

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKRATOKSİN A GÜDÜMLÜ KARSİNOGENEZ
MEKANİZMALARININ HK-2 HÜCRELERİNDE SİNYAL İLETİ
YOLAKLARI VE PROTEOM DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

ZEYNEP ÖZCAN
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2015

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKRATOKSİN A GÜDÜMLÜ KARSİNOGENEZ
MEKANİZMALARININ HK-2 HÜCRELERİNDE
SİNYAL İLETİ YOLAKLARI VE PROTEOM
DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

ZEYNEP ÖZCAN
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI
II. DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. İBRAHİM YAMAN

GEBZE
2015

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF THE MECHANISMS OF
OTA-INDUCED CARCINOGENESIS AT THE
LEVELS OF SIGNALING PATHWAYS AND
PROTEOME IN HK-2 CELLS**

ZEYNEP ÖZCAN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS DEPARTMENT

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI
II. THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. İBRAHİM YAMAN

GEBZE
2015



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/01/2015 tarih ve 2015/05 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/02/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zeynep ÖZCAN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

(II. TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. İbrahim YAMAN

ÜYE

: Doç. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Can Murathan ERİŞTİ

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Okratoksin A (OTA) boşaltım organlarına ait tümörlerin ve Balkan Endemik Nefropati'nin nedeni olduğu düşünülen bir mikotoksindir. Hayvan deneylerinde OTA karsinogenitesi açıkça gösterilmiş olmasına rağmen, OTA teşvikli karsinogenez mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, *in vitro* bir sistem kullanılarak OTA teşvikli karsinogenez ve toksisite mekanizmalarının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde, moleküler biyolojik teknikler kullanılarak OTA etkisi altındaki sinyal yollarının aktivasyon durumları araştırılmıştır. İnsan proksimal tübül epitel (HK-2) hücrelerinde OTA'nın doz- ve zaman-bağımlı olarak PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 sinyal yollarının uzun süreli aktivasyonunu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca, HK-2 hücrelerinde OTA'ya cevaben bu iki yolağın zıt rollere sahip olduğu, OTA ile aktive edilen PI3K/Akt sinyal yolağı hücre sağkalımını desteklerken, OTA teşvikli MEK/ERK1-2 sinyal yolağının uzun süreli aktivasyonunun apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. OTA muamelesi yapılan hücrelerde, ERK1-2 aktivasyonunun kimyasal inhibisyonu ya da dominant-negatif ve kinaz-inaktif MEK1'in aşırı ifadesi hücre canlılığında artışla ve apoptotik hücre ölümünde azalmayla sonuçlanmıştır. PI3K/Akt sinyalinin Wortmannin ile inhibisyonu OTA'nın hücre canlılığına negatif etkisini ve apoptoz seviyelerindeki artışı daha da şiddetlendirmiştir. Ayrıca, HK-2 hücrelerinde, c-MET proto-onkogeni, OTA teşvikli PI3K/Akt sinyal aktivasyonundan sorumlu olan fakat MEK/ERK1-2 aktivasyonundan sorumlu olmayan bir reseptör tirozin kinaz olarak tanımlanmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde, LC-MS/MS analizi ile, OTA'nın renal toksisitesinin mekanistik süreçlerini daha iyi anlamak için proteomik yaklaşım kullanılmıştır. OTA muamelesi yapılan hücrelerde 393 farklı protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 40 tanesinin ifadesinde artma, 56 tanesinin ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Okratoksin A (OTA), HK-2 hücreleri, PI3K/Akt, MEK/ERK1-2, sağkalım, apoptoz, karsinogenez, LC-MS/MS.

SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin suggested to be a causative agent for urethelial tract tumors and Balkan Endemic Nephropathy. Even though in animal experiments the carcinogenicity of OTA has clearly been shown, the precise mechanisms underlying OTA-induced carcinogenesis remain unclear. Therefore, it was aimed to unearth the mechanism(s) of OTA-induced carcinogenesis and toxicity utilizing an in vitro system. In the first part of this study, it was investigated the activation status of the signaling pathways under OTA influence using molecular biological techniques. It was demonstrated that OTA induced sustained activation of the PI3K/Akt and MEK/ERK1-2 signaling pathways in a dose- and time-dependent manner in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. Moreover, it was demonstrated that these two pathways have opposite roles in response to OTA, while OTA-activated PI3K/Akt signaling pathway supports cell survival, OTA-induced sustained activation of the MEK/ERK1-2 signaling pathway leads to apoptosis in HK-2 cells. Chemical inhibition of ERK1-2 activation or overexpression of dominant-negative and kinase-dead MEK1 result in increased cell viability and decreased apoptotic cell death in OTA-treated cells. Inhibition of PI3K/Akt signaling with Wortmannin aggravated the negative effect of OTA on cell viability and increased the levels of apoptosis. Furthermore, the c-MET proto-oncogene was identified as one of the upstream receptor tyrosine kinase responsible for OTA-induced activation of PI3K/Akt signaling but not MEK/ERK1-2 activation in HK-2 cells. In the second part of this study, proteomics approach was employed to gain further insight into the mechanistic processes of the renal toxicity of OTA using LC-MS/MS analysis. A total of 393 distinct proteins were identified from which 40 were upregulated and 56 were downregulated in OTA-treated cells.

Key Words: Ochratoxin A (OTA), HK-2 cells, PI3K/Akt, MEK/ERK1-2, survival, apoptosis, carcinogenesis, LC-MS/MS.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilgisini ve deneyimlerini benimle her zaman cömertçe paylaşan, bilimsel düşüncenin ve çalışmanın nasıl olması gerektiğini bana öğreten, sorgulayıcı bir bakış açısı kazandıran, çalışmalarına titizlikle yön veren ve yeni boyutlar getiren, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında büyük katkılar yapan, bilgisi ve cesaretiyle kendisine sonsuz saygı ve hayranlık duyduğum danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim YAMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin değerlendirilmesi sürecindeki önemli katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, Doç. Dr. Uygur H. TAZEBAY'a Yrd. Doç. Dr. Can M. ERİŞTİ'ye ve Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI'ya,

laboratuvarını ve laboratuvar olanaklarını karşılıksız olarak bana sunan, bilgisi ve fikirleriyle her zaman yol gösterici olan, sonsuz saygı duyduğum değerli bilim adamı kimliğiyle Doç. Dr. Ferruh Özcan'a,

ihtiyaç duymamı beklemeden sundukları içten ve her zaman hayat kurtarıcı olan yardımları için, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, çok değerli laboratuvar arkadaşlarım, YamanLab üyeleri, Ayşin DEMİRKOL, Nehir BANAZ, Hilal KAHRAMAN, Tijen BERGİN ve Gizem GÜL'e,

aynı laboratuvar ortamında çalışmayı şans saydığım ve de çok keyif aldığım, her daim bilgisine, fikrine ve yardımına başvurduğum, değerli arkadaşım Tuncay ŞEKER'e,

uzun doktora eğitimim süresince farklı eğitim ve kazanımların hayatıma dahil edilmesinde emeği geçen, TÜBİTAK-MAM Gıda Enstitüsü çalışanlarına, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, arkadaşlarıma ve çalışanlarına ve de Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, arkadaşlarıma ve çalışanlarına,

ve bu doktora çalışmasının oluşmasında maddi kaynağı ve proje desteğini sağlayan Avrupa Moleküler Biyoloji Organizasyonu'na (EMBO) teşekkür ederim.

Ayrıca değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. OKRATOKSİN A	3
2.1. OTA'nın Absorbsiyonu, Metabolizması ve Boşaltımı	4
2.1.1. OTA'nın Hedef Organları	5
2.2. OTA Toksisitesi	7
2.3. OTA Toksisitesine Aracılık Eden Mekanizmalar	7
2.3.2. Oksidatif Stres	8
2.3.2.1. Lipit Peroksidasyonu	9
2.3.2.2. DNA "Eklenti" Oluşumu	9
2.3.3. Mitokondriyal Fonsksiyon Bozukluğu	10
2.3.4. Apoptoz	10
2.3.5. Ca ⁺² Homeostazisindeki Değişimler	12
2.3.6. Glukoz Homeostazisinin Bozulması	13
2.3.7. Hücresel Farklılaşma	13
2.4. OTA Karsinojenitesi ile İlişkili Hücre Sinyal Yolakları	14
2.4.1. Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinazlar (MAPK)	15
2.4.1.1. MEK/ERK Sinyal Yolağı	16
2.4.1.2. JNK Sinyal Yolağı	16
2.4.1.3. p38 Sinyal Yolağı	17
2.4.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı	18
3. PROTEOMİK YÖNTEMLER	20

3.1. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Analizi	20
4. MATERYAL ve METOT	24
4.1. Hücre Hattı ve Kültürü	24
4.2. OTA ve İnhibitörler	24
4.3. Kimyasallar, Materyaller ve Kitler	25
4.4. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	27
4.5. Hücre Canlılığı Analizi	27
4.6. Nekrotik Hücre Analizi	28
4.7. Hücre Apoptoz Analizi	29
4.8. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Western Blot	30
4.9. PathScan® Reseptör Tirozin Kinaz Analizi	32
4.10. Plazmid Kurguları	33
4.11. Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu	33
4.12. Transfeksiyon	34
4.13. Hücre Morfolojilerinin Değerlendirilmesi	34
4.14. Proteom Analizi için Hücre Peletlerinin Hazırlanması	35
4.14.1. LC-MS/MS Analizi	35
4.14.1.1. Protein Örneklerin Hazırlanması ve Triptik Parçalama	35
4.14.1.2. Protein Örneklerin LC-MS/MS Sistemine Enjeksiyonu	37
4.14.1.3. Proteinlerin Tanımlanması ve Farklılıkların Belirlenmesi	37
4.15. İfadesi Değişen Proteinlerin Yolak Analizi	38
4.16. İstatistiksel Analiz	38
5. SONUÇLAR VE YORUMLAR	39
5.1. OTA'nın Uygulanacağı Besiyeri Koşullarının Tespiti	39
5.2. OTA'nın HK-2 Hücre Canlılığına Etkisi	41
5.3. OTA Teşvikli Nekroz	42
5.4. OTA Teşvikli Apoptoz	43
5.5. OTA Teşvikli PI3K/Akt Sinyal Yolağının Aktivasyonu	44
5.6. OTA Teşvikli MEK/ERK1-2 Sinyal Yolağının Aktivasyonu	45
5.7. OTA Teşvikli Akt ve ERK1-2 Aktiasyonunun Zamana Bağlı İncelenmesi	47
5.8. OTA ile Aktive Olan PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 Sinyal Yolaklarının Hücre Canlılığındaki Rollerini	48

5.9. OTA ile Aktive Olan MEK/ERK1-2 Sinyal Yolağının Apoptoz ile İlişkisi	51
5.10. MEK/ERK1-2 Sinyalinin Gen Düzeyinde İnhibisyonu ve HK-2 Hücre Canlılığına Etkisi	52
5.11. HK-2 Hücrelerinde OTA Teşvikli c-MET Aktivasyonu	54
5.12. c-MET RTK'ın Kimyasal İnhibisyonu	56
5.13. Proteom Analizi	58
5.13.1. İfadesi Değişen Proteinlerin Dahil Oldukları Sinyal Yolaklarına Göre Değerlendirilmesi	80
5.13.2. İfadesi Değişen Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına Göre Değerlendirilmesi	82
5.13.3. İfadesi Değişen Proteinlerin Yer Aldıkları Biyolojik Süreçlere Göre Değerlendirilmesi	84
5.14. OTA Teşvikli Ubikuitin Proteozom Yolağı Aktiasyonu	86
6. TARTIŞMA	88
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	107
EKLER	108

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
$^{\circ}\text{C}$: Derece selsiyus
Ca^{+2}	: Kalsiyum iyonu
CO_2	: Karbondioksit
cm	: Santimetre
H^{+}	: Hidrojen iyonu
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
Na_3VO_4	: Sodyum ortovanadat
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
pH	: Bir maddenin asit veya alkali değerini anlamak için kullanılan ölçü, potansiyel hidrojen
$\Delta\psi_m$: Mitokondriyal membran potansiyeli
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ADP	: Adenozin iki fosfat
AIF	: Apoptozu teşvik eden protein
Akt	: Serin/treonin protein kinaz
ANOVA	: Değişken analizi
Asp	: Aspartik asit
ATP	: Adenozin üç fosfat
BCA	: Bikinkoninik asit
BEN	: Balkan Endemik Nefropati
BrdU	: Bromodeoksiüridin
BSA	: Sığır serum albümini

CLB	: Hücre lizis tamponu
c-MET	: Reseptör tirozin kinaz (hepatosit büyüme faktör reseptörü)
CST	: Cell Signaling Technology
DEVD	: Aspartik asit-glutamik asit-valin-aspartik asit dizisinden oluşan peptit
DH5 α	: <i>Escherichia coli</i> soyu
DMEM/ F-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/nutrient mixture F-12
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DN	: Dominant Negatif
DTT	: Ditiyo treitol
ECL	: Yükseltilmiş kemilüminesans
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	: Etilen glikol tetraasetik asit
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	: Endoplazmik retikulum
ERK1-2	: Hücre dışı sinyallerle düzenlenen serin/treonin kinazlar
EV	: Boş vektör
FBS	: Fetal sığır serumu
Glu	: Glutamik asit
GO	: GeneOntology veritabanı
GPCR	: G protein bağımlı reseptör
GTPaz	: GTP bağlayan ve hidroliz eden enzimler
HepG2	: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HK-2	: İnsan proksimal tübül epitel hücre hattı
HPV	: İnsan papilloma virüs
HRP	: Yabanturbu peoksidazı
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFR	: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü

IHKE	: İnsan böbrek epiteli hücre hattı
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KD	: Kinaz inaktif
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria-Bertani sıvı besiyeri
LC-MS	: Sıvı kromatografili kütle spektroskopisi
MAPK	: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MAPKK	: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz
MAPKK	: Mitojen ile aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz
Mcl-1	: Myeloid Cell Leukemia 1
MEK1-2	: MAPK/ERK Kinaz 1-2
mRNA	: mesajcı RNA
miRNA	: mikroRNA
MS	: Kütle spektroskopisi
mTOR	: Mammalian Target Of Rapamycin
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NT	: Transfekte edilmemiş
NTP	: Ulusal Toksikoloji Programı
NF-κB	: Transkripsiyon faktörü
OAT	: Organik Anyon Taşıyıcıları
OTA	: Okratoksin A
PARP	: Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDK1	: Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PHA	: c-MET inhibitörü
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinaz
PIP2	: Phosphatidylinositol (4,5)-bisPhosphate
PIP3	: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate
Phe	: Fenilalanin
PMSF	: Fenilmetansülfonil florür
psi	: İnç kareye pound cinsinden uygulanan kuvvet
PTEN	: Phosphatase and TENsin homolog
PVDF	: PolyVinylidene Fluoride

RIPA	: Hücre lizis tamponu
RLU	: Relative Luminescence Units
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SAPK	: Stres ile aktive olan protein kinaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
S.E.M.	: Standard Error of the Mean
S473	: 473. serin aminoasidi
S6 RP	: S6 ribozomal protein
TBS-T	: Tris-Buffered Saline-Tween 20
T308	: 308. treonin aminoasidi
UPLC	: Nano akış sıvı kromatografisi
UPY	: Ubikuitin Proteozom Yolağı
UV	: Ultraviyole
va	: Vücut ağırlığı
Val	: Valin
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
WRT	: Wortmannin
WT	: Yabanıl tip

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: OTA'nın kimyasal yapısı ve hidroliz ürünleri.	3
2.2: MAPK sinyal yolağının şematik gösterimi.	15
2.3: PI3K/Akt Sinyal Yolağı.	19
3.1: MS ^E ile veri toplama.	21
3.2: LC-MS/MS Cihazı.	23
4.1: Nekrotik hücre ölümü analizinin (CytoTox-Glo TM Assay) prensibi.	29
4.2: Apoptoz analizinin (Caspase-Glo [®] 3/7 Assay) prensibi.	30
5.1: Farklı FBS yüzdelерinin HK-2 hücre proliferasyonuna etkisi.	39
5.2: Farklı FBS yüzdelерinde OTA'nın HK-2 hücre proliferasyonuna etkisi.	40
5.3: OTA'nın HK-2 hücre canlılığına etkisi.	41
5.4: HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli nekroz.	42
5.5: HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli kaspaz 3/7 aktivasyonu.	43
5.6: HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli PARP kesilmesi.	44
5.7: a) OTA teşvikli Akt aktivasyonu, b) OTA teşvikli PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı proteinlerinin seviyeleri ve fosforilasyonları, c) fosfo-PDK1/total-PDK1 rölatif bant yoğunluğu.	45
5.8: OTA teşvikli a) MEK/ERK1-2 sinyal proteinlerinin aktivasyonu, b) p38 ve JNK inaktivasyonu.	46
5.9: PI3K/Akt and MAPK sinyal proteinlerine OTA'nın zamana bağlı etkisi.	47
5.10: İnhibitörlerin HK-2 hücrelerin canlılığına etkisi.	48
5.11: OTA ve inhibitörlerin HK-2 hücre morfolojisine etkisi.	49
5.12: PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 yolaklarının kimyasal inhibisyonu ve inhibitörlerin diğer proteinler üzerindeki etkileri.	50
5.13: PI3K/Akt ve MAPK/ERK1-2 sinyalinin inhibisyonu ile OTA'nın HK-2 hücre canlılığına etkisi.	51
5.14: OTA ile Aktive Olan MEK/ERK1-2 Sinyal Yolağının Apoptoz ile ilişkisi.	52
5.15: HK-2 hücrelerinin transfeksiyon verimliliği	53

5.16:	MEK1'in gen düzeyinde inhibisyonu	53
5.17:	Fonksiyonel olmayan MEK1'in aşırı anlatımının HK-2 hücre canlılığına etkisi.	54
5.18:	PathScan RTK Array'in fiziksel haritası.	55
5.19:	a) PathScan RTK Array analizi, b)RTK Array'deki fosfo-c-MET spotlarının yoğunluğu.	55
5.20:	a) OTA teşvikli c-MET aktivasyonu, b) fosfo-c-MET(Tyr1234)/total c-MET rölatif bant yoğunluğu.	56
5.21:	OTA teşvikli Akt aktivasyonundan sorumlu olan c-MET RTK.	57
5.22:	c-MET'in kimyasal inhibisyonunun HK-2 hücre canlılığına etkisi.	57
5.23:	c-MET inhibisyonunun OTA teşvikli apoptoza etkisi.	58
5.24:	İfadesi değişen proteinlerin dahil olduğu sinyal yolakları.	80
5.25:	OTA teşvikli ifadesi azalan proteinlerin dahil olduğu sinyal yolakları.	81
5.26:	OTA teşvikli ifadesi artan proteinlerin dahil olduğu sinyal yolakları.	82
5.27:	İfadesi artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaları.	83
5.28:	İfadesi azalan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaları.	84
5.29:	İfadesi artan proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler.	85
5.30:	İfadesi azalan proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler.	86
5.31:	a) OTA'nın HK-2 hücrelerinde total protein kararlılığına ve UPY'na etkisi, b) Doza bağlı, c) Zamana bağlı OTA teşvikli Mcl-1 proteininin ifade değişimleri, d) Mcl-1'in OTA teşvikli UPY ile yıkımı.	87
6.1:	OTA-aracılı karsinogenez modeli.	96

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: Tez çalışmasında kullanılan kitler.	25
4.2: Kimyasallar ve materyaller.	26
5.1: HK-2 hücrelerinde OTA-teşvikli ifadesi artan proteinler.	60
5.2: HK-2 hücrelerinde OTA-teşvikli ifadesi azalan proteinler.	70

1. GİRİŞ

Gıdalarda kontaminant olarak bulunan mikotoksinler çeşitli hastalıklara neden olmaları ve kanser riski taşımaları açısından geniş çapta araştırma konusu olmaktadır. Mikotoksinler küf mantarları tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Yenmeleri, solunmaları ya da cilde temasları durumunda zararlı olabildikleri için mikotoksinler abiyotik yani cansız tehlike sınıfında yer almaktadırlar. Mikotoksinler ya hayvan yemlerine bulaş sonucu ya da doğrudan insanlar tarafından yenen kontamine besinler yoluyla besin zincirine girerler. Besin zincirine giren mikotoksinlerin, sindirim sonrasında farklı organ ya da dokularda birikimi ile sonuçlanabilir [Marin, 2013].

Okratoksin A (OTA) başlıca *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus carbonarius* küf mantarı türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir. Üzüm, şarap, tahıl ve tahıl ürünleri, bakliyat, kahve, kakao, baharat, kurutulmuş meyveler ve kuruyemişler gibi çok geniş çapta besinde OTA kontaminasyonuna rastlanmaktadır. Ayrıca, hayvan yemlerinin OTA ile kontaminasyonu sonucunda hayvanların kan serumunda, böbrek ve karaciğer gibi yenilebilir sakatatlarında OTA kalıntıları görülebilmektedir [EFSA, 2006]. Uygun koşullarda saklanmayan tıbbi bitkiler ve bitki çaylarında da OTA'nın varlığı bildirilmiştir. Test edilen insan kan serumları, böbrekleri ve insan sütü örneklerinin % 50-100'ünde OTA'nın varlığı gösterilmiştir [Petzinger and Ziegler, 2000]. Eser miktarda olmasına rağmen, yüksek stabilitesi ve geniş çaptaki besin kontaminasyonu nedeniyle insan popülasyonu sürekli olarak OTA'ya maruz kalmaktadır [EFSA, 2006].

OTA'nın sıçanlarda ve erkek farelerde böbrek adenom ve karsinomlarını arttıran renal bir karsinojen olduğu, ayrıca farelerde karaciğer tümörlerini artırdığı gösterilmiştir [NTP, 1989], [IARC, 1993]. İnsanlarda OTA'nın Balkan Endemik Nefropati (BEN) hastalığının patogenezi ve üriner sistem tümörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [Castegnaro, 2006]. OTA'nın nefrotoksik, nefrokarsinojenik ve immünotoksik olduğunu gösteren hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlar doğrultusunda, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC) tarafından OTA, olası insan karsinojeni (2B kategorisi) olarak sınıflandırılmıştır [IARC, 1993].

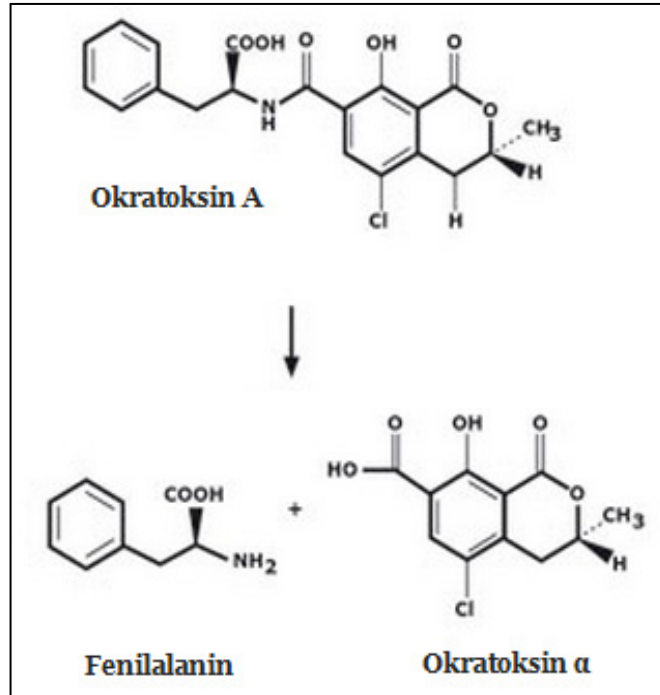
OTA karsinogenisitesi için farklı etki mekanizmaları önerilmektedir. Bir yandan OTA'nın ve/veya olası metabolitlerinin genotoksik maddeler olduğu ve DNA'ya kovalent olarak bağlanarak karsinogenezi teşvik ettiği önerilirken, diğer yandan OTA'nın epigenetik mekanizmalarla tümör oluşumunu tetikleyen "genotoksik olmayan" bir karsinojen olduğu savunulmaktadır [Dai et al., 2004], [Faucet et al., 2004], [Jennings-Gee et al., 2010], [Arbillaga et al., 2007a]. Önerilen epigenetik mekanizmalar arasında, oksidatif stres ile ilişkili DNA hasarı, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, apoptozdan kaçış, makromolekül sentezinin inhibisyonu ve sinyal ileti yollarının yeniden düzenlenmesi yer almaktadır [Gautier et al., 2001a], [Petrik et al., 2003], [Eder et al., 2000], [Braunberg et al., 1992], [Marin-Kuan et al., 2007]. Yoğun çalışmalara rağmen, OTA'nın karsinogenezdeki moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasındaki amacımız, OTA karsinogenisitesini moleküler düzeyde araştırmak ve proteomik temelli yaklaşım kullanarak karşılaştırmalı olarak incelemektir. Bu amaçla, OTA muamelesi altındaki HK-2 insan böbrek proksimal tübül epitel hücrelerinin kontrol grubu hücrelerine göre protein ifadesindeki ve bazı merkezi sinyal iletim yollarının aktivasyonundaki farklılıklar Western blotlama ve proteom analizi ile belirlenmiştir. Gruplar arası kantitatif proteom farklılıklarının belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Etkilenen sinyal ileti yolları ve tanımlanan proteinlerin birlikte değerlendirilmesi sonucu OTA karsinogenitesinin mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler sonucu OTA'nın hücre içinde etkilediği sinyal ileti yollarının bir kısmı tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarının OTA muamelesi altındaki görevleri belirlenmiştir. Çalışmada ilk kez MEK/ERK1-2 sinyal ileti yolağının HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli apoptoz için çalıştığı gösterilmiştir. Ayrıca, OTA muamelesi altındaki hücrelerin PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ile apoptozdan kaçış ve hayatta kalmayı başarabildikleri belirlenmiştir. OTA'nın PI3K/Akt yolağının aktivasyonu için c-MET reseptörünü aktive ettiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler dahilinde, OTA'nın karsinogenisitesi ile ilişkili sinyal yolları belirlenerek, literatürün bu konudaki boşluğu büyük oranda kapatılmıştır.

2. OKRATOKSİN A (OTA)

İlk kez 1965 yılında *Aspergillus ochraceus* Wilh.'ten izole edilerek toksik bir metabolit olarak tanımlanmış ve okratoksin A (OTA) olarak adlandırılmıştır. Aynı yıl OTA'nın analogları olan okratoksin B (OTB) ve C (OTC) de tanımlanmıştır. OTA, L-β-fenilalanin molekülüne peptit bağıyla bağlı olan bir dihidroizokumarin (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarin) molekülünden oluşur. Okratoksinler arasında en toksik olan form OTA'dır. OTA'nın hidrolizi sonucu Okratoksin α ve fenilalanin oluşur [van der Merwe et al., 1965]. OTA'nın kimyasal yapısı ve hidrolizi sonucu oluşan ürünler Şekil 2.1'de verilmiştir. Okratoksin α, klorlu dihidroizokumarin molekülüdür ve test edilen tüm canlılarda OTA'nın başlıca metabolitidir [JECFA, 2007].



Şekil 2.1: OTA'nın kimyasal yapısı ve hidroliz ürünleri.

OTA yüksek derecede stabil bir moleküldür. Bilinen ve yaygın olarak kullanılan gıda işleme teknikleri OTA'nın yıkımı için güçsüz kalmaktadır. Kuru buğdayda kontaminasyon sonucu var olan OTA'nın en az %50'sinin yıkımı için 250 °C'ta en az 6 dakika ısıl işlem gerekmektedir [Boudra, 1995]. Ayrıca pişirme sonrasında sıcaklıkla uyarılan OTA'nın 3R-epimerlerinin oluştuğu da tespit

edilmiştir. Kavrulmuş kahvede ve insan serumunda OTA'nın sıcaklıkla uyarılan 3S-epimerine (3S-OTA) rastlanmıştır [Studer-Rohr et al., 1995a]. OTA'nın yarı ömrü farklı canlılar arasında farklılık göstermektedir. Balıklarda 42 dakika iken maymunlarda 510 saate kadar uzamaktadır. Gönüllü erkek denek ile yapılan bir çalışmada, insanlarda OTA'nın plazmadan eliminasyon yarı ömrü 35.5 gün (840 saat) olarak hesaplanmıştır [Studer-Rohr, 1995b].

2.1. OTA'nın Absorbsiyonu, Metabolizması ve Boşaltımı

Zayıf bir organik asit olan OTA'nın pKa değeri, fenilalanin artığının karboksil grubu nedeniyle 4.2-4.4 ve fenolik grubu nedeniyle de 7.0-7.3 aralığında değişir. Bu asidik artıklar OTA absorpsiyonunda rol oynar [Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007]. Ayrışmamış formdaki OTA lipofilik karakterinden dolayı hücre membranından geçebilme özelliğindedir, ayrışmış formu ise (pH 7.4'te 2/3) hidrofildir [Gekle et al., 2005].

OTA başlıca küçük ince bağırsak olmak üzere gastrointestinal sistemden etkin bir şekilde emilip kan yoluyla böbreklere taşınır. Kanda OTA'nın % 99'u başta albümin olmak üzere serum proteinlerine bağlanır. Bu nedenle vücut içindeki yarı ömrü de uzamış olur. OTA, organik anyon taşıyıcı (OAT) proteinler sayesinde böbrek tübüllerinden atılır ve başta proksimal tübül olmak üzere tüm nefron segmentleri tarafından OAT ve H⁺-dipeptit taşıyıcı proteinleri sayesinde tekrar geri emilir [Dahlmann et al., 1998]. Bu taşıyıcı proteinler ve geri emilim mekanizması OTA'nın böbreklerde birikmesine neden olur [Schwerdt et al., 1996]. Bundan dolayı böbrek OTA'nın ana hedef organı olarak düşünülmektedir. Karaciğerde, kaslarda ve yağ dokuda da OTA'nın varlığı tespit edilmiştir [JECFA, 2007].

Dünya Sağlık Örgütü OTA'nın tolere edilebilir haftalık alım miktarı 100 ng/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. OTA'nın sığırlarda, tavşanlarda, insanda ve geviş getiren hayvanlarda süte geçtiği gösterilmiştir. OTA idrar ve dışkı ile dışarı atılır. Serum proteinlerine bağlanması ve enterohepatik sirkülasyonu nedeniyle boşaltım organlarının OTA tarafından en çok etkilenen organlar olması kaçınılmazdır [JECFA, 2007].

OTA'ya maruz kalan insanlarda plazmada OTA konsantrasyonunun nanomolar seviyede olduğu gösterilmiştir. Farklı ülkelerden sağlıklı insanların kanları analiz edildiğinde plazmada tespit edilen ortalama OTA'nın konsantrasyonunun 0.1-10

ng/ml arasında değiştiği bildirilmiştir. İstisnai olarak kanda çok daha yüksek OTA konsantrasyonlarına (160 ng/ml) da rastlanmıştır [EFSA, 2006].

2.1.1. OTA'nın Hedef Organları

OTA'nın doğal kontaminasyon dozlarının seçici olarak böbrekleri ve böbrek fonksiyonlarını etkilediği, bunun yanı sıra karaciğer, immün sistem ve beyin hücrelerinin de OTA'nın olası hedefleri olduğu gösterilmiştir.

Böbreklerde doku ağırlığı başına kan akışı çok yüksektir ve bu durum diğer organlara kıyasla daha fazla miktarda OTA geçişi ile sonuçlanır. Ayrıca, serbest OTA proksimal tübüllerden salınır ve ardından yeniden emilir. Bu emilim başlıca proksimal düz tübül olmak üzere, Henle kulpunun yukarı uzanan kalın kolunda ve toplama kanallarında gerçekleşir. Bu durum renal dokularda OTA birikimi ile sonuçlanır. Renal dokularda en yüksek OTA konsantrasyonu papilla ve i medullada tespit edilmiştir [Gekle et al., 2005]. OTA ile beslenen F344 erkek sıçanlarda patolojik olarak OTA'dan en şiddetli etkilenen organın böbrekler olduğu ve böbrek epitelinde sitoplazmik vakuol oluşumunun ve karyomegalinin belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca renal tübül epitel hücre membranlarında böbrek hasarının özgül biyobelirteci olan Kim-1 (kidney injury molecule-1)'in varlığı gösterilmiştir [Qi et al., 2014]. OTA'nın nefrotoksik karakteri iyi bilinmektedir. Domuz nefropatisinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. OTA ile kontamine yemle beslenen domuzlarda nefropati görülme oranının arttığı gösterilmiştir [Stoev et al., 2012].

OTA ile beslenen erkek F344 sıçanların karaciğerlerinde bbrektekine benzer oranda OTA birikimi bildirilmiştir. Ancak OTA'nın böbrek ve karaciğerde farklı metabolik süreçlere ait olan genlerin anlatımında değişime sebep olduğu gösterilmiştir [Arbillaga et al., 2008]. Kronik OTA muamelesinin sıçan karaciğerinde böbrek için tanımlanan fibroz durumundan farklı bir durum oluşturduğu belirtilmektedir. OTA teşvikli karaciğer hasarının aslında oksidatif stresin dengelenmesinde zayıflık olduğu durumlarda ortaya çıktığı ifade edilmektedir. Bu durumda ortaya çıkan ılımlı oksidatif stresin, hücreler arası iletişimden sorumlu olan yakın desmosomlar (gap junctions) ve hücre-hücre adezyonlarının kaybı ile birlikte hücrenin sürekli bölünmesini teşvik edebileceğini ve hepatokarsinomların

oluşumundan sorumlu olabileceğini öngören bir hipotez de mevcuttur [Gagliano et al., 2006].

OTA'nın bağışıklığı baskılayıcı aktivitesi timus, dalak ve lenf nodları gibi hayati öneme sahip immün sistem organlarının boyutlarındaki küçülmeyle, antikor yanıtlarının azalmasıyla, immün sistem hücrelerinin fonksiyonundaki ve sayısındaki değişimlerle ve sitokin üretimindeki azalmalarla karakterize edilmektedir. OTA'nın immünotoksik aktivitesi, hasar yaratan değişimlerin sebep olduğu hücre ölümlerinin ardından, protein sentezinin inhibisyonu nedeniyle immün sistem hücrelerinin yerine konmasındaki yavaşlama nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir [Al-Anati and Petzinger, 2006]. OTA teşvikli apoptoz insan periferel lenfositleri, insan lenfoit T hücre hattı (Kit 225 hücreleri) ve sığır lenfositleri gibi immün sistem hücrelerinde de gözlenmiştir [Assaf et al., 2004], [Lioi et al. 2003].

Makrofajlar immün yanıtta, tümörlere ve bakterilere karşı verilen konukçu savunmada (host defense) önemli rolere sahiptirler. İnflamasyon sırasında, erken yanıt olarak COX-2 (cyclooxygenase-2) ve iNOS'un (inducible nitric oxide synthase) *de novo* sentezinin arttığı bilinmektedir. OTA'nın fare peritonal makrofajlarında COX-2 ve Hsp-72 (heat shock protein-72) protein ifadelerinin arttırdığı, fare makrofaj hücre hattında (J774A.1) düşük konsantrasyonda (3 µM) COX-2 ve iNOS ifadesini arttırdığı, yüksek konsantrasyonda (10 µM) ise azalttığı hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerle gösterilmiştir [Ferrante et al., 2006], [Ferrante et al., 2008]. OTA'nın glia hücrelerinde de pro-inflamatuar yanıtta rol oynayan iNOS ve anti-inflamatuar yanıtla ilişkili olan PPAR-γ (peroxisome proliferator activating receptor-γ) gibi genlerin mRNA seviyelerini güçlü bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir [Zurich et al., 2005]. Ancak OTA'nın inflamatuvar enzimler ve aracılar üzerine olan etkisinin de hücre tipine bağlı olduğu bildirilmektedir.

NF-κB aktivasyonu IκBα olarak adlandırılan inhibitör protein ile düzenlenir. IκBα, NF-κB'yi sitosolde tutar. Pro-inflamatuar sinyallere cevaben IκBα hızlıca fosforillenir, poli-ubikuitinlenir ve 26S proteozom tarafından yıkılır. Serbest kalan NF-κB nükleusa geçer ve özgül pro-inflamatuar genlerin transkripsiyonunu başlatır [Baeuerle and Baltimore, 1996]. OTA'nın IκBα yıkımını ve p65 NF-κB ekspresyonunu arttırarak, NF-κB aktivasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir [Ferrante et al., 2008].

2.2. OTA Toksisitesi

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (National Institutes of Health, NIH) Ulusal Toksikoloji Programı (National Toxicology Program) kapsamında sıçanlar üzerinde yapılan toksikoloji ve karsinogenez araştırmaları sonucu OTA'nın nefrotoksik ve renal karsinojen olduğu gösterilmiştir [NTP, 1989]. Sıçanlarda çok düşük OTA dozlarında (0.07 mg/kg va/gün) bile böbrek tümörlerinin indüklendiği tespit edilmiştir [Boorman et al., 1992]. Farelerde erkek cinsiyetinin OTA'ya karşı daha duyarlı olduğu belirtilirken, dişi sıçanlarda OTA'nın meme fibroadenomalarının varlığını arttırdığı gösterilmiştir [Bendele et al., 1985], [Boorman et al., 1992].

OTA'nın başlıca hedef organının böbrek olması ile ilişkili olarak, insanlarda OTA'nın nefropati ve üriner sistem kanserleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Hayvanlarda, OTA alımının testis kanserinin görülme sıklığı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hayvan deneylerinden elde edilen veriler doğrultusunda OTA'nın teratojenik, genotoksik, karsinojenik ve immünotoksik bir ajan olduğu bilinmektedir [Marin et al., 2013].

Vero, LLC-PK1, NRK-52E, V79, OK gibi farklı hücre hatları ve primer kültür hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* deneylerle de OTA'nın güçlü bir sitotoksik ajan olduğu ve proliferasyonu tetikleyici sonuçlara sebep olduğu gösterilmiştir [Baudrimont et al., 1997], [O'Brien et al., 2001], [Kamp et al., 2005a], [Sauvant et al., 2005a].

2.3. OTA Toksisitesine Aracılık Eden Mekanizmalar

Literatürde OTA toksisitesine aracılık ettiği gösterilen/önerilen mekanizmalar arasında doğrudan ya da dolaylı yoldan makromolekül sentezinin inhibisyonu, DNA "eklentisi" oluşumu, lipit peroksidasyonu, oksidatif hasar, mitokondrial fonksiyon bozukluğu yer almaktadır [Gekle et al., 2005]. OTA'nın hücrel kalsiyum homeostazisi ile ilişkili genlerin anlatımını değiştirdiği, HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 alpha) ve Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) transkripsiyon faktörleri ile düzenlenen yolların bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir. HNF4 α sinyalindeki azalmanın renal karsinojenite ilişkili olduğu önerilmiştir. Birçok Nrf2

ile düzenlenen gen kimyasal detoksifikasyon ve antioksidan yanıtta rol alan enzimleri kodlamaktadır. Bu nedenle böbrekte Nrf2 sinyali ile düzenlenen proteinlerin yokluğunun hücrenin savunma mekanizmasını zayıflatarak oksidatif streste kronik bir yükselmeye sebep olduğu önerilmektedir [Marin-Kuan et al., 2006].

OTA'nın hayvan sağlığı üzerine etkileri geniş çapta çalışılmıştır. Diğer yandan OTA'nın hücreler üzerine etkisini anlamak için hücre kültürü çalışmaları büyük yarar sağlamaktadır. Farklı türlerden elde edilen hücre hatları ve primer kültür kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda, OTA'ya cevabın hücre tipine göre farklılaştığı bulunmuştur. Bazı hücreler OTA'ya daha dirençli iken, bazılarının daha düşük OTA konsantrasyonlarından etkilendiği belirlenmiştir.

2.3.1. Makromolekül Sentezinin İnhibisyonu

OTA yapısal olarak içerisinde fenilalanin aminoasidi (Phe) içerir. Bu nedenle, fenilalanini substrat olarak kullanan birçok enzim için inhibitör etkisine sahip olduğu düşünülmektedir. Özellikle Phe-tRNA sentetaz'ı inhibe ederek protein sentezi inhibisyonuna neden olabileceği ileri sürülmektedir. Fenilalanine benzer özelliği nedeniyle OTA aynı zamanda antibiyotik bir moleküldür. pH seviyesi 7'den düşük ortamlarda Gram-pozitif bakterilerin büyümesini inhibe eder. OTA'nın, fenilalanin ile yarışarak, Phe-tRNA sentetaz enzimine bağlandığı ve saflaştırılmış *Bacillus subtilis* Phe-tRNA sentetaz'sı kullanılarak yapılan çalışmada enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [Roth et al., 1993].

2.3.2. Oksidatif Stres

Canlı organizmaların çoğu hayatta kalmak için oksijene ihtiyaç duyar. Oksijen hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) ve süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$) gibi reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturma eğilimindedir. Normal fizyolojik durumda, canlı sistemlerde ROT üretimi ve ROT'un nötralizasyonu arasında bir denge vardır, bu nedenle oksidatif stres meydana gelmez. Ancak ağır metaller, ilaçlar, toksinler, UV, diyabet gibi nedenlerle oksidan ve antioksidan arasındaki denge bozulup oksidan tarafına kayduğunda oksidatif stres durumu ortaya çıkar. Oksidatif stres genellikle hayati

hücresel bileşenlerin ciddi oksidatif hasara uğradığını ve sonunda hücre canlılığının tehlikede olduğunu bildiren bir durumu ifade eder. Oksidatif stres boyunca ROT birikimi gerçekleşir. Kısa ömürlü olsalar da yüksek oranda reaktif olmaları nedeniyle fazla miktarda ROT üretimi sonucu hücrede bulunan protein, lipid ve nükleik asitlerin oksidatif hasara uğraması kaçınılmaz olmaktadır [Sinha et al., 2013]. Artmış oksidatif stres kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi çeşitli patolojik durumların oluşumunda kritik rol oynar [Trachootham et al., 2008].

2.3.2.1. Lipit Peroksidasyonu

Yüksek ROT seviyeleri DNA, protein ve lipid gibi hücresel moleküllerin oksidatif hasarlarına yol açabilir [Sinha et al., 2013]. Oksidatif hücre hasarına neden olan serbest radikal oluşumunun OTA sitotoksitesisi ve karsinojenitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Lipit peroksidasyonu ile oluşumu başlatılan reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot}) buldukları hücrelerdeki membranları, proteinleri ve nükleik asitleri hedef alarak geniş çapta doku lezyonları oluştururlar. Sıçanlarda OTA'nın karaciğer ve böbreklerde lipid peroksidasyonunu arttırarak oksidatif hasara neden olduğu *in vivo* ve *in vitro* deneylerle gösterilmiştir [Gautier et al., 2001a], [Klaric et al., 2006], [Ramya et al., 2014]. Maymun böbrek hücrelerinde OTA ile tetiklenen lipid peroksidasyonunun, oksijen radikallerinin temizleyicileri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi enzimler ve çeşitli antioksidanlar varlığında azaldığı saptanmıştır [Baudrimont et al., 1997], [Ramya et al., 2013].

2.3.2.2. DNA “Eklenti” Oluşumu

OTA'nın genotoksik olduğunu ve OTA'nın ya da metabolitlerinin doğrudan DNA'ya kovalent bağlarla bağlanarak DNA “eklenti”lerini oluşturduğunu ve bu yolla karsinojenik etkilerini sergilediğini savunan Pfohl-Leszkowicz ve çalışma arkadaşları ^{32}P -etiketleme yöntemi ile bu DNA “eklenti”lerini görüntüleme çalışmaları yürütmektedirler. Fare ve sıçanlarda tek bir OTA muamelesi sonrasında bile böbreklerde ve karaciğerde DNA “eklenti”lerinin oluştuğunu ve çeşitli antioksidanlar varlığında bu eklentilerin % 90'lara varan oranlarda azaldığını

bildirmişlerdir [Grosse et al., 1997]. Ancak benzer bir çalışmayı yürüten Gautier ve arkadaşları, trityum ile işaretli OTA (^3H -OTA) ve ^{32}P -etiketleme yöntemini birlikte kullanmış ancak bu eklentilerin oluşumunu tespit edememiştir. Bu deneyin sentetik OTA-DNA adduct standardı kullanmadan yapıldığı için ^{32}P -etiketleme ile belirlenen “eklen”lerin yapısının bilinmediği ve bu lezyonların aslında DNA’ya doğrudan bağlanan OTA metabolitlerinden ziyade OTA’nın sitotoksik etkisi sonucu oluşan ve DNA ile reaksiyona giren ROT partikülleri olabileceği yönünde bir hipotezleri bulunmaktadır [Gautier et al., 2001b]. DNA hasarının oksidatif stres kaynaklı olduğunu savunan ve ayrıca OTA’nın protein oksidasyonunu da gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur [Kamp et al., 2005b].

2.3.3. Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu

Mitokondri apoptozda merkezi bir role sahiptir. Mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin artması proapoptotik faktörler olan sitokrom c ve AIF (apoptosis inducing factor) gibi proteinlerin salınımına yol açar. Mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) kaybının normal mitokondriyal fonksiyonun bozulması yoluyla hücre ölümü (apoptoz) ile ilişkilendirilmektedir [Lakhani et al., 2006].

İnsan böbrek epitel hücrelerinde (IHKE1; immortalized human kidney epithelial), OTA’nın Ca^{+2} homeostasisi ile etkileşerek Na^+/H^+ değişimini ve mitokondri aktivasyonunu arttırdığı sonucuna varılmıştır. Mitokondriyal metabolizmanın uyarılması sonucu proton üretiminin yükseltildiği buna karşın anaerobik glikolizisin etkilenmediği gösterilmiştir. OTA’nın Ca^{+2} bağımlı olarak $\Delta\psi_m$ ’nin hiperpolarizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, OTA muamelesi sonrasında mitokondri-bağımlı hücre ATP seviyesinde artış gözlenmiştir [Eder et al., 2000].

2.3.4. Apoptoz

Embriyogenezden immün sistemin gelişimine kadar birçok biyolojik süreçte önemli bir role sahip olan apoptoz ya da diğer bir ifadeyle programlı hücre ölümü evrimsel olarak korunmuş bir intihar mekanizması olarak bilinir [Tewari et al., 1995]. Apoptoz sırasında hücreler ilk önce küçülüp büzülür ve hücre çekirdeği

yoğunlaşır. Ardından zarla çevrili olan apoptotik cisimlere parçalanırlar. Apoptozun biyokimyasal belirteçleri arasında kaspazlar gibi özgül proteazların aktivasyonu, PARP'ın (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) kesilmesi ve DNA'nın fragmanlara ayrılması yer alır [Proskuryakov et al., 2003].

Efektör (etkileyici) kaspazlar olarak da adlandırılan kaspaz 3 ve kaspaz 7 apoptozun çok önemli düzenleyicileridir. Apoptoz ile ilişkili mitokondriyal olaylarının düzenlenmesini, $\Delta\Psi_m$ 'nin kaybını ve AIF salınımını kontrol ederler. Ayrıca başlatıcı ölüm sinyalinin amplifikasyonunu sağlayarak daha sonra meydana gelecek olan sitokrom c salınımını güçlendirirler. Kaspaz 3 DNA fragmanlarının oluşumunu ve apoptozdaki morfolojik değişimleri kontrol ederken, kaspaz 7'nin bu süreçlerdeki rolünün daha az olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 7'nin hücre canlılığının kaybının düzenlenmesinde daha önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Kaspaz substratı olan PARP'ın kesilmesi de kaspaz 3 ve kaspaz 7'ye bağlıdır [Lakhani et al., 2006].

Nükleusa özgü bir protein olan PARP (116 kDa) apoptoz sırasında özgül olarak kesilerek 85 kDa'luk bir fragmanı verir [Tewari et al., 1995]. DNA kırıklarını tanıyarak aktive olan PARP, NAD⁺ molekülünü donör olarak kullanarak ADP-riboz polimerlerini oluşturur ve bu polimerleri bir ester bağı ile hedef proteinlerdeki glutamik asit, aspartic asit ve lizin aminoasitlerine ekler. Diğer bir deyişle PARP, poli(ADP-ribozil)asyon (PARilasyon) olarak adlandırılan bu eşsiz posttranslasyonel modifikasyonu gerçekleştiren bir enzimdir. Hasarlı dokularda PARP'ın aşırı aktivasyonu mitokondri ile ilişkili hücre ölümünü uyardığı da bildirilmiştir [Ba and Garg, 2011].

Kültür hücrelerinde OTA'nın nanomolar gibi düşük dozlarda başlıca apoptotik olmak üzere ölümü teşvik ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Keseli sıçan (opossum kidney; OK hücreleri), köpek (MDCK; Madin-Darby canine kidney) ve insan (IHKE) kaynaklı hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda OTA'nın apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir [Schwerdt et al., 1999]. Gekle ve arkadaşları MDCK-C7 ve MDCK-C11 hücreleri ile yaptıkları çalışmada OTA'nın nanomolar dozlarının özgül olarak apoptozu uyardığını bildirmişlerdir. Ayrıca OTA muamelesi altındaki MDCK-C11 hücrelerinin MDCK-C7 hücrelerine göre apoptoza daha dirençli olduğunu göstermişlerdir [Gekle et al., 2000]. Böbrek toplama kanallarından köken alan MDCK hücrelerinden elde edilen C7 ve C11 hücre klonları farklı fonksiyon, morfoloji ve karyotipe sahiptir. MDCK-C7 hücreleri çok köşeli ve yassı

morfolojiye sahipken, MDCK-C11 hücrelerinin kübik ve yüksek yapılı morfolojisi vardır. Bu morfolojik özellikleriyle MDCK-C7 hücreleri renal toplama kanallarının “principal” ve MDCK-C11 hücreleri ise “intercalated” hücrelerine benzerler. MDCK-C7’nin diploid kromozom sayısı 83.1 +/- 0.2 (n = 139) iken, MDCK-C11 hücrelerinininki 78.8 +/- 0.1 (n = 128). Alkali stres koşullarında, etkin hücre içi pH kontrol mekanizmalarına sahip olması nedeniyle, MDCK-C11’in daha dirençli olduğu, buna karşın MDCK-C7’nin transforme olduğu gösterilmiştir [Wünsch et al, 1995].

OTA’nın apoptotik yolakla ilişkili bazı genlerin miktarında artışa sebep olduğu hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda yapılan deneylerin “mikrodizin” analizi ile de gösterilmiştir [Lühe et al., 2003].

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada OTA’nın hem proksimal hem de distal epitel böbrek hücrelerinde apoptoza giden hücre sayısında artışa sebep olduğu TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) yöntemi ile belirlenmiştir. OTA ile kontamine yemle beslenen sıçanların böbrek dokularında gözlenen apoptozda 10 gün sonrasında 5 kat, 30 gün sonrasında 6.4 ve 60 gün sonrasında 12.7 kat artış olduğu bildirilmiştir [Petrik et al., 2003].

2.3.5. Ca⁺² Homeostazisindeki Değişimler

Kalsiyum (Ca⁺²) homeostazisi tüm hücresel fonksiyonlar için hayati role sahiptir. Kalsiyum hücre dışı ve hücre içi sinyal yolları için kritik bir ikincil haberci olarak görev yapar. Hücrenin yaşam ya da ölüm kararı için hayati öneme sahip bir moleküldür. Kalsiyum sinyalleri gelişim, nörotransmitter salınımı, kas kasılması, metabolizma, otofaji ve hücre ölümü gibi hücredeki çok çeşitli süreçleri kontrol etmek için kullanılır. Hücre içi kalsiyum seviyesinin aşırı yükselmesi hücreye zarar veren bir durumdur. Yüksek kalsiyum seviyeleri proteazların ve fosfolipazların aktivasyonu ile sonuçlanarak, hücreyi ölüme götürür [Kaufman and Malhotra, 2014]. HepG2 hücre hattında OTA’nın hücre içi Ca⁺² salınımını arttırdığı gösterilmiştir [Ramya et al., 2014]. OTA’nın kalsiyum homeostazisindeki değişimleri gen ekspresyonu düzeyinde de etkilediği bildirilmiştir. Kalsiyum düzenlenmesi ile ilişkili bazı genlerin anlatımının OTA muamelesi altındaki sıçanlarda kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. Oksidatif strese ayrı olarak kalsiyum

homeostazisindeki değişimlerin OTA toksisitesinde önemli olduğu vurgulanmaktadır [Arbillaga et al., 2008].

2.3.6. Glukoz Homeostazisinin Bozulması

İdrarda artmış glukoz seviyeleri böbrek hasarının iyi anlaşılması bir belirteçdir. Sıçanlarla yapılan bir *in vivo* çalışmada OTA'nın idrara glukoz salınımını arttırdığı tespit edilmiştir [Sieber et al., 2009]. Ayrıca, insan bağırsak epiteli hücre hattı (HT-29-D4) ile yapılan bir *in vitro* çalışmada, OTA'nın glukoz emilimini % 60 oranında azalttığı, buna karşın fruktoz ve L-serin emilimini arttırdığı bildirilmiştir. OTA'nın aktif glukoz taşınmasına engelleyici etkisi, L-fenilalanin ile kısmen tersine çevrilmiş olması nedeniyle de, OTA teşvikli protein sentezi inhibisyonu ile glukoz homeostazisinin bozulması arasında bir neden sonuç ilişkisi olduğu önerilmiştir [Maresca et al., 2001]. Ancak, OTA'nın idrara glukoz salınımını ve serumda indirgenmiş glukoz seviyeleri ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır [Mally et al., 2005], [Stoev et al., 2012].

2.3.7. Hücresel Farklılaşma

Çeşitli hücre tipleri ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar, OTA'nın hücre farklılaşması sürecine negatif etkisi olduğunu göstermektedir [Wilk-Zasadna and Minta, 2009], [Sava et al., 2007], [Lim et al., 2011].

Farklı kimyasalların hücre farklılaşmasına etkisinin araştırıldığı mikrokütle testi (micromass test) *in vitro* bir modeldir. Sıçan embriyonik orta beyinden türevlenen hücrelerin mikrokütle kültürleri, nöral hücre farklılaşması çalışmalarında kullanılmaktadır. OTA'nın konsantrasyon bağımlı olarak nöral hücre farklılaşmasını inhibe ettiği mikrokütle testi ile gösterilmiştir. Embriyonik merkezi sinir sistemi hücreleri kültürde çoğalarak, nörosfer adı verilen hücre topluluklarını oluştururlar. Nörosferdeki hücreler erken ve geç nöral gelişim veya astrosit belirteçleri olan β_{III} tübülün, MAP2 (microtubule associated protein 2) ve GFAP (glial fibrillary acidic protein) proteinlerinin ifadesini gerçekleştirir. Bu belirteçlerin ifadesindeki azalma immünohistokimyasal olarak gösterilerek OTA'nın nöral hücre farklılaşması üzerindeki negatif etkisi bildirilmiştir [Wilk-Zasadna and Minta, 2009]. OTA'nın

yetişkin fare hipokampal nöral kök/progenitör hücrelerinin farklılaşmasını da azalttığı *in vitro* deneylerle gösterilmiştir [Sava et al., 2007].

İnsan adipoz dokusu türevli mezenşim kök hücrelerinde de OTA'nın adipogenezi inhibe ettiği, hücre içi lipit damlacıklarının birikimindeki azalma ile gösterilmiştir. Ayrıca OTA PPAR- γ , C/EBP- α (CCAAT enhancer binding protein- α), LPL (lipoprotein lipase) ve aP2 (adipocyte fatty acid-binding protein) gibi adiposit-özgül belirteçlerin ifadesinde azalmaya sebep olmuştur. Moleküler seviyede ise OTA teşvikli ERK (extracellular signal-related kinase) aktivasyonu yoluyla PPAR- γ_2 'nin fosforilasyonu ve aktivitesinin inhibisyonu bildirilmiştir. ERK aktivasyonunun PD98059 (mitogen-activated protein kinase kinase; MEK inhibitörü) muamelesi ile engellenmesi sonucunda ise OTA-teşvikli adipogenez inhibisyonunun anlamlı derecede blokladığı gösterilmiştir. OTA'nın diğer kök hücre tiplerin farklılaşmasını da etkileyebileceği öngörülmektedir [Lim et al., 2011].

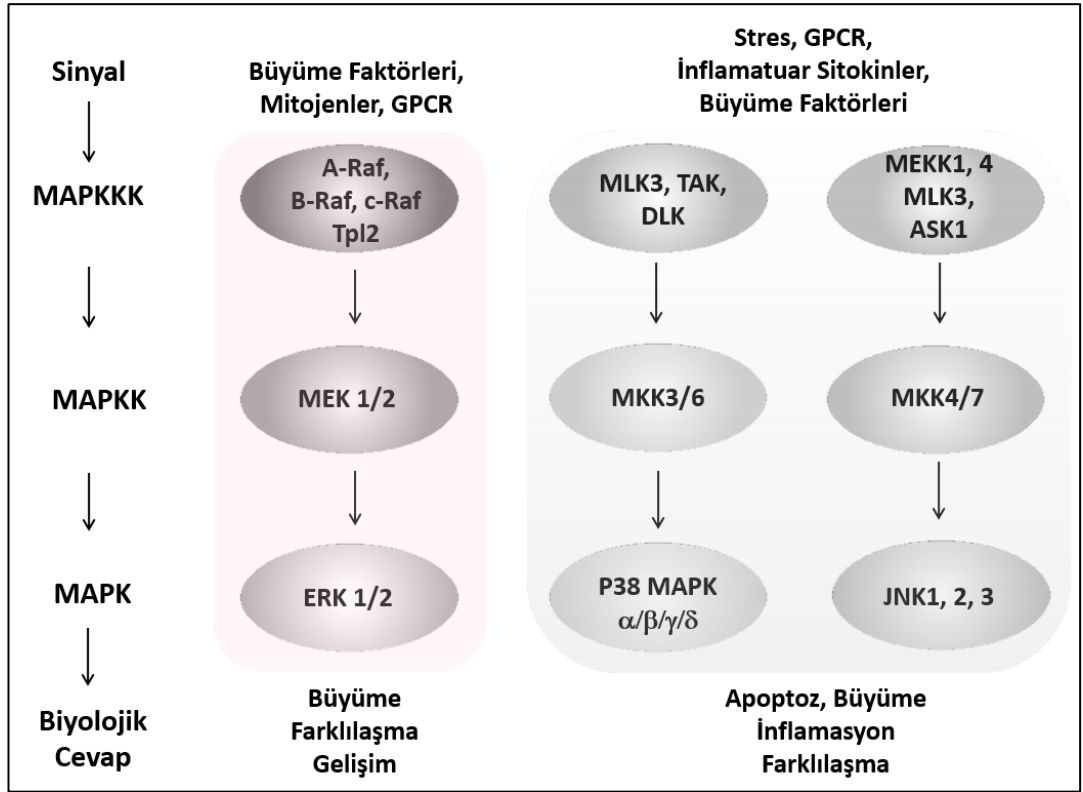
2.4. OTA Karsinojenitesi ile İlişkili Hücre Sinyal Yolakları

Hücrelerin birbirleriyle iletişimi ve değişen çevre koşullarına cevapları sinyal ileti yolakları üzerinden gerçekleşir. Kanserde bu yolakların yeniden düzenlenmesi olması gereken cevaplarda da değişim meydana getirir. Normal koşullar altında hücre ölümü veya hücre döngüsünün durması ile sonuçlanması gereken bir durumda hücrenin “sağkalım”ında ve çoğalmasında artış meydana gelebilir.

Gekle ve arkadaşlarının hipotezine göre; OTA, ikincil habercileri düzenleyen enzimler gibi belirli hücresel kilit hedeflerle etkileşime girerek hücre sinyal yolaklarının ve düzenleyici faktörlerin bozulmasına yol açar. Hücre sinyalindeki ve düzenleyici mekanizmalardaki bu değişimler ise hücre fonksiyonunda ve/veya fenotipinde özgül değişimlere neden olur. Bu durum böbrek fonksiyonlarının değişimine dolayısıyla organizmanın homeostazisinde bozulma ile sonuçlanır [Gekle et al, 2005]. *In vitro* ve *in vivo* deneyler sonucunda mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK; mitogen-activated protein kinases) sinyal yolaklarının ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K; phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt sinyal yolağının OTA muamelesi altındaki hücrelerde aktive edildiği gösterilmiştir [Kumar et al., 2013], [Özcan et al., 2014].

2.4.1. Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinazlar (MAPK)

MAPK sinyal yolları hücre dışından gelen sinyalleri ileterek, çoğaltarak ve farklı sinyalleri birleştirerek, değişen çevre koşullarına karşı hücrelerin genomik veya fizyolojik cevaplar oluşturmalarına aracılık ederler [Weston and Davis, 2002]. Diğer bir deyişle büyüme, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi önemli hücresel süreçleri kontrol eden makine ile hücre dışı sinyalleri birbirine bağlayan, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal ileti yolağıdır. MAPK sinyal yolları üç aşamalı kinaz modülünden oluşurlar. MAPKKK (MAPK kinaz kinaz) MAPKK'ı (MAPK kinaz), MAPKK da MAPK'ı fosforilasyon yoluyla aktive eder [Dhillon et al., 2007]. En çok çalışılan MAPK sinyal yolları MEK/ERK1-2, JNK ve p38 MAPK sinyal yollarıdır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: MAPK sinyal yollarının şematik gösterimi.

Tümör oluşumunun gerçekleşmesi için altı hücresel sürecin yeniden düzenlenmesi gerekir. Bir hücrenin kanser hücresi haline gelebilmesi için, proliferasyon sinyallerinden bağımsız olarak bölünebilmesi, apoptozdan kaçma mekanizmasını programlaması, büyüme durdurucu sinyallere duyarsız hale gelmesi,

sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olması, yayılma, metastaz ve anjiyogenez yeteneğine sahip olması gereklidir [Hanahan and Weinberg, 2000].

Genel olarak ERK1-2'nin (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2) hücre bölünmesinde, JNK (c-jun amino terminal kinase) ve p38'in ise apoptoz, fibroz ve inflamasyon cevabında rolü olduğu düşünülmektedir [Tian et al., 2001].

2.4.1.1. MEK/ERK Sinyal Yolağı

Aktive edilen Raf MEK1 ve MEK2'yi özgül serin aminoasitlerinden fosforlayarak aktive eder. Üç farklı Raf izoformu MEK1 ve MEK2'nin aktivasyonundan sorumludur. B-Raf en güçlü MEK kinazdır. A-Raf ise zayıf bir MEK aktivatörüdür ve tercihli olarak MEK1'i aktive eder. Raf-1 (c-Raf) ise MEK1 ve MEK2 yi eşit oranda aktive eder. Aktif ERK'ler, arasında kinazlar, fosfatazlar, transkripsiyon faktörleri ve hücre iskeleti proteinlerinin de bulunduğu çeşitli sitoplazmik ve nükleusa ait hedefleri fosforiller. ERK sinyal yolağı, hücre tipine de bağlı olarak, proliferasyon, hayatta kalma, migrasyon, anjiyogenez, kromatinin yeniden modellenmesi ve apoptoz gibi süreçleri düzenler [Dhillon et al., 2007].

Uzun süreli ERK sinyali siklin D1 gibi hücre döngüsüne giriş için gerekli proteinlerin düzenlenmesini sağlamakla birlikte, proliferasyonu inhibe eden genlerin baskılanmasını da sağlar [Yamamoto et al., 2006]. Diğer yandan güçlü ERK sinyalinin hücre döngüsünün durmasına sebep olduğu da gösterilmiştir [Mirza et al., 2004], [Hong et al., 2009]. Son yıllarda ERK1-2 sinyal yolağının apoptoz için de çalıştığını gösteren çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır. Özellikle renal ve nöral hücrelerde farklı stres uyaranlarına ve toksik maddelere cevaben ERK1-2 yolağının aktivasyonunun apoptotik ölüm süreciyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir [Wang et al., 2000], [Subramaniam et al., 2004], [Jo et al., 2005].

2.4.1.2. JNK Sinyal Yolağı

c-jun amino terminal kinaz (JNK), diğer adıyla stres ile aktive olan protein kinaz-1 (SAPK1) ailesi genellikle sıcaklık şoku, UV, oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinler gibi çevresel stres faktörleri ile uyarılan bir grup proteini içerir. JNK1 (p46 ya da SAPK1 γ olarak da bilinir), JNK2 (p54 ya da SAPK1 α) ve beyin, kalp ve testise

özgü olan JNK3 (p49 ya da SAPK1 β) bu aileyi oluşturan proteinlerdir. JNK aktivasyonu TPY (treonin, prolin, tirozin) motifinde yer alan treonin ve tirozinin, MEK4 ve MEK7 tarafından fosforilasyonu ile gerçekleşir. Aktivasyonun ardından JNK sitoplazmadan nükleusa geçiş yapar. JNK MAPK ailesinin efektörleri arasında başlıca c-Jun, Elk-1, ATF-2, STAT3, p53 gibi transkripsiyon faktörleri yer alır. JNK yolağının inflamasyon, tümörigenez ve apoptozda rolü olduğu bilinmektedir. Apoptozu teşvik etmesi nedeniyle JNK sinyalinin tümör baskılayıcı bir görevi olduğu düşünülmektedir [Tian et al., 2001], [Dhillon et al., 2007].

2.4.1.3. p38 Sinyal Yolağı

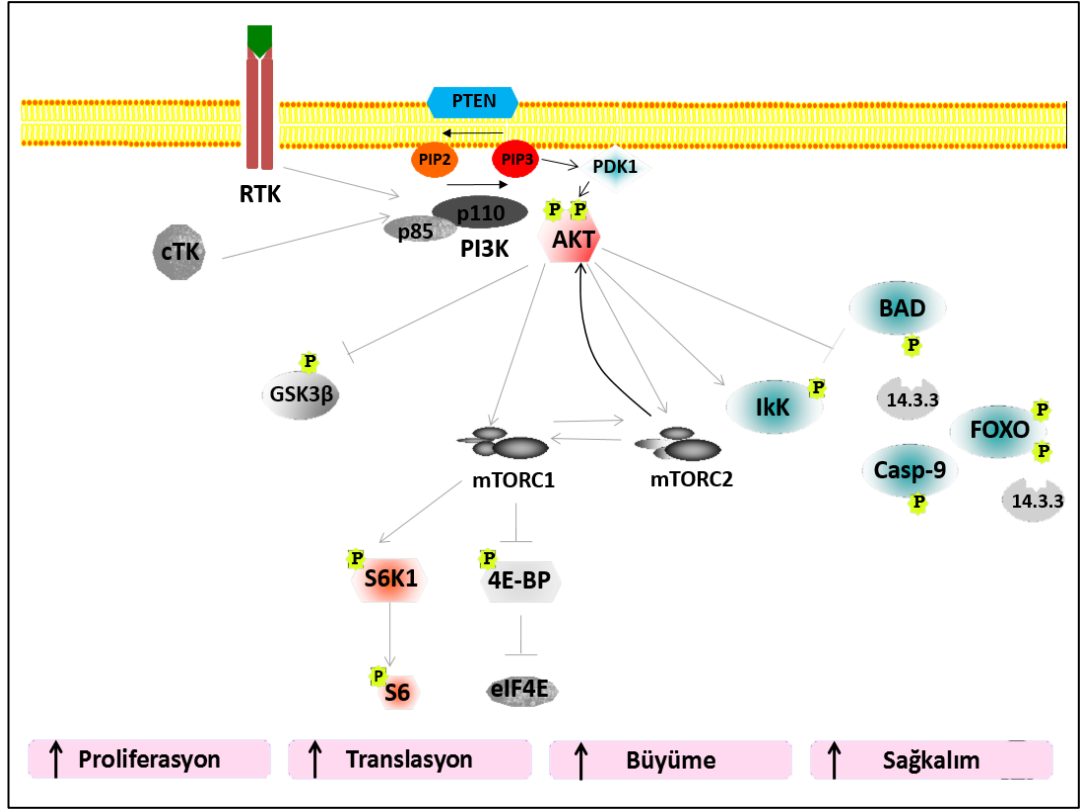
Memelilerde p38 (SAPK2) izoformları çevresel stres ve inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilirler. İnflamatuvar cevapta TNF α ve interlökin-1'in ekspresyonu için p38 gereklidir. Omurgalılarda korunmuş TGY (Treonin-Glisin-Tirozin) fosforilasyon motifi taşıyan, α , β , γ (ERK6) ve δ olmak üzere dört p38 izoformu tanımlanmıştır. Oksidatif stres, hipoksi, X-ışını, UV ve sitokinler gibi fiziksel veya kimyasal streslerle aktif hale getirilen MAPKKK'ler MEK3 ve MEK6'ü aktive eder. MEK3 ve MEK6 da p38 izoformlarını TGY motiflerinden fosforilleyerek aktive ederler. JNK aktivatörü olan MEK4'ün de p38'i fosforillediği gösterilmiştir. Aktif p38 proteinleri sitosolden nükleusa geçerek, ATF-2, Elk-1, CHOP/Gadd153, Max, MEF2C gibi transkripsiyon faktörlerini ve MAPKAP kinaz gibi enzim hedeflerini serin/treonin aminoasitlerinden fosforillerler. Stres cevabına ek olarak p38 sinyal yolağı apoptozun düzenlenmesinde, hücre döngüsünün ilerleyişinde, büyüme ve farklılaşmada da önemli rol oynar. Büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından da uyarılan p38 yolağının çok geniş çeşitlilikteki dış sinyalleri alan ve dağıtan çok çeşitli MAPKKK'lara (TAK1, ASK1/2, DLK, MEKK4, TAO1/2/3 ve MLK2/3 gibi) sahip olması rastlantı değildir [Tian et al., 2001], [Dhillon et al., 2007].

MDCK-C7 hücrelerinde OTA'nın zaman- ve konsantrasyon-bağımlı olarak ERK1-2 fosforilasyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir [Schramek et al., 1997]. Keseli sıçan proksimal tübül epitel hücrelerinde de OTA'nın doz-bağımlı olarak ERK1-2, p38 ve JNK aktivitesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir [Sauvant et al., 2005a]. Renal hücrelerde OTA zıt cevapları yöneten MAPK sinyal yollarını uyarabilmektedir. Gekle ve arkadaşlarının hipotezine göre OTA'nın tümör tetikleyici

etkisi ERK1-2 ile JNK ve p38 aktivasyonu arasındaki dengeye bağı olabileceği yönündedir. OTA'ya maruz kalan hücrelerde JNK ve p38 aktivasyonuna göre ERK1-2 aktivasyonu daha güçlü ise, apoptozun inhibe edilerek tümör gelişiminin teşvik edilebileceği ileri sürülmüştür [Gekle et al., 2005]

2.4.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

PI3K/Akt/ sinyal yolağı hücre içi ve hücre dışı sinyallere cevaben hücre büyümesini, sağkalımı, proliferasyonu, migrasyonu ve hücre metabolizmasını düzenleyen önemli bir yolaktır [Wymann et al., 2003]. PI3K/Akt yolağının aşırı aktivasyonu malignant transformasyon süreci ile ilişkilidir ve böbrek kanserinde sıklıkla rastlanan bir durumdur [Linehan et al., 2010]. PI3K'lar hücre yüzey reseptörleri, GPCR'ler (G-protein-coupled receptors) ya da Ras ile etkileşime girerek aktive edildiklerinde, fosfatidilinositol (4,5)-bifosfatı (Ptd-Ins(4,5)P₂; PIP₂) fosforilleyerek fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (Ptd-Ins(3,4,5)P₃; PIP₃) üretirler [Nicholson and Anderson, 2002], [Wymann et al., 2003]. Lipit yapısındaki ikincil haberci olan PIP₃, Akt'nin plazma membranına yerleşmesine yol açar. Plazma membranına yerleşen Akt'nin PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) ve diğer olası kinazlar tarafından T308 aminoasidinin fosforilasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir [Alessi et al., 1997]. Akt diğer adıyla PKB (Protein kinase B) bir serin/treonin kinazdır. Akt birçok hücre proteinin fosforilasyonunu gerçekleştirir (Şekil 2.3). Fosforilasyon yoluyla fonksiyonları düzenlenen bu proteinler çoğunlukla metabolizma, apoptoz ve proliferasyon süreçlerine ait proteinlerdir [Nicholson and Anderson, 2002]. Protein translasyonu, hücre çoğalması ve sağkalım için Akt'nin S473 fosforilasyonunun da gerçekleşmesi gerekir. mTORC2 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 2) kinaz tarafından gerçekleştirilen bu fosforilasyon Akt'nin tam aktivasyonu için gereklidir [Sarbasov et al., 2005]. Akt'nin apoptoz ile sağkalım arasındaki dengeyi düzenlemek amacıyla bazı apoptotik uyarımlarla da aktive edildiği gösterilmiştir [Tang et al., 2001]. Akt'nin hiperaktivasyonu apoptoza direnç, artan hücre çoğalması ve sağkalım, metastaz, anjiyogenez ve hücre enerji metabolizmasındaki artış ile ilişkilidir [Steelman et al., 2011].



Şekil 2.3: PI3K/Akt sinyal yolağı.

OTA karsinojenitesinin PI3K/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) sinyal yolağı ile ilişkili olabileceğini öneren ilk çalışma Stemmer ve arkadaşlarının Tsc2 (Tuberous sclerosis 2) tümör süpressör proteininin dominant bir mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan erkek Eker sıçanlarla ($Tsc2^{+/-}$) yaptıkları *in vivo* bir çalışmadır. Çalışmada zaman-bağımlı olarak OTA muamelesi uygulanan Eker sıçanların böbrek dokularında mikrodizin temelli gen ekspresyonu analizi yapılmıştır. (IGF)-PI3K-AKT yolağı ile ilişkili bazı genlerin (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase catalytic β subunit; PIK3CB, Akt2, insulin-like growth factor binding protein 4; IGFBP-4 vb.) ekspresyonunun OTA teşvikli olarak arttığı tespit edilmiştir [Stemmer et al., 2007]. Swiss albino dişi farelerle yapılan diğer bir çalışmada, OTA farelerin derisine topikal olarak uygulanmıştır ve 12 hafta sonunda deri tümörlerinin oluşumu gözlenmiştir. Çalışmada primer keratinosit hücrelerinde OTA teşvikli olarak EGFR (Epidermal growth factor receptor), ERK1-2, p38, JNK ve Akt fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir [Kumar et al., 2013].

3. PROTEOMİK YÖNTEMLER

Biyolojik süreçlerden sorumlu olan proteinlerin hastalık durumlarında yapısal ya da miktarsal olarak değişimleri nedeniyle biyobelirteç (biomarker) olarak kullanılmaları araştırma konusudur. Proteomik, biyolojik örneklerdeki protein ifadesinin çok değişkenli olarak değerlendirilmesi, kompleks patolojik ve fizyolojik olayların anlaşılması adına proteinlerin tanımlanması, karakterizasyonu ve kantitasyonu için kullanılan ve gelişmekte olan bir disiplindir. Günümüzde hastalık mekanizmalarını anlamak için sağlıklı ve hasta bireyler arasındaki proteinlerin tipi ve konsantrasyonlarındaki farklılıkların belirlenmesi ve bu farklılıkların biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin araştırılması için proteomik çalışmalardan yararlanılmaktadır. Kolon kanseri, kronik myeloid lösemi, böbrek hastalıkları, şizofreni, bipolar bozukluk ve daha birçok hastalığın erken tanısı için biyobelirteç araştırmalarında, yine çeşitli hastalıklar için geliştirilen hayvan ve hücre modellerinin araştırılmasında proteomik çalışmalarından elde edilen veriler sıklıkla kullanılmaktadır [Zhao and Lin, 2014].

Örnekler arasındaki protein ifade farklılıklarının rölatif miktar tayini için kullanılan, kütle spektrometrisi (MS, mass spectrometry) temelli iki proteomik yaklaşım vardır. Birincisi etiketleme temelli analiz olarak adlandırılan iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation), ICAT (isotope coded affinity tags), SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) ve ¹⁸O etiketleme gibi metotlardır. Etiket temelli analiz yaklaşımında peptitler kovalent olarak kimyasal etiketlerle işaretlenir ve analiz sırasında etiketlerden elde edilen sinyale dayanarak ifade farklılıkları hesaplanır. Diğer yaklaşım ise etiketsiz-MS olarak adlandırılır. [Craft et al., 2013].

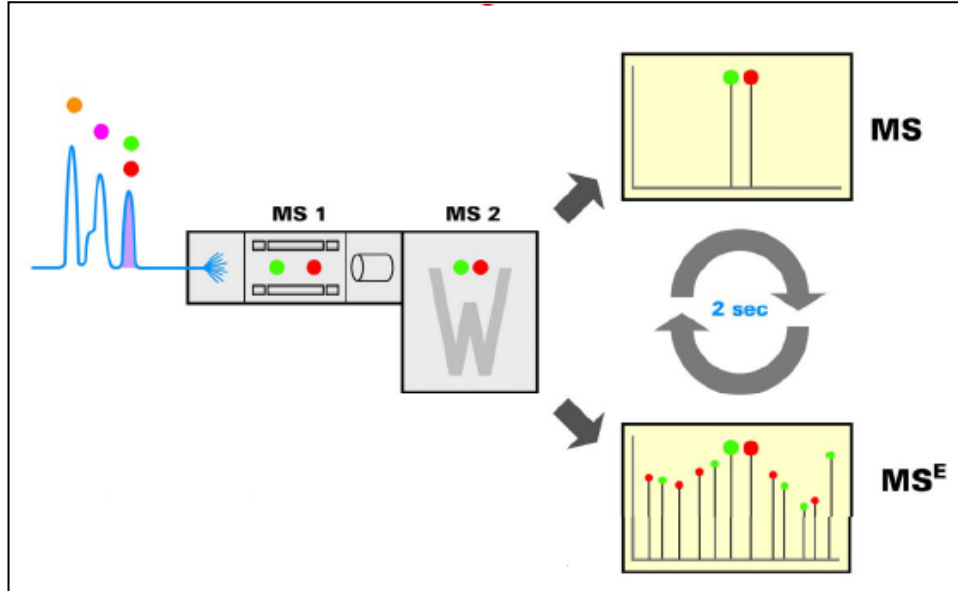
Çalışmamızda proteom analizi için kullanılan yöntem, etiketsiz LC-MS^E olarak bilinen yeni bir teknolojidir. MS^E “data independent acquisition” modu tanımlamaktadır.

3.1. Etiketsiz Karşılaştırmalı Proteomik Analizi

Kompleks biyolojik karışımlardaki proteinlerin ve peptitlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için sıvı kromatografisi ile kütle spektrometrisinin birlikte

kullanıldığı metodoloji LC-MS olarak adlandırılır. Belirli bir proteinin hedeflenmediği ve keşif amaçlı araştırmalar için tercih edilen proteomik yöntem genellikle etiketsiz LC-MS'tir. Bu yöntemde bir örnek içindeki proteinler enzimatik olarak peptitlere parçalanır ve kromatografik ayırma tabi tutulur. Amaca uygun olarak seçilen iyonlaştırma basamağından sonra kütle analizi (MS) gerçekleştirilir [Clough et al., 2009].

Etiketsiz LC-MS^E metodolojisi aslında bir veri toplama metodunu ifade etmektedir. Bu metotta analizi gerçekleştirilecek olan biyolojik örnek, tripsin ile muamele edilerek peptitlerine parçalanır ve tekrar edilebilirliği yüksek olan nano UPLC (nano Ultra Performance Liquid Chromatography) olarak adlandırılan sistemde kromatografik ayrıştırması gerçekleştirilir. UPLC sistemi, her bir peptidin kromatografik alıkonma zamanında yok denecek kadar az olan farklılığı yakalamaktadır. Ayrıştırma sonrasında peptitler "time of flight (TOF)" denilen uçuş zamanı tüpünden geçerek kuadrupol içinde argon ile çarpıştırılarak parçalanır. Bu aşamada MS^E sisteminde öncelikle düşük çarpışma enerjisinde peptidin bütünü hakkında ve daha sonra çarpışma enerjisi artırılarak peptidi oluşturan amino asitler hakkında bilgi toplanır (Şekil 3.1) [Web 1, 2011]. İyonların eş zamanlı olarak fragmanlara ayrılmasıyla analiz süresi de kısalmış olur [Silva et al., 2006].



Şekil 3.1: MS^E ile veri toplama.

Teknolojik yeniliklerle birlikte proteomik yöntemler de gelişmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (UPLC), elektrosprey iyonizasyon-kuadrupol

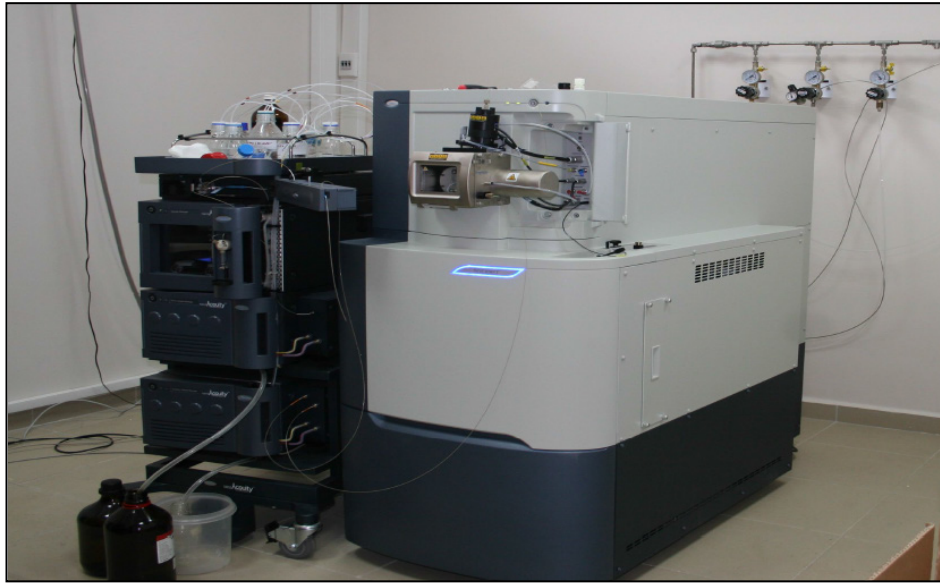
uçuş zamanı kütle spektrometresi (ElectroSpray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, ESI-QTOF-MS^E) ile birleştirilmesi ile protein ifade farklılıklarının hesaplanabileceği ileri bir proteomik araştırma platformu meydana gelmiştir [Waters Corporation, 2004].

İnsan proteomu verilmiş bir zamanda ve verilmiş bir hücrede ortalama 20000'in üzerinde protein içerir. Dolayısıyla, tripsin ile muamele sonrasında çok daha fazla sayıda peptit ile karşı karşıya kalınır. Maksimum miktarda protein tanımlanabilmesi için, MS analizi öncesinde örneklerin fraksiyonlara ayrılması genellikle zorunlu bir basamaktır [Weston et al., 2013]. Bu amaçla karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kararlı, yüksek çözünürlükte ve hassasiyette çalışabilen, gelişmiş kromatografik sistemler kullanılmaktadır. Protein karışımları binlerce peptidi içerdiği için ayrıştırma gücünün çok fazla olduğu kolonların kullanılması gerekmektedir. UPLC sisteminde çapı 2 µm'den daha küçük (1.7 µm) dolgu maddesi içeren ve daha uzun kolonların kullanılması sonucu daha kısa sürede daha güçlü kromatografik ayırım sağlanır. Bu sistemde pik kapasitesindeki gelişmelerden dolayı analiz edilebilen parçacık sayısında ciddi artışlar görülmektedir. UPLC sistemi 18.000 psi basınca kadar dayanabilmektedir ve bu sayede analiz süresi HPLC'ye (High-Performance Liquid Chromatography) göre 10 kat daha kısalmaktadır. UPLC sisteminde dolgu maddesi 1.7 µm olan, etil köprülü hibrit (Ethylene Bridged Hybrid, BEH) adı verilen BEH C18 partikülleri kullanılmaktadır ve kolon uzunluğu 30-150 cm kadar olabilmektedir. Böylelikle peptit yükleme miktarı artırılmaktadır ve daha yüksek akış hızlarında, yüksek basınç altında çok iyi ayrıştırma gerçekleştirilmektedir [Web 2, 2012]. Özellikle BEH dolgu maddelerinin kullanıldığı kolonlar çok kararlı olmaları nedeniyle florik asit yerine trifloroasetik asidin (TFA) kullanılmasını mümkün kılmaktadır. TFA kromatografik olarak daha keskin piklerin elde edilmesini sağlamaktadır [Xu, 2013].

Peptit miktarlarının analizi iyon kromatogramından elde edilen piklerin integrasyonu ile gerçekleştirilir. Bu nedenle farklı örnekler içindeki peptitlerin analiz edilebilmesi için kromatografik alıkonulma zamanlarının örtüşmesi gerekmektedir. "ProteinLynx Global Server" (PLGS) yazılımı ile her bir peptit piki üst üste çakıştırılır. Karşılaştırması yapılacak örneklerdeki protein ifade farklılıkları, 'Protein intensity Log(e) grafiği' gibi grafiklerle kolayca incelenebilir.

Sonuç olarak LC-MS^E metodolojisi kullanılarak yapılan protein analizi ile her bir örnek için yüzlerce protein tanımlanmakta ve örnekler arasında protein anlatım

farklılıkları belirlenebilmektedir. Gruplar arası karşılaştırmanın doğru bir şekilde yapılabilmesi, analiz grupları arasında farklılığa neden olan protein biyobelirteçlerin bulunabilmesi için temel komponent analizi (PCA) kullanılması gerekir. Elde edilen verilerden yola çıkarak anlamlı sonuçlara ulaşabilmek için çeşitli biyoinformatik yazılımlara başvurulur. Scaffold 3 yazılımı ile protein tanımlamaları doğrulanır ve aynı zamanda tanımlanan her protein için gen ontoloji bilgileri otomatik olarak “The National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) veribankasından indirilir. PANTHER gibi açık erişimi olan biyoinformatik araçların kullanılması ile de tanımlanan proteinler hızlı bir şekilde hücresel yerleşim, metabolik süreç, regülasyon gibi kategorilere ayrılarak hangi protein gruplarının etkilendiği bulunur. Tanımlanan yüzlerce proteinin birbirleri ile olan bağlantısının belirlenebilmesi ve hesaplanan ifade farklılıklarından yola çıkarak nasıl bir mekanizmanın rol aldığı bulunması için “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA) yolak analizi yazılımı kullanılabilir.



Şekil 3.2: LC-MS/MS Cihazı.

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Hücre Hattı ve Kültürü

HK-2 (Human Kidney 2) hücre hattı yetişkin insan böbreği proksimal tübül epitelinin izole edilen hücrelerin, insan papilloma virüsüne (HPV 16) ait E6/E7 genlerinin transdüksiyonu ile immortal hale getirilmesi yoluyla oluşturulmuştur. İlk olarak normal yetişkin insan böbrek korteksinden primer proksimal tübül hücre (PTH) kültürü yapılmıştır. PTH kültürü HPV 16 E6/E7 genlerini içeren rekombinant bir retrovirusa maruz bırakılmıştır. Sonuçta, bir yıldan daha uzun süre ile serumsuz besiyerinde sürekli olarak büyütülmüş HK-2 (human kidney-2) hücre hattı elde edilmiştir. HK-2 hücrelerinin büyümesi için EGF (epidermal büyüme faktörü) gereklidir [Ryan et al., 1994].

ATCC'den (American Type Culture Collection) satın alınan HK-2 hücreleri, % 10 fetal sığır serumu (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) besiyerinde, % 5 CO₂ ve 37°C koşullarında büyütülmüştür.

4.2. OTA ve İnhibitörler

Etanol içinde hazırlanan OTA'nın stok çözeltisi (10 mM) küçük hacimlere bölünmüş olarak -80°C'ta saklanmıştır. Hücrelere OTA muamelesi % 5 FBS içeriğine sahip DMEM/F-12 besiyeri ile gerçekleştirilmiştir. OTA muamelesi yapılan tüm deney gruplarında etanolün son konsantrasyonu % 0.1'dir. Kontrol grubu hücreleri % 0.1 etanol ile muamele edilmiştir.

OTA ile aktive olduğu belirlenen sinyal ileti yollarının inhibisyonu için, ilgili sinyal yollarında görevli kilit proteinlere özgün inhibitörler kullanılmıştır. Bu amaçla PI3K/Akt yolağının inhibisyonu için PI3K inhibitörü olan Wortmannin, MEK/ERK1-2 yolağının inhibisyonu için MEK inhibitörü olan U0126, c-MET reseptör tirozin kinazın inhibisyonu için PHA-665752 ve ubikuitin-proteozom yolağının inhibisyonu için MG132 kullanılmıştır. Wortmannin 1 mM, U0126 10 mM, PHA-665752 1 mM ve MG132 1 mM konsantrasyonlarında DMSO içinde stok

solüsyonlar olarak hazırlanmış ve -20°C'ta saklanmışlardır. İnhibitör muamelesi yapılan tüm deney gruplarında DMSO'nun son konsantrasyonu % 0.1'dir. Kontrol grubu hücrelerine % 0.1 DMSO muamele yapılmıştır.

OTA ve inhibitör muamelesi standart olarak şu şekilde yapılmıştır: Aksi belirtilmediği takdirde, 96-kuyucuklu plakalara üçlü biyolojik tekrar şeklinde 5×10^3 hücre/100 µl besiyeri; 60 mm hücre kültürü petrilere 5×10^5 hücre/4 ml besiyeri; 100 mm hücre kültürü petrilere 2×10^6 hücre/8 ml besiyeri olarak hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılmış, indirgenmiş serum (% 5 FBS) içeriğine sahip besiyeri içinde hazırlanan OTA konsantrasyonları hücrelere uygulanmıştır. Doz bağımlı deneylerde üç farklı OTA konsantrasyonu (0.1, 1 ve 10 µM) 24 saat süreyle hücrelere uygulanmıştır. Zamana bağlı deneylerde ise hücrelere 10 µM OTA konsantrasyonu 1, 3, 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. İnhibitör kullanılan deneylerde, ilgili inhibitörler OTA muamelesinden 1 saat önce belirtilen son konsantrasyonlarında olacak şekilde (1 µM Wortmannin, 10 µM U0126, 1 µM PHA-665752 ve 0.5 ya da 1 µM MG132) indirgenmiş serumlu besiyerinde hazırlanarak hücrelere tatbik edilmiştir. OTA muamelesi süresince inhibitörler de besiyerinde tutulmuştur. Kontrol grubu hücrelere % 0.1 etanol ya da % 0.1 etanol + % 0.1 DMSO uygulanmıştır.

4.3. Kimyasallar, Materyaller ve Kitler

Doktora çalışması süresince kullanılan kitlerin listesi ise Tablo 4.1'de, kimyasalların ve materyallerin listesi ise Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Tez çalışmasında kullanılan kitler.

Kit Adı	Tedarikçi Firma	Katalog No.
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche	11 669 915 001
Cell Proliferation Kit II (XTT Assay)	Roche	11 465 015 001
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	Promega	G9291
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega	G8091
BCA Protein Assay	Thermo Scientific	23227
Genopure Plasmid Midi Kit	Roche	03 143 414 001
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche	11 754 777 001
PathScan® RTK Antibody Array	CST	7982

Tablo 4.2: Kimyasallar ve materyaller.

Kimyasal/Materyal Adı	Tedarikçi Firma	Katalog No.
DMEM/F-12	Gibco	11039
FBS	Gibco	10270
Penisilin/Streptomisin	Gibco	15140
OTA	Sigma	O1877
PBS	Gibco	10010
Wortmannin	Sigma	W1628
U0126	CST	9903
PHA-665752	Sigma	PZ0147
MG132	Sigma	C2211
DMSO	Sigma	D2650
Etanol	Sigma-Aldrich	32221
Tris	Sigma	T6066
NaCl	AppliChem	A4661
PMSF	Roche	11 359 061
NP-40	Roche	11 754 599
Sodyum deoksikolat	Sigma-Aldrich	D6750
SDS	Sigma	L3771
PhosSTOP	Roche	04 906 837
cOmplete, EDTA-free	Roche	05 056 489
BCA Protein Assay	Thermo	23227
Gliserol	AppliChem	A1123
β -merkaptoetanol	Sigma	M3148
EDTA	AppliChem	A1103
Bromfenol mavisi	AppliChem	A2331
Glisin	AppliChem	A1067
PVDF membran	Millipore	ISEQ00010
Metanol	Sigma	32213
Tween-20	Sigma	P9416
BSA	CST	9998S
Yağsız süttozu	AppliChem	A0830
ECL (LumiGlo®/Peroxide	CST	7003S
Trypsin 0.25% (1X)-0.2 g/l	Hyclone	SH30042.01
Protein Ladder	Thermo Scientific	26616
X-tremeGENE HP	Roche	06 366 236
Cell Lysis Buffer, CLB	CST	9803S
pMEV-MEK1-WT	Biomyx	P1030a
pMEV-MEK1-DN	Biomyx	P1030b
pMEV-MEK1-K97R	Biomyx	P1030d
pEGFP-N ₂	Clontech	6081-1

4.4. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

OTA muamelesinin yapılacağı besiyeri koşullarını belirlemek için, farklı FBS yüzdesine sahip besiyerleri ile birlikte uygulanan OTA'nın HK-2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisinin bilinmesi temel alınmıştır. Bu amaçla Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) (Roche) kiti kullanılmıştır. Hücre proliferasyonu için DNA replikasyonu gerekli olduğundan, proliferasyonu dolaylı yoldan ölçen diğer bir yöntem DNA sentezinin analizidir. Bu teknik timidin'in 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) ile yer değiştirmesine dayalıdır. Diğer bir ifadeyle büyüyen hücrelerde primidin analogu olan BrdU'nun timidinin yerine sentezlenen zincire katılımı gerçekleşir. DNA'nın yapısına katıldıktan sonra BrdU immün analiz ile tespit edilir.

HK-2 hücreleri luminesans ölçüm için tasarlanmış 96-kuyucuklu beyaz plakalara ekilmiş ve 48 saat sonra besiyeri uzaklaştırılarak, serum içermeyen veya % 1, % 5 serum içeren besiyerlerinde hazırlanan farklı OTA konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi (24 saat) sonunda OTA muamelesine maruz bırakılan hücreler daha sonra 4 saat boyunca BrdU ile inkübe edilerek işaretlenmeleri sağlanmıştır. Ardından hücreler fikse edilerek BrdU antikoru (anti-BrdU POD) ile inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama aşamalarından sonra hücre ortamına eklenen substratın POD (peroksit dismutaz) enzimi tarafından yıkımı ile oluşan kemilüminesan ışımaya (relative luminescence unit; RLU) ölçülmüştür. Hücre proliferasyonunu ifade eden BrdU katılımı grafiği, besiyerinden gelen (boş kontrol; blank) RLU değerinin örneklerin RLU değerinden çıkarılması ile gösterilmiştir.

4.5. Hücre Canlılığı Analizi

OTA ve inhibitörlerin HK-2 hücrelerinin canlılığına etkisini belirlemek amacıyla Cell Proliferation Kit II (XTT Analizi) (Roche) kullanılmıştır. Analizin temeli sarı renkli tetrazolyum tuzu XTT'nin (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından turuncu renkli formazana dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Formazan sulu ortamda çözünür ve ortaya çıkan rengin absorbansı doğrudan

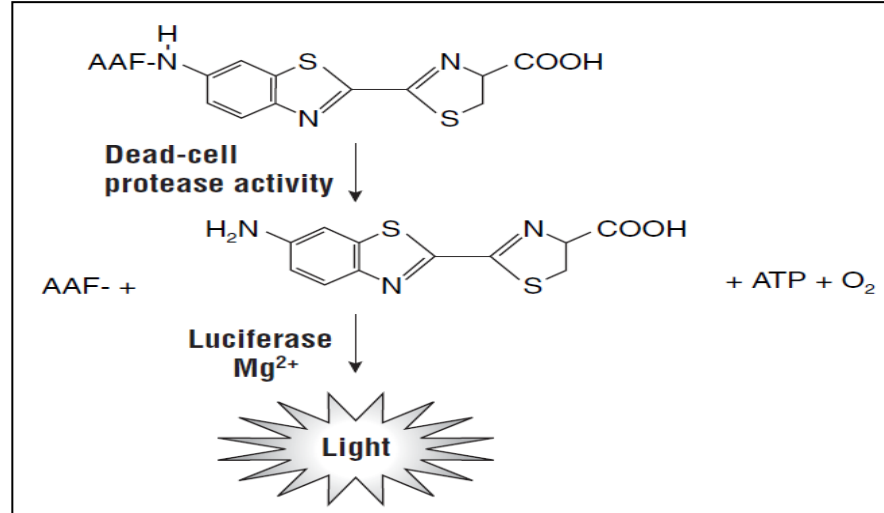
mikroplaka okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçülür. Absorbans ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır.

HK-2 hücreleri, 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve OTA ya da inhibitör varlığında OTA ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi (24 ya da 48 saat) sonrasında taze hazırlanan XTT solüsyonu (50 µl/kuyucuk) kuyucuklara eklenmiş, 37°C'ta, % 5 CO₂'li ortamda 4 saat inkübasyondan sonra BioRad (Model680) ya da VarioScan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) mikroplaka okuyucu kullanılarak 490 nm ve 655 nm dalga boylarında absorbans ölçümü yapılmıştır. Üçlü biyolojik tekrarlı örneklerin 490 nm'de ölçülen absorbans ortalamaları alındıktan sonra örneklere ait 655 nm'de ölçülen zemindeğer absorbans ortalamaları çıkarılarak deneysel değerler elde edilmiştir. Hücre canlılığı % olarak (4.1)'deki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek}}{\text{Kontrol}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.6. Nekrotik Hücre Analizi

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega) hücre popülasyonlarında nekroz yoluyla ölen hücrelerin sayısının ölçümüne olanak veren luminesans sonuçlu bir analizdir. Sitotoksisite ile ilişkili bir proteaz aktivitesini ölçer. Kit luminojenik bir peptit olan alanil-alanilfenilalanil-aminolusiferini (AAF-Glo™) substrat olarak kullanılarak, membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücrelerden salınan proteaz aktivitesini ölçer. AAF-Glo™ canlı hücre membranından geçemediği için canlı hücre popülasyonu tarafından herhangi bir sinyal oluşturulamaz. CytoTox-Glo™ Assay termostabil bir lusiferaz enzimi (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase) içerir. Bu enzim aminolusiferini substrat olarak kullanır ve stabil bir luminesans sinyal oluşturur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Nekrotik hücre ölümü analizinin (CytoTox-Glo™ Assay) prensibi.

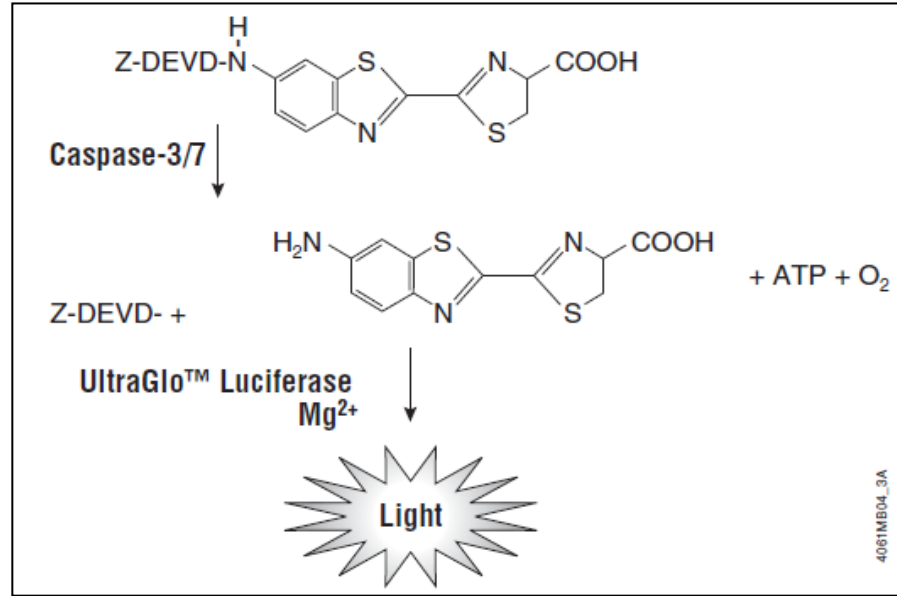
HK-2 hücreleri luminesans ölçüm için tasarlanmış 96-kuyucuklu beyaz plakalara ekilmiş ve OTA ya da inhibitör varlığında OTA ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi (24 saat) sonrasında 50 µl CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Reagent her biri kuyucuğa eklenerek 15 dakika boyunca oda sıcaklığında nazikçe çalkalandıktan sonra luminesans ölçüm alınmıştır. Toplam ölüm (% 100 ölüm) kontrolü, kontrol hücrelerinin lizisi ile belirlenmiştir. Bunun için kontrol grubu hücreleri 50 µl Lysis Reagent ile lizis edilerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tekrar luminesans sinyal ölçülmüştür. Üçlü biyolojik tekrarlardan oluşan kontrol ve örneklerin luminesans değer ortalamalarından medyumdan gelen zemindeğer ortalaması çıkarılarak deneysel değerler elde edilmiştir. Her bir örneğe ait nekrotik hücre ölümü yüzde (%) olarak (4.2) eşitliği ile hesaplanmıştır.

$$\text{Nekrotik Hücre Ölümü (\%)} = \frac{\text{Örnek} - \text{Kontrol}}{\text{Toplam ölüm} - \text{Kontrol}} \times 100 \quad (4.2)$$

4.7. Hücre Apoptoz Analizi

Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitelerinin ölçümüne dayalı luminesans bir analizdir. Kaspaz ailesinin üyeleri olan bu iki enzim memeli hücrelerinde apoptozda anahtar rol oynarlar. Kit ile sağlanan DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) dizisinden oluşan tetrapeptit, kaspaz-3/7'nin luminojenik substratıdır.

Caspase-Glo® 3/7 Reagent'ın eklenmesi ile hücre lizisi gerçekleşir. Lizis ile açığa çıkan kaspazlar DEVD dizisini içeren luminojenik substratın yıkımını katalizleyerek, aminolusiferinin açığa çıkmasını sağlarlar. Lusiferaz enziminin aminolusiferini substrat olarak kullanması sonucu luminesans sinyalin oluşumu gerçekleşir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Apoptoz analizinin (Caspase-Glo® 3/7 Assay) prensibi.

HK-2 hücreleri luminesans ölçüm için tasarlanmış 96-kuyucuklu beyaz plakalara ekilmiş ve OTA ya da inhibitör varlığında OTA ile muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi (24 saat) sonunda plakalar inkübatörden alınarak oda sıcaklığına gelmeleri için 15 dakika bekletilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µl Caspase-Glo® 3/7 Reagent eklenmiştir. Plaka çalkalayıcıda 300 rpm'de 30 saniye çalkalandıktan sonra 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş ardından luminesans ölçüm yapılmıştır.

4.8. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Western Blot

HK-2 hücreleri hücre kültür petrilere ekilerek bölüm 4.2.'de anlatıldığı üzere OTA ve inhibitör muameleleri yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra ya ticari hücre lizis tamponu (Cell Lysis Buffer, CLB: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM

Na₂EDTA, 1 mM EGTA, % 1 Triton, 2.5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM beta-gliserofosfat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml löpeptin, 1 mM PMSF) (Cell Signaling Technology; CST) içinde ya da RIPA tamponu (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, % 1 NP-40, % 0.5 sodyum deoksikolat, % 0.1 SDS, 1 mM PMSF) içinde lizis edilmiştir. Kullanılan her 10 mL lizis tamponu içine 1 tablet PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli (Roche) ve 1 tablet cOmplete EDTA-free proteaz inibitor kokteyli (Roche) eklenmiştir. Lizat, buzda 15 dakika inkübasyonun ardından 5-6 kez şırıngadan geçirilerek homojenize edilmiştir. Örnekler +4°C'ta, 14000 x g de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiş ve BCA Protein Assay (Thermo Scientific) ile protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Her bir örnekten eşit miktar (20-60 µg) total protein, SDS yükleme tamponu (4X SDS yükleme tamponu: 200 mM TrisHCl pH 6.8, % 8 SDS, % 40 gliserol, 572 mM β-Merkaptoetanol, 50 mM EDTA, % 0.08 bromofenol mavisi) ile karıştırılmış ve 95°C'ta 5 dakika ısıtılmıştır. İncelenecek proteinin büyüklüğüne göre % 7, % 10 ya da % 12'lik ayırma jeli hazırlanmıştır. Kullanılan tüm jellerde toplama jelinin yüzdesi 4 olarak hazırlanmıştır. Poliakrilamid jeller 1X SDS tamponu (1X SDS tamponu: % 1 SDS, 250 mM Tris, 1.92 M glisin) doldurulmuş tanka yerleştirilmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra toplama jelinde 100 V, ayırma jelinde 150 V'ta koşturulmuştur. Elektroforez sonrası jelde boyutlarına göre ayrılan protein profili PVDF membrana transfer edilmiştir. 1X transfer tamponu (1X transfer tamponu: 250 mM Tris, 1.92 M glisin, % 20 metanol) içinde 100 V'ta, 1 buçuk saat ıslak transfer yapılmıştır. Transfer sonrası membranlar % 5 yağsız süttozu TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween 20, TBS-T: 50 mM TrisHCl pH 7.4, 150 mM NaCl, % 0.1 Tween-20) içinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda çalkalanarak bloklama yapılmıştır. Primer antikolar tedarikçi firmanın tavsiye ettiği dilasyonlarda, % 5 BSA içeren TBS-T içinde hazırlanmıştır. Membranlar gece boyunca +4°C'ta orbital çalkalayıcıda primer antikolar (fosfo-MEK1/2 (Ser217/221), fosfo-ERK1-2 (Thr202/Tyr204), total-ERK1-2, fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), total-SAPK/JNK, fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), total-p38, PI3K-p110α, fosfo-PTEN (Ser380), total-PDK1, fosfo-PDK1 (Ser241), total-Akt, fosfo-Akt (Ser473), fosfo-Akt (Thr308), fosfo-GSK3β (Ser9), total-GSK3β, fosfo-mTOR (Ser2448), total-mTOR, fosfo-S6 RP (Ser235/236), c-MET, fosfo-c-MET (Tyr1234/35) ve Mcl-1 monoklonal antikoları CST'den, HA (hemagglutinin), fosfo-c-MET (Tyr1234) ve poly-Ub Santa Cruz'dan,

PARP Roche'tan, total-MEK1, total-MEK2, β -Aktin Becton Dickinson (BD) Biosciences'tan tedarik edilmiştir) ile inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikor muamelesinin ardından membranlar 3 kez 5 dakika süreyle TBS-T ile yıkanmıştır. TBS-T içinde % 5 yağsız süt tozunda 1:5000 oranında hazırlanan sekonder antikor (anti-Mouse IgG HRP-linked veya anti-Rabbit IgG HRP-linked antibody) (CST) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı olarak inkübasyon yapılmıştır. Sekonder antikor ile inkübasyon sonrasında membranlar 3 kez TBS-T ile yıkandıktan sonra ECL substratı (LumiGlo®/Peroxide Reagent, CST) ile 1 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir. Ardından membranlardaki protein bantları kemilüminesan görüntüleme sistemi (Stella, Raytest ya da BioRad, ChemiDoc™ XRS+System) ile görüntülenmiştir. Protein miktarlarındaki değişimler ImageJ ve ImageLab programları ile hesaplanmıştır. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin kullanılmıştır.

4.9. PathScan® Reseptör Tirozin Kinaz Analizi

PathScan® Reseptör Tirozin Kinaz Array (CST) sandviç immünoassay prensibine dayalı bir analizdir. Cam bir lam üzerine yerleştirilmiş, 28 reseptör tirozin kinaz ve 11 önemli sinyal proteininin fosforilasyon durumlarının aynı anda tespitini sağlar. Nitroselülöz kaplı cam slayt üzerinde hedef-spesifik antikorlar, pozitif kontrol (biotinlenmiş protein) ve negatif kontrol (spesifik olmayan IgG) spotları ikili olarak yer almıştır. Hücre lizatları lam üzerine inkübe edildikten sonra biyotinlenmiş antikorlarla işaretlenir. HRP-bağlı Streptavidin substratının inkübasyonunun ardından LumiGLO® Reagent ile bağlı antikorlar dolayısıyla hedef protein spotları kemilüminesans ışımaya yoluyla tespit edilir.

Zamana bağlı OTA muamelesine tabi tutulan örnekler bölüm 4.8.'de anlatıldığı gibi ticari hücre lizis tamponu (CLB) içinde hazırlanmış ardından kit ile sağlanan seyreltici tampon (Array Diluent Buffer) kullanılarak konsantrasyonları 1 mg/ml total protein olarak ayarlanmıştır. Her bir örnekten 150 μ g protein array slayta yüklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki basamalar kitin önerdiği şekilde uygulanmış ve LumiGlo®/Peroxide reagent ile analiz gerçekleştirilmiştir.

4.10. Plazmid Kurguları

MEK/ERK1-2 sinyal yolunun inhibisyonunun hedeflendiği deneylerde kullanılmak üzere dominant negatif (DN; pMEV-MEK1-DN: K97R, S218A, S222A), yabancı tip (WT; pMEV-MEK1-WT) ve kinaz inaktif (KD; pMEV-MEK1-K97R: K97R) MEK1 plazmid kurguları Biomyx Technology (SanDiego, USA)'den satın alınmıştır. Boş vektör olarak kullanılan HA (hemagglutinin)-etiketli boş kontrol vektör (EV; pMEV-2HA) pMEV-MEK-WT plazmidinin BamHI restriksiyon enzimi (NEB) ile kesilmesi ve T4 DNA ligaz enzimi (Roche) ile ligasyona tabi tutulması yoluyla laboratuvarımızda üretilmiştir. HK-2 hücrelerinin transfeksiyon verimliliğinin belirlenmesi için pEGFP-N₂ memeli ekspresyon vektörü (Clontech) kullanılmıştır.

4.11. Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu

Escherichia coli DH5 α kompetan hücrelerinin üzerine 50 ng plazmid DNA kurguları ilave edildi. Hücreler buz üzerinde 10 dakika inkübe edildikten sonra 42 °C'ta 90 saniye süre ile sıcaklık şokuna maruz bırakıldılar. Ardından yine buz üzerine alınan hücreler 2 dakika daha buzda bekletildikten sonra üzerlerine 800 μ l LB (Luria-Bertani) besiyeri ilave edildi. Bakterilerin büyümesi için 37 °C'ta 1 saat süreyle çalkalamalı inkübasyona bırakıldılar. Bir saat sonunda büyütülen bakteri örneklerinden 100 μ l alınarak plazmidin içerdiği antibiyotik direnç genine göre seçilen antibiyotikli (kanamisinli) LB agar petrisine ekimi yapıldı. Bakteri kolonilerinin büyümesi için gece boyunca 37 °C'ta inkübe edildi. Ertesi gün steril pipet ucu yardımıyla tekli koloniler alınarak antibiyotik içeren 50 μ g/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekildi. Gece boyunca 37 °C'ta büyütülen bakteri kültürü ertesi gün plazmid izolasyonunda kullanıldı. High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) yardımıyla elde edilen plazmidler doğrulanmak üzere dizileme analizine tabi tutuldu. Doğruluğu belirlenen plazmidleri taşıyan *Escherichia coli* DH5 α transformant kolonilerine ait kültür örneklerinin % 10 gliserol ilavesiyle gliserol stokları yapıldı ve -80 °C'ta saklandı. Daha sonraki transfeksiyon aşamalarında kullanılacak plazmidlerin eldesi için bu gliserol stoklar kullanıldı. Transfeksiyon basamağında kullanılacak olan endotoksin içermeyen saflıktaki plazmidlerin eldesi için Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) kullanıldı. *Escherichia coli* DH5 α transformantlarına ait

gliserol stoklardan pipet ucu yardımıyla alınan bir miktar bakteri 100 ml'lik 50 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerine ekilerek, gece boyunca büyümeleri için 37 °C'ta inkübe edildi. Ertesi gün tedarikçi firmanın önerdiği protokol kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmidlerin konsantrasyonu NanoDrop (Thermo Scientific) spektrofotometre yardımıyla belirlendi. Plazmid DNA'lar kullanılabilecek şekilde -20 °C'ta saklandı.

4.12. Transfeksiyon

HK-2 hücreleri 60 mm'lik hücre kültürü petrilere ya da 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 5 µg plazmid DNA/60 mm petri ya da 100 ng plazmid DNA/kuyucuk olacak şekilde EV, WT, DN ve KD MEK1 plazmid kurguları ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon ajanı olarak X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemi tedarikçi firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücelere OTA muamelesi (10 µM) yapılmıştır. Kontrol hücrelerine son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde etanol eklenmiştir. Muameleden 24 saat sonra 60 mm'lik hücre kültürü petrilere transfekte edilen hücreler Western blot analizi için bölüm 4.8'de anlatıldığı gibi lizat haline getirilmiştir. 96-kuyucuklu plakalarda transfekte edilen hücreler ise bölüm 4.5'de anlatıldığı üzere hücre canlılığı analizi (XTT analizi) ile değerlendirilmiştir.

HK-2 hücrelerinin transfeksiyon verimliliğinin belirlenmesi için, hücreler 60 mm'lik hücre kültürü plakalarına ekildikten 24 saat sonra pEGFP-N2 plazmidini ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra yeşil floresan proteinin (GFP) anlatımını yapan hücreler ECLIPSE Ti-FL floresan mikroskop (Nikon) ve DS-Fi1 kamera sistemi (Nikon) ile GFP kanalında (488 nm) görüntülenmiştir.

4.13. Hücre Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

HK-2 hücreleri 60 mm'lik hücre kültürü plakalarına ekilmiştir ve bölüm 4.2.'de anlatıldığı gibi hücelere 24 saat süreyle OTA ve inhibitör muamelesi yapılmıştır. Muameleden sonra hücre morfolojileri 40x büyütme altında faz kontrast

mikroskobu (ECLIPSE Ti-FL invert mikroskop ve DS-Fi1 kamera sistemi, Nikon) ile görüntülenmiştir.

4.14. Proteom Analizi için Hücre Peletlerinin Hazırlanması

HK-2 hücreleri, 1×10^6 hücre olacak şekilde 15 cm petrilere ekilerek inkübe edilmiştir. Hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştığında 10 ml 1X PBS ile yıkanarak, % 5 serum içeren besiyerinde OTA (0.1, 1 ve 10 μ M) ile 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Kontrol grubu hücrelere % 0.1 etanol uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve bir kez PBS ile yıkandıktan sonra hücre peletleri 3 kez 50 mM amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) ile yıkanmıştır. Santrifüj koşulları 3000 rpm, +4 °C'ta 5 dakika olarak uygulanmıştır. Hücre peletleri kütle spektroskopisine gönderilene dek -80°C'ta saklanmıştır. Proteom analizi TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

4.14.1. LC-MS/MS Analizi

HK-2 hücrelerinden ekstrakte edilen proteinler, tripsin ile parçalandıktan sonra kromatografik ayrıştırmadan geçirilmiştir. Ardından peptit ağırlıklarının belirlenebilmesi için MS analizi gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra ise MS/MS yöntemiyle amino asit sekansı belirlenmiştir.

4.14.1.1. Protein Örneklerin Hazırlanması ve Triptik Parçalama

Hücre peletleri 500 μ l lizis tamponu içinde vorteklenir. Proteomik araştırmada standart lizis tamponu (%0.1 RapiGest™ SF: 1 mg RapiGest™ SF 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 içinde çözülür) olarak % 0.1 RapiGest™ SF (Waters) kullanılır.

RapiGest™ SF, zwitter iyonik deterjanı proteindeki iyonik etkileşimleri ortadan kaldırarak denatürasyonu kolaylaştırır. Böylelikle hem proteinlerin çözünürlüğü artar hem de tripsin proteazının, proteine yaklaşmasına ve lizin, arginin aminoasitlerinden sonra daha kolay bir şekilde peptit zincirinin kesilmesine olanak verir. Bu şekilde daha hızlı ve etkin tripsinizasyon gerçekleştirilir.

Örnekler, buz üzerine alınarak sonikasyona tabi tutulur. Sonikasyon üç tekrarlı olarak ve her bir tekrar 5 sn sürecek şekilde ayarlanır. Bu aşamadan sonra, örnekler 15000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek, hücre debrisı çöktürülür. Süpernatant yeni tüplere konur. Örneklerin protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenir. Her bir örnekten 100 µg protein için gerekli hacimler alınarak yeni LoBind Eppendorf tüplere konur.

Protein ve peptitlerin LC-MS/MS yöntemi ile tanımlanabilmesi için örnek hazırlama aşaması çok önemlidir. Nano sıvı kromatografisi (nanoUPLC) ve elektrospray iyonlaşma kütle spektrometresi (ESI-QTOF-MS) özellikle örnek içerisindeki tuzlardan ve küçük moleküllerden olumsuz yönde etkilendiğinden dolayı, örneğin tuzlardan arındırılması gerekmektedir. Bu işlemde, tripsinizasyondan önce protein karışımı PES moleküler kütle membran zarlı 0.5 ml spin kolonu Vivaspin 500 (Sartorius) ile santrifüj edilir ve örnek tuzlarından arındırılır. Örnekler 5 kDa PES membran spin kolonuna transfer edilir ve ilave 500 µl % 0,1 RapiGest™ SF çözeltisi ile iki defa yıkanır. Örnekler bu kolonlar içinde, hacimleri 50 µl olana kadar santrifüj edilip yoğunlaştırılır. Ardından örnekler yeni LoBind Eppendorf tüplere alınır. Örneklerin protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile tekrar belirlenir. Her bir örnekten 50 µg protein için gerekli hacimler alınarak yeni LoBind Eppendorf tüplere konur.

Her birinde 50 µg protein olduğunu bilinen tüplere son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde DTT (Dithiothreitol) ilave edilir ve 60 °C'ta 15 dakika boyunca inkübe edilerek disülfit bağlarının kırılması sağlanır. Daha sonra son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde iyodoasetamit (IAA) ilave edilir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edilerek indirgenmiş olan sistein yan zincirleri alkilenmiş olur. DTT ile disülfit bağları kırılır. Disülfit bağları proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarında bulunur. Alkilenme işlemiyle tekrar oluşabilecek disülfit bağları ve protein katlanmaları engellenmiş olur.

Triptik peptitleri elde etmek üzere, hazırlanan bu karışıma 50 mM NH₄HCO₃ içinde hazırlanan 1 µg proteomik dereceli tripsin (20 ng/µL stoktan 50 µL) eklenerek, gece boyu 37 °C'deki etüvde inkübe edilir. İnkübasyondan sonra proteaz aktivitesi, 3 µl trifloroasetik asit (TFA) ve 2 µl asetonitril ilavesi ile durdurulur. Peptit karışımına TFA katılması ile RapiGest deterjanı hegzanol ve kütle spektrometresi ile uyumlu olan bir kimyasala parçalanmış olur. Elde edilen peptit karışımı içerisinde son konsantrasyonu 50 fmol/µl olacak şekilde *Saccharomyces*

Cerevisiae enolaz triptik peptitleri dahili standart olarak eklenir. Örnek içerisine katılan bu dahili standart, örnekler arası normalizasyonun yapılabilmesi için gereklidir. Karışım 50 mM NH₄HCO₃ ile 200 µL'ye tamamlanır. Elde edilen karışımın triptik peptit konsantrasyonu 100 ng/µL olarak ayarlanmış olur. Bu aşamada peptitler 60 °C'de 2 saat kadar çalkalanarak ısıtılır. Son aşama olarak da 10 dk kadar 15000 rpm hızda santrifüj edilerek, çözünmeyen ve kromatografi aşamasında sorun çıkartabilecek partiküller çöktürülür ve süpernatant 200 µl'lik PTFE (politetrafloroetilen) örnek viyaline konur. Peptitleri bulunduran tüpler analize kadar -80°C'de saklanır.

4.14.1.2. Protein Örneklerin LC-MS/MS Sistemine Enjeksiyonu

Hazırlanan triptik peptit karışımından 5 µL (500 ng) alınarak yüksek performanslı sıvı kromatografisine bağlı, elektriksel püskürtme ile iyonlaştırma ve dört kutup zaman bazlı ölçüm kaynağı içeren kütle spektrometresi sistemine [nanoUPLC (*nano ultra performance liquid chromatography*)-ESI (*electrospray ionization*)-QTOF (*quadrupole time of flight*)-MS (*mass spectrometry*), Waters] yüklenir. Teknik hataları elimine etmek amacıyla her bir örnek için toplam 3 enjeksiyon yapılır. Her bir örnek için üç farklı biyolojik tekrar çalışılmıştır. Toplamda her bir örnek için 9 ayrı enjeksiyon yapılmıştır.

4.14.1.3. Proteinlerin Tanımlanması ve Farklılıkların Belirlenmesi

Tripsin ile kesilen proteinlerin spotlarının tanımlanması için ProteinLynx Global Server (PLGS 2.5) yazılımı kullanılır. Bu yazılım MS verisini analiz etmek için Monte Carlo algoritmasını kullanır. PLGS 2.2.5 yazılımı ile hesaplanan PLGS skoru doğruluğun belirlenmesinin istatistiksel bir ölçümüdür. Daha yüksek skor protein tanımlaması için daha yüksek güven demektir. PLGS skoru için alt limit 20 olarak tanımlanmıştır. Bu koşullar altında tanımlanan protein % 95 kesinlikle doğru kabul edilir. Enjeksiyon bazlı protein miktarları arasındaki istatistiksel farklılık varyans analizi (ANalysis Of VAriance; ANOVA) yöntemi ile değerlendirilir.

MS/MS-temelli peptit and protein tanımlamalarının validasyonu için Scaffold yazılımı (version Scaffold_3.6.1, Proteome Software Inc.) kullanılmıştır. Protein

ifadesindeki değişimlerin belirlenmesi için Progenesis LC-MS yazılımı V4.0 (Nonlinear Dynamics) kullanılmıştır. Örnekler arası normalizasyon total iyon yoğunluğuna göre yapılmıştır. Benzer proteinler gruplandırılmıştır ve en yüksek skora sahip olan proteinin hesaplanan miktar değeri verilmiştir.

4.15. İfadesi Değişen Proteinlerin Yolak Analizi

İfadesi değişen proteinlerin dahil oldukları sinyal yolaklarını, biyolojik süreçleri ve moleküler fonksiyonlarını daha detaylı incelemek için PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) version 9.0 açık erişim veritabanı, UniProt, Gene Ontology (GO) ve Reactome yolak analizi veri tabanları birlikte kullanılmıştır.

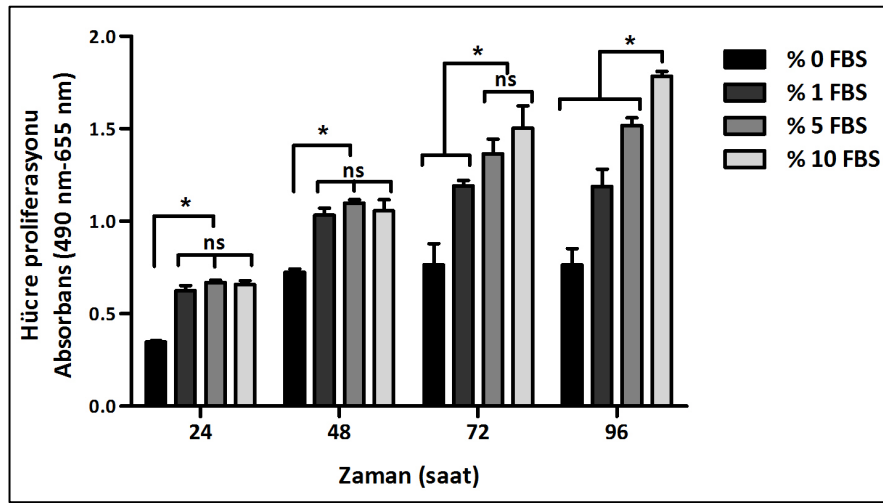
4.16. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama \pm S.E.M. olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5.03 software programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalar ANOVA ile yapılmıştır. ANOVA analizi Bonferroni oklu karşılaştırma analizi ile birlikte kullanılmıştır. Tüm testlerde istatistiksel önem için $p < 0.05$ kriter alınmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar * ile gösterilmiştir (*, $p < 0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıklar ise “ns” ifadesi ile gösterilmiştir (ns, $p \geq 0.05$). Her deney farklı zamanlarda en az üç kez tekrar edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE YORUMLAR

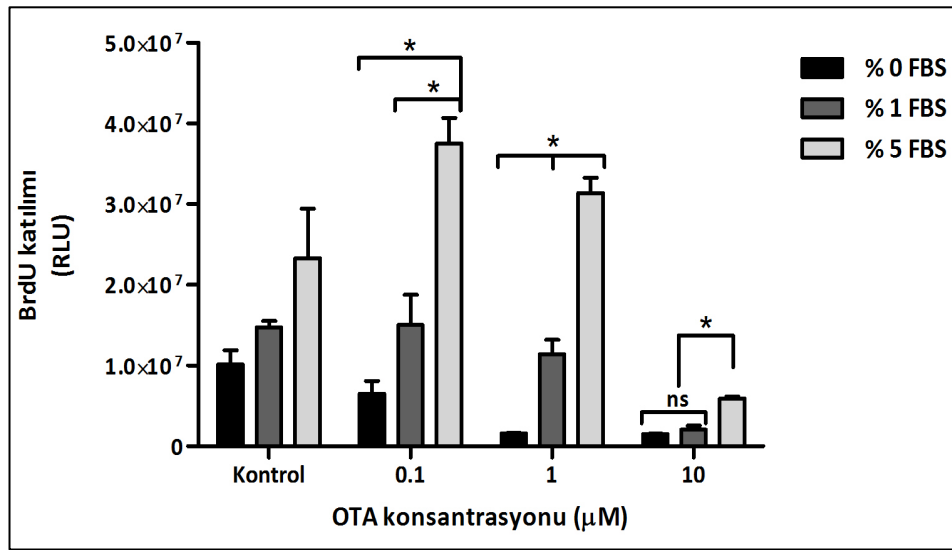
5.1. OTA'nın Uygulanacağı Besiyeri Koşullarının Tespiti

Literatürdeki *in vitro* çalışmaların genelinde, serum proteinlerine bağlanması nedeniyle OTA, serum içermeyen besiyerinde hücelere tatbik edilmiştir. Ancak laboratuvarımızda yapılan deneyler sonucunda HK-2 hücrelerinin serum içermeyen besiyerinde, uzun dönemde proliferasyon yeteneklerini kaybettikleri tespit edilmiştir (Şekil 5.1). Serum içermeyen besiyeri koşullarının hücreler için ayrıca bir stres kaynağı olması ve doğal koşullar altında OTA maruziyetinin serumsuz ortamda gerçekleşmeyeceği gerçeklerinden yola çıkarak, HK-2 hücrelerinin proliferasyon yeteneklerini kaybetmemesi için gereksinim duydukları minimum FBS oranı araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalar sonucu FBS içeriğinin % 5'in altına düştüğü durumlarda HK-2 hücrelerinin proliferasyon oranlarının, özellikle daha ileri zaman aralıklarında normal koşullara (% 10 FBS içeren besiyeri) göre oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, % 5 FBS içeren besiyerinin hücrelerin normal büyüme ve proliferasyon süreçlerini destekleyen minimum serum oranı olduğu bulunmuştur. Bu bulgulardan yola çıkarak OTA muamesesi sırasında hücreler için ayrıca bir stres oluşturmeyen ve hücre proliferasyonunun etkilenmediği FBS yüzdesi % 5 olan besiyeri kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Farklı FBS yüzdelерinin HK-2 hücre proliferasyonuna etkisi.

XTT analizi, mitokondriyal olarak aktif yani canlı hücreleri belirleyen bir analizdir. Dolayısıyla bu analiz yöntemi, proliferasyonu durduran herhangi bir ajanın yokluğunda, hücre proliferasyonunu belirlemek için kullanılmaktadır. Ancak OTA gibi bir ajanın varlığında, hücre proliferasyonunu daha direkt bir yolla belirlemek için BrdU katılımı analizi tercih edilmektedir. Bu nedenle, OTA'nın HK-2 hücre proliferasyonuna etkisini belirlemek amacıyla, hücelere farklı serum yüzdelerine sahip besiyerlerinde, farklı OTA konsantrasyonları (0.1, 1 ve 10 μM) 24 saat süreyle uygulanmıştır. BrdU katılımının analizi ile elde edilen bulgular Şekil 5.2'de grafik olarak verilmiştir.



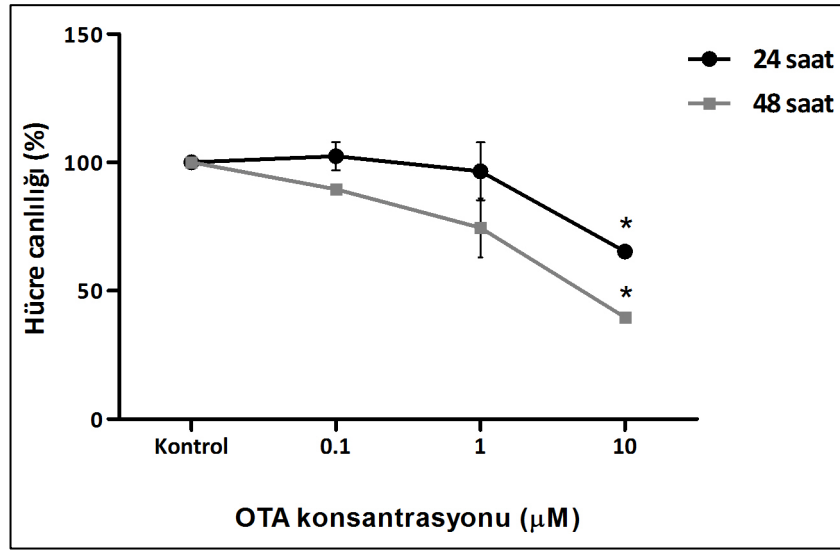
Şekil 5.2: Farklı FBS yüzdelerinde OTA'nın HK-2 hücre proliferasyonuna etkisi.

Serum içermeyen besiyerinde (% 0 FBS), kullanılan tüm OTA dozları HK-2 hücre proliferasyonunda inhibisyona sebep olmuştur. Besiyerinin serum içeriği % 1 iken uygulanan OTA dozlarına bağlı olarak, HK-2 hücre proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Yüzde 1 FBS içeren besiyerinde, 10 μM OTA dozunda, HK-2 hücrelerinin % 91.2'nin BrdU katılımını gerçekleştiremediği belirlenmiştir. FBS yüzdesinin 5 olduğu besiyerinde ise OTA'nın düşük dozlarında (0.1 ve 1 μM), HK-2 hücre proliferasyonunda artış varmış gibi gözlenirse de bu artışların anlamlı olmadığı hesaplanmıştır. Yalnızca 10 μM OTA konsantrasyonunda hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma gözlenirken, hücrelerin % 30'unun aktif olarak BrdU katılımını gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Şekil 5.2). OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerinin proliferasyon yeteneklerinin devam ettiği ortamın serum yüzdesinin 5

olduğu kabul edilerek, bundan sonraki deneylerimizde OTA'nın, % 5 FBS içeren besiyeri ile birlikte hücrelere uygulanmasına karar verilmiştir.

5.2. OTA'nın HK-2 Hücre Canlılığına Etkisi

OTA'nın HK-2 hücre canlılığına etkisini belirlemek için üç farklı OTA konsantrasyonu (0.1, 1 ve 10 μM) hücrelere 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Metabolik olarak aktif diğer bir ifadeyle canlı olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesinin ölçümüne dayalı olan analiz sonrasında elde edilen absorbans değerleri, OTA muamelesi gören hücrelerin absorbans değerlerinin kontrol hücrelerinin absorbans değerlerine oranlanması ile rölatif olarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı yüzde (%) olarak gösterilmiştir (Şekil 5.3).

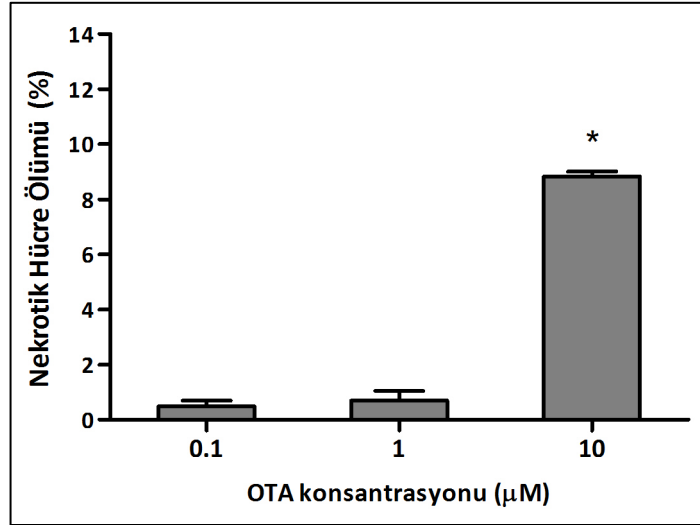


Şekil 5.3: OTA'nın HK-2 hücre canlılığına etkisi.

OTA zamana ve konsantrasyona bağlı olarak HK-2 hücrelerinin canlılığını azaltmaktadır. HK-2 hücre canlılığının 10 μM OTA konsantrasyonunda 24 saat sonunda % 35 oranında, 48 saat sonunda % 60 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.3). Düşük konsantrasyonlarda (0.1 ve 1 μM) gözlenen hafif azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5.3. OTA Teşvikli Nekroz

Hücre canlılığındaki doza-bağımlı azalmanın sebebinin OTA teşvikli nekroz olup olmadığını belirlemek amacıyla kontrol ve 24 saat süreyle OTA muamelesi yapılan HK-2 hücreleri CytoTox-Glo™ Assay ile analiz edilmiştir. Nekroz sırasında hücre şişer, ardından membran bütünlüğü bozulur ve hücre hızla lizis olur [Proskuryakov et al., 2003]. Böylece hücrenin sitoplazmik içeriği ortama karışır. Membran bütünlüğü bozularak ölen hücrelerden besiyerine salınan proteaz aktivitesinin ölçümüne dayalı olan CytoTox-Glo™ Assay ile OTA teşvikli nekrotik hücre ölümü ya da diğer bir ifadeyle sitotoksiste belirlenmiştir. İlgili proteazın substratı (AAF-Glo™) canlı hücre membranından geçemediği için canlı hücre popülasyonu tarafından herhangi bir sinyal oluşturulamaz. Şekil 5.4'teki grafikte kontrol grubuna görece OTA muamelesi yapılan örneklerdeki nekrotik hücre ölümü oranları yüzde (%) olarak gösterilmiştir.

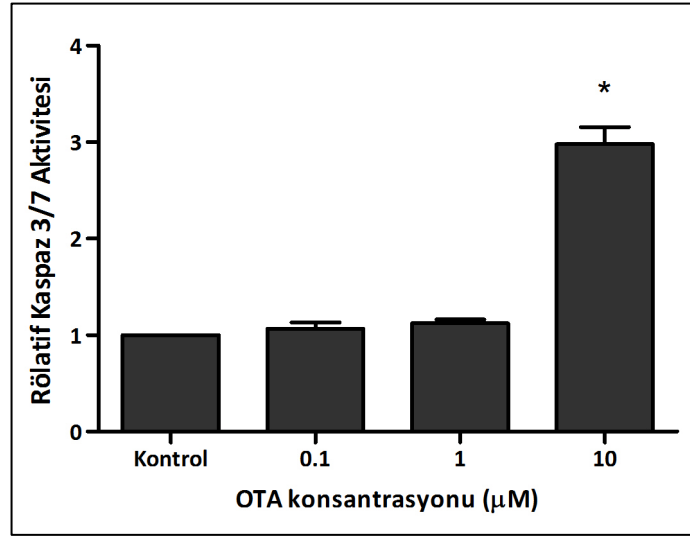


Şekil 5.4: HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli nekroz.

Sadece 10 µM OTA konsantrasyonu uygulanan grupta nekroz yoluyla ölen hücrelerin sayısında anlamlı olan bir artış tespit edilmiştir. Ancak % 8.8 ± 0.3 olarak hesaplanan bu artış ılımlı olarak kabul edilen değer aralığındadır (Şekil 5.4).

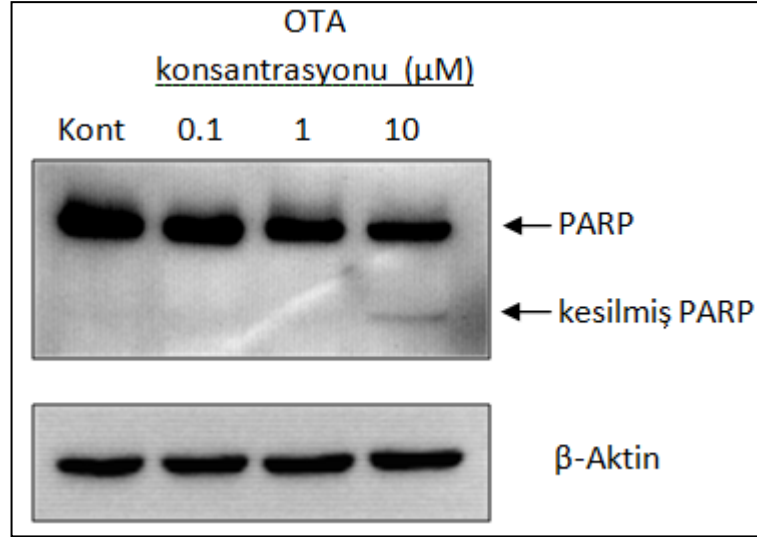
5.4. OTA Teşvikli Apoptoz

OTA'nın 10 μM konsantrasyonunda gözlenen nekrotik hücre ölümü oranı (% 8.8) (Şekil 5.4). HK-2 hücre canlılığında meydana gelen % 35'lik azalmayı (Şekil 5.3) tam olarak açıklayamamaktadır. Bu sebeple, HK-2 hücre canlılığındaki azalmada OTA teşvikli apoptozun rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 yapısal olarak birbirine çok benzeyen ve apoptotik yollarda kilit rol oynayan proteazlardır [Lakhani et al., 2006]. Kontrol ve 24 saat süreyle OTA muamelesi uygulanan hücrelerin apoptotik hücre ölümü oranları, kaspaz 3 ve 7 aktivitesinin ölçümüne dayalı olan Caspase-Glo® 3/7 Assay ile belirlenmiştir. HK-2 hücrelerinde düşük OTA konsantrasyonlarında (0.1 ve 1 μM OTA) kaspaz aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmezken, 10 μM OTA'nın kaspaz 3/7 aktivitesini 2.9 ± 0.3 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5.5: HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli kaspaz 3/7 aktivasyonu.

Ayrıca 10 μM OTA konsantrasyonunun HK-2 hücrelerinde teşvik ettiği apoptoz, 24 saat süreyle farklı OTA konsantrasyonları uygulanan hücrelerden elde edilen lizatların, anti-PARP antikoru kullanılarak yapılan Western blot analizi ile doğrulanmıştır. OTA'nın (10 μM) PARP kesilmesini uyardığı tespit edilmiştir (Şekil 5.6).

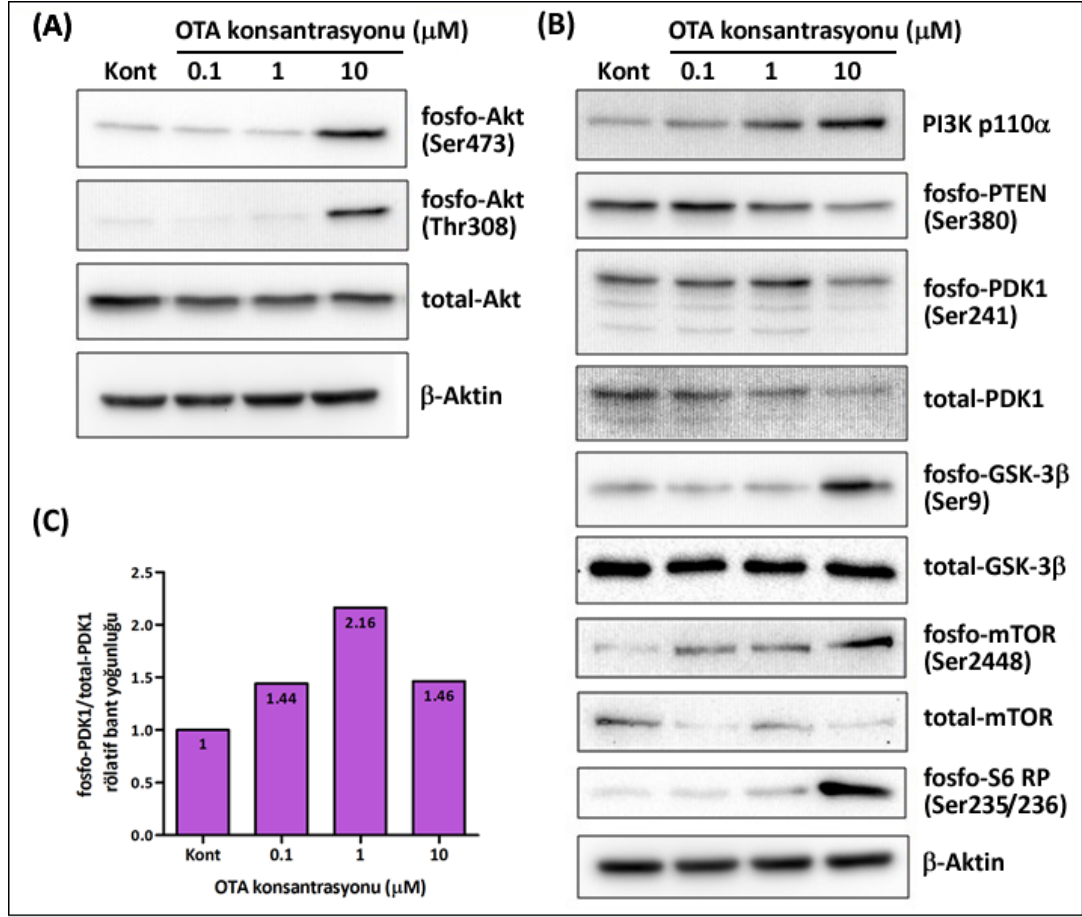


Şekil 5.6: HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli PARP kesilmesi.

5.5. OTA Teşvikli PI3K/Akt Sinyal Yolağının Aktivasyonu

Bir hücrenin kanserleşmesi sürecinde artmış sağkalım (survival) yeteneği olmazsa olmazlardandır. Sağkalım için temel yolak olan PI3K/Akt sinyal yolağının OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerindeki aktivasyon durumu bu yolağa özgül proteinleri ve bu proteinlerin fosfo-formlarını tanıyan antikolar kullanılarak Western blot yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 5.7).

HK-2 hücrelerinde OTA'nın düşük dozlarında (0.1 ve 1 μM) herhangi bir etki gözlenmezken, 10 μM OTA konsantrasyonunda Akt'nin hem Ser473 hem de Thr308 fosforilasyonunda artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7A). PI3K/Akt sinyal yolağının diğer bileşenleri için OTA'nın etkisi incelendiğinde, PI3K'in katalitik altbirimi olan p110α proteinin miktarında doz bağımlı olarak artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.7B). PI3K/Akt yolağının negatif düzenleyicisi olan PTEN'in (Phosphatase and tensin homolog) Ser380 fosforilasyonunda azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Ser380 fosforilasyonunun azalması PTEN'in stabilitesinin azaldığını göstermektedir [Vazquez et al., 2000]. Akt aktivasyonu için pozitif düzenleyici olan PDK1'in Ser241 fosforilasyonunda azalma gözlemlenmiştir (Şekil 5.7B). Ancak fosfo-PDK1 (Ser241) seviyesinde gözlenen bu azalma, fosfo-PDK1 (Ser241)'in total PDK1 ile normalize edilmesi durumunda artış olarak yansımaktadır (Şekil 5.7C).



Şekil 5.7: OTA teşvikli a) Akt aktivasyonu b) PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı proteinlerinin seviyeleri ve fosforilasyon durumları, c) fosfo-PDK1/total-PDK1 rölatif bant yoğunluğu.

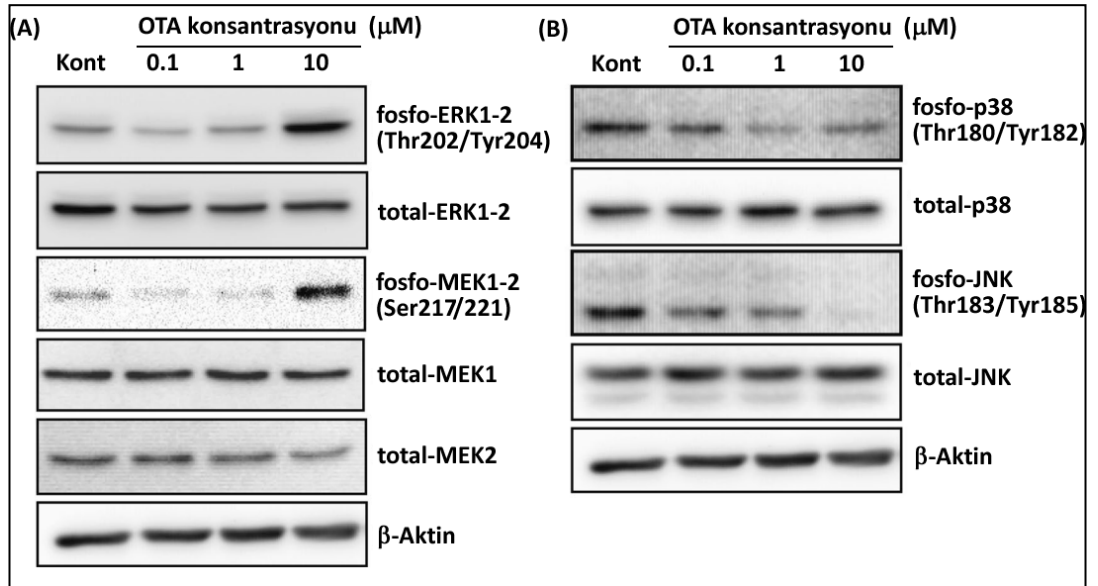
Akt aktivasyonu ile uyumlu olarak 10 μM OTA muamelesi gören hücrelerde GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) Ser9 pozisyonundan fosforillenerek inhibe edilmektedir. Akt'nin önemli hedefleri olan mTOR'un ve S6 RP'in (S6 ribosomal protein) fosforilasyon seviyelerinde de 10 μM OTA muamelesi gören HK-2 hücrelerinde artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7B). Elde edilen verilerle HK-2 hücrelerinde OTA'nın karsinogenez ile sıkı ilişkili bir yolak olan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını aktive ettiği ilk kez gösterilmiştir [Özcan et al., 2014].

5.6. OTA Teşvikli MEK/ERK1-2 Sinyal Yolağının Aktivasyonu

MAPK sinyali belirli kanserlerde düzenlenmesi bozulan yolaklar arasında yer almaktadır [Dhillon et al., 2007]. OTA aracılı MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonu daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. OTA teşvikli JNK aktivasyonu apoptoz ile

ilişkilendirilirken, ERK1-2 aktivasyonunun OTA aracılı karsinogenezde rolü olduğu düşünülmektedir [Gekle et al., 2000], [Gekle et al., 2005], [Marin-Kuan et al., 2007]. MDCK-C7 hücrelerinde OTA teşvikli uzun süreli ERK1-2 aktivasyonunun epitel hücrelerin yeniden farklılaşması ve transformasyonu ile ilişkilendirilmiştir [Gekle et al., 1998].

HK-2 hücrelerinde OTA'nın MAPK sinyal yollarına etkisini belirlemek için ilk olarak 24 saat süreyle farklı OTA konsantrasyonu uygulanan hücrelerden elde edilen lizatlar Western blot yöntemi ile incelenmiştir. OTA'nın HK-2 hücrelerinde MEK/ERK1-2 sinyalini aktive ettiği belirlenmiştir (Şekil 5.8). OTA'nın ERK1-2 fosforilasyonunu uyardığı hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerle daha önce gösterilmesine rağmen, HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli ERK1-2 fosforilasyonu ve bu fosforilasyonu yürüten üst düzenleyici kinazın MEK1-2 olduğu ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir [Özcan et al., 2014].

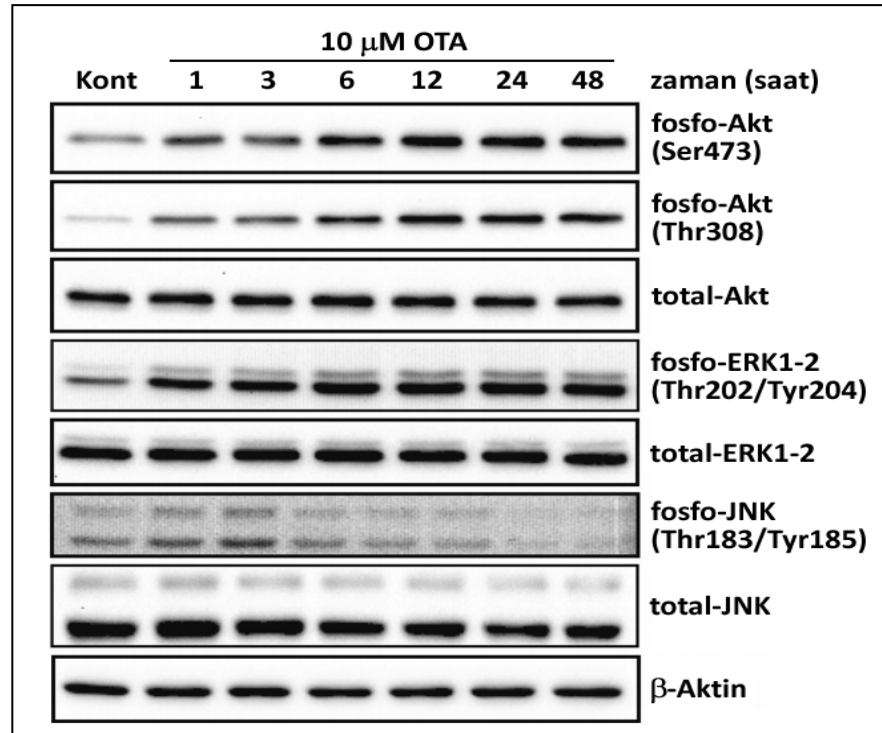


Şekil 5.8: OTA teşvikli a) MEK/ERK1-2 sinyal proteinlerinin aktivasyonu, b) p38 ve JNK inaktivasyonu.

HK-2 hücrelerinde 24 saatlik OTA muamelesi sonrasında 10 µM'lık OTA dozunun MEK/ERK1-2 fosforilasyonunu arttırdığı, buna karşın aynı koşullarda p38 ve JNK aktivasyonlarının kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.8).

5.7. OTA Teşvikli Akt ve ERK1-2 Aktivasyonunun Zamana Bağlı İncelenmesi

OTA'nın PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 sinyal yollarını aktive ettiğinin belirlenmesinin ardından, bu aktivasyon profilinin zamana bağlı olarak incelenmesine karar verilmiştir. HK-2 hücreleri 48 saat süreyle 10 μ M OTA'ya maruz bırakılmış ve Western blot yöntemiyle incelenmek üzere belirli zaman aralıklarında hücre lizatları hazırlanmıştır. Özgül antikorlar kullanılarak Akt, ERK1-2 ve JNK fosforilasyonları incelenmiştir. Birinci saatin sonunda ERK1-2 fosforilasyonunda güçlü bir artış gözlenirken, Akt fosforilasyonunun OTA muamelesinin altıncı saatinde pik yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 5.9). İlginç olarak, her iki kinazın fosforilasyonunun da 48 saate kadar sürdürüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuç HK-2 hücrelerinde OTA'nın bu yolların uzun süreli aktivasyonunu uyardığını işaret etmektedir.



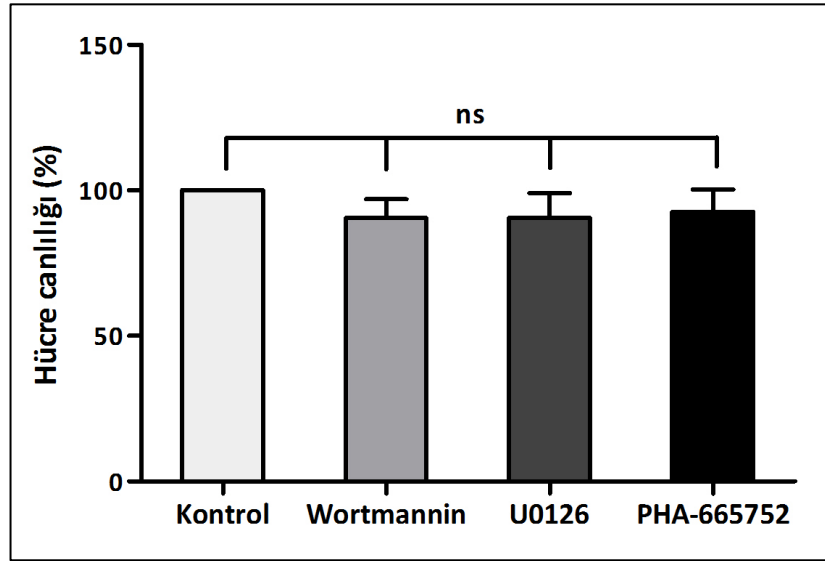
Şekil 5.9: PI3K/Akt and MAPK sinyal proteinlerine OTA'nın zamana bağlı etkisi.

Şaşırtıcı bir bulgu olarak, JNK/SAPK fosforilasyonunun OTA muamelesinin 6. saatten sonra baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 5.9). Bu sonuç HK-2 hücrelerinde

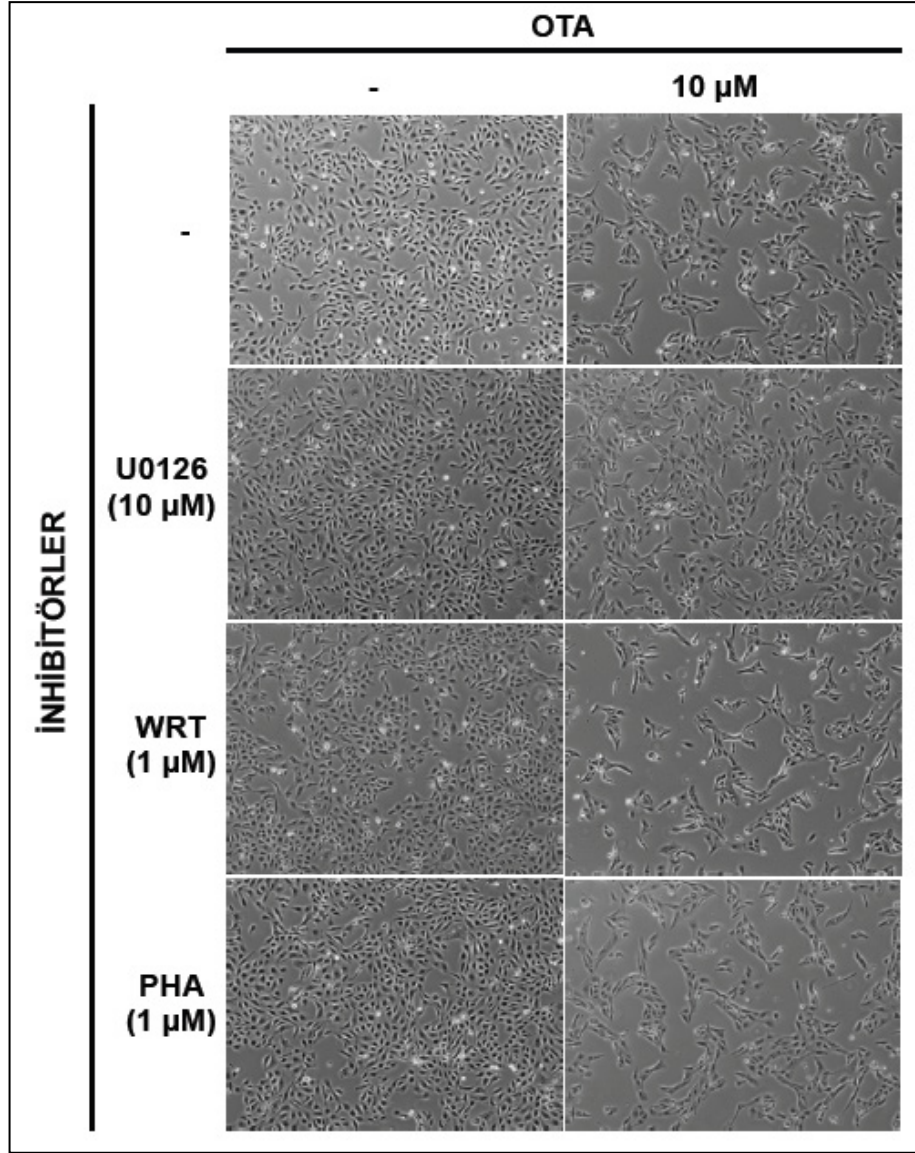
OTA teşvikli apoptozda beklenilenin aksine JNK/SAPK sinyalinin önemli bir role sahip olmadığına işaret etmektedir.

5.8. OTA ile Aktive Olan PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 Sinyal Yolaklarının Hücre Canlılığındaki Rollerini

OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerinde PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 sinyal yolaklarının işlevsel rollerini ve olası birbiriyle etkileşimlerini açığa çıkarmak için ilişkili sinyal yolaklarına özgü inhibitörler kullanılmıştır. PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu için PI3K inhibitörü olan Wortmannin (1 μ M) ve MEK/ERK1-2 sinyal yolağının inhibisyonu için MEK inhibitörü olan U0126 (10 μ M) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan inhibitörlerin (Wortmannin, U0126 ve daha sonra değinilecek olan PHA-665752) belirtilen konsantrasyonlarda HK-2 hücre canlılığına ve morfolojisine herhangi bir yan etkisi tespit edilmemiştir (Şekil 5.10 ve Şekil 5.11).

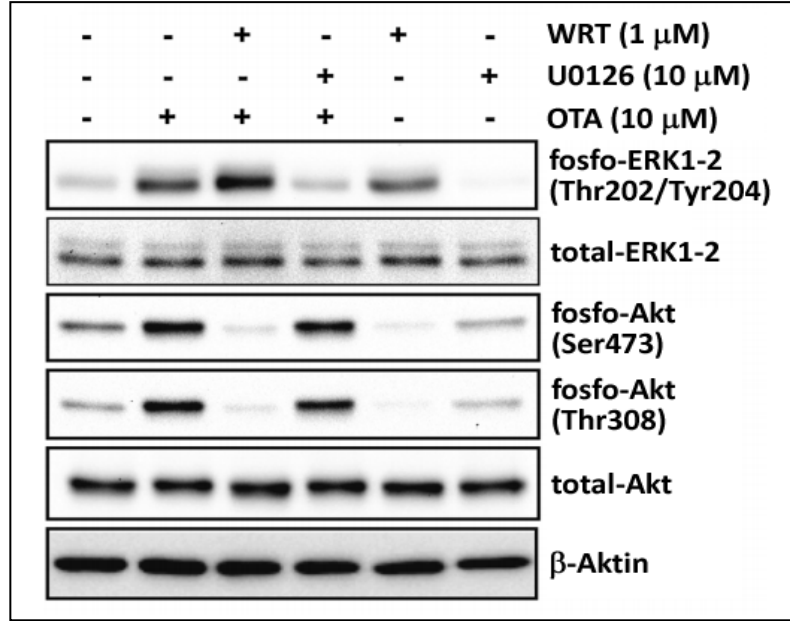


Şekil 5.10: İnhibitörlerin HK-2 hücrelerin canlılığına etkisi.



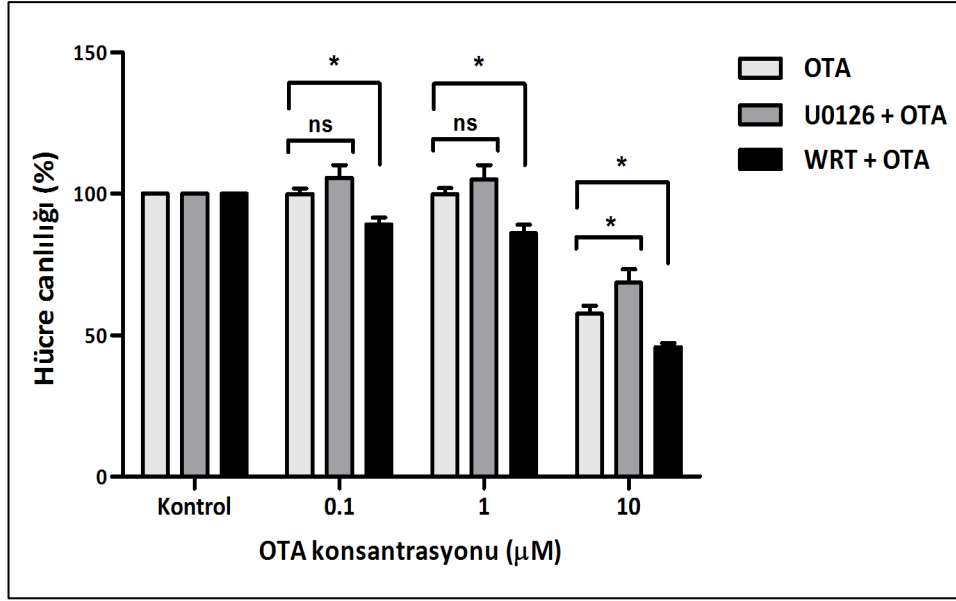
Şekil 5.11: OTA ve inhibitörlerin HK-2 hücre morfolojisine etkisi.

OTA muamelesinden 1 saat önce uygulanan inhibitörler 24 saat süreyle hücrelere uygulanmış ve OTA muamelesi sırasında ortamdaki çekilmemişlerdir. Beklenildiği gibi Wortmannin OTA teşvikli Akt fosforilasyonunu engellemiştir. Ancak umulmadık bir şekilde hücrelerde ERK1-2 fosforilasyonunun arttığı gözlenmiştir. Diğer yandan OTA teşvikli ERK1-2 fosforilasyonunun U0126 ile inhibe edilmesinin Akt fosforilasyonu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12: PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 yolaklarının kimyasal inhibisyonu ve inhibitörlerin diğer proteinler üzerindeki etkileri.

Paralel deneylerle sinyal yolaklarının inhibisyonu durumunda OTA'nın HK-2 hücre canlılığına ve apoptoza etkisi araştırılmıştır. Wortmannin ile PI3K/Akt sinyalinin inhibisyonu durumunda OTA muamelesi gören tüm hücre gruplarının canlılığında sadece OTA muamelesi gören hücrelerin canlılığına göre azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum uygulanan üç farklı OTA konsantrasyonu (0.1, 1 ve 10 μ M) için de istatistiksel olarak anlamlı bir azalmadır (Şekil 5.13). Buna karşın U0126 ile MEK/ERK1-2 sinyalinin inhibisyonu durumunda OTA muamelesi gören hücrelerin canlılığında, yalnızca OTA muamelesi gören hücrelerin canlılığına göre artış olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle, OTA'nın HK-2 hücre canlılığı üzerine olan negatif etkisinin, MEK/ERK1-2 sinyalinin inhibisyonu ile azaltıldığı saptanmıştır. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tek örnek grubu 10 μ M OTA grubudur. OTA'nın düşük konsantrasyonlarında (0.1 ve 1 μ M) hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif artışlar gözlenmiştir (Şekil 5.13).



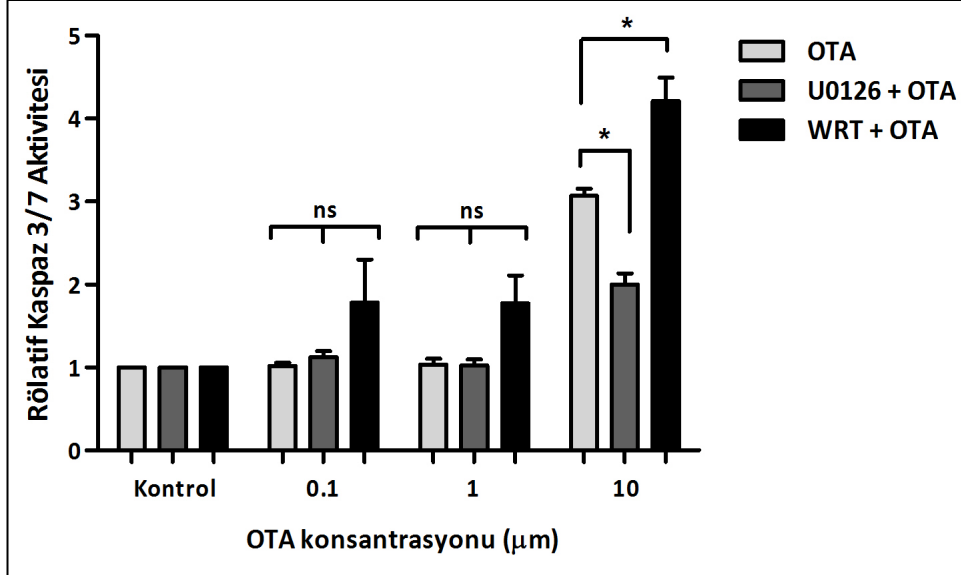
Şekil 5.13: PI3K/Akt ve MAPK/ERK1-2 sinyalinin inhibisyonu ile OTA'nın HK-2 hücre canlılığına etkisi.

Elde edilen veriler "OTA'ya maruz kalan HK-2 hücrelerinin yaşam ya da ölüm kararında, PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 sinyal yolları zıt yönde çalışmaktadır" hipotezinin oluşumunu sağlamıştır.

5.9. OTA ile Aktive Olan MEK/ERK1-2 Sinyal Yolağının Apoptoz ile İlişkisi

MEK/ERK1-2 aktivasyonunun hücre canlılığının azalmasına olan katkısının daha iyi anlaşılması için, U0126 ve OTA ile muamele yapılan HK-2 hücrelerinin kaspaz-3/7 aktivitesi analiz edilmiştir. U0126 ile OTA'nın birlikte uygulandığı HK-2 hücrelerinde, sadece OTA muamelesi yapılan hücrelerine göre, kaspaz-3/7 aktivasyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.14). Buna karşın, Wortmannin ile OTA'nın birlikte uygulandığı hücrelerde, sadece OTA muamelesi yapılan hücrelerine göre, kaspaz-3/7 aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.14). Elde edilen bu sonuç HK-2 hücrelerinde OTA ile aktive olan MEK/ERK1-2 sinyalinin apoptoz için çalıştığını desteklemektedir. Ayrıca HK-2 hücrelerinde OTA teşikli MEK/ERK1-2 sinyal aktivasyonunun apoptoz için çalıştığının doğrulanması için 10 µM OTA ve U0126+OTA uygulanan hücrelerin sub-G₀/G₁ popülasyonu oranları akış sitometrisi (flow cytometry) kullanılarak belirlenmiştir. MEK/ERK1-2 sinyalinin inhibisyonu hipodiploid apoptotik HK-2

hücrelerinin yüzdesini, sadece OTA muamelesi yapılan HK-2 hücrelerinininkine göre düşürmüştür [Özcan et al., 2014]. Tüm bu sonuçlar MEK/ERK1-2 aktivasyonunun HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli apoptoza neden olduğunu işaret etmektedir.

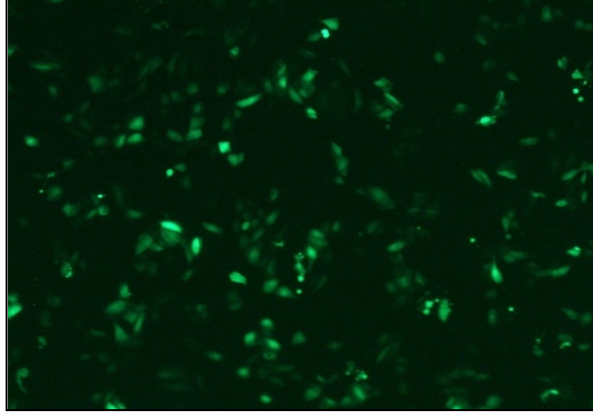


Şekil 5.14: OTA ile Aktive Olan MEK/ERK1-2 Sinyal Yolağının Apoptoz ile İlişkisi.

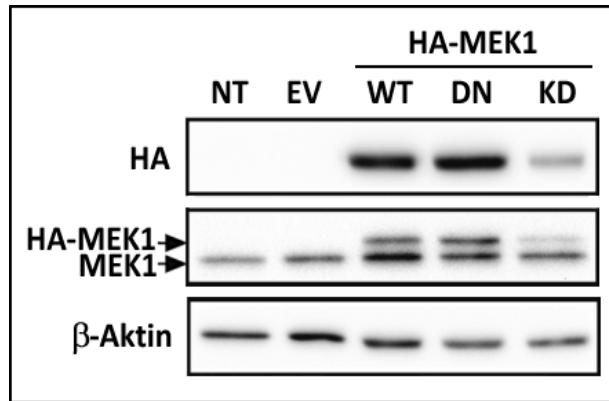
5.10. MEK/ERK1-2 Sinyalinin Gen Düzeyinde İnhibisyonu ve HK-2 Hücre Canlılığına Etkisi

MEK1-2 aktivasyonunun apototik etkisini (Şekil 5.13 ve Şekil 5.14) doğrulamak için daha direkt bir yaklaşım olan transfeksiyon yoluyla protein miktarının yeniden düzenlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, ilk olarak HK-2 hücrelerinin transfeksiyon verimliliğinin kontrolü için hücreler pEGFP-N₂ plazmidi ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra yeşil floresan proteinin (GFP) anlatımını yapan hücrelerin floresan mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 5.15'te verilmiştir. Daha sonra Bölüm 4.12'de anlatıldığı üzere HK-2 hücreleri MEK1'in dominant-negatif (DN-MEK1) ve kinaz inaktif (KD-MEK1) formlarını kodlayan ifade plazmidleri ile geçici olarak transfekte edilmişlerdir. Bu vektörler tarafından ifade edilen ve HA (hemaglutinin) etiketi taşıyan her iki proteinin de ERK1-2 aktivitesinde azalmaya dolayısıyla OTA aracılı apoptozda azalmaya sebep olması beklenmiştir. Ayrıca HK-2 hücreleri kontrol amaçlı olarak HA işareti taşıyan yabancı tip (WT-MEK1) ekspresyon plazmidi ve boş vektör (EV) ile de geçici olarak

transfekte edilmiştir. Tüm transgenlerin ekspresyonunun etkinliği, transfeksiyondan 48 saat sonra elde edilen lizatlarla, HA ve MEK1 antikorları kullanılarak yapılan Western blot yöntemi ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.16).

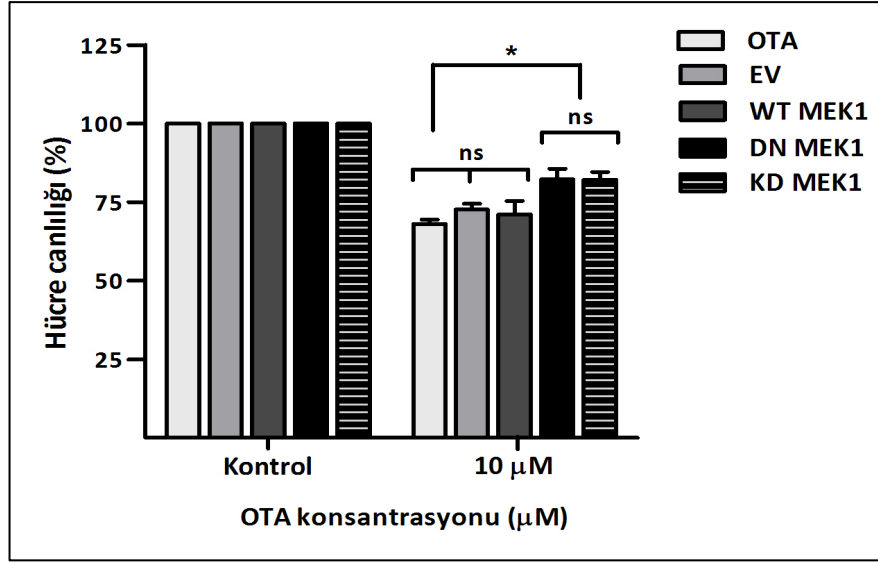


Şekil 5.15: HK-2 hücrelerinin transfeksiyon verimliliği.



Şekil 5.16: MEK1'in gen düzeyinde inhibisyonu.

MEK1 vektör plazmidlerin transfeksiyonundan 24 sonra 10 μ M OTA muamelesi yapılan HK-2 hücrelerinin canlılığı incelendiğinde, elde edilen sonuçların inhibitör kullanılarak yapılan deneylerle uyumlu olduğu görülmüştür. DN-MEK1 ve KD-MEK1'in aşırı ifadesi (overekspresyonu) yoluyla MEK1-2 sinyalinin inhibisyonu sonucu hücre canlılığında, transfekte olmayan (NT) ya da EV-MEK1 ve WT-MEK1 transfektan hücrelerinin canlılığına kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 5.17).

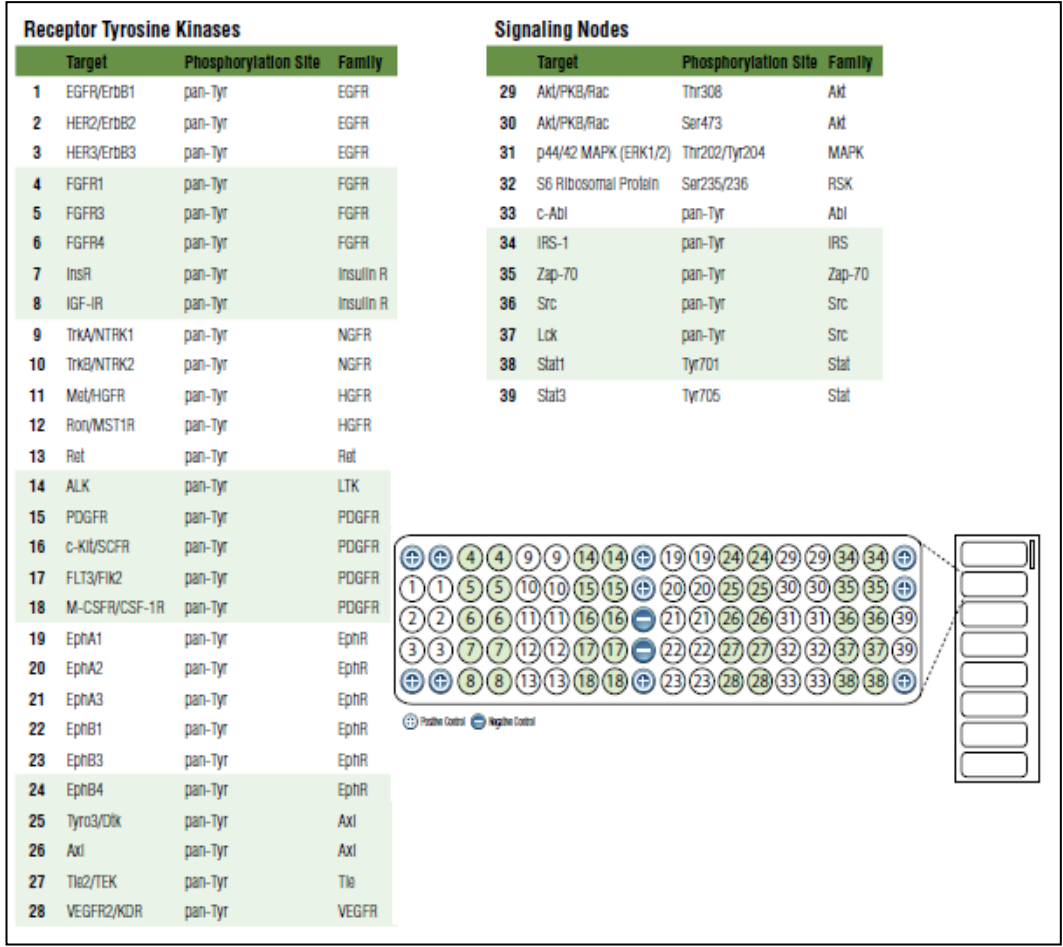


Şekil 5.17: Fonksiyonel olmayan MEK1'in aşırı anlatımının HK-2 hücre canlılığına etkisi.

5.11. HK-2 Hücrelerinde OTA Teşvikli c-MET Aktivasyonu

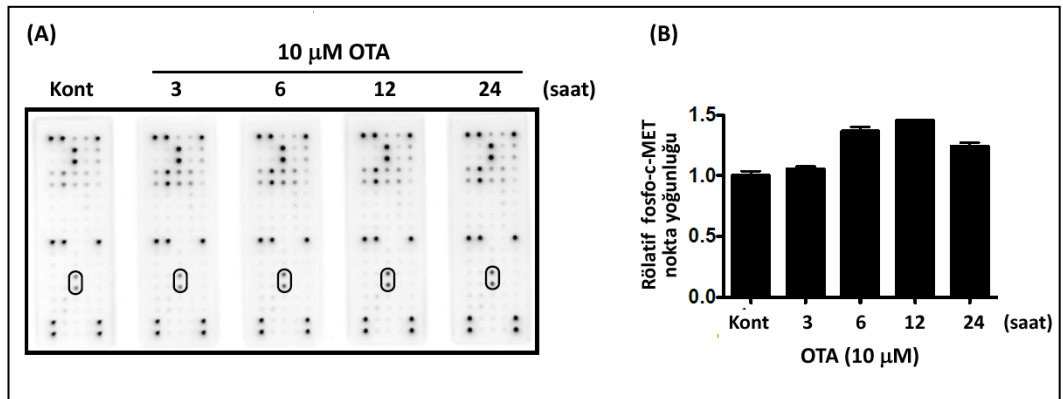
HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli PI3K/Akt ve/veya MEK/ERK1-2 aktivasyonunun üst düzenleyicilerini belirlemek, sinyal iletim olaylarını daha iyi anlamak ve OTA tarafından uyarılan bu yollara ilişkin herhangi bir reseptör tirozin kinazın varlığını araştırmak için PathScan Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Array kullanılmıştır. PathScan RTK Array slaytının şekli ve slayt üzerindeki fosfo-proteinlere özgül antikoları barındıran spotlar Şekil 5.18'te verilmiştir.

HK-2 hücreleri 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 10 μM OTA'ya maruz bırakılmıştır. PathScan RTK Array ile OTA muamelesini takiben c-MET reseptör tirozin kinazının fosforilasyonunun arttığı tespit edilmiştir. c-MET'in tüm fosfo-tirozin aminoasitlerini tanıyan diğer bir deyişle pan-Tyr antikoları içeren spotlar oval içine alınan 11 no.lu spotlardır (Şekil 5.19A). RTK Array'deki c-MET fosforilasyonunu işaret eden spotların yoğunluğu ImageJ programı yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar kontrole ait yoğunluk değerine oranlanarak rölatif fosfo-c-MET nokta yoğunluğu olarak grafiğe dökülmüştür (Şekil 5.19B).



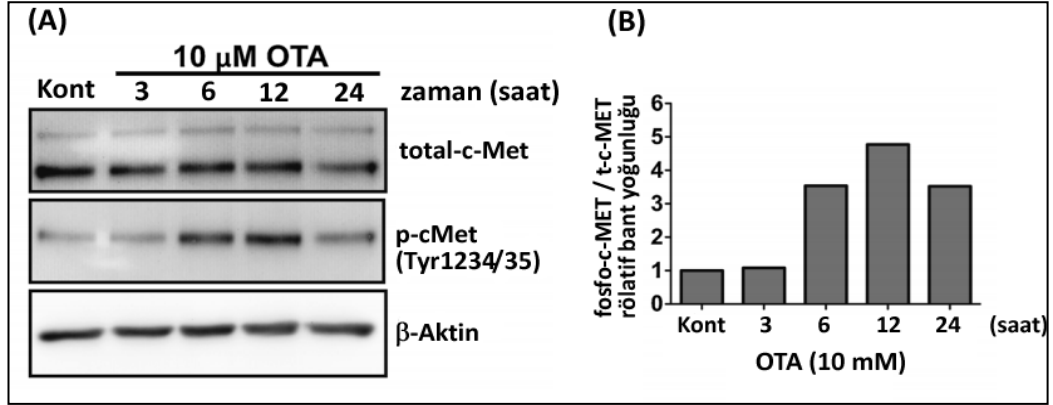
Şekil 5.18: PathScan RTK Array'in fiziksel haritası.

c-MET'ten başka, PathScan RTK Array ile fosforile olduğu belirlenen diğer kinazlar Akt (29 ve 30 numaralı spot), ERK1-2 (31 numaralı spot), Src (36 numaralı spot) ve S6 RP (32 numaralı spot)'dir (Şekil 5.19A).



Şekil 5.19: a) PathScan RTK Array analizi, b) RTK Array'deki fosfo-c-MET spotlarının yoğunluğu.

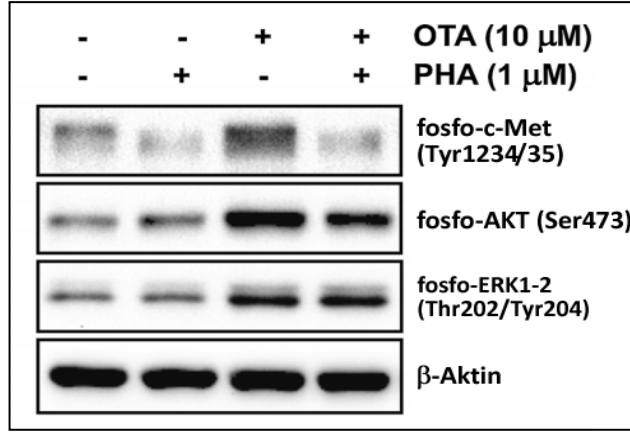
Gerçekten c-MET'in aktivasyonu için gerekli olan tirozin aminoasidinin fosforilasyona uğradığını doğrulamak için, zamana bağlı OTA muamelesi yapılan hücrelerden elde edilen lizatlar, total-c-MET ve fosfo-c-MET (Tyr1234/1235) antikorları ile Western blot yöntemiyle incelenmiştir. c-MET fosforilasyonunun OTA muamelesini takiben 6. saatte önemli ölçüde arttığı ve 12. saatte pik yaptıktan sonra tekrar bir miktar azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.20).



Şekil 5.20: a) OTA teşvikli c-MET aktivasyonu, b) fosfo-c-MET(Tyr1234)/total c-MET rölatif bant yoğunluğu.

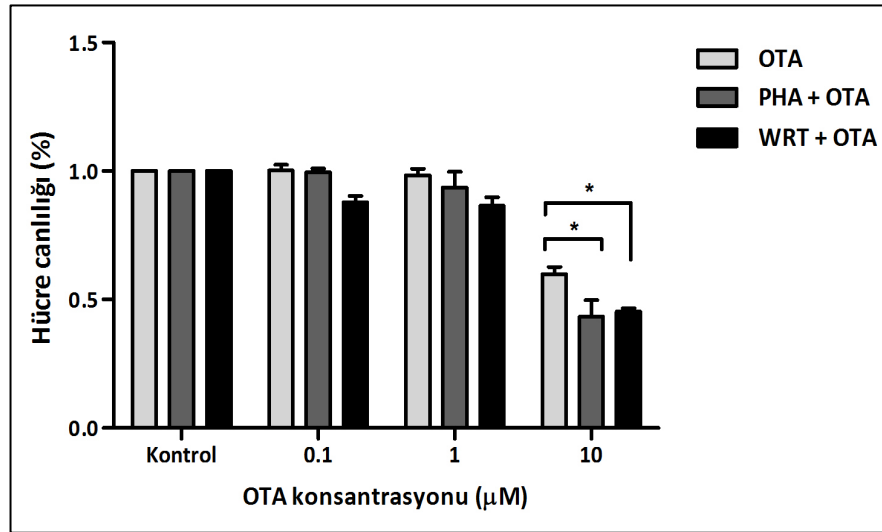
5.12. c-MET RTK'ın Kimyasal İnhibisyonu

c-MET'in OTA teşvikli Akt ve/veya ERK1-2 aktivasyonundan sorumlu olup olmadığını belirlemek için, c-MET'e özgü bir inhibitör olan PHA-665752 kullanılmıştır. PHA-665752 ATP ile yarışmalı olarak c-MET kinazın katalitik aktivitesini inhibe eder. PHA-665752 ve OTA'nın 6 saat süreyle uygulandığı hücrelerden elde edilen lizatlar kullanılarak yapılan Western blot analizi ile OTA teşvikli c-MET ve Akt'nin fosforilasyon seviyelerinde önemli ölçüde azalma meydana geldiği, ancak ERK1-2 fosforilasyonunun c-MET inhibisyonundan etkilenmediği tespit edilmiştir (Şekil 5.21).



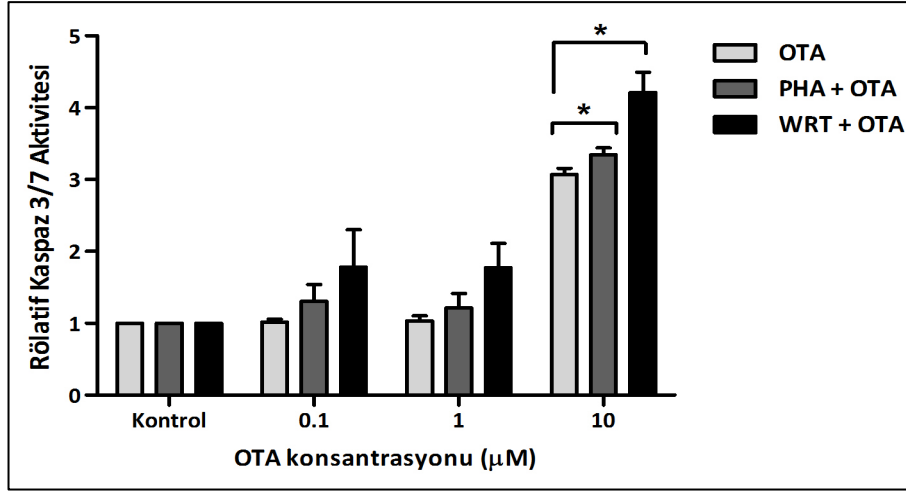
Şekil 5.21: OTA teşvikli Akt aktivasyonundan sorumlu olan c-MET RTK.

Akt aktivasyonunun anti-apoptotik etkisinin gözlenmesi ile uyumlu olarak, 1 μ M PHA-665752'nin OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerinin canlılığına etkisi araştırılmıştır. c-MET'in inhibisyonu durumunda 10 μ M OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerin canlılığının, sadece 10 μ M OTA muamelesi yapılan hücrelerine kıyasla daha da azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.22).



Şekil 5.22: c-MET'in kimyasal inhibisyonunun HK-2 hücre canlılığına etkisi.

c-MET inhibisyonunun kaspaz 3/7 aktivitesine etkisi incelendiğinde, c-MET'in inhibisyonu durumunda OTA'nın apoptotik etkisinin yalnızca OTA muamelesi gören hücrelerine göre hafif oranda arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5.23). Bu sonuç aynı zamanda OTA teşvikli c-MET aktivasyonunun ERK1-2 aktivasyonu ile ilişkili olmadığını da desteklemektedir.



Şekil 5.23: c-MET inhibisyonunun OTA teşvikli apoptoza etkisi.

Elde edilen sonuçlar, OTA muamelesine cevaben c-MET'in aktive olduğunu ve bu aktivasyonun hücre sağkalımı için PI3K/Akt sinyali aktivasyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşın, OTA teşvikli MEK/ERK1-2 aktivasyonunun c-MET aktivasyonu ile gerçekleşmediği, henüz bizim de bilmediğimiz, muhtemel başka bir üst düzenleyici kinazın MEK/ERK1-2 aktivasyonunda etkin olabileceği sonucunu doğurmuştur.

5.13. Proteom Analizi

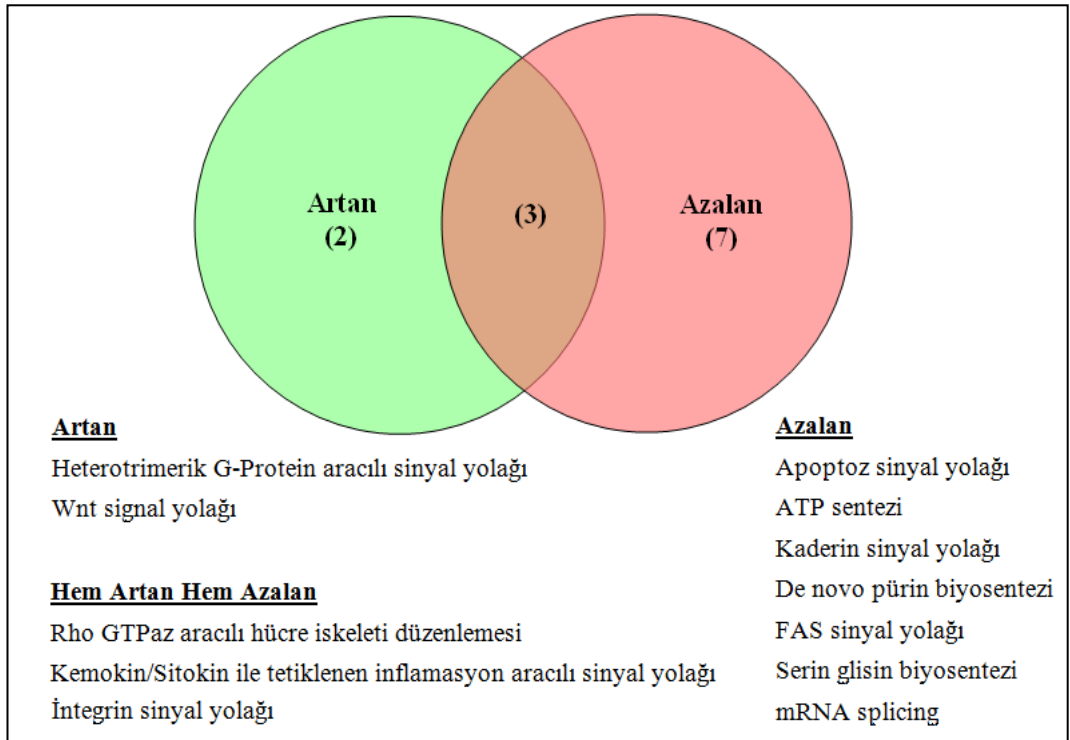
Kontrol ve 10 µM OTA muamelesi yapılan hücrelerden elde edilen lizatlar etiketsiz LC-MS/MS yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve sonuç olarak hem kontrol hem de 10 µM OTA muamelesi yapılan hücre lizatlarında ortak olarak 393 adet protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerden 96 tanesinin ifade değişimi istatistiksel olarak önemli görünmektedir. Protein miktarlarındaki değişim, kontrol grubuna kıyasla 10 µM OTA grubundaki rölatif değişimi ifade etmektedir. İfadesi değişen proteinlerin 40 tanesinde kontrol grubuna kıyasla artış gözlenirken, 56 tanesinde azalma olduğu belirlenmiştir. İfadesi değişen proteinlerin görevli oldukları sinyal yollarını, biyolojik süreçleri ve moleküler fonksiyonlarını daha detaylı incelemek için PANTHER version 9.0 açık erişim veritabanı, UniProt, Gene Ontology (GO) ve Reactome yolak analizi veri tabanları birlikte kullanılmıştır. Kontrol hücrelerine görece 10 µM OTA uygulanan hücrelerde ifadesi artan proteinlerin, dahil oldukları protein sınıfı, moleküler fonksiyonları, yer aldıkları

biyolojik süreçler ve sinyal yolları Tablo 5.1’de, ifadesi azalan proteinlerinki ise Tablo 5.2’de verilmiştir.

5.13.1. İfadesi Değişen Proteinlerin Dahil Oldukları Sinyal Yollarına Göre Değerlendirilmesi

PANTHER veritabanının OTA ile ifadesi değişen proteinler için ilişkilendirilebildiği başlıca sinyal yollarının, apoptoz, ATP sentezi, kaderin, RhoGTPaz’larca düzenlenen hücre iskeleti, *de novo* pürin biyosentezi, FAS sinyali, integrin, kemokin/sitokin ile tetiklenen inflamasyon aracılı sinyal, serin glisin biyosentezi, mRNA kırılması (mRNA splicing), Wnt sinyali ve heterotrimerik G-protein aracılı sinyal yolları olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.24).

İfadesi değişen proteinlerin dahil oldukları sinyal yolları PANTHER veritabanı ile tespit edilerek Şekil 5.24’te Venn şeması şeklinde gösterilmiştir. UniProt ve Reactome veritabanlarından elde edilen ek bilgiler Tablo 5.1 ve Tablo 5.2’de sırasıyla mavi ve yeşil renkli olarak bildirilmiştir.



Şekil 5.24: İfadesi değişen proteinlerin dahil olduğu sinyal yolları.

Tablo 5.1: HK-2 hücrelerinde OTA-teşvikli ifadesi artan proteinler.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G _(i) /G _(s) /G _(o) subunit gamma-12 (GBG12)	heterotrimeric G-protein	protein binding GTPase activity signal transducer activity	small molecule metabolic process cell communication signal transduction	Heterotrimeric G-protein signaling pathway Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway Wnt signaling pathway
P62820	Ras-related protein Rab-1A (RAB1A)	G-protein	GTPase activity	ER to Golgi vesicle-mediated transport autophagic vacuole assembly mitotic cell cycle	Small GTPase mediated signal transduction Autophagy Golgi cisternae pericentriolar stack reorganization
Q92928	Ras-related protein Rab-13 (RAB1C)	Small GTPase	GTP binding	protein transport probably involved in vesicular traffic	Small GTPase mediated signal transduction
Q15286	Ras-related protein Rab-35 (RAB35)	G-protein	GTPase activity	protein transport cytokinesis	Small GTPase mediated signal transduction

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P32004	Neural cell adhesion molecule L1 (L1CAM)	immunoglobulin receptor superfamily protein phosphatase immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule	phosphoprotein phosphatase activity receptor activity	cell-cell adhesion cell-cell signaling nervous system development immune system process induction of apoptosis protein modification process	Cell surface receptor signaling pathway
P04004	Vitronectin (VTNC)	cell adhesion molecule	integrin binding ECM binding	cell-matrix adhesion integrin-mediated cell adhesion cellular process	Vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway Regulation of complement activation
P08670	Vimentin (VIME)	intermediate filament structural protein	structural molecule activity	cellular component organization or movement apoptotic process developmental process	Apoptosis Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal proteins

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P35579	Myosin-9 (MYH9)	actin binding motor protein cell junction protein G-protein modulator	protein binding catalytic activity enzyme regulator activity motor protein structural molecule activity	cytoskeleton reorganization and regulation of cell shape transport angiogenesis cytokinesis, mitosis in utero embryonic development meiotic spindle organization	Cytoskeletal regulation by Rho GTPase Integrin-mediated signaling pathway Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway Termination of G-protein coupled receptor signaling pathway
P19105	Myosin regulatory light chain 12A (ML12A)	actin family cytoskeletal protein calmodulin	calcium and protein binding structural molecule activity	muscle organ developmental and contraction regulation of cell shape	Ephrin signaling
O43707	Alpha-actinin-4 (ACTN4)	non-motor actin binding protein integrin-binding protein	actin binding calcium binding structural molecule activity	cellular component organization tight junction assembly probably vesicular trafficking developmental process	Integrin signalling pathway Nephrin interactions
O43852	Calumenin (CALU)	calmodulin	protein binding calcium ion binding	cellular process, cell communication	

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P27797	Calreticulin (CALR)	calcium-binding protein	binding	cellular calcium ion homeostasis	Calnexin/calreticulin cycle
		chaperone	unfolded protein binding	protein folding	ER-Phagosome pathway
Q96AY3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (FKBP10)	isomerase	calcium ion binding	chaperone-mediated protein folding	
		chaperone	isomerase activity	protein peptidyl-prolyl isomerization	
		calcium-binding protein			
Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB (GANAB)	glucosidase	catalytic activity	post-translational protein modification	N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle
				protein folding	
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERP29)	membrane traffic protein	possibly protein folding and secretion	intracellular protein transport	
				vesicle-mediated transport; exocytosis	
P07237	Protein disulfide-isomerase (PDIA1)	isomerase (catalyzes the rearrangement of -S-S-bonds in proteins)	catalytic activity	protein folding	Collagen biosynthesis and modifying enzymes
				response to ER stress	Detoxification of Reactive Oxygen Species
				extracellular matrix organization	

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P12235	ADP/ATP translocase 1 (ADT1)	amino acid transporter	binding	transport	Mitochondrial protein import
		mitochondrial carrier protein	transporter activity	metabolic process	Regulation of insulin secretion
		transfer/carrier protein		apoptotic mitochondrial changes	Vpr-mediated induction of apoptosis by mitochondrial outer membrane permeabilization
		calmodulin		viral process	
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC2)	anion channel	transporter activity	anion transport	Negative regulation of intrinsic apoptotic signaling
		voltage-gated ion channel			
P02042	Hemoglobin subunit delta (HBD)	transfer/carrier protein	heme binding	blood circulation and coagulation	Megakaryocyte development and platelet production
			oxygen binding	transport	
			oxygen transporter activity		
P60903	Protein S100-A10 (S10AA)	signaling molecule	binding	cell cycle and communication	Orphan transporters
		calmodulin	calcium ion binding	metabolic process	Dissolution of Fibrin Clot
			protein homodimerization activity	immune system process	

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P84090	Enhancer of rudimentary homolog (ERH)	transcription factor	binding poly(A) RNA binding nucleic acid binding transcription factor activity	cell cycle transcription regulation of transcription	
Q92804	TATA-binding protein-associated factor 2N (RBP56)	transcription factor DNA binding protein mRNA splicing factor	binding catalytic activity nucleic acid binding transcription factor activity	mRNA splicing, via spliceosome RNA splicing, via transesterification reactions transcription	
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase (DDX5)	RNA helicase	RNA helicase activity translation initiation factor activity	alternative regulation of pre-mRNA splicing translation regulation of translation	
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase (DDX17)	RNA helicase	RNA helicase activity translation initiation factor activity	alternative regulation of pre-mRNA splicing translation regulation of translation	

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P05387	60S acidic ribosomal protein P2 (RLA2)	ribosomal protein	RNA binding structural molecule activity	translation	Peptide chain elongation
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IF2B2)	mRNA splicing factor ribonucleoprotein enzyme modulator	catalytic activity mRNA binding protein binding translational regulator activity regulation of mRNA stability and subcellular localization	induction of apoptotis transport RNA splicing, via transesterification reactions transcription, DNA-dependent mRNA splicing, via spliceosome	
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1 (PCBP1)	mRNA splicing factor ribonucleoprotein enzyme modulator	catalytic activity RNA and ssDNA binding protein binding	induction of apoptotis transport RNA splicing, via transesterification reactions transcription, DNA-dependent mRNA splicing, via spliceosome	mRNA Splicing - Major Pathway Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRPL)	mRNA splicing factor ribonucleoprotein	mRNA binding catalytic activity	mRNA splicing, via spliceosome RNA splicing, via transesterification reactions	mRNA Splicing-Major Pathway

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (YBOX1)		RNA binding DNA binding sequence-specific DNA binding transcription factor activity	CRD-mediated mRNA stabilization mRNA splicing, via spliceosome regulation of transcription, DNA-templated	mRNA Splicing - Major Pathway
P61326	Protein mago nashi homolog (MGN)		poly(A) RNA binding	developmental process regulation of alternative mRNA splicing gamete generation mRNA transport nonsense-mediated mRNA decay	mRNA Splicing - Major Pathway. Transport of mature mRNA derived from an intron-containing transcript mRNA 3'-end processing
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase subunit 1 (RPN1)	glycosyltransferase	catalytic activity	post-translational protein modification	Asparagine N-linked protein glycosylation
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase subunit 2 (RPN2)	glycosyltransferase	catalytic activity	post-translational protein modification	Asparagine N-linked protein glycosylation

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
Q96HE7	ERO1-like protein alpha (ERO1A)	oxidoreductase	oxidoreductase activity protein disulfide isomerase activity	cell redox homeostasis ER unfolded protein response transport	Detoxification of Reactive Oxygen Species
Q13162	Peroxiredoxin-4 (PRDX4)	peroxidase	antioxidant activity oxidoreductase activity	ROS metabolic process cell redox homeostasis	No hit for pathway
O00469	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2)	oxygenase	oxidoreductase activity	cell adhesion cellular protein modification process response to hypoxia	Collagen biosynthesis and modifying enzymes
P14314	Glucosidase 2 subunit beta (GLU2B)	transferase enzyme modulator calcium ion binding	protein binding transferase activity enzyme regulator activity	protein glycosylation	N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle Advanced glycosylation endproduct receptor signaling
Q9HDC9	Adipocyte plasma membrane-associated protein (APMAP)	lyase	lyase activity arylesterase activity	carbohydrate metabolic process	No hit for pathway

Tablo 5.1: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
Q6PIU2	Neutral cholesterol ester hidrolase 1 (NCEH1)	lipase	lipase activity	lipid metabolism, lipid degradation	No hit for pathway
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5 (TXND5)	isomerase	protein disulfide isomerase activity	cellular protein modification process protein folding	No hit for pathway
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (PPIB)	isomerase	isomerase activity	immune system process protein folding intracellular protein transport	Collagen biosynthesis and modifying enzymes

Tablo 5.2: HK-2 hücrelerinde OTA-teşvikli ifadesi azalan proteinler.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P99999	Cytochrome c (CYC)	mitochondrial carrier protein transfer/carrier protein	electron transporter	apoptotic process respiratory electron transport chain	Apoptosis signaling pathway ATP synthesis
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial (AIFM1)	dehydrogenase oxidase reductase	oxidoreductase activity	apoptotic process respiratory electron transport chain chromosome condensation	Apoptosis signaling pathway Caspase independent apoptotic pathway
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1)	glycosyltransferase	transferase activity	DNA repair protein ADP-ribosylation response to stress	FAS signaling pathway
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondria (ATPG)	ATP synthase hydrolase	hydrolase activity transporter activity	ATP biosynthetic process proton transport	ATP synthesis
P54819	Adenylate kinase 2, mitochondrial (KAD2)	nucleotide kinase	nucleotide kinase activity	purine/pyrimidine nucleobase metabolic process	De novo purine biosynthesis Synthesis and interconversion of nucleotide di- and triphosphates

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial (EFTU)	translation elongation and initiation factor	translation elongation and initiation activity	regulation of translation	Protein biosynthesis
		hydrolase	GTPase binding/activity	translational	Mitochondrial translational elongation
		G-protein			
P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial (GLYM)	methyltransferase	methyltransferase activity	nucleobase-containing compound metabolic process	Serine glycine biosynthesis
				cellular amino acid metabolic process	De novo mitochondrial thymidylate biosynthesis pathway
P52815	39S ribosomal protein L12, mitochondrial (RM12)	ribosomal protein	nucleic acid binding	translation	
			structural molecule activity	mitochondrial translation	
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (DHSA)	dehydrogenase	oxidoreductase activity	oxidation-reduction process	Respiratory electron transport
		oxidase		TCA cycle	TCA cycle
		flavin adenine dinucleotide binding		electron transport	
				carbohydrate metabolic process	
O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial (GLSK)	hydrolase	hydrolase activity	metabolic process	renal catabolism of glutamine pathway
		glutaminase activity		glutamate biosynthetic process	

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial (HCDH)	dehydrogenase	oxidoreductase activity	lipid metabolic process	Lipid metabolism; fatty acid beta-oxidation
		hydratase	lyase activity	carohydrate metabolic process	
		epimerase/racemase	racemase and epimerase activity	translation	
O60488	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4 (ACSL4)	ligase	Ligase activity	immune system process	Fatty acid metabolism
			transporter activity	lipid/fatty acid metabolic process	Lipid metabolism
				lipid transport	Synthesis of very long-chain fatty acyl-CoAs
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial (PRDX3)	peroxidase	antioxidant activity	metabolic process	Detoxification of ROS
			oxidoreductase activity		
P00403	Cytochrome c oxidase subunit 2 (COX2)	oxidoreductase	antioxidant activity	respiratory electron transport chain	Detoxification of ROS
			oxidoreductase activity	intracellular protein transport	
O95881	Thioredoxin domain-containing protein 12 (TXD12)	surfactant	oxidoreductase activity	metabolic process	
		reductase	protein-disulfide reductase (glutathione) activity	cell redox homeostasis	
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (CH60)	chaperonin	ATPase activity	protein folding	Mitochondrial protein import

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P78371	T-complex protein 1 subunit beta (TCPB)	chaperonin	chaperon	'de novo' posttranslational protein folding	
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma (TCPG)		ATPase activity	cellular component organization or biogenesis	
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCPE)			protein complex assembly	
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta (TCPZ)				
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta (TCPE)				
O75396	Vesicle-trafficking protein SEC22b (SEC22B)			ER to Golgi vesicle-mediated transport protein transport regulation of organelle organization	
P04222	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-3 alpha chain (HLA-C)	MHC class I	peptide antigen binding	Antigen Presentation Host-virus interaction	Endosomal/Vacuolar pathway ER-Phagosome pathway.
P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain (HLA-A)			Immunity	Interferon alpha/beta/gamma signaling

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit (PP1A)	protein phosphatase calcium-binding protein	binding protein serine/threonine phosphatase activity	apoptotic process cell division protein dephosphorylation immune system process regulation of glycogen biosynthetic process regulation of circadian rhythm transcription from RNA polymerase II promoter response to stress	Dopamine receptor mediated signaling pathway Nicotine pharmacodynamics pathway Downregulation of TGF β receptor signaling pathway
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial (MPCP)	amino acid transporter mitochondrial carrier protein calmodulin	calcium ion binding calmodulin binding transporter activity	transport metabolic process energy metabolism	
P35232	Prohibitin (PHB)		transcription regulatory region DNA binding histone deacetylase binding	cell cycle DNA synthesis inhibition	

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
O00622	Protein CYR61 (CYR61)	growth factor	ECM binding heparin binding growth factor activity	cell adhesion, cell proliferation, chemotaxis, angiogenesis wound healing developmental process	
O15173	Membrane-associated progesterone receptor component 2 (PGRC2)	signaling molecule receptor	steroid binding receptor activity	cell communication	Steroid hormone mediated signaling pathway
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran (RAN)	small GTPase	protein binding GTPase activity	mitotic nuclear division, cell cycle, cell division intracellular transport of protein/RNA nucleobase-containing compound metabolic process	Androgen receptor signaling pathway Small GTPase mediated signal transduction miRNA biogenesis
P51148	Ras-related protein Rab-5C (RAB5C)	small GTPase	nucleotide binding GTPase activity	protein transport probably involved in vesicular traffic regulation of endocytosis	Small GTPase mediated signal transduction Golgi Associated Vesicle Biogenesis
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 (IQGA1)	G-protein modulator	protein binding small GTPase regulator activity	biological regulation cell cycle, cell communication and metabolic process	Nephrin interactions

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway	
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 (ACTBL)	actin and actin related protein	structural molecule activity	cellular component organization or biogenesis	Alzheimer disease-presenilin pathway	
				cytokinesis	Cadherin signaling pathway	
				mitosis	Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	
				developmental process	Huntington disease	
				intercellular protein transport	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	
				vesicle-mediated transport	Integrin signalling pathway	
				- exocytosis	Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	
				- endocytosis		
O00159	Unconventional myosin-Ic (MYO1C)	G-protein modulator	protein binding	mitosis, cell communication	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	
				actin binding motor protein	membrane organization	Regulation of actin dynamics for phagocytic cup formation
				cell junction protein	mRNA/protein transport	
					positive regulation of cell migration	Positive regulation of vascular endothelial growth factor signaling pathway
	structural molecule activity	regulation of tight junction assembly				

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway			
P16403	Histone H1.2 (H12)	histone	chromatin DNA binding	chromatin organization or biogenesis	Chromatin remodeling			
P16402	Histone H1.3 (H13)				Nucleosome remodeling			
P10412	Histone H1.4 (H14)				nucleosome assembly and positioning	Post-translational modifications of histones		
Q96QV6	Histone H2A type 1-A (H2A1A)				transcription regulation,	DNA repair DNA replication	Oxidative Stress Induced Senescence	
P04908	Histone H2A type 1-B/E (H2A1B)							
P20671	Histone H2A type 1-D (H2A1D)							
Q71UI9	Histone H2A.V (H2AV)							
P33778	Histone H2B type 1-B (H2B1B)				structural protein	structural molecule activity	nuclear assembly and chromatin organization	FAS signaling pathway
P62807	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I (H2B1C)							intermediate filament
P62805	Histone H4 (H4)	mitotic cell cycle						
P02545	Prelamin-A/C (LMNA)	structural protein	structural molecule activity	nuclear assembly and chromatin organization	developmental process			
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 (K2C1)				intermediate filament	cellular component organization or biogenesis	cellular process	
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 (K2C8)							
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 (K1C10)							developmental process

Tablo 5.2: Devam.

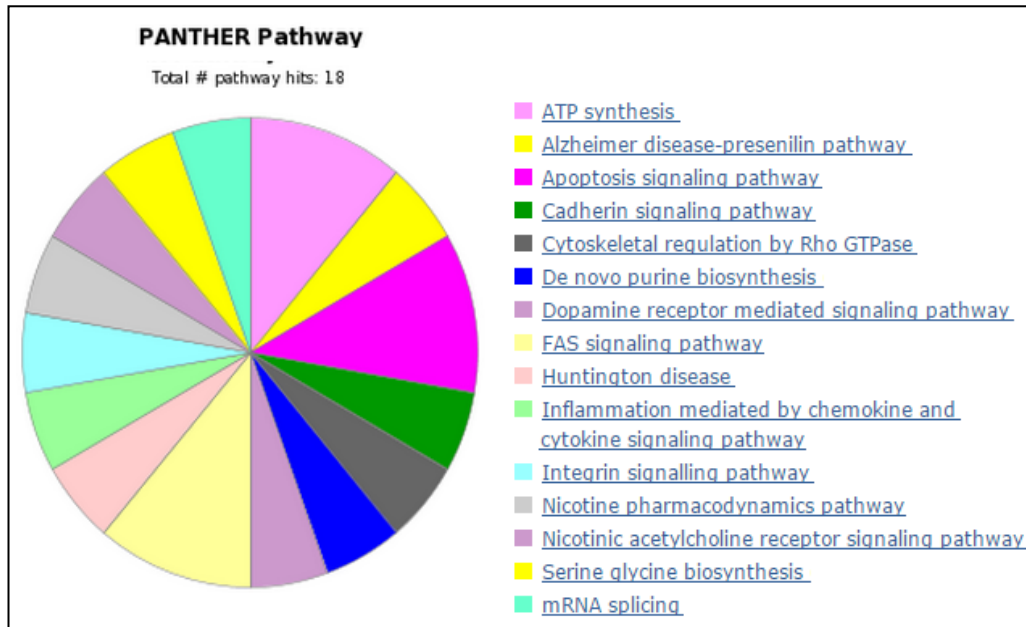
Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
Q9Y2X3	Nucleolar protein 58 (NOP58)	ribonucleoprotein	snoRNA binding	cell growth ribosome biogenesis rRNA processing	
P0CG48	Polyubiquitin-C (UBC)	ribosomal protein	nucleic acid binding structural constitute of ribosome	proteolysis	Apoptotic signaling pathway Cellular response to hypoxia
P08865	40S ribosomal protein SA (RSSA)		structural molecule activity	biosynthetic process rRNA metabolic process cell adhesion cellular component organization or biogenesis translation	
P18124	60S ribosomal protein L7 (RL7)	ribosomal protein	nucleic acid binding structural constitute of ribosome	translation	
P62888	60S ribosomal protein L30 (RL30)	ribosomal protein	nucleic acid binding structural constitute of ribosome	translation	

Tablo 5.2: Devam.

Erişim No	Protein Adı	PANTHER Protein Sınıfı	Moleküler Fonksiyonu	GO Biyolojik Süreçler	PANTHER/UniProt/Reactome Pathway
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (PABP1)	transcription factor	DNA binding	cell cycle	
		DNA binding protein	RNA binding	nervous system development	
		mRNA polyadenylation factor	sequence-specific DNA binding transcription factor activity	DNA replication	
		mRNA splicing factor		transcription from RNA polymerase II promoter	
		ribonucleoprotein		RNA splicing, via transesterification reactions	
				mRNA splicing, via spliceosome	
				mRNA polyadenylation	
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19 (PRP19)	mRNA splicing factor	mRNA binding	mRNA splicing, via spliceosome	mRNA splicing
			ubiquitin protein ligase activity	RNA splicing, via transesterification reactions	Protein modification, protein ubiquitination
				proteasomal protein catabolic process	Ubl conjugation pathway
				DNA damage response/DDR, DNA repair	signal transduction involved in DNA damage checkpoint
P62995	Transformer-2 protein homolog beta (TRA2B)	mRNA splicing factor	mRNA binding	mRNA splicing, via spliceosome	mRNA splicing
			catalytic activity	RNA splicing, via transesterification reactions	

OTA teşvikli olarak ifadesi değişen proteinlerle ilişkili sinyal yolaklarına göre değerlendirme yapılırken, ncelikle ifadesi azalan ve ifadesi artan proteinler olmak üzere iki alt başlık altında değerlendirilmiştir.

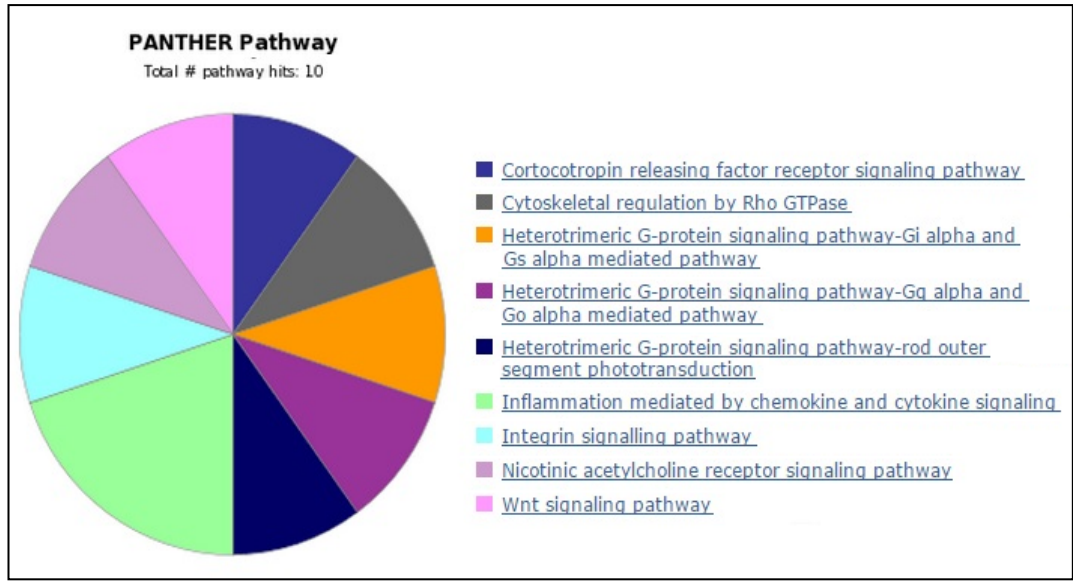
OTA muamelesinin 24. saatini yansıtan proteom analizi verisine göre, ifadesinde azalma olan proteinlerin dahil olduğu başlıca sinyal yolakları apoptoz, FAS sinyali, ATP sentezi, *de novo* pürin biyosentezi, serin/glisin biyosentezi ve mRNA kırılmasıdır (Tablo 5.2) ve (şekil 5.25). Ek olarak UniProt ve Reactome veritabanlarından elde edilen verilere dayanarak, mitokondriyal protein biyosentezi, TCA (tricarboxylic acid) döngüsü, glutamin yolağının renal katabolizması, lipid metabolizması, ROT detoksifikasyonu, ER-Fagozom yolağı, interferon $\alpha/\beta/\gamma$ sinyali, TGF β reseptör sinyal yolağının düzenlenmesi, steroid hormon aracılı sinyal yolağı, androjen reseptör sinyal yolağı, miRNA biyogenezi, küçük GTPaz aracılı sinyal iletimi, kromatin yeniden şekillenmesi, oksidatif stres teşvikli hüresel yaşlanma, yanlış katlanmış protein cevabı ve protein ubiquitinlenmesi gibi önemli sinyal yolaklarının da ifadesi azalan proteinlerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.2).



şekil 5.25: OTA teşvikli ifadesi azalan proteinlerin dahil olduğu sinyal yolakları.

OTA teşvikli olarak ifadesi artan proteinlerin dahil olduğu sinyal yolaklarının ise, heterotrimetik G-protein sinyal yolakları, integrin sinyal yolağı, Wnt signal

yolağı, hücre iskeleti düzenlenmesi ve inflamasyon sinyali gibi yollar olduğu PANTHER veritabanı ile belirlenmiştir (Şekil 5.26). UniProt ve Reactome veritabanından elde edilen ek bilgilere göre, küçük GTPaz aracılı sinyal yolları, otofaji, hücre yüzey reseptörü sinyal yolağı, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) reseptör sinyal yolağı, apoptoz, Ephrin sinyali, Nephrin etkileşimleri, ER ve kalnexin/kalretikulin yolağı, kollajen biyosentezi, ROT detoksifikasyonu, translasyon, mRNA kırılması ve translasyon sonrası modifikasyonlarla ilişkili yollar olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

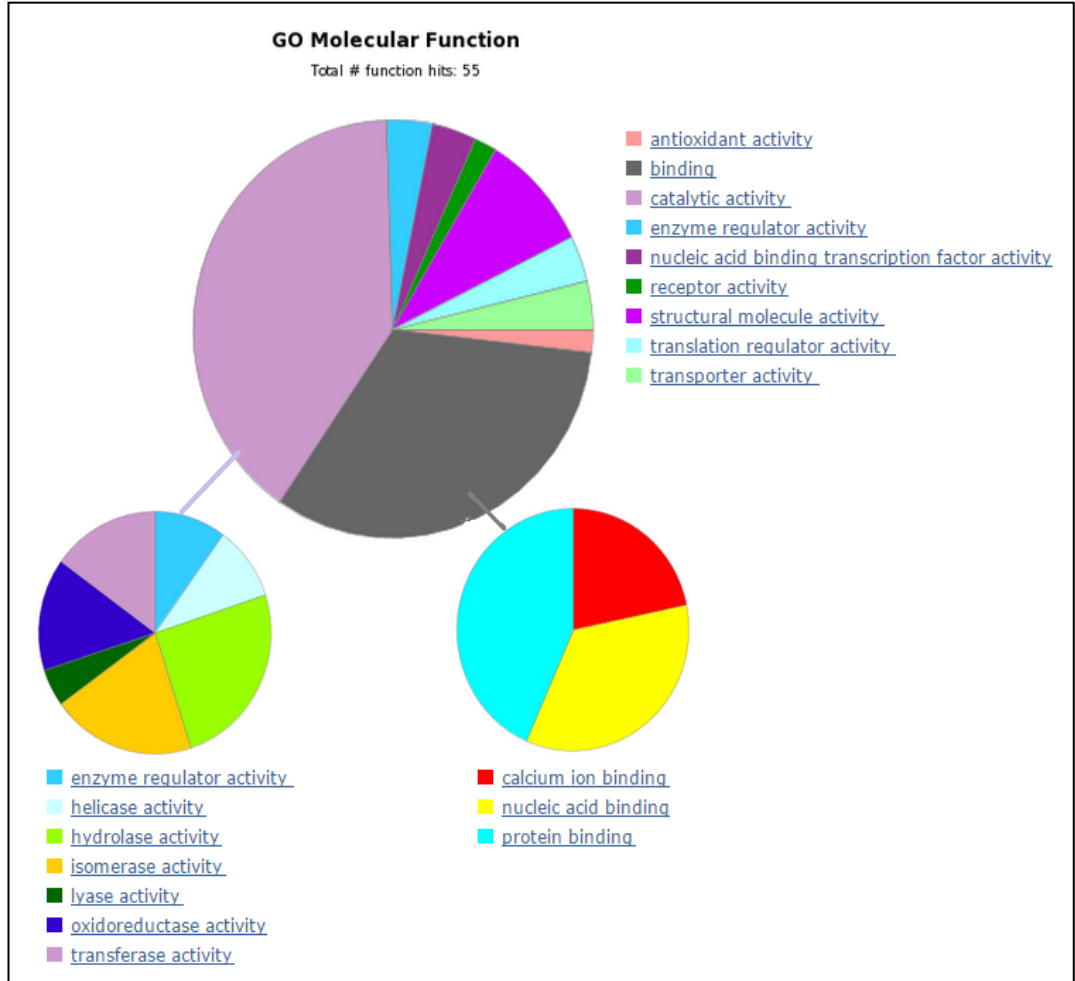


Şekil 5.26: OTA teşvikli ifadesi artan proteinlerin dahil olduğu sinyal yolları.

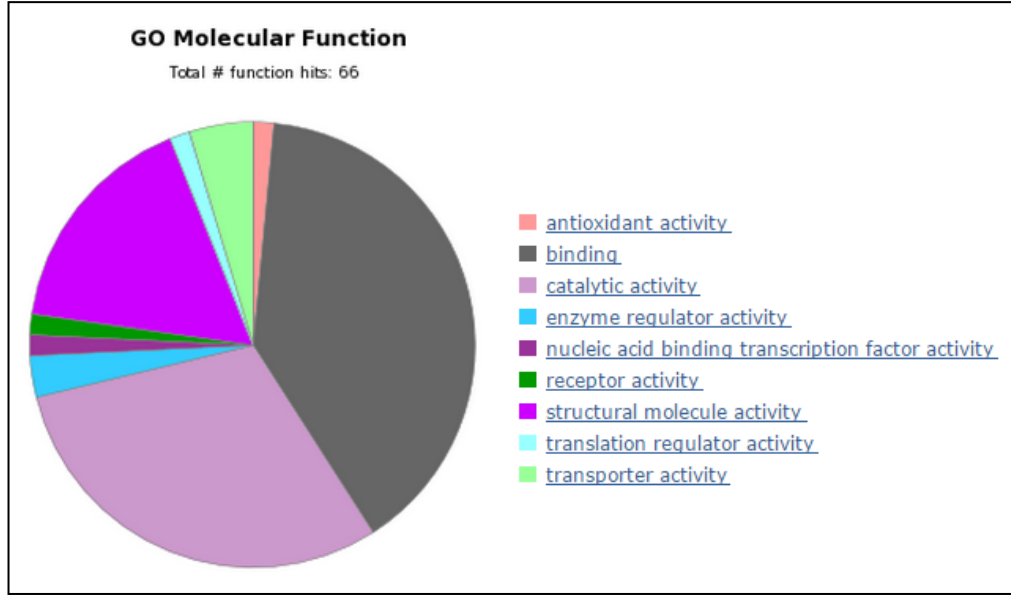
5.13.2. İfadesi Değişen Proteinlerin Moleküler Fonksiyonlarına Göre Değerlendirilmesi

İfadesi değişen proteinlerin moleküler fonksiyonları GO veritabanının ek bilgilerini kullanan PANTHER veritabanı ile belirlenmiştir. Moleküler fonksiyonuna göre değerlendirildiğinde ifadesi artan proteinlerin en büyük grubu katalitik aktiviteye sahipken, ikinci sırada bağlanma ile görelî proteinler yer almaktadır. Üçüncü sıradaki protein grubu ise yapısal moleküler aktiviteye sahip olan, hücreiskeleti ve ribozom yapısındaki proteinlerdir. İfadesi artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmalarının grafiksel ifadesi Şekil 5.27’de verilmiştir. İfadesi azalan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmasının grafiksel ifadesi ise Şekil 5.28’de verilmiştir. Şaşırtıcı olarak

yüzde dilimleri değişse de hem ifadesi artan hem de azalan proteinleri sahip oldukları moleküler fonksiyonlarına göre ayırdığımızda, ilk üçteki sıralama değişmemiştir. Diğer bir ifadeyle, gerek azalan gerekse artan proteinlerin içinde, en fazla ifade değişimi katalitik aktiviteye sahip proteinler, bağlanma proteinleri ve yapısal proteinler gruplarına ait protein gruplarında meydana gelmiştir (Şekil 5.27 ve Şekil 5.28).



Şekil 5.27: İfadesi artan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaları.



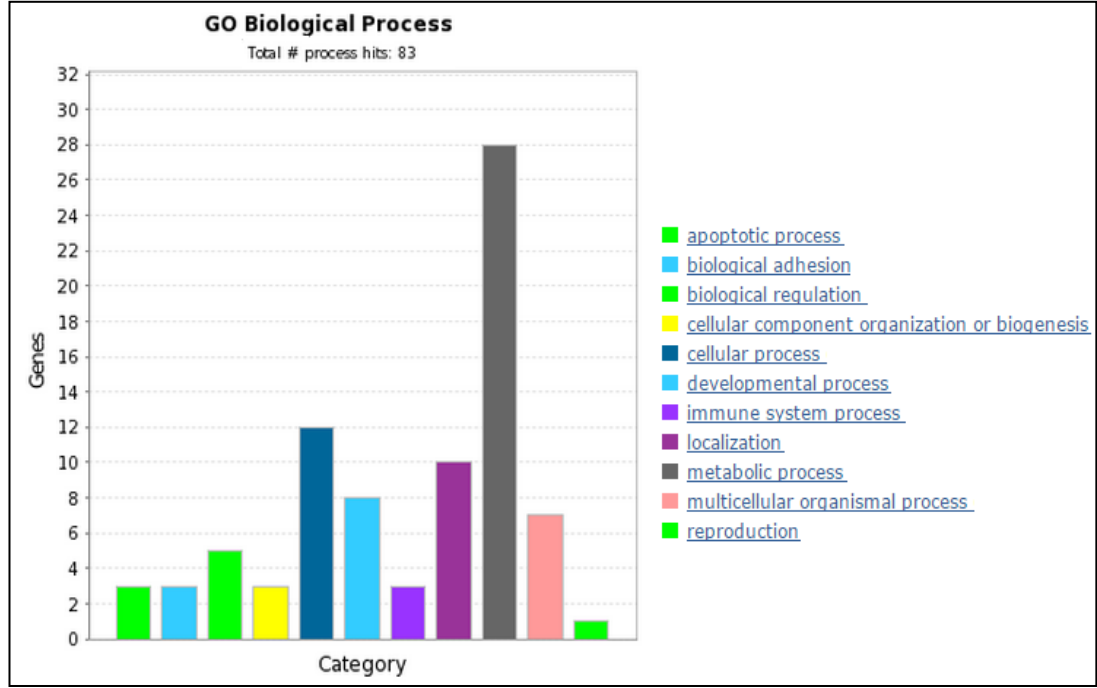
Şekil 5.28: İfadesi azalan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmaları.

5.13.3. İfadesi Değişen Proteinlerin Yer Aldıkları Biyolojik Süreçlere Göre Değerlendirilmesi

İfadesi değişen proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler GO veritabanının ek bilgilerini kullanan PANTHER veritabanı ile belirlenmiştir. İfadesi artan proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler Şekil 5.28’de verilmiştir. Metabolik süreçlerde görevli olan proteinler olarak sınıflandırılan grup ilk sırayı almıştır (Şekil 5.29). Bu grup içinde, protein modifikasyonları, protein katlanması ve translasyon süreçlerine dahil olan proteinlerin sayısı en fazladır. Ardından RNA kırılması ve transkripsiyon ile ilişkili proteinler yer almaktadır. İkinci sırada yer alan ve hücrel süreçler olarak tanımlanan grupta ise, hücre iletişimde görevli proteinler (miyozin-9, protein S100-A10, kalumenin, nöral hücre adezyon molekülü L1, Guanin nucleotit bağlayan protein $G_{(I)}/G_{(S)}/G_{(O)}$, gama altbirimi-12, insulin-benzeri büyüme faktörü 2 mRNA bağlayan protein 2 ve poly(rC)-bağlayan protein 1) yoğunluktadır (Tablo 5.1).

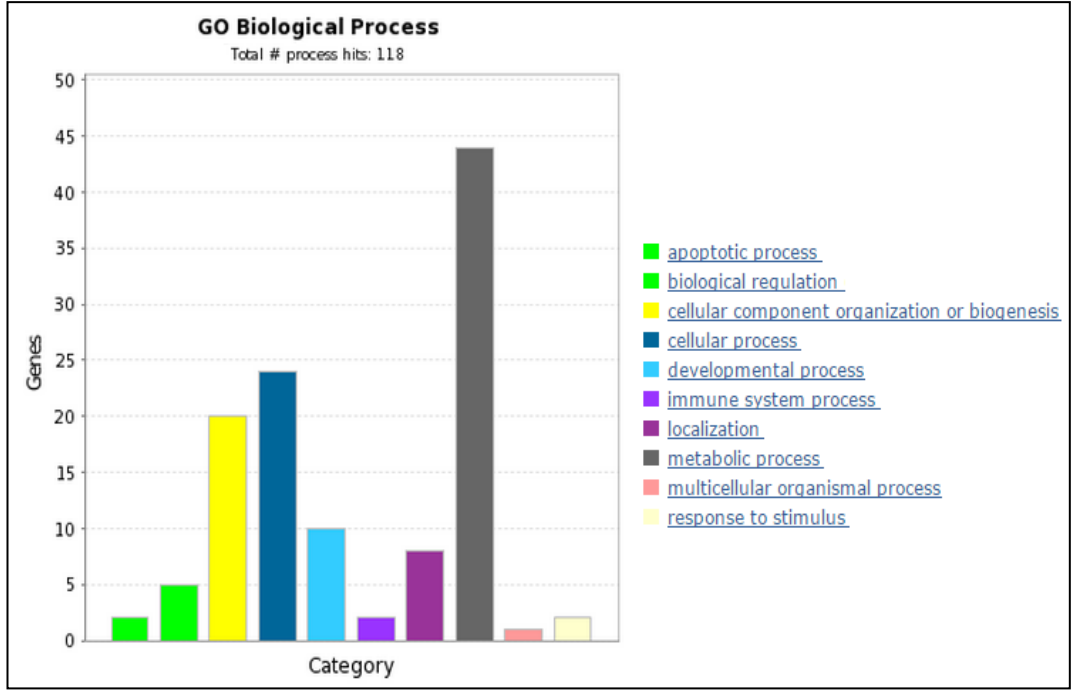
İfadesi azalan proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler Şekil 5.30’da verilmiştir. Yine metabolik süreçlerde görevli olan proteinler olarak sınıflandırılan grup ilk sırayı almıştır (Şekil 5.30). Bu grup içinde, transkripsiyon, RNA işlenmesi ve kırılması ile ilişkili proteinler çoğunluktadır. Ardından, sırasıyla protein katlanması, translasyon, protein kompleks oluşumu ve protein modifikasyonları süreçlerine dahil olan proteinler gelmektedir. İkinci sırada yer alan ve hücrel

süreçler olarak tanımlanan grupta ise, hücre döngüsü ve hücre iletişimde görevli proteinler yer almaktadır (Tablo 5.2).



Şekil 5.29: İfadesi artan proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler.

İfadesi azalan proteinlerin içinde yer alan ve kromatin organizasyonundan sorumlu olan histon grubu proteinleri üçüncü sırada yer alırken, bu grubu hücre sel bileşenlerin morfogenezi ile ilişkili proteinler (alışılmadık miyozin-1c, β -aktin benzeri protein 2, keratin proteinleri ve prelamin-A/C) takip etmektedir.



Şekil 5.30: İfadesi azalan proteinlerin yer aldıkları biyolojik süreçler.

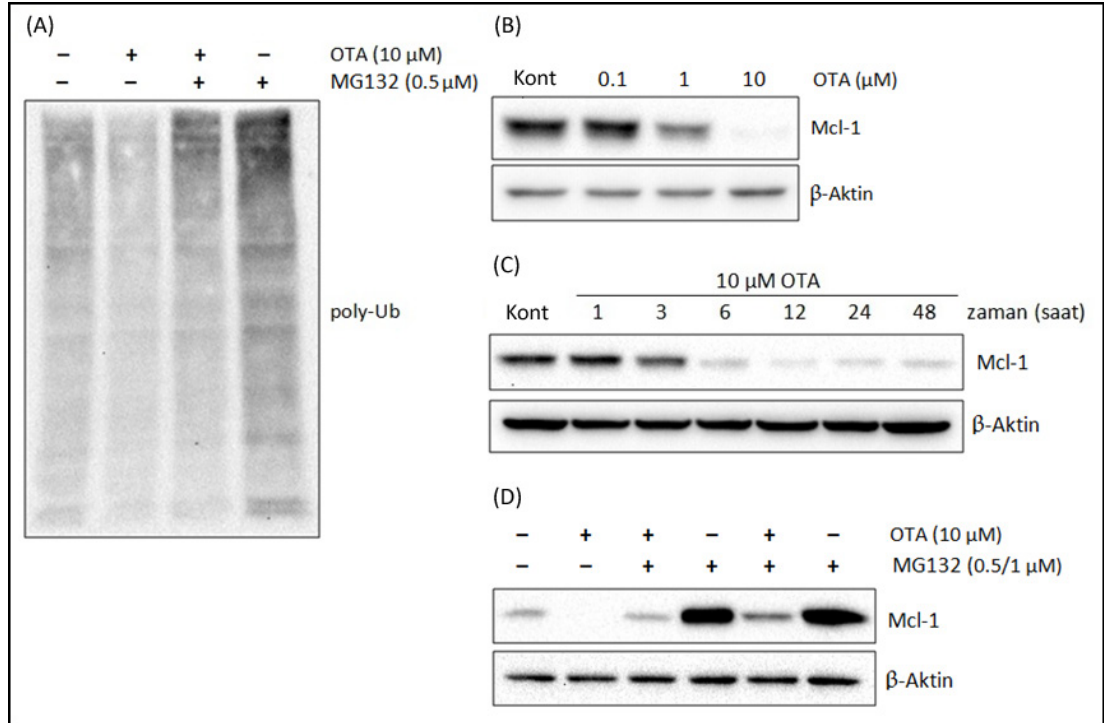
5.14. OTA-teşvikli Ubikuitin Proteozom Yolağı Aktivasyonu

Proteom analizi verilerine göre protein katlanmasından sorumlu olan bazı şaperon ve şaperonin proteinlerin ifadelerinde farklılık olduğu tespit edilmiştir. Genellikle artış eğilimi gösteren, protein katlanması ve endoplazmik retikulum (ER) stres ile ilişkili bu proteinler Ubikuitin Proteozom Yolağını (UPY) uyardığı için OTA'nın UPY ilişkisi incelenmiştir.

OTA'nın protein yıkımı üzerine etkisini incelemek için, proteozom inhibitörü MG132 varlığı (0.5 μ M) ya da yokluğunda HK-2 hücreleri 24 saat süre ile OTA'ya maruz bırakılmıştır. OTA muamelesinden 1 saat önce 0.5 μ M MG132 hücrelere uygulanmıştır. Total protein lizatları (20 μ g/kuyucuk) poly-Ub antikoru kullanılarak Western blot yöntemi ile incelenmiştir. OTA'nın MG132 yokluğunda total protein ubikuitinlenmesini azalttığı ancak MG132 varlığında total protein ubikuitinlenmesi kontrol hücrelerinin seviyesine yükseltilmiştir (Şekil 5.31A). Elde edilen bu sonuç OTA'nın HK-2 hücrelerinde proteozomal yıkımla da ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Mcl-1 UPY ile yıkıldığı iyi bilinen bir anti apoptotik proteindir [Ren et al., 2013]. OTA muamelesi altında Mcl-1 protein miktarının doz-bağımlı olarak azaldığı

saptanmıştır (Şekil 5.31B). Zamana bağlı olarak OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerinde Mcl-1 protein miktarının 3. saatte azalmaya başladığı ve 6. saatte bazal seviyenin çok altına düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 5.31C). Proteozom yolağının inhibisyonu durumunda OTA'nın protein yıkımını teşvik edemediği ve 0.5 μ M MG132 varlığında OTA muamelesi gören hücrelerde Mcl-1 protein seviyesinin kontrol grubu hücrelerin protein seviyesine yükseldiği tespit edilmiştir (Şekil 5.31D). MG132 miktarı 1 μ M'a çıkartıldığında ise MG132+OTA örneğindeki Mcl-1 protein seviyesinin kontrol grubu hücrelerindeki protein seviyesinin de üzerine çıktığı gözlenmiştir (Şekil 5.31D). Mcl-1 örnek alınarak yapılan bu veriler ışığında, OTA'nın HK-2 hücrelerinde UPY ile düzenlenen proteinlerin proteozomal yıkımını kolaylaştırabileceği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 5.31: a) OTA'nın HK-2 hücrelerinde total protein kararlılığına ve UPY'na etkisi, b) Doza bağlı, c) Zamana bağlı OTA teşvikli Mcl-1 proteininin ifade değişimleri, d) Mcl-1'in OTA teşvikli UPY ile yıkımı.

6. TARTIŞMA

OTA'nın domuzlarda nefropatiye sebep olduğu gösterildikten sonra, insanlarda da OTA'nın BEN ve boşaltım sistemi organlarına ait tümörlerin oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [Pfohl-Leszkowicz et al., 2002]. Hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, OTA'nın sıçanlarda ve erkek farelerde böbrek tümörlerinin görülme oranını arttırdığı bilinmektedir [IARC, 1993]. Ancak çok sayıda önerilen olası etki mekanizmalarına rağmen, OTA aracılı karsinogenezde başlıca rolü oynayan hücresel mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. OTA karsinogenitesine aracılık ettiği düşünülen mekanizmalar arasında apoptozdan kaçış, makromolekül sentezinin inhibisyonu, mitokondriyal solunumun ve/veya hücre iskeleti yapısının bozulması, oksidatif stresin artması, sinyal ileti yollarındaki değişimler [Arbillaga et al. 2007a] [Arbillaga et al., 2007b], [Jennings et al. 2012], [Marin-Kuan et al. 2007], [Schilter et al. 2005] ve DNA eklentilerinin oluşumu yer almaktadır [Obrecht-Pflumio and Dirheimer 2000]. OTA'nın başlattığı ya da ilerlettiği tahmin edilen karsinogenez ile ilişkili kritik sinyal yollarının araştırılması bu doktora çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

OTA'nın en çok etkilediği bilinen organın böbrek olması nedeniyle, bu çalışmada insan proksimal tübül epitelyum hücre hattı (HK-2) kullanılarak PI3K/Akt ve MAPK sinyal ileti yollarının OTA ile ilişkisi araştırılmıştır. HK-2 hücrelerinde OTA'ya cevaben PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 sinyal yollarının aktive edildiği, ayrıca bu aktivitenin OTA muamelesini takip eden 48 saate boyunca devam ettiği tespit edilmiştir. İlginç olarak, canlılıkla ilgili parametreler dikkate alındığında, HK-2 hücrelerinde bu iki yolağın birbirlerine zıt yönde çalıştıkları tespit edilmiştir. OTA muamelesine cevaben MEK/ERK1-2 sinyali apoptozu arttırırken, PI3K/Akt sinyalinin hücre canlılığının devamlılığı için çalıştığı belirlenmiştir. PI3K/Akt aktivasyonunun c-MET reseptör kinaz aktivasyonu ile ilişkili olduğu ancak MEK/ERK1-2 sinyalinin c-MET'ten bağımsız olarak düzenlendiği tespit edilmiştir. Mitojenler ve büyüme faktörleri ile uyarılan MEK/ERK1-2 sinyal yolağı aktivasyonu hücre büyümesi ve farklılaşma için çalışırken, MEK/ERK1-2 sinyalinin uzun süreli aktivasyonunun farklı hücre tiplerinde büyümeyi durdurduğu gösterilmiştir [Hong et al., 2009]. HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli apoptozda uzun süreli MEK/ERK1-2 aktivasyonunun rolü olduğu ilk kez bizim çalışmamız ile gösterilmiştir. Kimyasal bir inhibitör olan U0126 ile MEK1-2 sinyalinin farmakolojik inhibisyonu sonrasında

OTA muamelesi yapılan HK-2 hücrelerinde, yalnızca OTA muamelesi yapılan hücrelerinkine kıyasla, apoptoz oranlarının azaldığı ve canlılık oranlarının arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların doğrulanması için MEK1'in kinaz inaktif ve dominant negatif formalarının geçici transfeksiyon yoluyla OTA'nın pro-apoptotik etkisinin azaltıldığı ve hücre canlılığının artırıldığı belirlenmiştir.

Literatürde MDCK-C7 hücrelerinde, sıçan karaciğer epitel hücrelerinde (WB-F344), keseli sıçan böbrek (OK) hücrelerinde, insan böbrek (IHKE) hücrelerinde, insan gastrik epitel-türevli (GES-1) hücrelerde ve fare deri keratinositlerinde OTA'nın ERK1-2 aktivitesini arttırdığı/indüklediği önceki çalışmalarla gösterilmiştir [Schramek et al., 1997], [Horvath et al., 2002], [Sauvant et al., 2005a], [Rached et al., 2006], [Cui et al., 2013], [Wang et al., 2012], [Kumar et al., 2012]. Ancak bu çalışmalarda, OTA-aracılı ERK1-2 aktivitesi büyüme, sağkalım ve hücre döngüsünün durdurulması ile ilişkilendirilmiştir. OTA-aracılı ERK1-2 aktivasyonunun inhibisyonu ile kaspaz-3 aktivitesi arasındaki ilişkiyi irdeleyen sadece bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, OK hücrelerinde U0126 ile ERK1-2 inhibisyonu durumunda OTA'nın kaspaz-3 aktivitesini daha da arttırdığı bildirilmektedir [Sauvant et al., 2005b].

Elde ettiğimiz sonuçlarla literatürdeki sonuçlar arasındaki çelişkinin sebebi kullanılan farklı tür veya dokulara ait farklı hücre modelleri olabilir. Bilindiği üzere hücre hattı oluşturulurken kullanılan "immortalizasyon" yöntemleri hücrelerin genetik yapısında da değişimler meydana getirmektedir. Farklı doz ve deneysel kurguların yanı sıra yalnızca farklı "immortalizasyon" presedürleri ile kurgulanan hücre hatlarının kullanılması bile çelişkili sonuçların oluşmasına neden olabilir. Bununla birlikte, aktive edilmiş ERK1-2 sinyalinin apoptotik hücre ölümünü arttırdığına dair bulgular gün geçtikçe artmaktadır. Örneğin, renal ve nöral hücrelerde farklı stres uyaranları ve toksik maddelerle aktive edilen ERK1-2 sinyal yolağının apoptoz ile ilişkisi gösterilmiştir [Jo et al., 2005], [Subramaniam et al., 2004]. Tavşan proksimal tübül ve HeLa hücrelerinde sisplatin ile uyarılan ERK-12 sinyalinin kimyasal inhibisyonu sonucunda apoptozun azaldığı tespit edilmiştir [Nowak, 2002], [Wang et al., 2000]. MAPK ailesinin diğer üyeleri olan JNK/SAPK ve p38 apoptoz, farklılaşma ve inflamasyon cevaplarının verilmesinde önemli rollere sahiptirler [Ma et al., 2009]. OTA'nın JNK ve p38 aktivasyonunu teşvik ettiği farklı hücre modellerinde gösterilmiştir [Gekle et al. 2000], [Horvath et al. 2002], [Rached

et al. 2006]. Ancak, bizim hücre modelimizde OTA'nın, stres ile aktive olan bu iki kinazın aktivasyonunda etkin olmadığı görülmüştür.

İnsan kanserlerinde PI3K/Akt sinyal yolağı sürekli aktivasyonu sıkça rastlanan bir durumdur. *PI3KC* (PI3K katalitik altbirimi) ve/veya *Akt* genlerinin aşırı anlatımı ya da *PTEN* gibi negatif düzenleyicilerde meydana gelen anlatım düşüklükleri (downregulation) sonucunda PI3K/Akt sinyal yolağının sürekli aktivasyonu gerçekleşir [Hara et al., 2005], [Lee et al., 2005], [Qian et al., 2009]. Sıçanların kullanıldığı bir *in vivo* çalışmada, gen ekspresyonu sonuçlarına göre OTA-aracılı karsinojenik süreçte, OTA'nın (IGFR)-PI3K-Akt yolağını aktive ettiği önerilmiştir [Stemmer et al., 2007]. Dişi Swiss albino farelerden izole edilen primer keratinosit hücrelerinin OTA ile muamelesi sonrasında EGFR aracılı Akt ve MAPK sinyal yollarının aktive edildiği gösterilmiştir [Kumar et al., 2013]. Bu gözlemlerle uyumlu olarak, çalışmamızda insan proksimal tübül epitelyum hücreleri olan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Akt aktivatörü olduğu ve bu Akt aktivasyonunun test edilen 48 saate kadar sürdürüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, PI3K/Akt sinyal yolağının kesintiye uğramadan, fonksiyonel olarak işlevsel olduğu, bu yolla ilişkili GSK3 β , mTOR ve S6 ribosomal protein (S6 RP) gibi alt efektör proteinlerin fosforilasyonlarının gösterilmesiyle kanıtlanmaktadır. OTA'nın PI3K katalitik altbirimi p110 α 'nın ifadesini arttırdığı protein düzeyinde Western blot analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca OTA muamelesi sonrasında total-PDK1 ve fosfo-PDK1 seviyelerinde azalma tespit edilmesine karşın rölatif olarak değerlendirildiğinde PDK1'in Ser241 fosforilasyonunun artış olarak yansıdığı belirlenmiştir (Şekil 5.7C). PI3K p110 α ve PDK1 proteinlerinden elde edilen sonuçların birlikteliği Akt aktivasyonundaki artışı açıklamaktadır. PI3K'nin Wortmannin ile inhibisyonu, OTA teşvikli Akt aktivasyonunu baskılamasına ve HK-2 hücre canlılığının azalmasına neden olurken, hücrelerde gözlenen apoptoz yanıtında artışa yol açmıştır.

OTA'ya cevaben HK-2 hücrelerinde PI3K/Akt ve MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu başlatan herhangi bir ya da birkaç ligand-bağı reseptörün varlığı araştırılmıştır. PathScan[®] RTK Assay sonucuna göre, OTA muamelesini takiben, c-MET reseptör tirozin kinazın 6. ve 12. saatlerde pik yaparak geçici olarak aktive olduğu belirlenmiştir. Spesifik PHA-665752 inhibitörü kullanılarak c-MET'in farmakolojik inhibisyonu sonucu, OTA-aracılı Akt fosforilasyonunda azalma tespit edilirken, ERK1-2 fosforilasyonunun bu inhibisyondan etkilenmediği belirlenmiştir.

Wortmannin kullanılan deneylerin sonucuyla benzer olarak, c-MET'in inhibisyonu da 10 μ M OTA'nın HK-2 hücre canlılığını azaltıcı etkisini arttırmıştır (Şekil 5.21). Diğer yandan, PHA-665752 ile inhibisyonu sağlanan ya da 24 saat sonunda doğal olarak ortadan kaybolan c-MET aktivitesinin, Akt aktivasyonunu tamamiyle ortadan kaldırmaması dikkati çekmektedir. Bu durum, Akt sinyalinin düzenlenmesinde görevli olan protein ve lipid fosfatazların proteolitik yollarca daha hızlı degrade edilmesinden ya da *de novo* sentezlerinin inhibe edilmesinden kaynaklanıyor olabilir [Woods and Johnson, 2006], [Zhang and Claret, 2012]. Akt'nin aktivasyonunda c-MET'in diğer EGFR gibi reseptör ya da Src gibi reseptör olmayan tirozin kinazlarla birlikte aktivasyonu ("co-activation) ya da sinyalin c-MET'ten diğer tirozin kinazlara aktarımı ("switching") söz konusu olabilir. Bu durum c-MET aktivitesinin yokluğunda Akt aktivasyonunun sürdürülmesi ile sonuçlanır [Dulak et al., 2011], [Engelman et al., 2007], [Thomson et al., 2008], [Xu and Huang, 2010], [Xu et al., 2011]. Stemmer ve arkadaşlarının sıçan böbreğinden elde ettikleri gen ekspresyonu verilerine dayanarak önerdikleri gibi OTA teşvikli karsinogenezde IGFR, PI3K/Akt yolağının üst bölgesinde yer alabilir [Stemmer et al., 2007]. Kumar ve çalışma arkadaşları ise fare keratinositlerinde OTA teşvikli MAPK ve Akt aktivasyonlarından EGFR'ı sorumlu tutmuşlardır [Kumar et al., 2012]. Ancak biz insan orjinli HK-2 hücrelerinde OTA teşvikli olarak ne IGFR ne de EGFR'ın fosforilasyon durumunda bir artış belirleyemedik. Diğer yandan PathScan[®] RTK Assay ile Src tirozin kinazın da OTA-teşvikli olarak aktive olduğu belirlenmiştir. Ancak Src aktivasyonu daha ileride çalışılacak konular arasında değerlendirilmiştir.

c-MET aktivasyonunun MEK/ERK1-2 aktivasyonunda rol oynamaması şaşırtıcı bir sonuçtur. Proteom analizi verilerine dayanarak OTA teşvikli ERK1-2 aktivasyonu ile ilişkili olabilecek üst düzenleyici proteinler ve/veya yollar belirlenmeye çalışılmıştır.

Doktora çalışmasının ikinci bölümünü oluşturan proteom analizi verilerine göre OTA teşvikli olarak ifadesinde artış gözlenen proteinler arasında protein modifikasyonlarından ve protein katlanmasından sorumlu proteinler ilk sırada yer almaktadır. Arasında şaperonların, izomeraz, glukozidaz, oksidoredüktaz, peroksidaz gibi translasyon sonrası modifikasyonlardan sorumlu enzimlerin yer aldığı proteinlerin miktarındaki artış, bu proteinlerle ilişkili olan protein katlanması, ER (endoplazmik retikulum) stresi ve katlanmamış protein cevabında (unfolded protein response, UPR) OTA'nın rolünün olabileceğini işaret etmektedir. Bu

nedenle, OTA'nın ubikuitin proteozom yolağındaki etkisi araştırılmıştır. 26S proteozom inhibitörü MG132 varlığında veya yokluğunda OTA muamelesi yapılan HK-2 hücrelerinden elde edilen lizatlar poly-Ub antikoru ile Western blot yönteminde incelenmiştir. Kontrol grubu hücreleri HK-2 hücrelerinde verilmiş bir zamandaki bazal UPY aktivitesini göstermektedir. Kontrol grubuna göre, yalnızca 10 μ M OTA muamelesi yapılan hücrelerde poly-Ub ile işaretlenen total protein miktarındaki azalma olduğu belirlenmiştir. Buna karşın MG132 ile proteozom yolağı inhibe edilen hücrelere OTA muamelesi yapıldığında, poly-Ub antikoru ile işaretlenen total protein miktarı kontrol grubu hücrelerinininkine benzer bir oran sergilemiştir. Pozitif kontrol olarak yalnızca MG132 uygulanan hücrelerde poly-Ub miktarı doğal olarak en fazladır (Şekil 5.31A). Mcl-1 UPY ile yıkıldığı iyi bilinen bir proteindir [Ren et al., 2013]. OTA muamelesi altındaki HK-2 hücrelerinde Mcl-1'in protein miktarında doz ve konsantrasyon bağımlı olarak azalma tespit edilmiştir (Şekil 5.31B ve Şekil 5.31C). OTA teşvikli olarak Mcl-1 protein seviyesindeki bu azalmanın sebebinin UPY ile ilişkisi olup olmadığı, MG132 varlığında ya da yokluğunda OTA muamelesi yapılan hücre lizatları poly-Ub antikoru ile Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Yalnızca 10 μ M OTA uygulanan hücrelerde Mcl-1 protein seviyesi neredeyse yok denecek kadar azalmışken, MG132'nin 0.5 μ M konsantrasyonu ile OTA muamelesi yapılan hücrelerde, Mcl-1 protein seviyesi kontrol hücrelerinin düzeyine çıkarılmıştır. MG132'nin 1 μ M olarak kullanıldığı örneklerde ise Mcl-1 seviyesi kontrol grubununkinden daha fazla olarak sonuca yansımıştır (Şekil 5.31D). Elde edilen bu sonuçlar OTA'nın HK-2 hücrelerinde, yıkımı UPY ile düzenlenen proteinlerin proteozomal yıkımını kolaylaştırabileceği sonucunu desteklemektedir. UPY-OTA ilişkisi gelecekte çalışılması hedeflenen konular arasında yer almaktadır.

Proteom analizi sonucuna göre, OTA teşvikli olarak ifadesi artan diğer önemli grup proteinler translasyon, RNA kırılması ve transkripsiyon süreçlerine dahil olan bazı proteinlerdir. Translasyon sürecinde yer alan ATP-bağımlı RNA helikaz 5 (DEAD box RNA helicase, DDX5) ve 17 (DDX17), birçok aşamada gen anlatımının yeniden düzenlenmesi gereken, epitelden mezenşime geçiş (EMT), miyogenez (yeni kas dokusu oluşumu) gibi hücre farklılaşması süreçlerinden sorumlu olan başlıca yönetici/düzenleyici proteinlerdir. RNA moleküllerinin ikincil yapılarını değiştirerek, translasyonu başlatıcı aktivitelerinin yanısıra, transkripsiyon, alternatif kırılma, miRNA biyogenezinde önemli rollere sahiptirler [Dardenne et al., 2014].

Translasyonda görevli diğer bir protein, 60S asidik ribozomal protein P2 (RLA2) translasyonun uzama aşamasında önemli bir role sahiptir. RLA2 protein seviyelerindeki artışın, hücrelerde artan protein sentezinin bir belirteci olduğu düşünülmektedir [Chen et al., 2002]. Çok çeşitli RNA kırılması ve transkripsiyon ile ilişkili proteinin ifadesindeki artışla birlikte, OTA teşvikli olarak HK-2 hücrelerinde 24. saatin sonunda büyük bir olasılıkla belirli bir grup proteinin translasyonunun aktive edildiği sonucuna ulaşabilmekteyiz. Belirli bir grup protein deyimindeki kasıt, içerdiği sayısal miktar değişse de, aynı hücrel ve metabolik süreçlere (protein katlanması, translasyon, transkripsiyon ve RNA kırılması) ait başka proteinlerin miktarında OTA-teşvikli olarak azalma olduğunun da belirlenmiş olmasıdır (Tablo 5.2). İfadesinde azalma olan proteinlerin büyük bir kısmı mitokondriyal proteinlerdir. Örneğin, mitokondriyal translasyon uzama faktörü Tu (EFTU), mitokondriyal ribozomun büyük altbirimi olan 39S ribozomal protein L12 (MRPL12), mitokondriyal 60S sıcaklık şoku proteini (CH60), ribozomların yapısında yer alan çok sayıda mitokondriyal protein ve çeşitli süreçlerde katalitik aktiviteye sahip birçok mitokondriyal enzimin ifadesinde OTA teşvikli olarak azalma olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.2). Bu sonuç belirli bir grup proteinin ya da belirli süreçlerde görevli proteinlerin ifadesinde azalma olabileceğini işaret etmektedir. İfadesinde artış olduğu tespit edilen Guanin nükleotit bağlayan protein GBG12 (Guanine nucleotide-binding protein $G_{(I)}/G_{(S)}/G_{(O)}$ subunit gamma-12) heterotrimerik G-proteini oluşturan bir gama (γ) altbirimidir (Tablo 5.1). Hücre yüzey reseptörleri olan GPCR'lerden (G Protein-Coupled Receptors) gelen sinyallerin iletiminde görevli olan G-proteinler diğer adıyla GTP bağlayan proteinler, tümör gelişimi ve metastaz süreçleri ile de ilişkilidirler. Büyüme faktörleri, nörotransmitter, hormon, fosfolipit, foton, koku ve tat molekülleri gibi çok çeşitli hücre dışı uyaranlarla oluşturulan sinyalin hücre içinde iletiminde görev alan G-proteinlerin MAPK sinyal yolları ile etkileşimleri iyi bilinmektedir. Heterotrimerik G-proteinler üç altbirimden oluşur. G_{α} altbiriminin GTP-GDP dönüşümünü yürütmesi ile aktive olduktan sonra, $G_{\beta\gamma}$ dimeri üçlü kompleks yapıdan ayrılarak, aralarında iyon kanalları, PI3K'ler, fosfolipazlar, adenilil siklazlar ve reseptör kinazların olduğu birçok sinyal molekülünün aktivasyonunu düzenler [Gutkind, 2000]. G-proteinlerin ERK1-2 aktivasyonunu arttırdığını gösteren birçok çalışma mevcuttur [Guillard et al., 2003], [Hossain et al., 2006], [Perrault et al., 2011]. Örneğin düz kas hücrelerinde

Pertussis toksininin IGFBP-5 ve G-protein (G_{13}) aracılı olarak ERK1-2 aktivasyonunu arttırdığı ve bu aktivasyonun düz kas hücrelerinin büyümesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir [Flynn et al., 2009]. Bu veriye zıt sayılabilecek diğer çalışmada G protein aracılı ERK1-2 aktivasyonunun hücrelerde yaşlanmaya (senesense) sebep olduğu belirtilmektedir [Hossain et al., 2006]. OTA-teşvikli ifadesi artan GBG12 proteinin Wnt sinyalinde rolü olabileceği önerilmektedir [Jernigan et al., 2010], [Web 3]. Embriyonik gelişimde ve doku homeostazisinde önemli rollere sahip olan Wnt sinyal yolağının hücre proliferasyonunu, migrasyonu, adezyonu ve farklılaşmayı düzenlediği ve anormal Wnt sinyal aktivasyonun kanserle ilişkili bilinmektedir [Dorsam and Gutkind, 2007]. G-proteinler üzerinden hücre içi Ca^{+2} salınımına yol açtığı bilinmektedir [Komiya and Habas, 2008]. Dolayısıyla OTA teşvikli uzun süreli ERK1-2 aktivasyonundan heterotrimetik G-proteinlerin sorumlu olabilmesi muhtemeldir.

Proteom analizi sonucuna göre Calreticulin (CALR) ve Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (FKBP10) gibi kalsiyum bağlayan proteinlerin ifadesinde artış tespit edilmiştir. Ayrıca Ca^{+2} bağlayan ve calmodulin sınıfına dahil olan diğer bazı proteinlerin [ADP/ATP translocase 1 (ADT1), Protein S100-A10 (S10AA), Myosin regulatory light chain 12A (ML12A) ve Calumenin (CALU)] ifadesinde de artış tespit edilmiştir. OTA'nın HK-2 hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} salınımına etkisi de daha sonra araştırılması düşünülen konular arasında yer almıştır.

Ayrıca, OTA teşvikli olarak ifadesi değişen proteinler arasındaki, hücre adezyon molekülleri sınıfına giren proteinlerin sayısındaki hatırısayılır fazlalık da dikkati çekmektedir. Nöral adezyon molekülü L1 (L1CAM) de hücre adezyon molekülü sınıfında olan transmembran bir proteindir. Böbrek hücrelerinde de bulunan L1CAM, sinir sistemi gelişiminde, migrasyon ve farklılaşmada ve de kötü huylu insan tümörlerinin gelişiminde önemli role sahiptir [Nouwen et al., 1993], [Thelen et al., 2002], [Kiefel et al., 2012]. Fosfataz aktivitesine de sahip olan L1CAM'in OTA teşvikli olarak ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

OTA teşvikli uzun süreli protein aktivasyonunu bir bağlamada açıklayabilen bir diğer sonuç ise, protein fosfataz 1'in alfa katalitik altbirimi olan PP1A'nın protein miktarındaki azalma olabilir. Hücre bölünmesi, glikojen metabolizması ve protein sentezinde önemli role sahip olan PP1 ökaryotlardaki başlıca Ser/Thr protein fosfatazdır. DNA hasarı ile tetiklenen hücre ölümünde rol oynayan proteinleri düzenlenmesinde PP1A'nın rolü olduğu gösterilmiştir [Wang et al., 2011].

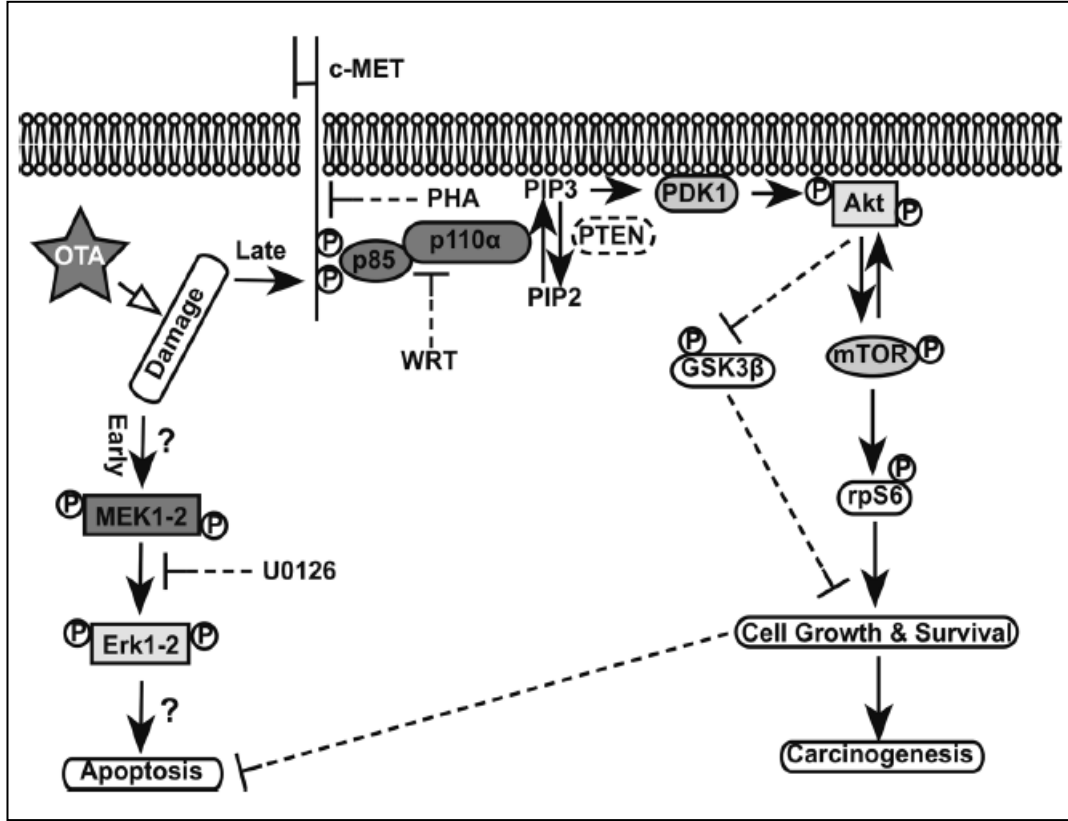
Ayrıca hücre iskeleti düzenlenmesinde, inflamasyon aracılı sinyal yolağında ve integrin sinyalinde görevli olan bazı proteinlerin ifadelerinde artış ve bazı proteinlerin ifadelerinde ise azalışa rastlanmıştır. İntegrin sinyal yolağı ile ilişkili çoğu proteinin (miyozin 9, α -aktinin, vitronektin) ifadesinde genellikle artış gözlenirken, yalnızca bir proteinin (β -aktin benzeri protein 2) ifadesinde azalma tespit edilmiştir.

Doktora çalışmasının ikinci bölümü olarak değerlendirilen proteom analizi sonuçlarına göre, OTA teşvikli olarak ifadesi artan proteinlerden öne çıkanlar, protein modifikasyonlarında ve katlamasında, heterotrimerik G-protein ve küçük GTPaz aracılı sinyal iletiminde, hücrelerarası iletişim ve adezyonda, apoptozda, RNA işlenmesinde, transkripsiyonda, translasyonda ve ROT detoksifikasyonunda görevli olan proteinlerdir. Diğer yandan, OTA teşvikli olarak ifadesi azalan proteinlerin büyük çoğunluğu apoptoz, ATP biyosentezi, elektron taşıma sistemi ve solunum, ROT detoksifikasyonu, aminoasit ve *de novo* pürin biyosentezi süreçlerine ait proteinlerdir. Öyle görünüyor ki OTA muamelesinin 24. saatinde HK-2 hücrelerinde mitokondriyal bir yorgunluğun ardından apoptoz azalmış, ATP, protein ve DNA biyosentezi minimuma indirilmiştir. OTA muamelesi gören HK-2 hücrelerinin hasarlı proteinleri tamir edilmeye, hücrenin hayatta kalması için gerekli yapısal proteinlerin transkripsiyonu, işlenmesi, translasyonu ve hücre-hücre adezyonları arttırılmaya çalışılıyor gibi bir resim karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmanın ilk bölümünü özetlersek, HK-2 hücrelerinde OTA ile aktive edilen PI3K/Akt ve MEK/ERK1-2 sinyal yolaklarının birbirine zıt yönde çalıştığı ilk defa gösterilmiştir. Daha önce literatürde yayınlanmamış bir bulgu olarak, HK-2 hücrelerinde OTA-teşvikli PI3K/Akt yolağı aktivasyonunda c-MET reseptör tirozin kinazın rolünün olduğu ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Apoptoza neden olan OTA-teşvikli MEK/ERK1-2 aktivasyonunun mekanizması henüz aydınlatılamamış bir konu olarak, ileride çalışılması planlanmaktadır.

HK-2 hücrelerinde OTA-aracılı karsinogenez için önerdiğimiz model Şekil 6.1'de resmedilmiştir. Çalışmamızın ilk kısmını baz alarak oluşturduğumuz bu modele göre, OTA'ya cevaben MEK/ERK1-2'nin uzun süreli aktivasyonu apoptoza aracılık ederken, c-MET ile de ilişkili olan PI3K/Akt/mTOR/S6 RP aktivasyonu anti-apoptotik ve sağkalımı destekleyici bir sinyal oluşturmaktadır. Sunulan veriler ışığında, c-MET/PI3K/Akt ekseninin aktivasyonu ile OTA'nın, hasarlı hücrelerin

sağkalımını desteklediği ve böylelikle insan böbreğinde olası karsinogenez mekanizmalarının yürürlüğe girmesine katkıda bulunduğunu önermekteyiz.



Şekil 6.1: OTA-aracılı karsinogenez modeli.

KAYNAKLAR

Al-Anati L., Petzinger E., (2006), "Immunotoxic activity of ochratoxin A", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29, 79-90.

Alessi D. R., James S. R., Downes C. P., Holmes A. B., Gaffney P. R. J., Reese C. B., Cohen P., (1997), "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α ", *Current Biology*, 7, 261-269.

Arbillaga L., Azqueta A., van Delft J. H. M., López de Cerain A., (2007a), "*In vitro* gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220, 216-224.

Arbillaga L., Azqueta A., Ezpeleta O., López de Cerain A., (2007b), "Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity", *Mutagenesis*, 22, 35-42.

Arbillaga L., Vettorazzi A., Gil A. G., van Delft J. H. M., García-Jalón. J. A., López de Cerain A., (2008), "Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230, 197-207.

Assaf H., Azouri H., Pallardy M., (2004), "Ochratoxin A Induces Apoptosis in Human Lymphocytes through Down Regulation of Bcl-xL", *Toxicological Science*, 79, 335-344.

Ba X. and Garg J., (2011), "Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases", *The American Journal of Pathology*, 178, 946-955.

Baeuerle P. A. and Baltimore D., (1996), "NF-kB: Ten Years After", *Cell*, 87, 13-20.

Baudrimont I., Ahouandjivo R., Creppy E.E., (1997), "Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents", *Chemico-Biological Interactions* 104, 29-40.

Bendele A.M., Carlton W.W., Krogh P., Lillehoj E.B., (1985), "Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse", *Journal of National Cancer Institute*, 75, 733-743.

Boorman G. A., McDonald M. R., Imoto S., Persing R., (1992), "Renal Lesions Induced by Ochratoxin A Exposure in the F344 Rat", *Toxicologic Pathology*, 20, 236-245.

Boudra H., Le Bars P., Le Bars J., (1995), "Thermostability of Ochratoxin A in Wheat under Two Moisture Conditions", *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1156-1158.

Braunberg R. C., Gantt O., Barton C., Friedman L., (1992), "In Vitro Effects of the Nephrotoxins Ochratoxin A and Citrinin upon Biochemical Function of Porcine Kidney", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22,464-470.

Castegnaro M., Canadas D., Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N., Pfohl-Leszkowicz A., (2006), "Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers", *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 519-529.

Chen A., Kaganovsky E., Rahimipour S., Ben-Aroya N., Okon E., Koch Y., (2002), "Two Forms of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Are Expressed in Human Breast Tissue and Overexpressed in Breast Cancer: A Putative Mechanism for the Antiproliferative Effect of GnRH by Down-Regulation of Acidic Ribosomal Phosphoproteins P1 and P2", *Cancer Research*, 62, 1036-1044.

Clough T., Key M., Ott I., Ragg S., Schadow G., Vitek O., (2009), "Protein Quantification in Label-Free LC-MS Experiments", *Journal of Proteome Research*, 8, 5275-5284.

Craft G. E., Chen A., Nairn A. C., (2013), "Recent advances in quantitative neuroproteomics", *Methods*, 61, 186-218.

Cui J., Liu J., Wu S., Wang Y., Shen H., Xing L., Wang J., Yan X., Zhang X., (2013), "Oxidative DNA damage is involved in ochratoxin A-induced G2 arrest through ataxia telangiectasia-mutated (ATM) pathways in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro", *Archives of Toxicology*, 87: 1829-1840.

Dahlmann A., Dantzer W.H., Silbernagl S., Gekle M., (1998), "Detailed Mapping of Ochratoxin A Reabsorption Along the Rat Nephron In Vivo: The Nephrotoxin Can Be Reabsorbed in All Nephron Segments by Different Mechanisms", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286, 157-162.

Dai J., Park G., Perry J. L., Il'ichev Y. V., Bow D. A., Pritchard J. B., Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R. A., Simon J. D., (2004), "Molecular Aspects of the Transport and Toxicity of Ochratoxin A", *Accounts of Chemical Research*, 37, 874-881.

Dardenne E., Polay Espinoza M., Fattet L., Germann S., Lambert M. P., Neil H., Zonta E., Mortada H., Gratadou L., Deygas M., Chakrama F. Z., Samaan S., Desmet F. O., Tranchevent L. C., Dutertre M., Rimokh R., Bourgeois C. F., Auboeuf D., (2014), "RNA Helicases DDX5 and DDX17 Dynamically Orchestrate Transcription, miRNA, and Splicing Programs in Cell Differentiation", *Cell Report*, 7, 1900-1913.

Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W., (2007), "MAP kinase signalling pathways in cancer", *Oncogene*, 26, 3279-3290.

Dorsam R. T. and Gutkind J. S., (2007), "G-protein-coupled receptors and cancer", *Nature Reviews Cancer*, 7, 79-94.

Dulak A. M., Gubish C. T., Stabile L. P., Henry C., Siegfried J. M., (2011), "HGF-independent potentiation of EGFR action by c-Met", *Oncogene*, 30: 3625-3635.

Eder S., Benesic A., Freudinger R., Engert J., Schwerdt G., Drumm K., Gekle M., (2000), "Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells", *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 440, 521-529.

EFSA, (2006), Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food : Request No EFSA-Q-2005-154, European Food Safety Authority.

Engelman J. A., Zejnullahu K., Mitsudomi T., Song Y., Hyland C., Park J. O., Lindeman N., Gale C. M., Zhao X., Christensen J., Kosaka T., Holmes A. J., Rogers A. M., Cappuzzo F., Mok T., Lee C., Johnson B. E., Cantley L. C., Jänne P. A., (2007), "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling", *Science*, 316: 1039-1043.

Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Dai J., Castegnaro M., Manderville R. A., (2004), "Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig", *Chemical Research in Toxicology*, 17, 1289-1296.

Ferrante M. C., Bilancione M., Raso G. M., Esposito E., Iacono A., Zaccaroni A., Meli R., (2006), "Expression of COX-2 and hsp72 in peritoneal macrophages after an acute ochratoxin A treatment in mice", *Life Sciences*, 79, 1242-1247.

Flynn R. S., Mahavadi S., Murthy K. S., Kellum J. M., Kuemmerle J. F., (2009), "Insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates growth of human intestinal muscle cells by activation of G α i3", *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 29:G1232-1238.

Gagliano N., Donne I. D., Torri C., Migliori M., Grizzi F., Milzani A., Filippi C., Annoni G., Colombo P., Costa F., Ceva-Grimaldi G., Bertelli A. A., Giovannini L., Gioia M., (2006), "Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study", *Toxicology*, 225, 214-224.

Gautier J. C., Holzhaeuser D., Markovic J., Gremaud E., Schilter B., Turesky R. J., (2001a), "Oxidative damage and stress response from ochratoxin a exposure in rats", *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1089-1098.

Gautier J., Richoz J., Welte D. H., Markovic J., Gremaud E., Guengerich F. P., Turesky R. J., (2001b), "Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes", *Chemical Research in Toxicology*, 14, 34-45.

Gekle M., Gassner B., Freudinger R., Mildenerger S., Silbernagl S., Pfaller W., Schramek H., (1998), "Characterization of an ochratoxin-A-differentiated and cloned renal epithelial cell line", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 152, 282-291.

Gekle M., Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Wilflingseder D., Pollack V., Dander M., Schramek H., (2000), "Ochratoxin A induces JNK activation and

apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations”, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293:837–844.

Gekle M., Sauvant C., Schwerdt G., (2005), “Ochratoxin A at nanomolar concentrations: A signal modulator in renal cells”, *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 118-130.

Grosse Y., Chekir-Ghedira L., Huc A., Obrecht-Pflumio S., Dirheimer G., Bacha H., Pfohl-Leszkowicz A., (1997), “Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone”, *Cancer Letters* 114, 225-229.

Guillard C., Chrétien S., Pelus A. S., Porteu F., Muller O., Mayeux P., Duprez V., (2003), “Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i) protein beta gamma-subunit-initiated pathway”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278:11050-11056.

Gutkind J. S., (2000), “Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Networks by G Protein-Coupled Receptors”, *Science's STKE*, 40, re1.

Halleskog C., Dijksterhuis J. P., Kilander M. B., Becerril-Ortega J., Villaescusa J. C., Lindgren E., Arenas E., Schulte G., (2012), “Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation, *Journal of Neuroinflammation*, 9, 111.

Hanahan D., Weinberg R. A., (2000), “The Hallmarks of Cancer”, *Cell*, 100, 57-70.

Hara S., Oya M., Mizuno R., Horiguchi A., Marumo K., Murai M., (2005), “Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor”, *Annals of Oncology*, 16: 928-933.

Hong S. K., Yoon S., Moelling C., Arthan D., Park J.I., (2009), “Noncatalytic Function of ERK1/2 Can Promote Raf/MEK/ERK-mediated Growth Arrest Signaling”, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 33006-33018.

Horvath A., Upham B. L., Ganey V., Trosko J. E., (2002), “Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line”, *Toxicol*, 40: 273-282.

Hossain M. N., Sakemura R., Fujii M., Ayusawa D., (2006), “G-protein gamma subunit GNG11 strongly regulates cellular senescence”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351: 645-50.

IARC: International Agency for Research on Cancer, (1993), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 56 Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*, 56, 40-490.

JECFA: The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, (2007), "Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report", WHO Technical Report Series, 947.

Jennings-Gee J. E., Tozlovanu M., Manderville R., Miller M. S., Pfohl-Leszkwicz A., Schwartz G.G., (2010), "Ochratoxin A: in utero exposure in mice induces adducts in testicular DNA", *Toxins (Basel)*, 2, 1428-1444.

Jennings P., Weiland C., Limonciel A., Bloch K. M., Radford R., Aschauer L., McMorrow T., Wilmes A., Pfaller W., Ahr H. J., Slattery C., Lock E. A., Ryan M. P., Ellinger-Ziegelbauer H., (2012), "Transcriptomic alterations induced by Ochratoxin A in rat and human renal proximal tubular in vitro models and comparison to a rat in vivo model" *Archives of Toxicology*, 86: 571-589.

Jernigan K. K., Cselenyi C. S., Thorne C. A., Hanson A. J., Tahinci E., Hajicek N., Oldham W. M., Lee L. A., Hamm H. E., Hepler J. R., Kozasa T., Linder M. E., Lee E., (2010), "G β γ Activates GSK3 to Promote LRP6-Mediated β -Catenin Transcriptional Activity", *Science Signaling*, 3, ra37.

Jo S. K., Cho W. Y., Sung S. A., Kim H. K., Won N. H., (2005), "MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis", *Kidney International*, 67, 458-466.

Kamp H. G., Eisenbrand G., Schlatter J., Würth K., Janzowski C., (2005a), "Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells", *Toxicology* 206, 413-425.

Kamp HG1, Eisenbrand G, Janzowski C, Kiossev J, Latendresse JR, Schlatter J, Turesky RJ. (2005b), "Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats", *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 1160-1167.

Kaufman R. J., Malhotra J. D., (2014), "Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843, 2233-2239.

Kiefel H., Bondong S., Hazin J., Ridinger J., Schirmer U., Riedle S., Altevogt P., (2012), "L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility", *Cell Adhesion and Migration*, 6, 374-384.

Klarić M. S., Pepeljnjak S., Domijan A. M., Petrik J., (2006), "Lipid peroxidation and Glutathione Levels in Porcine Kidney PK15 Cells after Individual and Combined Treatment with Fumonisin B1, Beauvericin and Ochratoxin A", *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*, 100, 157-164.

Komiya Y., Habas R., (2008), "Wnt signal transduction pathways", *Organogenesis*, 4, 68-75.

Kumar R., Ansari K. M., Chaudhari B. P., Dhawan A., Dwivedi P. D., Jain S. K., Das M., (2012), "Topical application of ochratoxin A causes DNA damage and tumor initiation in mouse skin", *PLoS ONE*, 7: e47280.

Kumar R., Alam S., Chaudhari B. P., Dwivedi P. D., Jain S. K., Ansari K. M., Das M., (2013), "Ochratoxin A-induced cell proliferation and tumor promotion in mouse skin by activating the expression of cyclin-D1 and cyclooxygenase-2 through nuclear factor-kappa B and activator protein-1", *Carcinogenesis*, 34, 647-657.

Lautert C., Ferreiro L., Wolkmer P., Paim F. C., da Silva C. B., Jaques J. A., Lopes S. T., Santurio J. M., (2014), "Individual in vitro effects of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and acetylcholinesterase in lymphocytes of broiler chickens", *SpringerPlus*, 3, 506.

Lee S., Choi E. J., Jin C., Kim D. H., (2005), "Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line", *Gynecologic Oncology*, 97:26-34.

Lim S., Jang H. J., Kim J. K., Kim J. M., Park E. H., Yang J. H., Kim Y. H., Yea K., Ryu S. H., Suh P. G., (2011), "Ochratoxin A inhibits adipogenesis through the extracellular signal-related kinases-peroxisome proliferator-activated receptor- γ pathway in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells", *Stem Cells and Development*, 20, 415-426.

Linehan W. M., Srinivasan R., Schmidt L. S., (2010), "The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease", *Nature Reviews Urology*, 7, 277-285.

Lioi M. B., Santoro A., Barbieri R., Salzano S., Ursini M. V., (2003), "Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes", *Mutation Research*, 557,19-27.

Ma F. Y., Liu J., Nikolic-Paterson D.J., (2009), "The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42: 29-37.

Mally A., Völkel W., Amberg A., Kurz M., Wanek P., Eder E., Hard G., Dekant W., (2005), "Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats", *Chemical Research in Toxicology*, 18,1242-1252.

Maresca M., Mahfoud R., Pfohl-Leszkwicz A., Fantini J., (2001), "The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176, 54-63.

Marin S., Ramos A. J., Cano-Sancho G., Sanchis V., (2013), "Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment", *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.

Marin-Kuan M., Nestler S., Verguet C., Bezençon C., Piguet D., Mansourian R., Holzwarth J., Grigorov M., Delatour T., Mantle P., Cavin C., Schilter B., (2006), "A

toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat”, *Toxicological Sciences*, 89, 120-134.

Marin-Kuan M., Nestler S., Verguet C., Bezençon C., Piguet D., Delatour T., Mantle P., Cavin C., Schilter B., (2007), “MAPK-ERK activation in kidney of male rats chronically fed ochratoxin A at a dose causing a significant incidence of renal carcinoma”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224, 174-181.

Mirza A. M., Gysin S., Malek N., Nakayama K., Roberts J. M., McMahon M., (2004), “Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT”, *Molecular and Cellular Biology*, 24, 10868-10881.

Morrison D.K., (2012), “MAP kinase pathways”, *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 4, a011254.

Nicholson K. M., Anderson N. G., (2002), “The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy”, *Cellular Signalling*, 14, 381-395.

Nouwen E. J., Dauwe S., van der Biest I., De Broe M. E., (1993), “Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney”, *Kidney International*, 44, 147-158.

Nowak G., (2002), “Protein kinase C- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 43377-43388.

NTP: National Toxicology Program, (2014), “Ochratoxin A CAS No. 303-47-9”, Report on Carcinogens, Thirteenth Edition.

NTP: National Toxicology Program, (1989), “Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin a (Cas No. 303-47-9) in F344/N rats (Gavage studies), NTP Technical Report Series, No.358.

Obrecht-Pflumio S. and Dirheimer G., (2000), “In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A”, *Chemico-Biological Interactions*, 127: 29-44.

O'Brien E., Heussner A. H., Dietrich D. R., (2001), “Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B”, *Toxicological Sciences*, 63, 256-264.

Özcan Z., Gül G., Yaman İ., (2014), “Ochratoxin A Activates Opposing c-Met/PI3K/Akt and MAPK/Erk 1-2 Pathways in Human Proximal Tubule HK-2 Cells”, *Archives of Toxicology*, DOI 10.1007/s00204-014-1311-x.

Park F., (2015), “Activators of G-protein Signaling in the kidney”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, DOI: 10.1124/jpet.115.222695

Perrault R., Wright B., Storie B., Hatherell A., Zahradka P., (2011), “Tyrosine kinase-independent activation of extracellular-regulated kinase (ERK) 1/2 by the insulin-like growth factor-1 receptor”, *Cell Signaling*, 23: 739-746.

Petrik J., Zanić-Grubisić T., Barisić K., Pepeljnjak S., Radić B., Ferencić Z., Cepelak I., (2003), "Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney", *Archives of Toxicology*, 77, 685-693.

Petzinger E, and Ziegler, K., (2000), "Ochratoxin A from a toxicological perspective", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, 91-98.

Pfohl-Leszkowicz A. and Manderville R. A., (2007), "Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans", *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 61-99.

Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N., Castegnaro M., (2002), "Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins", *Food Additives and Contaminants*, 19, 282-302.

Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L., (2003), "Necrosis: a specific form of programmed cell death?", *Experimental Cell Research*, 283, 1-16.

Qi X., Yu T., Zhu L., Gao J., He X., Huang K., Luo Y., Xu W., (2014), "Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280, 543-549.

Qian C. N., Furge K. A., Knol J., Huang D., Chen J., Dykema K. J., Kort E. J., Massie A., Khoo S. K., Vanden Beldt K., Resau J. H., Anema J., Kahnoski R. J., Morreau H., Camparo P., Comperat E., Sibony M., Denoux Y., Molinie V., Vieillefond A., Eng C., Williams B. O., Teh B. T., (2009), "Activation of the PI3K/AKT pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models", *Cancer Research*, 69: 8256-8264.

Rached E., Pfeiffer E., Dekant W., Mally A., (2006), "Ochratoxin A: apoptosis and aberrant exit from mitosis due to perturbation of microtubule dynamics?", *Toxicological Science*, 92: 78-86.

Ramyaa P., Padma V. V., (2013), "Ochratoxin-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis ameliorated by quercetin--modulation by Nrf2", *Food and Chemical Toxicology*, 62, 205-216.

Ramyaa P., Krishnaswamy R., Padma V. V., (2014), "Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells - up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- κ B and COX-2", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 681-692.

Ren H., Koo J., Guan B., Yue P., Deng X., Chen M., Khuri F. R., Sun S. Y., (2013), "The E3 ubiquitin ligases β -TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis", *Molecular Cancer*, 12, 146.

Roth A., Eriani G., Dirheimer G., Gangloff J., (1993), "Kinetic properties of pure overproduced *Bacillus subtilis* phenylalanyl-tRNA synthetase do not favour its in vivo inhibition by ochratoxin A", Federation of European Biochemical Societies, 326, 87-91.

Ryan M. J., Johnson G., Kirk J., Fuerstenberg S. M., Zager R. A., Torok-Storb B., (1994), "HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney", *Kidney International*, 45, 48-57.

Sarbassov D. D., Guertin D. A., Ali S. M., Sabatini D. M., (2005), "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex", *Science*, 18, 1098-1101.

Sauvant C., Holzinger H., Gekle M., (2005a), "The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells", *Cellular Physiology and Biochemistry*, 15:125-134.

Sauvant C., Holzinger H., Gekle M., (2005b), "Proximal tubular toxicity of ochratoxin A is amplified by simultaneous inhibition of the extracellular signal-regulated kinases 1/2", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313, 234-241.

Sava V., Velasquez A., Song S., Sanchez-Ramos J., (2007), "Adult hippocampal neural stem/progenitor cells in vitro are vulnerable to the mycotoxin ochratoxin-A", *Toxicological Sciences*, 98, 187-197.

Schramek H., Wilflingseder D., Pollack V., Freudinger R., Mildenerger S., Gekle M., (1997), "Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 83, 1460-1468.

Schwerdt G., Bauer K., Gekle M., Silbernagl S., (1996), "Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro", *Toxicology*, 114, 177-185.

Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Silbernagl S., Gekle M., (1999), "The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells", *Cell Biology and Toxicology*, 15, 405-415.

Schwerdt G., Holzinger H., Sauvant C., Königs M., Humpf H. U., Gekle M., (2007), "Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture", *Toxicology*, 232, 57-67.

Schilter B., Marin-Kuan M., Delatour T., Nestler S., Mantle P., Cavin C., (2005) "Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity", *Food Additives and Contaminants*, 22: 88-93.

Sieber M., Wagner S., Rached E., Amberg A., Mally A., Dekant W., (2009), "Metabonomic study of ochratoxin a toxicity in rats after repeated administration: phenotypic anchoring enhances the ability for biomarker discovery", *Chemical Research in Toxicology*, 22, 1221-1231.

Silva J. C., Gorenstein M. V., Li G. Z., Vissers J. P., Geromanos S. J., (2006), "Absolute quantification of proteins by LCMS^E: a virtue of parallel MS acquisition", *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 144-156.

Sinha K., Das J., Pal P. B., Sil P. C., (2013), "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis", *Archives of Toxicology*, 87, 1157-1180.

Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Kempf R. C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M. C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C, Martelli A. M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J. A., (2011), "Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging", *Aging*, 3, 192-222.

Stemmer K., Ellinger-Ziegelbauer H., Ahr H. J., Dietrich D. R., (2007), "Carcinogen-specific gene expression profiles in short-term treated Eker and wild-type rats indicative of pathways involved in renal tumorigenesis", *Cancer Research*, 67, 4052-4068.

Stoev S. D., Gundasheva D., Zarkov I., Mircheva T., Zapryanova D., Denev S., Mitev Y., Daskalov H., Dutton M., Mwanza M., Schneider Y. J., (2012), "Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a mouldy diet containing ochratoxin A and fumonisin B1", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, 733-741.

Studer-Rohr I., Dietrich D. R., Schlatter J., Schlatter C., (1995a), "The occurrence of ochratoxin A in coffee" *Food and Chemical Toxicology*, 33, 341-355.

Studer-Rohr I., (1995b), "Ochratoxin A in Humans: Exposure, Kinetics and Risk Assessment", Ph. D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zürich.

Subramaniam S., Zirrgiebel U., von Bohlen Und Halbach O, Strelau J., Laliberté C., Kaplan D. R., Unsicker K., (2004), "ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3", *The Journal of Cell Biology*, 165, 357-369.

Tang D., Okada H., Ruland J., Liu L., Stambolic V., Mak T. W., Ingram A. J., (2001), "Akt is activated in response to an apoptotic signal", *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 30461-30466.

Thelen K., Kedar V., Panicker A. K., Schmid R.S., Midkiff B. R., Maness P. F., (2002), "The Neural Cell Adhesion Molecule L1 Potentiates Integrin-Dependent Cell Migration to Extracellular Matrix Proteins", *The Journal of Neuroscience*, June 15, 2002, 22, 4918-4931.

Thomson S., Petti F., Sujka-Kwok I., Epstein D., Haley J. D., (2008), "Kinase switching in mesenchymal-like non-small cell lung cancer lines contributes to EGFR

inhibitor resistance through pathway redundancy”, *Clinical and Experimental Metastasis*, 25: 843-854.

Tian W., Zhang Z., Cohen D. M., (2001), “MAPK signaling and the kidney”, *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 279, 593-604.

van der Merwe K. J., Steyn P. S., Fourie L., (1965), “1304. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh”, *Journal of the Chemical Society*, 7083-7088.

Vazquez F., Ramaswamy S., Nakamura N., Sellers W. R., (2000), “Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function”, *Molecular and Cellular Biology*, 20, 5010-5018.

Wang X., Martindale J. L., Holbrook N. J., (2000), “Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis”, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 39435-39443.

Wang P., Bai Y., Song B., Wang Y., Liu D., Lai Y., Bi X., Yuan Z., (2011), “PP1A-mediated dephosphorylation positively regulates YAP2 activity”, *PLoS One*, 6, e24288.

Wang Y., Liu J., Cui J., Xing L., Wang J., Yan X., Zhang X., (2012), “ERK and p38 MAPK signaling pathways are involved in ochratoxin A-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells”, *Toxicology Letters*, 209: 186-192.

Waters Corporation, (2004), “Ultra Performance LC™ by design by Waters Corporation”, USA, 720000880EN LL&LW-UL.

Web 1, (2011), <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004036en.pdf>, (Erişim Tarihi: 4/12/2014).

Web 2, (2012), <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf> (Erişim Tarihi: 5/12/2014).

Web 3, (2015), <http://www.pantherdb.org/geneListAnalysis.do>, (Erişim Tarihi: 03/02/2015)

Weston L. A., Bauer K. M., Hummon A. B., (2013), “Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC-MS analysis of complex proteomes”, *Analytical Methods*, 5, 18.

Weston C. R., Davis R. J., (2002), “The JNK signal transduction pathway”, *Current Opinion in Genetics and Development*, 12, 14-21.

Wilk-Zasadna I. and Minta M., (2009), “Developmental toxicity of Ochratoxin A in rat embryo midbrain micromass cultures”, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 37-49.

Woods D. C. and Johnson A. L., (2006), "Phosphatase activation by epidermal growth factor family ligands regulates extracellular regulated kinase signaling in undifferentiated hen granulosa cells", *Endocrinology*, 147: 4931-4940.

Wünsch S., Gekle M., Kersting U., Schuricht B., Oberleithner H., (1995), "Phenotypically and karyotypically distinct Madin-Darby canine kidney cell clones respond differently to alkaline stress", *Journal of Cellular Physiology*, 164, 164-171.

Wymann M. P., Zvelebil M., Laffargue M., (2003), "Phosphoinositide 3-kinase signalling-which way to target?", *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 366-376.

Xu H., Stabile L. P., Gubish C. T., Gooding W. E., Grandis J. R., Siegfried J. M., (2011), "Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells", *Clinical Cancer Research*, 17: 4425-4438.

Xu Q. A., (2013), "Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications", First Edition, Wiley.

Xu A. M. and Huang P. H., (2010), "Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer", *Cancer Research*, 70: 3857-3860.

Yamamoto T., Ebisuya M., Ashida F., Okamoto K., Yonehara S., Nishida E., (2006), "Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression", *Current Biology*, 16, 1171-1182.

Zhang Q. and Claret F. X., (2012), "Phosphatases: the new brakes for cancer development?", *Enzyme Research*, 2012: 659649

Zhao Y.Y. and Lin R.C., (2014), "UPLC–MSE application in disease biomarker discovery: The discoveries in proteomics to metabolomics", *Chemico-Biological Interactions*, 215, 7-16.

Zurich M. G., Lengacher S., Braissant O., Monnet-Tschudi F., Pellerin L., Honegger P., (2005), "Unusual astrocyte reactivity caused by the food mycotoxin ochratoxin A in aggregating rat brain cell cultures", *Neuroscience*, 134, 771-782.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Özcan 1979 yılında İzmit'te doğdu. 1998-2002 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimi aldı. Yüksek lisans eğitimini 2002-2005 yılları arasında Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda tamamladı. Ardından 2006 yılında, o dönemdeki adıyla Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE), şimdiki adıyla Gebze Teknik Üniversitesi (GTÜ), Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2009 yılından bu yana danışmanı olan Yrd. Dr. İbrahim Yaman ile birlikte önce TÜBİTAK MAM Gıda Estitüsü'nde, Haziran 2010'dan itibaren ise Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde , “*In vitro* Genome-wide Assessment of Ochratoxin A Carcinogenicity by Utilizing Transcriptomics and Proteomics” başlıklı EMBO projesi kapsamında doktora çalışmalarını sürdürmüş ve tamamlamıştır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Özcan Z., Gül G., Yaman İ., (2014), “Ochratoxin A Activates Opposing c-Met /PI3K/Akt and MAPK/Erk 1-2 Pathways in Human Proximal Tubule HK-2 Cells”, Archives of Toxicology, DOI 10.1007/s00204-014-1311-x.