluşumu ve otofajinin düzenlenmesinde rol alan sinyal yolları arasındaki ilişkiler yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Otofaji tarafından indüklenen yapılar ve TOR sinyal yolağının upstream efektörleri olan PTEN, TSC1 ve TSC2 kanser insidansını azaltan tümör baskılayıcılarıdır [129-131]. Öte yandan ise TOR tarafından aktive edilen çeşitli onkogenler (PI3K, Akt) otofajiyi inhibe edici role sahip olarak kanser oluşumunu tetiklemektedirler [132]. Tümör hücrelerinde görülen otofaji, onları öldüren mekanizmanın otofaji olduğunu kanıtlamamaktadır. Hücrelerin bu durumu ölmek için kullandıkları bir savunma mekanizması olduğunu savunan görüşler de bulunmaktadır. Otofajinin kanser hücrelerini kemoterapötik tedavilere karşı koruduğu ve ilaç kombinasyonlarına otofaji inhibitörlerinin de eklenmesinin daha etkin tedavi

yanıtlarına yol açacağını savunan pek çok araştırma mevcuttur [118]. Ancak apoptoz yolağında problem olan tümör hücrelerinin kemoterapötik tedaviler sonrasında otofaji ile hücre ölümüne gittiğini savunan çalışmalar da yer almaktadır.

Endoplazmik retikulum (ER) stresi kanser hücrelerinde ilaca bağlı hücre ölümünde majör role sahiptir. ER, katlanma, olgunlaşma, translokasyon, bozulma ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi çeşitli fonksiyonel protein düzenlenmesinden sorumlu bir organdır [145]. Endoplazmik retikulum homeostazı BİP, PERK, IRE1 α ve ATF6 moleküllerin ER reseptörleriyle ilişkisine bağlıdır. Katlanmamış protein birikmesi ya da ilaca maruz kalma sonrasında salınan BİP katlanmamış proteinlerin cevabını aktive eder. PERK, ER lümeninde yeni sentezlenmiş proteinlerin birikmesini önleyen eIF2a'yı fosforile ederek transkripsiyonu düzenler. Diğer bir ER membran reseptörü olan IRE1 α , XBP1 mRNA'ya ve stresi düzenleyen proteinlere bağlanarak bazı pro-apoptotik proteinlerin anlatımlarının artmasına neden olabilir [146, 147]. ER stresin yol açtığı hücre ölümü, otofaji yolağının bir sonucu olabilir [148, 149]. ER stres, yüksek IRE1 α anlatımı ile birlikte LC3 II dönüşümünü ve otofagozom oluşumunu indüklemiştir. IRE1 α , ER stresi tetikleyen tedavi sonrasında otofagozom oluşumu ve LC3 II dönüşümü için çok önemlidir. Bu sonuç, PERK yerine IRE1 α 'nın UPR'yi otofajiye bağladığını öne süren önceki bir araştırmayla tutarlıdır [145]. Alternatif olarak, bazı çalışmalarda PERK / eIF2a fosforilasyonu yoluyla ER strese bağlı otofaji farklı hücre modellerinde çeşitli mekanizmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca ER stresin yol açtığı hücre ölümü apoptoz yolağının da bir sonucu olabilir [150, 151]. Son çalışmalar, kaspaz-12'nin ER stresin indüklediği apoptotik sinyale spesifik olarak katıldığını göstermektedir [152, 153]. Bunun yanı sıra CHOP, ER stres uyarımlı apoptozun önemli bir mediatörüdür. Protein katlanması baskılandığında CHOP uyarılırsa; oksidatif stres ve pro-apoptotik sinyalleri artırır [89].

Kemoterapötik ilaçların apoptotik etkinliğinde rol alan ER stres sinyal anahtar moleküllerin anlatım profillerinin irdelenmesi *in vitro* kanser çalışmalarında önem arz etmektedir [89]. Özellikle ilaç direnç mekanizmasının kanser hücrelerindeki kemoterapötik mekanizmaları ve altında yatan moleküler etkileşimleri majör öneme sahiptir [154]. Bu amaç doğrultusunda otokrin BH anlatımı olan MDA-MB-231 ve T47D hücrelerinde curcumine karşı ilaç direnç mekanizmasındaki ER stresin rolünün irdelenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen immüno blotlama sonucunda PERK ve IRE1 α gibi ER stresde rol oynayan anahtar moleküllerin bazal

anlatımının otokrin BH ile beraber indüklendiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda PERK / eIF2a fosforilasyonu yoluyla ER strese bağlı otofaji farklı hücre modellerinde çeşitli mekanizmalar ile gösterilmiştir [178, 179]. Tez çalışması doğrultusunda gerçekleştirilen immünoablota sonucunda MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde PERK anlatımının doğal tip hücrelerdeki bazal anlatım seviyesine göre BH anlatımı ile arttığı tespit edilmiştir. BH+ hücrelerde curcumin uygulamasının PERK anlatımını 9. saate kadar baskıladığı görülürken, MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde ise PERK anlatımının 9. ve 12. saatte indüklendiği saptanmıştır. Ayrıca T47D hücrelerinde BH anlatımının PERK bazal anlatımını hem 24 hem de 48 saatte doğal tip hücrelere kıyasla indüklediği görülmüştür. Bunun yanı sıra MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla T47D BH+ hücrelerinde 24 saat curcumin uygulamasının PERK anlatımını hem doğal tip hem de BH+ hücrelerinde indüklendiği saptanmıştır. Ancak bu etki 48 saatte etkisini ortadan kaldırmıştır. Literatürdeki çalışma bunu destekler nitelikte; IRE1 α , ER stresi tetikleyen tedavi sonrasında otofagozom oluşumu ve LC3 II dönüşümü için çok önemlidir [173]. Gerçekleştirdiğimiz immünoablota sonucunda IRE1 α anlatımının MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde 9. saatte indüklendiği tespit edilirken, BH anlatımı olan hücrelerde ise bu durum daha geç saatlerde görülmüştür. T47D doğal tip hücrelerde hem 24 hem de 48 saat curcumin uygulamasının IRE1 α üzerinden otofajiyi indüklediği görülürken, otokrin BH anlatımı yapan hücrelerde bu etkinin sadece 24 saat curcumin uygulaması ile ortaya çıktığı tespit edilmiştir. ER stres sinyalinde anahtar molekül olarak görev yapan BİP'in anlatımı MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde özellikle 12. ve 24. saatte anlatımın indüklendiği tespit edilirken, BH+ anlatımı olan meme kanseri hücrelerinde ise BİP anlatımında değişiklik gözlenmediği saptanmıştır. T47D doğal tip meme kanseri hücrelerinde ise 24 saatlik curcumin uygulamasıyla beraber BİP anlatımının indüklendiği görülürken, BH anlatımı olan hücrelerde değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca T47D meme kanseri hücrelerinde 48 saatlik curcumin uygulaması sonucunda hem doğal tip hem de BH+ hücrelerinde BİP anlatımında herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir. Buna bağlı olarak otokrin BH anlatımı olan hücrelerde BİP yerine diğer ER stres elemanlarının rol aldığı düşünülmektedir. ER stres elemanlarından bir diğeri olan CHOP, ER stres uyarımlı apoptozun önemli bir mediatörüdür. Protein katlanması baskılandığında CHOP uyarılırsa; oksidatif stres ve pro-apoptotik sinyalleri artırır [89]. Bu literatür bilgisi ışığında T47D doğal tip ve BH+ hücrelerinde 24 saatlik curcumin uygulaması sonucunda CHOP anlatımının indüklendiği tespit edilmiştir. Ancak bu etkinin doğal tip hücrelerde 48 saat curcumin

uygulamasıyla beraber 24. saate kıyasla etkin olarak görülmediği tespit edilerek ER stresin CHOP üzerinden tetiklenmesinin 24 saat zaman zarfında doğal tip hücrelerde gerçekleştiği saptanmıştır. Otokrin BH anlatımı yapan hücrelerde 48 saat curcumin uygulamasında 24 saate kıyasla azalsa da CHOP aktivasyonunun devam ettiği gösterilmiştir. ER stresde major rol oynayan CHOP'un aktivasyonu ile şaperon bağlı protein yıkımında, transkripsiyonel olarak metabolizma ve redoks mekanizmalarında rol alan ATF4'ün aktivasyonunun tetiklendiği belirlenmiştir [78, 80]. Ayrıca T47D hücrelerinde geç curcumin uygulamasının otokrin BH anlatımı varlığında ATF4 indüksiyonunu belirgin olarak doğal tipe kıyasla 48 saat zaman zarfında gerçekleştirerek ER stres ve apoptoz arasındaki ilişkide esas rol oynamıştır. Benzer anlatım profili bir başka ER stres molekülü olan ATF6 için de otokrin BH+ T47D hücrelerinde 48 saat zaman zarfında tespit edilmiştir. Aktif ATF6'nın protein sentezi ve strese karşı hücre cevabında rol oynadığı, ER stres sürecinde etkin bir koruma mekanizması olarak bilinmektedir [85-87]. Böylece bu tez çalışmasında curcumin ile ER stresin indüklenmesinin, IRE1 α ve BİP (GRP-78) üzerinde MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde; CHOP, ATF4 ve ATF6 anahtar molekülleri aracılı curcumin tarafından ER stresin tetiklenmesi ise otokrin BH anlatımı yapan T47D hücrelerinde ilk defa gösterilmiştir. Ayrıca curcuminin ER strese bağlı CHOP aktivasyonu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre akış sitometrisi ile analizi sonucunda CHOP anlatımının indüklendiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde ER stres elemanı olan CHOP'un rol aldığını ve apoptotik sinyallerin CHOP üzerinden tetiklendiği düşünülmektedir. Böylece literatürde curcumin ER stres markırları üzerindeki etkisinin meme kanseri hücrelerinde modellenmesi şeklindeki çalışmaları destekler nitelikte T47D ve MDA-MB-231 doğal tip hücrelerde sonuçlar elde edilmiştir [155]. Ancak bu tez çalışmasıyla literatürde ilk defa otokrin BH sinyaline bağlı curcumin direncinde ER stres elemanlarının rolü gösterilmiştir. Bunun yanı sıra ER stres altındaki hücreler aktif makro otofaji içerir ve otofagozomal zarın bir kısmı ER membranından orijin alır [156, 157]. ATF4 aracılı CHOP transkripsiyonel olarak Atg5 'i uyarırken, aktive olan PERK Atg12 'nin ATF4 aracılı transkripsiyonel regülasyonu yoluyla otofajiyi indükleyebilir [89, 156]. Ayrıca ATF4, Beklin-1 gibi otofajiyile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu artırarak ve anti-oksidatif stres yanıtlarını uyararak, amino asit biyosentezi ve transportunu indükleyerek hücrel homeostazı ve adaptasyonu geliştirir [158, 159].

Otofajinin kemoterapötik ilaçlara karşı apoptotik hücre ölümüne neden olan bir engel teşkil ettiği pek çok çalışmada kanser hücrelerinin ölüme karşı savunma mekanizması olarak gösterilmiştir [160]. İlaç kaynaklı otofajinin yanı sıra, ER stresin kemoterapötik ilaçların aracılık ettiği apoptotik hücre ölümüne karşı bir engel olduğu varsayılmıştır [161]. Curcuminin, ER stresine bağlı apoptoz ile hücre büyümesini inhibe ederek tiroid kanseri hücrelerinde rol oynadığı bildirilmiştir [162]. Bununla birlikte, bir curcumin türevi olan bis-Dehidroksi-curcumin insan kolon kanseri hücrelerinde hücre ölümünü indüklemek için ER stresi aktive etmektedir [163]. Başka bir çalışma, curcumin'in CD4 T hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon ve ER stresi artırarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir [164]. Literatürdeki bu bilgiler ışığında curcuminin otofajik indüksiyonunun olduğu pek çok kanser hücrelerinde saptanmıştır. Bu tez ile birlikte otokrin BH eksprese eden MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde ilk kez curcumin kaynaklı otofaji zamana bağlı olarak gösterilmiştir. İmmüno blotlama sonuçlarına göre MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde otofajik indüksiyonun Beklin-1 anlatımı üzerinden 3. saatten itibaren başlayarak 12. saate kadar curcumin uygulaması ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bununla beraber curcuminin erken saat uygulamasının (3-6 saat) Beklin-1 anlatımını indüklediği MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde görülmüştür. Ancak bu etki sadece T47D doğal tip hücrelerinde belirlenmiştir. T47D BH+ hücrelerinde geç curcumin uygulamasının (24-48 saat) Beklin-1 anlatımı üzerinde böyle bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Özellikle otofajik regülasyonda önem arz eden LC3 molekülünün anlatımı otofagozom yapısı oluşumunda curcuminin etkisinin hem MDA-MB-231 doğal tip hem de BH+ hücrelerinde 3-9 saat zaman zarfında gerçekleştiği saptanmıştır. Bununla beraber T47D BH+ hücrelerinde LC3 anlatımının hem 24 saat hem de 48 saat curcumin uygulamasıyla indüklenerek otofagozom oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca otofajik regülasyonda Atg12-5-16 kompleksinin otofagozom oluşumunda rol oynadığı ve LC3 lipidasyonunda Atg3 ve Atg7 ile beraber etkinlik gösterdiği bilinmektedir [91]. MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde otofagozom membran yapısına katılan Atg3 ve Atg12'nin 3 saat ve 9 saat zaman zarfında anlatımında artış görülürken, BH+ hücrelerinde bu etkinin genel olarak Atg12 molekülü üzerinde 24 saatte etkin olarak görüldüğü saptanmıştır. Ancak T47D BH+ hücrelerinde Atg5 anlatımı üzerinden otofajik indüklemenin 24 saat curcumin uygulamasıyla görüldüğü ancak 48 saatte bu etkinin kaybolduğu gösterilerek curcuminin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde 24 saat öncesi otofajik regülasyonunun indüklendiği ve T47D meme kanseri

hücrelerinde 24 saat ve sonrası curcumin uygulamasının otofagozom oluşumu üzerindeki etkinliği ilk defa tespit edilmiştir.

Otofaji zorlu koşullara, strese ya da hipoksik koşullara karşı hasar görmüş organelleri veya proteinleri amino asitlere parçalayarak gerekli enerjiyi hücrelere sağlayan, kendi kendine yardım eden bir süreçtir [165]. Son bulgular curcuminin kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamak için otofajiyi indükleyebileceğini göstermektedir [166-168]. p62, hücre büyümesi ve çoğalmasına dahil olan sinyal yollarını düzenleyen bir proteindir. p62 seviyeleri genellikle otofajik degradasyon ile ters orantılıdır [169]. Otofaji, anti-kanser tedaviler sonrasında farklı tümörler için sağ kalım yanlısı bir cevap olabilir [170]. Bununla birlikte, hücresel stresin şiddeti veya derecesi, hücrelerin zararları onarma yeteneğini aşıyorsa, otofaji engellenir ve apoptoz aktive edilir. Bu nedenle, otofaji sıklıkla kemoterapötik ajanlarla kanser hücrelerinin tedavisinden sonra, apoptozdan önce gelir [171, 172]. p62, kaspaz 8'i aktive ederek apoptozun düzenlenmesinde rol oynar [173]. Bu bilgiler ışığında p62 anlatımı incelendiğinde yukarıda ifade edilen otofaji anahtar molekülleri (Atg3, Atg7 ve Beklin-1) anlatımının curcuminle 24 saati takiben baskılanmasını destekler nitelikte p62 anlatımının geri kazanıldığı otokrin BH anlatımı yapan T47D hücrelerinde modellenmiştir.

Bafilomisin, geç evrede otofajiyi engelleyen bir makrolid antibiyotik ilaçtır. Lizozomun asidifikasyonunu engelleyerek bir vakuolar- tip H⁺ ATPaz (V-ATPaz) inhibitörü olarak işlev görmektedir. Bafilomisin ile vesiküler asidifikasyonunu bozulması sonucunda lizozom ve otolizozom arasındaki füzyonu inhibe ederek otofajik vesiküllerin olgunlaşmasını önlemek için kullanılmıştır [174]. Vakuolar- tip H⁺ ATPaz (V-ATPaz) tipik olarak kanser hücrelerinde yüksek oranda aktive edilerek; hücre proliferasyonu, metastazı kolaylaştırma, otofajik ve apoptozun düzenlenmesi, ilaç direnci ve çeşitli sinyal iletiminde rol oynamaktadır [175, 176]. Yapılan çalışmalarda hepatosellüler karsinoma (BEL-7402) ve ovaryum kanseri (HO-8910) hücre hatlarında bafilomisin etkisi araştırılmış ve sonuç olarak bafilomisinin bu hücre hatlarında proliferasyonu baskılayarak apoptozu indüklediği ve hücrelerin invaziv potansiyelini azalttığı tespit edilmiştir. Ohta ve arkadaşları (1998), bafilomisinin pankreatik hücre hattında apoptozu indükleyebildiğini ve bu hücreleri kullanarak bir ksenograft modelinde tümör büyümesini önleyebildiğini bildirmektedirler [177].

Hem pre-klinik hem de klinik açısından curcumin ile beraber pek çok kombine ilaç tedavisi gerçekleştirilmiştir [61]. Kolorektal kanser vakalarında curcumin

uygulamasının etkisine bakıldığında hasta serumlarında curcumin ve metabolitlerinin beklenenden düşük seviyede olduğu belirlenmiştir [178]. Bunun yanı sıra curcumin ile sitralin beraber uygulamasının meme karsinom hücrelerinde hücre proliferasyonu, ölümü ve döngüsüne ket vurarak etkilediği saptanmıştır [179]. Fakat literatürde bafilomisin ile curcuminin kombine uygulamasının BH+ meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Tüm bu bilgiler ışığında bizim tez çalışmasındaki amacımız; laboratuvarımızda yaratılmış olan otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücre hatlarına seçili dozlarda [(T47D hücre hatlarında 20 μ M; MDA-MB-231 hücre hattında 25 μ M] curcumin uygulamasının apoptotik etkisini arttırmak üzere bir otofaji inhibitörü olan bafilomisin ile beraber kombin ilaç uygulaması ile otokrin BH sinyaline bağlı ilaç direncini kırmak üzere strateji geliştirme hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda bafilomisinin curcumine bağlı hücre canlılığı üzerindeki ket vurucu etkisi her iki hücre hattında da gösterilmiş, özellikle curcumine karşı direnç gösteren otokrin BH anlatımı yapan MDA-MB-231 ve T47D hücrelerinde bafilomisinin curcuminle beraber uygulanması sonucunda hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı baskılayıcı etki saptanmıştır. Ayrıca benzer cevap mitokondri membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) için de tespit edilmiş ve tüm meme kanseri hücrelerinde ikili ilaç uygulaması sadece curcumin uygulamasıyla kıyaslandığında mitokondriyel membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Bu tez kapsamında literatürde ilk defa curcumin ile beraber bafilomisin uygulamasının curcumine karşı direnç gösteren BH+ MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığına ket vurma potansiyelinin arttığı ve hücre ölümünü mitokondri membran potansiyelini ($\Delta\Psi_m$) düşürerek indüklendiği gösterilmiştir [180]. Bafilomisinin otokrin BH anlatımı kaynaklı curcumin direnci üzerine etkisi koloni ve üç boyutlu koloni oluşum deneylerinde ket vurucu etkisi hem MDA-MB-231 hem de T47D hücrelerinde mtt ve floresan boyamalarını destekler nitelikte sonuç vermiştir.

Yapılan çalışmalarda curcuminin otofajik vakuol oluşumu üzerinde artış gösteren bir etkisinin olduğu çeşitli hücre hatlarında tespit edilmiştir [167]. Bu tez çalışmasında da MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasının otofaji üzerine etkisi akridin oranj boyaması ile gösterilmiştir. Bunun yanı sıra otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulamasının yalnız curcumin uygulamasına kıyasla otofajik vakuol oluşumunda daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak otofajiyi geç fazda (otolizozom) inhibe eden bafilomisin uygulanması sonucunda hücrelerin otofagozom durumunda kalarak otoliz olayının

gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca otofajinin engellendiği durumda curcumin uygulamasının otofajiye bağlı GFP-LC3 aktivasyonu üzerine etkisinin MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde hücre akış sitometrisi ile analiz edilmesi sonucunda saptanan bulgular akridin oranj boyamasının sonuçları ile paralellik göstermektedir. Böylece geç otofajik süreç olan otolizozom oluşumunu engelleyen bafilomisin uygulamasının curcumin kaynaklı otofajik süreçte erken otofagozom oluşum yapısını LC3 lipidasyonu üzerinden engelleyemediği tespit edilmiştir. Yapılan bütün bu araştırmalara rağmen halen otofajiyi her bir aşamasında inhibe edebilen kemoterapötik bir ajan bulunamamaktadır. Erken aşamada 3-MA otofajiyi inhibe edebilirken, klorokuin ve bafilomisin lizozomal inhibitörler olup daha geç aşamalarda otofaji inhibisyonunu gerçekleştirmektedirler. Otofajinin farklı aşamalarda inhibe edilmesi de farklı sonuçların oluşmasına yol açmaktadır. Klorokuin ve hidroklorokuin yapıları meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser tipinde umut vaad eden sonuçlar vermekte ve klinik çalışmalar devam etmektedir [181, 182].

Bafilomisin ile otofajinin baskılandığı durumda curcumin uygulaması yalnızca curcumin uygulamasına kıyasla ER stres anahtarı olan PERK ve BİP anlatımını MDA-MB-231 doğal tip hücrelerinde azaltmıştır, BH+ hücrelerinde ise anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Bunun yanı sıra hem doğal tip hem de BH+ T47D hücrelerinde ise kombine ilaç uygulaması sonucunda PERK ve BİP anlatımlarının düştüğü saptanmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında bafilomisin ile birlikte uygulanan kombine tedavi sonrasında hem MDA-MB-231 hem de T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde LC3 II dönüşümünü saptanmıştır. Kombine ilaç uygulamasıyla beraber erken otofaji proteinlerinin (Beklin-1, Atg5, Atg12) anlatımında azalma olduğu görülürken geç otofaji proteinlerinin (LC3) anlatımında ise artış olduğu belirlenmiştir. Bu tespit edilen bulgulardan sonra bafilomisin ile curcumin kombine uygulamasının apoptotik süreç üzerindeki etkisi irdelenmeye çalışılmıştır. Literatürde programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, organizmada çok sayıda molekülü içeren karmaşık bir metabolik süreçtir. Apoptoz mekanizması tümörlerde zayıflamış olarak yer alırken, birçok kemoterapi ilacının anti tümör mekanizması da apoptozu teşvik etmektedir [183]. Bu tez çalışmasında, curcumin ve bafilomisin kombine uygulamasının MDA-MB-231 ve T47D BH+ meme kanseri hücrelerinde pro-apoptotik protein Bax ekspresyonunun anlatımını sadece curcumin uygulamasına kıyasla önemli ölçüde arttırdığını ve anti-apoptotik protein Bcl-2 ekspresyonunun anlatımını ise aynı grupta (MDA-MB-231

BH+) azalttığı tespit edilmiştir. Literatürde pek çok çalışma Bcl-2 ve Beklin-1 arasındaki etkileşimin otofajik ve apoptotik süreçte önemli olduğunu göstermektedir [184]. Özellikle Bcl-2 anlatımı arttırılmış kanser hücrelerinde Beklin-1'in biyolojik fonksiyonunu gerçekleştirilerek otofajiyi baskıladığı ve apoptozu engellediği gösterilmiştir [185]. Ayrıca Bcl-2'nun baskılandığı durumda serbest kalan Beklin-1'in ilaç direnç mekanizmasında otofaji-apoptotik ölüm arasındaki konuşmada hücre canlılığı yönünde etki gösterdiği tespit edilmiştir [186]. Bu bilgileri destekler nitelikte MDA-MB-231 BH+ hücrelerinde Beklin-1 anlatımının hem curcumin hem de curcumin+bafilomisin uygulamasında artış göstermesi curcuminin Bcl-2 proteini üzerinde inhibitif kaynaklı etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca kombine uygulama sonrasında MDA-MB-231 ve T47D doğal tip ve MDA-MB-231 BH+ meme kanseri hücrelerinde full kaspaz-7 anlatımındaki azalmayla beraber apoptotik sürecin indüklendiği saptanmıştır. Böylece bu tez ile literatürde ilk defa otokrin BH anlatımı yapan meme kanseri hücrelerinde curcuminin otofajik ve ER stres sinyalleri üzerindeki etkisi yanında bafilomisin gibi geç otofajik yolak inhibitörü ile kombine tedavinin BH kaynaklı ilaç direncini apoptoz yönünde kırdığı tespit edilmiştir.

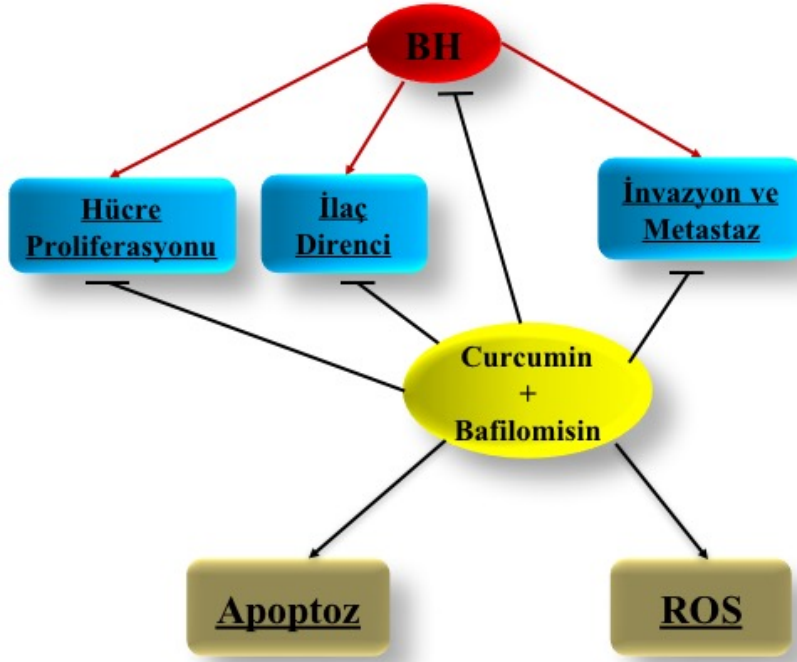
Curcuma longa bitkisinin kökünden izole edilen curcuminin meme, cilt, kolon, karaciğer, akciğer gibi pek çok kanser türünün üzerinde terapötik etkisi gösterilmiştir. [47, 187]. Fenolik bir bileşik olan curcuminin pek çok hedef molekül üzerinde (farklı inflamatuvar sitokinleri, transkripsiyon faktörlerini, büyüme hormonlarını, protein kinazları ve pek çok onkojenik molekülleri) negatif yönde düzenleyici etki göstermesi kemoterapötik ajan olma özelliğini arttırmaktadır [59]. Kanser hücreleri üzerinde curcuminin, kaspaz-8'i aktifleştirerek Bid üzerinden dış apoptotik yolağı etkilediği; sitokrom-c salınımı, kaspaz- 3, 9 aktivasyonu ve PARP kesilimi ile de iç apoptotik yolağı etkilediği tespit edilmiştir [52]. Ayrıca curcuminin, çeşitli hormonların sentezini ve salınımını azaltarak hücre proliferasyonuna ket vurduğu görülmüştür [54, 55]. Hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve hormon negatif hücrelerde p53 anlatımını arttırarak Bax/Bcl-2 ve p21 oranı gibi apoptotik markırları tetiklediği belirlenmiştir [57]. Curcuminin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkin bir NF-κB inhibitörü olduğu gösterilmiştir [188, 189]. Yapılan bazı araştırmalarda 5-FU, docetaksel, gentsatamib gibi çeşitli kemoterapötik ilaçlar ile beraber curcumin uygulamasının kanser türlerinde tedavi etkinliğini arttığı saptanmıştır. Ancak düşük biyoyararlanıma sahip curcuminin çeşitli analoglarının sentezlenmesi ya da kombin uygulamalara geçilerek etkinliğinin arttırılması gerekmektedir [72].

Pek çok kanser hücre hattında (kolon, servikal, melanoma, meme kanseri) curcumin hücre döngüsüne ket vurarak hücre ölümünü tetikleyen bitkisel kökenli bir ajandır [190]. Yapılan araştırmalar neticesinde curcuminin G2/M fazında hücre döngüsüne ket vurduğu pankreatik kanser (PANC1 ve BxPC3) hücrelerinde tespit edilmiştir [183]. Laboratuvarımızda üretilen otokrin MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve MCF-7 BH anlatımı yapan meme kanseri hücrelerinde curcumin uygulamasının etkin bir NF- κ B inhibitörü olduğu ve hücreleri G1 ve G2/M fazlarında sırasıyla tuttuğu bir önceki yayınıımızda gösterilmiştir [143]. Ayrıca T47D otokrin BH anlatımı yapan hücrelerde curcuminin apoptotik etkisi ve hücre döngüsüne G2/M fazında ket vurduğu yine laboratuvarımız tarafından gerçekleştirilen çalışmada saptanmıştır [144]. Daha önceki çalışmalarımız ve literatürdeki verilere göre bu tez kapsamında hücre döngüsü üzerine curcuminin etkisi incelendiğinde hem doğal tip hem de BH otokrin sinyal aktif olan meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün G2/M fazında bloke edildiği gösterilmiştir. Ancak bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının ise belirgin olarak hücre döngüsüne erken fazda ket vurduğu (G1 fazı) tespit edilmiştir. Ayrıca bir önceki yayınıımızda gösterdiğimiz gibi curcuminin MDA-MB-231 ve T47D hücrelerinde otokrin BH anlatımına bağlı direnç mekanizmasının zamana ve doza bağlı kırıldığı saptanmıştır [143, 144]. Curcumin ile beraber bafilomisin uygulamasının Annexin V/PI analizlerine göre apoptotik hücre ölümüne hem doğal tip hem de BH+ MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde sadece curcumine kıyasla apoptotik hücre ölümünü indüklediği belirgin olarak gösterilmiştir. Bu tez kapsamında literatürde ilk defa bafilomisin ile beraber curcumin uygulamasının BH otokrin sinyali kazandırılmış MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde curcumine karşı ilaç direncini hücre proliferasyonuna ket vurarak, $\Delta\Psi$ azaltıp, hücre döngüsüne ket vurarak veya bazı meme kanseri modelinde subG1 hücre popülasyonunu arttırarak, apoptotik ölümü tetiklediği tespit edilmiştir.

Düşük ROS seviyeleri, hücre çoğalmasını ve sağ kalımını indüklerken, ROS seviyelerinin artması, DNA, protein ve lipitlere zarar vererek otofaji ve apoptozu tetikleyebilir [191]. Yapmış olduğumuz flow sitometrik analizler sonrasında sadece curcumin uygulamasında ya da bafilomisin ile beraber curcumin uygulanması sonrasında hem MDA-MB-231 hem de T47D doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde ROS miktarında artış tespit edilmiştir. Böylece ROS seviyesindeki artışla bağlantılı olarak otofajik ve apoptotik hücre ölümlerinin indüklediği belirlenmiştir.

Model organizmaların kanser sorununu çözmeye majör bir araç olarak rol oynadığı geniş ölçüde kabul görmüştür [192]. Memeliler ve *C. elegans* arasında var olan güçlü biyolojik korunma sebebiyle genlerin %60-80'inin homologlarının belirlenmesi mümkün olmuştur [193, 194]. Bu nedenle farmakolojik olarak aktif olan bitkisel bileşiklerin biyolojik süreçler üzerindeki etkilerini araştırmak ve yeni hedefleri belirlemek için *C. elegans* modelinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır [195]. Curcumin anti-inflamatuar, anti-bakteriyel ve anti-kanser özellikleri nedeniyle büyük bir önem taşıyan bitkisel kökenli bir bileşiktir [196]. Özellikle, hayvan modellerinde tümör oluşumu ve progresyonu engelleyebilir, bu da curcumin'in kanser tedavisi için potansiyel bir araç olduğuna işaret edebilir [197]. Ancak doğada hidrofobik formda olduğundan, curcumin suda çözünmez ve düşük biyoyararlanımı klinik çalışmalarda önemli bir engel olmaya devam etmektedir. Çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak için lipozomlarda kapsülleme, biyobozunur mikroküreler, siklodekstrin ve hidrojeller gibi çeşitli stratejiler çalışılmıştır [198]. Yapılan bir çalışmada gamma siklodekstrin (γ CD) ile curcumin hidrofilik hale getirilmiş ve *C. elegans* model sistemini kullanarak nöroprotektif etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 50 μ M curcumin uygulamasının N2 doğal tip solucanlarında kontrole kıyasla yaşam süresini 3 gün arttığı sonucu tespit edilmiştir [199]. Bir diğer çalışmada; *B. pseudomallei* ile enfekte olmuş *C. elegans* modeli üzerinde durulmuş; curcumin uygulaması yapılarak solucanların hayatta kalma süresini uzatabilecek bir model kabul edilmiş ve bu araştırma sonucunda uygulanan curcuminin, bakteri sağ kalımını etkilemeden solucanların sağ kalımını arttırabildiği saptanmıştır [200]. Birçok genin, çeşitli canlılarda yaşam süresini modüle ettiği bilinmektedir. *C. elegans*'ta ise dauer formasyonundaki (Daf) mutasyonların erişkin ömrünü büyük ölçüde artırdığı tespit edilmiştir [201]. DAF-2, korunmuş bir PI3-kinaz / Akt yolundan sinyal verir, sonuçta bir FOXO ailesi transkripsiyon faktörü olan DAF-16'nın aktivitesini inhibe eder [202]. DAF-16 (bir FOXO ailesi transkripsiyon faktörü), yaşam süresi, metabolizma ve stres yanıtları gibi birçok önemli biyolojik sürecin kilit bir düzenleyicisi olarak kabul edilen insülin sinyal yolağında bir transkripsiyon faktörüdür [203]. İnsülin / IGF-1 yolağında bulunan genlerdeki birçok mutasyonun ise erişkin ömrünü önemli ölçüde uzattığı tespit edilmiştir [204]. Curcumin tedavisini takiben DAF-16'nın bir hedef geni olan sod-3 ekspresyon seviyeleri indüklenmemiştir, bu da curcumin'in DAF-16'dan bağımsız olarak hareket edebileceğini göstermektedir. Ayrıca, curcumin uygulaması ile daf-2 mutant solucanlarında sağ kalım önemli ölçüde artmış ve hücre içi ROS seviyeleri azalmıştır. Bu nedenle bu durum

curcuminin DAF-2'den bağımsız olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir. DAF-2, *C. elegans*'taki tek insülin / IGF-1 benzeri reseptördür. DAF-2, DAF-16 etkinliğini engelleyen insülin/IGF-1 yolağında önemli bir oyuncudur [205]. Literatürdeki bu bilgiler ışığında doğal tip ve BH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ile yapmış olduğumuz *in vitro* çalışmaların etkinliğini *in vivo* çalışmalarla da desteklemek adına N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde doza bağlı curcumin uygulamaları gerçekleştirdik. N2 doğal tip ve DAF-2 mutant *C. elegans* modellerinde sağkalım deneyindeki yaşam eğrisine bakıldığında mutant DAF-2'nin doğal tipe kıyasla uzun ömürlülüğü bu deney ile de gösterilmiştir. Curcumin uygulaması sonrasında hem N2 doğal tip hem de DAF-2 mutantın yaşam eğrisine bakıldığında ise sağkalım sürelerinin kontrollere kıyasla düştüğü saptanmıştır. Bunun sebebinin ise literatürde kullanılan curcumin dozuna göre daha düşük konsantrasyondaki kullanımdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Son çalışmalar, ROS'un hücre sinyallemede rol oynadığını göstermiştir; apoptoz, gen ifadesi ve hücre sinyalizasyon kaskadlarının aktivasyonu ile ilişkisinin varlığını ortaya koymuştur. ROS'un hem hücre içi hem de hücreler arası haberciler olarak hizmet edebileceğine dikkat çekilmiştir [206]. Yapılan araştırmalara göre, curcumin *C. elegans*'ta patojenik stres faktörlerini taklit edebilir, bu durumda SEK-1 ve MEK-1 tabanlı patojen savunma sistemleri curcuminin toksik etkilerine karşı koruma sağlayabilir. Oksidatif stres direnci sadece antioksidatif enzimlerin indüklenmesine değil aynı zamanda potansiyel olarak daha karmaşık mekanizmalara aracılık eder [207]. Doza bağlı curcumin uygulaması sonrasında yapmış olduğumuz H2DCFDA ve akridin oranj boyamaları sonucunda kontrollere kıyasla floresan ışımalar görülmüş ve böylelikle curcumin uygulamasıyla apoptoz ve ROS düzeyindeki artış tespit edilmiştir.



Şekil 38. Curcumin ve Bafilomisin'in kombin uygulanmasının MDA-MB-231 ve T47D meme kanseri hücrelerinde invazyon ve metastatik profil, ilaç direnci, hücre proliferasyonu, apoptoz ve ROS üretimi üzerine etkisi.

Apoptoz ve otofaji ile ilgili sinyal yolları ve molekülleri birbiri ile ilişkilidir ve aralarındaki etkileşimi göstermek için birçok çalışma mevcuttur [208, 209]. Bulgularımız meme kanseri hücrelerinin kaderini belirlemeye yardımcı olan ER stres, otofaji ve apoptoz yolu arasında bir karşılıklı konuşma olduğunu göstermektedir. Meme kanseri hücrelerinde ER stres indüksiyonu yoluyla hücre ölümünü arttıran ilaçlarla beraber otofaji inhibitörlerinin kombinasyon halinde kullanılması ve apoptoza gidişin hızlanmasıyla etkin bir tedavi yöntemi sağlanabilir. Tüm bu bilgiler curcumin ve bafilomisin ile ilgili mevcut olan literatürü doğruladığı gibi gelecekte yapılacak olan çalışmalar için otokrin BH sinyali aktive olan meme kanserinde curcumin ve bafilomisin'in kombin olarak kullanımı anti-hormonal ve terapötik etkisinin açısından temel oluşturma niteliği taşımaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen veriler curcuminin bafilomisinle kombine tedavisinde etkin apoptotik ajan olma özelliğini otofaji-ER stres anahtar moleküllerinin etkinliği üzerinden gösterdiğini ortaya koymuştur. Gelecekte bu veriler ışığında gerçekleştirilecek ileri çalışmalar; özellikle hormona bağlı ilaç direnci mekanizmasının meme kanserinde etkin tedavi başarılarının arttırabilmesi için kombine ilaç uygulamalarının *in vivo* deneylerle desteklenerek curcuminin terapötik etkinliğinin arttırılmasında otofaji ve ER stres sinyallerinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması pre-klinik çalışmaların önemini arttıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Sudhakar, A., *History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods*. J Cancer Sci Ther, 2009. **1**(2): p. 1-4.
2. Baykara, O., *Current Modalities in Treatment of Cancer*. Balikesir Health Sciences Journal, 2016. **5**(3): p. 154-165.
3. Blackadar, C.B., *Historical review of the causes of cancer*. World J Clin Oncol, 2016. **7**(1): p. 54-86.
4. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
5. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
6. American Society of Clinical, O., *American Society of Clinical Oncology Statement on the Impact of Utilization Management Policies for Cancer Drug Therapies*. J Oncol Pract, 2017. **13**(11): p. 758-762.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
8. Rockwell, S., et al., *Genomic instability in cancer*. Novartis Found Symp, 2001. **240**: p. 133-42; discussion 142-51.
9. Tennant, D.A., et al., *Metabolic transformation in cancer*. Carcinogenesis, 2009. **30**(8): p. 1269-80.
10. Perou, C.M. and A.L. Borresen-Dale, *Systems biology and genomics of breast cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
11. Society, A.C., *Breast cancer facts & figures 2007-2008*. 2007.
12. Rosen, P.P., *Rosen's Breast Pathology*. Second ed. 2001, Lippincott Williams & Wilkins.
13. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
14. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
15. Ravdin, P.M., et al., *The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States*. N Engl J Med, 2007. **356**(16): p. 1670-4.
16. Washbrook, E., *Risk factors and epidemiology of breast cancer*. Women's Health Medicine, 2006. **3**(1): p. 8-14.
17. Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, *The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. 229-39.
18. Şen, S. and D. Aygin, *Role of Environmental Carcinogens in The Etiology of Breast Cancer*. Sakarya Tıp Dergisi, 2014. **4**(3): p. 109-114.
19. Lynch, H.T., et al., *Clinical/genetic features in hereditary breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1990. **15**(2): p. 63-71.
20. Key, T.J., P.K. Verkasalo, and E. Banks, *Epidemiology of breast cancer*. Lancet Oncol, 2001. **2**(3): p. 133-40.
21. MacMahon, B., P. Cole, and J. Brown, *Etiology of human breast cancer: a review*. J Natl Cancer Inst, 1973. **50**(1): p. 21-42.
22. Chavez-MacGregor, M., et al., *Postmenopausal breast cancer risk and cumulative number of menstrual cycles*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(4): p. 799-804.
23. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, *ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics*. BMJ, 2000. **321**(7261): p. 624-8.
24. Ford, D., et al., *Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(3): p. 676-89.
25. Carmichael, A., A.S. Sami, and J.M. Dixon, *Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation*. Eur J Surg Oncol, 2003. **29**(5): p. 475-9.

26. Fisher, B., et al., *Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1233-41.
27. Edmond, S.N., et al., *Symptom communication in breast cancer: relationships of holding back and self-efficacy for communication to symptoms and adjustment*. J Psychosoc Oncol, 2013. **31**(6): p. 698-711.
28. Hortobagyi, G.N., et al., *Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy*. Cancer, 1988. **62**(12): p. 2507-16.
29. Chew, H.K., *Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what?* West J Med, 2001. **174**(4): p. 284-7.
30. Haydaroglu, A., *I. Ulusal Meme Kanseri Konsensusu*. 2007: Kongre Basimevi Matbaasi.
31. Beral, V. and C. Million Women Study, *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
32. Fang, F., et al., *Quantification of PRL/Stat5 signaling with a novel pGL4-CISH reporter*. BMC Biotechnol, 2008. **8**: p. 11.
33. Fang, F., M.A. Rycyzyn, and C.V. Clevenger, *Role of c-Myb during prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5a signaling in breast cancer cells*. Endocrinology, 2009. **150**(4): p. 1597-606.
34. Swaminathan, G., et al., *Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2*. J Endocrinol, 2008. **196**(2): p. R1-7.
35. Shemanko, C.S., *Prolactin receptor in breast cancer: marker for metastatic risk*. J Mol Endocrinol, 2016. **57**(4): p. R153-R165.
36. Goldhar, A.S., et al., *Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1*. Mol Cell Endocrinol, 2005. **232**(1-2): p. 9-19.
37. Tworoger, S.S. and S.E. Hankinson, *Prolactin and breast cancer risk*. Cancer Lett, 2006. **243**(2): p. 160-9.
38. Kaplan, S.L., *Hormonal regulation of growth and metabolic effects of growth hormone*. Comprehensive Physiology 1999.
39. Waters, M.J. and B.L. Conway-Campbell, *The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(42): p. 14992-3.
40. Emerman, J.T., et al., *Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients*. Horm Metab Res, 1985. **17**(8): p. 421-4.
41. Mukhina, S., et al., *Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(42): p. 15166-71.
42. Zhu, T., et al., *Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 317-24.
43. Seeburg, P.H., *The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone*. DNA, 1982. **1**(3): p. 239-49.
44. Ergun-Longmire, B. and M. Wajnrajch, *Growth and Growth Disorders*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
45. Winston, L.A. and T. Hunter, *JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone*. J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 30837-40.
46. Jones, J.I. and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. Endocr Rev, 1995. **16**(1): p. 3-34.
47. Srimal, R.C. and B.N. Dhawan, *Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent*. J Pharm Pharmacol, 1973. **25**(6): p. 447-52.
48. Liu, D. and Z. Chen, *The effect of curcumin on breast cancer cells*. J Breast Cancer, 2013. **16**(2): p. 133-7.
49. Limtrakul, P., et al., *Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice*. Cancer Lett, 1997. **116**(2): p. 197-203.
50. Ushida, J., et al., *Chemopreventive effect of curcumin on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(9): p. 893-8.

51. Hatcher, H., et al., *Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1631-52.
52. Anto, R.J., et al., *Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl*. Carcinogenesis, 2002. **23**(1): p. 143-50.
53. Mohandas, K.M. and D.C. Desai, *Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel*. Indian J Gastroenterol, 1999. **18**(3): p. 118-21.
54. Miller, M., et al., *Curcumin (diferuloylmethane) inhibits cell proliferation, induces apoptosis, and decreases hormone levels and secretion in pituitary tumor cells*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 4158-67.
55. Schaaf, C., et al., *Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in vitro and in vivo*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(4): p. 1339-50.
56. Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7490-8.
57. Nagaraju, G.P., et al., *The impact of curcumin on breast cancer*. Integr Biol (Camb), 2012. **4**(9): p. 996-1007.
58. Choudhuri, T., et al., *Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 334-40.
59. Somasundaram, S., et al., *Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(13): p. 3868-75.
60. Aggarwal, S., et al., *Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkkappaBalpha kinase and Akt activation*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(1): p. 195-206.
61. Cheng, A.L., et al., *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions*. Anticancer Res, 2001. **21**(4B): p. 2895-900.
62. Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(9): p. 1529-42.
63. Aggarwal, B.B., A. Kumar, and A.C. Bharti, *Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies*. Anticancer Res, 2003. **23**(1A): p. 363-98.
64. Ambegaokar, S.S., et al., *Curcumin inhibits dose-dependently and time-dependently neuroglial cell proliferation and growth*. Neuro Endocrinol Lett, 2003. **24**(6): p. 469-73.
65. Nagai, S., et al., *Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis by curcumin in human malignant astrocytoma cell lines*. J Neurooncol, 2005. **74**(2): p. 105-11.
66. Dhandapani, K.M., V.B. Mahesh, and D.W. Brann, *Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors*. J Neurochem, 2007. **102**(2): p. 522-38.
67. Aoki, H., et al., *Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(1): p. 29-39.
68. Dhillon, N., et al., *Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(14): p. 4491-9.
69. Uddin, S., et al., *Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma*. Oncogene, 2005. **24**(47): p. 7022-30.
70. Goel, A., A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal, *Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic*. Biochem Pharmacol, 2008. **75**(4): p. 787-809.
71. Ichiki, K., et al., *Regulation of activator protein-1 activity in the mediastinal lymph node metastasis of lung cancer*. Clin Exp Metastasis, 2000. **18**(7): p. 539-45.
72. Toptaş, B. and Z.A. Alagöz, *Kurkumin ve Analoglarının Antikanserojen Etkileri*. Ankara Ecz. Fak. Derg., 2016. **40**(2): p. 58-82.
73. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
74. Spierings, D.C., et al., *Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(6): p. 821-31.

75. Curtin, J.F. and T.G. Cotter, *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*. Cell Signal, 2003. **15**(11): p. 983-92.
76. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Biomedicine. Insulin resistance takes a trip through the ER*. Science, 2004. **306**(5695): p. 425-6.
77. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
78. Rasheva, V.I. and P.M. Domingos, *Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis*. Apoptosis, 2009. **14**(8): p. 996-1007.
79. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
80. van der Kallen, C.J., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver?* Apoptosis, 2009. **14**(12): p. 1424-34.
81. Kaufman, R.J., *Orchestrating the unfolded protein response in health and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1389-98.
82. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
83. Ron, D., *Translational control in the endoplasmic reticulum stress response*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1383-8.
84. Liu, C.Y., M. Schroder, and R.J. Kaufman, *Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24881-5.
85. Yoshida, H., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1239-48.
86. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 455-62.
87. Naidoo, N., *ER and aging-Protein folding and the ER stress response*. Ageing Res Rev, 2009. **8**(3): p. 150-9.
88. Rutkowski, D.T. and R.J. Kaufman, *A trip to the ER: coping with stress*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 20-8.
89. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3460-3470.
90. Gozuacik, D. and A. Kimchi, *Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2891-906.
91. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1102-9.
92. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
93. Martinez-Vicente, M. and A.M. Cuervo, *Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike*. Lancet Neurol, 2007. **6**(4): p. 352-61.
94. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. **306**(5698): p. 990-5.
95. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
96. Bursch, W., et al., *Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors*. Toxicology, 2008. **254**(3): p. 147-57.
97. Wirawan, E., et al., *Autophagy: for better or for worse*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 43-61.
98. Yorimitsu, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy: molecular machinery for self-eating*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1542-52.
99. Glick, D., S. Barth, and K.F. Macleod, *Autophagy: cellular and molecular mechanisms*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 3-12.
100. Martinet, W., et al., *In situ detection of starvation-induced autophagy*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(1): p. 85-96.
101. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.

102. Fimia, G.M. and M. Piacentini, *Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(10): p. 1581-8.
103. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Another way to die: autophagic programmed cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1528-34.
104. Xue, L., G.C. Fletcher, and A.M. Tolkovsky, *Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution*. Mol Cell Neurosci, 1999. **14**(3): p. 180-98.
105. Qian, W., et al., *Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1*. Leuk Res, 2007. **31**(3): p. 329-39.
106. Basciani, S., et al., *Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(30): p. 5897-903.
107. Bauvy, C., et al., *Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29*. Exp Cell Res, 2001. **268**(2): p. 139-49.
108. Espert, L., et al., *Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2161-72.
109. Eisenberg-Lerner, A., et al., *Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them*. Cell Death Differ, 2009. **16**(7): p. 966-75.
110. Levine, B., S. Sinha, and G. Kroemer, *Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy*. Autophagy, 2008. **4**(5): p. 600-6.
111. Bell, B.D., et al., *FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16677-82.
112. Yousefi, S., et al., *Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(10): p. 1124-32.
113. Zalckvar, E., et al., *DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy*. EMBO Rep, 2009. **10**(3): p. 285-92.
114. Boya, P., et al., *Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1025-40.
115. Lum, J.J., et al., *Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis*. Cell, 2005. **120**(2): p. 237-48.
116. Chen, H.Y. and E. White, *Role of autophagy in cancer prevention*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(7): p. 973-83.
117. Hippert, M.M., P.S. O'Toole, and A. Thorburn, *Autophagy in cancer: good, bad, or both?* Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9349-51.
118. Ravikumar, B., et al., *Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(7): p. 1209-16.
119. Liang, X.H., et al., *Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 672-6.
120. Qu, X., et al., *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1809-20.
121. Karantza-Wadsworth, V., et al., *Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis*. Genes Dev, 2007. **21**(13): p. 1621-35.
122. Mathew, R., et al., *Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability*. Genes Dev, 2007. **21**(11): p. 1367-81.
123. Paglin, S., et al., *A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 439-44.
124. Abedin, M.J., et al., *Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage*. Cell Death Differ, 2007. **14**(3): p. 500-10.
125. Qadir, M.A., et al., *Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(3): p. 389-403.
126. Samaddar, J.S., et al., *A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 2977-87.
127. Apel, A., et al., *Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1485-94.

128. Marino, G., et al., *Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18573-83.
129. Arico, S., et al., *The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35243-6.
130. Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan, *TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-90.
131. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
132. Blommaert, E.F., et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes*. Eur J Biochem, 1997. **243**(1-2): p. 240-6.
133. Bursch, W., et al., *Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?* Ann N Y Acad Sci, 2000. **926**: p. 1-12.
134. Crichton, D., et al., *DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis*. Cell, 2006. **126**(1): p. 121-34.
135. Tasdemir, E., et al., *Regulation of autophagy by cytoplasmic p53*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 676-87.
136. Degenhardt, K., et al., *Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis*. Cancer Cell, 2006. **10**(1): p. 51-64.
137. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 540-50.
138. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
139. Moller, N. and J.O. Jorgensen, *Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects*. Endocr Rev, 2009. **30**(2): p. 152-77.
140. Mojarrad, M., et al., *Autocrine human growth hormone expression leads to resistance of MCF-7 cells to tamoxifen*. Med Oncol, 2010. **27**(2): p. 474-80.
141. Minoia, M., 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, 2012. **97**(6): p. E907-16.
142. Bougen, N.M., et al., *Autocrine human growth hormone reduces mammary and endometrial carcinoma cell sensitivity to mitomycin C*. Oncol Rep, 2011. **26**(2): p. 487-93.
143. Coker-Gurkan, A., et al., *Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF-kappaB signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells*. Amino Acids, 2018.
144. Coker-Gurkan, A., et al., *Curcumin prevented human autocrine growth hormone (GH) signaling mediated NF-kappaB activation and miR-183-96-182 cluster stimulated epithelial mesenchymal transition in T47D breast cancer cells*. Mol Biol Rep, 2018.
145. Ogata, M., et al., *Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(24): p. 9220-31.
146. Wolfson, J.J., et al., *Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways*. Cell Microbiol, 2008. **10**(9): p. 1775-86.
147. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2656-64.
148. Choi, J.Y., et al., *From the Cover: Ethylmercury-Induced Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death: Involvement of Autophagosome-Lysosome Fusion Arrest*. Toxicol Sci, 2016. **154**(1): p. 27-42.
149. Liu, W.T., et al., *Inhibition of glioma growth by minocycline is mediated through endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and autophagic cell death*. Neuro Oncol, 2013. **15**(9): p. 1127-41.
150. Gorman, A.M., et al., *Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(3): p. 306-16.
151. Cheng, Y. and J.M. Yang, *Survival and death of endoplasmic-reticulum-stressed cells: Role of autophagy*. World J Biol Chem, 2011. **2**(10): p. 226-31.

152. Wali, V.B., S.V. Bachawal, and P.W. Sylvester, *Endoplasmic reticulum stress mediates gamma-tocotrienol-induced apoptosis in mammary tumor cells*. *Apoptosis*, 2009. **14**(11): p. 1366-77.
153. Wu, K., et al., *Endoplasmic reticulum stress activation mediates Ginseng Rg3-induced anti-gallbladder cancer cell activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **466**(3): p. 369-75.
154. Mansoori, B., et al., *The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review*. *Adv Pharm Bull*, 2017. **7**(3): p. 339-348.
155. Yin, C., et al., *Alantolactone promotes ER stress-mediated apoptosis by inhibition of TrxR1 in triple-negative breast cancer cell lines and in a mouse model*. *J Cell Mol Med*, 2019.
156. Kouroku, Y., et al., *ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(2): p. 230-9.
157. Bernales, S., S. Schuck, and P. Walter, *ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum*. *Autophagy*, 2007. **3**(3): p. 285-7.
158. Wang, S. and R.J. Kaufman, *The impact of the unfolded protein response on human disease*. *J Cell Biol*, 2012. **197**(7): p. 857-67.
159. Harding, H.P., et al., *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*. *Mol Cell*, 2003. **11**(3): p. 619-33.
160. Hussain, A.R., et al., *Curcumin induces apoptosis via inhibition of PI3'-kinase/AKT pathway in acute T cell leukemias*. *Apoptosis*, 2006. **11**(2): p. 245-54.
161. Park, M.J., et al., *Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53*. *Int J Oncol*, 2002. **21**(2): p. 379-83.
162. Yang, C.L., et al., *Curcumin induces small cell lung cancer NCI-H446 cell apoptosis via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and not the cell death receptor pathway*. *DNA Cell Biol*, 2012. **31**(2): p. 139-50.
163. Berrak, O., et al., *The inhibition of PI3K and NFkappaB promoted curcumin-induced cell cycle arrest at G2/M via altering polyamine metabolism in Bcl-2 overexpressing MCF-7 breast cancer cells*. *Biomed Pharmacother*, 2016. **77**: p. 150-60.
164. Morselli, E., et al., *Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(19): p. 3056-61.
165. Hale, A.N., et al., *Autophagy: regulation and role in development*. *Autophagy*, 2013. **9**(7): p. 951-72.
166. Guan, F., et al., *Curcumin Suppresses Proliferation and Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Autophagy-Dependent Akt Degradation*. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0146553.
167. Kim, J.Y., et al., *Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells*. *Arch Oral Biol*, 2012. **57**(8): p. 1018-25.
168. Xiao, K., et al., *Curcumin induces autophagy via activating the AMPK signaling pathway in lung adenocarcinoma cells*. *J Pharmacol Sci*, 2013. **123**(2): p. 102-9.
169. Lippai, M. and P. Low, *The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 832704.
170. Maes, H., et al., *Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response*. *Trends Mol Med*, 2013. **19**(7): p. 428-46.
171. Marino, G., et al., *Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(2): p. 81-94.
172. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(9): p. 741-52.
173. Jin, Z., et al., *Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling*. *Cell*, 2009. **137**(4): p. 721-35.
174. Mauvezin, C. and T.P. Neufeld, *Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion*. *Autophagy*, 2015. **11**(8): p. 1437-8.
175. von Schwarzenberg, K., et al., *Mode of cell death induction by pharmacological vacuolar H+-ATPase (V-ATPase) inhibition*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(2): p. 1385-96.

176. Lu, Q., et al., *The expression of V-ATPase is associated with drug resistance and pathology of non-small-cell lung cancer*. *Diagn Pathol*, 2013. **8**: p. 145.
177. Ohta, T., et al., *Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1*. *J Pathol*, 1998. **185**(3): p. 324-30.
178. Tu, Y., A. Gardner, and A. Lichtenstein, *The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses*. *Cancer Res*, 2000. **60**(23): p. 6763-70.
179. Patel, P.B., V.R. Thakkar, and J.S. Patel, *Cellular Effect of Curcumin and Citral Combination on Breast Cancer Cells: Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest*. *J Breast Cancer*, 2015. **18**(3): p. 225-34.
180. Jia, Y.L., et al., *Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells*. *J Asian Nat Prod Res*, 2009. **11**(11): p. 918-28.
181. Cheong, H., et al., *Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy*. *Nat Biotechnol*, 2012. **30**(7): p. 671-8.
182. Solomon, V.R. and H. Lee, *Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **625**(1-3): p. 220-33.
183. Zhu, Y. and S. Bu, *Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017. **2017**: p. 5787218.
184. Pattingre, S. and B. Levine, *Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer?* *Cancer Res*, 2006. **66**(6): p. 2885-8.
185. Pattingre, S., et al., *Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy*. *Cell*, 2005. **122**(6): p. 927-39.
186. Akar, U., et al., *Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells*. *Autophagy*, 2008. **4**(5): p. 669-79.
187. Chuang, S.E., et al., *Curcumin-containing diet inhibits diethylnitrosamine-induced murine hepatocarcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(2): p. 331-5.
188. Maheshwari, R.K., et al., *Multiple biological activities of curcumin: a short review*. *Life Sci*, 2006. **78**(18): p. 2081-7.
189. Sharma, R.A., A.J. Gescher, and W.P. Steward, *Curcumin: the story so far*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(13): p. 1955-68.
190. Zheng, J., et al., *Spices for Prevention and Treatment of Cancers*. *Nutrients*, 2016. **8**(8).
191. Zhang, L., et al., *Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **89**: p. 452-65.
192. Kirienko, N.V., K. Mani, and D.S. Fay, *Cancer models in *Caenorhabditis elegans**. *Dev Dyn*, 2010. **239**(5): p. 1413-48.
193. Consortium, C.e.S., *Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology*. *Science*, 1998. **282**(5396): p. 2012-8.
194. Kaletta, T. and M.O. Hengartner, *Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(5): p. 387-98.
195. Gami, M.S. and C.A. Wolkow, *Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan*. *Aging Cell*, 2006. **5**(1): p. 31-7.
196. Lim, G.P., et al., *The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse*. *J Neurosci*, 2001. **21**(21): p. 8370-7.
197. Duvoix, A., et al., *Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin*. *Cancer Lett*, 2005. **223**(2): p. 181-90.
198. Das, R.K., N. Kasoju, and U. Bora, *Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells*. *Nanomedicine*, 2010. **6**(1): p. 153-60.
199. Pankaj Satapathy¹, C.S.,³ Madhava Naidu M1 and Rajini PS^{2,3*}, *Attenuation of Dopaminergic Neuronal Dysfunction in *Caenorhabditis elegans* by Hydrophilic Form of Curcumin*. *Journal of Neuroscience and Neuropharmacology*, 2016. **2**(111).
200. Eng, S.A. and S. Nathan, *Curcumin rescues *Caenorhabditis elegans* from a *Burkholderia pseudomallei* infection*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 290.

201. Kenyon, C., et al., *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
202. Ogg, S., et al., *The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 994-9.
203. Mukhopadhyay, A., S.W. Oh, and H.A. Tissenbaum, *Worming pathways to and from DAF-16/FOXO*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 928-34.
204. Ailion, M., et al., *Neurosecretory control of aging in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7394-7.
205. Yu, C.W., C.C. Wei, and V.H. Liao, *Curcumin-mediated oxidative stress resistance in Caenorhabditis elegans is modulated by age-1, akt-1, pdk-1, osr-1, unc-43, sek-1, skn-1, sir-2.1, and mev-1*. Free Radic Res, 2014. **48**(3): p. 371-9.
206. Hancock, J.T., R. Desikan, and S.J. Neill, *Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 345-50.
207. Liao, V.H., et al., *Curcumin-mediated lifespan extension in Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2011. **132**(10): p. 480-7.
208. Zhou, G.Z., G.C. Sun, and S.N. Zhang, *The Interplay between Autophagy and Apoptosis Induced by One Synthetic Curcumin Derivative Hydrazinobenzoylcurcumin in A549 Lung Cancer Cells*. J Biochem Mol Toxicol, 2015. **29**(6): p. 267-73.
209. Zhou, T., et al., *Autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma induced by EF25-(GSH)2: a novel curcumin analog*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107876.
210. <https://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=971§ionid=62648691&jumpsectionID=62648697>
211. (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00052>)
212. <http://www.ohsu.edu/xd/health/services/doernbecher/research-education/research/research-labs/ron-rosenfeld-lab.cfm>
213. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/319432774#section=2D-Structure>)
214. [https://www.aatbio.com/blog/1493146167/apoptosis assays and probes](https://www.aatbio.com/blog/1493146167/apoptosis%20assays%20and%20probes)

EKLER

Tablo 1. Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810R	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
Florascope Mikroskopu	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
PVDF Membran	88518	Thermo

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
MDA-MB-231 hücreleri		ATCC
RPMI Medium	11875093	Gibco
T47D hücreleri		ATCC
Etüv	Heracell 1150	Thermo
Hemastometre	-	Neubauer
Laminar flow	12469,2	Thermo
Pipet Uçları	-	CAPP

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-merkaptetanol	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	Applichem
Curcumin	C1386-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
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 BH ELISA	GR180572-1	Abcam
Millipore Falcon Centrifuga 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	Applichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Acridine Orange	A1398,0025	Applichem
Bafilomisin A1 ab120497	88899-55-2	Abcam

Tablo 4. Kullanılan Tamponların Listesi

10X TBS	87,6 gr NaCl, 12,11gr Tris-Baz 800 ml distile su ile çözdürülür. pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml 'e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için; 500 µl 10X TBS, üzerine 500 ml hacimde olacak şekilde distile su eklenerek 1X TBS'e dönüştürülür.
1X TBS-Tween	1X TBS-Tween; 500 ml 10X TBS ve 500 µl Tween-20, 500 ml hacimde olacak şekilde üzerine distile su eklenerek hazırlanır.
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 ile çözdürülür. pH: 7,4 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml 'e tamamlanır. Hazırlanan 10X PBS kullanılmak için; 500 µl 10X PBS, üzerine 500 ml hacimde olacak şekilde distile su eklenerek 1X PBS'e dönüştürülür.
Full Besiyeri Hazırlanması	450 ml negatif besiyeri içerisine 50 ml FBS ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (10,000 U/ml) eklenir. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek 50 ml'lik falkonlara süzülür.
Protein Standardı (Bovine Serum Albumin: BSA)	0,015 gr Albumin 10 ml distile suda çözdürülüp 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek süzülür.

Bradford Reagent	100 mg Comassie Brilliant Blue (6-250) 50 ml %95 etanol de çözdürülür. 100 ml %85 fosforik asit eklenir hepsi 1 litreye tamamlanır. Filter kağıdı ile süzülür.
Hücre Lizis Tamponu (CLB)	100 µl Proteinaz inhibitörü 10 ml CLB içerisinde karıştırılır.
Harsh Strip Buffer	200 ml %10'luk SDS, 125 ml Tris-HCl (pH=6,8), 8 ml β-merkaptan etanol üzerine 675 ml distile su eklenerek karıştırılır ve 1 litreye tamamlanır.
Mild Strip Buffer	15 gr glisin, 1 gr SDS, 10 ml Tween-20 eklenerek 800 ml distile suda çözdürülür. pH 2,2'ye ayarlandıktan sonra distile suyla 1 litreye tamamlanır.
%10 Ammonium Persulphate Solution (APS)	100 mg Ammonium persulfate 1 ml distile suda çözdürülür.
Coumaric Asit (CA)	0,15 gr P-Coumaric asit 10 ml DMSO'da çözdürülür.
Luminol	0,44 gr Luminol 10 ml DMSO'da çözdürülür.
Yürütme tamponu	30,3gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 1 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözdürülür. pH: 8.3 e ayarlanır. Hazırlanan 10X yürütme tamponu, 100 ml 10X yürütme tamponu ve 900 ml distile suyla 1000ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür ve jel yürütmesi sırasında kullanılır.
Transfer Tamponu	33,3 gr Tris-base ve 144 gr Glisin tartılarak 1000 ml distile su içinde çözdürülür. pH: 8.3 e ayarlanır. Hazırlanan 10X transfer tamponu, 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile suyla 1000 ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür ve jelin transferi sırasında kullanılır.
Yürütme Jelinin Hazırlanması	Proteinleri ağırlıklarına göre ayırmak için %12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütüldü. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo 4'te sunulmuştur.

Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması	9 ml FBS ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılır ve hücre kültürüyle uyumlu olan 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek dondurma medyası hazırlanmıştır. Dondurma medyasıyla hücreler uzun süreli sıvı azot tankları içinde saklanabilir.
Nematod Büyütme Besiyeri (NGM)	3 gr NaCl, 20 gr agar, 1 gr pepton 975 ml distile su içerisinde çözdürülür ve otoklavlanır. 55°C su banyosunda 15 dakika tutularak soğutulur. İçerisine 1 ml CaCl ₂ , 1 ml kolestrol (5mg/ml etanolde çözdürülmüş), 1 ml 1 M MgSO ₄ , 25 ml 1 M KPO ₄ solüsyonu, 1 ml 1 M ampisilin eklenir. Eklendikten sonra 60 mm ve 35 mm'lik petrilere dökülerek donması beklenir.
M9 Solüsyonu	3 gr KH ₂ PO ₄ , 6 gr NaHPO ₄ , 5 gr NaCl, 1 ml 1 M MgSO ₄ distile suyla 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır. 50 ml'lik falkonlara 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek süzülür.
LB Agar	20 gr LB agar 1 litre suda çözdürülür ve otoklavlanır.
%20'lik Bleach Solüsyonu	2 ml evlerde kullanılan çamaşır suyu, 0,5 ml 10 N NaOH ve 7,5 ml distile su eklenerek 10 ml'e tamamlanır.
S-basal Solüsyonu	5,85 gr NaCl, 1 gr K ₂ HPO ₄ ve 6 gr KH ₂ PO ₄ distile suyla 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır. Daha sonra 1 ml kolestrol (5 mg/ml etanol içinde) eklenir.
Trace Metals Solüsyonu	1,86 gr disodium EDTA, 0,69 gr FeSO ₄ , 0,2 gr MnCl ₂ , 0,29 gr ZnSO ₄ , 0,025 gr CuSO ₄ distile su ile 1 litreye tamamlanır ve otoklavlandıktan sonra karanlıkta saklanır.
S-Complete Solüsyonu	1 litre S-basal, 10 ml 1 M potasyum sitrat (pH 6), 10 ml trace mtals solüsyonu, 3 ml 1M CaCl ₂ ve 3 ml 1M MgSO ₄ solüsyonları steril bir şekilde karıştırılır ve otoklavlanmaz.

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

Adı-Soyadı : Derya BULUT

Tel: +90 544 857 0113

E-posta: buluttderya@gmail.com



Adres: Piyalepaşa Mahallesi, Güzel Bahçe Sokak No:9 D:3 Şişli / İstanbul

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi : 06.01.1991

Doğum Yeri : İstanbul

Medeni Durum : Bekâr

Eğitim Bilgileri :

2016-2018

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik- Yüksek Lisans

2014-2015

(Vancouver)

International Language Academy of Canada – ILAC

Dil Okulu

2010-2014

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik - Lisans (%25 Destek Burslu)

2005-2009

Dilnihat Özyeğin Anadolu Lisesi- Fen Bilimleri (İstanbul)

Ortaöğrenim

1997-2005

İTO Kadınlar Çeşmesi İlköğretim Okulu(İstanbul)

İlköğrenim

Projeler :

2016-2017

Yüksek Lisans Dönemi

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Tübitak 1001 Projesi (Bursiyer)** Curcumin'in terapötik etkinliğinin otokrin büyüme hormonu sinyal yolağı aracılığı ile farklı meme kanseri hücrelerinde poliamin metabolizması irdelenerek incelenmesi

Uluslararası Yayın :

Coker-Gurkan A, **Bulut D**, Genc R, Arisan ED, Obakan-Yerlikaya P, Palavan-Unsal N. Curcumin prevented human autocrine growth hormone (GH) signaling mediated NF-κB activation and miR-183-96-182 cluster stimulated epithelial mesenchymal transition in T47D breast cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2018. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4479-y>

Bulut D, Coker-Gurkan A, Genc R, Arisan ED, Obakan-Yerlikaya P, Palavan-Unsal N. Autocrine Growth Hormone Mediated Curcumin Resistance Overcame by Autophagy Inhibition via Bafilomycin in MDA-MB-231 and T47D Breast Cancer Cells. *Proceedings* 2018, 2(25), 1569. <https://doi.org/10.3390/proceedings2251569>

Poster Sunumu :

01-04 Kasım 2018

Derya Bulut*, Ajda Çoker Gürkan, Recep Genç, Elif Damla Arisan, Pınar Obakan, Narçın Palavan Ünsal, "Autocrine Growth Hormone Mediated Curcumin Resistance Overcame by Autophagy Inhibition via Bafilomycin in MDA-MB-231 and T47D Breast Cancer Cells", The 2nd International Cell Death Research Congress, İzmir.

Ödüller :

01-04 Kasım 2018

The *FEBS* Journal Poster Prize, The 2nd International Cell Death Research Congress, İzmir.

Çalıştay :

3 Kasım 2018

Hücre Akış Sitometrisi Çalıştayı, 2nd International Cell Death Research Congress, İzmir.

9 Aralık 2016

II. Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, İstanbul.

Sertifikalar :

- 1-4 Kasım 2018 2nd International Cell Death Research Congress, İzmir.
- 14 Nisan 2014 “Ben Seni Anlıyorum” isimli Kişisel Gelişim Semineri, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi
- 20 - 21 Aralık 2013 Nanoteknoloji ve Doku Mühendisliği: Güncel Sorunlar ve Gelecek Öngörüler, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi
- 16 - 18 Nisan 2013 Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkileri, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- 2 - 7 Eylül 2012 Uluslararası Poliamin Kongresi, T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi
- 24 - 26 Şubat 2012 Uluslararası Katılımlı 9. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi
- 9 - 10 Nisan 2011 Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu VI Kongresi, Boğaziçi Üniversitesi
- 4 - 6 Mart 2011 Uluslararası Katılımlı 8. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi

İş Deneşimi :

- Eylül 2016 - Haziran 2018 T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Kanser Biyoloji Laboratuvarı Doç. Dr. Ajda Çoker Gürkan.
- Ekim 2017 - Nisan 2018 T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, *C elegans* Laboratuvarı Doç. Dr. Pınar Obakan Yerlikaya.

Laboratuvar Deneşimi :

- *C. elegans* kültür teknikleri
- Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu
 - Otoklav
 - Kuru sterilizasyon
- Elektroferez
 - Nükleik asitlerin dikey ve yatay elektroferezde ayrışımı
 - Sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroferezi
 - Native jel elektroferezi
 - Denatüre edici gradient jel elektroferezi (Mutasyon analizi)
- İmmünoblotlama

- Protein tayin yöntemi
 - Bradford
- Hayvan Doku Kültürü
 - Memeli hücre kültüründe hücre canlılığı ve sağ kalım analizi
 - FACS flow
- HPLC ile poliamin analizi (Benzilasyon)
- Mikroskop Kullanımı
 - Işık mikroskobu
 - Floresan mikroskobu
 - Diseksiyon mikroskobu
- PCR Uygulamaları
 - RT – PCR
 - qRT – PCR
- Mikrobiyoloji
 - Bakterilerde boyama teknikleri
 - Bakterilerin fizyolojik karakter özelliklerinin belirlenmesi
 - Mikroorganizmaların sayım teknikleri
 - Spektrofotometrik bakteri miktarı tayini

Yabancı Dil(ler) :

- **İngilizce**
Seviye: İleri düzeyde

Kullanılan Bilgisayar Programları:

- Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook)
- PyMOL
- Ednote
- ImageJ
- ImageLab
- BD Accuri C6
- GraphPad

İlgi Alanları :

- Doku Mühendisliği, Nörodejeneratif Hastalıklar ve Moleküler Kanser Biyolojisi.

Yapılan Ödevler :

2011 – 2012 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler
Mikrobiyoloji Laboratuvarı Dersi**

- Sarımsak Bitkisinin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

2012 – 2013 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Biyoloji Teknikleri Dersi**

- Protein Kütle Spektrometre Yöntemleri: LC-MS/MS, MS-MS, LC/MS Teknikleri

2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Hücre Moleküler Biyolojisi Dersi**

- Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins

2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Kanser Biyolojisi Dersi**

- Kanserde HGF/Met Sinyal Yolunun Hedflenmesi

Yapılan Sunumlar :

2011 – 2012 Bahar Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Mikrobiyoloji Dersi**

- Bakterilerin Fizyolojik Karakter Özellikleri
- Mikroorganizmaların Büyüme Koşulları
- Mikroorganizmaların Fiziksel Kontrol Koşulları

2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Bitirme Projesi Dersi**

- Otofaji

2013 – 2014 Güz Dönemi T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **Moleküler Kanser Biyolojisi Dersi**

- Serviks (Rahim Ağzı) Kanseri

Üyelikler :

2010-2011 T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kulübü

2010-2012 T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Satranç Kulübü

Hobiler :

Seramik

2011-2012 Üniversite dönemim boyunca İstanbul Kültür Üniversitesi bünyesinde çeşitli seramik ve Raku çalışmalarım mevcuttur. Bunlardan bazıları halen İstanbul Kültür Üniversitesinde sergilenmektedir.

Ayrıca İstanbul Sanat Fuarı-Tüyap Fuar ve Kongre Merkezinde 2012 yılında sergilenmiş bir seramik çalışmam bulunmaktadır.

Spor

04.05.2008 Kadir Has Üniversitesi- Geleneksel Altın Boynuz 6. Yol Koşusu

13.06.2015 THE COLOR RUN VANCOUVER