

D/L-Homosistein Tamoksifene Dirençli MCF-7/TAMR-1 Meme Kanseri Hücrelerinin Proliferatif Özelliklerini ER Stresi Aracılı Olarak Baskılayabilir

Yalçın ERZURUMLU^{*1}, Hatice Kübra DOĞAN²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 14.02.2022, Kabul / Accepted: 30.05.2022, Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022)

Anahtar Kelimeler

ER stresi,
MCF-7/TAMR-1,
Meme kanseri,
Tamoksifen

Öz: Tamoksifen meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ancak reseptör ifade profillerindeki değişimlere bağlı olarak kullanımı sınırlanan önemli bir tedavi yaklaşımıdır. Her ne kadar tamoksifen klinikte yoğun bir uygulama alanına sahip olsa da meme kanseri hastalarının %20-30'u çeşitli nedenlerle de novo veya tedavi sonrasında tamoksifene karşı direnç geliştirmektedir. Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir ve her yıl birçok kişi meme kanseri nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Bu nedenle meme kanseri hücrelerinin tamoksifen duyarlılığını arttırmak üzerine çok sayıda çalışma sürdürülmektedir. Son çalışmalar, endoplazmik retikulum (ER) stresine ilişkin mekanizmaların meme kanserinin ilerlemesinde ve kazanılmış ilaç direncinde önemli anahtar düzenleyiciler olduğuna işaret etmiştir. Bu nedenle ER stresini modüle eden ajanlar meme kanserine yönelik geliştirilecek yeni tedavi yaklaşımları için yoğun olarak araştırılmaktadır. Çalışmalarımızda D/L-homosistein'in tamoksifen ile kombine uygulamasının *in vitro* da tamoksifene direnç gelişimini iyi mimik eden MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde ER stresi modülasyonu yolu ile tamoksifen duyarlılığını geliştirdiği belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular meme kanserinde ER stresi ile ilişkili süreçlere etki edebilecek yeni moleküllerin tamoksifen ile kombine edilerek tamoksifen direncine karşı uygulanacak alternatif yaklaşımlar açısından umut vaat ettiğini önermektedir.

D/L-Homocysteine May Suppress Proliferative Properties of Tamoxifen-resistant MCF-7/TAMR-1 Breast Cancer Cells through Modulation of ER Stress

Keywords

ER stress,
MCF-7/TAMR-1,
Breast cancer,
Tamoxifen

Abstract: Tamoxifen is an important treatment approach that is frequently used in the treatment of breast cancer, but its usage is limited due to changes in receptor expression profiles of breast cancer cells. Although tamoxifen has an intense clinical application area, 20-30% of breast cancer patients develop resistance to tamoxifen de novo or after treatment for various reasons. Breast cancer is the second cause of cancer-related death among women worldwide, and many people die from breast cancer each year. For this reason, many studies are continuing to increase the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen. Recent studies have pointed out that mechanisms related to endoplasmic reticulum (ER) stress are important key regulators of breast cancer progression and acquired drug resistance. Thus, agents that modulate ER stress are intensively investigated for new treatment approaches to be developed for cancer. In our studies, combined application of D/L-homocysteine with tamoxifen improves tamoxifen sensitivity of MCF-7/TAMR-1 cells, which well-mimic the development of tamoxifen resistance *in vitro* by ER stress modulation. Our findings suggest that combined treatment of new molecules that can affect the processes associated with ER stress, with tamoxifen, might be promising alternative approaches to be applied against tamoxifen resistance in breast cancer.

*İlgili yazar: yalcinerzurumlu@sdu.edu.tr

1. Giriş

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir [1]. Meme kanseri hücrelerinin reseptör ifade profillerindeki değişimler kanser progresyonunu doğrudan etkileyerek metastaz ve invazyon gibi süreçleri düzenlemektedir. Ayrıca bu değişimler hücrelerin ilaç direnci geliştirmesi ile doğrudan ilişkilendirilmiştir [2]. Günümüzde hormon reseptörü pozitif meme tümörlerinde, tamoksifen en sık kullanılan ve etkili kemoterapötik ajanlardan biridir [3]. Seçici östrojen modülatörü olan tamoksifen, östrojen antagonisti gibi davranarak östrojenlerin meme dokusundaki östrojen reseptörüne bağlanmasını önlemektedir. Her ne kadar tamoksifen klinikte yoğun bir uygulama alanına sahip olsa da meme kanseri hastalarının %20-30'u çeşitli nedenlerle de novo veya tedaviyi takiben tamoksifene karşı direnç geliştirmektedir [4, 5]. Günümüzde hastalar primer tümörün reseptör durumuna göre hormonal tedavi seçeneğine sahip olabilmektedir. Ancak tamoksifene karşı direnç gelişimi meme kanserinin tedavisinde tamoksifenin etkin kullanımındaki en büyük sınırlamalardan biridir. Son çalışmalar, endoplazmik retikulum (ER) stresine ilişkin mekanizmaların meme kanserinin ilerlemesinde ve kazanılmış ilaç direncinde önemli anahtar düzenleyiciler olduğuna işaret etmiştir [6]. Bu nedenle ER stresini modüle eden ajanlar meme kanserine yönelik geliştirilecek yeni tedavi yaklaşımları için yoğun olarak araştırılmaktadır.

Homosistein metiyonin aminoasidinden türevlenen aminoasit metabolizmasındaki ara ürünlerden birisidir [7-9]. Homosistein'in endotel hücrelerinde ve nöronlarda hücre döngüsünün tutuklanması, yaşlanma ve apoptotik hücre ölümü gibi süreçleri düzenlediği rapor edilmiştir [10-13]. Homosisteinin etki mekanizmalarından birisi de ER stresinin modülasyonu üzerindeki etkileridir [9, 10, 12].

Ökaryotik hücrelerde yeni sentezlenen proteinlerin %30'luk bir bölümü ER'ye bağlı ribozomlarda sentezlenmekte olup yeni sentezlenen bu polipeptit zincirlerinin olgunlaşma süreçleri, ER'de yer alan protein kalite mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir [14, 15]. Değişen fizyolojik koşullar altında ER, ökaryotik hücreleri tekrar programlamak için doğrudan yanıt oluşturmaktadır. Genotoksik etkiler, oksidatif stres veya hücrenin artan protein sentezi ihtiyacı nedeniyle ortaya çıkan dengesiz protein sentezi durumu ve ER'nin kapasitesinin aşılması gibi nedenler ER stresini olarak adlandırılan ER homeostazının bozulmasını tetiklemektedir [14]. Hücrelerde oluşan bu ER stresinin üstesinden gelineemediği durumlarda ER ilişkili sinyal mekanizmaları aracılı olarak programlanmış hücre ölümü apoptozis tetiklenebilmektedir [15].

Homosisteinin protein katlanması için kritik öneme sahip disülfid bağ oluşumunu bozarak ve katlanmamış

protein yanıtını aktive ederek ER stresine neden olabildiği rapor edilmiştir [10]. İnsan göbek bağı damarı endotel hücreleri (HUVEC) ile yapılan bir çalışmada fizyolojik dozun üzerinde homosistein uygulamasının ER stresini ile ilişkili kritik düzenleyiciler olan GRP78/BiP (78-kDa glucose-regulated protein) ve CHOP/GADD153 (CEBP homology protein/growth arrest and DNA damage-inducible protein 153) gibi ER stres belirteçlerinin ifadelerini indüklediği belirlenmiştir [10]. ER stresinin programlanmış hücre ölümü ve hücre döngüsünün duraksaması gibi süreçlerle yakın ilişkili olduğu bilinmektedir [10, 15]. Özellikle ER stresini ile ilişkili CHOP düzeyindeki artış hücre bölünmesinin tutuklanması ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir [16, 17].

Son yıllardaki çalışmalar ER stresini ile ilişkili süreçlerin kanser progresyonuna destek verdiğini ortaya koymuştur ve bu mekanizmaların biyokimyasal olarak aktivitelerindeki değişimlerinin pankreas, ovaryum, prostat ve meme kanserinin de dahil olduğu çok sayıdaki kanser tipi ile sıkı ilişkili olduğu gösterilmiştir [18-20]. Ayrıca kemoterapötiklere karşı direnç gelişmesinde ER stresinin etkin bir mekanizma olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [21, 22].

Çalışmalarımızda meme kanseri hücrelerinde D/L-Homosistein uygulamasının tamoksifen direnci üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bulgularımız tamoksifene dirençli MCF-7/TAMR-1 meme kanseri hücrelerinde D/L-Homosistein-tamoksifen kombine uygulamasının ER stresinin indüklenmesi ve hücre döngüsünün baskılanmasına neden olarak MCF-7/TAMR-1 proliferasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre kültürü

Çalışmalarda American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiş tamoksifen dirençli insan meme kanseri hücreleri olan MCF-7/TAMR-1 %10 FBS içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yerinde konvansiyonel hücre kültürü şartlarında (37 °C ve %5 CO₂) kültüre edildi. Kültür işlemlerinde ilave büyüme gereksinimleri için 10 µg/mL rekombinant insan insülini (Gibco) ve 1 µM 4-hydroxytamoksifen (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

2.2. Proliferasyon tahlili

Hücrelere uygulanan D/L-Homosistein (Santacruz Biotechnology) etanol içerisinde çözündürülerek 1000 kat konsantrasyon stok hazırlandı. Hücrelere 48 saat süre ile 0.1, 0.5, 1 mM D/L-Homosistein ve/veya 2.5 µM tamoksifen uygulaması yapıldı. Kontrol uygulaması olarak eş hacimde çözücü uygulaması gerçekleştirildi. MCF-7/TAMR-1 hücrelerinin hücre proliferasyonundaki değişimler WST-1 hücre proliferasyon reaktifi (Takara) kullanılarak üreticinin

önerdiği protokol kullanılarak gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapıldı. 24 saat sonra ajanlar hücrelere 48 saat süre ile uygulandı. Süre sonunda her bir örneğe 20 µl WST-1 ajanı eklendi ve 2 saat süre ile hücre kültür şartlarında inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Takiben mikropłaka okuyucuda (BioTek, Epoch 2) 450nm dalga boyunda absorbans okuması gerçekleştirildi. Her bir örnek 3 teknik ve 3 biyolojik tekrar şeklinde çalışılmış olup sonuçlar grafikte % değişim olarak sunuldu.

2.3. İmmünoblotlama

İmmünoblotlama çalışmaları daha önce rapor edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir [23]. MCF-7/TAMR-1 hücreleri RIPA tamponu (50 mM Tris-HCl pH 7.5 içinde 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS) ile lizalandı. Lizatlanan örnekler 4 °C'de 20 dakika boyunca 14.000 r.p.m'de santrifüj edildi ve hücre pelleti uzaklaştırılarak süpernatant saklandı. Örneklerdeki toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi için BCA protein tahlil kiti (Takara) kullanıldı. Her bir örnek SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez işlemi ile proteinler ayrıştırıldı. Takiben protein örnekleri PVDF

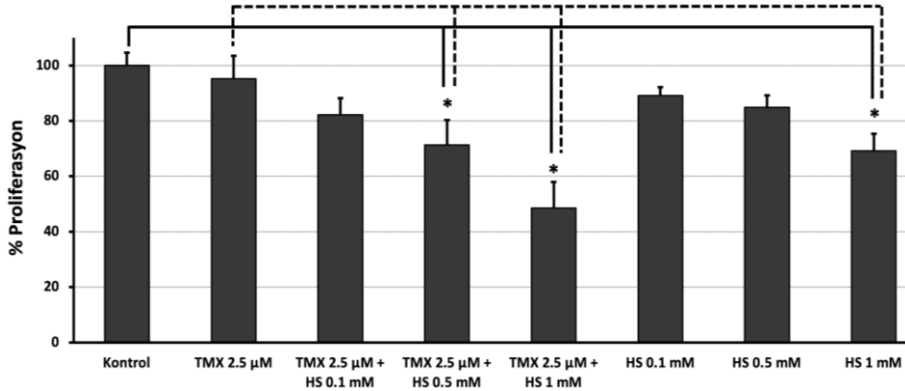
membrana transfer edildi. Transfer işlemi sonrasında sırasıyla blokama, birincil antikor uygulaması, yıkama, HRP konjuge ikincil antikor uygulaması, yıkama ve kemi-görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Protein bantlarının görüntülenmesi için ECL substrat kiti (Bio-Rad) kullanıldı. Protein bantları ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) sisteminde görüntüledi. İmmünoblotlamada anti-BiP, anti-CHOP, anti-p21, anti-p27 antikorları (Proteintech) ve anti-beta Aktin (Proteintech) birincil antikorları kullanıldı.

2.4. İstatistiksel değerlendirme

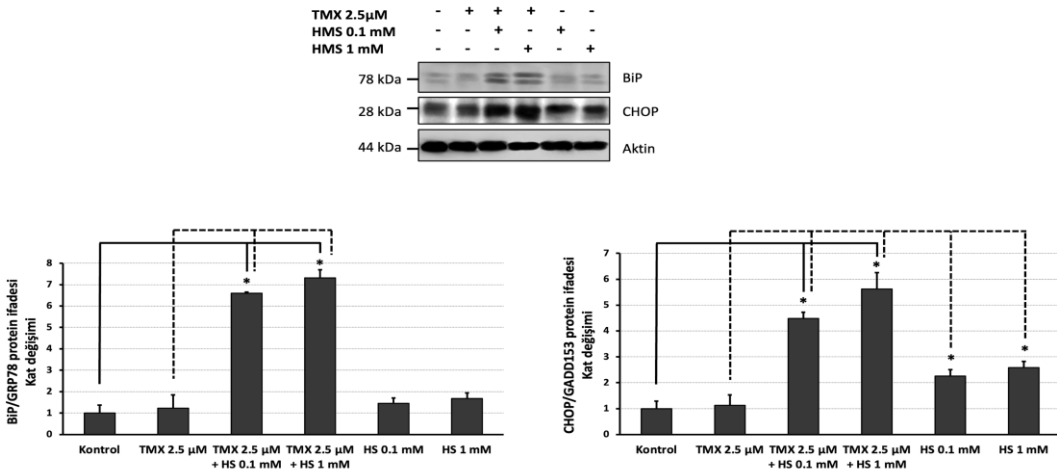
Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunuldu. Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığı GraphPad Prism 5 yazılımı kullanılarak minimum %95 güven aralığı ile Student t testi ile belirlendi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

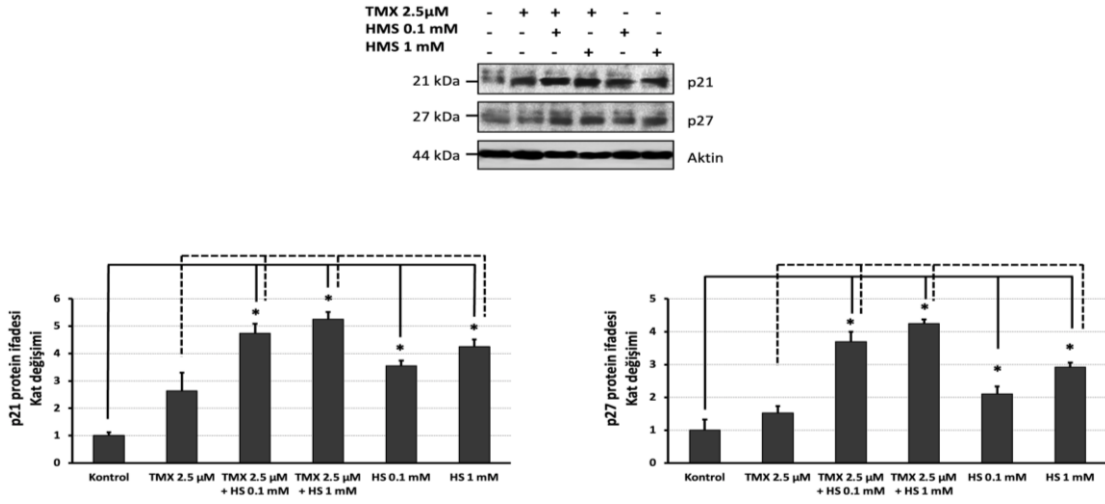
Tamoksifene dirençli MCF-7/TAMR-1 hücrelerine D/L-homosistein uygulamasının tamoksifen duyarlılığı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla WST-1 temelli hücre proliferasyon testi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla MCF-7 / TAMR-1



Şekil 1. D/L-Homosistein uygulaması MCF-7/TAMR-1 hücrelerinin tamoksifen duyarlılığını arttırarak hücre proliferasyonunu baskılar (* $p < 0.05$).



Şekil 2. D/L-Homosistein uygulaması MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde ER stresini indüklemektedir. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Protein bantları ImageJ yazılımı kullanılarak densitometrik olarak analiz edilmiş ve sonuçlar grafikte kat artışı cinsinden sunulmuştur (* $p < 0.05$).



Şekil 3. D/L-Homosistein uygulaması MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde hücre döngüsü akışını tutuklamaktadır. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Protein bantları ImageJ yazılımı kullanılarak densitometrik olarak analiz edilmiş ve sonuçlar grafikte kat artışı cinsinden sunulmuştur (* p<0.05).

hücreleri 48 saat süre ile 2.5 µM tamoksifen ve/veya 0.1, 0.5, 1 mM D/L-homosistein'e maruz bırakılmıştır. Bulgularımız tamoksifene ile eş uygulanan D/L-Homosistein'in doz bağımlı olarak MCF-7/TAMR-1 hücrelerinin proliferasyonunu yalnızca tamoksifen uygulanan gruba kıyasla daha etkili olarak baskıladığını göstermiştir. Hücrelerdeki tamoksifen duyarlılığı artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

D/L-homosistein'in ER stresi ile ilişkili süreçleri etkilediği rapor edilmiştir [24, 25]. Bu amaçla MCF-7/TAMR-1 hücreleri 24 saat süre ile 2.5 µM tamoksifen ve/veya 0.1 ve 1 mM D/L-homosistein'e maruz bırakılmıştır. Deney sonlandığında ER stresi ile ilişkili olan BiP/GRP78 ve CHOP/GADD153 düzeyleri immünoiblota ile incelenmiştir. Protein sonuçlarımız D/L-Homosistein uygulamasının BiP/GRP78 ve CHOP/GADD153 düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttırdığını göstermiştir. Ayrıca yalnızca tamoksifen uygulanan grup ile kıyaslandığında tamoksifen ile D/L-Homosistein eş uygulamasının BiP/GRP78 ve CHOP/GADD153 düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 2).

Önceki çalışmalarda D/L-homosistein'in hücre bölünmesi döngüsünün baskılanmasına neden olduğu rapor edilmiştir [10]. Buradan hareketle D/L-homosistein'in p21 ve p27 düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla MCF-7/TAMR-1 hücreleri 24 saat süre ile 2.5 µM Tamoksifen ve/veya 0.1 ve 1 mM D/L-homosistein'e maruz bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler lizatlanarak hücre döngüsünün baskılanması ile ilişkili siklin inhibitör proteinleri olan p21 ve p27 düzeylerindeki değişimler immünoiblota ile değerlendirilmiştir [26, 27, 28, 29]. Sonuçlarımız D/L-homosistein uygulamasının MCF-7/TAMR-1 hücrelerindeki p21 ve p27 ifade düzeylerini kontrol grubuna ve yalnızca tamoksifen uygulanan gruba kıyasla arttırdığını göstermiştir (Şekil 3).

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmalarımızda D/L-homosistein'in tamoksifene dirençli MCF-7/TAMR-1 meme kanseri hücrelerinin tamoksifen duyarlılığını artırarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan yaklaşımların başında tamoksifenin yer aldığı tedavi yaklaşımları yer almaktadır [30]. Ancak meme kanseri hücreleri reseptör ifadesi açısından heterojenite sergilemektedir. Bu nedenle meme kanseri hücrelerinin sergilediği östrojen reseptörü, progesteron reseptörü veya büyüme faktörü reseptörü ifade profillerine bağlı olarak tercih edilen tedavi yaklaşımları farklılıklar göstermektedir [31]. Seçici östrojen reseptörü modülatörü olan tamoksifen östrojen reseptörlerine östrojen bağlanmasını engelleyerek meme kanseri hücrelerinin karsinojenik özelliklerini baskılamaktadır [31]. Meme ve prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerine yönelik uygulanan tedavi stratejilerinde kanser hücreleri ilaç direnci geliştirebilmektedir. Bu durum tedavi protokollerinin en sınırlayıcı basamağını teşkil etmektedir [32]. Bu nedenle yeni keşfedilecek ilaç aday moleküllerine ve kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı duyarlılığını arttıracak yeni yaklaşımların geliştirilmesine duyulan ihtiyaç devam etmektedir.

D/L-homosistein metiyonin aminoasidinden türevlenen tiyol içeren bir aminoasittir [33]. Homosistein'in endotelial hücrelerinde hücre büyümenin tutuklanmasını ve ER stresi induksiyonu aracılı olarak apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir [9, 10, 12]. Bununla birlikte homosistein'in hepatosit hücrelerinin proliferatif özelliklerini ER stresi aracılığıyla inhibe ettiği rapor edilmiştir [25].

Tamoksifene direnç gelişimini iyi mimik eden MCF-7/TAMR-1 meme kanseri hücreleri ile

sürdürdüğümüz çalışmalarda D/L-homosistein uygulamasının hücre proliferasyonunu doz bağımlı olarak önemli ölçüde baskıladığı belirlenmiştir. D/L-homosistein'in tamoksifen ile kombine uygulaması MCF-7/TAMR-1 hücrelerinin proliferatif özelliklerini yalnızca D/L-homosistein ve tamoksifen uygulanan gruba kıyasla daha güçlü düzeyde doza bağlı olarak baskıladığını göstermiştir. Bu bulgular MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde D/L-homosistein uygulamasının tamoksifen ile sinerjistik etki sergileyerek tamoksifen duyarlılığını arttırarak meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını önermektedir (Şekil 1).

D/L-homosistein'in ER stresine olan etkisini değerlendirmek üzere BiP/GRP78 ve CHOP/GADD153 protein ifadelerindeki değişimler immüno blotlama ile incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre D/L-homosistein uygulaması sonrası MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde BiP/GRP78 ve CHOP/GADD153 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Tamoksifene karşı direnç kazanımında meme kanseri hücrelerinde ER stresinin anahtar rol oynadığı rapor edilmiştir [34]. Bulgularımız tamoksifen ve D/L-homosistein kombine uygulamasına bağlı olarak ER stresinin yalnızca tamoksifen uygulanan gruba kıyasla artmış olduğunu göstermiştir (Şekil 2). ER stresi sürecinde artan CHOP protein düzeylerinin ER stres aracılı apoptotik hücre ölümünü düzenlediği bilinmektedir [35]. Sonuçlarımız tamoksifen ve D/L-homosistein uygulamasına bağlı artan CHOP ifade düzeyleri ile ilişkili olarak MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün indüklendiğini önermektedir. Ancak bu sürecin karakterize edilebilmesi için ileri düzeyde analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda D/L-homosistein'in hücre döngüsünün tutuklanmasına aracılık ettiği rapor edilmiştir [9, 10]. Bu nedenle çalışmalarımızda iyi bilinen hücre döngüsü inhibitör proteinleri p21 ve p27 düzeyleri immüno blotlama ile incelendi. p21 hücre döngüsü progresyonunda G1/S ve G2/M geçişini sırasıyla CDK4,6/siklin-D ve CDK2/siklin-E inhibisyonu yolu ile baskılamaktadır [26, 27]. p27 CDK2/siklin E diğer siklin kompleksleri ile sürdürdüğü etkileşimler ile hücre döngüsünü G1 fazında sınırlandırmaktadır [28, 29]. Literatürdeki D/L-homosistein'in hücre döngüsünün tutuklanması ilişkili etkileri ile tutarlı olarak; MCF-7/TAMR-1 hücrelerine tamoksifen ve D/L-homosistein eş uygulamasının hücre döngüsü inhibisyonu ile ilişkili siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21 ve p27 protein ifade düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 3).

Çalışmamızdan elde edilen bulgular D/L-homosistein'in ER stresi induksiyonu ve hücre döngüsünün baskılanması aracılı olarak MCF-7/TAMR-1 hücrelerinin tamoksifen direncini zayıflattığını ve bu yol ile meme kanseri hücrelerinin

proliferatif özelliklerini sınırlandırdığını önermektedir.

Tamoksifen meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ancak reseptör ifade profillerindeki değişimler ve hücrelerde direnç gelişimi gözlenmesi nedeniyle çoğu zaman kullanımı sınırlanan seçici östrojen modülatörüdür. Çalışmamızda D/L-homosistein'in tamoksifen ile kombine uygulamasının *in vitro* da tamoksifene direnç gelişimini iyi mimik eden MCF-7/TAMR-1 hücrelerinde tamoksifen duyarlılığını ilerlettiği belirlenmiştir. Bulgularımız ER stresi ile ilişkili süreçlere etki edebilecek yeni moleküllerin tamoksifen ile kombine uygulamasının meme kanseri hücrelerinde gelişen tamoksifen direncine karşı uygulanacak alternatif yaklaşımlar açısından umut vaat ettiğini önermektedir.

Teşekkür

Bu çalışmadaki bazı analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan cihazlar ile destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (YETEM)'ne katkılarından dolayı teşekkür ederiz. Bu çalışmanın sürdürülmesinde Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminden alınan TSG-2021-8302 kod numaralı proje desteğinden faydalanılmıştır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., Coleman, W. B. 2013. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *The American journal of pathology*, 183(4), 1113-1124.
- [2] Hong, R., Ma, F., Xu, B., Li, Q., Zhang, P., Yuan, P., Wang, J., Fan, Y., Cai, R. 2014. Efficacy of platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer patients with metastases confined to the lungs: a single-institute experience. *Anti-Cancer Drugs*, 25(9),1089-1094.
- [3] Viedma-Rodríguez, R., Baiza-Gutman, L., Salamanca-Gómez, F., Diaz-Zaragoza, M., Martínez-Hernández, G., Ruiz Esparza-Garrido, R., Velázquez-Flores, M. A., Arenas-Aranda, D. 2014. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncology reports*, 32(1), 3-15.

- [4] Chang, M. 2012. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomolecules & therapeutics*, 20(3), 256–267.
- [5] Dorssers, L. C., Van der Flier, S., Brinkman, A., van Agthoven, T., Veldscholte, J., Berns, E. M., Klijn, J. G., Beex, L. V., Foekens, J. A. 2001. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs*, 61(12), 1721–1733.
- [6] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. 2005. *Global cancer statistics, 2002*. CA: a cancer journal for clinicians, 55(2), 74–108.
- [7] Welch, G. N., Loscalzo, J. 1998. Homocysteine and atherothrombosis. *The New England journal of medicine*, 338(15), 1042–1050.
- [8] Thambyrajah, J., Townend, J. N. 2000. Homocysteine and atherothrombosis-mechanisms for injury. *European heart journal*, 21(12), 967–974.
- [9] Zou, C. G., Banerjee, R. 2005. Homocysteine and redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 7(5-6), 547–559.
- [10] Outinen, P. A., Sood, S. K., Pfeifer, S. I., Pamidi, S., Podor, T. J., Li, J., Weitz, J. I., Austin, R. C. 1999. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood*, 94(3), 959–967.
- [11] Xu, D., Neville, R., Finkel, T. 2000. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS letters*, 470(1), 20–24.
- [12] Zhang, C., Cai, Y., Adachi, M. T., Oshiro, S., Aso, T., Kaufman, R. J., Kitajima, S. 2001. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), 35867–35874.
- [13] Kruman, I. I., Culmsee, C., Chan, S. L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L., Mattson, M. P. 2000. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *The Journal of neuroscience*, 20(18), 6920–6926.
- [14] Adams, C. J., Kopp, M. C., Larburu, N., Nowak, P. R., Ali, M. 2019. Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Frontiers in molecular biosciences*, 6, 11.
- [15] Hetz C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(2), 89–102.
- [16] Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., Ron, D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 12(7), 982–995.
- [17] McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., Holbrook, N. J. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology*, 21(4), 1249–1259.
- [18] Madden, E., Logue, S. E., Healy, S. J., Manie, S., Samali, A. 2019. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the cell*, 111(1), 1–17.
- [19] Robinson, C. M., Talty, A., Logue, S. E., Mnich, K., Gorman, A. M., Samali, A. 2021. An emerging role for the unfolded protein response in pancreatic cancer. *Cancers*, 13(2), 261.
- [20] Romero-Ramirez, L., Cao, H., Regalado, M. P., Kambham, N., Siemann, D., Kim, J. J., Le, Q. T., Koong, A. C. 2009. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas. *Translational oncology*, 2(1), 31–38.
- [21] Bahar, E., Kim, J. Y., Yoon, H. 2019. Chemotherapy resistance explained through endoplasmic reticulum stress-dependent signaling. *Cancers*, 11(3), 338.
- [22] King, A. P., Wilson, J. J. 2020. Endoplasmic reticulum stress: an arising target for metal-based anticancer agents. *Chemical Society reviews*, 49(22), 8113–8136.
- [23] Erzurumlu, Y., Ballar, P. 2017. Androgen mediated regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation and its effects on prostate cancer. *Scientific reports*, 7, 40719.
- [24] Werstuck, G. H., Lentz, S. R., Dayal, S., Hossain, G. S., Sood, S. K., Shi, Y. Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S. K., Malinow, M. R., Austin, R. C. 2001. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *The Journal of clinical investigation*, 107(10), 1263.
- [25] Yu, X., Lv, J., Zhu, Y., Duan, L., Ma, L. 2013. Homocysteine inhibits hepatocyte proliferation via endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*, 8(1), e54265.
- [26] Gartel A. L. 2006. Is p21 an oncogene?. *Molecular cancer therapeutics*, 5(6), 1385–1386.
- [27] Bertoli, C., Skotheim, J. M., de Bruin, R. A. 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8), 518–528.
- [28] Lloyd, R. V., Erickson, L. A., Jin, L., Kulig, E., Qian, X., Cheville, J. C., Scheithauer, B. W. 1999. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in

- human cancers. *The American journal of pathology*, 154(2), 313–323.
- [29] Vlach, J., Hennecke, S., Amati, B. 1997. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *The EMBO journal*, 16(17), 5334–5344.
- [30] Jordan, V. C. 1992. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Current problems in cancer*, 16(3), 129–176.
- [31] Manna, S., Holz, M. K. 2016. Tamoxifen action in ER-negative breast cancer. *Signal transduction insights*, 5, 1–7.
- [32] Vasan, N., Baselga, J., Hyman, D. M. 2019. A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309.
- [33] Strakova, J., Williams, K. T., Gupta, S., Schalinske, K. L., Kruger, W. D., Rozen, R., Jiracek, J., Li, L., Garrow, T. A. 2010. Dietary intake of S-(alpha-carboxybutyl)-DL-homocysteine induces hyperhomocysteinemia in rats. *Nutrition research*, 30(7), 492-500.
- [34] Ming, J., Ruan, S., Wang, M., Ye, D., Fan, N., Meng, Q., Tian, B., Huang, T. 2015. A novel chemical, STF-083010, reverses tamoxifen-related drug resistance in breast cancer by inhibiting IRE1/XBP1. *Oncotarget*, 6(38), 40692–40703.
- [35] Oyadomari, S., Mori, M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation*, 11(4), 381–389.