

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

**Meme Kanseri Hücre Hatlarında Transkripsiyon Faktör Proteini Olan FOXM1'in Otofaji
Sinyal Yoluyla Rolünün Araştırılması**

Proje No:

TDA-2016-6415

Proje Türü

Kurum Dili

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Zuhale Hamurcu
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacıların Adı Soyadı

Yrd. Doç. Dr. Elif Funda Lener (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Prof. Dr. Yusuf Ozkul (Genetik Anabilim Dalı)

Prof. Dr. Hamiyet Dönmez Altıntaş (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Dr. Bülent Özpolat (MD Anderson, Texas, USA)

Nesrin Delibaşı (Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Ekim 2017

KAYSERİ

TELEKKÜR

. TDA-2016-6415 nolu projemiz Erciyes Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. Bu finansal destekten dolayı Erciyes Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.I.Fork Head Box M1 (FOX M1) proteinleri	3
II.II.Otofaji ve Basamaklar	4
II.III.Otofajinin Fonksiyonu	7
II. IV.Otofaji ve Kansere Arasındaki İlişki	8
III. MATERYAL VE METOD	10
III.I.Hücre Hatları	10
III.II.Hücre kültürü	10
III.III.Hücrelerin FOX M1, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 siRNA lar ile transfeksiyonu	10
III.IV.MDA-MB-231 hücrelerinin FOX M1 overekspresyon vektörü ile transfeksiyonu	10
III. V.MTS Testi	10
III. VI.Western Blot Analizi	11
III. VII.Klonojenik Tespit	11
III.VIII.Migrasyon tespiti (Wound healing assay)	11
III.IX.invazyon tespiti	12
III.X.Annexin-V Analizi	12
III.XI.Otofaji Analizi	12
III.XII.Asidik Veziküllerin (Otofajik Veziküllerin) Tespiti	13
III.XIII.Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizi	13
III.XIV.Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Analizi	14
III.XV.Dual Luciferaze Reporter Analizi	16
III.XVI.immunofloresan (IF) Boyama	17
IV. BULGULAR	18
IV.I.FOX M1 LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotör bölgelerine bağlanış ve ekspresyonları düzenler.	18
IV.II. FOX M1 otofajinin düzenlenmesinde rol oynar	28
IV.III. Otofaji agresif meme kanser hücrelerinin (MDA-MB-231) kanserojenik özellikler kazanmasında rol oynar	31
IV.IV.Açlık İ artlarında normal epitelyal (MCF10A) hücreleri ve agresif meme kanser hücreleri (MDA-MB-231) farklı tepki gösterirler.	47
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
VI. KAYNAKLAR	55

Ėkil Listesi

Sayfa no

Şekil 1.Otofaji il levinde görev alan proteinlere e e e e e e e e e e e e e e e e .5

Şekil 2.Otofaji basamaklarinda ematik diyagram e e e e e e e e e e e e e e e e .5

Şekil 3.FOX M1/LC3 promotor ve FOX M1/Beclin-1 promotor bolgesi arasindaki konsensus .14

Şekil 4.DNA sonikasyonu e .15

Şekil 5.FOX M1 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 ve MCF-7 hucrelerinde FOX M1, LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. .19

Şekil 6.Farkli zaman araliklarda ac bakan MDA-MB-231 hucrelerinde asidik vezikuler olumlar. .19

Şekil 7.4 saat ac bakan MDA-MB-231 hucrelerinde otofaji induklenme oran e e e 20

Şekil 8.Ki farkli FOX M1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231. hucrelerinde bazal ve ac k durumunda FOX M1, LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri.21

Şekil 9.FOX M1 overekspresyon vektoru ve empty vektore ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde FOX M1, LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. e e e e .22

Şekil 10.Ki farkli FOX M1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde FOX M1-B ve FOX M1-C genlerinin ekspresyon seviyeleri. e e e e e e e ...23

Şekil 11.Ki farkli FOX M1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyon seviyeleri. e e e e e e e .23

Şekil 12.Ki farkli FOX M1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyon yuzdeleri. e e e e e e e .24

Şekil 13.FOX M1 in LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bolgelerinde Bagland ediziler. e e e e e e 25-26

Şekil 14.FOX M1 in LC3 ve Beclin- genlerinin transkripsiyonel aktivitesine etkisi e e e 27

Şekil 15.Ki farkli FOX M1 siRNA ile transfete edilen MDA-MB-231 hucrelerinde otofajinin cel itli basamaklarinda gorev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. e e e .28

Şekil 16.Ki farkli FOX M1 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde asidik vezikuler olumlar. e e e ..29

Şekil 17.Ki farkli FOX M1 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde otofaji induklenme oran e e e 30

Şekil 18.Ki farkli FOX M1 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hucrelerinde sitoplazmik LC3 proteinin dak en e e e 31

- Ėekil 19.**MDA- MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde bazal seviyede asidik Ė Ė Ė Ė ..32
veziküler oluğ umlar.
- Ėekil 20.**MDA- MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde bazal seviyede LC3, Ė Ė Ė Ė ...33
Beclin-1, Atg4 ve ULK1 poteinlerinin ekspresyonlarĖ
- Ėekil 21.**LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 siRNAĞ lar ile transfekte edilen hücrelerdeğ Ė Ė Ė Ė 34
bu siRNAĞ larĖ hedef aldĖklarĖgenlerin ĖrĖnĖ olan proteinlerin ekspresyon
seviyeleri.
- Ėekil 22.** LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ve Beclin-41Ė Ė Ė Ė ...34
genlerinin ekspresyon seviyeleri.
- Ėekil 23.**LC3, Beclin-, Atg4 ve ULK1 siRNAĞ larla transfekte edilen hücrelerde asidikĖ Ė35
veziküler oluğ umlar.
- Ėekil 24.**LC3, Beclin-, Atg4 ve ULK1 siRNAĞ larla transfekte edilen hücrelerde otofajiğ Ė 36
indĖklenme oranĖ
- Ėekil 25.** Otofajik aktivitenin arttĖĖhücrelerde LC3, Beclin-1, ULK1 ve Atg4BĖ Ė Ė Ė Ė Ė 37
siRNAĞ larĖĖ otofaji indĖklenme oranĖna etkisi.
- Ėekil 26.**Hem bazal seviye de hem de otofajinin indĖklendiĖi hücrelerde LC3,Ė Ė Ė Ė Ė Ė ...38
Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAĞ larĖ otofajik aktiviteye etkisi.
- Ėekil 27.**LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerindeğ Ė Ė Ė Ė ..39
stoplazmik LC3 proteininin daĖĖĖĖĖ
- Ėekil 28.**LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA ile tranfekte edilen MDA-MB-231Ė Ė Ė Ė Ė Ė 40
hücrelerinde canlĖĖ/proliferasyon oranĖ
- Ėekil 29.** LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAĞ lar ile transfekte edilen MDA-MB-231Ė Ė Ė .41
hücrelerinde klon oluğ umu.
- Ėekil 30.** LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAĞ lar ile transfekte edilen MDA-MB-231Ė Ė .42-43
hücrelerinde migrasyon oranĖ
- Ėekil 31.** LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAĞ lar ile transfekte edilen MDA-MB-231Ė Ė .44
hücrelerinde invazyon oranĖ
- Ėekil 32.** LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAĞ lar ile transfekte edilen MDA-MB-231Ė Ė .45
hücrelerinde apopitoz indĖklenme oranĖ
- Ėekil 33.** LC3 ve Beclin-1 siRNAĞ lar ile transfekte edilen hücrelerde PARP proteininĖ Ė ...46
ekspresyon seviyesi.

- Ėkil 34.** LC3 ve Beclin-1, Atg4 ve ULK1 siRNA ile ĖarĖan hĖcrelerin hĖcre dĖngĖsĖ, Ė Ė Ė ..47
migrasyonu, ivazyonu ve adezyonunda gĖrevli olan proteinlerin
ekspresyonlarına etkisi.
- Ėkil 35.** Farklı zaman aralıklarında aç kalan MDA-MB-231 ve MCF10A hĖcrelerinde Ė Ė 48
otofajik vezikĖler oluğ umlar.
- Ėkil 36.** Aç bırakılan MDA-MB-231 ve MCF10A hĖcrelerinde otofaji indĖklenme Ė Ė Ė 49
oranı
- Ėkil 37.** Açlık MDA-MB-231 ve MCF10A hĖcrelerinde açlık, hĖcre canlılığına Ė Ė ..50
etkisi.
- Ėkil 38.** Açlık MDA-MB-231 ve MCF10A hĖcrelerinde açlık, apoptotik hĖcre Ė Ė 50-51
ölümüne etkisi.

Tablo Listesi

Sayfa no

Tablo 1. LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotorlarına spesifik primer baz dizileri. 15

ÖZET

Meme kanser hücre hatlarında transkripsiyon faktör proteini olan FOXM1in otofaji sinyal yolağında rolünün aralı tēđması

FOXM1, kanser geliğ imine, ilerlemesine katkı sağılayan transkripsiyon faktörüdür. Otofaji, çel itli stres í artlarında uyarđarak hücrelerin hayatta kalmasē sağılayan katabolik bir mekanizmadđ. Bununla birlikte, otofajinin çok ya da az olmasēkanser gibi patolojik durumlara yol açar. Bu yüzden otofajinin sēđbir í ekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Fakat otofajide rol alan genlerin transkripsiyonları nēđ nasē düzenlendiği bilinmemektedir. Çalı mamēda, meme kanser hücre hatlarında, otofajinin belirteçleri olarak kabul edilen, *LC3* ve *Beclin-1* genlerinin transkripsiyonlarında FOXM1ın olası rolünün aralı tēđması ayrıca, otofaji ve kanser arasındaki çeli kili olan ili kinin açıkl a kavul turulmasēamaçlandı

MDA-MB-231 hücreleri FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle karı đalı tēđđında, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ve Beclin-1 ekspresyonları nēđ gen ve protein seviyesinde azaldđđ bulundu. Çp analizi ile FOXM1ın hem LC3 hem de Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerine bağılandıđđ lusiferaz reporter analizi ile FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ve Beclin-1 ekspresyonları nēđ azaldđđ FOXM1 ekspresyon vektörü ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ve Beclin-1 ekspresyonları nēđ arttdđđ bulundu. Bu verilerimiz, FOXM1ın LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyonları nēđ düzenlenmesinde rol aldđđđ gösterdi. Böylece, literatürde ilk kez LC3 ve Beclin-1 genlerinin bilinmeyen moleküler mekanizmasē ortaya çkardığ. Ayrıca, LC3, Beclin-1, ULK1 ve Atg4 siRNA larla transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde otofajinin baskılandıđđ hücre canlıđđđ, klon oluđ umunun, invazyonun, migrasyonun azaldđđ apoptozun indüklendiği bulundu. Bu sonuçları nēđla da, otofajinin agresif kanser hücrelerinin kanserojenik özellik kazanmasēna önemli bir katkı sağladđđve otofajinin karmağ k rolüne bir açıkl a getirildiği dúđ ünülmektedir. Sonuç olarak, FOXM1ın, agresif meme kanser hücrelerinde bilinen rolleri dēđda otofaji aracđđyla da hücrelerin kanserojenik özellikler kazanmasēna katkıda bulunduğunu ve bu hücrelerde otofajinin baskılanması gerektiğini, bunun içinde otofajinin çel itli basamaklarında fonksiyon yapan genleri (LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1) hedef siRNA ların teröpatik bir ajan olarak kullanılabilirliğini gösterdi. Ancak FOXM1ı hedeflemenin çok yönlü antitümör etkiler göstereceği ve agresif meme kanser hücreleri üzerinde daha fazla terapötik etkiye yol açabileceği kanđđdayđ.

Anahtar Kelimeler: FOXM1, Otofaji, MDA-MB-231, siRNA, açıkl a, migrasyon, invazyon, proliferasyon, klon, apoptoz, LC3, Beclin-1, Atg4, ULK1.

Abstract

Investigation of role of FOXM1 which is the transcription factor protein on autophagia signal pathway in breast cancer cell lines

FOXM1 is a transcription factor that contributes to the development of cancer. Autophagy is a catabolic mechanism that stimulated to survival of cells under various stress conditions. However, if the autophagy is too much or too little, it leads to pathologic conditions such as cancer. Therefore, autophagy must be strictly regulated. But, it is not known how transcription of genes involved in autophagy is regulated. In our study, it was aimed to investigate the possible role of FOXM1 in transcription of LC3 and Beclin-1 genes, which are considered as markers of autophagy, in breast cancer cell lines, as well as clarifying the conflicting relationship between autophagy and cancer.

MDA-MB-231 cells were transfected with FOXM1 siRNAs and control siRNA. Compared to cells transfected with control siRNA, in cells transfected with FOXM1 siRNAs decreased RNA and protein expressions of both LC3 and Beclin-1. ChIP assay analysis showed that FOXM1 was linked to promoter regions of both LC3 and Beclin-1 genes. Luciferase reporter assay showed that while LC3 and Beclin-1 expression decreased in cells transfected with FOXM1 siRNA, LC3 and Beclin-1 expressions increased in cells transfected with FOXM1 expression vector.

All our data demonstrated that FOXM1 is involved in the regulation of transcription of LC3 and Beclin-1 genes. Thus, for the first time in the literature, unknown molecular mechanisms of LC3 and Beclin-1 genes were revealed. In addition, we found that cell viability, clonogenic formation, migration and invasion was markedly suppressed in MDA-MB-231 cells transfected with LC3, Beclin-1, ULK1 and Atg4 siRNAs. These results suggested that autophagy has an important contribution to the carcinogenic characterization of aggressive breast cancer cells. Based on our results, we think that our data clarifies the complex role of autophagy in cancer cells.

In conclusion, autophagy should be suppressed in aggressive breast cancer cells, LC3, Beclin-1, Atg4 and ULK1 siRNA can be used as a therapeutic agent. However, we believe that FOXM1 has multi-antitumor effects of targeting, may lead to more therapeutic effects on aggressive breast cancer cells.

Key words: FOXM1, autophagy, MDA-MB-231, siRNA, starvation, migration, invasion, proliferation, clone, apoptosis, LC3, Beclin-1, Atg4, ULK1.

I.GİRİŞ

FOX proteinleri, transkripsiyon faktörleri olarak görev yapan protein ailesidir. FOX protein ailesinin üyelerinden olan FOXM1, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre çoğalmasında görev alan genlerin transkripsiyonundan sorumlu olan transkripsiyon faktörüdür. Son yıllarda ise FOXM1 kanser hücrelerinde yüksek derecede ifade olan onkogenik bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır (Dai vd. , 2015; Wang vd., 2015; Hamurcu vd. 2016; Hamurcu vd. 2017). Görevinden dolayı FOXM1, kanser hücrelerinin tümöröjenik özellik kazanmasında ve onkogenik fenotipinin ilerlemesinde kritik bir rolü üstlendiği gösterilmiştir (Wang vd. 2005; Nandi vd. , 2017; Wang vd. , 2017). Ayrıca, FOXM1 apoptozu baskılayarak, anti-kanser ajanlara karşı hücrelerin direnç kazanmasına da yol açtığı gösterilmiştir (Raychaudhuri ve Park 2011; Halasi vd. 2013, Wang vd.,2017). Bizim daha önce yaptığımız bir çalışmada, FOXM1, agresif meme kanser hücrelerinin (MDA-MB-231 hücreleri), kanserojenik özellikler kazanmasında (migrasyon, invazyon, klonojenik, hücre proliferasyonu/canlılığı), eEF2K (ökaryotik uzama faktör-2yi fosforilleyen kinaz) ve Integrin- β genlerinin transkripsiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu gösterildi (Hamurcu vd. 2016, Hamurcu vd, 2017). Bu etkilerinden dolayı FOXM1, kanser hücrelerinde bilinen fonksiyonları dışında daha birçok rolü olabileceği düşünülmekte ve buna yönelik birçok çalışma yapılması gerektiği önerilmektedir.

Otofaji, açlıkta hücrenin hayatta kalmasını sağlayan, stresle uyandırılan katabolik bir süreçtir. Katabolik rolünden dolayı otofajinin, hızlı çoğalan kanser hücrelerinin besin ihtiyaçlarını karşılayan koruyucu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Ozpolat ve Benbrook, 2015). Ancak, otofaji; hücre ölümü ve yaşaması gibi farklı sonuçlar doğurabilen iki yönlü etkiye sahiptir (Mizushima 2017).Bir grup araştırmacılar, otofajinin uyarılmasını kanser hücrelerinin yaşamasına olanak sağlayan bir mekanizma olduğunu (Choi vd. , 2013; Wang vd. 2015) diğer bir grup araştırmacılar ise otofajinin alternatif bir ölüm mekanizması olduğunu rapor etmişlerdir (Tekedereli vd. , 2013; Ozpolat ve Benbrook 2015; Mizushima 2017). Dolayısıyla, kanser hücrelerinde otofajinin kesin rolü tam olarak açıklanamamıştır ve otofaji düzenlenme mekanizması ile ilgili kili cevaplanmamış birçok soru vardır:

1.Bu sorulardan birisi, kanser hücrelerinde otofaji genleri nasıl düzenlenir? Otofaji genlerini düzenleyen transkripsiyonel mekanizma henüz bilinmemektedir. FOXM1 otofajide rolü olduğuna dair literatürde de herhangi bir bilgiye rastlanamamıştır. Ancak, daha önceki çalışmamız (Hamurcu vd., 2016), FOXM1 otofajide rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, sunulan bu çalışmada transkripsiyon faktörü olan FOXM1, otofajinin belirteci olarak kabul edilen otofajik genlerin (LC3 ve Beclin-1 genleri) (Chen vd., 2017)transkripsiyon

mekanizmasında rol alıp almadığını araştırmak birincil olarak amaçlandı. Böylece, LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyonel düzenlenme mekanizmasını ilk kez açığa çıkarmak hedeflendi.

2. Kanser ve otofaji arasındaki ilişki çok karmaşık olup birbiri ile çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Çalışmalar, kanserin balı laması ilerlemesi ve terapiye dirençte otofajinin çok önemli role sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, kanser hücrelerinde otofaji, çift yönlü bir etkiye sahip olduğu için: kanser hücrelerinde otofaji baskılanmalı mı yoksa uyarılmalı mı sorusu şu anki literatür bilgileri ile henüz açıklanamamıştır (Mizushima 2017; Ozpolat ve Benbrook 2015). Çalışmamızda, literatürü baz alarak belirlediğimiz otofaji genlerini (LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 genleri) bu genleri hedef alan siRNA'larla baskılayarak, meme kanser hücre hücrelerinin kanserojenik özelliklerindeki değişikliklerin (proliferasyon, migrasyon, invazyon) araştırılması amaçlandı. Böylece kanser hücrelerinde otofajinin rolünü açıkla ve kavul turarak, kanser hücrelerinde otofaji baskılanmalı mı yada uyarılmalı mı sorusuna cevap bulunması hedeflendi.

II. GENEL BİLGİLER

II.I. Fork Head Box M1 (FOXM1) proteinleri

Fork Head Box (FOX) proteinleri, transkripsiyon faktörleri olarak görev yapan bir protein ailesidir. FOX proteinleri hücre çoğalmasında hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre farklılaşmasında doku homeostazisi, anjiyogenez ve apoptozu içeren birçok biyolojik süreçte yer almaktadır (Gomes vd., 2013 ;Hamurcu vd., 2016; Hamurcu vd., 2017; Nandi vd., 2017; Wang vd.,2017). FOX protein ailesinin üyelerinin bir kısmı tümör-süpressör olarak, bir kısmı ise onkogen olarak davranır (Shimeld vd. , 2010; Carlsson veMahlapuu 2002; Bella vd. , 2014).

Bu ailenin üyelerinden biri olan FOXM1 proteini, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre çoğalmasında önemli bir fonksiyona sahip olup klasik bir onkogen olarak görev yapar (Halasi vd, 2013; Xue vd, 2012; Gomes vd, 2013; Hamurcu vd. , 2016; Hamurcu vd. , 2017; Nandi vd. , 2016). FOXM1'in en önemli özelliği, çoğalan hücrelerde ve tümör hücrelerinde ifade olurken, farklılaşma sürecini tamamlama bölünmesini durdurmuş G0 evresinde bekleyen hücrelerde ifade olmamasıdır. Bölünen hücrelerde FOXM1'in aktivitesi hücre döngüsünün S evresinde artar, M ve G2 fazı boyunca yüksek seviyede kalır. FOXM1'in transkripsiyonel aktivitesi ise onkogenik Ras-MAP, NF- κ B ve EGFR sinyal yollarıyla kontrol edilir. Onkogen olan FOXM1, tümör süpressör olan p53 tarafından da negatif olarak düzenlenir (Gartel vd. , 2010; Wang vd 2010).

FOXM1'in solid tümörlerde; malin mezotelyoma, meme kanseri, akciğer kanseri, glioblastoma, gastrik karsinoma, kolorektal kanser, hepatosellular karsinoma, pankreatik karsinoma, over ve böbrek kanserlerinde yüksek oranda ifade edildiği bulunmuştur. (Xue vd, 2012; Christensen vd, 2013; Wang ve Gartel, 2011). Yine, bizim tarafımızdan daha önce yapılan çalışmada da FOXM1'in çelitle meme kanser hücre hatlarında normal epitel hücrelerine göre daha fazla ifade edildiği bulunmuştur (Hamurcu vd., 2016). FOXM1'in fazla ifade olmasının in vitro kanser hücre hatlarında invazyonu, anjiyogenezisi artırdığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (Dai vd., 2007; Huang vd., 2007; Gabriel vd.2011; Xue YJ vd., 2012; Hamurcu vd., 2016). Pankreatik, meme, prostat, böbrek kanser hücre hatlarında FOXM1 siRNA ile susturulduğunda, hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve invazyon oranlarında önemli bir azalma olduğu bulunmuştur (Xue vd, 2012; Dai vd, 2007; Ahmad vd, 2010). Bu bulgular FOXM1'in tümörögenizde anahtar bir rolü olduğu, kanser gelişimine, kanser hücrelerinin tümöröjenik özellikler kazanmasına ve onkogenik fenotipin ilerlemesine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca FOXM1'in, bu hücrelerde radyoterapik ve kemoterapik ajanlara karşı dirençli de olduğu gösterilmiştir (Millour vd, 2011; Carr vd, 2010;

Kwok vd, 2010; Halasi vd, 2012; Wang vd 2017). Bizim daha önce yaptığımız çalışmalarda da, siRNA aracılığıyla baskılanmış FOXM1'in MDA-MB-231 meme kanser hücre hatlarında invazyonu, proliferasyonu, migrasyonu azalttığı bulunmuştur (Hamurcu Z vd, 2016; Hamurcu vd. , 2017).Yapılan tüm bu çalışmalar, tümörlerde artmış FOXM1 seviyesi ile ilerlemiş tümör derecesi, yüksek proliferasyon oranı ve zayıf prognoz arasında bir ilişki olduğunu ve FOXM1'in kanser hastaları için yeni bir prognostik marker olabileceğini göstermektedir (Gomes vd, 2013; Halasi vd, 2013,; Dai vd., 2015, Wang vd., 2014, Nandi vd., 2017).

II.II. Otofaji ve Basamakları

Kelime anlamı kendi kendini (auto) yeme (phagy) olan otofaji, açlıkta hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji, hücrenin kendi içeriği olan sitozolik proteinlerin veya organellerin otofagozomlar tarafından alınması ve yıklan için lizozoma taşıılması sonra da lizozomlarda yıklan küçük moleküllerin tekrar kullanılmak üzere sitoplazmaya aktarılması olayıdır (Ge vd, 2014; Ozpolat ve Benbrook, 2015; Gallagher vd., 2016; Mizushima, 2017).

Otofajinin 3 aşamalı olarak otofaji, mikro-otofaji, makro-otofaji olmak üzere üç tipi bulunmaktadır (Chen ve Klionsky, 2011; Ozpolat ve Benbrook ,2015; Bootman vd., 2017):

1. 3 aşamalı olarak otofaji: yüksek yapışkanlı ökaryotlarda görülen otofaji tipidir. 3 aşamalı olarak protein önce hedefi olan sitozolik proteine bağlanır ve daha sonra da lizozom membranında bulunan reseptörüne bağlanır. Sitosolik protein yıklan için lizozom içine alınır.
2. Mikro-otofaji: lizozom membranının içe doğru çıkıntı oluşturmasıyla sitoplazmik materyalin lizozomda dokrudan yıklanmasıdır.
3. Makro-otofaji: çift membranlı vezikül olan otofagozom oluşturulmasıyla tanımlanır. Makro-otofaji sırasında, sitoplazmik proteinler, organeller ve diğer bileşenler fagoforla çevrelenir. Fagofor genişler ve otofagozoma dönüşür. Otofagozom lizozom membranıyla birleşir ve otolizozoma dönüşür ve asit hidrolazlar tarafından sitoplazmik bileşenlerin yıklan gerçekleştirir. Yıklan sonucu oluşan ürünler yeniden kullanılmak üzere lizozom membranında bulunan permeazlar tarafından tekrar sitozole taşınır.

Bu üç otofaji tipinden makro-otofaji en çok çalışılan otofaji tipidir (Chen ve Klionsky, 2011; Ozpolat ve Benbrook, 2015) ve literatürde makro-otofaji otofaji olarak ifade edilmektedir. Bizimde sunulan çalışmamızda makro-otofaji sinyal yolağı çalışılmıştır.

Mayalarda yapılan çalışmalar da otofaji ile ilgili (autophagy-related(Atg)) en az 37 protein tanımlanmıştır (Ozpolat ve Benbrook, 2015; Mizushima, 2017; Bootman vd., 2017). Otofaji için esas olan Atg proteinleri, integral membran proteinlerini, Atg9 ve en az dört büyük multiprotein kompleksini içerir. Bu proteinlerinin herbirinin tam olarak görevi tanımlanmamakla birlikte otofajinin farklı basamaklarında görev yaparlar (Şekil 1).

1. Otofajinin uyarılması ve fagozor oluşumu: Otofajinin oluşumunu başlatan en önemli faktör açlık, yani temel besin maddelerinden herhangi birinin bulunmaması otofajiyi başlatabilir. Otofajinin temel inhibitörü, mTOR (target of rapamycin) proteini olup, serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu kinaz besin varlığında, protein kinaz olan Atg10 negatif olarak düzenler. Açlıkla mTOR'un inhibisyonu, Atg10n aktivasyonuna sebep olur. Aktifleşen Atg1, diğer Atg proteinlerini fosforilleyerek otofagozom oluşumunu başlatır. Otofagozom oluşumundaki ilk basamak fagozor oluşmasıdır. Atg10n memelilerdeki homoloğu ULK (Unc-51-Like Kinase) kompleksi olup, otofagozom oluşumunu başlatır. ULK kompleksi ULK1, ULK2, Atg13, fokal adezyon kinaz proteini olan FIP200 ve Atg101 proteinlerini içerir. Açlıkta mTOR inhibisyonu ULK kinazı aktive eder. Aktifleşen ULK, Atg13 ve FIP2000 proteinlerini fosforiller ve böylece fagozor oluşumu tetiklenir. (Cerella vd, 2014; Chen vd, 2014; Ge vd, 2014; Pengo vd., 2017; Gallagher vd., 2016) (Şekil 1, 2).

2. Fagozor uzaması ve olgun vezikül oluşumu: Fagozor oluşumunun başlangıcı ağızlanmasında, fagozor membranının yapışanması için fosfatidilinozitol-3- kinaz (PI3-K) kompleksi gereklidir. Bu kompleks membran için gerekli olan protein ve lipidlerin toplanmasını sağlar. IP3-K kompleksi, fagozorun uzaması ve otofagozomun tamamlanması için gerekli olan ubiquitin-benzeri konjugasyon sistemiyle etkilenebilir (Şekil 1). Bu konjugasyon sisteminde görev alan Atg proteinleri LC3'ü aktive eder (Şekil 1). Aktifleşen LC3, Atg4'ünde görev alarak Atg proteinleri tarafından iletilen hedefi olan lipid fosfatidil etanolamin (PE)'ye bağlanır. Lipid bağlanırsa dönüşen LC3 fagozor membranına yerleşir ve otofaji için fagozorun genişlemesini ve tamamlanmasını sağlar (Şekil 1, 2) (Cerella vd, 2014; Chen vd, 2014; Mizushima, 2017; Ge vd, 2014; Gallagher vd., 2016).

3. Olgunlaşmış fagozomun (vezikülün) lizozomla birleşmesi: Otofajide son basamak, olgunlaşmış otofagozomların, endolizozom membranıyla birleşmesidir (Şekil 2). Bu basamak olgun otofagozom membranından Atg proteinlerinin ayrışmasını gerektirir. Bu işlemde Atg4 olmak üzere yine birkaç Atg proteinleri tarafından düzenlenir (Cerella vd, 2014; Chen vd, 2014; Mizushima, 2007; Ge vd, 2014; Sánchez-Wandelmer vd., 2017) (Şekil 1). Otofagozomun lizozomla birleşmesinden sonra, vezikül içeriğinin yakılması lizozomda bulunan asit-hidrolaz enzimlerince gerçekleştirilir. Yıkıldıktan sonra oluşan küçük moleküller özellikle amino asitler açlıkta hücrenin fonksiyonlarının korunabilmesi için tekrar sitoplazmaya transfer edilir (Chen vd, 2014; Ge vd, 2014; Cerella vd, 2014; Mizushima 2017).

Sunulan Araştırmada çalışılan gen ve proteinler

1. Atg8 (LC3): Mayalarda tanımlanan 37 Atg proteinden, görevi en iyi şekilde açıklanan Atg8 (memelilerde homoloğu LC3) proteindir ve otofajinin bir belirteci olarak kabul edilir (Tang vd., 2016) LC3, ubiquitin benzeri bir protein olup, sitoplazmada LC3-I formunda serbest halde bulunur. Otofaji uyarıldıkça, LC3-I fosfatidiletanolamin bağlanır ve LC3-I formundan LC3-

II formuna dönüşür. LC3-II (fosfatidiletanolamin bağlı formda iken) otofajik membranın yüzeyine yerleşir, otofagozomun uzamasında, olgunlaşmasında görev yapar (Lekil1) (Yoshii ve Mizushima 2017).

2.Atg6 (Beclin-1): Atg6'nın, Memelilerdeki homoloğu Beclin-1 proteindir ve otofajinin belirteci olarak kabul edilir (Ge vd, 2014; Tang vd., 2016). Beclin-1 görevi en iyi tanımlanmış proteinlerden biri olup otofagozomun oluşmasında katkı sağlar (Gallagher vd 2016; Mizushima 2017) (Lekil 1).

3.Atg4 (Atg4B): Memelilerdeki homoloğu Atg4B'dir. Proteaz aktivitesine sahiptir. Hem, LC3'ün ilenmesinde görev yapar hem de otofagozomun lizozomla birleşmesi için, otofagozomun dış membranında bulunan LC3'ün membrandan uzaklaşmasında görev alır (Gallagher vd., 2016; Sánchez-Wandelmer vd., 2017) (Lekil 1).

4.ULK1 proteini: Mayalardaki Atg1 proteininin memelilerdeki homoloğu olarak tanımlanan ULK (Unc-51-Like kinazlar) memelilerde otofajide rol oynayan ilk protein olarak tanımlanmıştır. ULK1; serin/treonin kinazdır ve otofajinin uyarılmasından sorumludur. (Mizushima 2010; Gallagher vd., 2016; Pengo vd., 2017) (Lekil 1).

II.III. Otofajinin Fonksiyonu

Otofaji, hücre gelişiminde ve homeostazisinde önemli bir role sahiptir. Otofajinin primer görevi, açlık gibi stres faktörlerine karşı hücreleri korumaktır. Açlık süresince otofaji sitoplazmik bileşenlerin yıkımını sağlar. Böylece yeni proteinlerin sentezi ya da ATP üretimi için ihtiyaç duyulan amino asit ve yağ asidi ihtiyacı karşılanır. Bununla birlikte otofaji aynı zamanda uyarıldıkça zaman, hücre ölümüne yol açabilir ve bu ölüm tipi, tip-II programlanmış hücre ölüm tipi olarak adlandırılır (Ge L vd 2014; Fulda vd., 2017; Ozpolat ve Benbrook , 2015; Mizushima, 2017). Normal faktörler altında ve kısa süreli açlık süresince amino asit konsantrasyonunun korunması için otofajiden daha çok ubiquitin proteozom sistemi kullanılır. Ancak, birkaç saat devam eden açlık sırasında gerekli olan amino asitler otofaji ile üretilir. Besin kıtlığına ilaveten, hipoksik faktörler, metabolik stres de otofajiyi uyarır. Metabolik stres tipik olarak apoptozu indükler ama, apoptoz mekanizmasının bozulduğu hücreler hipoksik faktörler altında ya da amaya devam eder. Bu hücrelerin canlı kalması otofajiye bağlıdır. Hem apoptozis hem de otofaji baskılandıkça zaman hücre canlılığını sürdürmede başarısız olur ve ölür. (Mizushima , 2014).

Otofaji ya da fonksiyonundaki bozukluklar, kanser, kalp hastalıkları nörodejenerasyon, kalp hastalıkları gastrointestinal hastalıklar gibi patolojik durumlara yol açar (Jiang ve Mizushima, 2014; Rodolfo vd., 2017). Bir çok durumda otofajinin çok ya da az olması hem pozitif hem de negatif etkiye sebep olur. Otofaji ile ilgili yapılan araştırmalardan ortaya çıkarılan temel sonuçta göre, otofajinin çok ya da az olması zararlı olabileceğinden otofaji çok sıkı bir şekilde düzenlenmek zorundadır. Otofajinin terapötik amaçla kullanabilmesi için

otofajinin düzenlenme mekanizmasını çok iyi anlaması gerekmektedir. (Ge vd., 2014; Chen vd., 2011).

II. IV. Otofaji ve Kanser Arasındaki İlişki

Katabolik rolünden dolayı otofaji, kanser gelişiminin başlangıç basamaklarında hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan koruyucu bir mekanizma olarak gösterilmektedir. Hipoksi, metabolik stres, kemoterapi ya da radyoterapi tedavileri otofajiyi tetikler (Xin vd 2017). Otofajinin tamoksifen gibi hormonal terapiler ve DNA hasarlayıcı ajanların yol açtığı apoptotik hücre ölümünü de geciktirdiği gösterilmiştir. Tümör başlangıcında oluşan hipoksi ve metabolik stres artışlarında, pre-kanser ve kanser hücrelerinin enerji taleplerinin karşılanması ATP seviyesinin korunması için, bu hücrelerde otofaji aktive edilir. Bu yüzden tümörün başlangıç ve büyüme aşamalarında otofajinin aktive edildiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda otofaji, hücre ölürken özellikle apoptozun başlaması apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu için ihtiyaç duyulan ATP gibi enerji kaynaklarının saklanması da destek verir. (Cerella vd, 2014). Dolayısıyla, otofaji ve kanser arasındaki ilişki ile ilgili literatür oldukça karmaşık olup elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyumluluk göstermemektedir (Ozpolat ve Benbrook 2015; Mizushima 2017; Zhou vd., 2016). Özpolat ve ekibi meme kanser hücrelerinde siRNA kullanarak otofaji ile ilişkili hedef genleri susturduklarında, otofajik hücre ölümünün yavaşladığı ve baskılanmış otofajinin şu anda kullanılan tedavilerin etkisini artırabileceğini göstermişlerdir (Tekedereli vd 2013). Yine, Özpolat ve ekibi, pankreatik kanser hücrelerinde otofajide anahtar rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarının baskılandıklarında otofajik hücre ölümünün tetiklendiğini göstermişler ve baskılanmış otofajinin tedaviye yanıt vermeyen kanser hücrelerinde alternatif bir mekanizma olabileceğini önermişlerdir (Akar vd, 2007; Ozpolat vd 2007). Yine bazı araştırmacılar, otofajide rol alan Atg6, Beclin-1, Atg10 ve Atg12 genlerini siRNA ile ya da bafilomisin gibi farmakolojik inhibitörlerle susturarak otofajiyi baskılandıklarında, baskılanmış otofajinin kanserlerde kullanılan terapötik ajanların etkisini artırdığını göstermişlerdir (Amaravadi vd, 2007; Qadir vd, 2008). Oysa, bazı çalışmalar, otofajinin düşük ekspresyonun kanserin ilerlemesine katkı sağladığını ayrıca otofajinin düşük ekspresyonunun kanser hücrelerinin daha az agresif bir davranış sergilemesine ve kemoterapiye daha duyarlı olmasına yol açtığını göstermişlerdir (Valente vd, 2014; Maycotte P ve Thorburn A, 2014). Sonuç olarak, bazı çalışmalar otofajinin hücre ölümüne yol açarak tümör süpresör bir rolü olduğunu, bazı çalışmalar ise otofajinin tümör hücrelerini yaşamaya ve çoalmaya teşvik ederek onkogen olarak davrandığını ortaya koymuşlardır (Cerella vd, 2014; Chen vd, 2014; Bassam vd, 2013). Bu yüzden, kanser hücrelerinde, otofajik hayatta kalma mekanizması baskılandığında mı yoksa otofajik ölüm mekanizması yavaşladığında mı sağlıklı için yararlı? sorusu literatürde henüz cevaplanamamıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmalar, bu sorunun cevabının yapılacak yeni

aralı tēmalarla açığa kavulı masē gerektiğini önermektedir (Gomes vd, 2016; Zambrano ve Yeh, 2016).

III. MATERYAL VE METOD

III.I. Hücre Hatları

Çalışmamızda üçlü reseptör negatif meme kanser hücre (TNBC) hattı olarak MDA-MB-231 , östrojen reseptör pozitif (ER+) meme kanser hücre hattı olarak MCF7 ve normal epitel hücre hattı olarak MCF10A hücreleri kullanıldı.

III.II. Hücre kültürü

Çalışmamızda kullanılan hücreler Fetal-Bovin-Serum (FBS +) içeren uygun büyüme besiyeri (medya) kullanılarak 37 °C'de inkübatörde çoğaltıldı. Bilindiği gibi açlık otofajiyi indükleyici major etkidir. Bu nedenle *otofajiyi indüklemek ve pozitif kontrol olarak kullanmak için*, çalışmamızda kullanılan hücrelerin bir kısmında serum içermeyen (FBS -) besiyerinde aç bırakılarak kültür yapıldı. Tüm bu işlemler steril ortamda laminar-air flow kabin kullanılarak yapıldı.

III.III. Hücrelerin FOXM1, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 siRNA'lar ile transfeksiyonu

Çalışmamızda meme kanser hücrelerinde, FOXM1'in otofajinin belirteci olduğu ileri sürülen LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyonlarının düzenlenmesinde ve otofaji de rol alıp almadığını araştırmak için, FOXM1 genini hedefleyen iki farklı FOXM1 siRNA kullanıldı. Meme kanser hücrelerinde otofajinin karmaşık rolüne açıklık getirmek için, otofajinin temel belirteci olan LC3, Beclin-1 genleri ve bu genlerin yanı sıra otofajide rol oynayan genlerden ULK1, Atg4 genlerini hedefleyen iki farklı LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 siRNA'ları kullanıldı. Ayrıca tüm deneylerimizde negatif kontrol olarak (herhangi bir geni baskılamayan) kontrol-siRNA kullanıldı.

Hücreler, FOXM1, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 genlerini hedefleyen FOXM1, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 siRNA'ları ve herhangi bir geni hedeflemeyen kontrol siRNA ile transfekte edildi. siRNA transfeksiyonu için hyperfect transfeksiyon ajanı olarak kullanıldı. Hücrelerin çoğaltıldığı kültür ortamına son konsantrasyonları 50 nM olacak şekilde siRNA'lar eklendi ve 72 saat boyunca hücrelerin siRNA'lar ile transfekte olmasını sağlandı (Hamurcu vd., 2016; Hamurcu vd.2017).

III.IV. MDA-MB-231 hücrelerinin FOXM1 overekspresyon vektörü ile transfeksiyonu

FOXM1'in ekspresyonunu artırmak için MDA-MB-231 hücreleri FOXM1 overekspresyon plasmidi (vektör) ve negatif kontrol olarak empty vektör ile transfekte edildi. Transfeksiyon ajanı olarak hyperfect kullanıldı. Transfeksiyonun 40. saatinde hücreler toplandı (Hamurcu vd., 2016; Hamurcu vd., 2017).

III. V.MTS Testi

MTS hücrelerin canlılık/proliferasyon oranlarını analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda kullanılan hücreler 96 delikli plate'lere ekildi. inkübasyonları 24.saatinde

FOXm1, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4, kontrol siRNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyonların 72.s aatinde hücrelerin bir kısmının inkübasyonları sonlandırıldı bir kısm hücreler 4 saat serum içermeyen medyum içerisinde inkübe edilerek aç kalmasa saklandı Sonra, PMS/MTS solusyonu kullanılarak ELISA reader'la ölçüm yapıldı

III. VI. Western Blot Analizi

Hedef proteinlerin ekspresyon analizlerini yapmak için kullanılan yöntemdir. Hücreler medyum içeren flasklara ekildi, kullanılan hücrelerde hedeflenen proteinlerin (FOXm1, LC3, Beclin-1, ULK1 ve Atg4 proteinleri) bazal ekspresyon seviyelerini ve siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde hedef proteinlerin (FOXm1, LC3, Beclin-1, Atg4, ULK1, hücre çoğalmasa migrasyonda ve invazyonda rol alan, Cyclin-D1, integrin, pSrc, Src, PARP ve otofajide görev alan diğer proteinlerin) ekspresyon seviyelerini belirlemek için kültüre edilen hücrelerden western blot analizi yapıldı

Western blot analizi için, amaca uygun 1 artlarda çoğaltılan hücreler toplandı Toplanan hücreler, hücre liziz tamponu kullanarak parçalandı ve bu hücrelerden proteinler izole edildi. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı ve tüm hücrelerde elde edilen proteinler elüt konsantrasyonlarda SDS-PAGE jeli yüklendi, yürütme tamponu (Running Buffer) varlığında elektroforez tankında elektrik akım varlığında 2-3 saat jelde proteinlerin yürümesi (ayrılması) saklandı Daha sonra proteinler membrana transfer edildi. Sonra hazırlanan membranlarda hedeflenen proteinlerin ekspresyonları görüntüleme sistemi kullanılarak analiz edildi.

III. VII. Klonojenik Tespit

Hücreler, kontrol siRNA, LC3, Beclin-1 ULK1 ve Atg4 siRNA'lar ile transfekte edildi ve transfeksiyon sonrasında hücrelerde klon oluşumu araştırıldı Bunun için; medya bulunan 600 plate'lere uygun miktarlarda hücreler ekildi ve ekimin 48. saatinde siRNA (LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4, kontrol siRNA) transfeksiyonu yapıldı ve sonra 10-12 gün 37°C'de inkübe edildi. inkübasyon sonrasında ortamdan medyum uzaklaştırıldı ve hücreler (her bir plate) metanolle hazırlanmış %100'ük kristal-viyole ile boyandı ve oluşan klonlar sayılarak yüzde değerleri hesaplandı(Hamurcu vd., 2016).

III.VIII. Migrasyon tespiti (Wound healing assay)

Bu yöntem, hücrelerin bulunduğu ortamda pipet aracılığıyla yara oluşturularak, bu yaranın kapanma oranına göre, hücrelerin migrasyonlarının analiz etme ilimidir.

600 plate'lere hücreler ekildi ve inkübe edildi. inkübasyonun 24. saatinde, hücreler LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 ve kontrol siRNA'ları ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler inkübatörden çıkartıldı laminar air flow kabinde hücrelerde steril pipet ucu kullanılarak yara oluşturuldu, sonra 0.saatte yara oluşturulan hücrelerin kamera ataçmanlı mikroskop kullanılarak fotokraf çekildi ve sonra bu hücreler tekrar inkübatöre kondu. Yara

kapanması (pipetle oluş turulan boş luşa hücrelerin göç ederek, oluş turulan boş luğun doldurması) kontrol-siRNA ile transfeke edilmiş hücrelerde mikroskop altında belli zaman aralıklarında takip edildi, bu hücrelerde yara kapandış (oluş turulan boş luk hücrelerle doldurulduğu zaman) zaman kültür sonlandırdı ve hücrelerin tekrar görüntüleri alındı. Oluş turulan boş luşa göç eden hücreler sayılarak, siRNAlarla transfeke edilen hücrelerde migrasyon oranı hesaplandı (Hamurcu vd., 2016).

III. IX. İnvazyon tespiti

Hücreler medyum içeren kültür flaklarına ekildi ve inkübasyonun 24. saatinde LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 ve kontrol siRNAlarla transfeke edildi. siRNA transfeksiyonun 72 saatinde hücreler toplandı. Sonra hücrelere toma lamında sayıldı ve tüm hücreler elit miktarda önceden hazırlanmış matrijel içeren insertlere yerleştirildi ve 24 saat inkübe edilerek invazyonu saklandı. 24 saat sonra kültür sonlandırdı. Ortamdaki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler fikse edilerek boyandı. Sonra boyanmış olan insertler kesildi ve lama yerleştirildi. Preparat hazırlandı. Daha sonra kamera atışmanlı mikroskop kullanılarak preparatların görüntüsü alındı ve membran (insert) bir taraftan diğer tarafa geçen hücreler sayılarak invazyon yapan hücre oranı hesaplandı (Hamurcu vd., 2016).

III. X. Annexin-V Analizi

Apopitoza giden hücrelerin membran yapısında deşililik olur. Normalde hücre membranı sitozole bakan yüzünde (iç yüzünde) bulunan fosfatidil serin, apopitoza giden hücrelerde membranın iç yüzünden dış yüzüne taşır. Annexin-V membranın dış yüzünde bulunan fosfatidil serini boyar. Bu nedenle yaygın olarak apopitoz analizinde Annexin-V yöntemi kullanılır.

Hücreler medyum içeren kültür flaklarına ekildi ve inkübasyonlarının 24. saatinde siRNAlar (kontrol siRNA, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4) ile transfeke edildi. 72 saatlik siRNA transfeksiyonu sonrasında hücreler toplandı. Annexin-V kit içeriğine uygun şekilde hücreler ilimlerden geçirildi ve Muse cihazında apopitoz oranı ölçüldü.

III. XI. Otofaji Analizi

Kontrol siRNA, LC3, Beclin-1 ULK1 ve Atg4 siRNAlarıyla transfeke edilen meme kanser hücrelerinde, otofaji düzeyini tespit etmek için; hücreler medya içeren 60k plakelere ekildi ve 37 °C'de etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun 24. saatinde hücreler siRNA (LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 kontrol siRNA, FOXM1)larla transfeke edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde inkübasyon sonlandırdı ve hücreler toplandı. Hücrelerin bir kısmında 4 saat aç bırakıldı (72 saatlik transfeksiyon sonrasında, ortamdaki medyum uzaklaştırılarak FBS (-) eklendi ve 4 saat bu ortam içerisinde inkübe edildi.) Sonra otofaji kit prosedürüne uygun şekilde hücreler ilimlerden geçirildi ve Muse cihazında otofaji indüklenme oranı ölçüldü.

III. XII. Asidik Veziküllerin (Otofajik Veziküllerin) Tespiti

Akridin oranj, asidik veziküler oluú umlarē(otofajik veziküller, lizozom, endozom, otofagozom vb.) belirlemek için kullanēan floresan bir boyadē ve asidik veziküler yapıları etrafında birikerek sarēturuncu görüntü oluú tururken, sitoplazmayēyel ile boyar. Çalēmamēda asidik veziküler oluú umlatēbelirlemek için, hücreler medya içeren 60k platelere ekildi ve 37 °C'de etüvde inkübe edildi. inkübasyonun 24. saatinde hücreler siRNA (LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 kontrol siRNA, FOXM1)larla transfekte edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde inkübasyon sonlandırdē Ortamdan medyum uzaklaı tēdē ve hücreler acridine orange ile boyandē (acridine orange sitoplazma ve nükleusu yēl ile boyarken, otofagozomlar parlak kēmēya boyar). Sonra hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri alēnarak otofajik veziküler oluú umlar analiz edildi.

III.XIII.Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Analizi

Hedef genlerimizin ekspresyon seviyelerini belirlemek için, MDA-MB-231 hücreleri medyum içeren 6 kuyucuklu kaplara ekildi. Hücreler 24. saatte son konsantrasyonu 50 nM olacak ē ekilde kontrol siRNA, iki farklı FOXM1 siRNA, iki farklı LC3 siRNA ve iki farklı Beclin-1 siRNAlar ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde hücrelerden trizolle RNA izolasyonu yapıdē Total RNA miktarē nano-dropta ölçüldü. RNA örneklerinden reverse-trankriptaz enzimi kullanarak cDNA elde edildi.

RNA örneklerinden cDNA elde etmek için; reverse-transkriptaz enzimi içeren mix hazēlandē ve alē aēdaki program kullanēarak RNAdan cDNA elde edildi.

cDNA Termal Programē

42°C 15 dakika
95°C 5 dakika

cDNA örnekleri LC3 genine spesifik (F: 5'GAG CAG CAT CCA ACC AAA -3' R: 5'CGT CTC CTG GAG GCA TA -3' ve Beclin-1 genine spesifik (F: 5'GAA CGG CAA GAT AGT GGC-3' R:5'CAG AGC ATG GAG CAG CAA-3' pirmerler kullanēarak alē aēdaki programa göre PCR cihazında çoēaltēdē

LC3 için PCR programē

2 dakika	94°C	
30 saniye	95°C	} 35 dōngü
30 saniye	52°C	
1 dakika	72°C	
1 dakika	72°C	
0	4°C	

Beclin-1 için PCR programē

2 dakika	94°C	
30 saniye	95°C	} 35 dōngü
30 saniye	54°C	
1 dakika	72°C	
1 dakika	72°C	
0	4°C	

Çokaltılan örnekler etidiyum bromür içeren %1.2'lik agaroz jele yüklendi ve 70 voltta kolı turuldu. Jel görüntüsü görüntüleme cihazı Biorad kullanılarak görüntülendi.

III. XIV. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Analizi

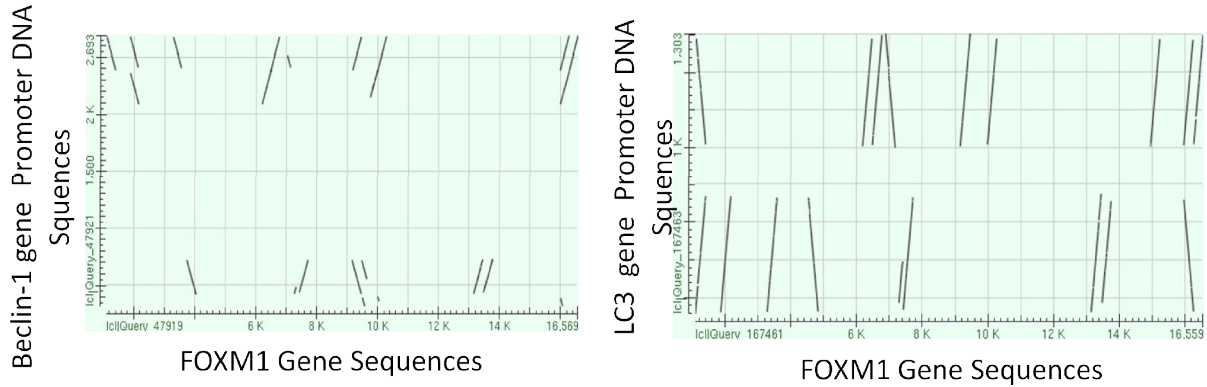
ChIP analizi transkripsiyon faktörü olarak görev yapan proteinlerin hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanıp bağlanmadığını analiz etmek için kullanılan yöntemdir (Hamurcu vd, 2016, Hamurcu vd 2017).

Bu analizi yapmak için aşağıdaki belirtilen ön-hazırlıklar yapıldı

1. LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerinin bazı dizisi bir biyoinformatik uzmanından destek alınarak belirlendi. Transkripsiyon başlama bölgesinden yukarı doğru 3000 bazlık bölgenin bazı dizisi tespit edildi.

2. LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgesi için belirlenen 3000 bazlık dizi ile FOXM1 geni arasındaki konsensusa

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq) programi kullanılarak bakıldı. Hem Beclin-1 hem de LC3 genlerinin belirlenen promotor bölgeleri ile FOXM1 geni arasında konsensus olduğu bulundu (Şekil 3).



Şekil 3. FOXM1/LC3 promotor ve FOXM1/Beclin-1 promotor bölgesi arasındaki konsensus. FOXM1 gene sekansı ile Beclin-1 geninin promotor bölgesi sekansı ve LC3 geninin promotor bölgesi sekansı arasında konsensus bulundu.

3. Bu 3000 bazlık bölgeler 1000 baz olacak şekilde 3 bölgeye bölündü. Her 1000 bazlık bölge için 2 farklı primer olmak üzere her gen için toplam 6 primer, primer-3 programi kullanılarak belirlendi. Primer bazı dizileri Tablo 1'de gösterildi.

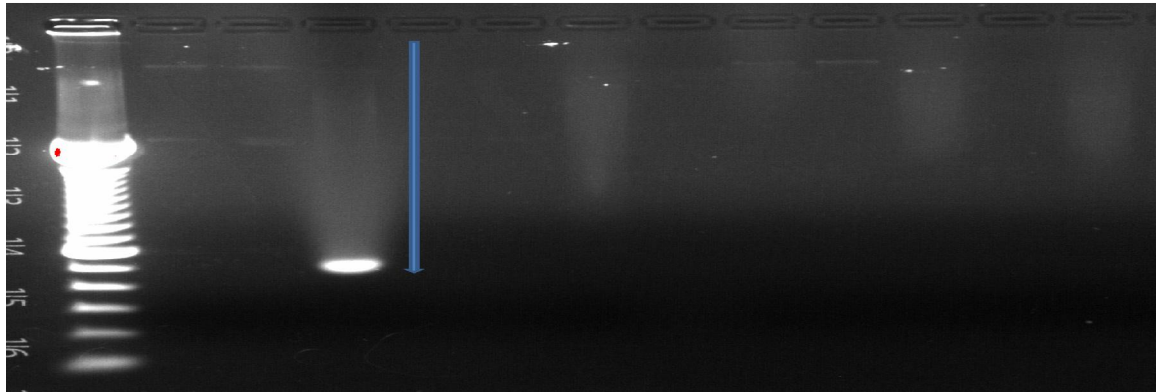
Tablo 1. LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotorlarına spesifik primer baz dizileri.

Hedef Gen	Left primer	Right primer
Beclin-1-BS1	AGCTGATATTGCACCACTGC	ACGGTTTCACCATGTTAGCC
Beclin-1- BS 2	ATTAGCCGGGTGTAGTGGTG	TTGATTGCTGGTAAGGCTGA
Beclin-1- BS 3	GTAATCACCCACAGGGGAAA	ATGGGGTCTCACTTTGTTGC
Beclin-1- BS 4	AAGGGGAGATGGGAAATGTT	GACTGGGTCTTGAGCAGAGG
Beclin-1- BS 5	CTACCCAGCCTCCTGAGTA	GCAAGGCTCCATCTCAGAAC
Beclin-1- BS 6	TTCCCGTGGTAACCTTGTTT	ACCATCGCTCTGTCTTCAGC
LC3B- BS 1	AGCCATCTTCTGAACGCTGT	ATTTGTGCAGGTGGCACTTT
LC3B- BS 2	TGCACAAATGCACCGTTATT	AGGTGATTCTCCTGCCTCAG
LC3B- BS 3	CACACCCGGCTAATTTTTGT	CTTGAGCCCAGGAGTTTGAG
LC3B- BS 4	CTGGGTTTACAGGCTTGGAG	AGCCCCATAGTTCCAGGATT
LC3B- BS 5	GTGGGCAATAGCAACCAAT	TTAGGTCGTCTGTGGCGACT
LC3B- BS 6	CTCTCTGGAGGGGAAAGGAT	CCCTGAGGTGACGGTTGT

4. MDA-MB-231 hücrelerinden DNA izolasyon kiti (Rhoche) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örnekleri LC3B ve Beclin-1 promotorlarına spesifik belirlenen primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi.

5. Daha sonra MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilen genomik DNA kullanılarak, DNA'yı 200-1000 bp arasında parçalamak için DNA sonikasyon optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon için farklı hücre sayıları ve farklı setlerde sonikasyon yapıldı. Sonikasyon sonrası ürünler %20lik agaroz jelde yürütülerek DNA sonikasyonu kontrol edildi (Şekil 4). En iyi DNA sonikasyonu, 20 µL ile 2.5 x10⁶ hücre içeren tüp %60 güçle 15 saniyede, 15 set sonikasyon probu kullanılarak elde edildi ve Chip analizi için bu protokolün kullanılması uygun bulundu.

DNA sonikasyonu için optimizasyon çalışmaları



Şekil 4. DNA sonikasyonu. DNA sonikasyonunu optimize etmek için kullanılan yöntemler

sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin jel görüntüsü.

Chip analizi, Milpore EZ-ChIP kiti kullanılarak yapıldı. 2x10⁷ /20 ml hücre %18.8'de formaldehit ile fikse edildi ve protokole göre hücreler lizis edildi. Lizis sonrasında kromatin yukarıda anlatılan optimize ettiğimiz protokole göre parçalandı. Kromatin fragmentinin %1 normalizasyon için total kromatin (input) olarak ayrıldı. Kalan kromatin fragmentleri elüt olarak 3 ependorf tüpe bölündü. Bu tüplerden biri, pozitif kontrol olarak (anti-RNA Polimeraz II), diğeri negatif kontrol olarak (Normal Mouse IgG) antikorlarıyla ve 3. tüpte hedefimiz olan FOXM1 antikoruna ile bir gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. Sonra kromatin-antikor kompleksi protein G agoroze beads ile 1 saat inkübe edildi. Daha sonra ardarda yıkamalar yapıldı, sonra hücreler RNAaz-A ile ardından da proteinaz-K ile inkübe edilerek RNA ve proteinlerin yıkılması sağlandı ve purifiye DNA elde edildi. (Hamurcu vd.,2016; Hamurcu vd. 2017). Bu kromatin örnekleri (Input, pozitif kontrol, negatif kontrol ve FOXM1 antikorlarıyla inkübe edilen kromatin fragmentleri) öncelikle GABDH genine spesifik kontrol primeri kullanılarak amplifiye edildi. Sonra bu kromatin fragmentleri LC3 ve Beclin-1 promotoruna spesifik olarak belirlenen primerler kullanılarak amplifiye edildi.

III. XV. Dual Luciferase Reporter Analizi

Dual Luciferase Reporter Analizi hedef promotor aktivitesini ölçmek için yaygın olarak kullanılan oldukça duyarlı bir yöntemdir (Hamurcu vd, 2016, Hamurcu vd 2017).

Analiz için yapılan ön hazırlıklar:

1. Bu çalışmamız için öncelikle FOXM1'in bağlandığı LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotör bölgeleri LC3-P3, Beclin-1-P2 ve Beclin-P6 primerleri kullanılarak çoğaltıldı (Lekil 13A). Hedef genler (çoğaltılan LC3 ve Beclin-1 promoter bölgeleri) ve boş plazmid (vektör) DNA'sı *EcoRI* restriksiyon enzimiyle kesildi, DNA ligaz enzimi ile DNA ligasyon yapıldı. Böylece plazmid içerisine hedef gen bölgeleri inset edildi. Elde edilen rekombinant DNA bakteriyeye (E.Coli) transfer edilerek klonlanması sağlandı. Sonra bakteriden purifiye rekombinant DNA'lar izole edildi.

Dual Luciferase Reporter Analizi, Hücreler 24'ük plakelere ekildi. inkübasyonun 24. saatinde, hücrelerin bir kısmı FOXM1'i baskılamak için; iki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfeke edildi. Hücrelerin bir kısmında FOXM1'in overekspresyonu için; FOXM1 overekspresyon vektörü ve kontrol olarak empty vektörle transfeke edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra bu hücreler hazırlanan LC3 (LC3-P3) ve Beclin-1 (Beclin-1-P2 ve Beclin-P6) vektörleri ve lusiferaz aktiviteyi tespit için pRLTK renilla luciferase expression plasmidi ile transfeke edildi. MDA-MB-231 hücrelerine tüm plazmidlerin ve siRNA'ların transfeksiyonu için hyperfect kullanıldı. Transfeksiyondan 40 saat sonra, hücreler toplandı, lizis edildi, ve proteinler izole edilerek lusiferaz aktivitesi uygun tamponların varlığında Lusiferaz Dual Reporter assay kiti kullanılarak Eliza Reader da dual-luciferase programında analiz yapıldı.

(Hamurcu vd.,2016; Hamurcu vd. 2017).FOXM1siRNA ve FOXM1 overekspresyon plazmidi ile transfekte edilen hücreler renilla lusiferaz aktitesine göre normalize edildi ve sonuçlar pGL3-Basic empty vector (boş vektör) ile transfekte edilen hücrelerle karşılaştırıldı.

III.XVI. İmmüno Floresan (IF) Boyama

Hücre içerisindeki spesifik (hedef) proteini görüntülemek için kullanılan bir yöntemdir. Otofajinin belirteci olarak bilinen LC3 proteininin sitoplamik dağılımını belirlemek için, hücreler 24000 plakelere ekildi. İnkübasyonun 24. saatinde son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde FOXM1 siRNA ile ve kontrol siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde ortamdaki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı ve ortama FBS içermeyen medyum eklenerek hücrelerin 4 saat boyunca açık kalmasını sağlandı. 4 saatlik açık sonrasında ortamdaki medya uzaklatıldı ve hücreler %4000 paraformaldehit ile fiks edildi. Fiks edilen hücreler %0.01 Tween-20 içeren PBS ile permeabilize edildi. Permeabilizasyon sonrasında hücreler %0.10 BSA ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 1 µl LC3 primer antikoruna içeren BSA ile bir gece inkübe edildi. Overnight sonrasında primer antikor uzaklaştırıldı ve sonra sekonder antikor (alexa-fluor) 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında sekonder antikor ortamdaki uzaklaştırıldı ve floresan mikroskopta görüntüler alındı.

IV. BULGULAR

IV.1. FOXM1 LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerine bağlanış ve ekspresyonlarındaki düzenler.

Çalışmamızda birincil olarak, transkripsiyon faktörü FOXM1'in otofajinin belirteci olarak kabul edilen LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyon mekanizmasında olası rolünün araştırılması amaçlandı. Bu araştırma için yapılan analiz sonuçlarımız aşağıda belirtildi.

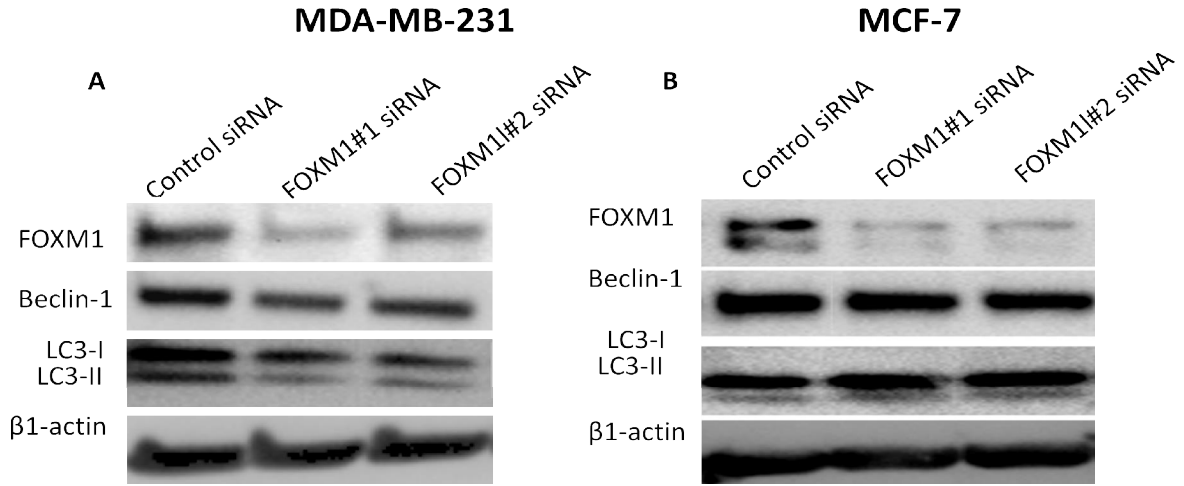
1. FOXM1 MDA-MB-231 hücrelerinde otofajinin belirteci olan LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarındaki düzenler.

FOXM1'in otofajinin belirteci olan LC3 ve Beclin-1 ekspresyonlarının düzenlenmesinde bir fonksiyonunun olup olmadığını araştırmak için hücreler iki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edildi ve transfeksiyon sonrası western blot analizi yapıldı.

Öncelikle çalışmada kullanılan FOXM1 siRNA'nın hedefi olan FOXM1'in ekspresyonunu baskılayıp baskılamadığını belirlemek için FOXM1 proteinin ekspresyon seviyesi analiz edildi ve kullanılan iki farklı FOXM1 siRNA'nın hem MDA-MB-231 (üçlü reseptör negatif) hem de MCF-7 (ER+) hücrelerinde FOXM1 protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı bulundu (Şekil 5 A,B).

Daha sonra, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen her iki hücre hattında da FOXM1 siRNA'nın LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkisi analiz edildi. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarının baskılandığı bulunurken (Şekil 5A), MCF-7 hücrelerinde, FOXM1 siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarının baskılandığı (Şekil 5B).

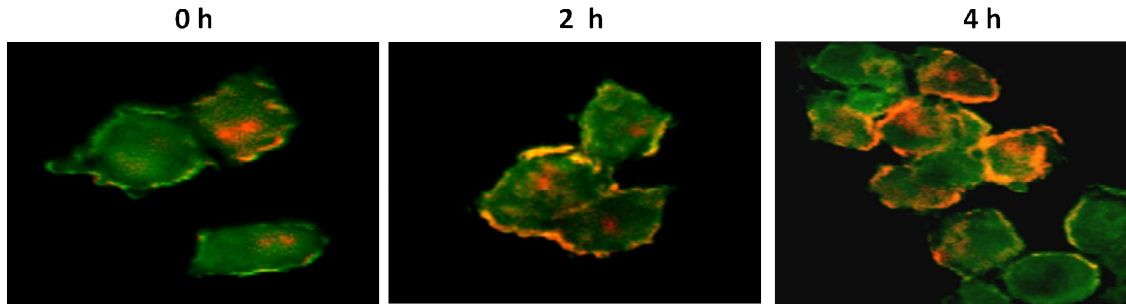
Western blot analiz sonuçlarımız, MDA-MB-231 hücrelerinde otofajinin belirteci olan LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinde FOXM1'in olası bir rolünün olabileceğini gösterdi. Fakat, MCF-7 hücrelerinde LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinde olası bir rolünün olmadığı gösterdi. Bu nedenle FOXM1'in otofajide rolünü araştırmak için bundan sonraki yapılan tüm çalışmalarımızda üçlü reseptör negatif meme kanser hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı.



Ėkil 5. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde FOXM1, LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. İki farklı FOXM1 siRNA MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde FOXM1 protein ekspresyonunu baskıladı (A, B). FOXM1 siRNA MDA-MB-231 hücrelerinde Beclin-1 ve LC3 ekspresyonunu baskıladı (A), MCF-7 hücrelerinde Beclin-1 ve LC3 proteinlerinin ekspresyonlarındaki baskılamadı (B). Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Çalışmamızın bundan sonraki basamağında, FOXM1 siRNA ile otofajinin aktifleştirildiği hücrelerde LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkisi araştırıldı. Bilindiği gibi açlık otofajiyi indükleyici major etkidir. Bu nedenle serum içermeyen kültür ortamında hücreler aç bırakılarak otofajinin tetiklenmesi sağlandı ve daha sonra bu hücrelerde FOXM1 siRNA ile LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarındaki etkisi analiz edildi.

Bu çalışmamıza başlamadan önce, MDA-MB-231 hücreleri farklı zamana aralıklarında aç bırakılarak otofajinin tetiklendiği uygun zaman aralığı akridin oranj boyama yapılarak belirlendi. Sonuçlarımızla göre 4 saat serum içermeyen ortamda aç bırakılan hücrelerde otofajinin önemli seviyede uyarıldığı görüldü (Ėkil 6).



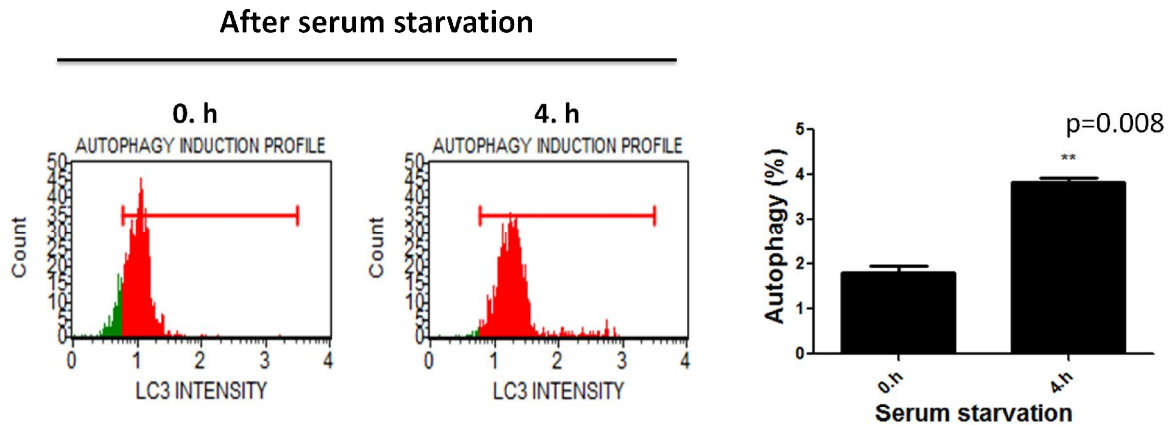
Ėkil 6. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde asidik veziküler oluşumları. MDA-MB-231 hücreleri belirtilen zamanlarda aç bırakıldı ve açlık

ortamında olu an asidik veziküller organelleri (AVO) tespit etmek için akridine oranjile boyandę floresan mikroskopta görüntüledi. AOV miktarę aç kalma zamanına baklę olarak değil kenlik gösterdi. Aęlęın 4.saatinde 0. saate göre AOV sayısında belirgin bir artı tespit edildi. (Akridin oranj ile sitoplazma yei ile boyanęken, asidik veziküller sarıturuncu renge boyanę).

Daha sonra bu sonucumuzu teyit etmek hücreler 4 saat serum içermeyen ortamda aç bırakıldę ve 4 saatlik açlık sonrasında bu hücrelerde otofaji indüklenme oranı muse cihazında LC3 temelli otofaji kiti kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, normal í artlarda inkübe edilen hücrelere kıyasla, 4 saat aç bırakılan hücrelerde otofajinin istatistiksel olarak önemli seviyede tetiklendiği bulundu (Lekil 7).

iki farklı analiz sonuçları, hücreleri 4 saat serum içermeyen ortamda aç bırakmanın otofajinin tetiklenmesi için uygun olduğunu gösterdi. Bundan sonraki yapılan açlık deneylerinde hücreler 4 saat aç bırakıldę ve bu hücreler pozitif kontrol olarak kullanıldę

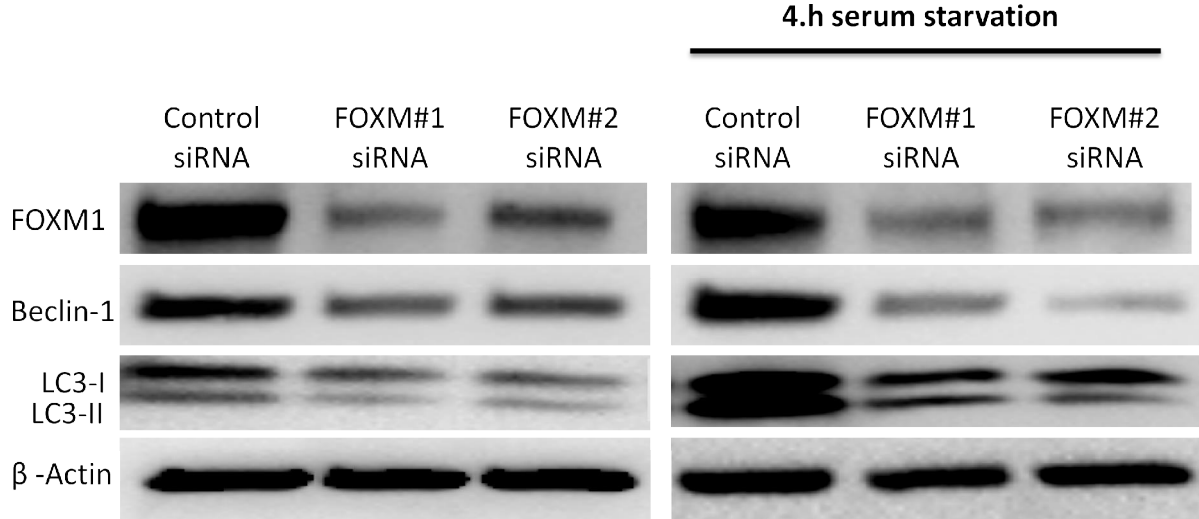
MDA-MB-231



Lekil 7. 4 saat aç bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde otofaji indüklenme oranı Normal í artlarda inkübe edilen hücrelere göre 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilen hücrelerde otofaji önemli seviyede tetiklenir.

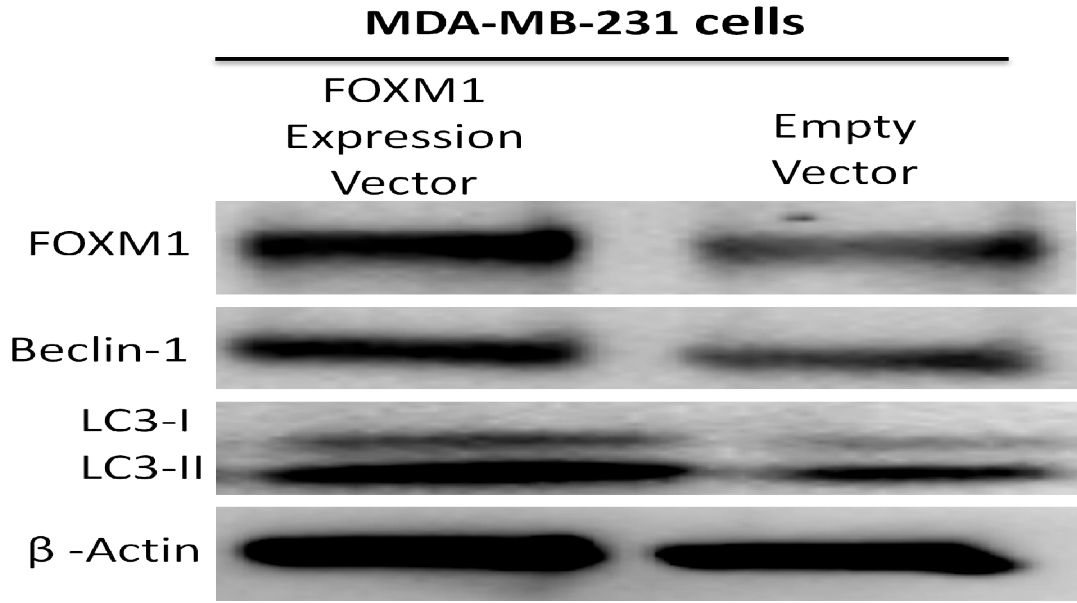
Daha sonra, hücreler kontrol siRNA ve FOXM1 ekspresyonunu baskılamak için FOXM1 siRNA ile 72 saat transfeke edildi. FOXM1 siRNA ile transfeke edilen hücrelerin bir kısmı serum içeren normal kültür í artlarında inkübe edildi. Bir kısmı ise 72 saatlik transfeksiyon sonrasında 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilerek aç bırakıldı. Daha sonra hücrelerden proteinler izole edildi ve western blot analiz yapıldı. Analiz sonuçlarına göre, FOXM1 siRNA ile hem normal í artlarda hem de 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilen hücrelerde, FOXM1 ekspresyonları baskılandığı bulundu (Lekil 8). Bulgularımız

FOXM1 siRNA'nın her iki ortam şartlarında da etkili olduğunu gösterdi. Ayrıca, her iki şartlarda da , hücrelerde FOXM1 siRNA aracılığıyla FOXM1 baskılandığında, otofajinin belirteci olan LC3 ve Beclin-1 proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı bulundu (Şekil 8).



Şekil 8. İki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde bazal ve açlık durumunda FOXM1, LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. Hem normal şartlarda hem de 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilen hücrelerde FOXM1 siRNA transfeksiyonu FOXM1 protein ekspresyonunu inhibe eder. FOXM1 siRNA aracılığıyla FOXM1'in baskılanması LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarını azaltır. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Sonra, hücreler empty vektör ve FOXM1'in hücrelerde ekspresyonunu artırmak için FOXM1 overekspresyon vektörü ile transfekte edildi. 72 saatlik transfeksiyon sonrasında hücrelerden proteinler izole edildi ve western blot analiz yapıldı. Analiz sonuçlarına göre, FOXM1 overekspresyon vektörü ile transfekte edilen hücrelerde empty vektörle transfekte edilen hücrelere göre FOXM1 ekspresyonunun arttığı bulundu (Şekil 9). Ayrıca, overekspresyon vektörü aracılığıyla artmış FOXM1 ekspresyonu LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonunu empty vektörle transfekte edilen hücrelere göre artırdığı bulundu (Şekil 9).

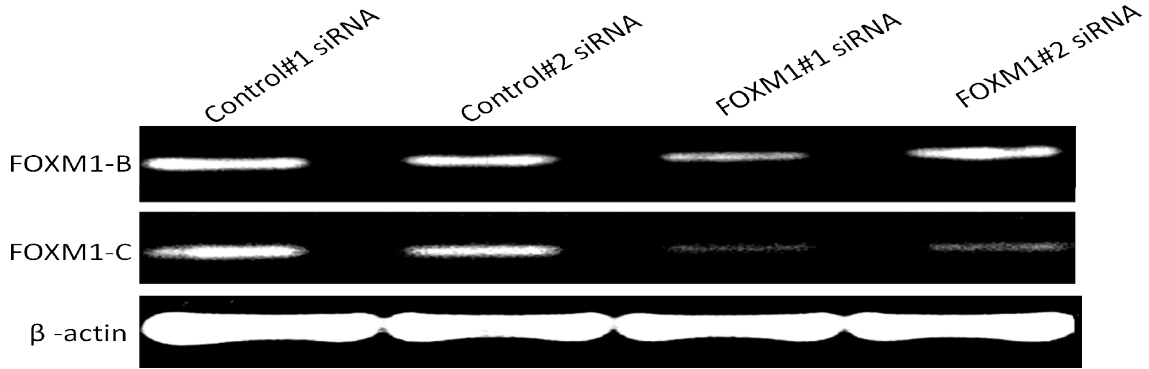


Ėekil 9. FOXM1 overekspresyon vektöşü ve empty vektöşle ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1, LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. FOXM1 overekspresyon vektöş aracılı FOXM1'ın ekspresyonunun artması LC3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyonlarını artırır. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

2. FOXM1 MDA-MB-231 hücrelerinde otofajinin belirteci olan LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyonlarını düzenler.

Transkripsiyondan sonra, FOXM1 mRNA'sının alternatif ilenmeden dolayı 3 farklı izoformu (FOXM1-A, FOXM1-B ve FOXM1-C) bulunmaktadır. Bu üç farklı izoformdan FOXM1-A hücrelerde inaktif halde bulunurken, FOXM1-B ve FOXM1-C aktif halde bulunmaktadır (Lam vd, 2013, ZhangY 2008). Bu nedenle, kullanılan iki farklı FOXM1 siRNA ile, FOXM1 mRNA'sının her iki aktif izoformunun ekspresyonuna etkisini belirlemek için, FOXM1-B ve FOXM1-C izoformuna spesifik primerler kullanılarak revers transkripsiyon PCR (RT-PCR) analiz yapıldı. Kontrol siRNA ile tranfekte edilen hücrelere göre, FOXM1#1 siRNA ve FOXM1#2 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, FOXM1#1 siRNA ile FOXM1-B formunu, FOXM1#2 siRNA ile FOXM1'in her iki izoformunun ekspresyonlarını belirgin bir şekilde baskıladı (Ėekil 10).

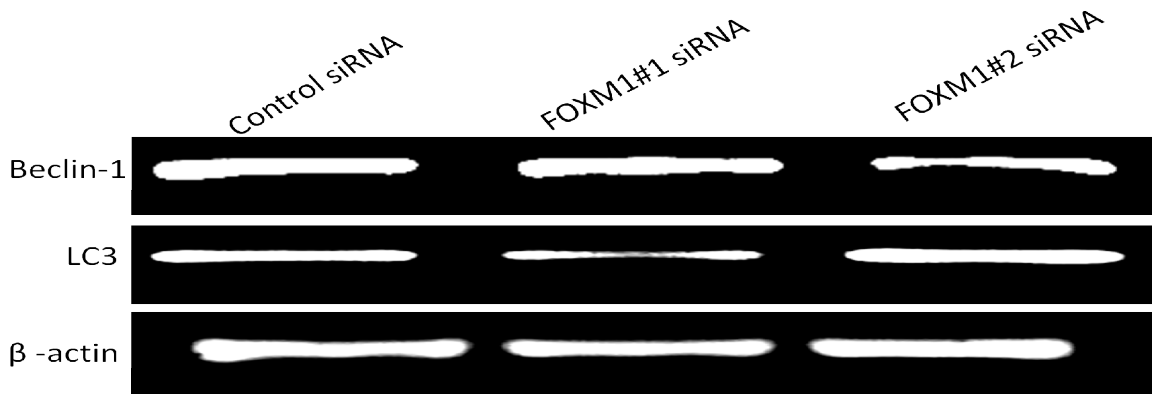
MDA-MB-231



Şekil 10. İki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1-B ve FOXM1-C genlerinin ekspresyon seviyeleri. Kontrol siRNA'ya göre iki farklı FOXM1 siRNA, FOXM1 geninin her iki izoformunun ekspresyonunu baskıladı. FOXM1#1 siRNA FOXM-B izoformunun ekspresyonunu belirgin bir şekilde baskıladı, FOXM1-C izoformunun ekspresyonu iki farklı FOXM1 siRNA tarafından da baskılandı. Beta aktin kontrol olarak kullanıldı.

Daha sonra, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde FOXM1 siRNA'nın LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyonları üzerine etkisi araştırıldı. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri, LC3 ve Beclin-1 genlerine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile amplifiye edildi. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre hem Beclin-1 hem de LC3 genlerinin ekspresyonlarında azalma bulundu (Şekil 11).

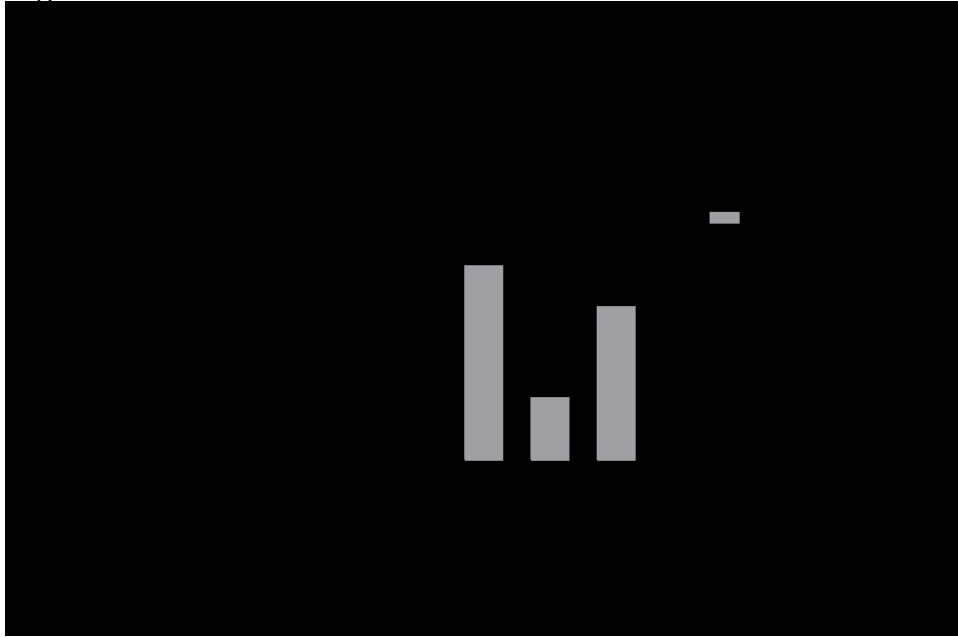
MDA-MB-231



Şekil 11. İki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyon seviyeleri. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, FOXM1 siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyonları baskılandı. Beta aktin kontrol

olarak kullanıldı

FOXM1 siRNA aracılığıyla, LC3B ve Beclin-1 genlerinin ekspresyonlarının revers transkriptaz-PCR analizi sonucu kısmen baskılandığı bulundu (Şekil 11). Bu sonuçların teyit etmek FOXM1 siRNA transfekte edilen hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri spesifik LC3B ve Beclin-1 primerleri kullanılarak real-time-PCR'da amplifiye edildi. Elde edilen veriler delta delta ct metodu kullanılarak hesaplandı ve Beta aktin kullanılarak normalize edildi. Real-Time PCR sonucuna göre, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde, FOXM1 siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunun önemli ölçüde baskılandığı bulundu (Şekil 12).

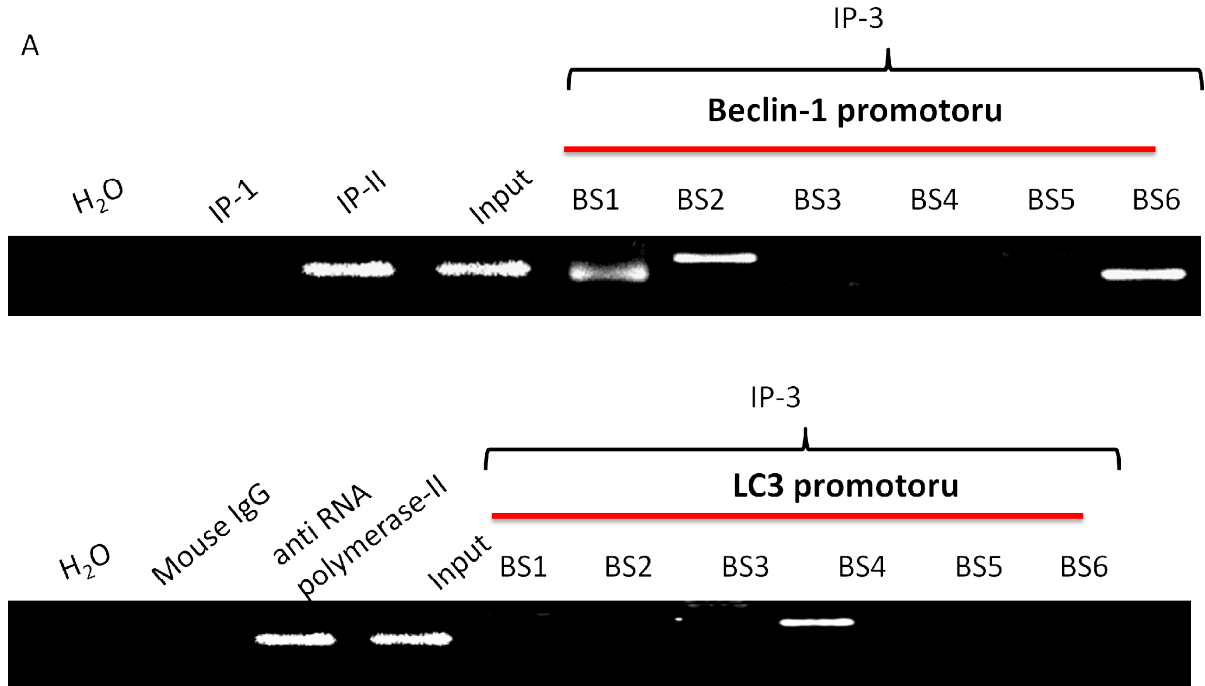


Şekil 12. İki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyon yüzdeleri. MDA-MB-231 hücrelerinde, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyonları önemli ölçüde baskılandı

3. FOXM1 MDA-MB-231 hücrelerinde LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerine bağlanır ve onların transkripsiyonunu düzenler

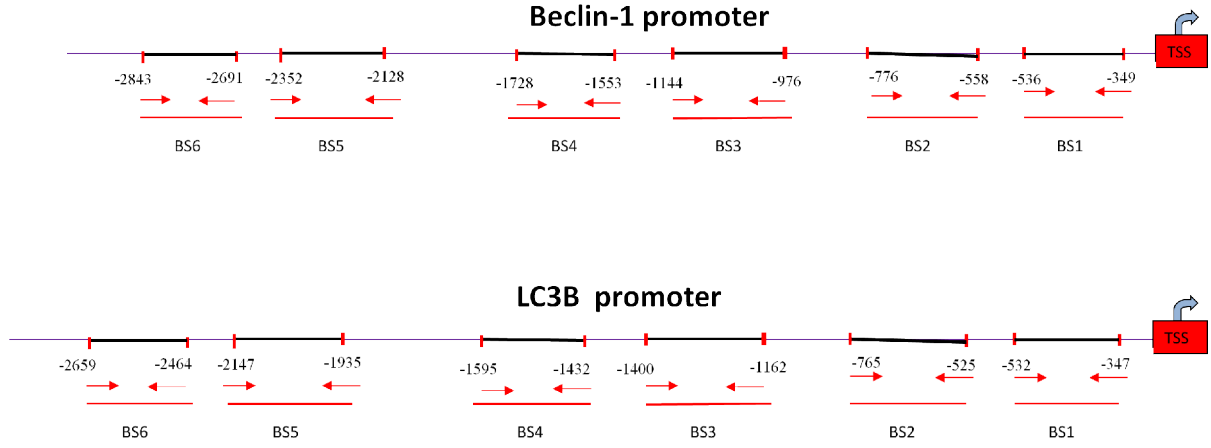
Western blot analiz ve RT-PCR analiz sonuçlarına göre FOXM1 siRNA aracılığıyla FOXM1'in baskılanması LC3 ve Beclin-1 ekspresyonlarını baskıladıkça (Şekil, 5A, 8, 11-12) FOXM1'in over-ekspresyonu LC3 ve Beclin-1 ekspresyonunu artırmaktadır (Şekil 9). Bu bulgularımızdan dolayı FOXM1 ve LC3, Beclin-1 arasındaki bağlantıyı ve FOXM1'in LC3 Beclin-1 genlerinin transkripsiyonel olarak ekspresyonunu düzenleyip düzenlemediğini göstermek için, FOXM1'in bu genlerin promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığı araştırıldı. Bunun için standart CHIP analizi yapıldı. Öncelikle, FOXM1 gen

dizisi ile LC3 ve Beclin-1 promotor bölgelerinin dizileri arasındaki konsensusa the *Align Sequences Nucleotide BLAST program* kullanılarak bakıldı. Hem Beclin-1 hem de LC3 genlerinin belirlenen promotor bölgeleri ile FOXM1 geni arasında konsensus olduğu bulundu (Şekil 3). Sonra, MDA-MB-231 hücrelerinden hazırlanan sonike kromatin, FOXM1 ve RNA polimeraza (pozitif kontrol) özgü antikorlarla ve negatif kontrol olarak normal fare IgG antikorunu ile immün çökeltme yapıldı. immün çökeltimili kromatin ile ilişkili genomik DNA, Gereç ve Yöntemler kısmında açıklandığı üzere, LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotör bölgesine özgü primerler (Tablo 1) kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. anti-FOXM1 antikorunun, BS2, BS6 dizisini ihtiva eden Beclin-1 promotor fragmanları (Şekil 13 A, B) ile BS4 dizisini ihtiva eden LC3 promotor fragmanları çöktürdüğü bulundu (Şekil 13 A). ChIP analiz sonucumuza göre, transkripsiyon faktör FOXM1 Beclin-1 promotorunda iki bölgeye (BS2:-776 -558, BS6:-2843-2691), LC3 promotorunda bir bölgeye (BS4:-1595-1432) bağlandı (Şekil 13 B).



Input: Total DNA, IP-1: mouse IgG (negatif kontrol), IP-2: anti-RNA polimeraz-II (pozitif kontrol), IP-3: anti FOXM1

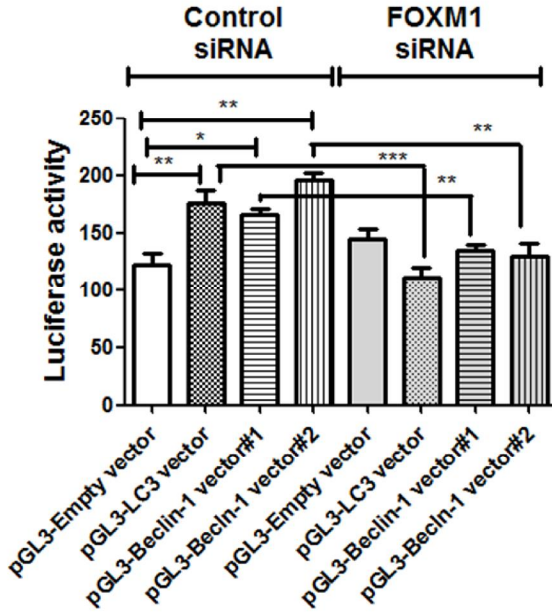
B



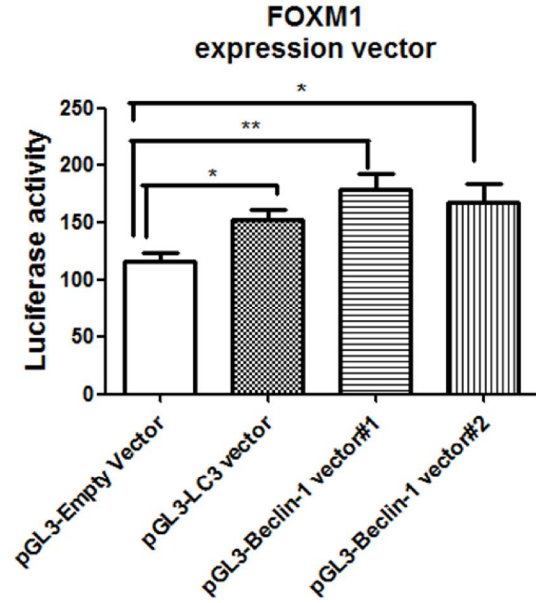
Şekil 13. FOXM1'ın LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerinde bağlandığı diziler. anti-FOXM1 antikoruna, BS2, BS6 dizisini içeren Beclin-1 promotor fragmanına LC3B promotorunda BS4 dizisini içeren fragmanına çöktürdü (A). FOXM1; BS2, BS6 dizisini içeren Beclin-1 promotor bölgesine, LC3B promotorunda BS4 dizisini içeren promotor bölgesine bağlandı (B).

Daha sonra, FOXM1'ın LC3 ve Beclin-1 promotor aktivitesini düzenleyip düzenlemediğini araştırmak için lusiferaz reporter analizi yapıldı. Eş zamanlı olarak, hücreler FOXM1'ı baskılamak için olarak FOXM1 siRNA ve MDA-MB -231 hücrelerinin LC3 ve Beclin-1 promotoruna yerleştirilmiş pGL3 plazmid vektörleri (pGL3-LC3, pGL3-Beclin-1 promotoru içeren plazmid vektörü) ile transfekte edildi. Ters bir şekilde, artmış FOXM1 ekspresyonunun LC3 ve Beclin-1 transkripsiyonu üzerine etkisini test etmek için, eş zamanlı olarak hücreler FOXM1 ekspresyon vektörü ve pGL3-LC3, pGL3-Beclin-1 promotor vektörü ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 40 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinden protein ekstratları hazırlanarak dual-luciferase aktivitesi ölçüldü. Sonuçlara göre, FOXM1 siRNA ile FOXM1'ın baskılanması LC3 ve Beclin-1 promotorlarının aktivitesinin azalmasına (Şekil 14A), FOXM1'ın artan ekspresyonunun LC3 ve Beclin-1 promotorlarının aktivitesinde artışa yol açtığı bulundu (Şekil 14B).

A



B

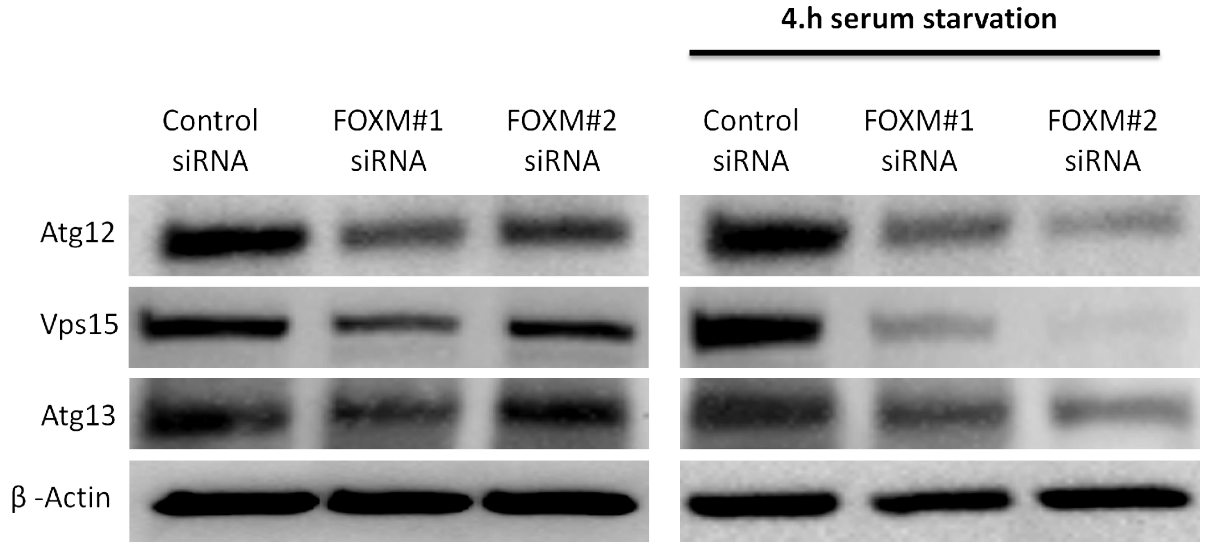


Şekil 14. FOXM1'in LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyonel aktivitesine etkisi. FOXM1 siRNA aracılı FOXM1'in baskılanması LC3 ve Beclin-1 promotorlarının aktivitesini azaltır (A). FOXM1 over-ekspresyonu LC3 ve Beclin-1 promotorlarının aktivitesini artırır (B).

Hem ChIP hem de lusiferaz repoter analiz sonuçlarına göre, transkripsiyon faktörü FOXM1 LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerine bağlanmakta ve bu genlerin aktivasyonunu düzenlemektedir.

4. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde otofaji sinyal yolağında görev alan medyatör proteinlerin ekspresyonları baskılandığında

MDA-MB-231 hücreleri inkübasyonlarının 24. saatinde iki farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edildi. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerin bir kısmı 72 saatlik transfeksiyonun sonunda 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilerek açıldı. Daha sonra hücrelerden proteinler izole edildi ve western blot analiz yapıldı. Analiz sonuçlarına göre, FOXM1 siRNA ile hem normal hücrelerde hem de 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilen hücrelerde, otofajinin farklı basamaklarında görev alan (Şekil 1) ATG12, Vps15, Atg13 proteinlerinin ekspresyonları baskılandığı görüldü (Şekil 15).



Ėekil 15. İki farklı FOXM1 siRNA ile transfecte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde otofajinin ćel İtli basamaklarında görev alan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. FOXM1 siRNA ile transfecte edilen hücrelerde otofajinin medyatörleri olan Atg12, Vps15, Atg13 proteinlerinin ekspresyonları baskılandı ve Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

IV.II.FOXM1 otofajinin düzenlenmesinde rol oynar.

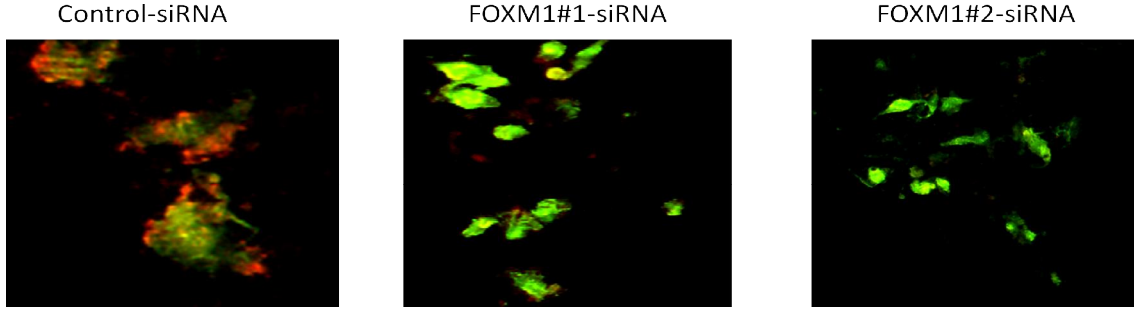
Western blot, RT-PCR, ChIP ve Dual reporter analizlerimizle, FOXM1'ın otofajinin belirteci olan LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerine bağlandığını ve aktivitelerini düzenlediğini gösterildi. Daha sonra FOXM1'ın hücresel düzeyde otofajik aktivitedeki (otofajik veziküllerin) rolünü analiz etmek için deneyler yapıldı ve elde edilen verilerimiz aşağıda belirtildi.

1. FOXM1 siRNA ile transfecte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde asidik veziküler oluğ umlar azaldı

MDA-MB-231 hücreleri inkübasyonun 24. saatinde kontrol siRNA ve iki farklı FOXM1 siRNA ile transfecte edildi. 72 saatlik transfectasyondan sonra hücreler 4 saat serum içermeyen medyum içerisinde aç bırakıldı. Otofajinin tetiklenmesi sırasında açlık süresi tamamlanırken, hücreler Akridin oranj ile boyandı ve floresan mikroskopta görüntüleri alındı. Kontrol siRNA ile transfecte edilen hücrelerde fazlaca asidik veziküler oluğ umlar tespit edilirken, iki farklı FOXM1 siRNA ile transfecte edilen hücrelerde çok az asidik veziküler oluğ umlar gözlemlendi (Ėekil 16).

MDA-MB-231

4 h. serum starvation

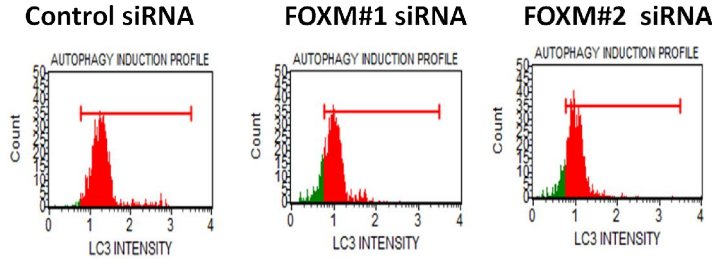


Ėekil 16. İki farklı FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde asidik veziküler olu   umlar. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde belirgin oranda otofajik veziküller olu   umlar tespit edilirken, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde çok az otofajik veziküller olu   umlar gözlendi. (Akridin oranj ile sitoplazma ye   ile boyan  ken, asidik veziküller sar  turuncu renge boyan  ).

2. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde otofaji ind  klenme oran   azaldı

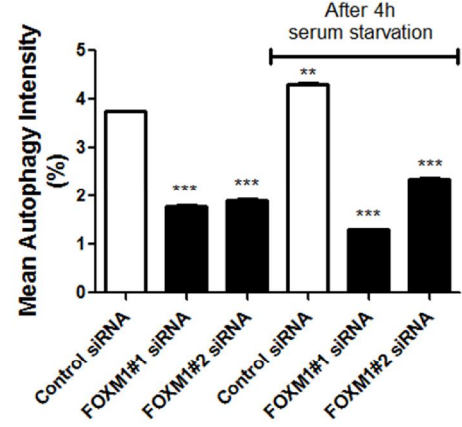
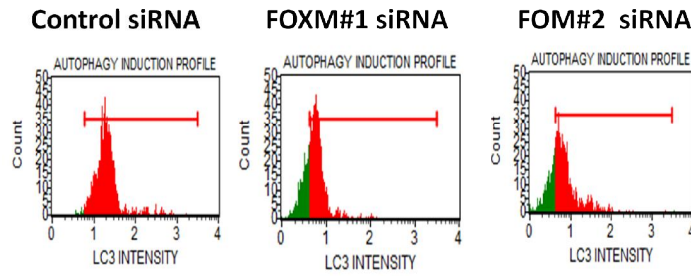
MDA-MB-231 hücreleri ink  basyonlan  n   24. saatinde, son konsantrasyonu 50 nM olacak Ėekilde FOXM1 siRNA (FOXM1#1 ve FOXM1#2 siRNA) ve kontrol siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra, hücrelerin bir kısmı 4 saat serum içermeyen ortamda a   b  rak  ld  . Daha sonra her iki ortamda da inkübe edilen hücrelerde otofaji ind  klenme oran   analiz edildi (Muse Autophagy (LC3 detection) kiti kullanılarak akın sitometride). Analiz sonuçlarına göre, bazal seviyede kontrol siRNA ile transfekte edilen h  crelerle kar  la  la  r  ld  nda, iki farklı FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofaji ind  klenme oran   önemli seviyede azaldı bulundu (Ėekil 17A). Ağla otofajinin aktive olduğu hücrelerde, artm   otofajik aktiviteyi FOXM1 siRNA ile baskılayıp bask  lamad  n   test etmek için yapt  n     al  mam  zda da, otofaji artmasına rağmen, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofaji ind  klenme oran   önemli seviyede azaldı bulundu (Ėekil 17B).

A



B

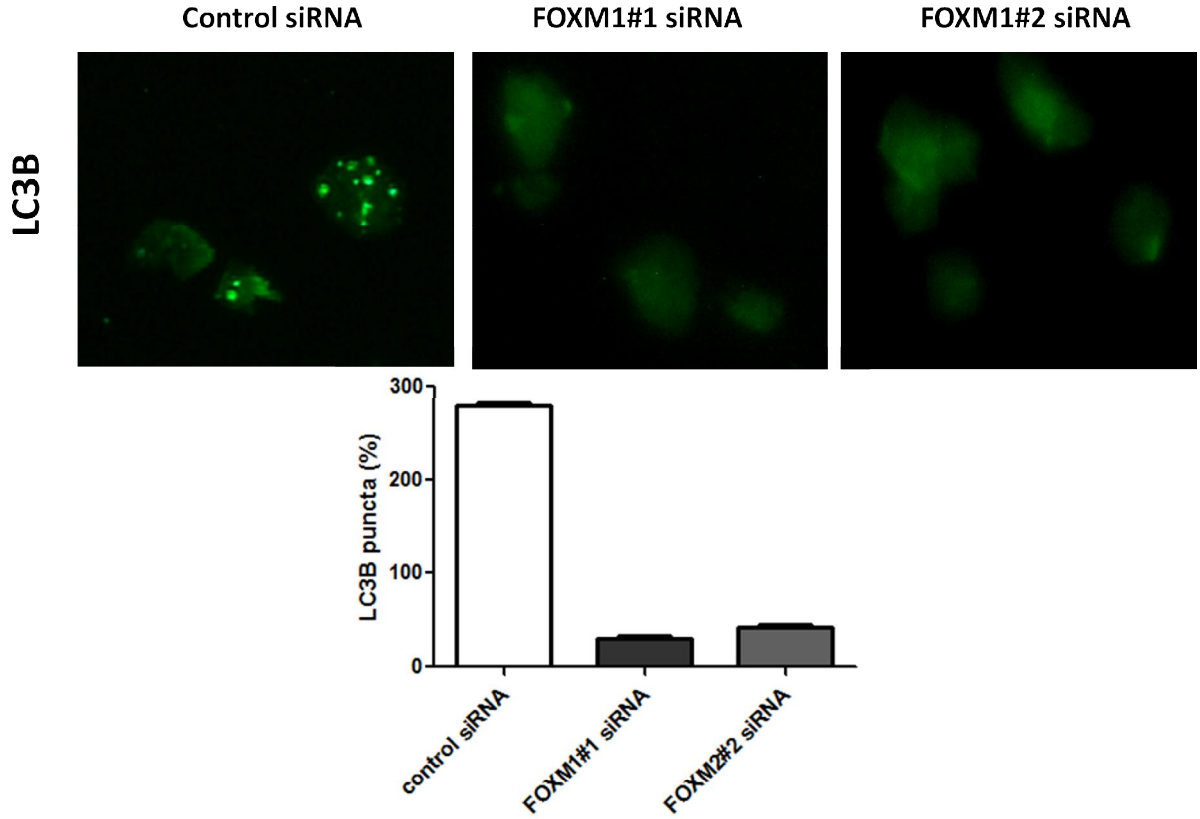
4.h serum starvation



Éekil 17. İki farklı FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde otofaji indüklenme oranı Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler göre, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde hem bazal seviyede (A) hem de 4 saatlik açlık sonrasında (B) otofaji indüklenme oranı azaldı

3. FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde LC3'ün sitoplazmik dağılımı azaldı

MDA-MB-231 hücreleri inkübasyonlarının 24. saatinde 2 farklı FOXM1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde otofajiyi tetiklemek için 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilerek, hücrelerin aç kalmaları sağlandı. Daha sonra bu hücrelerde immüno floresans (IF) boyama yapılarak LC3 proteinin sitoplazmik dağılımı floresan mikroskopta analiz edildi. Analiz sonucumuza göre, FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, LC3 proteinin sitoplazmik dağılımının belirgin bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Éekil 18).



Ėekil 18. İki farklı FOXM1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde sitoplazmik LC3 proteinin dağılımı FOXM1 siRNA (FOXM1#1, FOXM1#2 siRNA) ve kontrol siRNA transfekte edilen hücrelerde immün floresan boyama ile LC3B'nin sitoplazmik dağılımı karşılaştırmada iki farklı FOXM1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3B'nin sitoplazmik dağılımı kontrol siRNA transfekte edilen hücrelere göre önemli seviyede azaldı

Bulguların tümü hem hücresel seviyede hemde moleküler seviyede FOXM1'in otofajide rol oynadığını gösterdi.

IV.III. Otofaji agresif meme kanser hücrelerinin (MDA-MB-231) kanserojenik özellikler kazanmasında rol oynar

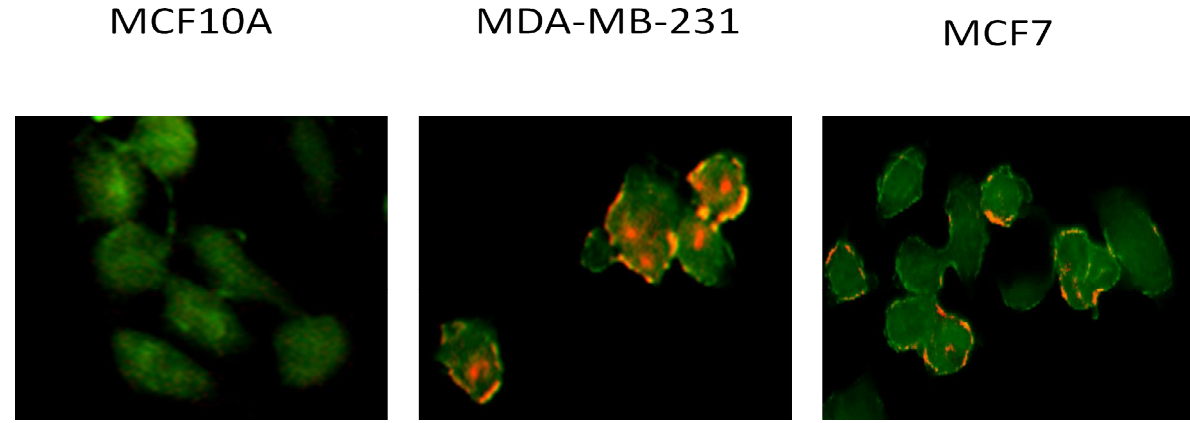
Çalışmamızda ikincil olarak, otofajinin meme kanser hücrelerinin kanserojenik özellikleri üzerine (proliferasyon, migrasyon, invazyon) etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu amaç için literatüre göre; otofajide önemli rol oynayan LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 genleri, bu genleri hedef alan siRNA'larla baskılandı ve bu genler baskılandığında meme kanser hücrelerinin kanserojenik özelliklerindeki (klonojik, migrasyon, invazyon ve apoptoza direnç) değişiklikler analiz edildi.

1. MDA-MB-231 hücreleri MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine göre daha fazla otofajik aktiviteye sahiptir.

Çalışmamıza başlamadan önce iki farklı meme kanser hücrelerinde ve normal epitel

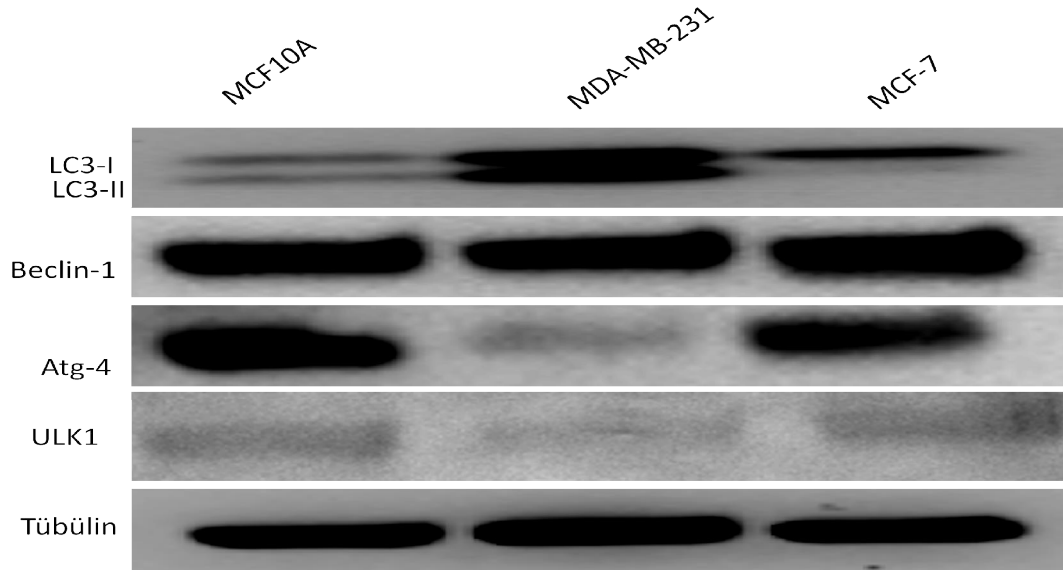
hücrelerinde hem akridin oranj boyama ile hemde westen blot analizi ile bazal otofaji seviyesi belirlendi.

İlk olarak, üçlü-reseptör negatif (TNBC) meme kanser hücre hattı olan MDA-MB-231, östrojen reseptör pozitif (ER+) meme kanser hücre hattı olan MCF7 ve tümöröjenik olmayan normal meme hücre hattı olan MCF10A hücrelerinde bazal seviyede asidik veziküllerin (AVO) oluşumunu belirlemek için akridin oranj boyama yapıldı. Akridin oranj boyama sonuçlarına göre, bazal seviyede MDA-MB-231 hücrelerinde AVO daha fazla, MCF-7 ve MCF10A hücrelerine göre daha fazla olduğu bulundu (Şekil 19).



Şekil 19. MDA- MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde bazal seviyede asidik veziküller oluşumları. MDA-MB-231 hücreleri bazal seviyede, MCF-7 ve MCF10 hücrelerine göre çok daha fazla otofajik aktiviteye sahiptir.

Daha sonra, MDA-MB-231, MCF-7 and MCF10A hücrelerinde otofajide önemli rol oynayan LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 proteinlerinin bazal seviyede ekspresyonları western blot analiziyle belirlendi. Analiz sonuçlarına göre LC3 protein ekspresyonu bazal seviyede MDA-MB-231 hücrelerinde yüksek olduğu bulunurken, Beclin-1 ekspresyonu normal epitel hücre olan MCF10A hücreleri ile MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde benzer (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmamış), Atg-4 ve ULK1 proteinlerinin ekspresyonları bazal düzeyde MCF10A ve MCF-7 hücrelerinde yüksek bulundu (Şekil 20).

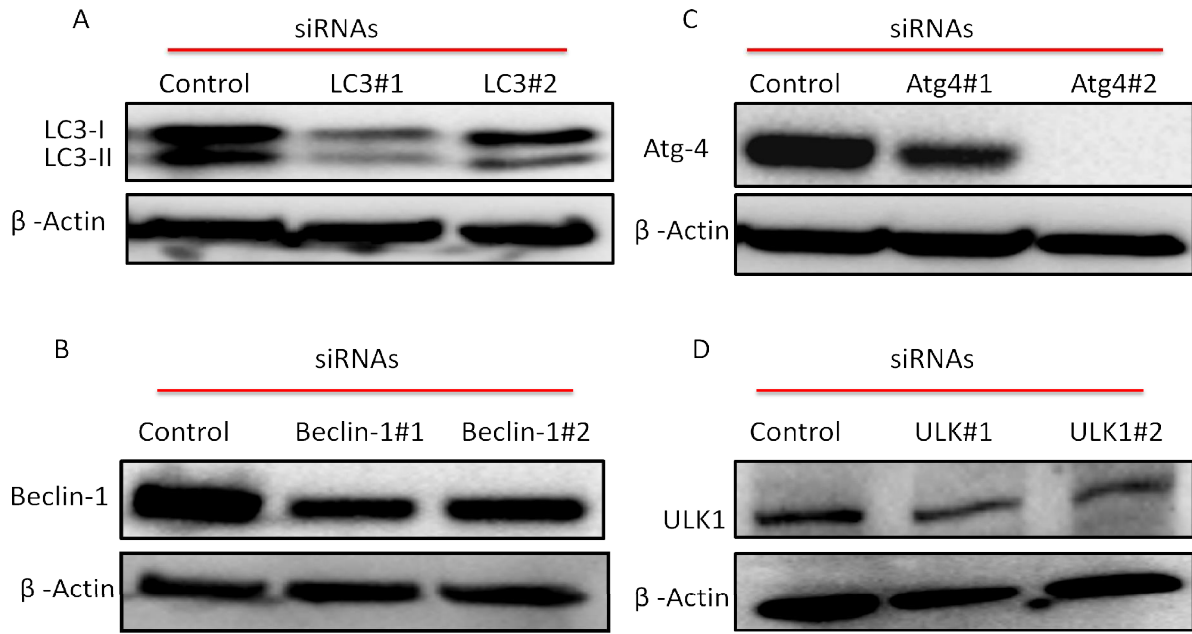


Şekil 20. MDA- MB-231, MCF-7 ve MCF10A hücrelerinde bazal seviyede LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 proteinlerinin ekspresyonları Bazal seviyede LC3 protein ekspresyonu MDA-MD-231 hücrelerinde fazla, Beclin-1 ekspresyonu MCF10A hücreleri ile MCF-7 ve MDA-MD-231 hücrelerinde benzer, Atg-4 ve ULK1 proteinlerinin ekspresyonları MCF10A ve MCF-7 hücrelerinde yüksek bulunur. Tübülin yükleme kontrolü olarak kullanıldı

Otofaji uyarıldığında zaman, sitozolik LC3-I ile fosofotidiletanolamin (PE) eklenir ve LC3, LC3-I formundan LC3-II formuna dönüşür ve otofagozomun membranına bağlanır. Dolayısıyla, LC3-II ekspresyonunun yüksek olması ile indüklenmiş otofaji arasında bir ilişki vardır (Lee vd, 2016). Şekil 20'de görüldüğü gibi, MDA-MB-231 hücrelerinde LC3-II ekspresyonunun, MCF-7 ve MCF10A hücrelerine göre belirgin bir şekilde yüksek bulundu. Dolayısıyla farklı analiz sonuçları MDA-MB-231 hücrelerinin bazal seviyede en yüksek otofajik aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Bu nedenle yaptığımız diğer deneylerde MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı

2. MDA-MB-231 hücrelerinde LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 genlerinin ekspresyonları bu genleri hedef alan siRNA'lar aracılığıyla baskılandı

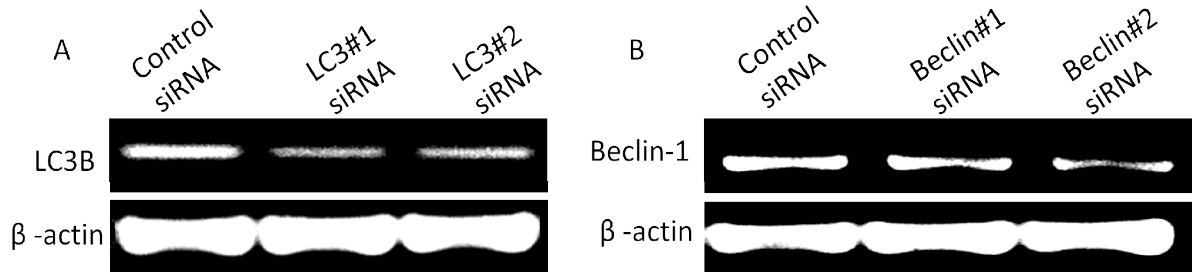
Öncelikle çalışmamızda kullanılacak olan siRNA'ların hedefleri olan LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 ekspresyonlarını baskılayıp baskılamadığını belirlemek için hücreler bu siRNA'larla 72 saat transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında hücrelerden proteinler izole edilerek western blot analizi yapıldı. İki farklı LC3 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ekspresyonunun (Şekil 21A), iki farklı Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde Beclin-1 ekspresyonunun (Şekil 21B), iki farklı Atg4 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde Atg4 ekspresyonunun (Şekil 21C), iki farklı ULK1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde ULK1 ekspresyonunun (Şekil 21D) kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre azaldığı bulundu.



Şekil 21. LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde bu siRNA'ların hedef aldıkları genlerin ürünü olan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 siRNA'lar kendi hedefleri olan genlerin ürünü olan proteinlerin ekspresyonlarını baskıladı. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Daha sonra, LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri, LC3 ve Beclin-1 genlerine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile amplifiye edildi. LC3 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 geninin ekspresyonunda (Şekil 22A) ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde Beclin-1 geninin ekspresyonunda (Şekil 22B) kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre azalma bulundu (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmaktadır).

MDA-MB-231

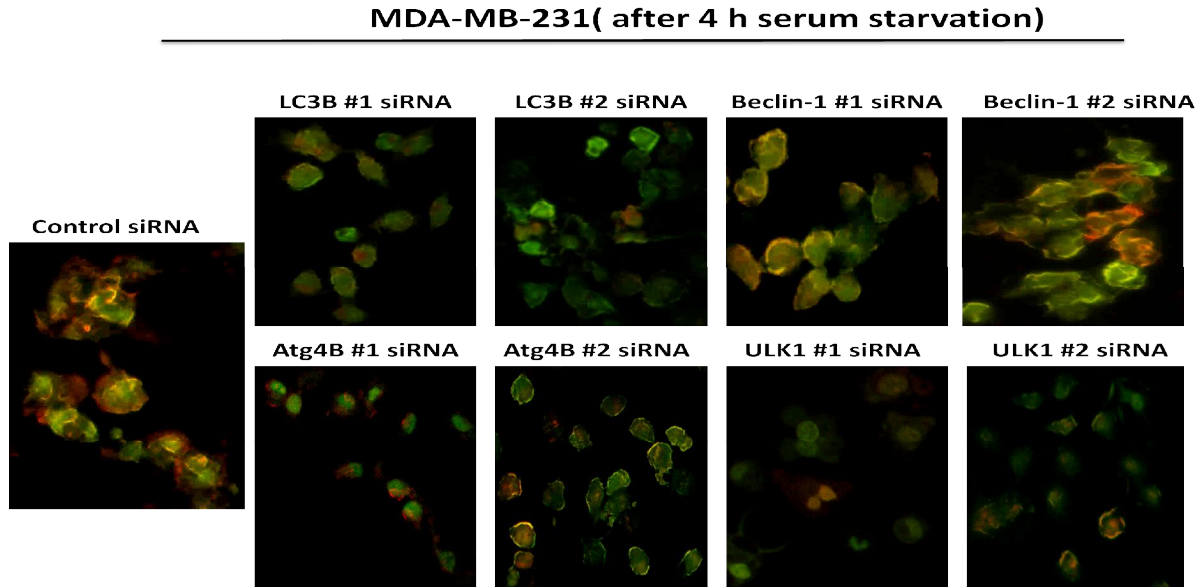


Şekil 22. LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 ve Beclin-1 genlerinin ekspresyon seviyeleri. LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3, Beclin-1 siRNA'lar kendi hedefleri olan genlerin ekspresyonlarını baskıladı. Beta aktin

yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4. LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlarla transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde asidik veziküler oluú umlar azaldı

LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlarla transfeke edilen hücrelerde otofajinin (asidik veziküler oluú umları) baskılanıp baskılanmadığını kontrol etmek amacıyla, bu siRNAlarla transfeke edilen hücrelerde, transfeksiyon sonrasında akridin oranla boyama yapıldı ve floresan mikroskopta otofajik veziküller oluú umları analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, kontrol siRNA ile transfeke edilen hücrelerde yoğun bir biçimde asidik veziküler oluú umları tespit edilirken, LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNA ile transfeke edilen hücrelerde asidik vezikülerin oluú umunda belirgin bir şekilde azalma tespit edildi (Şekil 23).

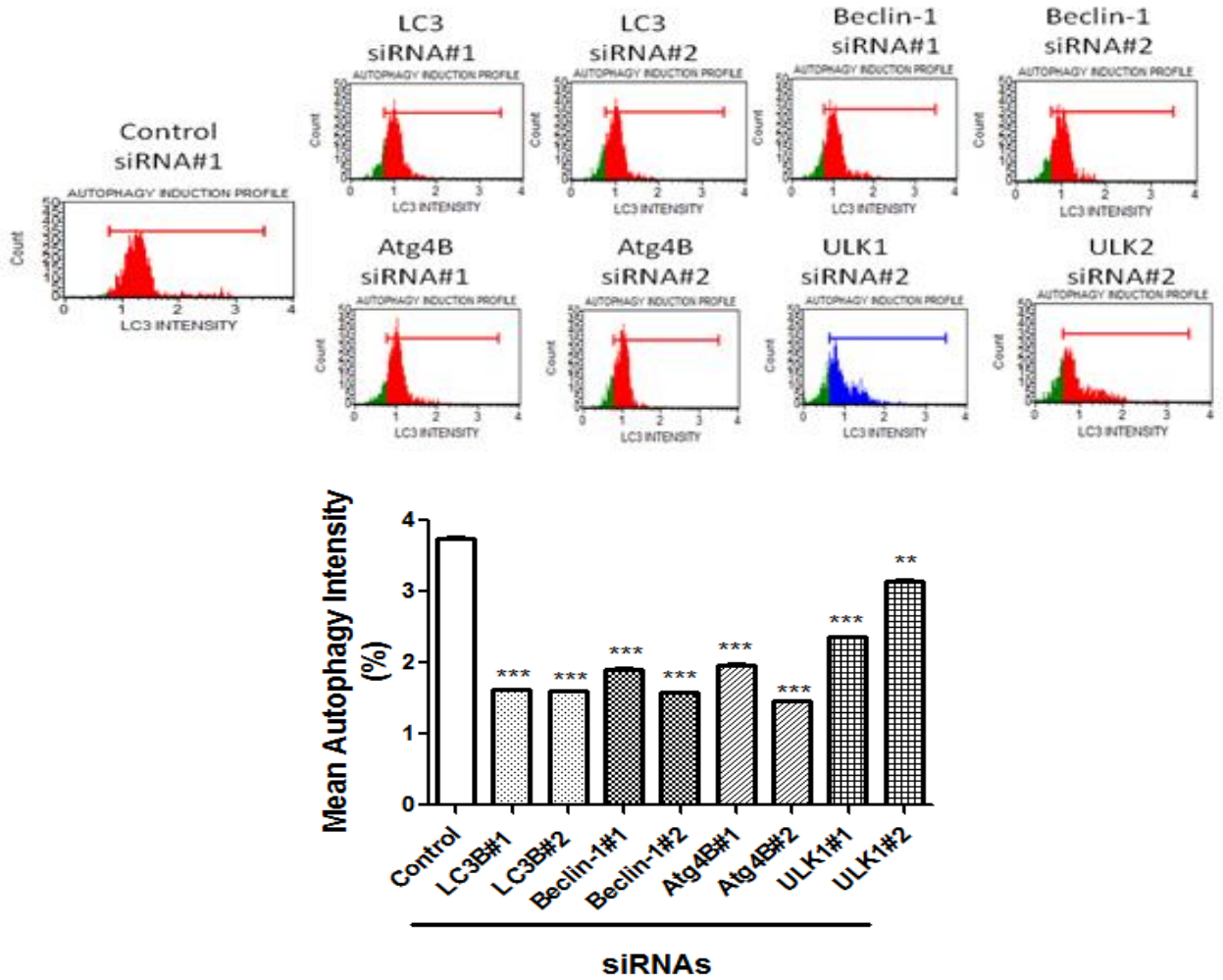


Şekil 23. LC3, Beclin-, Atg4 ve ULK1 siRNAlarla transfeke edilen hücrelerde asidik veziküler oluú umları. LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlarla transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde asidik veziküler oluú umları azaldı

5. LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlarla transfeke edilen hücrelerde otofaji indüklenme oranı azaldı

Akridin oran asidik yapıdaki otofajik veziküllerin yanı sıra, lizozom, endozom gibi diğer asidik vezikülleri de boyamaktadır. Bu nedenle, akridin oran boyama sonuçlarının farklı bir yöntemle teyit etmek için flov sitometri ile otofaji analizi yapıldı. Bunun için hücreler kontrol siRNA ve LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNA ile transfeke edildi ve transfeksiyon sonrasında akın sitometriyle bazal seviyede otofaji indüklenme oranı ölçüldü. LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNA ile transfeke edilen hücrelerde transfeksiyondan sonra, bazal seviyede otofaji indüklenme oranının kontrol siRNA ile transfeke edilen hücrelere göre önemli oranda

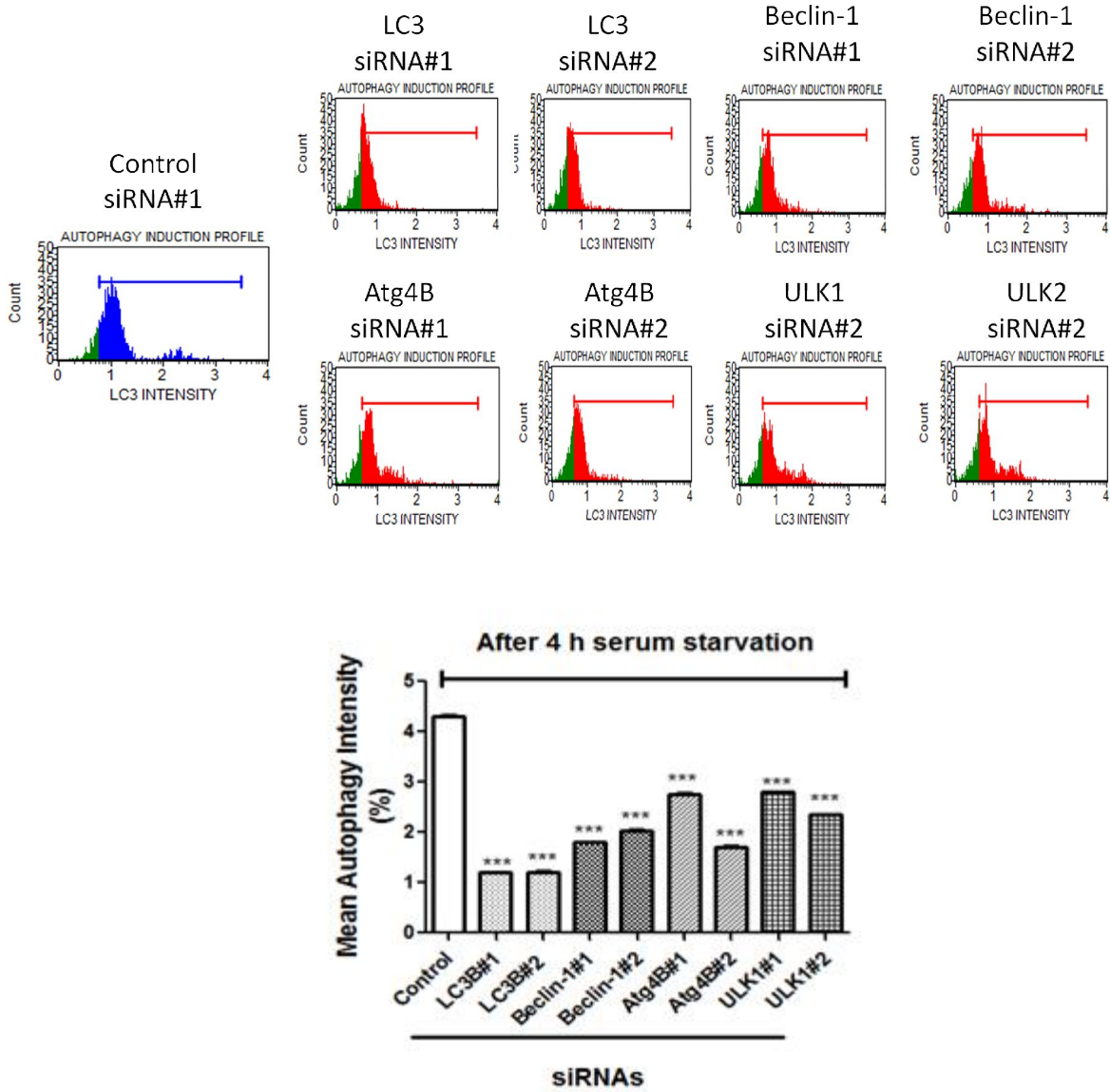
baskı altında bulundu (Şekil 24).



Şekil 24. LC3, Beclin-, Atg4 ve ULK1 siRNAlarla transfekte edilen hücrelerde otofaji indüklenme oranı LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlar ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde bazal seviyede otofaji indüklenme oranı önemli seviyede azaldı

Daha sonra, MDA-MB-231 hücreleri inkübasyonun 24. saatinde son konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde kontrol siRNA ve LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlar ile transfekte edildi. Transfeksiyonların 72. saatinde ortamdaki medyum uzaklaştırılarak serum içermeyen ortamda 4 saat inkübe edildi ve otofajinin tetiklenmesi sağlandı. İnkübasyon sonrasında, serum içermeyen ortamda aç bırakılan hücrelerde LC3 temelli otofaji kiti kullanılarak akış sitometride otofaji indüklenme oranı analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNA ile transfekte edilen hücrelerde transfeksiyondan sonra, otofajik aktivitenin arttığı hücrelerde bile otofaji indüklenme oranının kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre önemli oranda baskı altında bulundu (Şekil 25).

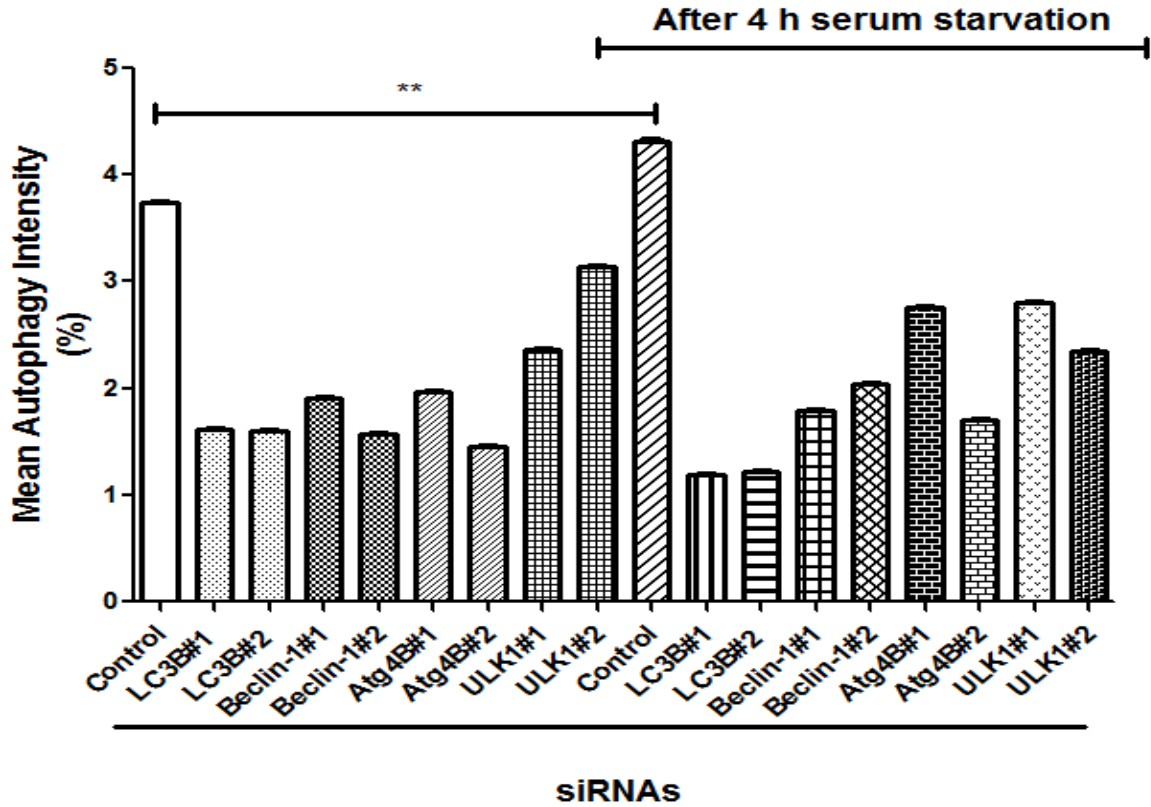
After 4h serum starvation



Şekil 25. Otofajik aktivitenin arttığı hücrelerde LC3, Beclin-1, ULK1 ve Atg4B siRNA'ların otofaji indüklenme oranına etkisi. Açıkla otofajinin tetiklendiği MDA-MB-231 hücrelerinde LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNA'ların artmış otofajik aktiviteyi baskılamadığı

Bazal seviyede yani otofajik aktivitenin daha az olduğu hücrelerde LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNA'ların aracılığıyla otofaji indüklenme oranı önemli seviyede azaldığı bulundu (Şekil 24, 26). Ancak, kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak, sürekli olarak çoğaldıkları için normal hücrelerden daha fazla besine ihtiyaç duyarlar ve özellikle de agresif ve hızlı büyüyen tümör hücreleri çok ciddi besin eksikliğine maruz kalırlar. Bu yüzden, çalışmamızda, MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik aktivite arttığı zaman kullanılan bu siRNA'ların artmış otofajik aktiviteyi baskılamadığı test edildi. Açıkla ve kontrol siRNA ile transfekte

edilen hücrelerde, normal şartlarda indüklenen ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre otofajik aktivitenin arttığı bulundu (Şekil 26). Sonuçlarımız, LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAların aç kalan hücrelerde de artmış otofajik aktiviteyi bastırdığını gösterdi (Şekil 25, 26) (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmasında) Dolayısıyla, çalışmamızın verilerimiz, otofajiyi baskılamak için seçtiğimiz LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAların iki farklı ortamda da otofaji indüklenme oranını baskılamak için uygun siRNAlar olduğunu gösterdi.

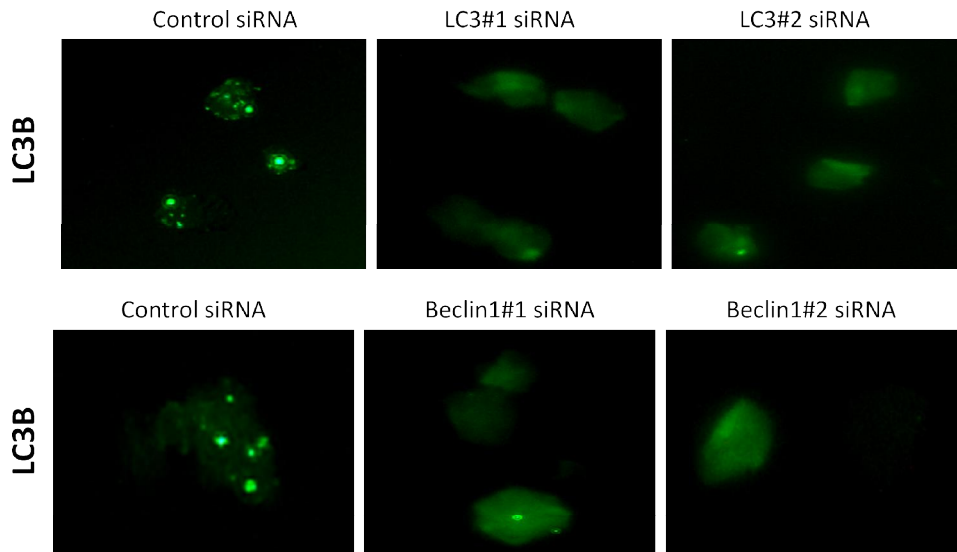


Şekil 26. Hem bazal seviye de hem de otofajinin indüklendiği hücrelerde LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAların otofajik aktiviteye etkisi. Normal şartlarda indüklenen ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, aç bırakılan ve kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofajik aktivite artar. LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNAlar hem bazal seviyedeki hemde 4 saatlik açlık sonrasında tetiklenen artmış otofajik aktiviteyi inhibe eder.

6. LC3 ve Beclin-1 siRNAlarla transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde LC3 proteinin sitoplazmik dağılımı

LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde transfeksiyondan sonra otofajin en önemli belirteci olan LC3 proteinin sitoplazmik dağılımını araştırmak için immüno floresan boyama yapıldı. Sonuçlarımızla göre, LC3 ve Beclin-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 proteininin sitoplazmik dağılımı kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre,

belirgin bir şekilde azaldığı bulundu (Şekil 27) (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmamış)



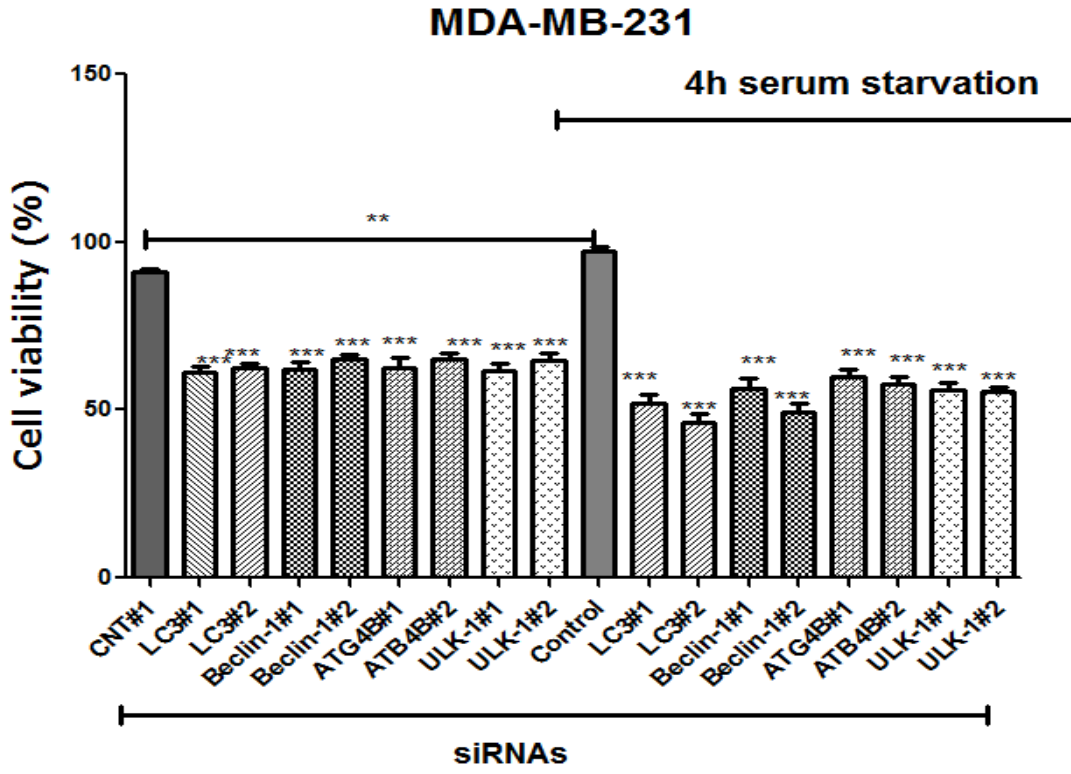
Şekil 27. LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde sitoplazmik LC3 proteininin dağılımı Kontrol siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerine göre, LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfeke edilen hücrelerde LC3ün sitoplazmik dağılımı azaldı

Akridin oranj boyama, flov sitometri ve immüno floresan deneylerimizle , seçtiğimiz LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde otofajik aktivitenin baskılandığı bulundu. Bu sonuçlarımızdan sonra, çalışmamızın ikincil amacı olan kanser hücrelerinin kanserojenik özelliklerinde otofajinin rolünü araştırmak için bu siRNA ile transfeke edilmiş hücreler kullanılarak bir sonraki deneylerimiz yapıldı ve analiz sonuçlarımız aşağıda belirtildi.

7. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu ve klon oluşumunu baskıladı

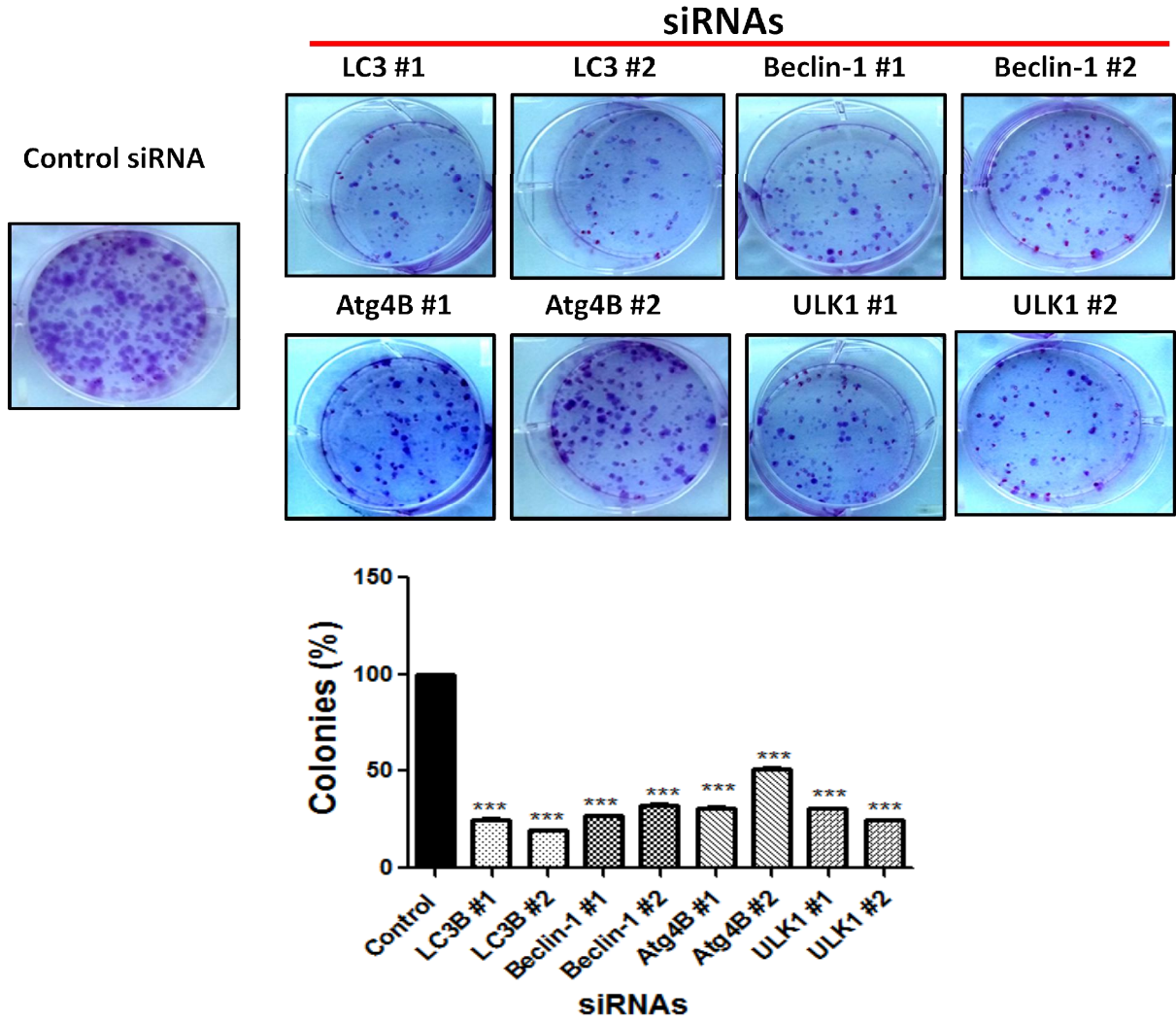
MDA-MB-231 hücreleri inkübasyonun 24. saatinde LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA ile transfeke edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde hücrelerin bir kısmı 4 saat serum içermeyen ortamda bırakılarak inkübe edildi. inkübasyondan sonra hem normal şartlarda inkübe edilen hem de aç bırakılan hücrelerde MTS (hücre canlılığı/proliferasyonu gösteren analiz) analizi yapıldı. Analiz sonucunda normal şartlarda inkübe edilen hücrelerde; kontrol siRNA ile transfeke edilen hücrelere göre, LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA ile transfeke edilen hücrelerde hücre canlılığı/proliferasyonunun istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı bulundu (Şekil 28). Aç bırakılan hücrelerde de kontrol siRNA ile transfeke edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA ile transfeke edilen hücrelerde 4 saatlik açlık sonrasında hücre canlılığı belirgin bir şekilde azaldığı bulundu (Şekil 28). Ayrıca, kontrol siRNA ile transfeke edilen hücrelerde 4 saatlik açlık

sonrasında, 28. Şekil 28'de görüldüğü gibi aç bırakılmayan kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, hücre canlılık oranının arttığı görüldü.



Şekil 28. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık/proliferasyon oranı LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAlar aracılığıyla hem bazal seviyedeki hemde indüklenmiş otofajinin baskılanması MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu/canlılığını inhibe etti.

Çalışmamızın bir sonraki basamağında, otofajinin agresif meme kanser hücrelerinin klon oluşturmada rolünü araştırmak için, MDA-MB-231 hücreleri, inkübasyonlarının 48. saatinde LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAlar ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 12. gününde inkübasyon sonlandırıldı ve hücreler kristal viyole ile boyandı. Boyama sonrasında, LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNAlarla transfekte edilen hücrelerde, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre, klon oluşturma oranının belirgin bir şekilde baskılandığı görüldü (Şekil 29).



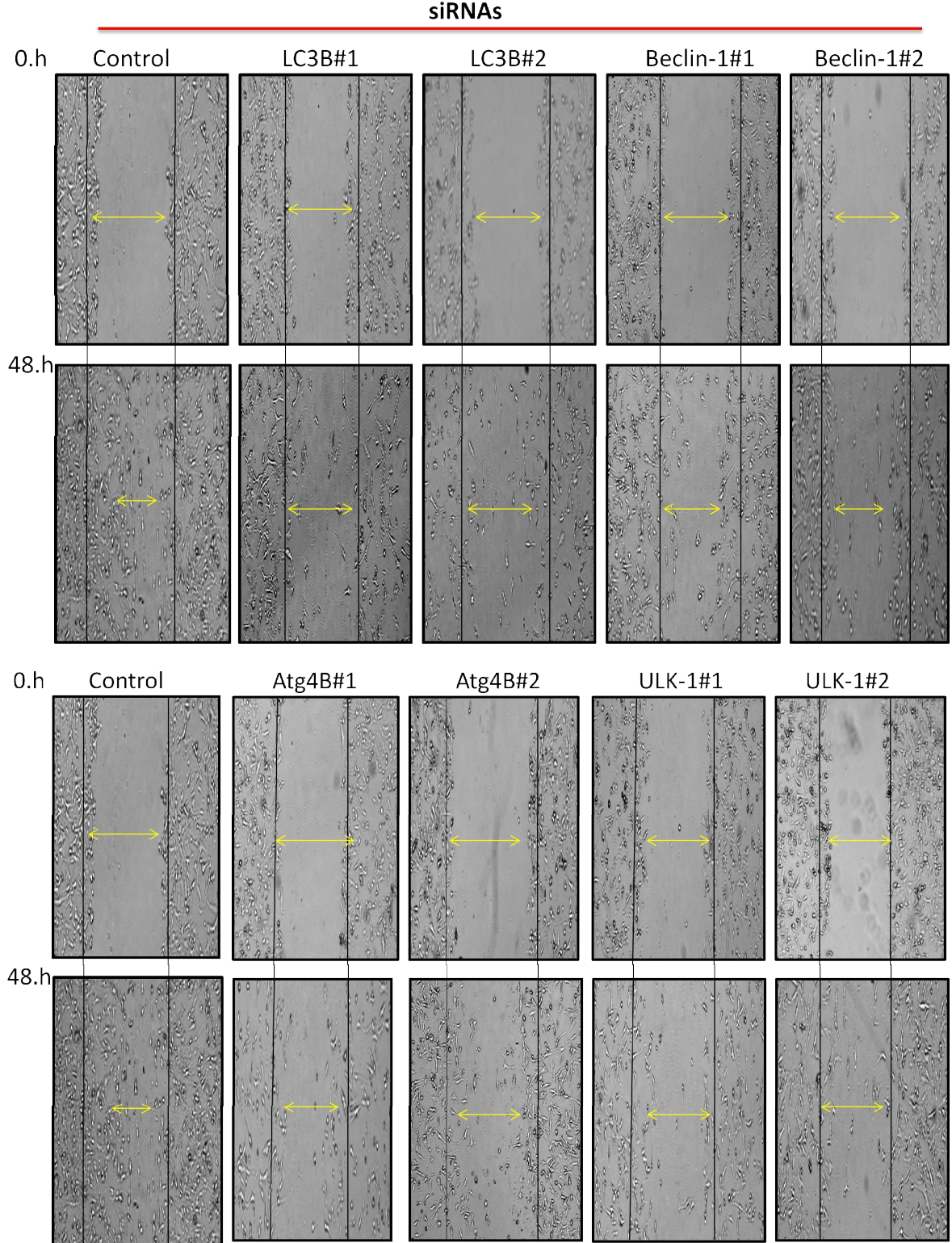
Şekil 29. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA'lar ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde klon oluşı mu. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA'lar aracılığıyla baskılanmış otofaji MDA-MB-231 hücrelerinde klon oluşı muunu inhibe etti.

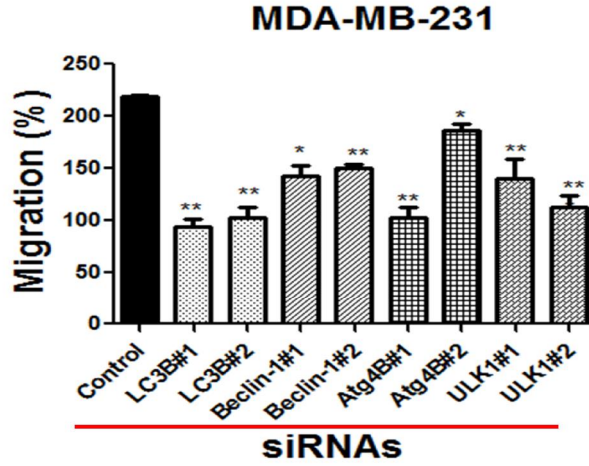
Hem MTS hem de klonojenik assay sonuçları, LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNA'lar aracılığıyla baskılanmış otofajinin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonunu ve klon oluşı mu baskılaması otofajinin bu hücrelerin proliferasyonunda, canlılıkta ve klon oluşı turmasında önemli bir fonksiyona sahip olduğunu gösterdi.

8. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA aracılığıyla baskılanmış otofaji MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonu baskıladı

Yara oluşı turma kanser hücrelerinin migrasyon oranını belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Otofajinin MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonunda olası bir rolünü araştırmak için hücreler kontrol siRNA ile hem de LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNA'larla transfeke edildi ve bu siRNA'lar aracılığıyla otofajinin baskılanması sağlandı. İki adet edilen siRNA'larla ve kontrol

siRNA ile transfekte edilen hücrelerde yara oluşı turularak yaranın kapanma oranına (oluşı turulan boş luğa doğru göç eden hücre sayısına göre) göre migrasyon analizi yapıldı. Analiz sonucuna göre, LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNA larla transfekte edilen hücrelerde, oluşı turulan yara ya doğru göç eden hücre sayısı, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre önemli ölçüde azaldı. (Şekil 30).



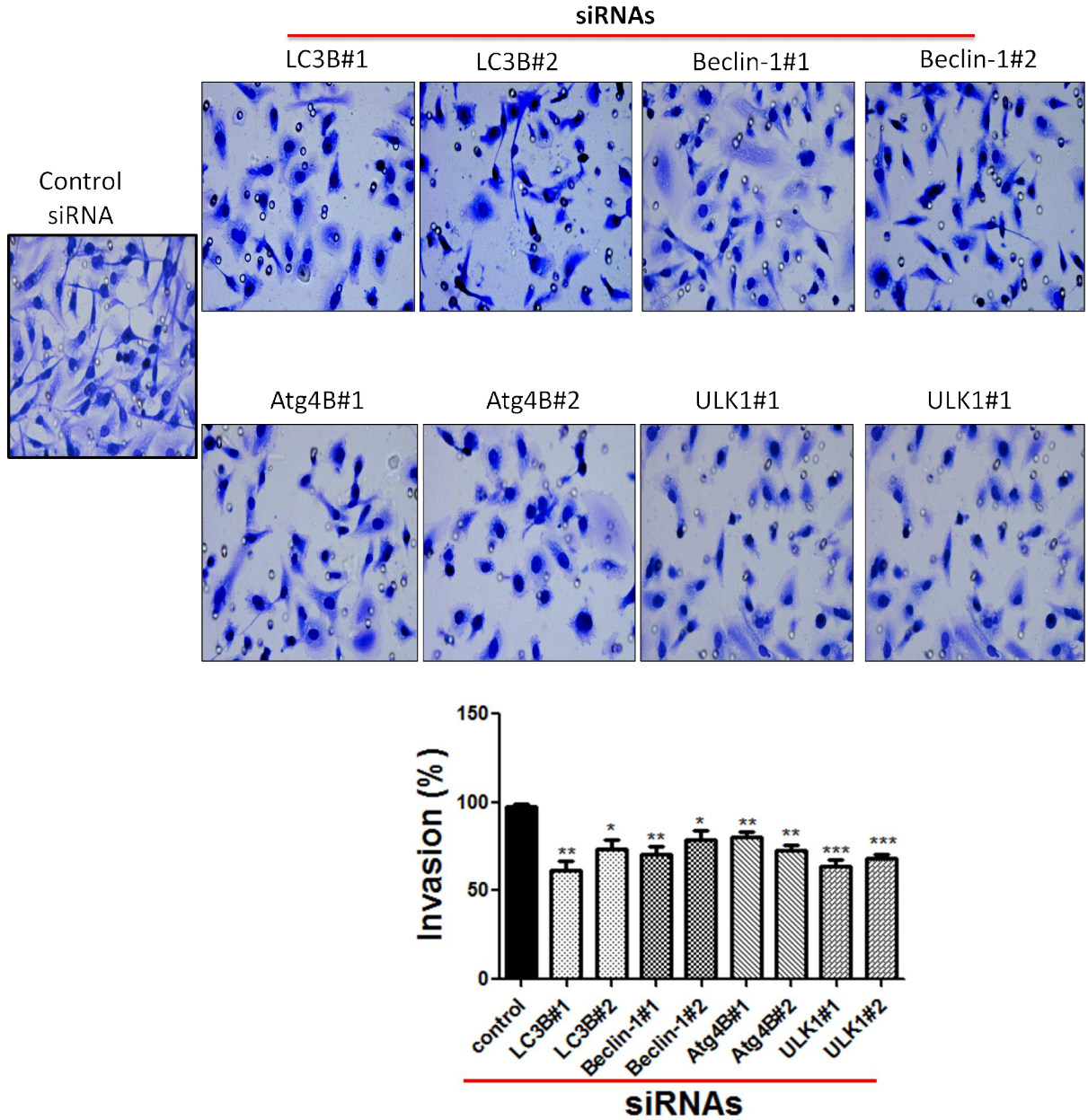


Ėekil 30. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAĞlar ile transfekte edilen MDA-MB-231 hĖcrelerinde migrasyon oranĖ LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNAĞlar aracĖıyla baskĖlanmĖ otofaji MDA-MB-231 hĖcrelerinde migrasyonu baskĖladĖ

Elde ettiğimiz veriler; LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4B siRNAĞlar aracĖıyla baskĖlanmĖ otofajinin, agresif meme kanser hĖcrelerinde migrasyon oranĖĖnemli ĖlĖde baskĖladĖĖĖ gösterdi. DolayĖıyla, bu sonuÇ bize otofajinin agresif meme hĖcrelerinin migrasyonunda etkin bir role sahip olduğunu ortaya koydu (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayĖn alĖ amasĖnda).

9. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA aracĖıyla baskĖlanmĖ otofaji MDA-MB-231 hĖcrelerinde invazyonu baskĖladĖ

ĖalĖmamĖda, LC3, Beclin-1, ULK1 ve Atg4 siRNAĞlar aracĖıyla baskĖlanmĖ olan otofajinin meme kanser hĖcrelerinin invazyonunda bir role sahip olup olmadĖĖ araĖtĖmak amacĖyla ; MDA-MB-231 hĖcreleri kontrol siRNA ve LC3B, Beclin-1, Atg4B ve ULK1 siRNA ile transfekte edildi. Bu siRNAĞlarla 72 saatlik transfeksiyondan sonra matriks jel invazyon analizi yapĖldĖ. Analiz sonuĖlarıĖmĖza gĖre, invazyonun, kontrol siRNA ile transfekte edilen hĖcrelerle kĖyaslandĖĖnda, LC3, Beclin-1, Atg4B ve ULK1 siRNAĞlarla transfekte edilen hĖcrelerde istatistiksel olarak Ėnemli seviyede azaldĖĖ bulundu (Ėekil 31) Bu sonuÇ bize otofajinin agresif meme kanser hĖcrelerinin invazyonunda da Ėnemli bir role sahip olduğunu gĖsterdi.

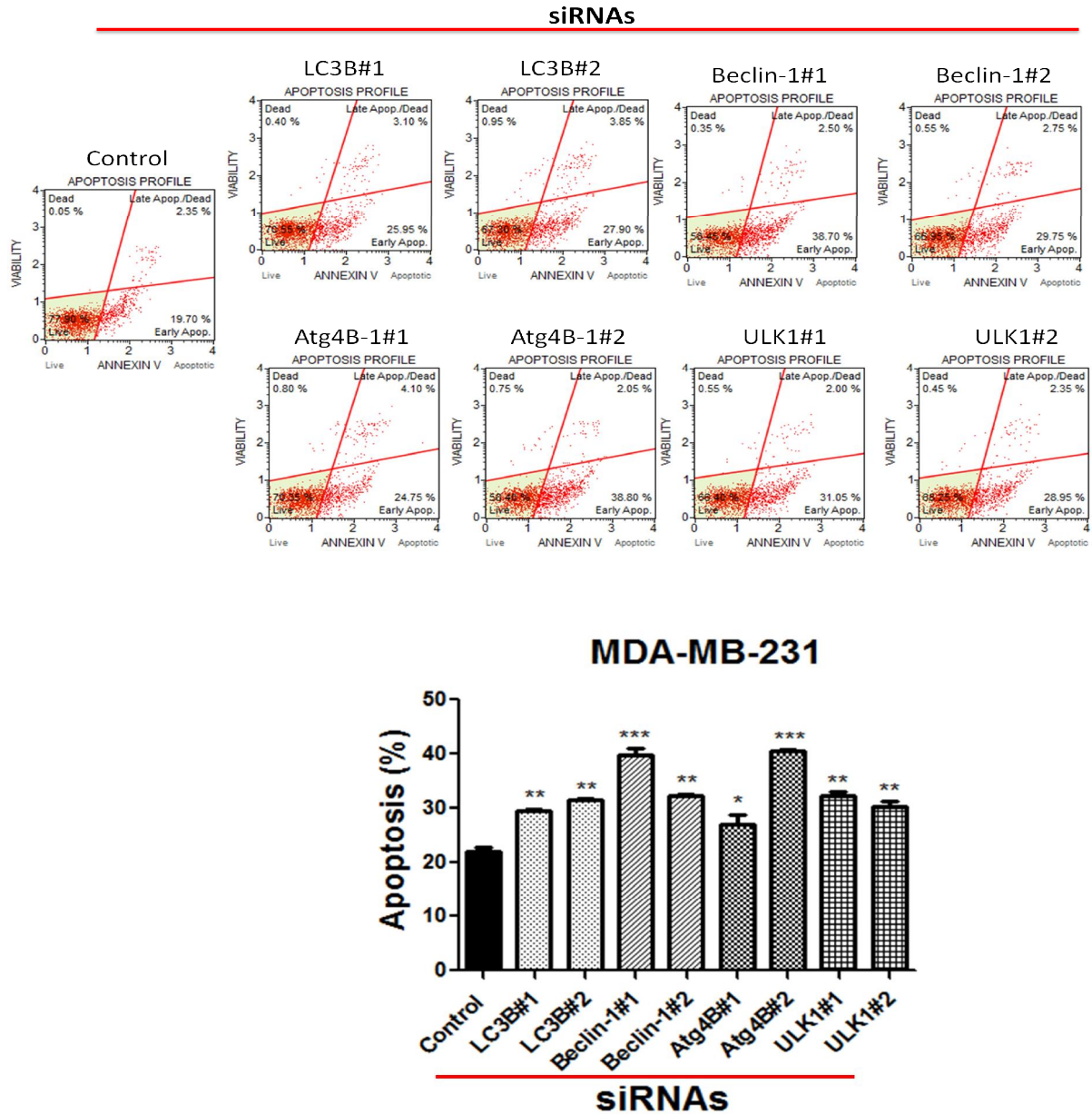


Şekil 31. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA'lar ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde invazyon oranı LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA'lar aracılığıyla baskılanmış otofaji MDA-MB-231 hücrelerinde invazyonu baskıladı.

10. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA aracılığıyla baskılanmış otofaji MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu indükledi.

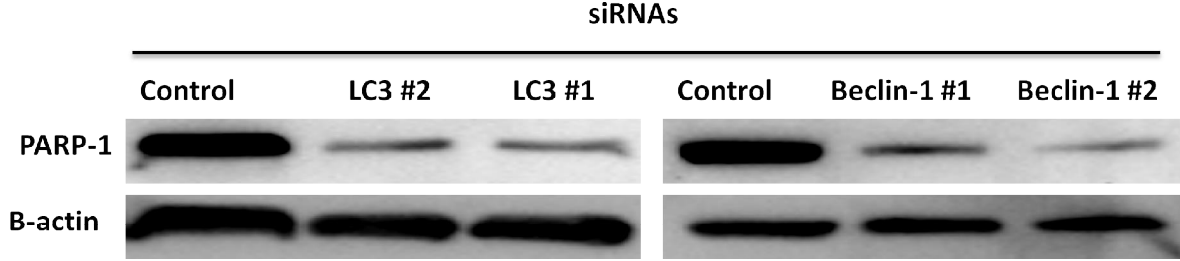
Apoptoza karşı direnç gösterme, apoptozdan kaçma kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biridir. Annexin-V analizi hücrelerdeki apoptoz oranını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda, otofajinin apoptozdaki rolünü öğrenmek amacıyla LC3, Beclin-

1 ULK1, Atg4 siRNA ile transfeke edilen hücrelerde Annexin-V yöntemi ile akın sitometride apopitoz analizi yapıldı. Analiz sonucunda, kontrol siRNA ile transfeke edilen hücelere göre, LC3, Beclin-1 ULK1, Atg4 siRNA ile transfeke edilen hücelerde apopitoz oranı arttı. Apopitozun indüklendiği bulundu (Şekil 32). Dolayısıyla, verilerimizle otofajinin baskılanmasıyla birlikte apopitozun indüklendiği ortaya çıktı. Bu sonucumuz, meme kanser hücrelerinde otofajinin apopitozu baskılayarak kanser hücrelerinin apopitozdan kurtulmasına yol açtığına ve hücre canlılığına katkı sağladığını gösterdi (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmamış).



Şekil 32. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA'lar ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apopitoz indüklenme oranı. LC3, Beclin-1, ULK-1 ve Atg4 siRNA'lar aracılığıyla baskılanmış otofaji MDA-MB-231 hücrelerinde apopitozu indükledi.

Ayrıca, LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinden proteinler izole edildi ve western blot analizi yapıldı. Analiz sonucunda, siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin-1 ekspresyonlarının inhibisyonunun DNA tamirinde görev alan PARP'nin ekspresyonunu baskıladığı bulundu (Şekil 32) (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmamışta).

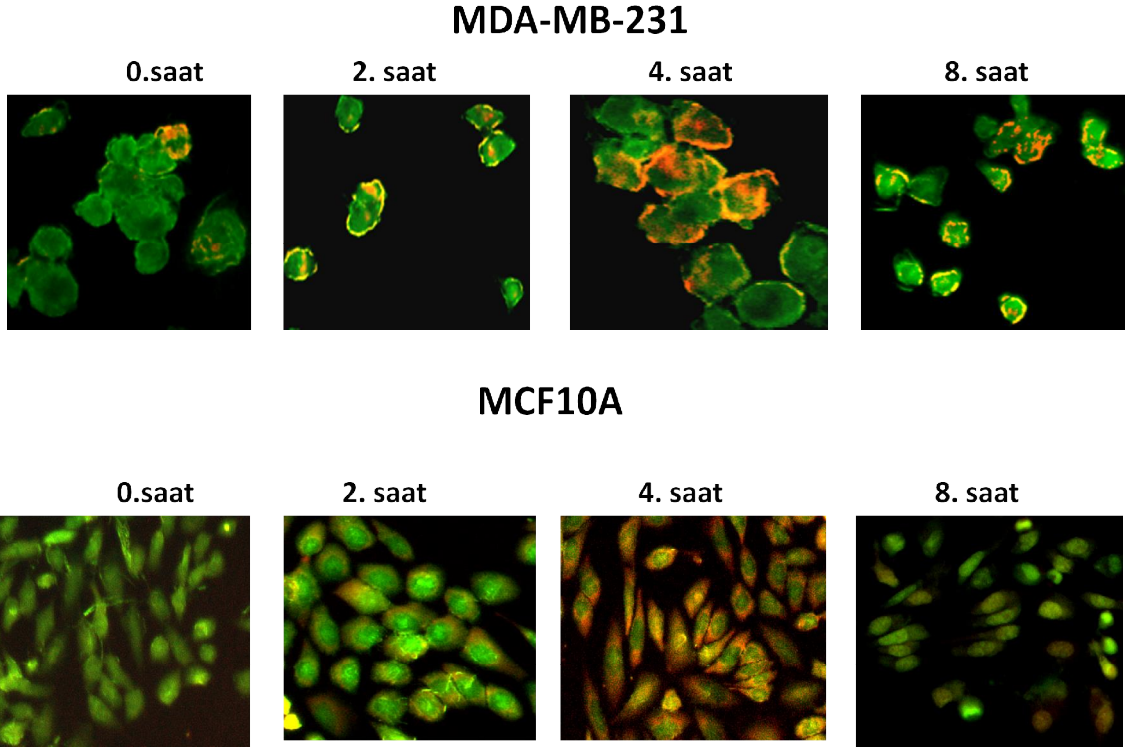


Şekil 33. LC3 ve Beclin-1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde PARP proteinin ekspresyon seviyesi. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin-1'in inhibisyonu PARP'nin ekspresyonunu baskıladı. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

11. LC3, Beclin-1, Atg4B ve ULK1 siRNA aracılığıyla hücre döngüsü, hücre migrasyonu ve invazyonunda görev alan medyatörlerin ekspresyonları baskılandı

LC3, Beclin-1, ULK1, Atg4 siRNA ile transfekte edilen hücrelerden proteinler izole edildi ve western blot analizi yapıldı. *LC3 ve Beclin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde*, siRNA aracılığıyla LC3 ve Beclin-1 inhibisyonunun, bu hücrelerde cyclin-D1 (hücre döngüsünde görev alır), Integrin- α 1, pSrc (her ikisinde hücre çoğalması migrasyonu ve invazyonunda görev alan medyatörlerdir), uPAR ve uPA (hücre proliferasyonu, adezyonu ve invazyonunda görev alır) ekspresyonları baskılandığı bulundu (Şekil 33 A, B) (Hamurcu vd.,2017, J Cancer Res Clin Oncology yayımlanmamışta). *Atg4 ve ULK1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde*, siRNA aracılığıyla Atg4 ve ULK1 inhibisyonunun, bu hücrelerde cyclin-D1, Integrin- α 1, pSrc ekspresyonları baskılandığı bulundu (Şekil 33 C, D).

gözlendi (Ėekil 35).

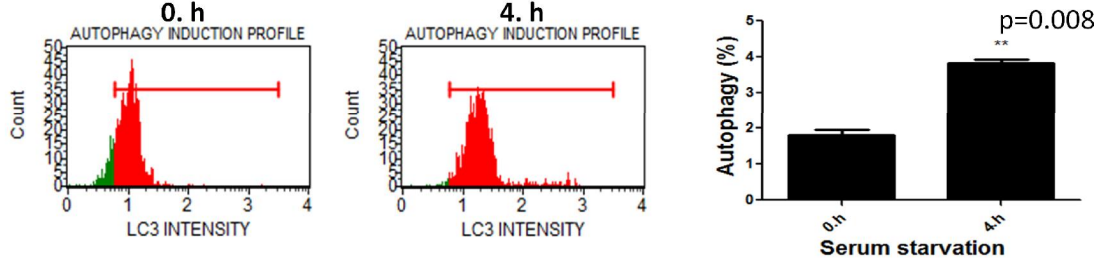


Ėekil 35. Farklı zaman aralıklarında aç kalan MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinde otofajik veziküler oluşumlar. Farklı zaman aralıklarında serum içermeyen ortamda aç bırakılan MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinde zaman aralığına bakılarak otofajik vezikül oluşum arttı. Her iki hücre hattında da 4 saatlik açlık sonrasında otofajik veziküllerin sayısı yüksek bulundu.

Ayrıca, çalışmamızda akridin oranj bulgularımız doğrulamak amacıyla farklı bir yöntem olan flov sitometri ile otofaji indüklenme oranı LC3-temelli otofaji kiti kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçlarımızla göre, 4 saatlik açlık sonrasında hem MDA-MB-231 hem de MCF10A hücrelerinde 0. saate göre otofajide önemli bir artış olduğu (Ėekil 36) hatta bu artışın MDA-MB-231 hücrelerinde MCF10A hücrelerine göre oldukça belirgin ve önemli bir seviyede olduğu (Ėekil 36) ve bu sonuçlarımızın akridin oranj boyama sonucu elde ettiğimiz verilerimizi desteklediği bulundu.

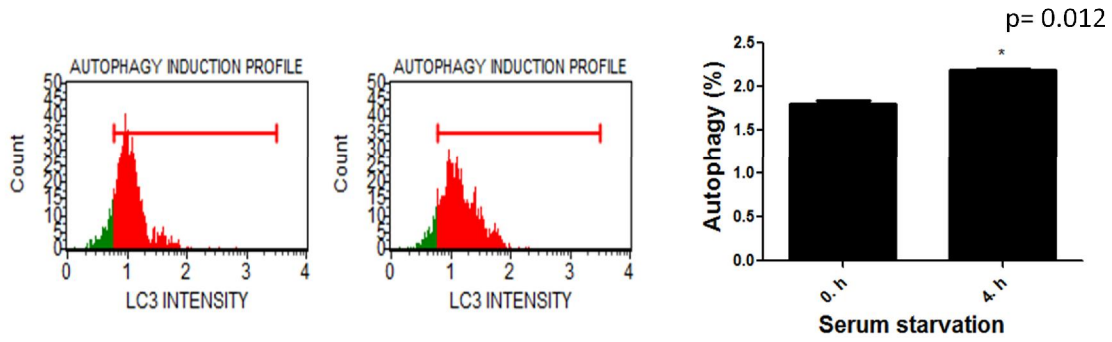
MDA-MB-231

After serum starvation



MCF10A

After serum starvation

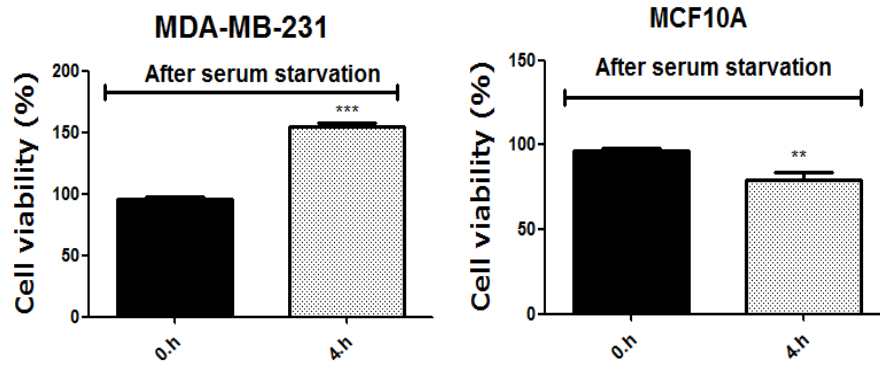


Ėekil 36. A bėakėdan MDA-MB-231 ve MCF10A hėcrelerinde otofaji indėklenme oranė

Her iki hėcre hattėnda da 4 saatlik açlık sonrasė orofaji indėklenme oranėn 0. saate gėre önemli seviyede ertėėbulundu.

2. Açlık Ėartlarėnda MCF10A hėcrelerinde canlılık/proliferasyon azalėken, MDA-MB-231 hėcrelerinde canlılık/proliferasyon artar.

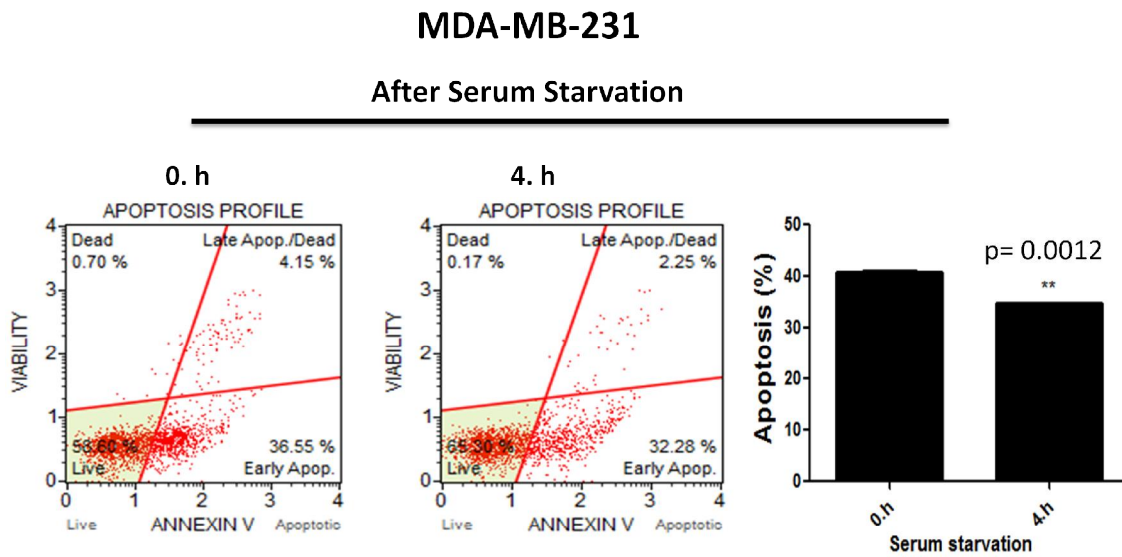
MF10A ve MDA-MB-231 hėcreleri normal Ėartlarda (serum içeren besiyerinde) kėltėre edildi. Hėcreler belli bir ykunulua gelince, hėcrelerin bir kėsmė kėltėr sonlandėrmadan 4 saat serum içermeyen ortamda inkėbe edilerek a kalmalarė salandıDaha sonra MTS analizi yapılarak hėcrelerdeki canlılık/proliferasyon oranė lėėldė. A bėakėmayan (0. saat) MDA-MB-231 hėcrelerine gėre, serum içermeyen ortamda 4 saat inkėbe edilerek a bėakėdan MDA-MB-231 hėcrelerinde açlık sonrasė hėcre canlılık nėn önemli seviyede arttığbulundu (Ėekil 37). Tersine, a bėakėmayan (0. saat) MCF10 hėcrelerine gėre, 4 saat serum içermeyen ortamda a kalan MCF10A hėcrelerinde, açlık sonrasė hėcre canlılık nėda önemli seviyede azalma bulundu (Ėekil 37).



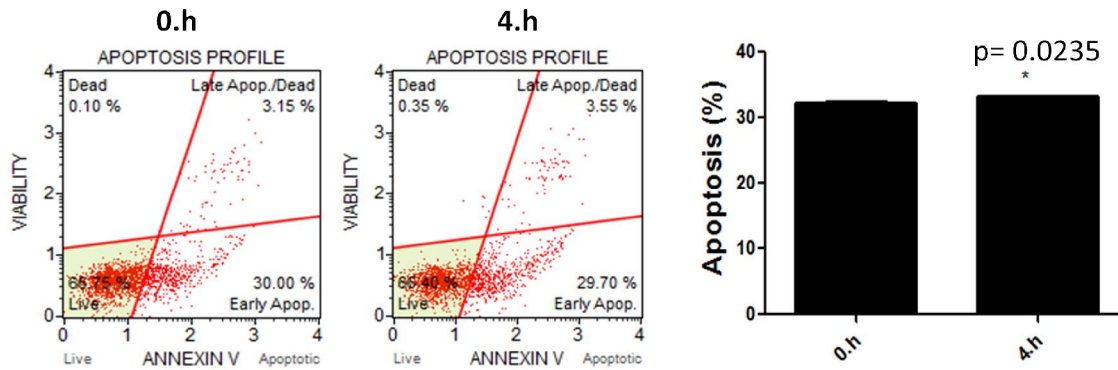
Şekil 37. Açlık MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinde açlık, hücre canlılığına etkisi. MTS analiz sonuçlarına göre, açlık MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığı 0. saate göre artarken, MCF10A hücrelerinde 0. saate göre hücre canlılığı proliferasyonunu baskıladı.

3. Açlık İartlarında MCF10A hücrelerinde apoptoz indüklenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz baskılandı

MCF10A ve MDA-MB-231 hücreleri normal İartlarda (serum içeren besiyerinde) kültüre edildi. Hücreler belli bir yoğunluğa gelince, hücrelerin bir kısmı kültür sonlandırmadan 4 saat serum içermeyen ortamda inkübe edilerek aç kalmaları sağlandı. Daha sonra Annexin-V analizi yapılarak hücrelerdeki apoptoz oranı ölçüldü. MDA-MB-231 hücrelerinde 4 saatlik açlık sonrasında, aç bırakılmayan MDA-MB-231 hücrelerine göre apoptozun önemli seviyede baskılandığı bulundu (Şekil 38). Oysa, MCF10A hücrelerinde 4 saatlik açlık sonrasında apoptozun önemli oranda uyarıldığı bulundu (Şekil 38).



After Serum Starvation



Şekil 38. Açık MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinde açık, apoptotik hücre ölümüne etkisi. Açık MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu baskıyken, MCF10 hücrelerinde apoptozu uyardı

Tüm bu verilerimiz artmış otofajik aktivitenin normal epitel hücrelerinde hücre ölüm mekanizması agresif meme kanser hücrelerinde sakı kalın mekanizması olarak davrandığını il aret etti.

V.TARTILMA

FOXM1, solid tümörlerde, ağız kanserinde eksprese edilen onkogenlerden biri olarak tanımlanmıştır. Yapılan birçok çalışmada FOXM1'in kanserin başlamasında değil, aynı zamanda proliferasyon, invazyon, migrasyon, angiogenezis ve metastaz da dahil olmak üzere tumorigenezin birçok basamağında rol aldığı gösterilmiştir (Hamurcu vd., 2016; Wang vd., 2014; Gomes vd., 2013; Nandi vd., 2017; Wang vd., 2017). FOXM1 özellikle hücre döngüsünde görev alan proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörü olarak gösterilmiştir (Leung vd., 2001; Wang vd., 2005) Bu bulgulara ilaveten, bizim daha önceki yaptığımız çalışmalarda, FOXM1'in eEF2K (uzama faktörü-2 (eEF2)'yi fosforilleyip translasyonu negatif yönde düzenleyen bir protein kinazdır) ve Integrin $\alpha 1$ 'in promotor bölgelerine bağlandığını ve onların transkripsiyonunu düzenlediği gösterildi (Hamurcu vd., 2016 ; Hamurcu vd., 2017). Bununla birlikte, onkogenik transkripsiyon faktörü FOXM1'in kanser hücrelerinde moleküler hedefleri hala belirlenmeye devam etmektedir.

Ökaryotlarda protein sentezinde görev alan eEF2K translasyonu negatif yönde düzenleyen bir proteindir. eEF2K substratı olan uzama faktörü-2 (eEF2)'yi fosforiller. Fosforillenen eEF2'nin ribozoma bağlanma afinitesi azalır ve translasyon durur (Liu vd 2012; Tavares vd 2012). eEFK meme kanser hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan onkogenik bir proteindir. Çünkü kanser hücreleri hızlı bir şekilde büyümek için normal hücrelerden çok daha fazla enerjiye ve besine ihtiyaç duyarlar. Protein sentezi enerji gerektiren bir olay olduğu için kanser hücreleri eEF2K'nin ekspresyonunu artırarak protein sentezinin baskılanmasını sağlar. Translasyonun (protein sentezi) durması açlığa yol açar, sonuç olarak açlıkta otofajiyi tetikler. Dolayısıyla, eEF2K sinyal yoluyla otofajiyi uyarır ve bundan dolayı da eEF2K otofajinin pozitif düzenleyicisi olarak kabul edilir (Leprivier vd., 2013; Cheng vd., 2011). Daha önceki yaptığımız çalışmada FOXM1 proteininin eEF2K geninin promotör bölgesine bağlanarak meme kanser hücre hatlarında eEF2K'nin ekspresyonunu düzenlediği bulundu (Hamurcu vd., 2016). Önceki bulgumuzdan yola çıkarak sunulan çalışmada, FOXM1'in otofajide de bir rolünün olabileceği öngörüldü ve sunulan çalışmada FOXM1'in otofajide rolü araştırıldı. Otofaji genleri strese karşı cevap olarak aktive olmaktadır. Örneğin, açlık arttığında, mayalarda ve memeli hücrelerinde otofagozom belirteci olan LC3 geninin transkripsiyonun arttığı gösterilmiştir, fakat transkripsiyonunu düzenleyen mekanizma tam olarak bilinmemektedir. FOX protein ailesinden olan FOXO, Drosophila larvasında otofajiyi uyarmak için yeterli ve gerekli ilk transkripsiyon faktörü olarak gösterilmiştir. Memeli hücreleri için FOXO'nun transkripsiyon mekanizmasını keşfetmek fare kas hücrelerinde protein yıklanma çalışmaları sırasında ortaya çıkmış ve fare iskelet kas hücrelerinde aktif FOXO3'ün otofagozom oluşumunu uyardığı gösterilmiştir. Ancak, otofaji genlerinin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyonel mekanizma henüz tanımlanamamıştır (He ve Klionsky, 2009; Liu

ve Lehman, 2008). Bu yüzden sunulan çalışmada, FOXM1'in LC3 ve Beclin-1 genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesinde bir rolünün olup olmadığı araştırıldı. Çalışmamızda, onkogenik transkripsiyon faktörü FOXM1'in, agresif meme kanser hücrelerinde LC3 ve Beclin-1 genlerinin promotor bölgelerine bağlanıp ve onların transkripsiyonel aktivitesinde önemli bir rol oynadığı literatürde ilk kez gösterildi.

Otofaji, evrimsel olarak korunmuş bir lizozomal yoldur ve hücrelerin metabolik stres artışlarında adaptasyonunu sağlar. Bunun yanı sıra, indüklenmiş otofaji, otofajik hücre ölümüne yol açabilir ve bu da tip II programlı hücre ölümü olarak bilinir (Ge vd 2014; Fulda vd., 2017; Ozpolat ve Benbrook ; 2015; Mizushima, 2017). Otofajinin hücrelerde çift yönlü etki göstermesinden dolayı çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, otofajinin ilavinin hala tartışılmalı olduğu rapor edilmektedir. Benzer şekilde meme kanser hücrelerinde de, otofaji tümör büyümesini baskılıyor mu ? (Aita vd, 1999; Yue vd, 2003; Dong vd, 2013; Suman vd 2013) ya da destekliyor mu ? (Choi vd, 2013; Wang vd, 2015; Sahni vd, 2014; Lefort vd, 2014) hala yoğun bir tartışma konusudur (Zhou vd., 2016; Ozpolat ve Benbrook 2015; Mizushima, 2017). Sunulan çalışmada, agresif meme kanser hücrelerinde LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 siRNA'ları aracılığıyla otofaji baskılandığında, hücrelerin canlılık/proliferasyonları, koloni olumunun, invazyonun ve migrasyonun baskılandığı ilaveten de apoptozun indüklendiği bulundu (Hamurcu vd 2017, yayınlanmamış). Bu sonuçlarımız, otofajinin agresif meme kanser hücrelerinde tümörün büyüme ve ilerleyen aşamalarında rol oynadığını, tümörün büyüme ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu gösterdi. Bu verilerimizle otofajinin meme kanser hücrelerindeki kritik duruma bir açıklık getirdiğini ve etkin bir tedavi için otofajinin baskılanması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1'in baskılanması meme kanseri hücrelerinde SRC'nin aktivitesini (fosforilasyonunu) azalttığını, Integrin- β 1 ve Siklin-D1'in ekspresyonunu inhibe ettiği bulundu (Şekil 33). Integrin- β 1, meme kanseri büyüme ve ilerlemesinin kritik mediyatörü olarak gösterilmiştir (Hou vd., 2016). Ligand bağlanması ile aktive olan integrinler, çok sayıda adaptör proteinleri ve SRC gibi reseptör olmayan protein kinazları aktive eder. Özellikle SRC meme kanseri hücrelerinin hücre göçü/ invazyonunda en önemli mediyatörü olup, integrin aracılığıyla hücre adezyonu, siklinlerin ekspresyonunu ve aktivitelerini düzenleyerek hücre döngüsü/çoğalmasını kontrol etmektedir (Huang vd, 2015; Nagaharu, vd 2010). Siklin-D1, G1 fazında anahtar rol oynamaktadır, G1/ S geçişi ve Integrin aracılığıyla sinyal yollarının fonksiyonel bir hedefi olarak gösterilmiştir (Shroff vd, 2012). Ayrıca, integrine bağlı sinyalizasyon, uPAR aracılığıyla aktiviteyi düzenler (Kjoller L ve Hall A, 2001; Smith vd, 2008). uPAR, otofaji ile düzenlenen ve hücrede proteolize, hücre göçüne, adezyona ve hareketliliğe aracılık eden uPA (serin proteaz)'ya sıkıca bağlanan bir hücre yüzey reseptörüdür (Liu vd, 2002). Sonuçlarımız, otofajide görev alan, LC3, Beclin-1, Atg4 ve

ULK1'in siRNA aracılığıyla baskılanması Integrin β 1 ve SRC sinyal yollarında dahil olmak üzere onların altı aşağıdaki hedeflerini de baskıladığını gösterdi. Bu bulgularımızla dayanarak, LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1 genleri, hücre proliferasyonunu, hayatta kalmayı göçü ve invazyonu arttıran mediyatörlerin düzenlenmesine ve ekspresyonuna katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

Ayrıca, çalışmamızda, LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1'in siRNA aracılığıyla baskılanmasını apoptotik hücre ölümünün indüklendiği ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı bulundu. Bu bulgumuza ek olarak, LC3 ve Beclin'in baskılanmasını, DNA onarımında rol oynayan PARP (Ali R 2016; Aleskandarany vd 2015) proteininin ekspresyonunun azalmasına yol açtığını gösterildi (Hamurcu vd, 2017 yaygın alımlarında). Bu sonuçlarımızla ilaveten açıklıkla tetiklenen otofajinin agresif meme kanser hücrelerinde hücre canlılığını artırmayı apoptozu baskılamayı normal epitel hücrelerinde ise hücre canlılığını azaltıp apoptozu indüklemesi; otofajik sürecin meme kanser hücrelerinde hücre sağkalımı için gerekli olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak bulgularımızla tamamen otofajinin agresif meme kanser hücrelerinde hücre sağkalımını proliferasyon, invazyon, göç ve apoptozla direnç gibi birden fazla mekanizmayla önemli biyolojik süreçleri desteklediğini ve inhibisyonunun bu mekanizmaları önemli ölçüde baskıladığını ve otofajinin agresif meme kanserlerinin progresyonunda kritik bir mekanizma olabileceğini göstermektedir (Hamurcu vd., 2017, J Cancer Res Clin Oncology yaygın alımlarında).

Agresif meme kanser hücrelerinin biyolojisi ve genetik yönlerinin anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, hala iyi bir şekilde belirlenmiş moleküler hedefli terapiler yoktur. Bu nedenle, daha iyi moleküler terapötik stratejiler geliştirmek için bu kompleks meme kanserlerinin biyolojisinin daha iyi anlaşılması gerekli olduğu kanaatindeyiz. Çalışmamızla sonuçlarımızla otofajinin meme kanserlerinde oynadığı rol ile ilgili çelişkili sonuçlara bir açıklık getirdiğini, agresif meme kanser hücrelerinin baskılanması ve ilerlemesinde kritik bir rol üstlendiğini, otofajinin agresif meme kanser tedavisi için potansiyel moleküler terapötik bir hedef olarak değerlendirilmesi gerektiğini ve otofajinin çeşitli basamaklarında fonksiyon yapan genleri (LC3, Beclin-1, Atg4 ve ULK1) hedef alan siRNAların terapötik bir ajan olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, onkogenik transkripsiyon faktörü FOXM1 üçlü reseptör negatif meme kanser hücrelerinin tümörigenezinin ve ilerlemesinin önemli bir medyatörü olan Integrin β 1 / FAK (Hamurcu vd, 2017) ve ökaryotik uzama faktörü 2 kinazı (eEF2K) (Hamurcu vd., 2016 Z) ve LC3/Beclin-1 düzenlenmesi de dahil olmak üzere birçok sinyal yolağın aktive edilmesinde rol almaktadır. Bu nedenle, FOXM1'i hedeflemenin çok yönlü antitümör etkiler göstereceği ve üçlü reseptör negatif meme kanser hücreleri üzerinde daha fazla terapötik etkiye yol açabileceği kanısındayız.

VI. KAYNAKLAR

1. Ahmad A, Wang Z, Kong D, Ali S, Li Y, Banerjee S, Ali R, Sarkar FH. Breast Cancer Res Treat. 2010. "FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extra-cellular matrix degrading factors" 122, 337-46.
2. Aleskandarany M, Caracappa D, Nolan CC, Macmillan RD, Ellis IO, Rakha EA, Green AR. 2015. "DNA damage response markers are differentially expressed in BRCA-mutated breast cancers" Breast Cancer Res Treat, 150, 81-90. doi: 10.1007/s10549-015-3306-6.
3. Ali R, Rakha EA, Madhusudan S, Bryant HE .2017. "DNA damage repair in breast cancer and its therapeutic implications" Pathology, 49, 156-165. doi: 10.1016/j.pathol.2016.11.002.
4. Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G. Mol Cancer Res. 2007. "Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells" 5, 241-9.
5. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB. 2007. "Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma" J Clin Invest, 117, 326-36.
6. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. 1999. "Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21" Genomics 59, 59-65.
7. Bassam Janji, Elodie Viry, Joanna Baginska, Kris Van Moer , Guy Berchem "Role of Autophagy in Cancer and Tumor Progression Immunology and Microbiology", 2013, Chapter 9 "Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?", book edited by Yannick Bailly, ISBN 978-953-51-1062-0 .
8. Bella L, Zona S, Nestal de Moraes G, Lam EW. 2014. "FOX M1: A key oncofoetal transcription factor in health and disease" Semin Cancer Biol., 29, 32-9. doi: 10.1016/j.semcancer.
9. Bootman MD, Chehab T, Bultynck G, Parys JB, Rietdorf K. 2017. "The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus?" Cell Calcium. pii: S0143-4160(17)30123-9. doi: 10.1016/j.ceca.2017.08.005.
10. Carr JR1, Park HJ, Wang Z, Kiefer MM, Raychaudhuri P. 2010. "FoxM1 mediates resistance to herceptin and paclitaxel" Cancer Res., 15, 5054-63.
11. Carlsson P, Mahlapuu M. 2002. "Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism" Dev Biol. , 250, 1-23.
12. Cerella C, Teiten MH, Radogna F, Dicato M, Diederich M. Biotechnol Adv, 2014,

- From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment pii: S0734-9750(14)00042-1.
13. Chen L , Zhou K, Chen H, Li S, Lin D, Zhou D. 2017. "Calcitriol promotes survival of experimental random pattern flap via activation of autophagy" *Am J Transl Res.* 2017 9, 3642-3653.
 14. Chen Y, Klionsky DJ. 2011. "The regulation of autophagy - unanswered questions" *Jan J Cell Sci.* ,124(Pt 2):161-70. doi: 10.1242/jcs.064576.
 15. Chen Y, Liu XR, Yin YQ, Lee CJ, Wang FT, Liu HQ, Wu XT, Liu J. 2014. "Unravelling the multifaceted roles of Atg proteins to improve cancer therapy" *Cell Prolif*, 47,105-12.
 16. Cheng Y, Ren X, Zhang Y, Patel R, Sharma A, Wu H, et al. 2011. "EF-2 kinase dictates cross-talk between autophagy and apoptosis induced by Akt Inhibition, thereby modulating cytotoxicity of novel Akt inhibitor MK-2206" *Cancer Res.*, 71, 2654-63.
 17. Choi J, Jung W, Koo JS. 2013. "Expression of autophagy-related markers beclin-1, light chain 3A, light chain 3B and p62 according to the molecular subtype of breast cancer" *Histopathology*, 62, 275-86 doi: 10.1111/his.12002.
 18. Christensen L, Joo J, Lee S, Wai D, Triche TJ, May WA. 2013. "FOX M1 is an oncogenic mediator in Ewing Sarcoma" *PLoS One*, 8, e54556. doi: 10.1371.
 19. Dai B, Kang SH, Gong W, Liu M, Aldape KD, Sawaya R, 2007. "Aberrant FoxM1B expression increases matrix metalloproteinase-2 transcription and enhances the invasion of glioma cells" *Oncogene*, 26, 6212-9.
 20. Dai J, Yang L, Wang J, Xiao Y, Ruan Q. 2015. "Prognostic Value of FOX M1 in Patients with Malignant Solid Tumor: A Meta-Analysis and System" *Dis Markers* 2, 352-478. doi: 10.1155/2015/352478.
 21. Dong M, Wan XB, Yuan ZY, Wei L, Fan XJ, Wang TT, Lv YC, Li X, Chen ZH, Chen J, Lin Q, Wen JY, Ma XK, Liu Q, Wu XY. 2013. "Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1 α refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer" *Med Oncol*, 3, 355. doi: 10.1007/s12032-012-0355-0.
 22. Fulda S. 2017. "Autophagy in Cancer Therapy" *Front Oncol*, 7, 128. doi: 10.3389/fonc.2017.00128.
 23. Gabriel T. M. Lok, David W. Chan, Vincent W. S. Liu, Winnie W. Y. Hui, Thomas H. Y. Leung, et al. 2011. "Aberrant Activation of ERK/FOX M1 Signaling Cascade Triggers the Cell Migration/Invasion in Ovarian Cancer Cells" *PLoS One*.; 6: e23790.
 24. Gallagher LE , Williamson LE , Chan EY . 2016. "Advances in Autophagy Regulatory

- Mechanisms of Cells, pii: E24. doi: 10.3390/cells5020024.
25. Gartel AL. 2010. A new target for proteasome inhibitors: FoxM1. *Expert Opin Investig Drugs*, 19, 235-42.
 26. Ge L, Baskaran S, Schekman R, Hurley JH. 2014. The protein-vesicle network of autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 18-24.
 27. Gomes AR, Zhao F, Lam EW. 2013. Role and regulation of the forkhead transcription factors FOXO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance. *Chin J Cancer*, 32, 365-70.
 28. Gomes LR, Vessoni AT, Menck CF. 2016. Microenvironment and autophagy cross-talk: Implications in cancer therapy. *Pharmacol Res*, 107, 300-7. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.031. Epub 2016 Mar 29.
 29. Halasi M, Gartel AL. 2013. FOX(M1) news--it is cancer. *Mol Cancer Ther*, 12, 245-54.
 30. Halasi M, Gartel AL. 2012. Suppression of FOXM1 sensitizes human cancer cells to cell death induced by DNA-damage. *PLoS One* 7, e31761.
 31. Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, Ozpolat B. 2016. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget* 7, 16619-35. doi: 10.18632/oncotarget.7672.
 32. Hamurcu Z, Kahraman N, Ashour A, Ozpolat B. 2017. FOXM1 transcriptionally regulates expression of integrin $\alpha 1$ in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 163, 485-493. doi: 10.1007/s10549-017-4207-7.
 33. Hamurcu Z, Delibali N, Geçene S, Lener E F, Dönmez-Altuntaş H, Özkul Y, Canatan Halit, Ozpolat B. 2017. LC3 and Beclin-1 siRNAs-mediated Suppressed autophagy leads to the decrease of tumorigenic features of Triple Negative Breast Cancer Cells. *J Cancer Res Clin Oncology (JOCR-D-17-01350)*.
 34. He C, Klionsky DJ. 2009. Regulation mechanisms and signaling. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93.
 35. Huang S. 2007. Aberrant FoxM1B expression increases matrix metalloproteinase-2 transcription and enhances the invasion of glioma cells. *Oncogene*, 26, 6212-9.
 36. Huang YL, Chu YL, Ho CT, Chung JG, Lai CI, Su YC, Kuo YH, Sheen LY. 2015. Antcin K, an Active Triterpenoid from the Fruiting Bodies of Basswood-Cultivated *Antrodia cinnamomea*, Inhibits Metastasis via Suppression of Integrin-Mediated Adhesion, Migration, and Invasion in Human Hepatoma Cells. *J Agric Food Chem* 63, 4561-9. doi: 10.1021/jf5059304.
 37. Hou S, Isaji T, Hang Q, Im S, Fukuda T, Gu J. 2016. Distinct effects of $\alpha 1$ integrin on

- cell proliferation and cellular signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells[†] Sci Rep 6: 18430. doi: 10.1038/srep18430.
38. Jiang P, Mizushima N. 2014. [†]Autophagy and human diseases[†] Cell Res. 24, 69-79. doi: 10.1038/cr.2013.161.
 39. Kjoller L, Hall A. 2001. [†]Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin[†] J Cell Biol 152, 1145-1157.
 40. Kwok JM, Peck B, Monteiro LJ, Schwenen HD, Millour J, Coombes RC, Myatt SS, Lam EW. 2010. [†]FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells[†] Mol Cancer Res, 8, 24-34.
 41. Lam AK, Ngan AW, Leung MH, Kwok DC, Liu VW, Chan DW, et al. 2013. [†]FOXM1b, which is present at elevated levels in cancer cells, has a greater transforming potential than FOXM1c[†]Front Oncol, 11. doi:10.3389
 42. Lee YK, Lee JA. 2016. [†]Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy[†] BMB Rep, 49, 424-30.
 43. Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel AM, Bourachot B, Zago G, Bieche I, Dubois T, Meseure D, Vincent-Salomon A, Camonis J, Mechta-Grigoriou F. 2014. [†]Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers[†] Autophagy, 10, 2122-42. doi: 10.4161/15548627.2014.981788.
 44. Leung TW, Lin SS, Tsang AC, Tong CS, Ching JC, Leung WY, et al. 2001. [†]Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression[†] FEBS Lett, 507, 59-66.
 45. Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo AR, Kool M, et al. 2013. [†]The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation[†] Cell, 153, 1064-79.
 46. Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, et al. 2002. [†]EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma[†] Cancer Cell, 1, 445-1157.
 47. Liu Y, Lehmann M. 2008. [†]Genes and biological processes controlled by the Drosophila FOXA orthologue Fork head[†] Insect Mol Biol, 17, 91-101.
 48. Maycotte P, Thorburn A. 2014. [†]Targeting autophagy in breast cancer[†] World J Clin Oncol, 5, 224-40.
 49. Millour J, de Olano N, Horimoto Y, Monteiro LJ, Langer JK, Aligue R, Hajji N, Lam EW. 2011. [†]ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance[†] Mol Cancer Ther, 10, 1046-58.

50. Mizushima N. 2017. "The exponential growth of autophagy-related research: from the humble yeast to the Nobel Prize" *FEBS Lett* 591, 681-689. doi: 10.1002/1873-3468.12594.
51. Mizushima N. 2007. "Autophagy: process and function" *Genes Dev*, 21, 2861-73.
52. Mizushima, N. 2010. "The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*" 22, 132-139.
53. Nagaharu K1, Zhang X, Yoshida T, Katoh D, Hanamura N, Kozuka Y, Ogawa T, Shiraishi T, Imanaka-Yoshida K . 2010. "Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells" *Am J Pathol*, 178, 754-6., 2011 doi: 10.1016/j.ajpath..10.015.
54. Nandi D, Cheema PS, Jaiswal N, Nag A. 2017. "FoxM1: Repurposing an Oncogene as a Biomarker" *Semin Cancer Biol*, pii: S1044-579X(17)30061-5.doi: 10.1016/j.semcancer.2017.08.009.
55. Ozpolat B, Akar U, Mehta K, Lopez-Berestein G. 2007. "PKC delta and tissue transglutaminase are novel inhibitors of autophagy in pancreatic cancer cells" *Autophagy*, 3, 480-3.
56. Ozpolat B, Benbrook DM.2015. "Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments" *Cancer Manag Res*, 7, 291-9. doi: 10.2147/CMAR.S34859.
57. Pengo N, Agrotis A, Prak K, Jones J, Ketteler R. 2017. "A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nat Commun*" 8, 294. doi: 10.1038/s41467-017-00303-2.
58. Qadir MA , Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB, Gorski SM. 2008. "Macroautophagy, inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization" *Breast Cancer Res Treat*,112,389-403.
59. Raychaudhuri P, Park HJ. 2011. "FoxM1: a master regulator of tumor metastasis" *Cancer Res*, 71, 4329-33.
60. Rodolfo C, Campello S, Cecconi F. 2017. "Mitophagy in neurodegenerative diseases" *Neurochem Int*, pii: S0197-0186(17)30087-6. doi: 10.1016/j.neuint.2017.08.004.
61. Sahni S, Merlot AM, Krishan S, Jansson PJ, Richardson DR. 2014. "Gene of the month: BECN1" *J Clin Pathol*, 67, 656-60. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202356.
62. Sánchez-Wandelmer J, Kriegenburg F, Rohringer S, Schuschnig M, Gómez-Sánchez R, Zens B, Abreu S, Hardenberg R, Hollenstein D, Gao J, Ungermann C, Martens S, Kraft C, Reggiori F. 2017. "Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1

- phosphorylation[†] Nat Commun, 8, 295. doi: 10.1038/s41467-017-00302-3.
63. Shimeld SM, Degnan B, Luke G N. 2010. [†]Evolutionary genomics of the Fox genes: Origin of gene families and the ancestry of gene clusters[†] Genomics, 95, 256–260.
 64. Shroff K, Pearce TR, Kokkoli E .2012 .[†]Enhanced integrin mediated signaling and cell cycle progression on fibronectin mimetic peptide amphiphile monolayers[†] Langmuir, 28, 1858-65 doi: 10.1021/la203322t.
 65. Smith HW, Marra P, Marshall CJ. 2008. [†]PAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180[†] J Cell Biol, 182, 777–90.
 66. Suman S, Das TP, Reddy R, Nyakeriga AM, Luevano JE, Konwar D, Pahari P, Damodaran C. 2014. [†]The pro-apoptotic role of autophagy in breast cancer[†] Br J Cancer, 111, 309-17, doi: 10.1038/bjc.2014.203.
 67. Tang DY1, Ellis RA1, Lovat PE2. 2016. [†]Prognostic Impact of Autophagy Biomarkers for Cutaneous Melanoma[†] Front Oncol, 6, 236.
 68. Tavares CD, O'Brien JP, Abramczyk O, Devkota AK, Shores KS. 2012. [†]Calcium/calmodulin stimulates the autophosphorylation of elongation factor 2 kinase on Thr-348 and Ser-500 to regulate its activity and calcium dependence[†] Biochemistry, 51, 2232-45.
 69. Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han HD, Sood AK, Lopez-Berestein G, Ozpolat B.2013. [†]Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer[†] Mol Ther Nucleic Acids, 10;2:e121 doi: 10.1038/mtna.45.
 70. Valente G, Morani F, Nicotra G, Fusco N, Peracchio C, Titone R, Alabiso O, Arisio R, Katsaros D, Benedetto C, Isidoro C. 2014. [†]Expression and Clinical Significance of the Autophagy Proteins BECLIN 1 and LC3 in Ovarian Cancer[†] Biomed Res Int, doi: 10.1155/2014/462658.
 71. Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, et al. 2005. [†]Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase[†] Mol Cell Biol, 25, 10875-94.
 72. Wang IC, Ustiyanyan V, Zhang Y, Cai Y, Kalin TV, Kalinichenko VV. 2014. [†]Foxm1 transcription factor is required for the initiation of lung tumorigenesis by oncogenic Kras(G12D.)[†]Oncogene. 33:5391-6. doi: 10.1038/onc.2013.475.
 73. Wang J, Li W, Zhao Y, Kang, Fu W, Zheng X, Pang X, Du G. 2017. [†]Members of FOX family could be drug targets of cancers[†] Pharmacol Ther, pii: S0163-7258(17)30213-

9. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.003.
74. Wang M, Gartel AL. 2011. "The suppression of FOXM1 and its targets in breast cancer xenograft tumors by siRNA" *Oncotarget*, 2, 1218-26.
75. Wang MC, Wu AG, Huang YZ, Shao GL, Ji SF, Wang RW, Yuan HJ, Fan XL, Zheng LH, Jiao QL. 2015. "Autophagic regulation of cell growth by altered expression of Beclin 1 in triple-negative breast cancer" *Int J Clin Exp Med*, 8, 7049-58.
76. Wang Z, Ahmad A, Li Y, Banerjee S, Kong D, Sarkar FH. 2010. "Forkhead box M1 transcription factor: a novel target for cancer therapy" *Cancer Treat Rev*, 36, 151-6.
77. Wang Z, Zhang S, Siu TL, Huang S. 2015. "Glioblastoma multiforme formation and EMT: role of FoxM1 transcription factor" *Curr Pharm Des*, 21, 1268-71.
78. Xue YJ, Xiao RH, Long DZ, Zou XF, Wang XN, Zhang GX, Yuan YH, Wu GQ, Yang J, Wu YT, Xu H, Liu FL, Liu M. 2012. "Overexpression of FoxM1 is associated with tumor progression in patients with clear cell renal cell carcinoma" 10, 200. doi: 10.1186/1479-5876-10-200.
79. Xin Y, Jiang F, Yang C, Yan Q, Guo W, Huang Q, Zhang L, Jiang G. 2017. "Role of autophagy in regulating the radiosensitivity of tumor cells" *J Cancer Res Clin Oncol*, doi: 10.1007/s00432-017-2487-2.
80. Yoshii SR, Mizushima N. 2017. "Monitoring and Measuring Autophagy" *Int J Mol Sci*, pii: E1865. doi: 10.3390/ijms18091865Int.
81. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. 2003. "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15077-82.
82. Zambrano J, Yeh ES. 2016. "Autophagy and Apoptotic Crosstalk: Mechanism of Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancer" *Breast Cancer (Auckl)*, 10, 13-23. doi: 10.4137/BCBCR.S32791.
83. Zhou Y, Rucker EB 3rd, Zhou BP. 2016. "Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer" *Acta Biochim Biophys Sin* 48, 60-74. doi: 10.1093/abbs/gmv119.
84. Zhang Y, Zhang N, Dai B, Liu M, Sawaya R, Xie K, Huang S. 2008. "FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells" *Cancer Res*, 68, 8733-42.