

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELATONİNİN
MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDEKİ
OTOFAJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hüseyin DÖNMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK

KONYA – 2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELATONİNİN
MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDEKİ
OTOFAJİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hüseyin DÖNMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından proje numarası: **13202029** ile desteklenmiştir.

KONYA - 2014

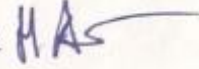
ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Hüseyin DÖNMEZ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

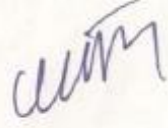
Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Hasan ACAR
Selçuk Üniversitesi



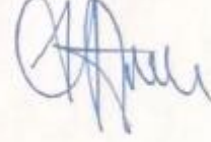
Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK
Selçuk Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ii.ÖNSÖZ

Kanser için geleneksel kemoterapi ve radyoterapiler, özellikle hızlı bölünen hücreleri hedef almaktadır. Çünkü çoğu kanser hücresi köken aldığı normal sağlıklı hücrelerden daha hızlı çoğalır. Ancak, tedaviler vücudumuzdaki normal kök hücreler ve çoğu diğer hücreler gibi yavaş bölünen hücrelere zarar vermeyecek şekilde dizaynedilmeye çalışılıyor. O zaman buna karşı görünen çözüm, spesifik olarak kanser kök hücrelerini hedef alan tedavilerin geliştirilmesi olacaktır.

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından proje no: **13202029** desteklenmiştir.

Bu tez çalışmasında beni yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a, yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. Hasan ACAR'a ve desteğinden dolayı Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya, bu tezin hazırlanmasında farklı bakış açılarıyla ve deney aşamalarındaki her zorlukta destek veren Prof. Dr. Aydın GÜZELOĞLU ve Doç. Dr. Ercan KURAR hocalarıma, tezin optimizasyon aşamalarında tecrübeleri ile her daim yardımcı olan doktora öğrencisi Vildan Betül YENİGÜN'e ve maddi manevi desteklerinden dolayı tüm Tıbbi Genetik Anabilim dalı ekibi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tezi ve sarf ettiğim emeklerimi, desteklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem Ayşe DÖNMEZ ve babam Abdullah DÖNMEZ'e ithaf ediyorum.

BEYAN

Bu tez metninin, atıfta bulunulanların dışında daha önce başka biri tarafından yayınlanmış çalışma kısmen veya tamamen atıf göstermeksizin kullanılmadığını beyan ederim. Bu tezdeki sonuçlar, başka herhangi bir derece veya diploma için sunulmamıştır.

Hüseyin DÖNMEZ

iii.İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	i
ii.ÖNSÖZ	ii
iii.İÇİNDEKİLER.....	iii
iv.SİMGELER ve KISALTMALAR	v
1.GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanseri	4
1.1.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	4
1.1.2. Meme Kanserinin Histopatolojisi, TNM Sınıflanması ve Evrelemesi.....	6
1.2. Meme Kanseri Kök Hücreleri	9
1.2.1.Kanser Kök Hücrelerinin Tarihçesi	9
1.2.2.Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Özellikleri	10
1.3.Meme Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyon Teknikleri	12
1.3.1.Side-Populasyon Tekniği.....	12
1.3.2.Tümörfaz (Tumorspheres).....	12
1.3.3. Aldehit Dehidrogenaz	13
1.3.4.CD44 ⁺ , CD24 ^{-/düşük} Fenotipi	13
1.4.Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	14
1.4.1.Apoptoz	14
1.4.2.Otofaji.....	16
1.5.Otofaji ve Kanser Kök Hücreleri	19
1.5.1.Hipoksi ve Açlık Bağımlı Otofaji: Mikroçevre Stresine Karşı Kanser Kök Hücrelerinin Sito-koruyucu Mekanizması	19
1.5.2.Açlık Bağımsız Otofaji: Kanser Kök Hücrelerinde İntrinsik Metabolik Mekanizması	21
1.6.Melatonin	21
1.7.Melatonin ve Kanser	25
2.GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1.Hücre Kültürü.....	30

2.2.Hücre Sayımı.....	30
2.3.Canlılık Analizi	31
2.4.Etken Maddeler ve Muameleleri	31
2.5. Apoptoz Analizi	32
2.6. Kök Hücre İzolasyonu	32
2.7. Tümörfaz (Sphere) Oluşumu.....	33
2.8.Otofaji Analizi.....	33
2.8.1.İmmunofloresans Analizi	34
2.8.2.Western Blot Analizi	34
2.9.İstatistiksel Analizler	37
3.BULGULAR	38
3.1. Hücre Kültürleri	38
3.2.Proliferasyon ve Canlılık Analizlerinin Optimizasyonu.....	38
3.2.1.Melatonin Kanser Hücrelerinde Proliferasyonu ve Canlılığı Azaltır.....	40
3.3. Akış-sitomerti Kök Hücre İzolasyonu ve Tümörfaz (Sphere) Oluşum Optimizasyonu	42
3.4.Otofaji Analizi İçin İmmünofloresan Optimizasyonu	46
3.4.1.Melatonin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki LC3 Agregasyon ve Otofajik Vakuollerin Oluşumunu Tetikler	47
3.5.Western Blot ile LC3-I'in LC3-II'ye Dönüşüm Optimizasyonu	51
3.5.1.Melatonin, Meme Kanseri Kök Hücrelerinde LC3-I'in LC3-II'ye Dönüşümünü Uyarır	52
4.TARTIŞMA.....	55
5.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
6. ÖZET.....	60
7.SUMMARY	61
8.KAYNAKLAR	62
9.EKLER.....	66
10.ÖZGEÇMİŞ.....	69

iv.SİMGELER ve KISALTMALAR

6-HMS	6-hidroksimelatoninsülfat
ABCG2	ATP Bağlayıcı Kaset
AIF	Apoptoz Teşvik Edici Faktör
ALDH1	Aldehit Dehidrojenaz 1
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APS	Amonyum Persülfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Otofaji İlişkili Genler
ATP	Adenozin Trifosfat
BAX	BCL2-Associated X Protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BECN	Beclin 1 Otofaji İlişkili
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT	Epitelyal'dan Mezenkimal'e Geçiş
ER	Östrojen Reseptör
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas (TNFRSF6)-Associated Via Death Domain
FBS	Fetal Dana serum
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
hTRET	Human Telomerase Reverse Transcriptase
hVps34	İnsan Vakuolar Protein Sıralı Faktör Proteinini 34
IC50	Yarı-maksimum İnhibe edici Konsantrasyon
IL-1	İnterlökin-1
IL-12	İnterlökin-12
IL-6	İnterlökin-6
LC3-II	Mikrotübül ilişkili protein hafif zincir 3
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog

MPs	Matriks Metalloproteinazlar
MT1	Melatonin Reseptör 1
MT2	Melatonin Reseptör 2
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NOD	Non-Obese Diabetic
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Fosfoinositid 3-Kinaz
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PR	Progesteron Reseptör
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RHT	Retinohypothalamic Tract
ROS	Reactive Oxygen Species
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBS-T	Tris Buffered Saline - Twen20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
VTA	Ventral Tegmental Alan

1.GİRİŞ

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık ölüm nedeni olarak majör sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Dünya sağlık örgütü [World Health Organization (WHO)] raporuna göre, Dünya genelinde kansere bağlı ölümler 2000 yılında 6 milyon iken, bu sayı 2005 yılında 7,6 milyona, 2007 yılında ise 7,9 milyona yükselmiştir. Buna bağlı olarak 2000-2007 yılları arasındaki artışın % 32 olduğu hesaplanmıştır. 2008 yılında Dünya genelinde yaklaşık 12,7 milyon kanser vakası belirlenmiş ve yine bu yıl içerisinde 7,6 milyon insanın kanserden öldüğü rapor edilmiştir (Jemal ve ark 2011). Bu ölüm insidansında ilk sırada akciğer kanseri (1,4 milyon) bulunmakta bunu sırasıyla mide kanseri (740,000), karaciğer kanseri (700,000), kolorektal kanser (610,000) ve meme kanseri (460,000) takip etmektedir (World Health Organization 2011). Bunlar arasında meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olup ölüm insidansı açısından da kadınlar arasında ikinci sırada yer almaktadır.

Kansere karşı etkin tedavi protokolleri geliştirilmesi çalışmalarında son 30 yılda bazı kanser türlerinde önemli gelişmeler sağlanmasına rağmen, genel başarı oranına bakıldığında beş yıllık sağ kalım açısından önemli bir ilerlemenin sağlanmadığı görülmektedir (Jemal ve ark 2010). Bu durum ve Dünya genelinde artan kanser insidansı kansere yaklaşım ve tedavide yeni yaklaşımların oluşturulması gereğini doğurmuştur. Bu yönde yapılan çalışmalarda elde edilen veriler giderek artan bir oranda kanserin kök hücre özelliği taşıyan bir grup hücre tarafından oluşturulduğunu göstermiş ve bu hücreler daha sonra kanser kök hücreleri olarak adlandırılmıştır (Dick 2009, Reya ve ark 2001).

Yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerinin sitotoksik ajanlara ve radyasyona karşı intrinsik veya kazanılmış bir direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu direncin altında yatan mekanizmaların DNA hasarını tanıma ve onarma kabiliyetindeki artış, apoptotik yollardaki aktivite azlığı, kemoterapötik ajanların hücre içerisine alınmasındaki yetersizlik veya bu ajanların hücre dışına atılımındaki artışa bağlı olabileceği rapor edilmiştir (Gottesman ve ark 2002, Guzman ve ark 2001). Bununla birlikte bazı dokularda kanser kök hücrelerinin hücre döngülerini yavaşlatarak sesiz duruma geçtikleri ve dormant bir karakter sergiledikleri görülmüştür (Guan ve ark

2003, Kusumbe ve Bapat 2009). Bu durum proliferatif aktivite gösteren hücrelerin hedeflendiği tedavilere karşı kanser kök hücrelerinin direnç göstermesinin nedenlerinden biri olarak kabul edilmiştir. CD133 glioblastoma kanser kök hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada radyoterapi sonrasında bu hücrelerin sayısında belirgin artış olduğu saptanmıştır (Bao ve ark 2006).

Kanser kök hücrelerini hedefleyen tedaviler genellikle; a) kanser kök hücreleri yüzey markırlarına selektif antikorlar aracılığıyla kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi, b) kendini yenilemede (self-renewal) etkin sinyal yollarının bloklanması, c) kemoterapi ve radyoterapiye direnç sağlayan yolların engellenmesi, d) kanser kök hücrelerinin diferansiyasyon yönünde indüksiyonu şeklinde biçimlenmeye başlamıştır (Bao ve ark 2006, Zhou ve ark 2009). Kanser kök hücrelerinin yüzey markırları yoluyla hedeflendiği yaklaşımlar bu yüzey markırlarının normal hücrelerde de eksprese edilmesi dolayısıyla güçlükler taşımaktadır.

Genel olarak bakıldığında son on yılda yapılan çalışmalar otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma gibi fizyolojik hücresel olaylarda ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında rol oynadığını göstermektedir (Shintani ve Klionsky 2004, Mizushima ve ark 2008, Rajawat ve Bossis 2008). Ayrıca araştırmalar, hücrelerdeki otofaji bozukluklarının kas hastalıkları, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve Huntington, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların etiolojisinden sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (Rubinsztein ve ark 2007). Fakat bunlara karşın kontrolsüz otofajinin hücre ölümlerine yol açarak hastalıkların patolojik etkilerine katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (Yorimitsu ve Klionsky 2007).

Kanser ve otofaji arasındaki ilişkinin araştırıldığı birçok çalışmada, büyüme faktörlerinden yoksun tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin ölümden otofaji ile kaçtığı ve hücrelerdeki otofaji inhibe edildiğinde, hücrelerin apoptoz ile öldüğü gözlenmiştir (Boya ve ark 2005, Lum ve ark 2005). Otofajinin tümör hücrelerini ölümden koruyan bir mekanizma olduğuna dair hipoteze karşı otofajinin kanser oluşumunu önleyici rolünü gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Kanser

hücrelerinde normal hücelere kıyasla daha az otofaji gözlenmektedir. Atg proteinlerinden LC3-II ve beclin-1 proteinin kanser hücelerinde ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. *BECN* geninde meydana gelen hasar sonrasında tümör oluşumunda artış olduğu ve *BECN*'nin aşırı ekspresyonunun tümör oluşumunu azalttığı bilinmektedir.

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine); çeşitli fizyolojik fonksiyonları ile filogenetik açıdan iyi korunmuş bir moleküldür (Lee ve ark 2009). Öncelikle epifiz bezinde üretilen ve kana salgılanan doğal bir üründür. Melatoninin aynı zamanda monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere, çeşitli hüceler tarafından üretilir ve enflamasyona karşı koruma yönünde etkinliği gösterilmiştir (Lee ve ark 2009, Guney ve ark 2007). Melatonin antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-tümör aktivite göstermesi sebebiyle biyolojik etkileri geniş bir yelpazeye sahiptir (Dominguez-Rodriguez ve Breu-Gonzalez 2011, Hill ve ark 2011, Gonzalez ve ark 2011). Melatonin ayrıca, insan kanserlerinde potansiyel kemoterapötik bir etkiye sahiptir. Hücre hayatta kalma, proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili çeşitli sinyal transdüksiyon yollarını etkileyecek yeteneğe sahip olacağı gösterilmiştir (Um ve ark 2011, Dai ve ark 2008). Ancak melatonin moleküler etki mekanizması henüz tam olarak ortaya konmamıştır.

Han ve arkadaşları (2008) otofajik yanıtları iskemik hasar sonrası endotel hasarına neden olan nitrozatif stres ile ilişkili olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışma, sıçanlarda mikro embolizma oksijen-glikoz yoksunluğu kullanılarak in vitro ve in vivo olarak gerçekleştirilmiştir. İn vivo ve in vitro her iki düzenekte de otofajinin, nitrozatif gerilme derecesine göre yükseldiği gözlenmiştir (Han ve ark 2008). Melatonin uygulamasından sonra otofajik işlemlerinde kısmi bir azalma olduğunu rapor edilmiştir. Koh (2011)'un yaptığı bir çalışmada, melatoninin mTOR sinyal yolu aktivasyonu ile iskemik beyin hasarını önlediği gösterilmiştir (Koh 2011). mTOR proteinin, hücre büyümesi ve hücre döngüsünün ilerlemesinde merkezi bir regülatör rolü olduğu bilinmektedir ve buna ek olarak, mTOR yolağının otofaji üzerinde inhibitör etkisi olabileceği düşünülmektedir.

1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür. Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanseri kadınlarda en sık kanser tanısı konulan kanserdir. Tüm kanser teşhislerinin %30'unu ve kansere bağlı ölümlerin %16'sını oluşturur. Tüm dünyada özellikle gelişmiş ülkelerde temel sağlık problemidir. Meme kanseri sıklığı ülkeden ülkeye farklılık gösterir örneğin Asya ülkelerinde en düşük oranda görülürken batı ülkelerinde en yüksek oranda görülür (Abelof ve ark 2004). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre meme kanseri % 37,6 ile en sık görülen kanserdir (www.saglik.gov.tr).

Meme kanseri normal epitel hücrelerin malignant transformasyonuna neden olan kompleks genetik ve epigenetik olaylar sonucu oluşur. Epigenetik değişimler meme kanserine yol açan temel mekanizmalardan birisidir ve meme kanseri oluşumu tetikleyen çeşitli tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında anahtar rol oynar.

Birçok çalışma yapılmasına rağmen, meme kanserinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte genetik, çevresel, hormonal faktörlerin meme kanseri oluşumunda rol aldığı bilinmektedir. Meme kanseri oluşumunda pek çok risk faktöründen söz edilmektedir.

1.1.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserine neden olan risk faktörlerini çevresel ve genetik faktörler olarak iki grupta incelenebilir. Bununla birlikte; yaş, cinsiyet, erken menarj ve geç menapoz, doğum öyküsü, alkol tüketimi, yağlı diyet ve şişmanlık, radyasyon, doğum kontrol haplarının kullanılması, menopoz sonrası hormon tedavisi hikayesi olmak üzere özetlenebilir. Genetik faktörler ise aile temelli faktörler veya *de novo* genetik faktörler olabilmektedir. Bunları ayrı ayrı ele aldığımızda;

Yaş: İleri yaş önemli bir risk faktörüdür. 30 yaşına kadar meme kanseri insidansı oldukça düşükken 80 yaşına kadar doğrusal bir şekilde artış gösterir (Singletary 2003).

Cinsiyet: Tüm meme kanserlerinin %99'u kadınlarda %1 kadarı da erkeklerde görülür (Ying ve ark 2005).

Erken Menarj ve Geç Menopoz: Meme kanseri riski, menarj ve menopoz yaşıyla oldukça ilişkilidir. Erken menarj (12 yaştan küçük) meme kanseri riskini %10 ila 20 artırırken menopozda (55 yaştan büyük) her geciken bir yıl riski yaklaşık %3 artırdığı bildirilmiştir (Oldenburg ve ark 2007).

Doğum Öyküsü: Hiç doğum yapmamış kadınlar ve ilk canlı doğumunu 30 yaşından sonra yapmış kadınlar artmış meme kanseri riskine sahiptirler (Singletary 2003). 20 yaşından önce ilk canlı doğum 35 yaşından sonraki ilk doğumdan %50 daha düşük meme kanseri riskine sahiptir. İlaveten 3 veya daha fazla doğum yapan kadınlar hiç doğum yapmamış kadınlardan daha düşük riske sahip olduğu rapor edilmiştir (Abeloff ve ark 2004).

Alkol Tüketimi: Alkol alınması estradiol serum seviyesini artırabilir, bu da dolaylı yoldan östrojen hormonuna maruz kalmayı artırarak meme kanseri gelişimini artırdığı öne sürülmüştür (Martin ve Weber 2000).

Yağlı Diyet Ve Şişmanlık: Obezite, menopoz sonrası (postmenopoz) kadınlarda meme kanseri riskini artırır. Çünkü adipoz doku önemli bir östrojen kaynağıdır ve obez kadınlarda endojen östrojen seviyesi yüksektir (Oldenburg ve ark 2007).

Radyasyon: Meme bezinin yüksek doz iyonize radyasyona maruz kalması, meme kanseri riskini artırır (Oldenburg ve ark 2007).

Doğum Kontrol Haplarının Kullanılması: Doğum kontrol haplarının kullanımı meme kanseri riskini çok hafif artırır. Bu risk hapların kullanımı kesildiği zaman ortadan kaybolur (Abeloff ve ark 2004).

Menopoz Sonrası Hormon Tedavisi: Menopozal semptomların kontrol edilmesi ve osteoporozun önlenmesi için eksik hormonu yerine koyma tedavisi yapılır (Singletary 2003). Uzun süreli aralıksız hormon kullanılması durumunda risk artmaktadır. Ancak kısa süreli kullanım (<5 yıl) postmenopozal semptomların

giderilmesi için kullanılabilir. Bir risk artışına sebep olmadığı tespit edilmiştir (Abeloff ve ark 2004).

Ailede Meme Kanseri Hikâyesi: Aile yakınları arasında meme kanserine yakalanmış kadınların, meme kanserine yakalanma riski, diğer kadınlara göre daha fazladır. Riski belirleyen ise akrabalık derecesi (birinci veya ikinci), akrabada meme kanserinin ortaya çıktığı yaş ve etkilenen akraba sayısıdır. 50 yaş ve üzerinde meme kanseri geliştiren birinci derece akrabaya (anne, baba, kardeşler vb) sahip bireyler 1,8 nisbi riske sahipken 50 yaş altında meme kanseri geliştiren birinci derece akrabaya sahip bireyler 3,3 nisbi riske sahiptir. İkinci derece akrabası meme kanserine yakalanmış olan bireyler 1,5 nisbi riske sahiptir. Anne ve kız kardeş gibi iki tane birinci derece akrabası meme kanserli olan bireylerde nisbi risk 3,6'dır (Singletary 2003).

1.1.2. Meme Kanserinin Histopatolojisi, TNM Sınıflanması ve Evrelemesi

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv olmak üzere iki ana gruba ayrılır. İn-situ (invaziv olmayan) tipte tümör duktus bazal membranı içindeyken, invaziv durumda tümör hücreleri bazal membranı aşarak stroma içerisine yayılmıştır (Dizbay ve Perçinel 2008). Meme kanserinin %90'dan fazlası invaziv karsinom özelliğindedir.

2003 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) tarafından invaziv karsinom; invaziv duktal karsinom, invaziv lobuler karsinom, tubuler karsinom, invaziv kribriform karsinom, medüller karsinom, müsinöz karsinom, invaziv papiller karsinom, invaziv mikropapiller karsinom, apokrin karsinom, Sekretuar (juvenil) karsinom, adenoid kistik karsinom, metaplastik karsinom ve nöroendokrin karsinom olarak sınıflandırılmıştır (WHO 2003).

İnfiltratif duktal karsinom, invaziv meme karsinomlarının en sık gözlenen formudur ve hastaların yaklaşık %75'ini oluşturur (Meisner ve ark 2008). Genellikle 50'li yaşlarda görülür ve tümör büyüklüğü birkaç mm ile 14 cm arasında değişiklik gösterir. Makroskobik olarak daha sık görülen yıldız şeklinde veya iyi sınırlı olabilir.

Mikroskopik özellikleri ise; tümör sınırları infiltratif veya itilme şeklinde olabilir, bazal lamina bulundurmaz (Tolunay 2005).

Meme kanseri evrelemesinde AJCC 2002 (American Joint Committee on Cancer) evreleme sistemi kullanılmaktadır ve TNM (Tümör-Nod-Metastaz) sınıflamasına göre yapılmaktadır (Greene ve ark 2002).

Meme kanserinde TNM sınıflaması açıklamaları;

Primer tümör

Tx: Değerlendirilemeyen primer tümör

To: Primer tümöre ait bulgu yok

Tis: In situ karsinom

Tis (DKIS): Duktal karsinom in situ

Tis (LKIS): Lobuler karsinom in situ

Tis (Paget): Meme başının paget hastalığı(primer başka tümör yok)

T1: En büyük çapı < 2,0 cm tümör

T1mic: En büyük çapı < 0,1 cm mikroinvazif tümör

T1a: Tümör çapı > 0,1 cm, ancak < 0,5 cm

T1b: Tümör çapı > 0,5 cm, ancak < 1,0 cm

T1c: Tümör çapı > 1,0 cm, ancak < 2,0 cm

T2: Tümör çapı > 2,0 cm, ancak < 5,0 cm

T3: Tümör çapı > 5,0 cm

T4: Göğüs duvarı (GD) (a) veya deri (b) tutulumu

T4a: Göğüs duvarına invazyon

T4b: Memede ödem (portakal kabuğu görüntüsü ile peau d'orange) veya cilt ülseri veya aynı memede uydu (satellit) cilt nodüllerinin olması

T4c: T4a ve T4b birlikte

T4d: İnflamatuar meme karsinomu

Bölgesel lenf nodları (N)

Klinik sınıflama

- NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
- N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
- N1: Hareket edebilen ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz

- N2: Birbirine veya çevreye yapışık ipsilateral aksiller lenf nodu metastazı veya klinik olarak aksilla (-) ancak ipsilateral internal mamaryan lenf nodu metastazı
- N2a: Birbirine veya çevreye yapışık aksiler ipsilateral lenf nodu metastazı
- N2b: Klinik olarak aksilla (-) iken, klinik ipsilateral internal mamaryan lenf nodu metastazı
- N3: İpsilateral aksiller lenf nodu tutulumu ile birlikte internal mammaryan lenf nodu metastazı veya infraklaviküler lenf nodu metastazı veya supraklaviküler lenf nodu metastazı.
- N3a: İpsilateral infraklaviküler lenf nodu metastazı
- N3b: İnternal mamaryan lenf nodu ve birlikte aksiller lenf nodu metastazı
- N3c: İpsilateral supraklaviküler lenf nodu metastazı

Uzak metastaz (M)

- MX: Uzak metastaz belirlenmiyor
- M0: Uzak metastaz yok
- M1: Uzak metastaz

Çizelge 1.1. AJCC 2002 Meme Kanseri Evrelemesi

Evre 0	Tis, N0, M0
Evre I	T1, N0, M0
Evre IIA	T0, N1, M0 / T1, N1, M0 / T2, N0, M0
Evre IIB	T2, N1, M0 / T3, N0, M0
Evre IIIA	T0, N2, M0 / T1, N2, M0 / T2, N2, M0 / T3, N1, M0 / T3, N2, M0
Evre IIIB	T4, N0, M0 / T4, N1, M0 / T4, N2, M0
Evre IIIC	Herhangi bir T, N3, M0
Evre IV	Herhangi bir T, herhangi bir N, M1

Son yıllarda yapılan çalışmalarda tümörün biyolojisinin TNM sisteminden daha karmaşık olduğu ve tümörlerin anatomik yapıları ile biyolojik davranışını tahmin etmenin doğru bir yol olmadığı bildirilmektedir (Baratelli 2007). Sporadik meme kanserleri arasında gen ifadesi farklılıklarının belirlenmesi üzerine meme tümörleri dört ana sınıfa ayrılmıştır (Perou ve ark 2000).

1. Luminal hücre benzeri: Luminal A ve B olmak üzere iki gruba ayrılmakla birlikte A grubu B grubundan daha fazla östrojen reseptör (ER) eksprese eder. Her iki grupta düşük düzeyde *HER2* eksprese eder.

2. Bazal hücre benzeri: Bu grup ‘üçlü’ negatif meme kanseri (östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR), *HER2* negatif) fenotipine sahiptir.

3. *HER2* pozitif grup

4. Normal epitel benzeri

1.2. Meme Kanseri Kök Hücreleri

1.2.1.Kanser Kök Hücrelerinin Tarihçesi

Kanser kök hücreleri (KKH), normal kök hücrelerinin karakteristik özelliklerine sahiptir. KKH özellikleri arasında az bir kanser dokusunda bulunsa da tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip olan bir hücre grubudur. Kanser kök hücreleri tümöröjeniktirler ve böylece tümör oluşturma özelliğine sahiptirler. Kanser kök hücreleri, kendini yenileme ve birçok hücre tipine farklılaşma gibi kök hücre işlemleri aracılığıyla tümör oluşturabilirler (Charafe-Jauffret ve ark 2009).

Kanser kök hücre hipotezi, tümörün küçük bir hücre grubu tarafından başlatıldığı ve sürdürüldüğünü önerir. Ancak bu tümöröjenik hücrelerin kaynağı hali hazırda bilinmemektedir. KKH teorisi iki büyük konsept ile karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan birisi; kanserler hem çocuk hem de erişkin dokularda var olan kök hücrelerden meydana gelir. Bazı araştırmacılar bu teoriye destek olarak gelişim sürecinde kök hücre popülasyonunda kanser kök hücrelerinin bir mutasyon sonucunda oluştuğunu söylemektedirler (Klonisch ve ark 2008). Gelişmekte olan bu kök hücre popülasyonunun mutasyona uğradığını ve daha sonra yayıldığını ki böylece mutasyona uğramış kök hücrelerden türeyen hücrelerde bu mutasyonun paylaşılma olduğunu iddia etmektedir (Wang ve ark 2009). Alternatif bir teori ise, transforme olan ve farklılaşan hücrelerin kök hücre benzeri karakteristik özellikleri kazanmalarıdır (Santisteban ve ark 2009). Bu hipotez Epitelyal’dan Mezenkimal’e Geçiş (EMT) olarak da adlandırılmaktadır. Bu hücrelerin kökeninin ve biyolojisinin

saptanması, kanserin tekrarlama riskini azaltan tedavilerin geliştirilmesi için önem arz etmektedir.

Kanser kök hücreleri ilk kez John Dick ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (John Dick ve ark 2001). Bu araştırmacılar, lösemik hücrelerin büyümesi ve yayılmasının; lösemi hücrelerinin kendini sürekli yenileyebilme kabiliyetine sahip küçük bir hücre grubu tarafından yapıldığı tespit etmişlerdir (John Dick ve ark 2001). Daha sonra bu hücre grubunu kanser kök hücreleri olarak adlandırmışlardır (Charafe-Jauffret ve ark 2008). Weissman ve ark (2001) yaptıkları çalışmalarında, tümör kök hücrelerinin durdurulması lösemnin tekrar etmesinden koruduğunu vurgulamışlardır. O zamandan itibaren kanser kök hücreleri, karsinogenezin önemli bir parçası olarak tanımlanmış ve meme, beyin, deri, baş boyun, troid kanseri gibi birçok kanser türlerinden de izole edilmiştir (Patrawala ve ark 2005).

1.2.2.Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Özellikleri

KKH; beyin, kan, deri, baş ve boyun, tiroit, rahim ağzı, akciğer, retina, mide-bağırsak ve üreme sistemleri organlarındaki kanserlerde tanımlanmıştır. Ayrıca kanser kök hücreleri göğüs kanserlerinde de tanımlanmıştır. Meme bezinin gelişiminde ve meme biyolojisinde kök hücrelerin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Meme kök hücreleri memenin büyük plastisitesinin elde edilmesi için gereklidir. Bu durum, meme bezinin özellikle karsinogenezise eğilimli ve bu olayda meme kanseri kök hücrelerinin önemli bir rol oynadığı gösterilmektedir. Meme kanserinde kanser kök hücreleri hipotezi; kanser kök hücrelerinin anormal ve sınırlı şekilde hücreler üretebileceğini varsayar. Epigenetik değişiklikler ve onkojenik olaylar tümör farklılaşmasını etkileyebilmektedir (Charafe-Jauffret ve ark 2008).

KKH diğer kanserlerde de olduğu gibi, meme kanserinin önlenmesi, tanısı ve tedavisinde temel etkileri olabilen, kan damarı oluşumunu teşvik eden, hücre motilitesini destekleyen ve çeşitli tedavilere direnç gösteren belirli özellikler sergilemektedir. Çalışmalar ışığında meme kanseri kök hücrelerinin daha yavaş sikluslarla kendini yenileyebildiğini ve kemoterapiye karşı daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Fillmore ve Kuperwasser 2008). Ayrıca, hem mezenkimal kök hücrelerin hem de meme kanseri kök hücrelerinin ilaç ve radyasyona karşı direnç ile

bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Dean ve ark 2005). Kemoterapi ve radyasyon farklılaşmış hücreleri öldürmek için günümüzde kullanılan geleneksel tedavilerdir. Bu terapiler tümör kitlesini küçültmekte fakat kanseri başlatan hücreleri öldürmede başarısız olmaktadır. KKH'leri, kemoterapiye oldukça direnç gösteren bir mekanizmaya sahip olmasıyla normal kök hücrelerle benzer özellikler göstermektedir. Bu özellikler, nispi hareketsizliği, *BCL-2* ailesi proteinlerinin artan ekspresyonunu, çoklu ilaç direnci ve aktif DNA tamir mekanizması gibi membran taşıyıcılarının artan ifadelerini içerdiği gösterilmiştir (Zhou ve ark 2001, Charafe-Jauffret ve ark 2008). Sitotoksik direnç, genellikle hücrelerde ilaç pompalarının artan ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Meme kanseri direnci ile ilişkili BCRP (Meme Kanseri Rezistans Proteinler) ve PGP (P-Glikoprotein) olmak üzere iki pompa vardır (Hait ve Yang 2005). Antimitotik kemoterapiler, kök hücrelerde olgun tümör hücrelerine kıyasla daha az etki göstermektedir. Ayrıca, farklılaşmış hücreler serumsuz süspansiyonda ölürken, kök hücreler bu ortamda dayanıklı, büyüyen ve tümörfaz olarak bilinen koloni oluşumunu gerçekleştirirler. Solid tümörlerde, bu tümör hücrelerinin sadece küçük bir bölümünün, vitroclonogenic deneylerle koloni oluşturabileceği gösterilmiştir. Koloni oluşturabilen bu hücrelerin, meme kanserindeki metastaz ve mortalitenin gelişimi arasındaki ilişkisi gösterilmiştir (Charafe-Jauffret ve ark 2008).

Kanserli kök hücreleri etkilemeyen tedaviler, tedaviye dirençli hücrelerin oluşumu ve kanserin yeniden ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle, kök hücreler gibi davranan kanser hücrelerinin keşfi ile kanserin tamamen tedavisinin neden zor olduğununun olası bir açıklamasını sunmaktadır ve bundan dolayı yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına yön vermektedir. Antikanser tedavisi, farklılaşan kanser hücrelerinin etkilerini ve kanser kök hücrelerini başarılı bir şekilde ortadan kaldırması gerekmektedir. Sonuç olarak, kanser kök hücre belirteçlerinin tanımlanması ve hedeflenen kemoterapinin kullanılması kanser araştırmalarında çok önemlidir.

1.3.Meme Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyon Teknikleri

1.3.1.Side-Populasyon Tekniği

Kök hücrelerin Hoechst ya da rhodamine gibi boyaları hücre dışına atabilirler. Bunu p-glikoproteinler ya da BCRPs (Breast Cancer Resistant Proteinler) gibi membran taşıyıcı proteinlerinin artmış ekspresyonu ile yaparlar. Boyanın hücre dışına bu şekilde atılması, meme epitel hücrelerinde side–popülasyon (SP) olarak tanımlanan bir alt grubu ortaya çıkarır. Memedeki SP'nin multipotent özelliği, transplante edildikleri farelerde meme dokusunu oluşturmaları ile anlaşılmıştır. Mammoplasti ya da memenin iyi huylu hastalıkları için yapılan cerrahilerinden elde edilen dokularda, fare meme bezinekinde benzer SP özelliğinde alt grup tespit edilmiştir. Bu SP tekniği ile meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'den kök hücre izole edilmiştir. İzole edilen bu popülasyon yüzdesi, toplam hücrelerin %2'si kadar olup diğer hücrelerden daha fazla kanser oluşturduğu gözlenmiştir. Bu bölgedeki hücre popülasyonunun aynı zamanda kök hücre özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir (Patrawala ve ark 2005).

1.3.2.Tümörfaz (Tumorospheres)

Bu teknik daha çok farklılaşmış hücrelerin serumsuz süspansiyon koşullarında ölürken, kök hücre ve projenitör hücrelerinin hayatta kalıp yaşamlarına devam etmesi özelliğine dayanmaktadır. Solid tümörlerde, hücrelerin sadece küçük bir kısmı in vitro ortamda klonojenik koloni oluşturmalarının mümkün olduğu gösterilmiştir. Soft agarda yapılan çalışmalarda bu koloni oluşturan grubun en tümorojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Wolman ve ark 1997). Ayrıca, bu popülasyonun spesifik yüzey belirteçleri olan CD44⁺, CD24⁻ bakımından zengin olduğu ve kök benzeri bu hücrelerin mamosferi oluşturma yeteneği olduğu gösterilmiştir (Hwang-Verslues ve ark 2009, Engelmann ve ark 2008).

1.3.3. Aldehit Dehidrogenaz

Bu yöntem, son zamanlarda normal, tümöral meme kök ve projenitör hücreleri izole etmek için kullanılmıştır. Bu hücre içi aldehitlerin oksidasyonundan sorumlu detoksife enzim olan aldehit dehidrojenazı 1 (ALDH1)'in enzimatik aktivitesine dayanmaktadır. ALDH1'in retinol oksitleyici rolü sayesinde kök hücrelerin erken farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır (Sophos ve Vasiliou 2003). ALDEFLUOR deneyi ile tespit edilen ALDH aktivitesi, hem normal hem de KKH'leri için ortak bir belirteç olabilir. Bu yöntemle lösemi ve multiple miyelomda başarıyla kök hücreler izole edilmiştir (Matsui ve ark 2004).

Hem normal hem de tumoral insan meme hücrelerinden izole edilen ALDEFLUOR-pozitif hücler meme kök hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel karakteristiğini gösterdiği gösterilmiştir (Sophos ve Vasiliou 2003). Bununla birlikte, insan meme tümörlerinden izole edilen ALDEFLUOR-pozitif hücrelerin KKH içerdiği ve NOD/SCID farelerde tümör oluşturduğu gösterilmiştir (Ginestier ve ark 2007).

1.3.4. CD44⁺, CD24⁻/^{düşük} Fenotipi

CD44 antijeni hücre-hücre etkileşimleri, hücre yapışması ve göçü ile ilgili bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. İnsanlarda, CD44 antijen *CD44* geni tarafından kodlanır. CD24 glikoproteini, *CD24* geni tarafından kodlanan ve en çok B lenfositlerin yüzeyinde bulunur. CD44 aynı zamanda farklı organ ve patolojiler için ortak bir kök hücre işaretleyicidir. Bununla birlikte CD44⁺, CD24⁻ fenotipi ise doku kısıtlaması bulunmaktadır.

CD44⁺, CD24⁻ markırları kullanılarak meme kanseri hücre hatlarından kanser kök hücrenin ayırt edilebileceği öne sürülmüştü (Al-Hajj ve ark 2003). Yüksek tümörejenik aktivite gösteren meme kanseri hücreleri, tümör içerisinden bu yüzey belirteçlerini kullanarak bir alt popülasyona ayırmak için kullanılır. KKH'lerinin en belirgin özelliği, hayvan deneylerinde tümör oluşturma yeteneğine sahip olmasıdır. Al-Hajj ve arkadaşları (2003), CD44⁺, CD24⁻ markırlara sahip hücreleri SCID/NOD farelere naklettiğinde, farelerde tümör oluştuğu gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca; bu

hücrelerin kendini yenileyebilir olması, döngülerinin daha yavaş ve kemoterapiye daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Fillmore ve Kuperwasser 2008). Bunun yanında meme kanser hücre hattı MCF-7'de CD44⁺ CD24⁻ fenotipi gösteren kanser kök hücrelerinin nispi radiorezistans gösterdiği belirtilmiştir (Charafe-Jauffret ve ark 2008). Bu hücreler kısa süreli ışınlarla maruz bırakıldığında popülasyonlarının da artış gösterdiği bildirilmiştir (Al-Hajj ve ark 2003).

1.4.Hücre Ölüm Mekanizmaları

1.4.1.Apoptoz

Apoptoz, çok hücreli organizmalarda gerçekleşen programlanmış hücre ölümü sürecidir. Programlı hücre ölümü; DNA hasarının bulunması, hücrenin virüslerle enfekte olması ve hücrenin normal fonksiyonlarında düzensizlik ve tahribat olması durumlarında gerçekleşir. Ayrıca, programlanmış hücre ölümü programlı bir fizyolojik gelişimi için gereklidir. Hücrenin geri dönüşmez şekilde hasar görmesi sonucu ortaya çıkan nekroza göre apoptozun bir organizmanın yaşam döngüsü boyunca avantajları vardır. Örneğin; gelişmekte olan bir insan embriyosunda el ve ayak parmaklarının arasında perde yapısındadır. Bu perdenin ortadan kalkması ve parmakların ayrılması hücrelerin apoptotik ölümü ile ilgilidir. Beyindeki nöronlar arasındaki uygun bağlantıların oluşumu da apoptoz ile gerçekleşmektedir.

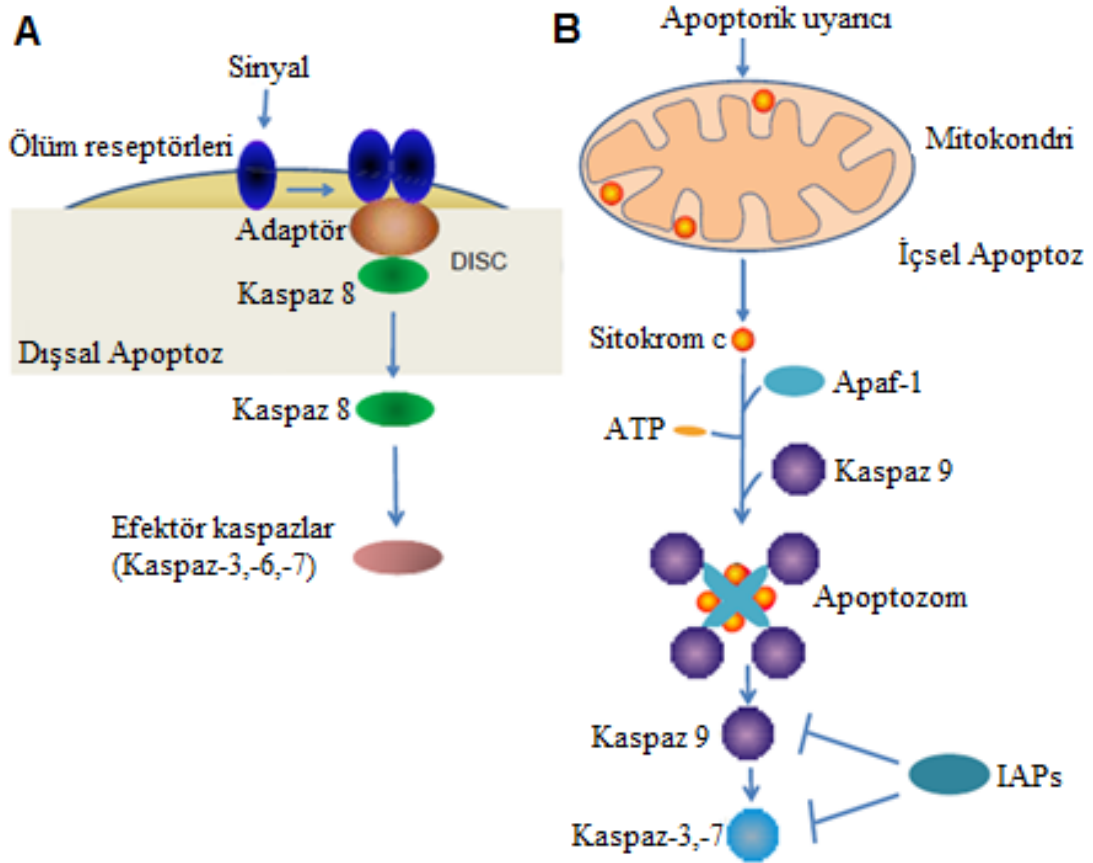
Hücre içindeki oksidan düzeylerinde artış gibi bazı sinyallerin alınması, oksidasyon ya da X-ışınları ve kemoterapötik ilaçlar gibi diğer maddeler ile zararlı bir DNA hasarı ya da üçüncül yapı katlanmalarındaki başarısız birikmiş proteinler, hücre üzerinde spesifik reseptörlere (Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- α) gibi) bazı moleküllerin bağlanması sonucu apoptoz tetiklenmiş olur.

Apoptoz sinyal mekanizmalarına göre; kaspaz bağımlı veya kaspaz bağımsız yolları kullanarak gerçekleşir. Kaspazlar inaktif ön-maddeler olarak sentezlenir ve aktif enzimler üretmek için apoptoz indüksiyonunu pro-domains içerirler. Kaspazlar iki alt sınıfa ayrılır. Bunlar; başlatıcı kaspazlar olarak bilinen uzun pro-domain bölgeleri içeren (kaspaz 2, 8, 9, 10) ve efektör kaspazlar olarak bilinen başlatıcı

kaspazlar tarafından bölünen, kısa pro-domain bölgesi içeren (kaspaz 3, 6, 7) kaspazlardır (Noy 2010).

Mitokondri Aracılı Apoptoz (İnstrinsik Apoptoz): Bu yolda, apoptoz hücre içi sinyaller ile tetiklenir. Sağlıklı bir hücrede, mitokondriya dış zarından apoptozu inhibe eden Bcl-2 (B-hücre Lenfoma 2) proteini salınır. Hücredeki iç hasar sonucunda BAX (Bcl-2 İlişkili X Protein) proteini mitokondri yüzeyine göç eder ve dış zarı konumlanarak BCL-2'nin inhibe etkisini ortadan kaldırır. Daha sonra, sitokrom c dışarı salınır ve apoptozom olarak bilinen bir protein kompleksi oluşturmak için pro-kaspaz 9 apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) 'e bağlanır. Kaspaz 9 bulunan bu protein kompleksini aktifleşmek için kaspaz 3 devreye girer ve aktif kaspaz 9 oluşur. Bu kaspaz aktivasyonu, şekil 1.3.1.2'de gösterildiği gibi sitoplazmada hücrenin fagositoz ile sindirimine yol açan proteolitik aktiviteli bir kaskad oluşturur (Adams ve Cory 2001).

Ölüm Reseptör Aracılı Apoptoz (Ekstrinsik Apoptoz): Fas ve TNF reseptörleri integral membran proteinleridir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur. Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir ve bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar (Şekil 1.1) (Spierings ve ark. 2004, Curtin ve Gotter 2003).



Şekil 1.1. Dışsal (A) ve içsel (B) apoptoz yolları. Her iki mekanizma da kaspaz aktivasyonuna yol açar (Li ve Sheng 2012).

Kaspaz Bağımsız Apoptoz: Kaspaz bağımsız apoptoz yolu normal olarak mitokondrinin zarlar arası boşluğunda bulunan apoptoz başlatıcı faktör (AIF) aracılık eder. Hücre, bir ölüm sinyalini aldığı anda, mitokondriden apoptoz indükleyici faktör salınır ve çekirdeğe göç eder. Daha sonra DNA'ya bağlanır ve yıkımını gerçekleştirerek hücrenin ölümüne yol açar (Susin ve ark. 1999).

1.4.2. Otofaji

Otofaji kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelmektedir ve hücre biyolojisinde hücre içi makromoleküllerin ve organellerin lizozomal enzim aktivitesiyle yıkılma mekanizmasıdır (Gozuacik ve Kimchi 2004).

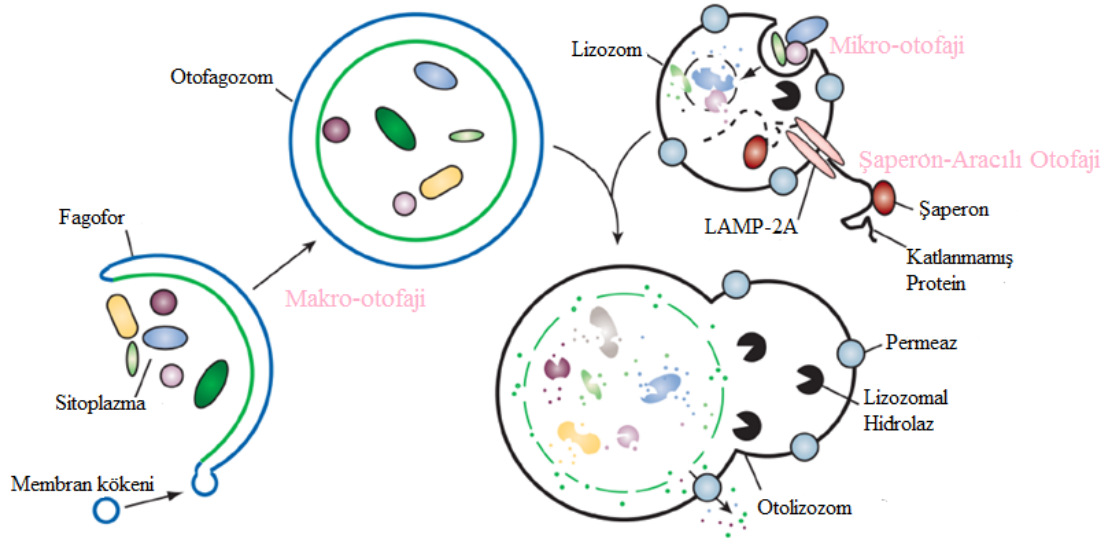
Hücresel bütünlüğü ve genomik istikrarını korumak için hücre içerisinde yıkım, sentez ve hücre içi maddelerin geri dönüşümünü dengelemektedir (Cuervo ve ark 2005). Hücre dışındaki bir stres faktörü veya hücre içerisinde metabolik stres ile

karşılaşması durumunda hücrede otofaji mekanizmasını aktive edilir. Otofaji hücrelerin gereksiz, aşırı ve hasarlı organellerini ve makromoleküllerini yıktığı ve geri dönüşümünü sağlayarak düzenlediği bilinmektedir. Otofaji mekanizmasının diğer bir önemi ise hasarlı ya da uzun ömürlü organellerin ve proteinlerin uzaklaştırılmasıdır ve böylece homestostazis sağlanır (Lin ve ark 2012). Hasarlı organel proteinleri, hücre membranları ve diğer hücre hasarı birikimleri ve yaşlanma otofaji de başarısızlıklara neden olmaktadır (Mizushima ve ark 2008).

Otofaji sırasında hücrenin yıkıma uğratılacağı organel ve proteinler sitoplazmada oluşturulan preotofagozom adlı membran sistemi ile çevrelenir. Çift katlı membranlı kesecikler içine hapsedildiğinde de otofagozom ismini alırlar. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesi sonucunda maddeler lizozomal enzimlerle yıkıma uğratılırlar. Yıkıma uğrayan proteinler ATP ve yeni proteinlerin sentezi için kullanılırlar. Hücreler otofaji sayesinde kendi organel ve proteinlerini enerji üretimi için hammadde olarak kullanarak metabolik stres durumlarında canlı kalabilmektedirler. Yani otofaji besin yokluğu ve büyüme faktör çekilmesi gibi nedenlerle ortaya çıkan metabolik streslere adaptasyon cevabıdır (Mizushima ve ark 2008, Shintani ve Klionsky 2004).

Otofaji, ilk çalışmalar neticesin hücrenin sağkalımı ile ilgili bir savunma mekanizması olarak bilinmektedir. İlerleyen çalışmalar sonucunda hayatta kalma ve ölüm arasında karmaşık bir dengeyi sağladığını göstermiştir. Bunların yanısıra otofajideki sorunlar kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıkların gelişimine de yol açmaktadır (Degenhardt ve ark 2006, Yang ve Klionsky 2010).

Otofajinin karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşse de temel olarak; mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaci (CMA) olarak 3 formu bulunmaktadır. Her mekanizma da içeriğini lizozoma ulaştırmak için farklı biyolojik etkiler göstermektedir (Peracchio ve ark 2012) (Şekil.1.2).



Şekil.1.2. Otofaji çeşitleri (Mizushima ve ark 2008).

Otofajik programının düzenlenmesi ve otofagozom oluşumu ilk olarak mayada keşfedilmiştir ve otofaji ilişkili genler (ATG) olarak isimlendirilmiştir (Codogno, ve Meijer 2005). Bu genler, türler arasında yüksek bir homoloji göstermektedir. Otofagozom oluşumu sınıf III fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ve insan vakuolar proteini sıralı faktör proteinini 34 (hVps34)'ün Atg6 (aynı zamanda Beclin-1 olarak da bilinir) ile etkileşimi sonucu başlatılır. Ek olarak otofagozom oluşumu için ubiquitinasyona uğrayan atg5, atg12 ve E1 benzeri enzim olan atg7 ile atg10 gereklidir. Mikrotübül ilişkili protein hafif zincir 3 (LC3) mayalarda Atg8 proteini ile eşdeğerdir. LC3-I ve-II olmak üzere iki formu bulunmaktadır. LC3-I sitoplazmada bulunan 18 kDa'luk bir polipeptiddir. LC3-II ise 16 kDa olup autophagosomal zarlarında bulunur. LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü memeli hücrelerinde otofaji göstermek için bir belirteçtir (Ohsumi 2001).

Otofagozomların oluşumu, PI3K ve hVps34 ile Atg6'nın etkileşimi ile başlatılır. Atg6 kompleksinin aktivitesi otofagosomal membrane için önemlidir. Bu süreç, sitozolik proteinlerin ve organellerin içeriğinin geri alınması olan otofagozomun oluşmasına yol açar. Otofagozomun olgunlaşması ve lizozomla birleştirilmesinde UVRAG, LAMP2 ve RAB7A etkindir. Atg6 kompleksi otofajiyi regüle eden protein komplekslerini oluşturmak için farklı proteinleri toplar. LC3'e PE (Fosfotidiletanolamin) eklenir ve membrane dahil olur. Atg proteinleri sitozole geri

döndürülür ve LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü sağlanır. LC3-II lizozomla birleştikten sonrada olgun otofagozom oluşur (Ohsumi 2001).

1.5.Otofaji ve Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri, kanser hücrelerinin bir alt grubudur ve normal kök hücreler ile benzer özellikler göstermektedir. Kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği sayesinde tümördeki heterojeniteden de sorumludur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, otofajinin embriyonik kök hücreler ve doku kök hücrelerinin yanında kanser kök hücrelerinin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Gatenby ve Gillies 2004).

1.5.1.Hipoksi ve Açlık Bağımlı Otofaji: Mikroçevre Stresine Karşı Kanser Kök Hücrelerinin Sito-koruyucu Mekanizması

Epitelyal tümörlerdeki mikroçevrenin fizyolojisi normal dokularla karşılaştırıldığında; daha düşük oksijen seviyeleri (hipoksiya), daha yüksek laktat seviyesi, hücre dışı asidoz ve besin maddelerinin (glikoz ve glutamin gibi) tükenmesi ön plana çıkmaktadır (Gatenby ve Gillies 2004, Gatenby ve Gillies 2008). Bu değişikliklere tümör mikroçevre stresleri ismi verilmektedir. Bu streslerden özellikle hipoksiya, tümör stromal mikroçevresinin gelişimi ve KKH nişlerinin oluşması sırasında kritik roller oynamaktadır (Lin ve Yun 2010, Quail ve ark 2012). Hipoksik bir mikroçevre; kanser kök hücreleri olmayan tümör hücrelerinin aksine, kanser kök hücreleri için gerekli olan hücreler arası etkileşimleri içerir. Bu hipoksik mikroçevre, çevresel sinyal sağlama yeteneği ile kanser kök hücreleri havuzlarının belirgin genişlemesine yol açabilmektedir. Hipoksiya aracılı otofajinin, anti-anjiyojenik tedavilere tepki olarak tümör hücreleri yaşamını artırır. Anti-anjiyojenik ajanların yakın dönemde HIF1A aracılığıyla kanser kök hücrelerinin popülasyonunu artırdığı kanıtlanmıştır. Bundan yola çıkarak hipoksiyaya dayalı otofajinin, kanser kök hücreleri uyarımında etkili olduğu ileri sürülmüştür (Quail ve ark 2012). Ne yazık ki, az sayıdaki çalışma, biyofiziksel stresli mikroçevre koşullarında kanser kök hücrelerinin otofaji ile artırılmış toleransının; kanser kök hücreleri fonksiyonelliğinin devamına ve kanser kök hücreleri popülasyonunun genişlemesine sebebiyet verebildiğini göstermiştir (Conley ve ark 2012, Liang ve ark 2012).

Biyofiziksel kısıtlamalardan kaçınmanın ötesinde, aç kalan kanser kök hücreleri metabolik dönemler boyunca; metabolik homeostazisini, uyku halini ve hücre yaşama yeteneğini devam ettirmek için kendilerine hücre içi parçaları yeniden işleme imkanı veren katabolik süreçlerin aktivasyonu aracılığıyla alternatif enerji kaynaklarını kullanmak zorundadırlar. Ayrıca, kanser kök hücresi işlevselliği ile yaşayabilirliğini sürdürmesi; premalign, preinvaziv lezyonların gelişmesi ve büyümesi dışındaki zamanlarda tamamlayıcı biyoenerjik kaynakları sağlama yeteneklerine bağlıdır.

Göç eden KKH'leri ikincil organa geçmesinden hemen sonra hipoksi durumu ile karşılaşacaktır. Bunun sebebi, ikincil tümörler ortamdaki besin ve oksijeni kullandığından dolayı metastatik kanser kök hücresi besinsiz ve oksijensiz kalacaktır (Keith ve Simon 2007, Espina ve Liotta 2011). Bu değerlendirmeler, açlık koşulları altında KKH'lerini korumada otofajinin protein katabolizma fonksiyonlarının rol aldığı düşüncesini desteklemektedir.

Otofajinin aktivasyonu ile kanser kök hücrelerinin artan hücre yaşamsallığı arasındaki ilişkisi ilk olarak memenin belirli premalign lezyonlarında BECN1'in upregulasyonu ile gözlemlenmiştir. İnsan comedo-ductal carcinoma in situ hücrelerinde (DCIS), hipoksik duktal nişte intraduktal hücrelerinde dikkat çekici bir şekilde BECN1'in upregule olduğu tespit edilmiştir (Espina ve ark 2010, Espina ve Liotta 2011). Otofajik efektör MAP1LC3A'nın ekspresyonunda DCIS lezyonlarında normal meme dokusuna göre arttığı belirlenmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, otofajinin BECN1 bağlantılı artışı, DCIS tümörünü oluşturan progenitor hücrelerde gerçekleştiği izlenimini vermektedir. Ayrıca premalign ve DCIS lezyonlarından direkt izole edilen DCIS tümörfaz oluşturu hücrelerde de otofaji bağlantılı proteinlerin artan ekspresyonu görülmektedir. Bu da otofajinin premalign lezyonlarında önceden bulunan KKH benzeri öncü hücrelerin hayatta kalması için gerekli olduğunu doğrulamaktadır (Guan ve ark 2013).

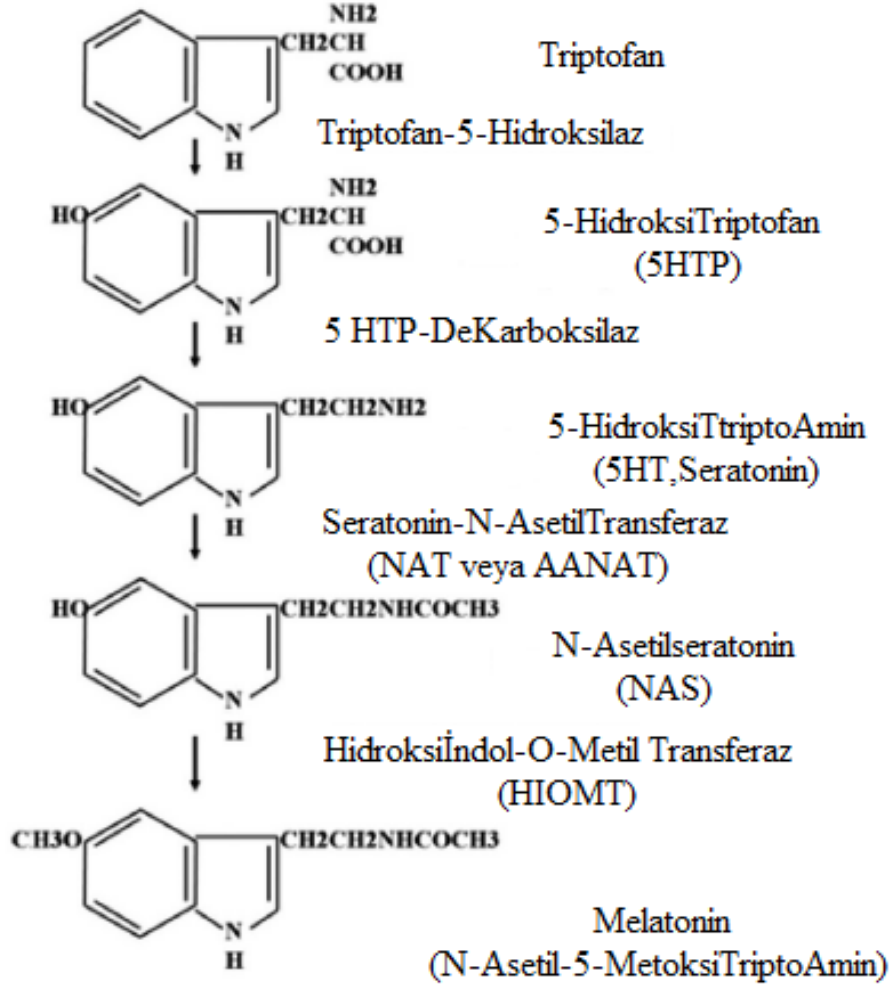
1.5.2.Açlık Bağımsız Otofaji: Kanser Kök Hücrelerinde İntrensik Metabolik Mekanizması

Homeostatik olarak otofaji, kanser kök hücresinin hücrel durumlarının bir intrinsik metabolik özelliğini oluşturmak için açlıktan bağımsız bir şekilde faaliyet gösteriyor olabilir. Hastalardan alınan mamosferler ve insan meme kanseri hücre hatları karşılaştırıldığında, otofaji aktivitesi hem bazal seviyelerde hem de açlık koşulları altında, mamosferde anlamlı bir şekilde daha yüksek gözlemlenmiştir (Gong ve ark 2012).

Meme kanseri hücrelerinden elde edilen kök hücre fenotipli hücreler, kanser kök hücresi olmayan hücrelerle kıyaslandığında kanser kök hücresi fenotipi taşıyan hücrelerin daha yüksek seviyede otofaji aktivitesi sergilediği izlenimini uyandırmaktadır. Zira mamosferlerden izole edilen aldehit dehidrogenaz 1 (ALDH1)-pozitif hücrelerde, tümör hücrelerine göre otofaji aktivitesi daha yüksek tespit edilmiştir. BECN1'in spesifik azalması apaçık bir şekilde mamosferlerin hem büyüklüğünü hem de oluşma etkinliğini azaltmaktadır. Bu da BECN1 ekspresyonunun meme kanser kök hücrelerinin tümör oluşturması açısından çok önemli olabileceğini göstermektedir (Espina ve Liotta 2011). Yapılan çalışma ile kanser kök hücrelerindeki BECN1'in azalması NUD farelerde tümör gelişimini de azalttığı görülmektedir (Liang ve ark 2012). Otofaji, meme kanseri kök hücre popülasyonlarının devamı ve genişlemesi için zorunlu olarak gerek duyulduğu ileri sürülmektedir (Guan ve ark 2013).

1.6.Melatonin

Bir pineal bez hormonu olan melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) (Şekil 1.3), epifiz bezinde triptofan aminoasitinden sentezlenmekte ve plazmada proteinlere (albuimin vb.) bağlı olarak bulunmaktadır (Kveder ve McIsaac 1961). Çoğu karaciğerde olmak üzere böbrekte de metabolize olmakta ve başlıca metaboliti olan 6-hidroksimelatonininsülfat (6-HMS)'a dönüştürülmektedir. İnsanlarda ekzojen melatoninin metabolik yarı ömrü 20-60 dakika kadar kısadır ve bu yüzden karaciğer ve böbrekteki metabolize işlemi kısa sürmektedir (Gibbs ve Vriend 1981).



Şekil 1.3. Melatonin sentezi (Srinivasan ve ark 2012)

Melatoninin salgılanmasındaki hız belirleyici en önemli faktörlerden birisi çevrenin aydınlık veya karanlık olmasıdır (Claustrat ve ark 2005). Genellikle; ışık melatonin sentez hızını azaltırken, karanlık arttırmaktadır. Melatonin, pineal bezden başka retina ve bağırsakta da sentezlendiği gösterilmiştir (Pandi-Perumal ve ark 2007). Kan melatonin düzeyine en çok katkı pineal bezden sağlanmakta, diğer dokuların katkısı yok denecek kadar az olmaktadır. Melatonin üretildikten sonra yüksek lipofilikliğinden dolayı hızlı bir biçimde önce kana, daha sonra beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara ve tüm dokulara dağılmaktadır (Pandi-Perumal ve ark 2007). Ayrıca dolaşımdaki melatoninin, VTA (Ventral Tegmental Alan)/substansiya nigra dahil çok sayıda beyin bölgesine geçerek bağlandığı bildirilmiştir. Melatonin, aktivite sonrasında karaciğerde önce 6-hidroksi-melatonine ve sonra 6-sulfoksi-melatonine dönüşerek idrarla atılmaktadır

edebilir. i) Oksidatif hasarı azaltıp ve serbest radikalleri temizleyebilir (Grant ve ark 2009).

Sırasıyla G_i/G_o ve G_q proteinlerine bağlanan MT1 ve MT2 reseptörleri talamus, serebral ve serebellar korteks, hipotalamus, hipokampus gibi çeşitli santral sinir sistemi bölgelerinde yer almaktadırlar. Bu reseptörlerin aktivasyonu adenilat siklaz ve guanilat siklaz yollarının inhibe ederken fosfolipaz C aktivasyonu ile inositol 1,4,6 trifosfat, Ca^{+2} , diaçilgliserol ve araşidonik asit seviyelerini artırmaktadır (Uz ve ark 2005).

Ayrıca melatonin, sitozolde bulunan kalmodüline bağlanarak CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) aktivasyonunu modüle etmektedir. Ayrıca melatonin $GABA_A$ reseptörleri (hipokampus), K^+ kanalları, kalmodulin, protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ve serbest oksijen radikallerine de bağlanabilmektedir. Diğer yandan hipokampal piramidal hücrelerdeki potasyum kanallarının indol bölgeleriyle etkileşime giren melatonin, hücre dışına yönelmiş olan K^+ akımlarını inhibe etmektedir. Ca-kalmodulin aktivasyonu hücre siklusunda G_0 fazından bölünme aşamasına geçişte ve S ve M fazlarının başlamasında önemli görevler üstlenmektedir. Melatonin ise kalmodülini kalsiyumdan uzaklaştırarak hücre siklusunu yavaşlamasına neden olmaktadır. Bu etkisini kanser hücreleri üzerinde de göstererek tümörün büyümesini yavaşlatıp (antimitojenik) kanser hücreleri üzerinde dormant bir etki göstermektedir (Topal ve ark 2009).

Reseptör çeşitliliği bulunması sayesinde melatonin farklı dokularda farklı işlevler gösterebilen çok yönlü bir molekül olarak dikkat çekmektedir. İşlev ve etkileri arasından şu ana kadar bildirilmiş olanlardan ön plana çıkanları kronobiyolojik düzenleyici, uyku düzenleyici, antioksidan, immün destekleyici, anti-kanser, kan basıncı düzenleyici, üreme fonksiyonları düzenleyici şeklinde sıralayabiliriz. (Srinivasan ve ark 2008).

1.7.Melatonin ve Kanser

Melatoninin MCF-7 hücre hatlarında telomeraz aktivitesi üzerine yapılan in vitro çalışmalarda, tedaviden sonra telomeraz enzim aktitesinin düştüğü bildirilmiştir (Mercedes ve ark 2003). Özellikle telomeraz enziminin katalitik aktivitesinden sorumlu olan hTRET, hTR ve hTEP1'in mRNA ekspresyonlarına bakıldığında, subfizyolojik (1 pM), fizyolojik (1 nM) ve farmokolojik (10 µM) dozlarda uygulanan melatoninin, bu moleküllerin tümünde mRNA ekspresyonlarını azalttığı rapor edilmiştir (Mercedes ve ark 2003).

Pineal bezden melatonin sentezi sirkadiyen bir ritim sergilemekte kandaki düzeyleri gece en yüksek düzeylerdeyken gün içerisinde seviyeleri düşmektedir. Bu sirkadiyen patern günlük aktivite zamanlarından (gece/günüz) bağımsız olarak hayvanların hemen hemen hepsinde benzer şekillerde görülmektedir (Claustrat ve ark 2005). Işık/karanlık siklusu retinohypothalamic tract (RHT) aracılığıyla pineal melatonin sentezini regüle etmektedir. Bütün yüksek organizmalarda melatonin seviyelerinin geceleri gündüze göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı nöral melatonin ritminin sirkadiyen ritmi belirleyen önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir (Pandi-Perumal ve ark 2007). Diğer bir çalışmada ileri meme kanseri kadınlarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında üriner melatonin seviyelerinin düşük olduğu bulunmuştur (Bartsch ve ark 1981). Bu veriler ER (Östrojen reseptörü)-pozitif meme kanserli kadınlar üzerinde yapılan diğer bir çalışmada üriner melatonin seviyeleri ile birlikte kan melatonin (6-sulfatoxymelatonin) seviyelerinin de düşük olduğunun bulunmasıyla desteklenmiştir. Bunun yanında, görme düzeyi ile meme kanseri insidansı arasında ters bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalarda literatürde yer almaktadır. Tamamen doğuştan görme yetkisi olmayan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda bu kişilerde meme kanseri insidansının çok düşük olduğu bildirilmiştir (Verkasalo ve ark 1999, Kliukiene ve ark 2001). Bu çalışmalardan elde edilen veriler, görme yetisi olmayan kişilerde meme kanser riskinin %40'a kadar varan oranlarda düşük olduğunu göstermektedir.

Işık-melatonin-meme-kanseri hipotezini destekleyen çalışmalar insan meme kanseri dokusu transfer edilmiş atimik fareler üzerinde de yapılmıştır. Burada sürekli

ışığa maruz bırakılan farelerle, normal gece/gündüz ortamında bulundurulan fareler karşılaştırıldığında tümör büyümesinde 7 kat artış olduğu belirlenmiştir. Sürekli ışık altında buluna farelerde linoeik asit ve onun metaboliti olan 1,3-hydroxyoctadecadienoic düzeylerinde artış olduğu ve bununda sirkadiyen melatonin sinyallerinde inhibisyona yol açtığı belirlenmiştir (Blask ve ark 2003). Bu bulgular, endüstrileşmiş ülkelerdeki meme kanser artışının sebeplerinden birinin gece ışığa maruz kalma olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan diğer çalışmalarda pineal fonksiyon azalmasının melatonin salınımını azaltarak hiperestrojenizme yol açtığı ve bunun da meme kanserine yol açabileceği rapor edilmiştir. Melatoninin bu özelliği ile meme kanseri gelişimi üzerinde onkostatik ve anti-proliferatif etki gösterdiği belirtilmektedir (Blask ve Hill 1986). MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında hücre siklusunun G₀-G₁ 'den S fazına geçişinin bloke olduğu ve bunun da östrodiol ile indüklenen hücre proliferasyonunun inhibe ettiği belirlenmiştir (Cos ve ark 1991). Ayrıca melatoninin MCF-7 hücrelerinde p53, p21 ekspresyonlarını arttırarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (Mediavilla ve ark 1991). Bunun yanında, melatonin apoptotik ve antikanser etkinliği belirlenmiş birleşiklerle kombine kullanıldığı çalışmalarda yapılmıştır. Melatonin ve vitamin D3 (1,25-dihidroksivitamin)'ün kombine kullanıldığı çalışmalarda öncelikle *p53-MDM2* yolağı hedeflenmiş ve bunların kombine kullanımının meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe edip apoptotik yolağı indüklediği belirlenmiştir (Bizzarri ve ark 2003, Proietti ve ark 2011).

Melatonin ile yapılan diğer kombine tedavi çalışmalarında kanser hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde melatonin, somatostatin ve all-trans retinoik asit ile yapılan kombine uygulamalarda, hücre proliferasyonu ve canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir (Harrison ve ark 2010). Bu uygulamada *Notch-1* ekspresyonunu önemli ölçüde azaldığının belirlenmesi, bunların sinerjist etki gösterdiklerini düşündürmüştür. Bu da *Notch-1* yolağının bu moleküllerin anti-proliferatif etkinliğinin oluşmasında bir basamak olabileceğini göstermiştir (Margheri ve ark 2012).

Mekanizması tam anlaşılmamakla birlikte melatoninin anti-östronejik özelliklerinden dolayı endometrial karsinoma üzerinde de anti-tümör etki gösterdiği düşünülmektedir. BG-1 insan over kanser hücrelerinde yürütülen çalışmalarda melatonin hücre proliferasyonunu %20 oranında azalttığı belirlenmiştir (Sandyk ve ark 1992, Petranka ve ark 1999). Ayrıca farklı ovaryan karsinoma hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda da homojen olmamakla birlikte proliferasyonu azaltıcı yanıtlar alınmıştır (Bartsch ve ark 2000). Yine sınırlı sayıda çalışmada endometrium karsinomu olan hastalarda melatonin sekresyonunun az olduğu gösterilmiştir (Karasek ve ark 2000). Ksenograft fare modellerinde yapılan çalışmalarda melatoninin androjen duyarlı prostat kanserlerinde inhibitör etkisi olduğu rapor edilmiştir (Buzzell 1988). Bu çalışmalarda gece yapılan melatonin ve kemoterapi enjeksiyonlarının diğer vakitlerde yapılan enjeksiyonlara göre daha belirgin antitümörojenik etki gösterdiği belirlenmiştir (Buzzell 1988). Prostat kanseri ile ilişkili olarak melatoninin hormon bağımlı LNCaP prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu MT1 üzerinden inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu çalışmalarda, melatoninin hem androjen duyarlı LNCaP hücrelerinde ve androjen duyarsız PC3 hücrelerinde hücre siklusunu durdurduğu ve kanser hücre kitlesini azalttığı rapor edilmiştir (Buzzell 1988). Yine görme duyusu olmayan kişiler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu kişilerde prostat kanserine rastlanma oranının görme duyusu olan kişilere oranla daha az olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak bu kişilerde melatonin düzeyinin daha yüksek olması gösterilmiştir (Siu ve ark 2002).

Bunun yanında kolorektal kanser gelişiminde de melatoninin koruyucu bir rol oynayacağı belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, 15 yıldan beri ayda en az 3 tane gece nöbeti tutan bayan hemşirelerde kolorektal kanser riskinin arttığı bulunmuştur (Schernhammer ve ark 2003). Kolorektal karsinomlu 21 erkek ve 12 bayan hastada melatonin düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırılığında belirgin olarak düşük olduğu saptanmıştır (Kos-Kudla ve ark 2002). Melatoninle kombine tedavilerin etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada metastatik kolorektal kanserli 30 hastada, kemoterapik ajan CPT-11 ile melatonin kombine kullanımının anti-tümörojenik etkileri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Burada CPT-11'in melatonin ile kombine uygulanmasının, CPT-11'in tek başına uygulanmasına kıyasla hastalığın kontrolünde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular melatonin kolorektal

kanserinde kemoterapinin etkisini artırmada önemli bir adjuvan rol oynayabileceğini göstermiştir (Wenzel ve ark 2005).

Melatoninin ayrıca antioksidan etkilerinin olduğu, yapılan değişik çalışmalarda rapor edilmiştir (Proietti ve ark 2011). Melatonin önemli özelliklerinden biri de hücrelerin hemen her tarafına ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi, beyin gibi diğer dokulara da geçebilmesidir. Böylece antioksidan etkilerini çok geniş bir alanda gösterebilmektedir. Melatonin çeşitli yönleriyle klasik antioksidanlardan (E vitamini, C vitamini, β -karoten vs.) farklıdır. Klasik antioksidanlar etkilerini gösterdikten sonra prooksidan maddelere dönüşürler. Yani bu maddeler süpürdükleri oksidan maddelerden sadece daha az zararlıdır. Ancak melatonin oksidan maddelere etki ettikten sonra ara kademelerde ve sonuçta oluşan ara ürünleri yine antioksidan etki gösterebilmektedir. Bu özellik bir antioksidan ajan için çok değerlidir ve “suicidal veya terminal antioksidan” olarak nitelendirilir (Martinez-Cayuela ve ark 1995).

Yaşa bağlı olarak melatonin seviyesindeki azalma immün yaşlanmanın (immunosenesence) en önemli etkenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Bunun için yapılan bir çalışmada, melatonin seviyelerinin belirgin düşük olduğu saptanan yaşlı farelerin yaklaşık % 50'sinde süreç içerisinde spontan lenfoma, akciğer adenokarsinom veya sarkoma geliştiği gözlenmiştir. Bu yüzden melatoninin yaşlılarda bağışıklık fonksiyonu artırmada olumlu bir rolü olduğu ve stres, neoplastik hastalık ya da enfeksiyon gibi bağışıklığın zayıfladığı durumlarda etkili bir tedavi ajanı olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Reiter ve ark 2007).

Melatonin onkostatik etkilerini; lenfosit, monosit/makrofaj ve NK hücreleri uyarıcı etkileri üzerinde de olabileceği belirtilmiştir (Garcia-Mauriño ve ark 1997). Bu kapsamda yapılan çalışmalar ile melatonin monositlerden IL-1, IL-6, IL-12, tümör nekroz faktör üretimini ve kültüre edilmiş insan periferik kan mononükleer hücrelerinde de IL-2, IFN- γ ve IL-6 üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Winnie ve ark 2012). Bunla bağlantılı olarak melatonin, bağışıklık fonksiyonunu düzenleyen çeşitli polimorfonükleer hücreleri, makrofaj, NK hücreleri ve lenfositleri doğrudan uyarak sitokin üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Bu bulgular ile lenfoid hücrelerden de salgılanan melatoninin otokrin ve parakrin etkileri ile bağışıklık sistemini düzenlemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan

çalışmalarda, melatonin CD4⁺ hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Carrillo-Vico ve ark 2005). CD⁺ hücreleri aktif IFN- γ , TNF- α sentezini ve sitotoksik T-hücrelerin yanıtını düzenlemekle görevlidir. Bu çalışmada, melatonin uygulaması yapılan sıçanların lenf düğümlerinde CD4⁺ hücrelerinin sayısını artığı tespit edilmiştir (Carrillo-Vico ve ark 2005).

Bu bilgilerden yola çıkarak melatonin kanser hücrelerinde proliferasyonu azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, melatoninin kanser hücrelerinde indüklenmiş otojiden koruyucu bir etkisi olduğu gözlenmiştir; ancak literatürdeki çalışmalara bakıldığında melatonin, KKH miktarı üzerindeki etkisi ve KKH'deki otofaji yolağı üzerindeki etkinliği ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmada melatoninin kanser kök hücredeki otofaji yolağı üzerindeki etkisini araştırılması amaçlandı.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Hücre Kültürü

Meme karsinoma kökenli olan MCF-7 ve insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293 American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edildi. Dondurulmuş hücreler önce 37°C de çözüldükten sonra 200 ×g'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Hücre pelleti steril PBS ile bir kez yıkandı ve tekrar aynı santrifüj koşullarında çöktürüldü. MCF-7 ve HEK293 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS; Gibco®), %1 L-glutamine ve %1 antibiyotikli (Streptomycin-Penicilin 1:1; Gibco®) RPMI-1640 (Gibco®) kültür vasatında, T25 kültür flasklarında 37°C'de %5'li CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılarak kültüre edildi.

Hücreler flaskta %80'lik alanı doldurduktan sonra %0,25 trypsin solüsyonu muamelesi ile kaldırıldı. Kaldırma işlemi şu şekilde gerçekleştirildi; hücreler önce 5 veya 10 ml steril PBS ile yıkandı T25 flaskına 2 ml ve T75 flaskına 5 ml steril %0,25 trypsin solüsyonu eklenerek 5 dakika 37°C'de inkübe edildi. Bundan sonra hücrelerin x20 ışık mikroskopunda incelendi ve kalkmayan hücreler fiziksel darbeler uygulanarak kaldırıldı. Tripsin inaktivasyonu için yarı hacimde kültür medyumunu eklenerek sağlandı ve hücre solüsyonu 12 ml'lik tüplere aktarıldı ve ardından 200 ×g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 1 ml kültür medyumunu içinde çözdürüldü ve hemositometri lamında (Thermo, ABD) hücre yoğunluğu sayısal olarak incelendi.

2.2.Hücre Sayımı

100 µl hücre süspansiyonu 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine dilüsyon faktörü 2 olmak üzere 100 µl %0,04 trypan blue boya solüsyonu eklendi ve hafiften pipetaj yapıldı. Boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında bekletildi, daha sonra hemositometri lamına 20 µl hücre süspansiyonundan yüklendi ve canlı hücreler ışık invert mikroskop altında (100× büyütme) 5 farklı bölgede sayıldı ve sayı ortalaması alındı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplandı:

$$1 \text{ ml'de hücre sayısı} = \text{sayılan bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

İleriki çalışmalar için hücreler ayrı ayrı çoğaltıldı ve 1 ml dondurma medyumunu (%10 DMSO, %90 FBS) içinde sıvı azot tankında hızlıca donduruldu ve -85°C derin dondurucuda arşivlendi.

2.3.Canlılık Analizi

Hücrelerin canlılık analizi, MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) testi ile gerçekleştirildi. Bunun için yaklaşık 10^4 hücre 100 µl kültür medyumunu içinde 96'lik well plate'e eklendi ve 24 saat 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda eski medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile iki kez yıkandı. Her bir kuyucuktaki hücrelerin mitoz sikluslarını eşitlemek için serumsuz medyum içerisinde 24 saat süre ile bekletildi (Starvasyon işlemi). Daha sonra hücrelerin farklı dozlardaki etken madde içeren 100 µl medyum ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 10 µl 12 mM' lik Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT; Sigma Aldrich® #: M2128) solüsyonu eklendi ve 4 saat 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı ve yerine 50 µl DMSO eklenerek 37°C, %5 CO₂ etüvde 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışım yumuşakca pipetaj yapılarak mavi kristallar çözüldü ve micro-plate okuyucu cihazında (Biotek, ABD) 490 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

2.4.Etken Maddeler ve Muameleleri

Çalışmada kullanılan melatonin ticari olarak (Sigma-Aldrich Corporation, Almanya #SLBC7539V) temin edildi. Toz olarak temin edilen melatonin 20 mM konsantrasyonda olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Hazırlanan bu ara stok +4°C'de muhafaza edildi. Otofaji analizinde pozitif kontrol etkeni olarak kullanılan C₂ Ceramid (N-Acetyl-D-sphingosine) (C₂Cer) (Sigma-Aldrich Corporation, Almanya #0211M5200V) ticari olarak temin edildi. Toz olarak temin edilen C₂Cer, DMSO (Dimetil sülfoksit) (ChemAlert #112509) ile sulandırılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

MCF-7 ve HEK293 hücrelerin her birisinden yaklaşık 2×10^6 hücre T75 kültür flasklarına ekildi ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücreler

platelere tutunduktan sonra, eski medyumunu alındı ve steril PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra hücreler 25 µM C₂ seramid ve 35 µM Melatonin ile 48 saat için 4 farklı kombinasyonda muamele edildi. Hücre grupları ve kombinasyonları Çizelge 2.1’de verilmiştir. Her grup hücre için etken madde ya da etken maddesiz 10 ml medyum verilerek 37°C’de, %5 CO₂’lu etüvde 48 saat inkübe edildi.

Çizelge 2.1. C₂Cer ve melatonin muamele kombinasyonları. MCF-7 ve HEK293 hücreleri 25 µM C₂Cer ve 35 µM melatonin ile farklı kombinasyonda 48 saat boyunca muamele edildi.

Etken Madde Kombinasyonları (Gruplar)	C ₂ seramid	Melatonin
C ₂ Cer-/Mel-	0	0
C ₂ Cer+/Mel-	25 µM	0
C ₂ Cer+/Mel+	25 µM	35 µM
C ₂ Cer-/Mel+	0	35 µM

2.5. Apoptoz Analizi

Apoptoz analizi annexin-V metodu kullanılarak akış-sitometri de gerçekleştirildi. Melatonin uygulanmış hücre grupları belirlenen süre sonrasında medyum falkon tüplere aktarılır. Daha sonra hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılır. Kaldırılan hücreler falkona ayrılan medyum ile birleştirilir ve santrifüj edilir. Elde edilen pellet PBS ile pipetaj yapılarak yıkanır. Yıkamadan sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılır. Yaklaşık olarak 2-5x10⁵ hücreye 200 µl Binding Tamponu (1x) ilave edilir. Tampon ilavesinden sonra süspansiyon üzerine 5 µl Annevin V-FITC (eBioscience ABD #BMS500FI/20) eklenir ve karıştırılır. Daha sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Süre sonunda hücreler Binding Tampon (1x) ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra 10 µl Propodium Iodide (20 µg/ml) ilave edilerek BD FACSAria III cihazında analizi gerçekleştirilir.

2.6. Kök Hücre İzolasyonu

Kök hücre izolasyonu CD44/CD24 yüzey belirteçleri kullanarak akış-sitometri ile gerçekleştirildi. Melatonin ve kontrol etken maddesi C₂Cer ile muamele edilen 4 farklı kombinasyon ile akış sitometri tekniği ile CD44⁺/CD24⁻ yüzey belirteçlerine

sahip kök hücreler izole edildi. Bunun için yukarıda anlatıldığı gibi MCF-7 meme kanseri hücreleri ve HEK293 kontrol hücreleri kültüre edildi. Kültüre edilen hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve santrifüj edildi. Hücre çökeltisi yoğunluğuna göre 1-2 ml HBSS içerisinde çözüldü ve hücreler hemositometre ile sayıldı. Her bir FACS tüpü, kullanılacak antikora göre etiketlendi. Sayılan hücreler istenilen miktara göre etiketli FACS test tüplerine aktarıldı. FACS tüpü içerisindeki hücreler 250 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra çökelti 100 µl %2 FBS/HBSS içerisinde süspanse edildi. Her bir konjuge antikordan (CD44-APC, Sigma-Aldrich Corporation, Almanya; CD24-FITC, Sigma-Aldrich Corporation, Almanya) 1×10^6 hücreye 20 µl olacak şekilde alındı ve karanlık ortamda uygun test tüpüne eklendi. DAPI etiketli tüpe her aşamada diğer tüplerle beraber aynı uygulama yapıldı ama DAPI, bu tüp dahil tüm tüplere en son aşamada eklendi. Tüpler karanlık ortamda (alüminyum folyo ile örtülerek) 4°C'de 10 dakikada bir çalkalanarak bir saat boyunca bekletildi. Her bir tüp içerisindeki hücreler, bağlanmayan antikoru uzaklaştırmak için 3 ml %2 FBS/HBSS ile yıkandı. HBSS ile ekstra bir yıkamadan sonra hücre çökeltisi, 400 µl DAPI (0,4 ng/ml) (Sigma-Aldrich Corporation, Almanya) ile sulandırıldı ve FACS cihazı (FACS Aria III – BD Pharmingen, ABD) ile hücreler ayrıldı.

2.7. Tümörfaz (Sphere) Oluşumu

MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden akış-sitometri ile CD44⁺/CD24⁻lü kök hücreler izole edildi. İzolasyon işleminden sonra bekletilmeden 96'lık kültür plakelere serumsuz medyum (%1 PC + RPMI-1640) ile ekim gerçekleştirildi. Ekim sonrasında hücreler %5 CO₂, 37°C'li inkübatöre aktarıldı. Belirli periyotlarla medyumunu tazelenildi ve mikroskopta x40 büyütmede incelendi. Tümörfaz oluşumu için 45-60 gün boyunca kültüre edildi. Süre sonunda tümörfaz oluşumu incelendi ve fotoğraflandırıldı.

2.8. Otofaji Analizi

Melatoninin kanser kök hücrelerinde otofajik etkisi immüno Floresan yöntemi ve western blot protein analizi ile gerçekleştirildi. İmmüno Floresan yönteminde LC3-II agregasyonu, western blot yöntemi ile LC3-I ve -II proteinlerinin analizini yapmadan önce her bir basamak optimize edildi.

2.8.1. İmmunofloresans Analizi

Akış-sitometri ile deney gruplarından izole edilen CD44⁺/CD24⁻ yüzey belirteciye sahip kök hücreler beklemeyen iki kez PBS ile yıkandı ve %100 soğuk metanol içinde 15 dakika 20 °C’de inkübe edildi. Fiksasyon sonrası preparatlar 3 kez 5’er dakikalık 1x TBST (10x TBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl, 5 ml Tween-20, 950 ml dH₂O, pH 7,4) içinde yıkandı ve %1 BSA (1 g BSA, 100 ml TBST) solüsyonunda 1 saat boyunca oda ısısında ve 50 rpm çalkalamada bloklama işlemi gerçekleşti. Bloklama sonrası slaytlar 3 kez 5’er dakikalık TBST içinde yıkandı ve 2 µg/ml konsantrasyonlu rabbit anti ATF6 (N-terminous) IgG antibadi (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #sc-22799) solüsyonunda gece boyunca +4°C de ve 50 rpm ajitasyonda inkübe edildi. Ertesi gün slaytlar tekrar 3 kez 5’er dakikalık TBST içinde yıkandı ve bu sefer 2 µg/ml goat anti-rabbit IgG FITC konjugeli antibadi (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #sc-2012) solüsyonunda oda ısısında 2 saat boyunca, 50 rpm çalkalamada ve karanlık ortamda inkübe edildi. Sürenin sonunda slaytlar 3 kez 5’er dakikalık TBST içinde yıkandı ve 10 µl 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile boyandı ve floresan mikroskop (Nikon, Japonya) altında x100 büyütmede incelendi ve fotoğrafları alındı.

2.8.2. Western Blot Analizi

Western blot analizi aşağıdaki temel başlıklar gerçekleştirilerek yapıldı. Protein izolasyonu; bunun için western blot çalışmasında kullanılacak proteinler hücre hatlarından ticari kit (Millipore, kat. no: 2910) kullanılarak izole edildi. Protein izolasyonları yapılacak örnekler buz üzerine alındı ve örnekler üzerine 1,001 ml izolasyon çözültisi (1 ml tüm hücre ekstraksiyon tamponu (1x); 1 µl proteaz inhibitör karışımı) eklendi. Akış-sitometri ile izole edilen CD44⁺/CD24⁻ yüzey belirteçlerine sahip kök hücrelerin (yaklaşık olarak 2x10⁵ hücre) üzerine 2 ml soğuk PBS solüsyonu eklenerek hücreler yıkandı (bu aşama 2 kere tekrarlandı). Daha sonra 250 x g’de 5 dakika +4°C santrifüj işlemleri gerçekleştirilip süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine hazırlanan karışım ilave edildi ve 15 dakika buz kalıbı içerisinde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 8.000 x g ‘de +4°C’de 20 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldı ve herbir gruptan izole edilen proteinler nano drop cihazında konsantrasyonları ölçüldü.

İzole edilen proteinlerin yürütülmesi için SDS-PAGE hazırlandı. SDS-PAGE analizlerinde kullanılacak olan jeller için 10x10 cm'lik jel kalıpları kullanıldı (Bio-Rad, Mini-PROTEAN®Tetra Cell). Separating (ayırma) ve stacking (yükleme) olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yüzdeleri ayarlanan ayırma jeli için protokoller aşağıdaki gibidir.

Çizelge 2.2. Separating (Ayırma) Jeli

Çözelti	Akrilamidin farklı jel yüzdeleri için miktarlar (ml)		
	% 10	% 12	% 13
H2O	6,25	5,25	4,75
%30'luk akrilamid çözeltisi/ %0,8'lik bisakrilamid	5,00	6,00	6,50
Tris-Cl/SDS (4x) ph: 8,8	3,75	3,75	3,75
%10 Amonyum persülfat	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01

Çizelge 2.3. Stacking (Yükleme) Jeli

Çözelti	%5 'lik akrilamid jeli için miktarlar (ml)
H2O	3,05
%30'luk akrilamid solüsyonu/ %0,8'lik bisakrilamid	0,65
Tris-Cl/SDS (4x) ph: 6,8	1,25
%10 Amonyum persülfat	0,025
TEMED	0,005

Ayırıcı jel bileşenleri TEMED ve APS hariç sırasıyla 15 ml'lik tüplere eklendi ve karıştırıcıda 2 dakika beklemeye bırakıldı. TEMED ve APS akrilamid ve bisakrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için jel dökülmeden hemen önce eklenerek jel kasetinin $\frac{3}{4}$ lük kısmına hızlı bir şekilde döküldü. Ardından üst kısımda oluşan hava kabarcıklarını düzleştirmek amacıyla bir miktar isopropil alkol eklendi. 30 dakika beklendi ve sonrasında kurutma kağıdı ile üst kısımdaki alkol geri alındı. Daha sonra yürütme jeli yine aynı şekilde TEMED ve APS hariç sırasıyla eklendi.

TEMED ve APS de eklenerek jel karışımı kasetin üst kısmında kalan ¼ 'lük bölüme döküldü. Tarak takılarak kuyucukların oluşması sağlandı. Yürütme jelin polimerize olduğu gözlemlendikten sonra kullanılmak üzere hava almayacak şekilde sarılarak +4 dereceye kaldırıldı.

Yükleme tamponu olan 4x Lammeli tamponu (0,5 M Tris-HCl (ph: 6,8) 4,4 ml; Gliserol 4,4 ml; %20 SDS 2,2 ml; %1 Bromophenol Blue 0,5 ml; 2-mercapto-etanol 0,5 ml) hazırlandı. Her protein örneğine eşit miktarda Laemli Tamponu eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra 5 dakika 90°C'de inkübe edildi. Her örnekten 20 µg total protein %4-12 gradiyant SDS-PAGE mini jeline yüklendi ve 40 mA'de 45 dakika yürütme gerçekleştirildi. Kullanılan elektroforez tamponu şu şekilde hazırlandı. 30 g Tris, 144 g Glycin, 10 ml SDS ve 1 litreye tamamlamak için dH₂O ilave edildi. Protein marker olarak 5 µl PageRuler Plus Prestained Protein Ladder kullanıldı.

Jel yürütülmesi tamamlandıktan sonra SDS-PAGE jeli kabından çıkarılarak dH₂O içinde 5 dk süre ile yıkandı. Daha sonra dH₂O boşaltılarak jeli 100 ml fiksatif solüsyonu içerisinde (metanol-glasiyal asetik asit-dH₂O 5:1:4) 1 saat boyunca yumuşak çalkalamada (50 rpm) fikse edildi. Jel tekrar 5 dk dH₂O ile yıkandı ve 1x Coomassie Brilliant Blue solüsyonunda ve 50 rpm çalkalamada 1 saat boyunca boyanmaya bırakıldı. Jel dH₂O'da 5 dakika yıkandı ve ardından yıkama solüsyonunda (metanol-glasiyal asetik asit-dH₂O 4:1:5) zemin boyası silininceye kadar yıkama yapıldı. SDS-PAGE jeli uzun süre saklamak için %5 glasiyal asetik asit solüsyonunda +4°C' da kaldırıldı.

Elektroforez sonrası jel kabından çıkarıldı ve Trans-Blot^R TurboTM Transfer sistemi (Bio-Rad Laboratories, Inc., #170-4155) kullanılarak 1,3 A elektrik akımında PVDF membrana protein transferi gerçekleştirildi. PVDF membranı 1x TBS-T (10xTBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl, 5 ml Tween-20, 950 ml dH₂O, PH 7,4) solüsyonunda 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra % 5'lik yağsız süt solüsyonunda (5 gr süt tozu, 100 ml TBS-T) ya da % 1'lik BSA (1 gr BSA tozu, 100 ml TBS-T) solüsyonu içinde 50 rpm çalkalamada yaklaşık 1 saat boyunca blokladı.

Bloklama sonrasında birincil antikolar son konsantrasyonu 1:200 (1 ug/ml) ve ikincil antikolar rabbit anti-goat IgG 1:2000 (0,1 ug/ml) ve goat anti-goat IgG

1:5000 (0,04 ug/ml) oranında bloklama solüsyonunda (%5'lik yağsız sütte ya da % 1 BSA' da) sulandırıldı.

PVDF membranı 1x TBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkandı ve 1 ug/ml antikor solüsyonunda 50 rpm çalkalamada gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılarak membran 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkandı. 0,1 ug/ml konsantrasyonlu ikincil antikor solüsyonu içinde 2 saat boyunca 50 rpm çalkalamada ve oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

Sekonder antibadi muame süresi tamamlandığında hedef proteinin saptanması için immün-star Western C chemiluminescent Substrate solüsyonu kullanıldı. İkincil antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez 1x TBS-T solüsyonu içinde yıkandı ve ardından substrat solüsyonu ile çalkalamada oda ısısında 10 dakika boyunca muamele edilerek kemilüminesans tarama cihazında görüntüsü alındı.

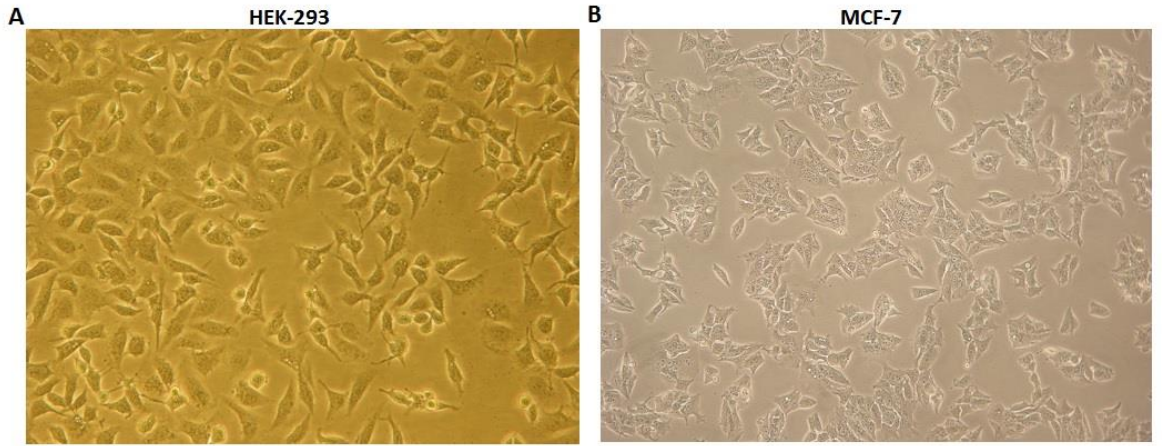
2.9.İstatistiksel Analizler

Etken madde ile muamele edilmiş çalışma grupları negatif kontrol (muamelesiz gruplar) ve pozitif kontroller ile istatistiki karşılaştırma yapıldı ve anlamlılık *P* değeri hesaplanarak incelendi. Gruplar içi farklılık bağımlı t testi ve gruplar arası farklılık Varyans Analizi (ANOVA) uygulanarak araştırıldı. Bütün istatistik işlemleri GraphPad Prism® V.5.00 (GraphPad software deneme sürümü) ve MINITAB® Release 14 programı kullanılarak gerçekleştirildi. *P*<0.05 istatistiksel fark olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Hücre Kültürleri

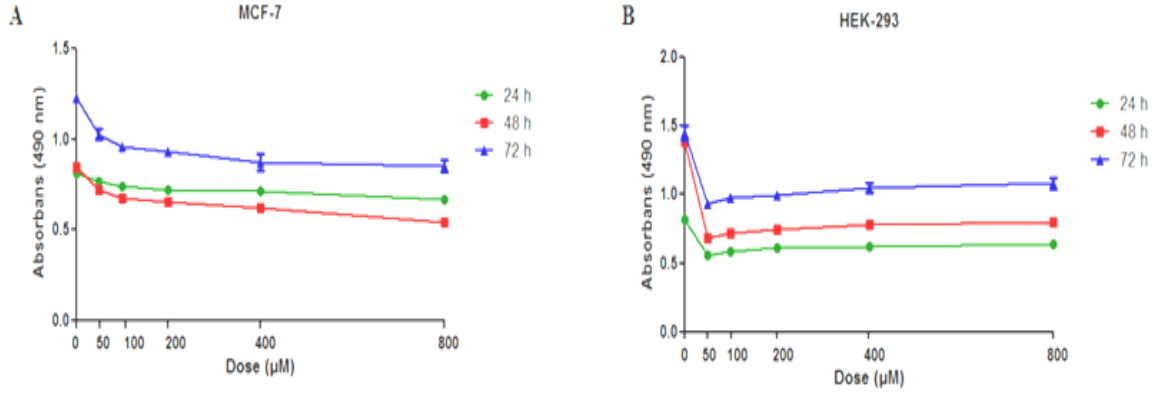
Hem MCF-7 ve HeK293 hücreleri ATCC'da tanımlandığı gibi kültür edildi ve hücrelerin mitotik indeksleri dikkate alınarak optimizasyonları gerçekleştirildi. Etken maddesi optimize edilen hücre kültürleri (Şekil 3.1) projenin diğer amaçları için kullanıldı.



Şekil 3.1. Kullanılan hücre hatları. (A) İnsan embryonik böbrek kökenli HEK293 hücre hattı (x100), (B) Meme kanseri kökenli MCF-7 hücre hattı (x100).

3.2.Proliferasyon ve Canlılık Analizlerinin Optimizasyonu

Hücrelerin canlılık analizi için MTT metodu kullanıldı. Melatoninin, çalışma da kullanılmak üzere literatür ile uyumlu 100 μ M doz seçildi ve dilusyonları yapılarak canlılık testi gerçekleştirildi (Şekil 3.2).

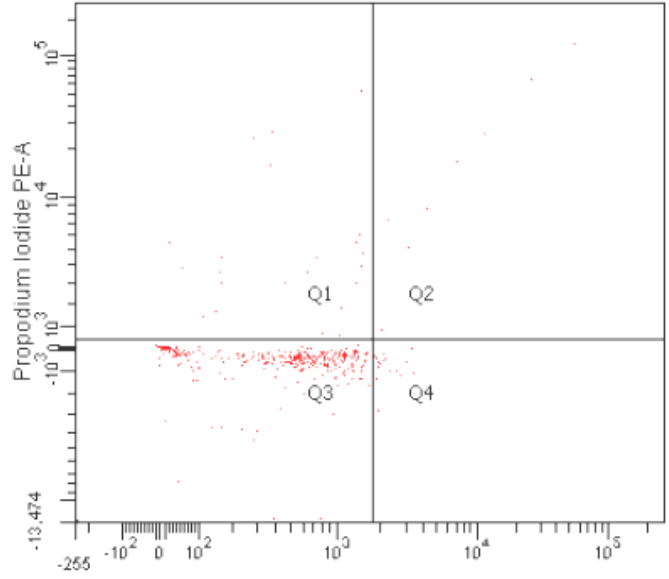
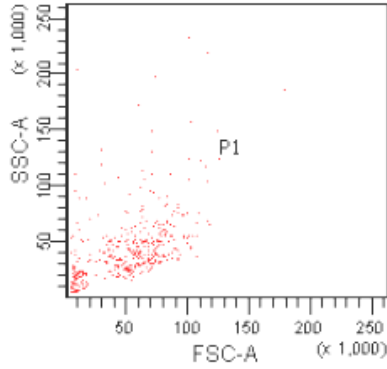


Şekil 3.2. Melatonin doz optimizasyonu. Literatürde melatonin uygulama dozunun fazla değişkenlik göstermesi sebebiyle MCF-7 (A) ve HEK293 (B) hücrelerinde kendi IC₅₀ dozumuzu belirlemek için literatürden alınan 100 µM melatonin ve dilasyonları ile yapılan MTT analiz sonuçları.

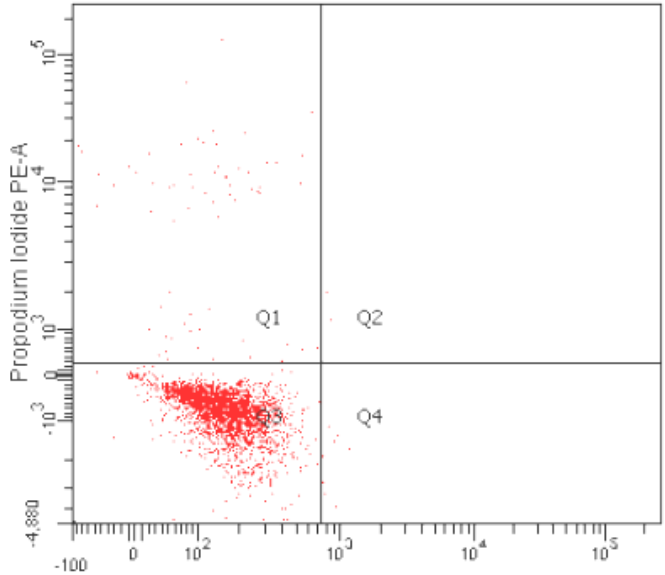
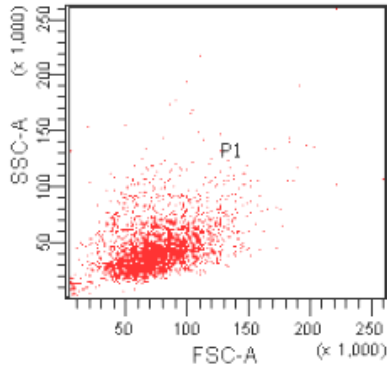
Elde edilen MTT sonuçlarına bakılarak 100 µM melatonin ve üzerindeki dozlarda hücrede bir stabilite olduğu gözlemlendi. Bundan dolayı çalışmamıza daha düşük doz serileri uygulanmasının uygun olduğuna karar verildi ve 10, 20, 40, 80 µM dozlarda MTT analizi tekrarlandı ve uygun doz seçildi.

Melatoninin uygun dozu seçildikten sonra, apoptotik etkisini ortaya koymak için annexin v analizinin optimizasyonu sağlandı. Annexin-V antiodisi uygulanmadan önce ayrı bir tüpte hücreler, interkalan ajan olan propodium iodide (PI) ile muamele edildi. PI, ölmüş hücrelerde DNA fragmentlerine bağlanır. PI yardımıyla analizde kullanılacak olan canlı-ölü kapılamaları alındı (Şekil 3.3).

A. MCF-7 - PI



B. HEK293 - PI

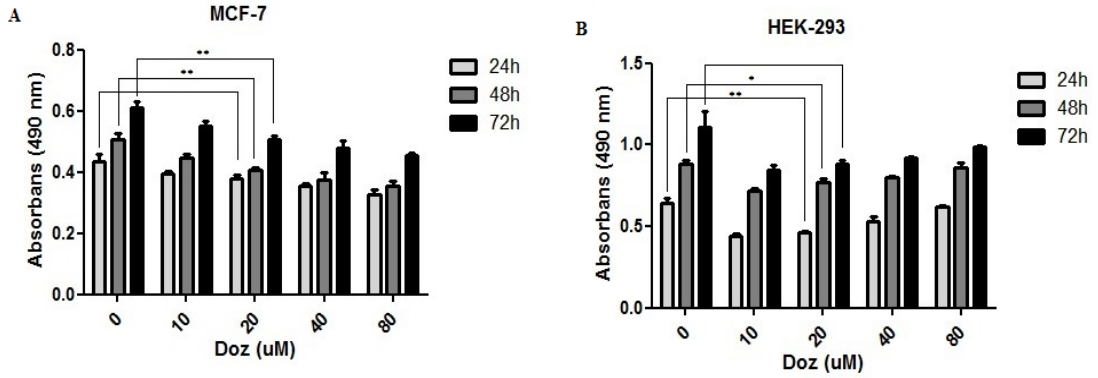


Şekil 3.3. Apoptoz tayini için kapılama. Melatonin uygulanmayan hücrelerde canlı olan kısmı kapılamak için hücreler sadece PI ile muamele edildi. Kapılama sonucunda canlı hücreler Q3 bölümünde sınırlandırıldı.

3.2.1. Melatonin Kanser Hücrelerinde Proliferasyonu ve Canlılığı Azaltır

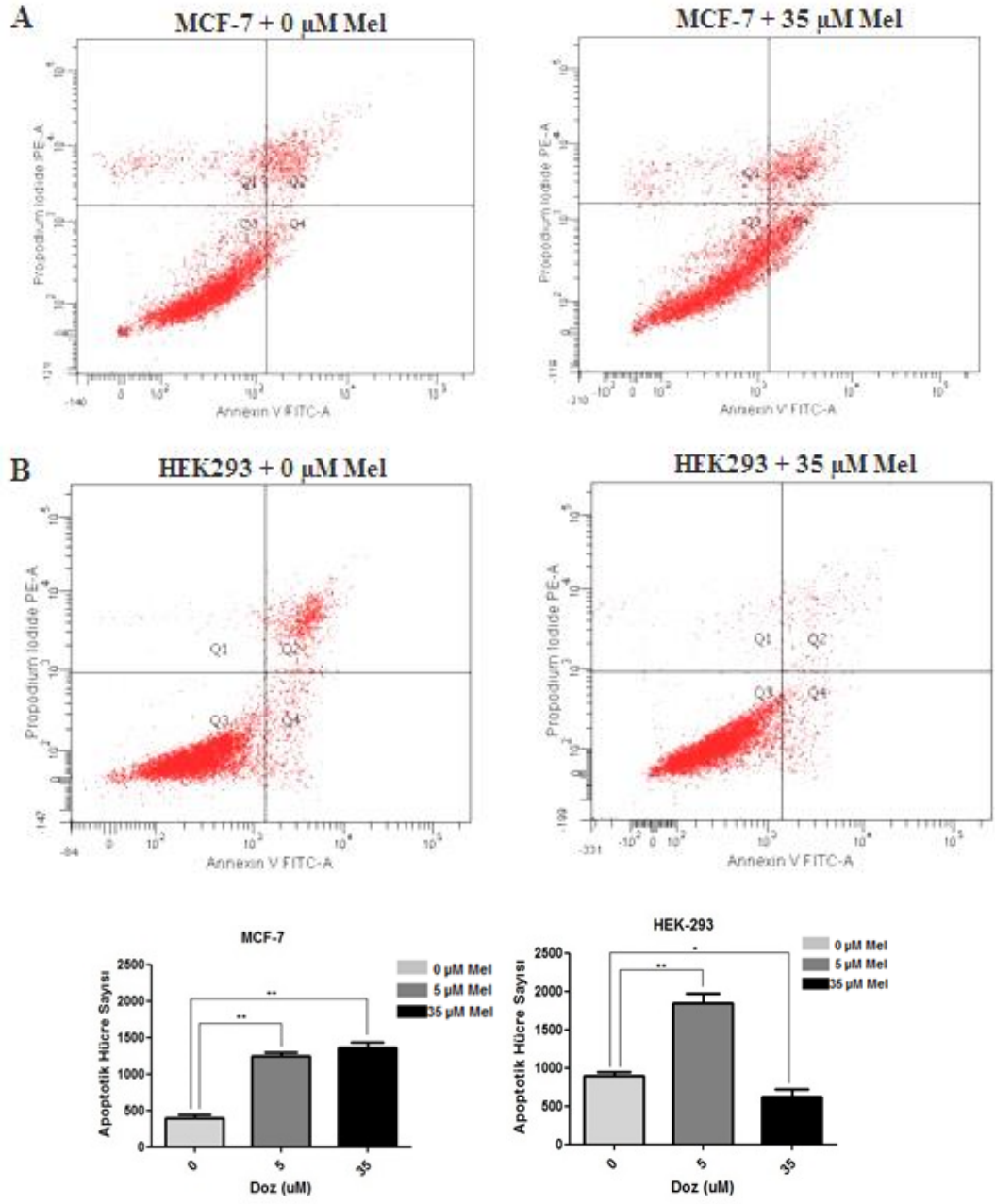
Optimizasyon aşamasından sonra MCF-7 ve HEK293 hücreleri 10, 20, 40, 80 μM melatonin dozları 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi (Optimizasyon için kullanılan yüksek doz melatonin uygulamaları optimizasyon aşamasında değerlendirilmiştir). Canlılık durumu MTT assay tekniği ile incelendi. Melatonin uygulanan tümöröjenik MCF-7 hücrelerinde melatonin uygulanmayan kontrollere

göre canlılığın 24 (p=0,06549), 48 (p=0,0037) ve 72 (p=0,0088) saat sonunda azaldığı tespit edildi. Melatonin uygulanan HEK293 hücrelerinde ise melatonin uygulanmayan negatif kontrole göre canlılığın 24 (p=0,0039), 48 (p=0,0341) ve 72 (p=0,0599) saat sonunda kısmi azalmanın ardından zamana bağlı olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücre canlılık seviyesi. Yaklaşık 10^4 sayıda MCF-7 (A) ve HEK293 (B) hücreleri üçerli gruplarda 96'lık well plate'lere ekildi ve 24 saat sonra serumsuz medyum içinde bir gece bekletildi (starvasyon işlemi için materyal-metod bakınız). Farklı dozlarda hazırlanan melatonin ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. Süre sonunda canlı hücre miktarı MTT assay uygulaması ile 490 nm dalga boyunda absorbansı incelendi.

Melatonin ile muamele süresinden bağımsız olarak bu dozları karşılaştırdığımızda MCF-7 hücrelerinde ciddi bir canlılık düşüşü gözlenirken, kontrol hücre hattı olan HEK293 hücrelerinde ise doz arttıkça zamana bağlı olarak canlılıkta da artış tespit edildi. Bu azalmanın hücre ölümü sonucunda gerçekleştiğini araştırmak için Annexin V analizi yapıldı. Özellikle HEK293 hücrelerindeki melatonin uygulanan 10-20 µM dozlar arasındaki azalışı doğrulamak için ara dozlar olan 5 ve 35 µM dozları çalışmaya dahil edildi. MCF-7 ve HEK293 hücrelerine 5 ve 35 µM melatonin 48 saat süresince muamele edildi ve annexin V apoptoz analizi yapıldı. Sonuç olarak MCF-7 hücrelerinde 5 µM (p=0,0040) ve 35 µM (p=0,0060) dozlarda melatonin uygulaması apoptozu artırdığı gözlenmiştir. Aynı şekilde HEK293 hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında 5 µM (p=0,0025) melatonin uygulanmasında apoptoz artarken 35 µM (p=0,0324) melatonin uygulanmasında apoptozda azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Her iki hücre hattında da verimli sonuçları 35 µM melatonin dozunda almamızdan dolayı diğer çalışmaları bu doz üzerinden yürütüldü.

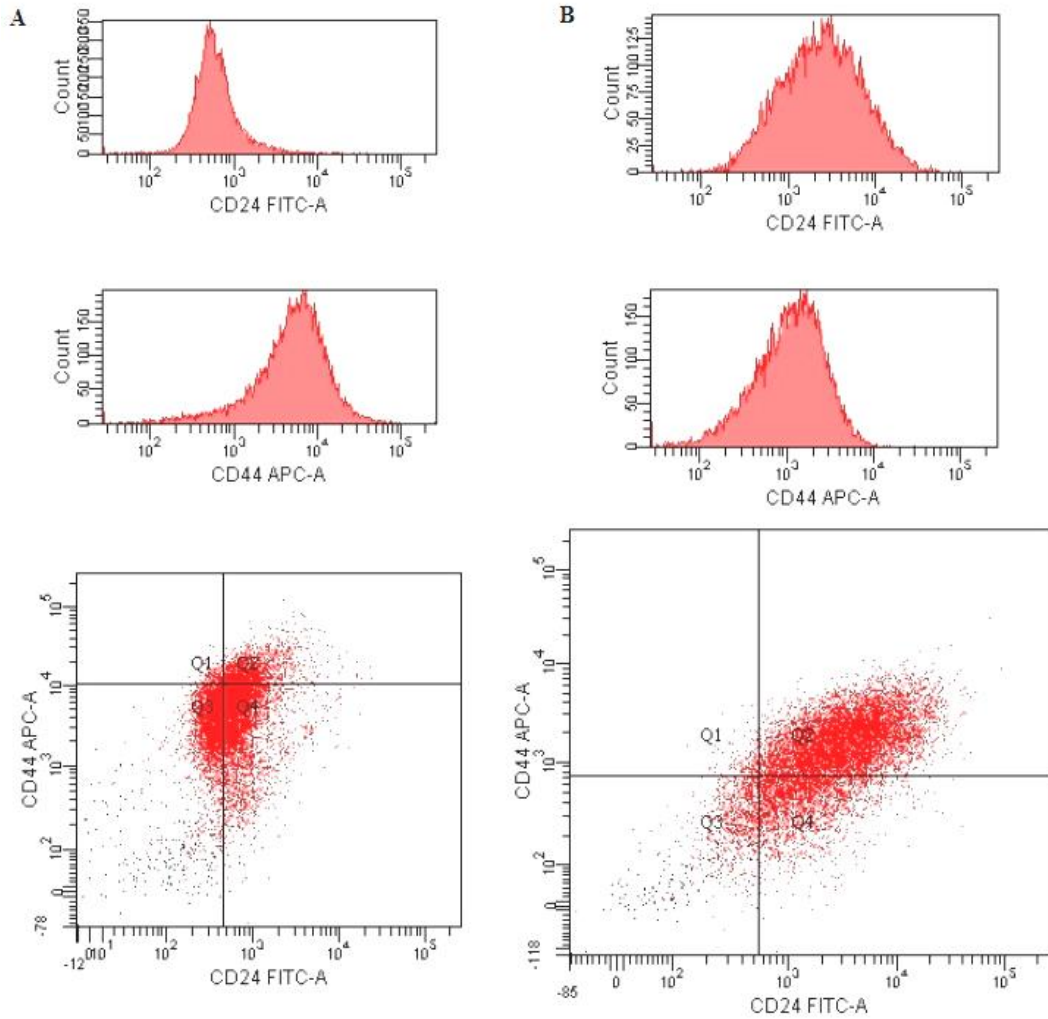


Şekil 3.5. Annexin V ile apoptoz analizi. Yaklaşık 10^4 sayıda MCF-7 (A) ve HEK293 (B) hücreleri FITC işaretli annexin V ve propidium iodide ile muamele edildi.

3.3. Akış-sitomerti Kök Hücre İzolasyonu ve Tümörfaz (Sphere) Oluşum Optimizasyonu

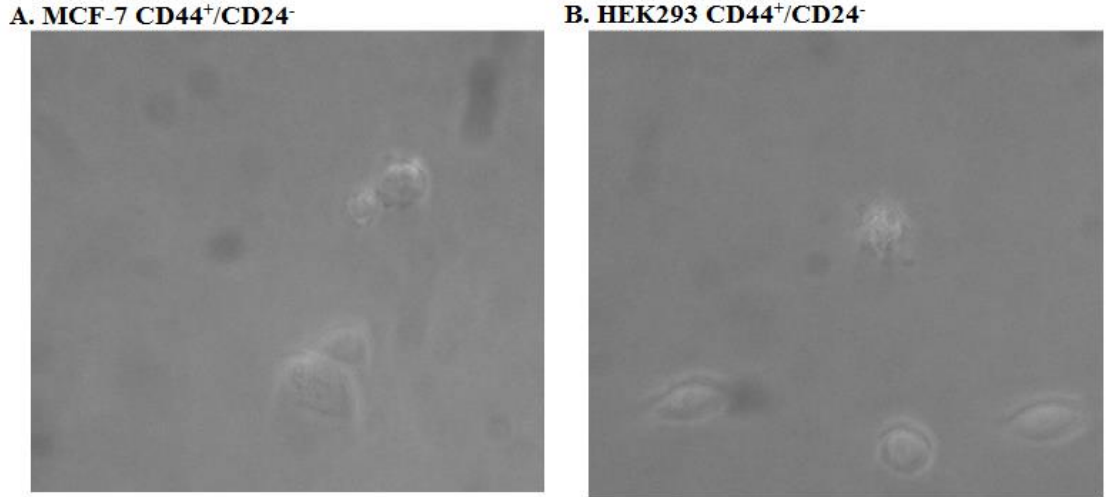
Kanser kök hücreleri miktarı CD44/CD24 yüzey belirteçleri kullanarak akış-sitometri ile tespit edildi. İzole edilen KKH'lerin tümörfaz (sphere) oluşum tekniği kullanılarak akis sitometrisinden izole edilen kök hücre varlığı doğrulandı.

Kök hücre izolasyonu için farklı teknikler bulunmaktadır. Bu çalışmada, tümorojenik hücre hattı olan MCF-7 ve tümorojenik olmayan HEK293'ten spesifik hücre belirteçleri kullanılarak kök hücreler izole edilmiştir. Bu CD44⁺ ve CD24⁻lü hücreler çalışmaya alınmıştır. CD44 ve CD24 antikorları sırasıyla APC ve FITC ile konjigeydi. MCF-7 hücrelerinde CD44⁺ belirteçine sahip hücreler yaklaşık %18 iken CD24⁻ hücre miktarı yaklaşık %29'du. HEK293 hücrelerinde ise CD44⁺ belirteçli hücreler yaklaşık %66,7 iken CD24⁻ hücre miktarı yaklaşık %8,3 olduğu gözlenmiştir. Genel olarak, CD44⁺/CD24⁻ kombinasyonunun miktarına bakıldığında ise MCF-7 hücre hattında %1,2 iken HEK293 hücre hattında %1,1 olarak tespit edildi. Şekil 3.6'de kadran ve histogram grafiğinin Q1 bölümünde CD44⁺/CD24⁻lü hücre miktarı görülmektedir.



Şekil 3.6. FACS analizinde kadran ve histogram belirlenmesi. FACS analizinde MCF-7 (A) ve HEK293 (B) hücrelerinde CD44 ve CD24 etiketli hücrelerin histogram ve kadran verileri. Q1 bölümünde CD44⁺/CD24⁻lü hücreler görülmektedir.

MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden izole edilen CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerin, kök hücre olduklarını doğrulamak ve desteklemek için tümörfaz (sphere) oluşumu gözlemlendi. Bunun için izole edilen hücreler serumsuz medyum içerisinde kültüre edildi. Tam tümörfaz (sphere) oluşumu 45-60 gün süre sonunda gerçekleşti. Kök hücrelerin serumsuz medyum içerisindeki 4 ve 5 gün sonundaki mikroskoptaki görünüşleri şekil 3.7’de gösterilmiştir.

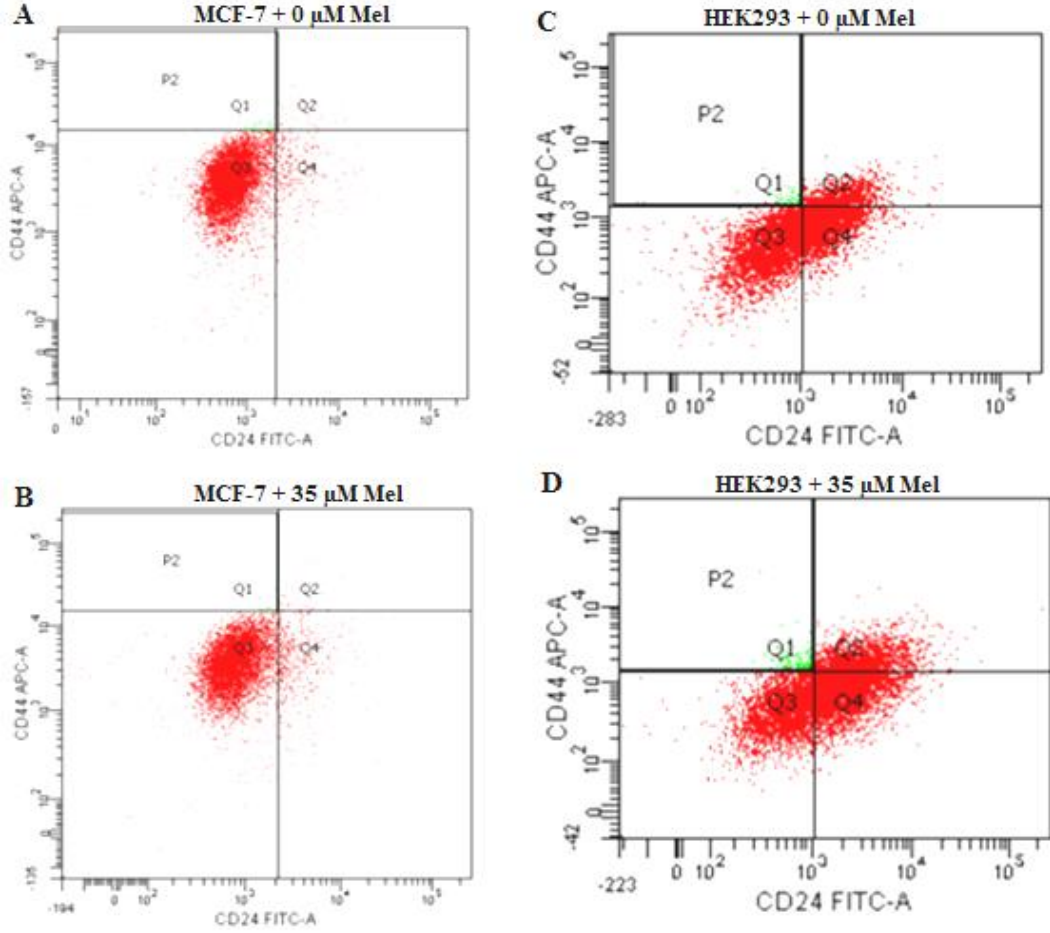


Şekil 3.7. Kök hücre tümörfaz oluşturma süreci. İzole edilen kök hücrelerin serumsuz medyum ortamda 4. gün sonundaki x40 büyütmedeki MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ (A), HEK293 CD44⁺/CD24⁻ (B) görünümü.

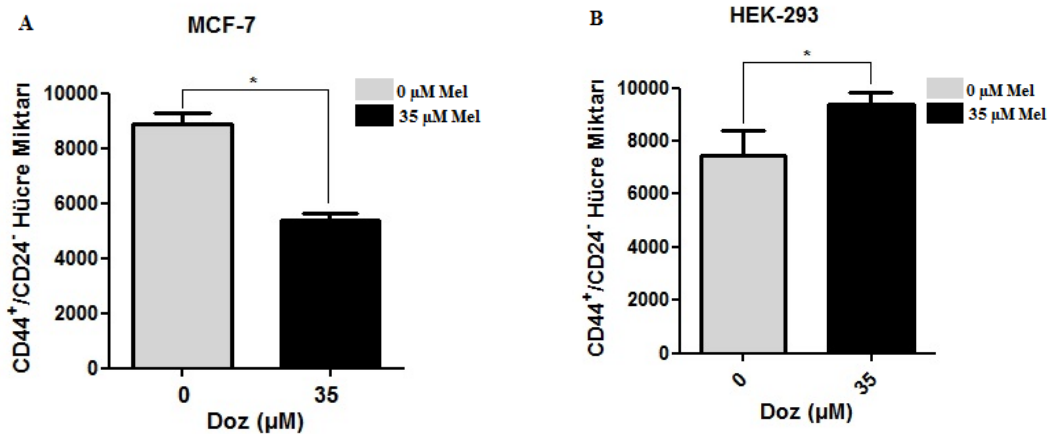
Tümörfaz (sphere) oluşumu gözlemlendikten sonra MCF-7 ve HEK293 hücre hatlarından izole edilen CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerin kök hücre olduğu doğrulandı.

3.3.1. Melatonin Kanser Kök Hücre Miktarını Düşürmektedir

Çalışmamızda total hücrelere verilen 35 µM melatoninin 48 saat muamelesinden sonra CD44⁺/CD24⁻lü kök hücreler izole edilerek (Şekil 3.8) kontrol grubuna kıyasla MCF-7 kök hücrelerinde azalma gözlenirken (p=0,0106) HEK293’deki kök hücrelerde ise artış gözlenmiştir (p=0,0493) (Şekil 3.9). Bu sonuçlar neticesinde, kök hücre miktarının azalmasında rol alabilecek olası mekanizmalar arasında apoptoz, farklılaşma, otofaji ve diğer yollar yer almaktadır.

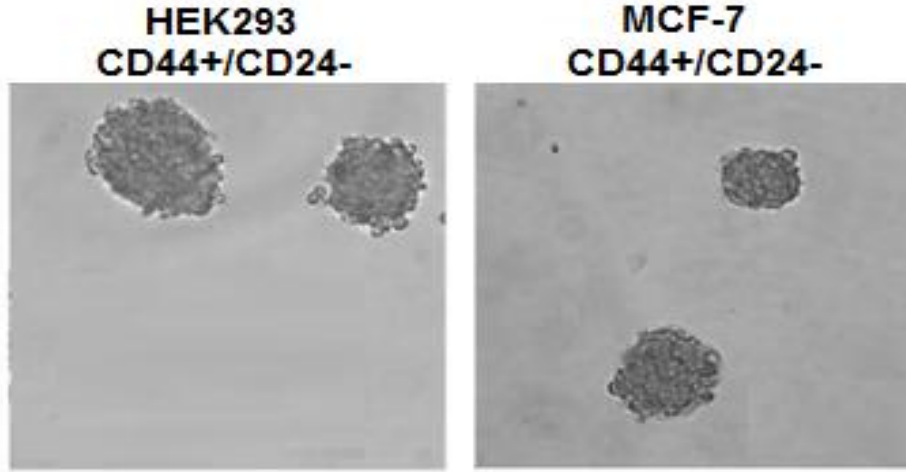


Şekil 3.8 FACS analizi. Melatonin uygulanmayan MCF-7'deki (A) $CD44^+/CD24^-$ kök hücre miktarı, 35 μM melatonin uygulanan MCF-7'deki (B) kök hücre miktarı. Melatonin uygulanmayan HEK293'deki (C) $CD44^+/CD24^-$ kök hücre miktarı, 35 μM melatonin uygulanan HEK293'deki (B) kök hücre miktarı. (Q1: $CD44^+/CD24^-$, Q2: $CD44^+/CD24^+$, Q3: $CD44^-/CD24^-$, Q4: $CD44^-/CD24^+$)



Şekil 3.9 FACS analizi ile kök hücre miktarı. Total MCF-7 (A) ve HEK293 (B) hücrelerine 35 μM melatonin uygulandıktan sonraki $CD44^+/CD24^-$ hücre miktarındaki değişim. Her grup için 1×10^6 total hücreden izole edilen $CD44^+/CD24^-$ miktarına göre analiz yapılmıştır (MCF-7 $p=0,0106$, HEK293 $p=0,0493$ 'tür). Verilerin istatistik analiz detayı (Bkz. EK A).

Tümörfaz oluşturmak için izole edilen hücreler serumsuz medyum içerisinde 45-60 gün kültüre edildi ve süre sonunda mikroskopta x100 büyütme de görüntülendi (Şekil 3.10).

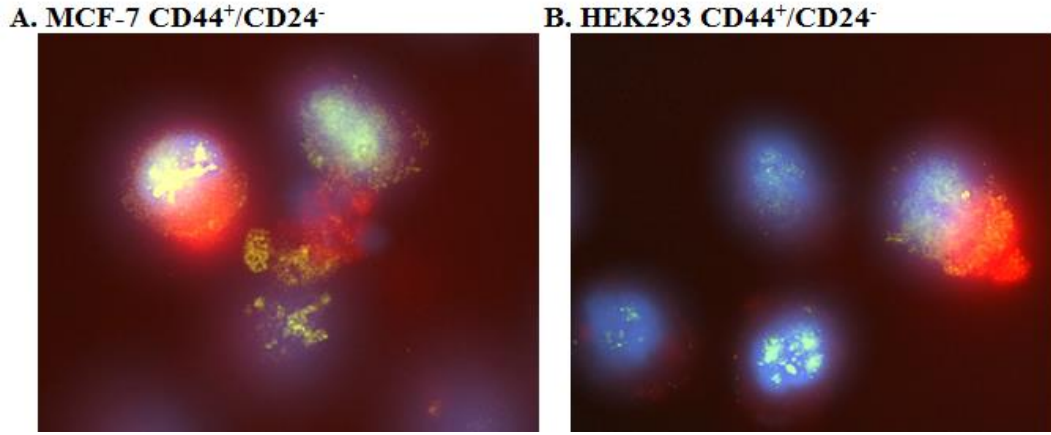


Şekil 3.10. Kök hücrede tümörfaz oluşumu. Akış sitometriyle HEK293 ve MCF-7 hücrelerinden izole edilen CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerin kök hücre olduklarını konfirme etmek için 45-60 gün süreyle serumsuz RPMI-1640 medyumunda bekletildi ve tümörfaz (sphere) oluşumu gözlemlendi. 4-5 günde bir kontrol edilerek medyumunu tazelenildi.

3.4.Otofaji Analizi İçin İmmüno Floresan Optimizasyonu

MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden CD44⁺/CD24⁻lü kök hücreler izole edildikten sonra LC3-II'nin floresan görüntülenmesi için kök hücrelerin lamlara fiksasyonu metanol ile gerçekleştirildi. Protokollere uygun olarak slaytlar primer ve sekonder antibadilerle muamele edildi. Görüntüleme aşamasında mikroskopta herhangi bir hücre bulunamadı. Antibadi muameleleri sırasında slaytlar sıvı ve çalkalama ortamında gerçekleştiğinden dolayı hücrelerin lamdan kalktığına kanaat getirdik. Bu yüzden fiksasyon aşamasını farklı bir kimyasal olan formaldehid ile gerçekleştirdik. Slaytlar tekrar antibadilerle muamele edildi ve yine sonuç alınmadı. Total MCF-7 ve HEK293 hücreleri ile lamel kültürü yapıp antibadilerle muamele edildiğinde başarılı sonuçlar alınarak LC3-II görüntülendi. Bu yüzden izole edilen kök hücrelerin 24 saat süre ile lamel kültürü yapıp ondan sonra antibadiler ile muamelesinin uygulanmasını uygun gördük. Kök hücrelerin 24 saat süre ile kültüre edilmesinde ise kök hücrelerin farklılaşacağını ve olgun kanser hücrelerini oluşturacağını düşündük. Bu farklılaşmanın ise analizimizi dolayısıyla sonucumuzu yansıtmayacağına karar verildi. Bundan dolayı floresan görüntüleme de kullanılmak üzere çalışmaya eklendi.

CD44-Alexa Flour-680 antiadisi ile LC3-II antiadisi birlikte kullanıldı ve görüntülendi (ekil 3.11).



Şekil 3.11. Kök hücrede CD44-Alexa Flour-680 ve LC3-II-FITC immünofloresan görüntüsü. İzolen edilen kök hücreler 24 saat lamel kültüründen sonra CD44-Alexa Flour-680 ve LC3-II-FITC antiadileri ile mamele edildi (Mavi: DAPI ekirdek boyası, yeşil: LC3-II, kırmızı: CD44).

Floresan görüntüleme sonucunda, CD44⁺ hücrelerde, LC3-II agregasyonu gösterildi. Bu analiz ile kök hücrelerin 24 saat kültürü sonucundaki farklılamı olma ihtimali ekarte edilemedi. LC3-II antiadilerini alan CD44⁺ belirteçli hücreleri gösterildi, ancak bu görüntüleme de CD24⁻ belirteçli hücrelerin olmadığını gösterilemedi. Bundan dolayı, izole edilen kök hücreleri lama herhangi bir fiksasyon ajanı kullanmadan PBS solüsyonu içindeki hücreler primer ve LC3-II-FITC antiadileri ile muamele edildi. Antiadı muamelesinden sonra hücreler lama damlatıldı ve DAPI ile muamelesinden sonra floresan mikroskopunda incelendi ve görüntülendi.

3.4.1.Melatonin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki LC3 Agregasyon ve Otofajik Vakuollerin Oluşumunu Tetikler

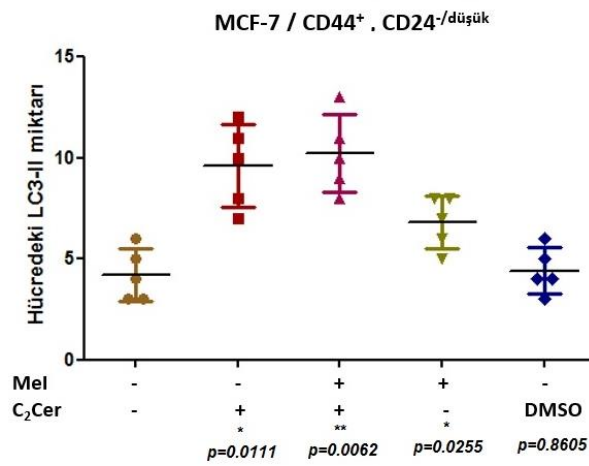
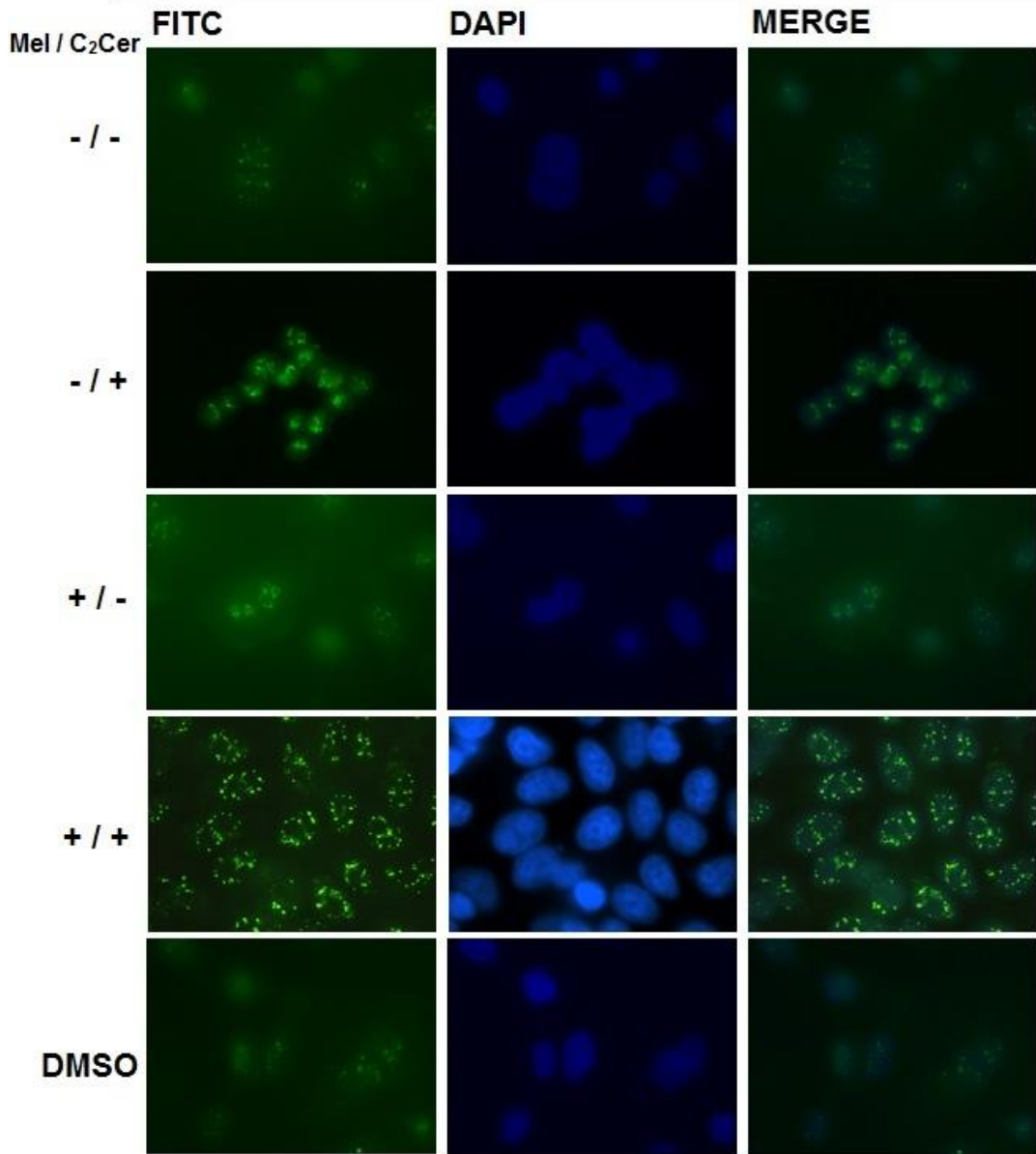
LC3 agregasyonu, otofaji takibinde kullanılan ve hücrede oluşan otofaji vakuollerin miktarınının ollmesine dayanan bir yöntemdir. Otofaji aktif değilse LC3-I formunda sitoplazmada lokalizedir. Otofajik yolak uyarıldığında LC3-I'den LC3-II'e dnm gerçekleşir ve otofagozom membranı ile birleşir. LC3-II proteininin antikoru imminofloresan ile işaretlenerek muamele edildiğinde, otofajiyi saptamak mümkün olmaktadır. Çalışmada, total MCF-7 ve HEK293 hücrelerine 48

saat boyunca 35 µM melatonin ve otofaji belirteci olan C₂Cer 25 µM konstrasyonlarla muamele edildi. Süre sonunda CD44⁺/CD24⁻lü kök hücreler izole edilerek floresan işaretli antibodilerle muamele edildi. Otofaji vakuelleri floresan mikroskobu altında incelendi. C₂Cer maddesinin sulandırılmasında dimetil sülfoksit (DMSO) kimyasalı kullanılmasından dolayı, kontrol grubu olarak DMSO'da ilave edildi ve otofajik etkisi gözlemlendi.

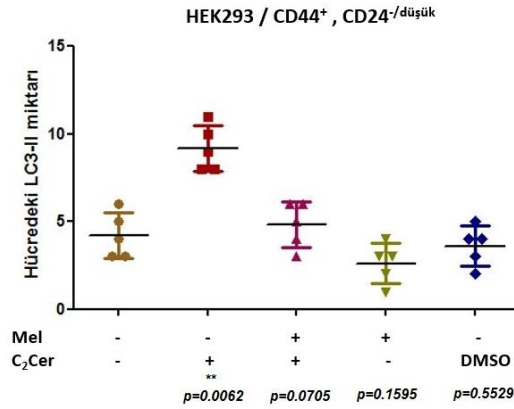
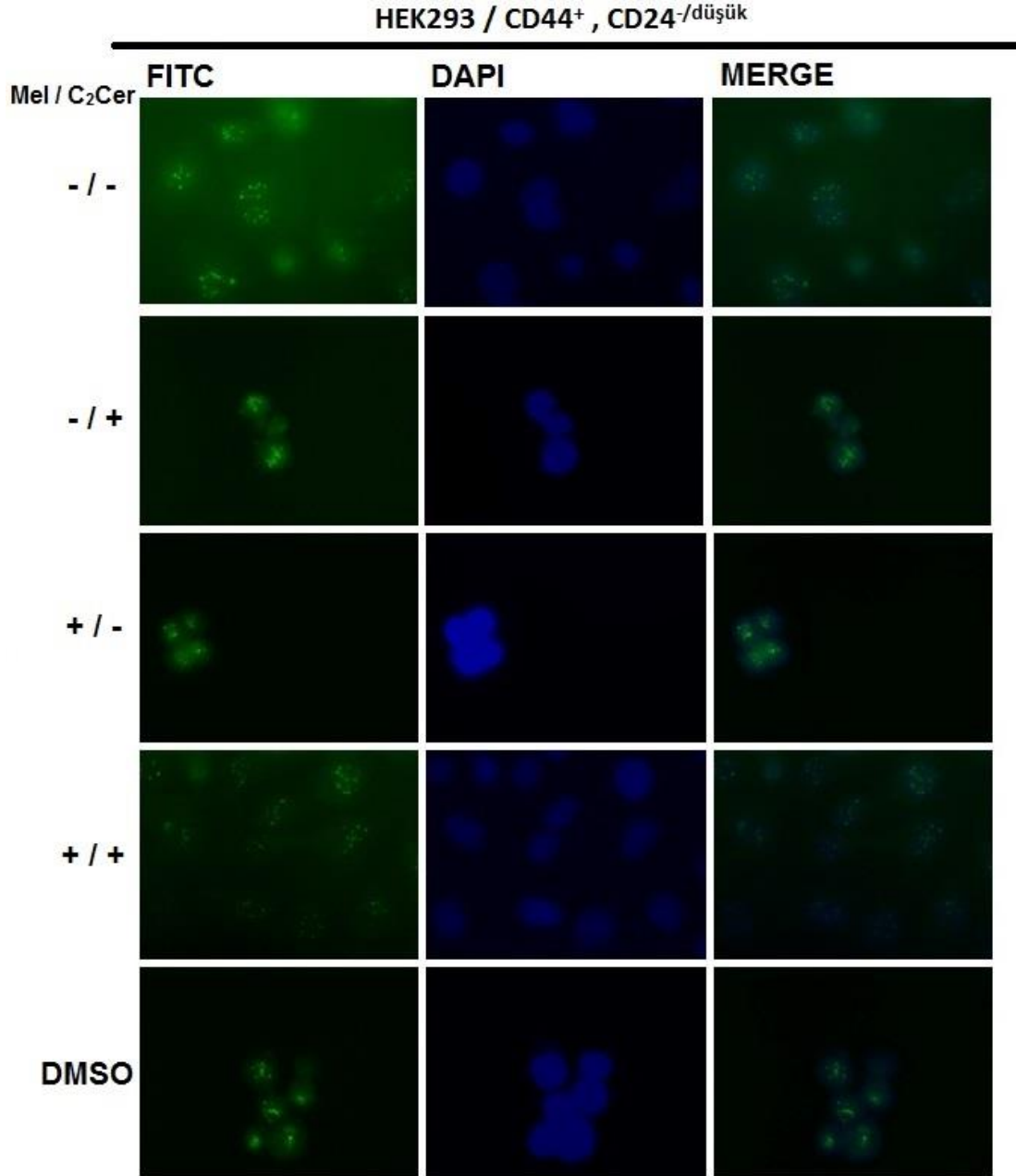
Melatonin, C₂Cer ve DMSO kombinasyonları oluşturuldu ve analiz sonucunda LC3-II sinyalleri sayıldı. MCF-7'den elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücrelerde sadece melatonin uygulanan grupta otofajide 2 kat artış olduğu gözlemlendi (p=0,0255). MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde melatonin uygulanan gruptaki otofaji artışı, sadece C₂Cer verilen kontrol grubundaki otofaji artışı kadar yüksek değildi. Ayrıca MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde kontrol olarak deney gruplarına ilave edilen DMSO'nun ise melatonin uygulanmayan grup ile otofaji artışı yakın değerler gösterdi (p=0,8605) (Şekil 3.12).

HEK293'ten elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücreler içinde melatonin, C₂Cer ve DMSO maddelerin kombinasyonları oluşturuldu ve analiz edildi. HEK293 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde sadece melatonin uygulanan grup melatonin uygulanmayan grup ile kıyaslandığında otofaji de azalma tespit edildi (p=0,1595). Ayrıca HEK293 CD44⁺/CD24⁻ hücrelerinde kontrol olarak deney gruplarına ilave edilen DMSO'nun ise melatonin uygulanmayan grup ile otofaji artışı yakın değerler gösterdi (p=0,5529). Floresan mikroskop görüntüleri, analiz sonucu ve oluşturulan grafikler şekil 3.12'te verilmiştir.

MCF-7 / CD44⁺, CD24⁻/düşük



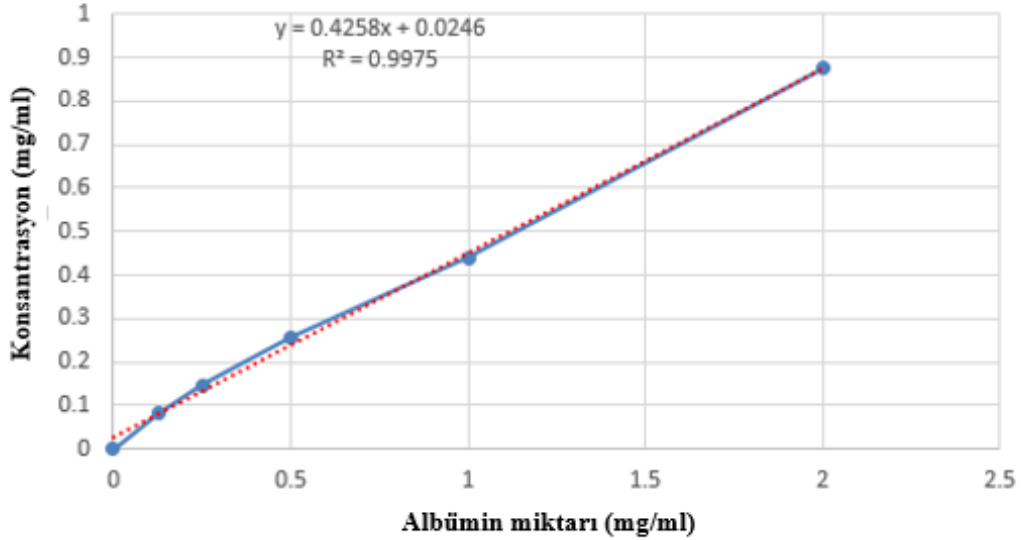
Şekil 3.12. LC3-II protein translokasyonu. MCF-7'den izole edilen CD44⁺/CD24⁻ hücrelerde LC3-II'nin immünofloresan görüntüsü (x100) ve istatistiksel grafiği.



Şekil 3.13. LC3-II protein translokasyonu. HEK293'ten izole edilen CD44⁺/CD24⁻ hücrelerde LC3-II'nin immüno Floresan görüntüsü (x100) ve istatistiksel grafiği.

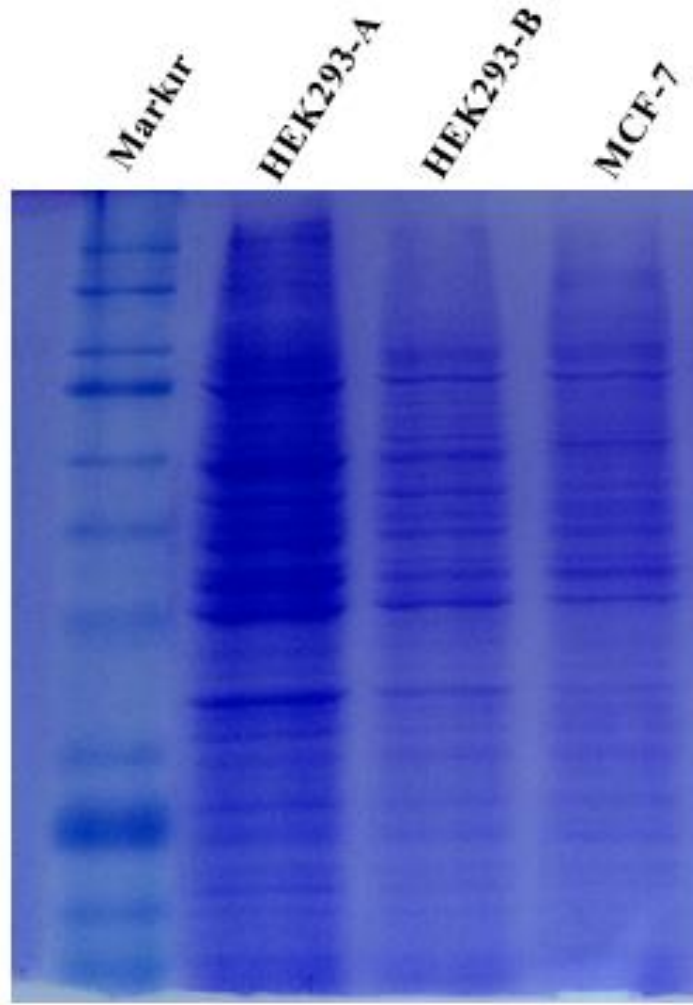
3.5. Western Blot ile LC3-I'in LC3-II'ye Dönüşüm Optimizasyonu

Akış-sitometri ile izole edilen CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerden protein izolasyonu yapıldı. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları, 2 mg/ml albümin dilüsyonları ile oluşturulan konsantrasyon grafiği kullanılarak eşitlendi (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Albümin dilüsyonları. 2 mg/ml albümin dilue edilip nano drop konsantrasyonları ölçüldü ve örneklerimiz için bir standart oluşturuldu (Grafik; albüminin nano droptaki 3 farklı ölçüm sonuçlarının ortalaması alınarak çizilmiştir). İzole edilen protein örnekleri standart sınırları içerisinde eşitlendi.

Her örnekten izole edilen proteinler çalışmada kullanılmak üzere 20 µg olacak şekilde eşitlendi (optimizasyon denemesi için ilk örnek olan HEK293-A 40 µg olacak şekilde hazırlandı) ve SDS-PAGE yüklendi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel comassie brilliant blue ile boyandı ve görüntülendi (Şekil 3.15).

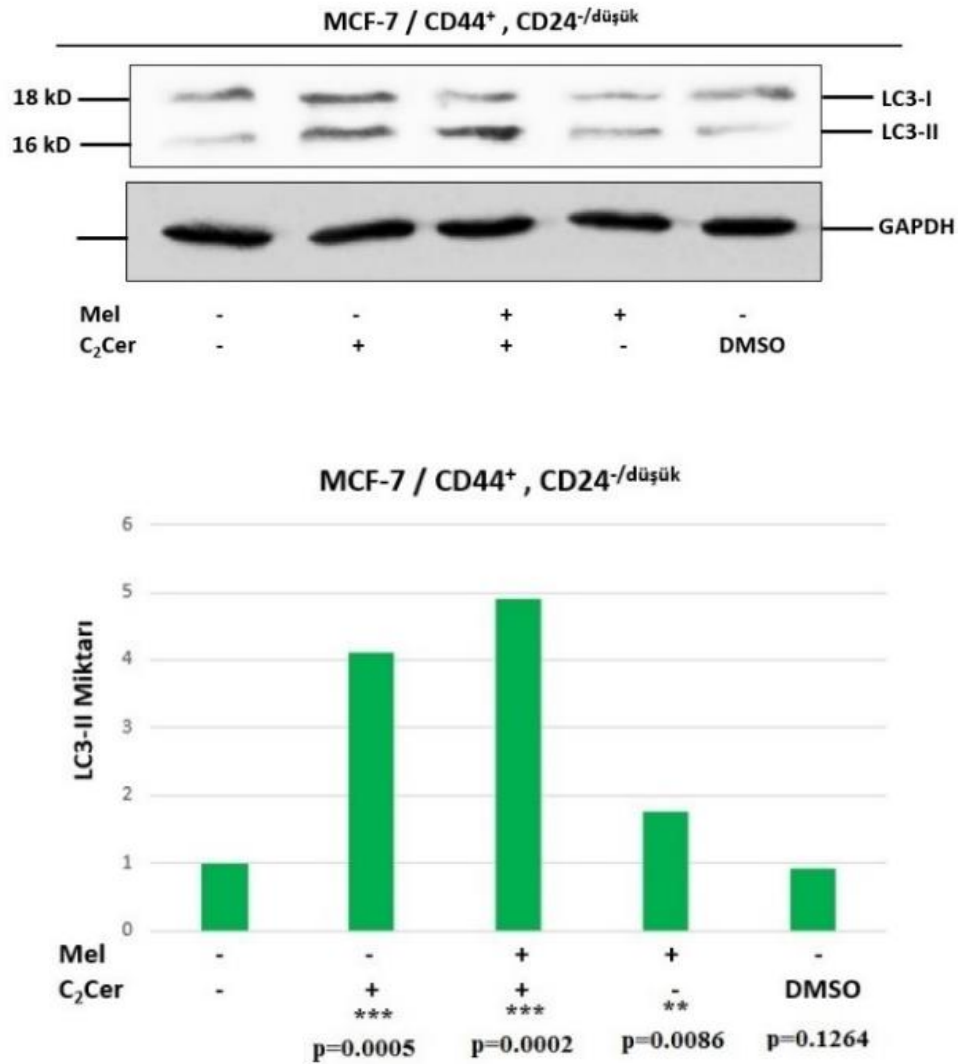


Şekil 3.15. SDS-PAGE jel görüntüsü. Optimizasyon için MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden izole edilen proteinler farklı konstrasyonlarda SDS-PAGE jele yüklenerek yürütüldü ve comassie-brillant blue ile boyandı (Markır: 250 kDa protein ladder, HEK293-A: 40 µg protein, HEK293-B: 20 µg protein, MCF-7: 20 µg protein).

3.5.1.Melatonin, Meme Kanseri Kök Hücrelerinde LC3-I'in LC3-II'ye Dönüşümünü Uyarır

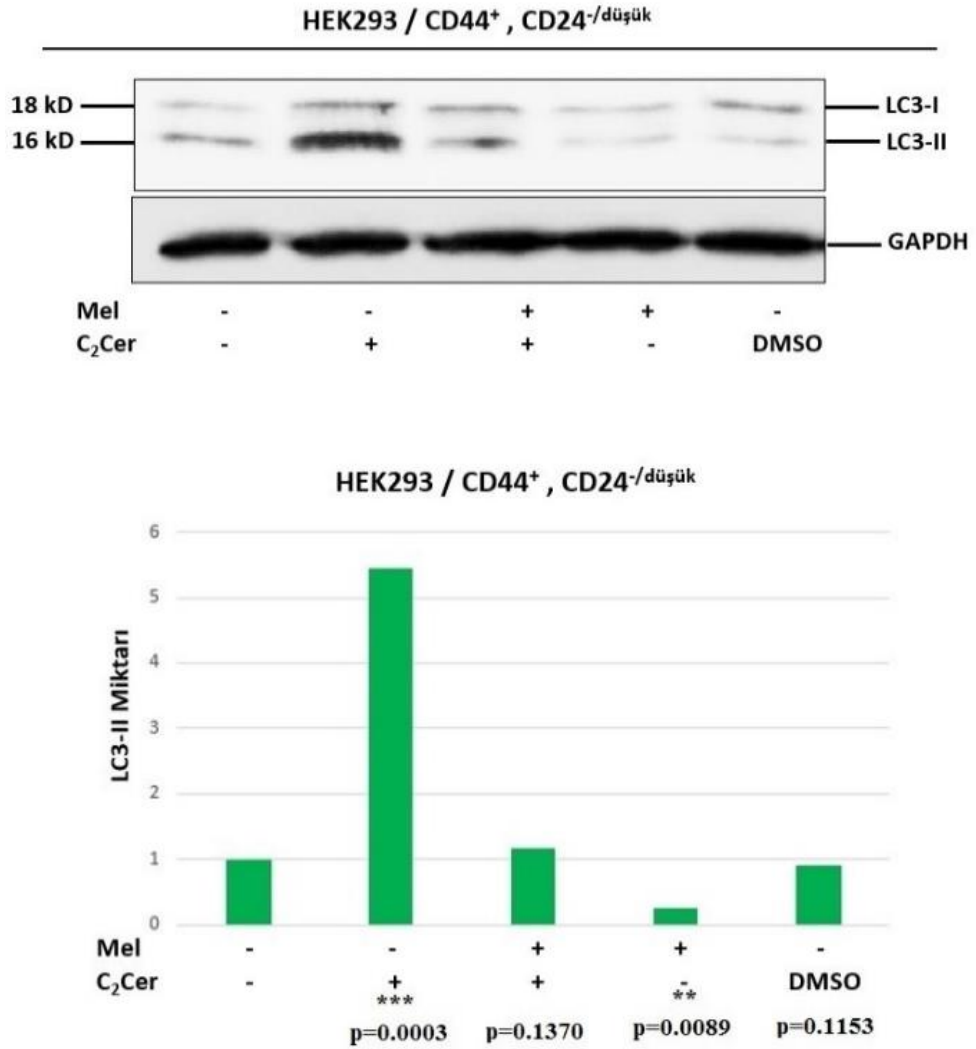
LC3 otofajinin son basamağında yer alan bir proteindir. LC3 immünoblotlama sonrası 18 kDa (LC3-I) ve 16 kDa'lık (LC3-II) olmak üzere 2 bant vermektedir. LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün saptanması memeli hücrelerinde otofajiyi ayırmada belirteç olarak kullanılmaktadır. LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü yoksa otofaji gözlenmemektedir. Melatonin, C₂Cer ve DMSO maddeleri ile kombinasyonları oluşturuldu. Western blot analiz sonucunda LC3-I ve LC3-II bantları görüntülendi.

Western blot sonuçlarında melatoninin MCF-7'den elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücrelerde sadece melatonin uygulanan grup ile melatonin uygulanmayan grup kıyaslandığında LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün arttığı gözlenmiştir (p=0,0086). C₂Cer ve melatonin birlikte uygulanan gruba bakıldığında en fazla LC3-II oluşumunun olduğu tespit edilmiştir (p=0,0002). DMSO uygulanan grupta ise immünofloresan sonuçlarında olduğu gibi madde uygulanmayan kontrol grubu ile yakın bant yoğunluğu gösterdi (p=0,1264). Elde edilen verilere göre melatonin MCF-7'den elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücrelerde otofajik etki göstermektedir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. (A) MCF-7 CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerde LC3-I ve LC3-II western blot analiz görüntüleri; MCF-7 CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerinde LC3-I ve LC3-II western blot analiz grafiksel sonuçları.

HEK293'ten elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücrelerde sadece melatonin uygulanan grup ile melatonin uygulanmayan grup kıyaslandığında LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü yarı yarıya azalmıştır (p=0,0089). C₂Cer ve melatonin birlikte uygulanan gruba bakıldığında ise melatonin, C₂Cer'in otofajik etkinliğini azaltarak LC3-II oluşumunu engellemiştir. C₂Cer ve melatonin birlikte uygulanan gruptaki LC3-II miktarındaki bu azalma madde uygulanmayan gruba yakın bir bant yoğunluğu göstermiştir (p=0,1370). DMSO uygulanan grupta ise madde uygulanmayan kontrol grubu ile yakın bant yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 3.17). HEK293'ten elde edilen sonuçlar daha etkili bir şekilde göstermektedir ki melatonin, CD44⁺/CD24⁻lü kök hücrelerin otofajiye gitmesini engellemektedir.



Şekil 3.17 HEK293 CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerde LC3-I ve LC3-II western blot analiz görüntüleri; HEK293 CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerinde LC3-I ve LC3-II western blot analiz grafiksel sonuçları.

4. TARTIŞMA

Pineal bezden melatonin sentezi sirkadiyen bir ritim sergilemekte; kandaki düzeyleri gece en yüksek seviyedeysen gün içerisinde seviyeleri düşmektedir. Bu sirkadiyen özellik günlük aktivite zamanlarından (gece/günüz) bağımsız olarak hayvanların hemen hepsinde benzer şekillerde görülmektedir (Claustrat ve ark 2005). Pineal fonksiyon azalmasının melatonin sekresyonunu azaltarak hiperöstrojenizme yol açtığı ve bunun da meme kanserine yol açabileceği rapor edilmiştir (Claustrat ve ark 2005). Melatoninin bu özelliği ile meme kanseri gelişimi üzerinde onkostatik ve anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Blask ve Hill 1986). Melatoninin kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu azaltıcı etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Margheri ve ark 2012). Bununla birlikte, hali hazırda literatürde kanser kök hücreler üzerinde nasıl bir etki gösterdiği bilinmemektedir. Bu çalışmada, melatoninin meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve kontrol hücre olarak HEK293 hücre hatlarından elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kanser kök hücreler üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışmamızda, in-vitro ortamda total MCF-7 ve HEK293 hücrelerine melatonin uygulandı. Her iki hücre hattı içinde ortak bir IC₅₀ dozu belirlendi. Daha sonra melatoninin belirlenen dozdaki apoptotik etkisini araştırmak için annexin V analizi gerçekleştirildi. Kök hücre çalışmaları için; total MCF-7 ve HEK293 hücrelerine melatonin uygulandıktan sonra akış-sitometri ile CD44⁺/CD24⁻lü kanser kök hücreler izole edildi. Böylece melatoninin kök hücre miktarına etkisi incelendi. Daha sonra melatoninin CD44⁺/CD24⁻lü kök hücrelerdeki otofaji yolağı üzerine etkisini araştırmak için; LC3-II agregasyonu immunofloresan yöntemiyle analiz edildi. İmmunofloresan sonuçlarını doğrulamak amacıyla western blot ile LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü araştırıldı.

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında hücre siklusunun G₀-G₁ 'den S fazına geçişinin bloke olduğu ve bunun da östrodiol ile indüklenen hücre proliferasyonun inhibe ettiği gösterilmiştir (Cos ve ark 1991). Literatür incelendiğin çok farklı doz kullanımları bulunmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda MCF-7 ve HEK293 hücreleri için ortak IC₅₀ dozu belirlendi ve canlılık analizi (MTT analizi) gerçekleştirildi. Canlılık analizi sonucunda, MCF-7 hücrelerinde melatonin uygulanmayan grup ile melatonin

uygulanan gruplar kıyaslandığında zamana bağlı olarak toplam hücrelerde canlılıkta azalma tespit edildi. HEK293 hücrelerinde ise melatonin uygulanmayan grup ile melatonin uygulanan gruplar arasında zamana bağlı olarak canlılıkta bir artışın olduğu saptandı. Cos ve ark (2011)'da benzer bulgular rapor etmiştir. Bu bulgular çerçevesinde melatonin literatürdeki kullanılan dozlardan farklı bir dozun çalışmamızda kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Canlılık analizi ile melatoninin MCF-7 ve HEK293 hücreleri için IC₅₀ dozu 35 µM ve uygulama süresi 48 saat olarak belirlendi (sırasıyla p=0,0037, p=0,0341). Rodriguez ve ark (2013) melatoninin, kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisi tümör tipine bağlı olarak içsel veya dışsal apoptoz yollarının aktivasyonuna neden olduğu bildirmiştir. (Rodriguez ve ark 2013). Bu nedenle, 35 µM melatoninin MCF-7 ve HEK293 hücrelerinde apoptotik etkisi incelendi. Apoptoz analizi ile 35 µM melatoninin 48 saat uygulamasında MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği ve apoptozda anlamlı bir artış olduğu tespit edildi (p=0,0060). Kontrol grubu olan HEK293 hücrelerinde ise aynı melatonin uygulaması sonucunda apoptozda azalma gözlemlendi (p=0,0324). Mevcut bulgularımız ve literatür verileri melatoninin apoptotik etkinliği olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, apoptozun hangi yolağını kullandığı ileri araştırmalar ile ortaya konması gerekmektedir.

Melatoninin kök hücre üzerindeki etkisini araştırmadan önce kültüre edilen ve melatonin uygulanmayan MCF-7 ve HEK293 hücrelerinde CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerin miktarı tespit edildi. Analiz sonucumuzda genel olarak bakıldığında MCF-7'den izole edilen CD44⁺/CD24⁻lü hücre miktarı %1,2 iken HEK293'ten izole edilen CD44⁺/CD24⁻lü hücre miktarı %1,1 olarak belirlendi. Elde ettiğimiz bu bulgular, Hajj ve ark (2003), Yenigun ve ark (2014) çalışmasından elde edilen bulgular ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Serumsuz süspansiyon koşullarında, kök hücre ve projenitör hücrelerin hayatta kalıp tümörfaz oluşturarak yaşamlarını devam ettirdiği bildirilmiştir (Wolman ve ark 1997). Kök hücrenin bu özelliğinden faydalanarak mevcut çalışmada, MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden izole edilen CD44⁺/CD24⁻ hücrelerin serumsuz ortamda tümörfaz oluşturmaları incelendi. Bu sayede izole edilen hücrelerin kök hücre özelliği taşıdığını doğrulandı. Daha önce yapılan çalışmalarda da CD44⁺/CD24⁻lü hücrelerin tümörfaz oluşturduğu bildirilmiştir (Engelmann ve ark 2008, Hwang-Versluis ve ark 2009).

Melatoninin kök hücreler üzerine etkisi ile ilgili çalışmalara bakıldığında, kısıtlı bir literatür bilgisi bulunmaktadır. Wang ve ark (2014), yaptıkları çalışmalarında hipoksi ve serum yokluğunda melatonin uygulandığında mezenkimal kök hücrelerinin hayatta kalabileceğini ve bu koruyucu etkisini MAPK sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Wang ve ark 2014). Diğer bir çalışmada ise melatoninin embriyonik kök hücrelerin nöral hücrelere farklılaşması üzerine etkisi araştırılmıştır (Sotthibundhu ve ark 2010). Bunun sonucunda, nöral farklılaşmanın düzenlenmesinde melatoninin etkili olduğu gösterilmiştir (Sotthibundhu ve ark 2010). Beyin tümörü kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada, melatoninin farklı bir mekanizma (ABCG2 / BCRP promotor bölge metilasyonlarına etkisi) ile çoklu ilaç direnci üstesinden gelebileceği gösterilmiştir (Martin ve ark 2013). Mevcut çalışmamızda ise melatonin uygulamasından sonra MCF-7'den elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücre miktarında %35-40 oranında azalma tespit edilmiş (p=0,0106), buna karşın HEK293 hücrelerinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻lü kök hücre miktarında %20-25 oranında bir artış gözlenmiştir (p=0,0493). Bu bulgular, melatoninin kanser kök hücreleri üzerinde azaltıcı bir etki oluştururken, normal kök hücreler üzerinde koruyucu hatta miktarında artırıcı bir etki sağlamaktadır. Melatoninin literatürde, MCF-7 CD44⁺/CD24⁻lü kanser kök hücre miktarını üzerine etkisi hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde HEK293 CD44⁺/CD24⁻lü hücreler üzerinde de bir çalışma bulunmamaktadır. Diğer taraftan, Wang ve ark. (2014) ise, melatonin mezenkimal kök hücrelerindeki koruyucu olduğunu rapor etmişlerdi. Farklı kökenli hücreler olması ile birlikte mevcut çalışmada, Wang ve ark. (2014)'larının bulguları ile benzerlik göstermektedir (Wang ve ark 2014).

Melatonin, pro-otofaji ya da anti-otofaji yolakların her ikisinde etkili olduğu bildirilmiştir (Klongpanichapak ve ark 2007). Bu durum otofajinin evresine bağlıdır. Normal fizyolojik koşullarda, otofaji hücrelerin homeostazısını sürdürmek için hayatta kalma olarak görev yapar. Hücre ROS (Reaktif Oksijen Türleri) veya toksik ajanlara maruz kalması durumunda (yüksek seviye) hücre otofaji yolağı ile ölüme yönelecektir. Bu durumda, melatonin otofajiyi yüksek seviyede inhibe ederek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Klongpanichapak ve ark 2007). Nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda melatoninin, metamfetamin (MET) toksisitesinden oluşan hücre ölümlerine karşı koruma sağladığı ileri sürülmüştür (Klongpanichapak

ve ark 2007, Klongpanichapak ve ark 2008). Otofaji bir şekilde engellendiğinde DNA hasarına neden olan reaktif oksijen türlerinin birikmesine yol açar. DNA hasarı birikmesi ise çift zincir kırıklarına neden olur. Bu süreçler, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun azalmasına ve metabolik strese yol açar (Qu ve ark 2003). Otofaji tümör baskılanması için önemli bir mekanizma olsa da, olumsuz şartlarda, tümör hücrelerine stres toleransı sağlayarak hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Eskelinen ve ark 2009). Kanser hücresinde, stres kaynaklı otofaji, tedaviye direnç kazandırabilir ve tümörün büyümesini ve ilerlemesine neden olabilir (Degenhardt ve ark 2006).

Otofaji fizyolojisi çok çalışılmış olmasına rağmen, kök hücrelerdeki etkisi üzerine sınırlı literatür bilgisi bulunmaktadır. Oliver ve ark (2012) yılında yaptıkları çalışmada, hücrel stres koşullarında melatoninin mezenkimal kök hücrelerde hayatta kalma üzerine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (Oliver ve ark 2012). Kanser kök hücrelerinin ise mikroçevresi ile ilişkili yapılan araştırmada, açlık koşullarında kanser kök hücrelerinin, otofaji protein katabolizması fonksiyonlarından faydalandığı rapor edilmiştir (Espina ve ark 2010, Espina ve Liotta 2011). Mevcut çalışmada ise melatonin uygulaması sonucunda, MCF-7 ve HEK293 hücrelerinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerinde LC3-II agregasyonunu immüno Floresan analizi ile incelendi. Melatoninin MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerinde LC3-II agregasyonunda artışa sebep olduğu tespit edildi (p=0,0255). Kontrol hücresi olan HEK293 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelere melatonin uygulamasında ise LC3-II agregasyonunun azaldığı gözlemlendi (p=0,1595). LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü Western blot analiz ile incelenerek, immüno Floresan yöntemi ile elde edilen bulgular doğrulandı. Melatonin, MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerde LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü artırdığı (p=0,0086), ancak HEK293 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerde LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü engellediği tespit edildi (p=0,0089). Bu bulgular, melatoninin kanser kök hücrelerinde otofaji yolağı üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin kanser kök hücrelerinde bir ölüm mekanizması olan otofajide artışı tetiklediğini göstermektedir. Buna karşın melatonin HEK293 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerinde otofaji yolağını baskılama yönünde etki göstermektedir. Bu bulgular melatoninin kanser kök hücrelerinde hangi apoptotik yolağı uyardığı bir araştırma konusu olarak durmaktadır.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, melatoninin insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve kontrol hücre hattı olarak HEK293 hücrelerinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻ kök hücreler kullanılarak otofajik yolak üzerindeki etkisi araştırıldı.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, melatonin MCF-7'deki CD44⁺/CD24⁻ kök hücre miktarını azaltırken, HEK293'deki CD44⁺/CD24⁻ kök hücre miktarını artırdığı gösterilmiştir. Bu MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ kök hücre miktarındaki azalma da etkili olabilecek mekanizmalar arasında farklılaşma, apoptozis, otofaji ve diğer mekanizmalar yer almaktadır. Bu azalmanın bir kısmından otofajinin sorumlu olduğunu tespit edildi. Kanser kök hücre miktarındaki azalmaya sebep olacak diğer yolların ise ileri çalışmalarla ortaya konması gereklidir.

Kanserin hipoksi ortamında radyoterapi ve kemoterapiye karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir. Ayrıca hipoksi ortamının, otofaji aktivitesini artırdığı göz önüne alınacak olursa, melatonin hangi mekanizma ile kansere etki edeceği ya da kanser kök hücre üzerinde nasıl bir etkisi olacağı bilinmemektedir. Kök hücrenin bu azalmasından sorumlu olabilecek başka bir yolak ise kök hücrenin kendini yenileme/farklılaşma mekanizması olabilir. Literatüre bakıldığında melatoninin kendini yenileme faktörleri (oct4, sox2, nanog, klf4 gibi) üzerine etkisi olabileceği düşünülmektedir. Melatonin kendini yenileme faktörlerini baskılayıp farklılaşmasını destekleyerek, kanser kök hücre miktarında bir azalmaya neden olabilir. Ayrıca melatonin telomeraz üzerinde de etkinliği olabileceği düşünülmüş ve araştırma konusu olmuştur. Bu araştırmalardan da olumlu sonuçlar elde edilmiş, ancak literatürde kanser kök hücreleri üzerinde yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Melatoninin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki Otofajik Etkisininin İncelenmesi

Hüseyin DÖNMEZ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014

Kanser kök hücreleri (KKH) diğer kanserlerde de olduğu gibi, meme kanserinin tanısı, önlenmesi, kan damarı oluşumunu teşvik eden, hücre motilitesini destekleyen ve çeşitli tedavilere direnç gösteren belirli özellikler sergilemektedir. KKH, kemoterapiye oldukça direnç gösteren bir mekanizmaya sahip olmasının yanı sıra normal kök hücrelerle benzer bir çok özelliğe sahiptir. KKH ve otofaji arasındaki ilişkinin araştırıldığı birçok çalışmada, büyüme faktörlerinden yoksun tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin ölümden otofaji ile kaçtığı ve hücrelerdeki otofaji inhibe edildiğinde, hücrelerin apoptoz ile öldüğü gözlenmiştir. Otofajinin tümör hücrelerini ölümden koruyan bir mekanizma olduğuna dair hipoteze karşı otofajinin kanser oluşumunu önleyici rolünü gösteren birçok çalışma da bulunmaktadır. Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), epifiz bezinde triptofan aminoasitinden sentezlenmektedir ve farklı dokularda farklı işlevler gösterebilmektedir. Melatoninin anti-kanser özelliği; MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde, *p53* ve *p21* genleri üzerinden apoptozisi indüklediği, dolayısıyla hücre proliferasyonunu inhibi ettiği bildirilmiştir.

Mevcut çalışmada, melatonin MCF-7'den izole edilen CD44⁺/CD24⁻ kök hücre miktarını %35-40 oranında azalttığı ($p=0,0106$), bunun yanı sıra kontrol hücre grubu olarak kullanılan HEK293'ten izole edilen CD44⁺/CD24⁻ kök hücre miktarında %20-25 oranında artışa ($p=0,0493$) sebep olduğu tespit edildi. Kanser kök hücrelerindeki bu azalmadan sorumlu olabilecek mekanizmalardan biri olan otofaji incelendi. Otofaji belirteci olan LC3-II immüno floresan ve western blot teknikleri ile analiz edildi. Elde ettiğimiz immüno floresan bulguları sonucunda, melatonin uygulanan MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerinde LC3-II agregasyonu artarken ($p=0,0255$), HEK293 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerde ise LC3-II agregasyonunun azaldığı ($p=0,1595$) gösterilmiştir. Melatonin uygulanan MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerde Western blot yöntemi ile incelenen LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü artarken ($p=0,0086$), HEK293 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerde LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünde azalma olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0089$).

Literatürdeki veriler ve mevcut çalışmadan elde edilen bulgular, melatonin kanser kök hücrelerinde otofaji yolağı üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin kanser kök hücrelerinde bir ölüm mekanizması olan otofajide artışını tetiklediğini göstermektedir. Buna karşın, melatonin HEK293 CD44⁺/CD24⁻ kök hücrelerinde otofaji yolağını baskılama yönünde etkisinin olduğu gösterildi.

Anahtar Sözcükler: Kanser kök hücre; Meme kanseri; Melatonin; Otofaji

7.SUMMARY

Investigation of The Autophagy Effects of Melatonin on Breast Cancer Stem Cells

Cancer stem cells (CSC) as well as in other cancers, breast cancer diagnosis, prevention, which stimulates the formation of blood vessels, promote cell motility and exhibits specific properties that are resistant to various treatments. CSC, as well as being a mechanism of resistance to chemotherapy is showing quite a lot of features similar to normal stem cells. CSC and in many studies investigating the relationship between autophagy, the lack of tumor cell growth factor from an increase in autophagy, the cell death of autophagy and how he and the cells of the autophagy is inhibited, it was observed that die by apoptosis of cells. Cancer formation of autophagy in tumor cells, autophagy protects against the hypothesis that the mechanism of death there are many studies showing the inhibitory role. Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptam a) is synthesized from the amino acid tryptophan in the pineal gland and can exhibit different functions in different tissues. Of anti-cancer properties and melatonin; MCF-7 human breast cancer cells by inducing apoptosis via *p53* and *p21* genes, so it is reported that the inhibition of cell proliferation.

In the present study, melatonin in MCF-7 isolated from CD44⁺/CD24⁻ the amount of stem cells decreases by 35-40% ($p = 0.0106$), as well as the control group of cells used HEK293 the isolated CD44⁺/CD24⁻ the amount of stem cells increased by 20-25% ($p = 0.0493$) was found to be caused. One of the mechanisms that may be responsible for this reduction in cancer stem cells, which were examined autophagy. Autophagy is a marker LC3-II was analyzed by western blot and immunofluorescence techniques. As a result we obtained immunofluorescence findings, melatonin treated MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ stem cells LC3-II aggregation increased ($p = 0.0255$), HEK293 CD44⁺/CD24⁻ in stem cells is decreased LC3-II aggregation ($p = 0.1595$) is shown. Melatonin treated MCF-7 CD44⁺/CD24⁻ stem cells in Western blot with the examined LC3-I to LC3-II transformation increased ($p = 0.0086$), HEK293 CD44⁺/CD24⁻ stem cells LC3-In LC3-II was determined by a reduction in conversion ($p = 0.0089$).

Data and findings from existing studies in the literature on cancer stem cells, melatonin has an effect on autophagy pathway and this is a mechanism of death in active cancer stem cells suggests that triggered the increase in autophagy. However, melatonin HEK293 CD44⁺/CD24⁻ in the direction of the effect of stem cells that were shown to suppress autophagy pathway.

Key Words: Autophagy; Breast cancer; Cancer stem cells; Melatonin

8.KAYNAKLAR

- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *TRENDS in Biochemical Sciences* January 2001;Vol.26 No.1.
- Bartsch C, Bartsch H, Jain AK, Laumas KR, Wetterberg L. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. *J Neural Transm.* 1981;52:281-294.
- Bartsch H, Buchberger A, Franz H, et al. Effect of melatonin and pineal extracts on human ovarian and mammary tumor cells in a chemosensitivity assay. *Life Sci.* 2000;67:2953-2960.
- Beau, I, Mehrpour M, Codogno P. Autophagosomes and human diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2011;43, pp. 460–464.
- Bizzarri M, Cucina A, Valente MG et al. Melatonin and vitamin D3 increase TGF-beta1 release and induce growth inhibition in breast cancer cell cultures. *J Surg Res* 2003; 110:332–337.
- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, Krause JA, Brainard GC. Growth and fatty acid metabolism of human breast cancer (MCF-7) xenografts in nude rats: impact of constant lightinduced nocturnal melatonin suppression. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;79:313-320.
- Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm Suppl.* 1986;21:433-449.
- Buzzell GR. Studies on the effects of the pineal hormone melatonin on an androgen-insensitive rat prostatic adenocarcinoma, the Dunning R 3327 HIF tumor. *J Neural Transm.* 1988;72:131-140.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine.* 2005;27:189-200.
- Charafe-Jauffret, E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer.* 2009;9:202.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005;9:11-24.
- Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman P, Korkaya H, Heath AN, Clouthier SG, Wicha SM. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *PNAS* February 2012; vol. 109 no. 8;212784–2789.
- Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and “estrogen-rescue” of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 1991;10:36-42.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, Ffrench M, Terman A. Autophagy and Aging The Importance of Maintaining “Clean” Cells Autophagy. *October/November/December 2005; 1:3, 131-140;*
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling* Received 31 March 2003; accepted 13.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Geşlinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell* July 2006; 10, 51–64.
- Engelmann K, Shen H, Finn OJ. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Research* 2008; 68, pp. 2419.
- Eskelinen E, Saftig P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 2009; 664–673.
- Espina E, Mariani BD, Gallagher RI, Tran K, Banks S, Wiedemann J, Huryk H, Mueller C, Adamo L, Deng J, Petricoin EF, Pastore L, Zaman S, Menezes G, Mize J, Johal J, Edmiston K, Liotta LA. Malignant Precursor Cells Pre-Exist in Human Breast DCIS and Require Autophagy for Survival. *PLoS ONE* April 2010;Volume 5; Issue 4; e10240.
- Espina V, Liotta LA. What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ. *Nat Rev Cancer* January 2011; 11(1); 68–75.
- Espina V, Mariani BD, Gallagher RI, Tran K, Banks S, Wiedemann J, Huryk H, Mueller C, Fillmore, C.M, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research* 2008; 10:R25.
- Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159:574-581.
- Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(1):56-61.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis. *Nature Reviews Cancer* November 2004;4, 891-899.

- Gibbs FP, Vriend J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 1981;109(5): 796–1798.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; pp. 555–567.
- Gong C, Song E, Codogno P, Mehrpour M. The roles of BECN1 and autophagy in cancer are context dependent. *Autophagy* December 2012;8:12, 1-3.
- Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism *Oncogene* 2004; 23, 2891–2906.
- Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA. Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. February 2009; Vol.11; e5.
- Guan J, Simon AK, Prescott M, Menendez JA, Liu F, Wang F, Wang C, Wolvetang E, Vazquez-Martin A, Zhang J. Autophagy in stem cells. *Landes Bioscience* June 2013; 9:6, 1–20.
- Harrison H, Farnie G, Brennan KR, Clarke RB. Breast cancer stem cells: something out of notching *Cancer. Res.* 2010;70, 8973–8976.
- Hwang-Verslues WW, Kuo HW, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, Lee EY, Chang EJ, Lee WH. Multiple Lineages of Human Breast Cancer Stem/Progenitor Cells Identified by Profiling with Stem Cell Markers. *Plos One* 2009;21, 4(12), pp. 8377.
- Kang J, Cho H, Lee S. Melatonin Inhibits mTOR-Dependent Autophagy during Liver Ischemia/Reperfusion *Cell Physiol Biochem* 2014;33:23-36.
- Karasek M, Kowalski AJ, Zylinska K. Serum melatonin circadian profile in women suffering from the genital tract cancers. *Neuroendocrinol Lett.* 2000;21:109-113.
- Keith B, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* May 4, 2007;129.
- Kliukiene J, Tynes T, Andersen A. Risk of breast cancer among Norwegian women with visual impairment. *British Journal of Cancer* 2001; 84(3), 397–399.
- Klongpanichapak S, Phansuwan-Pujito P, Ebadi M, Govitrapong P. Melatonin protects SK-N-SH neuroblastoma cells from amphetamine-induced neurotoxicity *J. Pineal Res.* 2007; 43:65–73.
- Klongpanichapaka S, Phansuwan-Pujitob P, Ebadic M, Govitrapong P. Melatonin inhibits amphetamine-induced increase in α -synuclein and decrease in phosphorylated tyrosine hydroxylase in SK–N–SH cells. *Neuroscience Letters* 2008; 436; 309–313.
- Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Los M. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine* 2008; 14,10, pp. 450-60.
- Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Kozlowski A, et al. Circadian rhythm of melatonin in patients with colorectal carcinoma. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002;23:239-242.
- Kveder S, McIsaac WM. The metabolism of melatonin (N-acetyl -methoxytryptamine) and 5-methoxy-tryptamine. *J Biol Chem* 1961; 236: 3214–3220.
- Li Z, Sheng M. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain* 2012, 5:15.
- Lin N, Beyer C, Giebl A, Kireva T, Scholtyssek C, Uderhardt S, Munoz LE, Dees C, Distler A, Wirtz S, Krönke G, Spencer B, Distler O, Schett G, Distler JHW. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis *Ann Rheum Dis.* 2013;72:761–768.
- Lin Q, Yun Z. Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. *Cancer Biology & Therapy* June 15, 2010; 9:12, 949-956.
- Martin V, Sanchez-Sanchez M, Herrera F, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Alvarez-Vega MA, Antolin I, Rodriguez C. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells.
- Margheri M, Pacini N, Tani A, Nosi D, Squecco R, Dama A, Masala E, Francini F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: Molecular basis for the anticancer effect of these molecules. *European Journal of Pharmacology* 2012;681; 34–43.
- Martinez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 1995;77:147-161.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103; pp. 2332–2336.
- Mediavilla MD, Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci.* 1999; 65:415-420.
- Mercedes M. Leon-Blanco, Juan M. Guerrero, Russel JR, Juan R. Calvo and David Pozo Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro *J. Pineal Res.* 2003; 35:204–211.

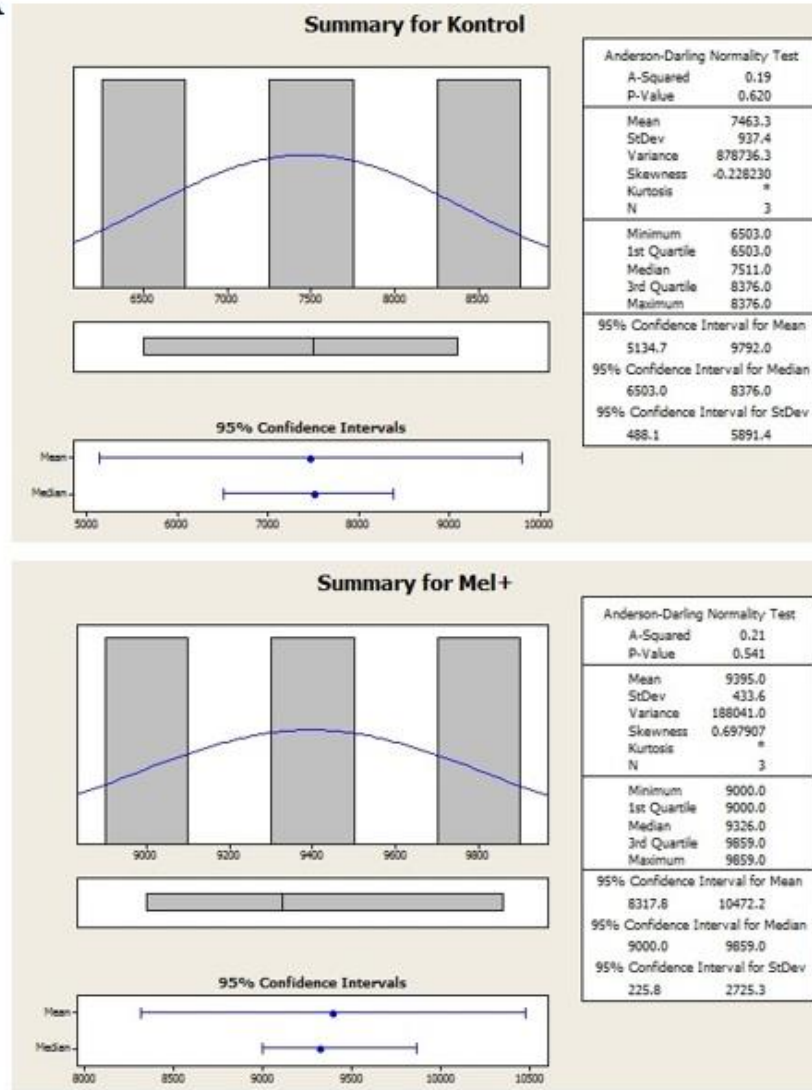
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008 February 28; 451(7182): 1069–1075.
- Noy N. Between Death and Survival: Retinoic Acid in Regulation of Apoptosis. *Annual Review of Nutrition* 2010; 21; 30; pp. 201-17.
- Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2001; 2, pp. 211-216.
- Oliver L, Hue E, Priault M, Vallette FM. Basal Autophagy Decreased During the Differentiation of Human Adult Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*. October 10; 2012; 21(15): 2779-2788.
- Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, et al. Dim light melatonin onset (DLMO): a tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007;31:1-11.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side Population Is Enriched in Tumorigenic, Stem-Like Cancer Cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- Cancer Cells Are Similarly Tumorigenic. *Cancer Res* July 15 2005; 65: (14),2.
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stemlike cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Research* 2005; 65, pp. 6207;6219.
- Peracchio C, Alabiso O, Valente G, Isidoro C. Involvement of autophagy in ovarian cancer: a working hypothesis. *Journal of Ovarian Research* 2012, 5:22.
- Petranka J, Baldwin W, Biermann J, Jayadev S, Barrett JC, Murphy E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res*. 1999;26:129-136.
- Piao Y, Liang J, Holmes L, Zurita AJ, Henry V, Heymach JV, Groot JF. Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro-Oncology* 2012;14(11):1379–1392.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation*. December 2003; Volume 112; Number 12.
- Quail DF, Taylor MJ, Postovit L. Microenvironmental Regulation of Cancer Stem Cell Phenotypes. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2012; 7, 197-216.
- Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions *Acta Biochim Pol*. 2007;54:1-9.
- Rodriguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sánchez-Sánchez AM, Suárez S, Puente-Moncada N, Anitua MJ, Antolin I. Mechanisms Involved in the Pro-Apoptotic Effect of Melatonin in Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14, 6597-6613.
- Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Is the pineal gland involved in the pathogenesis of endometrial carcinoma. *Int J Neurosci*. 1992;62:89-96.
- Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluksa P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH, Radisky DC, Ferrone S, Knutson KL. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Research*. 2009; 69, 7, pp. 2887-2895.
- Proietti S, Cucina A, Anselmi FD, Dinicola S, Pasqualato A, Lisi E, Bizzarri M. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGFb-1-dependent growth inhibition of breast cancer cells. *J. Pineal Res*. 2011; 50:150–158.
- Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz GA. Night-Shift Work and Risk of Colorectal Cancer in the Nurses' Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*. June 4 2003;Vol. 95, No. 11.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004; 306, pp. 990-995.
- Siu SW, Lau KW, Tam PC, Shiu SY. Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. *Prostate*. 2002;52:106-122.
- Sophos NA, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*. 2003; pp. 143-144.
- Sothibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J. Pineal Res*. 2010; 49:291–300.
- Spierings D, Vries EG, Vellenga E, Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, Jong S. Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2004; Volume 52(6): 821–831.

- Srinivasana V, Lauterbach EC, Ahmedc AH, Prasadd A. Alzheimer's Disease: Focus on the Neuroprotective Role of Melatonin. *J Neurol Res* 2012;2(3):69-81.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999; 397 (6718) pp. 441–446.
- Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve Kanserle İlişkisi. *Genel Tıp Derg* 2009;19(3):137-143.
- Uz T, Arslan A, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, Pandey GN, Manev H. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Molecular Brain Research* 2005; 136; 45–53.
- Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms integrative. *Cancer Therapies* September 2008; Volume 7 Number 3 189-203.
- Verkasalo PK, Pukkala E, Stevens RG, Ojamo M, Rudanko SL. Inverse association between breast cancer incidence and degree of visual impairment in Finland. *British Journal of Cancer*. 1999; 80(9), 1459–1460.
- Verkasalo PK, Pukkala E, Stevens RG, Ojamo R, Rudanko SL. Inverse association between breast cancer incidence and degree of visual impairment in Finland. *Br J Cancer*. 1999;80:1459-1460.
- Wang F, Zhou H, Du Z, Chen X, Zhu F, Wang Z, Zhang Y, Lin L, Qian M, Zhang X, Li X, Hao A. Cytoprotective effect of melatonin against hypoxia/serum deprivation-induced cell death of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *European Journal of Pharmacology* 2014; 09; 033.
- Wang Y, Yang J, Zheng H, Tomasek GJ, Zhang P, McKeever PE, Lee EY, Zhu Y. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell*. 2009, 15, 6, pp. 514–26.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001; 17, pp. 387–403.
- Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Melatonin potentiates flavoneinduced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *Int J Cancer*. 2005;116:236-242.
- Wolman SR, Heppner GH, Wolman E. New directions in breast cancer research. *FASEB Journal*. 1997; 11, 7, pp. 535-43.
- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(9): 814–822.

9.EKLER

EK A. Verilerin parametrik testlere uygunluğu. Elde edilen verilen istatistiki olarak anlamlılığını tespit etmek için bağımlı T-testi yapıldı. Parametrik bir test olan T-testinin uygulanabilirliğini göstermek için verilerin normal dağılıma uygunluğu ve varyansların yakın olduğu gösterildi. HEK293 hücrelerine kontrolleri ile birlikte melatonin uygulamasından sonraki kök hücre miktarı verileri (A), MCF-7 hücrelerine kontrolleri ile birlikte melatonin uygulamasından sonraki kök hücre miktarı verileri (B)

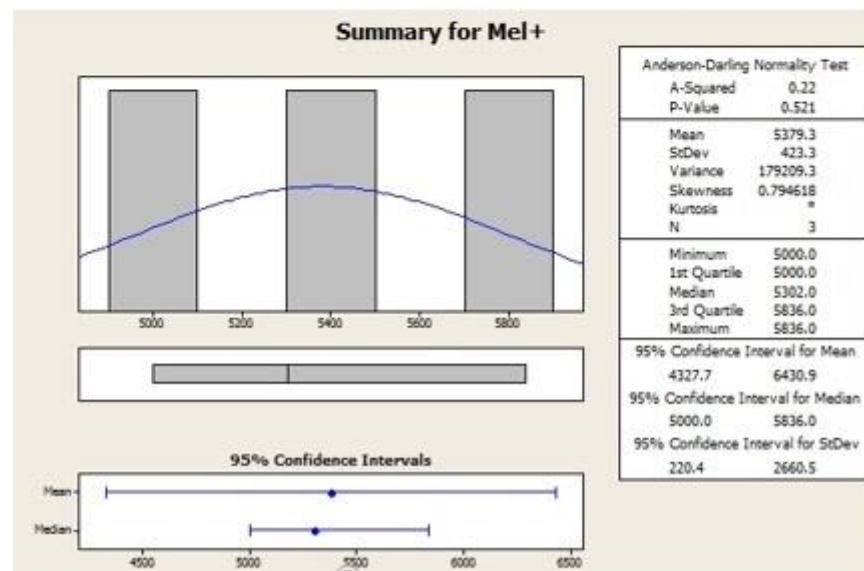
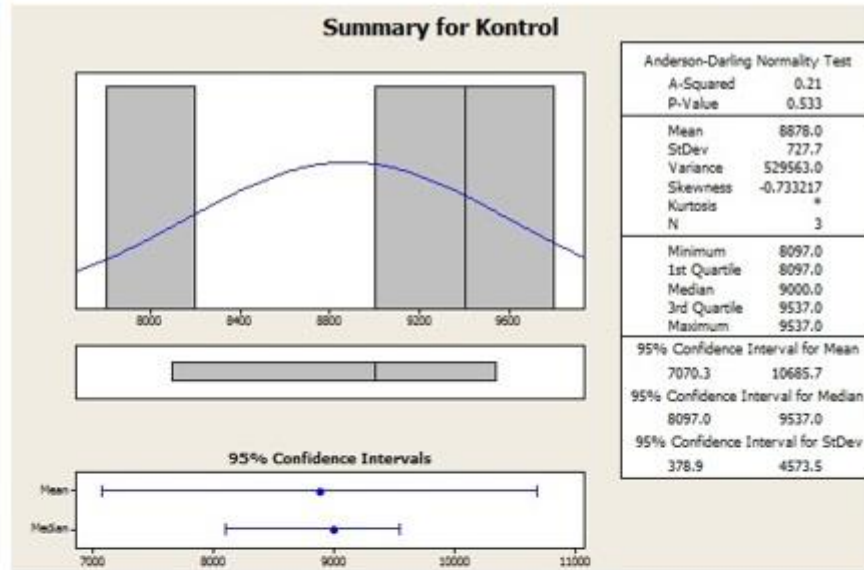
A



Descriptive Statistics: Kontrol, Mel+

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Variance	Sum	Median
Kontrol	3	0	7463	541	937	878736	22390	7511
Mel+	3	0	9395	250	434	188041	28185	9326

B



Descriptive Statistics: Kontrol, Mel+

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Variance	Sum	Median
Kontrol	3	0	8878	420	728	529563	26634	9000
Mel+	3	0	5379	244	423	179209	16138	5302

EK B. Etik Kurul Onay Belgesi.

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2013/07

Toplantı Tarihi : 23.05.2013

Karar Sayısı 2013/164 S:Ü: Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Nadir KOÇAK'ın, "Melatoninin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki Otofajik Etkisinin İncelenmesi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 13.05.2013 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Nadir KOÇAK'ın, "Melatoninin Meme Kanseri Kök Hücrelerindeki Otofajik Etkisinin İncelenmesi" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekretaryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

ASEL GIBILIR
23/05/2013
M. M. K. SIK
Sekreterya

10.ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD' da yüksek lisans eğitimine başladı ve eğitimine devam ediyor.