

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SEROTONİN UYGULAMASI YAPILAN MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE HÜCRE SAĞKALIM VE ÖLÜM KARARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞENAY DURSUN

1409241003

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elif Damla ARISAN

ARALIK 2016

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SEROTONİN UYGULAMASI YAPILAN MCF-7 VE MDA-MB-231 MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE HÜCRE SAĞKALIM VE ÖLÜM KARARININ İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞENAY DURSUN

1409241003

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elif Damla ARISAN

Diğer Juri Üyeleri:

Doç. Dr. Ajda Çoker Gürkan

Doç. Dr. Uğur Gezen

Aralık 2016

ÖNSÖZ

Istanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yürüttüğüm tez çalışmam sırasında, bilgi ve deneyimleri ile bana yön gösteren, karşılaştığım her zorlukta bana destek olan, fikirleri ile beni ilmen cesaretlendiren, sağladığı bilimsel katkılarla beni aydınlatan çok sevdiğim danışman hocam Sayın Doç. Dr. Elif Damla ARISAN' a,

Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü büyük bir özveriyle kuran Prof. Dr. Narcin Palavan ÜNSAL ve Prof. Dr. Çimen ATAK başta olmak üzere Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN' a, Doç. Dr. Özge ÇELİK' e Yrd. Doç. Dr.Pınar OBAKAN' a, ve Sayın Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ' e, Sayın Araş. Gör. Özge BERRAK' a ve bölümümdeki çok kıymetli hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Üniversiteye başladığım ilk günden itibaren en zor anlarımda manevi desteği ve sevgisiyle yanımda olan dış politika yazarı Sayın Mustafa Necati ÖZFATURA' ya ne kadar teşekkür etsem azdır.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni destekleyen sevgili ailem Babam Selveddin DURSUN, Annem Sayime DURSUN , Ablam Şengül DURSUN ve kardeşim Musa DURSUN bu onuru en başta size borçluyum. Beni okuttuğunuz ve bugünlere gelmem için maddi ve manevi kol kanat gerdiğiniz için size sonsuz teşekkür ederim.

Bu bölümü seçmemin manevi mimarı olan canım arkadaşlarım Bennur KARABURUN ve Şahika TEMUR' a çok teşekkür ederim. Hem akademik, hem de özel hayatımda desteklerini hissettiğim, zor zamanlarımda yüzümü güldüren Zeynep YETİM, Benan TEMİZCİ, Tuğcenur ERALP' a çok teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanması sırasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Şafak NAHMEDOVA ve laboratuvar da bana destek olan tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezin gerçekleştirilmesi için destek sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi, Bilimsel Projeler Destek Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ.....	3
1.1. SEROTONİN.....	3
1.1.1. Triptofanın Metabolizmadaki Rolü ve Triptofan Türevleri	4
1.1.2. Serotoninin Biyosentezi	5
1.1.3. Serotoninin Evrimi ve Organizmalardaki Rollerini	8
1.2. SEROTONERJİK SİSTEMİN GENETİK ORGANİZASYONU VE İLİŞKİLİ OLDUĞU YOLAKLAR	14
1.2.1. Serotonerjik Sistemin Farmakolojik Olarak Tanımlanması.....	15
1.2.2. Serotonin Reseptörlerinin Genomik ve Post Genomik Sınıflandırması.....	15
1.2.3. Serotonin ve RNA Düzenlenmesi	20
1.2.4. G protein Aracılı Sinyalleşme ve 5-HT Reseptörleri	21
1.2.5. G protein Bağımlı Olmayan Sinyalleşme.....	31
1.2.6. Sürekli Aktif Olan Sinyalleşme.....	32
1.2.7. Agonist Aracılı Sinyalleşme.....	33
1.2.8. 5-HT ₃ Reseptörü Sinyal Yolağı	36
1.2.9. Serotonin Reseptörleri ve İlişkili Protein Yapıları	36
1.3. MEME KANSERİ.....	38
1.3.1. Meme Kanserinin Prevelansı	40
1.3.2. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	42
1.3.3. Meme Kanseri Tipleri	44
1.3.4. Meme Kanseri Teşhisi ve Tedavi Yöntemleri.....	45

1.4.	SEROTONİN VE KANSER İLİŞKİSİ	50
1.4.1.	Damar düzeni, Anjiyogenez ve Metastazla İlişkisi	50
1.4.2.	Hücre döngüsü ve PI3K yolağı ile ilişkisi.....	52
1.5.	SEROTONİN VE MEME KANSERİ	55
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	56
2.1.	MATERYALLER	56
2.1.1.	Hücre Kültürü Donanımları.....	56
2.1.2.	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	56
2.1.3.	Kullanılan Çözeltiler	56
2.2.	YÖNTEM	56
2.2.1.	Hücre Kültürü.....	56
2.2.2.	MTT Hücre Canlılık Testi.....	56
2.2.3.	Tripan Mavisi Testi	57
2.2.4.	Floresan İndikatörler Aracılığıyla Hücre Ölümü ve Asidik Vakuollerin belirlenmesi.....	57
2.2.5.	Klonojenik Metod	57
2.2.6.	İmmunoblotlama Yöntemi ile Çeşitli Sinyal Yolaklarında Rol Alan Proteinlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi	58
2.2.7.	Soft Agar Koloni Oluşum Testi	58
2.2.8.	Akım Sitometrisi Analizi	59
2.2.9.	Veri Toplama ve analizi	60
3.	SONUÇLAR	61
3.1.	Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi.....	61
3.2.	Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Koloni Oluşumu Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	64
3.3.	Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Apoptotik Etkisinin Gösterilmesi.....	67

3.3.1. Serotoninin meme kanseri hücre hatlarında yol açtığı morfolojik değişimlerin gösterilmesi	67
3.3.2. Serotoninin MCF-7 ve MDA- MB- 231 Hücrelerinde Hücre Döngüsü ve Apoptoz Üzerine Etkileri	72
4. TARTIŞMA	91
5. EKLER.....	99
6. KAYNAKÇA.....	104

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Serotoninin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2. Triptofandan türevlenen önemli yapılar.....	5
Şekil 3. Serotonin biyosentetik yolağı	6
Şekil 4. Triptofan hidroksilazın amino asit dizisi	6
Şekil 5. Serotonin reseptörü 1A' nın yapısı	9
Şekil 6. 12 insan GPCR 5-HT reseptör yapısının ligand bağlanma bölgelerinin dizilenmesi. 14	
Şekil 7. Bütün insan GPCR 5-HT reseptör yapılarının dizilenmesi	16
Şekil 8. 5-HT reseptörü kodlayan sekansların yapıları	17
Şekil 9. G proteini aracılı olarak sistemik fonksiyonların denetlenmesi	22
Şekil 10. Kanonikal Gs yolağı	23
Şekil 11. Majör 5-HT reseptörlerinin ilişkili olduğu sinyal yolları.....	28
Şekil 12. Bazı 5-HT _{2A} agonistlerine LSD ve DOI gibi halusinojenlerin etkisi.....	35
Şekil 13. Kanserin ayırıcı özellikleri.....	39
Şekil 14. Meme histolojisi	40
Şekil 15. Dünya kadın kanser istatistikleri.....	41
Şekil 16. Yaşa bağlı olarak meme kanseri gelişiminin dünyada oranı.	43
Şekil 17. Doksorubisin ve epirubisinin kimyasal şekilleri.....	48
Şekil 18. Paklitaksel ve oksotakselin kimyasal gösterimi.....	48
Şekil 19. Trastuzumab yapısı	49
Şekil 20. Hücre döngüsü	53
Şekil 21. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile gösterimi.	61
Şekil 22. MCF-7 ve MDA-MB 231 hücrelerinde serotoninin zamana bağlı olarak hücre sağkalımı üzerine etkisinin tripan mavisi boyama yöntemiyle belirlenmesi.	63
Şekil 23. Serotoninin MCF-7 hücrelerinin sağkalımı ve koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisinin soft agar aracılığıyla oluşturulan 3 boyutlu ortamda gösterilmesi.	65
Şekil 24. Serotoninin MDA-MB 231 hücrelerinin sağkalımı ve koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisinin soft agar aracılığıyla oluşturulan 3 boyutlu ortamda gösterilmesi.....	66
Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin PI boyama ile gösterilmesi.	67
Şekil 26. MCF-7 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin DAPI boyama ile gösterilmesi.	68

Şekil 27. MCF-7 hücrelerinde serotoninin uygulamasının asidik vakuol oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.....	69
Şekil 28. MDA-MB 231 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin PI boyama ile gösterilmesi	70
Şekil 29. MDA-MB 231 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin DAPI boyama ile gösterilmesi.....	71
Şekil 30. MCF-7 hücrelerinde serotoninin uygulamasının asidik vakuol oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.....	72
Şekil 31. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben hücre devrindeki değişimlerin PI boyamasını takiben akış sitometrisi aracılığıyla incelenmesi.....	73
Şekil 32. Serotoninin MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında hücre devrinin düzenleyen proteinlere etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi.....	74
Şekil 33. MDA-MB 231 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben hücre devrindeki değişimlerin PI boyamasını takiben akış sitometrisi aracılığıyla incelenmesi.....	77
Şekil 34. Serotoninin MDA-MB 231 meme kanseri hücre hatlarında hücre devrinin düzenleyen proteinlere etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi.....	78
Şekil 35. Serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde anneksin V/PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi. Hücrelerin 24 saat boyunca serotoninle inkübesi ardından Anneksin V/PI ikili boyaması yapılmış ve BD Bioscience Accuri C6 programı ile analizleri yapılmıştır.	79
Şekil 36. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben PARP-1 enziminin ekspresyon düzeyindeki değişimin gösterilmesi.....	80
Şekil 37. Serotonin uygulanan MDA-MB 231 hücrelerinde anneksin V/PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi. Hücrelerin 24 saat boyunca serotoninle inkübesi ardından Anneksin V/PI ikili boyaması yapılmış ve BD Bioscience Accuri C6 programı ile analizleri yapılmıştır.	81
Şekil 38. MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben PARP-1 enziminin ekspresyon düzeyindeki değişimin gösterilmesi.....	82
Şekil 39. MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi.	83
Şekil 40. Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak rol alan GSK3 β aktivitesi üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi.....	84
Şekil 41. MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi.	85

Şekil 42. MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin Ras/Raf/MEK (ERK MAPK) sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniğı ile gösterilmesi.....	87
Şekil 43. MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin p38 MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniğı ile gösterilmesi.	88
Şekil 44. MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin JNK MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniğı ile gösterilmesi.	89
Şekil 45. MCF-7 ve MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin epiteryal mezenşimal dönüşüm (EMT) sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniğı ile gösterilmesi.	90

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Serotonin reseptörleriyle etkileşen proteinler (Azmitia, 2010).....	36
Tablo 2. Kullanılan hücre kültürü donanımları.	99
Tablo 3. Deneylede Kullanılan Cihazların Listesi	99
Tablo 4. Laboratuvarda kullanılan kimyasallar.	101

KISALTMALAR

5-HT: 5-Hidroksi Triptamin

5-HTP: L-HidroksiTriptofan

5-HTR: Serotonin Reseptörü

APS: Amonyum PerSülfat

ATP: Adenozin Tri Fosfat

BDNF: Beyin Türevli Nörotropik Faktör

c-AMP: Siklik Adenozin Mono Fosfat

CDK: Sikline Bağımlı Kinaz

Cip/Kip: CDK inhibitör protein/Kinaz inhibitör protein

CDKN1A: p21Cip1

CDKN1B: p27 Kip1

CDKN1C: p57 Kip2

CO₂: Karbon Di Oksit

CNS: Merkezi Sinir Sistemi

CSC: Kanser Kök Hücresi

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCIS: Duktal Karsinoma İn Situ

DiOC₆: 3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür

DMSO: DiMetilSulfoksit

dsDNA: Çift zincirli DNA

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

ERK1/2: Ekstrasellüler sinyal-düzenlenmiş kinaz ½

FGFR-2: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü- 2

GDNF: Glial Türevli Nörotropik Faktör

GPCR: G-Protein Çiftleşmiş Reseptör

GTP: Guanozin Tri Fosfat

H₂O: Di Hidrojen Monoksit

kDa: KiloDalton

LC-50: %50 Öldürücü Doz

LCIS: Lobular Karsinoma İn Situ

MTT: Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum bromür

MAO: Mono Amin Oksidaz

MAPK: Mitojen aktive olmuş kinaz

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

P-CREB: Siklik AMP cevap elementine bağlanan protein

PBS: Fosfat tamponlu çözelti

PI: Propidyum iyodür

PI3K: Fosfotidilinositol-3 fosfat

PKC: Protein kinaz C

RuBC: Rubiloz Bifosfat

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE: SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

SERT: Serotonin taşıyıcısı

ssDNA: Tek iplikli DNA

TBS: Tris tamponlu tuz çözeltisi

TEMED: Tetrametiletildiamin

TPH: Triptofan Hidroksilaz

UV: UltraViyole

ÖZET

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) monoamin bir hormon olup, evrimsel süreçte korunmuş önemli bir nörotransmitter maddedir. 5-HT merkezi ve periferal sinir sisteminde olduğu gibi, endokrin ve ekzokrin organlar ve hematopoiyetik sistemlerdeki hücrelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır.

Meme kanseri kadınlarda gözlenen kanser vakaları arasında en sık gözlenen kanser tipi olup, her yıl 1,1 milyondan fazla kadında rastlanmaktadır. Teknolojik gelişmeler sayesinde erken teşhis ve çok ileri teknikler sayesinde tedavi imkanları olsa bile, halen bu hastalık nedeni ile kişiler hayatını kaybetmektedir.

Meme epitelyal hücrelerindeki homeostatik mekanizmalar, hamilelik ve emzirme gibi ciddi değişikliklerin olduğu durumlarda dokunun normal fonksiyonunu yerine getirmesinin kontrolünde rol almaktadır. Meme kanseri, epitelyal homeostatik sistemlerinin yanlış düzenlenmesi sonucunda meydana gelmektedir. Serotonin epitelyal homeostatik sisteminin bir parçası olup, meme epitel hücrelerinin homeostaz mekanizmalarının düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu nedenle, 5-HT sisteminin epitel dokularında yanlış düzenlenmesi tümör oluşumuna yol açmaktadır ve meme epitel hücrelerinden kökenlenen tümörlerin progresyonunda 5-HT sinyal yolağındaki değişikliklerin önemli bir neden olabileceği düşünülmektedir.

Bu araştırmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, serotoninin hücre sağkalımı ve hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkisinin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

ABSTRACT

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an important evolutionary-conserved monoamin hormone that is also considered important as a neurotransmitter. 5-HT not only regulates cellular functions of nervous system, but also involved in regulating cellular function of endocrine/exocrine organs and hematopoietic systems.

Breast cancer is the most common type of cancer among cancer cases observed in women. This cancer type is encountered in more than 1.1 million women in each year. Although breast cancer could be treated under favour of early diagnosis possibility and advanced treatment techniques, patients still loose their lives due to this disease.

The homeostatic mechanisms in breast epithelial cells play a role in controlling normal tissue function in cases where there are serious changes such as pregnancy and lactating.

Breast cancers arise on the occasion of incoordination in the regulation of epithelial homeostatic systems. Serotonin is part of the epithelial homeostatic system and it is involved in the regulation of the epithelial homeostasis mechanisms of breast epithelial cells. Thus, dysregulation of the 5-HT system in epithelial tissues leads to tumor formation, and changes in the 5-HT signaling pathway may be an important cause of progression of tumors originating from mammary epithelial cells.

In this research, the investigation of effects of serotonin on cell survival and cell death mechanisms in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell line was aimed.

1. GİRİŞ

1.1. SEROTONİN

Serotoninin monoamin yapıda bir nörotransmitter olduğu bilinmesine rağmen beyin hariç diğer bölgelerde gösterdiği etkiler nedeniyle sınıflanması işlemi halen ikilem boyutundadır; çünkü insan beyni hariç deri, akciğer, böbrek, karaciğer ve testis gibi vücutta diğer organ yapılarında da yer almaktadır. Aynı zamanda neredeyse tüm organizmalarda serotoninin varlığı saptanmıştır (Azmitia,1999).

Filogenetik olarak incelendiğinde oldukça eski bir molekül olan serotoninin nöronların oluşmasıyla beraber gelişerek evrimleştiği düşünülmektedir. Serotoninin keşif hikayesi İtalya'dan (Vittorio Erspamer) Amerika'ya (Irvine Page, Arda Green and Maurice Rapport) kadar uzanmaktadır (Şekil 1). Serumdan izole edilmiş (sero-) bir damar daraltıcı (-tonin) olarak belirlenmiştir ve yapısı 5-Hidroksitriptamin (5-HT) olarak tanımlanmıştır (Azmitia, 2012).



Şekil 1. Serotoninin kimyasal yapısı. (pubmedchem.org)

Serotoninin biyolojik öneminin araştırılmasında önem daha çok sinir biliminde insan davranışı üzerindeki etkilerine (beslenme, uyku, eşleşme, uyku ve öğrenme) ve bazı rahatsızlıklardaki rollerine (depresyon, otizm, Alzheimer hastalığı) yoğunlaşarak devam etmiştir. Serotonine daha geniş bir perspektiften bakmak ise son zamanlarda ortaya çıkan bir fenomen olmuştur. 50 yıllık bir sürecin ardından serotoninin organsal düzeydeki rolleri de yavaş yavaş aydınlatılmaya başlanmıştır (Brodie ve Shore 1957; Woolley, 1961; Scheibel ve ark., 1975). Serotoninle ilgili olan daha geniş teorik yaklaşımlarsa bu monoaminin homeostatik düzenleyici ve bir dış dünya

algılayıcısı olarak nasıl çalıştığını anlamaya yönelik olacak şekilde günümüzde devam etmektedir (Azmitia 2001; Azmitia, 2007).

1.1.1. Triptofanın Metabolizmadaki Rolü ve Triptofan Türevleri

Triptofan var olan en büyük ve en hidrofobik aminoasit yapısı olup; büyük proteinler için katlanmayla ilişkili sinyallerin oluşturulmasında önemli rollere sahiptir (Aoyagi ve ark., 2001). Protein moleküllerinin yapısında da en nadir bulunan aminoasitlerden olup genelde proteinin kuru ağırlığının yaklaşık %1- 2' sini oluşturmaktadır. Genetik kodda triptofan için yalnız bir kod ('UGG') onun aminoasit olarak kodlanmasını sağlamaktadır; diğer kodon kısımları durdurucu kodon yapıları olan UGA, UAG ve UAA ile çakışmadan dolayı evrimsel süreçte böyle bir yapının tercih edildiği düşünülmektedir. Triptofandan türevli birçok önemli molekül yapısı mevcut olup, bunlara örnek olarak nükleik asit yapısında bulunan Adenozin ve Timidin yapıları verilebilir (Azmitia, 2010).

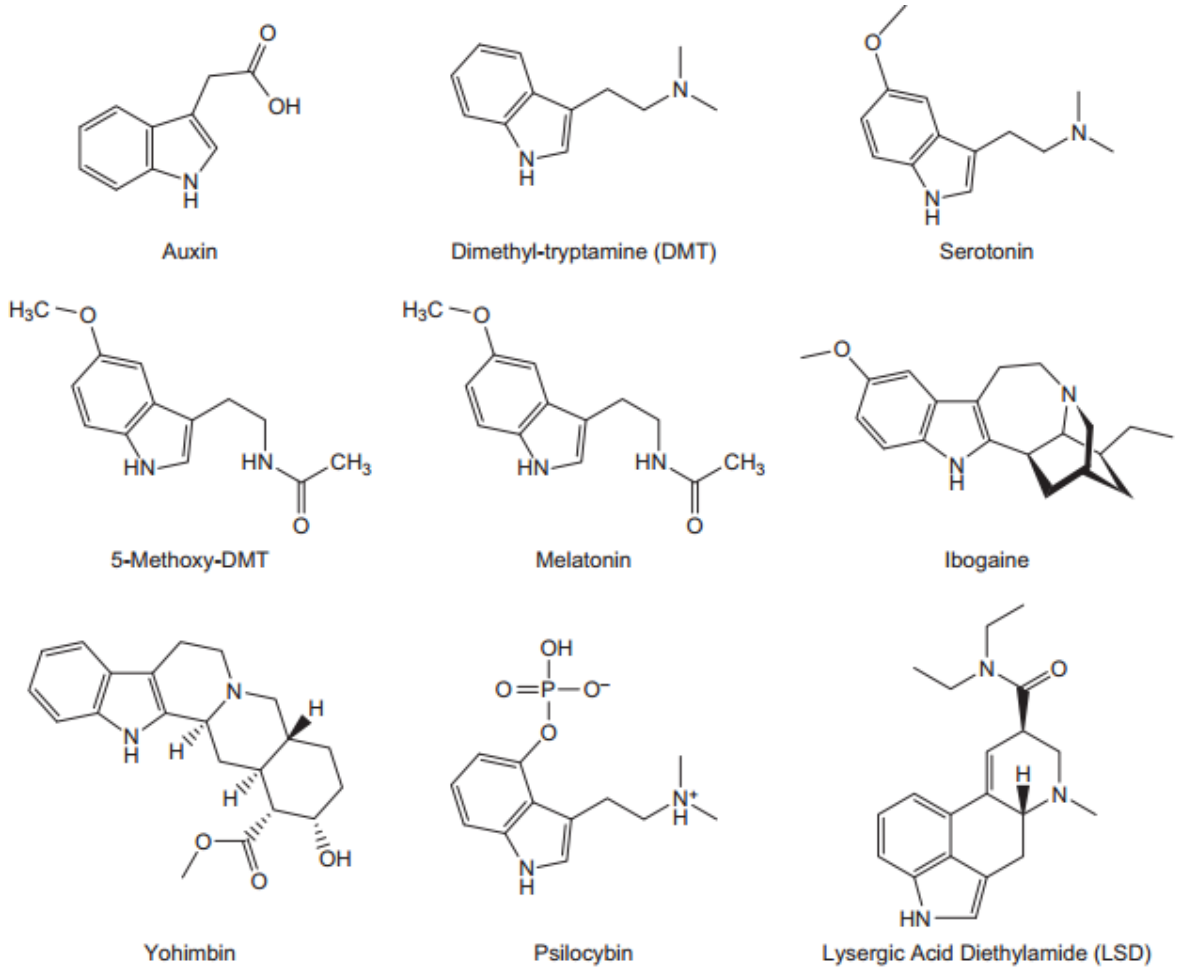
Bunun dışında yeni keşfedilen bir nükleolar protein olarak sayabileceğimiz WDR55 proteini triptofan ve aspartat içeren tekrarlı bir motif taşımakta olup, bu motifin ribozomal RNA' nın oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir (Iwanami ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar WDR55' in rRNA sentezi için önemli bir nükleik düzenleyici olduğunu, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve embriyonik organogenezdeki rollerini de ortaya koymuştur. Tüm bu olayları göz önünde bulundurduğumuzda triptofan az miktarda bulunmasına rağmen organizmanın hayatına nasıl büyük etki ettiği mitoz (Humphrey ve Enoch, 1998), hücre hareketi (Efimenko ve ark., 2006) ve olgunlaşmadaki (Cooke ve ark., 2002) rolleri de göz önüne alınarak anlaşılabilir. Triptofandan türevlenen bazı yapıların en önemlileri oksin, serotonin, melatonin ve N formilkinurenindir (Azmitia, 2010), (Şekil 2).

Triptofandan türevlenen çoğu yapı tek hücreli organizmalarda antioksidan özelliğe sahip olmakla beraber insanoğlu binlerce yıldır triptofan türevli yapıları entaktojen ve etojen olarakta kullanmaktadır. Bu yapılara örnek olarak Psilocybin mantarı, Dimetiltriptamin (DMT), Bufotenine, 5-MeO-DMT, Ergot, ergotamin, LSD, Ibogaine ve Yohimbine örnek olarak verilebilir. Triptofanın metabolizmada ve tüm organizmalardaki en önemli türevi ise serotonin yapısıdır (Azmitia, 2010).

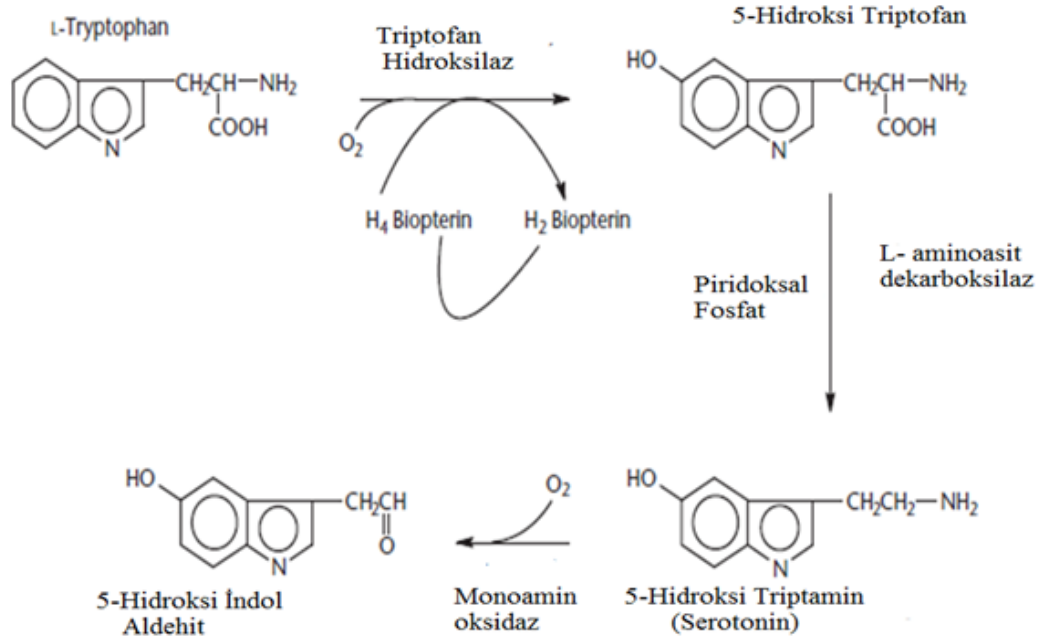
1.1.2. Serotoninin Biyosentezi

Serotonin triptofandan iki enzim aracılığıyla sentezlenmektedir. Triptofan hidroksilaz moleküler oksijen gerektiren bir enzim olup diğer enzimse piridoksal fosfat gerektiren tetrahidro biyopterin ve aromatik aminoasit dekarboksilaz yapısıdır. Monoamin oksidaz A ve B (MAO A ve B) yapılarınca metabolize edilir ve bu reaksiyon sonucunda H₂O₂ ve Hidroksi İndol Asetik Asit yapıları ortaya çıkar (Şekil 3). Bu mekanizma ilk defa funguslarda ortaya çıkarılmıştır (Sablın ve ark., 1998). Omurgalılarda serotonin melatonini oluşturacak şekilde metillenme reaksiyonuna uğrayabilir (Azmitia, 2010).

Serotonin sentezinde hız sınırlayıcı basamak triptofan hidroksilazın rol aldığı basamaktır. Bu enzim yapısı 444 aminoasit içermekte olup moleküler ağırlığı 51 kDa' dur (Şekil 4), (Azmitia, 2012).



Şekil 2. Triptofandan türetilen önemli yapılar (Azmitia, 2010).



Şekil 3. Serotonin biyosentetik yolağı (Azmitia, 2012).



Şekil 4. Triptofan hidroksilazın amino asit dizisi. Düzenleyici diziler kırmızı ile (1-186); katalitik bölge mavi ile (187-444) ile simgelenmiştir (Azmitia, 2012).

1.1.2.1. Öncü hidroksilaz enzimleri

Dünyanın oluştuğu ilk zamanlarda karboksilazların CO₂ ile beraber bulunduğu düşünülüyordu. Bununla beraber O₂ miktarının artışının ardından bu bileşiğin O₂'i seçmeye başladığı düşünülmekteydi (Smith, 1976). Oksijen temelli olan tepkime enerji yönünden verimsizdi; fakat yüksek miktarda ışık akışı sırasında fazla oksijenin kullanımını sağladığından tercih edilmeye devam edildi. Bu yapının oksijene bağlı olan ilk enzim sistemi olduğu düşünülmekle

beraber (aynen triptofanın 5-Hidroksitriptofan oluşturma tepkimesinde olduğu gibi) bu tür enzim yapılarına sonrasında hidroksilaz adı verilmiştir; çünkü tek bir molekül oksijen kullanılmaktadır ve diğer yandan suyun oluşumu gerçekleşmektedir. RuBP (Ribuloz BiFosfat) karboksilaz aynı fosfat bağlanma sekansına sahip olup normalde bu bölge triptofan biyosentetik yolağındaki enzimlerde mevcuttur (Wilmanns ve ark., 1991).

Fenilalaninin biyosentezi tirozin ve triptofan aminoasitlerini oluşturabilecek şekilde ek basamaklara da evrimleşmiştir. Öne atılan bir evrimsel senaryoya göre primitif reaksiyonlar daha çok enzimleri içermeyen reaksiyonlardı ve enzimatik sistemlerse modern bakterilerin oluşumu sırasındaki ayrımların sağlanmasında bu nedenle önemli roller oynadı (Ahmad ve Jensen, 1998). Bu enzimatik özelliklerin birçoğu ve biopterinin kofaktör olarak tepkimedeki kullanılması, tüm memeli triptofan hidroksilazları arasında ortaktır ve bu enzimin katalizlediği aşama biyosentez için hız sınırlayıcıdır. Bitkilerde hidroksilaz enzimleri birçok sayıda alkaloid yapının oluşmasına öncülük eder ve bu alkaloidler bitkilerin antioksidan özelliklerinin potansiyeli halindedirler. Primitif hidroksilaz enzimlerinin substratları ışığı yakalama özelliğine sahip olan fenilalanin, tirozin ve triptofandır (Grenett ve ark., 1987; Boularand ve ark., 1998; Wiens ve ark., 1998).

Normalde hücresel oksidasyon hücrenin olgunlaşması ve bölünmesi için önemliyken aşırı oksidasyon hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Farmasötik olarak önemli indollerin sentezi dekarboksilaz enzimleri kadar hidroksilazları da içermektedir (Facchini ve ark., 2000). Serotonin öncülü olan 5-HTP, triptofan hidroksilaz enzimi aracılığıyla oluşmaktadır. Bu molekül dekarboksilaz olarakta bilinen özelliği taşıyan karboksilaz aktivitesiyle serotonine dönüşmektedir. Bu nedenle serotoninin oksijen daha hücre içine geçiş yapmadan anaerobik organizmalarda da triptofandan üretildiği en çok savunulan görüştür; fakat oksijen ve serotoninin en etkin sentez eden yapılar bitkilerdir (Azmitia, 2010).

1.1.2.2. Dekarboksilazlar

Serotonin biyosentezinde rol alan bir diğer enzim yapısı triptofan dekarboksilazlardır. *Enterobacteria cloacae* türü bakteriler bitki kökleriyle ilişki içinde olup indolpirüvat dekarboksilaz enzimini kullanarak oksin hormonu üretimini gerçekleştirmektedir (Facchini ve ark., 2000). Hayvanlarda ise bu enzim triptofana olan özgüllüğü kaybetmiş ve genel aromatik aminoasit yapıları için işlevsel hale gelmiştir. Bu nedenle triptofan sentezinde rol alan enzimlerin kaybı nedeniyle hayvanlarda triptofanın sentezlenemediği ve miktarının daha az olduğu düşünülmektedir (Azmitia, 2010).

1.1.2.3. Kofaktörler

Triptofanın biopterin, NADH ve piridoksal fosfatı da içeren birçok kofaktör tipinin sentezinde önemli olduğu düşünülmektedir (Nelson ve Cox, 2008). Biopterin hidroksilaz enzimleri için gerekli bir kofaktör yapısı olup serotonin sentezinde gereklidir. NADH ve NADPH yapılarında evrimsel olarak erken dönemlerde bile var olduğu ve neredeyse hücredeki her redoks reaksiyonunda var olduğu da bilinmektedir; çünkü bu yapılar hem okside edici hemde redükte edici ajanlar olarak tepkimelerde rol almaktadır (Azmitia, 2010).

Piridoksal-5-fosfat aminoasit oluşumunu da içeren bir çok redoks reaksiyonunun kataliz partneri olarak görev alan bir yapıdır (Alexander ve ark., 1994). Aynı zamanda dekarboksilaz kofaktörü olan piridoksal fosfat yapısı 330- 340 nm'de ışığı absorblamakta ve bu nedenle bu yapının 5-Hidroksi Triptofan oluşumunda fotoaktif bir kromofor olarak rol aldığı düşünülmektedir. Kofaktör piridoksal-5-fosfatın biyolojik evrimin erken aşamalarında görüldüğü düşünülmektedir ve bununla da tutarlı olacak şekilde organik kofaktörler ve metal iyonlarının ilk biyolojik katalizörler olduğu düşünülmektedir (Mehta ve Christen, 2005).

1.1.3. Serotoninin Evrimi ve Organizmalardaki Roller

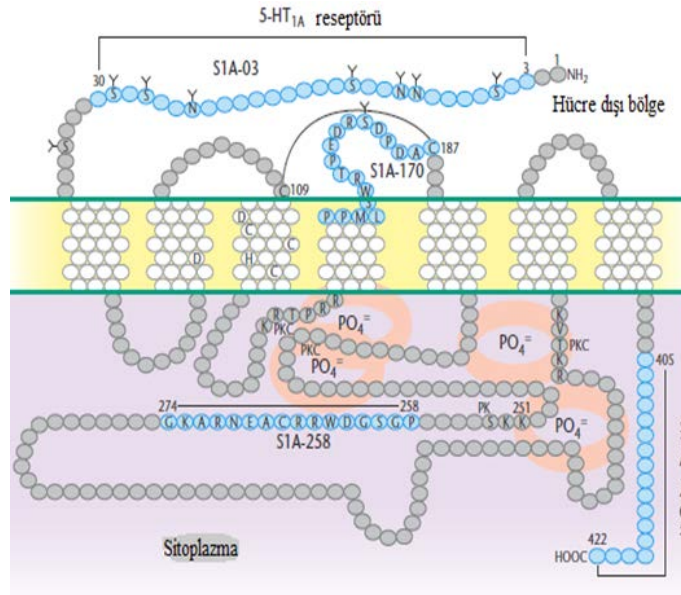
Melatonin ve 5-metoksitriptaminin sentezi ve varlığının neredeyse yaşayan her hücrede saptanmıştır (Hardeland, 1999). Oksin bileşiği de birçok tek hücreli organizmada sentez edilmektedir (Overbeek, 1940; Jacobs ve ark., 1985). Bir fungal organizma olan *Candida guilliermondii*'de, serotonin ve onunla ilişkili diğer hidroksi triptamin yapıları) ve ergot türevleri provide ultraviyole (UV) toksisitesinden korunmayı ve hücre proliferasyonunun tetiklenmesini sağlamaktadır (Strakhovskaia ve ark., 1988 ; Belenikina ve ark., 1991). *Candida* oksijen üretememekle beraber enerji üretimi oksijene bağımlı olan bir zorunlu aerobdur. Bitkilerde memelilerden daha çok miktarda serotonin sentezi gerçekleşmektedir (Garattini ve Valzelli, 1965; Smith, 1971; Sparks ve Slevin, 1985). Yüksek derecede serotonin varlığının nedeni olarak hücre içindeki oksijenin, triptofanın, enzimlerin ve kofaktörlerin varlığı büyük önem teşkil etmektedir Bitkilerdeki serotonin miktarı ise hayvanlardan ve özellikle hayvan beynindeki miktarından 100 kat daha fazladır. Örnek olarak muz derisinde 40 mg/g serotonin mevcutken fare hipokampusünde bu miktar 0.4 mg/g' dır. 5-HT öncülü olan, 5-HTP yapısı, *Grivonia simplicifolia* bitkisinin kuru ağırlığının %20' sini oluşturmaktadır (Lemaire ve Adosraku, 2002).

Birçok hayvan tipi fotosentez sonucu üretilen karbonu elde edebilmek için algler ve siyanobakterilerle simbiyotik yaşam sürmektedir. Bu birliktelikler *Porifera* ve *Cnidaria* filumlarında yaygın olup diğer birçok filum bu özellikten yoksundur (Venn ve ark., 2008). En

basit hayvan formu olan Poriferalar 600 milyon yıl önce evrimleşmiştir (Valentine, 2004). Hayvanlar alemindeki birçok organizma triptofan içeren organizmaları yakalayabilme ve diğer yandan da özellikle solunum için O₂ soluyabilme özelliğine sahiptir. 5-HT ve bundan kökenlenen alkaloid yapıları süngerlerde bulunmaktadır (Salmoun ve ark., 2002). Bu organizmalarda sinir sistemi olmayıp ve filtrasyonla beslenir.

Hidralar en basit primitif hayvanlar olarak kabul edilmekte olup özelleşmiş sinir ve motor sistemleri vardır. 5-HT organizmanın epitelini boyunca buraya yakın olarak yerleşen duyu nöronlarında yerleşim göstermiştir. Yassı solucanlar (*Stenostomum leucops*) gibi ayrı bir sinir sisteminin görüldüğü yapılarda ise serotonin nöronları bulunmaktadır (Wikgren ve Reuter, 1985). Serotonin hayvanlar aleminde ki birçok canlıda oldukça az miktarda üretilmektedir. Nedeni ise triptofan miktarının diğer canlı gruplara göre az olmasından ileri gelmektedir (Azmitia, 2010).

Serotonin reseptörleri için gen çeşitliliğine baktığımızda ve muskarinik, dopaminerjik ve adrenerjik reseptör yapılarıyla kıyasladığımızda bu reseptörün 750 milyon ile 1 milyar yıl arasında evrimsel bir geçişinin olduğu düşünülmektedir (Peroutka ve Howell, 1994). Siyanobakterileri düşünerek durum ele alınırsa 5-HT_{1A} yapısının rodopsin için ilk örnek olduğu düşünülmekle beraber serotonin reseptörlerinin bu canlılarda 2,5-3,5 milyon yıl önce evrimleştiği düşünülmektedir (Şekil 5), (Azmitia, 2012).



Şekil 5. Serotonin reseptörü 1A' nın yapısı (Azmitia, 2012).

Hücreler membran potansiyellerini sabit tutabilmek amacıyla iyon kanalları ve nörotransmitter değişimlerinin homeostasisi için nörotransmitter yapılarını evrimleştirmişlerdir. İkincil mesajcı yapıları (G proteinler, c- AMP ve fosfolipaz C sistemleri) evrimin erken aşamasında ortaya çıkmıştır ve tüm filumlarda bu yapıların varlığı saptanmıştır. *Porifera* ve *cnideria* filumlarını bir yana alarak düşünüldüğünde, tüm klasik nörotransmitter reseptör alt tipleri memelilerde dahil tüm organizmalarda mevcuttur (Walker ve ark., 1996).

Bazı serotonin reseptör tiplerine embriyonik dönemde bile rastlanabilmektedir. H3-5HT bağlanmasına deniz kestanelerinin blastula ve gastrula aşamalarında rastlanmaktadır (Brown ve Shaver, 1989). Deniz tavşanı 5-HT₂ reseptörü ile deniz kestanesi 5-HT- hpr reseptörü sekans homolojisi göstermektedir (Katow ve ark., 2004). 5-HT reseptörü yapısı arkenteronlarda fertilizasyon sonrasındaki 33 saat içindeki larvada görülmektedir. 48 saat içinde larval vücut yüzeyindeki 7 hücresel alandaki kısa fiberlerde ektoderm boyunca yerleşim göstermektedir (Azmitia, 2010).

Bu serotonerjik reseptör hücreleri mezensefalik hücre kökenindedir ve denizkestanelerindeki gastrulasyon başlangıcında serotonin sinyallerinin ektodermal hücrelere aktardığı saptanmıştır. İnsanlarda ise 5-HT 1A reseptörlerinin miktarı doğumdan önce en yüksek seviyededir (Bar-Peled ve ark., 1991). Ratlarda ise serotonin için reseptörler yalnızca fetüste bulunmamakla beraber bazı agonistlerin enjeksiyonuyla modifiye edilebilmektedir (Whitaker-Azmitia ve ark., 1987). Tüm omurgasız reseptörleri yakın zamanda klonlanmıştır ve memeli reseptörleriyle homolojileri saptanmıştır. Bu olgular temel serotonin reseptör tiplerinin erken jeolojik periyotlarda ve erken ontojenik zamanlarda evrimleştiğini göstermektedir. Memelilerde serotonin reseptörlerinde büyük miktarlarda çeşitlilik saptanmıştır. Yüzlerce serotonin reseptörü klonu elde edilmiş olup insan beyinde en az 20 tip 5-HT nöronal transkriptinin varlığı ayırt edilmiştir (Moroz ve ark., 2006).

Serotonin insan beyinde spesifik olarak en az 16 spesifik reseptör proteinine bağlanmaktadır. Bu düzenleyici yapılar içerisinde iyon kanallarını, c-AMP seviyelerini, kinaz aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamaktadır. 5-HT reseptörleri vücuttaki her hücrede bulunmaktadır. Bunun nedeninin ise az miktarda triptofanın vücutta mevcut olması veya sentez edilmesi nedeniyle ondan en yüksek düzeyde yararlanılabiliyor olmak istenmesi olabileceği olarak düşünülmektedir (Azmitia, 2010).

Hayvan hücrelerinde kanda spesifik triptofan ve serotonin bağlanan proteinlere sahiptir ve beyin gibi bazı organlara bu moleküllerin transportunu sağlamaktadır. Glial hücreler kanla da

alakalı olup kan-beyin bariyerinde triptofanı konsantre edebilmek ve serotonerjik nöronlara taşıyabilmek için çeşitli transport proteinleri mevcuttur (Bachmann, 2002; O'Kane ve Hawkins, 2003).

Serotonerjik nöron yapıları uzun, miyeline olmamış aksonlara sahiptir. Bu akson yapıları triptofanı alabilme ve serotonin sentezi için beyin ve gutta gereken enzimlerin sentezi için gerekli olan yapılardır (Azmitia, 2010).

Serotonin, oksin ve melatonin bitki hücrelerinin farklılaşması, pluripotensisi ve iyon sinyallerinde rol almakta olan triptofan türevli olan yapılardır (Jones ve ark., 2007). Oksin yapısı bitkilerdeki tek ve ilk keşfedilen en önemli tropik faktördür (Perrot-Rechenmann ve ark., 2002). Serotonin ve melatonin güneşten alınabilen enerjiye bağlı olarak sentezi ve fonksiyonu açısından mevsimsel ve günlük ritimlere bağlıdır. Birçok transport ve reseptör mekanizmalarının serotonin ve serotonin ilişkili yapıların mekanizmalarında nöronlarda öncülük etmektedir. Memelilerde serotoninin etkisi nöroplastisite ve sinirsel gelişimde etkili olduğu kadar aynı zamanda hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve hareketlerin farklılaşmasında rol almaktadır (Azmitia, 1999).

Serotonin üreten hücreleri içeren yapılar olan Cnidaria ve bazı böceklerde savunma mekanizmasında rol almaktadır (Horen, 1972; Weiger, 1997). Daha düşük organizmalarda serotonin nöronları dış uyaranlar tarafından harekete geçen duyu nöronları olarak rol almaktadır ve besin alımı, yüzme gibi lokomotor aktiviteler, savunma ya da kaçma mekanizmaları gibi birçok süreçte de aktivitelerine rastlanmaktadır (Yaguchi ve Katow, 2003). Solucan gangliyasında (Annelid), serotonine ilk olarak nöronlar arası bölgelerde saptanmıştır; bu düzenlenme şeklinin öğrenme, hafıza (Moss ve ark., 2005), yüzme (Kristan ve Nusbaum, 1982) gibi kompleks davranışlara etki ettiği saptanmıştır. *Caenorhabditis elegans* (Nematod)' ta, 5-HT hızlı bir şekilde kemosensör ağın kontrolüne olanak sağlamaktadır (Chao ve ark., 2004).

Aynı zamanda serotonin içerik ve miktarı direk olarak nöronlar tarafından düzenlenmektedir. Duyusal ve motorsal işlemler için serotonin spesifik nöronal reseptör yapıları hedef hücrelerde cevabı azaltmak yada artırmak amacıyla apikal gangliyonlarla etkileşim gösterebilmektedir (Marois ve Carew, 1997). Serotoninin üreme ve cinsel aktivitedeki rolü de bilinmektedir (Boyle ve Yoshino, 2005).

Ek olarak serotonin miktarındaki değişimler hedef nöronlardaki cAMP ve Ca²⁺ miktarını da değişime uğratmaktadır. Bu değişimlerse hedef hücrede transkripsiyon oranına ve hücre morfolojisinin değişimine olanak vermektedir (Pettigrew ve ark., 2005). Daha yüksek organizmalarda ise 5-HT organizmada içte homeostasinin sağlanması ve dış dünyayla etkileşimin nasıl gerçekleşeceğiyle ilgili kararların verilmesinde oldukça önemlidir (Azmitia, 2010).

cAMP ve fosfo CREB (p-CREB) miktarının artması yoluyla, serotonin deniz yumuşakçalarında olgunlaşma ve hafızada görev almaktadır (Glanzman ve ark., 1990). Nöronal morfolojide meydana gelen morfolojik değişimler oldukça şaşırtıcı olup bu değişimler omurgalılarda nöronlar arasındaki iletişime etki etmektedir. Kısa bir süre için serotonince kısıtlanan hayvanlarda dendritik profil ve sinapslarda kayıplara rastlanmıştır (Yan ve ark., 1997; Okado ve ark., 2001). Bu nöroplastisite diğer birçok grup tarafında çalışılmıştır (Azmitia, 2007; Azmitia, 2001; Azmitia ve Whitaker-Azmitia, 1991; Azmitia ve Whitaker-Azmitia, 1997; Jacobs ve Azmitia, 1992).

Memelilerde serotonin glial hücrelerle tropik bir ilişki içerisinde olacak şekilde evrimleşmiştir. Serotonin için yüksek afinitede olan reseptörler kemiricilerden primatlara kadar Schwan hücreleri ve astrositlerde tanımlanmıştır (Hertz ve ark., 1984; Whitaker-Azmitia ve Azmitia, 1986; Gaietta ve ark., 2003). Astrositlerin serotonerjik reseptörlerle ilgili belki de en önemli görevi onlara triptofan sağlamaktır (Pow ve Cook, 1997). Astrositlerdeki serotonin reseptörleri aynı zamanda bir nörit uzama faktörü olan S100B ve glukozda salgılamaktadır (Azmitia, 2001). Serotonin uygulaması sonucunda FGFR- 2 aktivasyonu sonucunda GDNF aktivasyonu gerçekleşmektedir (Tsuchioka ve ark., 2008). Diğer yandan serotonin reseptörlerinin aktivasyonu ratlarda beyin kökünde glial hücrelerin gelişimini uyarmaktadır (Tajuddin ve ark., 2003). Astrositler omurgalıların yanı sıra *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster*'de de bulunmaktadır. Bu destek hücrelerinin de erken aşamada evrimleştiği düşünülmektedir. Miyelin belirteci ve astrosit belirteci olan antikor yapıları markır olarak kullanıldığında glial hücrelerin Arthropodlarda ve deniz yumuşakçalarında da bulunduğu saptanmıştır (Roots, 1981).

Serotonin tropotropik bir sistemdir. Serotoninin tropik fonksiyonları mitoz, apoptoz, farklılaşma ve metabolizmada aldığı rollerden anlaşılmaktadır ve bu etkisini doğrudan ya da direk beyindeki majör bir hücresel sistem olan astrositler üzerinde etkilidir. Bu etkileri dışında reseptörler aracılığıyla glukoz kullanılabilirliğindeki değişimler ve tropik faktör salınımı üzerinde

de etkilere sahiptir. Bu özellikler beyin gelişimi ve yaşlanmada etkin olan özelliklerdir (Azmitia, 1999). Serotonin aslında tüm organizmanın gelişimi ve olgunlaşması açısından önemlidir çünkü reseptörleri vücuttaki tüm hücrelerde bulunmaktadır. Örneğin; bağırsakta Hansen ve Witte, 2008, akciğerde Wasserman, 1980, böbrekte Raymond ve ark., 1993, karaciğerde Hagmann ve ark., 1992 ve deride Nordlind ve ark., 2008 serotonin reseptörlerinin varlığı saptanmıştır.

Omurgalı beyninde serotoninin trofik fonksiyonları serotoninin aksonlardan itibaren nasıl etki ettiğiyle ilgili yeni görüşlerin ortaya atılmasını sağlamıştır. Geleneksel olarak nörotransmitterlerin spesifik sinaptik bölgelere aksonlar aracılığıyla taşındığı ve sonrasında salındığı kabul edilmektedir. Serotonin aksonların birçoğunda görülmektedir (Muller ve ark., 2007). Sinaptik olmayan bölgelerde bulunan miyelinsiz aksonal varikositlerde serotonin diffüze olduğu saptanmış olup bu konuda halen devam eden tartışmalar mevcuttur. (Beaudet ve Descarries, 1978). Örnek olarak rat beyninde serotonin aksonları lateral ve III ventriküller boyunca ependimal hücrelerde lokalizasyon göstermektedir (Møllgård ve Wiklund, 1979). Yaşlı bireylerde ve nörodejeneratif hastalıklarda insan beynindeki serotonerjik nöronların dejenere olduğu saptanmıştır (Azmitia ve Nixon, 2008).

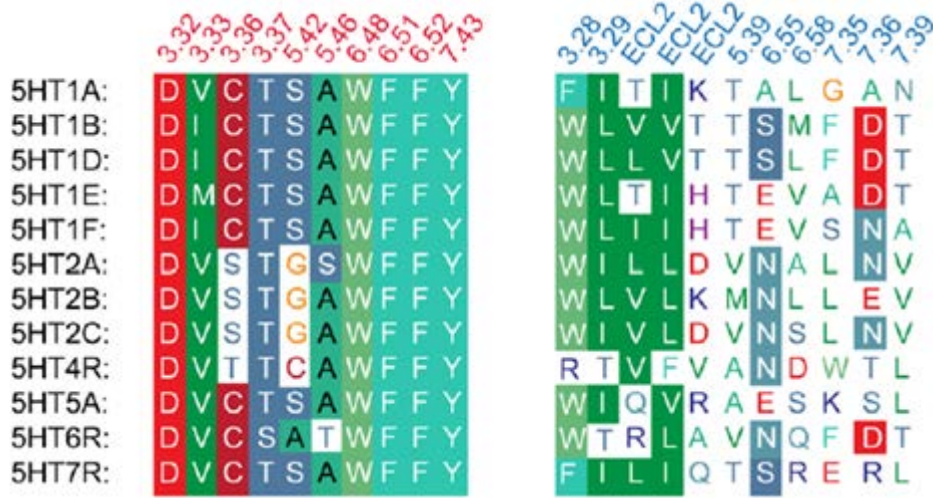
Beyindeki serotonerjik sistemde meydana gelen bozulmalar Down sendromu, otizm, anoreksiya nevroza, anksiyete ve depresyon gibi birçok rahatsızlıkta görülmektedir. Alkol bağımlılığı da (Martinez ve ark. , 2008) ve *Herpes zoster* (Ohyama ve ark., 2004)' de dahil olmak üzere birçok sinirsel rahatsızlıkla serotoninin alakasıyla ilgili 10.000'i aşkın yayın bulunmaktadır. Serotonin ve depresyon ilişkisiyle ilgili yayınların sayısı ise 13.000'i aşmıştır. Beyindeki serotonin seviyesi ve depresyonla intihar arasındaki ilişkiyle ilgili olan ilk yayın bundan yaklaşık 40 yıl öncesine aittir (Shaw ve ark., 1967). Yapılan PET çalışmaları 5-HT-2A reseptörünün depresif ve intihara yeltenen hastalarda değiştiğini göstermiştir (Audenaert ve ark., 2006).

Serotonin seviyesindeki düşüşler normal beyin homeostasisini etkilemekte ve hem yapısal hem fonksiyonel açıdan ciddi değişimlere sebebiyet vermekte ve bireyin hayatının devamını etkilemektedir. Aynı zamanda ışığın insanlarda beyin serotonin sistemindeki dramatik etkileri de görülmüştür (Lambert ve ark., 2002).

1.2. SEROTONERJİK SİSTEMİN GENETİK ORGANİZASYONU VE İLİŞKİLİ OLDUĞU YOLAKLAR

5-HT reseptörlerinin sınıflandırılması hem primer sekans dendogramlarına (sekans dizilemelerini temel alan ağaçlar) ve/ve ya farmakolojilerine göre yapılmıştır. Dendogramlar omurgasızlardaki GPCR lar ve diğer 5-HT7 benzeri reseptörler olarak ayrılacak şekilde düzenlenmiştir. Bu nedenle omurgasızlar için tam olarak sınıflama yapılabildiği bilimsel olarak söylenememektedir (Kroeze ve Roth, 2006).

Omurgalı da ise sınıflandırma geçtiğimiz 50 yılda çok az değişim gösterecek şekilde yapılmıştır. Omurgalılarda 2 ana periyot altında bu sınıflandırmaları birleştirebiliriz. Farmakolojik periyotta; özgül 5-HT liganlarının tanımlanması gerçekleştirilmişken, moleküler periyotta 5-HT reseptörlerinin klonlanmasıyla farmakolojik sınıflandırmada sona gelmiştir (Şekil 6), (Wang ve ark., 2013).



Şekil 6. 12 insan GPCR 5-HT reseptör yapısının ligand bağlanma bölgelerinin dizilenmesi.

Ortosterik bağlanma bölgeleri kırmızı ile, uzamış bağlanma bölgeleri mavi ile gösterilmiştir. 5.38 ve 6.59 pozisyonundaki rezidüer ligand varken 5-HT2B reseptörü yapısında görülüp 5-HT1B yapısında görülmeyen ligand reseptör etkileşimini simgelemektedir (Wang ve ark., 2013).

Farmakolojik periyotta 4 sınıf tanımlanmışken (5-HT 1–4) moleküler klonlama periyodunda 3 reseptör yapısı daha (5-HT5–7) eklenmiştir. Alt sınıfların oluşturulması da moleküler biyolojik metodlara dayanılarak gerçekleştirilmiştir. Son halde ise omurgalı 5-HT reseptör yapılarının sınıflandırılması farmakolojik olarak göz önünde bulundurulmuş bağlanma bölgelerinin yapıda dikkate alınarak yapılmıştır (Şekil 7), (Wang ve ark., 2013).

Sekans açısından baktığımızda ise 5-HT reseptör genleri intron- ekzon yapılarına göre 7 gruba ayrılmaktadır. Bu kadar çeşit reseptörün mevcudiyeti ise farmasötik endüstride spesifik terapötik yapıların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Eğer fizyolojik ve farmakolojik görüşler bir araya toplandığında bu reseptörlerin her biri farklı hücrelerde farklı ifade düzeyleri göstermekte ve farklı şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenlemeler sonucunda ise sinyal yollarında ve hücre fizyolojisinde farklı roller üstlenmektedir (Bockaert ve ark., 2006; Hannon ve Hoyer, 2008).

1.2.1. Serotonerjik Sistemin Farmakolojik Olarak Tanımlanması

Farmakolojik periyot 1950li yıllarda Gaddum ve arkadaşları öncülüğünde ortaya çıkmıştır (Gaddum ve Picarelli, 1957). Gadum ve arkadaşları *Guinea pig* ileumunda 5-HT varlığında kontraksiyonu indüklenen ve Dibenzilin varlığında aktivitesi bloke olan “D reseptörü” ve morfinle uyarılan “M reseptörü” olarak sınıflandırmayı gerçekleştirmişlerdir. Sonrasına D reseptörlerinin post sinaptik 5-HT2 reseptörü, M reseptörünün ise presinaptik 5-HT3 reseptörü olduğu kanıtlanmıştır (Azmitia, 2010).

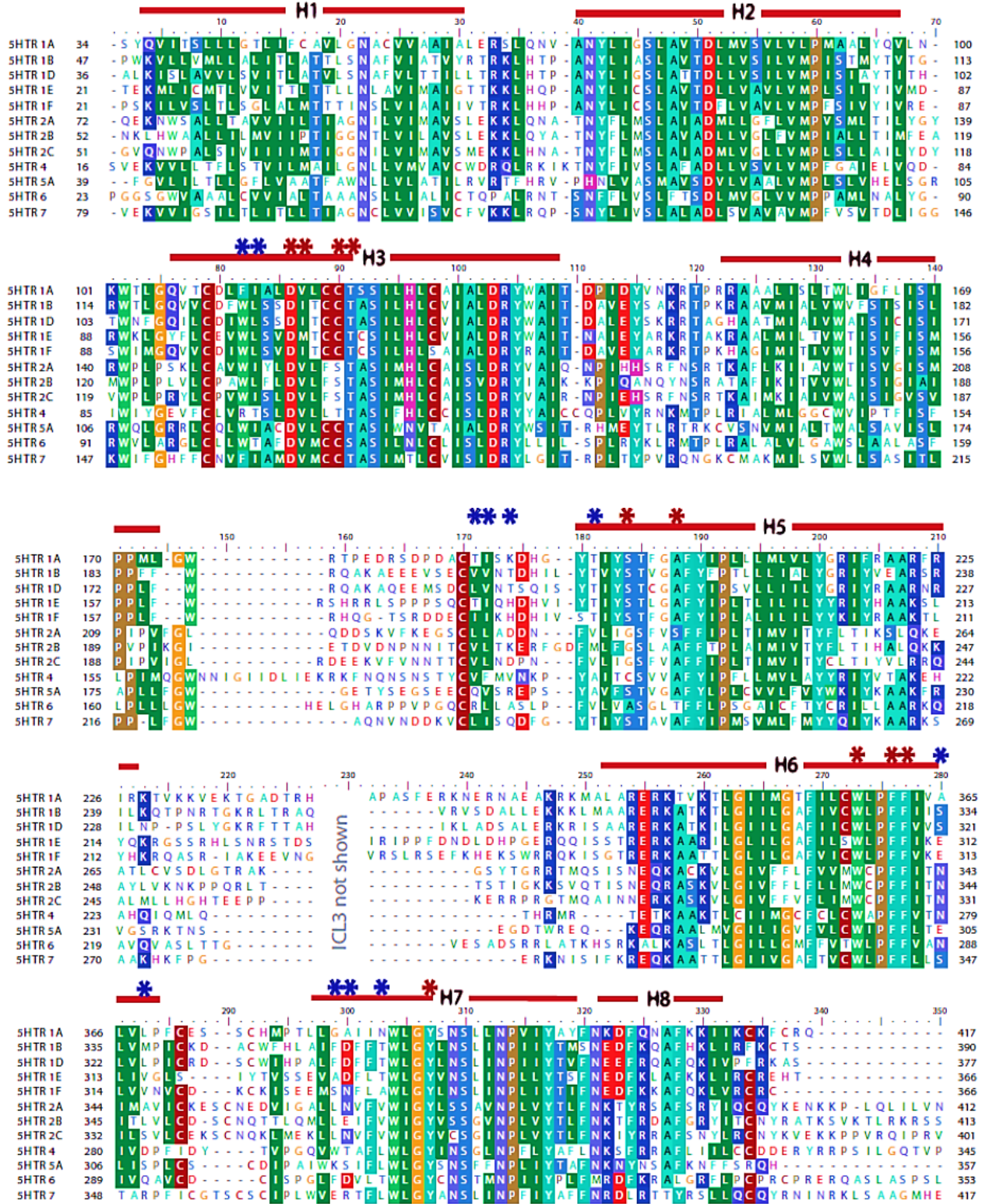
Bağlanma çalışmaları ve organ cevabına bakılan çalışmalara ek olarak 1980lerde yeni bir fenomen ortaya çıktı. Bu çalışmalarda 5-HT yapısının membranları ve/ ve ya intakt hücreleri stimüle etmesini takiben ikincil mesajcı üretiminin değişimi gözlenmeye başlandı. Bu tip deneyler sonucunda *Colliculi* nöronlarında 5-HT4 reseptör yapısının cAMP oluşumunu stimüle ettiği ortaya çıkarıldı. Yapılan bu çalışmaların diğer bir avantajı ise yapı- cevap ilişkisine bakılarak agonist ve antagonistlerin birbirinden net şekilde ayırt edilmesine olanak vermesidir (Dumuis ve ark .,1988a; Bockaert ve ark., 2008).

1.2.2. Serotonin Reseptörlerinin Genomik ve Post Genomik Sınıflandırması

15 –HTR yapıları insan genomunda 17 farklı gen aracılı olarak sentezlenmekte olup; 12 gen metabotropik 5-HTR yapısı, 5 gen ise iyonotropik 5-HT3R yapısı sentezinde rol almaktadır. Aynı zamanda 1 adette psödögen yapısı bulunmaktadır (5-HT5B), (Azmitia, 2010).

1.2.2.1. Metabotropik Serotonin Reseptörleri

GPCR genleri ortak bir atadan kökenlenip ayırım göstermiş olup aralarında yapısal ve evrimsel çeşitli ilişkiler bulunmaktadır (Barnes ve Sharp, 1999). 5-HT1 reseptörleri intronu olmayan genler tarafından kodlanmakta olup; 1, 3, 5 ve 6.kromozomlarda meydana gelen duplikasyonlar sonucu oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 8), (Azmitia, 2010).



Şekil 7. Bütün insan GPCR 5-HT reseptör yapılarının dizilenmesi. Heliks yapılarını oluşturan rezidülerin tanımlanması kırmızı çizgiler aracılığıyla simgelenirken, 5-HT1B reseptöründe ergotamin bağlanma bölgesi yıldızlarla simgelenirken; kırmızı yıldızlar ortosterik bağlanma bölgesindeki rezidüleri, mavi yıldızlarsa uzamış bağlanma bölgesinde bulunan rezidüleri göstermektedir. Dizileme ve renklendirme BioEdit programı kullanılarak yapılmıştır (Wang ve ark., 2013).

GEN	GEN YAPISI	GEN ÜRÜNÜ	CDS
HTR1A 5q11.2-q13		5-HT _{1A} : 422aa	1269b
HTR1B 6q13		5-HT _{1B} : 390aa	1173b
HTR1D 1p36.3-p34.3		5-HT _{1D} : 377aa	1134b
HTR1E 6q14-q15		5-HT _{1E} : 365aa	1098b
HTR1F 3p12		5-HT _{1F} : 366aa	1101b
HTR2A 6q14-q21		5-HT _{2A} : 471aa	>60kb
HTR2B 2q36.3-q37.1		5-HT _{2B} : 481aa	>15kb
HTR2C Xq24		5-HT _{2C} : 458aa	>183kb
HTR3A 11q23.1		5-HT _{3A(a)} : 510aa 5-HT _{3A(b)} : 478aa	>15kb
HTR3B 11q23.1		5-HT _{3B} : 441aa	>41kb
HTR3C 3q27.1		5-HT _{3C} : 447aa	>7kb
HTR3D 3q27.1		5-HT _{3D} : 279aa	>7kb
HTR3E 3q27.1		5-HT _{3E} : 471aa	>6kb
HTR4 5q31-q33		5-HT _{4(a)} : 387aa (b): 388aa, (c): 411aa, (d): 360aa, (e): 371aa, (f): 363aa, (g): 378aa, (hb): 402aa, (i): 428aa, (n): 359aa,	>185kb
HTR5A 7q36.1		5-HT _{5A} : 357aa	>14kb
HTR5B 2q14.1		Pseudogene	none
HTR6 1p36-p35		5-HT ₆ : 440aa	>15kb
HTR7 10q21-q24		5-HT _{7(a)} : 445aa 5-HT _{7(b)} : 432aa 5-HT _{7(d)} : 479aa	>116kb

Şekil 8. 5-HT reseptörü kodlayan sekansların yapıları (Azmitia, 2010).

5-HT2 reseptör genleri uzaktan ilişkili olup transmembran domain 2 (TM2)' in sonunda ve TM4 kodlayan sekansın içerisinde bulunan 2 benzer introna sahiplerdir. 5-HT2C reseptör geninde kodlayan sekansın ekstraselüler domainine denk gelen kısmında ek bir intron yapısına sahip olup 183 kb kadar yer kaplamaktadırlar (Şekil 8). 5-HT2 reseptör geninin alternatif splicingi herhangi bir fonksiyonel splice varyantı oluşumuna sebebiyet vermemektedir (Xie ve ark., 1996).

5-HT4 reseptör genleri biraz daha kompleks bir yapı teşkil etmektedir. Kodlama yapan sekansı 185 kb' den biraz daha uzun olup en az 14 ekzon ve çok sayıda da splice variantı içerdiği düşünülmektedir. İnsandaki 5-HT4 reseptörüne baktığımızda 10 adet fonksiyonel splice variantının oluşturulabildiği mevcuttur (Bender ve ark., 2000; Hiroi ve ark., 2001). Bu varyantların 9 tanesinde splicing olayı C-terminal domainlerinin değişiklik göstermesine olanak sağlamaktadır (Şekil 8). Bazı ekzonlar (h yada i ekzonları gibi) in frame stop kodunu içermemekte olup farklı ek kombinasyonların halen keşfedilmediği bilinmektedir (Brattelid ve ark., 2004). Bununla beraber yapılan bir çalışmada porcine 5-HT4 reseptörü varyantlarının fonksiyonel homofüzyon varyantlarını da içeren yapıların oluşumuna olanak sağladığı saptanmıştır (De Maeyer ve ark., 2008). Bu varyantların varlığının insan genomunda duplikasyon olayları sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda 5-HT4 varyantlarından 5-HT4A ve 5-HT4E reseptör yapılarının spesifik intraselüler proteinlerle etkileştiği ve bu izoformların sinyal yollarının ayarlanmasında ince ve önemli roller aldığı belirlenmiştir (Joubert ve ark., 2004).

2 tane 5-HT5 reseptör geni kemiricilerde saptanmış olup bu yapılardan yalnız 5-HT5A reseptörünün insanda eksprese edilebildiği saptanmıştır (Rees ve ark., 1994). 5-HT5B reseptörü psödogenininde insan genomuna kromozom 2' de lokalize olduğu 35.1' de bulunduğu ve 36.3 olan asıl lokalizasyonunda kalıcı olarak baskılandığı gösterilmiş olup, bu lokustan transkripsiyona uğradığı hakkında yeterli kanıtta bulunamamaktadır (Azmitia, 2010).

5-HT6 reseptörü geninde 2 adet splicing bölgesi bulunmaktadır. İlki intraselüler lob 3' ün ortasında lokalize olup 5-HT5A reseptör genindeki splicing bölgesiyle benzerlik göstermektedir. 2.kısım ise TM6 ve TM7 bölgelerini kodlayan ekzonların ayrımını sağlamaktadır (Şekil 8). Bu reseptör yapısı için fonksiyonel olmayan splice varyantları da keşfedilmiştir (Olsen ve ark., 1999).

İnsan 5-HT7 reseptör geni belki de bu reseptör yapıları içerisinde en kompleks olanıdır. Bu reseptör yapısında C terminal domainleri uzunlukça farklıdır ve her biri farklı akseptör ve donör bölgesi kompozisyonuna sahiptir. 5-HT7 reseptör tipleri 5-HT7A , 5-HT7B ve 5-HT7D yapıları olarak ayırım göstermektedir. Değişken özellikteki intron- ekzon organizasyonu nedeniyle rat genleri 5-HT7C reseptör yapısını oluştururken 5-HT7D izoformunu oluşturamamaktadır (Heidmann ve ark., 1997). Bu splicing pozisyonu 5-HT4 reseptörünün geninde C terminal kısmını kodlayan sekansla benzerlik gösteren terminalin oluşumuna sebep olmaktadır. 5-HT7 reseptörlerinin farklı C-terminal domainlerinin ve varyantlarının aynen 5-HT4 reseptör izoformlarında oluşu gibi özgül intrasellüler proteinlerle etkileşime olanak sağladığı düşünülmektedir (Azmitia, 2010).

1.2.2.2. İyonotropik Serotonin Reseptörleri

5-HT3 iyon kanallarının pentamerik alt üniteleri 5 farklı gen yapısı tarafından kodlanmaktadır (Barnes ve ark., 2009; Şekil 8). HTR3A ve HTR3B genleri aynı lokusun (11q23.1) duplikasyonu sonucu oluşmuştur. Diğer bir duplikasyon olayı ise 5-HT3 reseptör geninde 3q27.1 lokusunda çoklu kopyaların oluşturulması şeklinde gerçekleşmekte olup HTR3C, HTR3D, HTR3E genlerinin ve bir psödogen yapısının (htr3c2) oluşumunu sağlamaktadır. HTR3D yapısı hariç tüm gen yapıları 8 ile 9 arası değişen ekzona sahip olup TM bölgeleri en az 2 ya da 3 son ekzon tarafından kodlanmaktadır. HTR3A geninin alternatif splicing bölgesi aracılı oluşturulan splice varyantlarının biri 510 diğeri 478 aminoasit içermekte olup sırasıyla 5-HT3Aa ve 5-HT3Ab genlerinin oluşumunu sağlamaktadır. Bu iki yapı TM3 ve intrasellüler loop 3 açısından farklılık sergilemektedir (Belelli ve ark., 1995; Miyake ve ark., 1995; Şekil 8).

5-HT3A reseptör izoformlarının sayısı net olarak bilinmemekle beraber ek splicing varyantlarının varlığı da rapor edilmiştir (Bruss ve ark., 2000). HTR3D geninin N terminal domainin büyük kısmı eksik olan 279 rezidüden oluşan 4 TM alt ünitesi kodladığı kanıtlanmıştır (Niesler ve ark., 2007; Şekil 8). Bununla birlikte 2 alternatif transkript yapısının sırasıyla 454 ve 233 aminoasitten oluşan yapılar oluşturduğu rapor edilmiştir (Q70Z44-1 ve Q70Z44-3: Uniprot Database, <http://www.uniprot.org>’ an alternatif transkriptlere ulaşılabilir). Yapılacak ileri çalışmaların bu yapıların aydınlanmasında etkili olacağı düşünülmektedir (Azmitia, 2010).

1.2.3. Serotonin ve RNA Düzenlenmesi

RNA düzenlenmesi moleküler ve fonksiyonel çeşitliliğin oluşumunu sağlayan dinamik bir mekanizmadır. RNA düzenlenmesinin en yaygın tipi Sitozinden Uridine (C-U) ve Adenozinden İnosine (A-I) dönüşümü içermektedir. Inozin yapısı hücredeki translasyon makinesi tarafından Guanozin gibi okunabilmektedir (Higuchi ve ark., 1993).

5-HT_{2C} reseptör yapıları bu tip bir düzenleme sonucu ortaya çıkan GPCR yapılarıdır. Ekzon 5' te (kodlama yapan sekanstaki 2.ekzona denk gelmekte olan yapı); 4 majör (A, B, C, D) ve 1 minör pozisyonda (E) RNA düzenlenmesi olayı meydana gelmektedir. 5-HT_{2C} reseptör mRNA'sına meydana gelen düzenlenme A- I dönüşümü şeklinde gerçekleşir ve bu olay sonucu potansiyel olarak 3 kodon oluşur (Azmitia, 2010).

Teorik olarak 5-HT_{2C} gen yapısı düzenlenmemiş formları (INI) ve tamamen düzeltilmiş yapıları da (VNV) içeren 32 farklı mRNA' dan 24 reseptör izoformu üretmektedir (Fitzgerald ve ark., 1999). 5-HT_{2c} transkriptlerinin bu düzenlenmesi dokuya özgündür. Fare beynindeki 7 majör 5-HT_{2c} reseptör izoformu 11 farklı RNA türü tarafından eksprese edilmektedir. İnsan beyne ise 14 reseptör izoformu 23 transkript tarafından oluşturulmaktadır. 5-HT_{2c}-VSV insan beyinde en sık rastlanan izoformken, rat beyinde en sık rastlanan form 5-HT_{2c}-VNV' dir. RNA düzeyindeki bu yapısal olaylar 5-HT'nin kendisi tarafından düzenlenmektedir. 5-HT miktarının azalması 5-HT için yüksek afiniteye sahip olan izoformların sentezini artırmaktadır. Diğer yandan ise 5-HT_{2c} reseptörü zıt etkiyle düzenlenmektedir (Gurevich ve ark., 2002a).

5-HT_{2c} reseptörünün RNA düzenlenmesinin değişmesinin depresyonda rol aldığı düşünülmektedir. 5-HT_{2c} reseptörü mRNA izoformlarının ekspresyonunun sağlıklı insanlarla; depresif ve intihara meyilli hastalar karşılaştırıldığında insan prefrontal kompleksinde farklı ekspresyonlar gözlenmiştir. İntihar görülen insanlarda en sık bulunan bölgeler olan E ve C bölgelerinde ekspresyon artışı, bölgesine ve reseptörü kodlayan birçok kısımda A ekspresyonunun azalması saptanmıştır. Bu izoformların bu şekilde eksprese olması bazal aktivitenin, agonist afinitesinin ve potansiyelin azalmasına sebep olduğu kanıtlanmıştır (Gurevich ve ark., 2002b).

Küçük nükleolar RNA (snoRNA) yapısı olan HBII-52'nin reseptör mRNA splicingini düzenlediği saptanmıştır. HBII52 yapısı splice olmuş ekzon 5' in fonksiyonel 5-HT_{2C} yapısı oluşumunu sağlayan kısmına sekans komplementerliği sergilemekte ve bu şekilde etkinliğini göstermektedir (Azmitia, 2010).

1.2.4. G protein Aracılı Sinyalleşme ve 5-HT Reseptörleri

Heterotrimerik Guanin nükleotidini bağlayan proteinler (G protein) sinyal transdükleyicileri olup hücre yüzeyinin plazma membranına yapışık olup efektör ve reseptörle ilişki içerisinde hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde rol alırlar (Ross ve Gilman, 1980).

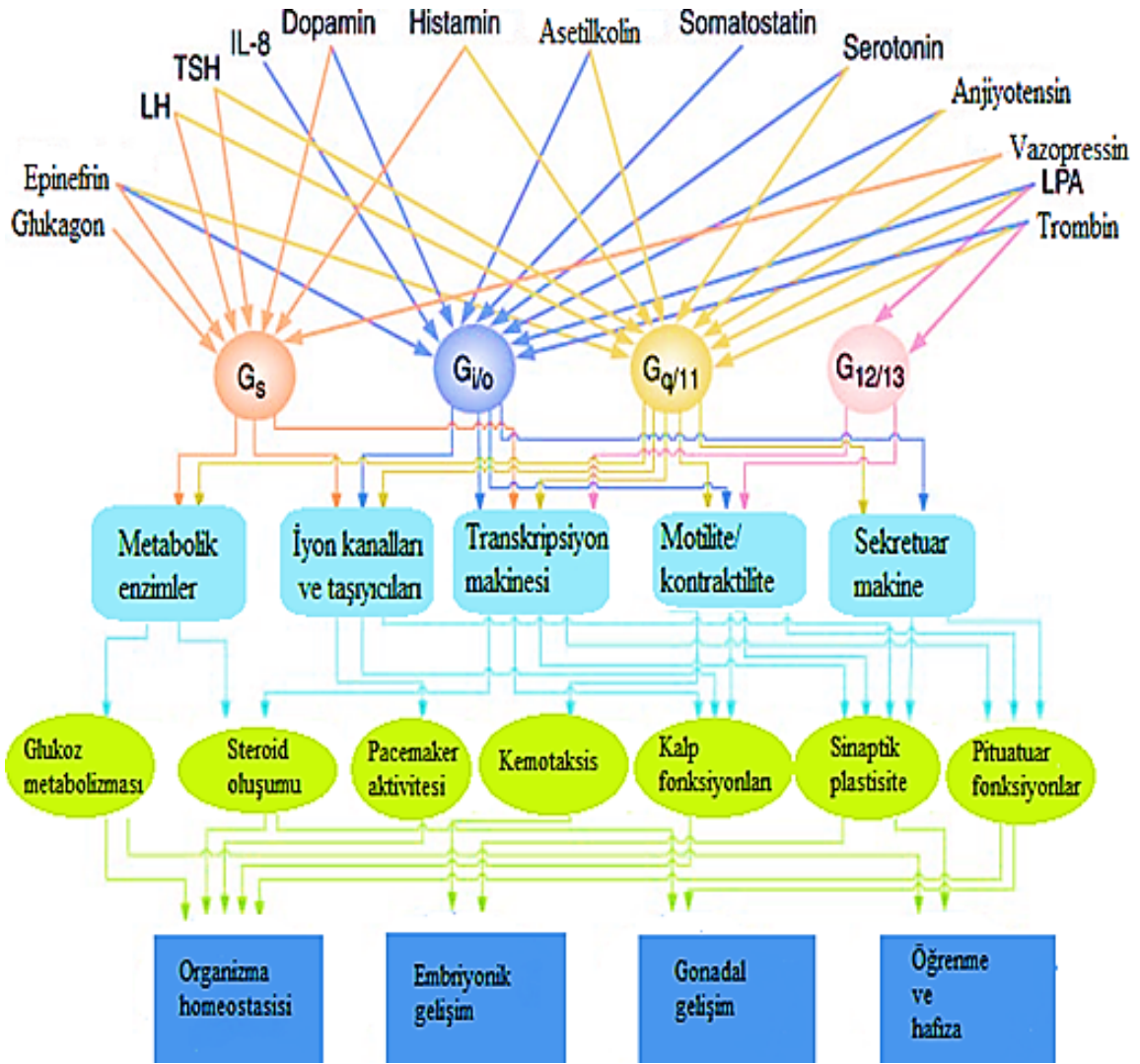
G proteiniyle ilişkili yapılar içerisinde çok sayıda hormon, nörotransmitter, kemokinler, otokrin ve parakrin faktörler bulunmaktadır. İlk 4 G proteinin (Gs, Gt, Gi, ve Go) biyokimyasal saflaştırmasının ardından çok sayıda G proteini cDNA klonlanması ile tanımlanmıştır (Simon ve ark., 1991).

G proteinleri a, b ve g olmak üzere 3 alt ünite içermektedir. Sinyalleşmede esasen dimer olarak rol alırlar; çünkü sinyal Ga veya Gbg kompleksi ile ilişkilidir. Birçok durumda Gbg alt üniteleri nondenatüre edici koşullarda bile birbirlerinden ayrılmazlar (Azmitia, 2010).

Toplamda bilinen 20 adet Ga, 6 adet Gb ve 11 adet Gg alt ünitesinin varlığı söz konusudur. Sekans benzerliklerini temel alarak ele alacak olursak Ga alt üniteleri 4 aileye ayrılabilir. Bu sınıflandırma hem reseptör hem efektör eşleşmeleri göz önünde bulundurmakla yapılmış olmakla beraber bazı istisnaları da bulunmaktadır. Bu açıdan bakıldığında ve STKE deki sinyal transdüksiyon haritaları göz önüne alındığında STKE (Signal Transduction Knowledge Environment) G protein yapılarını alfa alt ünitelerinin özelliğine göre isimlendirmekte ve sınıflamaktadır. Bu yaklaşımla hem reseptör spesifitesi hemde geniş çapta efektör spesifitesi göz önünde bulundurulurken, bg alt üniteleri arasındaki sinyal transferi göz önüne alınmamaktadır. Gs ve Gq aileleri iyi tanımlanmış efektör yollarında rol almaktadır. Bu yollar sırasıyla adenil siklaz ve fosfolipaz C-b (PLC-b) yollarıdır. Gi ve Go aileleri daha amorf olup sinyal akışı Ga ve Gbg üniteleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Hem Ga (Gao ve Gai) hemde Gbg komplekslerini de içine alan birçok downstream efektör yollar keşfedilmiştir. Belki de en iyi anlaşılmiş Gi aile yolağı transducin yolağıdır. Bu yolk gözde ışığın saptanmasına ilişkin süreçlerde rol almaktadır. G12 ve G13 yolları arasındaki ilişki en sık çalışılmış olandır. İki yolkta benzer downstream sinyal bileşenlerine sahip olmasına rağmen farklı spesifite göstermektedir. Ga12 ve Ga13 için farklı iletişim haritaları saptanmış olup farklı biyolojik yolları düzenleyip düzenlemedikleri halen net anlaşılabilmiş değildir (Ram ve Iyengar, 2002; Naves ve ark; 2002).

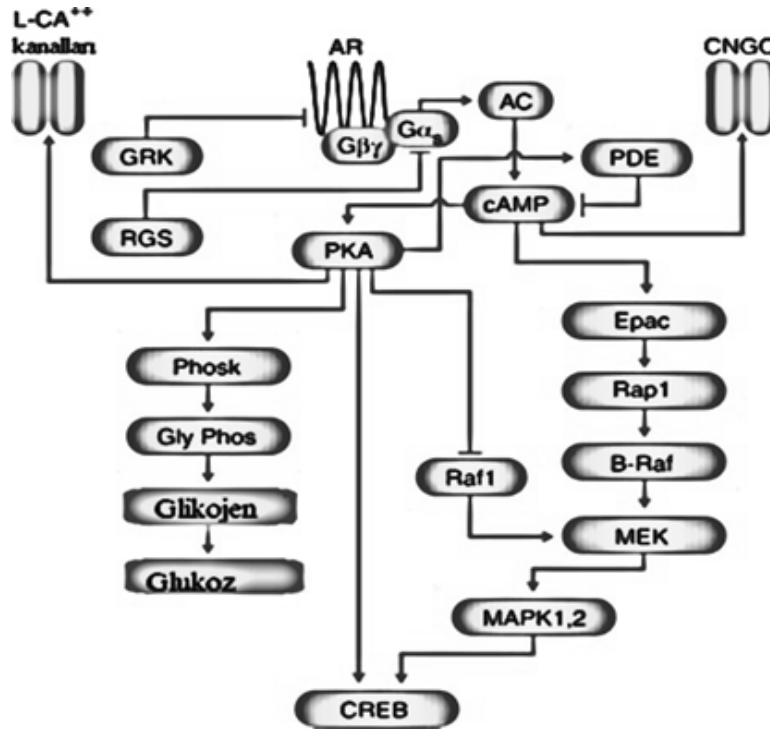
Bu 4 geniş G protein aile üyesi; çok sayıda ekstraselüler ajan tarafından sinyallerle indüklenabilmektedir. Şekil 9' da gördüğümüz bazı ekstraselüler sinyaller birçok G protein yolağını etkileyen proteinlerin yalnızca küçük bir kısmını göstermektedir. Ekstraselüler

sinyaller spesifik G protein yapılarını farklı reseptörlere spesifik şekilde yönlendirilmektedir. Örnek olarak epinefrin sinyali beta adrenerjik reseptörle ilişkili G_s, Gi ile ilişkili α₂ adrenerjik reseptör ve α₁-adrenerjik reseptörle ilişkili G_q ve G₁₁ sinyalleriyle çalışmaktadır. G proteinleri; metabolik enzimleri, iyon kanallarını, transkripsiyon makinelerini düzenlemektedir. Sonuç olarak bu yapılardaki değişimler; hücre davranışı ve fonksiyonunda, embriyonik gelişimde, öğrenmede, hafızada ve organizma homeostasisinde roller almaktadır. Sistem düzeyinde bu değişimlerin düzenlenmesi sayesinde kompleks düzenlenmeler sağlanmaktadır (Neves ve ark., 2002).



Şekil 9. G proteini aracılı olarak sistemik fonksiyonların denetlenmesi (local mediators (LPA) (Neves ve ark., 2002).

Gs yolağı orijinal hücre sinyal yollarını da içine alan ve ikincil mesajcıları da içine alan birçok anahtar kompleksten yol alan bir süreç olma özelliğini taşımaktadır (Sutherland ve Wossilati, 1955). Protein fosforilasyonu (Krebs ve Fischer, 1956) ve sinyal indükleyicileri (Rodbell ve ark., 1971; Ross ve Gilman, 1977) bu yolların çalışılması sonucunda bulunmuştur. Bu yolaktaki birçok etkileşim yapısı biyokimyasal analizler sonucunda tespit edilmiştir. 40 yıllık geçmişi olan Gs yolak çalışmalarında her geçen gün yeni etkileşim partnerleri tespit edilmeye devam edilmektedir. Yapılan çalışmalarla küçük guanozin trifosfataz (GTPaz) Rap yapısı ve bu yapının ikincil mesajcı olan adenosin monofosfatla ilişkisi saptanmıştır (Bos ve ark., 2001). Bulunan bu mekanizmalar G proteinlerinin küçük GTPazların aktivitesini nasıl düzenlediğini de görmemizi sağlamıştır. Rap aktivasyonu Gs sinyali aracılı olarak MAPK (Mitojen İlişkili Protein Kinaz) yolak modülü ile etkileşimdedir. cAMP bağımlı protein kinaz aracılı olarak [protein kinase A (PKA)] Rap' ın c- Src tirozin kinazıyla etkileşimi ve aktifleşmesinin bu yolların keşfinde önemli rollerinin olduğu bilinmektedir (Schmitt ve Stark., 2001). Bunun dışında Gas için olası bir GTPaz aktive edici protein yapısında keşfi sağlanmıştır (Zheng ve ark., 2001).



Şekil 10. Kanonikal Gs yolağı (AC, adenylyl cyclase; PKA, protein kinase A; PDE, phosphodiesterase; L-Ca¹¹ channel, L-type Ca²¹ channel; CNGC, cyclic nucleotide gated channel; PhosK, phosphorylase kinase; GlyPhos, glycogen phosphorylase; CREB, cAMP response element binding protein; EPAC, the cAMP- and AMP-regulated exchange factor for Rap1; Rap1, a small GTPase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Raf1 and B-Raf, MAP kinase kinase kinases; MEK, MAPK/ERK kinase; MEKK, MAPK/ERK kinase kinase; GRK, G protein receptor kinase; RGS, regulators of G protein signaling; bAR, b-adrenergic receptor) (Neves ve ark., 2001).

Gi yolağı orijinal olarak Gai' nin adenil siklazı inhibe etme yeteneğinin keşfi sayesinde saptanmıştır. Birçok önemli hormon ve nörotransmitter (epinefrin, asetilkolin, dopamin ve serotonin) Gi ve Go yolaklarının fizyolojik cevapları oluşturmasında rol almaktadır. Bu yolak tarafından akan sinyal pertussis toksini aracılı olarak inhibe olmaktadır. Pertussis toksini COOH terminal bölgesinde G proteininin alfa alt ünitesini ADP ribozile ederek reseptör etkileşimlerini engeller. Bu yolakta, hem Ga hemde Gbg alt üniteleri etkileşerek iletişim kurar. Gbg direk olarak en az 4 efektör molekülle ilişki içindedir. İndirek olaraksa MAPK' ı aktive eden GTPaz Ras ile ilişki içindedir. Gbg tarafından direk düzenlenen efektörlerin içerisinde PLC-b, K1 kanalları, adenil siklaz ve fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K) bulunmaktadır. Aynı zamanda bu proteinlerin yalnız belirli izoformları Gbg tarafından düzenlenmektedir. Pacemaker aktivitesinin kalpte M2 muskarinik kolinerjik aracılı düzenlenmesi Gi, K1 kanallarının aktivesi gibi çeşitli olayların devamı niteliğinde meydana gelmektedir. Gai ve Gao sinyal yolaklarını c-Src' den STAT3' e aktararak düzenleyebilmekte, diğer yandansa Rap yolağı aracılığıyla adenil siklazı inhibe edebilmektedir (Neves ve ark., 2002).

Gq yolağı Kalsiyum taşıyan hormonlar aracılığıyla aktive olabilen ve PLC-b' yi hücre içi mesajlar olan Inositol trifosfat (IP3) ve diasil gliserol (DAG) sentezi için aktive edebilen bir yapıdır. IP3 hücre içi kaynaklardan kalsiyum salınımını sağlarken DAG, PKC (Protein Kinaz C) ile membranda bir araya gelerek onu aktive eder. Bu ilişki biyokimyasal olarak birçok hücre tipinde de gösterilmiştir. Çoğu hücre tipinde hücre içi kalsiyumun salınımı hücre yüzeyindeki kalsiyum kanallarına etki ederek hücre içi kalsiyumun hücrenin içerisine akışını kolaylaştırır. Gaq, PKC aracılı çalışan bir yapı olup büyük ihtimalle direkt bir etkiyle fosfolipaz D'nin izoformlarını düzenlemektedir (Xie ve ark., 2002). Gaq yapısının transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi PYK2 aracılı olarak aktive ettiği rapor edilmiştir (Shi ve Kehrl, 2001).

G12 and G13 yolaklarına bakarsak bu 2 protein yapısının keşfi bu proteinlerin Ga'ya olan benzerliği sayesinde sağlanmıştır ve tüm deneyler transfekte hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Biyokimyada birçok durumda efektörlerin birbirleriyle direkt etkileşimleri tamamen gösterilememektedir. Birbiriyle endojen olarak beraber bulunan Ga12 ve Ga13 sinyal yolakları da halen net olarak anlaşılammıştır. Sekans benzerliği dikkate alınarak bu 2 yapının aynı ailede olduğu fakat farklı sinyal girdi- çıktılara sahip oldukları ve sonuçta çakışan etkinlikleri olduğu düşünülmektedir(Azmitia, 2010).

Ga12 yapısının direk olarak Ras için GAP aktivitesi gösteren RasGAP ve Bruton's tyrosine kinase (Btk) ile etkileşebildiği gösterilmiştir (Jiang ve ark., 1998). Ga12 yapısının aynı zamanda

fosfolipaz D'yi, PKC ve c-Src' yi bilinmeyen bir yolla aktive ettiği düşünülmektedir. Bu yolağın çıkış noktası ve fizyolojik sonuçlarıysa halen çalışılmaktadır. Birçok durumda MAPK ailesinin farklı üyeleri aktive olabilmektedir. Bu yapılara ERK5 veya JNK örnek olarak verilebilir. Bu yapıların aktivasyonu ise gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle sonuçlanmaktadır. Aslında Ga12 yapısı fonksiyon görüntüleme yöntemlerinde bir onkogen olarak saptanmış bir yapıdır ve gen ekspresyonundaki etkileri de aynen bu şekilde saptanmıştır (Chan ve ark., 1993).

Ga13 yapısıyla nativ olarak ilişkili olan 2 yapı LPA (lizofosfatidik asit) reseptörü ve tromboksan A2 reseptörüdür. Ga13 direk olarak GTPazlar için guanin nükleotid değişim faktörü olan Rho'nun aktivasyonunu sağlayan p115RhoGEF ile etkileşir ve bu etkileşim sonucunda Na⁺-H⁺ exchangerın aktifleşmesini sağlar. PYK2 yapısının aktivasyonu ile birlikte Ga13, PI3K yolağına da etki eder. Ga13 protein kinaz Akt'ı aktifleştirir ve aynı zamanda NFkB faktörünü de düzenleyebilir (Shi ve Kehrl, 2001). Ga13' ün PYK2' yi nasıl aktifleştirdiği ise halen bilinmemektedir (Azmitia, 2010).

14 farklı serotonin reseptörü yapısı bulunmakla beraber bunların 13 tanesi GPCR (G protein coupled receptors) özelliği göstermektedir ve yaklaşık olarak %40'ı önümüzde onaylanmış terapötik birer hedef olarak bulunmaktadır (Neves ve ark., 2002)

5-HT yapısının pleotropik fonksiyonları halen net olarak anlaşılmamış olmakla beraber birçok reseptör tipiyle etkileştiği ve kendi aralarında bu alt tiplerin düzenleme ve splicing ile izoformlar oluşturabildiği saptanmıştır (Bockaert ve ark., 2006 ; Millan ve ark., 2008).

1.2.4.1. 5-HT reseptörleri

5-HT_{1A} reseptörü Gi/ Go yapısı ile ilişkili olan inhibitör reseptör yapısıdır. Adenil siklazın ve gCa⁺² inhibisyonunda rol oynar ve GIRK (G-protein-gated inwardly rectifying gK) açılmasını sağlar (Şekil 11). 5-HT_{1A} reseptör yapıları lokalizasyonlarına göre farklı özellikler gösterirler. Oto reseptör yapıları olan 5-HT nöronlarında ve postsinaptik heterolog nöronlarda farklı lokalizasyonlara ve farklı özelliklere sahiptirler (Şekil 11A) . İlaçlarda bundan ötürü farklı etkinliklere sahiptir. Otoreseptör yapıları desensitize olmaya daha yatkın özellikler gösterirler. Bunun sebebini açıklamak üzere yapılan çalışmalarda otoreseptörlerin seçici olarak Gi3 yapısını, postsinaptik reseptörlerinse Go'ı tercih ettiği saptanmıştır (Mannoury la Cour ve ark., 2006). Nativ dokularda ve bazı durumlarda in vivo da Gi/ Go aktifleşmesini takiben gerçekleşen sinyal olayları şu şekildedir: (1) Beyinde bulunan bölgeye bağlı olarak ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktivasyonu yada inhibisyonu (Crane ve ark., 2007); (2) Akt yolağının

aktivasyonu (Cowen ve ark., 2005) ve (3) prefrontal komplekste NMDA geçişinin inhibisyonu ve RGS4 etkisinin köreltilmesi şeklinde gerçekleşir (Gu ve ark., 2007). RGS4; RGS aracılı olarak düzenlenen ve şizofreniyle ilişkilendirilen bir gen yapısıdır (Gu ve ark., 2007).

COS7 hücrelerinde 5-HT1A reseptörleri ERK' e bağımlı anti apoptotik yolağı uyarır. Diğer yandansa Janus-kinase 2 (Jak2) bağımlı pro-apoptotik yolağında c-jun N-terminal kinaz aracılı uyarımı gerçekleşir (Turner ve ark., 2007a; Turner ve ark., 2007b). 5-HT1B reseptörleri adenil siklazla negatif ilişkili olup substantia nigrada Gi/Go ile ilişkilendirilmektedir (Bouhelal ve ark., 1988; Hamblin ve Metcalf, 1991). Transfekte hücrelerde 5-HT 1B reseptörlerinin PLC, PLD, Akt, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve ERK yolağının aktifleştirdiği saptanmıştır. Bu yapının bunlara ek olarak K⁺ kanallarını aktive ederken Ca⁺² kanallarını da inhibe ettiği de saptanmıştır (Azmitia, 2010). 5-HT 1D/1E/1F reseptör yapılarının adenil siklazla ilgili olan negatif ilişkisi transfekte hücrelerde ve in vivoda gösterilmiştir (Bockaert ve ark., 2006).

5-HT2A reseptörleri PLC, PLA2 ve PLC downstreaminde olan ERK yolağını nöronlarda aktive etmektedir (Bockaert ve ark., 2006; Şekil 11B). 5-HT2A ile ilgili son çalışmalarda bu reseptörün plateletlerde ve rat kortikal hücrelerinde farklı bir yoldan aktive olduğunu ortaya koymuştur. RhoA, Rac1 ve Rab4 gibi küçük G proteinlerinin glutamin rezidülerine serotoninin kovalent olarak bağlanmasıyla konstitütif olarak tamamen aktif bir süreç gerçekleşmektedir (Walther ve ark., 2003; Dai ve ark., 2008). 5-HT bağlanması aracılığıyla gerçekleşen fiziksel etkileşim sonucu, aktive Rab4 (Rab4-GTP) yapısı oluşur ve serotonin transporter (SERT)' un hücre içi bölümlerden plazma membranına translokasyonu paralize olur (Ahmed ve ark., 2008).

Piramidal nöronlara 5-HT2A reseptörleri 5-HT1A–aracılı olarak NMDA akımını arrestin/Src/ERK yolağı aracılı olarak inhibe etmektedir (Yuen ve ark., 2008). C6 glioma hücrelerinde 5-HT2A'nın MMP (matrix metalloproteinases) proteinlerini Src yolağı aracılı olarak aktive ettiği ispatlanmıştır. FGF receptor 2 ligandının bağlanması, FGFR-2 reseptörünün aktifleşmesi, ERK downstreaminin aktifleşmesi ve GDNF' nin transkripsiyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Tsuchioka ve ark., 2008). 5-HT2A reseptörleri ERK'i farklı reseptörler aracılığıyla uyarabilmektedir. Bunun dışında iskelet kaslarında ve düz kas gibi non nöronal hücrelerde Janus kinase-2 (Jak2/ STAT) transkripsiyon yolağının aktifleşmesi de gerçekleşmektedir (Guillet-Deniau ve ark., 1997; Banes ve ark., 2005)

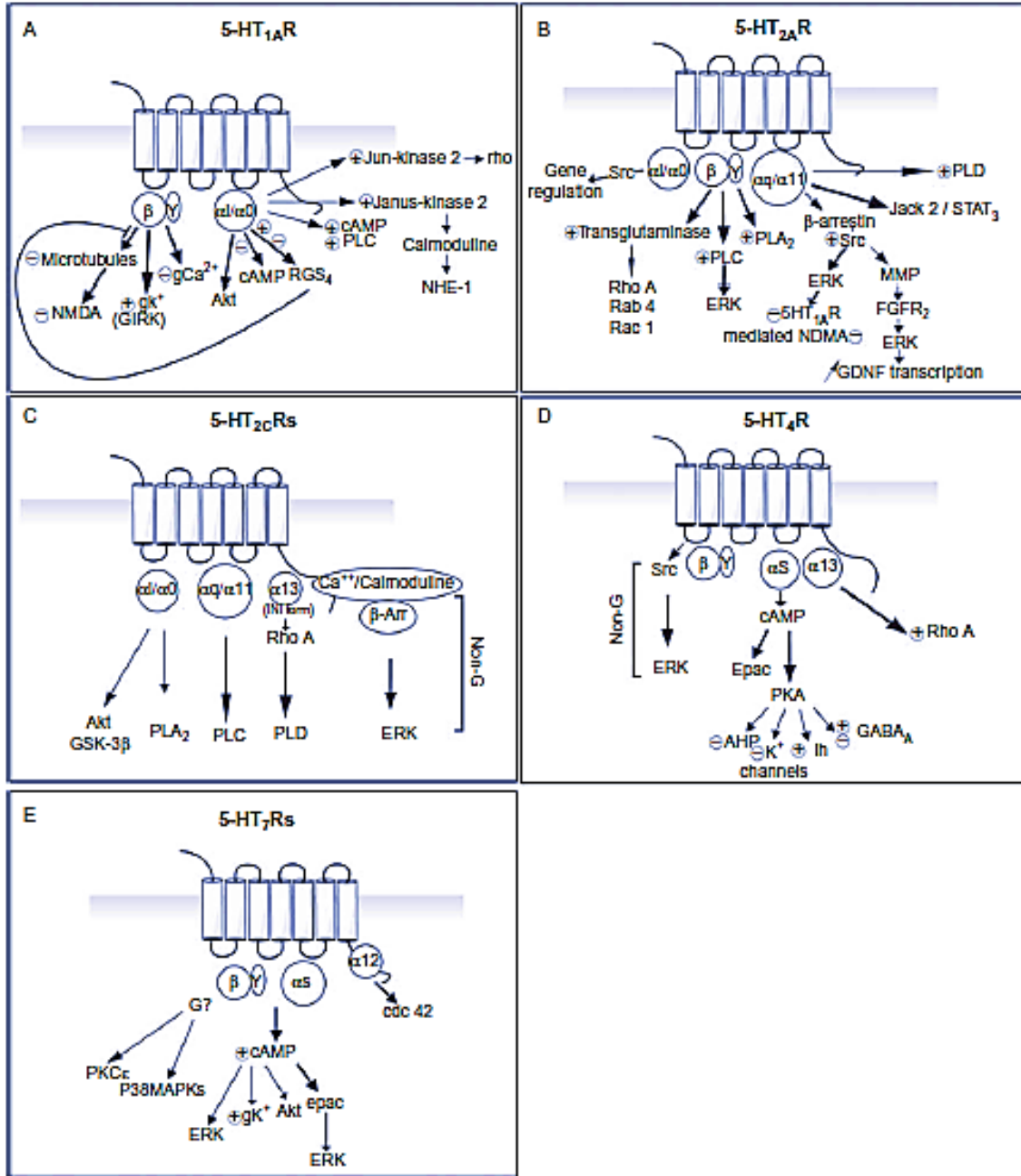
5-HT2A reseptörlerine benzer şekilde, 5-HT2B reseptörleri de Gq/G11 proteinleri ile ilişkili olup PLC aktivasyonunu sağlar. 5-HT2B reseptörlerinin astrositlerden kökenlenen rat serebral

nöronlarında kalsiyum mobilizasyonunu uyardığı saptanmıştır. Ek olarak endojen reseptörleri de içeren nöronal olmayan hücrelerde 5-HT_{2B} yapısının kendisi aracılı yolları da aktive edebildiği saptanmıştır. 5-HT_{2B} reseptörlerinin uyarımı konstitütif ve indüklenebilir NOS aracılığıyla cGMP artışıyla da ilişkili olduğu saptanmıştır. Gq/G11-aracılı 5-HT_{2B} reseptörleri PI3K/Akt ve ERK1/2 sinyal yollarını aktive edebilmektedir (Bockaert ve ark., 2006).

5-HT_{2C} reseptör yapılarının koroid pleksusu da içerecek şekilde birçok beyin bölgesinde PLC aracılı olarak Gq/G11' i aktive ettiği deneylerle kanıtlanmıştır (Sanders-Bush ve Breeding, 1988; Şekil 11C). Düzenlenmemiş form olan 5-HT (2CINI), PLC' yi uyarabilme konusunda daha potansiyel bir role sahiptir ve düzenlenmiş formdan daha yüksek konstitütif aktivite gösterebilmektedir (Niswender ve ark., 1999). 5-HT (2CINI) reseptörlerinin G13 ile de ilişkisi vardır ve PLD sinyal yolağı aktivesini ve Rho GTPaz aktivitesini artırdığı saptanmıştır (McGrew ve ark., 2002), Tam düzenlenmiş form 5-HT (2CVGV)' nin G13'ü aktive etmede başarısız olduğu saptanmıştır. *in vivo*' da sinyal indüklenmesine RNA düzenlenmesinin önemi de bu şekilde açığa çıkmıştır (Price ve ark., 2001). CHO hücrelerinde 5-HT_{2C} reseptörleri Gi/Go' ı aktive edip PLA2 ve Akt/ GSK3- β ' yı düzenlerler (Cussac ve ark., 2002).

5-HT₄ reseptörlerinin adenil siklazı aktive ettiğinin keşfinin ardından 5-HT₄ reseptörü aracılı gelişen Gs/cAMP/PKA sinyal yolu en iyi karakterize edilmiş olanıdır (Şekil 11D). Transfekte edilmiş hücrelerde bulunan diğer yollarsa Gq ve G13 ilişkili yapılardır (Bockaert ve ark., 2006; Bockaert ve ark., 2008). PKA aktivasyonunu takiben birçok iyonik akımın modüle edildiği kanıtlanmıştır. Düzenlenen bu yapılar arasında K⁺ akışlarının uzun süren inhibisyonu en önemlilerinden olup PKA aracılı olarak fosfatazların inhibisyonu işlemini içermektedir. Bu sayede nöronal uyarımın artışı ve iğlerin sabit kalmasında azalmanın olduğu, GABA A reseptörününse inhibe yada aktive olabileceği saptanmıştır (Ansanay ve ark., 1995; Bockaert ve ark., 2006; Bockaert ve ark., 2008). 5-HT₄ reseptörünün aktifleşmesini takiben cAMP'nin üretilmesi değişim faktörü Epac' in uyarımını sağlar. Epac yapısı α -sekretazın aktifleşmesini ve sAPP- α (amyloid öncülü protein) salınımını Epac/ Rap1/ Ras yolağı üzerinden gerçekleştirir (Lezoualc'h ve Robert, 2003).

5-HT₅ olası reseptörleriyle ilgili bilgiler halen aşikar değildir. Nativ hücrelerde 5-HT₅ ile ilgili henüz kesin bilgiler elimizde bulunmamaktadır (Hannon ve Hoyer, 2008). Nöronlarda 5-HT₄ ve 5-HT₇ reseptörleri gibi 5-HT₆ reseptörleri adenil siklazla pozitif ilişkilidir (Sebben ve ark., 1994). CHO hücrelerinde 5-HT₆ reseptörleri kısmen PKA'ye bağımlı ve tirozin kinaz Fyn'yi de gerektirecek şekilde ERK aktiflenmesini sağlar (Yun ve ark., 2007).



Şekil 11. Majör 5-HT reseptörlerinin ilişkili olduğu sinyal yolları (Azmitia, 2010).

5-HT₇ reseptör yapısının sinyal yollarıyla ilişkilerinin 5-HT₆'dan daha iyi anlaşıldığı söylenebilir (Şekil 11E). 5-HT₇ reseptörü guinea-pig hipokampusünde daha sık çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda bu reseptör yapısının adenil siklazla ilişkili olduğu ve 5-CT (5-karboksamidotriptamin)'e yüksek afiniteye sahip olduğu saptanmıştır (Shenker ve ark., 1987; Dumuis ve ark., 1988b). 5-HT₇ reseptörleri aynı zamanda hipokampal nöronlarda ERK1/2 ile de ilişkilendirilmiş yapılarıdır ve bu yapıların aktifleşmesinin Epac'la alakası olduğu da ortaya çıkmıştır (Lin ve ark., 2003). Bunun dışında ERK'in PKA aracılı olarakta aktifleştiği olasılığı göz önüne alınmaktadır. Hipokampal nöronlarda 5-HT₇ reseptörünün aktivasyonu, G α

12/RhoA/Cdc42 sinyal yolağı aracılığıyla nörit uzunluğunun artışı sağlamaktadır (Lin ve ark., 2003; Kvachnina ve ark., 2005). Astrositoma hücrelerinde 5-HT7 reseptörleri p38 ve PKC proteinlerini aktive edebilmektedir; fakat bu yolda G proteinlerinin rolü halen net değildir (Lieb ve ark., 2005).

1.2.4.2. Triptofan Hidroksilaz Genleri

Triptofan Hidroksilaz (TrpOHase) ya da L-tryptophan tetrahydropteridine oxygen oxidoreductase olarak biliniyor olup serotonin biyosentezindeki sınırlayıcı enzimdir. Gerekli bir aminoasit yapısı olan triptofanın 5-hidroksitriptofana hidroksilasyonunun katalizinden sorumludur. Fenilalanin hidroksilaz ve tirozin hidroksilazla beraber, fenilalanin hidroksilaz aromatik aminoasit hidroksilaz ailesinin üyesi olup tetrahydropterinleri substrat olarak kullanır. Beyinde 5-HT sentezinde görevli triptofan hidroksilaz 2 gen tarafından kodlanır. Bunlar TPH1 ve TPH2 olarak bilinir. Genel olarak TPH1 periferik organlarda serotonin sentezinden sorumluyken, TPH1' e göre daha yeni keşfedilen TPH2 merkezi sinir sisteminde serotonin sentezinden sorumludur (Invernizzi, 2007).

1.2.4.2.1. Triptofan Hidroksilaz 1 (TPH-1)

TPH-beta ve alfa tarafından kodlanmakta olup; PC12 hücrelerinde (rat pheokromositoma) TPH beta, TPH- α 'ya göre heterolog gen lusiferaz translasyonunda daha etkindir. Bu özellikte translasyon etkinliğinin seçici olarak TPH1' de nasıl düzenlendiğini gözler önüne sermektedir (Chamas ve Sabban, 2002). Farelerde P815 mastositoma hücrelerinden klonlanan TPH1 21 kb uzunlukta olup 11 ekzon içerir ve kromozom 7' nin proksimal ucunda lokalizasyon gösterir. Rat TPH-1' ine benzer şekilde bu genin insan karsinoid tümörlerinde 1332 baz çiftlik kısım 50. 592 Da büyüklüğünde 444 aminoasitlik bu proteini kodlar. İnsan koryokarsinoma ve adenokarsinoma hücre hatlarında TPH-1 geninin baskılanması 5' düzenleyici bölgesinde meydana gelen 3 SNP sebebiyle meydana gelmektedir. Bu SNP yapıları TGT haplotipine olup sırayla T-1607C, G-1066A, T-346G şeklindedir (Souza ve Craig, 2010).

1.2.4.2.2. Triptofan Hidroksilaz 2 (TPH2)

TPH-1 ve TPH-2 insanlarda %71 oranında aminoasit benzerliği göstermektedir. Farelerde TPH2 geninin mRNA' sı primer olarak beyinde saptanmışken, TPH1 mRNA' sı periferde timusta, dalakta, pineal bezde bulunmuştur. TPH2 geninde meydana gelen polimorfizmler proteinin üretimine, stabilitesine ve fonksiyonuna etki etmektedir (Souza ve Craig, 2010).

Örneğin; genin düzenleyici bölgesinde meydana gelen T473A polimorfizmi unipolar ve bipolar depresyonla ilişkilendirilmiştir (Van Den Bogaert ve ark., 2006). Yine bu polimorfizmin rat

Raphe çekirdeğinde ve SHP- 77 insan küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde kayda değer şekilde transkripsiyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucundaysa A alelindeki transkripsiyon faktörleri olan n-Oct3' e bağlanmanında azaldığı gözlenmiştir (Scheuch ve ark., 2007).

HEK293 hücrelerinde saptanan haplotipler olan G-703T, T-473A ve A90G mutasyonları transkripsiyonel aktivitenin azalmasıyla sonuçlanmakta olup, her 3 polimorfizmde DNA-protein etkileşimini değiştirmektedir (Chen ve ark., 2008).

1.2.4.3. Serotonin Taşıyıcı Genleri (SERT, 5-HTT, SLC6A4)

SERT geni kromozom 17' de lokalizedir ve 31 kb uzunlukta olup gende 14 adet ekzon bulunmaktadır. Organizasyonu diğer Na/Cl nörotransmitter transportörler ailesi üyeleriyle benzerdir (Souza ve Craig, 2010).

Diğer bir serotonin taşıyıcısı olan 5-HTT lokusunda en çok çalışılan polimorfizm transkripsiyon başlama bölgesinin 1 kb upstreaminde meydana gelmektedir. Bu temel polimorfizm 5-HTTLPR 44 baz çiftlik insersiyon ve delesyonları içermekte olup uzun 16 tekrarlı bir alel ya da kısa 14 tekrarlı bir alel oluşmasına sebebiyet vermektedir. Diğer düşük frekanslı alellerse 15, 18, 19, 20 ve 22 tekrar içermektedir. Yapılan klasik çalışmalarda kısa alelin daha düşük transkripsiyon potansiyeline ve anksiyete ile ilişkilendirilmiş kişisel davranışlara sebep olduğu gösterilmiştir (D'Souza ve Craig, 2008).

5-HTTLPR kısa varyantı daha düşük transkripsiyonel aktiviteye de sahiptir. Periferik lenfoblast hücrelerinde ve insan plasental koryokarsinoma hücreleri JAR' da kısa varyantın uzun varyanta göre serotonin alımı ve transportör ekspresyonuna daha fazla etki ettiği saptanmıştır (Heils ve ark., 1996).

Son olarak SERT ekspresyonunun epigenetik olarak cinsiyet temelli olarak düzenlemesi de genotipik etkilerinin modifiyesinde önemli etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Lenfoblastoid hücrelerde CpG adacıklarıyla çakışan 5' bölgesinin kadınlarda erkeklere göre daha fazla metilasyona uğradığı saptanmıştır. Bunun sonucunda transkripsiyonda da azalmanın meydana geldiği saptanmıştır (Philibert ve ark., 2007, 2008).

1.2.4.4. Beyin Türevli Nörotropik Faktör (BDNF)

BDNF (Beyin Türevli Nörotropik Faktör)' nin lenfoblastik hücrelerde serotonin transportunu düzenlediği gösterilmiş olup bu proteinin varyantlarının monoamin yolaklarının fonksiyonelliği ile de ilişkili olduğu saptanmıştır. Gen 11p14' te lokalizasyon göstermektedir. Bu yapı öncül

peptid proBDNF' yi kodlamakta ve olgun proteinin oluşabilmesi için öncül yapı proteolitik olarak kesime uğratılmaktadır. BDNF protein yapısı hücre modellerinde ve hayvanlarda hipokampus bağımlı hafızayı ve hipokampal plastisiteyi düzenlemektedir. Davranışsal bozukluklarda, transmitter sistemlerin düzenlenmesinde, nöronların hayatta kalımında ve rejenerasyonunda oldukça önemli rolleri vardır (Souza ve Craig, 2010).

BDNF lokusunun 5 adet kodlama yapmayan ekzona sahip olduğu saptanmıştır (Marini ve ark., 2004). Bunun dışında alternatif promoterları, alternatif splice donörleri ve alıcı bölgeleri, alternatif poliadenilasyon bölgeleri olan 9 transkript daha tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2006). Tüm transkriptler proBDNF kodlar (Souza ve Craig, 2010).

1.2.4.5. Monoamin Oksidaz Genleri

Monoamin oksidaz A ve B iki adet bitişik X bağlı genin ürünü olup perifer ve merkezi sinir sisteminde biyojenik aminlerin metabolizmasına önemli rolleri vardır. Monoamin oksidazlar oksijen oksidoredüktazlar olup flavin içeren enzimlerdir. MAO A ve MAO B, farklı substrat ve inhibitör spesifitesi, vücutta dağılımı ve farklı immünolojik özellikler gösterir. MAO A serotonin, norepinefrin ve epinefrin gibi biyojenik aminleri okside ederken, MOA-B feniletilamin ve benzilamini katalizler. Dopamin, tyramin ve triptamin her 2 enzim formuna da substrat olma özelliği taşımaktadır. Promoter bölgelerindeki önemli farklılıklar bu 2 formun doku ve hücreye spesifik ekspresyon profilinde rol oynarlar. Upstreamde bulunan tekrarlayan birimler insan serviks kanseri hücreleri HeLa ve insan glioma 1242 MG hücrelerinde promoter bölgenin downregülasyonuna sebep olur (Souza ve Craig, 2010).

1.2.5. G protein Bağımlı Olmayan Sinyalleşme

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada GPCR yapılarının aktifleşmesinin ve sinyal vermesinin G protein aktivasyonunu gerektirmeden de oluşabileceği ortaya çıkarılmıştır. G protein aracılı olmayan bu sinyal yolağında rol alan yapılar GPCR'larla etkileşen diğer protein yapılarının ortaya çıkmasına ön ayak olmuştur (Bockaert ve ark., 2004).

Klasik bir non-G protein sinyal yolağı içerisinde β – arrestinlerde olan ERK yolağını içerir. Uzun süren bir ERK (5 dakikadan saatlere kadarki bir süreç olabilir) aktivasyonu birçok GPCR tarafından tetiklenebilecek bir durumdur. Tetiklenmeyi sağlayan GPCR yapılarına örnek olarak; β -adrenerjik reseptörler veya AT 1A angiotensin II reseptörleri örnek verilebilir. Bu yapılar β -arrestin ile beraber internalize olup G proteinlerinden ayrılabilirler. Internalize olmuş GPCR- β –arrestin kompleksi Src – Raf – MEK – ERK modülündeki birçok proteinin bir araya gelmesini sağlar. Oluşan bu yapı GPCRlar ve G protein aracılı olarak oluşan hızlı (5 dakikadan

az süren) ERK aktivasyonundan daha farklı bir süreçtir; bu yapı G protein bağımlı bir yol izleyip nükleusa ERK translokasyonunu sağlamaktadır. Bununla beraber birçok 5-HT reseptörlerini de içeren birçok GPCR bu şemadan ayırım göstermektedir. Örneğin; 5-HT_{2C} reseptörü aracılı olarak başlatılan ERK aktivasyonu sinyalinin hem erken hemde ileriki aşamalarında 5-HT_{2C} reseptör yapısı G_q, G₁₃ ve G_{i/o}' dan bağımsız olup Kalmodulin proteininin reseptörün C-terminal domainiyle etkileşimini ve β -arrestin 1 ve 2 ile fiziksel etkileşimini içermektedir (Labasque ve ark., 2008). Bu non-G protein ilişkili sinyal yolağındaki etkileşim yalnız HEK293 transfekte hücrelerde değil aynı zamanda nativ olarak 5-HT_{2C} eksprese eden koroid pleksus epitel hücrelerinde ve kortikal nöronlarda da görülmektedir (Azmitia, 2010).

5-HT₄ reseptörlerinin aktivasyonu kültüre alınmış colliculi nöronlarına ve transfekte HEK293 hücrelerinde ERK fosforilasyonunun sürekliliğini indüklemektedir (Barthet ve ark., 2007). Bu aktivasyonun tümüyle G_s/cAMP/PKA bağımsız olduğu, diğer G protein (G_q, G_i, G_o) yapılarını içermediği ve downstream mesajcıları da içine aldığı saptanmıştır. 5-HT₄ reseptörü aracılı olarak ERK proteininin aktive olması β -arrestin leri içermezken Src tirozin kinaza bağlı olduğu ispatlanmıştır. Reseptör aracılı olarak gelişen bu yolağın 5-HT₄ aracılı uzun ömürlü potansalizasyonda (LTP) rolü olduğu saptanmıştır (Huang ve Kandel, 2007).

Tüm bu bilgileri bir arada düşündüğümüzde; G protein aracılı olmayan mekanizmaların β -arrestin ve etkileşim partnerleri aracılı yolaktaki yapıları çoğunlukla gerektirdiği ortaya koyulmuştur. Aynı zamanda da bu etkileşimlerin 5-HT reseptörleri aracılığıyla ERK yolağının aktifleşmesine de katkısı ortaya çıkarılmıştır (Azmitia, 2010).

1.2.6. Sürekli Aktif Olan Sinyalleşme

Bazı GPCR yapıları agonist yokluğunda da G proteinlerini aktifleştirme özelliğine sahiptir. Bazı antagonistler bu konstitütif aktiviteler bu aktiviteyi inhibe de edebilirler ve bu nedenle invers agonist olarakta davranabilirler. Birçok 5-HT reseptör yapısı nöronlarda konstitütif aktivite de gösterebilmektedir. Post sinaptik 5-HT_{1A} reseptörlerinin konstitütif aktivitesi hipokampüste görülmektedir. 5-HT_{1A} otoreseptörlerinin intrinsik aktivitesi ise henüz kanıtlanamamıştır (Marte ve ark., 2007).

5-HT_{2C} reseptörlerinin konstitütif aktivitesi yüksek derecede mRNA düzenlenmesine bağlıdır. Düzenlenmemiş ya da kısmen düzenlenmiş reseptör tipleri en yüksek konstitütif aktiviteyi gösterir. Tamamen düzenlenmiş formlarına konstitütif aktiviteden yoksun olduğu bilinmektedir (Berg ve ark., 2005; Chanrion ve ark., 2008).

Düzenlenmemiş yada kısmen düzenlenmiş izoformların konstitütif olarak internalizasyonla ilişkisi saptanmıştır (Marion ve ark., 2004). 5-HT_{2A} reseptörlerinin fizyolojik konstitütif aktivitesi inverse agonistler varlığında öğrenmenin azalmasına sebep olmaktadır (Berg ve ark., 2005). 5-HT₄ reseptörlerinin transfekte edilmiş hücrelerde splice varyantlarına bakıldığında daha yüksek konstitütif aktivite göstermekte olduğu saptanmıştır. Daha kısa olan yapıların uzun yapılardan daha yüksek konstitütif aktivite göstermekte olduğu saptanmıştır (Bockaert ve ark., 2008).

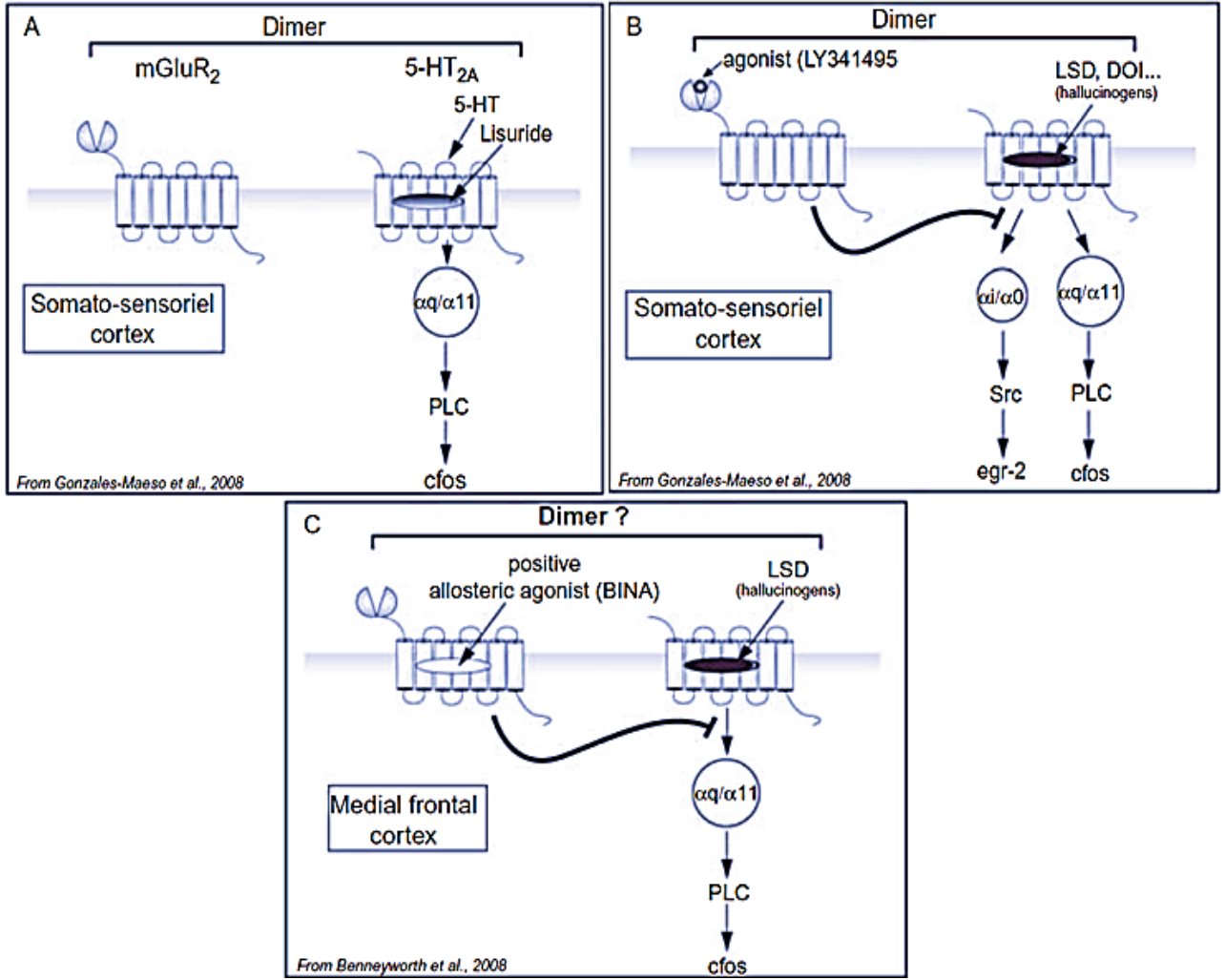
1.2.7. Agonist Aracılı Sinyalleşme

Agonist varlığı kaynaklı olarak GPCR ların farklı aktif konformasyonlarda bulunabileceğini ve bu her bir durumda yapının stabil olduğunu öneren bir fenomen olan ligand aracılı sinyalleşme (LDS) ortaya atılmıştır (Kenakin, 2007). LDS fenomeni farklı 5-HT reseptör alt tiplerinde gözlemlenmiş bir olgudur. Otoreseptörlerde ve post sinaptik reseptörlerde agonistlerin farklı etki göstermelerinin nedeninin sırasıyla bu yapıların Gi₃ ve G_o etkileşimleriyle alakalı olduğu düşünülmektedir (Millan ve ark., 2008).

LDS olgusunun 5-HT reseptörleri üzerindeki etkilerini gösteren en ilginç örneklerden biri saykodelik halüsinojenler (LSD, DOI ve DOB) ve nonhalüsinojen agonistlerle (lisuride) yapılan deneylerin sonucunda 5-HT_{2A} reseptör yapısı üzerinde açığa çıkarılmıştır. Her iki ligand kategorisi de Gq/PLC yllağı aracılı olup, sonuçta c-fos indüksiyonu hem somatosensor kortekste hem de medial-prefrontal kortekste gerçekleşmektedir (Benneyworth ve ark., 2007; Gonzalez-Maeso ve ark., 2007). Tam tersi bir şekilde yalnız halüsinojenik ajanların Gi/o-Src yolağını aktive ederek egr-2 ekspresyonunu primer somato-sensor komplekste ve kortikal nöronlarda indükleyebileceği saptanmıştır (Gonzalez-Maeso ve ark., 2007; Benneyworth ve ark., 2007).

Verilen bir raporda bu hallüsinojenik ligand sinyalleşmesinin kompleksiteside ortaya konmuştur. Kortikal bölgedeki 5-HT_{2A} ve mGlu 2/3 reseptörleri birbiri arasında fizyolojik bir antagonizm göstermektedir (Marek ve ark., 2000). mGlu 2/3 reseptörlerinin aktive olması hallüsinojenlerin davranışlara olan etkisini azaltmakta olup akut şizofrenide de görülen ilaç intoksikasyonu durumlarının oluşumuna da katkı sağlamaktadır (Marek ve ark., 2000). mGlu 2/3 reseptör agonisti ile yapılan faz II çalışmasında bu reseptör agonistinin efektif bir antipsikotik terapi ilacı olduğu saptanmıştır (Aghajanian ve Marek, 1999; Schoepp 2006). mGlu 2/3 reseptör agonistinin etkisinin geri dönüşümlü olduğu da saptanmıştır. mGlu 2/3 reseptörlerinin glutamaterjik terminallerdeki piramidal nöron yapılarıyla ilişkili olduğuna dair

çalışmalar vardır. 5-HT_{2A} reseptörlerinin V piramidal nöronlarındaki post sinaptik bölgelerde bulunduğu da gösterilmiştir. mGlu 2/3 reseptörlerinin aktivasyonunun; 5-HT_{2A} reseptörü indüklü post sinaptik akım geçişlerini inhibe ettiği saptanmıştır. Hipotezin devamı mGlu2/3 reseptörlerinin etkisini açıklamak için şu şekilde bir sıralı model önermiştir: (1) Post sinaptik tabakadaki V piramidal nöronlarının aktivasyonu presinaptik sinir uçlarından glutamat salınımını ve retrograde taşıyıcılarla iletişimini düzenlemektedir. (2) Glutamat bu nöronlarda post sinaptik uyarıcı akımlarını düzenlemekte ve yine bu salınım presinaptik mGlu 2/3 reseptörlerinin ileriki aşamada aktivasyonunu inhibe etmektedir (Aghajanian ve Marek, 1999; Benneyworth ve ark., 2007). Bununla beraber bu hipotez yapılan bir çalışmayla değişime uğramıştır. Bu çalışmada post sinaptik piramidal nöronlarda mGlu 2 reseptörlerinin 5-HT_{2A} reseptörleriyle heterodimer oluşturduğu saptanmıştır (Gonzalez- Maeso ve ark., 2008). mGlu2 reseptörlerinin aktivasyonu direk olarak halüsinojenlerce indüklenen Gi/o- Src aktivasyonunu sağlarken, egr2 indüksiyonunu da inhibe etmektedir ve bu olaylar Gq-PLC ve c-Fos indüksiyonuna etki etmeden gerçekleşmektedir (Şekil 12), (Gonzalez-Maeso ve ark., 2008). Bu çalışmaya ek olarak mGlu2 reseptörlerinin somatosensör yapılarında da halüsinojen indüklü yolağın tam tersine çalıştığı kanıtlanmıştır (Benneyworth ve ark., 2007). Bu paradoksun çözülebilmesi için daha çok çalışma yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 12. Bazı 5-HT_{2A} agonistlerine LSD ve DOI gibi halusinojenlerin etkisi. (A) Somatosensoryel kortekste heterodimerizasyon (Gonzalez-Maeso ve ark., 2008). (B) Kortikal kültürlerde (Gonzalez-Maeso ve ark., 2007) ve somatosensoryel komplekslerde (Gonzalez-Maeso ve ark., 2007, 2008), LSD ve DOI gibi halusinojenik ilaçlar Gq/G₁₁/PLC/c-fos yolağına ek olarak Gi/Go/Src/erg-2 yolağını da aktifleştirir. LY341495 ile beraber somatosensoryel yapılarda mGluR₂ aktivasyonu Gi/Go/Src/erg-2 yolağınca inhibe edilirken Gq/G₁₁/PLC/c-fos yolağınca inhibe edilmez. LY341495, mGluR₂rtosterik agonistidir (Gonzalez-Maeso ve ark., 2008). (C) Medial fronta kortekste, allosterik agonist BINA halusinojenlerin c-Fos aracılı indüksiyonunu inhibe etmektedir (Benneyworth ve ark., 2007).

1.2.8. 5-HT3 Reseptörü Sinyal Yolağı

5-HT3 reseptör sinyal yolağı ilişkili hücrel olaylar genelde oldukça basittir. Na^{+1} , Ca^{+2} ve K^{+1} e geçirgen olan katyonik kanallar aracılı olarak 5-HT3 reseptörlerinin aktivasyonu hücrenin depolarize olmasıyla sonuçlanmaktadır. 5-HT3 reseptörleri post sinaptik olarak hızlı sinaptik cevapları düzenlemekte; 5-HT ve bazı diğer nörotransmitterlerinde salınımını presinaptik olarak uyarmaktadır. Homo-pentamerik 5-HT3A reseptörleri ve native 5-HT3 reseptörleri arasında biyofiziksel farklılıklar bulunmaktadır. 5-HT3B reseptörlerinin klonlanmasının ardından kısmende olsa 5HT3A ve 3B reseptörleri arasındaki farklar gözlemlenmiştir. 5HT3AB reseptörlerinin native reseptörlerle benzer özellikler sergilediği ispatlanmıştır (Jensen ve ark., 2008).

1.2.9. Serotonin Reseptörleri ve İlişkili Protein Yapıları

Artan kanıtlar 5-HT reseptörlerinin aslında izole edilmiş birer adacık yapısı olmadığını, aksine plazma membranında yüzme benzeri hareketler gösterdiklerini ama aynı zamanda birçok çoklu protein kompleksine yerleşim gösterdiklerini açığa çıkarmıştır. Bu çoklu protein kompleks yapılarında ya dimer ya da oligomerlerin içerisine yerleşim göstermektedir. GPCR yapıları arasında etkileştiği protein yapıları en iyi saptanmış olanlar 5-HT reseptör ailesi proteinlerinin etkileşimleridir (Tablo 1). Bu sonuçların ele edilebilmesi için proteomik stratejiler ve maya iki hibrit görüntülemelerinden yararlanılmıştır. Liste halen büyümekte ve gelecekte de etkileşim yapan proteinlerin daha kolay keşfedilebileceği düşünülmektedir (Azmitia, 2010).

Tablo 1. Serotonin reseptörleriyle etkileşen proteinler (Azmitia, 2010).

Reseptör Yapısı	Etkileştiği Protein	Etkileşimin Fonksiyonu	Kaynakça
-----------------	---------------------	------------------------	----------

5-HT1A	Calmodulin	Sinyalleşme ve trafficking	Turner ve ark., 2004; Della Rocca ve ark., 1999.
	Yif1B	Dendritik hedefleme,	Carrel ve ark . 2008.
5-HT1B	P11	Sinyalleşme ve trafficking	Svenningsson ve ark., 2006.
5-HT2A	PSD 95	Sinyalleşme, trafficking	Xia ve ark., 2003a; Becamel ve ark., 2004.
	MUPP1	Hedefleme ve trafficking	Becamel ve ark., 2001.
	SAP97	Sinyalleşme	Becamel ve ark., 2004.
	MAG12	Hedefleme	Becamel ve ark., 2004.
	MPP3	Sinyalleşme	Becamel ve ark., 2004.
	CIPP	Fosforilasyon	Becamel ve ark., 2004.
	Caveolin 1-2	Desensitizasyon	Bhatnagar ve ark., 2004.
	Arf1- 6	Sinyalleşme	Robertson ve ark., 2003.
	MAP1A	Sinyalleşme	Cornea-Hebert ve ark., 2002.
	JAK2- STAT3	NO sentezi	Guillet-Deniau ve ark., 1996.
	RSK2	Desensitizasyon	Sheffler ve ark., 2006; Strachen ve ark., 2008.
5-HT2B	Calmodulin	Reseptör Fosforilasyonu	Turner ve Raymond, 2005.
	PDZ	Dendritik hedefleme	Xia ve ark., 2003b.
5-HT2B	PDZ	Desensitizasyon ve trafficking	Manivet ve ark., 2000.
	MUPP1	Desensitizasyon ve trafficking	Becamel ve ark., 2001.
5-HT2C	PDZ	Sinyalleşme	Backstrom ve ark., 2000.
	MUPP1	Reseptör defosforilasyonu ve bağımlılıklar	Ullmer ve ark .,1998; Becamel ve ark., 2001; Parker ve ark., 2003.
	PSD95	Trafficking ve sinyalleşme, reseptör uyarımına	Becamel ve ark., 2002; Becamel ve ark., 2004; Parker ve ark., 2003.

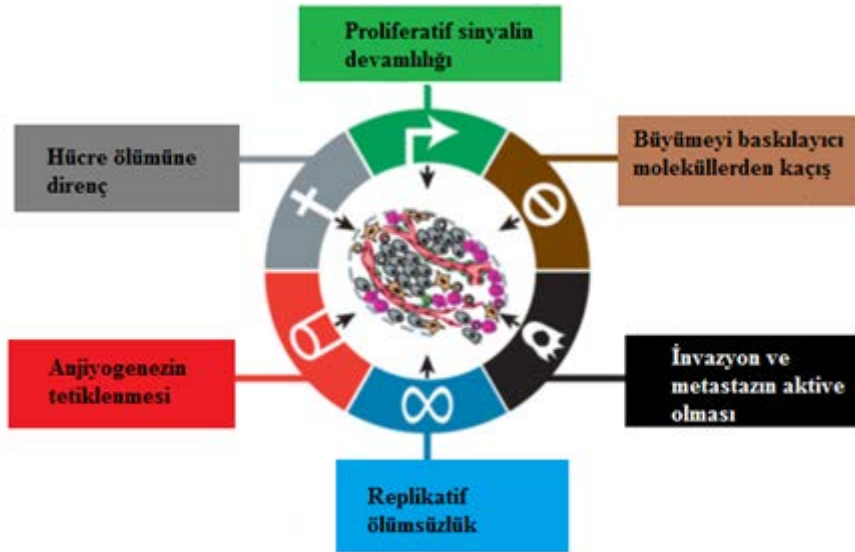
		antidepresif cevap verilmesi	
5-HT2C	SAP97	Hedefleme	Becamel ve ark., 2004.
	SAP102	Hedefleme	Becamel ve ark., 2004.
	MAGI- 2	Sinyalleşme	Becamel ve ark., 2004.
	MPP3	Tam olarak bilinmiyor	Becamel ve ark., 2002; Becamel ve ark., 2004; Gavarini ve ark., 2006.
	Veli3/CASK/ Mint1	Tam olarak bilinmiyor	Becamel ve ark., 2002; Becamel ve ark., 2004.
	Calmodulin	Trafficking ve sinyalleşme	Becamel ve ark., 2002; Labasque ve rk., 2008.
	PICOT	Tam olarak bilinmiyor	Becamel ve ark., 2002
	PTD4	Tam olarak bilinmiyor	Becamel ve ark., 2002
	PTEN	Tam olarak bilinmiyor	Ji ve ark., 2006; Warner-Schmidt ve ark., 2009.
	5-HT4	P11	Tam olarak bilinmiyor
5-HT4A	SNX27	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	NHERF1 (NBP50)	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	MAGI2	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	MPP3	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	Veli 1- 3	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	CMP2	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	Src	Tam olarak bilinmiyor	Barthet ve ark., 2007.
5-HT4E	CIPP	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	nNOS	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
	Sec23	Tam olarak bilinmiyor	Joubert ve ark., 2004.
5-HT6	Fyn	Tam olarak bilinmiyor	Yun ve ark., 2007.

1.3. MEME KANSERİ

Kanser, iyi huylu tümörlerin zıttına metastaz ve yayılım özelliğine sahip olan kötü huylu tümörlerdir. Normal hücrelerin DNA'sındaki mutasyonlar sebebiyle tümörlerin oluşabileceği

saptanmıştır; fakat bunun dışında her bir tip için oluşuma neden olabilen çeşitli etkenler mevcuttur (Pecorino, 2008), (Weinberg ve Hanahan, 2011), (Şekil 13).

Kanserlerin büyük kısmı çevresel faktörler tarafından tetiklenerek oluşur ve önlenabilir bir hastalıktır. Kalıtım yoluyla meydana gelme insidansı çevresel faktörlere oranla azdır. Çeşitli çevre koşulları ile kanser türleri de farklılaşmaktadır. Gama, x, morötesi ışınlar, bazı ilaçlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kimyasal faktörler kanser oluşumunda etkilidir. Diğer yandan virüsler de bir hücreyi transforme edip hücrede kanser oluşturabilir. Kimyasal kanser yapıcı ajanlar, tümörü ya uygulandığı yerde veya absorbe edildiği yerde ya da metabolizmanın durumuna göre karaciğer, böbrek gibi organlarda, bazı durumlarda da farklı bir yerde meydana getirir. Diğer yandan kanseri oluşturan kimyasal ajana maruziyet kanser oluşturmak için tek başına yeterli değildir. Kanser tipleri arasında akciğerden sonra 2. en sık rastlanılan kanser tipi meme kanseridir. Süt bezleri ve kanallardan oluşan meme hücrelerinin kontrol dışı proliferasyon ve yayılması ile meme kanseri ortaya çıkabilmektedir (Karantza-Wadsworth ve White, 2007).

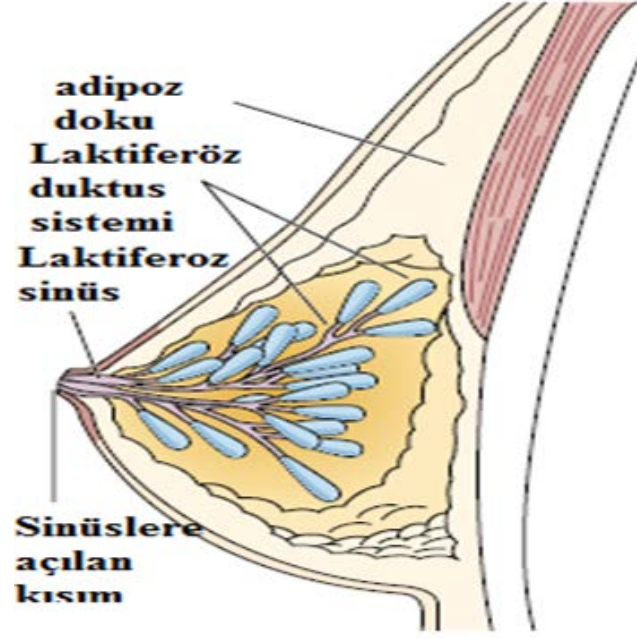


Şekil 13. Kanser ayırıcı özellikleri (Weinberg ve Hanahan, 2011).

Meme kanseri tüm dünyada kadınların en sık karşılaştığı ölüm sebebidir. Meme hücrelerinde meydana gelen kontrolsüz büyüme gösteren hücrelerden kaynaklı kanserin oluştuğu ve büyüme

ile ilgili hücrelerde anormal değişikliklerin olmasıyla, mutasyonların meydana geldiği saptanmıştır (Pecorino, 2008).

Memenin yağ ve fibröz içeren stromal dokularında ise daha az sıklıkta meme kanseri başlamaktadır. Genelde memede süt bezlerinde, kanallarda, lobüllerin hücrelerinde görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Meme histolojisi (Gartner ve Hiatt, 1994).

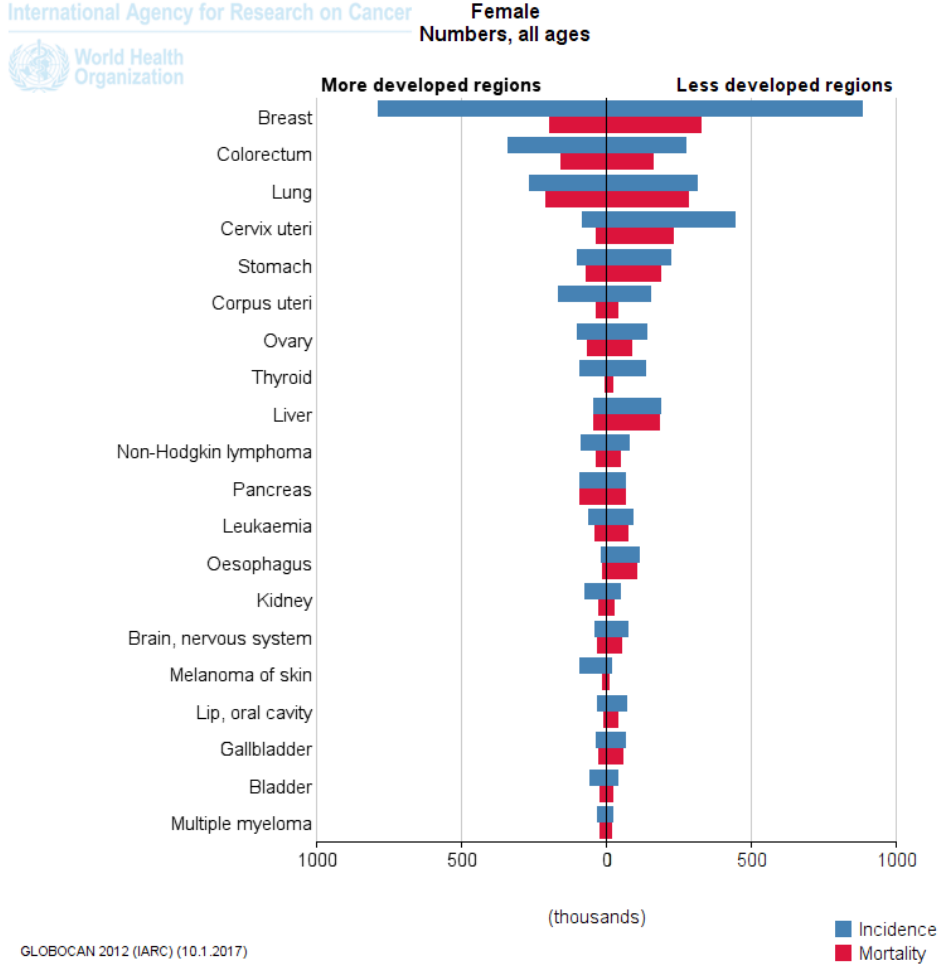
1.3.1. Meme Kanserinin Prevelansı

Meme kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilk sıralarda görülen kanser tipidir. Meme kanserlerinin çoğu da geri kalmış ve orta seviyedeki ülkelerde sağlık hizmetleri tam olmadığından, erken teşhis imkanı olmadığından daha sık görülür (GLOBOCAN).(Şekil 15).

1.1 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuş, bunlardan 410.000'in hayatını kaybettiği belirlenmiştir (Ferlay ve ark., 2004). 2000 li yılların başında kadınlarda meme kanserine rastlanma sıklığının % 3 oranında azaldığı açığa çıkarılmıştır. Bu durumun sebebi , mamografinin yaygınlaşması ve menopoz sonrasında kadınlarda hormon tedavisinin azaltılması görülmektedir (Jemal ve ark., 2007; Ravdin ve ark., 2007).

Gelişmiş ülkelerde meme kanseri insidans oranı 100.000 kadında %40 azalmasına rağmen kadınlar arasında en yaygın olduğu ifade edilmiştir (Parkin ve ark., 2005). Yaşa bağlı olarak

incelendiğinde ise menapoza kadar artan yaş ile meme kanserine yakalanma riskinde arttığı belirlenmiş, sebep olarak östrojen döngüsü gösterilmiştir (Henderson ve ark., 1988). Yaşa bağlı olarak yaş artışıyla birlikte meme kanserinin arttığı belirtilmiştir (Ferlay ve ark., 2005).



Şekil 15. Kadınlarda kanser istatistikleri (GLOBOCAN2012).

Amerika’da yapılan istatistiksel çalışmalara göre şunlar saptanmıştır: Amerika’da sekiz kadından birinde meme kanserine yakalanma durumu mevcuttur. 2011’de Amerika ‘da yapılan bir istatistikte 230,480 kadında invaziv meme kanseri görülmüşken, 57,650 kadında invaziv olmayan meme kanseri görülmüştür. Erkekler de ise 2,140 kişide meme kanseri teşhis edilmiştir. Amerika’da 39,520 kadın bu kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Bu rakamlar 1990 yılındaki hesaplara göre azalış göstermektedir. Bu azalmanın sebebi erken teşhisler, kullanılan ilaçlar, hormona yönelik çalışmalardır. Beyaz kadınlar Amerikalı ve Afrikalı kadınlara nazaran daha sık meme kanserine yakalanabilir; fakat 45 yaş altındaki kadınlarda, Amerikalı ve Afrikalılarda beyaz kadınlara göre daha sık bu kansere rastlanır. 2011’de 2,6 milyon kişi meme kanserinden kurtulmuştur. Meme kanseri görülen bireylerin %15’lik bir

kısımında ailesel sebepli kanserin olduğu saptanmıştır. %85'lik kısımda ise genlerdeki mutasyonlardan, risk faktörlerinden kaynaklı sebeplerden oluştuğu saptanmıştır (World Health Organization) (Ferlay ve ark., 2004). Bu sonuçlarla dünyada ve Türkiye'de meme kanserinin önem teşkil ettiği belirtilmiştir (Çöl ve ark., 2000).

Meme kanserinin kadınlarda hangi yaşlarda görüldüğü literatürden incelendiğinde, genellikle 20'li yaşlarda meme kanseri insidansı düşüktür. 30'lu yaşlardan menopoza kadar olan süreçte artış görüldüğü, menopozdan sonrasında büyük artış olduğu belirlenmiştir (Rogers ve ark., 2002). Amerika kanser topluluğunun yaptığı bir istatistiğe göre kliniğe başvuranların %26'sında meme kanseri teşhisi yapılmıştır, %15'inde de meme kanseri sebepli ölüm tespit edilmiştir (Jemal ve ark., 2008).

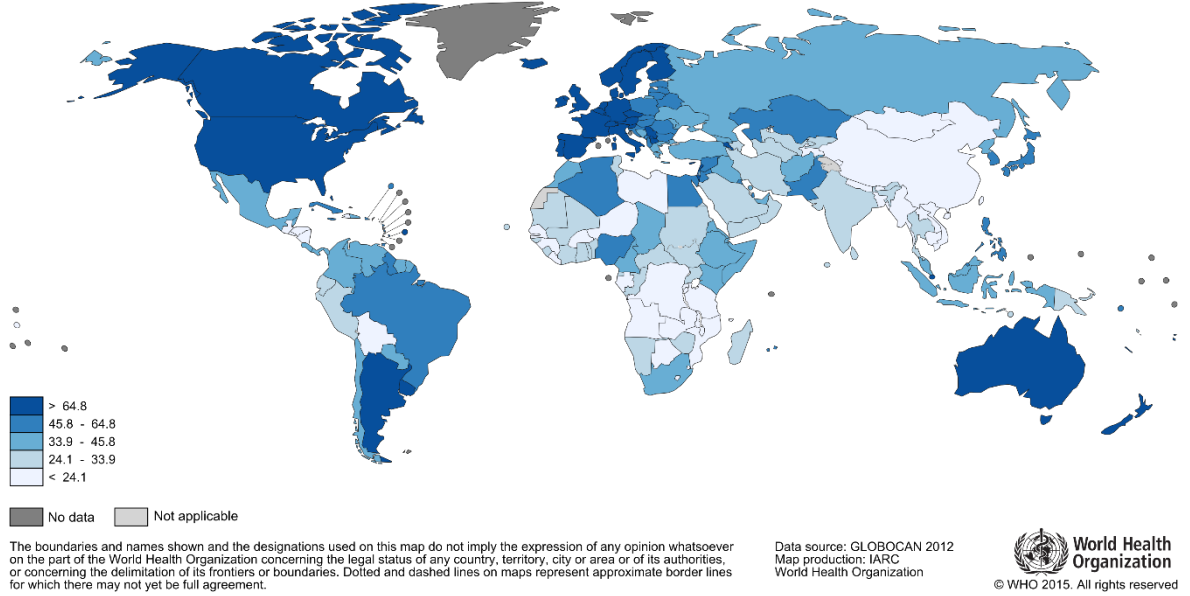
Ülkemizde yapılan araştırmalarda meme kanseri dağılımında birtakım faktörler açığa çıkmıştır. (Coğrafik, Ekonomik, Sosyal ve Kültürel faktörler).Ülkemizin batı bölgesinde ki yaşam tarzı Avrupa kıtasındakine paralellik gösterdiği için meme kanseri görülme sıklığı, doğuya göre daha fazladır. Meme kanseri insidansı doğuda 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranındadır. Türkiye'de insidansının ikinci sırasında meme kanserinin olduğu saptanmıştır (Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı,2002). Ülkemizde meme kanserine bağlı ölüm oranları 45-64 yaş aralığında artış göstermektedir (Devlet İstatistik Enstitüsü,1999). Sağlık Bakanlığı'nın hastalık yükü verilerine bakıldığında meme kanseri insidansı 24.4/100.000, prevalansı ise % 0. 3'tür. Meme kanserinin Türkiye'de kadınlarda en sık görülen kanser türü olması sebebiyle erken tanı ve tedaviye yönelik çalışmaların önem kazandığı belirtilmiştir. Dünyadaysa çevresel faktörler, genetik yatkınlık, ailedeki kanser hikayesi, yaşam tarzı, hormon kullanımı meme kanseri riski olan faktörlerdir.

1.3.2. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanseriyle ilgili çalışmalar halen sürmekte beraber elde edilen bilgiler ışığında (Matsui, 2002; Vatten, 1991) başlıca risk faktörleri Dünya Sağlık Raporu'nun yaptığı çalışmalara göre belirli başlıklar altında toplanmaktadır. Meme kanseri geçmişi olan ve tedavi olan kadınların, diğer memelerinde kanser gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha çoktur (U.S. Preventive Services Task Force, 2002).

Ailede de genetik geçiş vardır; aile de meme kanseri geçmişi olan birey var ise, diğer kadınların meme kanseri olma olasılığı artış göstermektedir. Özellikle kız kardeşi yada annesi meme kanseri olan bir kadında, bu hastalığın oluşma riski, diğer kadınlara kıyasla 2- 5 kat daha çoktur. Bu durumdaki bireylerin tedbirli olmaları önerilmektedir (Matsui, 2002; Meiser ve ark., 2000).

İlerleyen yaşlarda meme kanseri oldukça sık görülmektedir (U.S. Preventive Services Task Force, 2002). 50 yaş ve üzerinde olan kadınlarda meme kanseri görülme oranı, 50 yaşın altındakilere göre 4 kat fazla olduğu saptanmıştır (Matsui, 2002), (Şekil 16).



Şekil 16. Yaşa bağlı olarak meme kanseri gelişiminin dünyada dağılımı (GLOBOCAN2012).

Kadının uzun süre östrojen hormonu etkisi altında kalmasının kanser gelişim oranını arttırdığı saptanmıştır. Fertil çağın uzun sürmesi de östrojen hormon etkisini artırmaktadır (Bentley ve ark., 1998; Manjer ve ark., 2000).

Menopoz sebebiyle 10 seneden çok östrojen tedavisi gören bireylerde meme kanseri görülme sıklığı artmaktadır. Doğum kontrol ilaçlarının meme kanseri riskini arttırdığı belirlenmiştir (Cuzick,2003).

Türkiye’deki bir çalışmada hastaların memelerindeki kitle sebepli hastaya biyopsi yapılmış ve iyi huylu tümörlere sıklıkla rastlanmıştır, bu iyi huylu tümörlerin bulunması da, kanser gelişme riskini artırabileceği düşüncesine sebep olmuştur (Özdemir ve Çalışkan, 2002).

Kadınlarda çocuk dünyaya getirme yaşı kanser durumunu etkilemektedir. Bu saptamaya bağlı olarak şunlar ortaya çıkmıştır: İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanseri görülmesinin prevalansı 20 yaşından önce doğuran kadınlara göre 2 kat daha çoktur. Hiç çocuk doğurmayan kadınlarda kanser riski daha da fazladır. Sosyo-ekonomik düzeyi arttikça, meme kanseri oluşma riski artmaktadır. Ekonomik çitası yüksek olan ailelerde beslenme sebebiyle kız çocukları fertil çağa erken girmektedir. Geç yaşta yapılan evlilik ve geç

yaşta bebek sahibi olabilmekte meme kanseri riskini arttırmaktadır (Clavel-Chapelon ve Gerber, 2002).

Yapılan çalışmalar 50 yaş ve üzerindeki kadınlarda beden kitle indeksinin normal sınırların üstünde olmasının meme kanserine yakalanma riskini yükselttiği ortaya çıkmıştır (Clavel-Chapelon ve Gerber,2002).

Kişilerin spor yapmaması, beyaz ırktan olması, yüksek dozda radyasyona maruz kalması, emzirilme olayının kısa tutulması ya da hiç emzirilmemesi, rahim ve yumurtalık kanseri geçirilmesi, kırmızı et yönünden zengin beslenme alışkanlığı, uygun pişirme tekniklerinin kullanılmaması da meme kanserine sebep olan faktörler olarak saptanmıştır. (Clavel-Chapelon ve Gerber, 2002; Matsui,2002; Smith ve ark., 2003).

1.3.3. Meme Kanseri Tipleri

Meme kanserinin memenin çeşitli bölgelerinde oluşabileceği, meme dokusunu oluşturan bu bölgelerin birbirinden değişik karakteristikler gösterebileceği belirlenmiştir (Abeloff ve ark., 2008).

1.3.3.1. Duktal Karsinoma

Bu tür meme karsinomu sıklıkla sütü meme ucuna taşıyan süt kanalları civarında görülür (Şe Meme kanserlerinin %85-90 civarı bu bölgede oluşur. Meme kanserinin erken formu olarak belirlenen bu tipin sebebi için kesin kanıtlar belirtilmemekle beraber genetik mutasyon sebepli olduğu düşünülmektedir (Abeloff ve ark., 2008). Eğer kanser DCIS (ductal carcinoma in situ) ise yayılcı cinste değildir ve başarıyla tedavi edilebileceği belirlenmiştir. Tamamen temizlendiği takdirde radyasyon tedavisiyle devam edilebileceği saptanmıştır (Ganz, 2010).

1.3.3.2. Lobular Karsinoma

İnsidansı %1 - %20 arasında olduğu rapor edilmiştir (Racha ve ark., 2008). Bu karsinoma çeşidi süt bezlerinde yada lobüllerde baş gösterir (Şekil 14). Lobüller memenin daha derin bir bölgesinde bulunurlar. Meme kanseri cinslerinden ancak %8'i lobüllerde oluşur. Eğer kanser LCIS (lobular carcinoma in situ) ise bu durumda sadece lobüllerde oluşur ve çevreye yayılım göstermez. Yayılma niteliği gösteren lobüler karsinoma sık görülen yayılcı kanserler arasında ikinci sırada gelmektedir. Yaş artışıyla beraber daha sık rastlanmaktadır. İlaç tedavisi ve hormon uygulaması bu tür hastalarda sistematik olarak kullanılmaktadır. Hastaların %32'sinde kullanıldığı belirtilmiş ve sağ kalımı da arttırdığı görülmüştür (Deogracias ve ark., 2010). Eğer tümör mikroçevresi temizse ve bir yere bağlı değilse lumpektomi(sadece tümörlü

kısmın alınması) ameliyatı ve devamında radyoterapi yapılabilir. Eğer çevre meme dokularına sıçramışsa mastektomiye ihtiyaç duyulmaktadır (Hanby, 2008).

1.3.3.3. İnvaziv (Yayılmacı) Meme Kanseri

Yayılmacı cinsteki meme kanserlerinin tümörün bulunduğu yerden memenin diğer bölgelerine yada vücudun diğer bölümlerine yayılım meyili gösterdiği belirlenmiştir (Fisher ve ark., 2004).

1.3.3.4. İnflamatuvar Meme Kanseri

Nadir rastlanan bir tür olup, bu tipte memede kızarıklık ve şişlik olduğu tespit edilmiştir. Bu görüntü, kanserli hücrelerin lenf damarlarını tıkaması sonucu ortaya çıkmakta ve göğüs enfeksiyonu ile de karıştırılmaktadır (Woodward ve ark., 2009).

1.3.3.5. Tekrarlayan Kanser

Bazı durumlarda belirli bir süre atlatıldığı sanılan kanser geri dönebilir. Bunun sebebi; kanser tamamen yok edilmiş gibi görünse de tedaviden sonra da tespit edilemeyen kanser hücrelerinin vücudun belirli bölgelerinde kalmış olmalarından kaynaklanır (Pecorino, 2008).

1.3.4. Meme Kanseri Teşhisi ve Tedavi Yöntemleri

1.3.4.1. Belirtileri ve Tanı

Meme kanserinin vücutta yayılımı kişiden kişiye değişir. Kadınların çoğunda ağrısız oluşum gösterir. Bunun dışında belirtileri sıralanmıştır (Cancerbackup, 2006).

- Memede kitle varlığı,
- Memenin portakal kabuğu şeklindeki görünümü,
- Meme başının normal durumdan içeriye doğru çekilmesi,
- Memenin başından akıntı gelmesi,
- Memenin derisinde yara, kızarıklık ve ödem oluşumu,
- Lenf bezlerinde şişlik olması,
- Kolda şişlik ve ödem oluşması (Matsui, 2002; Özdemir ve Çalışkan, 2002)

Erken tanı meme kanseri tedavisi için oldukça önemlidir. Amacı, kanseri belirleme metodlarına ve tedavi sonrası yapılan kontrollere bağlı olarak ölüm oranı azaltma olasılığının bulunması sebebiyledir (Siahpush ve Singh, 2002). Aynı zamanda erken teşhis edilmesi daha başarılı tedaviyi de beraberinde getirmektedir (Smith ve ark., 2003).

Tanı yöntemi olarak; Kendi kendine meme muayenesi, Klinik meme muayenesi ve mamografi bulunmaktadır (American Cancer Society, 2003; Özdemir ve Çalışkan, 2002). Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve ultrasonografi taraması yapılması da meme kanseri tanısında kullanılmaktadır (Smith ve ark., 2003). Düzenli şekilde kendi kendine meme muayenesi yapılması meme kanserinin erken teşhisine yardımcı olmaktadır (Strickland ve ark., 1997).KMM ile yanıtıcı olabilecek mamografi sonuçlarının insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin engellenebileceğinin farkına varılmıştır. Bundan dolayı düzenli yapılan klinik meme muayenesi ile meme kanserinin erken teşhis imkanının doğacağı belirtilmiştir (Tabar ve ark., 2002).

Mamografi memenin X-ışını aracılı görüntülenmesi olarak tanımlanır ve sonucunda memenin yapısını ortaya koyar (National Health Services-Breast Screening Programmes, 2008). Mamografinin avantajı, kanser olarak ifade edilebilecek meme değişimlerini, fiziksel semptomların ortaya çıkmasından önce belirleyebilmesidir (Beaton ve Schemitsch; 2003). Meme kanseri teşhisinde geliştirilen yeni yöntemin MBI (Molecular Breast Imaging) olduğu belirtilmiştir. Bu teknikte radyasyonun anormal hücrelere daha çok etki gösterdiği belirtilmiştir. Rochester'da Mayo klinikte bu yöntemin altı seneden beri kullanıldığı belirtilmiştir. Tümörler mamografide net görülemezken, MBI ile daha açıkça görülebilmektedir. Hem maliyet açısından uygun olması, hem de tümörlü hücrelerin net bir şekilde gözlenmesi sebebiyle avantajlı görülmüştür. Mamografiye göre daha çok radyasyona maruz kalınması da bu yöntemin dezavantajı olarak belirtilmiştir. Bu teknik kullanılarak teşhis edilen meme kanserinde, tümörün boyutunun küçük olacağı, bu sebeple tedavinin kolaylaşacağı, aynı zamanda metastaz riskinin de azalacağı belirtilmiştir (Ernst ve ark., 2002).

1.3.4.2. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanserli bireylerin tedavisinde sosyokültürel yapı., psikososyal çevre vb etkilidir. Bu bireyler desteklenmelidir. Hastalığın tıbbi tedavisi ile eş zamanlı psikolojik tedavi verilmelidir. Psikolojik desteği ortadan kaldırmak tedavinin etkisinde olumsuz sonuç oluşturabilir (Spiegel, 1997). Meme kanseri tedavisi için kullanılan yöntemler şöyle sıralanabilir:

1.3.4.2.1. Cerrahi tedavi

İki tür cerrahi tedavi şekli bulunmaktadır. Meme koruyucu cerrahiler kanserli dokunun çıkarıldığı fakat memenin şeklinin korunduğu ameliyatlardır. Mastektomi ise kanserli meme dokusunun tamamının ve yayılım gösterdiği lenf düğümlerinde birlikte alındığı ameliyat tekniğidir. (Kronowitz ve ark., 2006).

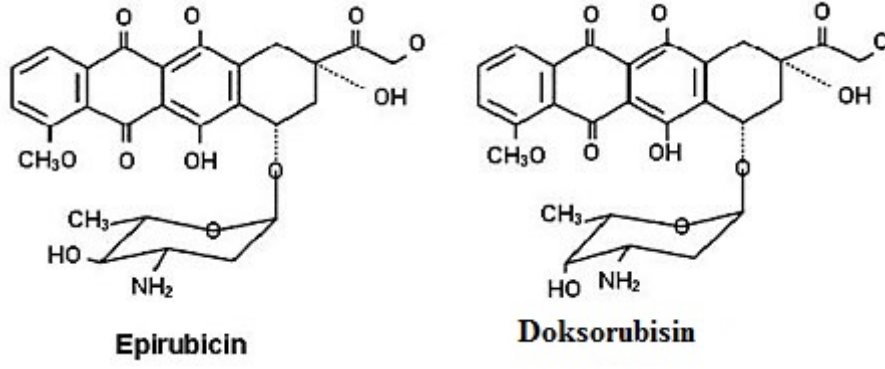
1.3.4.2.2. Radyoterapi

Yüksek enerjili X-ışınlarının meme ve koltuk altı bölgelerine uygulanması esasına dayanır. Cerrahi tedavi olduktan sonra kalmış olabilecek kanser hücrelerinin yok edilebilmesi için uygulanır. Tümörü küçültmek, kanserli hücreleri öldürmek amaçlı yapılır. Hastalarda sıklıkla kullanılan metod harici ışınlama tekniğidir. Lenflere yayılmış kanser hücreleri varsa ve yayılcı tümör 5 cm.'e ulaşmışsa tercih edilir (Lawrence ve ark., 2008).

1.3.4.2.3. Kemoterapi

Meme kanseri tümörü küçük bir bölgede değilse, yayılmışsa kullanılan yöntemdir. İki çeşittir: Adjuvan kemoterapi: cerrahi ameliyat sonrası koruma amaçlı yapılan tedavidir. Neoadjuvan kemoterapi ise 3. evre kanseri olan bireylerde kitlenin küçültülüp ve cerrahiye uygun hale getirilip ameliyatın kolaylaştırılması amacıyla uygulanır. Kullanılan ajanlar belli başlıklar altında toplanabilir.

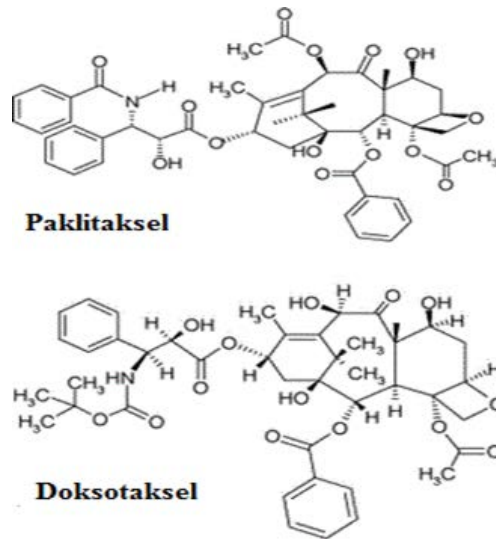
Doksorubisin veya Epirubisin: Doksorubisin mantarlardan elde edilen bir antrasiklin türevi antibiyotiktir. Antrasiklinler DNA ve RNA sentezini inhibe edip replikasyonu engelleyerek kanser hücrelerinin proliferesini durdurur.. Doksorubisinin etki mekanizması net anlaşılmamış olmakla birlikte enterkalasyon yoluyla DNA ile etkileştiği ve DNA sentezini etkilediği bilinmektedir (Şekil 17). Topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA 'nın iki sarmalının birleşmesini engelleyerek görevini yapar (Fornari ve ark. ,1994).



Şekil 17. Doksorubisin ve epirubisinin kimyasal şekilleri (www.medscape.org).

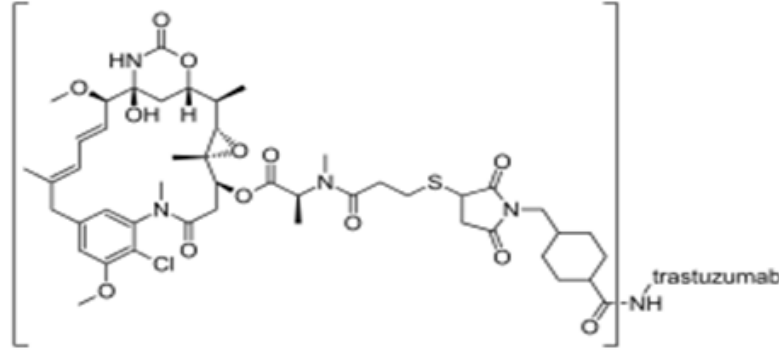
Siklofosamid, 5-FloroUrasil, Metoterxate (CMF terapi): . 5 FU kanser hücrelerinde bulunan thymidilate sentetaz adı verilen enzime bağlanarak hücreler üzerinde etkisini gösterir toksik bir ilaçtır. Bu kombinasyonların yerlerini antrasiklinler almıştır (Hoff ve ark., 2001).

Paclitaxel ve Doksitaksel: Dosetaksel mikrotübül sitotoksik taksandır. Taksanların ilave olduğu kombinasyonların lenf nodu pozitif kanserli hastalarda daha etkin olduğu saptanmıştır. Doksitaksel yapısı mikrotübüllere bağlanarak etkisini gösterir. Bu bağlanma ile kalsiyum depolimerazasyonunu engeller (Yvon ve ark., 1999). Ayrıca onkoprotein olan Bcl-2 üzerine de fosforilasyonla etki edip hücreyi apoptoza götürür. Bu ilaçların etkisine dair çalışmalar halâ devam etmektedir. Taksanlar vinka alkololid yapıları gibi antimitotik ajanlardır. (ZIOPHARM Oncology,2009) (Şekil 18).



Şekil 18. Paklitaksel ve oksotakselin kimyasal gösterimi (pubs.rsc.org).

Trastuzumab (Herceptin): HER2 proteini pozitif olan bireylerde kullanılan ajandır (Şekil 19). Erken saptanan meme kanseri olan ve metastatik kanserli kişilerde de kullanımı mevcuttur. HER2 reseptörüne yüksek afinite ile bağlanarak , reseptör yıkımını hızlandırarak ,anjiyogenezi inhibe ederek işlev göstermektedir.. Son yıllarda meme kanseri hastalarında kullanılan bu ilaç umut vaad eden sonuçlar vermektedir (Vogel ve ark., 2002).



Şekil 19. Trastuzumab yapısı (Patent no: WO 2005051424 A1).

1.3.4.2.4. Hormon tedavisi

Bu tedavinin amacı; östrojen hormonunun salınmasını engelleyerek meme kanseri hücrelerinin büyümesinin engellenmesidir. Hormonal tedavi yapısında hormon reseptörü içeren tümörlerde etkili olmaktadır. Bazı meme kanseri hücreleri östrojene duyarlı olduğundan östrojen hormonu kanser hücrelerinin hacimce artmalarına ve proliferasyonuna sebep olmaktadır. Bunun içinde hormon azaltımı tedavisi veya östrojen biyosentezini engelleyen aromataz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu terapi modelleri meme kanserlerinin yaklaşık 2/3'ünü oluşturan hormona duysuz, ya da başlangıç evresinde hormona cevap veren fakat daha sonraki evrede cevap vermeyen tümörlerin tedavisinde etkisiz olmaktadır. Diğer tedaviyi güçleştiren durum cevapsızlık mekanizmasıdır. İlaça baştan duysuz veya hastalık süresince edinilen direnç mekanizmasının moleküler düzeyde her hasta için modellenmesinin mortaliteyi düşüreceği düşünülmektedir. Bu nedenle moleküler mekanizmaların daha detaylı tanımlanması, yeni terapotik hedeflerin gösterilmesi önem taşımaktadır. Metastaza uğramış meme kanseri üzerine birçok tedavi geliştirilmiş olmasına rağmen sağ kalım oranının 2 yıl olması sebebiyle hedefe yönelik tedaviler geliştirilmiştir. İlk hedefe yönelik tedavilerde Tamoksifen ve aromataz inhibitörleri kullanılarak östrojen/progesteron reseptörleriyle (ER/PR) düzenlenen büyüme sinyallerine yönelik olmuştur (Smith ve ark., 2003).

1.4.SEROTONİN VE KANSER İLİŞKİSİ

Serotonin karsinoidlerde, karsinomalarda ve diğer tümör hücrelerinde büyüme tetikleyici etkilere sahiptir. Aynı zamanda serotoninin kanser hücrelerinin göçü ve metastazındaki rolüyle de alakalı datalar mevcuttur. Serum serotonin seviyelerinin mesane kanserinde, renal hücre karsinomunda, prostat adenokarsinomunda prognoz için kullanılabileceği düşünülmektedir. Bazı durumlarda serotonin reseptörü antagonistlerinin kanser hücrelerinin büyümesini başarılı bir şekilde inhibe ettiği de saptanmış olup serotonin reseptörü aracılı farmakoterapinin uygunluğu tartışılmaktadır. Bunlarla beraber SERT' in seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) olan bazı antidepresanlarla inhibisyonu ve serotonin sentezinin düzenlenmesi bize terapötik bir strateji sunabilecektir (Sarrouilhe ve ark., 2015).

1.4.1. Damar düzeni, Anjiyogenez ve Metastazla İlişkisi

Serotoninin kan damarlarındaki kompleks rolü birçok farklı reseptörle etkileşimi sonucunda meydana gelir. Serotoninin bağımlı vazokonstriksiyon düz kas hücrelerinde 5-HT1B, 1D ve 5-HT2A reseptörlerinin aktivasyonuna bağımlı endotel hücrelerinde serotonine bağımlı vazodilatasyon 5-HT2B reseptör alt tipiyle ilişkilidir (Watts ve Davis, 2011). Subkütanöz olarak Balb/ C farelere verilmiş MethA fibrosarkomasında yapılan gözlemler doğrultusunda farelerin 5-HT1A,1B ve 5-HT2A spesifik agonistlerine yüksek derecede hassasiyet gösterdiği görülmüştür. Tümörü besleyen kan damarlarında serotonin ve serotonin agonistlerinin vazokonstriktif etkileri arteriyollerin kontrolünde ve böylece spesifik olarak tümör kan akışının düzenlenmesiyle değişen malignant büyümenin azaltılmasında oldukça etkilidir (Stücker ve ark., 1997).

Serotonin aynı zamanda subkutanöz olarak insan kolon adenokarsinoması ksenotransplante edilmiş atimik farelerde tümör arteriyollerinin büzülmesini sağlayarak tümör büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Lübbe ve Huhnt, 1994). Yapılan diğer bir çalışmada serotoninin yüksek dozajlarının küçük hücreli akciğer kanseri grafiti olan atimik farelerde tümör büyümesini tetiklediği görülürken, düşük dozda tümör büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır. Bu makalenin yazarları yüksek dozda serotoninin tümör hücrelerinde direk mitojenik etkiye sahip olduğunu; düşük dozda ise bağlandığı farklı reseptörler aracılığıyla tümörün damar düzenine etki ederek tümör büyümesini azaltabileceğini belirtmişlerdir (Vicaut ve ark., 2000).

Birçok farklı serotonin reseptörü tümörleri besleyen kan damarlarında lokalizasyon göstermektedir. 5-HT1D ve 5-HT2B reseptörleri hem benign hem malign tümör dokularındaki vasküler endotel hücrelerinde yüksek ekspresyon göstermektedir (Dizeyi ve ark., 2005). Meme kanseri hasta örneklerinin immunohistokimyasal analizlerine bakıldığında özellikle duktal adenokarsinoma tipinde 5-HT1A ve 5-HT2B reseptörlerinin kan damarlarıyla ilişkili malignant ve malignant olmayan hücrelerde ekspresyonu saptanmıştır (Kopparapu ve ark., 2013).

Anjiyogenez, tümörün ilerlemesi ve metastazına öncülük eden, malign hücelere oksijen ve besin sağlamada yeni damarların oluşumunu sağlamak gibi önemli bir işlev üstlenen etkin bir metabolik süreçtir. Serotonin fizyolojik konsantrasyonlarda VEGF gibi bir potansiyel angiokin olarak görev görmekte ve anjiyogenezi tetiklemektedir. Plateletlerin agregasyonu ve kanın koagülasyonu tümör mikroçevresinde sık görülen olaylardandır. Tümörün trombotik çevresinde platelet agregasyonu serotoninin salınımına öncülük eder ve bu da anjiyogenez sürecine etki ederek tümörün büyümesine neden olur (Zamani ve Qu, 2012).

in vivoda kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonuna serotoninin nasıl etki ettiğini görmek için yapılan bir çalışmada, CNS dışında serotonin eksikliği olan bir genetik fare modeli kullanılmıştır. Fare kolon karsinomu MC-38 hücreleri Tph^{-/-} hücelere allograft yapıldığında tümör hacminin 14 günün ardından kayda değer şekilde azaldığı görülmüştür (Sarrouilhe ve ark., 2015). Allograft edilmiş Lewis akciğerkarsinoma hücre proliferasyonu göz önünde bulundurulduğunda serotonin bağlı hücresel etkilerin tekrar edilebilir olduğu ortaya çıkmıştır. Bu veriler ışığında serotoninin in vivodaki tümör büyümesinde anahtar bir düzenleyici olduğu çıkarımı yapılmıştır. Bu etki serotoninin hücre proliferasyonunu artırma etkisinden çok tümörün damar düzenini değiştirmesiyle alakalı olduğu da deneyler sonucunda ortaya çıkan diğer bir hipotezdir. Tümörden infiltre olmuş makrofajlarda kullanılarak oluşturulan fare tümör modellerinde serotoninin MMP12 ekspresyonunu baskılayarak anjiyogenezi pozitif olarak düzenlediği açığa çıkmıştır. Serotonin bu modelde anjiyogenez baskılayıcısı olan angiostatin ekspresyonunu baskılamaktadır (Nocito ve ark., 2008). Serotonin seviyesinin azalmasının in vivoda tümör büyümesine etkisi serotonin taşıyıcı 5-HTT susturulmuş fareler (5-HTT^{-/-}) çalışılarak saptanmaya çalışılmıştır. Lewis akciğer karsinomu hücreleri, KLN205 akciğer skuamöz karsinoma hücreleri veya B16F10 melanoma hücreleri bu fare modeline engraft edilmiş ve sonuçlar 5-HTT^{+/+} farelerle karşılaştırılmıştır. Tümör büyümesi ve serotonin seviyeleri 5-HTT^{-/-} farelerde 5-HTT^{+/+} farelere göre kayda değer şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar ışığında serotonin seviyelerinin tümör içerisindeki malignant hücrelerin büyümesinde

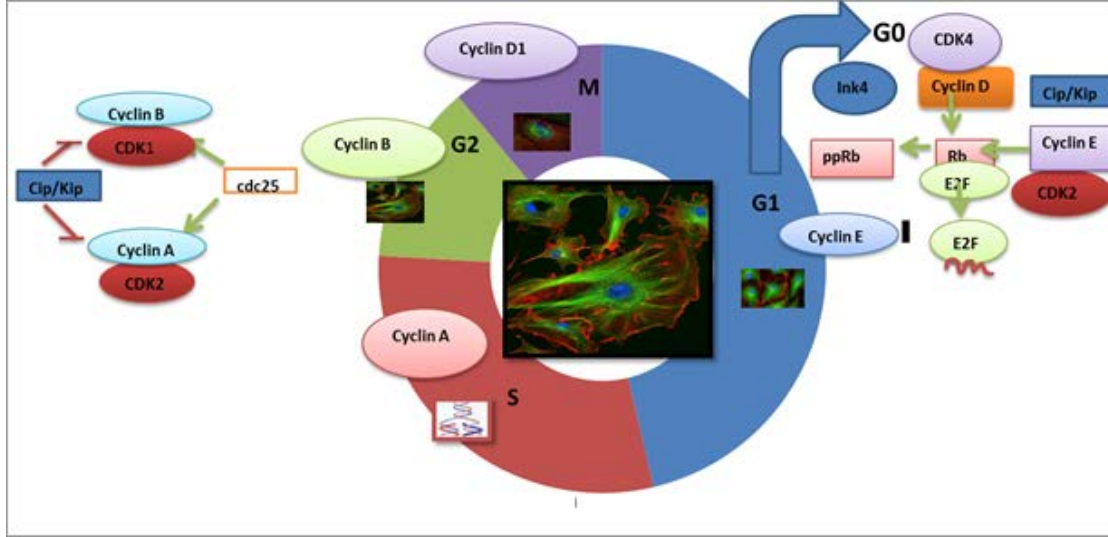
kritik roller oynadığı açığa çıkmıştır. Serotoninin fizyolojik seviyelerinin tümördeki hücrelerin malignan olarak büyüebilmesi için elzem olduğu da saptanmıştır (Sarrouilhe ve ark., 2015).

Bununla beraber serotoninin azalmasının tümörlere oksijen ve besin sağlayan damarlarda vazodilatasyonuna katkı sağlayabileceği de öne sürülmüştür. 5-HT_{2B} reseptörünün SB204741 tarafından inhibe edilmesi implante edilmiş akciğer kanseri tümörlerinin büyümesini azaltmıştır. Bu azalmanın anjiyogenezin baskılanması ve ERK1/2 ve endotelial NOS' un inhibisyonuyla ilişkili olduğu da saptanmıştır. Öncül sonuçları HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hücrelerinde alınan sonuçlarla örtüşmektedir (Asada ve ark., 2010).

Kültüre alınmış HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hücrelerini temel alarak yapılan in vitro anjiyogenez modeli çalışmalarda seçici 5-HT₄ reseptör agonisti mosapride sitratın antianjiyogenik aktivitesinin saptanması sonucunda, bu kimyasalın olası antikanser ajan olarak kullanımına yol açabileceği saptanmıştır (Nishikawa ve ark., 2010).

1.4.2. Hücre döngüsü ve PI3K yolağı ile ilişkisi

Hücre bölünmesinin doğru bir şekilde sağlanabilmesi için, hücre döngüsü birçok mekanizma tarafından kontrol edilmekte olup, bu mekanizmalar siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK), CDK inhibitörleri ve fosforilasyon olayları ile sağlanmaktadır. CDKlar kendi başlarına inaktif olup, kendilerine özgü siklinlere bağlandıklarında aktifleşir. Hücre devri G₁, S, G₂ ve mitoz fazlarından oluşmaktadır ve hücre döngüsünün farklı fazlarında farklı siklin/CDK komplekslerinin etkinliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Üç farklı D tip siklin (siklin D₁, siklin D₂ ve siklin D₃), CDK4 ve CDK6 proteinlerine bağlanma kapasitesine sahip olup, oluşturdukları CDK/siklin kompleksleri tarafından G₁ fazına giriş sağlanmaktadır. Diğer siklinlerden farklı olarak, siklin D periyodik bir şekilde ifade edilmemekte, ancak büyüme faktörü tarafından uyarılmasına bağlı olarak sentezi gözlenmektedir. G₁ fazında rol alan diğer bir siklin olan, siklin E CDK2 ile etkileşim göstererek, G₁ fazından S fazına geçişi düzenlemektedir. Siklin A CDK2'ye bağlanabilmekte olup, bu birliktelik S fazı boyunca etkisini sürdürmektedir. Ayrıca geç G₂ fazı ve erken M fazında siklin A proteininin, CDK1 ile oluşturduğu kompleks M fazına girişi desteklemektedir. Mitoza girişin sağlanmasının ardından, mitoz evresinin düzenlenmesi, siklin B/CDK1 kompleksleri tarafından sağlanmaktadır (Şekil 20).



Şekil 20. Hücre döngüsü (Gaurisankar ve Das, 2008' den modifiye edilmiştir).

CDK aktivitesinin düzenlenmesinde, siklinlerle etkileşiminin yanı sıra, CDK moleküllerinin korunmuş treonin ve tirozin residülerinin fosforilasyonu da rol almaktadır. CDK1 aktivasyonunun tamamen sağlanması için, treonin 161 residüsünün CDK7/siklin H kompleksi (CAK) tarafından fosforilasyonu gerekirken, CDK4 treonin 172 ve CDK2 treonin 160 residülerinde fosforilasyona ihtiyaç duymaktadır. Bu bölgelerde fosforilasyona uğrayan kinazlarda gözlenen konformasyonel değişimlere bağlı olarak, sikline bağlanma kapasiteleri artmakta ve aktiviteleri tamamen sağlanmaktadır. Bunların yanı sıra, CDK1 aktivitesinin, Wee1 ve Myt1 kinazları tarafından, tirozin 15 ve treonin 14 residülerinde fosforilasyonuna bağlı olarak inhibe edildiği bilinmekte olup, fosforilasyona uğramış bu bölgelerin Cdc25 fosfatazları tarafından defosforilasyonu, CDK1 aktivasyonu için gerekmektedir.

CDK aktivitesi, CDK inhibitörleri (CDI) olarak adlandırılan hücre devri inhibitör proteinleri (p15, p18, p19, p21, P27) tarafından etkisiz hale getirilebilmekte olup, CDK inhibitörleri sadece CDK'ya bağlanabildiği gibi CDK-siklin kompleksleri ile etkileşime geçerek de etkisini gösterebilmektedir. INK4 ve CIP/KIP ailesi olmak üzere, iki farklı CDK inhibitör ailesi belirlenmiştir. Sikline bağımlı kinaz inhibitörleri, hem hücre içi hem de hücre dışı kaynaklı sinyallere bağlı olarak düzenlenmektedir. p53 tümör baskılayıcı geninin transkripsiyonel kontrolüne bağlı olarak p21 inhibitörlerinin anlatımı gözlenmekte olup, p21 gen promotor bölgesi p53 bağlanma bölgesi içermekte ve böylelikle p53 transkripsiyonuna bağlı olarak p21 genini aktive edebilmektedir. Ayrıca p15 ve p27 inhibitörlerinin anlatımı ve aktivasyonu

dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β)'ya cevap olarak artmakta ve büyümenin durdurulmasına katkı sağlamaktadır (Vermeulen ve ark., 2003).

Rb hücre bölünmesi ve farklılaşmasında anahtardır. Terminal farklılaşmasını bitirmiş, dinlenme halindeki ya da yaşlı hücrelerde Rb eksprese edilip defosforile halde bulunur. pRb'nin görevi hücre döngüsünü, proliferasyonu G1/S kontrol noktasında durdurmaktır. Rb'nin bu inhibitör etkisi E2F ailesini bağlayarak (dolayısıyla inaktifleştirerek) gerçekleşir. E2F ailesinin inaktif hale gelmesi ile hücre S fazına ilerleyemeyeceğinden siklus durur. Diğer yandan G0'daki ("quiescence") hücre bölünme sinyali almışsa Rb'nin G1 fazı süresince hipofosforile formu G1/S kontrol noktasında, G1/S CDK'ların etkisiyle fosforillenir ve M fazına kadar fosforile halde kalır. Fosforile haldeki pRb artık E2F ailesi proteinlerini bağlayamaz ve E2F ailesi pRb'den ayrılır. Böylece hücre S fazına girer. E2F ailesi ise etkisini S fazına girişi sağlayan DNA polimeraz α , my, ve timidin kinaz gibi proteinlerin ilgili genlerini aktive ederek gösterir. CDK'ların aktivitesi yada inhibesi pRb ve E2F üzerinden hücre siklusunun durumunu değiştirir. CDK'larca fosforillenmiş substratların hipofosforile durumlarına dönüşü fosfatazların da etkisiyle oluşur (Gaurisankar ve Das, 2008; Ulukaya, 2001), (Şekil 20)

Akt (protein kinaz B) Akt1 ve Akt2 genleri aracılığı ile kodlanır ve Serin/treonin kinaz ailesindedir. Hüresel işlev olarak apoptoz, proliferasyon, transkripsiyon ,hücre döngüsü gibi süreçlerde fazlasiyla roller alır. Akt'ın aktif olması PI3K tarafından fosforile edilmesiyle gerçekleşir. Bazı GPCRlar ya da TrkBlerin uyarımı fosfotidil inositol sinyal yolağı üzerinden PI3K aktivitesini arttırıp Akt'ın fosforilasyonu ile beraber aktivasyonunu sağlar. Diğer yandan Akt proteinin PI3K yolağı üzerinden GSK-3 inhibesine zıt yönde işleyen β -arrestine bağlı farklı bir yolda işlev göstererek aktivitesinin inhibe olmasıyla GSK-3'ün aşırı aktifleşmesine sebebiyet verir (Şahin ve ark., 2014).

İnhibitör GPCRlar ve TrkB reseptörlerinin uyarımı PI3K/Akt yolağının uyarılması ile sonuçlanır. Reseptör uyarımı fosfoinositol yolağını kullanarak PI3K aracılı Akt fosforilasyonu ve aktivesini sağlamakta, aktifleşen Akt ise kinaz aktivitesiyle GSK-3'ü N-terminalindeki Ser kalıntısı üzerinden fosforlayarak inaktif hale getirmektedir. İnhibitör GPCR yapılarından olan 5-HT1A reseptörlerinin faaliyetlerini arttırarak PI3K/Akt yolağı aracılı GSK-3 inhibisyonuna sebep olduğu da kanıtlanmıştır (Jope ve Roh, 2006).

1.5.SEROTONİN VE MEME KANSERİ

Dünya çapında kadınlar arasında en yaygın tip olan meme kanserinin prognozu için belirlenmiş markırların sayısı oldukça azdır. Bu nedenle tanı ve prognozda mevcut metotların geliştirilebilmesi için yeni parametrelerin eklenmesi bu alanda çalışılan önemli konulardan bir tanesidir. Serotoninin meme bezi gelişimindeki rolü açıktır. Gebelik boyunca, laktasyon ve involüsyon sürecinde epitelyal homeostasinin düzenlenmesinde lokal düzenleyici olarak serotonin önemli işlevler üstlenir. Epitelyal homeostatik dengenin meme bezine bozulması meme kanserinin başlangıcı ve ilerlemesiyle ilişkilendirilmektedir (Sarrouilhe ve ark., 2015). Serotonin neoplastik meme hücrelerinin büyümesini 5-HT_{2A} reseptörleri aracılığıyla tetiklemektedir. Bu gözlem insan meme adenokarsinoması MCF-7 hücre hattının plazma membranında bu reseptörün lokalize olduğunu ve bu hücrelerde eksprese olduğunu görülmesiyle saptanmıştır. Bu hücrelerde serotonin ve seçici 5-HT_{2A} reseptör agonisti DOI hücrelerin büyümesini maksimum etkisi 10⁻⁵ M dozda olacak şekilde uyarmaktadır (Sonier ve ark., 2006).

Meme bezinde serotonin sinyalinin değişmesi sonucu epitelin yanlış düzenlenmesi meme kanseri fenotipi oluşumuna da sebep olmaktadır. Tümörün ilerlemesi, TPH1 ifadesini arttırmaktadır; yani serotoninin biyosentetik kapasitesi artış göstermektedir. Sonucunda ise serotonin reseptör paterni yanlış düzenlenmekte ve ilişkili yolaklar değişme göstererek proliferasyon tetiklenmekte ve apoptoza direnç oluşmaktadır (Pai ve ark., 2009). Meme kanserli 102 hastanın örneklerinin immunohistokimyasına bakıldığında özellikle duktal adenokarsinoma örnekleri de doku mikroarrayleri halinde incelendiğinde 5-HT_{1A}'nın plazma membranında lokalize olduğu saptanmıştır. Malignant olmayan örneklerdeyse bu reseptörün yalnızca sitoplazma da varlığı gösterilmiştir. 5-HT_{1B} ve 2B ekspresyonunun malignant ve malignant olmayan hücrelerde oldukça farklı olduğu görülmüştür (Kopparappu ve ark., 2013).

SSRI ilaçlar seçici serotonin geri alım inhibitörleri olup meme kanserini takip eden depresyonları da tedavi edebilme amacıyla kullanılan depresyon ilacı tipleridir. Diğer yandan bu ilaçların hayvanlarda ve insanlarda kanseri tetikleyebileceği de saptanmıştır; fakat çalışmada 1-2 yıllık antidepressan kullanımıyla meme kanserinin gelişmesi arasında ilişki kurabilecek meta analiz eksikliği vardır (Eom ve ark., 2012). Diğer yandan bazı çalışmalarda ise SSRI fluoxetine in anti karsinojenik etkisi olabileceği ve meme karsinomlarının tedavisinde de potansiyel olabileceği belirtilmiştir (Zhou ve ark., 2012).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.MATERYALLER

2.1.1. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan materyaller Ek A'da yer almaktadır.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Kullanılan cihazlar Ek B'de yer almaktadır. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Ek C'de yer almaktadır.

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler Ek D'de yer almaktadır.

2.2.YÖNTEM

2.2.1. Hücre Kültürü

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri (ATCC No; HTB 22 ve HTB 26), DMEM besiyerinde % 10 sığır fetüs serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısıyla % 5 CO₂ içeren 370C şartlarını sağlayan hücre inkübatöründe (Hera Cell 150i, Thermo) büyütülmüştür.

2.2.2. MTT Hücre Canlılık Testi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi uygulanarak; serotoninin değişik konsantrasyonlarda hücrelere uygulanması sonucunda hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, 1X10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarına MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri (ATCC No; HTB 22 ve HTB 26), ekildikten sonra gece boyu yapışmaları beklenmiştir. Hücrelere 0-100 µM serotonin 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. MTT tetrazolium tuzuyla 4 saat bekletildikten sonra oluşan kesilmiş formazan bileşikleri, canlı hücrelerin hücre yüzeyinde birikir. Bu nedenle spektrofotometrik okuma sonucunda ilaç uygulanmamış kontrol örneklere oranlama yapılarak serotoninin hücre canlılığı üzerine etkileri belirlenmektedir.

2.2.3. Tripan Mavisi Testi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. MTT canlılık testiyle belirlenen dozda (50 μ M) uygulanan serotoninle; 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca bekletilmiştir. Belirlenen bu zaman dilimlerine göre her 24 saatte bir olacak şekilde hücrelerin sayımı yapılmıştır. Bu amaçla önce örnekler 1X PBS ile yıkanmış ve Tripsin-EDTA muamelesiyle kaldırılmıştır. 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilen hücrelerin üzerine 50 μ l 0.4 % (w/v) Tripan Mavisi ve 50 μ l DMEM eklenmiştir. Homojenize edilen bu karışımdan 10 μ l çekilerek Neubauer hemositometresinde her iki hücre hattında 2 tekrarlı sayımları gerçekleştirilmiştir. Her bir deney en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve biyolojik tekrarları sağlamak amacı ile ayrı hücre kültürü petrilерinde deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.4. Floresan İndikatörler Aracılığıyla Hücre Ölümü ve Asidik Vakuollerin belirlenmesi

5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ekildikten sonra, gece boyu petriye yapışmaları için hücreler inkübatörde bekletilmişlerdir. Hücreler uygun dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra PI (Propidium İyodür), AO (Akridin Turuncusu), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) floresan boya ları uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

2.2.5. Klonojenik Metod

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 6×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 6 mm çaplı hücre kültürü kaplarına ekilmişlerdir. 24 ve 48 saat boyunca serotonin ile muamele edildikten sonra ilaçlı besi yeri ortamdan çekilip, yerine ilaçsız besiyeri verilmiştir. Hücreler 14 gün boyunca 37 °C % 5 CO₂ ve % 95 nem ortamı olan hücre büyütme etüvünde inkübe edilip, büyümeleri kontrol edilmiştir. 14 gün sonra MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri uygun ortamda ilk önce 1x PBS çözeltisi ile yıkanmış ardından her bir hücre kültürü kabına 1: 3 oranında 750 μ l amonyum asetat/metanol karışımı ilave edilerek 8 dakika boyunca hücrelerin sabitlenmesi sağlanmıştır. 8 dakikanın ardından sabitleme solüsyonu ortamdan uzaklaştırılıp, hücre kültürü kaplarına kuyu başına 1ml olacak şekilde kristal viyole boyası eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Hücrelerin boya ile muamele edilmesinin ardından görüntüleri alınmıştır.

2.2.6. İmmunoblotlama Yöntemi ile Çeşitli Sinyal Yolaklarında Rol Alan Proteinlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Total protein izolasyonu için 5×10^5 hücre her kuyuda olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere hücreler ekilmiştir. Serotonin için seçilen dozun uygulanmasını takiben hücrelerden toplam protein içeriği elde edilmiştir. Bu amaçla, hücre özütleme tamponu (% 1 nonidet p40, % 0.5 deoxycholate, % 0.1 SDS, 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , taze eklenmek üzere 1 mM PMSF, 1 mM DTT ve 40 μl proteaz inhibitör) içerisine alınan hücreler, 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 30 dakika 13200 rpm'de 4°C 'de santrifüjlenen örneklerin üst sıvısı yeni bir tüpe alınarak -80°C 'de saklanmıştır. Bradford yöntemi ile BSA standartları üzerinden çizilen standart grafiğe göre miktarları ölçülmüştür (Biorad, Bradford çözeltisi). Toplam protein özütleri, 595 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak tespit edildiler. Western immunoblotlama yöntemi için her bir örnekten alınan protein miktarı 30 μg olacak şekilde eşitlenmiştir. Yükleme tamponu 2X (Sigma) ve 30 μg protein örnekleri 1: 1 oranında karıştırılarak 95°C ' de 5 dakika tutulmuştur ve %12 ve % 15 sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS- PAGE) hazırlanmıştır. Örnekler protein belirteçler ile birlikte 75 Volt'da 2,5 saat SDS içeren yürütme tamponunda yürütülmüştür. Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transfer tamponu aracılığıyla TransBlot Turbo aracılığıyla transfer edildikten sonra yağsız süt tozu ile 2 saat oda sıcaklığında 3D orbital rotatorda çevrilmiştir (100 ml %1 Tween20 içeren Tris Tuz Solüsyonu için 5g süt tozu). 5'er dakikalık üç kez TBS- T ile yıkama sonrasında 1: 1000 metastatik yolak örnekleme antikor kiti (Cell signalling technology) antikorları ile immunoblotlaması yapılarak metastatik belirteçler yönünden taranmıştır. Uygun anti-rabbit veya anti- Mouse antikor (Cell signalling technology, 1: 3000) uygulamasının ardından 15' er dakikalık TBS- T ile iki kez yıkama ve 15 dakikalık TBS ile yıkama sonrasında örnekler oda sıcaklığındaki kemiluminesans madde ile 1 dakika boyunca muamele edilmiştir. Kemiluminesans ışınlar, ChemiDoc™ Imaging System, Bio-Rad ile görüntülenmiştir. Sonuçlar β -Actin, β -Tubulin, GAPDH yükleme kontrolleri ile karşılaştırılarak tartışılmıştır. Her bir deney en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve biyolojik tekrarları sağlamak amacı ile ayrı hücre kültürü petrilinde deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. İmmünoblat sonuçlarının densitometrik analizleri için Adobe C3 Photoshop programı kullanılmıştır ve bütün protein miktarları loading kontrol proteinlerine (β -aktin ve β -tubulin) göre ölçülmüştür.

2.2.7. Soft Agar Koloni Oluşum Testi

Serotonin uygulamasının, MCF7 ve MDA MB 231 hücrelerinin yumuşak agarda koloni oluşturmasını nasıl etkilediğini belirlemek için ilk önce %5' lik agaroz (0,1 gram agaroz+20ml

1xPBS) hazırlanıp otoklavda steril edilmiştir. Alt agar için 500µl %5'lik agaroz ile 500 µl %20 FBS içeren DMEM besiyeri karıştırılmış ve 6 kuyucuklu petriye her kuyuda 1ml olacak şekilde dökülmüştür. Agar donana kadar laminar flow içerisinde bekletilmiştir. %5'lik agar %3'lük agara seyreltilmiştir (1200µl %5'lik agaroz+800µl 1xPBS) %3'lük agaroz %20 FBS içeren besiyeri ile karıştırılıp pipetaj yapılmıştır. Üzerine 333µl %10 FBS içeren besiyeri+ 2500 hücre karışımı eklenip pipetaj yapılmış ve petrilere dökülmüştür. İlaçlı örnekler için bu karışımın üzerine ilaç eklenmiştir. 10 gün boyunca 37°C'de %5 CO2'li ortamda bekletilmiştir. 10 gün sonunda koloniler ışık mikroskopunda incelenmiştir.

2.2.8. Akım Sitometrisi Analizi

2.2.8.1. Hücrelerin Hazırlanması

5x10⁵ adet MCF7 ve MDA MB 231 hücresi 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek, bir gece boyunca 37°C'de %5'lik CO2'li etüvde tutulmuşlardır. Petri kabının dibine yapışan hücelere serotonin uygulaması hücre döngüsünü üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Hücre membranının dışına çıkarak bölge değişikliği yapan fosfatidilserinlerin tayini için kullanılan anneksin V ve ölü hücrelerin belirlenmesi için kullanılan PI boyaması yapılmıştır. Belirtilen zaman diliminde serotonin uygulamasını takiben hem yüzen hücreler hem de tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj edilip, akım sitometrisi için hücreler hazırlanmıştır.

2.2.8.2. Akım Sitometrisinde Apoptotik Hücre Ölümünün Anneksin V ve Propidyum İyodür Boyaması ile Belirlenmesi

Apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde anneksin V-PI boyama ile tespit edilmiştir. Protokol üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Santrifüj edilen hücreler 500 µl anneksin V bağlama tamponu içinde karıştırıldıktan sonra, 5 µl annexin V-FITC ve 5 µl PI (50µg/ml) ile 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin sonrasında akım sitometrisinde ölçümü gerçekleştirilmiştir. Örnek başına 10000 hücre, akım sitometrisi tarafından analiz edilmiştir. Anneksin V floresansı absiste, PI floresansı ordinatta olmak üzere hücreler noktalar halinde dörtgen bölümlü grafikte sunulmuştur. Bu dörtgen grafiğin her bir bölmesindeki rakamlar hücre popülasyonunun % değerini temsil etmektedir. Grafiğin her bir bölmesi sırasıyla: alt sol: canlı; alt sağ: erken apoptotik; üst sağ: geç apoptotik; üst sol: nekrotik hücre popülasyonlarını işaret etmektedir. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences ve Flow Jo programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.8.3. Hücre Döngüsünün Akım Sitometrisi Kullanılarak İncelenmesi

Tripsin- EDTA uygulaması sonrası santrifüj edilen hücreler 1 ml %70 etanol ile fikse edilerek, 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 3 dakika boyunca 13200 rpm'de santrifüj edilen hücreler etanolden uzaklaştırılmıştır. Her bir örneğin üzerine 980µl PBS, 10µ PI ve 10µl RNaz A eklenerek 30 dakika boyunca 37 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Örnek başına 10000 hücre akım sitometrisinde incelenmiştir. PI floresansı sunulan grafikte absis ekseninde verilmiştir. Bu grafiğe göre DNA miktarı, hücre devrinin G1, S, G2 ve M evrelerinde değiştiği için, ilk pik 2n sayıda DNA içeren ve hücre devrinin G1 fazındaki hücreleri, plato bölümü DNA sayısı artmaya başlayan S fazındaki hücreleri, 2. pik DNA sayısı 4n'e çıkmış G2 evresindeki hücreleri göstermektedir. G1 fazından önceki evre ise DNA kırıkları bulunduran apoptotik hücrelerin yer aldığı subG1 fazı olarak bilinmektedir. Veri analizi BD C6 Biosciences ve Flow Jo programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

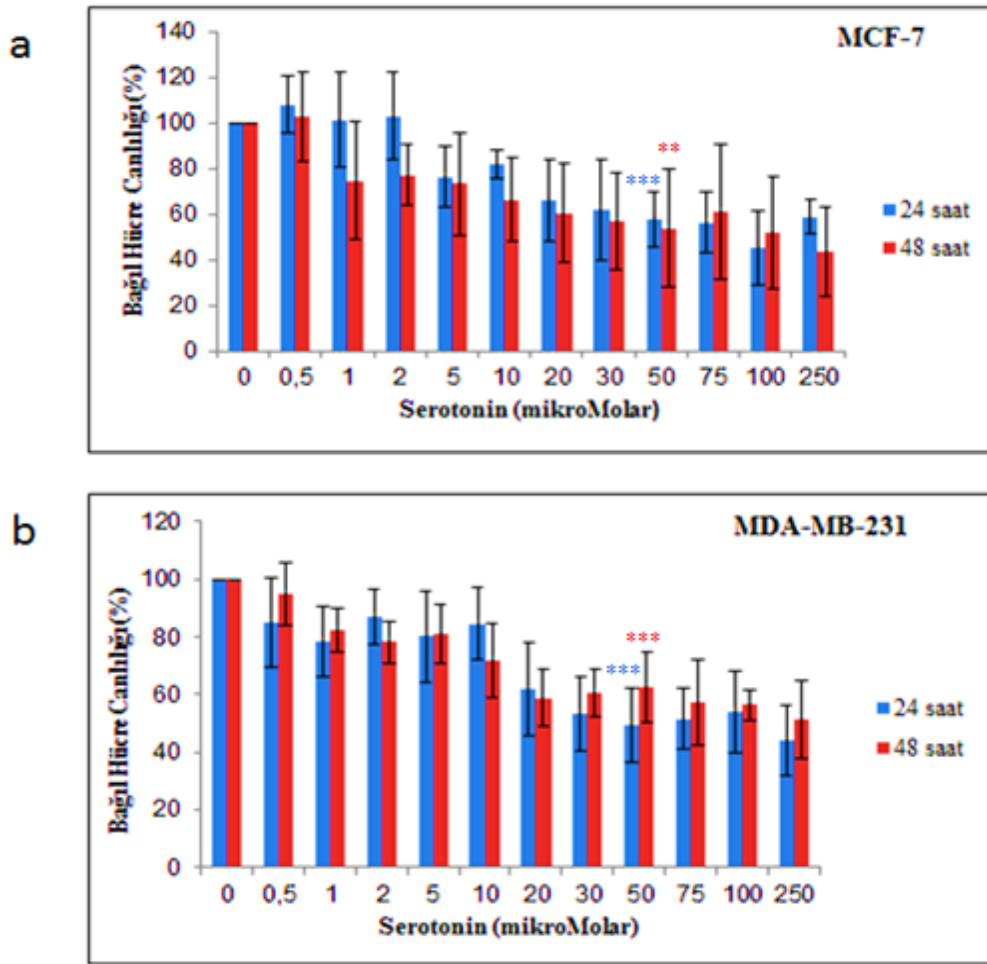
2.2.9. Veri Toplama ve analizi

Biyolojik tekrarlar arasındaki farklar deney sonuçlarının matematiksel ortalaması alındıktan sonra ifade edilecek ve standart sapma değeri ile birlikte sunulacaktır. İlaç uygulamasının; uygulanmamış olan kontrol örneklere göre farklılıkları t testi uygulanarak ifade edilmiş ve 0,05'lik anlam seviyesinde p değeri hesaplanmıştır.

3. SONUÇLAR

3.1. Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığına Etkisinin Gösterilmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında serotoninin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi yapılmıştır. 10×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücrelerin DMEM besiyerinde %5 CO² içeren 37°C' lik etüvde gece boyu yapışmaları beklendikten sonra, hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda (0,5-250 µM) serotonin uygulanmıştır. Serotoninin hücreler üzerindeki toksisitesinin zamana bağlı değişimini de incelemek için hücreler 24 ve 48 saat boyunca serotonine maruz bırakılmıştır.

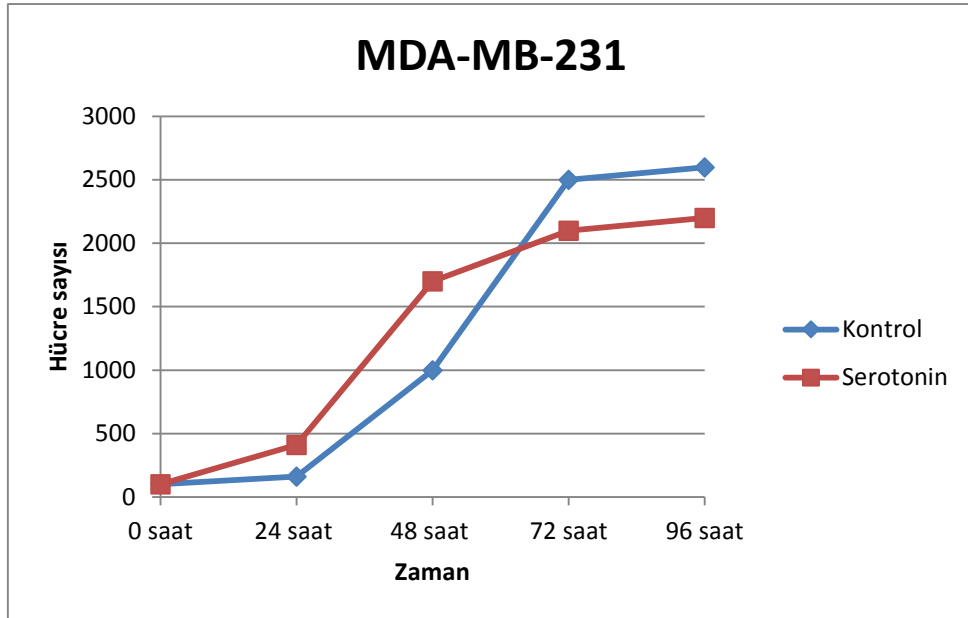
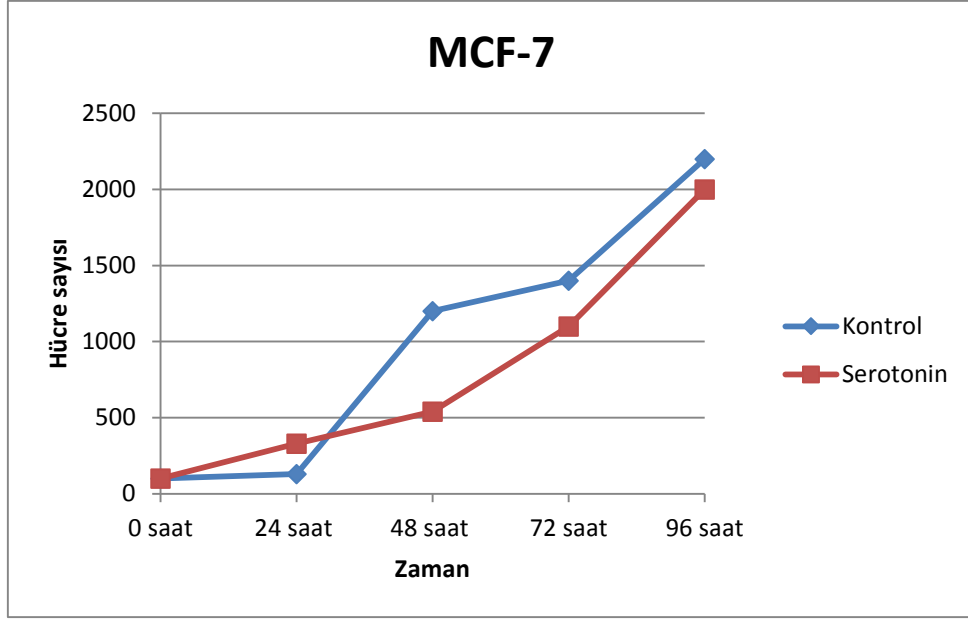


Şekil 21. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile gösterimi. Hücreler 10×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere DMEM besiyeri ile ekilmiştir. Ertesi gün, 0-250 µM doz aralığında serotonin uygulaması yapılmış ve hücreler 24-48 saat boyunca ilaca maruz bırakılmıştır. Ardından, 10 µl MTT ajanı uygulanmış ve 4 saat sonra 100 µl DMSO uygulanarak 570-655 nm dalga boyunda absorbans Bio-rad 96 kuyucuklu petri okuyucu (ELISA) yardımı ile ölçülmüştür. Bar grafiklerinde gösterilen standart sapma değerleri \pm SD 4'er tekrarlı olarak 6 bağımsız deney sonucu elde edilmiştir (p<0,05=*, p<0,01=**, p<0,001=*** olarak belirtilmiştir).

Şekil 21’de görüldüğü üzere, serotonin uygulanmış her iki meme kanseri hücre hattında bağıl canlılık yüzdeleri doza bağılı olarak azalmıştır. MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik serotonin (50 μ M) uygulamasını takiben, hücrelerin bağıl canlılık yüzdesi %57 iken, 48 saat sonunda hücre canlılığı %53 olarak saptanmıştır (Şekil 21.a). MDA-MB-231 hücrelerinde ise 24 saatlik serotonin (50 μ M) uygulaması sonrasında hücrelerin bağıl canlılık yüzdesi %50 iken 48 saat sonunda hücre canlılığı % 62 olarak saptanmıştır (Şekil 21.b). MTT testi sonuçları doğrultusunda her iki meme kanseri hücrelerine uygulanacak serotoninin etkin dozu 50 μ M olarak belirlenmiştir.

Serotoninin etkin dozunun bulunmasını takiben, her iki meme kanseri hücre hattında da serotoninin hücre canlılığına zamana bağılı olarak etkisini belirlemek amacıyla, tripan mavisi kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir. Her iki hücre hattına da MTT canlılık testiyle belirlenen, 50 μ M serotonin uygulanmış ve hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca serotonine maruz bırakılmıştır. Belirlenen bu zaman dilimlerinde her iki hücre hattı da tripan mavisi ile boyanarak canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık oranı, serotonin uygulamasını takiben ilk 48 saat boyunca kontrol hücre grubuna göre azalış göstermiştir. Bununla birlikte ilaç uygulamasından 72 ve 96 saat sonrasında hücrelerin canlılık düzeyinde bir miktar artış gözlenirse dahi, serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinin sağkalım oranının kontrol hücrelerine göre daha düşük olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 22.a). Buna karşılık, MDA-MB-231 hücre hattındaki zamana bağılı değişim incelendiğinde, serotonine maruz bırakılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığında ilaca maruz bırakıldıktan ilk 48 saat sonrasında kontrol hücrelerine göre bir değişim gözlenmemiştir. Bununla birlikte 72 ve 96 saat boyunca serotonine maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık düzeylerinin kontrole göre düşüş gösterse dahi, bu düşüşün kayda değer bir etkisinin olmadığı ve hücre miktarındaki artışın zamana bağılı olarak doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 22.b). Bu sonuçlar toplu bir şekilde incelendiğinde, serotoninin her iki meme kanseri hücre hattında da etkisinin ilk 24 saat içerisinde gerçekleştiği ve ardından etkisinin ortadan kalktığını ortaya çıkarmıştır.



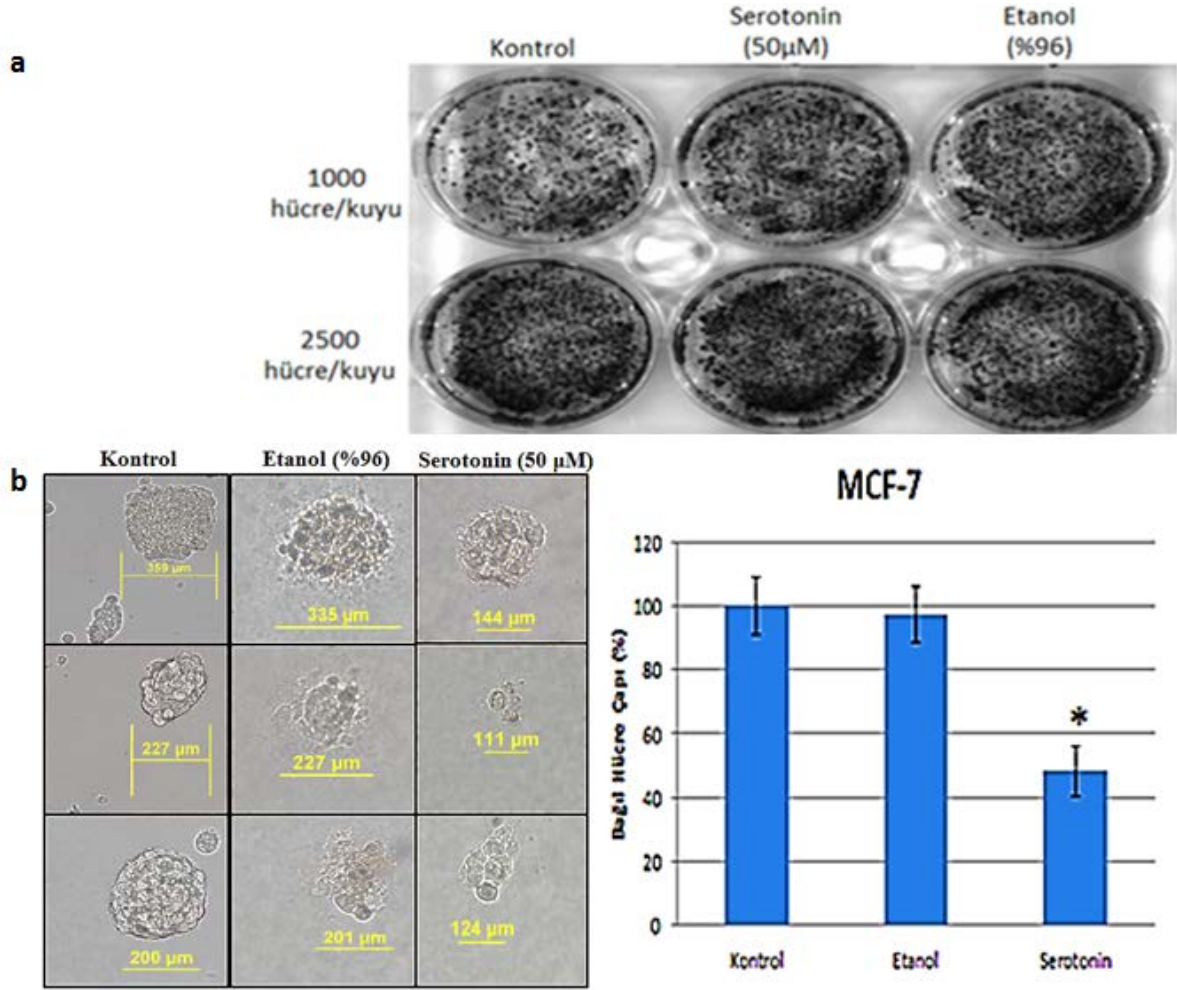
Şekil 22. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin zamana bağlı olarak hücre sağkalımı üzerine etkisinin tripan mavisi boyama yöntemiyle belirlenmesi. Hücreler her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ertesi gün MTT ile belirlenen uygun dozda ($50 \mu\text{M}$) uygulama yapılmıştır ve hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca ilaca maruz bırakılmıştır. Belirlenen bu zaman dilimlerine göre her 24 saatte bir olacak şekilde, tripan mavisi aracılığıyla hücrelerin sayımı yapılmıştır. Her deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

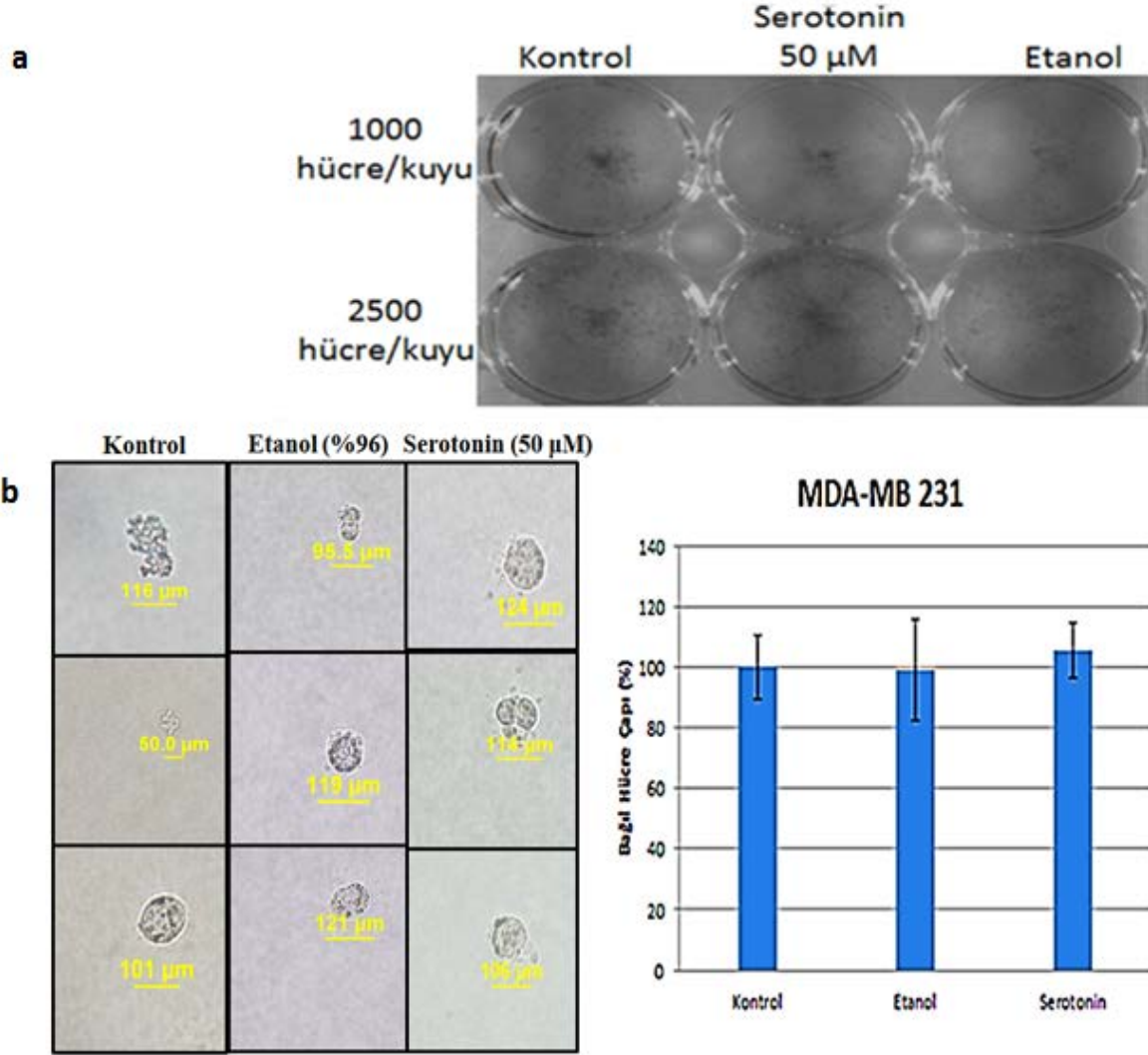
Serotoninin her iki meme kanseri hücre hattında da hücre canlılığına, hücre proliferasyon hızına ve hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerine etkisini test etmek amacı ile klonojenik hücre canlılığı yöntemine başvurulmuştur.

MCF-7 hücrelerine etanole maruz bırakıldığında, koloni oluşum kapasitelerinde herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Ancak serotonin uygulanması durumunda MCF-7 hücrelerinin oluşturdukları koloni miktarlarında kontrol hücrelerine göre gözle görünür bir değişim olmasa dahi (Şekil 23.a), hücrelerin oluşturdukları kolonilerin çapları kontrol grubuna göre yaklaşık %50 oranında bir küçülme göstermiştir (Şekil 23.b).

MCF-7 hücreleri ile elde edilen bulguların tersine, serotonin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin oluşturdukları koloni miktarlarında (Şekil 24.a) ve hücrelerin oluşturdukları kolonilerin çaplarında az miktarda dahi olsa artış meydana geldiği, ancak bu değişimin anlamlı bir düzeyde olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Şekil 24.b). Bu sonuç, MDA-MB-231 hücre hatlarında serotoninin etkisinin kısa süreli olduğunu ve klonojenik hücre canlılığı yönteminde gözlemlendiği üzere hücreler uzun süre serotonine maruz bırakıldığında etkilerinin ortadan kalktığını gözler önüne sermiştir. Bu nedenle, her iki meme kanseri hücrelerinde de serotoninin hücre sağkalımı ve hücre ölümü üzerine moleküler düzeyde etkisinin incelendiği ileri çalışmalarda ilk 24 saatlik süreç incelenmiştir.



Şekil 23. Serotoninin MCF-7 hücrelerinin sağkalımı ve koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisinin soft agar aracılığıyla oluşturulan 3 boyutlu ortamda gösterilmesi. MCF-7 hücreleri 6×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 6 mm çaplı hücre kültürü kaplarına ekilmişlerdir. 24 saat boyunca serotonin ile muamele edildikten sonra ilaçlı besi yeri ortamdan çekilip, yerine ilaçsız besiyeri verilmiştir. Hücreler 14 gün boyunca inkübe edilmiş, ardından amonyum asetat/metanol karışımı ile hücrelerin sabitlenmesi sağlanmıştır. Sabitlenen hücreler kristal viyole boyası ile boyanmış ve görüntüleri alınmıştır (a). Serotonin uygulamasının, MCF-7 hücrelerinin yumuşak agarda koloni oluşturmalarını nasıl etkilediğini belirlemek için hazırlanan agar ortamı üzerine 2500 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve uygun oranlarda etanol ve serotonin uygulanmıştır. 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, ardından ışık mikroskopunda incelenmiş ve serotonin uygulamasına bağlı olarak çaplarındaki değişim incelenmiştir (b). Bar grafiklerinde gösterilen standart sapma değerleri \pm SD 3'er tekrarlı olarak 2 bağımsız deney sonucu elde edilmiştir ($p < 0,05 = *$ olarak belirtilmiştir).



Şekil 24. Serotoninin MDA-MB-231 hücrelerinin sağkalımı ve koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisinin soft agar aracılığıyla oluşturulan 3 boyutlu ortamda gösterilmesi. MDA-MB-231 hücreleri 6×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 6 mm çaplı hücre kültürü kaplarına ekilmişlerdir. 24 saat boyunca serotonin ile muamele edildikten sonra ilaçlı besi yeri ortamdan çekilip, yerine ilaçsız besiyeri verilmiştir. Hücreler 14 gün boyunca inkübe edilmiş, ardından amonyum asetat/metanol karışımı ile hücrelerin sabitlenmesi sağlanmıştır. Sabitlenen hücreler kristal viyole boyası ile boyanmış ve görüntüleri alınmıştır (a). Serotonin uygulamasının, MDA-MB-231 hücrelerinin yumuşak agarda koloni oluşturmalarını nasıl etkilediğini belirlemek için hazırlanan agar ortamı üzerine 2500 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir ve uygun oranlarda etanol ve serotonin uygulanmıştır. 10 gün boyunca inkübe edilen hücreler, ardından ışık mikroskopunda incelenmiş ve serotonin uygulamasına bağlı olarak çaplarındaki değişim incelenmiştir (b), ($p=0,4$ bulunmuştur).

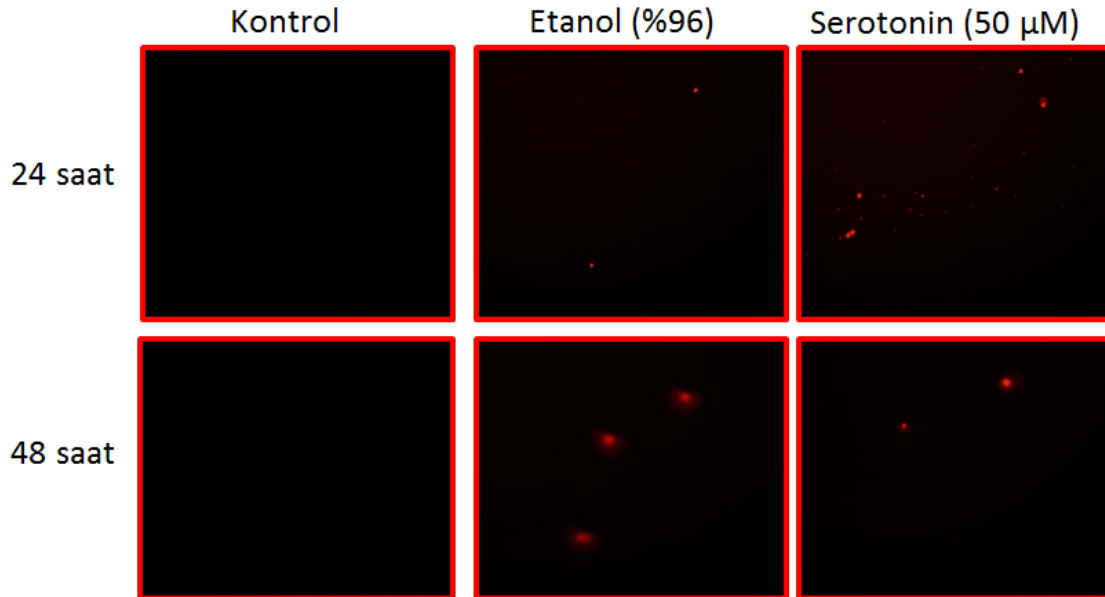
3.3. Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücrelerindeki Apoptotik Etkisinin Gösterilmesi

3.3.1. Serotoninin meme kanseri hücre hatlarında yol açtığı morfolojik değişimlerin gösterilmesi

3.3.1.1. Serotoninin MCF-7 hücrelerinde yol açtığı morfolojik değişimlerin gösterilmesi

DNA'ya bağlanabilen florojenik bir boya olan PI total hücre popülasyonundan ölü hücreleri ayırmak için kullanılmaktadır. Sağlıklı hücrelerin membranlarından geçemeyen bu boya, apoptoza uğrayan hücrelerin membranlarının bütünlüğünün bozulması nedeniyle apoptotik hücrelerin membranlarından geçerek DNA'larına bağlanabilmektedir. PI boyamada ilaç uygulanan gruplarda ölü hücrelerin sayısı daha fazla olduğu için daha çok sayıda boyayı içine alan hücreler parlak kırmızı renkte gözlenmektedir.

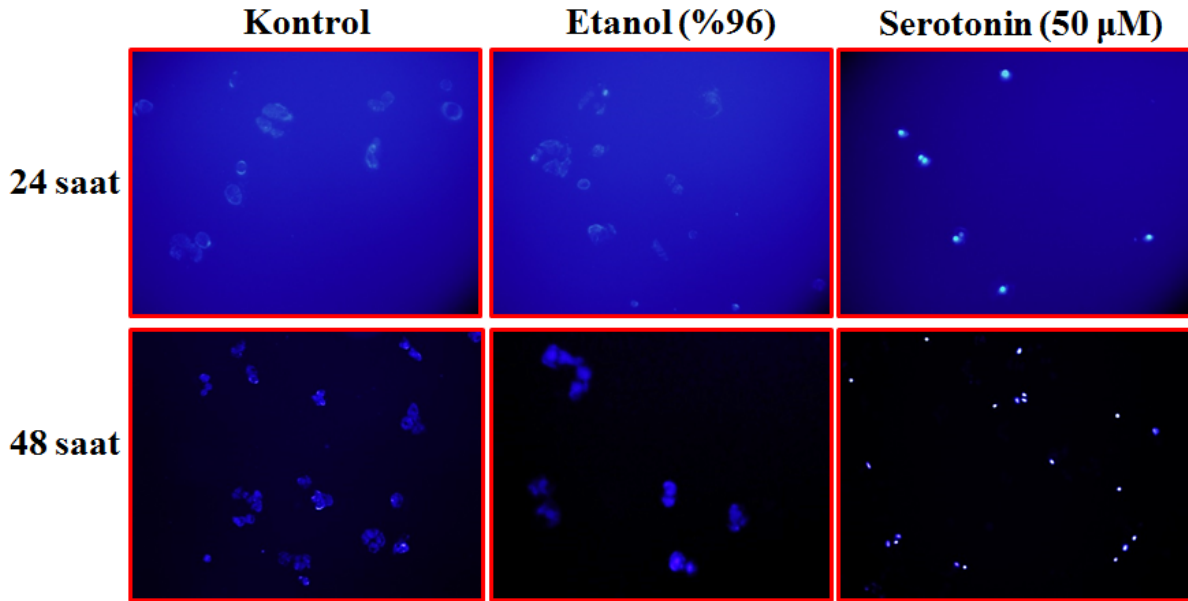
Şekil 25'te gözleendiği üzere, 24 saat süre ile serotonine maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre apoptotik ölüm gözlenen hücre sayısında ciddi bir artış gözlenirken, etanol uygulanan hücrelerde kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Buna karşın, 48 saat boyunca serotonine maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün gözlenmesi dahi, 24 saat süre ile serotonine maruz kalan MCF-7 hücrelerindeki apoptotik hücre miktarına göre ciddi oranda bir azalış olduğu gözler önüne serilmiştir.



Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin PI boyama ile gösterilmesi. MCF-7 meme kanseri hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ardından, hücrelere $50 \mu\text{M}$ dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra PI (Propidium İyodür) floresan boyası uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

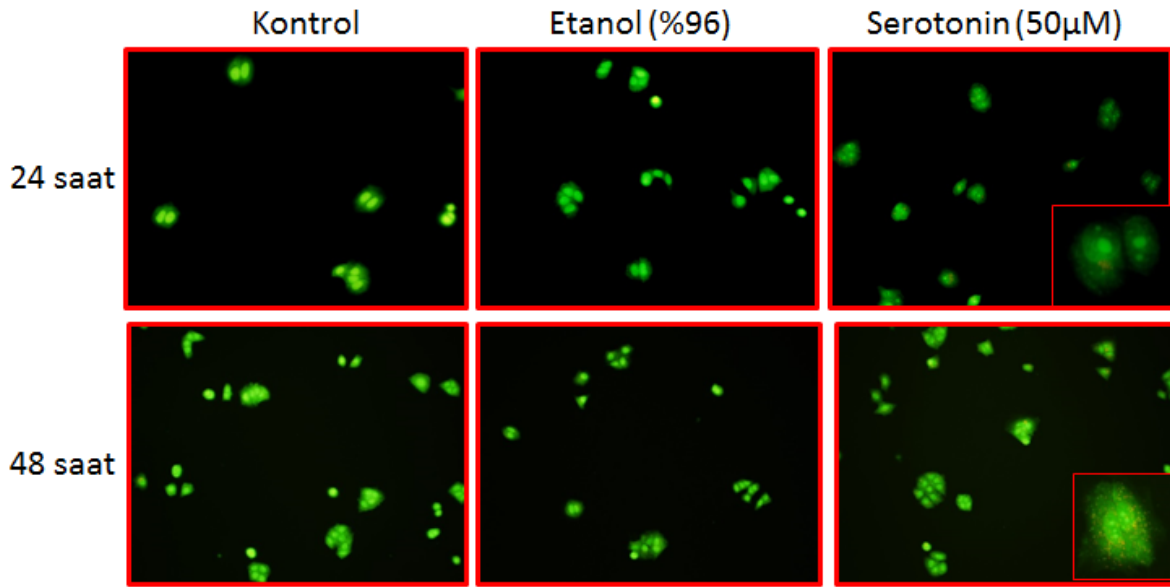
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) DNA'ya spesifik bir diğer boya olup, DNA'daki A=T bağlarının yoğun olduğu bölgelere bağlanarak mavi floresan eksite etmektedir. Apoptotik hücrelerdeki membran integritisinin bozulması nedeniyle DAPI boyasının hücre içerisine girişi artmakta ve koyu mavi floresan ortaya çıkmaktadır. Buna ek olarak, apoptotik olmayan hücrelerin bozulmamış nükleus ve membranlarının varlığı nedeniyle bu hücreler açık mavi floresan verirken, apoptotik hücrelerde DNA kırıklarının varlığı nedeniyle bu hücreler daha koyu mavi floresan vermektedir.

Şekil 26'da gözleendiği üzere, kontrol ve etanol uygulanmış MCF-7 hücrelerinde, bozulmamış nükleer membranları nedeniyle, DAPI ile boyanmış hücreler gözlenmez iken, 24 ve 48 saat boyunca serotonine maruz kalan hücrelerde DAPI ile işaretlenmiş hücrelerin varlığı ortaya çıkarılmıştır ve uygulama süresine bağlı olarak DAPI ile boyanmış hücre miktarında bir artış olduğu gözler önüne serilmiştir. Serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı artan DAPI boyanmasına rağmen, PI ile işaretlenmiş ölü hücre sayısındaki zamana bağlı azalışın varlığı hücrelerin direnç mekanizması geliştirdiğini düşündürmüştür.



Şekil 26. MCF-7 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin DAPI boyama ile gösterilmesi. MCF-7 meme kanseri hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ardından, hücelere 50 µM dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) floresan boyası uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

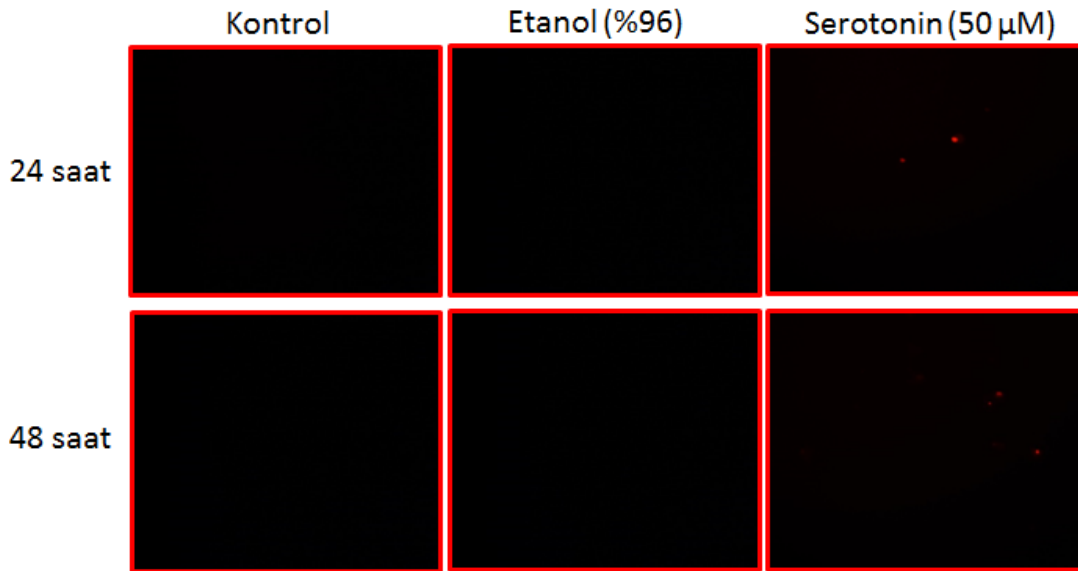
Acridine orange (AO) çok yönlü kullanılabilen bir floresan boyası olup, sadece nükleik asitleri değil aynı zaman da asidik vakuolleri de boyayabilmektedir. AO DNA'ya bağlandığı zaman yeşil, RNA'ya bağlandığı zaman sarı floresan yayarken, lizozom içerisine girdiği zaman protone hale gelerek kırmızı floresan yaymaktadır. MCF-7 hücrelerinde serotoninin otofajik vakuol oluşumunu tetikleyip tetiklemediğini incelemek üzere AO ile boyama yapılmıştır. Kontrol ve etanol uygulanan MCF-7 hücrelerinde otofajik belirteç olan asidik vakuollerin varlığına rastlanmamışken, serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde varlıkları tespit edilmiştir. Ayrıca, serotonin uygulanım süresi ile doğru orantılı olacak şekilde, 48 saat süre boyunca serotonine maruz bırakılan MCF-7 hücrelerde, 24 saat süre ile serotonin uygulanmış hücrelere oranla daha fazla miktarda asidik vakuollerin var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 27).



Şekil 27. MCF-7 hücrelerinde serotoninin uygulamasının asidik vakuol oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi. MCF-7 meme kanseri hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ardından, hücelere 50 μ M dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra AO (Akridin Turuncusu) floresan boyası uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

3.3.1.2. Serotoninin MDA-MB-231 hücrelerinde yol açtığı morfolojik değişimlerin gösterilmesi

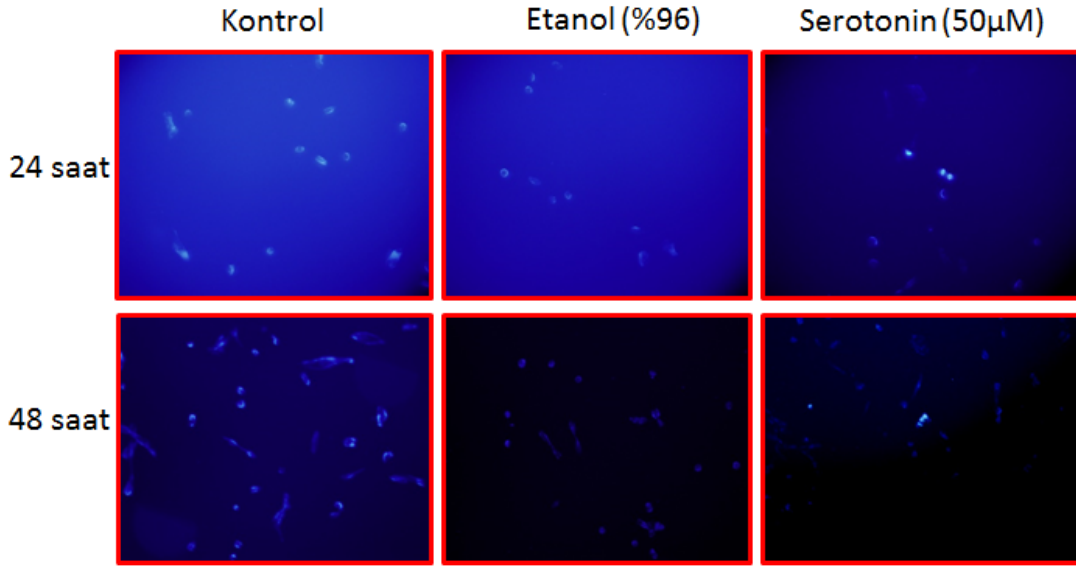
Serotoninin MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetikleyip tetiklemediğini test etmek amacıyla PI boyama yöntemine başvurulmuştur. Etanol uygulanan hücrelerde kayda değer bir artış gözlenmediği gibi, 24 saat süre ile serotonine maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde de kontrol hücrelerine göre apoptotik ölüm gözlenen hücre sayısında ciddi bir artış olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, 48 saat boyunca serotonine maruz bırakılan hücrelerde de apoptotik hücre ölümün gözlenirse dahi, 24 saat süre ile serotonine maruz kalan MDA-MB-231 hücrelerindeki apoptotik hücre miktarına göre bir artış gözlenmediği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 28).



Şekil 28. MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin PI boyama ile gösterilmesi. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ardından, hücrelere 50 µM dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra PI (Propidium Iyodür) floresan boyası uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

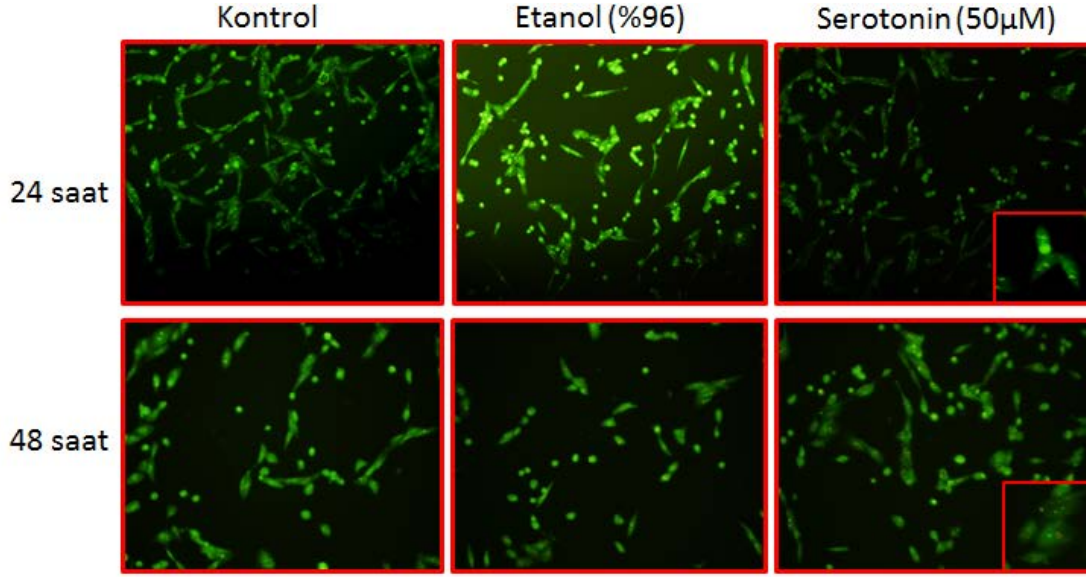
Daha önce de belirtildiği üzere, DNA kırıklarının varlığı apoptotik hücre ölümünün belirteçlerinden biridir. Serotoninin hücrelerin DNA'larında fragmentasyona neden olup, olmadığını incelemek amacıyla MDA-MB-231 hücrelerinde DAPI boyama yöntemine başvurulmuştur. Şekil 29'da gözlemlendiği üzere kontrol ve etanol uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde, bozulmamış nuklear membranları nedeniyle, DAPI ile boyanmış hücreler

gözlenmez iken, 24 ve 48 saat boyunca serotonine maruz kalan hücrelerde DAPI ile işaretlenmiş hücrelerin varlığı ortaya çıkarılmıştır. Ancak, serotonin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen DAPI ile işaretlenen hücre miktarındaki artışın, serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerindeki miktarına göre oldukça az olduğu gözler önüne serilmiştir. Bu durum serotonin uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik süreci tetiklemediğini gözler önüne sermiştir.



Şekil 29. MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin hücre ölümü üzerinde etkisinin DAPI boyama ile gösterilmesi. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ardından, hücelere 50 μ M dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) floresan boyası uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerine serotonin uygulamasını takiben 48 saatlik süreçte ilaca karşı oluşan direnç mekanizmasında otofajinin rolü olup, olmadığını incelemek üzere hücreler AO ile boyanmış ve asidik vakuollerin varlığı test edilmiştir. Şekil 30'da görüldüğü üzere, etanol uygulanan ve kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik belirteçlerin varlığı gözlenmemiştir. Bununla birlikte, serotonin uygulamasına tabi tutulan MDA-MB-231 hücrelerinde ilk 24 saatlik süreçte asidik vakuollerini tespit edemezken, 48 saat sonrasında hücrelerde asidik vakuollerin var olduğu ortaya çıkarılmıştır.

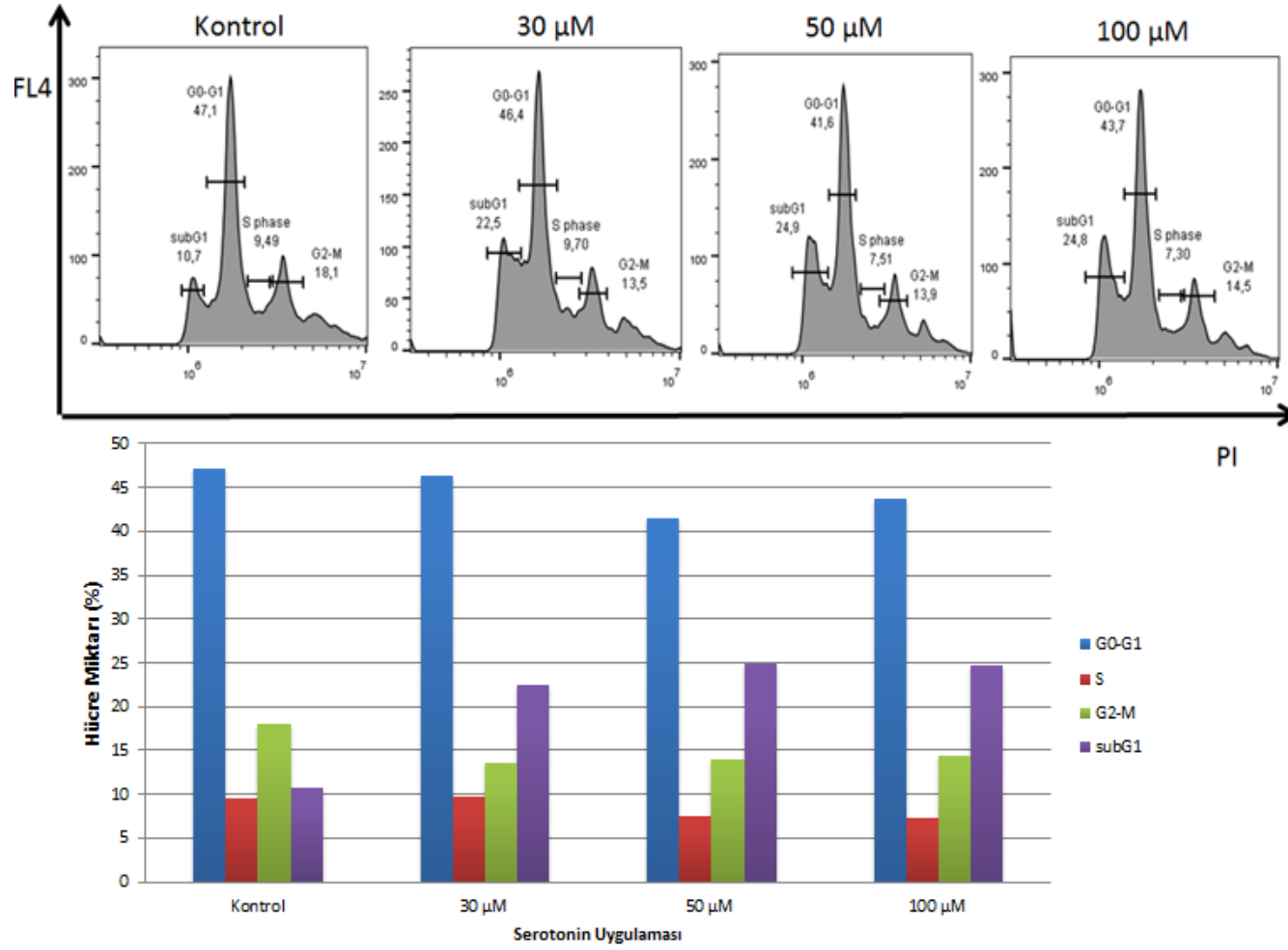


Şekil 30. MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin uygulamasının asidik vakuol oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Ardından, hücelere 50 µM dozda serotonin uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra AO (Akridin Turuncusu) floresan boyası uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

3.3.2. Serotoninin MCF-7 ve MDA- MB- 231 Hücrelerinde Hücre Döngüsü ile Apoptoz Üzerine Etkileri

3.3.2.1. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serotoninin hücre döngüsü üzerine etkileri

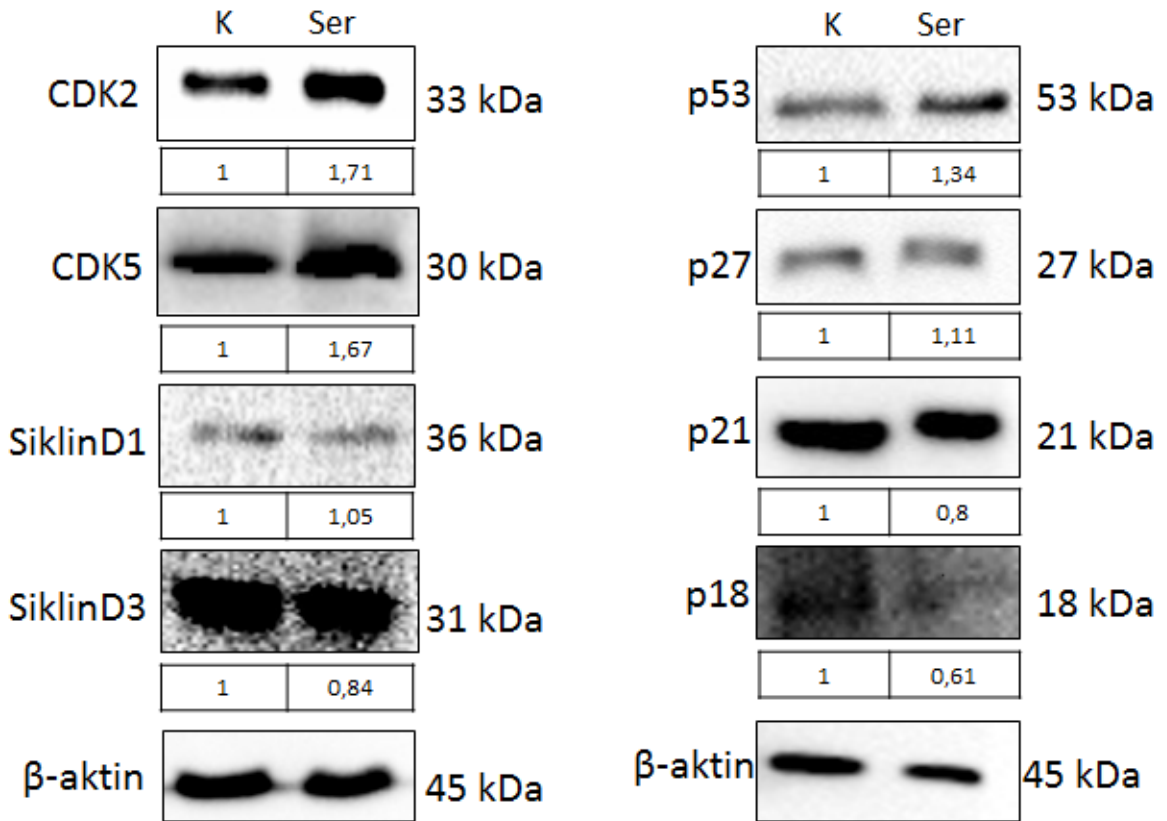
Serotoninin MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptoz üzerine etkisini anlamak amacıyla, belirli doz aralığında (0-100 µM) serotoninine maruz bırakılan hücrelerde apoptotik nükleusların büyüklüğü, hacmi ve yüzdesi PI boyama yöntemine tabi tutulmuş ve hücre siklus evrelerindeki değişimler akış sitometrisi aracılığıyla incelenmiştir. Bu yöntem ile apoptotik hücrelerde meydana gelen fragmente DNA'lar kullanılarak, G1, S ve G2-M fazlarındaki apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Daha önce de belirtildiği üzere, apoptotik hücrelerin membran bütünlüğünde meydana gelen bozulma nedeniyle PI boyası apoptotik hücrelerin DNA'larına bağlanabilmektedir. Apoptotik süreçte DNA endonükleazlar tarafından yıkılmakta ve hücreler hipodiploid hale gelmektedir. Apoptotik süreçte artan DNA fragmentleri hücre döngüsünün bozulmasına ya da tutuklu kalmasına yol açmakta olup, hipodiploid hale gelen apoptotik hücreler sub-G1 olarak adlandırılan fazda yığılmaktadır.



Şekil 31. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben hücre devrindeki değişimlerin PI boyamasını takiben akış sitometrisi aracılığıyla incelenmesi. MCF-7 hücreleri 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca serotonin ve etanol ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler kaldırılıp, %70 etanol ile fikse edilmiş ve PI ile boyanmıştır. Hücreler 1000 hücre/örnek olacak şekilde akım sitometrisinde incelenmiştir. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences ve Flow Jo programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında serotoninin apoptotik etkileri PI boyamasını takiben akış sitometrisinde belirlenmiştir. Kontrol MCF-7 hücrelerinde sub-G1 popülasyonu % 10,7 oranında gözlenirken, serotonin uygulamasını takiben doza bağlı olarak sub-G1 düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir. 30 μ M serotonin uygulamasını takiben sub-G1 popülasyonu % 22,5 oranına, 50 μ M serotonin uygulamasını takiben sub-G1 popülasyonu % 24,9 oranına ve 100 μ M serotonin uygulamasını takiben sub-G1 popülasyonu % 24,8 oranına yükselmiştir (Şekil 31).

Serotonin uygulamasını takiben G0/G1 fazındaki hücre popülasyonu düşerken, S ve G2/M fazındaki hücre popülasyonunda ciddi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonucun altında yatan moleküler mekanizmayı ortaya çıkarmak için Western Blot tekniğine başvurulmuştur ve hücre döngüsünde rol alan proteinlerin serotonin uygulamasını takiben ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimler analiz edilmiştir.



Şekil 32. Serotoninin MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında hücre devrini düzenleyen proteinlere etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

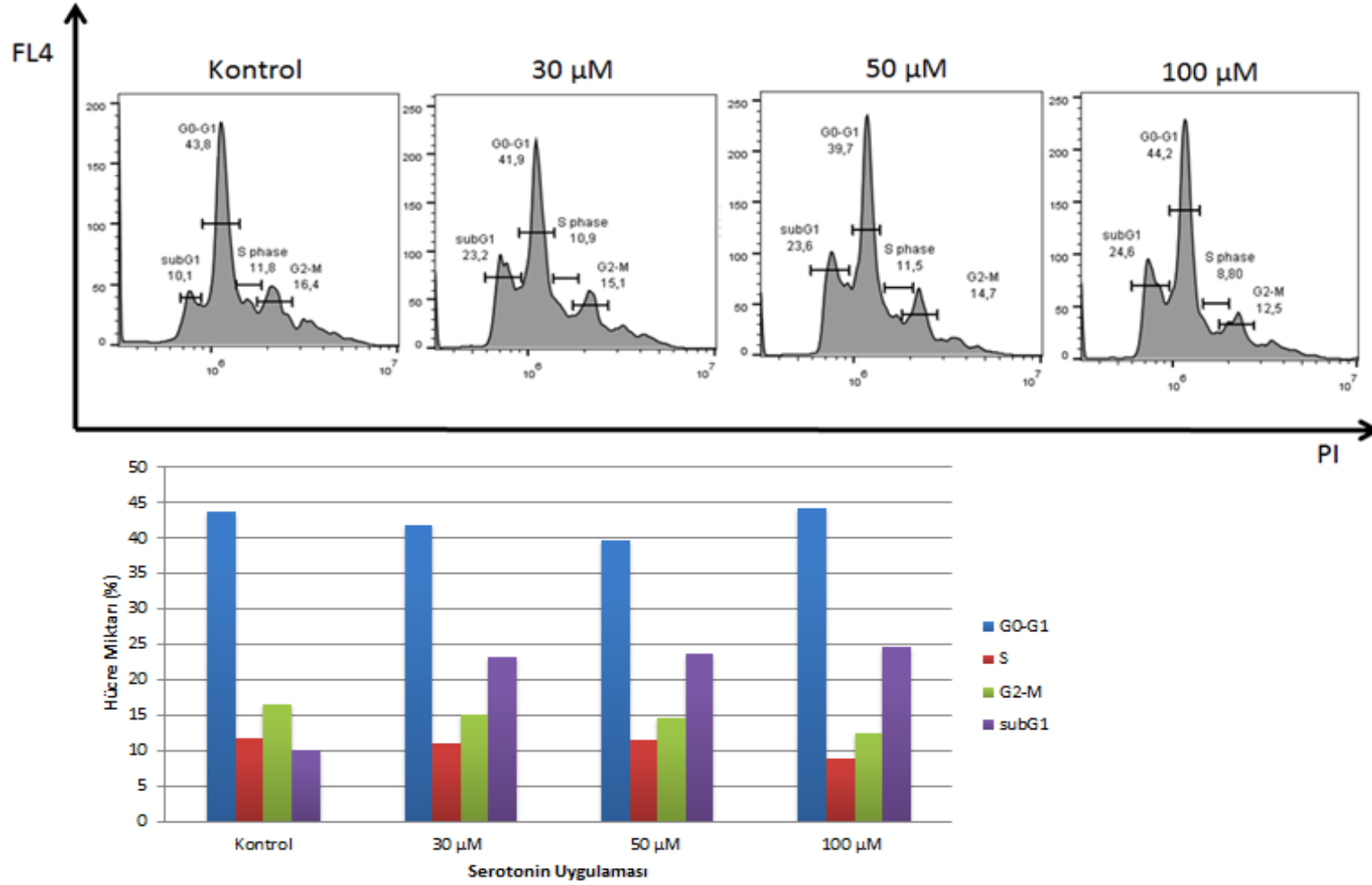
Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan iki önemli anahtar moleküllerdir. CDK2 siklin E ile kompleks oluşturarak, hücreler G1 fazından S fazına geçişini sağlamaktadır. Bununla birlikte, CDK2'nin hücre devrini farklı evrelerde durdurabildiği ve hücreyi apoptoza duyarlı hale getirdiği de bilinmektedir. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben CDK2 protein düzeyin 1,7 kat artış olduğu gözlenmiştir. Siklin D1 hücre devrinin başından sonuna kadar eksprese edilmekte olup, en yüksek düzeyine G1 fazında ulaşmaktadır. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben siklin D1 ekspresyon seviyesinde ciddi bir değişim olmadığı, buna karşılık siklin D3 proteininin ekspresyon düzeyinde ise az miktarda azalış gözlenmiştir (Şekil 32).

CDK inhibitörleri, siklin ve siklin bağımlı kinazların oluşturdukları komplekslere bağlanarak onları inhibe edebilmekte ve bu nedenle hücre devrinin regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. p27 ve p21 G1'den S fazına geçişte rol alan CDK2-siklin E kompleksinin inhibitörü olarak rol almaktadır. Bununla birlikte, p21 ekspresyon seviyesinin de tümör baskılayıcı olarak rol alan ve hücrelerin DNA onarımına veya apoptoza geçişini belirlediği bilinen p53 tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Serotonine maruz kalan MCF-7 hücrelerinde p53 seviyesi 1,3 kat artarken, p21 ekspresyon seviyesinde düşüş olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, diğer bir CDK2 inhibitörü olarak bilinen p27 proteininin seviyesinde serotonin uygulamasına bağlı olarak ciddi bir değişim olmadığı da ortaya çıkarılmıştır. Son olarak, CDK4/6-Siklin D1 kompleksinin inhibitörü olarak bilinen p18 proteininin ekspresyon düzeyindeki değişim incelenmiş ve serotonin uygulamasını takiben p18 ekspresyon düzeyinde 1,6 kat artış olduğu gözler önüne serilmiştir (Şekil 32).

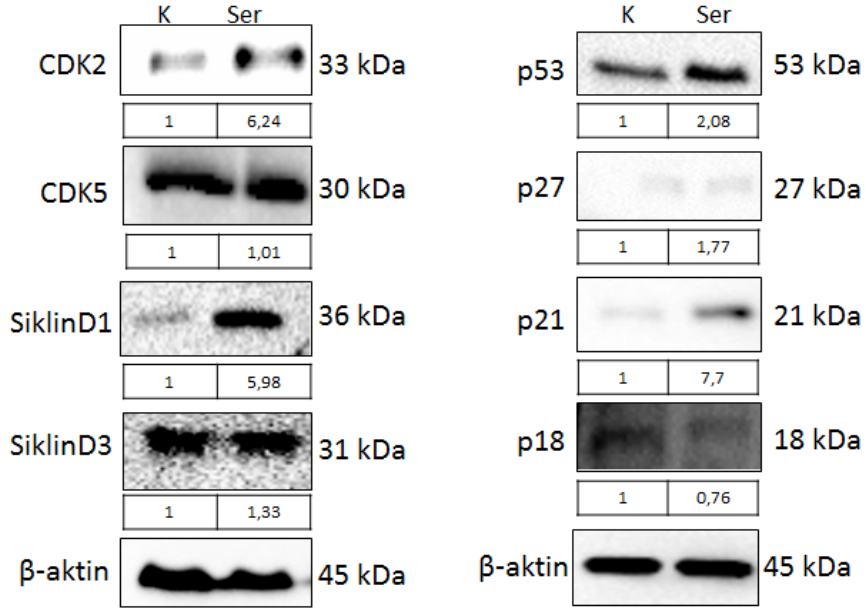
3.3.2.2. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin hücre döngüsü üzerine etkileri

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında serotoninin apoptotik etkileri PI boyamasını takiben akış sitometrisinde belirlenmiştir. Kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde sub-G1 popülasyonu % 10 oranında gözlenirken, serotonin uygulamasını takiben doza bağlı olarak sub-G1 düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir. 30 µM serotonin uygulamasını takiben sub-G1 popülasyonu % 23,2 oranına, 50 µM serotonin uygulamasını takiben sub-G1 popülasyonu % 23,6 oranına ve 100 µM serotonin uygulamasını takiben sub-G1 popülasyonu % 24,8 oranına yükselmiştir (Şekil 33).

MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilen bu sonucun altında yatan moleküler mekanizmayı ortaya çıkarmak için Western Blot tekniğine başvurulmuştur ve hücre döngüsünde rol alan proteinlerin serotonin uygulamasını takiben ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimler analiz edilmiştir. Aynı MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasının ardından CDK2 protein ekspresyon düzeyinde 6 kat artış gözlenirken, MCF-7 hücrelerinden farklı olarak siklin D1 ekspresyon düzeyinde yaklaşık 6 kat artış, CDK5 ve siklin D3 proteinlerinin ekspresyon düzeyinde ise ciddi bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, MCF-7 hücrelerinde elde edilen bulgulara zıt olacak şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben CDK2-siklinE inhibitörü olan p21 protein ekspresyonunda ciddi bir artış gözlenmiştir. Bu hücrelerde aynı zamanda bir diğer CDK inhibitörü olan p27 ve tümör baskılayıcı etkiye sahip olan p53 protein düzeylerinde, serotonin uygulamasına bağlı olarak sırasıyla 1,7 ve 2 kat artış olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 34).



Şekil 33. MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben hücre devrindeki değişimlerin PI boyamasını takiben akış sitometrisi aracılığıyla incelenmesi. MDA-MB-231 hücreleri 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca serotonin ve etanol ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler kaldırılıp, %70 etanol ile fiks edilmiş ve PI ile boyanmıştır. Hücreler 1000 hücre/örnek olacak şekilde akım sitometrisinde incelenmiştir. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences ve Flow Jo programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

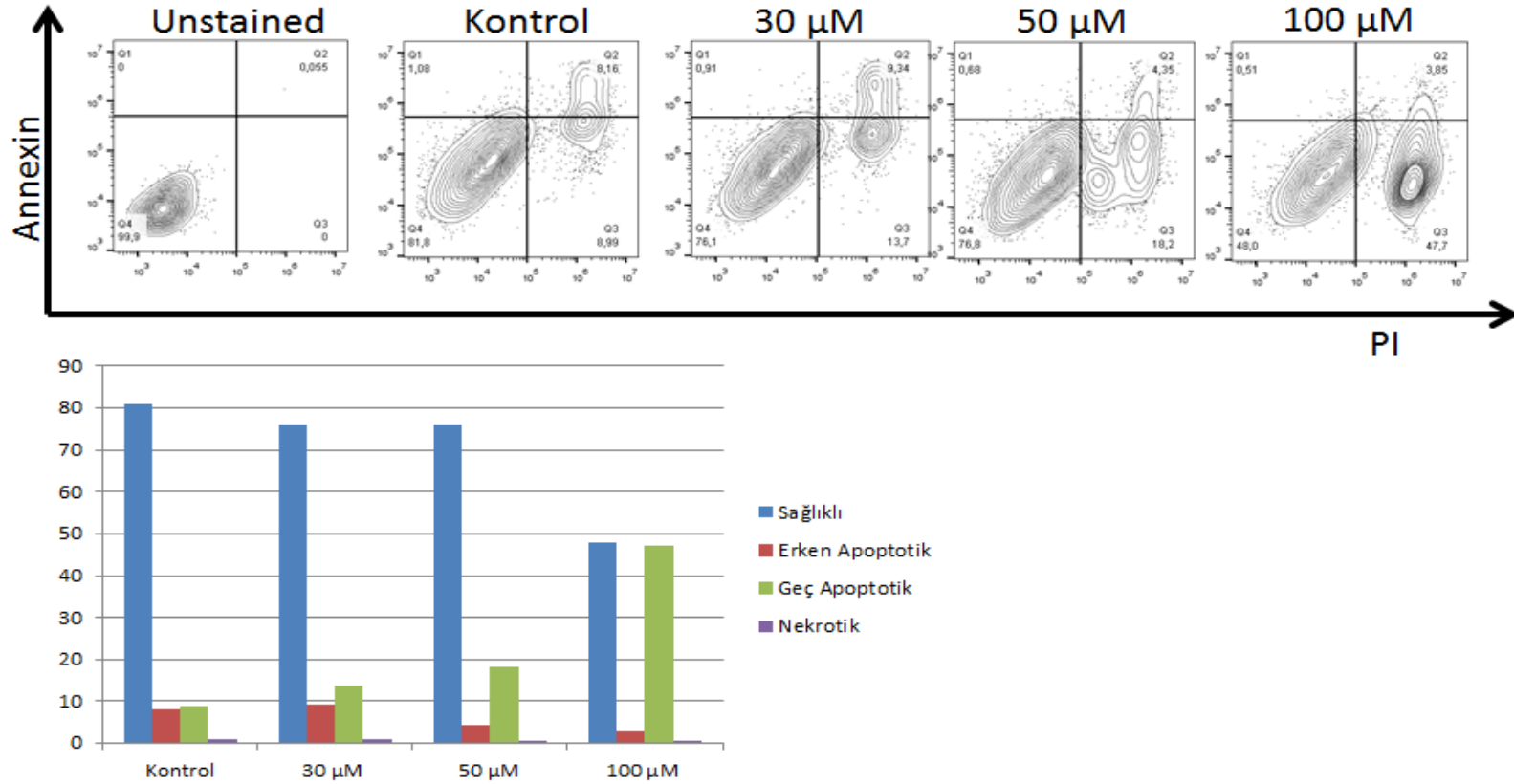


Şekil 34. Serotoninin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında hücre devrinin düzenleyen proteinlere etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 µM konsantrasyonda serotonin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

3.3.2.3. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serotoninin apoptotik ölüm üzerine etkisinin Anneksin V/PI ikili boyama ile gösterimi

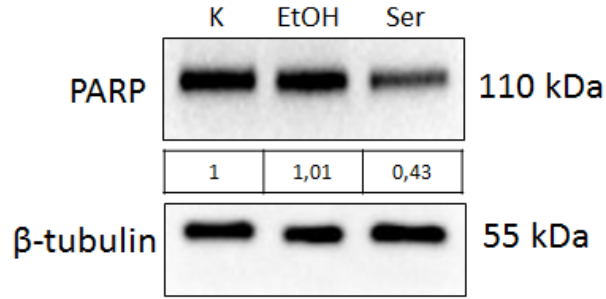
Normal canlı hücrelerde, bir fosfolipid olan fosfatidilserin hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde bulunmaktadır. Ancak, apoptozun ara evrelerinde fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine translokasyonu gerçekleşmektedir. Böylelikle apoptotik hücreler, dış yüzeye geçen fosfatidilserinin anneksin V boyası ile boyanması ile belirlenebilmektedir. Hücrelerin anneksin V ve PI ile ikili boyamasının ardından akış sitometrisi aracılığıyla analiz edilmesi sonucunda, sağlıklı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre populasyonları belirlenebilmektedir.

MCF-7 hücrelerinde belirli doz aralığında (0-100 µM) serotonin uygulaması sonucunda hücrelerde apoptozun tetiklenip tetiklenmediğini incelemek için anneksin V/PI ikili boyaması yapılmıştır. Şekil 35’de gözlendiği üzere kontrol MCF-7 hücrelerinde sağlıklı hücreler popülasyonunun %82’ sini oluştururken, serotonin uygulaması ardından sağlıklı hücreler popülasyonunun sırasıyla %76, %77 ve %48’ine düşmüştür. Bununla doğru orantılı olacak şekilde, MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben, doza bağlı olarak apoptotik hücre ölümünde artış gözlenmiştir (Şekil 35). Bu durum serotonin uygulamasının MCF-7 hücrelerinde apoptotik etki gösterdiğini bir kez daha ortaya çıkarmıştır.



Şekil 35. Serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde anneksin V/PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi. MCF-7 hücreleri 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca serotonin ve etanol ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler kaldırılıp, %70 etanol ile fikse edilmiş ve Annexin V/PI ile ikili boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1000 hücre/örnek olacak şekilde akım sitometrisinde incelenmiştir. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences ve Flow Jo programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

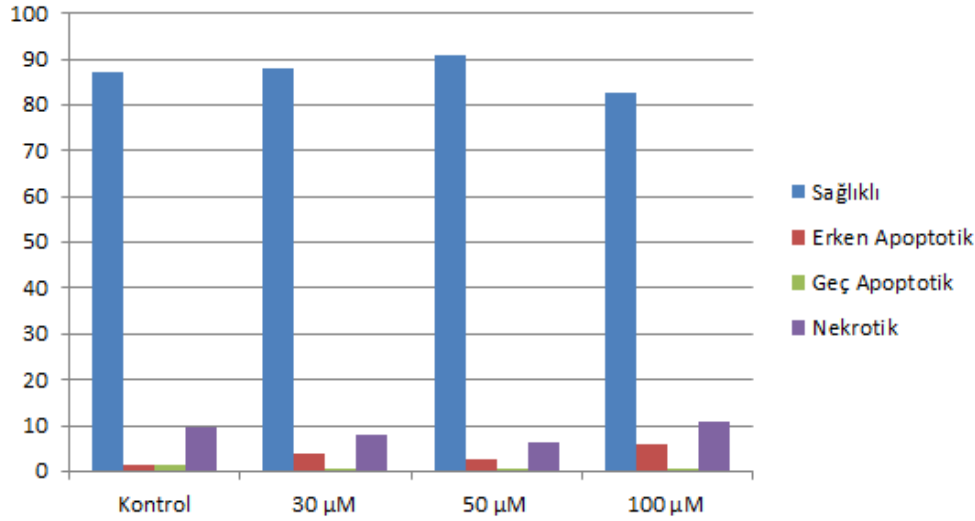
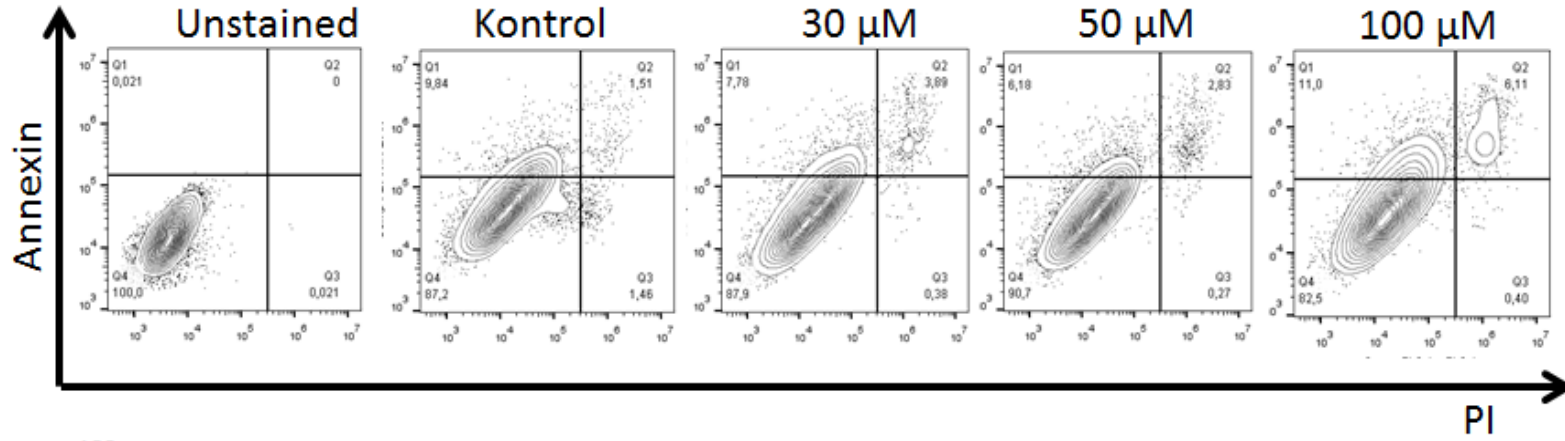
Poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) nuklear bir enzim olup, DNA'ya bağlanmakta ve DNA tamir mekanizmasını tetikleyebilmektedir. PARP-1 proteini sadece DNA onarımını sağlamamakta, aynı zamanda hücre enerjisinin düzenlenmesinde, ERK ilişkili sinyal yollarının tetiklenmesinde ve ölüm yollarının tetiklenmesinde rol almaktadır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben PARP-1 enziminin ekspresyon düzeyindeki değişimi incelemek için Western Blot tekniğine başvurulmuştur. Yapılan incelemeler sonrasında MCF-7 hücrelerinde yalnız EtOH uygulaması yapıldığında PARP enziminin ekspresyon düzeyinde herhangi bir değişim olmadığı, buna karşın serotonin uygulanan hücrelerde PARP-1 ekspresyon düzeyinin, kontrol hücrelerindeki göre yarı yarıya azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Şekil 36).



Şekil 36. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben PARP-1 enziminin ekspresyon düzeyindeki değişimin gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, EtOH: Etanol uygulanan, Ser: Serotonin uygulanan).

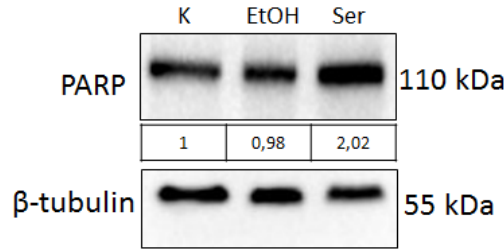
3.3.2.4. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin apoptotik hücre ölümüne etkisinin Anneksin V/PI ikili boyama ile gösterimi

MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben apoptotik hücre ölümünün tetiklenip tetiklenmediğini incelemek için anneksin/PI ikili boyaması yapılmış ve akış sitometrisi ile hücre canlılığındaki değişim incelenmiştir. Şekil 37'de gözlendiği üzere, kontrol hücrelerinde sağlıklı hücreler populasyonun %88'ine tekabül etmekte olup, serotonin uygulanan hücrelerde sağlıklı hücre miktarında azalma gözlenmemiştir. Bununla birlikte, serotonin uygulanan hücre populasyonunda apoptotik hücre miktarında kontrol hücrelerine göre bir artış olmadığı hatta düşük oranda da olsa azalış gözlendiği ortaya çıkarılmıştır. Bu durum, serotoninin MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklemediğini hücrelerin serotonine karşı direnç gösterdiğini ve canlılığını tekrar sağladığını gözler önüne sermiştir.



Şekil 37. Serotonin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde aneksin V/PI boyama sonrası erken ve geç apoptotik hücre populasyonlarının belirlenmesi. MDA-MB-231 hücreleri 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre petrilere ekilerek bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca serotonin ve etanol ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler kaldırılıp, %70 etanol ile fikse edilmiş ve Anksin V/PI ile ikili boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1000 hücre/örnek olacak şekilde akım sitometrisinde incelenmiştir. Elde edilen verilerin analizi BD C6 Biosciences ve Flow Jo programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Daha önce belirtildiği üzere, DNA tamir mekanizmasında önemli rol oynayan PARP-1 enzimi apoptotik süreci tetikleyebildiği gibi, ERK sinyal yolağının tetiklenmesini sağlayarak hücre canlılığını da tetikleyebilmektedir. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben PARP-1 enziminin ekspresyon düzeyindeki değişimi incelemek için Western Blot tekniğine başvurulmuştur. Yapılan incelemeler sonrasında MDA-MB-231 hücrelerinde yalnız EtOH uygulaması yapıldığında PARP enziminin ekspresyon düzeyinde herhangi bir değişim olmadığı, buna karşın serotonin uygulanan hücrelerde PARP-1 ekspresyon düzeyinin, kontrol hücrelerindeki göre 2 kat arttığı ortaya çıkartılmıştır (Şekil 38).



Şekil 38. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben PARP-1 enziminin ekspresyon düzeyindeki değişimin gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, EtOH: Etanol uygulanan, Ser: Serotonin uygulanan).

3.3.2.5. Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde sağkalım ve ölüm kararı üzerinde moleküler hedeflerinin gösterimi

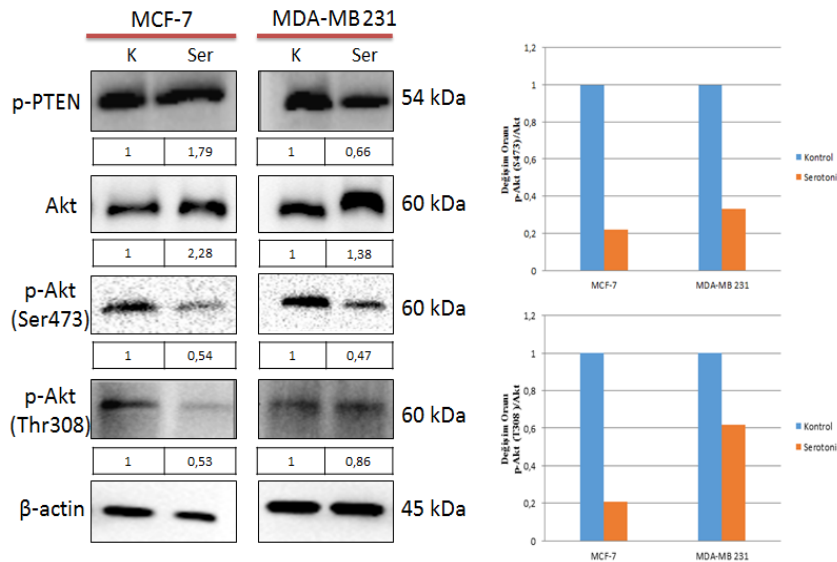
Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki bu iki zıt etkisinin altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatılabilmek adına, her iki hücre hattında da serotonin PI3K/Akt/mTOR, MAPK ve EMT sinyal yollarına etkisi irdelenmiştir.

3.3.2.5.1. Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterimi

PI3K/Akt sinyal yolağı karsinogenezde rol alan en önemli sinyal yollarından biri olup, birçok insan kanseri hücrelerinde bu sinyal yolağında aşırı aktivasyon gözlenmektedir. PI3K inaktif fosfotidilinositol (4,5) bifosfatı (PIP2) fosforilleyerek, aktif fosfotidilinositol (3,4,5) trifosfatın (PIP3) oluşumunu tetiklemektedir. PTEN ise PI3K'nın bu aktivitesinin antagonisti olarak rol almakta ve PIP3'ün 3' pozisyonundan defosforilasyonuna neden olarak tekrar inaktif forma geçmesini sağlamaktadır. Akt spesifik olarak 3' fosfotidilinositole bağlandığından, PIP3 Akt etkileşimi meydana gelmekte ve Akt konformasyonel değişim geçirerek aktivasyonu için gerekli olan fosforilasyona hazır hale gelmektedir. PDK1 tarafından Thr308 aminoasidi ve mTORC2 tarafından Ser473 aminoasidi fosforile edilen Akt aktif hale gelmektedir. Akt'ın

Thr308 aminoasidindeki fosforilasyon tümör baskılayıcı gibi rol alan GSK3 β 'yı inhibe etmekte ve mTORC1 aktivasyonuna neden olmaktadır.

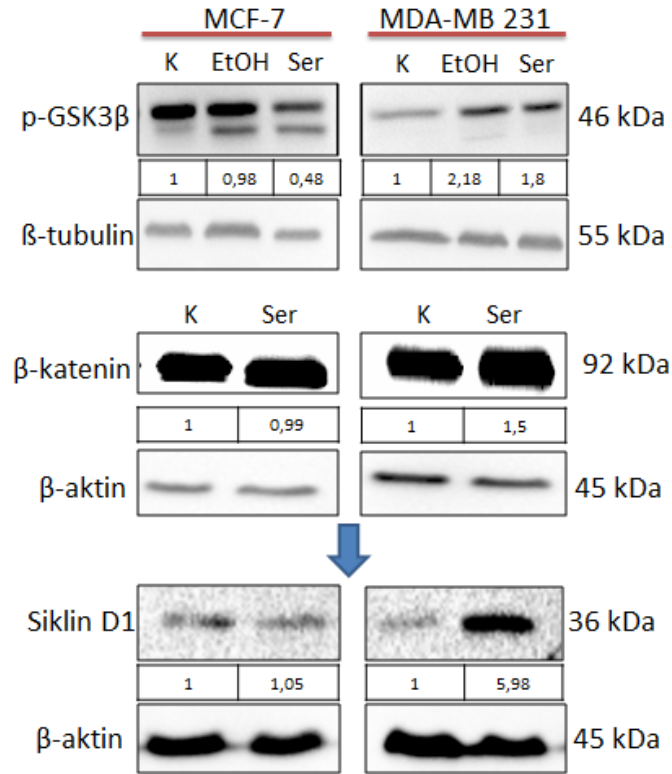
Serotonin her iki meme kanseri hücre hattında PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerine etkilerini incelemek adına Western Blot tekniğine başvurulmuştur. Şekil 39'da gözlendiği üzere MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben p-PTEN ekspresyon seviyesinin kontrol hücrelerine göre 1,8 kat arttığı ve bununla birlikte total Akt ekspresyon düzeyinde artış gözlemlense dahi p-Akt (Ser473) ve p-Akt (Thr308) ekspresyon düzeyinde ciddi bir azalış meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. Buna karşılık, MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben p-PTEN ekspresyon düzeyinde azalış gözlemlendiği ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, MDA-MB-231 hücrelerinde PDK1 tarafından fosforilasyonu sağlanan p-Akt (Thr308) seviyesinde serotonin uygulamasını takiben bir miktar azalış gösterse dahi dikkate değer bir azalış gözlenmemiştir. Ancak serotonin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde, mTORC2 tarafından fosforile edilen p-Akt (Ser473) seviyesinde aynı MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi ciddi bir azalış meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda, serotoninin her iki meme kanseri hücre hattında da mTORC2 aktivitesini engellediği, ancak PI3K yolağını yalnızca MCF-7 hücrelerinde inhibe ederken, MDA-MB-231 hücrelerinin PI3K yolağının serotonininden etkilenmediğini gözler önüne sermiştir.



Şekil 39. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

Serotonin her iki meme kanseri hücre hattındaki PI3K/Akt yolağında neden olduğu zıt etkisinin tümör baskılayıcı bir protein olarak işlev gören GSK3 β üzerindeki etkisi incelenmiştir. GSK3 β 'nın p-Akt (Thr308) ile fosforilasyonu sonucu inaktif hale gelmekte ve β -

katenin degradasyonu önlenerek hücre devrinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan siklinD1'in ekspresyonu sağlanmaktadır. Şekil 41'de gözlendiği üzere serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde GSK3 β 'nin inaktif formu olan p-GSK3 β 'nin ifade düzeyi yarı yarıya azalmıştır. Buna karşılık, siklinD1 ekspresyonu için aktivatör etkisine sahip β -katenin ekspresyon düzeyinde herhangi bir değişim olmadığı ortaya çıkarılmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise serotonin uygulamasını takiben GSK3 β 'nin fosforile formunun ifade düzeyinde kontrol hücrelerindeki göre 1,8 kat artış olduğu ve aynı zamanda β -katenin ifade düzeyinde kontrole göre 1,5 kat artış meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 40). Bu bulgular, serotonin uygulamasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde siklinD1 ekspresyon düzeyindeki artışın, buna karşılık MCF-7 hücrelerinde serotoninin siklinD1 ifadesine etki etmeyişinin nedenini ortaya çıkarmıştır.



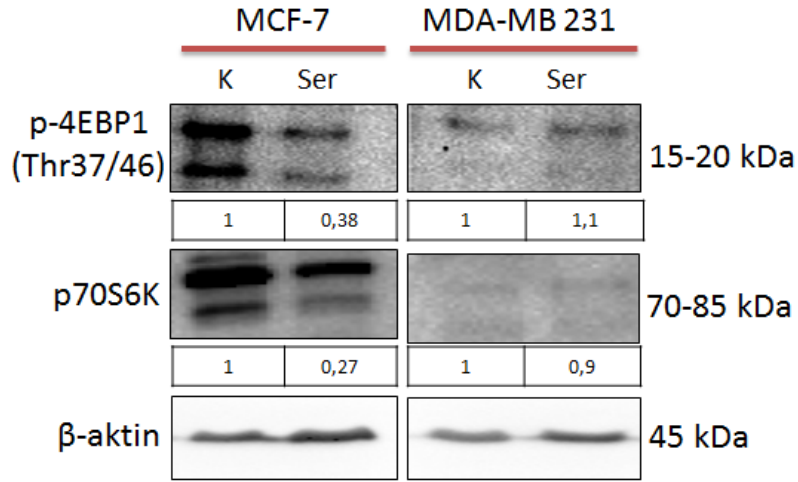
Şekil 40. Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak rol alan GSK3 β aktivitesi üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, EtOH: Etanol uygulanan, Ser: Serotonin uygulanan).

Translasyon regülasyonu hücre büyümesi ve proliferasyonunun kontrol edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Hücre devrinde G1 fazına giriş ve G1 fazından geçişin sağlanması için translasyon hızında artış gerekmektedir. Translasyonun düzenlenmesinde hata gözlendiğinde anormal büyüme ve tümörigenez meydana gelebilmektedir. mTOR hücrede translasyonun

düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir kinaz olup, mTOR aşırı aktivasyonu tümör oluşumuna neden olmaktadır.

Aktive olan mTORC1 alt yolunda bulunan 4E-BP1 ve p70S6K aracılığıyla hücre büyümesi, hücre devrinin progresyonunu ve hücrenin metabolizmasında gerekli proteinlerin mRNA ribozomal çevirimini sağlamaktadır. Hücre çoğalmasının durduğu basamakta, etkinleşmemiş 4E-BP1 eIF4E'ye bağlanarak, protein translasyonunun oluşmasını durdurmaktadır. Büyüme etmenleri gibi uyarıcıların etkisiyle 4EBP1'in mTORC1 tarafından fosforilasyonu gerçekleşmekte ve eIF4E'nin 4EBP1'den ayrılmasını sağlamaktadır.

Serotonin her iki meme kanseri hücre hattında da mTOR yolağı üzerine etkisini incelemek üzere 4ebp1'in fosforile formunun ve p70S6K'nin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasının ardından 4EBP1'in fosforilasyonunda ciddi bir düşüş olduğu, bununla birlikte P70S6K ekspresyon düzeyinde de azalma meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin p-4EBP1 ve P70S6K ifadesinde herhangi bir etkisi bulunamamıştır (Şekil 41).



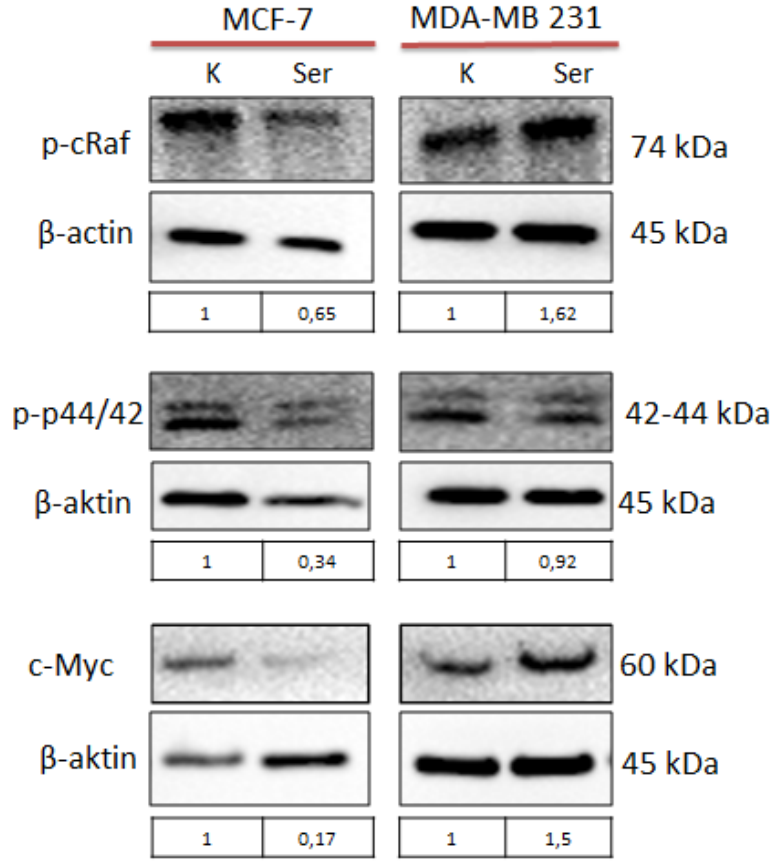
Şekil 41. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin mTOR sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 µM konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

3.3.2.5.2. Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterimi

Mitojen ile aktive olan protein kinaz MAPK sinyal yolağı 3 farklı aktive edilen protein kinaz içermekte olup, bu protein kinazlar hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümünü regüle etmektedir. MAP kinazlar, ERK (ekstraselular sinyallerle regüle edilen kinazlar;

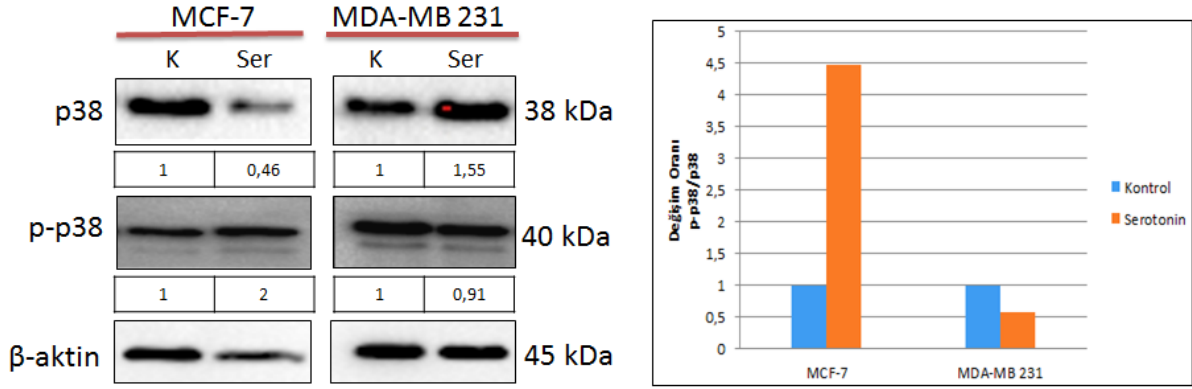
Raf/MEK/ERK sinyal yolağında sorumlu olanlar), JNK (Jun-amino terminal kinazlar) ve p38/SAPK (stresle aktive edilen kinazlar) olmak üzere üç grup altında toplanabilmektedir. ERK ailesi üyeleri (ERK1, ERK2 ve büyük ERK'ler) büyüme faktörleri ve mitojenlerle tetiklenerek, hücre büyümesi ve farklılaşmasını tetiklemektedir. JNK ailesi üyeleri (JNK1, JNK2 ve JNK3) ise iyonize radyasyon, ısı, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi çevresel etkenler tarafından aktive edilmekte ve aktif JNK sinyal yolağı üyeleri apoptoz, inflamasyon ve sitokin üretimi gibi önemli süreçleri tetiklemektedir. Bir diğer MAP kinaz aile üyesi olan p38 üyeleri de, aynı JNK üyeleri gibi, stresle ve inflamatuvar sitokinleri tarafından tetiklenmektedir ve p38 aktivasyonu inflamasyon, hücre farklılaşması, apoptoz ve hücre devrinin düzenlenmesinde rol almaktadır.

Her iki meme kanseri hücre hattında da serotonin uygulamasının MAPK sinyal yollarına etkisini moleküler düzeyde incelemek için Western Blot tekniğine başvurulmuştur. Serotonin Raf/MEK/ERK yolağına etkisini araştırmak üzere, Raf1 (cRaf), ERK1/2 (p44/42) ve c-Myc ekspresyon düzeyleri irdelenmiştir. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben Raf1'in fosforile formunda yaklaşık yarım kat azalış olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, Raf1 tarafından tetiklenen ERK1/2'nin fosforile formunun ifade düzeyinde de kontrole göre ciddi bir azalış olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgularla aynı doğrultuda olacak şekilde, serotonin uygulamasının ardından MCF-7 hücrelerinde ERK1/2 aktivasyonuna bağlı olarak ekspresyonu tetiklendiği bilinen ve hücre büyümesinde etkin rol oynadığı bilinen c-Myc ekspresyon düzeyinde ciddi oranda azalış gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 43). Buna karşılık, MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben p-cRaf ifade düzeyinde kontrole göre 1,6 kat artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, serotoninin p-44/42 ifade düzeyine ciddi bir etkisi gözlenmese dahi, c-Myc ekspresyon düzeyini kontrole göre 1,5 kat artırdığı ortaya çıkarılmıştır (Şekil 42).



Şekil 42. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin Ras/Raf/MEK (ERK MAPK) sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

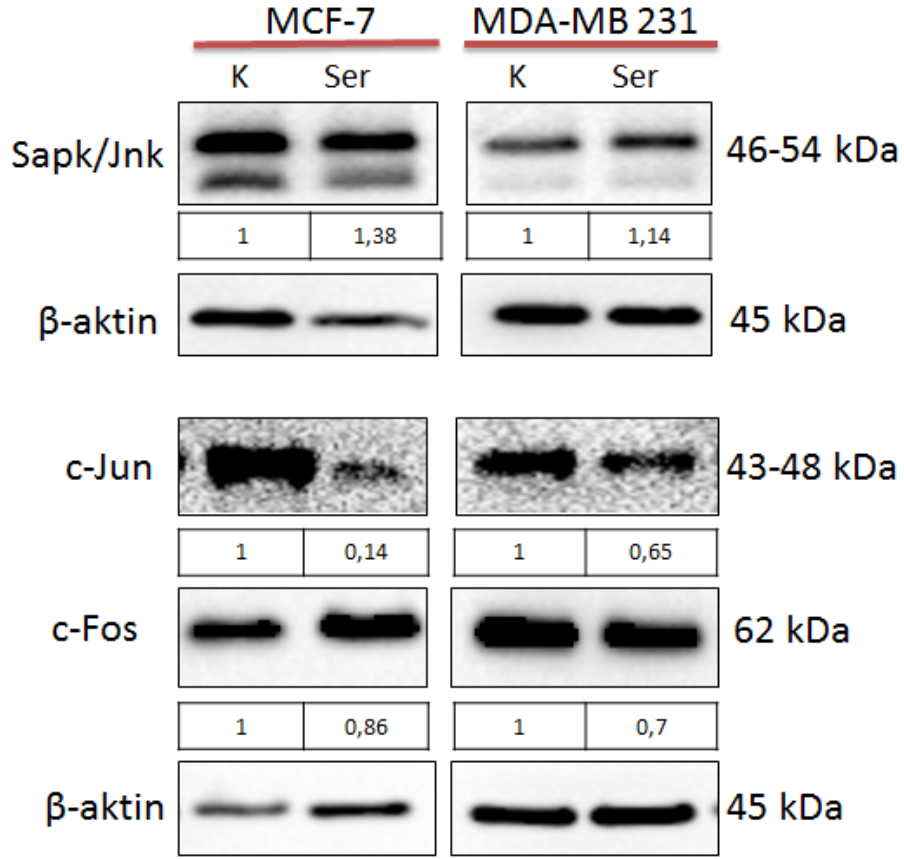
Serotoninin stresle tetiklenen p38 MAPK sinyal yolağı üzerine etkisini anlamak için, her iki meme kanseri hücre hattında da serotonin uygulamasını takiben total p38 ve fosforile edilmiş p38 ifade düzeyindeki değişim incelenmiştir. Serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerindeki total p38 ifade düzeyinde kontrole göre yarı yarıya azalış gözlenirse dahi, Bax-caspase 3 aktivasyonunu sağladığı bilinen p-p38 ifade düzeyinin kontrole göre 2 kat artış gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, fosforile haldeki p38 ifade düzeyi, total p38 ifade düzeyine göre analiz edildiğinde serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde p38 fosforilasyonunun kontrole göre 4,5 kat artış gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 43). Bu durum, serotonin uygulamasını takiben MCF-7 hücrelerinde gözlenen apoptotik artışa karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen canlılığın nedenini bir kez daha gözler önüne sermiştir.



Şekil 43. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin p38 MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 µM konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

c-Jun ile c-Fos veya c-Jun ile c-Jun dimerizasyonu sonucu oluşan AP-1 transkripsiyon faktörü hücre proliferasyonunun ve farklılaşmasının sağlanmasında rol almaktadır. Stresle tetiklenen bir diğer MAPK üyesi olan JNK sinyal yolağı, c-Jun'u aktive ederek, onun c-Fos ile dimerizasyonunu tetiklemekte böylelikle stresle tetiklenen apoptotik hücre ölümünden hücreyi kurtarmaya çalışmaktadır.

MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulanmasını takiben JNK sinyal yolağındaki değişimi irdelemek için, SAPK/JNK, c-Jun ve c-Fos ekspresyon düzeylerindeki değişim Western Blot tekniği ile incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, MCF-7 hücrelerinde serotoninin SAPK/JNK ekspresyon düzeyini 1,4 kat artırdığını, buna karşın c-Jun ekspresyon düzeyini ciddi oranda azalttığı gözler önüne serilmiştir. Bununla birlikte, MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben c-Fos ekspresyon düzeyinde azalış gözlenirse dahi, bu azalışın kayda değer oranda olmadığı gözler önüne serilmiştir (Şekil 45). MDA-MB-231 hücrelerinde ise, serotonin uygulamasını takiben SAPK/JNK ekspresyon düzeyinde kontrole göre ciddi bir değişim gözlenmemiştir. Buna karşın, c-Jun ve c-Fos ekspresyon düzeyinde kontrole göre azalış gözlenmiştir, ancak MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben c-Jun ifade düzeyindeki azalışın, MDA-MB-231 hücrelerindeki azalışa göre çok daha ciddi oranda olduğu gözler önüne serilmiştir (Şekil 44).



Şekil 44. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin JNK MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniğı ile gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

3.3.2.5.3. Serotoninin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde EMT sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterimi

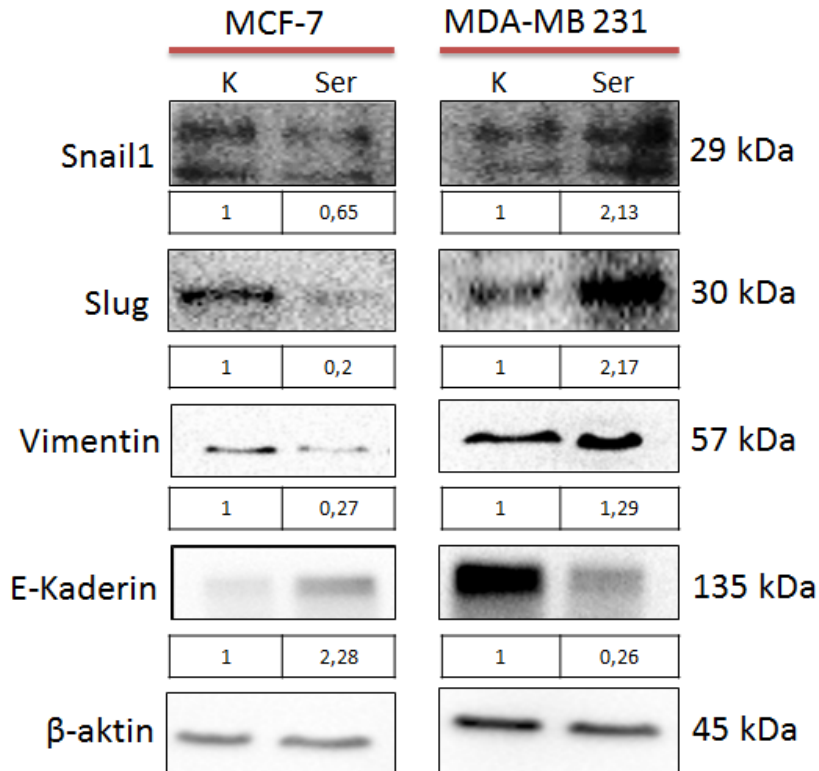
Epitel hücrelerin hareket edebilen mezenşimal hücrelerine transdiferansiyon süreci epitelyal–mezenşimal dönüşümü (EMT) olarak bilinmekte olup, kanser progresyonunda rol almaktadır. EMT süreci Raf/MEK/ERK, p38 MAPK, JNK ve Wnt sinyal yollarının da içinde bulunduğu birçok sinyal yolağı ile regüle edilmektedir. Raf/MEK/ERK, p38 MAPK ve JNK sinyal yolları, NF- κ B aracılığıyla EMT için gerekli olan SNAIL ekspresyonunu tetiklemektedir. Bununla birlikte, indüklenen Akt yolağı GSK3 β 'nin inhibisyonuna neden olmakta ve böylelikle SNAIL ve β -katenin stabilizasyonunu sağlayarak EMT sürecine katkı sağlamaktadır.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin, PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK, p38 MAPK ve JNK sinyal yolları üzerindeki zıt etkisinin EMT sinyal yolağını etkileyip etkilemediğini incelemek için, mezenşimal markırı olarak bilinen vimentin, epitelyal markırı olarak bilinen E-

kaderin ve E-kaderin ekspresyonunu baskılayarak EMT sürecini tetiklediği bilinen Snail1 ve Slug (Snail2) proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben, Snail1 ve Slug ekspresyon düzeyinde kontrole göre ciddi bir azalış olduğu, buna karşılık E-kaderin ekspresyon düzeyinde kontrole göre 2,3 kat artış olduğu ortaya çıkarılmıştır. Buna karşılık MCF-7 hücrelerinde mezenşimal hücrelerde ekspresyonu gözlenen vimentinin, serotonin uygulamasını takiben ifade düzeyinin ciddi oranda düşüş gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 45). Bu durum, serotoninin hücrelerde yalnızca hücre çoğalmasında değil, aynı zamanda metastaz kapasitesini de inhibe ettiğini gözler önüne sermiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde ise serotonin uygulamasını takiben, Snail ve Slug ekspresyon düzeyinde kontrole göre 2 kat artış olduğu, buna karşılık E-kaderin ekspresyon düzeyinde kontrole göre ciddi oranda azalış olduğu ortaya çıkarılmıştır. Buna karşılık, serotoninin vimentin ekspresyon düzeyinde kayda değer bir değişime neden olmadığı gözler önüne serilmiştir. Bu durum, MDA-MB-231 hücrelerinin metastaz kapasitesinin serotonin uygulaması ile tetiklendiğini gözler önüne sermiştir (Şekil 45).



Şekil 45. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde serotoninin epiteryal mezenşimal dönüşüm (EMT) sinyal yolağı üzerine etkisinin Western Blot tekniği ile gösterilmesi. 50 μ M konsantrasyonda serotonin uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen proteinlerle immunoblot analizi gerçekleştirilmiştir (K: Kontrol, Ser: Serotonin uygulanan).

4. TARTIŞMA

Karsinogenez, sayısız genin, proteinlerin, sinyal yollarının ve hücre tiplerinin koordineli etkileşimini gerektiren karmaşık bir süreçtir. Kanser nedeniyle her yıl birçok birey yaşamını yitirmektedir. Bilim adamlarının yaptığı tahminlere göre 2050' de 17 milyon kişinin kanserli teşhis edileceği tahmin edilmektedir; bu sebepten kanser araştırmalarında doğru moleküler hedeflerin tespit edilmesi gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır (Kamangar ve ark., 2006).

5-HT sinyalleşmesi pozitif ve negatif sonuçların sentezi olarak kanser hücrelerini etkilemesine rağmen, kanser hücreleri 5-HT sinyalleşmesinden kaçarak mikroçevrelerini basitleştiremezler. Endojen olarak serotonin sentezleyen epitel hücrelerinden farklı olarak, kanser hücreleri 5-HT sinyalini komşu hücreleri olan normal meme dokusu, normal kan dolaşımı ve tümör içindeki hemostatik plaklar olmak üzere en azından üç dış kaynaktan almaktadır (Ho-Tin-Noe ve ark., 2008). Dolayısıyla meme kanseri hücreleri için 5-HT sinyalleşmesinden kaçmaktansa sinyalleşmeyi değiştirme yeteneğini kazanmak avantajdır.

Kanserli farklı hücre tipleri arasında, serotonin sistemlerinin fonksiyonellik ve bileşenlerinde tahmini farklılıklar vardır. Bu farklılıklar hücrelerin daha fazla veya daha az 5-HT sentez etmesine yol açmaktadır. Meme tümörlerinde heterotipik 5-HT fizyolojisi epey bir karmaşa oluşturmaktadır, ancak ileriki çalışmalar serotoninin meme kanserlerinde terapötik olarak kullanılabilirliğinin aydınlatılmasında etkili olacaktır (Pai ve ark., 2009). Artan 5-HT biyosentez kapasitesiyle beraber, bu hücrelerde 5-HTR anlatımında çoklu değişimler ve insan meme kanseri hücrelerinin malignant progresyonunun da değişmesine neden olmaktadır. Serotonin, MCF-7 hücrelerinde mitojenik etki göstermektedir ve bu proliferatif etki kısmen 5-HT_{2A} reseptör alt kümesi tarafından yönlendirilmektedir (Sonier ve ark., 2006). Bu 5-HT'nin anti-mitojenik etkisi serumsuz koşullarda ortadan kaldırılmıştır fakat hücrelere estradiol veya prolaktin eklendiği zaman eskiye dönmektedir (Blask, D.E. ve S.M. Hill.,1986). Bu sebeple, 5-HT'nin MCF-7 hücrelerindeki mitojenik etkisinin serum varlığına ve diğer hormon veya büyüme faktörleriyle ilişkilerine bağlılığı oldukça olasıdır.

Yaptığımız çalışmada her 2 hücre hattının yarısının ölmesi için gereken serotonin dozu 50 µM olarak saptanmış ve çalışmalara bu şekilde devam edilmiştir. Serotoninin her iki meme kanseri hücre hattında sağkalım üzerine zamana bağlı etkisini incelemek üzere yapılan tripan mavisi ile boyama yöntemi sonucunda, serotoninin MCF-7 hücrelerinde ilk 24 ve 48 saat sonucunda hücre canlılığı kontrol hücrelerine göre azalırken, 72 ve 96 saat sonunda hücreler sonrasında tekrar kontrol seviyesine yükselmiştir. Bu durum, serotoninin MCF-7 hücrelerindeki hücre

büyümesini inhibe edici etkisinin kısa süreli olup, 48 saat sonrasında serotonin etkisinin ortadan kalktığını göstermiştir. Buna karşın, serotoninin MDA-MB-231 hücre canlılığına ciddi bir etkisi olmadığı, hatta canlılığı kontrole göre az da olsa artırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde serotoninin her iki meme kanseri hücre hattında koloni oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde, serotonin etkisiyle MCF-7 hücrelerinin koloni çaplarında azalış gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinin koloni çaplarında serotonine bağlı olarak ciddi oranda bir değişim gözlenmediği ortaya çıkarılmıştır. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında 50 µM serotoninin MCF-7 hücrelerinde apoptotik süreci tetikleyebileceği, fakat MDA-MB-231 hücrelerinin bir şekilde bu etkiden kurtulmayı başardığı düşünülmüştür. Bu öngörünün doğruluğunu incelemek adına, apoptotik belirteç olarak bilinen PI ve DAPI boyamaları yapılarak floresan altında hücrelerdeki değişimler irdelenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde PI boyama yapıp floresan mikroskopu altında yapılan incelemeler sonucunda, serotonin uygulamasını takiben ilk 24 saat boyunca apoptotik hücre ölümünde ciddi bir artış gözlenirken, 48 saat sonrasında hücre ölümünde azalış meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. Buna karşılık, MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünde herhangi bir değişim olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Her iki hücre hattından elde edilen bu sonuç, apoptotik hücre belirteci olan DNA kırıklarını boyayan DAPI boyama yöntemi ile bir kez daha doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra, her iki hücre hattında da serotoninin otofajik süreci tetikleyip, tetiklemediği incelenmiştir. Bunun için her iki hücre hattında da, otofajik belirteç olarak bilinen asidik vakuoller hedef alan akridin orange boyaması yöntemine başvurulmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben asidik vakuol oluşumunun tetiklendiği, ancak MDA-MB-231 hücrelerinde asidik vakuol oluşumunda ciddi bir artış gözlenmediği ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlar, MCF-7 hücrelerinin serotoninin etkisinden 48 saat sonunda kurtulmasının nedenini ortaya koymuştur.

Hücre bölünmesinin doğru bir şekilde sağlanabilmesi için, hücre döngüsü birçok mekanizma tarafından kontrol edilmekte olup, bu mekanizmalar siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK), CDK inhibitörleri ve fosforilasyon olayları ile sağlanmaktadır. CDKlar kendi başlarına inaktif olup, kendilerine özgü siklinlere bağlandıklarında aktifleşir. Hücre devri G1, S, G2 ve mitoz fazlarından oluşmaktadır ve hücre döngüsünün farklı fazlarında farklı siklin/CDK komplekslerinin etkinliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Üç farklı D tip siklin (siklin D1, siklin D2 ve siklin D3), CDK4 ve CDK6 proteinlerine bağlanma kapasitesine sahip olup, oluşturdukları CDK/siklin kompleksleri tarafından G1 fazına giriş sağlanmaktadır. Diğer siklinlerden farklı olarak, siklin D periyodik bir şekilde ifade edilmemekte, ancak büyüme faktörü tarafından

uyarılmasına bağı olarak sentezi gözlenmektedir. G1 fazında rol alan diğ bir siklin olan, siklin E CDK2 ile etkileşim göstererek, G1 fazından S fazına geçişi düzenlemektedir. Siklin A CDK2'ye bağlanabilmekte olup, bu birliktelik S fazı boyunca etkisini sürdürmektedir. Ayrıca geç G2 fazı ve erken M fazında siklin A proteininin, CDK1 ile oluşturduğu kompleks M fazına girişi desteklemektedir. Mitoza girişin sağlanmasının ardından, mitoz evresinin düzenlenmesi, siklin B/CDK1 kompleksleri tarafından sağlanmaktadır CDK aktivitesi, CDK inhibitörleri (CDI) olarak adlandırılan hücre devri inhibitör proteinleri (p15, p18, p19, p21, P27) tarafından etkisiz hale getirilebilmekte olup, CDK inhibitörleri sadece CDK'ya bağlanabildiği gibi CDK-siklin kompleksleri ile etkileşime geçerek de etkisini gösterebilmektedir.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin hücre devri üzerine etkileri PI boyasını takiben akış sitometrisinde incelendiğinde, serotoninin subG1 fazındaki hücre miktarında artışa yol açtığı ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben, S ve G2/M fazındaki hücrelerin yüzdesinde azalış gözlendiği ortaya çıkarılmıştır. Bu durum, serotoninin MCF-7 hücrelerinin G1 evresinde tutulmasına yol açtığını ortaya çıkarmıştır ve hücreler S ve G2/M evrelerine geçiş sağlayamamaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin hücre devrine etkisi incelendiğinde ise, serotonin uygulanan hücrelerde subG1 fazındaki hücre miktarında artış gözlenirse dahi S ve G2/M fazındaki hücre miktarında kontrole göre bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Bu durum, MDA-MB-231 hücre popülasyonunun büyük bir çoğunluğunun serotonin uygulamasını takiben hücre devri progresyonunun devam ettiğini gözler önüne sermiştir. Serotonin uygulamasını takiben MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre siklusunda gözlenen zıt etkinin altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatmak için hücre devrini düzenleyen siklin ve CDK proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde farklı şekilde değişim gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasıyla CDK4, CDK5 ve CDK2 miktarında artış görülürken, SiklinD1 ve Siklin D3 miktarında önemli bir değişim olmamıştır. Buna karşın, MDA-MB-231 hücre hattında ise SiklinD1, CDK2 ve CDK5' in miktarı 50 µM serotonin uygulamasıyla beraber artış gösterirken, CDK4 ve Siklin D3 ekspresyon miktarında önemli bir değişim olmamıştır. Diğ yandan her 2 hücre hattında da serotonin uygulamasıyla beraber p53 miktarında artış saptanmıştır. MCF-7 hücre hattında serotonin uygulamasıyla beraber p18 ekspresyonunda azalma görülürken, p21 ve p27 ekspresyonunda kayda eğer bir değişim saptanmamıştır. Buna karşılık, MDA-MB-231 hücre hattında ise p18 ifade düzeyinde serotonine bağı olarak azalma gözlenirken, serotonin uygulamasıyla p21 ve p27 ifade düzeyinde dikkate değer bir artış meydana gelmiştir. Serotoninin özellikle G1'den S fazına geçişte önemli rol aldığı bilinen siklinD1 proteininin

ifade düzeyini MDA-MB-231 hücrelerinde ciddi oranda artırırken, MCF-7 hücrelerinde herhangi bir değişimin gözlenmemesi MDA-MB-231 hücrelerinde hücre devrinin progresyonu devam ederken, MCF-7 hücrelerinin G1 fazında tutulu kalmasına sebep olduğunu düşündürmüştür. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben ciddi artış gözlenen subG1 fazı, apoptotik hücrelerde gözlenen DNA kırıklarının yol açtığı bir durumdur. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin apoptotik süreci ne ölçüde tetiklediğini incelenmiştir. Bunun için AnneksinV/PI ikili boyamasının ardından akış sitometrisi kullanılmış ve popülasyondaki sağlıklı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarındaki değişimler incelenmiştir. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben sağlıklı hücre sayısında ciddi bir azalış gözlenmese dahi, geç apoptotik evredeki hücre miktarında serotonin dozuna bağlı olarak artış gözlendiği ortaya çıkarılmıştır. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin sağlıklı hücre popülasyonunu etkilemediği hatta az da olsa sağlıklı hücre miktarında artış gözlendiği ortaya çıkarılmıştır ve bununla birlikte MDA-MB-231 hücrelerinde serotonin dozuna bağlı olarak apoptotik hücre popülasyonunda artış gözlenirse dahi bu artışın kayda değer bir düzeyde olmadığı gözler önüne serilmiştir.

Homeostatik bir hücrede apoptozu indükleyen ve apoptozu baskılayan genler düzen içindedir. Bu düzende meydana gelen bir bozukluk apoptoz mekanizmasının inhibe olmasına ve hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesine sebep olmaktadır; bu nedenle apoptozun indüklenmesi için kullanılan kemoterapötik ajanlar kanser hücrelerinin programlı olarak ölmeleri için potansiyel bir hedef olarak araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu yapıların biyolojik moleküller olması da bu alana olan ilgiyi oldukça artırmaktadır. Bu kemoterapötik ajanlar, tek başlarına ya da kombinasyonel terapi olarak adlandırılan bir arada kullanılarak kanser hücrelerinde en az yan etki ile apoptozu indüklerler. PARP, DNA tamirinde önemli olup, enzimin yıkımı DNA onarımını engeller. PARP aynı zamanda DNA'yı apoptoz boyunca parçalayan endonükleazları inhibe etmektedir. Meme kanseri hücrelerinde apoptotik bir belirteç olan PARP anlatımı immünoablota ile belirlenmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında kontrol grupları ve serotonin uygulanan gruplarda PARP fragmentlere ayrılmamıştır. İmmünoablota sonucuna göre, MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulandığı zaman kontrole kıyasla PARP ifade düzeyi azalmaktadır. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde ise serotonin uygulandığı zaman kontrole kıyasla PARP ifade düzeyi beklendiği şekilde artmaktadır. Serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde PARP ifade düzeyindeki azalışın nedeninin, serotoninle tetiklenen kaspaz kaskat sinyali yolağının PARP enzimini yıkarak inhibe etmesi olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, serotonin uygulanan MDA-MB-231

hücrelerindeki artan PARP ifade düzeyi ise, MDA-MB-231 hücrelerinin apoptozdan kurtulmaya çalıştığını ortaya koymaktadır. Serotonin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında apoptotik sürecin tetiklenmesi üzerine yol açtığı iki zıt etkinin altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatılabilmek adına, her iki hücre hattında da serotoninin PI3K/Akt/mTOR, MAPK ve EMT sinyal yollarına etkisi irdelenmiştir.

Akt (protein kinaz B) Akt1 ve Akt2 genleri aracılığı ile kodlanır ve Serin/treonin kinaz ailesindedir. Hücresel işlev olarak apoptoz, proliferasyon, transkripsiyon, hücre döngüsü gibi süreçlerde fazlasiyla roller alır. Akt'ın aktif olması PI3K tarafından fosforile edilmesiyle gerçekleşir. Bazı GPCRlar ya da TrkBlerin uyarımı fosfotidil inositol sinyal yolağı üzerinden PI3K aktivitesini arttırıp Akt'ın fosforilasyonu ile beraber aktivasyonunu sağlar. Diğer yandan Akt proteinin PI3K yolağı üzerinden GSK-3 inhibesine zıt yönde işleyen β -arrestine bağlı farklı bir yolda işlev göstererek aktivitesinin inhibe olmasıyla GSK-3'ün aşırı aktifleşmesine sebebiyet verir (Şahin ve ark., 2014).

İnhibitör GPCRlar ve TrkB reseptörlerinin uyarımı PI3K/Akt yolağının uyarılması ile sonuçlanır. Reseptör uyarımı fosfoinositol yolağını kullanarak PI3K aracılı Akt fosforilasyonu ve aktivitesini sağlamakta, aktifleşen Akt ise kinaz aktivitesiyle GSK-3'ü N-terminalindeki Ser kalıntısı üzerinden fosforlayarak inaktif hale getirmektedir. İnhibitör GPCR yapılarından olan 5-HT1A reseptörlerinin faaliyetlerini arttırarak PI3K/Akt yolağı aracılı GSK-3 inhibisyonuna sebep olduğu da kanıtlanmıştır (Jope ve Roh, 2006).

Serotonin uygulanan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR ve MAPK yolağındaki proteinler ekspresyonel olarak farklı cevaplar vermiştir. Elde edilen sonuçlar, serotoninin her iki meme kanseri hücre hattında da mTORC2 aktivitesini engellediğini, ancak PI3K yolağını yalnızca MCF-7 hücrelerinde inhibe ederken, MDA-MB-231 hücrelerinde PI3K yolağının serotonininden etkilenmediği ortaya çıkarılmıştır. Serotoninin her iki meme kanseri hücre hattındaki PI3K/Akt yolağı üzerine yol açtığı zıt etkisinin, tümör baskılayıcı bir protein olarak işlev gören GSK3 β üzerinde nasıl etki ettiğini incelemek için immünoiblottama tekniğine başvurulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, serotonin uygulamasının ardından MCF-7 hücrelerinde GSK3 β 'nin inaktif formu p-GSK3 β 'nin ifade düzeyi yarı yarıya azaldığı, MDA-MB-231 hücrelerinde ise GSK3 β 'nin fosforile formunun ifade düzeyinde kontrol hücrelerindeki göre ciddi artış gösterdiği bulunmuştur. Bununla birlikte, GSK3 β tarafından kontrol ettiği bilinen β -katenin ifade düzeyinin ise, MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben kontrole göre değişim göstermediği, buna karşın MDA-MB-231 hücrelerinde 1,5 kat

artışa yol açtığı ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular, serotonin uygulamasını takiben MDA-MB-231 hücrelerinde siklinD1 ekspresyon düzeyindeki artışın, buna karşılık MCF-7 hücrelerinde serotoninin siklinD1 ifadesine etki etmeyişinin nedenini ortaya çıkarmıştır.

mTOR hücrede translasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir kinaz olup, mTOR aşırı aktivasyonu tümör oluşumuna neden olmaktadır. Aktive olan mTORC1 alt yolunda bulunan 4E-BP1 ve p70S6K aracılığıyla hücre büyümesi, hücre devrinin progresyonunu ve hücrenin metabolizmasında gerekli proteinlerin mRNA ribozomal çevirimini sağlamaktadır. Hücre çoğalmasının durduğu basamakta, etkinleşmemiş 4E-BP1 eIF4E'ye bağlanarak, protein translasyonunun oluşmasını durdurmaktadır. Büyüme etmenleri gibi uyarıcıların etkisiyle 4EBP1'in mTORC1 tarafından fosforilasyonu gerçekleşmekte ve eIF4E'nin 4EBP1'den ayrılmasını sağlamaktadır.. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasıyla p-4EBP1 ve p70S6K ekspresyonunda azalma görülmüştür. Buna karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin p-4EBP1 ve p70S6K ekspresyon düzeyini etkilemediği ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuç, MCF-7 hücrelerinde serotoninle otofajik sürecin tetiklenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde asidik vakuol oluşumunun gözlenmemesinin nedenini gözler önüne sermiştir.

MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulamasını takiben ERK MAPK sinyal yolağında rol alan proteinlerin downregülasyonu gerçekleşirken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise upregüle olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, stresle aktive edildiği bilinen diğer MAPK sinyal yolağı ailesi olan p38 MAPK sinyal yolağı üyelerinin, serotonin uygulaması ardından MCF-7 hücrelerinde aşırı ifadesi ve aktivasyonu gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise herhangi bir değişim meydana gelmediği ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte stresle tetiklenen ve hücrenin büyümesi için gerekli transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücrelerin apoptozdan kurtulmasını sağlayan bir diğer MAPK sinyal yolağı ailesi JNK sinyal yolağındaki değişimler de incelenmiştir. Her iki meme kanseri hücrelerinde de serotonin uygulamasını takiben SAPK/JNK ekspresyon düzeyinde kayda değer bir değişim gözlenmemiştir, ancak JNK aktivasyonu ile dimerizasyonu gerçekleştiği bilinen c-Jun ve c-Fos ekspresyon düzeyinin serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde ciddi oranda azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca serotonin uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde de aynı MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi c-Jun ve c-Fos ekspresyon düzeyinde azalış gözlendiği, fakat MCF-7 hücrelerinde gözlenen ifade düzeyindeki azalışın MDA-MB-231 hücrelerine göre çok daha ciddi düzeyde olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlar, serotonin uygulamasını takiben MCF-7 hücrelerinde gözlenen apoptotik artışa karşın, MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen canlılığın nedenini bir kez daha gözler önüne sermiştir

Kanser hastalarında metastaz, kanser sebepli ölümlerin başlıca nedeni olduğundan dolayı bu süreçte rol alan moleküler partnerlerin ve hücrel yapıların bilinmesi ile sağlıklı hücrelere zarar verilmeden en etkin terapilerin yapılabilmesi kanser moleküler biyolojisinin daimi hedefleri arasındadır. Metastatik süreçte rol alan hedeflerin en doğru şekilde belirlenmesiyle kanser hastalarının yaşam kalitesi ve ömrü istenilen düzeyde artırılabilir, hastalar sağlıklı bir yaşam sürebileceklerdir. 5-HT1B ve 5-HT1D reseptörleri, E-kaderinin up-regülasyonu ile ilişkilidir. Sinyalleşmeye ve EMT sürecine yol açan β 1 integrin-aracılı proliferasyon/invazyonun aktivasyonu ile 5-HT1B ve 5-HT1D reseptörlerinin ilişkili olduğu önerilmiştir (Gürbüz ve ark., 2014). Bu reseptörler pro-tümörjenik sinyallerinin yeni önemli düzenleyicileridir. Serotonin uygulamasının metastazda rol alan proteinlerin ekspresyonuna nasıl etki ettiğini görmek için immunoblotlama yapılmıştır.

Epitel hücrelerin hareket edebilen mezenşimal hücrelerine transdiferansiyon süreci epitelyal–mezenşimal dönüşümü (EMT) olarak bilinmekte olup, kanser progresyonunda rol almaktadır. EMT süreci Raf/MEK/ERK, p38 MAPK, JNK ve Wnt sinyal yollarının da içinde bulunduğu birçok sinyal yolağı ile regüle edilmektedir. Raf/MEK/ERK, p38 MAPK ve JNK sinyal yolları, NF- κ B aracılığıyla EMT için gerekli olan SNAIL ekspresyonunu tetiklemektedir. Bununla birlikte, indüklenen Akt yolağı GSK3 β 'nin inhibisyonuna neden olmakta ve böylelikle SNAIL ve β -katenin stabilizasyonunu sağlayarak EMT sürecine katkı sağlamaktadır.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde serotoninin, PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK, p38 MAPK ve JNK sinyal yolları üzerindeki zıt etkisinin EMT sinyal yolağını etkileyip etkilemediğini incelemek için, mezenşimal markırı olarak bilinen vimentin, epitelyal markırı olarak bilinen E-kaderin ve E-kaderin ekspresyonunu baskılayarak EMT sürecini tetiklediği bilinen Snail1 ve Slug (Snail2) proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, MCF-7 hücrelerinde mezenşimal markırların ifade düzeyinde azalış gözlenirken, serotoninin MDA-MB-231 hücrelerinde mezenşimal markırların ifade düzeyini artırdığı ortaya çıkarılmıştır.

Sonuç olarak, bu araştırma kapsamında elde edilen bulgular, serotonin MCF-7 hücreleri üzerinde apoptotik bir ajan gibi etki ederken, MDA-MB-231 hücrelerinde mitojenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Serotoninin iki farklı meme kanseri hücre hattında yol açtığı bu iki zıt durumun altında yatan moleküler mekanizmalar incelendiğinde, serotoninin MCF-7 hücrelerinde hücre büyümesinde rolü olan PI3K/Akt/mTOR ve MAPK sinyal yollarını downregüle ederken, MDA-MB-231 hücrelerinde bu sinyal yollarını etkilemediği hatta bazı

durumlarda upregüle ettiği ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, serotoninin MCF-7 hücrelerinde EMT sinyal yolağının negatif yönde regülasyonuna neden olurken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise EMT sinyal yolağını tetiklediği gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, MCF-7 hücrelerinde HTR1D, HTR1E, HTR1F, HTR2B ve HTR2C reseptörleri bulunurken, MDA-MB-231 hücrelerinde HTR1D, HTR1F, HTR2B ve HTR7 reseptörleri bulunmaktadır (Pai ve ark., 2009). Her iki meme kanseri hücre hattında ortak reseptörler bulunsa dahi, MCF-7 hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerinden farklı olarak HTR2C reseptör ifadesi gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise HTR7 ifadesi olduğu gözlenmektedir. Serotoninin hücreler üzerindeki bu iki zıt etkisinin, iki farklı meme kanseri hücre hattında farklı reseptörlere bağlanarak zıt sinyal yollarını aktive etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda bu iki reseptörün iletişim halinde olduğu ve tetiklediği sinyal yollarının daha detaylı bir şekilde araştırılması, serotoninin terapötik açıdan kullanışlı olup, olmayacağını belirleyebilecektir. Bu kapsamda;

- 5-HT'nin; ROS oluşumu, poliamin metabolizması ve otofaji üzerine etkisi,
- 5-HT'nin farklı hücre hatlarındaki sağkalım-ölüm belirteçleri üzerine etkisi,
- 5-HT'nin model organizmalar üzerindeki etkisi incelenmelidir.

5. EKLER

EK A. Hücre Kültürü

Tablo 2. Kullanılan hücre kültürü donanımları.

Ürün Adı	Firma	Katalog Numarası
25 cm ² büyütme kabı	TPP	90026
75 cm ² büyütme kabı	TPP	90076
100 mm petri	TPP	93100
60 mm petri	TPP	93060
6 kuyucuklu petri	TPP	92012
12 kuyucuklu petri	TPP	92006
96 kuyucuklu petri	TPP	92096
10 ml steril pipet	TPP	94010
5 ml steril pipet	TPP	94005
Şırınga filtresi (0.22 µm)	TPP	99722
Kriyoviyal tüp	NUNC	V7634
DMEM besiyeri	Gibco	
Fetal Bovine Serum	Pan Biotech	P291509
Trypsin- EDTA	Pan Biotech	P10- 0231
Penisilin- Streptomisin	Pan Biotech	P06- 07100
MCF- 7 hücre hattı	ATCC	HTB 22
MDA-MB-231 hücre hattı	ATCC	HTB 26

EK B. Kullanılan Cihazların Listesi

Tablo 3. Deneylede Kullanılan Cihazların Listesi

Ürün Adı	Firma	Katalog Numarası
Buzolabı (no-frost özellikli)	Arçelik	4263TMB
Derin dondurucu	Arçelik	2041D
Dikey akışlı Güvenlik kabini	Thermo Scientific	Hera Safe
Distile su cihazı	TKA- Pasific	D56412

Dondurucu (-80°C)	Ultra Low New Brunswick	
Elektroforez sistemi	Bio-Rad	165-8000
Elektroforez transfer sistemi	Bio-Rad	170-4155
Floresan ataçmanlı invert mikroskop	Olympus	DP71
Fluorometre	Thermo Scientific	FluoroSkan
Güç Kaynağı	BioRad	PowerPac/B
Hassas Terazi	Sartorius	LE6202S
Hemasitometre	Sigma Aldrich	Z359629
HPLC	Agilent	1200 series
Invert mikroskop	SOIF	XDS-1B
Inkubatör	Nüve	EN 025
Kantitatif eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı	BioRad	PTC- 1148C
Kar- buz makinesi	ScotsMan	AF80
Manyetik karıştırıcı	Stuart/ ProLab	SB162
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf	5417R
Mikropipet (0,5µl-10µl)	Thermo	EH52836
Mikropipet (2µl-20µl)	Thermo	CJ17240
Mikropipet (20µl-200µl)	Thermo	EH46925
Mikropipet (200µl-1000µl)	Thermo	T27274
Mikroplaka okuyucu	BioRad	680
Otoklav	Nüve	OTO32
pH metre	SEM/ Mettler	N315
PVDF membran	Thermo Scientific	88518
Sıvı azot koruma ve azot ikmal tankı	Air Liquid	Arpege 40
Spektrofotometre	UltraSpec Biosciences	117
Tartı	Sartorius	LE6202S
Tüp Rotasyon Aleti	Stuart	SRT9D
Vorteks	Stuart/ ProLab	SA8

EK C. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 4. Laboratuvarıda kullanılan kimyasallar.

Ürün Adı	Firma	Katalog Numarası
10X PBS	Pan Biotech	P04-53500
2-merkaptoetanol	Merck	S4805940517
30% Akrlamid / Bis-Akrlamid	Sigma Aldrich	A3699
APS	Sigma Aldrich	A3678
DAPI	InVitrogen	D1306
Dioc6	Fluka	2129966
Dimetilsülfoksit	Sigma Aldrich	D5879
DTT	Sigma Aldrich	D0632
EDTA	Sigma Aldrich	A3542
Etanol	Sigma Aldrich	A3452
Glisin	AppliChem	A1067
Hidrojen Peroksit	MERCK	K39218400838
İzopropanol	Rieel-de Haen	24137
Laemmlı Tamponu	Sigma Aldrich	S3401
Luminol	Sigma Aldrich	A8511
Metanol	Sigma Aldrich	24229
MTT tuzu	SIGMA	M2003-119
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas	SM0671
PI	AppliChem	A2261
Protein İzolasyonu Tamponu	Fermentas	K0301
Saf etanol	Rieel-de Haen	32221
SDS	AppliChem	A3452
Serotonin Hidroklorid	SIGMA	H9523
Sığır Serum Albumini	BioRad	500-0007
Sodyum Klorür	AppliChem	A2942
TEMED	AppliChem	A1148
Tris Base	AppliChem	A2264

Tris- HCl	AppliChem	A3452
Tween 20	MERCK	S4927784802
Yağsız süt tozu	Cell Signaling	9999
Yükleme standart antikorları	Cell Signaling	5142

EK D

Çözeltilerin Hazırlanması

Hücre lizis tamponu: 10 ml

150 mM NaCl

% 1 NP-40

50 mM Tris-HCl

Yukarıda verilen kompozisyon distile su içerisinde çözüldükten sonra pH 8.0'a ayarlanır. Lizis tamponu -20°C'de saklanır ve kullanmadan önce içerisine 1 mM PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) ve proteaz inhibitör kokteyli eklenir. 1 mM PMSF metanol içerisinde çözerek taze olarak hazırlanır ve kullanılır. Proteaz inhibitör kokteylinin hazırlanması için her bir tablet 1 ml steril PBS veya distile su içerisinde çözüldükten sonra -20°C'de saklanır. Kullanılacak olan her 1 ml lizis tamponu için 50µl kokteyl eklenmesi gerekmektedir.

10X TBS Hazırlanışı

86,6 g NaCl, 12,11 g Tris-Baz konular pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml' e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için 1X TBS' e dönüştürülür.

TBS-Tween Hazırlanışı

1X TBS içine 500 µl Tween 20 konularak hazırlanır.

Yağsız süt tozu (% 5(w/v)): 50 ml

Süt tozu 2,5 g tartılır ve 50 ml 'ye kadar TBS-T ile tamamlanır. Vorteksin ardından bloklama için kullanıma hazırdır.

0,5 M Tris-HCl (pH 6.8): 100 ml

6 g Tris bazı 60 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 6 N HCl kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav ile steril edilerek saklanır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 150 ml

27.23 g Tris bazı 80 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 6 N HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlanır. Hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav ile steril edilerek saklanır.

% 10 (w/v) APS (amonyum persulfat): 10 ml

1 gr APS 10 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanır. APS'nın taze kullanılması gerektiği için -20°C'de saklanır ve kullanılmadan hemen önce çözdürülür.

Yürütme Tamponunun Hazırlanışı

30,3 g Tris-Baz, 114 g Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1000ml distile su içinde çözünür. Hazırlanan 10X yürütme tamponu hazırlanır. Jel yürütmesi sırasında kullanılmak için 1X' e dönüştürülür.

Transfer Tamponunun Hazırlanışı

200 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 100 ml metanol konularak distile su ile 1000 ml' e tamamlanır.

Yürütme Jelinin Hazırlanması

Proteinler ağırlıklarına göre ayrılmaları için % 12-15' lik SDS poliakrilamid jelde yürütülürler.

6. KAYNAKÇA

Abeloff MD. Cancer of the breast, Abeloff's Clinical Oncology, 4th ed. Philadelphia, Pa., Churchill Livingstone Elsevier; 1875, 2008.

Aghajanian GK. and Marek GJ. Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. *Brain Res.*, 825: 161 – 171, 1999.

Ahmad S. and Jensen RA. New prospects for deducing the evolutionary history of metabolic pathways in prokaryotes: aromatic biosynthesis as a case-in-point. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 18: 41– 57, 1998.

Ahmed BA., Jeffus BC., Bukhari SI., Harney JT., Unal R., Lupashin VV., Van Der Sluijs P. and Kilic F. Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C terminus of serotonin transporter. *J. Biol. Chem.* , 283: 9388 – 9398, 2008.

Alexander FW. , Sandmeier E., Mehta PK. and Christen P. Evolutionary relationships among pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families. *Eur. J. Biochem.*, 219: 953– 960, 1994.

Aoyagi M., Arvai AS., Ghosh S., Stuehr DJ., Tainer J A. and Getzoff ED. Structures of tetrahydrobiopterin binding-site mutants of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer and implicated roles of Trp457. *Biochemistry*, 40: 12826– 12832, 2001

Asada M., Ebihara S., Yamanda S., Niu K., Okazaki T., Sora I., Arai H. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia*; 11: 408-17, 2010.

Asano T., Morishita R., Ueda H., Asano M., Kato K. GTPbinding protein γ 12 subunit phosphprylation by protein kinase C. Identification of the phosphorylation site and factors involved in cultured cells and rat tissues in vivo. *Eur J Biochem.*, 251: 314-319, 1998.

Audenaert K., Peremans K., Goethals I. and van Heeringen C. Functional imaging, serotonin and the suicidal brain. *Acta Neurol. Belg.*, 106: 125– 131, 2006.

Azmitia EC. Serotonin. *Neuroscience*, EIS: 1- 13 ,2012.

Azmitia EC. and Nixon R. Dystrophic serotonergic axons in neurodegenerative diseases. *Brain Res.*, 1217: 185– 194, 2008.

Azmitia EC. Cajal and brain plasticity: insights relevant to emerging concepts of mind. *Brain Res. Rev.*, 55: 395 – 405, 2007.

Azmitia EC. *Handbook of Behavioral Neurobiology of serotonin*. Academic Press is an imprint of Elsevier, San Diego, USA, 2010.

Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* , 56: 413– 424, 2001.

Azmitia EC. Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology*, 21: 33 – 45, 1999.

Bachmann C. Mechanisms of hyperammonemia. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 40: 653– 662, 2002.

Backstrom JR., Price RD., Reasoner DT. and Sanders-Bush E. Deletion of the serotonin 5-HT_{2C} receptor PDZ recognition motif prevents receptor phosphorylation and delays resensitization of receptor responses. *J. Biol. Chem.*, 275: 23620 – 23626, 2000.

Banes AK., Shaw SM., Tawfik A ., Patel BP., Ogbi S., Fulton D. and Marrero MB. Activation of the JAK/ STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288: C805 – C812, 2005.

Barnes NM. and Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083 – 1152, 1999.

Barnes NM., Hales TG., Lummis SC. and Peters JA. The 5-HT(3) receptor – the relationship between structure and function. *Neuropharmacology*, 56: 273 – 284, 2009.

Bar-Peled O., Gross-Isseroff R., Ben-Hur H., Hoskins I., Groner Y. and Biegon A. Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neurosci. Lett.*, 127: 173 – 176, 1991.

Barthet G., Framery B., Gaven F., Pellissier L., Reiter E., Claeysen S., Bockaert J. and Dumuis A. 5-hydroxytryptamine 4 receptor activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway depends on Src activation but not on G protein or beta-arrestin signaling. *Mol. Biol. Cell.*, 18: 1979 – 1991, 2007.

Beaton DE., Schemitsch E. Measures of health-related quality of life and physical function. *Clin Orthop Relat Res.*; 413:90-105, 2003.

Beaudet A. and Descarries L. The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience*, 3: 851– 860, 1978.

Becamel C., Alonso G., Galeotti N., Demey E., Jouin P., Ullmer C., Dumuis A., Bockaert J. and Marin P. Synaptic multiprotein complexes associated with 5-HT (2C) receptors: a proteomic approach. *EMBO J.*, 21 : 2332– 2342, 2002.

Becamel C., Gavarini S., Chanrion B., Alonso G., Galeotti N., Dumuis A., Bockaert J. and Marin P. The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins . *J. Biol. Chem.*, 279: 20257– 20266, 2004.

Belelli D., Balcarek JM., Hope AG., Peters JA., Lambert JJ. and Blackburn TP. Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit. *Mol. Pharmacol.*, 48: 1054 – 1062, 1995.

Belenikina NS., Strakhovskaya MG. and Fraikin GY. Near-UV activation of yeast growth. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 10: 51– 55, 1991.

Bender E., Pindon A., Van Oers I., Zhang YB., Gommeren W., Verhasselt P., Jurzak M., Leysen J. and Luyten W. Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant. *J. Neurochem.*, 74: 478 – 489, 2000.

Benneyworth MA., Xiang Z., Smith RL., Garcia EE., Conn PJ. and Sanders-Bush E. A selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 2 blocks a hallucinogenic drug model of psychosis. *Mol. Pharmacol.*, 72: 477 – 484, 2007.

Berg KA., Harvey JA., Spampinato U. and Clarke WP. Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26: 625– 630, 2005.

Bhatnagar A. , Sheffler DJ., Kroeze WK., Compton-Toth B. and Roth BL. Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G α q-coupled protein receptors. *J. Biol. Chem.*, 279: 34614 – 34623, 2004.

Blask DE. and Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm Suppl.*, 21: p. 433-449, 1986.

- Bockaert J., Roussignol G., Becamel C., Gavarini S., Joubert L., Dumuis A., Fagni L. and Marin P. GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions . Biochem. Soc. Trans., 32: 851 – 855, 2004.
- Bockaert J., Claeysen S., Becamel C., Dumuis A. and Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell Tissue Res., 326: 553– 572, 2006.
- Bockaert J., Claeysen S., Compan V. and Dumuis A. 5-HT(4) receptors: history, molecular pharmacology and brain functions. Neuropharmacology, 55: 922 – 931, 2008.
- Bos JL., de Rooij J., Reedquist KA. Rap1 signalling: adhering to new models. Nat Rev Mol Cell Biol., 2: 369-377, 2001.
- Bouhelal R., Smounya L. and Bockaert J. 5-HT 1B receptors are negatively coupled with adenylate cyclase in rat substantia nigra. Eur. J. Pharmacol., 151: 189 – 196, 1998.
- Boularand S., Biguet NF., Vidal B., Veron M., Mallet J., Vincent JD. , Dufour S. and Vernier P. Tyrosine hydroxylase in the European eel (*Anguilla anguilla*): cDNA cloning, brain distribution, and phylogenetic analysis. J. Neurochem., 71:460 – 470, 1998.
- Boyer JL., Graber SG., Waldo GL., Harden TK., Garrison JC. Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein α - and $\beta\gamma$ -subunits. J Biol Chem., 269: 2814-2819, 1994.
- Boyle JP. and Yoshino TP. Serotonin-induced muscular activity in *Schistosoma mansoni* larval stages: importance of 5-HT transport and role in daughter sporocyst production. J. Parasitol., 91: 542– 550, 2005.
- Boyle P. and Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol.; 16: 481-488, 2005.
- Brattelid T., Kvingedal AM. , Krobert KA. , Andressen KW., Bach T., Hystad ME., Kaumann A.J. and Levy FO. Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT4 receptor splice variant, 5-HT4(i). Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 369: 616 – 628, 2004.
- Brodie BB. and Shore PA. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. Ann. NY Acad. Sci., 66: 631– 642, 1957.

Bruss M., Barann M., Hayer-Zillgen M., Eucker T., Gothert M. and Bonisch H. Modified 5-HT_{3A} receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT_{3A} receptor isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 362: 392 – 401, 2000.

Bushfield M., Murphy GJ., Lavan BE., Parker PJ., Hruby VJ., Milligan G., Houslay MD. Hormonal regulation of Gi₂ α -subunit phosphorylation in intact hepatocytes. *Biochem J.*, 268: 449-457, 1990.

Cancerbackup 2006. Macmillan Cancer Support. (<http://www.canceractive.com/cancer-active-page-link.aspx?n=356>)

Carrel D., Masson J., Al Awabdh S., Capra CB., Lenkei Z., Hamon M., Emerit MB. and Darmon M. Targeting of the 5-HT_{1A} serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B. *J. Neurosci.*, 28: 8063– 8073, 2008.

Casey PJ. Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans.*, 23: 161-166, 1995.

Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science*, 268: 221-225, 1995.

Ceber E., Soğukpınar N., Mermer G., Aydemir G. Nutrition, lifestyle, and breast cancer risk among Turkish women, *Nutr Cancer*; 53: 152-9, 2005.

Chamas F. and Sabban E.L. Role of the 5' untranslated region (UTR) in the tissue-specific regulation of rat tryptophan hydroxylase gene expression by stress. *J. Neurochem.*, 82: 645 – 654, 2002.

Chan AM., Fleming TP., McGovern ES., Chedid M., Miki T., Aaronson SA. Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 762- 768, 1993.

Chao MY., Komatsu H., Fukuto HS., Dionne HM. and Hart AC. Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a *Caenorhabditis elegans* chemosensory circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 15512– 15517, 2004.

Chen CA., Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*, 20: 1643-1652, 2001.

Chen G-L. and Miller GM.. Rhesus monkey tryptophan hydroxylase-2 coding region haplotypes affect mRNA stability. *Neuroscience*, 155: 485 – 491, 2008.

Clavel- Chapelon F. and E3N group. Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women. *Cancer Causes Control*; 13: 831–838, 2002.

Cooke TJ., Poli D., Szein AE. and Cohen JD. Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol. Biol.*, 49 :319– 338, 2002.

Cowen DS., Johnson-Farley NN. and Travkina T. 5-HT receptors couple to activation of Akt, but not extracellular- regulated kinase (ERK), in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.*, 93: 910 – 917, 2005.

Crane JW., Shimizu K., Carrasco GA., Garcia F., Jia C., Sullivan NR., D'Souza DN., Zhang Y., Van De Kar LD., Muma NA. and Battaglia G. 5-HT 1A receptors mediate (–)8-OH-DPAT-stimulation of extracellular signalregulated kinase (MAP kinase) *in vivo* in rat hypothalamus: time dependence and regional differences. *Brain Res.*, 1183: 51 – 59, 2007.

Cussac D., Newman-Tancredi A., Duqueyroi D., Pasteau V. and Millan MJ. Differential activation of Gq/11 and Gi(3) proteins at 5-hydroxytryptamine(2C) receptors revealed by antibody capture assays: influence of receptor reserve and relationship to agonist-directed trafficking. *Mol. Pharmacol.*, 62: 578 – 589, 2002.

D' Souza UM. and Craig EW. Chapter 1. 2. Genetic organization of serotonergic system. Page:23- 47. Azmitia EC. *Handbook of Behavioral Neurobiology of serotonin*. Academic Press is an imprint of Elsevier, Edt.1. San Diego, USA, 2010.

D'Souza UM. and Craig IW. Functional genetic polymorphisms in serotonin and dopamine gene systems and their significance in behavioural disorders. *Prog. Brain Res.*, 172: 73 – 98, Heils A., Teufel A., Petri S., Stober G., Riederer P., Bengel D. and Lesch KP. Allelic variation of human serotonin transporter. *J. Neurochem.*, 66: 2621- 2624, 1996.

Dai Y., Dudek NL., Patel TB. and Muma NA. Transglutaminase-catalyzed transamidation: a novel mechanism for Rac1 activation by 5-hydroxytryptamine2A receptor stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326: 153 – 162, 2008.

De Maeyer JH., Aerssens J., Verhasselt P. and Lefebvre RA. Alternative splicing and exon duplication generates 10 unique porcine 5-HT₄ receptor splice variants including a functional homofusion variant. *Physiol. Genomics.*, 34: 22 – 33, 2008.

Della Rocca GJ., Mukhin YV., Garnovskaya MN., Daaka Y., Clark GJ., Luttrell LM., Lefkowitz RJ. and Raymond JR. Serotonin 5-HT_{1A} receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.*, 274: 4749– 4753, 1999.

Deogracias M., Jaime L., Camisón I., Zamacola I., Murillo Guibert J., Suescun García R, Rectal metastasis from lobular breast carcinoma 15 years after primary diagnosis, *Clin Transl Oncol*; 12: 150–153, 2010.

Dizeyi N., Bjartell A., Hedlund P., Tasken KA., Gadaleanu V., Abrahamsson PA. Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell line. *Eur Urol.*; 47: 895-900, 2005.

Dumuis A., Bouhelal R. , Sebben M. , Cory R. and Bockaert J. A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol. Pharmacol.*, 34: 880 – 887, 1988a.

Dumuis A., Bouhelal R., Sebben M. and Bockaert J. A 5-HT receptor in the central nervous system, positively coupled with adenylate cyclase, is antagonized by ICS 205 93. *Eur. J. Pharmacol.*, 146: 187 – 188, 1988 b.

Efimenko E., Blacque OE., Ou G., Haycraft CJ., Yoder BK., Scholey JM., Leroux MR. and Swoboda P. *Caenorhabditis elegans* DYF-2, an orthologue of human WDR19, is a component of the intraflagellar transport machinery in sensory cilia. *Mol. Biol. Cell*, 17: 4801– 4811, 2006.

Eom CS., Park SM., Cho KH. Use of antidepressants and the risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*; 136: 635-45, 2012.

Facchini PJ., Huber-Allanach KL. and Tari LW. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, and metabolic engineering application. *Phytochemistry*, 54: 121– 138, 2000.

Fields TA., Casey PJ. Phosphorylation of G α by protein kinase C blocks interaction with the $\beta\gamma$ complex. *J Biol Chem.*, 270: 23119-23125, 1995.

Fields TA., Casey PJ. Signaling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G proteins. *Biochem J.*, 321: 561-571, 1993.

Fisher B., Land S., Mamounas E., Dignam J., Fisher ER., Wolmark N. Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: An update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience, 2004.

Fitzgerald LW., Iyer G., Conklin DS., Krause CM., Marshall A., Patterson JP., Tran DP., Jonak GJ. and Hartig PR. Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor. *Neuropsychopharmacology*, 21: 82S – 90S, 1999.

Fornari FA., Randolph JK., Yalowich JC., Ritke MK., Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol.*; 45: 649-656, 1994.

Gaddum JH. and Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 12: 323 – 328, 1957.

Gaietta GM., Yoder EJ., Deerinck T., Kinder K., Hanono A., Han A., Wu C. and Ellisman MH. 5-HT_{2a} receptors in rat sciatic nerves and Schwann cell cultures. *J. Neurocytol.*, 32: 373– 380, 2003.

Ganz PA. Quality-of-life issues in patients with ductal carcinoma in situ, *Journal of the National Cancer Institute Monographs*; 41: 218- 222, 2010.

Garattini S. and Valzelli L. Serotonin. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1965.

Gartner LP. And Hiatt JL. *Color Atlas of Histology*. Wolters Kluwer; 2ⁿ edition, 1994.

Gaurisankar S. and Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div.*; 3: 14, 2008.

Gavarini S., Becamel C., Altier C., Lory P., Poncet J., Wijnholds J., Bockaert J. and Marin P. Opposite effects of PSD-95 and MPP3 PDZ proteins on serotonin 5- hydroxytryptamine_{2C} receptor desensitization and membrane stability. *Mol. Biol. Cell.*, 17: 4619 – 4631, 2006.

Glanzman DL., Kandel ER. and Schacher S. Target dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in *Aplysia* neurons. *Science*, 249: 799– 802, 1990.

Glick JL., Meigs TE., Miron A., Casey PJ. RGSZ1, a G_z selective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of G α . *J Biol Chem*. 273: 26008-26013, 1998.

GLOBOCAN, Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition. American Cancer Society.

Gonzalez-Maeso J., Ang RL., Yuen T., Chan P., Weisstaub NV., Lopez-Gimenez JF., Zhou M., Okawa Y., Callado LF., Milligan G., Gingrich JA., Filizola M., Meana JJ. and Sealfon S.C. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452: 93 – 97, 2008.

Gonzalez-Maeso J., Weisstaub NV., Zhou M., Chan P., Ivic L., Ang R., Lira A., Bradley-Moore M., Ge Y., Zhou Q., Sealfon SC. and Gingrich JA. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron*, 53: 439– 452, 2007.

Green BB., Taplin SH. Breast cancer screening controversies. *J Am Board Fam Pract.*;16: 233-241, 2003.

Grenett HE., Ledley FD., Reed LL. and Woo SL. Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5530– 5534, 1998.

Gu Z., Jiang Q. and Yan Z. RGS4 modulates serotonin signaling in prefrontal cortex and links to serotonin dysfunction in a rat model of schizophrenia. *Mol. Pharmacol.*, 71: 1030 – 1039, 2007.

Guillet-Deniau I., Burnol AF. and Girard J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT2A receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.*, 272: 14825 – 14829, 1997.

Gurbuz N., Ashour AA., Alpay SN., Ozpolat B. Down-regulation of 5-HT1B and 5-HT1D receptors inhibits proliferation, clonogenicity and invasion of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 9: p. e105245, 2014.

Gurevich I., Englander MT., Adlersberg M., Siegal NB. and Schmauss C. Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J. Neurosci.*, 22: 10529 – 10532, 2002.

Gurevich I., Tamir H., Arango V., Dwork AJ., Mann JJ. and Schmauss C. Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron*, 34: 349 – 356, 2002b.

- Hagmann W., Hacker HJ. and Buchholz U. Resident mast cells are the main initiators of anaphylactic leukotriene production in the liver. *Hepatology*, 16: 1477– 1484, 1992.
- Hanahan D. and Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674, 2011.
- Hanby AM. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast, *Histopathology*,; 52: 58- 66, 2008.
- Hannon J. and Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors . *Behav. Brain. Res.*, 195: 198 – 213, 2008.
- Hansen MB. and Witte AB. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol. (Oxf)*, 193: 311– 323, 2008.
- Hardeland R. Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. *Reprod. Nutr. Dev.*, 39: 399– 408, 1999.
- Heidmann DE. , Metcalf MA. , Kohen R. and Hamblin MW. Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron – exon organization. *J. Neurochem.*, 68: 1372 – 1381, 1997.
- Hertz L., Schousboe I., Hertz L. and Schousboe A. Receptor expression in primary cultures of neurons or astrocytes. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 8: 521– 527, 1984.
- Higuchi M., Single FN., Kohler M., Sommer B., Sprengel R. and Seeburg PH. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron – exon structure determines position and efficiency. *Cell*, 75: 1361 – 1370, 1993.
- Hiroi T., Hayashi-Kobayashi N., Nagumo S., Ino M., Okawa Y., Aoba A. and Matsui H. Identification and characterization of the human serotonin-4 receptor gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289: 337 – 344, 2001.
- Hirsch A., and Kachnic LA. Management of locoregional recurrence of breast cancer after mastectomy, Wolters& Kluver: 2011.
- Hoff PM., Ansari R., Batist G., Cox J., Kocha W., Kuperminc M., Maroun J., Walde D., Weaver C., Harrison E., Burger HU., Osterwalder B., Wong AO., Wong R. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605

patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol.*; 15: 2282-2292, 2001.

Horen WP. Insect and scorpion sting. *J. Am. Med. Assoc.*, 221: 894– 898, 1972.

Ho-Tin-Noé B., Goerge T., Cifuni SM., Duerschmied D. and Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res.*, 68: 6851-8, 2008.

<http://www.uniprot.org>

Huang YY. and Kandel ER. 5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala. *J. Neurosci.*, 27: 3111 – 3119, 2007.

Humphrey T. and Enoch T. Sum1, a highly conserved WD-repeat protein, suppresses S-M checkpoint mutants and inhibits the osmotic stress cell cycle response in fission yeast. *Genetics*, 148: 1731– 1742, 1998.

Invernizzi RW. Role of TPH-2 in brain function: news from behavioural and pharmacologic studies. *J. Neurosci. Res.*, 85: 3030 – 3035, 2007.

Iwanami N., Higuchi T., Sasano Y., Fujiwara T., Hoa VQ., Okada M., Talukder SR., Kunimatsu S., Li J., Saito F., Bhattacharya C., Matin A., Sasaki T., Shimizu N., Mitani H., Himmelbauer H., Momoi A., Kondoh H., Furutani-Seiki M. and Takahama Y. WDR55 is a nucleolar modulator of ribosomal RNA synthesis, cell cycle progression, and teleost organ development. *PLoS Genet.*, 4 (8) : e1000171, 2008.

Iyengar R., Aaronson D. Gai Pathway, Science's STKE (Connections Map, as seen May 2002), [http:// stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_7430](http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_7430).

Jacobs BL. and Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, 72: 165– 229, 1992.

Jacobs WP., Falkenstein K. and Hamilton RH. Nature and amount of auxin in algae: IAA from extracts of *Caulerpa paspaloides* (Siphonales). *Plant Physiol.*, 78: 844– 848, 1985.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.*; 58: 71-96, 2008.

Jemal A., Ward E., Thun MJ. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women, *Breast Cancer Res.*; 9: R28, 2007.

Jensen AA., Davies PA., Brauner-Osborne H. and Krzywkowski K. 3B but which 3B? And that's just one of the questions: the heterogeneity of human 5-HT(3) receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 29: 437 – 444, 2008.

Ji SP., Zhang Y., Van Cleemput J., Jiang W., Liao M., Li L., Wan Q., Backstrom JR. and Zhang X. Disruption of PTEN coupling with 5-HT_{2C} receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse. *Nat. Med.*, 12: 324– 329, 2006.

Jiang Y., Ma W., Wan Y., Kozasa T., Hattori S., Huang XY. The G protein G alpha12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature*, 395: 808- 813,1998.

Jones MP., Cao J., O'Brien R., Murch SJ. and Saxena PK. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purp-urea L.* *Plant Cell Rep.*, 26: 1481– 1490, 2007.

Jope RS, Roh MS. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets.*; 7: 1421–1434, 2006.

Joubert L., Hanson B., Barthet G., Sebben M., Claeysen S., Hong W., Marin P., Dumuis A. and Bockaert J. New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT_{4A} receptor splice variant: roles in receptor targeting. *J. Cell. Sci.*, 117: 5367 – 5379, 2004.

Kamangar F. , Dores GM. and Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 24: 2137-2150, 2006.

Kanserle Savaş Dairesi 2002 Raporu.

Karantza-Wadsworth V. and White E. Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy*; 3: 610– 613, 2007.

Katow H., Yaguchi S., Kiyomoto M. and Washio M. The 5-HT receptor cell is a new member of secondary mesenchyme cell descendants and forms a major blastocoelar network in sea urchin larvae. *Mech. Dev.*, 121: 325– 337, 2004.

Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship?. *Mol. Pharmacol.*, 72: 1393 – 1401, 2007.

Kopparapu PK., Tinzl M., Anagnostaki L., Persson JL., Dizeyi N. Expression and localization of serotonin receptors in human breast cancer. *Anticancer Res.*; 33: 363-70, 2013.

Kozasa T., Gilman AG. Protein kinase C phosphorylates G12 α and inhibits its interaction with G $\beta\gamma$. *J Biol Chem.* 271: 12562-12567, 1996.

Krebs EG., Fischer EH. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.*, 20: 150- 157, 1956.

Kristan WB. Jr. and Nusbaum MP. The dual role of serotonin in leech swimming. *J. Physiol.*, 78: 743– 747, 1982.

Kroeze WK. and Roth BL. *Molecular Biology and Genomic Organization of G Protein-coupled Serotonin Receptors*. Humana Press , Totowa, NJ, 2006.

Kronowitz SJ. and Kuerer HM. Advances and surgical decision-making for breast reconstruction. *Cancer*, 107: 893–907, 2006.

Kvachnina E., Liu G., Dityatev A., Renner U., Dumuis A., Richter DW., Dityateva G., Schachner M., Voyno- Yassenetskaya TA. and Ponimaskin EG. 5-HT₇ receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12- protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J. Neurosci.*, 25: 7821 – 7830, 2005.

Labasque M., Reiter E., Becamel C., Bockaert J. and Marin P. Physical interaction of calmodulin with the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor C-terminus is essential for G protein independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.*, 19: 4640 – 4650, 2008.

Lambert GW., Reid C., Kaye DM., Jennings GL. and Esler MD. Effect of sunlight and season on serotonin turnover in the brain. *Lancet*, 360: 1840– 1842, 2002.

Lampic C., Thurfjell E., Sjoden PO. The influence of a false-positive mammogram on a woman's subsequent behaviour for detecting breast cancer. *Eur J Cancer*; 39: 1730–1737, 2003.

Lemaire PA. and Adosraku RK. An HPLC method for the direct assay of the serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan, in seeds of *Grivonia simplicifolia*. *Phytochem. Anal.*, 13: 333– 337, 2002.

- Lezoualc'h F. and Robert SJ. The serotonin 5-HT₄ receptor and the amyloid precursor protein processing. *Exp. Gerontol.*, 38: 159 – 166, 2003.
- Lieb K., Biersack L., Waschbisch A., Orlikowski S., Akundi RS., Candelario-Jalil E., Hull M. and Fiebich BL. Serotonin via 5-HT₇ receptors activates p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C epsilon resulting in interleukin-6 synthesis in human U373 MG astrocytoma cells. *J. Neurochem.*, 93: 549 – 559, 2005.
- Lin SL., Johnson-Farley NN., Lubinsky DR. and Cowen DS. Coupling of neuronal 5-HT₇ receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A independent pathway that can utilize Epac. *J. Neurochem.*, 87: 1076 – 1085, 2003.
- Liu Q-R., Zhu X.-G., Gong J-P., Shaham Y. and Uhl GR. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res.*, 1067: 1 – 12, 2006.
- Lübbe AS., Huhnt W. Microvessel diameters of human colon adenocarcinoma during acute treatment with serotonin. *Int J Microcirc Clin Exp.*; 14: 218-25, 1994.
- Manivet P., Mouillet-Richard S., Callebert J., Nebigil CG., Maroteaux L., Hosoda S., Kellermann O. and Launay JM. PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J. Biol. Chem.*, 275: 9324 – 9331, 2000.
- Mannoury La Cour C., El Mestikawy S., Hanoun N., Hamon M. and Lanfumey L. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 70: 1013 – 1021, 2006.
- Marek GJ., Wright RA., Schoepp DD., Monn JA. and Aghajanian GK. Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine(2A) and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 292: 76 – 87, 2000.
- Marini AM., Jiang X., Wu X., Tian F., Zhu D., Okagaki P. and Lipsky RH. Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: from genes to phenotype. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 22: 121 – 130, 2004.
- Marion S., Weiner DM. and Caron M.G. RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5- hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. *J. Biol. Chem.*, 279: 2945 – 2954, 2004.

- Marois R. and Carew TJ. Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica*. *J. Comp. Neurol.*, 386: 477– 490, 1997.
- Martel JC., Ormiere AM., Leduc N., Assie MB., Cussac D. and Newman-Tancredi A. Native rat hippocampal 5-HT 1A receptors show constitutive activity. *Mol. Pharmacol.*, 71: 638 – 643, 2007.
- Martinez D., Slifstein M., Gil R., Hwang DR., Huang Y., Perez A., Frankle WG., Laruelle M., Krystal J., Abi-Dargham A. Positron emission tomography imaging of the serotonin transporter and 5-HT(1A) receptor in alcohol dependence. *Biol Psychiatry.*, 65: 175- 180, 2008.
- Matsui W., Uhara J., Satoi S., Kaibori M., Yamada H., Kitade H., Imamura A., Takai S., Kawaguchi Y., Kwon AH., Kamiyama Y. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol.*; 37: 78-86, 2002.
- McGrew L., Chang MS. and Sanders-Bush E. Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by G α 13 and pertussis toxin sensitive G β 2 γ subunits. *Mol. Pharmacol.*, 62: 1339 – 1343, 2002.
- Mehta PK. and Christen P. The molecular evolution of pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 74: 129– 184, 2005.
- Millan MJ., Marin P., Bockaert J. and Mannoury La Cour C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 29: 454 – 464, 2008.
- Miller T., Ross C., Al-Rawi H., Taylor B., and Al-Jafari M. Unexpected Diagnosis of Both Adenocarcinoma of the Colon and Metastatic Lobular Carcinoma of the Breast in the Gastrointestinal Tract. *Case Rep Pathol.*; 2013: 153180, 2013.
- Miyake A., Mochizuki S., Takemoto Y. and Akuzawa S. Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol. Pharmacol.*, 48: 407 – 416, 1995.
- Morris AJ., Malbon CC. Physiological regulation of G protein- linked signaling. *Physiol Rev.* 79: 1373-1430, 1999.

Moss BL., Fuller AD., Sahley CL. and Burrell BD. Serotonin modulates axo-axonal coupling between neurons critical for learning in the leech. *J. Neurophysiol.*, 94: 2575– 2589, 2005.

Moyers JS., Linder ME., Shannon JD., Parsons SJ. Identification of the in vitro phosphorylation sites on Gs α mediated by pp60c-src. *Biochem J.*, 305: 411-417, 1995.

Muller JF., Mascagni F. and McDonald AJ. Serotonin immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 505: 314–335, 2007.

Murayama T., Ui M. Loss of the inhibitory function of the guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase due to its ADP ribosylation by islet-activating protein, pertussis toxin, in adipocyte membranes. *J Biol Chem.*, 258: 3319-26, 1983.

Murthy KS., Grider JR., Makhlof GM. Heterologous desensitization of response mediated by selective PKC-dependent phosphorylation of Gi-1 and Gi-2. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 279: 925-934, 2000.

National Health Services-Breast Screening Programmes, 2008.

Nelson DL. and Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. WH. Freeman, New York, 2008, NY.

Neves S., Ram P., Iyengar R. G α 12 Pathway, Science $\tilde{\text{O}}$ s STKE (Connections Map, as seen May 2002), http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_8022.

Neves S., Ram P., Iyengar R. G α 13 Pathway, Science $\tilde{\text{O}}$ s STKE (Connections Map, as seen May 2002), [http:// stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_8809](http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_8809).

Niesler B., Walstab J., Combrink S., Moller D., Kapeller J., Rietdorf J., Bonisch H., Gothert M., Rappold G. And Bruss M. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C , 5-HT3D , and 5-HT3E. *Mol. Pharmacol.*, 72: 8 – 17, 2007.

Nishikawa T., Tsuno NH., Shuno Y. Antiangiogenic effect of a selective 5-HT4 receptor agonist. *J Surg Res.*, 159: 696-704, 2010.

Niswender CM., Copeland SC., Herrick-Davis K., Emeson RB. and Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J. Biol. Chem.*, 274: 9472 – 9478, 1999.

Nocito A., Dahm F., Jochum W., Jang JH., Georgiev P., Bader M., Graf R., Clavien PA. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res* 2008; 68: 5152-8.

Nordlind K., Azmitia EC. and Slominski A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. *Exp. Dermatol.*, 17: 301– 311, 2008.

Nowak M., Kolaczowski M., Pawlowski M. and Bojarski AJ. Homology modeling of the serotonin 5-HT_{1A} receptor using automated docking of bioactive compounds with defined geometry. *J. Med. Chem.*, 49: 205– 214, 2006.

O’Kane RL. and Hawkins RA. Na⁺-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood– brain barrier. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285: E1167 – E1173, 2003.

Ohyama S., Kuniyoshi M., Nishi S. and Inanaga K. Postherpetic neuralgia alleviated by an SSRI fluvoxamine: two cases of PHN accompanied with depression were treated with fluvoxamine. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 24: 79– 81, 2004.

Okado N., Narita M. and Narita N. A biogenic amine synapse mechanism for mental retardation and developmental disabilities. *Brain Dev.*, 23 (Suppl. 1) : S11– S15, 2001.

Olsen MA., Nawoschik SP., Schurman BR., Schmitt HL., Burno M., Smith DL. and Schechter LE. Identification of a human 5-HT₆ receptor variant produced by alternative splicing. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 64: 255 – 263, 1999.

Oran B., Çelik İ., Erman M., Baltalı E., Zengin N., Demirkazık F., Tezcan S. Analysis of menstrual, reproductive, and life-style factors for breast cancer risk in Turkish women: a case-control study. *Med Oncol.*;21: 31-40,2004.

Overbeek JV. Auxin in marine algae. *Plant Physiol.*, 15: 291– 299, 1940.

Özdemir O. ve Çalışkan D. Meme Kanserinin Erken Tanısında Kullanılan Yöntemler, *Sağlık ve Toplum*; 12: 10-14, 2002.

Pai V.P., Marshall AM., Hernandez LL., Buckley AR. and Horseman ND. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.*, 11: R81, 2009.

Pai VP., Marshall AM., Hernandez LL., Buckley AR., Horseman ND. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.*; 11: R81, 2009.

Parker LL., Backstrom JR., Sanders-Bush E. and Shieh BH. Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. *J. Biol. Chem.*, 278: 21576– 21583, 2003.

Parkin DM., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*;55: 74-108, 2005.

Parkin DM., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*; 55: 74-108, 2005.

Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. OUP Oxford, 2nd edition. 2008.

Peroutka SJ. and Howell TA. The molecular evolution of G-protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology*, 33: 319– 324, 1994.

Perrot-Rechenmann C., Hagen G. and Perrot-Rechenmann C. *Auxin Molecular Biology*. Springer Publisher, New York, 2002, NY.

Pettigrew DB. , Smolen, P., Baxter DA. and Byrne JH. Dynamic properties of regulatory motifs associated with induction of three temporal domains of memory in aplysia. *J. Comput. Neurosci.*, 18: 163– 181, 2005.

Philibert R., Madan A., Andersen A., Cadoret R., Packer H. and Sandhu , H. Serotonin transporter mRNA levels are associated with methylation of an upstream CpG island. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 144: 101 – 105, 2007.

Philibert RA., Sandhu H. , Hollenbeck N. , Gunter T., Adams W. and Madan A. The relationship of 5HTT (SLC6A4) methylation and genotype on mRNA expression and liability to major depression and alcohol dependence in subjects from the Iowa Adoption Studies. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* , 147: 543 – 549,2008.

Pigram WJ., Fuller W., Hamilton LD. Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat New Biol.*; 235: 17-19, 1972.

Pow DV. and Cook DK. Tryptophan is present in glial cells and photoreceptors in the chicken retina. *Neuroreport*, 8: 1767– 1770, 1997.

Price RD., Weiner DM., Chang MS. and Sanders-Bush E. RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor alters receptor-mediated activation of G₁₃ protein. *J. Biol. Chem.*, 276: 44663 – 44668, 2001.

Rakha EA., El-Sayed ME., Menon S., Lee AH., Ellis IO. Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast, *Breast Cancer Res Treat.*, 111: 121–127, 2008.

Ram P., Iyengar R. Gαq Pathway, Science's STKE (Connections Map, as seen May 2002), pathway. http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_6680.

Ram P., Iyengar R. Gas Pathway, Science's STKE (Connections Map, as seen May 2002), http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_6634.

Raymond JR., Kim J., Beach RE. and Tisher CC. Immunohistochemical mapping of cellular and subcellular distribution of 5-HT_{1A} receptors in rat and human kidneys. *Am. J. Physiol.*, 264: F9– F19, 1993.

Rees S., Den Daas I., Foord S., Goodson S., Bull D., Kilpatrick G. and Lee M. Cloning and characterisation of the human 5-HT_{5A} serotonin receptor. *FEBS Lett.*, 355 : 242 – 246, 1994.

Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl SL., Krans MH. Characteristics of glucagon action on the hepatic adenylate cyclase system. *Biochem J.*, 125 : 58P–59P, 1971.

Roots BI. Comparative studies on glial markers. *J. Exp. Biol.*, 95: 167– 180, 1981.

Ross EM., Gilman AG. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interactions of solubilized components with receptor-replete membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74 :3715–3719, 1977.

Ross EM., Gilman AG. Biochemical Properties of Hormone-Sensitive Adenylate Cyclase *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 533- 564, 1980.

Sablin SO., Yankovskaya V., Bernard S., Cronin CN. and Singer TP. Isolation and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B. *Eur. J. Biochem.*, 253: 270– 279, 1998.

Salmoun M., Devijver C., Daloz D., Braekman JC. and van Soest RW. 5-Hydroxytryptamine-derived alkaloids from two marine sponges of the genus *Hyrtios*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1173– 1176, 2002.

Salvador MT., Rodríguez-Yoldi MC., AI A., MJ R. 5-HT receptor subtypes involved in the serotonin-induced inhibition of L-leucine absorption in rabbit jejunum. *Life Sci.*, 61: 309- 318, 1997.

Sanders-Bush E. and Breeding M. Putative selective 5-HT-2 antagonists block serotonin 5-HT-1C receptors in the choroid plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247: 169 – 173, 1988.

Sarrouilhe D., Clarhaut J., Defamie N. and Mesnil M. Serotonin and Cancer: What Is the Link? *Current Molecular Medicine*, 15: 62-77, 2015.

Scheibel MS., Tomiyasu U. and Scheibek AB. Do raphe nuclei of the reticular formation have a neurosecretory or vascular sensor function? *Exp. Neurol.*, 47: 316– 329, 1975.

Scheuch K., Lautenschlager M., Grohmann M., Stahlberg S., Kirchheiner J., Zill P., Heinz A., Walther DJ. and Priller J. Characterisation of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons. *Biol. Psychiatry*, 62: 1288 – 1294, 2007.

Schmit K. and Ernst E. ‘Alternative’ cancer cures via the Internet?. *Br J Cancer.*; 87: 479–480, 2002.

Schmitt JM., Stork PJ. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Molecular Cell*, 9: 85-94, 2002.

Schoepp D. New directions in the treatment of schizophrenia: modulators of mGluR2 and or mGluR3 receptors. *Neuropsychopharmacology*, 32: S25, 2006.

Serventi IM., Moss J., Vaughan M. Enhancement of cholera toxin-catalyzed ADP ribosylation by guanine nucleotidebinding proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 175: 43-67, 1992.

Shaw DM., Camps FE. and Eccleston EG. 5- Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides. *Br. J. Psychiatry*, 113: 1407– 1411, 1987.

Sheffler DJ., Kroeze WK., Garcia BG., Deutch AY., Hufeisen SJ., Leahy P., Bruning JC. and Roth BL. p90 ribosomal S6 kinase 2 exerts a tonic brake on G protein coupled receptor signaling . Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103: 4717 – 4722, 2006.

Shenker A., Maayani S., Weinstein H. and Green JP. Pharmacological characterization of two 5-hydroxytryptamine receptors coupled to adenylate cyclase in guinea pig hippocampal membranes. Mol. Pharmacol., 31: 357 – 367, 1987.

Shi CS., Kehrl JH. PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation. J. Biol. Chem., 276: 31845- 31850, 2001.

Simon MI, Strathmann MP., Gautam N. Science; 252, 802, 1991.

Singh GK., Siahpush M. Ethnic-immigrant differentials in health behaviors, morbidity, and cause-specific mortality in the United States: an analysis of two national data bases. Hum Biol.; 74: 83-109, 2002.

Smith BN. Evolution of C4 photosynthesis in response to changes in carbon and oxygen concentrations in the atmosphere through time. Biosystems, 8: 24– 32, 1976.

Smith RA., Saslow D., Sawyer KA., Burke W., Costanza ME., Evans III WP., Foster RS., Hendrick E., Eyre HJ., Sener S. American Cancer Society Guidelines for Breast Cancer Screening: Update 2003, CA Cancer Journal for Clinicians; 53: 141-169, 2003.

Smith TA. The occurrence, metabolism and functions of amines in plants. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., 46: 201– 241, 1971.

Soll C., Riener MO., Oberkofler CE., Hellerbrand C., Wild P.J, DeOliveira ML., Clavien PA. Expression of Serotonin Receptors in Human Hepatocellular Cancer. Clinical Cancer Research, 18: 5902-5910, 2012.

Sonier B., Arseneault M., Lavigne C., Ouellette RJ., and Vaillancourt C.vThe 5-HT2A serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. Biochem Biophys Res Commun., 343: 1053-1059, 2006.

Sonier B., Arseneault M., Lavigne C., Ouellette R., Vaillancourt C. The 5-HT2A serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. Biochem Biophys Res Commun.; 343: 1053-9, 2006.

Sparks DL. and Slevin JT. Determination of tyrosine, tryptophan and their metabolic derivatives by liquid chromatography- electrochemical detection: application to post mortem samples from patients with Parkinson's and Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 36: 449– 457, 1985.

Spiegel D. Psychosocial aspects of breast cancer treatment. *Seminars in Oncology*, 24 (1 Suppl 1):S1-36-S1-47, 1997.

Strachen RT., Sheffler DJ , Willard B., Kinter M., Kiselar J.G. and Roth BL. Ribosomal S6 kinase 2 directly phosphorylates the 5-HT_{2A} serotonin receptor thereby modulating 5-HT_{2A} signaling. *J. Biol. Chem.*, 284: 5557– 5573, 2008.

Strakhovskaia MG., Serdalina AM. and Fraikin GI. Effect of the photo-induced synthesis of serotonin on the photoreactivation of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki*, 3: 25– 28, 1983.

Strassheim D., Malbon CC. Phosphorylation of G α 2 attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108-15) cells. *J Biol Chem.*, 269: 14307-14313, 1994.

Stücker O., Laemmel E., Teisseire B., Vicaut E. Specific response of mouse tumor-feeding arterioles to stimulation by 5-HT₁ antagonists. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 37: 1125-31, 1997.

Sutherland EW., Wosilait WD. Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature*. 175: 169–170, 1955.

Svenningsson P., Chergui K., Rachleff I., Flajolet M., Zhang X., Yacoubi ME., Vaugeois JM., Nomikos GG. and Greengard P. Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like state . *Science*, 311: 77– 80, 2006.

Şahin C., Ünal G., Arıcıoğlu F. Akt-GSK-3 ilişkisi: İki Ayrı Yolak İki Ayrı Hastalık. *MÜSBED*; 4: 51-57, 2014.

Tajuddin NF., Orrico LA., Eriksen JL. and Druse MJ. Effects of ethanol and ipsapirone on the development of midline raphe glial cells and astrocytes. *Alcohol*, 29: 157– 164, 2003.

Tsuchioka M., Takebayashi , M. , Hisaoka , K. , Maeda , N. And Nakata , Y. (2008) Serotonin (5-HT) induces glial cell linederived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells . *J. Neurochem.*, 106: 244 – 257 .

Tsuchioka M., Takebayashi M., Hisaoka K., Maeda N. and Nakata Y. Serotonin (5-HT) induces glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA expression via the transactivation of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in rat C6 glioma cells. *J. Neurochem.*, 106: 244–257, 2008.

Turner JH. and Raymond JR. Interaction of calmodulin with the serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 280: 30741– 30750, 2005.

Turner JH., Garnovskaya MN. and Raymond JR. Serotonin 5-HT 1A receptor stimulates c-Jun N-terminal kinase and induces apoptosis in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1773: 391 – 399, 2007 b.

Turner JH., Garnovskaya MN., Coaxum SD., Vlasova TM., Yakutovich M., Lefler DM. and Raymond JR. Ca²⁺-calmodulin and janus kinase 2 are required for activation of sodium-proton exchange by the Gi-coupled 5-hydroxytryptamine 1a receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 320: 314 – 322, 2007 a.

Turner JH., Gelasco AK. and Raymond JR. Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5-hydroxytryptamine 1A receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C . *J. Biol. Chem.*, 279: 17027– 17037, 2004.

U.S. Preventive Services Task Force. Chemoprevention of breast cancer: Recommendations and rationale. *Annals of Internal Medicine* 137: 56-58, 2002.

Ui M., Katada T., Murayama T., Kurose H., Yajima M., Tamura M., Nakamura T., Nogimori K. Islet-activating protein, pertussis toxin: a specific uncoupler of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.*, 17: 145-51, 1984.

Ulukaya, 2001. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide İlkeler ve Uygulamalar. Kayıhan Engin, Nihat Özyardımcı. Avrupa Tıp Kitapçılık. Bölüm 3. ISBN: 9759479672. 2001.

Ulusal Hastalık Yüğü, 2002.

Valentine JW. *On the Origin of Phyla*. University of Chicago Press, Chicago, 2004, IL.

Van Den Bogaert K., Slegers K., De Zutter S., Heyrman L., Norrback KF., Adolfsson R., Van Broeckhoven C. and Del-Favero J. Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, *TPH2*

, with unipolar and bipolar disorder in a northern Swedish, isolated population. *Arch. Gen. Psychiatry*, 63: 1103 – 1110, 2006.

Venn AA., Loram JE. and Douglas AE. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.*, 59: 1069– 1080, 2008.

Vicaut E., Laemmel E., Stücker O. Impact of serotonin on tumour growth. *Ann Med.*; 32: 187-94, 2000.

Vogel CL., Cobleigh MA., Tripathy D., Gutheil JC., Harris LN., Fehrenbacher L., Slamon JD., Murphy M., Novotny WF., Burchmore M., Shak S., Stewart SJ. and Press M. Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *JCO*; 20: 719-726, 2002.

Walker RJ., Brooks HL. and Holden-Dye L. Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology*, 113(Suppl.): S3– S33, 1996.

Walther DJ., Peter JU., Winter S., Holtje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinckel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm CS., Ahnert-Hilger G. and Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115: 851 – 862, 2003.

Wang C., Jiang Y., Ma J., Wu H., Wacker D., Katritch V., Won Han G., Liu W., Huang XP., Vardy E., McCorvy JD., Gao X., Zhou EX., Melcher K., Zhang C., Bai F., Yang H., Yang L., Jiang H., Roth BL., Cherezov V., Stevens RC., Xu HE. Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors. *Science*; 340: 610- 614, 2013.

Warner-Schmidt JL., Flajolet M., Maller A., Chen EY., Qi H., Svenningsson P. and Greengard, P. Role of p11 in cellular and behavioral effects of 5-HT4 receptor stimulation. *J. Neurosci.*, 29: 1937– 1946, 2009.

Wasserman SI. The lung mast cell: its physiology and potential relevance to defense of the lung. *Environ. Health Perspect.*, 35: 153– 164, 1980.

Watts SW., Davis RP. 5-hydroxytryptamine receptors in systemic hypertension: an arterial focus. *Cardiovasc Ther.*; 29: 54-67, 2011.

Wedegaertner PB., Wilson PT., Bourne HR. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem.*, 270: 503-506, 1995.

Weiger WA. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. , 72: 61– 95, 1997.

Whitaker-Azmitia PM. and Azmitia EC. 5-hydroxytryptamine binding to brain astroglial cells: differences between intact and homogenized preparations and mature and immature cultures. J. Neurochem., 46: 1186– 1189, 1986.

Whitaker-Azmitia PM., Lauder JM., Shemmer A. and Azmitia EC. Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptors. Brain Res., 430: 285– 289, 1987.

Wieland T., Nurnberg B., Ulibarri I., Kaldenberg-Stasch S., Schultz G., Jacobs KH. Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein β -subunits. Characterization of the phosphorylated amino acid. J Biol Chem., 268: 18111-18118, 1993.

Wiens M., Koziol C., Batel R. and Muller WE. Phenylalanine hydroxylase from the sponge *Geodia cydonium*: implication for allorecognition and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. Dev. Comp. Immunol., 22: 469– 478, 1998.

Wikgren MC. and Reuter M. Neuropeptides in a microturbellarian– whole mount immunocytochemistry. Peptides, 6: 471– 475, 1985.

Wilmanns M., Hyde CC., Davies DR., Kirschner K. and Jansonius JN. Structural conservation in parallel beta/ alpha-barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. Biochemistry, 30: 9161– 9169, 1991.

Woodward WA. and Cristofanilli M. Inflammatory breast cancer, Seminars in Radiation Oncology; 19: 256- 265, 2009.

Woolley DW. The Biochemical Basis of Psychosis. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 1961.

World Health Organization. Cancer. Geneva, Switzerland: World Health Organization; [updated 2006 February].

www.pubmedchem.org

Xia Z., Gray JA., Compton-Toth BA. and Roth BL. A direct interaction of PSD95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 278: 21901 – 21908, 2003 a.

Xia Z., Hufeisen SJ., Gray JA. and Roth BL. The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT_{2A} serotonin receptors in cortical pyramidal neurons *in vitro*. *Neuroscience*, 122: 907– 920, 2003b.

Xie E., Zhu L., Zhao L. and Chang LS. The human serotonin 5-HT_{2C} receptor: complete cDNA, genomic structure, and alternatively spliced variant. *Genomics*, 35: 551 – 561, 1996.

Xie Z., Ho WT., Spellman R., Cai S., Exton JH. Mechanisms of regulation of phospholipase D1 and D2 by the heterotrimeric G proteins G₁₃ and G_q. *J. Biol. Chem.*, 277: 11979-11986, 2002.

Yaguchi S. and Katow H. Expression of tryptophan 5- hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior. *J. Comp. Neurol.*, 466: 219– 229, 2003.

Yan W., Wilson CC. and Haring JH. Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 98: 177– 184, 1997.

Yuen EY., Jiang Q., Chen P., Feng J. and Yan Z. Activation of 5-HT_{2A/C} receptors counteracts 5-HT_{1A} regulation of n-methyl-D-aspartate receptor channels in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J. Biol. Chem.*, 283: 17194 – 17204, 2008.

Yun HM., Kim S., Kim HJ., Kostenis E., Kim JI., Seong JY., Baik JH. and Rhim H. The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn. *J. Biol. Chem.*, 282: 5496 – 5505, 2007.

Yvon AM., Wadsworth P., Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell.*; 10: 947–959, 1999.

Zamani A., Qu Z. Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells. *FEBS Lett.*; 586: 2360-5, 2012.

Zang FL.,Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem.*, 65: 241-269, 1996.

Zheng B. and Farquhar MG. RGS-PX1, a GAP for G α S and sorting nexin in vesicular trafficking. *Science*, 294: 1939-1942, 2001.

Zhou T., Duan J., Wang Y., Chen X., Zhou G., Wang R., Fu L., Xu F. Fluoxetine synergys with anticancer drugs to overcome multidrug resistance in breast cancer cells. *Tumour Biol*; 33: 1299-306, 2012.

Zick Y., Sagi-Eisenberg R., Pines M., Gierschik P., Spiegel AM. Multisite phosphorylation of the α subunit of transducin by the insulin receptor kinase and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 9294-9297, 1986.

Zimmer W., Hundeshagen B. and Niederau E. Demonstration of the indole pyruvate decarboxylase gene homologue in different auxin-producing species of the *Enterobacteriaceae*. *Can. J. Microbiol.*, 40: 1072– 1076, 1994.