



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji

[Yüksek Lisans Tezi]

**OTOFAJİ - ER STRES ETKİLEŞİMİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN
PROLİFERASYONU VE METASTAZI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sona EMINOVA
ORCID: 0000-0001-8164-6716

Danışman
Prof.Dr. Hatice Gül DURSUN
ORCID: 0000-0001-5115-4681

Bu tez çalışması BAP tarafından 23YL18005 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya 2024

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, her konuda bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, beni yüreklendiren, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Hatice Gül DURSUN'a

Bilgi ve birikimleriyle desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hasibe VURAL'a ve Prof. Dr. Ercan KURAR'a

Akademik sürecim boyunca bana yol gösteren, bilgisi ve uzmanlığıyla desteğini hep hissettiğim Doç. Dr. İlknur ÇINAR AYAN'a

Bu süreçte desteğini ve katkısını esirgemeyen Doç. Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ'e,

Bu araştırmaya 23YL18005 proje numarası ile maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Yaşamım boyunca bana hep destek olan biricik annem Zamila HASHİMOVA'ya ve hayatım boyunca beni destekleyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim aileme, bu süreç boyunca yanımda olan tüm sevdiklerime

Teşekkür ederim

Sona EMİNOVA

Ağustos 2024

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. İnfiltrate lobüler karsinom (ILC)	3
2.1.2. İnfiltrate dujtal karsinom (IDC)	3
2.1.3. Duktal karsinoma in situ	3
2.1.4. Lobuler karsinoma in situ.....	4
2.2. Risk Faktörleri ve Etyolojisi	4
2.2.1. Aile öyküsü	4
2.2.2. Üreme faktörleri	5
2.2.3. Yaş.....	5
2.2.4. Yaşam tarzı.....	5
2.2.5. Genetik faktörler	6
2.3. Epidemiyolojisi	11
2.4 Evreleri.....	13
2.5. Otofaji.....	14
2.5.1. Genel bilgi.....	14
2.5.2. Otofajinin moleküler mekanizmaları	16
2.5.3. Otofaji ve kanser	19
2.6. ER Stresi.....	26
2.7. ULK-101	28
2.8. Tunikamisin.....	30
2.9. LYN-1604	31
3.GEREÇ VE YÖNTEM	32

3.1. Hücre kültürü.....	32
3.1.1. Hücre hattının dondurulması.....	32
3.1.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözündürülmesi.....	32
3.1.3. Hücre hattının pasajlanması.....	32
3.2. ULK-101 stok solüsyonun hazırlanması.....	33
3.3. Tunikamisin stok solüsyonun hazırlanması.....	33
3.4. LYN-1604 stok solüsyonun hazırlanması.....	33
3.5. GRP78 seviyesinin belirlenmesi.....	33
3.6. ULK-101'in ve tunikamisinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	34
3.7. Koloni formasyon analizi.....	35
3.8. Otofaji analizi.....	35
3.9. invazyon analizi.....	35
3.10. Deney gruplarında Otofaji, ER stres ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.....	36
3.10.1. Total RNA izolasyonu.....	37
3.10.2. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi.....	37
3.10.3. cDNA sentezi.....	38
3.10.4. qRT-PZR analizi.....	38
3.11. İstatistiksel analiz.....	39
4.BULGULAR.....	40
4.1. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi... 40	
4.2. ULK-101'in MCF7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi.....	41
4.3.ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi.....	42
4.4. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi... 43	
4.5. LYN-1604, ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkisi 44	
4.6.ULK-101 , tunikamisin ve ULK101+tunikamisin uygulamalarının meme kanseri hücrelerinde otofaji, ER stresi , apoptoz ve metastaz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi.....	45
5.TARTIŞMA.....	48
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
7.KAYNAKLAR.....	57
8. EKLER.....	63
8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı.....	63

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **SONA EMİNOVA'nın "Otofaji-ER stres Etkileşiminin Meme Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonu ve Metastazı Üzerindeki Etkilerin Araştırılması"** başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/ 04.09.2024

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Hatice GÜL DURSUN Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Gökhan CÜCE Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji A.D.
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Esra YETİŞGİN Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Moleküler biyoloji ve genetik bölümü

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 04/09/2024 tarih ve 20./11 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Otofaji-ER stres Etkileşiminin Meme Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonu ve Metastazı Üzerindeki Etkilerin Araştırılması başlıklı tez çalışmamın toplam **30** sayfalık kısmına ilişkin, 06.09.2024 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%18** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

06.09.2024

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

04.09.2024

KISALTMALAR

AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AKT	: Protein kinaz B
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
APC	: Tümör baskılayıcı gen
ASIR	: Meme kanserinin görülme oranı
ASMR	: Meme kanserinin ölüm oranı
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
ATG101	: Otofaji ile ilişkili 101
ATG12	: Otofaji ile ilişkili 12
ATG13	: Otofaji ile ilişkili protein 13
ATG14	: Otofaji ile ilişkili 14
ATG16	: Otofaji ile ilişkili 16
ATG3	: Otofaji ile ilişkili 3
ATG5	: Otofaji ile ilişkili 5
ATG7	: Otofaji ile ilişkili 7
Bcl-2	: BCL2 apoptoz düzenleyici
BRCA1/2	: Meme kanseri tip 1/2 duyarlılık proteini
BiP	: Bağlayıcı immünoglobulin Proteini
CMA	: Şaperon aracılı otofaji
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
ER	: Endoplazmik retikulum
FIP200	: 200 kDa'lık fokal adezyon kinaz ailesi
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ILC	: İnfiltrate lobüler karsinom
IDC	: İnfiltrate duktal karsinom
IRE1	: İnozitol gerektiren kinaz 1
IRE1 α	: İnositol gerektiren enzim 1 α
DCIS	: Duktal karsinoma in situ
LCIS	: Lobuler karsinoma in situ
KRAS	: Kirsten rat sarkomu viral onkogen homologu

LC3	: Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir
MAPK	: Mitojenle etkileşen protein kinaz
mTORC1	: Rapamisin kinazın mekanik hedef proteini 1
PAS	: pre-otofagosomal yapı
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PERK	: Protein kinaz benzeri ER kinaz
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PI3P	: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PIK3C3	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Tip 3
PCD	: Programlanmış hücre ölümü
qRT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
TME	: Tümör mikroçevresi
TP53	: Tümör proteini 53
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
ULK1	: UNC-51 benzeri kinaz
VPS15	: Fosfoinositid-3-Kinaz Düzenleyici Alt Birim 4
VPS34	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Tip 3
WHO	: Gıda/Diyet Tüketimi Dünya Sağlık Örgütü

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş genler	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. 2024 yılına göre 100.000 kişi başına meme kanserinin ölüm oranı	13
Şekil 2.2. Otofaji çeşitleri	16
Şekil 2.3. Kanserde otofajinin iki yönü.....	21
Şekil 2.4. Memeli hücrelerinde MTORC1'in aktivasyonun, otofaji düzeneğinin kurulmasını ve lizozomal biyogenezi doğrudan üç şekilde düzenlemesi	23
Şekil 2.5. p53 ile otofaji düzenlemesi	24
Şekil 2.6. Otofaji eksikliği olan hücrelerde oksidatif stresin bozulmuş yönetiminin sonuçları	25
Şekil 2.7. Metabolik stres ve otofaji	27
Şekil 2.8. ULK-101'in ULK1'i hedeflemesi	29
Şekil 2.9. LYN-1604'ün ULK1'i hedeflemesi	31
Şekil4.1.Tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.2.Tunikamisin ve ULK-101 kombine uygulamasının MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.3. 24 saat süresince ULK-101 uygulamasının MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.4. 48 saat süresince ULK-101 uygulamasının MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.5. 72 saat süresince ULK-101 uygulamasının MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.6. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.7. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi.....	44

Şekil 4.8. ULK-101 ve tunikamisın uygulamasının MCF7 hücrelerinde otofajik aktivite üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.9. MCF7 hücre hattında ULK-101, tunikamisın ve ULK-101+tunikamisın uygulamanın otofaji genleri üzerinde kat değişimi etkisi.....	47
Şekil 4.10. MCF7 hücre hattında ULK-101, tunikamisın ve ULK-101+tunikamisın uygulamanın otofaji , ER stres , apoptoz ve metastaz genleri üzerinde kat değişimi etkisi.....	47

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalını
Tıbbi Biyoloji
Yüksek Lisans Tezi

OTOFAJİ - ER STRES ETKİLEŞİMİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN PROLİFERASYONU VE METASTAZI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sona EMİNOVA

Konya-2024

En sık görülen kanser tiplerinden biri olan meme kanserinin görülme sıklığı her yıl dünya çapında artış göstermektedir. Meme kanserinde kemoterapi/radyoterapi gibi geleneksel tedavi protokollerine direnç gelişmesi nedeniyle tedavi seçenekleri kısıtlı kalmaktadır. İlaç direnç otofaji gibi faktörle de ilişkilendirilen bir süreçtir. Otofaji, hasarlı moleküllerin, yanlış katlanmış proteinlerin, subsellüler bileşenlerin (proteinler, nükleik asitler, lipidler) ve hasarlı organellerin parçalanması ve ortadan kaldırılması için gerekli olan fizyolojik bir hücresel süreçtir. Otofajinin kanserdeki rolü karmaşıktır. Otofaji tümör tipine veya içeriğine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. ER stresin indüklediği otofajinin hücre üzerindeki etkileri farklıdır. Artmış ER stres tarafından indüklenen otofaji aktivasyonu hücre ölümünü de teşvik edebilir.

Bu çalışmada ER stres ve otofajinin karşılıklı etkileşimlerinin meme kanseri hücrelerinin proliferatif ve metastatik davranışları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MCF7 hücre hattında ULK-101 ve tunikamisin kombinasyonunun sitotoksik etkisi WST-8/CCK8 testi ile bakılmıştır. Bunun yanı sıra otofajik aktivite LC3-II Kantitasyon ELISA kiti ile analiz edilmiştir. Sitotoksikite sonuçları dikkate alınarak, sonraki analizlerde hücreler 24 saat süresince 1 µM tunikamisin ile ön işleme tabi tutulmuş, ardından tunikamisin varlığında 3 saat süresince 47 µM ULK-101 ile muamele edilmiştir. Daha sonra deney gruplarında RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapılmış ve apoptoz, ER stresi ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri qRT-PZR ile analiz edilmiştir. Bunun yanı sıra otofajik aktivite LC3-II Kantitasyon ELISA kiti ile analiz edilmiştir. ULK-101'in ve tunikamisin meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkisi, koloni formasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Daha sonra GRP78/BiP ELISA kiti kullanılarak tunikamisin ER stresi üzerine etkisi araştırılmıştır. ULK-101, meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, tunikamisin ve ULK-101'in hücre canlılığının %50'sini inhibe ettiği dozlarla kombine kullanımları MCF7 hücrelerinde additif etkiye neden olmaktadır. Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, ULK-101'in meme kanseri hücrelerinde otofajiyi baskılayarak, ER stresi ile apoptozu arttırarak antikanser etkiye neden olduğu düşünülmektedir

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Endoplazmik retikulum stresi, otofaji.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
Medical Biology Master Thesis

"INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF AUTOPHAGY-ER STRESS INTERACTION ON THE PROLIFERATION AND METASTASIS OF BREASTCANCER CELLS

Sona EMİNOVA

Konya-2024

Breast cancer, one of the most common types of cancer, is increasing globally each year. The resistance of breast cancer to clinically used treatments such as chemotherapy and radiotherapy indicates that treatment options are limited. Drug resistance is a process also associated with factors such as autophagy. Autophagy is a physiological cellular process required for the degradation and removal of damaged molecules, misfolded proteins, subcellular components (proteins, nucleic acids, lipids), and damaged organelles. The role of autophagy in cancer is complex and can vary depending on the type or content of the tumor. The effects of ER stress-induced autophagy on cells can differ. Increased ER stress-induced autophagy activation may also promote cell death.

In this study, the cytotoxic effects of the combination of ULK-101 and tunicamycin in the MCF7 cell line were assessed using the WST-8/CCK8 assay. Additionally, autophagic activity was analyzed using the LC3-II Quantitation ELISA kit. Based on the cytotoxicity results, cells were pre-treated with 1 μ M tunicamycin for 24 hours, followed by treatment with 47 μ M ULK-101 for 3 hours in the presence of tunicamycin. Subsequently, RNA isolation and cDNA synthesis were performed, and the expression levels of genes associated with apoptosis, ER stress, and autophagy were analyzed using qRT-PCR. Furthermore, autophagic activity was also analyzed using the LC3-II Quantitation ELISA kit. The effect of ULK-101 and tunicamycin on the colony-forming ability of breast cancer cells was evaluated using colony formation analysis. The effect of tunicamycin on ER stress was then investigated using the GRP78/BiP ELISA kit. According to the results of this study, the combined use of tunicamycin and ULK-101 at doses that inhibit 50% of cell viability results in an additive effect in MCF7 cells. When considering all the results together, it is believed that ULK-101 exerts an anticancer effect by suppressing autophagy in breast cancer cells and increasing apoptosis through ER stress.

Keywords:Breast cancer, Endoplasmic reticulum stress, Autophagy.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, meme dokusundan kaynaklanan kanserleri ifade eder; çoğunlukla süt kanallarının iç yüzeyinden veya kanallara süt sağlayan lobüllerden kaynaklanır. Dünya çapında meme kanseri, kadınlarda görülen tüm kanser vakalarının %10,4'ünü oluşturur ve bu da onu ikinci en yaygın cilt dışı kanser türü (akciğer kanserinden sonra) yapar (Sharma ve ark., 2010). Çoğu meme kanseri iyi huylu ve cerrahi olarak tedavi edilebilir olsa da, dörtte biri latent ve sinsi bir karaktere sahiptir, yavaş büyür ancak erken metastaz yapar. Meme kanseri metastazı, meme kanserinden kaynaklanan ölümlerin çoğunluğunu oluşturur. Meme kanseri metastazının en erken evrede tespiti, meme kanseri ilerlemesinin yönetimi ve tahmini için önemlidir (Park ve ark., 2022). Meme kanserinin erken teşhisi, bu hastalığı önlemenin en iyi yaklaşımlarından biridir. Bazı gelişmiş ülkelerde, erken önleme sayesinde meme kanseri hastalarının 5 yıllık göreceli sağ kalım oranı %80'in üzerindedir (Sun ve ark., 2017). Kanser hücrelerinde otofajinin aşırı uyarılması, yüksek apoptotik eşiklere sahip dirençli kanser hücrelerini tedavi etmek için bir terapötik strateji de sağlayabilir. Kanser hücreleri, hızlı çoğalmaları ve değişen glikolitik metabolizmaları nedeniyle normal hücrelere göre daha yüksek metabolik talepler ve stresler yaşarlar ve bu nedenle hayatta kalmak için otofajiye daha fazla bağımlı olabilirler (Yun ve ark., 2018). Kanser hücrelerinde metabolizma ve otofaji sürekli bir döngü içinde iç içe geçmiştir, çünkü değişen metabolik yollar otofajiyi uyarır ve bu da metabolizmasını destekleyerek tümör hücresi büyümesini ve çoğalmasını teşvik eder (Anderson ve ark., 2019). Otofaji, katlanmamış/yanlış katlanmış proteinleri bertaraf ederek ER stresi azaltabilir. Bununla birlikte, şiddeti artmış ER stres tarafından indüklenen fazla otofaji aktivasyonu hücre ölümünü de neden olabilir. Sonuç olarak, ER stresinin neden olduğu otofajinin hücre üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir: ER stresinin şiddetine bağlı olarak hayatta kalmayı da sağlayabilir, hücreyi ölüme de götürebilir (Song ve ark., 2017).

Bu tez projesinde meme kanseri hücrelerinde ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının, otofaji ve endoplazmik retikulum stresi üzerine rolünün belirlenmesi ve ER stres ile otofajinin karşılıklı etkileşimlerinin meme kanseri hücrelerinin proliferatif ve metastatik davranışları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Tunikamisin uygulamasının endoplazmik retikulum stresi ile ilişkisi florometrik/kolorimetrik tabanlı kit kullanılarak değerlendirilmiştir. ULK-101 ve tunikamisin meme kanseri hücre proliferasyonu üzerine etkisi sitotoksikite ve koloni formasyon analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca bu mekanizmalarda görevli önemli genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile araştırılmıştır. ULK-101'in ve LYN-1604'ün

kombine uygulamasının otofaji üzerindeki etkisi, LC3-II otofajik aktivite testi kullanılarak değerlendirmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen kanser olup, kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Metastazları sıklıkla akciğer, cilt, kemik, yumuşak doku, karaciğer, sürrenal bezler ve beyine olmaktadır (Libson ve ark., 2014).

Meme, glandüler dokular ve stromal (destek) dokular olmak üzere iki ana doku türünden oluşur. Glandüler dokular süt üreten bezleri (lobüller) ve kanalları (süt kanalları) barındırırken, stromal dokular memenin yağlı ve lifli bağ dokularını içerir. Memenin farklı bölgelerinde gelişebilecek çeşitli tümör türleri vardır. Çoğu tümör memedeki iyi huylu (kansersiz olmayan) değişikliklerin sonucudur. Örneğin fibrokistik değişiklik kadınlarda kistlerin (birikmiş sıvı paketleri), fibrözün (yara benzeri bağ dokusunun), hassasiyet veya göğüs ağrısı alanlarının oluştuğu, kansersiz olmayan bir durumdur. Meme kanserlerinin birçoğu kanalları kaplayan hücrelerde (duktal kanserler), bazıları lobülleri kaplayan hücrelerde (lobüler kanserler) ve küçük bir kısmı ise diğer dokularda başlar. Meme kanseri invaziv ve noninvaziv olarak 2'ye ayrılmaktadır (Sharma ve ark., 2010).

2.1.1. İnfiltrate lobüler karsinom (ILC)

ILC aynı zamanda invaziv lobüler karsinom olarak da bilinir. ILC memenin süt bezlerinde (lobüllerde) başlar, ancak sıklıkla vücudun diğer bölgelerine metastaz yapar. Meme kanserlerinin %10 ila %15'ini ILC oluşturur.

2.1.2. İnfiltrate duktal karsinom (IDC)

IDC invaziv duktal karsinom olarak bilinmektedir. IDC memenin süt kanallarında başlar ve kanalın duvarına nüfuz ederek memenin yağ dokusunu ve muhtemelen vücudun diğer bölgelerini istila eder. IDC, meme kanseri tanılarının %80'ini oluşturan en yaygın meme kanseri türüdür. Noninvaziv kanserler yani yayılma göstermeyen kanserler (in situ) 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar duktal karsinoma in situ ve lobüller karsinoma in situ olarak isimlendirilmektedir (Sharma ve ark., 2010).

2.1.3. Duktal karsinoma in situ

Meme kanserinin invaziv olmayan bir formu olan duktal karsinoma in situ (DCIS) insidansı son yıllarda belirgin bir şekilde artmıştır ve DCIS artık mamografi ile teşhis edilen meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. İnvaziv olmayan meme kanserinin en yaygın türü olan DCIS, memenin kanallarıyla sınırlıdır. DCIS iyi huylu bir hastalık olmasına rağmen, DCIS'li kadınların invaziv hastalık geliştirme eğilimi yüksektir ve bu nedenle DCIS tedavisi sonuçta invaziv kanserin önlenmesine yönelik bir tedavidir (Leonard ve ark., 2004). DCIS görülme sıklığı 50 yaş altı kadınlarda artmaya devam etmektedir. Mamografi çekirmiş olmak, DCIS tanısıyla ilişkili en güçlü ve en yaygın risk faktörlerinden biridir. DCIS için diğer risk faktörleri artan yaş, ailede meme kanseri öyküsü, yüksek mamografik meme yoğunluğu ve menopoz sonrası hormon tedavisi dahil olmak üzere invaziv kansere benzemektedir (Kerlikowske ve ark., 2010).

2.1.4. Lobuler karsinoma in situ

Lobuler karsinoma in situ (LCIS) ilk kez 1941'de Foote ve Stewart tarafından tanımlanmış ve buna "nadir bir meme karsinomu türü" adı verilmiştir. LCIS, memenin süt bezlerindeki (lobüller) hücre sayısında keskin bir artıştır. Mamografinin yaygınlaşmasıyla birlikte son yıllarda daha sık saptanır hale gelen LCIS artık tüm meme biyopsi örneklerinin yaklaşık %1'inde ve tüm meme malignitelerinin %5'inde görülmektedir. Her ne kadar LCIS daha sonraki invaziv meme karsinomu riskini 12 kat artırsa da, doğal geçmişi bunun gerçek bir premalign lezyondan ziyade bir risk belirteci olduğunu göstermektedir (Wen ve ark., 2017).

2.2. Risk Faktörleri ve Etyolojisi

Yaş, aile öyküsü, üreme faktörleri ve yaşam tarzı gösterilen meme kanserinin piramit şemasında 4 önemli risk faktörüdür.

2.2.1. Aile öyküsü

Tüm meme kanseri vakalarının neredeyse dörtte biri aile öyküsüyle ilişkilidir. Annesi veya kız kardeşi meme kanseri olan kadınlar bu hastalığa yatkındır. İngiltere'de 113.000'den fazla kadın üzerinde yapılan bir kohort çalışması, birinci derece akrabalarından birinde meme kanseri olan kadınların bu hastalığa yakalanma riskinin, herhangi bir akrabası olmayan kadınlara göre 1,75 kat daha yüksek olduğunu gösterdi. Ayrıca iki veya daha fazla birinci derece akrabasında meme kanseri olan kadınlarda risk 2,5 kat veya daha fazla olmaktadır.

Meme kanserine kalıtsal yatkınlık kısmen *BRCA1* ve *BRCA2* gibi meme kanseriyle ilişkili genlerin mutasyonlarına bağlanmaktadır (Sun ve ark., 2017).

2.2.2. Üreme faktörleri

Erken menarş, geç menopoz, ilk gebelik yaşının geç olması ve doğum sayısının düşük olması ve ya hiç doğum yapmama gibi üreme faktörleri meme kanseri riskini artırabilmektedir. Üreme faktörleri ile meme kanseri arasındaki ilişki, ergenlik çağında başlayan ve aylık döngüler boyunca devam eden yumurtalık hormonlarının etkisi ile ilişkilidir ve bu hormonlar aynı zamanda gebelik sayısından da etkilenecek menopozda azalmaya neden olur. Hamilelik, özellikle de ilk hamilelik, meme kanserine yakalanma riskinde önemli rol oynuyor. İlk tam süreli gebelik yaşının ileri olması, meme kanserine yakalanma riskinin artmasıyla ilişkilidir. Araştırmaların sonuçları, ilk çocuğunu 33. gebelik haftasından önce doğuran kadınlarda meme kanseri riskinin neredeyse iki katına çıktığını göstermiştir. Doğum yapmış kadınlarda, doğum sayısı arttıkça meme kanseri riski azalmaktadır. Menopoz yaşının 50'nin üzerinde olması meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. Vaka kontrol çalışmasının bulguları, menarş sırasında daha genç yaşta olmanın meme kanseri riskini iki kat artırdığını göstermiştir. Daha yüksek kürtaj oranının da artmış meme kanseri riskiyle ilişkili olduğu gözlenmiştir (Momenimovahed ve ark., 2019).

2.2.3. Yaş

Meme kanserinde cinsiyetten sonra bilinen en önemli risk faktörü yaşır. Meme kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte önemli ölçüde artmakta, menopoz çağında zirveye ulaşmakta, daha sonra giderek azalmakta veya sabit kalmaktadır. Akciğer kanseriyle karşılaştırıldığında meme kanseri görülme sıklığı genç yaşlarda daha yüksektir (McPherson ve ark., 2000).

2.2.4. Yaşam tarzı

Aşırı alkol tüketiminin meme kanseri riskini artırabilecek bir risk faktörü olduğu gözlenmiştir. Alkol alımı genellikle beraberinde aşırı yağ kazanımına neden olur ve bu da riski daha da artırır. Diğer hipotezler arasında alkol metabolitlerinin doğrudan ve dolaylı kanserojen etkileri ve alkolle ilişkili bozulmuş besin alımı yer alır. Alkol tüketiminin özellikle östrojen pozitif meme kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir (Łukasiewicz ve ark., 2021). Günde >35-44 gram orta düzeyde alkol tüketiminin meme kanseri riskini %46 (95% CI = 1,33-1,61) oranında artırdığı bulunmuştur. Meme dokusunda, daha yüksek dozda alkol

dehidrogenaz enzimi tarafından asetaldehite metabolize edilir. Biriken asetaldehit proteinlere ve DNA'ya bağlanabilir ve BRCA1'i aşağı düzenleyerek antioksidan savunma sistemi, DNA sentezi ve onarım sistemine müdahale eder (Kashyap ve ark., 2022). İlk hamilelikten önce tüketildiğinde, meme dokusunda morfolojik değişikliklerin tetiklenmesine önemli ölçüde katkıda bulunur ve onu daha ileri kanserojen olaylara yatkın hale getirir . Sigara içmek, tütünde bulunan kanserojenlerin meme dokusuna taşınarak onkogenler ve baskılayıcı genler de (özellikle p53) mutasyon meydana gelme olasılığını artırarak karsinogenezde rol oynar. Bu nedenle, yalnızca aktif değil aynı zamanda pasif sigara içimi de prokarsinojenik olayların indüklenmesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Gıda/Diyet Tüketimi Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre yüksek oranda işlenmiş et, yalnızca gastrointestinal malignitelerin değil aynı zamanda meme kanseri riskini de artırabilecek Grup 1 kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. Aşırı doymuş yağ alımı açısından da benzer gözlemler yapılmıştır Ultra İşlenmiş gıdalar sodyum, yağ ve şeker açısından zengindir ve bu da daha sonra meme kanseri riskinin başka bir faktörü olarak kabul edilen obeziteye zemin hazırlar. Diyetle ultra işlenmiş gıdaların %10 oranında artmasının, %11 daha fazla meme kanseri riski ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Kimyasallara maruz kalma, tümör mikroçevresini etkileyerek meme karsinogenezini teşvik edebilir ve ardından pro-karsinojenik olayların indüksiyonu ile birlikte epigenetik değişiklikleri indükleyebilir .Çevresel kimyasallar insan dokularında birikme eğiliminde olduğundan ve kanserojen ve/veya östrojenik özelliklere sahip olduğundan, çevresel kimyasalların meme kanseri de dahil olmak üzere endokrinle ilişkili kanserler için riski oluşturmaktadır (Rodgers KM ve ark., 2017). Yapay ışığa maruz kalma yakın zamanda artan meme kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bu ilişki muhtemelen bozulmuş melatonin ritmi ve bunu takip eden epigenetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Łukasiewicz ve ark., 2021).

2.2.5. Genetik faktörler

BRCA1, *BRCA2* ve *TP53* başta olmak üzere hem kalıtsal olan hem de olmayan meme kanserleri ile ilişkili çok sayıda gen tanımlanmıştır (Polyak ve ark ., 2007).

BRCA1 ve BRCA2 geni

Bir dizi gendeki mutasyonların artık meme ve/veya yumurtalık kanserine yatkınlığa neden olduğu bilinmektedir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonun neden olduğu kalıtsal meme kanseri, tüm bu kanser vakalarının %5 ila %10'undan sorumludur. *BRCA1* kromozom 11q21'da ve *BRCA2* ise kromozom 13q12-13'de lokalizedir. *BRCA1*, 80 kb

genomik DNA'yı kapsayan 22 kodlayıcı ekzondan oluşur ve 1863 amino asit proteinini kodlayan 7.8 kb transkript içerir. BRCA2, 70 kb genomik DNA'yı kapsayan 26 kodlayıcı ekzondan oluşur, 11.4 kb transkriptte sahiptir ve 3418 amino asit proteinini kodlar. Her iki protein de çift sarmallı DNA kırılma onarım yolunda işlev görür ancak ek işlevlere sahip olabilir(Mehrgou ve ark., 2016). Germ hattındaki BRCA1 veya BRCA2'nin kusurlu bir kopyası, kansere yatkınlığa neden olmak için yeterlidir, ancak ikinci alel, yatkın bireylerden izole edilen tümör hücrelerinde sürekli olarak kaybolur. Dolayısıyla BRCA genleri, tümör baskılayıcı genlere yönelik klasik paradigmaya en azından kısmen uygundur. Öte yandan sporadik kanser vakalarında somatik BRCA mutasyonları nadiren ortaya çıkar(Venkitaraman ve ark., 2002). BRCA1 veya BRCA2 mutasyonuna sahip kadınlarda yaşam boyu meme kanseri riski yaklaşık %75'tir. BRCA1 için riskin farklı mutasyonlara göre değiştiğine dair çok az kanıt vardır; ancak BRCA2 için durum böyle değil. Ortak Ashkenazi kurucu mutasyonu BRCA2 6714delT'ye sahip kadınlarda meme kanseri riski, diğer BRCA2 mutasyonlarına sahip kadınların yaklaşık yarısı kadardır (Zhong ve ark., 2015). BRCA1 mutasyon taşıyıcıları için meme kanseri riski 30-50 yaşları arasında önemli ölçüde artarken, BRCA2 mutasyonu olan kadınlar için riskler 40-60 yaşları arasında en yüksek seviyededir. BRCA1 ile ilişkili meme kanserleri, agresif bir fenotipin patolojik özelliklerini sergiler ve genellikle hormon reseptörü negatiftir; BRCA2 ile ilişkili meme kanserleri ise sporadik kanserlere benzeme eğilimindedir ve ağırlıklı olarak hormon reseptörü pozitifdir. Daha geç menarş yaşı ve emzirme, BRCA1 ile ilişkili meme kanseri için koruyucudur, ancak BRCA2 mutasyonu olan kadınlarda riski etkilediği görülmemektedir (Kotsopoulos ve ark., 2018).

BRCA1, hem kontrol noktası aktivasyonunda hem de DNA onarımında görev alan bir pleiotropik DNA hasarı tepki proteinidir. BRCA2, homolog rekombinasyonun bir aracısıdır. BRCA1'in tümör oluşumundaki rolü, DNA onarımıyla ilişkili genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi, X kromozomunda heterokromatin oluşumu, çift sarmal kırık onarımı ve ubiquitinasyon olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerle ilişkilidir. BRCA1, hücre döngüsü ve DNA hasarı tepki yollarıyla ilişkili diğer proteinler arasında BRCA2, TP53 ve RAD51'e bağlanır (DNA çift sarmal kırıklarının onarımı). BRCA1 gibi, BRCA2'nin de rolü kromozom stabilitesinin korunması ve DNA'nın rekombinasyon aracılı çift sarmal kırılma onarımı ile ilişkilidir. BRCA1 ve BRCA2 ayrıca belirli hedef genlerin transkripsiyonel düzenleyicileri olarak da işlev görür. BRCA proteinleri ile c-myc (BRCA1) ve TP53 (BRCA1 ve BRCA2) gibi belirli transkripsiyon faktörleri arasında etkileşimler gösterilmiştir (Godet ve ark., 2017).

p53

İlk olarak 1979'da tanımlanan ve başlangıçta bir onkogen olduğu düşünülen p53, tanımlanan ilk tümör baskılayıcı genidir. p53, anormal hücrelerin çoğalmasını ortadan kaldırmak ve engellemek, böylece neoplastik gelişimi önlemek için işlev görür. Meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde bulunan somatik p53 gen mutasyonları kötü prognozla ilişkilidir. Mutant p53 meme kanseri taşıyan hastaların çeşitli kemoterapi ajanlarına direnci vardır ancak en azından neoadjuvan ortamda taksanlara karşı daha duyarlı olabilirler. İnsan p53 geni, çoklu ekleme, alternatif translasyon başlatma ve dahili promotör kullanımı sonucunda p53 proteininin farklı bölgelerini içeren en az dokuz farklı p53 protein izoformunu ifade eder (p53, p53 β , p53 γ , p53 α , p53 β , p53 γ , p53 α , p53 β ve p53 γ). p53 izoformları normal insan dokularında farklı şekilde ifade edilir. Normal meme dokusu p53, p53 β ve p53 γ ifade eder. Birkaç insan kanser türünde p53 izoformlarının anormal ifadesi tanımlanmıştır. p53 β gibi p53 izoformlarının p53 ile etkileşime girebileceği ve p53 tümör baskılayıcı aktivitesini düzenleyebileceği gözlemlenmiştir. Birlikte ele alındığında, bu bulgular p53 izoformlarının insan kanserlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Bourdon ve ark., 2011),

p53 hücre döngüsü durması, yaşlanma, apoptoz, DNA onarımı ve anjiyogenezde rol oynayan bir dizi geni indükleyerek veya baskılayarak, çeşitli streslere karşı hücre tepkisini düzenlemede önemli bir rol oynar. Bu önemli işleve göre, p53 aktivitesi düzinelere modülatör proteinin (p53 etkileşimi) müdahalesi yoluyla, birkaç oto-düzenleyici döngü de dahil olmak üzere çok karmaşık bir şekilde kontrol edilir. p53 mutasyonları meme tümörlerinin önemli bir azınlığında gözlenir. *p53*, *Tp53* geni tarafından kodlanır. 17p13'te bulunan gen 20 kb'yi kapsayan 11 ekson içerir. Meme kanserinde gözlenen p53 mutasyonlarının çoğu somatik kökenlidir. Aslında p53'ün iki akrabası p63 ve p73'ün aksine, p53 mutasyonları insan kanserinde en sık görülen genetik olaylardır. p53 mutasyonlarının çoğunluğunun, p53'ün orta kısmındaki DNA bağlanma alanında lokalize olduğu görülmektedir. Özellikle bu alan, apoptotik genlerle ilişkili olarak p53'ün transaktivasyon aktivitesinde önemli kofaktörler olan ASPP1 ve ASPP2 için bağlanma bölgesidir Sıcak nokta p53 mutasyonlarının çoğu, proteinin ASPP1 ile etkileşime girememesine neden olur. Mutant p53'ü eksprese eden hücrelerde, bu protein genellikle hücre proliferasyonunu artık kontrol edemez, bu da verimsiz DNA onarımı ve genetik dengesizlik ile sonuçlanır... Meme kanserlerinde gözlemlenen yaklaşık 1400 p53 mutasyonu Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nda (IARC) tutulan *Tp53* veri tabanında listelenmektedir Diğer tümör baskılayıcı

genlerle karşılaştırıldığında, p53 mutantları en sık (~%90) yanlış anlamlıdır ('nokta yanlış anlamlı mutasyonlar'). Mutant p53 proteinleri genellikle artan bir stabiliteye sahiptir ve neoplastik hücrelerin çekirdeğinde birikir (Lacroix ve ark., 2006).

TP53 mutasyonları meme kanserinde en sık görülen genetik değişikliklerdir ve meme kansinonlarının %25'inde görülür. Bunların dağılımı, luminal tümörlerin %26'sında (luminal A'nın %17'si, luminal B'nin %41'i), HER2 ile güçlendirilmiş tümörlerin %50'sinde, moleküler apokrin meme kansinonlarının %69'unda bulunan moleküler tümör alt tipleriyle oldukça bağlantılıdır (Bertheau ve ark., 2013).

Bir dizi çalışma germ hattı BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının taşıyıcılarında ortaya çıkan kanserlerde p53 mutasyonlarının artmış bir oranını belirlemiştir Dahası, bu tür kansinonlarda belirgin bir p53 mutasyonu spektrumu meydana gelir . Çarpıcı bir şekilde, tipik medüller meme kansinonlarında, p53 mutasyonu vakaların %100'ünde meydana gelir . Bu özellikle ilgi çekicidir, çünkü medüller meme kanserlerinin BRCA1 ile ilişkili vakalarla klinikopatolojik benzerlikler paylaştığı artık iyi bilinmektedir. Gerçekten de, BRCA1 ekspresyonunun metilasyona bağlı susturulması medüller meme kanserlerinde yaygın olarak meydana gelir (Gasco ve ark., 2002).

ATM

Ataksi-telenjiektazi mutasyonlu (*ATM*) geni, kromozom 11q23'te bulunan ve 3056 amino asitten oluşan 350-KDa'lık bir proteini kodlayan bir tümörsupressördür. Genel olarak *ATM* geni hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, gen düzenlemesi, oksidatif stres ve telomer bakımında rol oynar ve meme kanseri gibi birçok malignitede düzensizdir. *ATM* mutasyona uğramış meme kanserlerinin çoğunlukla endokrin pozitif, dediferansiye ve daha agresif olduğu ve bu nedenle kötü bir prognoza sahip olduğu bilinmektedir. *p53*'ü de aktive edebilir ve ayrıca *ATM*, *BRCA* proteinleri gibi DSB onarımında yer alan mekanizmaları aktive edebilir . Meme kanserinde, *ATM*'nin fizyolojik işlevi kötü huylu hücreler tarafından aşağı düzenlenir. Aslında, *ATM* *DBC1*'i fosforile eder ve p53 ve kaspaz-2'nin aktivasyonu ile apoptozu teşvik eder (Stucci ve ark., 2021). Çalışmalar sonucu *ATM*'de kesen germ hattı mutasyonları tanımlanmış ve *ATM* heterozigotlarında meme kansinomu geliştirme riskinin yaklaşık dokuz kat arttığı gözlemlenmiştir (Prokopcova ve ark., 2007).

PTEN

PTEN, hücre çoğalması ve sağ kalımında rol oynayan 1-fosfatidilinositol 3-kinaz yolunun (PI3K) modülasyonunda önemli bir rol oynar. Özellikle meme kanserinde, hücre hattı analizleri PTEN'in PI3K'nın aşağı düzenlenmesiyle meme kanseri büyümesini baskıladığını ve bunun sonucunda G1 tutuklanması ve hücre ölümü meydana geldiğini göstermiştir (Depowski ve ark., 2001). PTEN delesyonlarının veya azalmış ekspresyonunun meme kanseri vakalarının %4 ila %63'ünde mevcut olduğu gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2017).

CHEK2

Meme kanseri için artmış riskle ilişkili bir sıra genler de tanımlanmıştır; Bu genlerden biri, bir serin/treonin kinaz olan CHK2'yi kodlayan bir tümör baskılayıcı gen olan *CHEK2*'dir. *CHEK2* aşağı akış fosfataz CDC25, serin/treonin protein kinaz NEK6, transkripsiyon faktörü FOXM1, p53 proteini ve BRCA1 veya BRCA2 ile reaksiyona girer. *CHEK2*, DNA hasarına yanıt olarak hücrelerin mitoz girmesini önleyerek veya hücre döngüsünü boşluk 1 fazında (G1) durdurarak hücre bölünmesini düzenler. Bu nedenle *CHEK2* hücre döngüsü düzenlemesi için önemlidir ve anormal ifadesi kansere yol açabilir (Apostolou ve ark., 2017). *CHEK2* geninin en çok çalışılan iki meme kanseri yatkınlık oluşturan varyantı *1100delC* ve *I157T*'dir (Nevanlinna ve ark., 2006).

MSH1 ve MLH2

Yüksek penetranslı *MSH1*, *MLH1*, genlerindeki mutasyonlar da meme kanseri ve diğer malignitelerin yüksek yaşam boyu riskleriyle ilişkilidir (Peleg Hasson ve ark., 2020).

STK11 ve LKB1

Kromozom 19p'de yakın zamanda klonlanan *STK11/LKB1*'in yeni bir tümör baskılayıcı gen olduğu gözlemlenmiştir. Kromozom 19p'deki *LKB1/STK11* genindeki mutasyonlar, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinin yüksek riskleriyle ilişkili olduğu Peutz-Jeghers sendromunun (PJS) çoğu vakasından sorumludur (Chen ve ark., 2000).

CDH1

E-kadherin geni (*CDH1*), kromozom 16q22.1'de, insan meme kanserinde heterozigotluk kaybı (LOH) ile sıklıkla ilişkilendirilen bir bölgeyi haritalar. Bu bölgedeki

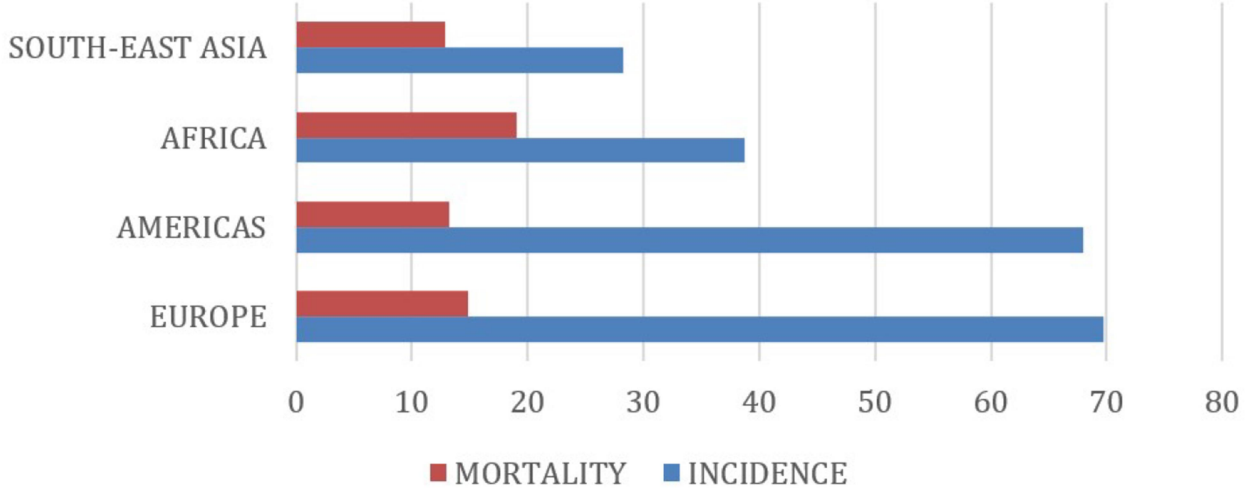
LOH'un, bu tümör baskılayıcı genin işlevini kaybetmesine yol açtığı ve hastalısız sağ kalımın azalması, kötü prognoz ve metastaz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Caldeira ve ark., 2006).

2.3. Epidemiyolojisi

Kanser dünya çapında ölümlerin ana nedenlerinden biridir. 2008 yılında kötü huylu hastalıklar nedeniyle 8 milyon ölüm kaydedilmiş olup, bu rakamın 2030 yılında 11 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Meme kanseri çok faktörlü bir hastalıktır ve çeşitli faktörler bunun oluşumuna katkıda bulunur. Hastalık dünyanın her yerinde görülmesine rağmen görülme sıklığı, ölüm oranı ve hayatta kalma oranları dünyanın farklı bölgeleri arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir; bu durum nüfus yapısı, yaşam tarzı, genetik faktörler ve çevre gibi birçok faktöre bağlı olabilir (Momenimovahed ve ark., 2019).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir ve 2020 yılında dünya çapında 685.000 ölüme neden olmuştur. Küresel olarak meme kanseri, kadınlarda dört kanser vakasından birinden ve altı kanser ölümünden birinden sorumludur. Elli yaş ve üzeri kadınlarda daha sık teşhis edilmesine rağmen, genç kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı artmaktadır. Şu anda, yılda 44.800 ölümlerle dünya çapında 0-39 yaş arası kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. GLOBOCAN 2018 verilerinin analizine göre 40 yaşına gelindiğinde meme kanserine yakalanma riski ortalama %0,44'tür. Kıtalar arasında, 40 yaşından önce meme kanserine yakalanmanın ortalama kümülatif riski yaklaşık iki kat değişiklik göstermektedir; en yüksek Okyanusya (%0,69), ardından Avrupa (%0,63), Amerika (%0,53) ve Afrika (%0,49) gelmektedir ve en düşük oran Asya'dadır (%0,38). 185 ülke arasındaki ulusal karşılaştırmalar, en yüksek kümülatif insidans oranının Güney Kore'de (%0,95) olduğunu, onu Birleşik Krallık, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'nın izlediğini (sırasıyla %0,77, %0,61 ve %0,61) ve en düşük Gine'de olduğunu gösterdi (Zhu ve ark., 2023). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) 185 ülkeden verileri kullanan GLOBOCAN 2020 raporuna göre, kadınlarda yeni tanısı konmuş meme kanseri vakaları 2020'de yeni kanser vakalarının %11,7'sini oluşturarak akciğer kanserini geride bırakmış olup görülme sıklığı açısından 159 ülkede, ölüm oranı açısından ise 110 ülkede birinci sırada yer almıştır (Mubarik ve ark., 2023). Erkeklerde meme kanseri nadir görülür ve tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturur. Kayıtlı hastalar arasında ortalama tanı yaşı erkeklerde kadınlara göre biraz daha yaşlıdır (67'ye karşı 61 yaş). Erkek meme kanseri insidans oranları siyah erkeklerde beyaz erkeklere göre biraz daha yüksektir (Korde ve ark.,

2010). Meme kanserinin görölme oranı (ASIR) Avrupa popülasyonunda 100.000 kadın başına 69,7 iken; bunu Amerika (68), Afrika (38,7) ve Güneydoğu Asya popülasyonları (28,3) takip etmektedir. Öte yandan, Meme kanserinin ölüm oranı (ASMR) Afrika popülasyonunda 100.000'de 19,1 ile daha yüksektir; bunu Avrupa (14,8), Amerika (13,2) ve Güneydoğu Asya popülasyonları (12,9) takip etmektedir (da Costa Nunes ve ark., 2024).



Şekil 2.1. 2024 yılına göre 100.000 kişi başına meme kanserinin ölüm oranı (da Costa Nunes ve ark., 2024).

Nüfusu 80 milyonu aşan Türkiye'de yeni kanser vakalarının sayısı erkeklerde 128.802, kadınlarda 98.508 olmak üzere toplam 227.310 kişi olarak tahmin edilmektedir. Aynı yıl 78.633'ü erkek, 47.155'i kadın olmak üzere 125.788 kişinin kanserden öldüğü tahmin ediliyor. NMSC dışındaki tüm kanserlerin 100.000 kişi başına yaşa standardize edilmiş insidans oranının (ASIR, dünya standart popülasyonu) 225,6 (erkekler için 283,0 ve kadınlar için 184,0) olduğu tahmin edilmektedir. En sık görülen beş kanser, ASIR değeri 46,6 olan meme kanseri olurken, bunu prostat kanseri (ASIR = 42,5), akciğer kanseri (ASIR = 40,0), kolorektal kanser (ASIR = 20,6) ve tiroid kanseri (ASIR = 14,3) takip etti. Tüm kanserlerin 100.000 kişi başına yaşa standardize edilmiş ölüm oranının (ASMR, dünya standart nüfusu) 119,9 (erkekler için 171,0, kadınlar için 81,1) olduğu tahmin edilmektedir. Her iki cinsiyette ve tüm yaş gruplarında en sık görülen ilk 5 kanser sırasıyla akciğer, meme, kolorektal, prostat ve tiroid kanserleridir. Öte yandan, her iki cinsiyette ve tüm yaş gruplarında en sık görülen kanser kaynaklı ölümlerin ilk 5'i sırasıyla akciğer, kolorektal, mide, pankreas ve meme kanseridir (Siegel RL ve ark., 2020).

2.4 Evreleri

Meme kanserinin aşamaları, tümörün boyutuna, türüne ve tümör hücrelerinin meme dokularına ne kadar nüfuz ettiğine bağlıdır. Evre 0, invaziv olmayan tümörü tanımlarken, aşama 4, invazif tümör türünü tanımlar (Sharma ve ark., 2010; Akram ve ark., 2017). Evrelerin tanımları şu şekildedir:

Evre 0:

Tümör hücreleri gelişimlerinin erken evresindedirler, ilk ortaya çıkmaya başladıkları meme bölgesinde kanser olmayan hücrelerle birarada bulunurlar. Henüz invaziv özellik kazanmamışlardır. Bu evre tümörlerine örnek olarak Duktal Hücreli Karsinom (DCIS) verilebilir (Akram ve ark., 2017; Cuthrell ve ark., 2023).

Evre 1:

Mikroskobik invazyonun gerçekleşme olasılığının olduğu evredir ve 1A ve 1B olmak üzere ikiye ayrılır. 1A, tümörün 2 cm'den küçük olduğu ve lenf nodlarına metastaz yapmadığı evreyi tanımlar. 1B ise lenf nodunda 0.2 mm'den daha büyük bir tümör dokusunun varlığını ifade eder (Akram ve ark., 2017; Cuthrell ve ark., 2023).

Evre 2:

2A ve 2B olmak üzere ikiye ayrılır. 2A evresinde tümör hücreleri sentinel ya da aksiller lenf nodlarında bulunurken, göğüs boşluğunda bulunmaz. B2 evresinde tümör dokusu 5 cm'den büyük olabilir, ancak aksiller lenf noduna metastaz yapmamıştır (Akram ve ark., 2017; Cuthrell ve ark., 2023).

Evre 3:

3A, 3B ve 3C şeklinde üçe ayrılır. 3A evresinde göğüs boşluğunda tümör bulunmazken, 4-9 arasında aksiller ya da sentinel lenf noduna metastaz söz konusudur. 3B evresinde tümör herhangi bir boyutta olabilir, ancak meme derisinde şişlik, kızarıklık veya ülser gelişmiştir. 9 kadar aksiller ya da sentinel lenf nodu da etkilenmiştir. 3C evresinde ise tümör aralarında köprücük kemiğinin üstündeki ve altındaki lenf nodlarının da bulunduğu 10 ya da daha fazla lenf noduna yayılmıştır (Akram ve ark., 2017; Cuthrell ve ark., 2023).

Evre 4:

Bu evre artık tümörün karaciğer, akciğer ve beyin gibi diğer organlara yayıldığı aşamadır (Akram ve ark 2017; Moo, ve ark 2018; Cuthrell ve ark., 2023).

2.5. Otofaji

2.5.1. Genel bilgi

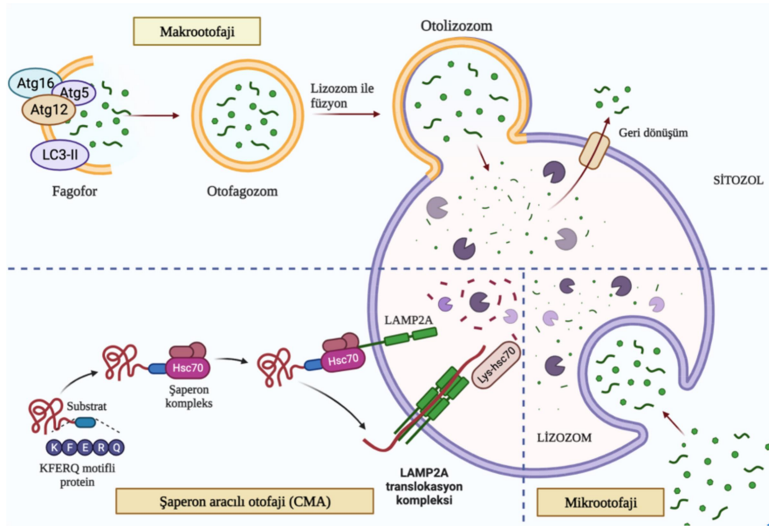
Otofaji homeostazi, farklılaşma, gelişme ve hayatta kalma fonksiyonlarının sürdürülmesi için nükleik asit, protein, lipit ve organeller dahil olmak üzere hücre içi moleküllerin ve sitoplazmik bileşenlerin lizozom aracılı bozunma yoluyla ortadan kaldırıldığı temel bir hücresel süreçtir (Aman ve ark., 2021). Otofaji terimi ilk defa 1963'te Christian de Duve tarafından rat karaciğerinde gerçekleştirilen bir çalışmada mitokondri ve diğer hücre içi yapıların lizozomlarda bozunma sürecini tanımlamak için kullanılmıştır (Ohsumi ve ark., 2013). 2016 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, otofaji alanındaki çalışmaları nedeniyle Moleküler Biyolog Yoshinori Ohsumi'ye verilmiştir. Bu da bir kez daha birçok bilim insanının dikkatinin mayadan memelilere kadar tüm ökaryotlarda meydana gelen ortak bir hücresel mekanizma olan otofajiye yönelmesine neden olmuştur (Długońska ve ark., 2017). Otofaji yanlış katlanmış veya kümelenmiş proteinlerin uzaklaştırılmasında, mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizom gibi hasarlı organellerin temizlenmesinde ve hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında rol oynar. Bu nedenle, deregülasyonu apoptotik olmayan hücre ölümüyle bağlantılı olmasına rağmen, otofaji genellikle bir hayatta kalma mekanizması olarak düşünülür (Glick ve ark., 2010). Otofaji genel (seçici olmayan) veya seçici olabilir. Genel otofaji, sitoplazmanın bazı bölümlerini otofagozomlara paketler ve bunları bozunmak üzere lizozomlara iletir. Buna karşılık, seçici otofaji hasarlı hücre organelleri, protein kümeleri ve hücre içi patojenler gibi belirli hedefleri tanıyarak çalışır. Son zamanlarda otofaji kusurlarının genomik hasar, metabolik stres ve tümörögenез ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yun ve Lee, 2018). Otofajinin birincil rolü, açlık gibi stres koşullarında hücreleri korumaktır. Açlık dönemlerinde otofaji, yeni proteinleri sentezlemek için kullanılabilir veya hücrenin hayatta kalması için ATP üretmek üzere mitokondri tarafından oksitlenecek amino asitleri ve yağ asitlerini üretmek için sitoplazmik malzemeleri bozunmaya uğratar. Bununla birlikte, otofaji aşırı derecede indüklendiğinde, tip I programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) ve nekrozdan farklı olan ve tip II programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan otofajik hücre ölümüyle sonuçlanabilir. Stres yönetimine ek olarak, otofaji normal gelişim, yaşlanma, yaşam süresinin uzaması, bağışıklık ve mikrobiyal istilaya karşı savunma ile ilgilidir. Otofaji ayrıca kanser, miyopatiler, nörodejenerasyon, kalp ve karaciğer

hastalıkları ve gastrointestinal bozukluklar gibi birçok insan hastalığının patofizyolojisi ile bağlantılı olduğu da bilinmektedir (Chen ve Klionsky, 2011).

Üç ayrı otofaji türü vardır: mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji ve makrootofaji. Otofaji terimi genellikle makrootofajiyi ifade eder (Janku ve ark., 2011). Hem mikro hem de makrootofaji seçici olabilir veya seçici olmayabilir ve bu süreçler en iyi mayalarda tanımlanmıştır. Makrootofajinin en ayırt edici özelliği, çift zara bağlı fagofor ve otofagozomun oluşumudur. Otofagozomlar daha sonra lizozomlarla birleşerek içerdikleri daha büyük parçacıkların ve organellerin degradasyonunu sağlarlar (Feng ve ark., 2014). Otofagozom oluşumu, otofajiye bağlı proteinlerin (ATG) sıralı işlevleri tarafından yönetilir. Günümüze kadar mayalarda 40'dan fazla otofaji ilişkili protein (Atg) tanımlanmıştır ve bunlar mayalardan memelilere kadar korunmuştur (Li ve ark., 2020). Mayalarda, otofagozomların biyogenezi için spesifik bir platform, pre-otofagosomal yapı (PAS) tanımlanmıştır. PAS, Atg proteinlerinin çoğunun mevcut olduğu maya vakuolüne bitişik tek noktalı bir yapıdır (Wesselborg ve ark., 2015). PAS, ATG proteinlerinin toplanması için bir iskele yapısı oluşturarak, otofajinin indüklenmesi sırasında kritik bir rol oynar. Otofaji indüklendiğinde, neredeyse tüm otofaji ile ilgili proteinler (Atg), hiyerarşik olarak PAS üzerinde toplanır (Li ve ark., 2020). Makrootofaji, fagofor oluşturmak üzere zarın çekirdeklenmesi ile başlayan, daha sonra oluşan fagoforun büyüyerek, kıvrılarak ve kapanarak çift zarlı otofagozom adı verilen yapılara dönüşmesi ile devam eden, ve otofagozomların lizozomlarla kaynaşması ile tamamlanan kademeli bir vakuol biyogenez sürecidir. Sürecin sonunda, yutulmuş hücre içi bileşenler otolizozomlar içinde elimine edilir. Makrootofaji, yetişkinlerde yaşam süresinin uzatılmasında ve hücrelerin açlık gibi stres tepkilerinden korunmasında patojenlerin, yanlış katlanmış proteinlerin ve hasarlı organellerin uzaklaştırılmasında koruyucu bir mekanizma olarak iş görür (Ke ve ark., 2019).

Mikrootofaji, sitozolik bileşenlerin, lizozomal membranın invajinasyonu ile doğrudan lizozom içerisine aktarılmasını sağlayan seçici bir mekanizmadır (Schuck ve ark., 2020).

Şaperon aracılı otofaji (CMA), "Lys-Phe-Glu-Arg-Gln" (KFERQ) motiflerini içeren proteinlerin HSC70 şaperonları ile tanınması ve lizozom zarına taşınması ile yıkımlarının gerçekleştiği otofoji türüdür (Kaushik ve ark., 2018).



Şekil 2.2. Otofaji çeşitleri (Kaushik ve ark., 2018).

2.5.2. Otofajinin moleküler mekanizmaları

Açlığa bağlı otofaji çok karmaşık bir süreç olup şematik olarak dört aşamaya ayrılır (Xiao ve ark., 2021).

1. Başlama (indüksiyon veya sinyali oluşumu) evresi
2. Nükleasyon aşaması
3. Olgunlaşma aşaması
4. Lizozom ile birleşme ve degradasyon aşaması

1. Başlama Aşaması

Otofagozomların oluşması ER membranından köken alan omegazom oluşumu ile başlar. Bu işlem memeli hücrelerinde amino asit yoksunluğu gibi güçlü bir uyarım sonrasında oluşur. Amino asit kıtlığı koşulları, ULK kompleksinin (ULK1 veya ULK2 kinazlarından ve FIP200, ATG13 ve ATG101 adaptörlerinden oluşur) ve bunun aktivasyonuna yol açan Rapamisin Kompleksi 1'in (mTORC1) memeli (mekanistik) hedefinin inaktivasyonunu tetikler (Ktistakis ve ark., 2021).

Bir serin/treonin kinaz olan mTOR, hücrel metabolizmanın ana düzenleyicisidir. mTOR, çoklu eşlik eden proteinlerle bağlanarak mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTORC2

olmak üzere iki farklı sinyal kompleksi oluşturur. mTORC1 kompleksi besin-ilişkili sinyallere daha duyarlıdır ve otofaji çoğu zaman mTORC1-bağımlı olarak mTORC1'in inhibisyonu ile indüklenir (Kim ve ark., 2015).

AMPK, hücre içi ATP üretimi azaldığında etkinleşen AMP ile aktive olan protein kinazdır. Aktif AMPK, TSC2 tümör baskılayıcıyı doğrudan fosforile ederek ve RAPTOR'u inhibe ederek mTORC1 aktivitesini bloke eder. Bundan başka glikoz açlığı altında, AMPK, Ser 317 ve Ser 777'nin fosforilasyonu yoluyla Ulk1'i doğrudan aktive ederek ULK1'in mTORC1 kompleksinden ayrılmasına neden olur (Kim ve ark., 2011). Besin açısından zengin koşullar altında mTORC1, Raptor ve Ulk1/2 arasındaki etkileşim yoluyla Ulk-Atg13-FIP200 kompleksine katılır, ve mTOR doğrudan Atg13 ve Ulk1/2'yi fosforile ederek ULK1/2'nin kinaz aktivitesini baskılar. Ancak açlık zamanı veya kimyasal muamele sonucu mTOR'un inhibe olmasıyla ULK1/2, mTORC1 kompleksinden ayrılır ve otofosforillenir (Alers ve ark., 2011). Aktive edilmiş ULK1/2, FIP200 ve ATG13'ü fosforilleyerek kompleks halde (ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101) pre-otofagozomal membrana transloke olur. Ardından fosfatidilinositol 3(PI(3)P)'ı oluşturmak için fosfatidilinositolün lipit baş grubunu fosforile eden III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KC3) kompleksi aktive olur. PI3KC3 kompleksinin aktivasyonu fagofor oluşumu için gereklidir (Guo ve ark., 2010).

2. Nükleasyon Aşaması

Fagofor ya da izolasyon membranı olarak adlandırılan 'C' şekilli yapıların oluşumunu ifade eden otofajinin 'nükleasyon' adımı öncelikli rolü Sınıf III PI3K kompleksi oynar. Memeli hücrelerinde sınıf III PI3K kompleksinin iki farklı tipi vardır: kompleks I (PI3KC3-CI) ve kompleks II (PI3KC3-CII). Her iki kompleks de üç çekirdek alt birimi paylaşır: VPS34, p150 ve Beclin1 (mayada Atg6/Vps30) ve her kompleks benzersiz bir bileşen içerir. Bunun dışında bu kompleks AMBRA1, Atg9 ve Atg14 gibi proteinler içerir. Vps34 PI3K aktivitesinin ve protein ortaklarının otofagozomların hem başlatılmasını hem de olgunlaşmasını düzenlemede merkezi bir rolü olduğunu göstermektedir (Li ve ark., 2020). Otofajiye özgü, VPS34 substrat olarak kullandığı fosfatidil inositol lipidleri (PI) fosfatidil inositol trifosfata (PI3P) dönüştürür. PI3P üretimi, Beclin-1 ile kompleks halinde PI3Kinaz, hVps34'ün sıkı kontrolü altındadır. PI3P'ler fagofor uzaması ve diğer Atg proteinlerinin fagofora çağırılması için esansiyeldir (Vergne ve Deretic, 2010).

Anti-apoptotik protein Bcl-2, evrimsel olarak korunan otofaji proteini Beclin 1 ile etkileşime girer ve bu da otofojiyi inhibe eder (Pattingre ve ark., 2005). Ancak açlık sinyali sonrasında Bcl-2'nin Jnk-aracılı fosforilasyonu sonucu Beclin1Bcl-2'den ayrılır ve Vps34 ile etkileşime girerek membran nükleasyonunu destekler. Beclin1, Vps34 kompleksi özgülüğünün ana düzenleyicisi olarak düşünülebilir ve Vps34, Atg14L ve UVRAG'e bağlanmaya ek olarak, Beclin1 ayrıca Ambra1 (Beclin1 tarafından düzenlenen otofajide aktive edici molekül) ile etkileşime girer (Robert ve ark., 2012). Ambra1, beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive eden, otofajiyi düzenleyen ve embriyogenezde çok önemli bir rolü olan bir WD40 alanı içeren bir proteindir. Diğer bir üye olan p50 ise (mayalardakiVps15'e benzer) Vps34'ün düzenleyicisidir ve PI3K ile etkileşimi lipid kinaz spesifik aktivitesini artırır (Rohatgi ve ark., 2016).

Erken aşamada otofagozom oluşumunu teşvik etmek için ya da daha sonraki aşamada otofagozom olgunlaşmasını teşvik etmek için otofaji düzenlemesinin farklı adımlarına katılabilen çok sayıda memeli hVps34-Beclin 1 kompleksi mevcuttur (Yang ve ark., 2009).

3. Olgunlaşma Aşaması

Üçüncü aşama, izolasyon membranının uzamasıdır. Bu aşamaya ise “uzama” adı verilir ve izolasyon membranının otofagozom oluşumu tamamlanana kadar genişleyerek degrade edilecek içerik etrafında uçlardan birleşip kapanması sürecidir. Bu sürecin yürütülmesini 2 ubikutin benzeri konjugasyon sistemi olan Atg5-Atg12 konjugasyon sistemi ve LC3-PE sistemi üstlenir. Uzama için LC3 gereklidir (Kruppa ve ark., 2016). Atg12 başlangıçta Atg7'ye konjuge edilir, E1 aktive edici enzim olarak görev yapar ve daha sonra E2 benzeri konjuge enzim Atg10'a aktarılır. Bu konjugatın ATG16'ya bağlanması ile ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi oluşur (Walczak ve ark., 2013). Atg5-Atg12 konjugatı, ikinci konjugasyon sistemi için bir E3 enzimi görevi görür ve büyüyen fagforun dış zarında oligomerizasyonu tetikler ve ayrıca LC3-I'in dönüşümünü sağlar (Delgado ve ark., 2009).

İkinci sistem, LC3 proteinine bir lipid molekülü olan fosfotidiletanolaminin (PE) konjugasyonunu içerir (Li ve ark., 2022). LC3'ün C-terminal peptidi, memeli Atg4 homologları tarafından bölünür ve LC3-I olarak adlandırılan serbest sitozolik bir protein oluşur. Memeli Atg7 ve Atg3 homologlarının eylemleriyle LC3-I ayrıca , PE-konjuge form olan LC3-II olarak adlandırılan başka bir forma değiştirilir. Bu çift katlı otofagozom

membranının her iki katmanında da bulunur. Bu bileşenler PAS üzerinde membranın uzamasını sağlamaktadır (Satoo ve ark., 2009).

4. Lizozom ile Birleşme ve Degradasyon Aşaması

Otofajinin en son aşaması olgunlaşmış otofagozomların, endolizozom membranı ile birleşmesidir. Bu aşama otofagozom membranından Atg proteinlerinin ayrılmasını gerektirir. Bu işlem de Atg4 başta olmak üzere 16 otofaji ile ilişkili (ATG) protein grubu, otofagozom biyogenezi için çekirdek makine olarak tanımlanmıştır (Lőrincz ve ark., 2020). Otofagozomun dış zarının lizozom zarı ile kaynaşması sonucu otolizozom oluşur. Daha sonra SNARE aracılı füzyon gerçekleşir. Zarda lokalize SNARE proteinleri, iki zar bölgesini birbirine sıkıca bağlayabilen ve iki zar vezikülünü birleştirmek için ip kuvveti sağlayan bir α -sarmal demet halinde kendilerini sıkıştırır. SNARE motifinde korunmuş bir glutamat (Q) veya arginin (R) kalıntısının varlığı göz önüne alındığında, SNARE proteinleri üç Q-SNARE proteini ve bir R-SNARE proteini olarak sınıflandırılabilir. Erken otofagozom oluşumunda yer alan SNARE proteinleri, uygun sınıfların tüm üyelerini içerir ve teorik olarak füzyonu yönlendirmek için yeterli olmalıdır (Wang ve ark., 2016). Bunun dışında integral proteinleri (ör:LAMP-2) ve RAB proteinleri (ör: RAB5 ve RAB7) gibi birçok protein kompleksi otofagozom-lizozom füzyonu sırasında rol oynar. SNARE proteinlerinden olan STX17, SNAP29 bu süreçte yer alır. Memelilerde otofagozomal Q-SNARE, STX17'dir (JenaBp ve ark., 2017).

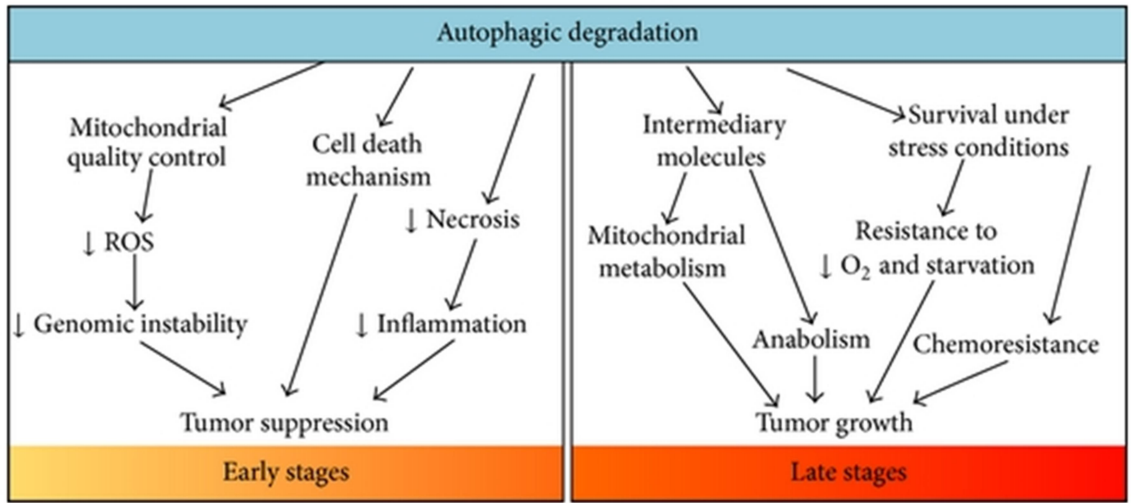
Otofagozom oluşumundan sonra temel birleştirici faktör HOPS kompleksidir. HOPS, vakuolar protein sıralaması Vps11, Vps16, Vps18, Vps33, Vps39 ve Vps41'den oluşan korunmuş bir protein kompleksidir. HOPS, STX17 ile etkileşim yoluyla otofagozom-lizozom füzyonunu sağlayan trans-SNARE kompleksinin oluşumunu kolaylaştırır (Jiang ve ark., 2014).

En son aşamada ise-otofagozomun lizozomla birleşmesinden sonra, vezikül içeriğinin yıkımı lizozomda bulunan asit-hidrolaz enzimler tarafından gerçekleştirilir. Bunu sonucunda oluşan yeni yapı taşları sitoplazmaya geri taşınır (Reggiori ve ark., 2017).

2.5.3. Otofaji ve kanser

Otofaji-kanser ilişkisi ilk kez 1999'da Beth Levine ve arkadaşları tarafından BECN1'in tümör baskılayıcı rolünün gösterilmesiyle ortaya konmuştur (Ariosa ve ark., 2021). Sonraki

süreçte de otofajinin aslında karsinogenez sürecinde kanser tipine, evresine, mikroçevresine ve genetik özelliklerine bağlı olarak ikili bir rol oynadığı anlaşılmıştır (Verzella ve ark., 2020; Ariosa ve ark.,2021; Li ve ark., 2020): Otofaji protein ve organel kalite kontrol fonksiyonu sayesinde, genom stabilitesini sürdürebilir, kronik doku harabiyetini, hücre hasarını ve inflamasyonu önleyebilir ve onkogenik p62 protein agregatlarının birikimini inhibe edebilir. Böylece tümörögenезin başlamasını, proliferasyonu, invazyon ve metastazı engelleyebilir. Dolayısıyla özellikle karsinogenezin erken basamağında tümör supressör bir mekanizma olarak iş görür (Li ve ark., 2020). Öte yandan, tümörögenезin ileri aşamasında ise, hücrel koruyucu, hayatta kalma ve savunma mekanizması olarak işlev görebilir. DNA hasarını azaltabilir ve kanser hücrelerinin hayatta kalışını ve strese (örn. besin yoksunluğu, hipoksi, DNA hasarı,metabolik stres ve kemoterapi) karşı direncini artırabilir ve ardından tümör metabolizmasının ve büyümesininin sürdürülmesine, tümörün ilerlemesine ve gelişmesine aracılık eder. Böylece tümörögenезi teşvik eder ve terapötik ajanlara karşı dirence neden olur (Li ve ark., 2020) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kanserde otofajinin iki yönü (Li ve ark., 2020)

Otofajinin tümör supressör rolü

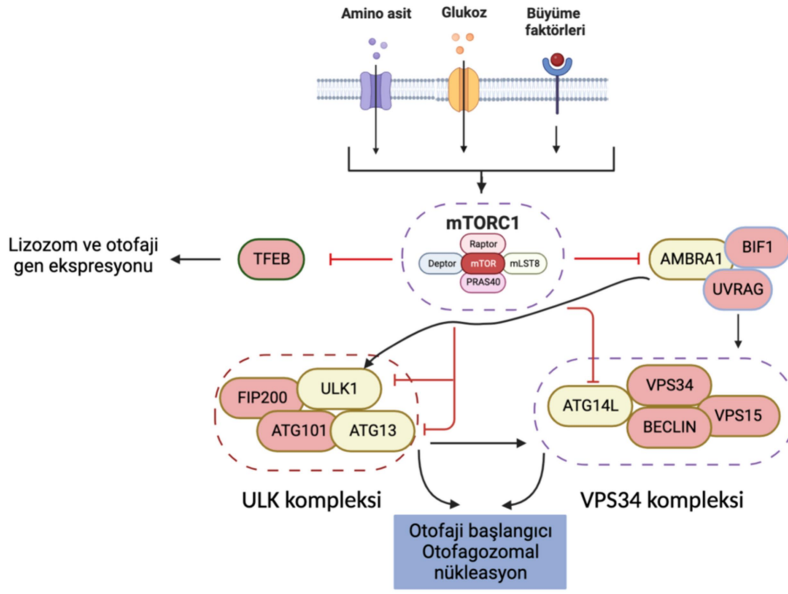
Anormal ve hasarlı yapıları, proteinleri veya zararlı maddeleri normal hücrelerden uzaklaştırmaya yarayan bir mekanizma olan Otofajinin defektif olması yani bu maddelerin/yapıların/proteinlerin temizlenememesi mutasyonların ve diğer kanser belirteçlerinin birikmesine yol açabilir. Bu görüşten yola çıkılarak gerçekleştirilen çalışmalarda da otofajinin tümör supressör bir role sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Nitekim insan prostat, meme ve yumurtalık kanserlerinde BECN1'in monoallelik delesyonunun yüksek insidansının tespit edilmesi, otofajinin tümör supressör rolünü desteklemiştir (Aita ve ark., 1999). Kanser hücrelerinde otofajik degradasyon miktarının normal muadillerinden daha az olduğunun saptanması tümör oluşumu ile azalmış otofaji seviyeleri arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu düşündürmüştür (Bhutia ve ark., 2013). Kanser hücre hatları ve fare modellerinde, BECN1'in kaybının, otofajinin azalmasına ve hücre proliferasyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Yun ve Lee, 2018). Over kanseri, hepatoselülerkarsinom, osteosarkom ve glioblastoma multiforme de Beclin 1 seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2009; Huang ve ark., 2010; Qiu ve ark., 2014; Cai ve ark., 2014). Beclin-1 ile etkileşime giren UVRAG ve Bif1/sh3glb1 gibi proteinleri kodlayan genler için de benzer durum söz konusudur. Her iki genin monoallelik mutasyonları/delesyonlarına ya da düşük ekspresyonlarına çeşitli kanserlerde rastlanmıştır (Liang ve ark., 2007; Davoli ve ark., 2013; Lee ve ark., 2006). Bu sonuçlar BECN1, UVRAG ve Bif1'in tümör supressör gen davranışlarını ortaya koyarak otofajinin tümör engelleyici yönünü desteklemektedir. Bu proteinlerin dışında ATG2B, ATG5, ATG7, ATG9B, ATG12, ATG16L gibi diğer kor ATG proteinlerinin de onkogenез sürecinde tümör supressörler olarak işlev görebilecekleri öne sürülmektedir (Ariosa ve ark., 2021; Deng ve ark., 2019).

Aslında otofajinin düzenlenmesine katılan proteinlerin çoğu ya tümör baskılayıcı proteinler ya da onkogen ürünleridir ve dolayısıyla otofajinin düzenlenmesinde yer alan mekanizmalar, kanserin kontrolünde yer alan sinyal yollarıyla büyük ölçüde örtüşmektedir. Bu nedenle, mTOR'u negatif olarak düzenleyen PTEN, AMPK, LKB1 ve TSC1/2 gibi tümör baskılayıcı genler otofajiyi uyarırken; tersine, sınıf I PI3K, Ras, RHEB ve AKT gibi mTOR'u aktive eden onkogenler de otofajiyi inhibe eder. Bu genlerdeki mutasyonlar ve buna bağlı olarak kusurlu otofaji ise malign transformasyona katkıda bulunur (Bhutia ve ark., 2013; Ávalos ve ark., 2014).

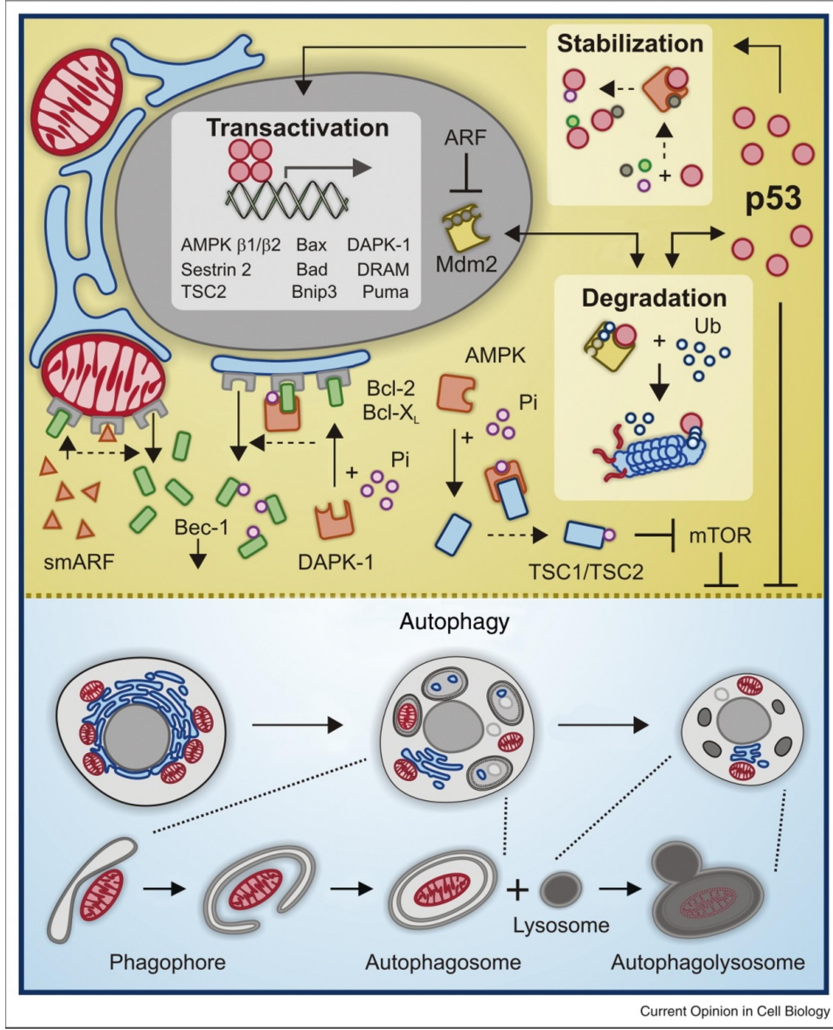
Otofajinin ana düzenleyicisi mTOR'dur. mTOR, PI3K ile ilişkili kinaz (PI3KK) süper ailesine ait, evrimsel olarak korunmuş bir serin/treonin protein kinazdır. Bu kinaz, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olarak adlandırılan, yapısal ve işlevsel olarak farklı iki kompleksten oluşur. Memeli hücrelerinde mTORC1'in besinler ve büyüme faktörleri tarafından aktivasyonu, otofaji düzenineğin kurulmasını ve lizozomal biyogenezi doğrudan üç şekilde düzenleyebilir: (1) ULK1/2 kompleksini doğrudan fosforile ederek, (2) otofagozom çekirdeklenmesi ve olgunlaşmasında önemli olan ATG14'ü

fosforilleyerek ve inhibe ederek, (3) otofajik ve lizozomal gen ekspresyonunun ana transkripsiyonel düzenleyicisi olan TFEB'nin fosforilasyon ile sitoplazmada kalmasını sağlayarak ve böylece lizozom biyogenezini baskılayarak. MTORC1 yolağının deregülasyonu karsinogenez sürecine doğrudan katkıda bulunabilir (Ariosa ve ark.,2021) (Şekil 3).



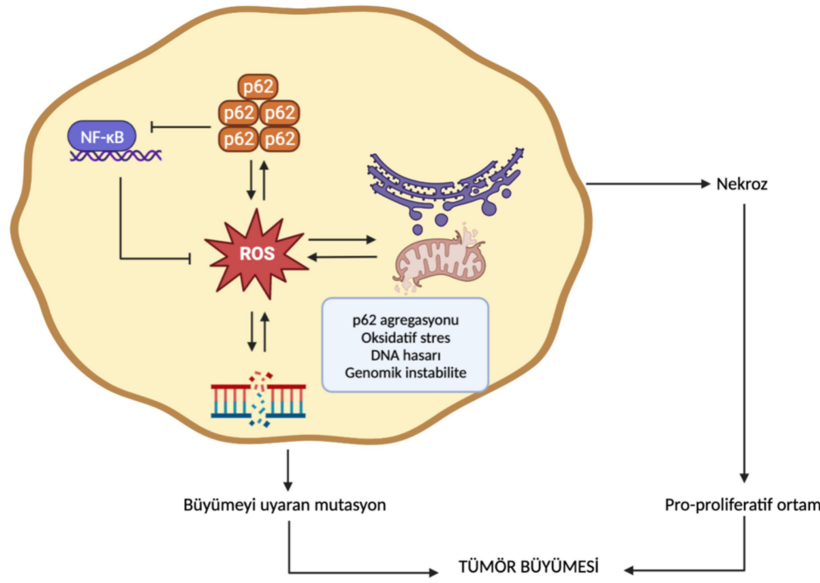
Şekil 2.4. Memeli hücrelerinde MTORC1'in aktivasyonunun, otofaji düzeneğinin kurulmasını ve lizozomal biyogenezini doğrudan üç şekilde düzenlemesi (Ariosa ve ark.,2021)

Otofaji regülasyonunda etkili olan proteinlerden biri de p53'tür. Etkisi subsellüler lokalizasyonuna, mutasyon durumuna ve stres seviyesine bağlı olarak değişmektedir. Fizyolojik şartlarda p53 seviyesi Mdm2 aracılı ubiquinizasyon ve proteazomal degradasyon ile kontrol edilir. Stres şartlarında ise p53 posttranslasyonel modifikasyona uğratılır. Bu modifikasyonlar p53'ün yıkımını önleyerek stabilizasyon kazandırır. Miktarı artan p53 nukleusa geçer ve tetramerik şekilde hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirir. Bu genlerin arasında mTORC'u doğrudan/dolaylı inhibe eden proteinleri kodlayan genler (SESN1 ve SESN2, Ddt4/REDD1) ve otofaji-ilişkili genler (ULK1, ATG7 gibi) bulunur. Sitoplazmik p53 ise henüz tam olarak anlaşılmayan bir mekanizma ile AMPK'ya bağlanarak inhibisyonuna yol açar. Bu inhibisyon mTOR'un aktivasyonu ve dolayısıyla otofajinin baskılanması ile sonuçlanır (Maiuri ve ark., 2010; Shim ve ark., 2021) (Şekil 4).



Şekil 2.5. p53 ile otofaji düzenlemesi (Maiuri ve ark., 2010; Shim ve ark., 2021)

Tümörögenез sırasında katlanmamış protein olarak birikmiş hücrel atıklar, hasarlı organeller ve kargo reseptörü p62 otofaji aracılığıyla temizlenir. Otofaji defektif olduğunda ise hücrel toksik maddeler degrade edilemez, p62 birikir ve bu ROS üretimine ve oksidatif strese neden olur. Ayrıca p62 birikimi, pro-survival sinyalleme ve dolayısıyla tümöröjenik olayları desteklemek için Nf-κB sinyalini değiştirir. ROS'un sürekli artması, buna karşılık ROS üreticilerinin ve biriken p62'nin yeterice temizlenememesinin yarattığı kısır döngü DNA hasarına, genetik kararsızlığa ve DNA'nın mutasyona uğrama eğiliminin artmasına yol açar. Aşırı artmış p62 protein ve ROS seviyeleri ile birlikte DNA hasarının bir sonucu olarak, hücreler ya nekrozla ölür ve pro-tümöröjenik bir inflamatuvar yanıt üretir ya da büyümeyi teşvik eden mutasyonlar kazanır (Rosenfeldt ve Ryan, 2011; Bhutia ve ark., 2013). Ayrıca tümör hücrelerinde otofaji inhibisyonu nekrotik hücre ölümünü, lokal inflamasyonu ve tümör büyümesini teşvik eder. Böylece otofaji tümör nekrozunu ve lokal inflamasyonu sınırlayarak tümör baskılanmasına katkıda bulunabilir (Ávalos ve ark., 2014) (Şekil 5).



Şekil 2.6. Otofaji eksikliği olan hücrelerde oksidatif stresin bozulmuş yönetiminin sonuçları (Ávalos ve ark., 2014)

Otofajinin tümör teşvik edici rolü

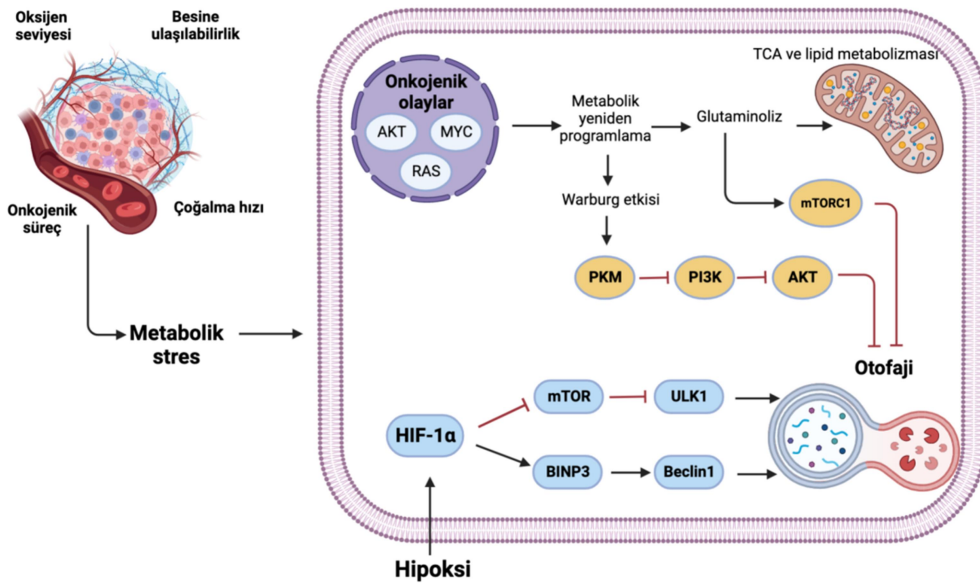
Otofaji başlangıçta tümörogenezi baskılayıcı bir rol sergilemesine rağmen, karsinogenezin ileri evrelerinde de tümör büyümesini destekleyici bir fonksiyon gösterir. Otofajinin bu birbirine zıt rolleri, muhtemelen başlangıç evresinde tümörogenezi teşvik eden ve tümör lehine çalışan faktörlerin (ROS, inflamasyon, DNA hasarı) ileri aşamalarda tümörün aleyhine etki göstermesinden ve otofajinin pro-survival doğasından beklenen şekilde davranmasından (hipoksi ve besin yokluğu gibi stres şartlarında katlanmamış proteinleri ortadan kaldırması, endojensubstratları parçalayarak ATP üretimi için substrat sağlaması gibi) kaynaklanmaktadır (Santana-Codina ve ark., 2017).

Kanser hücreleri sürekli artan proliferasyonun beraberinde getirdiği ihtiyaçları giderebilmek için metabolizmalarında adaptif değişiklikler yapmak zorundadır. Onkogenler, kanser büyümesini ve çoğalmasını destekleyen ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli olan sinyal yollarını etkiler. Otofaji de kanserin ilerlemesi sırasında hipoksi, besin açlığı ve endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi çoklu streslere yanıt olarak aktive olur.

Malign hücrelerin kontrolsüz çoğalması, doku mimarisinin değişmesine neden olur. Bu yapısal doku değişikliği, bir tümör içindeki besinlerin, büyüme faktörlerinin ve oksijenin işlevsiz dağılımını teşvik eder. Tümör dokusunun içinde hipoksik alanlar meydana gelir. Bu hipoksik koşullar, homeostazı sürdürmek için hücrel mekanizmaları tetikler. Hipoksi ile

indüklenabilir faktör 1 (HIF-1), hipoksik koşullar sırasında birincil bir transkripsiyon düzenleyicidir. HIF-1, α ve β olmak üzere iki alt birimden oluşan bir komplekstir. α alt birimi, normoksik koşullar altında (oksijen açısından zengin) bozulur. Bununla birlikte, hipoksi sırasında stabilite kazanan HIF-1 α DNA üzerinde hipoksiye duyarlı element dizilerine bağlanarak oksidatif fosforilyondan (OXPHOS) glikolize metabolik bir geçişi kolaylaştırır. Tümör hücrelerinde HIF-1, oksijen konsantrasyonundan bağımsız olarak glukoz metabolizması, hücre sağkalımı, tümör anjiyogenezi, invazyon ve metastaz için kritik olan 80'den fazla genin ekspresyonunu yukarı regüle eder. Hedefindeki genler arasında otofajiyi indükleyecek AMPK gibi otofaji-ilişkili ya da mTOR inhibisyonuna yol açacak genler bulunur (Chavez-Dominguez ve ark., 2020).

Kanser hücreleri O₂ varlığına rağmen, oksijen varlığından bağımsız şekilde temel besin olarak glukozu kullanıp pürivik asidi Krebs döngüsüne sokmaz ve bundan aerobik şartlar altında glikoliz yaparak laktat üretirler (Warburg etkisi/Aerobik glikoliz). Glikoliz, hücrelerin ATP'yi glukoz parçalanmasından elde etmesinin en hızlı yoludur ve oksijenden bağımsız olarak gerçekleşir. Tümör büyümesi organize değildir ve tümör mikro ortamı yetersiz oksijenlenir; bu nedenle glikoliz, kanser hücrelerinin hipoksik koşullarda bile çoğalmasına izin verir. Ek olarak, bu metabolik yol, yağ asitleri, nükleotidler ve serin sentezi gibi diğer metabolik yollar için gerekli yapı taşlarını sağlar. Warburg etkisi, RAS, AKT ve MYC gibi onkogen aktivasyonunu ve p53 gibi tümör baskılayıcıların inhibisyonunu gerektiren hücre transformasyonu ile ilişkili bir metabolik adaptasyondur (Chavez-Dominguez ve ark., 2020) (Şekil2,7).



Şekil 2.7. Metabolik stres ve otofaji (Chavez-Dominguez ve ark., 2020)

Bazı tümör hücreleri genellikle glikolizin spesifik bir düzenleyici enzimi olan yüksek seviyelerde piruvatkinaz2 (PKM2) ifade eder (Pürivatkinaz, glikolizin son basamağında fosfoenolpürivattan ADP'ye fosfat grubu transferini katalizleyen enzim). Kansere hücrelerinde PKM2 devre dışı bırakıldığında PI3K/AKT/mTOR yolu ve otofajinin inhibe olduğu görülmüştür (Chavez-Dominguez ve ark., 2020) (Şekil 2,7).

Artmış proliferasyon şartlarında esansiyel bir amino asit olan Glutamin, Glutaminoliz adı verilen bir enzimatik işlem ile α -glutarata dönüştürülür. Reaksiyonu Glutaminaz (GLS) ve Glutamat Dehidrogenaz katalizler. Kansere hücrelerinde MYC gibi onkogenlerin regülasyonu ile ilişkili bir şekilde Glutamin tüketimi artar. Glutaminoliz ve otofaji arasında da karmaşık bir ilişki söz konusudur. Glutaminoliz bir taraftan mTORC'u aktive eder ve dolayısıyla otofajiyi inhibe edebilir. Diğer taraftan da Glutaminolizin bir yan ürünü olan Amonyum düşük konsantrasyonlarda otofajiyi aktive ederken, yüksek konsantrasyonlarda baskılar (Chavez-Dominguez ve ark., 2020) (Resim 6).

Metastatik süreçte de otofaji etkin rol oynar. Metastazın erken evresinde metastazi baskılayıcı yönde işlev gösterebilir. Bunu tümör nekrozunu ve inflamasyonu engelleyerek gerçekleştirir. Ancak ileri aşamalarda dolaşımdaki malign hücrelerin yayılmasını, hedef organlarda kolonizasyonlarını, dormansiye girmelerini, yeni yerleşim yerlerine adaptasyonlarını teşvik eder. Metastaz sırasında yukarı düzenlenen otofajinin meme kanseri, melanom, hepatosellüler karsinom ve glioblastoma gibi kanserlerde agresifliği ve invazifliği artırdığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2020).

2.6. ER Stresi

Stres, herhangi bir sistemin normal durumundaki bozulmalara verdiği tepkidir. Bir hücre veya organizma için bunlar, beslenme gibi yaşamı iyileştiren değişiklikler veya açlık gibi yaşamı tehdit eden değişiklikler olabilir (Kim ve ark., 2022) Endoplazmik retikulum (ER) stresinin kalp hastalığı, kanser ve Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir. Uzun süreli veya aşırı ER stresi, hücre ölümüyle sonuçlanan sinyal yollarının başlatılmasıyla sonuçlanır (Logue ve ark., 2013). ER'nin işlevindeki bozulma veya bütünlüğünün kaybı, örneğin katlanmamış proteinlerin birikmesi ve ER içindeki kalsiyum homeostazisindeki değişikliklerden kaynaklanabilecek ER stresine yol açar. ER stresi, çevresel veya genetik bir

nedene sahip olan orijinal stresin etkilerini ortadan kaldıran, katlanmamış protein tepkisini (UPR) içeren sinyal yollarını aktive eder. Genel olarak UPR, ER şaperonları gibi spesifik proteinlerin ifadelerini değiştirir, yanlış katlanmış (mutant veya katlanmamış) proteinin bozulmasını artırır ve ER içindeki yükü azaltmak için protein sentezini inhibe eder. Bununla birlikte, ER'nin işlevi ciddi şekilde bozulursa, hücre ölümüne ve/veya hayatta kalmanın engellenmesine yol açan genler ve yollar da etkinleştirilir (Lindholm ark., 2016).

ER stresi oluştuğunda, uyarlanabilir yanıtları başlatmak için üç ER transmembran sensörü etkinleştirilir . Bu sensörler arasında protein kinaz benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) ve transkripsiyon faktörünü aktive eden transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) bulunur (Keylani ve ark., 2023).

Fizyolojik koşullar altında, PERK ve ATF6 proteinlerinin luminal alanları, onları inaktif tutan ER'de yerleşik şaperon BiP'ye (Bağlayıcı immünoglobulin Proteini) bağlanır. Katlanmamış proteinler ER'de biriktiğinde, biriken proteinlerin katlanmasına yardımcı olmak için bu komplekslerden BiP salınır BiP ile birleşme yoluyla modüle edilen UPR modülatörleri PERK ve ATF6 ile karşılaştırıldığında, IRE1a'nın, katlanmamış proteinler doğrudan kendisine bağlandığında aktive olduğu görülmektedir. Aktivasyon üzerine PERK, IRE1 α ve ATF6, ER şaperonlarının ekspresyonunu artırarak, mRNA translasyonunu durdurarak ER'ye protein girişini inhibe ederek ve yanlış katlanmış proteinlerin ER'den retrograd taşınmasını uyararak ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikimini hafifleten sinyal iletim olaylarını indükler. ERAD (ER destekli bozunma) adı verilen bir işlemle her yerde bulunma ve yok edilmek üzere sitozole girer (Sano ve ark., 2013).

Yıpranmış proteinleri, protein agregatlarını ve hasarlı organelleri geri dönüştürmek ve ortadan kaldırmak için hücre içi lizozom aracılı bir toplu bozunma yolu olan makrotofaji, ER stresi sırasında önemli bir koruyucu mekanizma olarak da ortaya çıkmıştır. Bu 2 sistem dinamik olarak birbirine bağlıdır ve son araştırmalar ER stresinin otofajiyi uyarabildiğini veya engelleyebildiğini ortaya çıkarmıştır. Tümör hücreleri, ER stresinin neden olduğu toksisiteden kaçmak için bir hayatta kalma mekanizması olarak otofajiyi aktive eder. ERN1 aracılı MAPK8 fosforilasyonunun bu yolda önemli bir düzenleyici olduğu görülmektedir. MAPK8, "stresle düzenlenen bir protein kinaz" olarak kabul edilir; stresin neden olduğu otofaji ve apoptoz, büyük ölçüde MAPK8 aktivasyonuna bağlıdır. Spesifik olarak ERN1 aktivasyonu, MAPK8 fosforilasyonuna yol açar ve bu, otofajiyi başlatabilir ve hücrelerin strese uyum sağlamasına izin verebilir . Otofajiyile ilişkili gen *BECN1*, MAPK8'in önde gelen aşağı akış

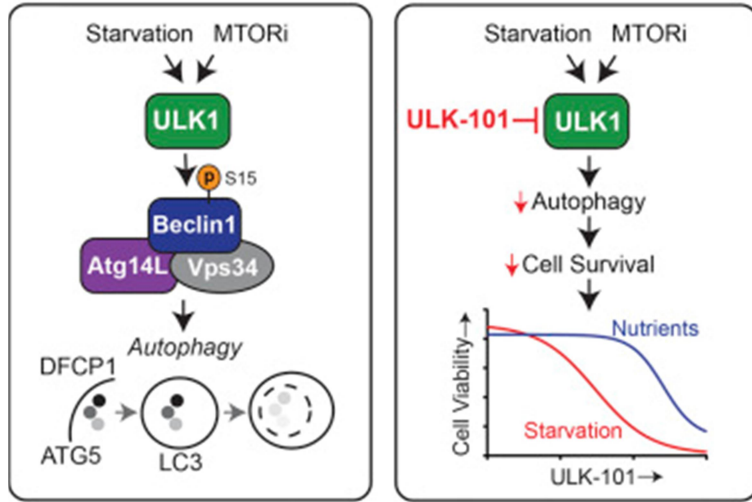
düzenleyicisidir ve aktivasyonunu, BCL2'nin doğrudan fosforilasyonu takip eder, bu da BECN1 ile BCL2 arasındaki etkileşimi bozar ve tümör hücrelerinde otofajiyi indükler (Rashid ve ark., 2015).

ER stresi altındaki hücrelerin otofajiyi (makrootofaji) aktive ettiğini göstermiştir. Stresin neden olduğu makrootofaji, hücrel organellerin otofagozom adı verilen çift katmanlı membranlar tarafından sekestrasyonunu içerir; bu membranlar sonuçta lizozomlarla birleşir ve içerikleri lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanır. Otofaji genellikle sitoplazmik vakuollerin ve otofagozomların varlığı, LC3'ün (mikrotübülle ilişkili protein 1 hafif zincir 3) bölünmesinde bir artış ve p62 (SQSTM1 olarak da bilinir) protein seviyelerinde bir azalma ile karakterize edilir. Bazal otofaji altında, uzun ömürlü proteinler ve hasarlı organeller uzaklaştırılır ve bozunma ürünleri, ara metabolitler olarak sitozole salınır. UPR gibi, otofaji de otofajinin düzeyine ve süresine bağlı olarak hem hücrenin hayatta kalması hem de hücre ölümü ile ilişkilidir. Örneğin, ER üzerindeki stres çözülmeden kalırsa veya sürekli ER stresi mevcutsa, UPR'nin uzun süreli aktivasyonu mitokondriyal apoptoza yol açar. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax, Bak, PUMA'nın yanı sıra Bcl-2 homoloji alanı 3 (BH3)-yalnızca proteinlerinin transkripsiyonel indüksiyonu veya translasyon sonrası aktivasyonu bu mitokondriyal apoptozda rol oynar (Guha ve ark., 2017).

2.7. ULK-101

Sitoplazmik proteinler ve organeller için bir kalite kontrol mekanizması olarak otofaji, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, bulaşıcı ve inflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında önemli roller oynar. Otofaji inhibitörlerinin ve aktivatörlerinin uygulanması, insan hastalıklarında otofajinin düzenlenmesini anlamamıza yardımcı olmaktadır (Yang ve ark., 2013). Otofaji, belirli koşullar altında kanser tedavisinde sitoprotektif bir fonksiyon olarak kabul edilir ve başarılı kanser tedavisine klinik bir engel teşkil eden ve kanser hastalarında kötü prognoza yol açan bir ilaç direnci mekanizmasıdır. Geliştirme aşamasındaki belirli klinik ilaçlar ve ajanlar sitoprotektif otofaji etkilerine sahip olduğundan, otofajik yolları hedeflemek kanser tedavisi için potansiyel olarak daha akıllı bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Birçok klinik öncesi ve klinik çalışma, otofaji inhibisyonunun çeşitli kanserlerde antikanser ajanlarının etkinliğini artırdığını göstermiştir (Liu ve ark., 2020).

Temel ve erken bir otofaji düzenleyicisi olan ULK1'i hedef alan inhibitörler, otofajiyi engellemek için bu kinazın hedeflenmesine yönelik konseptin kanıtını sağlamaktadır (Martin ve ark., 2018)



Şekil 2.8. ULK-101'in ULK 1 hedeflemesi (Martin ve ark., 2018).

Otofaji indüksiyonu öncelikle serin/treonin kinaz, ULK1 (unc-51 benzeri otofaji başlatan kinaz 1) tarafından kontrol edilir, maya ATG1'in memeli bir ortologudur. ULK1, bağlanma ortakları ATG13 (otofajiyle ilgili 13), RB1CC1 (RB1 indüklenebilir sarmal-sarmal; ayrıca FIP200 olarak da bilinir) ve ATG101 (otofajiyle ilgili 101) ile bir kompleksin parçasıdır. Bu kompleks aracılığıyla ULK1, erken otofajik membranların üretimini indüklemek için hem rapamisin kompleksi 1'in (mTORC1) besin algılama mekanistik hedefinden hem de AMP ile aktifleştirilen protein kinaz (AMPK) enerji algılama yollarından gelen yukarı akış sinyallerini birleştirir. ULK1'in tek başına kaybı, birçok hücre tipinde otofajiyi ortadan kaldırmak için yeterlidir ve bu, onun özellikle önemli rolünü vurgular (Martin ve ark., 2018).

ULK-101 otofajik akışı baskılar ve otofaji indüksiyonunu engeller. ULK-101 otofajik veziküler çekirdek oluşumunu ve açlık ve mTOR inhibisyonunu engeller. Beclin 1, Ser15'te ULK1 geni tarafından ifade edildiğinde, otofaji PIK3C3 kompleksi daha fazla PtdIns3P'ye neden olur. Bu PtdIns3P'nin üretimi, başlangıç aşamasında otofaji membran üretimi için bir

hizmet platformu olan endoplazmik retikulum mikrodomain - omegasomlarda meydana gelir . Omegasom, ubiquitin benzeri ATG12-ATG5-ATG16L kompleksi tarafından işaretlenen fincan şeklindeki otofajik membranlar olan fagozomların oluşumunu destekler. ULK-101'in varlığında, ne PtdIns3P ne de omegasomlar tespit edilir; bu da ULK-101'in indüklenen omegasom ve fagoforların oluşumunu engellediğini gösterir (Ou ve ark., 2024). ULK-101, hem ULK1 hem de ULK2 için nanomolar inhibitör aktivite sergilemektedir. ULK-101, mTOR inhibitörünün neden olduğu erken otofajik keseciklerin, omegasomların ve fagoforların oluşumunu baskıladı. ULK-101 ayrıca hem bazal hem de indüklenmiş otofajiyi azalttı. Böylelikle ULK-101, tam büyüme ortamına kıyasla açlık ortamında osteosarkom hücrelerinin hayatta kalma oranını azalttı. Bu nedenle ULK-101'in otofajiye bağlı kanser hücrelerinin hayatta kalmasını baskıladığı ileri sürülmektedir (Karmacharya ve ark ., 2023).

2.8. Tunikamisin

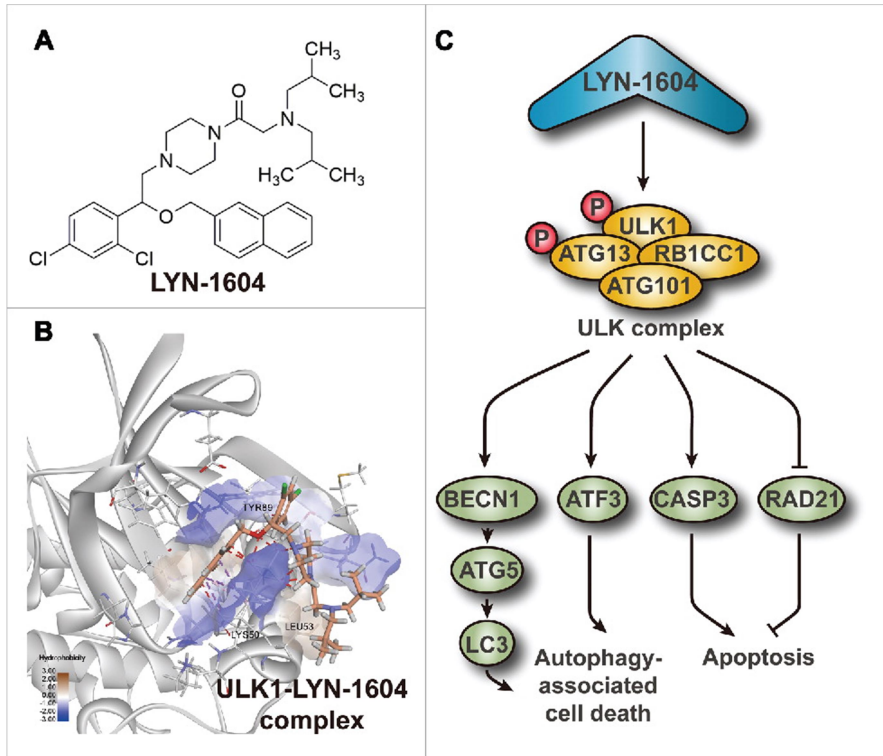
Endoplazmik retikulum (ER) içinde, yeni oluşan proteinler bir dizi moleküler şaperon, lektin ve glikozidazın eylemleriyle uygun şekilde katlanır ve daha fazla taşınma için Golgi aygıtına gider Bu süreç eksik olduğunda veya hücre protein sentezi talebi ile ER'nin protein olgunlaşmasını ve taşınmasını teşvik etme kapasitesi arasında bir dengesizlik varsa, hücre ER içinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerle başa çıkmak zorundadır - hücrenin özelliği ER stresi olarak bilinir. Tunikamisinin endoplazmik retikulumda (ER) katlanmamış protein tepkisi (UPR) yoluyla stres oluşturarak ve böylece apoptozu teşvik ederek kanser hücrelerine karşı terapötik bir ilaç olarak işlev görebileceğini öne sürmektedir. Bununla birlikte, hücre apoptozunun düzenlenmesinde sürekli ER stresi altında UPR'nin uzun süreli aktivasyonunun mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir. Doğal olarak oluşan bir antibiyotik olan tunikamisin (Tun), proteinlerdeki N-bağlı glikanların biyosentezindeki ilk adımı inhibe ederek hücrelerde ER stresi oluşturur ve bu da birçok yanlış katlanmış proteine neden olur . Birkaç çalışma, tunikamisinin insan kolon ve prostat kanseri hücrelerini TRAIL kaynaklı apoptozu duyarlı hale getirdiği gösterildiğinden kanser hücrelerine karşı terapötik bir ilaç olarak işlev görebileceğini öne sürmektedir . Ancak, hücre apoptozunun düzenlenmesinde uzun süreli UPR aktivasyonunun (sürekli ER stresi altında) potansiyel rolü büyük ölçüde bilinmemektedir

Farmakolojik bir ER stres indükleyicisi olan tunikamisin, bir anti-kanser ilacı geliştirmek için kullanılır. Ancak tunikamisinin hepatik enerji metabolizması üzerindeki

etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. ER stres indükleyicisi olan tunikamisin, tümör hücresi apoptozunu uyarabilir . Bu nedenle, bir kanser karşıtı ilaç geliştirmek için kullanılmıştır .ER stres indükleyici karakteri nedeniyle, tunikamisin birçok çalışmada metabolizma bozukluklarına neden olduğu bildirilmiştir. Hepatositler üzerinde yapılan bir çalışmada gösterildiği gibi, tunikamisin, insülin duyarlılığında ve glikoz ve trigliserit metabolizmasının düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan protein kinaz B'nin (Akt) fosforilasyonunu inhibe eder .Wang ve arkadaşları, kısa süreli tunikamisin tedavisinin hepatik glukoneogenezi inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir(Feng B ve ark., 2017)

2.9. LYN-1604

ULK1 koordinasyonu olarak belirlenen ilk şey küçük molekül LYN-1604'tür. Bir ULK1 aktivatörü olan LYN-1604 ULK1 ve kompleks bileşenleri mATG13 ve/veya FIP2000'in etkileşimini 'kilitleyerek' ULK1'i aktif duruma geçirebileceği gözlemlenmiştir(Park Y ve ark., 2022). LYN-1604 uygulaması zamanı, Beclin-1 önemli ölçüde yukarı regüle edilir, p62 bozulur ve LC3-I, LC3-II'ye dönüştürülür(Ou Y ve ark., 2024 Ouyang L ve ark., 2017).



Şekil 2.9. LYN-1604'ün ULK1'i hedeflemesi (Ou Y ve ark., 2024 Ouyang L ve ark., 2017).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre kültürü

Tez projesinde kullanılan insan meme kanser hücre hatları MCF7 (HTB-22™) ATCC® (American Type Culture Collection, Rockville)'den elde edilmiştir. MCF7 meme kanseri hücreleri %10 fetal sıgır serumu ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren yüksek glikoz DMEM besiyeri bulunan flasklarda 37°C'de, %95 nem ortamında, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir.

3.1.1. Hücre hattının dondurulması

Flask yüzeyine yapışarak çoğalan hücreler, yapıştıkları yüzeyden kalkmaları için Tripsin-EDTA ile muamele edilmiş ve 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inverted mikroskop ile yapılan kontrolün ardından kalkan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenmiş ve flastaki hücre-besiyeri içeriği falkon tüpüne aktarılmıştır. 1500 rpm'de 4 dk boyunca gerçekleştirilen santrifüj işlemi sonrası süpernatant kısım ortamdaki uzaklaştırılmış, kalan pellet 10:1 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş besiyeri ile çözdürülmüş ve ardından da kriyotüplere konulmuştur. Kriyotüpler -20 °C'de dondurulduktan sonra -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözdürülmesi

Dondurulmuş hücreler 37 °C'de hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra taze besiyeri içeren falkon tüpe alınmıştır. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet besiyeri ile çözdürülmüş ve çözdürüldükten sonra MCF7 hücreleri flasklara alınarak 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler flask yüzeyinin %80-85'ini doldurana kadar iki günde bir besiyeri değiştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Flask dolduğunda pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.1.3. Hücre hattının pasajlanması

Flaskda %80-90 yoğunluğuna ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi için ilk olarak eski besiyeri ortamdaki uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden kalkması için 1-2 ml Tripsin-EDTA eklendikten sonra hücreler 3-4 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilmiş ve ardından inverted mikroskopta hücrelerin kalkıp kalkmadığı incelenmiştir. Sonrasında flaska Tripsin-EDTA miktarının iki katı olacak şekilde yeni besiyeri

eklenmiş ve hücre-besiyeri içeriği falkon tüpe aktarılmıştır. Santrifüj işlemi 1500 rpm'de 4 dk olacak şekilde yapılmış ve süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edilmiştir. Hücrenin yoğunluğuna göre flasklara hücre ekimi yapılmış ve çoğalmaları için 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

3.2. ULK-101 stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmamızda ULK1 inhibitörü olarak seçilen ULK-101(MedChemExpres, HY-114490) ticari olarak satın alınmıştır. 460.45 g/mol molekül ağırlığına sahip toz halindeki ULK-101, protokole uygun olarak DMSO ile çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti alikotlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Tunikamisin stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmamızda ER Stress Stimülatörü olarak seçilen Tunikamisin (Sigma-Aldrich, T7765) ticari olarak satın alınmıştır. Moleküler ağırlığı 844.94 g/mol olan bu madde protokole uygun olarak DMSO ile çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti alikotlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. LYN-1604 stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmamızda ULK1 stimülatörü olarak seçilen LYN-1604 (Tocris Bioscience, Cat. No. 6617) ticari olarak satın alınmıştır. Moleküler ağırlığı 657.54 g/mol olan bu madde protokole uygun olarak DMSO ile çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti alikotlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. GRP78 seviyesinin belirlenmesi

Kontrol ve doz gruplarında GRP78 seviyesi, ELISA tabanlı kit (BT LAB , Cat.No.E3624Hu) kullanılarak belirlenmiştir. 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış kontrol ve doz grubu PBS ile liziz edilmiştir. Hücre lizatları endorf tüplere aktarılmış ve santrifüj sonrası süpernatantlar toplanmıştır. Analiz için kit içeriğinde bulunan GRP78 standardı ile dilüe standartlar oluşturulmuştur. Standart kuyularına 50 µl standart, örnek kuyularına 40 µl süpernatant ve üzerlerine 10 µl antikor solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra boş kontrol kuyusu hariç kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kit içeriğinde bulunan yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama işlemi yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sırasıyla kit içeriğinde bulunan substrat çözeltisi A ve substrat çözeltisi B 50 µl eklenmiştir. Tekrar oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun ardından

kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda absorbans değerleri belirlenmiştir.

3.6. ULK-101'in ve tunikamisinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi

ULK-101 ve tunikamisinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için Geliştirilmiş Hücre Sayım Kiti 8 (WST-8/CCK-8) (Elabscience, E-CK-A362) kullanılmıştır. Bu kit hücre çoğalması ve sitotoksitesinin tespitinde kullanılan kolorimetrik bir test kitidir. Test sırasında oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Absorbansın 450 nm'de ölçülmesiyle canlı hücre miktarı dolaylı olarak hesaplanabilmektedir.

ULK-101'in 1-100 µM aralığındaki çeşitli konsantrasyonları DMEM besiyeri ile hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucukta 2×10^3 hücre olacak şekilde hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler plaka yüzeyine yapışmaları için 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe sürelerinin sonrasında kuyucuklardaki besiyerleri çekilerek ULK-101'in sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla kuyucuklara 0-100 µM arasında değişen konsantrasyonlarda ULK-101 uygulanmıştır. Hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince inkübe edilmiş ve inkübasyonun sonunda besiyeri aspire edilerek kuyucuklara 100 µl taze besiyeri ve 10 µl CCK-8 Buffer eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyonun ardından her bir kuyucuktaki absorbans değerleri mikropate okuyucu ELISA cihazında (BioTek Epoch) 450 nm ve 630 nm dalga boyunda ölçülerek tüm konsantrasyonlar için % canlılık-ölüm belirlenmiştir. GraphPad Prism 8.01 programıyla IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

ULK-101'in IC_{50} değeri ve Tunikamisinin ER stresini tetikleyici dozu göz önünde bulundurularak MCF7 hücreleri üzerinde ULK-101 ve tunikamisin kombinasyonunun etkili olup olmadığını değerlendirmek için ULK-101 ve tunikamisin 24 saat uygulamış ve tekrar sitotoksite analizi gerçekleştirilmiştir. CCK-8 analizinin sonucunda hücre canlılık değerleri baz alınarak hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüren, 47 µM ULK-101 dozu kullanılmıştır. MCF7 hücreleri 24 saat boyunca belirtildiği gibi 1 µM tunikamisin ile tedavi edilmiş, ULK-101 yalnızca son 3 saate dahil edilmiştir. Sonrasında CCK-8 analizi yukarıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. CCK-8 analizi sonuçları göz önüne alınarak devam eden analizler;

1. Herhangi bir madde ile muamele edilmemiş MCF7 hücreleri (Kontrol grubu)
2. 24 saat süresince 47 µM ULK-101 ile muamele edilmiş ULK-101 grubu
3. 24 saat süresince 1 µM tunikamisin ile muamele edilmiş tunikamisin grubu

4. 21 saat süresince 1 µM tunikamisin ile ön muamele edilmiş, ardından tunikamisin varlığında 3 saat süresince 47 µM ULK-101 ile muamele edilmiş ULK-101 + Tunikamisin grubu olmak üzere 4 grupta gerçekleştirilmiştir.

3.7. Koloni formasyon analizi

Koloni formasyon analizi için 6 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları olacak şekilde her biri kuyuya 2×10^3 hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekiminden 24 saat sonra dozlar 24 saat süreyle uygulanmıştır. Seçilen dozlarla inkübasyon sonrasında 10 gün boyunca hücreler kültüre edilmiş ve 2 gün arayla besiyerleri değiştirilmiştir. Koloni oluşumları inverted mikroskop altında doğrulandıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Soğuk metanol uygulaması ile hücreler fikse edilmiş ve sonra kristal viyole boyası ile boyanmıştır. Yıkama işleminin ardından plakalar kurumaya bırakılmış ve sonrasında koloniler sayılmıştır.

3.8. Otofaji analizi

Otofaji analizi için LC3-II Kantitasyon ELISA kiti (Cell Biolabs, CBA-5116) ilgili firmadan temin edilmiştir. Test, sitozolik pro-LC3 ve LC3-II'yi uzaklaştırmak ve otofagozom membranına bağlı LC3-II'yi korumak için seçici bir permeabilizasyon prosedürü kullanır. Kit, hücre lizat örneklerinde LC3'ün tespiti için geliştirilmiş bir enzim immunoassaydir. Lizat örneklerindeki bilinmeyen LC3-II miktarı, absorbansı bilinen bir LC3 standart eğrisiyle karşılaştırılarak belirlenir. Kontrol ve doz grupları için 6 kuyucuklu plakalara %80 yoğunlukta olacak şekilde hücre ekimi yapılmış ve sonrasında hücreler seçilen dozlar ile 24 saat muamele edilmiştir. Hücreler 1 mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 2 mL 1X PBS ile inkübasyon süresinin sonunda yıkanmıştır. PBS tamamen aspire edildikten sonra 1 mL 1X Sitozolik LC3 Uzaklaştırma Reaktifi eklenerek, orbital çalkalayıcıda 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücreler yeniden 1 mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 2 mL 1X PBS ile üç kez yıkanmıştır. Son PBS yıkaması tamamen aspire edildikten sonra hücrelere önceden soğutulmuş 1X RIPA tamponu eklenmiştir. 10 dk inkübe etmek için plaka buza yerleştirilmiştir. Hücreler yüzeyden kazınarak santrifüj tüplerine toplanmış ve 12000 g 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant toplanarak protein konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından ELISA protokolüne geçilmiştir. 3 tekrarlı olacak şekilde Anti-LC3 Antikor Kaplı Plakaya 100 µL hacimde, LC3 standardı ve blank ayrı ayrı kuyulara eklenmiştir. Gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiş ve ardından kuyu başına 250 µL 1X Yıkama Tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Her bir kuyuya 100 µL seyreltilmiş Anti-LC3 antikoru

eklenmiş, oda sıcaklığında 2 saat boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve yeniden yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm kuyucuklara 100 µL seyreltilmiş HRP conjugated sekonder antikor eklenerek orbital çalkalayıcıda 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve yeniden yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Her kuyuya 100 µL Substrat Solüsyonu eklenmiştir. Orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Her kuyuya 100 µL Durdurma Solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılmış ve mikropłaka okuyucu ELISA cihazında 450 nm’de ölçüm yapılmıştır.

3.9. invazyon analizi

Hücrelerin invazyonunu incelemek için matrijel invazyon kiti (BioCoat™ ,Catalog No. 354480) ilgili firmadan temin edilmiştir. 24 kuyucuklu plakalara kontrol ve doz grupları olacak şekilde ekim yapılması için her biri kuyuya $2,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. İnsert ve kuyucukların dibine bikorbanat bazlı kültür ortamları ilave edilmiştir. Sonra 2 saat rehidrate olması için etüvde bekletilmiştir. Rehidrasyonun ardından plakanın boş kuyucuklarına matrijel insertlerle eşit sayıda kontrol insertleri yerleştirilmiştir. Odalara 500 µL hücre süspansiyonu eklendikten sonra 22 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrası soğuk metanol uygulaması yapılmış ve 2 dk bekletilmiştir. Sonra kristal viyole boyası uygulanmış ve 2 dk bekletildikten sonra yıkama işlemi yapılmıştır. Kuruduktan sonra preparatlar fotoğraflanarak ZEN programı ile sayılmıştır.

3.10. Deney gruplarında Otofaji, ER stres ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

ULK101 ve Tunikamisın uygulamasının otofaji, ER stres ve apoptoz ile ilişkili önemli genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardından cDNA sentezlenmiştir. Sonrasında ise hedef genlere yönelik olarak tasarlanmış primerler kullanılarak qRT-PZR analizi gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş kontrol ve doz hücrelerinin (25×10^4 hücre/kuyucuk) besiyerleri uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 500 µl RiboEx (GeneAll, 301-001) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyonun ardından hücre homojenizatları temiz ependorf tüplere aktarılmıştır. Her bir ependorf tüpe faz oluşturması için 100 µL kloroform eklenmiş ve 15 sn boyunca vortekslenmiştir. Ependorf tüpleri 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alınarak üzerine 250 µL izopropanol damla damla eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyonun ardından 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 750 µL önceden soğutulmuş %70'lik etanol ilave edilmiştir. 14000 g'de 5 dk santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak oluşan RNA pelletleri kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin sonunda pellet 30-50 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürülmüştür. RNA'lar -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.10.2. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi

İzole ettiğimiz RNA'ların kalite ve miktarının belirlenmesi için RNA örneklerimizden 1 µL alınarak nanodrop cihazında 260 ve 280 nm'de UV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. UV ölçümleri A260/A280 için $2 \pm 0,1$ ve A260/A230 için 2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır. Olası DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak amacı ile RNA örneklerine üretici firmanın (Thermo Scientific, #EN0521) protokolü doğrultusunda DNase-I enzimi eklenerek DNase işlemi uygulanmıştır. Bunun için 2 µg RNA örneğine 2 µl 10X buffer ve 2 µl 1U/µl DNase-I enzimi eklenmiştir. Toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek 37°C 'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem bitdikten sonra ise reaksiyonun durdurulması için örneklere 2 µl 50 mM EDTA eklenmiş ve tüpler Thermal Cycler cihazında 65°C 'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

3.10.3. cDNA sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi üretici firmasının talimatlarına göre (iScript™ cDNA sentez kiti, Bio-Rad, 170-8891) yapılmıştır. Bu amaçla 1µg total RNA örneğine 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı ve 1 µl Reverse Transkriptaz enzimi eklenmiştir. Ardından 25°C 'de 5 dk, 46°C 'de 20 dk ve 95°C 'de 1 dk şeklindeki cDNA sentez protokolü uygulanmıştır. cDNA örnekleri -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.10.4. qRT-PZR analizi

Deney gruplarında qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilen genler Tablo 3.1’de sunulmuştur. Reaksiyon için tüp içerisine 5 µl SYBRGreen 2X qPZR MasterMiks (ABM, MasterMix-R), 5 pMol ileri primer, 5 pMol geri primer, 2 µl cDNA konmuş ve toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 10 µl’ye tamamlanmıştır. Ardından 95°C’de 10 dk, 95°C’de 15 dk ve 60°C’de 60 saniye olacak şekilde 40 döngü halinde PZR protokolü oluşturulmuş ve reaksiyon Gerçek zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad, CFX Connect)’nde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 95°C 1 dakika ısıtılıp, 65°C’ye düşürülen ısı, 0,5°C’lik artışlar ile 95°C’ye kademeli olarak yükseltılarak erime eğrisi elde edilmiştir. Reaksiyon sonrası analiz için eşik döngü değerleri (Ct) kaydedilmiştir. Gruplar arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programı ile belirlenmiştir. Normalizasyon için ACTB ve GAPDH referans genleri olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş genler

Gen Sembolü	Açılımı
BECN1	Beclin
ATG5;	Otofaji ilişkili 5
ATG12;	Otofaji ilişkili 12
MAP1LC3A	Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 alfa
MAP1LC3B	Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 beta
GRP78;	Isı şok protein ailesi A (Hsp70) üyesi 5
IRE1α	ER-nukleus sinyali 1
TİMP1	Metalopeptidaz İnhibitörü 1
TİMP2	Metalopeptidaz İnhibitörü 2
MMP2	Matris Metalopeptidaz 2
MMP9	Matris Metalopeptidaz 7
ATF4	Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
CHOP	DNA hasarı indüklenebilir transkript 3
ATG14	Otofaji ilişkili 14
ATG16L	Otofaji ile ilgili 16 benzeri 1

PERK	Ökaryotik transkripsiyon başlatma faktörü 2 alfa kinaz 3
-------------	---

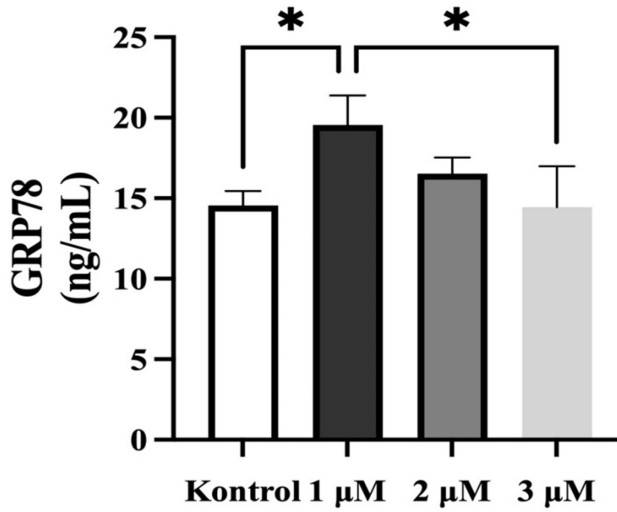
3.11. İstatistiksel analiz

Gruplar arası karşılaştırma GraphPad Prism yazılımı (Sürüm 8.0.2, San Diego, CA) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

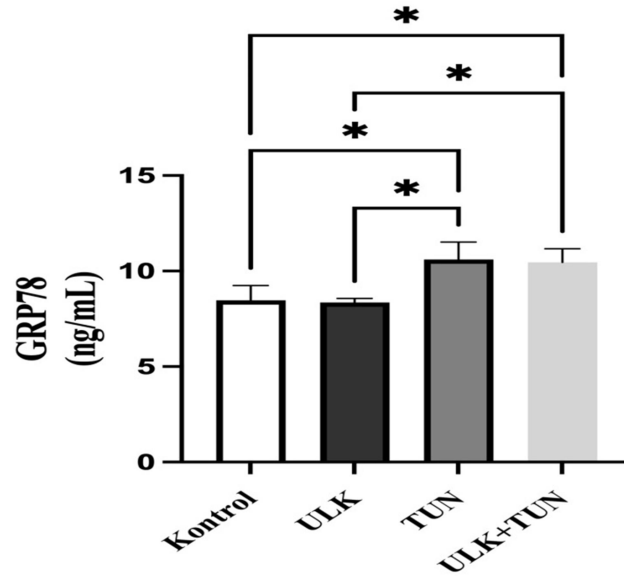
4.BULGULAR

4.1. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi

Tunikamisin ve ULK-10 MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi ER stresinin önemli belirteçlerinden biri olan GRP78/BiP seviyesinin belirlenmesini sağlayan ELISA tabanlı kit ile belirlenmiştir. Buna göre ilk önce MCF7 hücrelerinde 1, 2 ve 3 μM konsantrasyonlarında tunikamisin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GRP78/BiP anlamlı şekilde artmış ve ER stresinin indüklenen dozu 1 μM olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1) ($p < 0,05$). 24 saat 47 μM ULK-101 ile muamele edilmiş ULK-101 grubu ve 21 saat süresince 1 μM tunikamisin ile ön muamele edilmiş, ardından tunikamisin varlığında 3 saat süresince 47 μM ULK-101 ile muamele edilmiş ULK-101 + Tunikamisin grubu kontrole göre anlamlı artış gösterse de, 24 saat 1 μM tunikamisin ile muamele edilmiş tunikamisin grupuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.2) ($p < 0,05$).



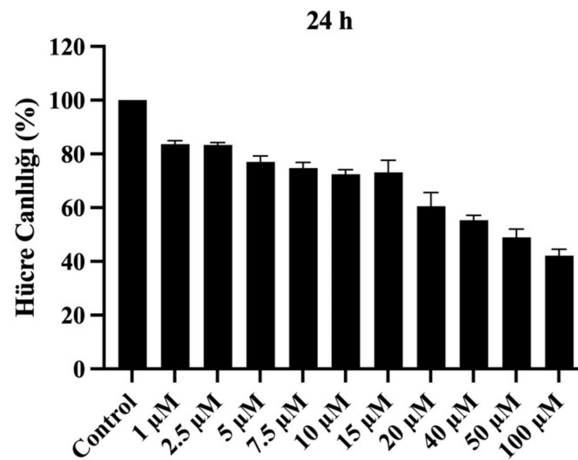
Şekil 4.1. Tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi



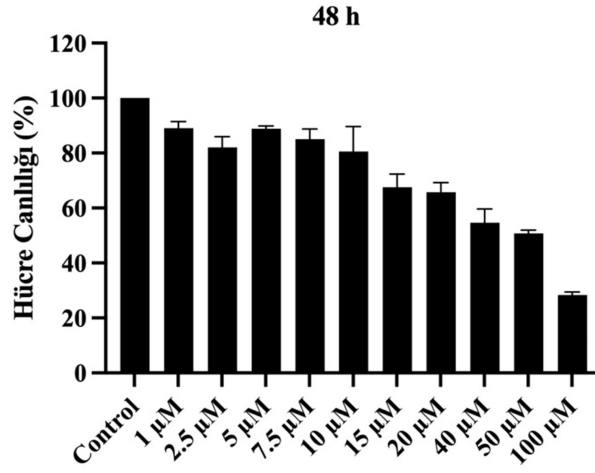
Şekil 4.2 Tunikamisin ve ULK-101 kombine uygulamasının MCF7 hücrelerinde ER stresi üzerine etkisi

4.2. ULK-101'in MCF7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi

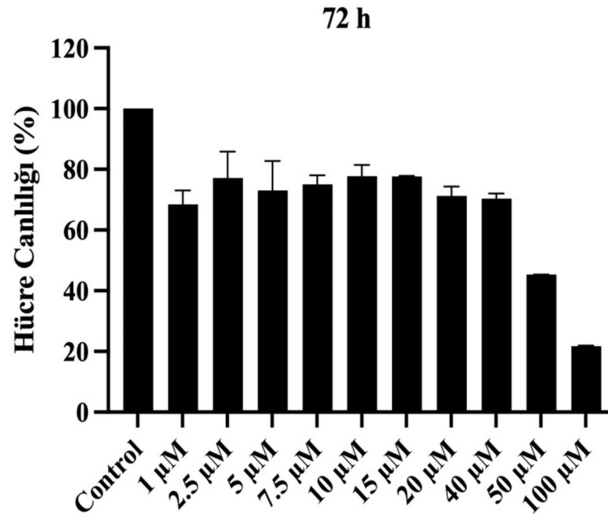
MCF7 hücrelerinde ULK-101 uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi CCK8 testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 40, 50 ve 100 μ M konsantrasyonları kullanılarak ULK-101 uygulaması yapılmıştır. CCK8 sonuçları değerlendirildiğinde ULK-101 ile muamele edilen MCF7 hücrelerinde (Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5), canlılığın uygulanan konsantrasyona ve zamana bağımlı şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. MCF7 hücrelerinde 24. saat sonunda ULK-101'in IC50 dozu 47 μ M olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 24 saat süresince ULK-101 uygulamasının MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.4. 48 saat süresince ULK-101 uygulamasının MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

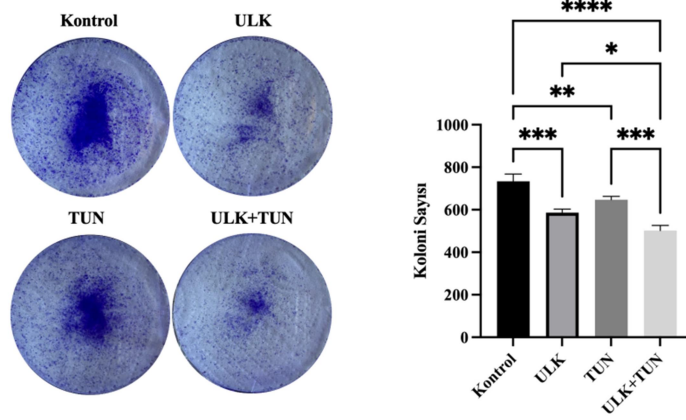


Şekil 4.5. 72 saat süresince ULK-101 uygulamasının MCF7 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

4.3. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi

MCF7 hücrelerinde belirlenen dozlarda ULK101 ve tunikamisin uygulamasının hücre proliferasyonu üzerine etkisi koloni formasyon analizi ile de değerlendirilmiştir. Buna göre

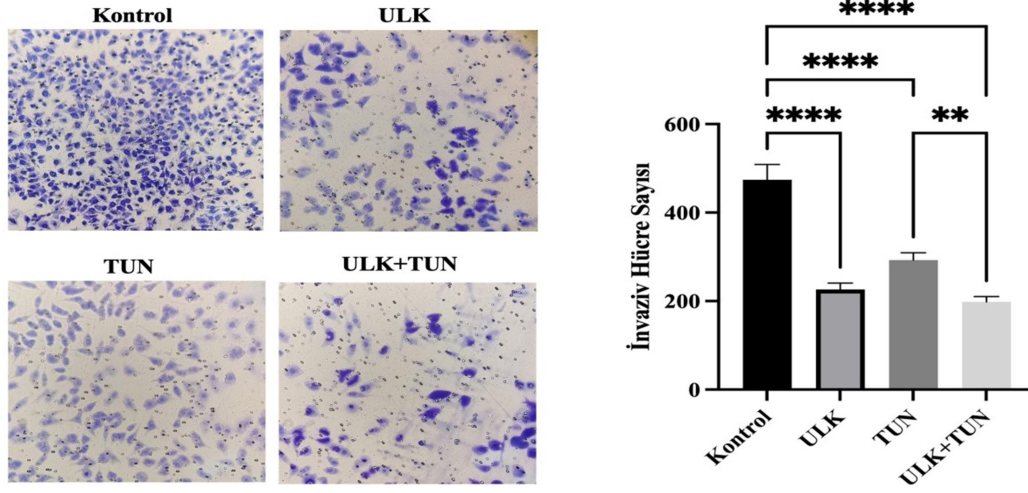
MCF7 hücrelerinde 24 saat 47 μ M konsantrasyonunda ULK-101 uygulaması sonrasında hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalmıştır ($p < ?$) (şekil 4.6). ULK-101 grubu ile kıyaslandığı zaman 24 saat 1 μ M tunikamisin ile muamele edilmiş tunikamisin grubunda anlamlı bir farklılık tespit edilmese de kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman anlamlı bir azalma görülmüştür ($p ?$). ULK-101+tunikamisin grubunun ise additif etki gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.6. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisi

4.4. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi

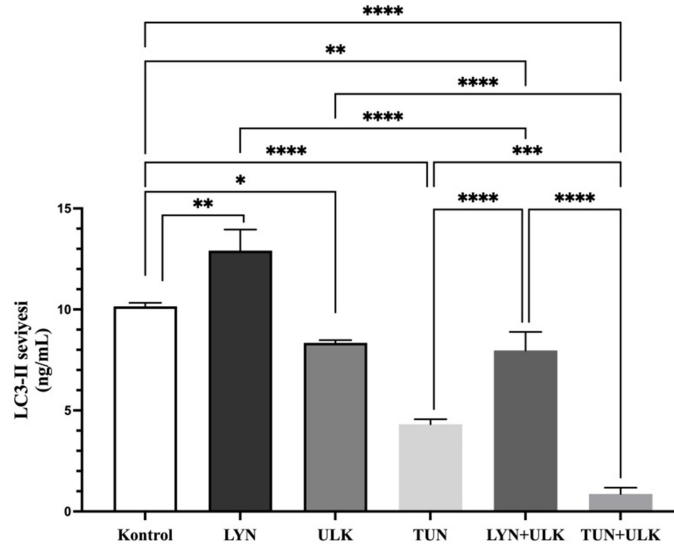
MCF7 hücrelerine uygulanan ULK-101, tunikamisin ve ULK-101+tunikamisin doz gruplarının invazyon üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için matrigel invazyon testi gerçekleştirilmiştir. Analizin tamamlanmasının ardından doz ve kontrol gruplarına ait hücreler mikroskop altında fotoğraflanmış ve analizi yapılmıştır (şekil 4.7). MCF7 hücrelerinde 24 saat 47 μ M konsantrasyonda ULK-101 uygulaması zamanı invaziv hücre sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. 24 saat 1 μ M tunikamisin ile muamele edilmiş tunikamisin grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülse de ULK-101 grubu ile kıyaslandığı zaman anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. ULK-101+tunikamisin grubu kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman additif etki gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 4.7. ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının MCF7 hücrelerinde invazyon üzerine etkisi

4.5. LYN-1604, ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkisi

MCF7 hücrelerinde LYN-1604, ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının otofajik aktivite üzerine etkisi LC-3 II miktarını baz alan kit kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ve doz grubu hücreleri 24 saat sonunda protokole göre toplanmış ve otofajik aktiviteyi değerlendirmek üzere üretici firmanın önerdiği protokol uygulanmıştır. Sonuçlara göre 2 μ M LYN-1604 uygulamasının kontrol grubu hücrelerine kıyasla MCF7 hücrelerinde $p < 0,01$ anlamlılıkta otofajik aktivitede artış meydana getirdiği gözlemlenmiştir. 24 saat 1 μ M'lık tunikamisin uygulamasının ve 24 saat 47 μ M'lık ULK-101 uygulamasının da anlamlı şekilde ($p < 0,01$) otofajik aktivitede azalmaya yol açtığı saptanmıştır. 1 saat 47 μ M ULK-101 ile ön işleme tabi tutulmuş LYN-1604+ULK-101 doz grubunda ULK-101 grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. 24 saat 1 μ M uygulanan tunikamisin ve son 3 saatinde 47 μ M ilave edilen ULK-101'in, (ULK-101+ tunikamisin grubu) kontrol grubu hücrelerine kıyasla additif etki göstererek otofajik aktiviteyi anlamlı şekilde azalttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. LYN-1604, ULK-101 ve tunikamisin uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkisi

4.6. ULK-101 , tunikamisin ve ULK101+tunikamisin uygulamalarının meme kanseri hücrelerinde otofaji, ER stresi , apoptoz ve metastaz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi

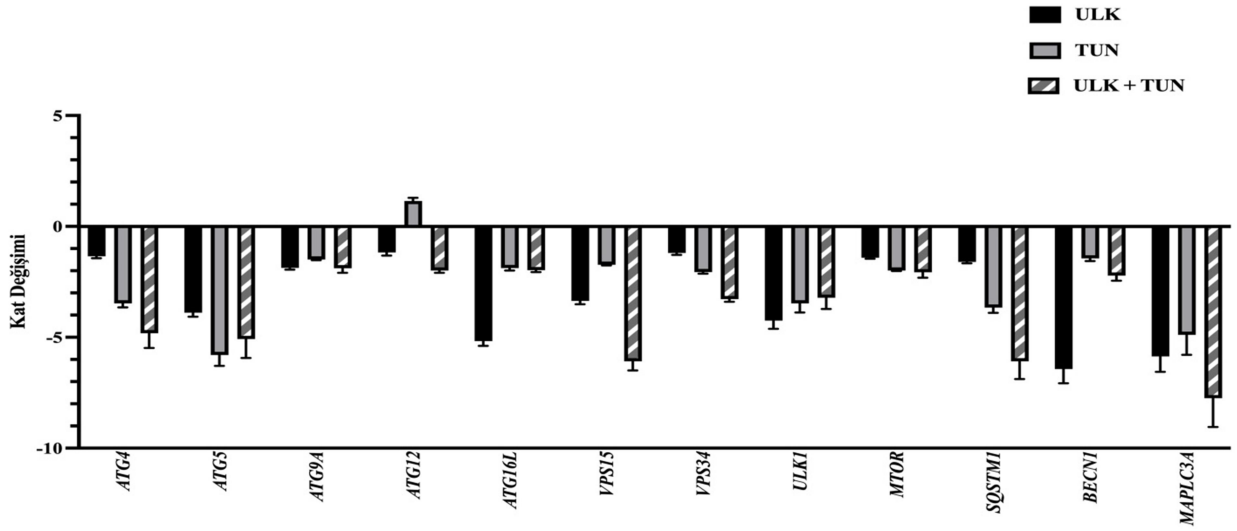
ULK-101, tunikamisin ve ULK-101+tunikamisin otofaji, ER stres, apoptoz ve metastaz üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için 27 genin ekspresyon analizleri qRT-PZR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

ULK uygulaması otofaji-ilişkili genlerin ekspresyonunda azalışa yol açmıştır. Bu genlerden ATG4 ve VPS34 genleri hariç diğer genlerdeki ekspresyon azalışları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$) (Şekil 4.9). Otofaji ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki bu azalış, ULK-101'in "otofaji inhibitörü" kimliği ile uyumludur. ULK uygulaması ER stres ilişkili genlerin çoğunda ekspresyon artışını uyarmakla birlikte bu artışlardan sadece ATF6 genine ait artış istatistiksel olarak anlamlı gözükmemektedir ($p < 0.01$) (Şekil 4.10). ER stres genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisi bakımından ele alındığında ULK'nın ER stres üzerinde doğrudan etkili olmadığını söylemek mümkündür. Apoptoz ilişkili genlerin ekspresyonunda ise CASP9 ve CYCS genlerinin ekspresyonunda önemli artışa ($p < 0.001$) ve BCL2 gen ekspresyonunda önemli azalışa ($p < 0.01$) yol

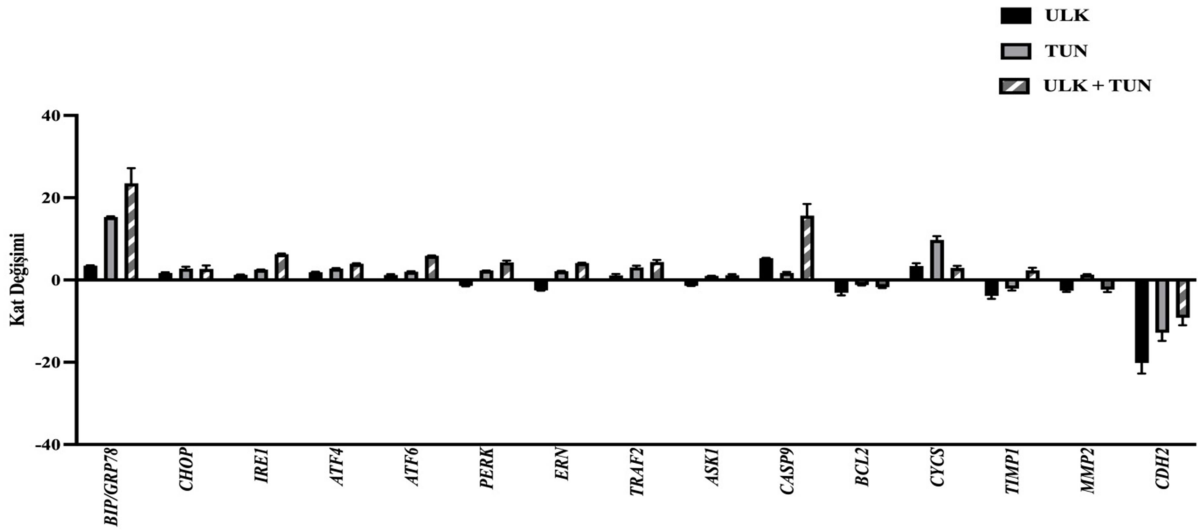
açmıştır (Şekil 4.10). Apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri göz önünde bulundurulduğunda ULK-101 uygulaması apoptoz uyarıcı etki göstermiştir. Uygulama TIMP1, MMP2 ve CDH2 gibi metastatik süreçte rol oynayan genlerin ekspresyonunda da anlamlı bir azalışa yol açmıştır ($p<0.01$)(Şekil 4.10). Bu sonuca göre ULK uygulaması metastatik sürecin de inhibitörü olarak davranmıştır.

Tunikamisin uygulaması otofaji ilişkili genlerin ekspresyonlarında azalışa neden olmuştur. Bu azalışlar ATG12 ve VPS34 hariç, tüm genler için istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$)(Şekil 4.9). Otofaji ilişkili genlerin ekspresyon analizi sonuçları dikkate alındığında tunikamisin otofajiyi inhibe edici bir etki gösterdiği düşünülmüştür. Tunikamisin ER stres ilişkili genlerin tümünün ekspresyonunda anlamlı artışlara neden olmuştur ($p<0.01$)(Şekil 4.10). Bu artışlar, zaten ER stres aktivatörü olduğu bilinen tunikamisinden beklenen sonuçlar olarak değerlendirilmiştir. Apoptoz ilişkili genler değerlendirildiğinde ise CASP9 ve CYCS genlerinde anlamlı ekspresyon artışları saptanmıştır ($p<0.05$)(Şekil 4.10). Bu sonuçtan hareketle tunikamisin apoptozu teşvik edici etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Metastaz ilişkili genlerin ifadelerine bakıldığında uygulamanın özellikle TIMP1 ve CDH2 genlerinin ekspresyonlarında azalışlara yol açtığı görülmüştür ($p<0.01$)(Şekil 4.10).

ULK-101+tunikamisin uygulaması otofaji ilişkili genlerin ifade düzeylerinde ATG16L ve VPS34 hariç tamamında anlamlı azalışa yol açmıştır ($p<0.01$) (Şekil 4.9). ULK-101+tunikamisin kombine uygulaması otofaji inhibisyonunda etkili gözükmemektedir. ER stres ilişkili genlerin ekspresyonları değerlendirildiğinde uygulama bütün genlerin ekspresyon seviyelerinde artışa yol açmıştır. Bu genlerden CHOP hariç diğerlerinin tamamındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$)(Şekil 4.10). Kombine uygulama otofaji stimülasyonunda etkili olmuştur. Apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon analizlerinde. İse CASP9 ve CYCS genlerinin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artışın olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Anlamlı olmamakla birlikte TRAF2 ve ASK1 genlerin ekspresyonlarında da artışın olduğu anlaşılmıştır. BCL2 seviyesinde de istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte bir azalış söz konusudur (Şekil 4.10). Kombine uygulama apoptoz teşvikinde etkili olmuştur. Uygulama metastaz ilişkili genlerden MMP2 ve CDH2 ekspresyonunda önemli bir azalışa yol açmıştır ($p<0.01$)(Şekil 4.10.). Kombine uygulama genel olarak metastatik sürecin engelleyicisi gibi etki göstermiştir.



Şekil 4.9. MCF7 hücre hattında ULK-101, tunikamisın ve ULK-101+tunikamisın uygulamanın otofaji genleri üzerinde kat değişimi etkisi.



Şekil 4.10. MCF7 hücre hattında ULK-101, tunikamisın ve ULK-101+tunikamisın uygulamanın otofaji , ER stres , apoptoz ve metastaz genleri üzerinde kat değişimi etkisi.

5.TARTIŞMA

Kanser hücreleri, DNA ve/veya RNA'nın bir modifikasyonu/mutasyonu sonucu normal hücrelerden oluşur. Bu modifikasyonlar/mutasyonlar kendiliğinden meydana gelebilir veya nükleer radyasyon, elektromanyetik radyasyon virüsler, bakteriler ve mantarlar, parazitler gibi diğer faktörler tarafından indüklenebilir(Sharma GN ve ark ., 2010).

Meme kanseri karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Lokal bir hastalık olarak başlar, ancak lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilir. Meme kanserinin gelişimi, birden fazla hücre tipini içeren çok adımlı bir süreçtir ve önlenmesi dünyada hala zorlu olmaya devam etmektedir. Meme kanseri metastatik bir kanserdir ve çoğunlukla tedavi edilemez olmasının nedeni olan kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi uzak organlara yaygın olarak yayılabilir olmasıdır(Sun YS ve ark ., 2017).

Dünya genelinde her yıl yaklaşık 1,7 milyon meme kanseri vakası teşhis ediliyor ve bu da yaklaşık her 18 saniyede bir yeni vakanın teşhis edildiği anlamına geliyor(Winters S ve ark ., 2017). Meme kanseri kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır. Ölümlerin %70'i düşük ya da orta sosyoekonomik gelir düzeyindeki ülkelerde görülmektedir. Tüm meme kanserlerinin sadece %1'i erkeklerde görülür. Meme kanseri görülme sıklığında son 50–60 yılda ciddi artışlar olduğu gözlemlenmiştir. Meme kanseri insidansının kadınlarda tahminlere göre %20, ölümlerin ise %14 arttığı bildirilmiştir(Mehmet Faik ve ark., 2018).

Programlanmış hücre ölümü (PCD), hücre ölümünü normal hücrelerin hayatta kalmasıyla dengeleyebilir; bozabilir ve PCD, kanser hücresi kaderinin nihai kararlarında önemli roller oynar.Otofoji de bu hücre yollarından biridir(Ouyang L ve ark 2012). Kanserde, otofaji ikili rol göstermektedir. Otofaji'nin tümör hücresine özgü etkileri hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici olabilir. Bu nedenle otofaji yalnızca hücre ölümünü aktive edip engellemekle kalmaz, aynı zamanda hücre ölümü mekanizmaları arasındaki geçişi de kolaylaştırır(Towers CG ve ark ., 2020). Otofaji, kötü huylu hücrelerde meydana gelen birçok süreçle bağlantısı olan ve bazı otofajiyle ilişkili genler (ATG'ler) tarafından yüksek oranda düzenlenen önemli, düzenlenmiş, katabolik bir mekanizmadır. Otofaji ve kanser arasındaki ilişkileri analiz ederken karşılaşılan yaygın bir zorluk, otofajinin hücrenin hayatta kalmasını mı koruduğunu yoksa hücre ölümüne mi katkıda bulunduğunu belirlemektir . Sonuç olarak, otofajik aktivasyon kanser ilerlemesinin erken evrelerinde koruyucu bir rol

oynayabilir. Öte yandan, otofaji onkogenezde pro-otofajik genleri aktive ederek ve anti-otofajik genleri bloke ederek bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir(Ouyang L ve ark ., 2012).

Otofaji, hücrel strese yol açtıkları için kanser tedavi edici ajanların çoğu tarafından indüklendiği bulunmuştur.Bazı otofaji indükleyicileri kanser karşıtı ilaçlara yanıt olarak hücre ölümünü arttırdığı için kemoterapinin otofajik hücre ölümüne yol açtığına bildirilmiştir(Jain K, ve ark ., 2013). Otofaji ile ilişkili birçok protein ve aktif faktörün insan kanserleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Otofajik hücre ölümü, örneğin, antiöstrojenle tedavi edilen kültürlenmiş insan meme karsinomu MCF7 hücrelerinde tanımlanmıştır. Kadota ve ark. ve Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmalar, meme kanserinin daha ileri aşamalarının IGF-1R, Siklin D1, c-myc, pERK, Stat3 ve Pak4 gibi bazıları Akt-mTOR yolunun bilinen aktivatörleri olan birkaç başka onkojenik ve sinyal proteinini aşırı ifade ettiğini göstermiştir. ERK aktivitesi ayrıca birçok hücrel modelde farklı streslere yanıt olarak ve ayrıca MCF7 hücrelerinde TNF- α (tümör nekroz faktörü-alfa) tedavisinde otofaji ve otofajik hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir(Zarzynska JM ve ark ., 2014).

Artan otofaji'nin katabolik avantajı, hipoksi, büyüme faktörü yoksunluğu, açlık, ER stresi, ROS birikimi, protein agregasyonu ve çok sayıda kanser karşıtı tedavi gibi çeşitli stres koşullarında da kritik olabilir. Kanser hücrelerinde, yanlış katlanmış protein seviyeleri ve ER stresi genellikle gen mutasyonları ve stresli mikroçevre nedeniyle artar. Dahası, ER stresi sıklıkla kanser tedavisine verilen hücrel bir yanıttır. Hücrel proteinlerin üçte birine kadarı ER içinde sentezlenir. Katlanmamış proteinlerin birikmesinin olumsuz etkilerini gidermek için hücre, topluca UPR (ER stres tepkisi;) olarak bilinen bir dizi olayı başlatırve küresel protein sentezinin azalmasına ve şaperonlar gibi ER'de uygun şekilde katlanmak için gereken proteinlerin üretimini artmasına neden olur(Clarke ve ark ., 2012), Meister ve arkadaşları verapamil ve proteazom inhibitörü bortezomib ile kombine tedaviden sonra miyelom hücrelerinde artan ER stresini ve ardından hücre ölümünü bildirdiler. ER stresi uzadığında ve yanlış katlanmış/katlanmamış proteinler proteazom bozunma sisteminin kapasitesini aştığında, otofajiyi tetikleyebilir. Memeli hücrelerinde UPR, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin seviyesini algılayan ve sinyali sitoplazmaya ve çekirdeğe ileten PERK, ATF6 veya IRE1 gibi farklı stres dönüştürücülerinin aktivasyonu ile aracılık edilebilir, IRE1 ve ATF6'nın aktivasyonu, UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu teşvik otofajide yer alan çok sayıda kinaz ve proteazın aktivasyonu ile sonuçlanır(Kania E, Pajak B ve ark ., 2015). Bu

nedenle, meme kanseri bağlamında otofaji ve ER stresinin etkileşimini anlamak, yeni hedeflerin belirlenmesinde önemli bir adım olabilir.

Meme kanserinin gelişimine etki eden moleküler mekanizmalarını aydınlatan bir alan olsa da, otofajinin bu süreçteki çift yönlü rolü ve ER stresi ile olan etkileşiminin daha ayrıntılı incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sonuç doğrultusunda tez çalışmasında meme kanserinde otofajinin ana düzenleyicilerinden biri olan ULK1 hedeflenerek meme kanserinde otofajik seviyeye ve bunun ER stres ile etkileşimine bakılmıştır. Bu nedenle otofajinin moleküler mekanizması ULK-101 ile inhibe edilmiş ve LYN-1604 ile aktive edilmiştir. Otofaji mekanizması ise otofaji aktivite testi ile incelenmiş sonrasında ise ER stresi etkinliği tunikmaisın muamelesi ardından elisa kiti ile değerlendirilmiştir. İnsan meme kanseri hücre hatlarından biri olan MCF7 hücrelerinde bu inhibisyonun etkinliği otofaji ve ER stresi ile ilişkili genler üzerinden qRT-PZR kullanılarak değerlendirilmiştir.

Otofaji böylece meme kanseri hücrelerini korurken onlara karşı ilaç duyarlılığını azaltır. Bu nedenle, otofaji meme kanseri hücreleri için sitoprotektif olabilir, Otofaji, onkoproteinler, protein agregatları, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve işlevsiz mitokondri gibi tümör oluşturan stres faktörlerini ortadan kaldırarak bu tür komplikasyonları önlemeye yarar. Bunun dışında, otofaji bağışıklık tepkilerinde ve inflamasyonda rol oynar. Bu nedenle, hücresel bütünlüğün korunması otofaji tarafından kolaylaştırılır. Otofaji, sitoprotektif işlevi nedeniyle, kanser başlangıcı açısından tümör oluşumunu baskılamaya yarar. Gerçekten de, sağlıklı meme bezlerinde otofaji için yükseltilmiş bir gen imzası gözlemlenir ve bunun meme kanseri ilerledikçe azaldığı görülür. Gerçekten de, otofaji, meme kanserinin başlamasına, büyümesine ve metastatik ilerlemesine ve tekrarlamasına katılan birden fazla proteini içeren karmaşık, çok adımlı bir süreçtir (Wu ve ark., 2023).

Yalnızca CQ ve HCQ'nun anti-otofaji aktiviteleri nedeniyle kanser karşıtı etkiler gösterdiği tam olarak tanımlanmıştır. CQ ve HCQ, lizozomal pH'ı artırarak otofajik akışı geç bir aşamada inhibe eder ve bu da lizozomal yıkıcı enzimleri inhibe eder (Cocco S, ve ark 2020). Otofajinin etki mekanizmalarının incelenmesi için farklı basamaklarındaki moleküllerin de hedeflenmesi önemlidir. Bunun için bu tez çalışmasında otofajinin moleküler mekanizmasında yer alan ULK1 hedeflenerek etkinliği incelenmiştir. ULK1'İ seçici olarak hedef alan ULK-101 inhibitörü kullanılarak otofaji inhibe edilmiştir.

ULK101 uygulaması farklı kanser hücrelerinde çalışılmıştır. ULK-101'in KRAS kaynaklı akciğer kanseri hücrelerini besin kısıtlamasına duyarlı hale getirdiğini gözlemlenmiştir. KRAS kaynaklı akciğer kanseri hücre hatlarında 24 saat boyunca ULK101 uygulaması yapılarak IC₅₀ değeri 8,3 nM olarak belirlenmiş ve hücre canlılığında anlamlı bir azalma saptanmıştır(Martin KR ve ark 2018). Başka bir çalışmada ULK-101 tedavisi 5555 hücrelerinde ULK1 ve erken otofajiyi inhibe ederek p-ATG13 ve LC3-II protein seviyelerini düşürmüştür. ULK-101 melanom hücrelerinde hücre canlılığını ve göçünü azaltmıştır(Fratta E ve ark ., 2023).

Bu tez çalışmasında ULK-101'in meme kanseri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini incelemek için, meme kanseri hücrelerinden olan MCF7'ye WST-8/CCK8 sitotoksosite testi uygulanmıştır. Artan ULK-101 dozajıyla, hücre canlılığının in vitro olarak MCF7 hücresinde hem zamana hem de konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Sitotoksosite analizin sonucunda hücre canlılık değerleri baz alınarak MCF7 hücrelerinde hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüren 47 µM ULK-101 dozu kullanılmıştır. 47 µM doz konsantrasyonu ve 24 saatlik inkübasyon süresi belirlendikten sonra koloni oluşturma kapasiteleri analiz edilmiş, MCF7 hücrelerinde otofajinin baskılanmasıyla beraber koloni oluşturma kapasitelerini inhibe ettiğini gözlemlenmiştir.

Başka bir çalışmada Üçlü negatif MDA-MB-231 ve ER⁺ MCF-7 meme kanseri hücreleri 48 saat boyunca tunikamisin (1 µg/mL) uygulanmış ve 1,0 µg/mL tunikamisin konsantrasyonunda 24 saatte hücre çoğalmasında ~%33 azalma olduğu görülmüştür. Bu da tunikamisinin MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde ER stresi oluşturduğunu doğrulamaktadır(Serrano-Negrón JE ve ark ., 2019).

Zhao ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada GRP78 ekspresyon seviyeleri hem ARO hem de FRO hücrelerinde metastaz ile korelasyon göstermiştir. Hem ARO hem de FRO hücreleri farklı dozlarda TM (0-1 µg/mL) ile muamele edilmiştir. Sonuçlar, TM'nin (1 µg/mL) ER stresini tetiklediğini ve western blotting analizi ile her iki hücrede de GRP78, PERK ve XBP1 ekspresyonunu yükselttiğini ve TM kaynaklı ER stresinin her iki hücrede de transwell deneyleriyle metastaz yeteneğini artırdığını göstermiştir(Zhao ve ark ., 2020).

Bu çalışmada meme kanseri hücrelerinde tunikamisin uygulamasının etkileri ER stresi üzerinden de değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre meme kanseri hücrelerinde tunikamisin uygulaması sonrasında ER stresi belirteci olan GRP78/BiP miktarında artış görülmüştür.

Ayrıca qRT-PZR analizi sonuçları tunikamsin uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meme kanseri hücrelerinde ER-stresi ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde artırmıştır.

Bir ER stres şaperonu olan Grp78, özellikle kanser sistemlerinde hücre apoptozunu, çoğalmasını, invazyonunu, inflamasyonunu ve bağışıklığını düzenler. Son zamanlarda tümör oluşumu, metastaz ve anjiyogenezde de rol oynadığı gösterilmiştir. Grp78 ekspresyonu hem hasta sağkalım oranı hem de tümör invazyonunun derinliği ile ilişkilidir. İnsan kanserlerinde, yükselmiş Grp78 düzeyleri meme, karaciğer, prostat, kolon ve mide kanserlerinde daha yüksek patolojik derece, tekrarlama riski ve düşük hasta sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir. Bir insan tümör ksenograft fare modelinde, ER stresi tümör gelişimi ve ilerlemesi üzerinde pro-sağkalım etkileri göstermiştir(Yadav RK ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında 24 saat 47 µM ULK-101 ile muamele edilmiş ULK-101 grubu ve 21 saat süresince 1 µM tunikamsin ile ön muamele edilmiş, ardından tunikamsin varlığında 3 saat süresince 47 µM ULK-101 ile muamele edilmiş ULK-101 + Tunikamsin grubu kontrole göre anlamlı artış gösterse de, 24 saat 1 µM tunikamsin ile muamele edilmiş tunikamsin grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.2) (p<0,05).

Bir başka çalışmada insan glioma hücre hattında IRE1α'nın genetik olarak silinmesi, bu hücreler daha sonra farelere enjekte edildiğinde anjiyogenezi inhibe ettiği ve tümör büyümesini azalttığı görülmüştür. IRE1α-XBP1s yolunun ayrıca c-MYC sinyallemesini aktive ederek prostat kanseri büyümesini desteklediği gösterilmiştir PERK'in, oksidatif hasarı sınırlayarak meme kanseri fare modellerinde tümör büyümesini desteklediği belgelenmiştir(Oakes ve ark., 2020).

Zhang ve ark. (2017) LYN-1604'ün vahşi tip ULK1 transfekte edilmiş HEK-293T hücrelerinde ser318'de mATG13 fosforilasyonunu artırdığını ortaya koymuştur ve bu da LYN-1604'ün canlı hücrelerde ULK1'i aktive ettiğini göstermektedir. Ancak, ULK1^{K50A} ve ULK1^{L53A} mutantları, LYN-1604 varlığında mATG13 fosforilasyonunda yalnızca ihmal edilebilir bir azalmaya neden olurken, ULK1^{Y89A} mutanı mATG13 fosforilasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ek olarak, bilinen bir ULK1 inhibitörü olan SBI-0206965, LYN-1604 tarafından indüklenen kinaz aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. SBI-0206965'in (300 nM) LYN-1604'ün neden olduğu ULK1 kinaz aktivitesi artışını belirgin şekilde tersine çevirebileceğini gözlemlemişlerdir.

LC3-II düzeyleri, TM (24 saat boyunca) ve Baf ile birlikte tedavi edilen LNCaP hücrelerinde, yalnızca TM veya Baf ile tedavi edilen hücrelerde gözlemlenen düzeyle karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır. Baf'ın, bu deney için önerildiği gibi, yalnızca 24 saatlik tedavi süresinin son 3 saatinde dahil edildiğine dikkat edin . Sadece Baf ile yapılan tedaviyle karşılaştırıldığında, TM artı Baf ile birlikte yapılan tedavi LC3-II seviyelerinde yaklaşık %59'luk bir artışa neden olmuştur(Luhr ve ark ., 2019).

ULK-101 uygulamasının otofajik aktivite üzerindeki etkinliği hem LC3-II ELISA kiti ile hem de gen düzeyinde qRT-PZR analizi ile incelenmiştir. Otofajinin kanserde ikili bir rolü olmasına rağmen, yukarıda ifade edildiği gibi otofaji meme kanseri gelişiminde tümör ilerlemesini destekleyerek kanser hücreleri için koruyucu bir mekanizma olarak hareket ettiğini göstermiştir. 47 µM dozda 24 saatlik inkübasyon ile ULK-101 uygulamasının, MCF7 hücrelerinde otofajiyi hem LC3-II ELISA analizinde hem de qRT-PZR analizinde anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. 2 µM LYN-1604 uygulamasının ise kontrol grubu hücrelerine kıyasla MCF7 hücrelerinde $p<0,01$ anlamlılıkta otofajik aktivitede artış meydana getirdiği gözlemlenmiştir.

Li J ve ark.(2009) kolon kanseri hücrelerinde 5-FU tarafından indüklenen apoptozu gözlemlenmişler. Bunun yanı sıra , otofajinin ise de uyarıldığını. 3-MA ve 5-FU'nun kombinasyon tedavisi apoptotik hücre ölümünü önemli ölçüde artırmıştır. Mitokondri ve sitozolün alt hücrel fraksiyonlarını izole ederek, kombinasyonla tedavi edilen hücrelerde sitokrom c salınımının arttığını gözlemlenmiştir. Sitokrom c, kaspaz-3'ün aktivasyonu ile sonuçlanmıştır ve böylece PARP'yi aktive ettiği gözlemlenmiştir. Dahası, anti-apoptotik protein Bcl-xL, 3-MA tarafından önemli ölçüde aşağı düzenlenmiştir.

Bu tez projesinde ise ULK-101 muamelesi apoptoz ilişkili genlerin ekspresyonunda CASP9 ve CYCS genlerinin ekspresyonunda önemli artışa ($p<0.001$) ve BCL2 gen ekspresyonunda önemli azalışa ($p<0.01$) yol açmıştır (Şekil 4.10). Apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri göz önünde bulundurulduğunda ULK-101 uygulaması apoptoz uyarıcı etki göstermiştir. Tunikamisın uygulaması sonrası ise apoptoz ilişkili genler değerlendirildiğinde ise CASP9 ve CYCS genlerinde anlamlı ekspresyon artışları saptanmıştır . Bu sonuçtan hareketle tunikamisinin apoptozu teşvik edici etki gösterdiği anlaşılmaktadır.

Yang ve ark (2020) memeli rapamisin hedefi (MTOR) kompleksi 1'in, kültürlenmiş kondrositler üzerinde kayma stresi sıvı akışı tarafından indüklenen otofaji ve ER stresinin koordinasyonunda rol oynadığını belirtmişlerdir. TM tarafından indüklenen UPR'nin kondrositleri apoptozdan korumak için otofaji aktivasyonu ile sonuçlandığını, ancak kalıcı UPR'nin kondrositlerin apoptozunu indüklediğini göstermektedir. Ek olarak, glikozla düzenlenen protein (GRP) 78'in baskılanmasından sonra, UPR tarafından indüklenen otofaji aktivasyonu engellenmiştir. TM ile 24 saatlik tedaviden sonra, 3-MA ile önceden tedavi edilmiş kondrositler arasındaki apoptoz oranı, normal kondrositler arasındakinden çok daha yüksektir. Bu sonuç, TM'ye maruz kalan kondrositlerde otofaji'nin koruyucu etkisini doğrulamıştır.

Başka bir çalışmada ER stresi sırasında ilk otofaji aktivasyonunun önemini değerlendirmek için PC-3 hücreleri tunikamisin varlığında klorokin ile tedavi edilmiştir. Klorokin ve tunikamisin varlığında PC-3 hücrelerinin sinerjik hücre ölümü PC-3 hücreleri Tun (5 µg/ml) ve ya klorokin 50 µg/ml ve ya kombinasyonu ile 24-72 saat süreyle tedavi edilmiştir ve hücre ölümü WST-1 boyama ile ölçülmüştür. Klorokin ve tunikamisin birlikte uygulandığında PC-3'ün sinerjik hücre ölümü meydana gelmiştir Bu da başlangıçtaki otofajik aktivasyonun hücre sağkalımı için önemli olduğunu düşündürmektedir(Guha ve ark ., 2017).

Bu tez projesinde, MCF7 hücrelerinde tunikamisin indüklü sitotoksositeye karşı ULK-101 inhibe etkisi WST-8/CCK8 sitotoksosite testi ile değerlendirilmiştir.

ER stresi ile otofaji arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalar, LC3'ü düzenleyen sinyal yollarını ve faktörleri çözmeye yoğun bir şekilde odaklanılmıştır. Bir dizi farklı ER stresörünün, PERK'in eylemini gerektiren bir şekilde LC3-II seviyelerini ve LC3 noktalarını artırdığı bildirilmiştir Ayrıca. IRE1 PERK-eIF2 α -ATF4 kolu, LC3B , ATG12(ATG5 , ULK1 BECN1 , ATG16L1 , ATG3 , ATG7 , ATG10 , GABARAP ve GABARAPL1 yukarı düzenlediği bildirilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak, UPR'nin genel olarak PERK/IRE1 tarafından yönlendirilen bir transkripsiyonel program aracılığıyla otofajiyi aktive ettiği çıkarımı yapılmıştır. Ek olarak, IRE1, BCL2'nin JNK aracılı fosforilasyonunu teşvik edebileceği bunun da Beclin-1'in LC3 noktalarının oluşumunu artırma yeteneğini indükleyebileceği ileri sürülmüştür(Luhr ve ark ., 2019).

Wu ve ark.(2020) Western blot analizi ile GRP78, ATF4, CHOP ve GADD34 dahil olmak üzere UPR ile ilişkili düzenleyicilerin protein düzeylerinin normal kondrositlerde düşük olduğunu göstermiştir . İlginç bir şekilde, bu dört proteinin kondrositlerdeki ifade düzeyleri, 24 saatlik TM tedavisinden sonra önemli ölçüde artmıştır. Aynı zamanda, otofajik veziküllerin çekirdeklenmesiyle ilişkili olan Beclin-1'in ifade düzeyi, 12-24 saatlik TM tedavisinden sonra önemli ölçüde artış göstermiştir. Bu arada, 12-24 saatlik TM tedavisinden sonra LC3B-II ifadesinde hızlı bir artış saptanmıştır (Western blot sonuçları, TM'nin UPR'yi ve aynı zamanda kondrositlerde in vitro otofaji aktivitesinde bir artışı indüklediğini ortaya koymuştur.

Sonuçlar bütün olarak değerlendirildiğinde otofaji inhibisyonunun insan meme hücrelerinden olan MCF7'de canlılığı azalttığı belirlenmiştir. Bu inhibisyona bağlı olarak otofaji ile ilişkili genlerde ve LC3II protein seviyesinde anlamlı bir azalma, apoptoz ilişkili genlerde ve Kaspaz-3 protein seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ve bunun yanı sıra ER stres aktivatörü olan tunikamisin otofoji ile ilişkili genlerde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Otofaji ve ER stresi arasındaki ilişkiyi net olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışma MCF7 insan meme kanseri hücrelerinde ULK-101 ve tunikamisin doz ve zaman bağımlı şekilde sitotoksik etkiye sebep olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca ULK-101 +tunikamisin kombine uygulaması sonrasında hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri baskılanmıştır. . Sonrasında LYN-1604, ULK-101, tunikamisin, LYN-1604+ULK-101, ULK-101+tunikamisin 24 saat süresince devam eden uygulamalar yapılmış ve otofajik aktivitede kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış LYN-1604 uygulamasında görülmüştür. Bu sonuçlara göre LYN-1604 hücrelerde otofojiyi indükleyen terapötik bir ajan olarak kullanılabilir olduğunu düşünmek mümkündür. Tunikamisin ve ULK-101 kombine halde uygulaması ise hücrelerde otofojiyi daha fazla azaltmıştır.

Bununla birlikte meme kanseri tedavisinde ER stres veya otofajiyi, ya da her ikisini birden hedefleyen yöntemlerin gelişiminde ve yeni moleküler adayların belirlenmesinde de faydalı olacağı düşünülmektedir. Meme kanseri, halen düşük sağkalım oranına sahip olsa da bu moleküler etkileşimlerin daha iyi anlaşılması ve hedeflenmesiyle gelecekteki tedavi yaklaşımlarında önemli bir ilerleme sağlayabilir.

7.KAYNAKLAR

- Admoun, C., & Mayrovitz, H. N. (2022). The Etiology of Breast Cancer. *Breast Cancer, August 2022*, 21–30. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-etiology>
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research, 50*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- BARAN, M., GÖKTEPE, Ö., ÖNDER, G. Ö., GONEN, Z. B., & YAY, A. (2022). KUERSETİNİN İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzeri Etkisini İncelemesi. *Ahi Evran Medical Journal, 6*(3), 261–269. <https://doi.org/10.46332/aemj.1005558>
- Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., et al. (2013). P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast, 22*(S2), S27–S29. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.005>
- Clarke, R., Cook, K. L., Hu, R., Facey, C. O. B., Tavassoly, et al. (2012). Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Cancer Research, 72*(6), 1321–1331. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3213>
- Cocco, S., Leone, A., Piezzo, M., Caputo, R., Lauro, V. et al. (2020). Targeting autophagy in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(21), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21217836>
- da Costa Nunes, G. G., de Freitas, L. M., Monte, N., Gellen, L. P. A., Santos, A. et al. (2024). Genomic Variants and Worldwide Epidemiology of Breast Cancer: A Genome-Wide Association Studies Correlation Analysis. *Genes, 15*(2). <https://doi.org/10.3390/genes15020145>
- Fan, Q. W., Knight, Z. A., Goldenberg, D. D., Yu, W., Mostov, K. et al. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell, 9*(5), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.029>
- Feng, B., Huang, X., Jiang, D., Hua, L., Zhuo, Y., & Wu, D. (2017). Endoplasmic reticulum stress inducer tunicamycin alters hepatic energy homeostasis in mice. *International Journal of Molecular Sciences, 18*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081710>
- Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D. et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *American Journal of Human Genetics, 62*(3), 676–689. <https://doi.org/10.1086/301749>
- Gasco, M., Shami, S., & Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research, 4*(2), 70–76. <https://doi.org/10.1186/bcr426>
- Guha, P., Kaptan, E., Gade, P., Kalvakolanu, D. V., & Ahmed, H. (2017). Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1. *Oncotarget, 8*(40), 68191–68207. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19277>
- İbiloğlu, İ. (2020). *Diyarbakır bölgesinde malign melanom hastalarının BRAF mutasyonu analizi BRAF mutation analysis of malignant melanoma cases in Diyarbakır , Turkey. 45*(4), 1384–1392. <https://doi.org/10.17826/cumj.732395>
- Jahan, S., Al-saigul, A. M., & Abdelgadir, M. H. (2016). Breast Cancer Breast Cancer. In *Journal of the Royal Society of Medicine* (Vol. 70, Issue 8).
- Jain, K., Paranandi, K. S., Sridharan, S., & Basu, A. (2013). Autophagy in breast cancer and its implications for therapy. *American Journal of Cancer Research, 3*(3), 251–265.
- Jin, Q., Lu, J., Wu, J., & Luo, Y. (2017). Simultaneous removal of organic carbon and nitrogen pollutants in the Yangtze estuarine sediment: The role of heterotrophic nitrifiers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science, 191*, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.04.019>
- Kania, E., Pająk, B., & Orzechowski, A. (2015). Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *BioMed Research International, 2015*(Lc3 I). <https://doi.org/10.1155/2015/352794>
- Karmacharya, U., & Jung, J. W. (2023). Small Molecule Inhibitors for Unc-51-like Autophagy-Activating Kinase Targeting Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24020953>
- Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., & Kayrın, L. (2018). Kanser Metabolizması ve Otofaji. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 27*(4), 388–396. <https://doi.org/10.17827/aktd.383576>
- Keylani, K., Arbab Mojani, F., Khalaji, A., Rasouli, A., Aminzade, D., Karimi, M. A., Sanaye, P. M., Khajevand, N., Nemayandeh, N., Poudineh, M., Azizabadi Farahani, M., Esfandiari, M. et al. (2023). Endoplasmic reticulum as a target in cardiovascular diseases: Is there a role for flavonoids? *Frontiers in Pharmacology, 13*(January), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1027633>
- Kim, J. S., Mochida, K., & Shinozaki, K. (2022). ER Stress and the Unfolded Protein Response: Homeostatic Regulation Coordinate Plant Survival and Growth. *Plants, 11*(23), 1–10. <https://doi.org/10.3390/plants1123197>
- Knobloch, H., & Knoll, W. (1991). Raman-spectroscopy and -imaging with surface-plasmon polaritons. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia, 46*(1), 389–393.

- <https://doi.org/10.1002/masy.19910460156>
- Korde, L. A., Zujewski, J. A., Kamin, L., Giordano, S. et al. (2010). Multidisciplinary meeting on male breast cancer: Summary and research recommendations. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(12), 2114–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.5729>
- Kotsopoulos, J. (2018). BRCA mutations and breast cancer prevention. *Cancers*, *10*(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers10120524>
- Lacroix, M., Toillon, R. A., & Leclercq, G. (2006). P53 and Breast Cancer, an Update. *Endocrine-Related Cancer*, *13*(2), 293–325. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01172>
- Lee, M. J., Park, J. S., Jo, S. Bin, & Joe, Y. A. (2023). Enhancing Anti-Cancer Therapy with Selective Autophagy Inhibitors by Targeting Protective Autophagy. *Biomolecules and Therapeutics*, *31*(1), 1–15. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.153>
- Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T., & Kuwano, H. (2009). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*, *16*(3), 761–771. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0260-0>
- Lindholm, D., Wootz, H., & Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*, *13*(3), 385–392. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401778>
- Logue, S. E., Cleary, P., Saveljeva, S., & Samali, A. (2013). New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*, *18*(5), 537–546. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0818-6>
- Lozy, F., & Karantza, V. (2012). Autophagy and cancer cell metabolism. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *23*(4), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.005>
- Luhr, M., Torgersen, M. L., Szalai, P., Hashim, A., Brech, A. et al.(2019). The kinase PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(20), 8197–8217. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002829>
- M Deshpande, T., Pandey, A., & Shyama, S. (2017). Review: Breast cancer and etiology. *Trends in Medicine*, *17*(1), 1–7. <https://doi.org/10.15761/tim.1000110>
- Martin, K. R., Celano, S. L., Solitro, A. R., Gunaydin, H., Scott, M. et al. (2018). A Potent and Selective ULK1 Inhibitor Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Nutrient Stress. *IScience*, *8*, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.09.012>
- Mercer, C., Hogg, P., & Kelly, J. (2022). Digital Mammography: A Holistic Approach. *Digital Mammography: A Holistic Approach*, 1–413. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-10898-3>
- Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, *13*(3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
- Mubarik, S., Wang, F., Nadeem, A. A., Fawad, M., & Yu, C. (2023). Breast cancer epidemiology and sociodemographic differences in BRICS-plus countries from 1990 to 2019: An age period cohort analysis. *SSM - Population Health*, *22*(April), 101418. <https://doi.org/10.1016/j.ssmph.2023.101418>
- Oakes, S. A. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *American Journal of Pathology*, *190*(5), 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010>
- Okulu, Y. B. (2018). *TÜRK CERRAHİ DERNEĞİ*.
- Ou, Y., Wang, M., Xu, Q., Sun, B., & Jia, Y. (2024). Small molecule agents for triple negative breast cancer: Current status and future prospects. *Translational Oncology*, *41*(January), 101893. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.101893>
- Ouyang, L., Zhang, L., Fu, L., & Liu, B. (2017). A small-molecule activator induces ULK1-modulating autophagy-associated cell death in triple negative breast cancer. *Autophagy*, *13*(4), 777–778. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1283470>
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126806>
- Purdie, C. A., Jordan, L. B., McCullough, J. B., Edwards, S. L., Cunningham, J., Walsh, M. et al. (2010). HER2 assessment on core biopsy specimens using monoclonal antibody CB11 accurately determines HER2 status in breast carcinoma. *Histopathology*, *56*(6), 702–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03533.x>
- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, *11*(11), 1956–1977. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091141>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833*(12), 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Serrano-Negrón, J. E., Zhang, Z., Rivera-Ruiz, A. P., Banerjee, A., Romero-Nutz, E et al.(2018). Tunicamycin-induced ER stress in breast cancer cells neither expresses GRP78 on the surface nor secretes it into the media. *Glycobiology*, *28*(2), 61–68. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx098>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,

- 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Singh, R., Ph, D. N., & Sain, N. (2023). *Etiology Of Breast Cancer*. 14(03), 1427–1434. <https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.03.192>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. et al. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Towers, C. G., Wodetzki, D., & Thorburn, A. (2020). Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *Journal of Cell Biology*, 219(1), 1–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201909033>
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00615-3)
- Wang, J., & Wu, S. G. (2023). Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 15(October), 721–730. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S432526>
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 151). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
- Wróbel, T., Stefanko, E., Dziatczek, J., Jaźwiec, B., Mazur, G. et al. (2014). Significance of GRP78 expression in acute myeloid leukemias. *Central European Journal of Medicine*, 9(2), 204–209. <https://doi.org/10.2478/s11536-013-0200-7>
- Wu, H., Meng, Z., Jiao, Y., Ren, Y., Yang, X. et al. (2020). The endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin affects the viability and autophagy activity of chondrocytes. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(10), 1–11. <https://doi.org/10.1002/jcla.23437>
- Yang, G., Sau, C., Lai, W., Cichon, J., & Li, W. (2015). BRAC1 and BRAC2 mutation and treatment strategies for breast cancer. *HHS Pulic Access*, 344(6188), 1173–1178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706734> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5505673>
- Yang, Y. P., Hu, L. F., Zheng, H. F., Mao, C. J., Hu, W. et al. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(5), 625–635. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.5>
- Yu, L., Shi, Q., Jin, Y., Liu, Z., Li, J., & Sun, W. (2021). Blockage of AMPK-ULK1 pathway mediated autophagy promotes cell apoptosis to increase doxorubicin sensitivity in breast cancer (BC) cells: an in vitro study. *BMC Cancer*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07901-w>
- Zarzynska, J. M. (2014). The Importance of Autophagy Regulation in Breast Cancer Development and Treatment. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/710345>
- Zhang, L., Fu, L., Zhang, S., Zhang, J., Zhao, Y., Zheng, Y. et al. (2017). Discovery of a small molecule targeting ULK1-modulated cell death of triple negative breast cancer in vitro and in vivo. *Chemical Science*, 8(4), 2687–2701. <https://doi.org/10.1039/C6SC05368H>
- Zhao, G., Kang, J., Xu, G., Wei, J., Wang, X. et al. (2020). Tunicamycin promotes metastasis through upregulating endoplasmic reticulum stress induced GRP78 expression in thyroid carcinoma. *Cell and Bioscience*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00478-0>
- Zhong, Q., Peng, H. L., Zhao, X., Zhang, L., & Hwang, W. T. (2015). Effects of BRCA1- And BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: A meta-analysis. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 211–220. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1816>
- Admoun, C., & Mayrovitz, H. N. (2022). The Etiology of Breast Cancer. *Breast Cancer*, August 2022, 21–30. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-etiology>
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- BARAN, M., GÖKTEPE, Ö., ÖNDER, G. Ö., GONEN, Z. B., & YAY, A. (2022). KUERSETİNİN İnsan Membran Hücre Hattı Üzeri Etkisini İncelemesi. *Ahi Evran Medical Journal*, 6(3), 261–269. <https://doi.org/10.46332/aemj.1005558>
- Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B. et al. (2013). P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast*, 22(S2), S27–S29. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.005>
- Clarke, R., Cook, K. L., Hu, R., Facey, C. O. B., Tavassoly, I. et al. (2012). Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Cancer Research*, 72(6), 1321–1331. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3213>
- Cocco, S., Leone, A., Piezzo, M., Caputo, R., Lauro, V. et al. (2020). Targeting autophagy in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21217836>
- da Costa Nunes, G. G., de Freitas, L. M., Monte, N., Gellen, L. P. A., Santos, A. et al. (2024). Genomic Variants and Worldwide Epidemiology of Breast Cancer: A Genome-Wide Association Studies Correlation Analysis. *Genes*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/genes15020145>

- Fan, Q. W., Knight, Z. A., Goldenberg, D. D., Yu, W., Mostov, K. et al. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell*, 9(5), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.029>
- Feng, B., Huang, X., Jiang, D., Hua, L., Zhuo, Y., & Wu, D. (2017). Endoplasmic reticulum stress inducer tunicamycin alters hepatic energy homeostasis in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081710>
- Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D. et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *American Journal of Human Genetics*, 62(3), 676–689. <https://doi.org/10.1086/301749>
- Gasco, M., Shami, S., & Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 4(2), 70–76. <https://doi.org/10.1186/bcr426>
- Guha, P., Kaptan, E., Gade, P., Kalvakolanu, D. V., & Ahmed, H. (2017). Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1. *Oncotarget*, 8(40), 68191–68207. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19277>
- İbiloğlu, İ. (2020). *Diyarbakır bölgesinde malign melanom hastalarının BRAF mutasyonu analizi BRAF mutation analysis of malignant melanoma cases in Diyarbakır , Turkey*. 45(4), 1384–1392. <https://doi.org/10.17826/cumj.732395>
- Jahan, S., Al-saigul, A. M., & Abdelgadir, M. H. (2016). Breast Cancer Breast Cancer. In *Journal of the Royal Society of Medicine* (Vol. 70, Issue 8).
- Jain, K., Paranandi, K. S., Sridharan, S., & Basu, A. (2013). Autophagy in breast cancer and its implications for therapy. *American Journal of Cancer Research*, 3(3), 251–265.
- Jin, Q., Lu, J., Wu, J., & Luo, Y. (2017). Simultaneous removal of organic carbon and nitrogen pollutants in the Yangtze estuarine sediment: The role of heterotrophic nitrifiers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 191, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.04.019>
- Kania, E., Pająk, B., & Orzechowski, A. (2015). Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. *BioMed Research International*, 2015(Lc3 I). <https://doi.org/10.1155/2015/352794>
- Karmacharya, U., & Jung, J. W. (2023). Small Molecule Inhibitors for Unc-51-like Autophagy-Activating Kinase Targeting Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24020953>
- Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., & Kayrın, L. (2018). Kanser Metabolizması ve Otofaji. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 27(4), 388–396. <https://doi.org/10.17827/akt.383576>
- Keylani, K., Arbab Mojeni, F., Khalaji, A., Rasouli, A., Aminzade, D. et al. (2023). Endoplasmic reticulum as a target in cardiovascular diseases: Is there a role for flavonoids? *Frontiers in Pharmacology*, 13(January), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1027633>
- Kim, J. S., Mochida, K., & Shinozaki, K. (2022). ER Stress and the Unfolded Protein Response: Homeostatic Regulation Coordinate Plant Survival and Growth. *Plants*, 11(23), 1–10. <https://doi.org/10.3390/plants11233197>
- Knobloch, H., & Knoll, W. (1991). Raman-spectroscopy and -imaging with surface-plasmon polaritons. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 46(1), 389–393. <https://doi.org/10.1002/masy.19910460156>
- Korde, L. A., Zujewski, J. A., Kamin, L., Giordano, S., Domchek, S. et al. (2010). Multidisciplinary meeting on male breast cancer: Summary and research recommendations. *Journal of Clinical Oncology*, 28(12), 2114–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.5729>
- Kotsopoulos, J. (2018). BRCA mutations and breast cancer prevention. *Cancers*, 10(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers10120524>
- Lacroix, M., Toillon, R. A., & Leclercq, G. (2006). P53 and Breast Cancer, an Update. *Endocrine-Related Cancer*, 13(2), 293–325. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01172>
- Lee, M. J., Park, J. S., Jo, S. Bin, & Joe, Y. A. (2023). Enhancing Anti-Cancer Therapy with Selective Autophagy Inhibitors by Targeting Protective Autophagy. *Biomolecules and Therapeutics*, 31(1), 1–15. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.153>
- Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T., & Kuwano, H. (2009). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*, 16(3), 761–771. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0260-0>
- Lindholm, D., Wootz, H., & Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death and Differentiation*, 13(3), 385–392. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401778>
- Logue, S. E., Cleary, P., Saveljeva, S., & Samali, A. (2013). New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*, 18(5), 537–546. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0818-6>
- Lozy, F., & Karantza, V. (2012). Autophagy and cancer cell metabolism. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23(4), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.005>
- Luhr, M., Torgersen, M. L., Szalai, P., Hashim, A., Brech, A., Staerk, J., & Engedal, N. (2019). The kinase

- PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. *Journal of Biological Chemistry*, 294(20), 8197–8217. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002829>
- M Deshpande, T., Pandey, A., & Shyama, S. (2017). Review: Breast cancer and etiology. *Trends in Medicine*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.15761/tim.1000110>
- Martin, K. R., Celano, S. L., Solitro, A. R., Gunaydin, H., Scott, M. et al. (2018). A Potent and Selective ULK1 Inhibitor Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Nutrient Stress. *IScience*, 8, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.09.012>
- Mercer, C., Hogg, P., & Kelly, J. (2022). Digital Mammography: A Holistic Approach. *Digital Mammography: A Holistic Approach*, 1–413. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-10898-3>
- Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, 13(3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
- Mubarik, S., Wang, F., Nadeem, A. A., Fawad, M., & Yu, C. (2023). Breast cancer epidemiology and sociodemographic differences in BRICS-plus countries from 1990 to 2019: An age period cohort analysis. *SSM - Population Health*, 22(April), 101418. <https://doi.org/10.1016/j.ssmph.2023.101418>
- Oakes, S. A. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *American Journal of Pathology*, 190(5), 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010>
- Okulu, Y. B. (2018). *TÜRK CERRAHİ DERNEĞİ*.
- Ou, Y., Wang, M., Xu, Q., Sun, B., & Jia, Y. (2024). Small molecule agents for triple negative breast cancer: Current status and future prospects. *Translational Oncology*, 41(January), 101893. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.101893>
- Ouyang, L., Zhang, L., Fu, L., & Liu, B. (2017). A small-molecule activator induces ULK1-modulating autophagy-associated cell death in triple negative breast cancer. *Autophagy*, 13(4), 777–778. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1283470>
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126806>
- Purdie, C. A., Jordan, L. B., McCullough, J. B., Edwards, S. L., Cunningham, J. et al. (2010). HER2 assessment on core biopsy specimens using monoclonal antibody CB11 accurately determines HER2 status in breast carcinoma. *Histopathology*, 56(6), 702–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03533.x>
- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 11(11), 1956–1977. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091141>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Serrano-Negrón, J. E., Zhang, Z., Rivera-Ruiz, A. P., Banerjee, A. et al. (2018). Tunicamycin-induced ER stress in breast cancer cells neither expresses GRP78 on the surface nor secretes it into the media. *Glycobiology*, 28(2), 61–68. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx098>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Singh, R., Ph, D. N., & Sain, N. (2023). *Etiology Of Breast Cancer*. 14(03), 1427–1434. <https://doi.org/10.47750/pnr.2023.14.03.192>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J. et al. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Towers, C. G., Wodetzki, D., & Thorburn, A. (2020). Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *Journal of Cell Biology*, 219(1), 1–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201909033>
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00615-3)
- Wang, J., & Wu, S. G. (2023). Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 15(October), 721–730. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S432526>
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 151). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
- Wróbel, T., Stefanko, E., Dzięczenia, J., Jaźwiec, B., Mazur, G. et al. (2014). Significance of GRP78 expression in acute myeloid leukemias. *Central European Journal of Medicine*, 9(2), 204–209. <https://doi.org/10.2478/s11536-013-0200-7>
- Wu, H., Meng, Z., Jiao, Y., Ren, Y., Yang, X., Liu, H. et al. (2020). The endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin affects the viability and autophagy activity of chondrocytes. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(10), 1–11. <https://doi.org/10.1002/jcla.23437>
- Yang, G., Sau, C., Lai, W., Cichon, J., & Li, W. (2015). BRAC1 and BRAC2 mutation and treatment strategies

- for breast cancer. *HHS Public Access*, 344(6188), 1173–1178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28706734><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5505673>
- Yang, Y. P., Hu, L. F., Zheng, H. F., Mao, C. J., Hu, W. et al. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(5), 625–635. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.5>
- Yu, L., Shi, Q., Jin, Y., Liu, Z., Li, J., & Sun, W. (2021). Blockage of AMPK-ULK1 pathway mediated autophagy promotes cell apoptosis to increase doxorubicin sensitivity in breast cancer (BC) cells: an in vitro study. *BMC Cancer*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-07901-w>
- Zarzynska, J. M. (2014). The Importance of Autophagy Regulation in Breast Cancer Development and Treatment. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/710345>
- Zhang, L., Fu, L., Zhang, S., Zhang, J., Zhao, Y. et al. (2017). Discovery of a small molecule targeting ULK1-modulated cell death of triple negative breast cancer in vitro and in vivo. *Chemical Science*, 8(4), 2687–2701. <https://doi.org/10.1039/C6SC05368H>
- Zhao, G., Kang, J., Xu, G., Wei, J., Wang, X. et al. (2020). Tunicamycin promotes metastasis through upregulating endoplasmic reticulum stress induced GRP78 expression in thyroid carcinoma. *Cell and Bioscience*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00478-0>
- Zhong, Q., Peng, H. L., Zhao, X., Zhang, L., & Hwang, W. T. (2015). Effects of BRCA1- And BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: A meta-analysis. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 211–220. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1816>

8. EKLER

8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 175

Toplantı Tarihi: 05 Mayıs 2023

Karar Sayısı: 2023/4319: (Başvuru ID: 14099) N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN'un "Otofaji - ER Stres Etkileşiminin Meme Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonu ve Metastazı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezi ile ilgili 30.04.2023 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Yüksek lisans öğrencisi Sona EMINOVA'nın tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN'un sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN

Yardımcı Araştırmacılar: Yüksek Lisans Öğrencisi Sona EMINOVA

ASLI GİBİDİR
05.05.2023

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı