

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**SEROTONİN'İN TERAPOTİK POTANSİYELİNİN MCF-7 MEME  
KANSERİ HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ESRA NUR GÜLTEKİN**

**1600007290**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN**

**MAYIS 2019**

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**SEROTONİN'İN TERAPOTİK POTANSİYELİNİN MCF-7 MEME  
KANSERİ HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ESRA NUR GÜLTEKİN**

**1600007290**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 20 Haziran 2019**

**Tezin Savunulduğu Tarih: 22 Mayıs 2019**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN**

**Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA**

**Dr. Öğrt. Üyesi Ayşe KARATUĞ KAÇAR (İ.Ü)**

**MAYIS 2019**

## ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde yürütmüş olduğum tez çalışmamda, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tez konumun belirlenmesi ve planlanmasında her türlü desteği sağlayan, bilimsel katkıları ve bu süreçte göstermiş olduğu anlayış ile beni cesaretlendiren saygıdeğer danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN' a,

Yüksek lisans eğitimim süresince deneyimlerini ve bilgilerini bizlerden esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Narçın Palavan ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN, Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA' ya

Deneysel süreçlerde deneyimlerini, tecrübelerini ve yardımlarını bizlerden esirgemeyen, Sayın Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ, Sayın Araş. Gör. Özge BERRAK ve Sayın Burcu AYHAN ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde gerçekleştirmiş olduğum deneysel çalışmalarımda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen en başta Kadriye KOYUNCU olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Lisans eğitimimden itibaren yanımda olan manevi desteklerini her daim hissettiren arkadaşlarım, Kübra ERGÜN, Selen SİPAHİ, Didem AKÇAMLI, Hatice KURNAZ, Özlem ERSOY, Merve ÖZYAMAN ve Fatma KARA' ya

Hayatım boyunca desteklerini, sevgilerini, sabırlarını ve yardımlarını üzerimden çekmeyen, başta sevgili annem Kadife YARBASAN olmak üzere, anneannem, dedem ve dayıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez ile ilgili tüm imkanları sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi, MOBİGEN laboratuvarlarına ve İstanbul Kültür Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destek mekanizmasına teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
TABLolar DİZİNİ .....	viii
KISALTMALAR .....	ixx
SEMBOLLER .....	xii
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. MEME KANSERİ .....	1
1.1.1. Meme Histolojisi .....	3
1.1.2. Meme Kanseri Epideyomolojisi .....	3
1.1.3. Meme Kanseri Türleri .....	4
1.1.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri .....	6
1.1.5. Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri .....	8
1.2. SEROTONİN .....	9
1.2.1. Serotonin Biyosentezi .....	10
1.2.3. Serotonin Reseptörleri ve İlişkili Protein Yapılar .....	12
1.2.4. Serotonin Meme Kanseriyle İlişkisi .....	15
1.3. APOPTOZ .....	17
1.3.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması .....	18
1.4. EPİTEL MEZANKİMAL GEÇİŞ (EMT) .....	20
1.5. RESEPTÖR TİROZİN KİNAZLAR .....	21
1.6. JAK/ STAT SİNYAL YOLU .....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM .....	24
2.1. MATERYAL .....	24
2.1.1. Model Hücre Hatları .....	24
2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları .....	24
2.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....	24
2.1.4. Çözeltiler .....	24
2.2. YÖNTEM .....	24
2.2.1. Sıvı Azottan Hücre Açma .....	24
2.2.2. Hücre Kültürü .....	25

2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması .....	25
2.2.4. MTT Hücre Canlılık Testi .....	25
2.2.5. Floresan İndikatörler Aracılığıyla Hücre Ölümünün Belirlenmesi	26
2.2.6. RNA İzolasyonu.....	26
2.2.7. cDNA Çevirimi .....	27
2.2.9. Protein İzolasyonu.....	28
2.2.10. İmmünoBlotlama .....	28
3. SONUÇLAR.....	34
3.1. Serotonin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi .....	34
3.2. Serotonin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi .....	35
3.3. Serotonin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Ölümü ve Epiteryal Mezankimal Değişimle İlgili Hedef Genlerin Üzerine Etkisi .....	38
3.4. Serotonin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Reseptör Tirozin Kinaz Hedefleriyle Protein İfade Düzeylerinin Belirlenmesi.....	40
3.5. Serotonin MCF-7 Hücrelerinde Protein Hedeflerinin İfade Düzeyindeki Biyolojik Fonksiyonların STRING Veritabanıyla Analizi .....	42
3.6. Serotonin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Reseptör Tirozin Kinaz Yoluğı Üzerinde Etkisinin Gösterilmesi.....	44
3.7. MCF-7 Hücre Hattında Serotonin Uygulanmasının Jak/Stat Yoluğı Üzerindeki Etkisi.....	46
3.8. Serotonin Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde İzoelektrik Noktalarına pH 1-7 Aralığında Ayrılan Hedef Proteinlerin Gösterilmesi .....	47
4. TARTIŞMA.....	49
5. KAYNAKÇA .....	57
7. EKLER .....	66
EK A. Hücre Kültürü.....	66
EK B. Cihaz Listesi .....	67
EK C. Kullanılan Kimyasallar .....	69
EK D. Çözeltilerin Hazırlanması .....	72
8. ÖZGEÇMİŞ.....	74

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Dünyada kadınlarda görülen kanser istatistikleri.....	2
Şekil 1. 2. Meme histolojisi.....	3
Şekil 1. 3. Meme kanseri risk faktörleri ve önlenmesinin şematik gösterimi ...	7
Şekil 1.4. Serotoninin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.5. Serotonin biyosentezi.....	11
Şekil 1.6. Serotoninin periferik ve santral sistemdeki etkisi.....	12
Şekil 1.7. HT <sub>1</sub> , 5-HT <sub>2</sub> , 5-HT <sub>3</sub> ve 5-HT <sub>7</sub> reseptörlerin membran lokalizasyonu.....	13
Şekil 1.8. Hücrede gerçekleşen apoptoz ve nekrozun gösterimi.....	18
Şekil 1.9. İntrinsik ve ekstinsik apoptotik yolak.....	19
Şekil 1.10. Reseptör tirozin kinaz sinyal yolu.....	22
Şekil 2. 1. Çoklu veri analizi için kullanılan .PathScan RTK Array Kit için hedef proteinlerin isimleri ve lam üzerinde yerleştirilmiş şeması.....	31
Şekil 3. 1. Doza ve zamana bağlı serotonin uygulamasının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bağıl canlılık üzerine etkisi. Hücreler 10x10 <sup>4</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere DMEM besiyeri ile ekilmiştir. 0-100 µM doz aralığında serotonin 24-48 saat boyunca uygulanmıştır. Ardından, 10 µl MTT ajanı eklenmiş ve 4 saat sonra 100 µl DMSO uygulanarak 570-655 nm dalga boyunda absorban Bio-rad 96 kuyucuklu petri okuyucu (ELISA) yardımı ile ölçülmüştür. Bar grafiklerinde gösterilen standart sapma değerleri ±SD 4'er tekrarlı olarak 5 bağımsız deney sonucu elde edilmiştir.....	34
Şekil 3. 2. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki hücre ölümünün floresan probalar ile belirlenmesi. Serotonin (50 µM) ve etanol (50 µM) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. PI boya ile boyanan hücreler floresan mikroskopunda incelendi (x10). .....	36
Şekil 3. 3. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki mitokondriyel membran potansiyelinin floresan probalar ile belirlenmesi. Serotonin (50 µM) ve etanol (50 µM) 24 saat boyunca süreyle	

hücrelere uygulandı. DiOc6 ile boyanan hücreler fluoressan mikroskopunda incelendi (x10).....	37
Şekil 3. 4. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki hücre ölümü değişim ile ilgili hedeflerin gen ifadelerinin belirlenmesi. Serotonin (50 µM) ve etanol (50 µM) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı. ....	39
Şekil 3. 5. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından dot blot yöntemi ile irdelendi. Serotonin (50 µM) ve etanol (50 µM) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. K: Uygulama yapılmamış kontrol, S: Serotonin uygulaması, E: EtOH uygulaması. B. STRING veri seti ile incelenen proteinler için ilişki analizinin belirlenmesi. ....	41
Şekil 3. 6. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Reseptör Tirozin Kinaz Hedefleri Açısından Proteinlerin İfade Düzeylerinin Analiz Edilmesi. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeylerinin analiz edilmesi. Serotonin (50 µM) ve etanol (50 µM) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. ....	42
Şekil 3. 7. Serotonin ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeylerinin analiz edildikten sonra ilgili biyolojik fonksiyonlar STRING veritabanı ile analiz edilmiştir.....	43
Şekil 3. 8. Serotonin ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeyleri açısından immunoblotlama ile analiz edilmiştir. Herbir örnek için en az 30 µg protein yüklenmiş ve %12 SDS jelinde ayırlandırma yapılmıştır. Sonuçlar en iki farklı biyolojik tekrardan elde edilmiş ve tekrarlardan biri sunulmuştur....	45

Şekil 3. 9. Serotonin zamana bağlı uygulaması yapılan hücrelerde JAK/STAT yolağının irdelenmesi. A. Serotonin ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki Jak2 gen ifadesinin RT-PCR ile belirlenmesi. A18S rRNA yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B. STAT1/STAT3 protein ifade düzeylerindeki değişimin Serotonin ve EtOH uygulaması ile kontrole karşın immunoblotlama ile değerlendirilmesi. Her bir örnek için en az 30 µg protein yüklenmiş ve %12 SDS jelinde ayırlandırma yapılmıştır. Sonuçlar en iki farklı biyolojik tekrardan elde edilmiş ve tekrarlardan biri sunulmuştur.....46

Şekil 3. 10. Serotonin ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim pH 1-7 aralığında izoelektrik noktalarına göre ayırımı ile ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeyleri açısından 2-D jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Her bir örnek için en az 380 µg protein yüklenmiş ve %12 SDS jelinde ayırlandırma yapılmıştır. Sonuçlar en iki farklı biyolojik tekrardan elde edilmiş ve tekrarlardan biri sunulmuştur.....48



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri.....	27
Tablo 2. PZR için reaksiyon bileşenleri.....	28



## KISALTMALAR

5-HT: 5- Hidroksi Triptamin

5-HTP: L-HidroksiTriptofan

5-HTR: Serotonin Reseptörü

SERT: Serotonin taşıyıcısı

TPH: Triptofan Hidroksilaz

MAO: Monoamin oksidaz

GPCR: G-Protein Çiftleşmiş Reseptör

JAK/STAT: Janus kinaz/ sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatörleri

PI3K: Fosfotidilinositol-3 fosfat

CNS: Merkezi Sinir Sistemi

DiOC6: 3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür

LCIS: Lobüler Karsinoma *In Situ*

DCIS: Duktal Karsinoma *In Situ*

PI: Propidyum iyodür

FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü

IDC: İnvaziv duktal karsinoma

ILC: İnvaziv lobüler karsinoma

EMT: Epitel mezenkimal geçiş

MTT: Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum bromür

PBS: Fosfat tamponlu çözelti

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TBS: Tris tamponlu tuz çözeltisi

TEMED: Tetrametiletildiamin

HER: Epidermal büyüme faktörü

ER: Östrojen reseptörü

PR: Progesteron reseptörü

DDC : Aromatik amino asit dekarboksilaz

PKA : protein kinaz A

cAMP: Siklik adenzin monofosfat

MOMP: Mitokondriyal dış membran geğirgenliği

TNF: Tumor nekroz faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü

PDGFR: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptör

IGF-1R: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptör

MAPK: Mitojen-aktive protein kinaz

VEGFR1-3 : Vaskular endotel büyüme faktörü

FBS: Fetal bovin serum

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

Akt: Protein kinaz B

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit

BAX : BCL2-uyumlu X Protein

## **SEMBOLLER**

$\mu$ M: Mikromolar

$\mu$ l: Mikrolitre

kDA: Kilodalton

L: Litre

nm: Nanometre

ml: Mililitre

pH: Hidrojen kuvveti

%: Yüzde

$^{\circ}$ C: Santigrat derece

$\mu$ g: Mikrogram

IC50: Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu

V: Volt

mA: Mili amper

ng: Nanogram

## ÖZET

Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında en yaygın kanser çeşidi olup, her sekiz kadından birinde görüme sıklığı olan bir kanser türüdür. Meme epitel hücreleri hemostatik dengenin korunması, hamilelik evrelerinde ve emzirme gibi önemli fizyolojik durulmada meme dokusunun fonksiyonel işlevini kontrol eder. Bu fonksiyonel işlevin bozulması durumunda meme kanseri oluşur. Erken tanı ve tedavi tekniklerine rağmen meme kanseri etki mekanizması halen açıklığa kavuşmuş değildir.

Serotonin (5- hidroksitriptamin) evrimsel süreçte korunup merkezi sinir sistemine etki eden bir nörotransmitter moleküldür. Santral ve perifer sistemde anahtar rolleri bulunan 5-HT, aynı zamanda endokrin ve ekzokrin organları ve hematopoietik sistemlerdeki hücrelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır.

5- HT epitelyal sistemin bir parçası olduğu için, meme hücrelerinin homeostaz mekanizmalarının düzenlenmesinde de efektif görevleri vardır. Serotonerjik sistemde ortaya çıkabilecek mutasyonlar yanlış düzenlenmesine yol açarak tümör oluşumunu desteklemektedir. Meme kanseri hücrelerinde eksprese serotonerjik sistem elemanları olan, TPH1, SERT, 5-HTR molekülleri kanser hücrelerinde tümör prognozunu etkileyen, apoptoz, epitelyum mezankimal geçiş (EMT), reseptör tirozin kinaz (RTK) migrasyon, invazyon ve metastaz gibi mekanizmalarda tümör prognozunu etkileyen mekanizmalarda doğrudan etkilidir. Bu etki mekanizmaları baz alınarak, 5-HT sinyal yolağındaki değişikliklerin tümör meme epitelinden köken alan tümör prognozuna önemli bir neden olabileceği düşünülmektedir.

Bu araştırmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde serotoninin, apoptoz, EMT, RTK, JAK/ STAT yolakları üzerindeki etki mekanizması irdelenerek teropotik potansiyelinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

## **ABSTRACT**

Breast cancer is the most common cancer type among women worldwide, with a high prevalence as one in eight women. Breast epithelial cells control the functional function of the mammary tissue in the maintenance of the homeostatic balance, important physiological stress in pregnancy stages and breastfeeding. Breast cancer occurs if this functional function deteriorates. Despite the early diagnosis and treatment techniques, the mechanism of action of breast cancer has not been clarified yet.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a neurotransmitter, which protects the central nervous system in the evolutionary process. 5-HT, which has key roles in the central and peripheral system, also plays an important role in the regulation of the function of cells in endocrine and exocrine organs and hematopoietic systems.

Mutations that may occur in the serotonergic system support the formation of the tumor by leading to incorrect regulation. TPH1, SERT, 5-HTR targets, which are the components of serotonergic system expressed in breast cancer cells, directly affect the tumor prognosis in mechanisms affecting tumor prognosis in mechanisms such as apoptosis, epithelium mesenchymal transition (EMT), receptor tyrosine kinase (RTK) migration, invasion and metastasis which affect tumor prognosis. Based on these mechanisms of action, changes in the 5-HT signaling pathway are thought to be an important cause of tumor prognosis originating from the breast epithelium.

In this study, the mechanism of action of serotonin on apoptosis, EMT, RTK, JAK / STAT pathways in MCF-7 breast cancer cells was examined and it was aimed to show therapeutic potential.

## 1. GİRİŞ

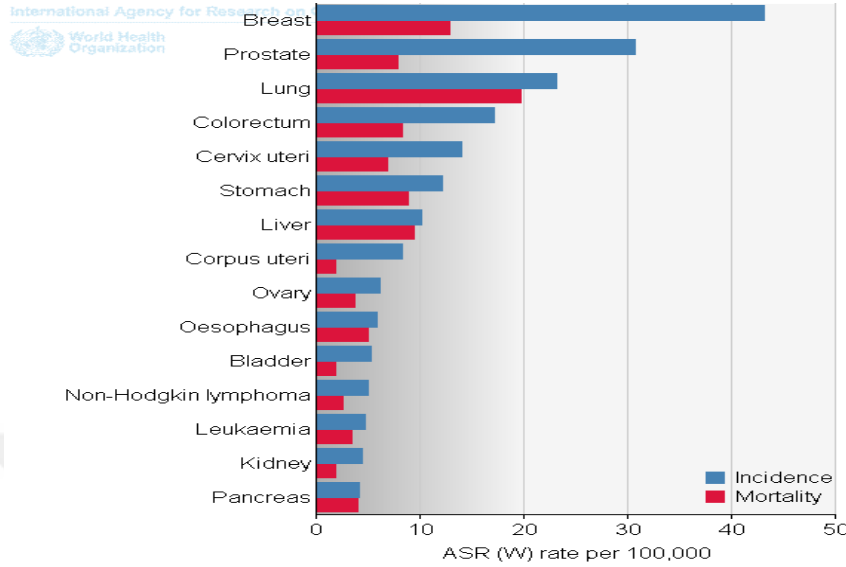
### 1.1.MEME KANSERİ

Kanser, klonal hücre popülasyonu dokusunun büyümesinden kaynaklı, gelişiminde temel hücrelerde genetik lezyonların birikmesinden oluşur. Kanserojenez olarak adlandırılan kanserin gelişimi, çeşitli şekillerde karakterize edilebilir (Rakoff-Nahoum 2006). Kanser gelişimi için altı temel özellik hücreler tarafından kazanılması gerekir. Bunlar, kendi için yeterli proliferasyon, anti-proliferatif sinyallere direnç, apoptoz sinyalinden kaçabilme, sınırsız ve düzensiz çoğaltma potansiyeli, vaskülarizasyonun korunması ve malignite için doku invazyonu ve metastazı olarak gösterilir (Hanahan ve Weinberg 2000). Kanserlerin büyük kısmı çevresel faktörler tarafından tetiklenerek oluşur ve önlenebilir bir hastalıktır. Fakat bunun yanı sıra kanser oluşumunda sadece çevresel faktörlerin etkisi olmamakla beraber kalıtımında etkisi var bulunmaktadır. Fakat çevresel faktörlerin meme kanserine olan etkisi, kalıtım etkisine oranla daha azdır. Morötesi, Gama ve X ışınları, kullanılan bazı ilaçlar, virüsler yada polisiklik aromatik hidrokarbonlar grubunda bulunan bazı kimyasal faktörler de hücrede kanser oluşturabilme özelliğine sahip faktörlerdir (Karantza-Wadsworth ve White 2007).

Deri kanserleri hariç olmak üzere, meme kanseri kadınlardaki görülen en sık kanser olmakla beraber, her 3 kanserden 1'ini oluşturmakla beraber akciğer kanserinden sonra kadınlar arasında kanserin türlerinden ikinci olarak gösterilen kanserdir. Yapılan istatistiksel araştırmalara göre her 8 kadında 1'inin meme kanserine yakalanma riski söz konusudur (DeSantis *ve ark.* 2014). Ayrıca meme kanseri, kanser kök hücresi (CSC) modelini takip ettiği bildirilen katı epitelyal tümörlerin ilk malignitesiydir (Hallett *ve ark.* 2016).

Kanser tarihini ele alacak olursak, M.Ö 480-370 yıllarında Hipokrates tarafından Kanser terimi tanımlanmış olup Rumca'da habis tümörlerini isimlendirmek amaçlı kullanılan 'Karkinos' kelimesinden türetilmiştir. Fakat kanserin ilk keşfi Hipokrates tarafından olmamış olup M.Ö 1600 yıllarından antik Mısır'daki mumyalar üzerinde

yapılan çalışmalarda insan kemik kanseri tespit edilmiştir. Buna takiben yapılan çalışmalarda M.Ö 1500 yıllarındaki en eski kayıtlara göre ilk kez belirlenen vakanın meme kanseri olduğu ileri sürülmüştür (Sudhakar 2009).



Şekil 1. 1. Dünyada kadınlarda görülen kanser istatistikleri (GLOBOCAN, 2012)

Meme bezinin dinamik yapısı onu mastitis ve meme kanseri gibi meme hastalıklarına karşı savunmasız olmasını sağlar. Buna takiben meme bezi gelişimi ve işlevini düzenleyen temel homeostatik düzenleyici mekanizmanın işlevsizliği nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, meme kanseri de dahil olmak üzere meme hastalıkları için zemin hazırlayan koşullar içerisinde meme bezinin gerileme aşamasını (evrimi) içerdiği gösterilmiştir (Pai ve ark. 2015).

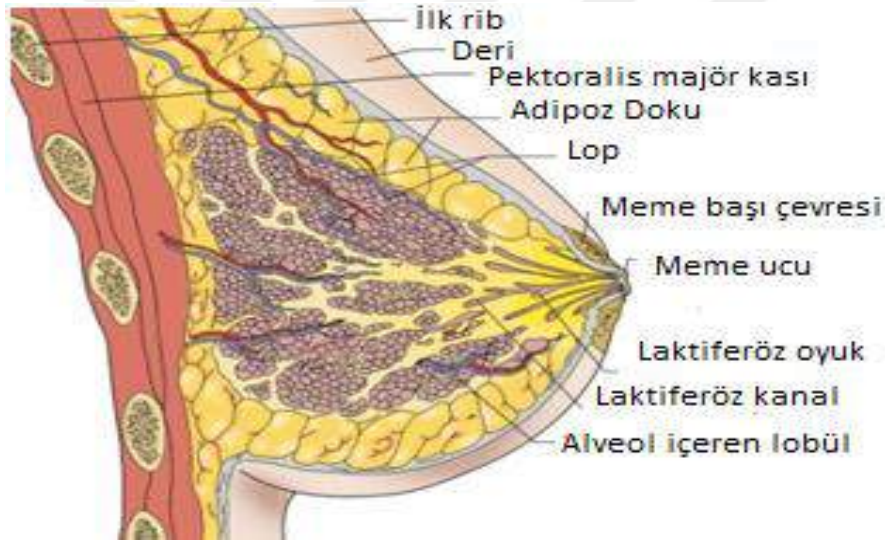
İnsan meme tümörlerinin başlatılmasının ve ilerlemesinin, tedavilere direnç gösteren meme tümörü başlatıcı hücreler (BTIC) olarak adlandırılan, nadir bir tümör hücresi alt popülasyonu tarafından oluşturulduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hallett ve ark. 2016).

Meme kanseri için en güçlü risk faktörleri arasında yaş ve genetik mutasyonlar birincil sebepler olarak gösterilse de bilinen ilave risk faktörleri arasında meme yoğunluğundaki artış, ailenin hastalık geçmişi ve üreme öyküsü bulunur (Lee ve ark. 2017).



### 1.1.1.Meme Histolojisi

Meme yağ dokusu adı verilen dokusundan oluşmaktadır. Kadınlarda sahip olunan meme yapısı genellikle erkeklerinkinden daha fazla glandüler doku içerir. Kadınların meme yapısında daha küçük loblara bölünmüş 12-20 lob bulunur ve bu bulunan loblar ve lobüller süt kanalları ile bağlanır. Memenin adipoz dokusu bir sinir ağsı, kan damarları, lenf damarları, lenf düğümleri tarafından sağlanır ve ayrıca fibröz bağ dokusu ve bağlardan oluşur (Akram ve ark. 2017). Meme dokusunda meydana gelen meme kanseri, dokunun histolojik özelliklerine göre iki kısımda incelenebilir. Meme içerisindeki loplarda meydana gelen kanser lobular karsinoma *in situ* (LCIS), kanal yapısı içerisinde meydana gelen duktal karsinoma *in situ* (DCIS) olarak adlandırılır (Davis 2001).



Şekil 1. 2. Meme histolojisi (Davis 2001)

### 1.1.2.Meme Kanseri Epidiyomolojisi

Yapılan birçok çalışmanın ışığında insan malignitesinin tanı ve tedavisinde elde edilen gelişmelere rağmen kanser, 2008'de oluşturulan kayıtlara göre, kanserin sebep olduğu 7,5 milyon ölümlle birlikte, dünya çapında önde gelen morbidite ve mortalite nedenleri arasında yer almaktadır. Meme kanseri küresel bir sorundur ve yılda 1,7 milyon yeni vaka teşhis edilmektedir (da Costa Vieira ve ark. 2017). Meme kanseri, günümüzde her yıl en sık tanı alan kanserdir ve kadınlarda kanser ölümünün önde gelen türlerindedir. Yapılan çalışmalarda kanser tanılarının % 23'ünü (1,38 milyon

kadın) ve kanser ölümlerinin %14'ünü (458.000 kadın) meme kanseri neden olmaktadır (Redig ve McAllister 2013). Gelişmiş ülkelerde zaten yüksek olan meme kanseri insidansı, Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelere de meme kanseri oranı çarpıcı bir şekilde artmaktadır. Türkiye'de 8,879 meme kanserli kadın sayısı yıllara göre artış göstermektedir. Bunu yanı sıra Türkiye Sağlık Bakanlığı'nın 2010 yılı verileri sonucunda, meme kanserinin kadınlarda tüm kanserlerin% 22,9'unu oluşturduğunu göstermiştir (Yüksel ve ark. 2017), (Uzun ve ark. 2004) .

Ülkelerin gelişmişlik düzeyleri incelendiğinde, meme kanseri görülme sıklığı gelişmiş ülkelere göre daha fazladır. Fakat bunun yanı sıra nispi ölüm oranları gelişmekte olan ülkelere nispi olarak artış gözlemlenmektedir (Ghoncheh ve ark. 2016). Gelişmekte olan ülkelere yapılan literatür taramalarının sonucunda meme kanseri nedeniyle ölümlerin yaklaşık %60'ı gelişmekte olan ülkelere görülmektedir. Hayatta kalma oranı gelişmiş ülkelere %73 üzerine çıkarken ve gelişmekte olan ülkelere bu oran %57 civarlarında seyretmektedir. Gelişmiş ülke olan ABD ise 5 yıllık sağ kalım oranı % 89,7 olarak belirlenmiştir (da Costa Vieira ve ark. 2017) .

Epidemiyolojik literatür ele alındığında sosyal faktörlerin ırksal eşitsizliklere katkısı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Meme kanseri insidansının oranlarına bakıldığında, tarihsel olarak beyaz kadınlar daha düşük insidan oranı görülürken, Afrikalı ve Amerikalı siyah kadınlarda bu oran daha yüksek olarak belirlenmiştir (Williams ve ark. 2016).

### **1.1.3.Meme Kanseri Türleri**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) en yeni yapılan sınıflandırmasına göre, meme kanseri hücre morfolojisi, büyümesi ve mimarisi kalıpları baz alındığında 21 ayrı histolojik türde sınıflandırılabilir. Genel olarak meme kanseri türleri invaziv ve non-invaziv (*in situ* karsinoma) olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Kanseri hücreleri, kanal ve lobüllerde sınırlı kalıp bazal membrana geçmiyorsa non-invaziv (*in situ* karsinoma), bazal membranı geçip stomaya göç ediyorsa invaziv karsinom olarak tanımlanmıştır (Hwangbo ve ark. 2013).

#### 1.1.3.1.Non-İnvaziv (*in situ* karsinoma)

*İn situ* meme karsinomu, meme lobları veya kanallarında bulunan mikroskop altında gözlemlendiğinde invaziv karsinom hücreleri ile benzerlik gösteren anormal epitelyal hücrelerden oluşan lezyonlar olarak tarif edilir. *İn situ* karsinomada kanser hücrelerin bazal membrandan geçerek meme stromasını göç etme potansiyeli taşıdığı ve tedavi başlamadığında istilacı kansere ilerleyeceği öngörülmüştür. Non-invaziv kanserler oluştuğu meme histolojisine göre; *in situ* duktal karsinom (DCIS) ve lobüler karsinom (LCIS) olarak iki kısımda incelenir (Ward ve ark. 2015).

DCIS, meme kanallarının lümeninde bulunan neoplastik epitel hücrelerinin kanser öncülerine dönüşümü ile proliferasyon sağlayan invaziv olamayan karsinomadır. DCIS, sağlam bir bazal membranla çevrilidir ve böylece meme stromasından ayrılır (Cowell ve ark. 2013). Erken tanı ile yakalanan *in situ* meme kanserlerinin % 83 gibi büyük bir oranla DCIS'dir (Ward ve ark. 2015). DCIS meme kanseri öncül lezyonları olarak da tanımlanabilir ve tedavi süreci başlatılmaz ise invaziv kanser türüne dönüşebilir. DCIS lezyonları 30 yaş altı kadınlarda düşük oranda gözlemlenirken, 50 yaş üstü kadınlarda bu oran yükselmektedir. 60-69 yaş aralığındaki kadınlarda ise, DCIS insidansında yüksek oranda artış tanımlanmıştır (Parikh ve ark. 2018).

*İn situ* lobular karsinoma (LCIS) meme lobüllerinde meydana gelen ve kanal lobüler birimlerinde sınırlı kalan karsinomadır. LCIS fizik muayene saptanmaz ve spesifik tanısal mamografik bulgulara nadiren gözlemlenir. Genellikle en sık olarak 40-55 yaşları arasındaki kadınlarda yapılan biyopsi örneklerinde rastlantısal olarak bulunur. LCIS invaziv meme karsinomasının gelişmesinde bir risk faktörü olarak görülebilir. LCIS lezyonları oluşan kadınlarda, invaziv meme kanseri ve kontralateral meme kanseri insidansı, DCIS lezyonları içeren kadınlara göre yüksek düzeydedir (Mao ve ark. 2017),(Logan ve ark. 2015), (Begg ve ark. 2016).

#### 1.1.3.2.İnvaziv Karsinoma

Yayılan özellikteki meme kanserleri tümörün bulunduğu yerden memenin diğer bölgelerine ya da vücudun diğer bölümlerine göç özelliği göstermesi durumunda invaziv karsinoma adını alır (Fisher ve ark. 2001). Amerikan Kanser Araştırmaları sonuçlarına göre geçtiğimiz her yıl içerisinde 207.000 kadına invaziv meme kanseri tanısı konmaktadır. Bu tanıların %10'u invaziv lobuler karsinoma (ILC) aitken,

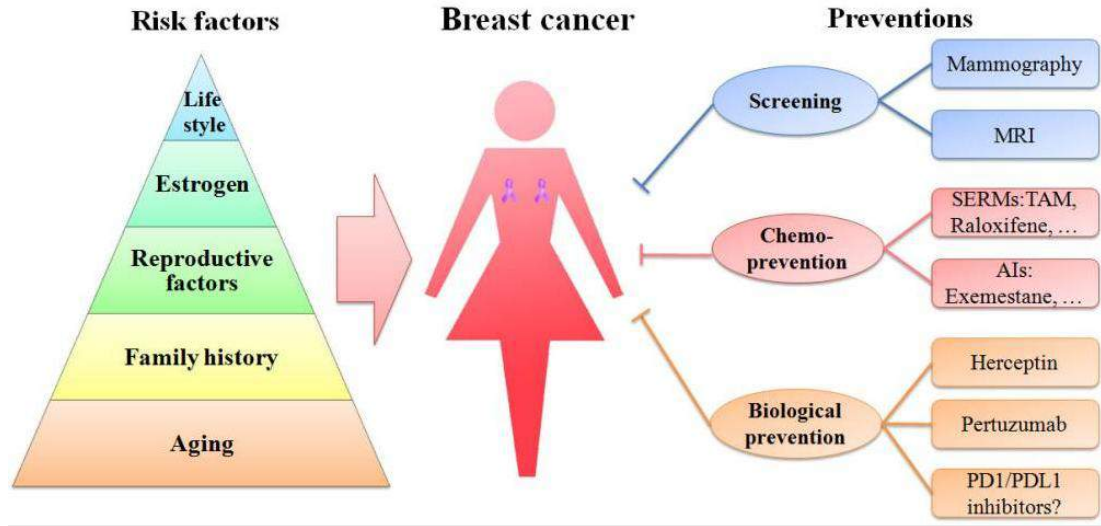
İnvaziv duktal karsinomda (IDC) en sık görülen meme kanseri histolojik alt tipidir (TİKEN *ve ark.* 2014).

İnvaziv duktal karsinoma (IDC), invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %75'ini oluşturur (Wu *ve ark.* 2017). Oluşan kanser hücreleri duktal bölgeden başlar ve çevresindeki bağ dokulara metastaz yapar (Hwangbo *ve ark.* 2013). IDC hücrelerinde östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve epidermal büyüme faktörü (HER) pozitif özellik gösterir ve bu özellik yayılımcı kanser türünde önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Gil Del Alcazar *ve ark.* 2017).

İnvaziv lobuler karsinoma (ILC), form olarak stromayı tek bir düzen içinde istila edebilen meme içerisindeki lobular kısımdan geçip bazal membranı aşan küçük yapışkan neoplastik hücreler olarak karakterize edilir. ILC çoğunlukla ER, PR pozitif ve HER2 negatif özellik gösterir. Fakat bazı ILC hücrelerin de HER2 protein yüksek ekspresyonu ve amplifikasyonu saptanmıştır (Ciriello *ve ark.* 2015), (Marmor *ve ark.* 2017). Son yıllarda ortaya çıkan genetik ya da çevresel faktörlerden dolayı ILC insidansında IDC'den daha hızlı bir artış gözlemlenmektedir. Ayrıca, ILC, IDC'nin gösterdiği metastazın tersine kemik, gastrointestinal sistem, uterus, meninges ve over gibi dokularada metastaz yapar (Cha *ve ark.* 2017).

#### **1.1.4.Meme Kanseri Risk Faktörleri**

Meme kanseri, çoklu hücre tiplerini ve özelliklerini içeren gelişimi çok adımda gerçekleşen ve önlenmesi dünyada zorlayıcı olan kanser türüdür. Erken teşhis meme kanserinde, hastalığı önlemek için gerekli olan en iyi yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Sun *ve ark.* 2017). Yaşam tarzı, yaş, üreme sorunu, aile öyküsü, genetik faktörler emzirme veya menopoz sorunları meme kanserinin başlıca risk faktörleri arasında yer almaktadır. Bunların yanı sıra beslenme bozuklukları ve sosyoekonomik durumlarda meme kanserinde risk faktörü olarak karşımıza çıkar (Jeronimo *ve ark.* 2017).



Şekil 1. 3. Meme kanseri risk faktörleri ve önlenmesinin şematik gösterimi (Sun ve ark. 2017)

Meme kanseri riskinde yaşına bağlı olarak artışında normal meme histolojisinde bozulmalar meydana gelir. Yaş faktörü, meme kanseri için güçlü risk faktörüdür ve DNA metilasyon değişiklikleriyle kuvveli bir biçimde ilişkilidir. Amerika'da yapılan araştırmaya göre meme kanseri nedeni ile gerçekleşen tüm ölümlerin yaklaşık %99,3'ü ve %71,2'si sırasıyla 40 ve 60 yaş üstü kadınlarda görüldüğü belirlenmiştir. Bu nedenle, 40 yaş ve üstü kadınlarda mamografi taraması yapılması büyük önem taşımaktadır (Johnson ve ark. 2017), (Siegel ve ark. 2017), (Sun ve ark. 2017).

Kadınlardaki emzirmenin meme dokusunda oluşabilecek meme kanseri riski üzerindeki büyük koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda bazal memran benzeri meme kanseri için emziren kadınlardan risk oranı emzirmeyen kadınlardakine oranla daha azdır (Holm ve ark. 2017). Ayrıca ek olarak geç menopoz veya çocuk doğurma eksikliği nedeniyle yaşam boyu östrojen azlığı olursa meme kanseri riski artar. Hamilelikte sahip olunan hormon yeterliliğinin meme kanseri riskini azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Dall ve Britt 2017). Bunun yanı sıra östrojen reseptörü negatif (ER-) meme kanseri, ER pozitif (ER +) meme kanserinden daha az yaygın ancak daha agresif bir meme kanseri alt tipidir (Jung ve ark. 2016).

Aile öyküsünde meme kanseri geçmişi olan bireylerde kanser risk oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra meme kanseri olan kadınlar için hastalığı gelişme riskinde ve insidansında önemli bir artış görülmektedir (Brewer *ve ark.* 2017). Yüksek meme yoğunluğu olan kadınlarda patolojik aile öyküsü nedeniyle meme kanseri görülme riskinde önemli artış belirlenmiştir (Duffy *ve ark.* 2018).

Kişilerin yaşam tarzları göz önüne alındığında, aşırı alkol tüketimi ve çok fazla diyet yağ alımı gibi modern yaşam tarzları meme kanseri riskini artırdığı, yapılan araştırmalara göre alkol tüketimi, östrojenle ilişkili hormonların seviyesini yükselttiği ve östrojen reseptörü yolaklarını tetikleyebildiği belirlenmiştir. Sigara içiminin meme kanseri üzerine etkisi çok kesin sonuçlarla belirlenmemiş olsa da alkol kullanımı ile beraber risk oranını arttırdığı saptanmıştır. Düzenli spor yapımı da meme kanseri risk oranını azaltan faktörlerden biridir. Kişilerdeki bazı mutasyonların varlığında fiziksel hareketsizlik kanser riskini azaltabilmektedir (Hamajima *ve ark.* 2002), (Jung *ve ark.* 2016), (van Erkelens *ve ark.* 2017).

### **1.1.5. Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri**

Dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri, kadınların kanser hastalığına bağlı olan ölümlerinin ikincisi olarak bilinir. Bu nedenden dolayı meme kanseri için erken tanı daha büyük bir önem oluşturmaktadır. Meme kanseri genellikle yapılan ağrı veya elle tutulur bir kitle nedeni ile oluşan semptomlar ile teşhis edilir. Mamografi, MRI, biyopsi, ultrason ve moleküler görüntüleme gibi farklı meme kanseri teşhis muayeneleri de sıkça kullanılan tanı yöntemlerindedir (Shamsi *ve Pirayesh Islamian* 2017), (McDonald *ve ark.* 2016), (Chien *ve ark.* 2017).

#### **1.1.5.1. Meme Kanseri Tanı Yöntemleri**

Yeni tanı konulmuş meme kanserli bir hastanın tanısız işlemlerinde fizik muayene, mamografi veya ultrason genellikle bölgesel evreleme için yeterlidir. Mamografi ise, meme kanserinin taranması ve teşhisinde kullanılan standart ve sıkça başvurulmuş bir yöntemdir. Yüksek riskli hastalar için ise mamografiyi diğer görüntüleme yöntemleriyle desteklemek, mamografik gizli kanserlerin tespitinde başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Son zamanlarda, dijital mamografiden daha fazla lezyon tespit etme vaadi ile tomosentez veya 3D mamografi teknolojisi tanıtıldı fakat rutin olarak kullanılmasının mortaliteyi azalttığı tam olarak kanıtlanmamıştır. Dijital meme

tomosentezi (DBT) yeni ortaya çıkan x-ışını ile çalışma prensibine sahip görüntüleme yöntemidir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) muayenesi tercihen ilk sırada olmasa da ancak seçilen hastaların risk gruplarına göre önceliği değişiklik gösteren bir yöntemdir Ayrıca MRG ameliyat öncesi için meme kanseri evreleme, kemoterapi tedavisindeki değerlendirme için başvurulan yöntemlerin başında gelir (McDonald *ve ark.* 2016), 49, (Chirita 2017).

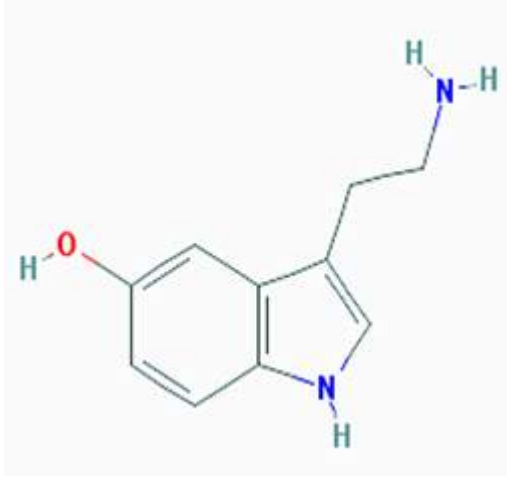
#### 1.1.5.2.Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanserinde tedavisel yaklaşımlara baktığımızda; ameliyat, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapi gibi yöntemler hastalık seyrine göre sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleridir. Birçok meme kanseri türünde başarılı sonuçlar elde edilen bu tedavilerde bazı metastazik kanser türünde yeterli gelmediği görülmüştür. Bu durumda yeni tedavi yolları ile ilgili çalışmaların hız kazanması önem arz etmektedir (Mu *ve ark.* 2017).

Meme kanseri tedavisinde sıkça başvurulan yöntemlerden biri olan cerrahi yöntem meme koruyucu yaklaşım ve meme koruyucu olmayan yaklaşımlar olmak üzere iki temele dayanmaktadır. Meme koruyucu yaklaşım sadece kanserli dokunun çıkarıldığı, meme koruyucu olmayan yaklaşım ise kanserli meme dokusunun tamamının alındığı cerrahi yöntemdir (Kronowitz ve Kuerer 2006).

## 1.2. SEROTONİN

Serotonin, (5-Hidroksitriptamin (5-HT)) bir nörotransmitter olarak oynadığı rol içerisinde dikkat çeken, santral sinir sistemine ve bu çevredeki bölgelere farklı efektif etkilere sahip olan bir biyojenik amin molekülüdür (Mohammad-Zadeh *ve ark.* 2008). 5-hidroksitriptamin (5-HT), iki azot molekülü içerir ve içerdiği ilk azot molekülü bazol ve indol-5'in içerisinde. İkinci azot molekülü ise, 2-aminoetil içerisindeki alifatik zincirin ucunda bulunur. 5-HT, triptofandan aminoasidinden üretilir ve melatonin, formil-5-hidroksinilenamin ve 5-hidroksiindoleketik asit gibi moleküllerin sentezi için substrat görev yapar (Arreola *ve ark.* 2015).



Şekil 1.4. Serotoninin kimyasal yapısı (pubmedchem.org)

Serotoninin tarihsel sürecine bakacak olursak, 1940'lı yıllarda gastrointestinal kanalda keşfedilmesinden önce, vasküler özellikleri baz alınarak adranalin taklit edildi madde olarak tanımlanmıştır. Daha sonrasında serotonin boğa kanından elde edilen serumdan saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Serotonin adı ise, maddenin 1948'de kristalize edilmesinden sonra serumdan (ser) ve kan damarlarındaki vasküler tonu (tonin) heceleri birleştirerek oluşturmuştur (Arreola ve ark. 2015), (Gothert 2013).

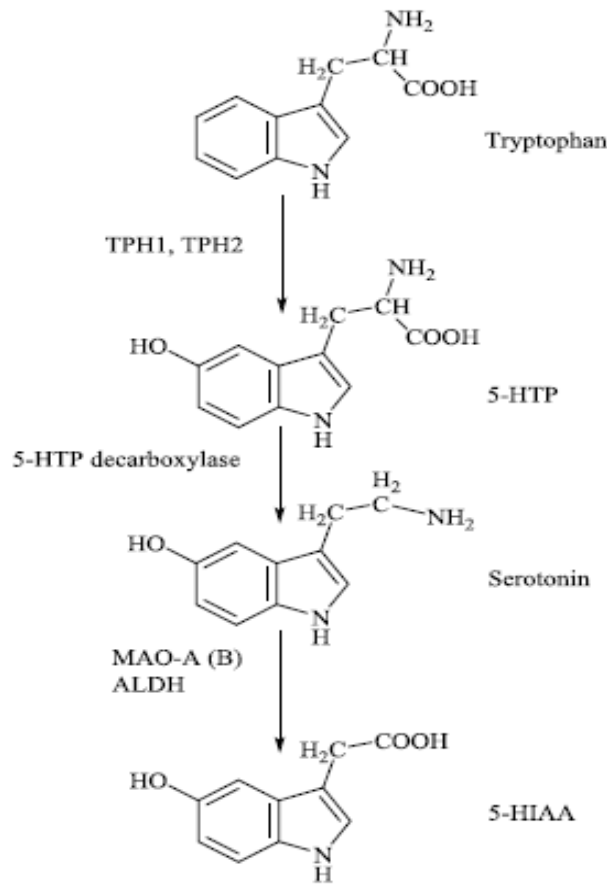
Serotoninin beyin hariç fonksiyon gösterdiği doku ve organlarda etkileri sebebiyle halen ikilem boyutundadır. Deri, akciğer, böbrek, karaciğer ve testis gibi vücutta diğer organ yapılarında da yer aldığı ve neredeyse tüm organizmalarda serotoninin varlığı belirlenmiştir (Azmitia 1999). Serotoninin beyinsel aktivasyonu incelendiğinde biliş, bellek, öğrenme, iştah, bağışıklık sistemi fonksiyonu, uyarılma gibi duygu durum düzenlemede sorumlu bir nörotransmitter olduğu belirlenmiştir (Tenpenny ve Commons 2017).

### 1.2.1. Serotonin Biyosentezi

Biyojenik amin olan serotonin (5-HT), sinir sistemi ve periferik organlarda dağılmış tespit edilen 13 reseptörü olan biyokimyasal haberci ve düzenleyicidir. 5-HT biyosentezi triptofan aminoasitinden iki adımda gerçekleşir ve triptofan mekanizmasının %3' nü oluşturur. Birinci adım olarak, triptofan hidroksilaz (TPH) enzimi tarafından hidroksi grubu eklenerek triptofan aminoasidi ara ürün olan 5-



hidroksitriptotana (5-HTP) dönüştürür. Bu adım serotonin biyosentezinde hız sınırlayıcı adım olarak belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonu gerçekleştiren TPH enziminin iki farklı izoformu bulunmaktadır. Triptofan hidroksilaz-2 (TPH2), merkezi sinir sisteminde bu sentezi gerçekleştirirken, TPH1 izoformu, bunu periferde yapar. Bu iki enzimde serotonin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimler olarak belirlenmiştir. Reaksiyondaki ikinci aşama, 5-HTP'nin aromatik amino asit dekarboksilaz (DDC) enzimi tarafından oluşturulan karboksilaz grubu uzaklaştırılan hızlı dekarboksilasyonu serotonin molekülü olan 5-HT sentezlenir (Islahudin ve ark. 2014),(Ge ve ark. 2017), (Welford ve ark. 2016).

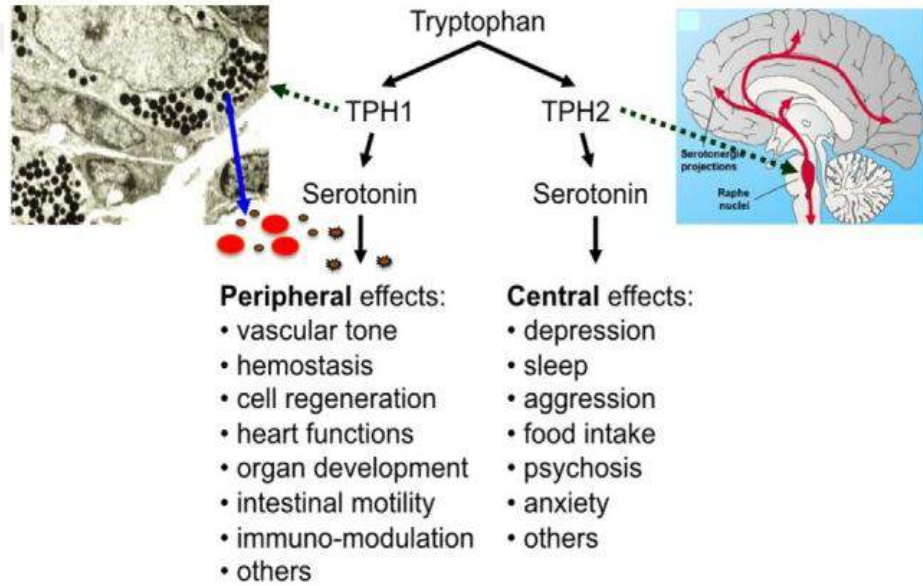


Şekil 1.5. Serotonin biyosentezi (Sarrouilhe ve ark. 2015)

Serotonin çeşitli enzimlerle parçalanması sonucu dört farklı katabolizmada görev almaktadır. Bunlardan birincisi, 5-HT'den iki enzimatik adımla melatonin oluşumu sentezlenir. 5-HT'nin ikinci katabolik yolu, formil-5-hidroksikinurenamin üretilmesidir. 5-HT'nin, monoamin A/B (MAO-Ao, MAO-B) ile 5-hidroksiindoleasetik aside (5-HIAA) dönüştürülmesi üçüncü katabolik yol olarak belirlenmiştir. MAO-A ifadesi, sitokinler IL-4 ve IL-3 tarafından düzenlenir ve

periferik kandan tanınlanır. Dördüncü ve son katabolik yol, amin N-metiltransferaz enzimini kullanarak 5-HT'den N-metilserotonin üretir ve böylece immün hücrelerde aktif olabilir (Arreola *ve ark.* 2015).

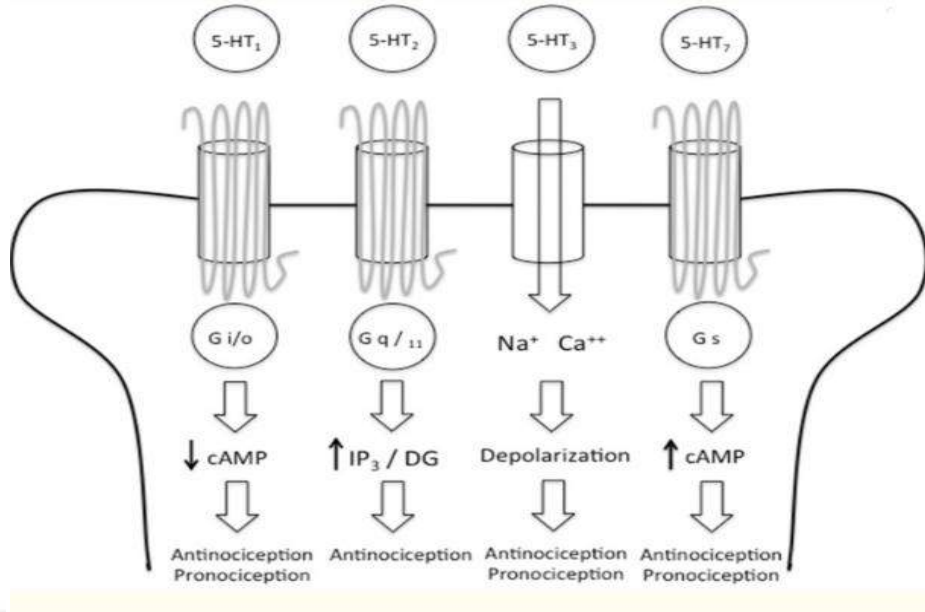
5-HT biyosentezinden sonra, santral sistemde ve periferik sistemde etki mekanizmasına sahip bir norotransmitterdir. Uyku, iştah, ruh hali, hafıza ve öğrenme gibi önemli beyin fonksiyonunu düzenler ve kan beyin bariyerinden geçerek periferik sisteme transfer olur. Diğer çevresel hormonlar gibi birçok organ ve sistemde merkezi rol oynar. Serotonin, triptofandan sentezi TPH1 enzimi tarafından gerçekleşir ise, santral sistemde, TPH2 enzimi gerçekleşir ise periferik sistemde etki gerçekleşir (Walther ve Bader 2003), (Herr *ve ark.* 2017).



Şekil 1. 6. Serotoninin periferik ve santral sistemdeki etkisi (Herr *ve ark.* 2017)

### 1.2.3. Serotonin Reseptörleri ve İlişkili Protein Yapılar

Rapport ve arkadaşları tarafından 1948'de vazokonstriktör olarak bilinen serotonin tanımlanması ile ilgili çalışmalar sürmektedir. Günümüzde tanımlanan 7 serotonin reseptörü (5-HT<sub>R</sub>) ve bunları yaklaşık olarak 15 alt tipi (5-HT<sub>1A</sub>-5-HT<sub>7</sub>) bulunmaktadır (Herr *ve ark.* 2017). 5HT<sub>R</sub>, 5HT<sub>3</sub> hariç, 7-transmembran alanı içeren G Protein-Bağlantılı Reseptör (GPCR) ailesinin A sınıfına aittir. 5HT<sub>R</sub>'den gelen sinyal iletimi, standart olarak GPCR'lere benzer (Harmar *ve ark.* 2009).



Şekil 1.7. 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> ve 5-HT<sub>7</sub> reseptörlerin membran lokalizasyonu (Cortes-Altamirano *ve ark.* 2018)

5HTR başta immün sistem yanı sıra birçok yapı ve dokuda fonksiyonel olarak rol oynamaktadır. İmmün sistemde sitokin proliferasyonunu, sitokinlerin iletimini, sitokinlerin göçünü ve hücrel aktivasyonu etkiler. Bununla beraber yapılan çalışmalarda, 5HTR'den gelen sinyaller 5-HT aktifleştirerek T hücresi aktivasyonunu lenfosit B hücresi poliferasyonunu düzenler (Muller *ve ark.* 2009).

Serotonin reseptörlerinin birçoğu merkezi sinir sisteminde (CNS) önemli düzenleyici role sahiptir. 5-HT<sub>1A</sub> reseptörleri omurilikteki ve dorsal ve ortanca raphe çekirdeğinde ve limbik bölgelerde lokalize olur. Bu reseptörler duygu durumunda, bilişlerde ve ağrı düzenlenmesinde rol oynar. 5-HT<sub>1B</sub> reseptörü, 5-HT<sub>1A</sub> nın CNS sistemindeki etkilerini taklit edici özellik gösterdiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Cortes-Altamirano *ve ark.* 2018). Aynı zamanda 5-HT<sub>1B</sub> reseptörü, presinaptik inhibisyon, pulmoner vazokonstriksiyon etkileri ile vasküler sistemde konumlanır (Mohammad-Zadeh *ve ark.* 2008).

Prefrontal kortekste bulunan 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri çalışma belleği, koşullama, klasik şartlandırma ve görsel seçicilik gibi bilişsel işlevlerde görevlidir (Kupers *ve ark.* 2009). Ayrıca MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri, mRNA ve reseptör proteinini kodlama açısından ifade edilir ve kanser gelişiminde düzenleyici rol oynar (Sonier *ve ark.* 2006). 5-HT<sub>2C</sub> reseptörü mide dokusunda lokalize olur ve HCC hücrelerinde sağ kalımı destekler (Soll *ve ark.* 2010).

5-HT<sub>3</sub> reseptörünün beyindeki aktivasyonu, striatum çekirdek boyunca nöronların postsinaptik depolarizasyon oluşumunu ve sinaptik iletim ile uyarılmayı sağlar (Maricq *ve ark.* 1991). Bunu yanı sıra 5-HT<sub>3</sub> reseptörü duyu ve enterik sinirlerde fonksiyonel rol oynar (Mohammad-Zadeh *ve ark.* 2008).

5-HT<sub>4</sub> hipokampus içerisinde eksprese edilen bir reseptördür. Dolayısıyla limbik sistem ve hipokampus önemli hedeflerindedir. 5-HT<sub>4</sub> reseptörünün aktivasyonundaki artış protein kinaz A (PKA) ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerinde artmasına neden olarak K<sup>+</sup> kanallarının inhibisyonunu tetikler. Buna ek olarak, beyin fonksiyonlarının daha az görünür olan yerlerini düzenler ve hipokampus gibi önemli beyin yapılarında sinaptik iletimi düzenler (Hagena ve Manahan-Vaughan 2017).

5-HT<sub>5</sub> reseptörü öğrenme ve hafıza ile ilgili olan beyin bölgelerinde sentezlenir. Fizyolojik fonksiyonları halen açıklığa kavuşmamış olsa da bazı yerleşim yerleri baz alınarak, duygusal durumların düzenlenmesi, biliş, kaygı, duyuşsal algı ve nöroendokrin fonksiyonların varlığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra, öğrenme, hafıza, duygusal davranış, immünoreaktif hücrelerin ekspresyonu, dopaminerjik iletim düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Meneses 2015), (Wesolowska 2002).

5-HT<sub>6</sub>, beyindeki fonksiyonel durumları ele anırsa, antagonizm, hafıza oluşumu, yaşa bağlı bilişsel bozukluklarla beraber, pronetik veya antiamnesik etkiler üretir. Bu etkiler dahilinde şizofreni, parkinson gibi hastalık modellerinde hafıza açıklarında 5-HT<sub>6</sub> rolü önemli bir noktadadır. Yapılan çalışmalarda reseptörün engellenmesi durumunda pizodik hafızayı normalleştiren mTOR yolağının aşırı aktivasyonunu azalttığı görülmüştür (Meneses 2015).

5-HT<sub>7</sub> reseptörü son zamanlarda yapılan çalışmalara göre antagonist ve agonistleri ile farmakolojik ajanlara etki mekanizması bu alt tip reseptörü daha önemli molekül haline getirmiştir. Vücut ısısını, uyku ve sirkadiyen ritim düzenlemede sağlam rolü bulunur. Bu reseptör duyuş durum bozukluklarında etkilediği için depresyon tedavisi için bir olası hedef olarak çok dikkat çekmektedir (Nikiforuk 2015). Aynı zamanda 5-HT<sub>7</sub> reseptörü etki mekanizması tam olarak biliniyor olmasa da kan damarları ve sindirim sistemine etkisi bulunmaktadır (Mohammad-Zadeh *ve ark.* 2008).

Serotonin ilişkili olduğu yapılardan olan serotonin geri alım taşıyıcısı (SERT), 12 transmembran alanlı bir nörotransmitter ailesine aittir. 5-HT için subsrat görevi yapıp hücre yapısına taşır. SERT trombosit de olmak üzere periferde sayısız bölgede eksprese edilir. SERT işlevi, Na<sup>+</sup> / Cl<sup>-</sup> iyonlarının taşınma olayına bağlıdır. SERT kodlayan gende 14 ekzon bulunur ve 17q11.1-17q12 kromozomda lokalizedir. İki farklı izoformu bulunur. Glikolize olan formu yavaş göç eden, glikolize olmayan formu ise hızlı göç eden olarak tanımlanmıştır. SERT'nin keşfinden bu yana, psikiyatrik bozukluklarda, kanser hastalıklarında rolünü anlama konusunun çalışmaları yapılmıştır. Selekt serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) kullanılarak SERT'ye bağlanan ve 5-HT alımını bloke etmesi sağlanmıştır. Özellikle meme tümör hücrelerinde SERT, TPH1, 5-HT sentezleme ve taşıma mekanizmaları bulunuyor. SERT ifadesi meme tümör hücrelerinde diğer tümörlere göre ekspresyonunda daha fazla artış olduğu saptanmıştır (Gwynne *ve ark.* 2017), (Muller *ve ark.* 2016), (Hallett *ve ark.* 2016).

Serotonin bazı durumlarda yüzey reseptörleri yardımı ile hücre içi bir sinyal molekülü olmanın dışında, bir proteine transiminyasyon reaksiyonu ile kovalent bağlanıp sinyal iletimini düzenlediği saptanmıştır. Serotonilasyon adı verilen durum, daha sonra spesifik GTPazları aktive eder. Reseptörden bağımsız olarak gerçekleşen bu sinyalleşme modeli serotoninin düzenleyici işlevine ek olmuştur. Protein serotonilasyonunun serotonin içeren dokulardaki salgılama süreçlerine etkisi var sayılmaktadır (Paulmann *ve ark.* 2009).

#### **1.2.4. Serotonin Meme Kanseriyle İlişkisi**

Dünyada kadınlar arasında yaygın olan meme kanseri için belirlenen biyolojik belirteçlerin fonksiyonları yeterli değildir. Bu nedenle meme kanseri prognozunda gerekli olan parametlerin araştırılması önem kazanmaktadır. Serotoninin rolü ise meme bezi gelişiminde tanımlı olmasından dolayı meme kanserinde kiritik bir moleküldür (Sarrouilhe *ve ark.* 2015).

Serotonin'in, bir nörotransmitter olması dışında meme içerisinde bulunan epitelyal denge düzenlemesinde görev alır. Ayrıca 5-HT reseptörlerinin kanser hücrelerinde mitogenik sinyalizasyon içinde rolleri vardır. Serotonin düzensizliği sonucunda

apoptik yollarda ve hücre poliferasyonunda düzensizlikler meydana gelir (Jose *ve ark.* 2017). Meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada, 5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, 5HT<sub>2B</sub> reseptörlerinin içinde olduğu birçok serotonin reseptörünün ekspresyonunda artış olduğu görülmüş ve bu artışlar tümör evresinin artması ile birlikte yükseliş göstermiştir. 5HT<sub>3A</sub> tüm kanser hücrelerinde düşük ekspresyonu olmaktadır, MCF-7 hücre hatlarında sadece 3 farklı 5-HT reseptörlerinin arttığı görülmüştür. Bunun yanı sıra MCF10A hücrelerinde ki 5-HT tedavisinden sonra kaspaz 2 aktivasyonunu arttırmış ve 5-HT aktivitesinin artması normal hücreyi apoptoza yönlendirme bilgisi yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Meme kanseri hücrelerinde 5-HT ye bağlı olarak kanser hücrelerinin büyüme inhibisyonuna dirençli olabilme yeteneğine sahip olabilirken ayrıca 5-HT dozuna bağlı olarak memeli epitel hücrelerinde proliferasyonu inhibe edebilmektedir (Pai *ve ark.* 2009).

Meme kanserine sahip hastalarda hormon seviyelerine bakılacak olunursa, östrojen seviyelerinde azalma görülür ve bu azalışla birlikte menapozal belirti olan ani ısı oluşumu ortaya çıkar (Li *ve ark.* 2019). Ani ısı, mekanistik olarak aydınlatılmamakla birlikte östrojen seviyesinin azalmasına bağlı olarak gerçekleşir (Casper ve Yen 1985). Ani ısı basmasına bağlı olarak östrojen azalması ile serotonin reseptörlerinin artması arasında bir ilişki vardır. Çeşitli serotonin reseptörlerinin sıcaklık kontrolü üzerinde etkisi bulunur. Meme kanseri hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda ani ısı gösteren menapozal durum için kullanılan çeşitli ilaçlar dışında serotonin geri alım inhibitörleri tedavi için hastalarda kullanılmıştır (Berendsen 2000, Leon-Ferre *ve ark.* 2017). Depresyon tedavisinde antidepresan grubu ilacı olarak, seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) kullanılmaktadır. Geç evre meme kanseri hastası üzerinde SSRI uygulaması sonucunda, tümör proliferasyonunun arttığı görülür. Bir istatistik çalışmasında, SSRI kullanan hastaların kontrol grubuna göre; meme kanseri olma riskinin %27 olduğu ve yüksek risk grubunda olduğu bulunmuştur (Busby *ve ark.* 2018), (Ballou *ve ark.* 2018).

Serotonin ilişkili protein yapıları olan TPH1, SERT ve 5-HT reseptörlerinin meme tümör hücrelerinde sentezleme ve taşıma mekanizmaları tanımlanmıştır. Bu serotonerjik sistem üzerinde kullanılan inhibitörlerin meme kanserine efektif etkisi araştırılmış olup önemli sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, invitro uygulamada serotonerjik sistem antagonistleri kemotropik ajanlarda beraber

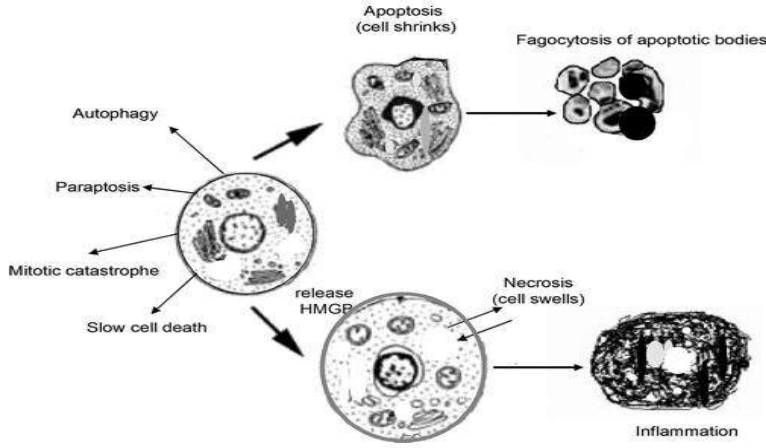
kullanılması doza bağılı olarak tümör çapını küçülttüğü ve apoptozu indüklediği saptanmıştır (Hallett *ve ark.* 2016), (Gwynne *ve ark.* 2017).

### 1.3. APOPTOZ

Kerr, Wyllie ve Currie' nin çalışmaları sonucunda apoptoz terimi ilk kez 1972'de bir bildiriye yayınlanmış ve kullanılmıştır (Elmore 2007). Apoptoz teorik olarak incelendiğinde, hücre dışında oluşan lezyonlar ya da genetik faktörler yardımı ile etkin hale gelen ve hücrenin kendisinin programlanmış olduğu mekanizma ile hücre ölümünü kontrol etmekte, diğer bir deyişle intihar etmektedir (Saikumar *ve ark.* 1999). Apoptoz embriyonik gelişim için veya çok hücreli organizmalarda hemostazın korunmasında gerekli olan fizyolojik bir süreçtir. Aynı zamanda kanser başta olmak üzere birçok patolojik durumda önemli rol oynar (Burz *ve ark.* 2009). Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz sadece homeostazı korumak için değil, gereksiz hücrelerin form organizmasını ortadan kaldırmak için çok önemli olan bir mekanizmadır. Ayrıca apoptoz mekanizmasında ortaya çıkabilecek sorunlar, insanlarda patolojik bulgulara yol açabilir (Ashkenazi 2015).

Apoptoz için uyarı alan hücre kendi mikro çevresinden uzaklaşır ve komşu hücrelerle olan bağlantısını koparır. Hücrede ilk aşamada hücrenin hacminin küçülmesi (büzüşme) ve ardından çekirdek içerisindeki kromatinin yoğunlaşmasıdır. Hücrenin DNA'sı nükleozomlarından kesilir fakat hücrenin organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarının yapısındaki fosfolipid dış yüzeye lokalize olur. Çekirdek yapısı küçülür ve hücre zarı içerisinde parçalar halinde kopar. Böylece apoptotik cisimlerin oluşumu gerçekleşir. Oluşan apoptotik cisimler ortamdaki makrofajlar tarafından tanılır ve fagozite edilir. Apoptoz olayında infamasyon gerçekleşmez (Burz *ve ark.* 2009).

Apoptoz ve nekroz hücrede görülen iki önemli ölüm şeklidir. Temel olarak ikisinde hücrenin gerçekleştirdiği ölüm şekli olarak görülse de morfolojik ve etki olarak birbirlerinden ayrılır. Nekroz apoptozun aksine çekirdek şişmesi ile karakterize edilir. Bunu yanı sıra apoptoz sonrasında infamasyon oluşmazken nekrozda infamasyon gerçekleşir ve komşu hücreler de nekroz somunda olumsuz etkilenir (Nikoletopoulou *ve ark.* 2013).



Şekil 1.8. Hücrede gerçekleşen apoptoz ve nekrozun gösterimi (Burz ve ark. 2009)

### 1.3.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptozun moleküler mekanizması kaspaz bağımlılığı ile değişkenlik göstermesine göre ayırt edilen iki farklı yoldan oluşur. Birbirine bağlı bu iki yol kaspaz proteazların hücre içi mekanizmasını aktive ederek apoptozu kontrol eder. İntrinsik yol, hücrel hasar ya da strese karşı reaksiyona giren BCL-2 protein ailesi üyeleri ve mitokondri yoluyla kaspazlara bağlanır. Ekstrinsik yol ise immün efektör hücreler üzerinde eksprese edilen ölüm ligandlarına yanıt veren hücre yüzeyi ölüm reseptörleri yoluyla kaspazları aktive eder (Ashkenazi 2015).

#### 1.3.1.1. İntrinsik Yol

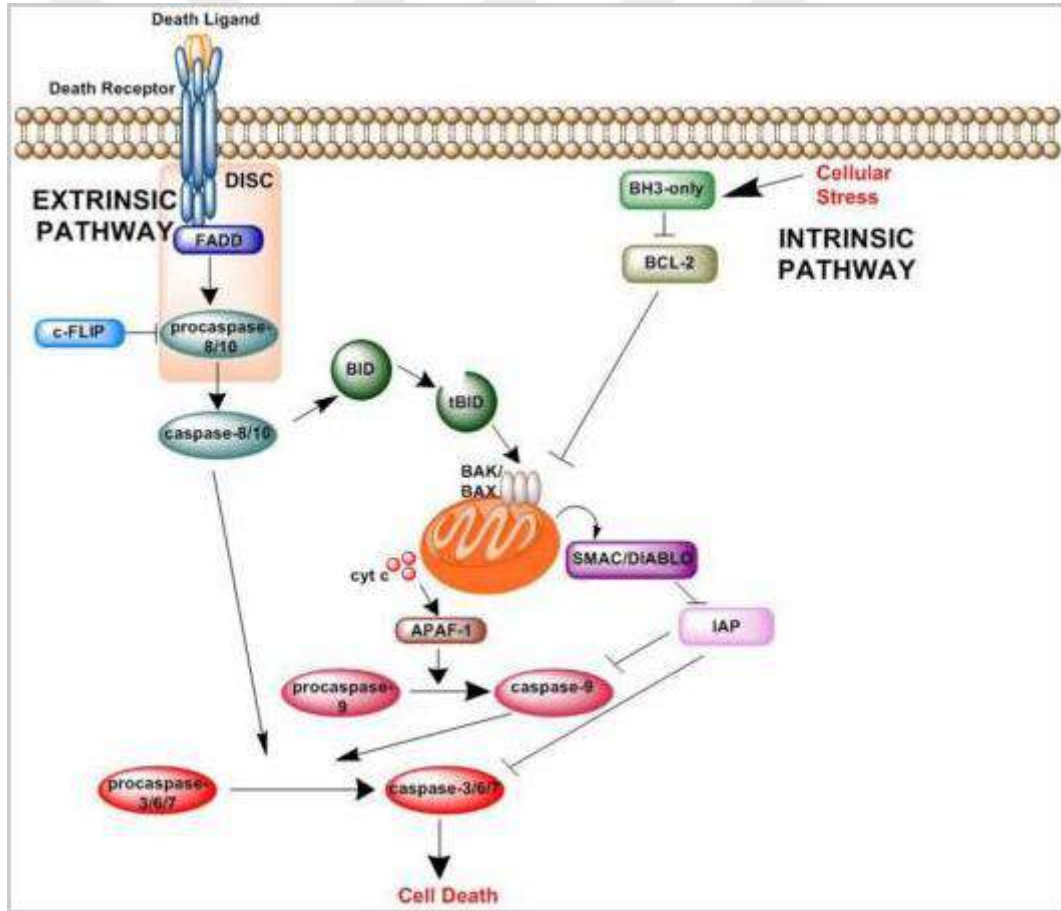
İntrinsik yol, diğer bir ismi ile mitokondriyal yol, BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir ve düzenlenir ve mitokondriyal dış membran geçirgenliği (MOMP) ile apoptoz olayı gerçekleştirilir (Kalkavan ve Green 2018). MOMP, kaspaz yolağını aktive etmek için mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c, SMAC/DIABLO gibi faktörlerin transfer olmasını sağlar. MOMP mitokondriden proteinleri sitoplazmaya salınımını sağladığı zaman hücre için apoptoz geri dönüşümsüz bir nokta olarak görülür. MOMP'dan sonra, kaspaz aktivasyonu birkaç dakika içinde gerçekleşir ve bu da hücre ölümüne yol açar (Pena-Blanco ve Garcia-Saez 2018). İntrinsik yol içerisinde rol oynayan BCL-2 proteini anti-apoptotik bir proteindir ve diğer anti-apoptotik moleküllere bağımlıdır (Gibson ve Davids 2015).



### 1.3.1.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yolakta apoptoz transmembran reseptörler aracılığı ile interaksiyona dayalıdır. Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesi üyeleri olan FasR, TNFR, DR3-5 reseptörlerine sırasıyla Fas Ligandı (FasL), TNF- $\alpha$ , Apol3L ve Apol2L ligandlarının bağlanmasıyla sinyal aktivasyonu oluşur (Rai *ve ark.* 2005). Bu yolunun aktive edilmesi ile kaspaz-10 ya da kaspaz-8'in tetiklendiği gözlemlenir. Tetiklemenin sonucunda apoptotik mekanizma başlatılır ve hücre kendini ölüme sürükler. (Schrader *ve ark.* 2010).

Hem intrinsik yolakta hem de ekstrinsik yolakta ortak olarak oluşan aspartik asit kalıntıları, yani kaspazlar için spesifik sistein proteazlarının aktivasyonuna yol açar (Pena-Blanco *ve Garcia-Saez* 2018).



Şekil 1.9. İntrinsik ve ekstinsik apoptotik yolak (Zaman *ve ark.* 2014)

#### 1.4. EPİTEL MEZANKİMAL GEÇİŞ (EMT)

Epitel mezankimal geçiş (EMT) epiteryal hücre fenotipinin mezenkimal hücre fenotipine dönüşüm yaptığı biyolojik süreçtir. Fizyolojik koşullarda EMT, organ gelişimi, yara onarımı doku tadilatı, kanser ve metastatik ilerlemede önemli rol oynamaktadır (Liu ve ark. 2015). Embriyonik gelişimde, hücreler epitelyum mezenkimal durumlar arasında oldukça hızlı ve dinamik geçiş yapabilirler (Nieto ve ark. 2016). EMT ilk zamanlarda embriyonik geçiş sırasında önemli bir farklılaşma olarak görülse de günümüzde iltihaplanma, fibroz ve kanser gibi çeşitli hastalıkların fizyolojisinde ve ilerlemede önemli patolojik bir mekanizma olarak kabul edilir (Wang ve ark. 2010).

EMT, epitelyal hücrelerin, biyolojik olayların bir kademesi boyunca bir mezenkimal fenotip ve hareketlilik elde ettiği karmaşık bir programdır. Tespit edilen üç farklı EMT programı vardır. Bunlardan birinci olan tip, embriyogenez, gastrulasyon ve nöral kret formasyonu ile ilgilidir. Tip 2 olarak tanımlanan türü ise doku yenilenmesi ve yara iyileşmesi ile alakalıdır. Tip 3 ise her iki tipten farklı olarak patolojik süreçleri içine alır ve malignite, invazyon ve metastaz ile ilişkilidir (Felipe Lima ve ark. 2016).

EMT aktivasyonu, hücrenin fizyolojik yapısında birçok değişimlere sebep olur. Hücre iskeletinde meydana gelen değişimler, hücre morfolojisinde oluşan iç benzeri uzanmış formlara bağlı değişimler, yapışkan ve boşluklu kavşakların varlığı epideryalden mezankimale geçişte karşılaşılan değişimler arasında gösterilebilir. Bunun yanı sıra bu geçişte meydana gelen epitel hücre-hücre bağlantılarının çözülmesi, apikal-bazal polarite kaybı ve eşlik eden ön-arka polarite kazancı gibi morfolojik durumlar için en az 400 genin ekspresyonu ile yapılandırıldığı belirlenmiştir (Shibue ve Weinberg 2017).

EMT aktivasyonu sırasında Slug, Snail, Twist ve Zeb1 gibi EMT ilişkili transkripsiyon faktörleri aktif olur ve epitelyal hücre formunu koruyan E-kaderini inhibe eder (Ungefroren ve ark. 2018). Epitel hücre belirteçleri olarak, E-kaderin, klauudin, okludin, tip IV kollajen, laminin I ve desmoplakin iken mezenkimal hücre belirteçleri N-kaderin, integrin, vimentin, fibronektin, tip I kollajen ve laminin 5'dir. TGF- $\beta$ , Wnt, Noct, Hedgehog gibi sinyal yolları EMT mekanizmasının

regülasyonunda görev alan ve destekleyen sinyal yollarıdır. Bu sinyal yollarının merkezi hedefi E-kaderin ekspresyonu düzenlemektir (Liu *ve ark.* 2015).

EMT belirteçlerinin ekspresyonu, kanser hücrelerinde migrasyon, metastaz ve invazyon gibi patolojik sonuçlar oluşmasına neden olur. Vimentin, meme kanserinde tümör agresifliğini ve EMT yolağını düzenleyen bir gendir. Üçlü negatif meme kanserinde, vimentin aktivasyonu kötü prognostik faktör olduğu belirlendi. Aynı zamanda HER2'yi aşırı eksprese eden normal insan meme epitel hücrelerinde yukarı regülasyonu saptandı (Geng *ve ark.* 2014).

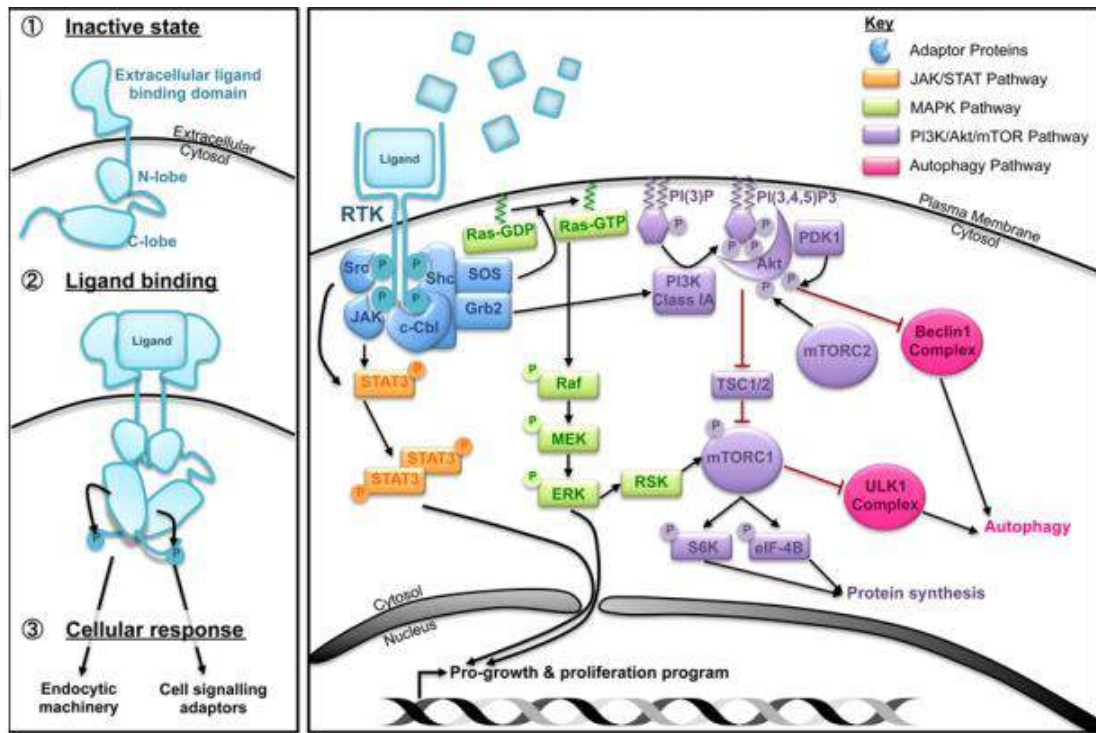
## 1.5. RESEPTÖR TİROZİN KİNAZLAR

Reseptör tirozin kinazlar (RTK), memeli hücrelerinin hücre dışı ortamdaki değişikliklerini algılayan plazma membran reseptör ailesidir. RTK'ların proliferasyon, hücre canlılığı, hücre farklılaşması ve motilite olmak üzere birçok önemli hücre işlevleri olduğu belirlenmiştir (Tan *ve ark.* 2017). Bunun yanı sıra veziküler geçişleri bölümlendirmede ve hücre bileşenlerin uygun şekilde sıralanmasında kilit rol oynar (Fraser *ve ark.* 2017). İnsanlar 28 alt aileye giren 58 çeşit tane RTK molekülüne sahiptir. RTK'nın aktivasyonu reseptör oligomerizasyonu gerektirir. Bu reseptör ilişkisi ligand bağlanmasına cevaben gerçekleşir (Chung 2017). Ligand bağlanmasından sonra oligomerizasyona uğrayan reseptörler fosforilasyona uğrayarak konformasyon değiştirir ve aktive olur. Bağlayıcı proteinler hücre içi sinyalizasyon başlamasının ardından fosforile olmuş reseptör ligand kompleksini tanır. Aktif formadaki RTK' lar mitojen-aktive protein kinaz (MAPK), Janus kinaz / sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (JAK / STAT) ve rapamisinin fosfoinositol-3-kinazın aktivatörü (PI3K) / Akt / mTOR olmak üzere bir çok sinyal kaskadını tetikler (Mendoza *ve ark.* 2011). RTK' ların hücre sağ kalımı ve büyümesindeki kritik rolü, EGFR (epidermal büyüme faktör reseptörü), PDGFR (trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptör) ve IGF-1R (insülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptör) regülasyonun sağlanması ile gerçekleştirilir. Bu reseptörlere olan etkisi ile kanser başta olmak üzere birçok patolojik durumda anahtar rol oynar (Fraser *ve ark.* 2017).

RTK' ların hücrede gerçekleşen, hücre döngüsü, invazyon ve metastaz üzerinde etkisi olduğu son yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. RTK' larda meydana gelen

mutasyonlar ve anormal aktivasyonlar, yapılan araştırmalarda kanser, diyabet, infalamsyon, şiddetli kemik bozuklukları, arteriyoskleroz ve anjiyogenez gibi hastalıkların oluşması ile ilişkilendirilmiştir (Schlessinger 2000).

RTK' ların meme kanserindeki ekspresyon seviyesi ve fizyolojik etkileri araştırıldığında; EGFR, VEGFR1-3 ( vasküler endotel büyüme faktörü), c-Kit moleküllerinin HER2- ve üçlü negatif meme tümörlerinde aşırı eksprese edildiği saptanmıştır. İnvitro ortamda yapılan deneylerde MCF-7 ve MDA-MB-231 gibi hücre hatlarında EGFR molekülünün yıkılması poliferasyonu azalttığı kanıtlanmıştır (Yan ve ark. 2018).



şekil 1.10. Reseptör tirozin kinaz sinyal yolu (Fraser ve ark. 2017)

## 1.6. JAK/ STAT SİNYAL YOLU

Janus Kinaz / Sinyal Transdüserleri ve transkripsiyon Aktivatrşleri ( JAK/ STAT) sinyal yolağı, tanımlaması 1980 yılında interferonların sinyalizasyonunda aracı olan bir yolak olarak aımlandı. Günümüzde yetmiş farklı sitokin ve interferonun JAK/ STAT yolağını kullanması ile hücre gelişimi ve fonksiyonu açısından önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sinyal yolağı interferon yanıt veren genlerin sinyal iletiminin araştırılması ile keşfedilmiştir (Yan ve ark. 2018). JAK / STAT yolu, interferon-yanıt veren genleri sinyal iletimini sinyallerle ilişkilendiren çalışma ile keşfedildi. Çok

miktarda sitokin tarafından kullanım alanına sahip olan transdüksiyon kaskadı olarak adlandırılan JAK/STAT yolağı, immün sistemi aktive etmek veya düzenlemek ve infalamatuar immün yanıtı sınırlamak gibi rollerinden dolayı kritik bir yolaktır (Pencik *ve ark.* 2016).

Doğal immüniteyi başlatmak, adaptif immün sistemleri düzenlemek ve nihai olarak enflamatuar ve immün yanıtları sınırlamak için kritiktir. Sitokinler, ligand olarak trozin kinaz reseptöre bağlanarak, fosfarile eder ve konformasyonel değişikliğe neden olur. Bu değişim sonucunda JAK molekülü aktive olur. Aktive formdaki Jak daha sonra STAT moleküllerinin aktivasyonunu sağlar. STAT molekülleri, SH ile etkileşerek homo ve ya heterodimerler yapılar oluşturur. Dimerizasyon işleminden sonra STAT çekirdeğe loklize olur ve hedef genlerin transkripsiyonunda rol oynar (Pencik *ve ark.* 2016), (Benveniste *ve ark.* 2014).

JAK/ STAT yolağı üzerindeki moleküller immün yanıt dışında kök hücre farklılaşmasında, onkogeneze, anjiyogeneze, migrasyon ve apoptoz gibi mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra meme bezi gelişimi, laktasyon ve adipogeneze gibi fizyolojik süreçlerde de mekanistik bir işlev sahibidir. Bu yolakta meydana gelebilecek mutasyonlar belirtilen süreçleri olumsuz etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Igaz *ve ark.* 2001).

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. MATERYAL**

#### **2.1.1. Model Hücre Hatları**

MCF-7, ilk olarak 1970 yılında Kafkasyalı 69 yaşındaki kadının meme dokusundan izole edilmiş östrojen pozitif ve invaziv meme kanseri hücre hattıdır. Adı Michigan Kanser Kuruluşu-7'nin baş harflerinden oluşmaktadır. Bölünme süreleri 29 saattir.

#### **2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları**

Ek A'da hücre kültüründe kullanılan tüm donanımlar bulunmaktadır.

#### **2.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar**

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar Ek B'de, deneyler esnasında kullanılan kimyasallar ise Ek C'de bulunmaktadır.

#### **2.1.4. Çözeltiler**

Ek D'de deneyler esnasında kullanılan çözeltiler yer bulunmaktadır.

## **2.2. YÖNTEM**

### **2.2.1. Sıvı Azottan Hücre Açma**

Kullanılan hücrelerin uzun süre, genomuna, hücresel metabolik faaliyetlerine ve temel fizyolojik özelliklerine herhangi bir zarar vermeden saklayabilmeleri için sıvı azot ile  $-196^{\circ}\text{C}$  de uygun tekniklerle dondurulmaları gerçekleştirilmiştir. Düşük pasaj sayılarına sahip sıvı azotta dondurulmuş olan hücrelerin açılması yapılan deneyler için kısa sürede kullanılabilmesinin ziyadesinde çalışmalar sırasında oluşabilecek olan kontaminasyon, stres faktörleri yolu ile hücre kaybının sonrasında kullanılması sağlanmıştır. Sıvı azottan çıkarılan hücreler hızlıca eritilerek uygun besiyeri içerisine aktarılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Çöktürülen pellet kısmı hücreleri içerirken, üst fazda sıvı azotta dondurulmak amacıyla besiyerine eklenen dimetilsülfoksit bulunur. Dimetilsülfoksit hücrelerde toksik etki oluşturarak stres faktörü olabileceğinden üst fazın atılması gerçekleştirilir. Kalan pellet üzerine 1 ml uygun besiyeri eklenerek

pelletin homojen olarak dağıtılması sağlanmış olup homojenize edilen hücre süspansiyonu T25-T75'lik flaska ekilmiştir. Ekimi yapılan hücreleri mikroskopta görüntülerine bakılarak yoğunlukları ve morfolojileri gözlemlenir. T25-T75'lik flasklar %5 CO<sub>2</sub>, 37°C sıcaklığa sahip inkübatöre alınmıştır.

### **2.2.2. Hücre Kültürü**

MCF-7 doğal tip meme kanseri hücreleri (ATCC No; HTB 22), DMEM besiyerinde (% 10 sıgır fetüs serumu (FBS) ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik) , % 5 CO<sub>2</sub> bulunan ve 37°C şartlarını oluşturan hücre inkübatöründe (Hera Cell 150i, Thermo), %95 nem ortamında büyütülmüştür. Hazırlanmış olan besiyeri 0.22 µm' lik filtrelerden geçirilip +4°C sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması**

Yapışan hücreler çoğaldıkça kullanılan besiyeri hücreler için yetersiz hale gelir ve buldukları kültür kabında yer olmadığından dolayı kontakt inhibisyon mekanizması ile hücrelerin poliferasyonunda artış meydana gelmez. Yapılan deney doğrultusunda ve petri kabındaki hücrelerin belli bir yoğunluğa ulaşması sonucunda pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründen alınıp içerisinde bulunan besiyeri uzaklaştırılmıştır. T75 flaska 2 ml, T25 falaska 1 ml PBS ile yıkama sonrasında flask içerisindeki PBS çekilip atılmıştır. T75 flask için 2 ml, T25 falask için 1 ml tripsin-EDTA eklenmiş olup ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde hücreler 5 dakika bekletilmiştir. 5 dakikanın sonunda inkübatörden alınan flasktaki hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiş ve hücrelerin tripsinle olan reaksiyondan zarar görmesini önlemek için petri kabına tripsin oranı kadar DMEM besiyeri eklenmiştir. Flasktaki hücrelerin duvarı hücre süspansiyonu ile yıkanarak 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan pelletin miktarına göre hücrelerin üzerine besi yeri eklenerek iyice pipetaj yapılır ve homojen hale gelen hücreler yoğunluk göz önünde bulundurularak deneysel sürece göre ekimi yapılmıştır. Üzerine hücre hattı, pasaj numarası, tarih yazılarak %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

### **2.2.4. MTT Hücre Canlılık Testi**

Hücre canlılığının en önemli belirteçlerinden biri olan mitokondriyel aktivitenin ölçümüne dayalı MTT ayıracı 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide kimyasalı bu deney esnasında kullanılmıştır. MTT testi yapıp serotoninin farklı konsantrasyonlarındaki hücelere uygulanması sonucunda hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle,  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petri kaplarına MCF-7 doğal tip meme kanseri hüceleri (ATCC No; HTB 22), ekimi yapıldıktan sonra bir gece boyu yapışmaları ve morfoloji almaları için beklenmiştir. Hücelere 0-100  $\mu\text{M}$  arası serotonin konsantrasyonları 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. MTT tetrazolium tuzuyla 4 saat bekletildikten sonra poliferasyona uğrayan hüceler artan dehidrogenaz aktivitesi ile tetrazolyum türevi olan MTT'yi formazana dönüştürürler. Reaksiyon sonucunda oluşan renk değişimi absorbans olarak spektrofotometrik ölçüm ile ilaç uygulanmamış kontrol örneklere kıyaslama yapılarak serotoninin hücre canlılığı üzerine etkileri belirlenmiştir.

#### **2.2.5. Floresan İndikatörler Aracılığıyla Hücre Ölümünün Belirlenmesi**

$5 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere MCF-7 meme kanseri hüceleri ekilip gece boyu petriye yapışmaları için hüceler inkübatörde bekletilmiştir. Hücelere uygun dozda serotonin uygulanarak 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra PI (Propidium İyodür), DiOC6 (3,3'Diheksiloksakarbosiyenin iyodür) floresan boyları uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak floresan mikroskop (Olympus IX70) altında incelenmiştir.

#### **2.2.6. RNA İzolasyonu**

60 mm lik petrilere ekilen hücelere 50 mikromolar serotonin uygulanıp %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonra petrileredeki hüceler çöktürülüp oluşan pellet üzerine 500  $\mu\text{l}$  TriPure (Roche) ajanı eklenip ve oda sıcaklığında 5 dk boyunca bekletilmiştir. Kullanılan TriPure oranına göre 100  $\mu\text{l}$  kloroform eklenmiş ve 15 saniye kadar elde çalkalanmıştır. 15 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilen örnekler maksimum hızda +4 °C'de 15 dk sürede santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni mikrofüj tüpüne aktarılmış olup ve kullanılan TriPuru oranına göre 250  $\mu\text{l}$  isopropanol eklenmiştir. Mikrofüj tüpü hafifçe karıştırılarak ve 5 dakika süre ile oda sıcaklığında bırakılmıştır. 10 dakika boyunca +4°C de santrifüj yapılan örneklerin üst fazı RNA pelletine zarar vermeden dökülmüştür. Örnekler üzerine 250  $\mu\text{l}$  kadar %70 oranında hazırlanan EtOH eklenip ve 8000 rpm de +4°C de 5 dakika boyunca ile santrifüj yapılmıştır. Etanol, RNA pelletine zarar verilmeden dikkatlice dökülmüştür.



Pellet oda sıcaklığında etanolden tamamen arınana kadar kurutulmaya bırakılmıştır. Pellet üzerine 20-50 µl arasında RNase-free su eklenilerek çözünmesini sağlanmıştır ve 55°C de 15 dk bekletilmiştir. RNA örnekleri uzun süre muhafaza edilebilmesi için -80 °C de saklanmıştır.

### 2.2.7. cDNA Çevirimi

iScript cDNA sentez kiti (170-8890 Bio-Rad) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1:cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri

İçerik	Reaksiyon miktarı
5x reaksiyon tamponu	4 µl
iScript RT enzimi	1 µl
Nükleazdan arındırılmış steril su	Değişken
RNA	1000 ng
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>

### 2.2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu( PZR)

iScript cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA'ya çevrilen örnekler 2x PCR karışımı, forward primer, reverse primer, kalıp cDNA(1000ng) ve nükleaz- free steril su kullanılarak 25 µl' lik PCR örnekleri hazırlanmıştır. 95°C' de 5 dk başlangıç denatürasyon, 95°C'de 30 sn denatürasyon, kullanılan primere göre değişkenlik gösteren bağlanma sıcaklığında 30 sn, 72°C'de 1 dk uzama protokolü ile 35 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Son olarak, 72°C'de 10 dk final uzama amplikasyon döngüsü ile PZR tamamlanmıştır. PZR ile çoğaltılan örnekler %1' lik agoroz jelde görüntülenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. PZR için reaksiyon bileşenleri.

<b>İçerik</b>	<b>Reaksiyon miktarı</b>
PCR reaksiyon karışımı (2X)	12,5 µl
Primer A	1 µl
Primer B	1 µl
Nükleazdan arındırılmış steril su	Değişken
cDNA	1000 ng
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25 µl</b>

### 2.2.9. Protein İzolasyonu

Yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre içerisinde olacak biçimde protein izolasyonu için 100 mm'lik petrilere ekim yapılmıştır. Serotonin için seçilen dozun uygulanmasını takiben hücrelerden toplam protein içeriği elde edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda petrilere 1X PBS ile yıkanarak hücreler toplanmıştır. 13200 rpm'de periyotlar halinde yapılan santrifüj sonrasında üst faz atılıp ve pellet miktarına göre CLB (Cell Lysis Buffer) eklenmiştir. Pipetaj sonrası 20 dk boyunca oda sıcaklığında 3D orbital rotatorda bekletilip 20 dk boyunca  $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 13200 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Protein örneklerinin bulunduğu üst faz yeni ependorf tüpüne alınarak,  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir. Bradford (Biorad, Bradford çözeltisi) yöntemi ile BSA standartları üzerinden çizilen standart grafiği baz alınarak elde edilen proteinlerin miktarları hesaplanmıştır. Toplam protein özütleri, 595 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.

### 2.2.10. İmmünoblotlama

Western immunoblotlama yöntemi için örneklerden alınan protein miktarı 55 µg olacak şekilde eşitlenmiştir. Konsantrasyona göre miktarları belirlenen proteinler yükleme için 4X Laemli boyası ile karıştırılarak  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca ısıtıcıda ısıtılmıştır.  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13200 rpm'de 30 saniye boyunca santrifüj yapılmıştır. %12

sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS- PAGE) hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, protein belirteçleri kullanılarak 2,5 saat SDS içeren yürütme tamponu içerisinde 75 Volt'da yürütülmüştür. Jel ıslak transfer için hazırlanıp ve membran metanolle aktive edilmiştir. Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transfer tamponu aracılığıyla TransBlot Turbo aracılığıyla transfer edilmiştir. Transferi yapılan membran yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında 3D orbital rotatorda çevrilmiştir. 3D orbital rotatordan alınan membran proteine özgü birincil antikora bir gün boyunca +4°C'de bekletilmiştir. Primer antikör kitine (Cell signalling technology, 1:1000) alınan membran ikinci gün TBS-Tween çözeltisinde 10 dk boyunca üç kere yıkanmıştır. Daha sonra primere uygun ikincil anti-rabbit veya anti- Mouse antikör (Cell signalling technology, 1: 3000) uygulanması ile 10 dakikalık süreçleri içeren TBS- T ile üç kez yıkama ve 5 dakikalık TBS ile yıkama gerçekleştirilip, +4°C'de bir gün bekletilmiştir. Işımları görüntülemek amacıyla ECL çözeltisi hazırlanmıştır. Karanlık odada TBS içinden alınan membran karanlıkta ECL çözeltisi içinde 1-2 dk bekletildikten sonra Image-lab yazılımı yardımıyla ChemiDoc'ta görüntülenmiştir. Sonuçlar  $\beta$ -Actin,  $\beta$ -Tubulin, GAPDH yükleme kontrolleri ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

### **2.2.11. Reseptör Tirozin Kinaz Testi**

10X lizis tamponu (CST 9803) 1X ile dilüe edilip ve total konsantrasyon 1mM olacak şekilde içerisine Fenilmetilsülfonil (PMSF) eklenmiştir. Toplam protein izolasyonu için  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 100 mm'lik petrilere ekilip, serotonin uygulamasına takiben PBS ile yıkanmıştır. Petriye 1X Lizis Tamponu eklenip 5 dk buzda bekletilmiştir. Buz üzerindeyken yapılan kazıma işleminden sonra +4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Protein içeren üst faz yeni Ependorf tüpüne alınmış ve -80 °C'de saklanmıştır. Protein miktar analizi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bio-Rad). Çok kuyucuklu örnek yükleme prepartı, silikon tabaka ve metal kıskaçlar yardımı ile oda sıcaklığına getirilmiş cam slaytla uygun bir şekilde birleştirilmiştir. Kuyucuklar 1X Array Blocking Buffer ekleyip oda sıcaklığında 15 dk 3D orbital rotarda inkübe edilmiştir. 1X Array Blocking Buffer dökülüp, 1000  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ' den hazırlanan protein lizatları her kuyucuğa 150  $\mu\text{l}$  olacak şekilde Array Diluent Buffer ile dilüe edilip kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler gece boyu +4 °C'de 3D orbital rotarda inkübe edilmiştir. Kuyucuklara boşaltılarak 1X Array Wash Buffer ile 5'er dakikalık 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Detection Antibody Coctail

kullanarak örnekler oda sıcaklığında orbital rotarda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Takiben 1X Array Wash Buffer ile yıkama işlemi tekrar edilmiştir. 1X HRP-linked Streptavidin eklenen örnekler 30 dk oda sıcaklığında orbital rotarda inkübe edilip yıkama aşamaları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası cam slayt sisteminden çıkarılıp 1X Array Wash Buffer ile yıkanmıştır. Örnekler, hazırlanan LumiGLO®/Peroxide reaktifi ile kaplanıp 30 sn içerisinde ChemiDoc'ta görüntülenmiştir. PathScan slaytlarında elde edilen ışımaya görüntüler ImageJ programında kantitatif verilere dönüştürülmüştür. PathScan hedef haritası RTK Signaling Array Kit için Şekil 2.1'de gösterilmiştir.





#### Receptor Tyrosine Kinases

Target	Phosphorylation Site	Family	
1	EGFR/ErbB1	pan-Tyr	EGFR
2	HER2/ErbB2	pan-Tyr	EGFR
3	HER3/ErbB3	pan-Tyr	EGFR
4	FGFR1	pan-Tyr	FGFR
5	FGFR3	pan-Tyr	FGFR
6	FGFR4	pan-Tyr	FGFR
7	InsR	pan-Tyr	Insulin R
8	IGF-1R	pan-Tyr	Insulin R
9	TrkA/NTRK1	pan-Tyr	NGFR
10	TrkB/NTRK2	pan-Tyr	NGFR
11	Met/HGFR	pan-Tyr	HGFR
12	Ror/MST1R	pan-Tyr	HGFR
13	Ret	pan-Tyr	Ret
14	ALK	pan-Tyr	LTK
15	PDGFR	pan-Tyr	PDGFR
16	c-KIT/SCFR	pan-Tyr	PDGFR
17	FLT3/Flk2	pan-Tyr	PDGFR
18	M-CSFR/CSF-1R	pan-Tyr	PDGFR
19	EphA1	pan-Tyr	EphR
20	EphA2	pan-Tyr	EphR
21	EphA3	pan-Tyr	EphR
22	EphB1	pan-Tyr	EphR
23	EphB3	pan-Tyr	EphR
24	EphB4	pan-Tyr	EphR
25	Tyro3/Dtk	pan-Tyr	Axl
26	Axl	pan-Tyr	Axl
27	Tie2/TEK	pan-Tyr	Tie
28	VEGFR2/KDR	pan-Tyr	VEGFR

#### Signaling Nodes

Target	Phosphorylation Site	Family	
29	Akt/PKB/Rac	Thr308	Akt
30	Akt/PKB/Rac	Ser473	Akt
31	p44/42 MAPK (ERK1/2)	Thr202/Tyr204	MAPK
32	S6 Ribosomal Protein	Ser235/236	RSK
33	c-Abl	pan-Tyr	Abl
34	IRS-1	pan-Tyr	IRS
35	Zap-70	pan-Tyr	Zap-70
36	Src	pan-Tyr	Src
37	Lck	pan-Tyr	Src
38	Stat1	Tyr701	Stat
39	Stat3	Tyr705	Stat

Şekil 2. 1. Çoklu veri analizi için kullanılan. PathScan RTK Array Kit için hedef proteinlerin isimleri ve lam üzerinde yerleştirilmiş şeması (cellsignal.com)

### 2.2.12. ReadyPrep 2-D Starter Kit

ReadyPrep 2-D Starter yöntemi kullanılarak ilk olarak protein saflaştırma (clean-up) işlemi ile örnekler muamele edilmiştir. Clean-up için her bir örnekten 380 µg kullanılmıştır. Clean-up sonrası elde edilen pellete uygun miktarda Rehidratasyon bufferı ilavesi yapılarak çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 30 saniye boyunca vortexlenmiş ve oda sıcaklığında 3-4 dakika bekletilmiştir. Bekletildikten sonra pellet 1 dakika boyunca vortexlenmiş ve pipetaj yapılarak çözünmesi sağlanmıştır. 5 dakika 18.000 rpm de oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve üst faz yeni mikrofüj tüpüne alınmıştır. 80°C’ de saklanmıştır.

Sonrasında, 1. boyut izoelektrik odaklama için, odaklama plakasında (FocusingTray, Bio-Rad, USA) belirtilen + ve - yüklü elektrotların üzerine gelecek şekilde konulmuştur. Protein örneklerine rehidrasyon tamponu ve Bromofenol Mavisi eklenmiştir. Readystrip IPG Strips (Bio-Rad) plakadaki + ve - yerler ile eşleşecek şekilde yerleştirilerek örneklerin IPG striplerdeki jele emdirilmesi gerçekleştirilmiştir. Rehidrasyon ve izoelektrik odaklama PROTEAN IEF Cell cihazında (Bio-Rad) yapılmıştır. Cihazda meydana gelen akım ile jelin zarar görmemesi için mineral yağı ile muamele edildi. Cihaz, 20°C’de 250 V da 20 dk lineer akımda ardından 2 saat 4000 Volt lineer akımda olmak üzere toplamda 5 saat 14000 Volt hızlı akımda IEF basamağı gerçekleştirilmiştir.

Proteinlerin pI noktalarına göre 1. boyut odaklama işleminin ardından SDS-PAGE işleminine tabi tutulmuştur. Bu basamakta proteinlerin SDS ile denature olmaları, DTT ile disülfid bağlarının redüklenmesi ve iodoasetamid ile alkillenmeleri sağlanarak yeniden disülfid bağları oluşturmaları engellenmiştir. İlk olarak odaklama plakasından alınan IPG Stripleri rehidrasyon/denge sağlama plakasına (rehidratation/equilibrium tray) alınır. Denge Tamponu I, eklenir ve 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Ardından Denge Tamponu II eklenerek yeniden 15 dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda döndürülmüştür. Bu aşamadan sonra SDS-PAGE geçilmiştir. Proteinler için %12’lik Poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Plakasından alınan strip, Tris-Glisin ve SDS içeren yürütme tampon ile yıkandıktan sonra hazırlanan jelin üzerine, yürütme tamponu ile yıkanan IPG strip yerleştirilmiştir. IPG stripin yanında kalan kısmına filter kağıdına emdirilmiş protein markırı da yüklenmiştir. SDS-PAGE jelin üzeri % 0,8’lik Agaroz çözeltisi ile kaplanmıştır. Hazırlanan jel, Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) kasedine

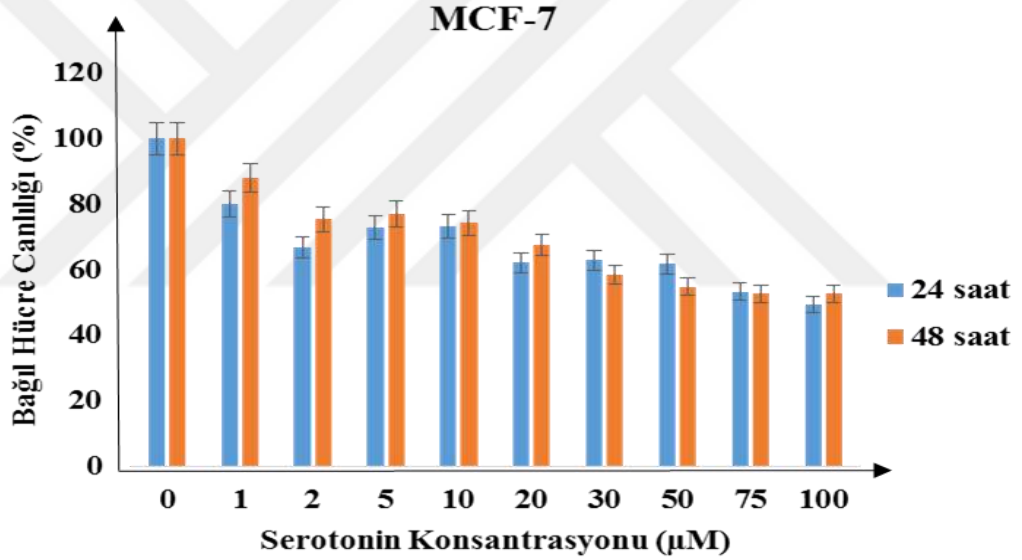
yerleştirilip, Tris-Glisin-SDS yurütme tampon ile doldurulmuştur. 200V'da 1 saat boyunca yurütölmüştür. Jelin yurümesinden sonra, IPG Stripi jelin üzerinden ayrılmış ve SDS'den arındırılmıştır. Distile su ile yıkanarak Coomassie boyama solüsyonun içine alınarak 1 saat bekletilmifitir. Boyama işleminin ardından jel su içirisine alınarak 15-30 dakika arasında boyadan arındırma işlemi gerçekteştirilmifitir. Daha sonra jel, Image-lab yazılımı yardımıyla ChemiDoc'ta göröntülenmifitir.



### 3. SONUÇLAR

#### 3.1. Serotonin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

MCF-7 hücre hattında serotoninin sitotoksik etkisini belirlemek için MTT testi yapılmıştır. 96 kuyucuklu petri kaplarına  $10 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıp DMEM besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C' lik etüvde gece boyu yapışmaları beklendikten sonra, hücrelere 0-100 mikromolar aralığındaki konsantrasyonlarında serotonin uygulanmıştır. Zamana bağlı olarak serotoninin hücreler üzerindeki toksisite değişimini incelemek için hücreler 24 ve 48 saat boyunca serotonine maruz bırakılmıştır.



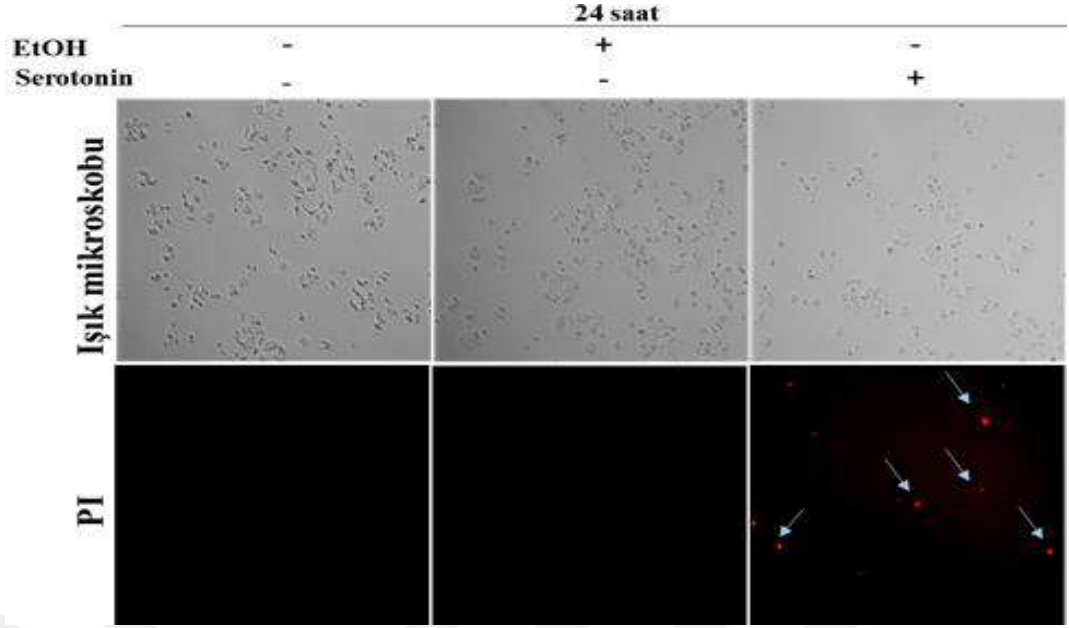
Şekil 3. 1. Doza ve zamana bağlı serotonin uygulamasının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bağıl canlılık üzerine etkisi. Hücreler  $10 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere DMEM besiyeri ile ekilmiştir. 0-100 µM doz aralığında serotonin 24-48 saat boyunca uygulanmıştır. Ardından, 10 µl MTT ajanı eklenmiş 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 5 bağımsız deney sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3.1’de belirtildiği gibi, serotonin uygulanmış MCF-7 meme kanseri hücre hattında bağıl canlılık yüzdeleri doza bağılı olarak azalmıştır. Hücrelere 24 saatlik serotonin (50 µM) uygulamasını takiben, hücrelerin bağıl canlılık yüzdesi azalma gözlemlenirken, 48 saat sonunda hücre canlılığında benzer sonuç elde edilmiştir. Yapılan MTT testi sonuçları doğrultusunda MCF-7 meme kanseri hücrelerine uygulanacak serotoninin etkin dozu 50 µM olarak belirlenmiştir. Serotoninin hücre üzerindeki etkin dozunun bulunmasıyla beraber, MCF-7 meme kanseri hücre hattında serotoninin zamana bağılı olarak hücre canlılığına etkisini belirlemek için 24 saat ve 48 saat serotonin uygulanması sonrasında elde edilen sonuçlar incelenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında serotoninin etkisinin ilk 24 saat içerisinde gerçekleştiği ve ardından etkisinin azaldığını ortaya çıkarmıştır. Böylece 50 µM etkin dozu belirlenen serotoninin, uygulama süresinin de 24 saat olacağı belirlenmiştir.

### **3.2. Serotoninin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Ölümü ve Mitokondri Membran Potansiyeli Üzerine Etkisi**

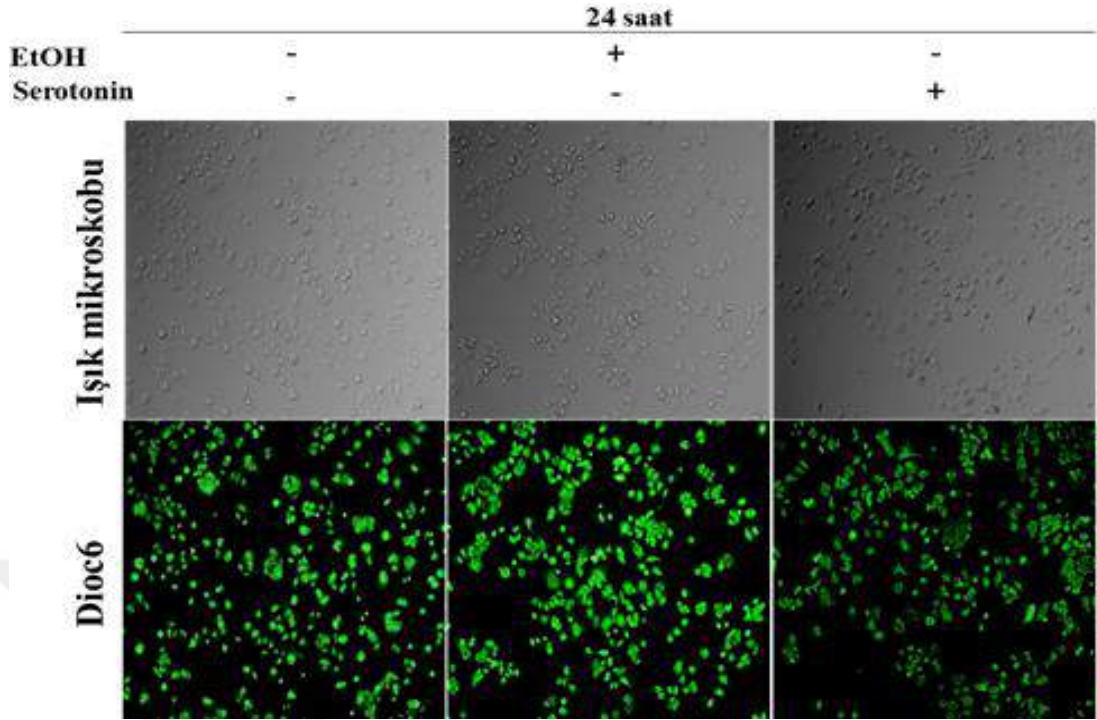
PI (propidyum iyodür) DNA’ya bağlanabilen florojenik bir boya olmasına takiben ölü hücreleri total hücre popülasyonundan ayırmak için kullanılmaktadır. Ölü hücrelere nüfus ederek hücrelerin görünür bir hale gelmesini sağlayan PI boya, sağlıklı hücrelerin membranlarından geçemez ve apoptoza uğrayan hücrelerin membranlarının bütünlüğünün bozulması nedeniyle apoptotik hücrelerin membranlarından geçerek DNA’larına bağlanabilir. PI boyamada apoptoza uğrayan hücrelerin membranlarından geçtiği için kırmızı renkte gözlemlenmektedir. MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında 24 saat süre ile 50 µM serotonin uygulaması sonucunda kontrol grubuna kıyasla ölü hücre sayısındaki değişim miktarları belirlenmiştir. Serotonin hazırlanırken %96’lık etanolde çözüldüğü için 50 µM EtOH iç kontrol grubu olarak kullanılmıştır.



Şekil 3. 2. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki hücre ölümünün fluoresan probalar ile belirlenmesi. Serotonin (50  $\mu$ M) ve etanol (50  $\mu$ M) 24 saat boyunca hücelere uygulandı. PI boya ile boyanan hücreler fluoresan mikroskopunda incelendi (x10).

Şekil 3.2’te, 24 saat süre 50  $\mu$ M ile serotonine uygulanan MCF-7 hücrelerinde PI ile boyanan hücre sayısında (kırmızı ok ile gösterilen) artış olduğu gözlemlenmektedir. Böylece serotonine maruz bırakılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre apoptotik ölüm gözlenen hücre sayısında ciddi bir artış olmakla beraber, etanol uygulanan hücrelerde kayda değer bir artış gözlenmemiştir.

Pozitif yük taşıyan DiOC6 boyası negatif yüklü mitokondri organeli tarafından tutulabilmektedir. Apoptotik ölüme giden hücreler membran potansiyeli bozulmuş hücrelerdir. Membran potansiyelinde gerçekleşen bu bozulma beraberinde DiOC6 boyasının membrana tutulmasını engelleyerek boyanan hücre sayısında azalma meydana getirir. Bu özellik baz alınarak serotonin uygulanmış hücrelerde DiOC6 boyama ile mitokondri kaynaklı apoptotik ölüm belirlenmiştir.



Şekil 3. 3. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki mitokondriyal membran potansiyelinin fluoresan probalar ile belirlenmesi. Serotonin (50  $\mu$ M) ve etanol (50  $\mu$ M) 24 saat boyunca süreyle hücelere uygulandı. DiOC6 ile boyanan hücreler fluoresan mikroskobunda incelendi (x10).

Şekil 3.3'te, 24 saat süre ile 50 $\mu$ M serotonine uygulanan MCF-7 hücrelerinde ile DiOC6 boyana hücre sayısında (yeşil renk ile gösterilen) azalma olduğu gözlemlenmektedir. Serotonine maruz bırakılan hücrelerde kontrol hücrelerine göre daha apoptotik ölüm gözlemlendiği için membran potansiyelindeki bozulmayı takiben DiOC6 boyasını tutmamışlardır. Böylece boyanan hücre sayısında ciddi bir azalış olmak ile beraber, etanol uygulanan hücrelerde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir

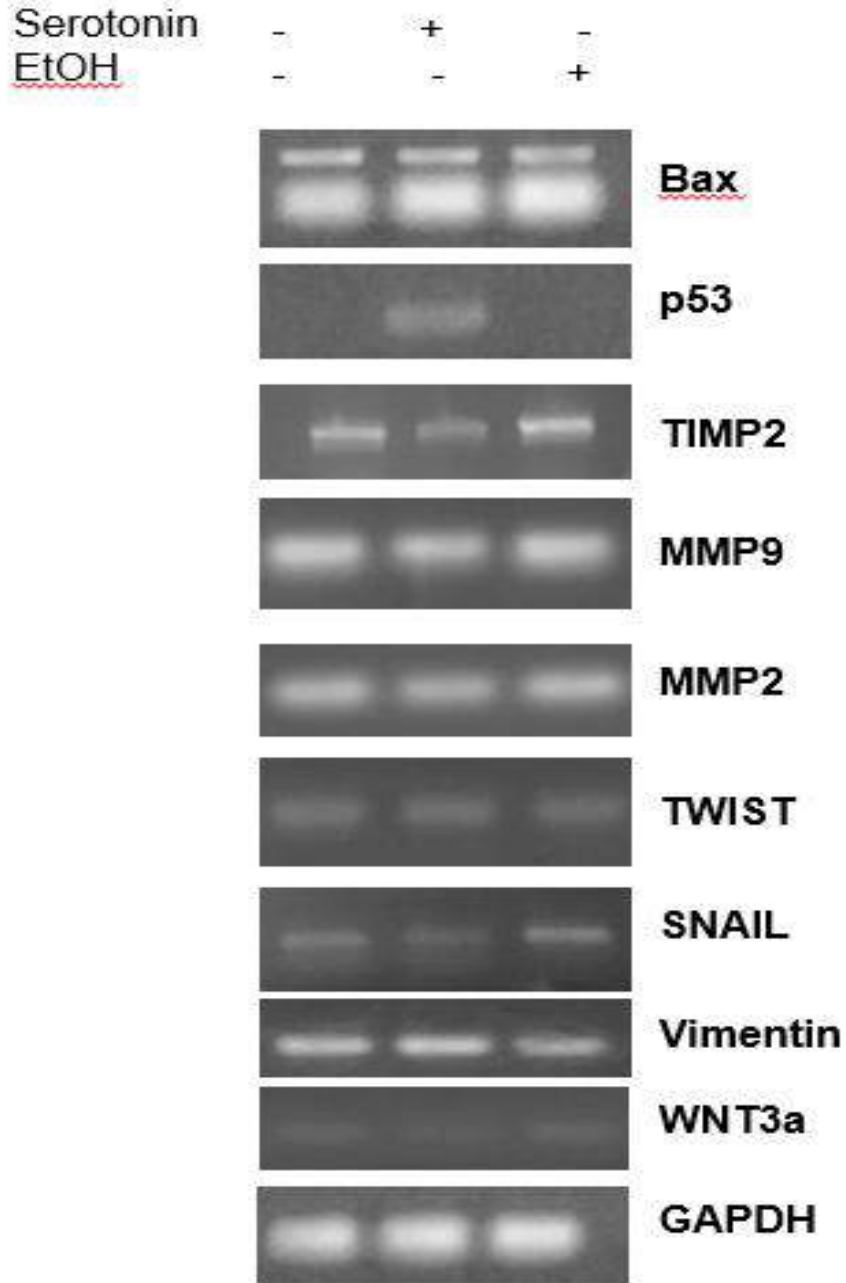
Sonuç olarak yapılan fluoresan indikatörler olan PI ve DiOC6 boya ile yapılan deneyler ile serotoninin 50  $\mu$ M konsantrasyonda 24 saat uygulamasıyla çeşitli yolları etkileyerek hücreyi apoptotik ölüme götürdüğü belirtilmiştir.

### **3.3. Serotoninin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Hücre Ölümü ve Epiteryal Mezankimal Değişimle İlgili Hedef Genlerin Üzerine Etkisi**

Serotonin meme kanseri hücrelerinde birçok hücreyel mekanizmayı etkilediği gibi hücre farklılaşmasına bağılı olarak EMT yolağını ve hücre ölümü gerçekleştirerek apoptoz yolağını tetiklemektedir Buna takiben bazı EMT ve apoptotik yolak üzerindeki hedef genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimi irdelenmiştir.

Serotonin ve taşıyıcı EtOH uygulaması gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerinde sırası ile hücre ölümü ve hücre farklılaşması ile ilgili hedef genlerin ifade düzeyleri uygulama sonrası 24. saat de RT-PCR tekniğı ile bakılmıştır. Bax ifadesi kontrole oranla Serotonin uygulaması sonucunda değişmemiştir. p53 ifadesi ise hücrelerde kontrole oranla artış göstermiştir. Hücrelerde özellikle hücre içi oksidatif stresin arttığı düşünölmüş ve hücre canlılığındaki azalma verileri ile bu sonuç uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

TIMP2, MMP' leri baskılayan bir faktör olarak serotonin uygulaması sonucunda azalmıştır. Bu durumda Serotonin uygulamasının invazyon ile pozitif etkisi olabileceğini düşöndürmüştür. Ancak MMP2 ve MMP9da görölen çok az miktarda görölen azalma dikkati çekmiştir. WNT3a ve SNAIL'in sadece Serotonin uygulaması sonucunda azalması tüm EMT yolağında Serotonin'in baskılayıcı etkisini göstermektedir. Vimentin ifade düzeyinde ise mRNA olarak azalma görölmemiştir.



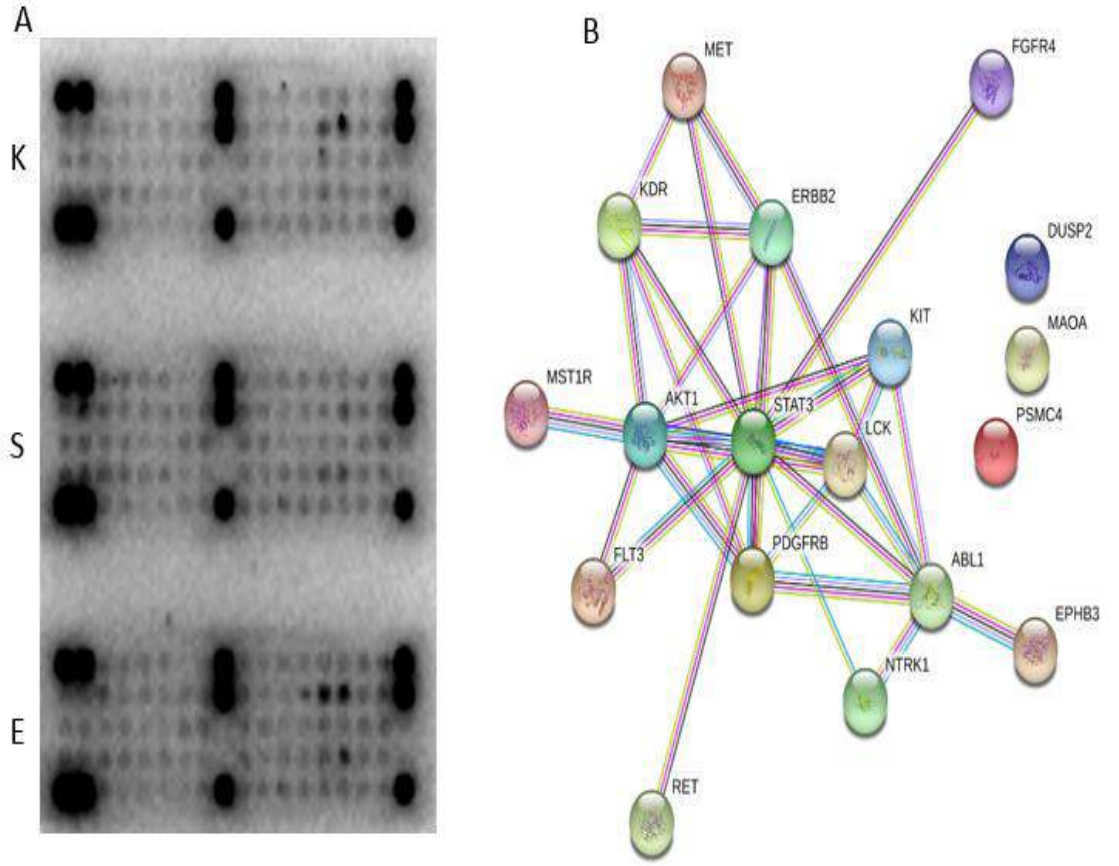
Şekil 3. 4. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki hücre ölümü değişimi ile ilgili hedeflerin gen ifadelerinin belirlenmesi. Serotonin (50  $\mu$ M) ve etanol (50  $\mu$ M) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

### **3.4. Serotoninin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Reseptör Tirozin Kinaz Hedefleriyle Protein İfade Düzeylerinin Belirlenmesi**

Serotonin uygulamasının hücre içi sinyal yolları üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için reseptör tirozin kinaz hedefleri çalışma kapsamında irdelenmiştir.

İlaç taşıyıcısı EtOH uygulamasına karşın Serotonin'in etkisi temelde STAT3, AKT1, MST1R, ERBB2, MET, KDR, KIT, LCK, ABL1, NTRK1, EPHB1, FLT3 gibi hedefleri üzerinden irdelenmiştir. İfade düzeylerinde görülen farklılıklara göre STRING protein etkileşim ağı üzerinde merkezi rol oynayabilecek protein hedefleri belirlenmeye çalışılmış ve ilgili biyolojik fonksiyonlar konusunda Serotonin'in etkileri tanımlanmıştır. MCF-7 hücre hatlarında Serotonin temelde Ephrin ailesi üyelerinin yanı sıra, M-CSFR, TrkA ve Met gibi hedefleri etkilemekte olduğu gösterilmiştir. Bu hedefler üzerinde ifade düzeyinde EtOH uygulamasına karşın ifade düzeyinde artış belirlenmiştir.

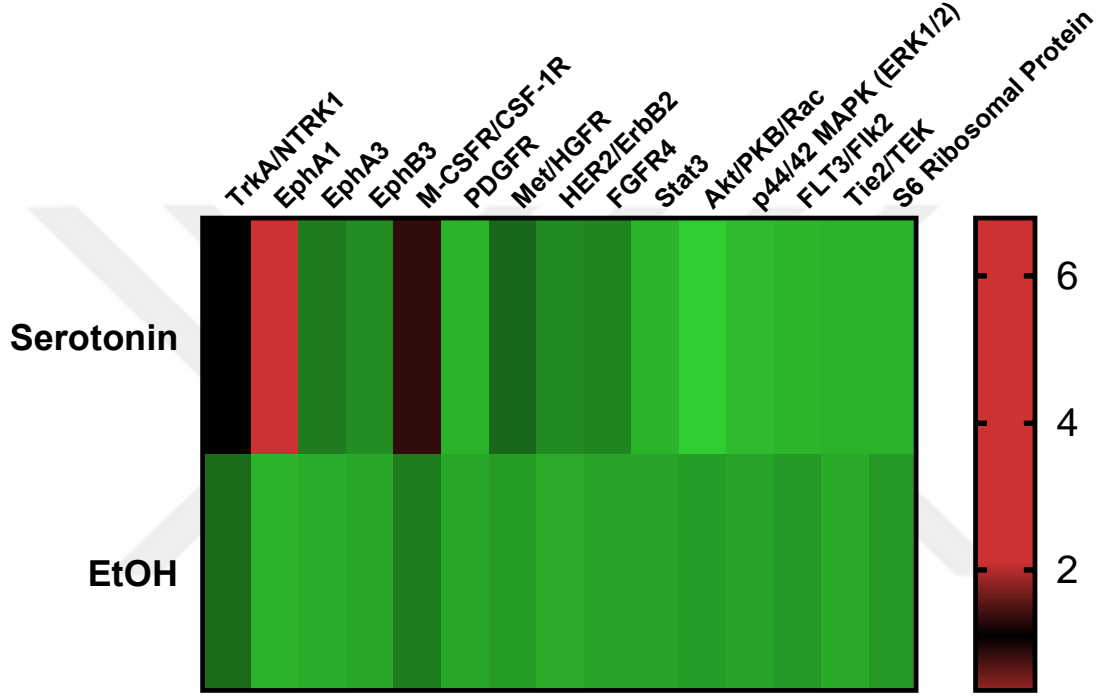
STAT1 bu anlamda Ephrin ailesi ile hem gen ifadesi beraber düzenlenme hem de etkileşimde olduğu bilinen hedeflerden birisi olduğu *in silico* olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle Serotonin etkileşiminde hücre sağkalım yolları ile birlikte tümör mikro çevresinin düzenlenmesinde ve nöroendokrin değişimlerde etkili olabilecek gen hedefleri irdelenmiştir.



Şekil 3. 5. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından dot blot yöntemi ile irdelendi. Serotonin (50  $\mu$ M) ve etanol (50  $\mu$ M) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. K: Uygulama yapılmamış kontrol, S: Serotonin uygulaması, E: EtOH uygulaması. B. STRING veri seti ile incelenen proteinler için ilişki analizinin belirlenmesi.

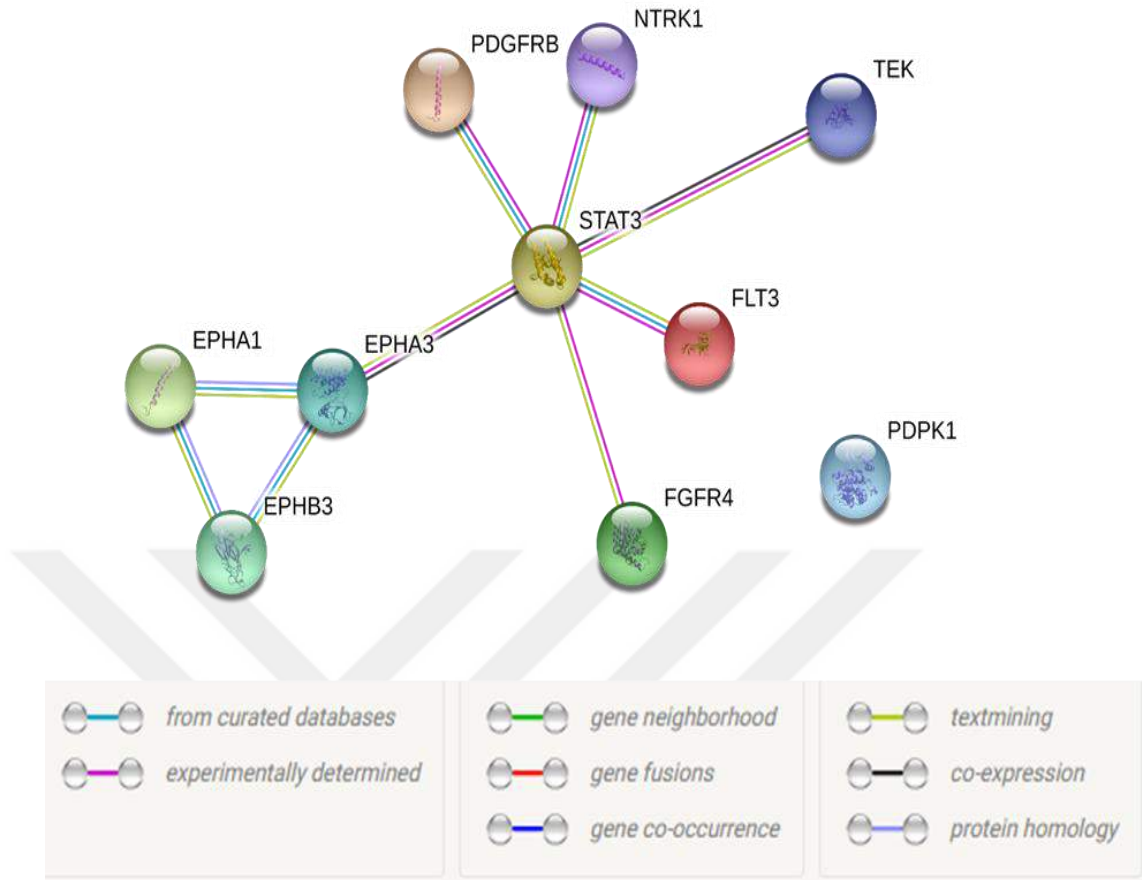
### 3.5. Serotonin MCF-7 Hücrelerinde Protein Hedeflerinin İfade Düzeyindeki Biyolojik Fonksiyonların STRING Veritabanıyla Analizi

STRING ile gerçekleştirilen proteinlerin ilişki analizlerinde Serotonin tarafından tetiklenen protein sinyal kaskadları konusunda bilgi edinilmiştir. Bu anlamda RTK analizinde elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak STAT3 ve ilişkili nöronal indükleyiciler Ephrin ailesinin ilişki analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 6. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Reseptör Tirozin Kinaz Hedefleri Açısından Proteinlerin İfade Düzeylerinin Analiz Edilmesi. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeylerinin analiz edilmesi. Serotonin (50  $\mu$ M) ve etanol (50  $\mu$ M) 24 saat boyunca hücrelere uygulandı.



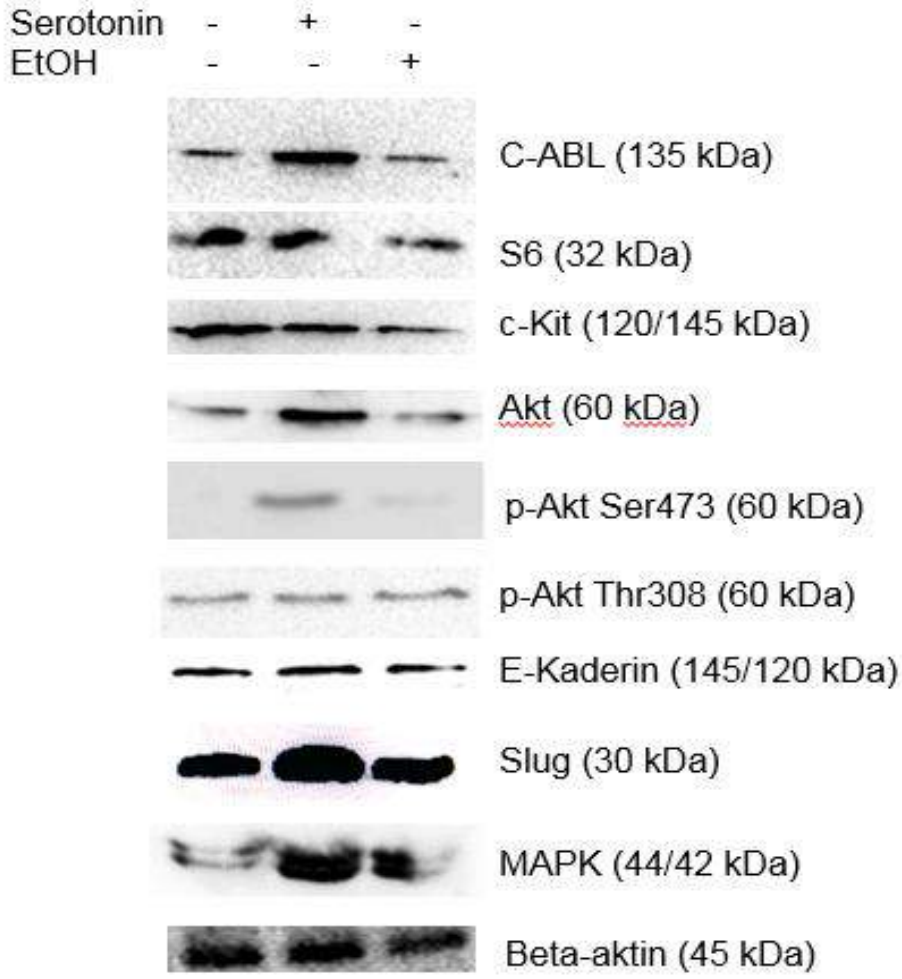


Şekil 3. 7. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeylerinin analiz edildikten sonra ilgili biyolojik fonksiyonlar STRING veritabanı ile analiz edilmiştir.

### **3.6. Serotoninin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatlarında Reseptör Tirozin Kinaz Yolağı Üzerinde Etkisinin Gösterilmesi**

Serotonin uygulanması ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bazı hedef genlerin protein ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Hücrelerde meydana gelen protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz (RTK) ve epitelyal mezankimal geçiş (EMT) hedefleri açısından belirlenmiştir.

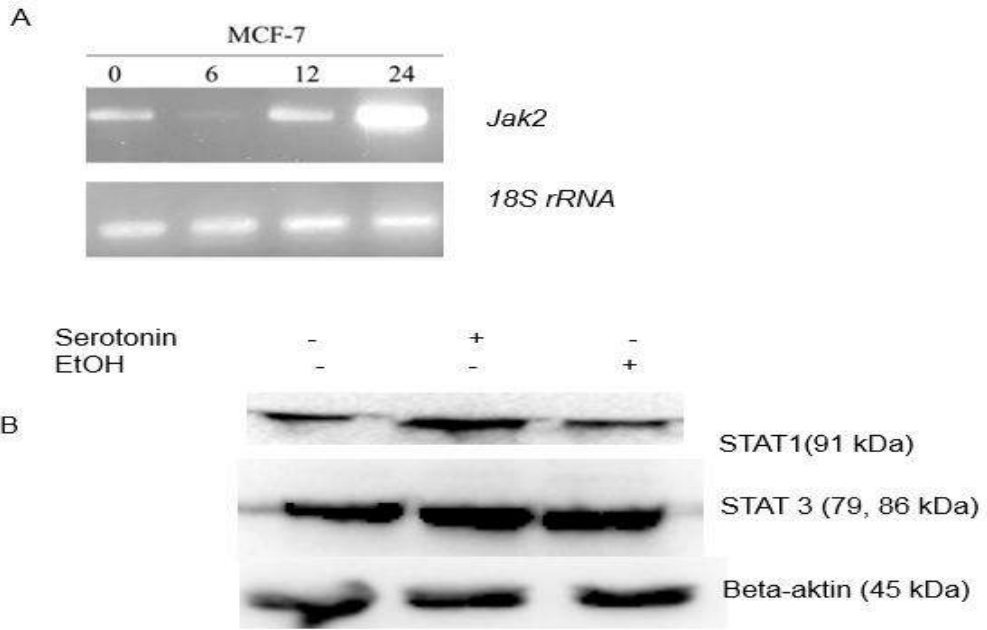
50 µM konsantrasyonda 24 saat serotonin uygulamasının kontrole ve taşıyıcı EtOH'a karşın hedef genler üzerindeki etkisi immunoblotlama yöntemi ile irdelenmiştir. Serotonin, c-Abl ve AKT'in ifade düzeyinde artışa neden olmaktadır. Bu etki p-AKT'in Ser473 rezidüsündeki fosforilasyon düzeyinin artıyor olması ile ayrıca doğrulanmıştır. mRNA sonuçlarının aksine Slug artmakta olduğu için hücrelerde Serotonin etkisinin hücre sağkalımı ve ilişkili onkogenез ve farklılaşma süreçlerini tetiklediği şeklinde değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 8. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim reseptör tirozin kinaz hedefleri açısından ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeyleri açısından immunoblotlama ile analiz edilmiştir. Herbir örnek için en az 30 µg protein yüklenmiş ve %12 SDS jelinde ayırlandırma yapılmıştır. Sonuçlar iki farklı biyolojik tekrardan elde edilmiş ve tekrarlardan biri sunulmuştur.

### 3.7. MCF-7 Hücre Hattında Serotonin Uygulanmasının Jak/Stat Yolağı Üzerindeki Etkisi

Serotonin zamana bağlı bir şekilde Jak2 mRNA'sının yapımında etkili olmaktadır. Jak2 mRNA ifadesini ilk 6. Saat içerisinde azaltırken, daha sonra zamana bağlı bir şekilde arttırıcı etki göstermiştir. Çoklu reseptör tirozin kinaz hedeflerinin gösterildiği kemiluminisans deneyinde elde edilen STAT hedeflerinin ifade düzeyindeki artış immunoblotlama ile gösterilememiştir. Bu nedenle protein yükleme konsantrasyonu ve kullanılan deneysel standart kontrolü amacı ile yükleme standartlarının belirleyici olduğu sonucuna varılmıştır. mRNA düzeyinde Jak2 miktarlarının artması nedeni ile Serotonin uygulamasının JAK-STAT ve önceki sonuçlarla AKT sinyal ekseni üzerinde etkili olduğu bu çalışmada modellenmiştir.

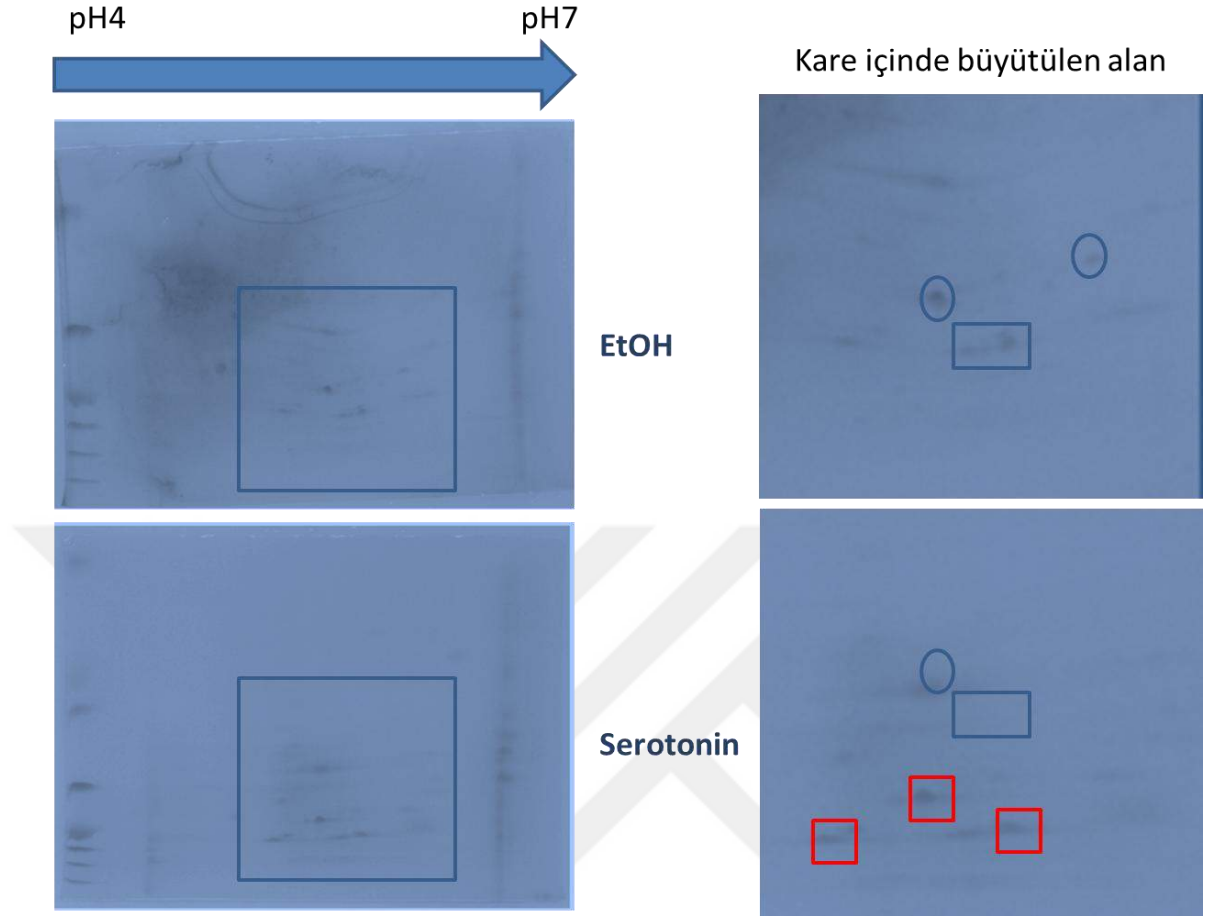


Şekil 3. 9. Serotonin zamana bağlı uygulaması yapılan hücrelerde JAK/STAT yolağının irdelenmesi. A. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki Jak2 gen ifadesinin RT-PCR ile belirlenmesi. A18S rRNA yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B. STAT1/STAT3 protein ifade düzeylerindeki değişimin Serotonin ve EtOH uygulaması ile kontrole karşın immunoblotlama ile değerlendirilmesi. Her bir örnek için en az 30 µg protein yüklenmiş ve %12 SDS jelinde ayırıldırmaya yapılmıştır. Sonuçlar en iki farklı biyolojik tekrardan elde edilmiş ve tekrarlarından biri sunulmuştur.

### **3.8. Serotonin Uygulanan MCF-7 Hücrelerinde İzoelektrik Noktalarına pH 1-7 Aralığında Ayrılan Hedef Proteinlerin Gösterilmesi**

Daha önceki çalışma sonuçlarımız ile birlikte global düzeyde protein ifadesinin belirlenmesi önem kazanmıştır. Bu amaçla 50 µM serotonin uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen protein lizatları IEF yöntemi ile 2 boyutlu jel elektroforezinde değerlendirilmiştir. Değişen spotlar temelde artan ve azalan olarak değerlendirilmiş ve daha sonraki çalışmalar kapsamında global protein ifadesindeki değişime yönelik deneylerin kurgulanmasının önemi ortaya çıkartılmıştır.

Mavi alan içerisine alınan bölgede protein spotlarının serotonin uygulanan hücrelerde taşıyıcısı EtOH uygulananlara göre değişim olduğu belirlenmiştir. Kırmızı, alan içerisinde gösterilen proteinler serotonin uygulanmasında artarken, mavi ile belirtilen noktalarda protein seviyelerinde azalmalar meydana gelmektedir. Bu protein ekspresyon değişimleri baz alınarak serotoninin hücresel fonksiyondaki etki mekanizmalarının yapılacak olan sonraki çalışmalarda açığa kavuşması beklenmektedir.



Şekil 3.10. Serotonin ile uygulama yapılan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki protein ifade düzeylerindeki değişim pH 1-7 aralığında izoelektrik noktalarına göre ayırımı ile ilaç taşıyıcısı EtOH'a karşın Serotonin uygulaması sonucunda farklı gen ifadesi görülen protein hedeflerinin ifade düzeyleri açısından 2-D jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Herbir örnek için en az 380 µg protein yüklenmiş ve %12 SDS jeline ayırlandırma yapılmıştır. Sonuçlar en iki farklı biyolojik tekrardan elde edilmiş ve tekrarlarından biri sunulmuştur.

#### 4. TARTIŞMA

Meme kanserinin günümüzde kadınlar arasında en büyük malignant tehdit olduğu bilinmektedir. Yeni teşhis konulan kadınlardaki kanserlerin %30'u meme kanseri kökenlidir. Etnik ve ülkelerin gelişmişlik durumlarına göre kanser oluşumu ve ilerlemesi değişiklik gösterse de meme kanseri yüksek insidans özelliği nedeniyle yapılan çalışmaların önemi daha da vurgulanmaktadır (Yüksel ve ark. 2017).

5-HT, otokrin ve parakrin aktivesi; laktasyon ve evrim sırasında meme bezi gelişiminde önemli rol oynar. Meme içerisinde bulunan süt bezlerini kuvvetlice uyarır. Özellikle serotonin reseptörlerinden olan 5-HT<sub>7</sub>, meme sekansındaki hücre yapısına ve hücre dönüşümüne katkı sağlar. Salgılama ve laktasyon kapasitesini koruma gibi birçok eylem için gerekli bir moleküldür. Bununla ilgili yapılan çalışmalardan biri, 5-HT<sub>7</sub> nakavt fareler kullanılarak, meme gelişimindeki süreçler izlenmiştir. 5-HT<sub>7</sub> nakavt farelerde, meme bezinde fizyolojik ve morfolojik değişimler oluşmamış bununla beraber süt salgılama süreçleri belirgin bir düzeyde azalmıştır. Meme epitelyum hücreleri normal farelere göre daha küçük ve daha az olarak belirlenmiştir. 5-HT<sub>7</sub> nakavt farelerin yavruları ise yetersiz beslenmeden kaynaklı kontrol farelerine göre daha az sağ kalım ile sonuçlanmıştır (Pai ve ark. 2015).

Serotonin, çeşitli hücre tiplerinde ve malign hücrelerde birçok farklı fonksiyonunun bulunmasının yanı sıra önemli mitojen bir faktörü olarak tanımlanmıştır. Mitojenik etkisini çok çeşitli 5-HT reseptör tipleri ile etkileşime girerek göstermekte olduğuna dair artan miktarda biyolojik kanıt literatür de yer bulmaktadır. Kanser gelişimi, ilerlemesi ve tedavisi ile ilgili makalelerde, bazı serotonin geri alım inhibitörlerinin, hayvanlarda ve insanlarda meme kanserini teşvik ettiğini göstermektedir. MCF-7 hücreleri meme kanseri modeli olarak yaygın bir şekilde kabul gören bir *in vitro* ortamda çalışmaya yardımcı olan bir hücre hattıdır. 5-HT<sub>2A</sub> serotoninergik reseptör alt tipinin ekspresyonu, RT-PCR, Western blotlama ve immüno Floresan analizleri doğrulanmıştır. Serotonin uygulanan MCF-7 hücreleri üzerinde artan düzeyde mitojenik etki görüldüğüne dair bulgular mevcuttur. 5-HT<sub>2A</sub> reseptör alt tipinin, mRNA ve reseptör proteinini kodlama açısından MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında tamamen ifade edildiği bilinmektedir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında bulunan 5-HT<sub>2A</sub> reseptörünün, insan trombositlerinde ve insan serebral korteksinde

bulunan 5-HT<sub>2A</sub>, reseptörüyle aynı olduğunu bilinmektedir. Ayrıca, bu reseptörün plazma zarında olduğu imünofluoresan ile gösterilmiştir. MTT çoğalma analizleri, seçici bir 5-HT<sub>2A</sub> reseptör alt tipi agonisti olan serotoninin MCF-7 hücrelerini uyardığını göstermektedir. Bu sonuçlar, 5-HT' nin, neoplastik meme hücrelerinde mitojenik bir rol oynadığına dair biyolojik kanıtlar olarak gösterilmektedir (Sonier *ve ark.* 2006).

Bunun tersine gösterilen diğer yayınlarda ise Serotonin sitotoksik etkilere neden olabilen bir ajandır. Anti-depresan ilaçlardan selektif serotonin geri alım inhibitörleri (sertralin, fluoksetin, paroksetin, sitalopram, essitalopram) ve serotonin-norepinefrin geri alım inhibitörleri (venlafaksin, duloksetin) ile gerçekleştirilen hücre canlılığı XTT deneylerinde 24 saat içerisinde sitotoksik etki gösterdikleri ifade edilmektedir. İlaçların konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre büyümesini inhibe ettiği ve Sertralin (IC<sub>50</sub>~ 16 µM) veya (IC eş değerde paroksetin, duloksetin ve fluoksetin, ardından en kuvvetli olduğu 50~ 31-36 µM), sitalopram, essitalopram ve venlafaksin önemli ölçüde zayıf etkiler göstermiştir. Sertralin, hücrelerde morfolojik değişiklikler, fosfatidilserinin dış zara atımı ve poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) kırılımını tetiklediği belirlenmiştir. MCF-7 büyümesinin inhibe edilmesinde serotonin geri alım inhibitörlerinin özellikle sertralinin, meme kanseri önleyici tedavide potansiyel kullanım için daha fazla değerlendirilmesi gerektiğini göstermiştir. Serotonerjik sistem içerisindeki, 5HT reseptör, serotonin geri alım taşıyıcısı olan SERT ve TPH1 antagonistleri doza bağımlı olarak HCC1954 meme kanseri tümör hücrelerinde küre oluşumunu engellediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Literatürde, SERT inhibitörü olarak kullanılan Vilazodon, kemoteropik ajan olarak kullanılan Docetaxel ile doza bağımlı kombine tedavide, BTIC hücrelerini hedef alarak apoptozu indükler ve tümör çapını azalttığı belirlenmiştir (Gwynne *ve ark.* 2017). Meme kanser hücre hatlarında SERT aşırı ekspresyonu bu serotonerjik sistemdeki moleküle gösterilen ilgiyi arttırmıştır. Docetaxel kemoteropik ajanı ile kombine tedavi üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. İn vivo olarak devam eden bu çalışmalarda fare modellerinde tümör başlatıcı hücreler hedef alınmıştır. SERT aktivitesini inhibe eden bir SSRI olan Sertraline, kemoteropik ajan Docetaxel ile birlikte null farelere uygulandığında BTIC hücrelerinin oluşturduğu tümörlerde azalma meydana gelip yapılan önceki çalışmaları destekleyici sonuçlar elde edilmiştir. Kombine tedavi uygulanan fare dokularına, immünohistokimyasal boyama sonucunda proliferasyon markırı olan



Ki67+ hücrelerde kontrol hücrelere göre belirgin azalma olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar yorumlandığında, Docetaxel ve SSRI ajanlarının birlikte kombine tedavisi, apoptotik yolları uyararak aktivasyonunu gerçekleştirir ve hedef hücrelerin proliferasyonundaki etkisi literatür bilgisi olarak gösterilmiştir (Hallett *ve ark.* 2016).

Meme kanseri ileri evrelerinde artmış sistemik 5-HT seviyesi ile korelidir. Terapotik ajan olarak kullanılan SSRI tümör büyümesi %50 artırmasının yanı sıra IL-10 ve IFN4 gibi sitokinleri inhibe ederken IL- $\beta$  ekspresyonunu arttırdığı yapılan *invitro* çalışmalarla belirlenmiştir (Arreola *ve ark.* 2015). Bu çalışmaların beraberinde edinilen literatür bilgisine göre, 5-HT<sub>2A</sub> reseptörü inflamatuvar süreçlerde bir role sahiptir. Özellikle, TNF- $\alpha$  içerisindeki hücre mekanizma inflamasyonda anahtar bir role sahiptir. 5-HT<sub>2A</sub> reseptörünün agonist(R)-DOI seçici aktivasyonu TNF- $\alpha$ 'nın sistemik etkilerini bloke edebilir. Aynı zamanda DOI, TNF- $\alpha$  tarafından uyarılmış IL-6 artışını önlediği belirlenmiştir. 5-HT<sub>2A</sub> reseptörlerinin agonizmi inflamatuvar hastalıkların tedavisi için küçük molekül temelli terapötiklerin geliştirilmesinde yeni bir yaklaşım oluşturabilir (Nau *ve ark.* 2013).

Serotonin meme kanseri ile doğrudan ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmektedir. Özellikle 5HT reseptörlerinin anormal ifadesi ile serotonin biyosentezinin tümör mikro çevresinde hızlanması hastalığın kötü prognozu ile ilişkili olarak gösterilmektedir. Meme kanseri dokusunda tutarlı bir şekilde gösterilen serotonin biyosentezinde öncü aminoasit triptofanın artan enzimatik degradasyonu, ayrıca artan serotonin sentezi için önemli bir substrat kaynağı sağlar. Hem triptofan hidroksilaz 1 (TPH1) ve indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO), ileri hastalık evresi ile korelidir ve zayıf prognozla bağlantılı olabilir. Bu değişimler ile birlikte Serotonin biyolojik fonksiyonlarının tümörigenezde araştırılması ilgi çekmektedir (Juhász *ve ark.* 2012). Son zamanlarda, meme kanseri hücrelerinde eksprese edilen 5HT reseptör alt tiplerinin, teşhis prognostik belirteçler olarak faydası olabileceği öne sürülmüştür (Kopparapu *ve ark.* 2013).

5-HT biyosentezinin artan kapasitesiyle birlikte, 5-HTR anlatımında çoklu değişimler ve insan meme kanseri hücrelerinin malignant progresyonunun da değişmesine neden olmaktadır. Literatür bilgisine bakıldığında, özellikle 5HT<sub>2A</sub> reseptörünün, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, mRNA ve reseptör proteinini kodlama açısından ifade edildiği ve kanser gelişiminde düzenleyici anahtar rol oynadığı bildirilmiştir (Sonier *ve ark.* 2006). Klinik düzeyde yapılan çalışmalar,

dolaşımdaki serotoninin özellikle trombositler içerisindeki konsantrasyonu ölçülmüş ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Plazmada potansiyel olarak önemli serbest serotonin havuzu mevcuttur. Son zamanlarda meme kanseri hücrelerinin, tümör büyümesini desteklemek için kullanılan 5HT'yi normal hücrelere kıyasla daha fazla sentezleyebildiği gösterilmiştir. Meme kanseri için en yaygın kullanılan serum bazlı tümör belirleyicisi olan Ca15.3 ile serotonin seviyeleri plazmada karşılaştırıldığında erken meme kanserinin değerlendirilmesinde plazma serbest serotoninin uygulanabilirliğini değerlendirilmiştir. Sıklıkla tekrarlayan meme kanserinde serotonin seviyelerinin sınırlı hasta grubunda tanımlayıcı olabileceği ifade edilmiştir (Frobe *ve ark.* 2014).

Serotonin hücre farklılaşması, progresyon ile ilişkili olduğu kadar hücre ölümünü tetiklemektedir. 5-HT varlığında kültürlenmiş Grup 1 Burkitt Lenfoma hücrelerinde 24 saat içerisinde mitokondri kökenli içsel apoptotik mekanizmanın aktiflendiği, kaspaz aktivasyonunun bu sürece eşlik ettiği gösterilmiştir (Sarafeim *ve ark.* 2002). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre, *Centaurea* tohumundan izole edilen N- (p-koumaroil) serotonin (CS) MCF-7 hücrelerinde apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu amaçla gösterilen sonuçlarda CS hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. Hücre ölümünün indüksiyonu ve hücre döngüsü durması, akış sitometrisi kontrolleri ile doğrulanmıştır. CS ile tedaviden sonra, CD24 / CD44 / CD58 / CD71 ekspresyonunda hücre içerisinde doza bağlı azalma gözlemlense de, CD56 ve CD15 ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı bulgular ışığında gözlenmiştir (Mitsis *ve ark.* 2018). Serotonin başta apoptoz olmak üzere metastaz, anjiyogenez, migrasyon ve invazyon gibi hücrel mekanizmalardaki etkin rolü, meme kanserindeki teropotik etkisini aydınlatmada araştırmacılar tarafından kilit nokta haline gelmiştir. 5-HT bağımlı anjiyogenez 5-HT1 reseptör bağımlı G $\beta$ y/ Src/PI3K, sinyal yolu ile gösterilmiştir. 5-HT, VEGF sinyal simülasyonu olan G $\beta$ y/ Src/PI3K, AKT/mTOR ve ERK/p38 yollarını HÜVECs hücrelerinde indüklediği belirtilmiştir. Bu yolların indüklenmesi ile anjiyogenez bağımlı ROS üretimi artar tümör oluşumu ve proliferasyonu gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu çalışmalar ek olarak, 5HT1 reseptörü antogostik karakterine sahip BJ-1108 ajanın anjiyogenez sinyalizasyonu inhibe ederek VCFR inhibitörü etkisi oluşturduğu için, hücre NOX yolu ile oluşan ROS üretimini de durdurmakta olduğu *in vitro* deneylerle kanıtlanmıştır (Banskota *ve ark.* 2016).

Tümör invazyonu oluşurken hücre adezyonu ve migrasyonundaki değişimler EMT yolağına benzetilmektedir. EMT yolağı tümör hücrelerinin oluştuğu dokudan çıkarak, uzak mesafedeki doku, organlara göç etmesi ayrıca onkogenik süreçleri ve metastazı sağlayan tümör gelişimindeki kritik süreç olarak tanımlanmaktadır. Epitel hücre polaritesinin fonksiyonel kaybı oluşurken mezankimal hücre fenotipine geçerek tümör hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır. Serotonin EMT yolağı üzerindeki kritik etkisi araştırmalar kapsamında belirlenmiştir. 5-HT<sub>1B</sub> ve 5-HT<sub>1D</sub> reseptörleri, E-kaderinin up-regülasyonu ile ilişkili olduğu bilgisine dayanarak, hücre içerisinde oluşan sinyalleşmeye ve EMT sürecine yol açan β1 integrin-aracılı proliferasyon ve invazyonun aktivasyonu ile 5-HT<sub>1B</sub> ve 5-HT<sub>1D</sub> reseptörlerinin etkili olduğu önerilmiştir (Gurbuz *ve ark.* 2014).

5-HT, her grupta birkaç alt tipi olan toplam 15 reseptör ailesine sahiptir. Bu reseptörlerin büyüme faktörü olarak hareket ettiği ve miyometriyum ve kanser hücresi proliferasyonu da dahil olmak üzere çeşitli normal hücrelerde bazı moleküler değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Serotonin için ana kaynaklardan biri olan mast hücreleri tümör dokularında IL-1α ve IL-1β salınımına yol açar. Ayrıca, serotoninin nörotransmisyon, bağırsak hareketleri, hafıza işleme ve uykunun düzenlenmesi gibi birçok hücresel etkiye dahil olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda, 5-HT<sub>1B</sub> reseptörlerinin, NF-κB, Src / FAK, integrin β1, doku transglutaminaz dahil olmak üzere çeşitli klinik sinyalleşme yollarının indüklenmesini teşvik ederek hücre çoğalması, motilitesi, invazyon ve malign hücrelerin hayatta kalmasında rol oynadığı gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, zamana ve doza bağlı olarak serotoninin MCF-7 hücreleri üzerindeki toksisite düzeyi incelendi. 50µM serotonin konsantrasyonundan sonraki her artan konsantrasyonda hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşumu gözlemlendiği için deney süresince devam edilen konsantrasyon 50 µM olarak belirlendi. Yapılan MTT deneyinde serotonin 24 saatten sonra hücreler üzerindeki fonksiyonel etkisini azaldığı için buna takiben etkin zaman diliminin 24 saat olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). MTT sonucunda doza bağımlı hücre proliferasyonunda meydana gelen azalmalar baz alındığında 50µM serotonin konsantrasyonunun apoptotik yolları tetikleyebilir olduğu öngörülmüştür. Literatürde yapılan birçok çalışmada, serotoninin apoptotik yollar üzerindeki mekanistik etkisi bilinmektedir. MCF-7 hücrelerinde serotonin uygulanması sonrasında florasan indikatör boyaları olan

DiOC ve PI boyamaları ile apoptoz varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Her iki boyanın da özellikleri paralellinde elde edilen bulgulara göre, 50µM serotonin konsantrasyonunun apoptotik yolların tetiklendiği ve hücrenin apoptoza yönlendirildiği belirlenmiştir (Şekil 3.2), (Şekil, 3.3).

Serotonin apoptoz üzerinde gösterdiği efektif etkisi, RT-PZR ile incelenmiştir. Apoptoz markırları olan BAX (BCL2-associated X Protein) ve p53 proteinlerin ifade düzeylerine bakılmış olup, her ikisinin de kontrole oranla, mRNA düzeyinde ekspresyonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. 50 µM serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde apoptozun uyarıldığı ve hücrenin kontrollü ölümü ile proliferasyonun azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.4). Buna bağlı olarak, literatürde yer alan serotonin apoptotik yolları etkilediği bilgisi elde edilen sonuçlarla kolerasyon göstermiştir.

Serotonin invazyon sürecindeki etkisi sıkça yapılan çalışmalarda yer almaktadır. Efektif olarak invazyon sürecini etkilediği ve hücredeki EMT mekanizmasını uyardığı bilinmektedir. MCF-7 kanser hücrelerinde ise invazyon sürecindeki etkisi görebilmek mümkündür. Yapılan RT-PZR sonuçlarında invazyonda etkili olan TIMP2' ni serotonin uygulanması sonucunda mRNA düzeyinde azaldığı gözlenmiştir. TIMP2 aynı zamanda MMP2- MMP9 faktörlerini de etkiler. TIMP2' deki ekspresyon değişimi MMP2-MMP9 faktörlerinde mRNA düzeyindeki ekspresyonunu etkilemiştir (Şekil 3.4). Bu faktörlerdeki azalma serotonin invazyon sürecinde teropotik bir ajan olarak kullanımı sorusunu akla getirir. Aynı zamanda WNT3a ve SNAIL gibi EMT markırlarında meydana gelen azalma sonucunda serotoninin epitelial hücre topluluğundan mezankimal hücre topluluğuna geçişinde etkin rol oynadığına yönelik bulgular elde edilmiştir. WNT3a ve SNAIL mezankimal geçişte oynadığı rol tanımlıdır. Ekspresyon seviyelerinde meydana gelen bu azalma mezakimal geçişini inhibe ettiği ve EMT mekanizmasının serotonin tarafından inhibisyonunun gerçekleştirildiği elde edilen bulgularca belirlenmiştir.

Reseptör tirozin kinaz (RTK) testi kullanılarak serotonin uygulanan MCF-7 hücrelerinde bu yolak üzerindeki serotonin etkisi tespit edilmesi amaçlanmıştır. RTK yolağında görev alan proteinlerin ifade düzeylerinde görülen farklılıklara göre STRING protein etkileşim ağı üzerinde merkezi rol oynayabilecek protein hedefleri belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizlere göre bu merkezi proteinin STAT3 olarak belirlendiği ve nöronal indükleyiciler Ephrin ailesi ile ilişkili olduğu bulgular doğrultusunda belirlenmiştir (Şekil 3.7). RTK'ların proliferasyon, hücre canlılığı,

hücre farklılaşması ve motilite olmak üzere birçok önemli hücresel işlevleri olduğu literatür bilgisinde tanımlanmıştır. Serotonin RTK üzerinde efektif etkisi göz önünde bulundurulursa, hücresel proliferasyona, farklılaşmaya veya motiliteye RTK sinyalizasyonu yolu ile etki edebileceği öngörülmektedir

Serotonin RTK yolağı üzerinde olan etki mekanizması yapılan araştırmalarda kanıtlanmıştır. 50 µM serotonin uygulaması sonucunda yaptığımız reseptör tirozin kinaz testi sonuçlarına göre anlamlı düzeyde ekspresyon gösteren proteinlerle sonuçları konfirme etmek amaçlı immünoiblotlama tekniğinden yararlanılarak protein düzeyleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, serotonin, c-Abl ve AKT'ın ifade düzeyinde artışa neden olduğu ve etkinin p-AKT'ın Ser473 rezidüsündeki fosforilasyon düzeyini de arttırması sonuçları ile doğrulanmıştır (Şekil 3.8). Serotoninin c-Abl c-Kit onkogen proteinler üzerindeki etkisi hücre sağ kalım ile ilişkili olan onkogenezi tetiklediği belirlenmiştir. Onkogenizasyon sürecindeki etkisi meme kanseri prognozunda etkili bir mekanizmaya sahip olduğu bu doğrultuda uygulanacak tedavi yollarının belirlenmesi için yapılan çalışmaların genişletilmesi düşünülmelidir. İmmünoiblotlama sonucunda EMT markırı olarak bilinen mezankimal geçişte rol oynayan SLUG protein ekspresyon seviyesinin artışı dikkat çekmektedir (Şekil 3.8). RT-PZR ile yapılan sonuçların aksine SLUG artışı ile serotoninin EMT yolağını tetiklediği görülmektedir. Bu durum, serotoninin etkin konsantrasyonda hücrelere uygulanması ile transkripsiyon düzeyinde EMT yolağı üzerinde inhibe edici etki olduğu fakat transkripsiyon sürecinde bu etkinin tetikleyici yönde değiştiği bilgisi öngörülmektedir. Serotoninin EMT yolağı üzerindeki etkisinin daha net bir şekilde anlaşılması için ileri tarama testleri ve kontrollerinin yapılması gerekmektedir.

Serotonin uygulanması hücrelerdeki JAK/STAT yolu üzerindeki mekanizmayı da uyardığı yapılan deneyde gösterilmiştir. Serotonin zamana bağlı olarak JAK 2 ifadesinin mRNA düzeyinde arttığı buna bağlı olarak, immünoiblotlama ile bakılan STAT1 ve STAT3'ünde serotoninin uygulanması ile arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.9). Buna takiben serotonin ligand olarak bağlayan hücrelerin reseptör tirozin kinaz aktivitesini sağlayarak JAK2'yi uyararak arttırıldığı sonucuna varılabilir. Uyarılan JAK2, yolağı üzerindeki STAT1 ve STAT3 ekspresyonunu arttırır ve hücre içerisinde immün yanıtı tetikleyebileceği düşünülmektedir.

Serotonin uygulaması yapılan MCF-7 hücrelerinde elde edilen protein lizatları IEF yöntemi kullanılarak 2 boyutlu jel elektroforezinde gösterilmiştir. Serotonin taşıyıcısının kontrol olarak kullanıldığı durumda serotonin uygulanan lizatlarda birçok proteinde meydana gelen değişim spotlar üzerinde belirlenmiştir (Şekil 3.10). Serotonin uygulananlarda, EtOH uygulananlara göre farklı alanlarda protein ekspresyonunda artış ve azalış meydana gelmiştir. Analiz süreci tamamlanmayan bu çalışmada, değişen spotlar temel alınarak daha sonraki çalışmalar kapsamında global protein ifadesindeki değişime yönelik deneylerin kurgulanmasının önemi vurgulanmaktadır.

Sonuç olarak, bu araştırma ile elde edilen bulgularla, serotonin MCF-7 hücreleri üzerinde apoptotik bir ajan gibi etki ettiği tespit edilmiştir. Buna takiben serotoninin EMT yolağı üzerindeki mRNA ekspresyon düzeyindeki baskılayıcı etkisi bulunurken, translasyon geçişinde bu etkinin ortadan kalktığı hatta epitelyum mezankimal geçişi tetiklediği elde edilen bulgular arasındadır. Ayrıca RTK sinyalizasyonunda anahtar rol oynadığı hücre poliferasyona, farklılaşmaya veya motiliteye etkisi olabileceği ön görülmektedir. JAK/STAT yolağı üzerindeki sinyalizasyonu arttırıcı etkisi sayesinde hücre içi immün yanıtı tetiklediği elde edilen bulgular arasında yer alır. Bu çalışmada, serotoninin MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki teropotik etkisi tanımlanmaya ve etki ettiği yollar üzerinde yapılan analizler sonucunda ileri çalışmalara zemin oluşturulmaya çalışılmıştır. 5-HT'nin meme tümörlerindeki çeşitli ve karışık mekanistik etkisi halen açıklığa kavuşmamıştır. Apoptoz, hücre farklılaşması, migrasyon, invazyon ve metastaz gibi hücre fonksiyonlarının serotonin ilişkiliği aydınlatılmasıyla birlikte yeni olası terapötik tedaviler geliştirilebilecektir. Buna takiben serotoninin meme kanseri hücrelerindeki fonksiyonel etkinin belirlenmesi ile uygun konsantrasyonlarda tedavi amaçlı *in vivo* deneylere geçebilmesi amaçlanmaktadır. Serotoninin meme kanserindeki rolünün açığa kavuşması ile birlikte meme kanseri hastalarının tedavisinde yeni terapotik opsiyonların ortaya çıkması mümkün olabilecektir.

## 5. KAYNAKÇA

- Akram, M., M. Iqbal, M. Daniyal and A. U. Khan (2017). "Awareness and current knowledge of breast cancer." Biol Res **50**(1): 33.
- Arreola, R., E. Becerril-Villanueva, C. Cruz-Fuentes, M. A. Velasco-Velazquez, M. E. Garces-Alvarez, G. Hurtado-Alvarado, S. Quintero-Fabian and L. Pavon (2015). "Immunomodulatory effects mediated by serotonin." J Immunol Res **2015**: 354957.
- Ashkenazi, A. (2015). "Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions." J Clin Invest **125**(2): 487-489.
- Azmitia, E. C. (1999). "Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue." Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 33S-45S.
- Ballou, Y., A. Rivas, A. Belmont, L. Patel, C. N. Amaya, S. Lipson, T. Khayou, E. B. Dickerson, Z. Nahleh and B. A. Bryan (2018). "5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability." Mol Clin Oncol **9**(3): 243-254.
- Banskota, S., J. Gautam, S. C. Regmi, P. Gurung, M. H. Park, S. J. Kim, T. G. Nam, B. S. Jeong and J. A. Kim (2016). "BJ-1108, a 6-Amino-2,4,5-Trimethylpyridin-3-ol Analog, Inhibits Serotonin-Induced Angiogenesis and Tumor Growth through PI3K/NOX Pathway." PLoS One **11**(1): e0148133.
- Begg, C. B., I. Ostrovnya, J. V. S. Carniello, R. A. Sakr, D. Giri, R. Towers, M. Schizas, M. De Brot, V. P. Andrade and A. Mauguen (2016). "Clonal relationships between lobular carcinoma in situ and other breast malignancies." Breast Cancer Research **18**(1): 66.
- Benveniste, E. N., Y. Liu, B. C. McFarland and H. Qin (2014). "Involvement of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Interferon Cytokine Res **34**(8): 577-588.
- Berendsen, H. H. (2000). "The role of serotonin in hot flushes." Maturitas **36**(3): 155-164.
- Brewer, H. R., M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth and A. J. Swerdlow (2017). "Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure." Breast Cancer Res Treat **165**(1): 193-200.
- Burz, C., I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu and A. Irimie (2009). "Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets." Acta Oncol **48**(6): 811-821.
- Busby, J., K. Mills, S. D. Zhang, F. G. Liberante and C. R. Cardwell (2018). "Selective serotonin reuptake inhibitor use and breast cancer survival: a population-based cohort study." Breast Cancer Res **20**(1): 4.
- Casper, R. F. and S. S. Yen (1985). "Neuroendocrinology of menopausal flushes: an hypothesis of flush mechanism." Clin Endocrinol (Oxf) **22**(3): 293-312.
- Cha, Y. J., H. M. Kim and J. S. Koo (2017). "Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins Differs between Invasive Lobular Carcinoma and Invasive Ductal Carcinoma." Int J Mol Sci **18**(1).

- Chien, T. J., C. H. Hsu, C. Y. Liu and C. J. Fang (2017). "Effect of acupuncture on hot flush and menopause symptoms in breast cancer- A systematic review and meta-analysis." *PLoS One* **12**(8): e0180918.
- Chirita, A. (2017). "Indications of the Magnetic Resonance Method in Breast Pathology." *Chirurgia (Bucur)* **112**(4): 367-377.
- Chung, I. (2017). "Optical measurement of receptor tyrosine kinase oligomerization on live cells." *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1859**(9 Pt A): 1436-1444.
- Ciriello, G., M. L. Gatz, A. H. Beck, M. D. Wilkerson, S. K. Rhee, A. Pastore, H. Zhang, M. McLellan, C. Yau, C. Kandoth, R. Bowlby, H. Shen, S. Hayat, R. Fieldhouse, S. C. Lester, G. M. Tse, R. E. Factor, L. C. Collins, K. H. Allison, Y. Y. Chen, K. Jensen, N. B. Johnson, S. Oesterreich, G. B. Mills, A. D. Cherniack, G. Robertson, C. Benz, C. Sander, P. W. Laird, K. A. Hoadley, T. A. King, T. R. Network and C. M. Perou (2015). "Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer." *Cell* **163**(2): 506-519.
- Cortes-Altamirano, J. L., A. Olmos-Hernandez, H. B. Jaime, P. Carrillo-Mora, C. Bandala, S. Reyes-Long and A. Alfaro-Rodriguez (2018). "Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System." *Curr Neuropharmacol* **16**(2): 210-221.
- Cowell, C. F., B. Weigelt, R. A. Sakr, C. K. Ng, J. Hicks, T. A. King and J. S. Reis-Filho (2013). "Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited." *Molecular oncology* **7**(5): 859-869.
- da Costa Vieira, R. A., G. Biller, G. Uemura, C. A. Ruiz and M. P. Curado (2017). "Breast cancer screening in developing countries." *Clinics (Sao Paulo)* **72**(4): 244-253.
- Dall, G. V. and K. L. Britt (2017). "Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk." *Front Oncol* **7**: 110.
- Davis, P. B. (2001). "Cystic fibrosis." *Pediatr Rev* **22**(8): 257-264.
- DeSantis, C., J. Ma, L. Bryan and A. Jemal (2014). "Breast cancer statistics, 2013." *CA Cancer J Clin* **64**(1): 52-62.
- Duffy, S. W., O. W. E. Morrish, P. C. Allgood, R. Black, M. G. C. Gillan, P. Willsher, J. Cooke, K. A. Duncan, M. J. Michell, H. M. Dobson, R. Maroni, Y. Y. Lim, H. N. Purushothaman, T. Suaris, S. M. Astley, K. C. Young, L. Tucker and F. J. Gilbert (2018). "Mammographic density and breast cancer risk in breast screening assessment cases and women with a family history of breast cancer." *Eur J Cancer* **88**: 48-56.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Felipe Lima, J., S. Nofech-Mozes, J. Bayani and J. M. Bartlett (2016). "EMT in Breast Carcinoma-A Review." *J Clin Med* **5**(7).
- Fisher, B., S. Land, E. Mamounas, J. Dignam, E. R. Fisher and N. Wolmark (2001). Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. Seminars in oncology, Elsevier.



- Fraser, J., A. G. Cabodevilla, J. Simpson and N. Gammoh (2017). "Interplay of autophagy, receptor tyrosine kinase signalling and endocytic trafficking." Essays Biochem **61**(6): 597-607.
- Frobe, A., L. Cicin-Sain, G. Jones, Z. Soldic, J. Lukac, A. Bolanca and Z. Kusic (2014). "Plasma free serotonin as a marker for early detection of breast cancer recurrence." Anticancer Res **34**(3): 1167-1169.
- Ge, X., C. Ding, W. Zhao, L. Xu, H. Tian, J. Gong, M. Zhu, J. Li and N. Li (2017). "Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility." J Transl Med **15**(1): 13.
- Geng, S. Q., A. T. Alexandrou and J. J. Li (2014). "Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis." Cancer Lett **349**(1): 1-7.
- Ghoncheh, M., Z. Momenimovahed and H. Salehiniya (2016). "Epidemiology, incidence and mortality of breast cancer in Asia." Asian Pac J Cancer Prev **17**(3): 47-52.
- Gibson, C. J. and M. S. Davids (2015). "BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis." Clin Cancer Res **21**(22): 5021-5029.
- Gil Del Alcazar, C. R., S. J. Huh, M. B. Ekram, A. Trinh, L. L. Liu, F. Beca, X. Zi, M. Kwak, H. Bergholtz, Y. Su, L. Ding, H. G. Russnes, A. L. Richardson, K. Babski, E. Min Hui Kim, C. H. McDonnell, 3rd, J. Wagner, R. Rowberry, G. J. Freeman, D. Dillon, T. Sorlie, L. M. Coussens, J. E. Garber, R. Fan, K. Bobolis, D. C. Allred, J. Jeong, S. Y. Park, F. Michor and K. Polyak (2017). "Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition." Cancer Discov **7**(10): 1098-1115.
- Gothert, M. (2013). "Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification." Pharmacol Rep **65**(4): 771-786.
- Gurbuz, N., A. A. Ashour, S. N. Alpay and B. Ozpolat (2014). "Down-regulation of 5-HT1B and 5-HT1D receptors inhibits proliferation, clonogenicity and invasion of human pancreatic cancer cells." PLoS One **9**(8): e105245.
- Gwynne, W. D., R. M. Hallett, A. Girgis-Gabardo, B. Bojovic, A. Dvorkin-Gheva, C. Aarts, K. Dias, A. Bane and J. A. Hassell (2017). "Serotonergic system antagonists target breast tumor initiating cells and synergize with chemotherapy to shrink human breast tumor xenografts." Oncotarget **8**(19): 32101-32116.
- Hagena, H. and D. Manahan-Vaughan (2017). "The serotonergic 5-HT4 receptor: A unique modulator of hippocampal synaptic information processing and cognition." Neurobiol Learn Mem **138**: 145-153.
- Hallett, R. M., A. Girgis-Gabardo, W. D. Gwynne, A. O. Giacomelli, J. N. Bisson, J. E. Jensen, A. Dvorkin-Gheva and J. A. Hassell (2016). "Serotonin transporter antagonists target tumor-initiating cells in a transgenic mouse model of breast cancer." Oncotarget **7**(33): 53137-53152.
- Hamajima, N., K. Hirose, K. Tajima, T. Rohan, E. E. Calle, C. W. Heath, Jr., R. J. Coates, J. M. Liff, R. Talamini, N. Chantarakul, S. Koetsawang, D. Rachawat, A. Morabia, L. Schuman, W. Stewart, M. Szklo, C. Bain, F. Schofield, V. Siskind, P. Band, A. J. Coldman, R. P. Gallagher, T. G. Hislop, P. Yang, L. M. Kolonel, A. M. Nomura, J. Hu, K. C. Johnson, Y. Mao, S. De Sanjose, N. Lee, P. Marchbanks, H.

W. Ory, H. B. Peterson, H. G. Wilson, P. A. Wingo, K. Ebeling, D. Kunde, P. Nishan, J. L. Hopper, G. Colditz, V. Gajalanski, N. Martin, T. Pardthaisong, S. Silpisornkosol, C. Theetranont, B. Boosiri, S. Chutivongse, P. Jimakorn, P. Virutamasen, C. Wongsrichanalai, M. Ewertz, H. O. Adami, L. Bergkvist, C. Magnusson, I. Persson, J. Chang-Claude, C. Paul, D. C. Skegg, G. F. Spears, P. Boyle, T. Evstifeeva, J. R. Daling, W. B. Hutchinson, K. Malone, E. A. Noonan, J. L. Stanford, D. B. Thomas, N. S. Weiss, E. White, N. Andrieu, A. Bremond, F. Clavel, B. Gairard, J. Lansac, L. Piana, R. Renaud, A. Izquierdo, P. Viladiu, H. R. Cuevas, P. Ontiveros, A. Palet, S. B. Salazar, N. Aristizabel, A. Cuadros, L. Tryggvadottir, H. Tulinius, A. Bachelot, M. G. Le, J. Peto, S. Franceschi, F. Lubin, B. Modan, E. Ron, Y. Wax, G. D. Friedman, R. A. Hiatt, F. Levi, T. Bishop, K. Kosmelj, M. Primic-Zakelj, B. Ravnihar, J. Stare, W. L. Beeson, G. Fraser, R. D. Bullbrook, J. Cuzick, S. W. Duffy, I. S. Fentiman, J. L. Hayward, D. Y. Wang, A. J. McMichael, K. McPherson, R. L. Hanson, M. C. Leske, M. C. Mahoney, P. C. Nasca, A. O. Varma, A. L. Weinstein, T. R. Moller, H. Olsson, J. Ranstam, R. A. Goldbohm, P. A. van den Brandt, R. A. Apelo, J. Baens, J. R. de la Cruz, B. Javier, L. B. Lacaya, C. A. Ngelangel, C. La Vecchia, E. Negri, E. Marubini, M. Ferraroni, M. Gerber, S. Richardson, C. Segala, D. Gatei, P. Kenya, A. Kungu, J. G. Mati, L. A. Brinton, R. Hoover, C. Schairer, R. Spirtas, H. P. Lee, M. A. Rookus, F. E. van Leeuwen, J. A. Schoenberg, M. McCredie, M. D. Gammon, E. A. Clarke, L. Jones, A. Neil, M. Vessey, D. Yeates, P. Appleby, E. Banks, V. Beral, D. Bull, B. Crossley, A. Goodill, J. Green, C. Hermon, T. Key, N. Langston, C. Lewis, G. Reeves, R. Collins, R. Doll, R. Peto, K. Mabuchi, D. Preston, P. Hannaford, C. Kay, L. Rosero-Bixby, Y. T. Gao, F. Jin, J. M. Yuan, H. Y. Wei, T. Yun, C. Zhiheng, G. Berry, J. Cooper Booth, T. Jelihovsky, R. MacLennan, R. Shearman, Q. S. Wang, C. J. Baines, A. B. Miller, C. Wall, E. Lund, H. Stalsberg, X. O. Shu, W. Zheng, K. Katsouyanni, A. Trichopoulou, D. Trichopoulos, A. Dabancens, L. Martinez, R. Molina, O. Salas, F. E. Alexander, K. Anderson, A. R. Folsom, B. S. Hulka, L. Bernstein, S. Enger, R. W. Haile, A. Paganini-Hill, M. C. Pike, R. K. Ross, G. Ursin, M. C. Yu, M. P. Longnecker, P. Newcomb, L. Bergkvist, A. Kalache, T. M. Farley, S. Holck, O. Meirik and C. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast (2002). "Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease." Br J Cancer **87**(11): 1234-1245.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Harmar, A. J., R. A. Hills, E. M. Rosser, M. Jones, O. P. Buneman, D. R. Dunbar, S. D. Greenhill, V. A. Hale, J. L. Sharman, T. I. Bonner, W. A. Catterall, A. P. Davenport, P. Delagrance, C. T. Dollery, S. M. Foord, G. A. Gutman, V. Laudet, R. R. Neubig, E. H. Ohlstein, R. W. Olsen, J. Peters, J. P. Pin, R. R. Ruffolo, D. B. Searls, M. W. Wright and M. Spedding (2009). "IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D680-685.

Herr, N., C. Bode and D. Duerschmied (2017). "The Effects of Serotonin in Immune Cells." Front Cardiovasc Med **4**: 48.

Holm, J., L. Eriksson, A. Ploner, M. Eriksson, M. Rantalainen, J. Li, P. Hall and K. Czene (2017). "Assessment of Breast Cancer Risk Factors Reveals Subtype Heterogeneity." Cancer Res **77**(13): 3708-3717.

- Hwangbo, W., J. H. Lee, S. Ahn, S. Kim, K. H. Park, C. H. Kim and I. Kim (2013). "EGFR gene amplification and protein expression in invasive ductal carcinoma of the breast." Korean journal of pathology **47**(2): 107.
- Igaz, P., S. Toth and A. Falus (2001). "Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice." Inflamm Res **50**(9): 435-441.
- Islahudin, F., S. M. Tindall, I. R. Mellor, K. Swift, H. E. Christensen, K. C. Fone, R. J. Pleass, K. N. Ting and S. V. Avery (2014). "The antimalarial drug quinine interferes with serotonin biosynthesis and action." Sci Rep **4**: 3618.
- Jeronimo, A. F., A. G. Freitas and M. Weller (2017). "Risk factors of breast cancer and knowledge about the disease: an integrative revision of Latin American studies." Cien Saude Colet **22**(1): 135-149.
- Johnson, K. C., E. A. Houseman, J. E. King and B. C. Christensen (2017). "Normal breast tissue DNA methylation differences at regulatory elements are associated with the cancer risk factor age." Breast Cancer Res **19**(1): 81.
- Jose, J., C. D. J. Tavares, N. D. Ebel, A. Lodi, R. Edupuganti, X. Xie, A. K. Devkota, T. S. Kaoud, C. L. Van Den Berg, E. V. Anslyn, S. Tiziani, C. Bartholomeusz and K. N. Dalby (2017). "Serotonin Analogues as Inhibitors of Breast Cancer Cell Growth." ACS Med Chem Lett **8**(10): 1072-1076.
- Juhász, C., Z. Nahleh, I. Zitron, D. C. Chugani, M. Z. Janabi, S. Bandyopadhyay, R. Ali-Fehmi, T. J. Mangner, P. K. Chakraborty, S. Mittal and O. Muzik (2012). "Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies." Nucl Med Biol **39**(7): 926-932.
- Jung, S., M. Wang, K. Anderson, L. Baglietto, L. Bergkvist, L. Bernstein, P. A. van den Brandt, L. Brinton, J. E. Buring, A. H. Eliassen, R. Falk, S. M. Gapstur, G. G. Giles, G. Goodman, J. Hoffman-Bolton, P. L. Horn-Ross, M. Inoue, L. N. Kolonel, V. Krogh, M. Lof, P. Maas, A. B. Miller, M. L. Neuhouser, Y. Park, K. Robien, T. E. Rohan, S. Scarmo, L. J. Schouten, S. Sieri, V. L. Stevens, S. Tsugane, K. Visvanathan, L. R. Wilkens, A. Wolk, E. Weiderpass, W. C. Willett, A. Zeleniuch-Jacquotte, S. M. Zhang, X. Zhang, R. G. Ziegler and S. A. Smith-Warner (2016). "Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies." Int J Epidemiol **45**(3): 916-928.
- Kalkavan, H. and D. R. Green (2018). "MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business." Cell Death Differ **25**(1): 46-55.
- Karantza-Wadsworth, V. and E. White (2007). "Role of autophagy in breast cancer." Autophagy **3**(6): 610-613.
- Kopparapu, P. K., M. Tinzl, L. Anagnostaki, J. L. Persson and N. Dizayi (2013). "Expression and localization of serotonin receptors in human breast cancer." Anticancer Res **33**(2): 363-370.
- Kronowitz, S. J. and H. M. Kuerer (2006). "Advances and surgical decision-making for breast reconstruction." Cancer **107**(5): 893-907.
- Kupers, R., V. G. Frokjaer, A. Naert, R. Christensen, E. Budtz-Joergensen, H. Kehlet and G. M. Knudsen (2009). "A PET [18F]altanserin study of 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in the human brain and responses to painful heat stimulation." Neuroimage **44**(3): 1001-1007.

- Lee, C. I., L. E. Chen and J. G. Elmore (2017). "Risk-based breast cancer screening: implications of breast density." Medical Clinics **101**(4): 725-741.
- Leon-Ferre, R. A., N. Majithia and C. L. Loprinzi (2017). "Management of hot flashes in women with breast cancer receiving ovarian function suppression." Cancer Treat Rev **52**: 82-90.
- Li, T., J. Yang, Y. Lv, F. Yin, L. Xu, H. Liu, Q. Zheng and L. Li (2019). "Quantitative comparison of drug efficacy in treating hot flashes in patients with breast cancer." Breast Cancer Res Treat **173**(3): 511-520.
- Liu, X., F. Yun, L. Shi, Z. H. Li, N. R. Luo and Y. F. Jia (2015). "Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer." Asian Pac J Cancer Prev **16**(15): 6201-6206.
- Logan, G. J., D. J. Dabbs, P. C. Lucas, R. C. Jankowitz, D. D. Brown, B. Z. Clark, S. Oesterreich and P. F. McAuliffe (2015). "Molecular drivers of lobular carcinoma in situ." Breast Cancer Research **17**(1): 76.
- Mao, K., Y. Yang, W. Wu, S. Liang, H. Deng and J. Liu (2017). "Risk of second breast cancers after lobular carcinoma in situ according to hormone receptor status." PloS one **12**(5): e0176417.
- Maricq, A. V., A. S. Peterson, A. J. Brake, R. M. Myers and D. Julius (1991). "Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel." Science **254**(5030): 432-437.
- Marmor, S., J. Y. C. Hui, J. L. Huang, S. Kizy, H. Beckwith, A. H. Blaes, N. M. Rueth and T. M. Tuttle (2017). "Relative effectiveness of adjuvant chemotherapy for invasive lobular compared with invasive ductal carcinoma of the breast." Cancer **123**(16): 3015-3021.
- McDonald, E. S., A. S. Clark, J. Tchou, P. Zhang and G. M. Freedman (2016). "Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer." J Nucl Med **57 Suppl 1**: 9S-16S.
- Mendoza, M. C., E. E. Er and J. Blenis (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." Trends Biochem Sci **36**(6): 320-328.
- Meneses, A. (2015). "Serotonin, neural markers, and memory." Front Pharmacol **6**: 143.
- Mitsis, M., G. A. Alexiou, E. Vartholomatos, G. Markopoulos, D. Lazari, E. Hodaj, D. Nastos, P. Zagorianakou, V. Galani and A. P. Kyritsis (2018). "N-(p-coumaroyl) serotonin induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells." J BUON **23**(1): 129-133.
- Mohammad-Zadeh, L. F., L. Moses and S. M. Gwaltney-Brant (2008). "Serotonin: a review." J Vet Pharmacol Ther **31**(3): 187-199.
- Mu, Q., H. Wang and M. Zhang (2017). "Nanoparticles for imaging and treatment of metastatic breast cancer." Expert Opin Drug Deliv **14**(1): 123-136.
- Muller, C. L., A. M. J. Anacker and J. Veenstra-VanderWeele (2016). "The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models." Neuroscience **321**: 24-41.

- Muller, T., T. Durk, B. Blumenthal, M. Grimm, S. Cicko, E. Panther, S. Sorichter, Y. Herouy, F. Di Virgilio, D. Ferrari, J. Norgauer and M. Idzko (2009). "5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo." PLoS One **4**(7): e6453.
- Nau, F., Jr., B. Yu, D. Martin and C. D. Nichols (2013). "Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation blocks TNF-alpha mediated inflammation in vivo." PLoS One **8**(10): e75426.
- Nieto, M. A., R. Y. Huang, R. A. Jackson and J. P. Thiery (2016). "Emt: 2016." Cell **166**(1): 21-45.
- Nikiforuk, A. (2015). "Targeting the Serotonin 5-HT<sub>7</sub> Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders: Rationale and Progress to Date." CNS Drugs **29**(4): 265-275.
- Nikoletopoulou, V., M. Markaki, K. Palikaras and N. Tavernarakis (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." Biochim Biophys Acta **1833**(12): 3448-3459.
- Pai, V. P., L. L. Hernandez, M. A. Stull and N. D. Horseman (2015). "The Type 7 Serotonin Receptor, 5-HT<sub>7</sub>, Is Essential in the Mammary Gland for Regulation of Mammary Epithelial Structure and Function." BioMed research international **2015**.
- Pai, V. P., L. L. Hernandez, M. A. Stull and N. D. Horseman (2015). "The type 7 serotonin receptor, 5-HT<sub>7</sub>, is essential in the mammary gland for regulation of mammary epithelial structure and function." Biomed Res Int **2015**: 364746.
- Pai, V. P., A. M. Marshall, L. L. Hernandez, A. R. Buckley and N. D. Horseman (2009). "Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival." Breast Cancer Res **11**(6): R81.
- Parikh, U., C. M. Chhor and C. L. Mercado (2018). "Ductal Carcinoma In Situ: The Whole Truth." AJR Am J Roentgenol **210**(2): 246-255.
- Paulmann, N., M. Grohmann, J. P. Voigt, B. Bert, J. Vowinkel, M. Bader, M. Skelin, M. Jevsek, H. Fink, M. Rupnik and D. J. Walther (2009). "Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation." PLoS Biol **7**(10): e1000229.
- Pena-Blanco, A. and A. J. Garcia-Saez (2018). "Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis." FEBS J **285**(3): 416-431.
- Pencik, J., H. T. Pham, J. Schmoellerl, T. Javaheri, M. Schlederer, Z. Culig, O. Merkel, R. Moriggl, F. Grebien and L. Kenner (2016). "JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome." Cytokine **87**: 26-36.
- Rai, N. K., K. Tripathi, D. Sharma and V. K. Shukla (2005). "Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing." Int J Low Extrem Wounds **4**(3): 138-144.
- Rakoff-Nahoum, S. (2006). "Why cancer and inflammation?" Yale J Biol Med **79**(3-4): 123-130.
- Redig, A. J. and S. S. McAllister (2013). "Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis." Journal of internal medicine **274**(2): 113-126.

Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam (1999). "Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease." Am J Med **107**(5): 489-506.

Sarrouilhe, D., J. Clarhaut, N. Defamie and M. Mesnil (2015). "Serotonin and cancer: what is the link?" Curr Mol Med **15**(1): 62-77.

Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.

Schrader, K., J. Huai, L. Jockel, C. Oberle and C. Borner (2010). "Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis?" Cell Mol Life Sci **67**(10): 1607-1618.

Shamsi, M. and J. Pirayesh Islamian (2017). "Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing." Nucl Med Rev Cent East Eur **20**(1): 45-48.

Shibue, T. and R. A. Weinberg (2017). "EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications." Nat Rev Clin Oncol **14**(10): 611-629.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2017). "Cancer Statistics, 2017." CA Cancer J Clin **67**(1): 7-30.

Soll, C., J. H. Jang, M. O. Riener, W. Moritz, P. J. Wild, R. Graf and P. A. Clavien (2010). "Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer." Hepatology **51**(4): 1244-1254.

Sonier, B., M. Arseneault, C. Lavigne, R. J. Ouellette and C. Vaillancourt (2006). "The 5-HT<sub>2A</sub> 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**(4): 1053-1059.

Sudhakar, A. (2009). "History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods." J Cancer Sci Ther **1**(2): 1-4.

Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao and H. P. Zhu (2017). "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." Int J Biol Sci **13**(11): 1387-1397.

Tan, A. C., S. Vyse and P. H. Huang (2017). "Exploiting receptor tyrosine kinase co-activation for cancer therapy." Drug Discov Today **22**(1): 72-84.

Tenpenny, R. C. and K. G. Commons (2017). "What Gene Mutations Affect Serotonin in Mice?" ACS Chem Neurosci **8**(5): 987-995.

TİKEN, E. E., M. GÜNALDI, Y. OKUTURLAR and N. SEVER (2014). "İnvaziv lobuler meme kanserinin mideye metastazı: Olgu sunumu." Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi **29**(4).

Ungefroren, H., D. Witte and H. Lehnert (2018). "The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF-beta-induced EMT and cell motility in cancer." Dev Dyn **247**(3): 451-461.

Uzun, Ö., F. E. Aslan, D. Selimen and M. Koç (2004). "Quality of life in women with breast cancer in Turkey." Journal of Nursing Scholarship **36**(3): 207-213.

van Erkelens, A., L. Derks, A. S. Sie, L. Egbers, G. Woldringh, J. B. Prins, P. Manders and N. Hoogerbrugge (2017). "Lifestyle Risk Factors for Breast Cancer in

- BRCA1/2-Mutation Carriers Around Childbearing Age." J Genet Couns **26**(4): 785-791.
- Walther, D. J. and M. Bader (2003). "A unique central tryptophan hydroxylase isoform." Biochem Pharmacol **66**(9): 1673-1680.
- Wang, Z., Y. Li and F. H. Sarkar (2010). "Signaling mechanism(s) of reactive oxygen species in Epithelial-Mesenchymal Transition reminiscent of cancer stem cells in tumor progression." Curr Stem Cell Res Ther **5**(1): 74-80.
- Ward, E. M., C. E. DeSantis, C. C. Lin, J. L. Kramer, A. Jemal, B. Kohler, O. W. Brawley and T. Gansler (2015). "Cancer statistics: Breast cancer in situ." CA Cancer J Clin **65**(6): 481-495.
- Welford, R. W., M. Vercauteren, A. Trebaul, C. Cattaneo, D. Eckert, M. Garzotti, P. Sieber, J. Segrestaa, R. Studer, P. M. Groenen and O. Nayler (2016). "Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation." Sci Rep **6**: 30059.
- Wesolowska, A. (2002). "In the search for selective ligands of 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptors." Pol J Pharmacol **54**(4): 327-341.
- Williams, D. R., S. A. Mohammed and A. E. Shields (2016). "Understanding and effectively addressing breast cancer in African American women: Unpacking the social context." Cancer **122**(14): 2138-2149.
- Wu, Y., N. Zhang and Q. Yang (2017). "The prognosis of invasive micropapillary carcinoma compared with invasive ductal carcinoma in the breast: a meta-analysis." BMC cancer **17**(1): 839.
- Yan, Z., S. A. Gibson, J. A. Buckley, H. Qin and E. N. Benveniste (2018). "Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases." Clin Immunol **189**: 4-13.
- Yüksel, S., G. A. UĞRAŞ, I. Cavdar, A. BOZDOĞAN, S. Ö. Gürdal, N. Akyolcu, E. Esencan, G. V. SARAÇOĞLU and V. Özmen (2017). "A risk assessment comparison of breast cancer and factors affected to risk perception of women in Turkey: A cross-sectional study." Iranian journal of public health **46**(3): 308.
- Zaman, S., R. Wang and V. Gandhi (2014). "Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies." Leuk Lymphoma **55**(9): 1980-1992.

## 7. EKLER

### EK A. Hücre Kültürü

Tablo 3. Hücre kültürü donanımları.

ADI	FİRMA ADI	ÜRÜN KODU
DMEM	Gibco	41966-029
Tripsin-EDTA	Pan Biotech	P10-0231
Penisilin/Streptomisin	Pan Biotech	P06-07100
Fetal Bovine Serum	Pan Biotech	P290310
MCF-7	ATCC	HTB-22
Kriyoviyal tüp	NUNC	V7634
75cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	TPP	90076
25cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	TPP	90026
100 mm hücre büyütme kapları	TPP	93100
60 mm hücre büyütme kapları	TPP	93060
6 kuyucuklu petri	TPP	92006
Muhtelif mikropipet uçları (10 -100 -1000 µl)	CAPP	-
Enjektör (5-10-25 cc)	Set Inject	B25107
Filtreler (0,22 µm)	TPP	99722
Hemastometre	Sigma Aldrich	Z359629
Laminar flow	Thermo	12469
Etüv	Thermo	Heracell 1150



## EK B. Cihaz Listesi

Tablo 4. Kullanılan cihazların listesi

ADI	FİRMA ADI	ÜRÜN KODU
Santrifüj	Eppendorf	5417R
Spin mini spin plus	LabNet	SN0708
Santrifüj	Eppendorf	5810R
Buzdolabı (No frost)	Arçelik	4263TMB
-80 °C	New Brunswick Scientific	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova
Derin Dondurucu	Arçelik	2041D
Otoklav	Nüve	OTO32
Vorteks	Stuart/ProLab	SA8
İnkübatör	Nüve	EN 025
Laminar Flow	HeraSafe	Model: 12469,2000
Floresan Mikroskopu	Olympus	Model: 1X71
Manyetik Karıştırıcı	Stuart/ProLab	SB162
pH Metre	SEM/Mettler Toledo	N315
Distile Su Cihazı	TKA-Pacific	D56412
Inverted Mikroskop	SOIF	Model: XDS-1B
Hassas Tartı	Sartorius	LE6202S
Çalkalayıcı	BioRad	
Kar- buz makinesi	ScotsMan	AF80
Spektrofotometre	Biosciences	Ultraspec 2100 pro
Mikropipet (0,5-10 µl)	Thermo	EH52836
Mikropipet (10-100 µl)	Thermo	EH46925
Mikropipet (100-1000 µl)	Thermo	T27274
PVDF Membran	Thermo	88518
Transfer Cihazı	BioRad	10016505C
Mikroplaka okuyucu	BioRad	680

Elektroforez sistemi	Bio-Rad	165-8000
Güç Kaynağı	BioRad	PowerPac/B
Sıvı azot tankı	Air Liquid	Arpege 40
Kantitatif eş zamanlı PCR	Bio-Rad	PTC-1148C



## EK C. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 5. Deneyleerde kullanılan kimyasalların listesi

ADI	FİRMA ADI	ÜRÜN KODU
2-merkaptolanol	Merck	S4805940517
1 kb Marker	Fermantas	SM1163
10X PBS	Pan Biotech	P04-53500
100 bp Marker	Fermantas	
4X yükleme Tamponu	Fermentas	R0631
Agaroz	Applichem	A2114,1000
Asetik Asit	Merck	K37230062
Amonyum persülfat	Sigma	A3678
Akrilamid/Bis Akrilamid 30%	Sigma Aldrich	A3699
Coomassie Blue	Bio-Rad	500-0006
PI	Invitrogen	D1306
DiOC6	Fluka	2129966
Etidyum Bromür	Fluka	46067
Fenol Kloroform	Applichem	A2279
Etanol	Sigma-Aldrich	A3452
DMSO	Sigma-Aldrich	D5879
Etanol	Sigma-Aldrich	A3452

Fetal Bovine Serum (FBS)	Pan Biotech	P290310
Glisin	AppliChem	A1067
Hidrojen peroksit	Merck	K39218400838
İzopropanol	Rieel-de Haen	24137
Laemli Tamponu	Sigma	S3401-1V
Luminol	Sigma Aldrich	A8511
Metanol	Sigma-Aldrich	24229
MTT Solüsyonu	Sigma	M2003-1G
Page Ruller Prestained Protein Ladder	Fermentas	SM0671
Koumaric Asit	Sigma Aldrich	C9008
Propidium Iodide	Applichem	A2261
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	Applichem	A3452
Protein İzolasyonu Tamponu	Fermentas	K0301
Serotonin Hidroklorid	SIGMA	H9523
Yağsız süt tozu	Cell Signaling	9999
Sığır Serum Albumin (BSA)	Bio-Rad	500-0007
Saf Etanol	Rieel-de Haen	32221

Tris Baz	Applichem	A2264
TEMED	Applichem	A1148
Yükleme standart antikorları	Cell Signaling	5142
Tween 20	Merch	S4927784802
Tris-HCl	Applichem	A3452



## **EK D**

### **Çözeltilerin Hazırlanması**

#### 1) Hücre lizis tamponu

150 mM NaCl, % 1 NP-40, 50 mM Tris-HCl kimyasallar karıştırılarak distile su içerisinde çözünür (pH 8,0). Oluşturulan lizis tamponu -20°C'de muhafaza edilir. Kullanıma alınmadan tampon içerisine 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör eklenir. Proteaz inhibitörü hazırlama sürecinde her bir tablet için 1 ml steril PBS içerisinde çözünür ve daha sonrasında -20°C'de muhafaza edilir. 1 mM PMSF için ise metanol içerisinde çözünen kimyasal hazırlandığı gibi taze bir şekilde kullanılır. 1 ml lizis tamponu için kullanılması gereken Proteaz inhibitörü miktarı 50µl olması gerekmektedir.

#### 2) TBS-Tween Hazırlanışı

500 µl miktarındaki Tween 20, 500 ml 1X TBS içerisine karıştırılarak hazırlanır.

#### 3) 10X TBS Hazırlanışı

12,11 g Tris-Baz ve 86,6 g NaCl kimyasalları karıştırılır (pH 8,0). Daha sonrasında distile su kullanılarak karışım ile 1000 ml'e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS solüsyonu kullanıma hazır olmak üzere 1X TBS' e çevrilir.

#### 4) Tris-HCl (pH 6,8): 100 ml

6 g Tris bazı kimyasalı 60 ml' ye kadar distile su içerisinde çözünür ve 6 N HCl asidi eklenir (pH 6,8). Hazırlanan çözelti otoklav ile steril edilir.

#### 5) Yağsız süt tozu (% 5(w/v)): 50 ml

2,5 g süt tozu tartılır ve 50 ml 'ye kadar distile su ile tamamlanır. Vortekleme işleminden sonra membran ardından bloklama için kullanılır.

#### 6) Tris-HCl (pH 8,8): 150 ml

27,23 g Tris bazı kimyasalı yarım ölçü distile su içerisinde çözünür ve 6 N HCl asidi eklenerek pH'sı ayarlanır. Oluşturulan karışım 150 ml'ye tamamlanır. Kullanılmadan önce otoklav ile steril edilir.

#### 7) Amonyum persulfat-APS

10 ml APS çözeltisi hazırlamak için 1 gr APS tartılır ve distile su içerisinde çözdürülür. Daha sonra kullanılabileceği kadar çözelti  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır. APS kullanılmadan önce çözdürülür.

#### 8) Yürütme Tamponunun Hazırlanışı

20 gr SDS, 60.4 g Tris-Baz, ve 228 g Glisin kimyasalları tartılır ve karıştırılır. Oluşturulan karışım 2 lt olarak hazırlanır ve 10X yürütme tamponu olarak konsantrasyonunu bir şekilde hazırlanmış bir şekilde etiketlenir. Jel yürütmesi esnasında kullanılmak üzere 10X tampon 1X'e çevrilir.

#### 9) Transfer Tamponunun Hazırlanışı

20 gr SDS, 60.4 g Tris-Baz, ve 228 g Glisin kimyasalları tartılarak karıştırılır. Karışım Böylece 2000 ml distile su içinde çözülerek 10X transfer tamponu hazırlanır. Jel yürütmesi esnasında kullanılmak için hazırlanan tampon 1X'e çevrilir.

#### 10) Yürütme Jelinin Hazırlanması

Elde edilen proteinlerin kDa'larına göre ayırım yapılması için uygun oranlarda TEMED, APS, Akrilamid/Bisakrilamid, SDS kimyasalları kullanılarak % 12-15'lik SDS poliakrilamid jelde hazırlanır.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

**ESRA NUR GÜLTEKİN**

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Cinsiyet** : Bayan  
**Uyruğu** : T.C.  
**T.C. Kimlik No** : 61681073844  
**Doğum Yeri** : Malatya  
**Doğum Tarihi** : 01/01/1994

### İLETİŞİM BİLGİLERİ

**Adres Bilgileri** : Altınşehir Mah. Dağ Sokak No:13 Başakşehir/ İSTANBUL  
**Cep Tel** : (537) 861 99 17  
**E-posta** : [esranurgultekin@gmail.com](mailto:esranurgultekin@gmail.com)

### EĞİTİM BİLGİLERİ

2017 – 2019	İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü – Yüksek Lisans (Tezli)
2012 – 2016	Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü – Lisans
2009 – 2012	Fatih Kız Lisesi

### STAJ DENEYİMİ

07/2014 - 08/2014	Çapa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı- Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı
08/2015 - 09/2015	Biruni Cento Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji Genetik Lab.



## LABORATUVAR DENEYİMİ

Mikroskop, Santrifüj cihazları, PCR cihazları, Western Blot, Hücre Kültürü, ChemiDoc Cihazı

## KURS / SERTİFİKA BİLGİSİ

2014 İsmek	Diksiyon Belgesi
2016 Haliç Üniversitesi	Pedagojik Formasyon
2018 English Time	Genel İngilizce Pre-intermedia
2013 Yeditepe Üniversitesi	1. Genetik ve Biyomühendislik Günleri'nin Genetik Oturumuna Katılım
2013 İstanbul Üniversitesi	5. DETAE GÜNLERİ; Deneysel Araştırmalar ve Kliniğe Yansımaları'na Katılım
2013 Haliç Üniversitesi	1. Tüp Bebek Paneli
2013 Haliç Üniversitesi	Kas Hastalıkları Sorunları ve Çözümleri Sempozyumu
19/04/2014 Haliç Üniversitesi	1. Onkoloji Sempozyumu
2015 Yeditepe Üniversitesi	3. Genetik ve Biyomühendislik Günleri
2015 Haliç Üniversitesi	1. Adli Bilimler Sempozyumu
2016 İstanbul Üniversitesi	IV. Cerrahpaşa Bilim Günleri
2016 İstanbul Üniversitesi	Kök Hücre'ye Giriş Sempozyumu
2016 Adli Biyoloji - Adli Genetik ve Gen Hukuku Derneği	Adli Genetik ve Hukuki Boyutu Sempozyumu

## YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce	Okuma, yazma, konuşma: Orta seviyede (pre-Intermediate)
-----------	---

