

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİKLİNE BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN  
DOĞAL TİP VE ATG5 İFADESİNDEN YOKSUN MEF  
HÜCRELERİNDE TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYÇA ECE NEZİR**

**1409241005**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elif Damla ARISAN**

**ARALIK 2016**

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLİNE BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN DOĞAL  
TİP VE ATG5 İFADESİNDEN YOKSUN MEF  
HÜCRELERİNDE TERAPOTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYÇA ECE NEZİR

1409241005

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elif Damla ARISAN

Diğer Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Doç. Dr. Dilek TELCİ

Aralık 2016

## ÖNSÖZ

Olağanüstü bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak gerek doğru çalışma prensiplerini, gerekse iş ahlakını bana aşıl原因an, olumsuz koşullarda devamlı destek ve anlayış gösteren, daha yetkin bir öğrenci olmam için uğraş veren saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Elif Damla ARISAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimime büyük katkıda bulunan değerli öğretmenlerim Prof. Dr. Narçın Palavan Ünsal'a, Doç. Dr. Ajda Çoker Gürkan'a, Yrd. Doç. Dr. Pınar Obakan Yerlikaya'ya ve Araş. Gör. Pelin Özfiliz ile Araş. Gör. Özge Berrak'a sıcak gülümsemeleri ve hoş sohbetleri de dahil olmak üzere benimle paylaştıkları her şey için teşekkür ederim.

İşine olan sevgisiyle çevresindekilere ilham veren, sıradan bir kahve molasını verimli bir bilim toplantısına çevirebilen ve en can sıkıcı anlarda dahi gülmeyi başaran akıllı, eğlenceli ve son derece değerli dostlarım Utku ÖZBEY'e, Zeynep DURDU'ya, Kaan ADACAN'a ve Okan AKAR'a geçen iki yıl için teşekkür ediyorum.

Çalışkanlığıyla ve ahlakıyla örnek teşkil eden, sevecenliğiyle, sadakatiyle hayatımı güzelleştiren çalışma arkadaşım, kardeşim Merve ÇELİK'e ve ailesinin değerli diğer üyeleri Emir, Onur, Selma ve Tarık ÇELİK'e; yıllardır hep yanımda yürüyen yol arkadaşlarım Elif EVEREST, Enzim SUBSTRAT ve Murat ÜSTÜN'e, sundukları ikincil aile ortamı için çok teşekkür ederim.

Her biriyle gurur duyduğum annem Nihal, babam Semih ve kardeşim Uğur NEZİR'e sağladıkları her türlü destek için minnetle teşekkür ediyorum ve her zaman aynı ölçüde minnet ve büyük bir özlem duyacağım Zülfünaz ÖZ'ü rahmetle anıyorum.

29/09/2014-29/11/2015 tarihleri arasında TÜBİTAK ARDEB 112T433 nolu proje kapsamında bursiyer olarak beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ii</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>1</b>
1.1. Otofaji.....	1
1.2. Apoptoz.....	4
1.3. Otofaji ve Apoptozun Hücre Sağkalım ve Ölüm Kararlarındaki Etkileşimi.....	7
1.4. Otofaji ve Kanser.....	9
1.5. Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri.....	11
1.6. Sikline Bağımlı Kinazlar.....	11
1.7. Purvalanol ve Roskovitin.....	12
1.8. Amaç.....	13
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>14</b>
2.1. Materyaller.....	14
2.1.1. Cihazlar.....	14
2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları.....	14
2.1.3. Kimyasallar.....	14
2.1.4. Çözeltiler.....	14
2.1.5. Antikorlar.....	14
2.2. Yöntemler.....	14
2.2.1. Hücre Kültürü.....	14

2.2.2. Hücrelerin Dondurulması.....	15
2.2.3. Hücrelerin Çözülmesi.....	15
2.2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	15
2.2.5. Hücre Sağkalım Analizi.....	16
2.2.6. Akış Sitometrisi ile Annexin V-PI Boyama Analizi.....	16
2.2.7. Total Protein İzolasyonu.....	16
2.2.8. Protein Miktarının Bradford Analizi ile Belirlenmesi.....	17
2.2.9. Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	17
2.2.10. SDS-PAGE.....	17
2.2.11. Proteinlerin Membran üzerine transferi ve Membran Blokklama.....	18
2.2.12. Antikor Bağlanması ve Membranların Görüntülenmesi.....	18
2.2.13. Ko-immunopresipitasyon.....	18
2.2.14. İmmunofloresan Yöntemi.....	19
2.2.15. İstatistiksel Analizler.....	20
<b>3. SONUÇLAR.....</b>	<b>21</b>
3.1. Doğal Tip ve Atg5 İfadesinden Yoksun MEF Hücrelerinde Atg5 Protein Seviyelerinin Tayin Edilmesi.....	21
3.2. Purvalanol ve Roskovitinin MEF Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Gösterilmesi.....	22
3.3. Purvalanol ve Roskovitinin MEF Hücrelerindeki Otofaji Belirteçleri Üzerindeki Etkileri.....	23
3.4. Purvalanol ve Roskovitinin MEF Hücrelerinde mTOR ile İlişkili Yolaklar Üzerindeki Etkileri.....	28
3.5. Purvalanol ve Roskovitinin MEF Hücrelerindeki Otofaji İlişkili Proteinler Üzerindeki Etkileri.....	30
3.6. Purvalanol ve Roskovitinin MEF Hücrelerindeki Apoptotik Etkileri.....	31
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>35</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>41</b>
<b>6. EKLER.....</b>	<b>46</b>
Ek A: Cihazlar.....	46
Ek B: Hücre Kültürü Donanımları.....	48

Ek C: Kimyasallar.....	49
Ek D: Çözeltiler.....	51
Ek E: Antikorlar.....	57

## KISALTMA LİSTESİ

<b>Akt/PKB:</b>	Protein kinaz B
<b>AMP:</b>	Adenozin monofosfat
<b>AMPK:</b>	AMP-aktive protein kinaz
<b>Apaf-1:</b>	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
<b>APS:</b>	Amonyum persülfat
<b>Atg:</b>	Otofaji ilişkili protein
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>Bad:</b>	Bcl2-ilişkili hücre ölüm agonisti
<b>Bak:</b>	Bcl2-antagonist protein
<b>Bax:</b>	Bcl2-ilişkili X proteini
<b>Bcl-2:</b>	B-hücresi lenfoma-2
<b>Bcl-w:</b>	Bcl-2 benzeri protein-2
<b>Bcl-x<sub>L</sub>:</b>	Bcl-2 benzeri protein-1
<b>Beklin-1:</b>	Bcl-2 etkileşimli protein
<b>BH:</b>	Bcl-2 homoloji
<b>Bid:</b>	BH3-etkileşim bölgesi ölüm antagonisti
<b>Bik:</b>	Bcl-2 etkileşimli ölüm proteini
<b>Bim:</b>	Bcl-2 benzeri protein-11
<b>BSA:</b>	Sığır serum albumin
<b>CAK:</b>	CDK aktifleştirici kinaz
<b>CDK:</b>	Sikline bağımlı kinaz
<b>CDKi:</b>	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
<b>CLB:</b>	Hücre özütleme tamponu
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>Dt:</b>	Doğal tip
<b>DISC:</b>	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

<b>DMEM:</b>	Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri
<b>DMSO:</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA:</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>ER:</b>	Endoplazmik retikulum
<b>FADD:</b>	Fas-ilişkili ölüm bölgesi
<b>FBS:</b>	Fetal sığır serumu
<b>FIP200:</b>	Fokal adezyon kinaz etkileşimli 200 kDa protein
<b>GTP:</b>	Guanozin trifosfat
<b>LC3:</b>	Mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir 3
<b>Mcl-1:</b>	Uyarılmış miyeloid lösemi hücresi farklılaşma proteini
<b>MEF:</b>	Fare embriyonik fibroblast
<b>mTOR:</b>	Memeli rapamisin hedefi
<b>mTORC1/2:</b>	mTOR kompleks 1/2
<b>MTT:</b>	3-(4,5-dimetiltriaazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
<b>PARP:</b>	Poli-ADP riboz polimeraz
<b>PBS:</b>	Fosfat tamponlu tuz
<b>PE:</b>	Fosfatidiletanolamin
<b>PI:</b>	Propidyum iyodür
<b>PI3K:</b>	Fosfatidilinositol-3-kinaz
<b>PS:</b>	Fosfatidilserin
<b>Pur:</b>	Purvalanol
<b>PVDF:</b>	Poliviniliden florid
<b>Rheb:</b>	Beyinde zenginleştirilmiş Ras-homolog
<b>Raptor:</b>	mTOR-ilişkili düzenleyici protein
<b>ROS:</b>	Reaktif oksijen türevi
<b>Ros:</b>	Roskovitin
<b>SDS:</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SDS-PAGE:</b>	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
<b>Ser:</b>	Serin
<b>TBS:</b>	Tris tamponlu tuz
<b>TBS-T:</b>	TBS-Tween



<b>TEMED:</b>	Tetrametiletilendiamin
<b>Thr:</b>	Treonin
<b>Tsc1/2:</b>	Tuberoskleroz kompleks 1/2
<b>Tun:</b>	Tunikamisin
<b>ULK-1:</b>	Unc51 benzeri kinaz-1

## SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

<b>%:</b>	Yüzde
<b>°C:</b>	Santigrat derece
<b>µg:</b>	Mikrogram
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>µM:</b>	Mikromolar
<b>g:</b>	Santrifüj kuvveti
<b>gr:</b>	Gram
<b>kDa:</b>	Kilodalton
<b>L:</b>	Litre
<b>M:</b>	Molar
<b>mA:</b>	Miliamper
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>mm:</b>	Milimetre
<b>nm:</b>	Nanometre
<b>pH:</b>	Hidrojen kuvveti
<b>rpm:</b>	Dakikadaki dönüş sayısı
<b>sa:</b>	Saat
<b>V:</b>	Volt
<b>Δφ<sub>m</sub>:</b>	Mitokondri zar potansiyeli

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 6.1.</b> Laboratuvarda kullanılan cihazlar.....	44
<b>Tablo 6.2.</b> Hücre kültüründe kullanılan malzemeler.....	46
<b>Tablo 6.3.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	47
<b>Tablo 6.4.</b> 10X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH 7,4.....	49
<b>Tablo 6.5.</b> Hücre Dondurma Medyası.....	49
<b>Tablo 6.6.</b> 1,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH 8,8.....	49
<b>Tablo 6.7.</b> 0,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH 6,8.....	50
<b>Tablo 6.8.</b> Hücre Lizis Tamponu (CLB).....	50
<b>Tablo 6.9.</b> 5X Laemmli Tamponu.....	50
<b>Tablo 6.10.</b> %10 (ağırlık/hacim) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi.....	51
<b>Tablo 6.11.</b> %30 (hacim/hacim) Akrilamid/Bis-akrilamid Çözeltisi.....	51
<b>Tablo 6.12.</b> %10 (ağırlık/hacim) Amonyum Persülfat (APS).....	51
<b>Tablo 6.13.</b> %12 (hacim/hacim) Poliakrilamid Jel.....	51
<b>Tablo 6.14.</b> 10X Yürütme Tamponu, pH 8,3.....	52
<b>Tablo 6.15.</b> 10X Transfer Tamponu, pH 8,3.....	52
<b>Tablo 6.16.</b> 10X Tris Tampon Çözeltisi (TBS), pH 7,6.....	52
<b>Tablo 6.17.</b> %5 (ağırlık/hacim) Süt Çözeltisi.....	53
<b>Tablo 6.18.</b> Bradford Çözeltisi.....	53
<b>Tablo 6.19.</b> 1 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH 8,5.....	53
<b>Tablo 6.20.</b> Kumarik Asit Çözeltisi.....	53
<b>Tablo 6.21.</b> Luminol Çözeltisi.....	54
<b>Tablo 6.22.</b> Kemiluminesans Çözeltisi.....	54
<b>Tablo 6.23.</b> PBS/BSA Çözeltisi.....	54
<b>Tablo 6.24.</b> Blok Çözeltisi.....	54
<b>Tablo 6.25.</b> Çalışmada kullanılan antikorlar.....	55

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1.1. Otofagozomun oluşumu.....	2
Şekil 1.1.2. Otofajinin gerçekleşmesinde rol oynayan mekanizmalar.....	3
Şekil 1.1.3. Atg12 ve LC3 konjugasyon sistemleri.....	4
Şekil 1.2.1. Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişimler.....	5
Şekil 1.2.2. Apoptozun içsel ve dışsal yolları.....	6
Şekil 1.2.3. Bcl-2 ailesi proteinlerinin BH bölgeleri.....	7
Şekil 1.3.1. Otofaji ve apoptozun hücre sağkalım ve ölüm kararlarındaki etkileşimi.	8
Şekil 1.4.1. Otofaji ve apoptozun kanserin farklı evrelerindeki etkileri.....	10
Şekil 1.5.1. Fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri.....	11
Şekil 1.6.1. Hücre döngüsünde CDK kompleksleri.....	12
Şekil 1.7.1. Purvalanol ve roskovitin yapıları.....	13
Şekil 3.1.1. Dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Atg5 protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	20
Şekil 3.2.1. Dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde purvalanol ve roskovitin bağlı hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkilerinin gösterilmesi.....	21
Şekil 3.2.2. Purvalanol ve roskovitin dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerinin sağkalımı üzerindeki zamana bağlı etkilerinin gösterilmesi.....	22
Şekil 3.3.1. 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki otofaji belirteçlerinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	23
Şekil 3.3.2. 24 saat boyunca 20 µM purvalanol ve 30 µM roskovitin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki LC3 proteininin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi.....	25
Şekil 3.3.3. 0, 3, 6, 9 ve 12 saat boyunca 20 µM purvalanol ve 30 µM roskovitin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki otofaji ilişkili protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	26
Şekil 3.3.4. 0, 3, 9 ve 12 saat boyunca 20 µM purvalanol ve 30 µM roskovitin	

uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Bcl-2 ile bağılı bulunan Beklin-1 protein miktarlarının ko-immunopresipitasyon ve immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. .....	27
<b>Şekil 3.4.1.</b> 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki mTOR yolağı ile ilişkili protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	29
<b>Şekil 3.5.1.</b> 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Atg protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	30
<b>Şekil 3.6.1.</b> 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki apoptoz ile ilişkili protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.....	31
<b>Şekil 3.6.2.</b> 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisin uygulanan dt ve Atg5 <sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki apoptotik ve nekrotik popülasyonların Annexin V-PI boyama yöntemi ile akış sitometrisinde gösterilmesi. .....	33

## ÖZET

Günümüzde kanser, dünyanın her yerinde sıklıkla görülen, yüksek oranda ölüme, çoğu zaman da yaşam kalitesinin düşmesine neden olan, insan ömrünün uzaması ile birlikte artan vakalar sebebiyle araştırmacıların yoğun olarak ilgilendiği ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserin tanı ve tedavisine yönelik çok çeşitli stratejiler geliştirilmiş olup hala potansiyel terapötik ajanlar üzerine çok sayıda çalışma yürütülmektedir.

Kanser vakalarında hücrelerin aşırı çoğalması durumu büyük bir sorun teşkil etmektedir. Dolayısıyla hücre döngüsü ve bölünmesinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan birtakım proteinler, önemli birer hedef olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda sikline bağımlı kinazlar (CDK) son zamanlarda ele alınmaktadır. CDK'lerin aşırı aktivasyonu sonucunda hücreler sürekli olarak bölünme eğilimine girerler. Bu nedenle CDK inhibitörleri (CDKi) kanser tedavisinde kullanılabilir. Bu anlamda purvalanol ve roskovitin (CYC202, seliciclib) gibi, kendine özgü CDK hedeflerinin aktivasyonunu durduran ajanlar ile yapılan çalışmalar sonucunda CDKi türevlerinin hücre sağkalımına ket vuran apoptotik etkileri ortaya konmaktadır.

Otofaji, hücrenin eski organel, protein gibi sitoplazmik molekülleri yıkıma uğratarak, sonuçta yenilerinin sentezinde kullanılacak amino asit, yağ asidi gibi küçük moleküllerin üretildiği bir nevi geri dönüşüm mekanizmasıdır. Dolayısıyla böyle bir mekanizma, açlık benzeri stres koşullarında hücrede homeostasinin sağlanması için son derece önemlidir. Ancak otofajinin, apoptozun yanında bir diğer hücre ölüm mekanizması olarak da görev yapabildiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kanserde, otofajinin hücre sağkalım ve ölüm kararlarında hangi yöne etki ettiği tartışma konusudur.

Atg5 proteini otofagozomların oluşmasındaki önemli rolü nedeniyle otofaji süreci için gerekli görülmektedir. Bu tez kapsamında Atg5 protein varlığının purvalanol ve roskovitin uygulanan fare embriyonik fibroblast (MEF) hücrelerindeki apoptoz ve otofaji süreçlerini ve hücre sağkalımını ne şekilde etkilediği üzerine çalışmalar yapılmıştır. Doğal tip (dt) ve Atg5 ifadesinden yoksun (Atg5<sup>-/-</sup>) MEF hücrelerinde, ilaç uygulamalarını takiben, otofaji ve apoptoz ile ilişkili belirteçler ve otofaji ile yakından ilişkili olan memeli rapamisin hedefi (mTOR) sinyal yolağında yer alan bazı proteinlerin durumları incelenmiştir.

Çalışmalar sonucunda CDKi türevleri ile muamele edilen MEF hücrelerinde apoptozun gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca bu ilaçların her iki hücre hattında da Atg5 varlığından bağımsız olarak otofaji cevabının ortaya çıkmasına neden olduğu görülmüştür ki literatürde Atg5-bağımsız otofajik sinyal yollarının varlığı gösterilmiştir. Yine de, dt hücrelerin sağkalımının Atg5<sup>-/-</sup> hücelere kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Atg5 proteininin apoptozun gerçekleşmesindeki bazı rolleri de daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hücrenin sağkalım ve ölüm karar mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için bu bilgilerin de ele alınması, konu üzerine çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.

## **ABSTRACT**

Cancer is a worldwide problem that causes many deaths, at least a serious decrease in life quality, and as the cases keep increasing due to a higher lifespan, it has been a major interest for researchers from all over the world. Many strategies have been developed for cancer diagnosis and therapy, and there are many ongoing studies regarding the potential therapeutic agents.

One of the main problems in cases of cancer is the high rate of cell division. Thus, some key proteins in the regulation of cell cycle arise as important targets for therapy. In this concept, cyclin-dependent kinases (CDKs) have been greatly studied. Constant activation of CDKs is known to be responsible for abnormal cell growth. This suggests that CDK inhibitors (CDKIs) like purvalanol and roscovitine (CYC202, seliciclib), which inhibit their specific CDK targets, would make reasonable agents to be investigated. Already, it has been shown that these agents have apoptotic effects and are important for blocking abnormal division of cancer cells.

Autophagy is a kind of recycling process in which cytoplasmic components, such as organelles and protein aggregates, are degraded to yield small molecules, like amino acids and fatty acids, which can be reused to synthesize new components. It is not surprising that a mechanism of this kind is useful for a cell to gain homeostasis under stress conditions, like starvation. However, this mechanism has also been shown to act as another death mechanism, in addition to apoptosis. Making interpretations on the role of autophagy in cancer have been somewhat difficult.

Atg5 is a protein that has an important role in autophagosome formation, for which it has been accepted as a necessary part of the system. In this study, the effects of Atg5 on the mouse embryonic fibroblast (MEF) cells treated with purvalanol and



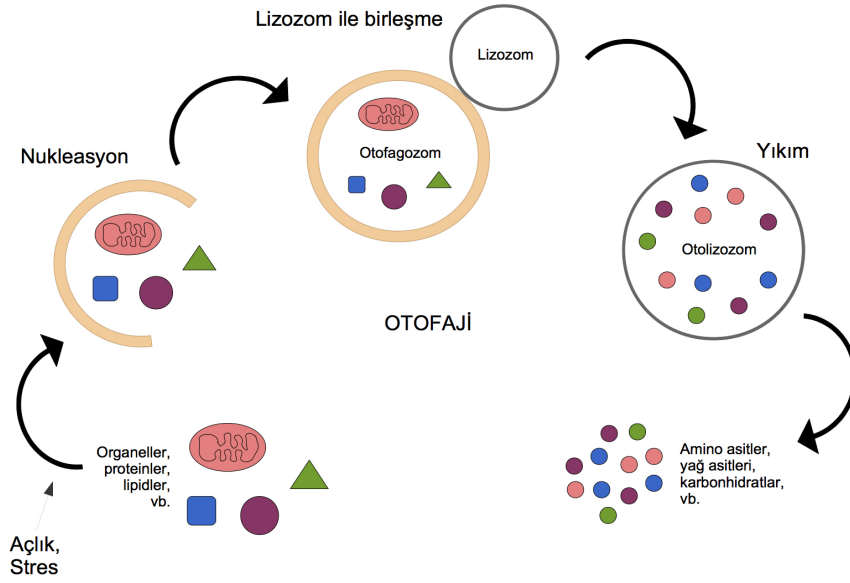
roscovitine, regarding autophagy and apoptosis, were investigated. Upon drug treatments, the markers for autophagy and apoptosis along with proteins in mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, which are strongly correlated to autophagy, were investigated in both wild type (wt) and Atg5 knockout (Atg5<sup>-/-</sup>) MEF cells.

As a result, it has been observed that apoptosis is induced in wt and Atg5<sup>-/-</sup> MEF cells both by purvalanol and roscovitine. Our findings also suggested that autophagy is induced in both wild type and Atg5 knockout MEF cells, indicating an Atg5-independent non-canonical pathway. These pathways have also been mentioned in some previous studies. Still, the experiments have demonstrated a higher survival rate for wild type MEF cells. There are also studies in which the apoptotic effects of Atg5 protein were mentioned. Thus, it is important to shed light on the many roles of Atg5 to understand the cell's decision on survival or death.

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. OTOFAJİ

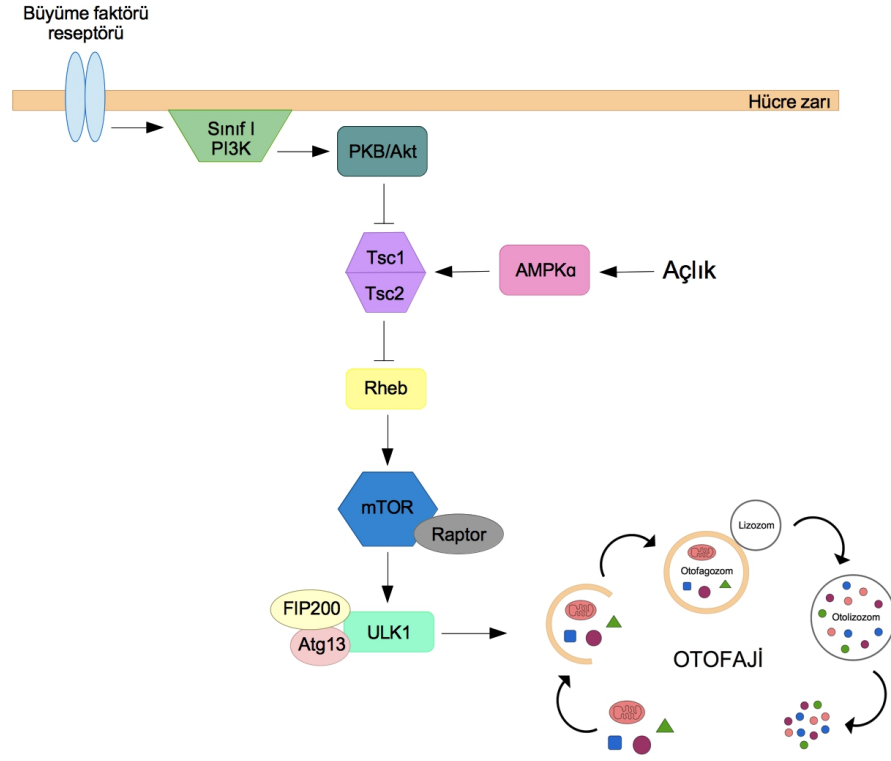
Otofaji, hücredeki büyük moleküllerin ve organellerin lizozom aracılığıyla yıkımının gerçekleştiği katabolik bir süreçtir [1]. Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç tip otofaji vardır. Bunlardan mikrotofaji, lizozom membranının içe doğru çökerek kargonun içeri alınmasıyla; şaperon aracılı otofaji ise kargonun doğrudan lizozom içerisine translokasyonu ile gerçekleşir [2]. Makrotofajide (otofaji veya tip II programlı hücre ölümü), çift katlı bir zara sahip olan otofagozom adlı yapıların oluşmasıyla geri dönüşüme uğrayacak olan kargo çevrelenir, daha sonra bu yapılar lizozom ile birleşerek kargonun yıkımını gerçekleştiren otolizozom adlı yapıları oluşturur (Şekil 1.1.1). Yıkım sonucunda ortaya çıkan küçük moleküller, yeniden kullanılmak üzere hücreye geri kazandırılır. Genel olarak otofaji, hücrelerde açlık ve stres koşullarında homeostasinin sağlanması ve hücre sağkalımı adına çok önemli bir mekanizmadır. Ancak aşırı stres durumunda bu mekanizmanın hücre ölümüne de yol açabildiği bilinmektedir [3]. Otofajik hücre ölümünde otofagozom ve otolizozomlar çok sayıdadır ve bu mekanizma, ölen hücrelerin fagositoz aracılığıyla değil de kendi lizozomal enzimleri tarafından parçalanmaları bakımından apoptotik hücre ölümünden ayrılır [4].



**Şekil 1.1.1: Otofagozomun oluşumu [44].**

Besin ve büyüme sinyallerinin algılanması ve bunun üzerine hücre bölünmesi ve otofajinin düzenlenmesinde en önemli molekül memeli rapamisin hedefidir (mTOR) [3,5]. mTOR, protein sentezi ve otofajiyi düzenleyerek hücre büyümesini kontrol eder. Zengin besin koşullarında fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt (PI3K/Akt) sinyal yolağı üzerinden aktive olan mTOR kinazı, kendi hedeflerinin fosforilasyonunu sağlayarak ribozomal proteinlerin ifadesinde ve protein sentezinin artmasında rol oynar. Akt hem Raptorun ana otofaji düzenleyicisi olan mTOR kompleks 1 (mTORC1) kompleksinden ayrılmasına neden olarak hem de mTORC1'in önemli bir negatif regülatörü olan tuberoskleroz kompleks 1/2'yi (Tsc1/2) inhibe ederek mTORC1 aktivitesini destekler (Şekil 1.1.2).

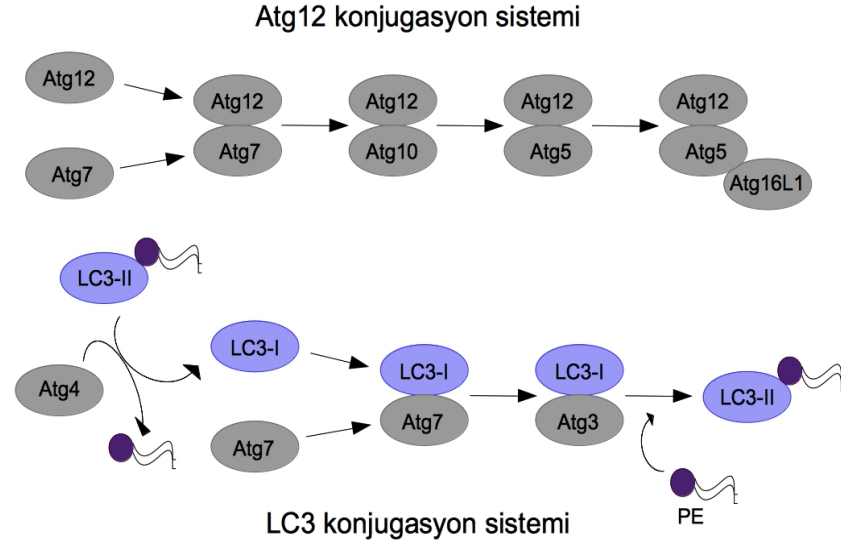
Otofajinin düzenlenmesinde Unc51 benzeri kinaz-1 (ULK-1) proteininin önemli bir rolü bulunur [4,5]. Bu protein, Atg13 ve fokal adezyon kinaz etkileşimli 200 kDa protein (FIP200) ile kompleks oluşturarak otofagozomlara yönlendirilir ve burada diğer Atg proteinlerinin toplanması için öncül otofagozomal yapıları oluşturur. Besin bakımından zengin koşullarda mTORC1 tarafından hiperfosforilasyonu gerçekleşen Atg13 veya Ser757 fosforilasyonu gerçekleşen ULK-1 birbirine bağlanamaz ve bu şekilde otofaji baskılanır [2].



**Şekil 1.1.2: Otofajinin gerçekleşmesinde rol oynayan mekanizmalar [45].**

Yetersiz besin koşullarında adenosin monofosfat-aktive kinaz (AMPK), Tsc1/Tsc2'nin, mTOR aktivitesi için gerekli bir guanozin trifosfat (GTPaz) olan beyinde zenginleştirilmiş Ras-homologu (Rheb) baskılamasına yol açar [5]. Büyüme sinyallerinin azalması ile Akt da Tsc1/Tsc2 üzerinden mTOR'un baskılanmasına neden olur. Azalan mTOR aktivitesine bağlı olarak otofaji gerçekleşir ve protein sentezi büyük ölçüde düşerken otofajiden elde edilen enerji ile yalnızca hücre sağkalımı için gerekli olan proteinlerin sentezine olanak sağlanır.

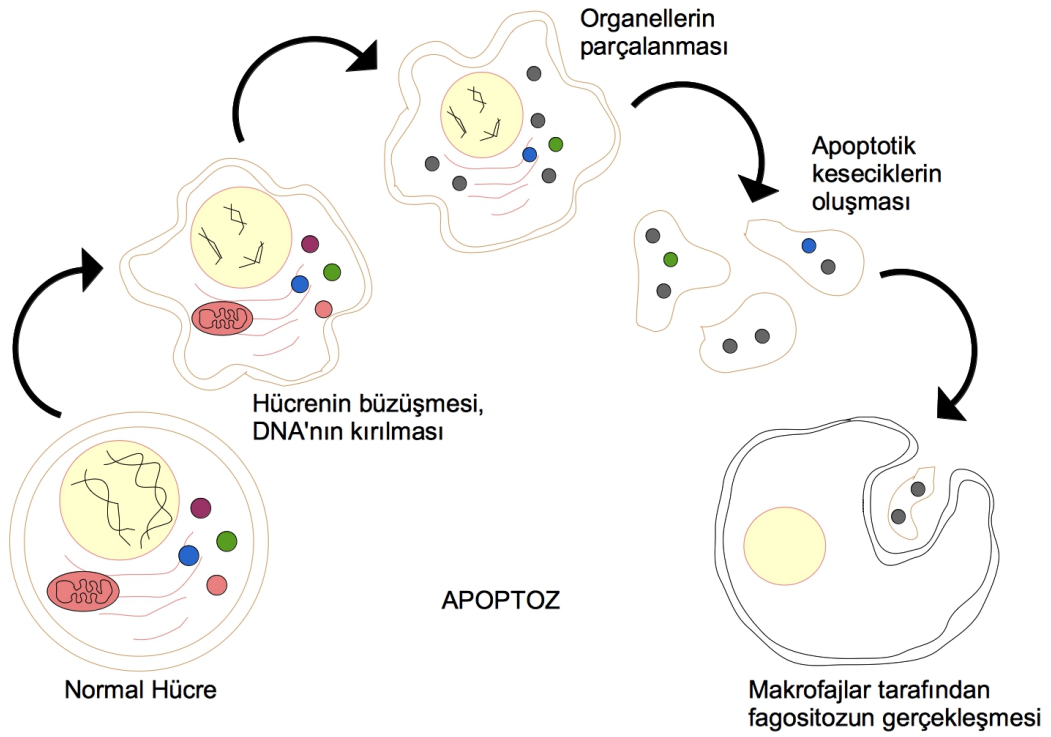
Nukleasyonun başlaması için otofaji ilişkili proteinlerin (Atg) aktivitesi gereklidir [2,5]. Bunlardan bazıları içinde Beklin-1'in de bulunduğu Sınıf III PI3K kompleksini aktive eder. Bu kompleks Atg5-Atg12 kompleksinin, Atg16'nın ve mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir 3 (LC3) proteini ile fosfatidilserin (PE) molekülünden oluşan kompleksin öncül otofagozomal yapıya yönlendirilmesi için gereklidir. Atg5-Atg12 ile LC3-PE konjugasyonları ise Atg3, Atg4, Atg7 ve Atg10 proteinleri tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.1.3). Otofagozomun tamamlanmasıyla bu yapı lizozomlarla birleşir ve içerideki hidrolazlar sayesinde makromoleküller yıkılır.



*Şekil 1.1.3: Atg12 ve LC3 konjugasyon sistemleri [46]. PE: fosfatidiletanolamin.*

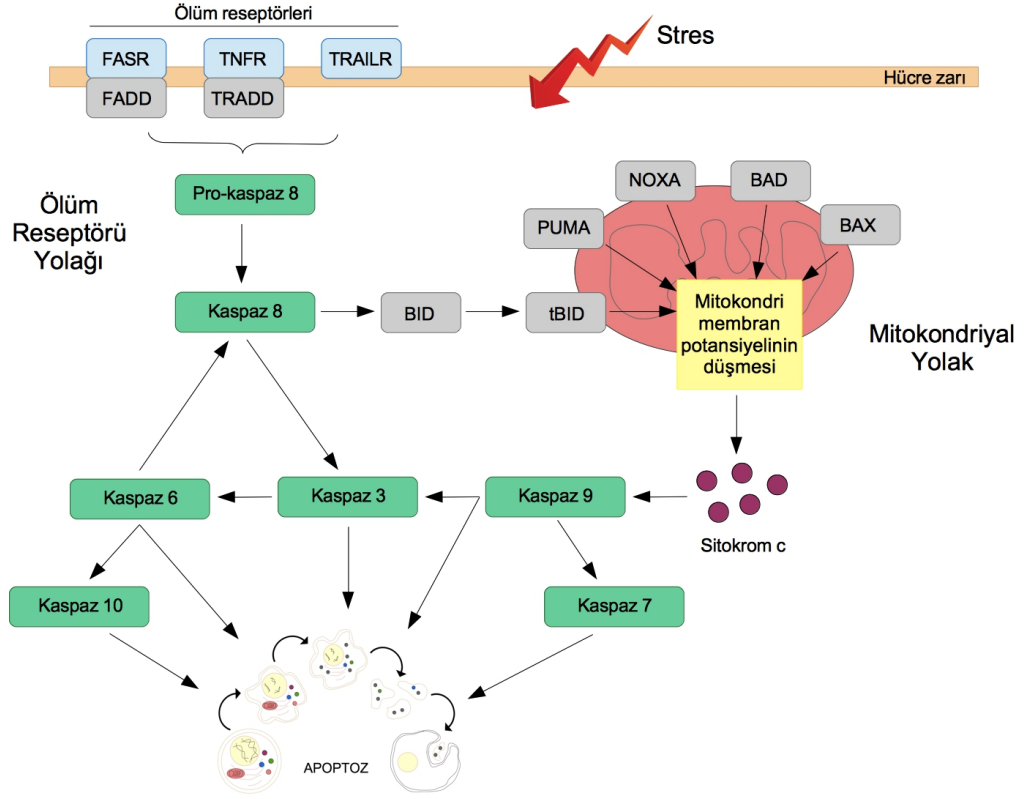
## 1.2. APOPTOZ

Tip I programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz ilk olarak 1972 yılında tanımlanmıştır ve hücrenin büzüşmesi, çekirdek kondensasyonu, DNA kırılması, apoptotik kesecikler adı verilen vesikülerin oluşumu ve hücre adezyonunun yitilmesi gibi belirli morfolojik ve biyokimyasal değişimler ile karakterize bir ölüm mekanizmasıdır (Şekil 1.2.1) [3,6].



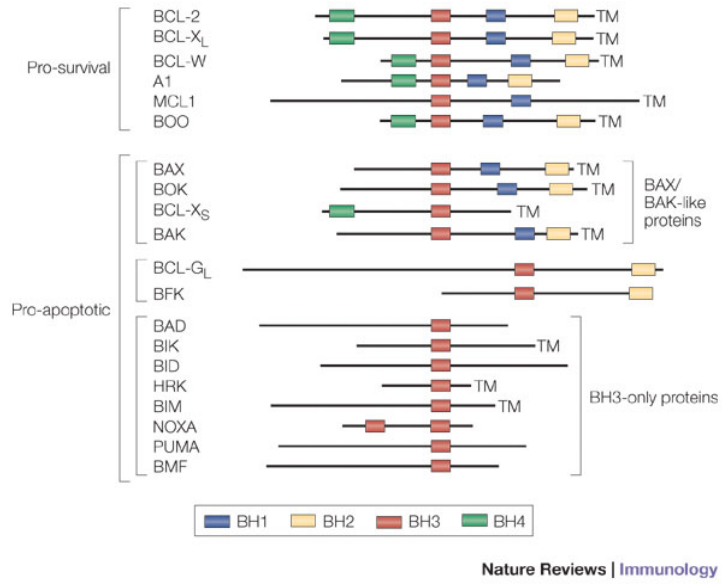
**Şekil 1.2.1: Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişimler.**

Hücrede DNA hasarı tamir edilemez boyutta olduğu zaman ana ölüm mekanizması olarak apoptoz görev yapar. Dışsal yolak (ölüm reseptörü yolağı) ve içsel yolak (mitokondriyal yolak) olmak üzere iki ana apoptoz sinyal yolağı gösterilmektedir (Şekil 1.2.2) [3]. Dışsal yolak hücre zarındaki Fas ve benzeri ölüm reseptörlerinin ilgili ligandlarına bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Ölüm sinyalinin meydana gelmesiyle Fas-ilişkili ölüm bölgesi (FADD) gibi adaptör proteinler ve pro-kaspaz 8 proteinleri reseptör-ligand kompleksine toplanır ve burada moleküller ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Söz konusu kompleks içindeki pro-kaspaz 8 kesilime uğrayarak aktif kaspaz 8'e dönüşür ve pro-kaspaz 3'ü keserek apoptoz sürecinin başlamasında çok önemli olan kaspaz 3 proteinini meydana getirir. Apoptozun tetiklenmesi hangi yoldan başlarsa başlasın mitokondri dış zarı, iç kısımda bulunan sitokrom c için geçirgen hale gelir ve bu moleküllerin sitozole salınımı gerçekleşir. Burada sitokrom c apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve pro-kaspaz 9 moleküllerini toplayarak dışsal yolaktakine benzer şekilde kaspaz kaskadının başlamasına neden olur. Apoptoz ile ilişkili düzenleyici proteinlerin olağandışı ifadesinin kansere neden olabildiği bilinmektedir.



**Şekil 1.2.2: Apoptozun içsel ve dışsal yolları [47].**

B-hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi apoptozun düzenlenmesinde kilit bir rol oynar [3]. Anti-apoptotik grubu Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, Mcl-1 gibi üyelerden oluşur. Pro-apoptotik üyeler arasında ise Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, Bim gibi proteinler bulunur. Ölüm sinyalinin meydana gelmesiyle post-translasyonel modifikasyon geçiren pro-apoptotik proteinler mitokondriye gider ve burada Bax ve Bak aracılığıyla aktivite gösterirler. Böylece içsel yolak tetiklenmiş olur. Anti-apoptotik Bcl-2 protein ifadesi birçok kanser hücrelerinde çok yüksektir. Bu durum kemoterapi ve radyoterapinin etkilerini önemli ölçüde indirmektedir [3].



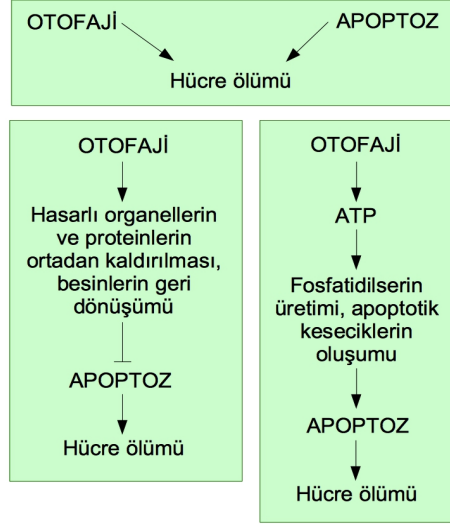
**Şekil 1.2.3: Bcl-2 ailesi proteinlerinin Bcl-2 homoloji bölgeleri [48].**

### 1.3. OTOFAJİ VE APOPTOZUN HÜCRE SAĞKALIM VE ÖLÜM KARARLARINDAKİ ETKİLEŞİMİ

Otofaji ve apoptoz arasındaki etkileşim üç farklı şekilde olabilir (Şekil 1.3.1). Bazı durumlarda bu iki mekanizma hücre ölümünün gerçekleşmesi için kooperatif olarak çalışır. Böyle bir ilişki söz konusu olduğunda mekanizmalardan herhangi biri çalışmazsa diğeri onun yerine görev yapabilir. Ya iki mekanizma da aynı anda çalışırken birinin diğerdinden daha baskın olması söz konusudur, ya da birinin çalışabilmesi için diğerdinin çalışamaz hale gelmesi gereklidir. Her iki durumda da hem apoptoz hem de otofaji hücre ölümünü sağlamaktadır [7,8].

Otofaji, apoptotik hücre ölümü için antagonist görevi yaparak hücre sağkalımına katkıda bulunabilmektedir [7]. Hücreye geri dönüşüm ile besin sağlayarak, katlanmamış proteinleri parçalayıp ER stresini azaltarak ve bunun gibi yollarla apoptotik hücre ölümünü baskılar.





**Şekil 1.3.1: Otofaji ve apoptozun hücre sağkalım ve ölüm kararlarındaki etkileşimi.**

Otofaji kendi başına bir ölüm mekanizması olarak çalışmadığı halde bazı morfolojik değişimlerin gerçekleşmesine olanak tanıyarak apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunabilir [7]. Örneğin apoptotik cisimciklerin oluşması ATP gerektiren bir süreçtir. Otofaji aracılığıyla sağlanan ATP bu morfolojik değişimin gerçekleşmesi için kullanılır. Ayrıca ölen hücrelerin çevredeki fagositler tarafından parçalanması için fosfatidilserin üretilerek gerekli sinyaller sağlanmalıdır ki bu süreçte de otofajinin hücreye sağladığı ATP kullanılır.

Otofaji ve apoptoz arasında moleküler bağlantılar da bulunmaktadır. Örneğin sıklıkla otofaji ile birlikte sözü geçen mTOR sinyal mekanizmasında görevli olan birçok molekül aynı zamanda apoptozun düzenlenmesi ile ilişkilidir. Yine otofaji proteinlerinden olan Atg5 ile anti-apoptotik Bcl-2 gibi bazı proteinler hem otofaji hem de apoptozun düzenlenmesinde görev almaktadır [7].

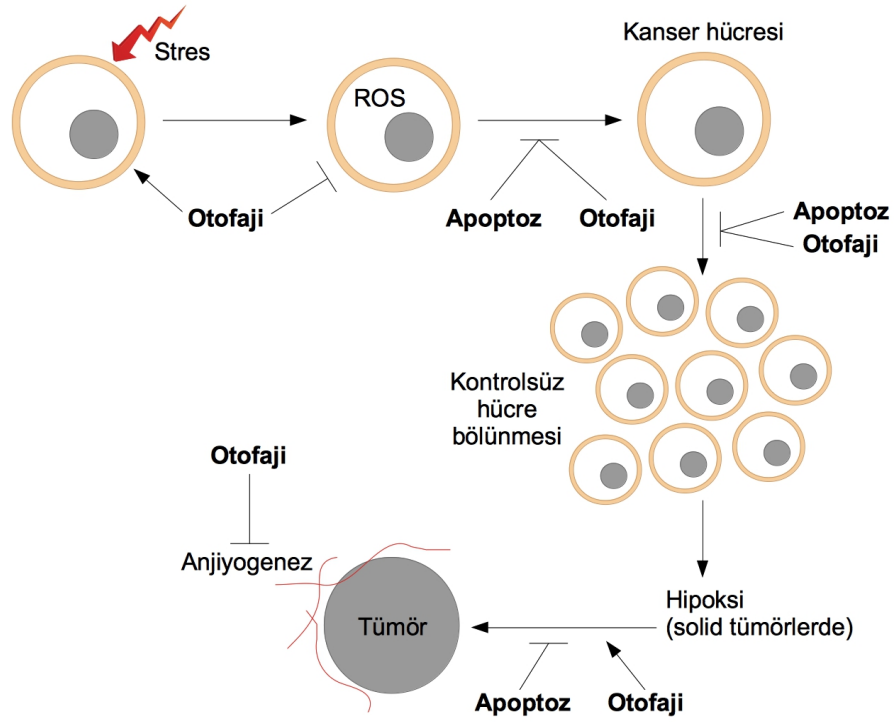
#### 1.4. OTOFAJİ VE KANSER

Otofajinin kanser hücrelerinde hem sağkalım hem de ölüme sebep olabildiği bilinmektedir. Besinin az olması durumunda geri dönüşümü sağlanan moleküller sayesinde hücrenin ihtiyaç duyduğu minimum enerji sağlanabilmekte ve bu şekilde hücre sağkalımı desteklenmektedir. Dolayısıyla kanserin erken aşamalarında otofaji, glikoliz ile elde edilen enerjiye destek sağlayarak hücrelerin korunmasına neden olabilir. Öte yandan otofajinin gerçekleşmediği durumda hasar görmüş mitokondrilerin birikmesi sebebiyle hücrelerde oksidatif stres meydana gelebilir ve bunun sonucunda DNA'nın da hasar görmesiyle genetik instabilite oluşur, böylece tümör hücreleri meydana gelebilir. Bu bağlamda otofaji tümör baskılanması için de önemlidir.

Kanserde otofaji ve apoptoz bazen sinerjistik bir etki yaratırken bazı durumlarda otofaji ancak apoptozun baskılanmasıyla ortaya çıkabilmektedir ki bu durum kanserin evresine, hücrenin çevresel koşullarına ve uygulanan terapötik stratejiye bağlıdır. İlk bakışta kanser için avantajlı bir mekanizma olarak görülmesine karşın birçok kanserde otofaji baskılanmış durumdadır ve hücreler daha farklı mekanizmalardan faydalanmaktadır. Ancak otofajinin baskılanmamış olduğu kanser hücre tiplerinde bu mekanizmayı baskılamak kemoterapi ve radyoterapinin etkilerini de arttırabilen bir stratejidir. [2, 3].

Kanserde terapötik strateji belirlenirken kanserin evresi mutlaka dikkate alınmalıdır. Örneğin hücreler mutajene maruz kaldığında, mitokondriler hasar alıp reaktif oksijen türevi (ROS) miktarı arttığında, DNA hasarı meydana geldiğinde, otofaji bu hasarlarla başa çıkılması için önemlidir. Dolayısıyla kansere neden olabilecek hasarların olduğu ilk evrede otofajinin baskılanması tümör oluşumunu hızlandırmak anlamına gelecektir. Daha ileri evrelerde, hücredeki hasarın kontrol edilemeyecek kadar artması durumunda hücre ölümü tetiklenebilir. Burada hem apoptoz hem de otofaji birer ölüm mekanizması olarak önemlidir ve herhangi birinin baskılanması yine tümör oluşumunun hızlanmasına sebep olabilir. Solid tümör oluşumu durumunda dokunun merkezinde hipoksi ve besin yetersizliği ortaya çıkar. Bu durumda apoptozun tetiklenmesi beklenebilir; ancak bu noktada apoptoz

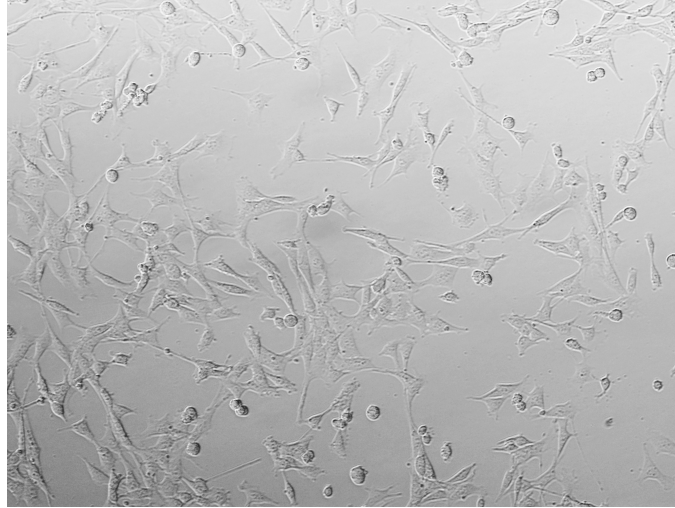
mekanizması sekteye uğramış olan hücrelerin seçilimi söz konusudur. Otofajinin böyle bir koşulda hücrelere sağlayacağı besinlerin sağkalımı destekleyeceği düşünülebilir. Ancak otofaji aynı zamanda daha büyük hasarların meydana gelmesine ve daha agresif tümörlerin oluşumunu baskılar [9]. Ayrıca hep apoptoz hem de otofajiden yoksun kalan hücrelerde nekrotik hücre ölümü görülür ve bu da daha agresif kanser oluşumu ile ilişkili olan inflamasyonu meydana getirir. Bu durum besin ve oksijen ihtiyacını karşılayan anjiyogeneze önyak olur. Ancak otofaji, antianjiyogenik bir etki gösterir [10,11]. Kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptörleri otofaji ile seçici olarak yıkılabilmektedir [12]. Dolayısıyla otofaji, uzun vadede tümör gelişimine ket vurabilmektedir (Şekil 1.4.1) [7].



**Şekil 1.4.1: Otofaji ve apoptozun kanserin farklı evrelerindeki etkileri [49].**

## 1.5. FARE EMBRYONİK FİBROBLAST HÜCRELERİ

Genetik olarak tasarlanmış fare modelleri hem *in vivo* çalışmalarda hem de *in vitro* çalışmalar için hücre hatlarının oluşturulmasında kullanılabilir. Nakavt ve transgenik fare modellerinden elde edilen fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri (Şekil 1.5.1) ilaç hedef ve mekanizmalarının belirlenmesi için uygun bir sistem oluşturur. İstenilen mutasyona sahip embriyolardan elde edilen bu hücrelerin kullanılmasında bir avantaj, söz konusu mutasyon embriyonik dönemde ölümcül olsa bile elde edilen hücrelerin araştırmalarda kullanılabilmesidir. Böylece fare modeli oluşturulamayan bu gibi ölümcül modifikasyonlar üzerine çalışmalar yürütülebilmektedir. Ayrıca bu hücreler daha sonra farelere nakledilerek *in vivo* çalışmalar için kullanılabilir [13].



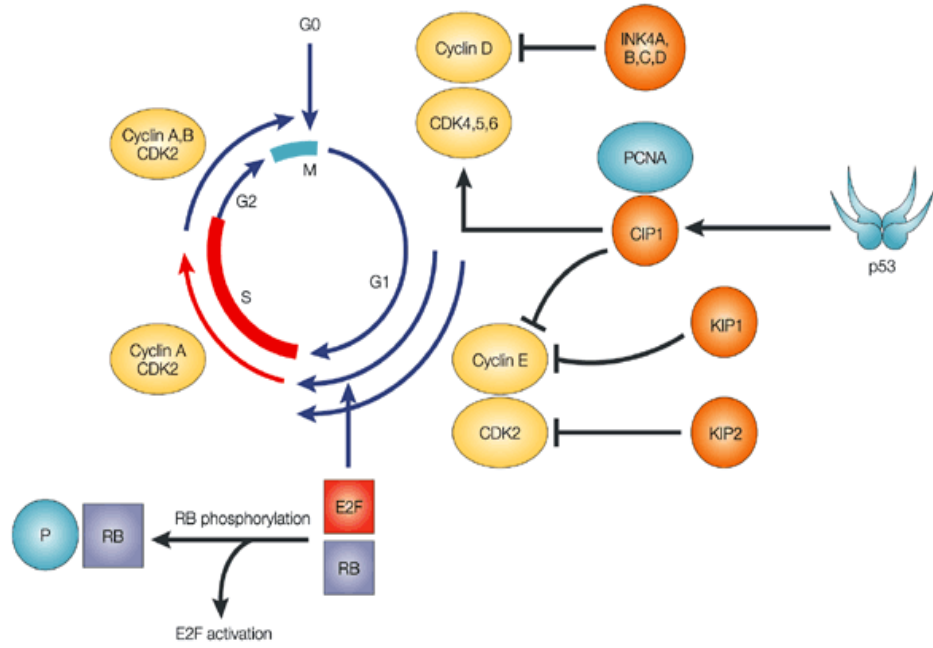
**Şekil 1.5.1: Fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri.**  
Büyütme: 10X.

## 1.6. SİKLİNE BAĞIMLI KİNAZLAR

Sikline bağımlı kinazlar (CDK) hücre döngüsündeki önemli düzenleyicilerdendir (Şekil 1.6.1). Bu moleküller ancak siklin gibi proteinlerle etkileşim halindeyken serin/treonin kinaz aktivitesi gösterirler. Oluşturdukları kompleks CDK aktifleştirici kinaz (CAK) tarafından fosforile edilerek görev yaparken CDK inhibitörleri (CDKi) tarafından da baskılanır. Söz konusu moleküllerden herhangi biri işlevini kontrollü

olarak gerçekleştiremediği takdirde hücre döngüsünde meydana gelen aksaklıklar tümör oluşumu ile yakından ilgilidir. Bu nedenle kanser tedavisinde CDK'lerin baskılanması önemli bir stratejidir. Bu bağlamda birçok CDKi türevi kanser araştırmalarında test edilmektedir [14].

Hücre döngüsünün farklı evrelerinde farklı CDK'ler görev alır. CDK4, 5, ve 6 hücre döngüsünün G1 fazında işlev görürken CDK2 S fazında ve CDK1'in yanında M fazında çalışır. Kanserde farklı fazlarda, söz konusu fazla ilişkili CDK'lerden kaynaklı bir mekanizma bozukluğu sıklıkla bir problem olarak ortaya çıkmaktadır.



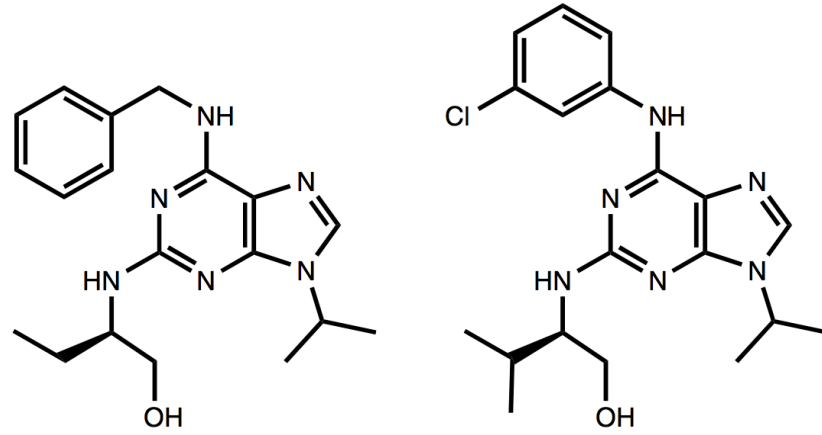
Nature Reviews | Drug Discovery

**Şekil 1.6.1: Hücre döngüsünde CDK kompleksleri [50].**

## 1.7. PURVALANOL VE ROSKOVİTİN

Kanser tedavisinde CDK'lerin hedeflenmesi farklı şekillerde olabilmektedir. Aktivitelerini sağlayan siklin moleküllerinin hedeflenmesi kadar, katalitik aktivitelerinin doğrudan baskılanması da bir stratejidir. CDKi türevleri, CDK'lerin ATP bağlanma bölgesine yarışçıl olarak bağlanır ve böylece aktivitelerini engeller.

Olomisin türevi birer purin analogu olan purvalanol ve roskovitin (CYC202, seliciclib) (Şekil 1.7.1), ATP bağlanma bölgelerine yarışçıl olarak bağlandıkları CDK'leri baskılayarak kanser hücrelerinde bölünmeyi durdurabildikleri ve apoptotik hücre ölümüne neden olabildikleri bilinmektedir [14,15]. Purvalanol seçici olarak CDK1 ve 2'yi baskılayan ROSKOVITIN özellikle CDK1, 2 ve 5 üzerinde etkilidir [16,17]. Her iki CDKi türevinin de geliştirilen ilk purin analoglarından olan olomisine kıyasla daha seçici ve düşük dozlarda çok daha etkili oldukları belirlenmiştir.



*Şekil 1.7.1: Purvalanol (sağ) ve roskovitin (sol) yapıları [51].*

## 1.8. AMAÇ

Çalışmanın amacı birer CDKi türevi olan purvalanol ve roskovitin önemli bir otofaji proteini olan Atg5'in hücrelerde bulunmaması durumundaki terapötik etkilerinin incelenmesi olup tez kapsamında söz konusu ajanların doğal tip (dt) ve Atg5 ifadesinden yoksun (Atg5<sup>-/-</sup>) MEF hücrelerinde oluşturduğu otofajik ve apoptotik cevaplar irdelenmiştir.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **2.1. MATERYALLER**

#### **2.1.1. Cihazlar**

Kullanılan cihazlar Ek A bölümünde yer almaktadır.

#### **2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları**

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler Ek B bölümünde yer almaktadır.

#### **2.1.3. Kimyasal Maddeler**

Kullanılan kimyasallar Ek C bölümünde yer almaktadır.

#### **2.1.4. Çözeltiler**

Kullanılan çözeltiler ve içerikleri Ek D bölümünde yer almaktadır.

#### **2.1.5. Antikorlar**

Çalışmada kullanılan antikorlar Ek E bölümünde yer almaktadır

## **2.2. YÖNTEMLER**

### **2.2.1. Hücre Kültürü**

Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücreleri Mizushima grubu, Japonya'dan alınmıştır. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS), 1% penisilin/streptomisin ve 55 µM 2-merkaptoetanol içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyerinde (DMEM), %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik nemli etüvde büyütülmüştür. Hücreler yoğunlaştığında eski besiyeri atılarak 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra %0,25'lik tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37°C'de iki dakika bekletilmiştir. Eşit miktarda besiyeri

kullanılarak enzim inaktivasyonu sağlandıktan sonra hücreler 2000 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml besiyerinde çözüldükten sonra hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve ana stok hücreleri ile yapılacak deneyler doğrultusunda gerekli olan hücrelerin uygun petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.2. Hücrelerin Dondurulması**

Petri yüzeyine tutunmuş halde bulunan hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Kullanılan tripsin-EDTA ile eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim aktivitesi inhibe edilmiş ve 15 ml'lik tüp içerisinde toplanan hücreler 2000 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml PBS içerisinde çözümlenerek hücre sayımı yapılmıştır. Yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre üzerine 1 ml dondurma medyası eklenerek hücreler kriyo tüplerine aktarılmış ve sıvı azot tankında saklanmıştır.

### **2.2.3. Hücrelerin Çözülmesi**

Hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra hızlı bir şekilde çözülerek dondurma medyası üzerine besiyeri eklenmiştir. Hücreler 2000 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiş ve medya atılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde çözülerek 25 veya 75 cm<sup>2</sup>'lik petrilere ekilmiştir.

### **2.2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücreleri  $1 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrasında hücrelere 10 mM stoktan uygun miktarlarda kullanılarak son konsantrasyon 0-50  $\mu$ M aralığında olacak şekilde purvalanol ve roskovitin uygulanmıştır. 24 saat boyunca ilaçlı besiyerinde inkübe edildikten sonra hücrelere 10  $\mu$ l MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ajanı uygulanmıştır. 4 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri atılarak oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için her kuyucuğa 100  $\mu$ l dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş ve mikropilaya okuyucusu kullanılarak ikili dalga boyunda (570 ve 655 nm'de) absorban ölçümü yapılmıştır.



### **2.2.5. Hücre Sağkalım Analizi**

Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücreleri 50x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrasında hücrelere canlılık analizi ile belirlenen dozlarda purvalanol (20 µM) ve roskovitin (30 µM) uygulanmıştır. Her hücre tipi için 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamaları tamamlandıktan sonra hücreler %0,25'lik tripsin-EDTA ile kaldırılarak 2000 rpm'de beş dakika santrifüj edilmiştir. Her bir hücre pelleti 500 µl PBS ile çözülerek 50 µl Tripkan mavisi eklendikten sonra canlı ve ölü hücrelerin sayımları yapılmıştır.

### **2.2.6. Akış Sitometrisi ile Annexin V-PI Boyama Analizi**

Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> hücreleri her kuyucukta 3x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik nemli etüvde bir gece boyunca hücrelerin petri yüzeyine tutunması beklendikten sonra belirlenen dozlarda ilaç uygulamaları yapılmıştır. 24 saatlik ilaç uygulamalarından sonra hücreler %0,25'lik tripsin-EDTA ile kaldırılarak tüplere toplanmış ve 300 µl PBS ile bir kez yıkanmıştır. BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II protokolüne göre hücreler Binding Buffer ile çözülerek içerisine 1'er µl Annexin V ve PI boya eklenmiş ve örnekler 15 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Daha sonra hücreler BD Accuri™ C6 Flow Cytometer ile okutulmuş ve cihazın yazılımı yardımıyla sonuçlar analiz edilmiştir.

### **2.2.7. Total Protein İzolasyonu**

Her 100 mm'lik petride 1,5x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler petri yüzeyine tutunduktan sonra her ilaç için belirlenen dozlarda uygulama yapılarak deney için gerekli sürelerle hücreler inkübe edilmiştir. Soğuk 1X PBS ve kazıyıcılar yardımıyla hücreler tüplere toplanarak +4°C ve 13.200 rpm'de iki dakika santrifüj edilmiş ve sıvı faz atılmıştır. Petrideki tüm hücreler toplanana kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Daha sonra hücre pelleti bir hücre miktar özütleme tamponu (CLB) ile homojenize edilerek oda sıcaklığındaki bir çalkalayıcıda 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak hücre özütleri +4°C ve 13.200 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilerek çözünmüş proteinleri içeren sıvı üst faz yeni tüplere aktarılmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.2.8. Protein Miktarının Bradford Analizi ile Belirlenmesi**

Bradford yönteminde proteinler G250 formundaki Coomassie parlak mavi boyasına bağlanarak kullanım öncesindeki kırmızı halinin yerine boyanın mavi halini stabilize eder. Söz konusu proteine bağlı formundayken boya 595 nm dalgaboyunda en yüksek absorbands değerini verir. Protein miktarları belirlenirken bu absorbands değerleri baz alınarak işlemler gerçekleştirilir. Öncelikle konsantrasyonu bilinen bir protein çözeltisi olarak 1,5 mg/ml sığır serum albumin (BSA) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözülden 1,5-7,5 µg (1-5 µl) aralığında örnekler alınarak 96 kuyucuklu petriye aktarılmıştır. Protein miktarı belirlenecek olan her bir örnekten de birer µl alınarak kuyucuklara aktarıldıktan sonra her kuyucuğa 200 µl Bradford çözeltisi eklenmiştir. Petri beş dakika boyunca karanlık ortamda bekletilerek proteinler ile boyanın bağlanması beklendikten sonra mikropilaya okuyucu kullanılarak 595 nm'deki absorbands verileri elde edilmiştir. Öncelikle farklı miktarlardaki BSA örneklerinden elde edilen absorbands değerleri ve bunların konsantrasyon bilgileri ile bir standart oluşturulmuş ve buradaki denklem kullanılarak absorbands değeri bilinen total protein örneklerinin konsantrasyonları tayin edilmiştir.

### **2.2.9. Protein Örneklerinin Hazırlanması**

Bradford yöntemi ile belirlenen konsantrasyon verilerine dayanarak her bir protein örneğinin eşit miktarda protein içermesi için gereken hacimlerde örnek alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır. Her tüpün içerisine toplam hacmi 1:5 oranında olacak şekilde 5X Laemmlı tamponu eklenerek örnekler beş dakika boyunca 95°C'de denatüre edilmiş ve hemen ardından buza alınmıştır.

### **2.2.10. SDS-PAGE**

Tabloda belirtilen malzemeler ile hazırlanan poliakrilamid jel tank içerisine yerleştirilmiş ve tankın içi soğuk 1X yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Hazırlanan protein örnekleri jel kuyucuklarına yüklenmiş ve örnekler 85 V sabit gerilim ile yürütülmüştür.

### **2.2.11. Proteinlerin Membran Üzerine Transferi ve Membran Bloklama**

Poliviniliden florid (PVDF) membran kullanım öncesinde metanol içerisinde aktifleştirilmiş ve SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinleri içeren poliakrilamid jel membran üzerine yerleştirilmiştir. Transfer cihazında yeterli süre ile sabit 2,5 mA akım uygulanarak proteinlerin jelden membrana geçişi sağlanmıştır. Daha sonra membran %5 süt çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında bulunan çalkalayıcı üzerinde bir saat süreyle inkübe edilerek membran bloklanmıştır.

### **2.2.12. Antikor Bağlanması ve Membranların Görüntülenmesi**

Bloklanan membran %5 süt çözeltisi kullanılarak 1:1000 dilüsyonunda hazırlanan birincil antikor içerisine alınmış ve +4°C'deki yatay döndürücülerde bir gece boyunca inkübasyon yapılmıştır. Ertesi gün membran her seferinde 15 dakika sürecek şekilde üç kez 1X TBS-Tween ile yıkanmıştır. Daha sonra membran %5 süt çözeltisi kullanılarak 1:2000 dilüsyonunda hazırlanan ikincil antikor içerisine alınmış ve +4°C'deki yatay döndürücülerde bir gece boyunca inkübasyon yapılmıştır. Ertesi gün membran her seferinde 15 dakika sürecek şekilde iki kez 1X tris tamponlu tuz-Tween (TBS-T) ile, bir kez de 1X TBS ile yıkanmıştır. Bu sırada kemilüminesans A ve B çözeltileri hazırlanmış ve yıkamalar bittikten sonra bunlar karıştırılarak membran karanlık ortamda bir dakika boyunca elde edilen karışım ile inkübe edilmiştir. Ardından membran Bio-Rad ChemiDoc™ görüntüleme sistemine yerleştirilmiş ve sonuçlar gözlenmiştir.

### **2.2.13. Ko-İmmunopresipitasyon**

Proteinlerin elde edilmesi için total protein izolasyonu protokolü uygulanmıştır. Protein miktarlarının tayinini takiben her protein örneğinden 750 µg alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Her bir tüpe hedef proteine bağlanacak olan birincil antikor 1:100 dilüsyon faktörü ile eklenmiş ve örnekler +4°C'deki bir çalkalayıcıda bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Her örnek için birer tüpe 30 µl manyetik boncuk aktarılarak özütlemeye tamponu ile bir tur yıkama yapılmış ve boncuklar manyetik tutucu yardımıyla sıvı fazdan ayrılmıştır. Protein örnekleri hazırlanan boncuklar ile karıştırılmış ve oda sıcaklığındaki bir çalkalayıcıda 40 dakika boyunca antikor ve

boncukların bağlanmaları sağlanmıştır. Yine manyetik tutucu yardımıyla boncuklar ayrılmış ve sıvı fazlar yeni birer tüp içerisine aktarılmıştır. Boncuklar üç defa özütleme tamponu ile yıkandıktan sonra her örnek 50 µl Laemmlı tamponu ile çözülmüş ve beş dakika boyunca 95°C'de denatüre edilmiştir. Bu süreçte antikorlardan ayrılmış olan boncuklar manyetik tutucu kullanılarak protein örneklerinden ayrılmış ve örnekler yeni birer tüpe aktarılmıştır. Daha sonra bu örneklerdeki hedef protein içerikleri immünoablottama tekniği ile görüntülenmiştir.

#### **2.2.14. İmmunofloresan Yöntemi**

Polilizin kaplı lameller 6 kuyucuklu petrilere yerleştirilerek her birine  $1 \times 10^4$  hücre ekilmiştir. Hücreler petri yüzeyine tutunduktan ve ilaçların belirlenen dozlarının 24 saat uygulanmasından sonra 1X PBS çözeltisi ile bir tur yıkama yapılmıştır. Hücrelerin fiksasyonunu sağlamak üzere her kuyucuğa -20°C'de bekletilmiş %100 metanolden 1'er ml eklenmiş ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra metanol ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler üçer defa PBS/BSA çözeltisi ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa bir ml Blok çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda bir saat inkübasyon yapılmıştır. PBS/BSA çözeltisi ile üç yıkama daha yapıldıktan sonra kuyucuklara birincil antikor çözeltisi eklenmiş ve petrinin üzeri kapağın altında gergin halde yerleştirilmiş nemli filtre kağıtları bulunacak şekilde kapatılarak alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Hücreler +4°C'de çalkalayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler ertesi gün üç defa PBS/BSA ile yıkanmış ve Alexa Fluor® 488 Conjugate ile birlikte DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) uygulanmıştır. Yine nemli filtre kağıtları ve alüminyum folyo ile kapatılan hücreler bir saat boyunca +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiş ve ardından üç defa PBS/BSA çözeltisi ile yıkanmıştır. Hücrelerin floresan mikroskopunda görüntülenmesi için bir lam üzerine bir damla 1X PBS damlatılarak hücrelerin bulunduğu yüzey altta kalacak şekilde lamel hazırlanan lamın üzerine kapatılmıştır. Görüntüleme işlemi tamamlanan lameller yeniden 6 kuyucuklu petrinin içerisine aktararak üzerine 1X PBS eklenmiş ve nemli filtre kağıtları ile alüminyum folyo kullanılarak kapatılmış halde muhafaza edilmiştir.

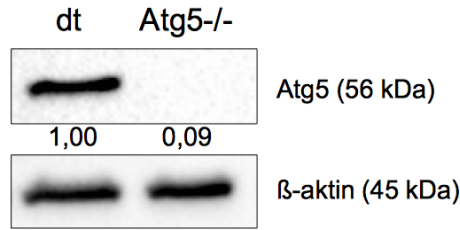
### **2.2.15. İstatistiksel Analizler**

İmmunoblot sonuçlarıyla ilgili kantitatif veriler Image J yazılımı kullanılarak elde edilmiş ve her kondüsyondaki veriler kontrol grubuna oranlanarak verilmiştir. Akış sitometrisi ile incelenen Annexin V-PI boyama sonuçlarının analizi BD Accuri C6 Plus (RRID:SCR\_014422) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. MTT hücre canlılığı testi ve hücre sağkalım analizi ile ilişkili veriler Windows için GraphPad Prism 6 yazılımı (La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) ile grafik halinde düzenlenerek iki yönlü ANOVA testi kullanılmış, anlamlı değişimler için p değeri <0,05 olarak belirlenmiştir.

### 3. SONUÇLAR

#### 3.1. DOĞAL TİP VE ATG5 İFADESİNDEN YOKSUN MEF HÜCRELERİNDE ATG5 PROTEİN SEVİYELERİNİN TAYİN EDİLMESİ

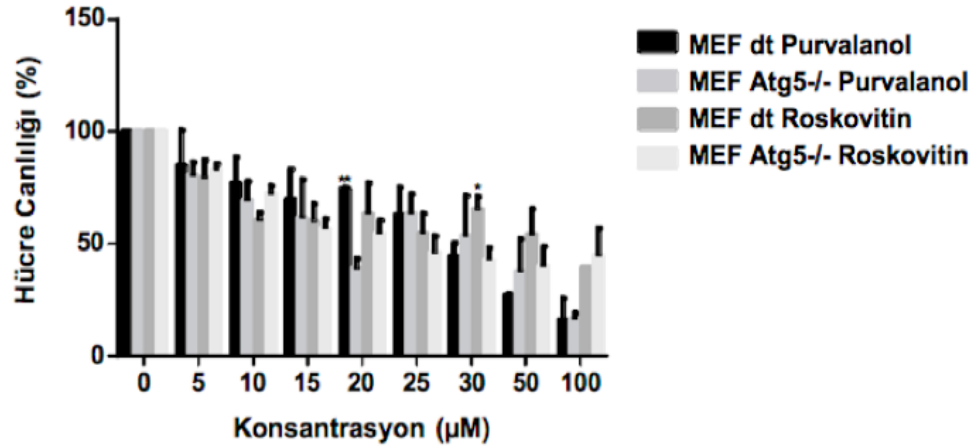
Hücrelerde otofagozom oluşumunun otofaji ilişkili proteinler, yani Atg proteinleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Bölüm 1.1). Bu süreçteki en önemli proteinlerden olan Atg5 ve Atg7'den herhangi birinin hücrede bulunmaması durumunda otofajinin gerçekleşemeyeceği öngörüldüğünden dolayı, kanser ilaçlarının otofaji ile ilişkili olarak meydana getireceği etkilerin irdelendiği bu çalışmada dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinin model olarak kullanılması uygun görülmüştür. Bu sebeple öncelikli olarak Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Atg5 protein seviyesi, immunoblotlama yöntemi kullanılarak dt MEF hücrelerindeki durum ile karşılaştırılmış ve bu hücrelerde Atg5 proteininin bulunmadığı teyit edilmiştir (Şekil 3.1.1).



**Şekil 3.1.1: Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Atg5 protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.** Her hücre hattına ait protein lizatları %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek Atg5 primer antikörünün bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Sonuçlar iki tekrarın ortalamasıdır.

### 3.2. PURVALANOL VE ROSKOVİTİNİN MEF HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN DOZA VE ZAMANA BAĞLI OLARAK GÖSTERİLMESİ

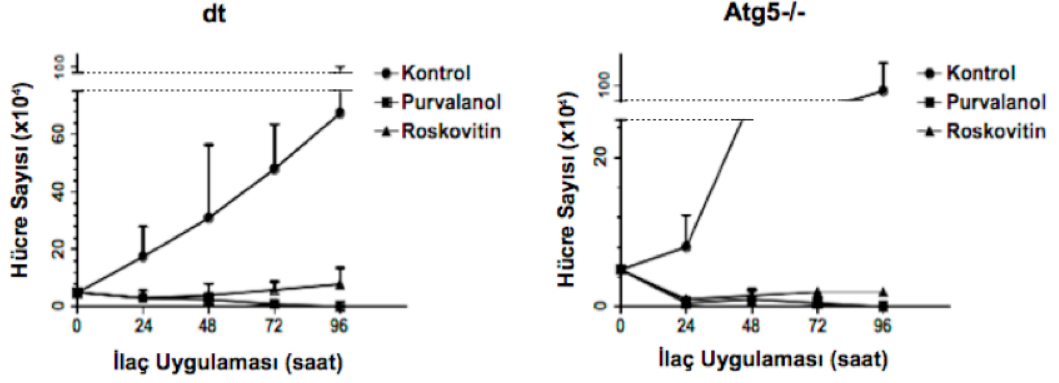
Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücre hatlarında etkileri araştırılmak istenen purvalanol ve roskovitin ilaçlarının 24 saatlik uygulama sonucundaki doza bağlı etkinliğini saptamak amacıyla MTT analizi yapılmıştır. Her iki hücre hattında da ilaç uygulamaları ile beraber bağıl hücre canlılığında azalma olduğu tespit edilmiştir. 24 saat sonunda canlılığın %50 oranında olduğu ilaç dozları purvalanol ve roskovitin için sırasıyla 20 ve 30 µM olarak belirlenmiş ve takip eden çalışmalarda her zaman bu dozlar kullanılmıştır (Şekil 3.2.1).



**Şekil 3.2.1:** Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde purvalanol ve roskovitin bağıl hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkilerinin gösterilmesi. 24 saat boyunca 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 ve 100 µM ilaç uygulanan hücrelere MTT ajanı eklenmiş ve 4 saat sonra oluşan formazan kristalleri DMSO'da çözülerek spektrometrik ölçüm verileri ile GraphPad kullanılarak grafik oluşturulmuştur. Veriler üç deney tekranının ortalamasıdır. Karşılaştırmalar ANOVA testi ile yapılmış ve  $p < 0.05$  için anlamlı değişimler \*,  $p < 0.01$  için \*\* ile ifade edilmiştir.

Purvalanol ve roskovitin MEF hücreleri üzerindeki zamana bağlı etkilerinin irdelenmesi amacıyla sağkalım analizi yapılmıştır. Her iki hücre hattı için 24, 48, 72 ve 96 saatlik ilaç uygulamaları gerçekleştirildikten sonra tripan mavisi ile boyama yapılarak canlı hücreler sayılmıştır. Yapılan analize göre her iki ilaç da 24 saatte hücre sağkalımını %80'e kadar düşürürken takip eden zaman dilimlerinde

purvalanolün her iki hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği; roskovitinin ise dt hücrelerde 48 saat itibariyle etkinliği azalırken Atg5<sup>-/-</sup> hücreler üzerinde sitostatik bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2.2).



**Şekil 3.2.2: Purvalanol ve roskovitin dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinin sağkalımı üzerindeki zamana bağlı etkilerinin gösterilmesi.** MTT analizi ile belirlenen dozlarda purvalanol ve roskovitin (sırasıyla 20 ve 30  $\mu$ M) uygulanan hücreler 24, 48, 72 ve 96. saatlerde tripan mavisi ile boyanarak sayılmış, canlı hücre sayıları kaydedilmiş ve bu verilerle GraphPad kullanılarak grafik oluşturulmuştur. Sonuçlar dört tekrarın ortalamasıdır.

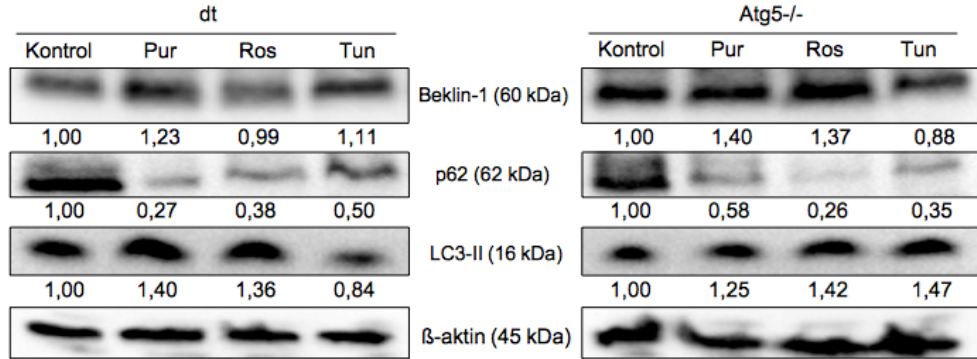
### 3.3. PURVALANOL VE ROSKOVİTİNİN MEF HÜCRELERİNDEKİ OTOFAJİ BELİRTEÇLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Beklin-1-Vps34-Vps15 kompleksi hücrelerde otofajinin tetiklenmesi için gerekli olduğundan ve yapılan birtakım çalışmalara göre Beklin-1 protein ifadesinin artması otofaji ile doğrudan ilişkilendirildiğinden, 24 saatlik purvalanol, roskovitin, ve tunikamisin uygulamaları yapılarak dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Beklin-1 protein seviyeleri irdelenmiştir. Yapılan immünoblotlama sonuçlarına göre purvalanol dt ve Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde sırasıyla %23 ve %40, roskovitin ise Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %37 oranında bir Beklin-1 artışına neden olurken, dt hücrelerdeki Beklin-1 protein seviyesinin roskovitin uygulamasına bağlı olarak değişmediği görülmüştür. Tunikamisin uygulanan dt hücrelerdeki Beklin-1 seviyesinde %11 oranında bir artış, Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde ise %12 oranında bir azalma söz konusudur.



Bir başka otofaji belirteci olan p62 proteini otofaji ile yıkılacak olan proteinlerin otofagozoma lokalize olmasını sağlarken süreç içerisinde taşıdığı kargo ile birlikte kendisi de yıkıldığından dolayı, yine 24 saatlik ilaç uygulamaları gerçekleştirilerek her iki hücre hattında da bu proteinin seviyesi incelenmiş ve her kondüsyon için azalma tespit edilmiştir. Bu azalma purvalanol uygulanan dt hücrelerde %73, Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %42 oranında iken roskovitin uygulanan dt hücrelerde %62 ve Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %74 oranındadır. Tunikamisın uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde ise p62 protein seviyelerinde sırasıyla %50 ve %65 oranında azalma olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca LC3 proteininin sitozolik LC3-I formundan otofagozom zarına bağlı LC3-II formuna dönüşümü yine bir otofaji belirteci olarak kabul edildiğinden, her iki hücre hattında da ilaçlarla birlikte bu dönüşümün gözlenmesi amaçlanarak immunoblotlama yapılmıştır (Şekil 3.3.1). Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücreleri için sırasıyla purvalanol %40 ve %25, roskovitin %36 ve %42 oranında LC3-II dönüşümüne neden olurken tunikamisın uygulanan dt hücrelerde LC3-II formu %16 daha az, Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %47 daha fazladır.

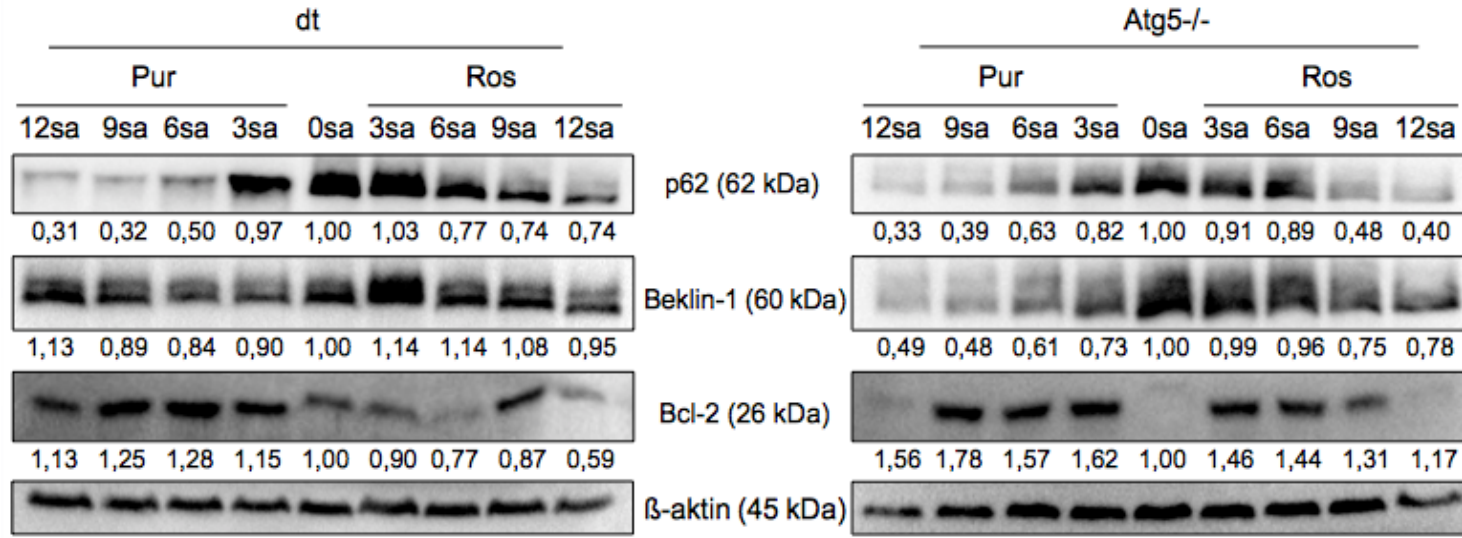


**Şekil 3.3.1: 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisın uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki otofaji belirteçlerinin immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.** Her hücre hattına ait protein lizatları %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek Beklin-1, p62 ve LC3 primer antikörlerinin bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Sonuçlar iki tekrarın ortalamasıdır.

Hücrelerdeki LC3 proteini floresan mikroskobu ile incelendiği zaman otofaji sırasında otofagozom zarlarında lokalize olması nedeniyle keseciklerin bulunduğu yerlerde bir noktasal görünüme sebep olmaktadır. Otofajinin gerçekleşmediği durumdaki sitozolik LC3-I formunun hücrelerdeki homojen görüntüsü ile karşılaştırıldığında özellikle purvalanolün Atg5 ifadesinden bağımsız olarak her iki hücre hattında da otofagozom oluşumunu tetiklediği görülmüştür (Şekil 3.3.2).

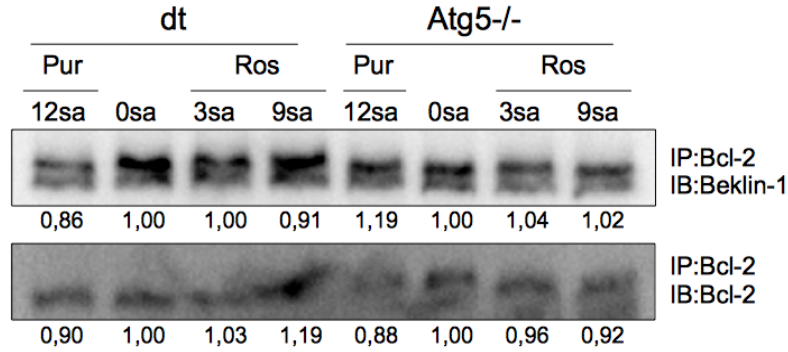
MEF hücrelerinde otofajinin tetiklendiği en etkili zaman diliminin belirlenmesi amacıyla farklı sürelerde ilaç uygulanmış ve Beklin-1 ile p62 protein düzeyleri belirlenmiştir. Deney sonucuna göre dt hücrelerde purvalanol 12. saatte %13 oranında bir Beklin-1 ifade artışına neden olurken aynı durum roskovitin ile birlikte 3. saatte %14 oranında gerçekleşmektedir. Ancak her iki ilaç da 6. saatten itibaren p62 seviyesinde düşüşe neden olmaktadır. Purvalanol için %50 ve roskovitin için %23 oranında bir değişim söz konusudur. Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde her iki ilaçla da 12. saate kadar Beklin-1 artışı görülmemiştir. Ancak bu hücre hattında da ilaç uygulamaları ile birlikte, özellikle purvalanol için 6. ve roskovitin için 9. saatlerde önemli ölçüde (sırasıyla %37 ve %52 oranında) degradasyon görülmektedir. Bcl-2 proteininin BH3 bölgesinden Beklin-1 ile bağlanarak otofajiyi inhibe etmesi sebebiyle 0-12. saatler arasında Bcl-2 protein miktarları da immunoblotlama yöntemiyle belirlenmiş ve dt hücrelerde purvalanol ile birlikte 3. saatte %15 oranında; Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde ise purvalanol ve roskovitin için 3. saatten itibaren sırasıyla %62 ve %46 oranında Bcl-2 artışı tespit edilmiştir (Şekil 3.3.3).





**Şekil 3.3.3:** 0, 3, 6, 9 ve 12 saat boyunca 20  $\mu$ M purvalanol ve 30  $\mu$ M roskovitin uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki otofaji ile ilişkili protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Her hücre hattına ait protein lizatları %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek p62, Beklin-1 ve Bcl-2 primer antikörlerinin bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Sonuçlar iki tekrarın ortalamasıdır.

Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde Beclin-1 ile Bcl-2 etkileşiminin otofaji üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi için ko-immünopresipitasyon yapılmıştır (Şekil 3.3.4). Dt MEF hücrelerinde Bcl-2 ve Beklin-1 proteinlerinin etkileşimi, 12 saat purvalanol uygulaması sonucunda %14 ve 9 saat roskovitin ile ancak %9 gibi bir oranda azalırken Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde 12 saat purvalanol uygulanmasından sonra %19 oranında artmış, diğer koşullarda bir değişiklik gözlenmemiştir.



**Şekil 3.3.4:** 0, 3, 9 ve 12 saat boyunca 20 µM purvalanol ve 30 µM roskovitin uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Bcl-2 ile bağlı bulunan Beklin-1 protein miktarlarının ko-immünopresipitasyon ve immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Hücrelerdeki Bcl-2 proteinleri Bcl-2 antikoruna bağlanan manyetik boncuklar yardımı ile ayrıştırılarak elde edilen proteinler %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek Beklin-1 ve Bcl-2 primer antikorlarının bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Deney bir kez yapılmıştır.

### 3.4. PURVALANOL VE ROSKOVİTİNİN MEF HÜCRELERİNDE mTOR İLE İLİŞKİLİ YOLAKLAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

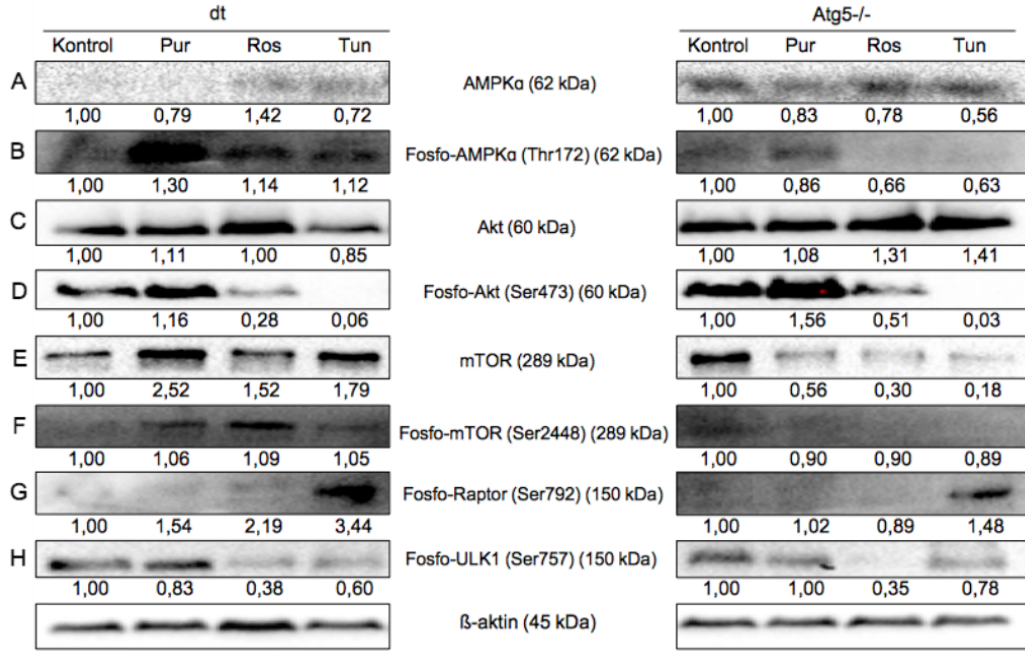
Hücrel stres koşullarına bağlı olarak AMP/ATP oranının artmasına cevaben Thr172 fosforilasyonu gerçekleşerek aktive olan ve bu durumda hem Tsc2/mTOR yolağı hem de Raptor proteininin Ser792 fosforilasyonu üzerinden mTORC1 kompleksinin inhibisyonunu sağlayarak hücrede otofajinin gerçekleşmesine yol açan AMPKα proteininin CDKi türevlerine verdiği cevap irdelenmiştir. Dt MEF hücrelerinde 24 saatlik ilaç uygulaması ile hem purvalanol hem de roskovitinin sırasıyla %30 ve %14 oranlarında AMPKα aktivasyonuna yol açtığı, fakat Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde aynı etkiyi göstermediği belirlenmiştir (Şekil 3.4.1, A, B).

Akt proteininin Ser473 fosforilasyonu ile aktive olduğu durumda mTORC1 kompleksinde bulunan mTOR proteinini fosforile ederek ve ayrıca bir mTOR inhibitörü olan Tsc2'yi inhibe ederek hücre büyümesinde rol oynadığı bilinmekteydi. Yapılan immunoblotlama sonucunda 24 saat purvalanol uygulanmasının her iki hücre hattında da Akt'ın Ser473 fosforilasyonu üzerinde durdurucu bir etkisi belirlenememişken roskovitin uygulaması ile bu proteinin aktivasyonunun büyük ölçüde (dt hücreler için %72 ve Atg5<sup>-/-</sup> hücreler için %49 oranında) azaldığı görülmüştür (Şekil 3.4.1, C,D).

mTOR proteininin hücre büyümesindeki önemli rolünü oynayabilmesi için PI3K yolağı üzerinden Ser2448 fosforilasyonu ile aktive olması beklendiğinden, ilaç uygulamalarını takiben bu proteinin fosforilasyon seviyeleri incelenmiştir. İmmunoblotlama sonuçlarına göre MEF hücrelerinde mTOR fosforilasyonu ne purvalanol ne de roskovitin uygulanması üzerine değişim göstermektedir. Ancak dt hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla mTOR protein seviyesinde önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Söz konusu artış purvalanol için 2,5; roskovitin için 1,5 kat civarındadır. Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde ise aksine, mTOR protein seviyesinde, purvalanol ile %44 ve roskovitin ile %70 oranında bir azalma görülmüştür (Şekil 3.4.1, E,F).

Açlık durumunda AMPK $\alpha$  tarafından fosforile edilen ve mTOR yolağının baskılanmasına etki eden Raptor proteininin Ser792 fosforilasyonunda otofajiyi tetiklediği bilinen tunikamisinin etkisiyle artış görülmüş, fakat purvalanol ile roskovitin her iki hücre hattında da bu duruma etkisi görülmemiştir (Şekil 3.4.1, G).

Otofaji için gerekli bir protein olan ULK-1 açlık durumunda AMPK $\alpha$  tarafından Ser317, Ser555 ve Ser777'den fosforile edilerek aktive olur. mTOR tarafından gerçekleştirilen Ser757 fosforilasyonu ise tersine bir etkiye sebep olur. MEF hücrelerinde 24 saatlik roskovitin uygulaması sonucunda Atg5 varlığından bağımsız olarak mTOR'a bağlı ULK-1 inhibisyonunun %65 civarında azaldığı, purvalanolün ise bu noktada bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.4.1, H).

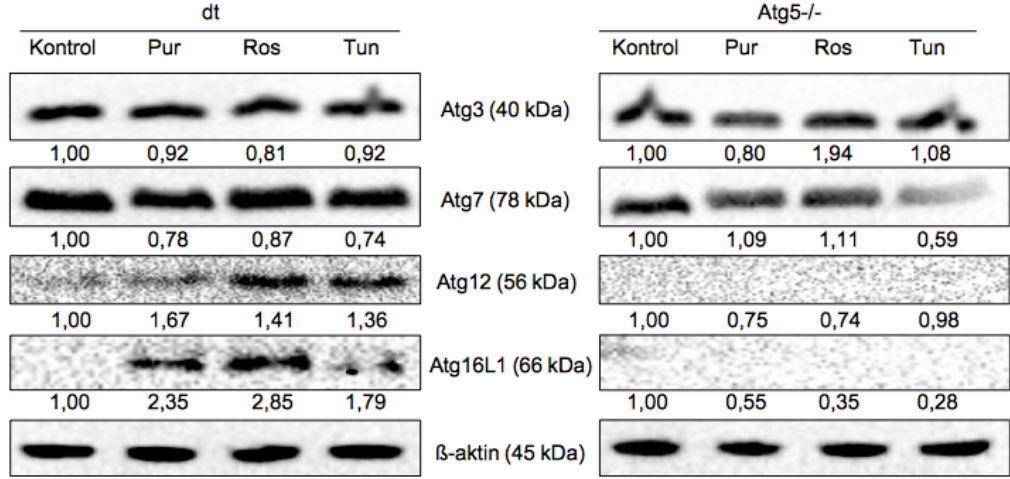


**Şekil 3.4.1:** 24 saat boyunca 20  $\mu$ M purvalanol, 30  $\mu$ M roskovitin ve 1  $\mu$ M tunikamisin uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki mTOR yoluyla ilişkili protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Her hücre hattına ait protein lizatları %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek AMPKa, fosfo-AMPKa (Thr172), Akt, fosfo-Akt (Ser473), mTOR, fosfo-mTOR (Ser2448), fosfo-Raptor (Ser792) ve fosfo-ULK1 (Ser757) primer antikörlerinin bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Sonuçlar iki tekrarın ortalamasıdır.

### 3.5. PURVALANOL VE ROSKOVİTİNİN MEF HÜCRELERİNDEKİ OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Atg proteinlerinin hücrelerde otofagozom oluşumunda önemli rol oynadığı belirtilmişti. Bunlardan Atg3, LC3-PE lipidasyonu için; Atg7 ise Atg5-Atg12-Atg16L1 kompleksinin otofagozom zarlarına bağlanması için gereklidir. Bu proteinlerin hücrelerdeki varlığı otofagozomların oluşumu için gerekli olan ubiquitin-benzeri bağlanma sistemlerinin hücrede var olduğunu gösterir. Yapılan immunoblotlama ile dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücre hatlarının her ikisinde de söz konusu sistemin varlığı belirlenmiştir. Atg12 ve Atg16L1 ise dt MEF hücrelerinde 24 saatlik

purvalanol, roskovitin ve tunikamisin uygulamaları sonucunda yaklaşık iki kat veya daha fazla artış gösterirken *Atg5*<sup>-/-</sup> hücrelerde bu proteinlerin varlığı tespit edilmemiştir (Şekil 3.5.1).



**Şekil 3.5.1:** 24 saat boyunca 20  $\mu$ M purvalanol, 30  $\mu$ M roskovitin ve 1  $\mu$ M tunikamisin uygulanan dt ve *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Atg protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Her hücre hattına ait protein lizatları %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek Atg3, Atg7, Atg12 ve Atg16L1 primer antikolarının bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Sonuçlar iki tekrarın ortalamasıdır.

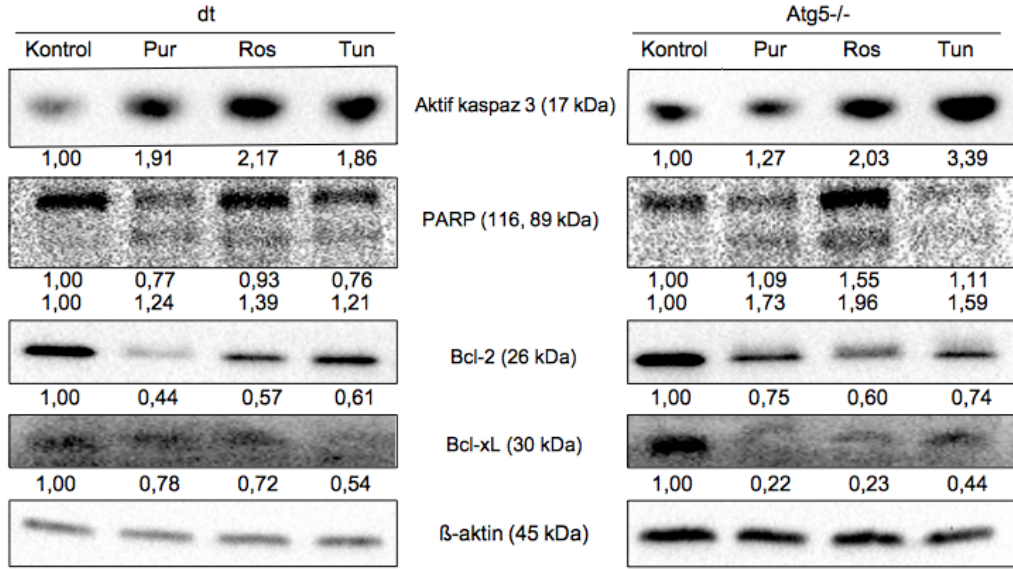
### 3.6. PURVALANOL VE ROSKOVİTİNİN MEF HÜCRELERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ

Dt ve *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinin 24 saatlik purvalanol ve roskovitin uygulamasına bağlı olarak canlılıklarının azalmasında apoptozun etkisini gözlemlemek amacıyla immunoblotlama yapılarak apoptoz sürecinde önemli rolü olan aktif kaspaz 3 protein seviyeleri belirlenmiştir. Ayrıca DNA tamir mekanizmasında görevli olan ve apoptotik süreçte kaspazlar tarafından kesilerek inhibe edilen PARP proteininin seviyeleri de gösterilmiştir. Her iki hücre hattında da ilaç uygulamalarına bağlı olarak kaspaz ve PARP kesilimleri gerçekleşmektedir. Kaspaz 3 seviyesi dt hücrelerde her bir ilaç ile yaklaşık iki kat artmıştır. *Atg5*<sup>-/-</sup> hücrelerde purvalanol için



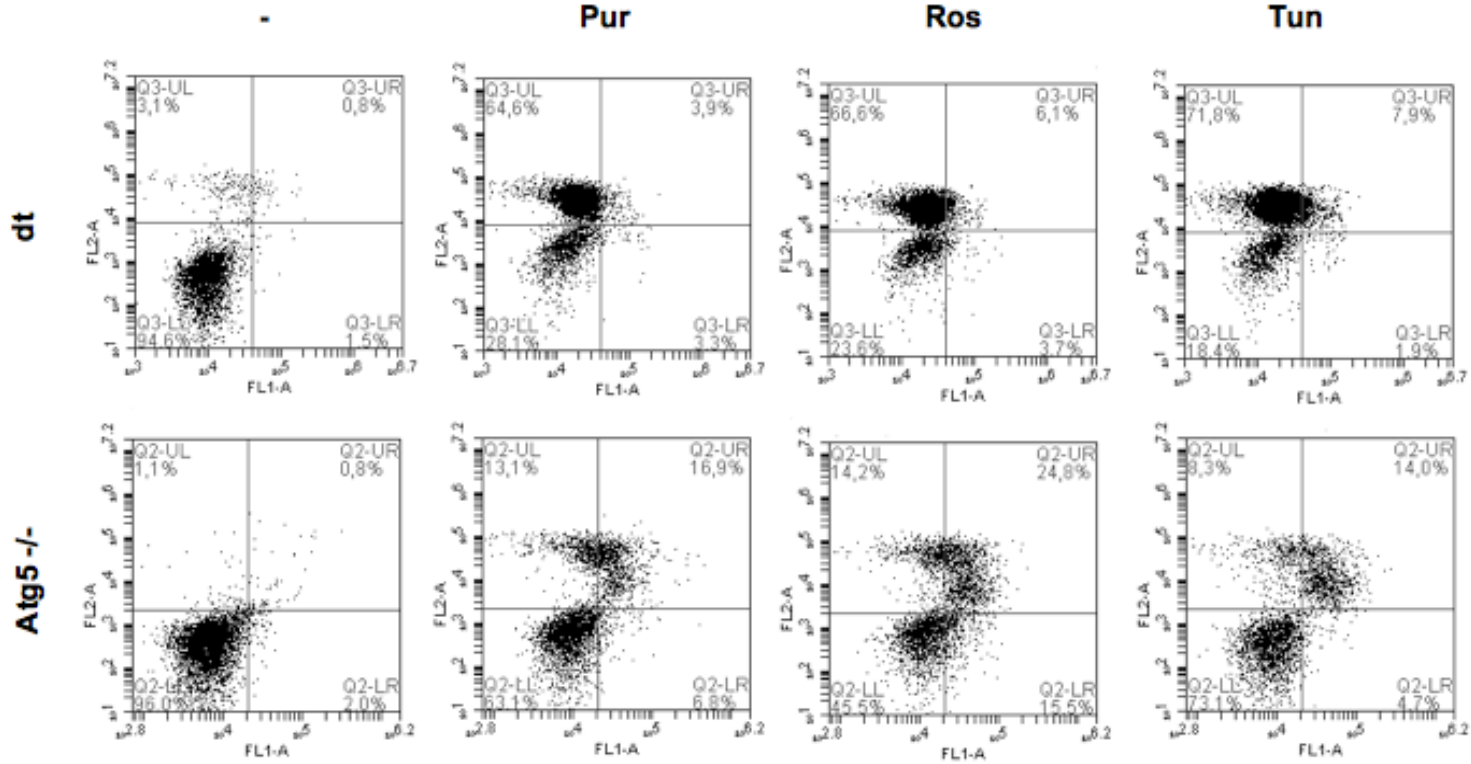
%27 oranında, roskovitin için iki ve tunikamisın için üç kat artış söz konusudur. PARP kesilimi ise dt hücrelerde purvalanol, roskovitin ve tunikamisın için sırasıyla %24, %39 ve %21; Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %73, %96 ve %59 oranındadır (Şekil 3.6.1).

Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub> protein seviyelerinin de 24 saat ilaç uygulanan MEF hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.6.1). Bcl-2 protein seviyesindeki azalma dt hücrelerde purvalanol, roskovitin ve tunikamisın için sırasıyla %56, %43 ve %39; Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %25, %40 ve %26 oranındadır. Bcl-x<sub>L</sub> için ise dt hücrelerde %22, %28 ve %46; Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde %78, %77 ve %56 oranındadır.



**Şekil 3.6.1: 24 saat boyunca 20 µM purvalanol, 30 µM roskovitin ve 1 µM tunikamisın uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki apoptoz ile ilişkili protein miktarlarının immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi. Her hücre hattına ait protein lizatları %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek aktif kaspaz 3, PARP, Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub> primer antikörlerinin bağlanması sağlandıktan sonra sonuçlar ChemiDoc MP cihazı ile görüntülenmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Kantitatif analizler ImageJ yazılımı ile yapılmıştır. Sonuçlar iki tekrarın ortalamasıdır.**

MEF hücrelerindeki apoptotik popülasyonlar Annexin V-PI boyaması yapılarak akış sitometrisinde gösterilmiştir. 24 saat purvalanol, roskovitin ve tunikamisin uygulamaları ile dt hücrelerin %60-70'inin nekroz, Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerin ise %15-25'inin geç apoptoz evresinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.6.2).



**Şekil 3.6.2:** 24 saat boyunca 20  $\mu$ M purvalanol, 30  $\mu$ M roskovitin ve 1  $\mu$ M tunikamisin uygulanan dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki apoptotik ve nekrotik popülasyonların Annexin V-PI boyama yöntemi ile akış sitometrisinde gösterilmesi. İlaç uygulamasını takiben boyanan hücreler 15 dakika boyunca karanlıkta bekletildikten sonra BD Accuri C6 akış sitometri cihazında okutulmuş ve ilgili yazılım kullanılarak analiz edilmiştir. Deney bir kez yapılmıştır. Pur: purvalanol, Ros: roskovitin, Tun: tunikamisin.

#### 4. TARTIŞMA

Günümüzde kanser, tüm dünyada sıklıkla görülen bir hastalıktır. Sayısız genetik ve/veya çevresel faktör sebebiyle ortaya çıkabilen ve yaşam kalitesini ciddi ölçüde düşüren, birçok ölüme neden olan bu hastalık, dünya çapında araştırmacılar için önemli bir konu olmuştur. Son yıllarda kanserle ilişkili birçok yolak, her bir kanser türündeki çok sayıda vaka için genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik, vb çalışmalar yapılarak ortaya konmuştur. Elde edilen verilere dayanarak, bugün, yürütülen birçok klinik araştırma mevcuttur [18].

Kanser tedavisinde birçok stratejiye başvurulmaktadır. Bunlardan bir tanesi de hücre döngüsündeki kilit rolleri sebebiyle CDK'lerin hedeflenmesidir. Her CDK kendine özgü siklin ile etkileşime geçerek hücre döngüsünün belirli bir evresinde görev alır. Her bir kompleksin doğru anda aktif durumda olması oldukça önemlidir. Bu sistemin düzenlenmesinde herhangi bir aksaklık olduğunda kontrolsüz hücre bölünmesine bağlı olarak kanser görülmesi riski çok yüksektir. Bu bağlamda kanser tedavisinde etkili olabileceği düşünülen CDKi türevleri geliştirilmiştir.

Purvalanol ve roskovitin pürin analogları olup ATP ile gösterdikleri yapısal benzerlikten ötürü CDK'lerin ATP bağlanma bölgelerine yarışçıl olarak bağlanabilen CDKi türevleridir. Bu ilaçların birçok hücre hattında apoptotik hücre ölümüne yol açabildiği ve aynı zamanda otofajinin gerçekleşmesine neden olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [14,19].

Otofaji, ana olarak açlık ve stres koşullarında hücrelerdeki organel ve proteinlerin katabolize edilmesinde ve hücrelerin bu süreçte elde edilen enerji ve yapıtaşlarını kullanarak homeostasi durumuna gelmesinde rol oynayan oldukça önemli bir mekanizmadır. Ancak aynı mekanizma, tam da bu rolünden dolayı, kanser ilaçlarının etkinliğini düşürebilmektedir [2, 20].

Otofaji kanser hücrelerinin sağkalımında etkili olabildiği gibi bu hücrelerin ölümüne de neden olabilmektedir. Bugüne kadar birçok kanser türü için yapılan araştırmalar göstermiştir ki otofajinin baskılanması durumunda hücre ölümünün artıp azalması kanserin evresine ve kullanılan ilaç stratejilerine de bağlı olarak farklılık göstermektedir [7]. Terapotik stratejilerin etkinliğinin belirlenmesinde fare modelleri oldukça önemli bir yere sahiptir. İstenilen bir genotipteki fare embriyolarından elde edilen MEF hücreleri *in vitro* çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Embryonik dönemde ölümcül olabilecek bir mutasyona sahip olan farelerden bile embryo gelişiminin erken aşamalarındayken hücre izole edilebilmekte, *in vitro* araştırmaların yanı sıra, söz konusu hücrelerin yetişkin farelere nakledilmesi sayesinde *in vivo* çalışmalar da yapılabilmektedir [13].

Bu çalışmada, otofagozomların oluşumundaki kilit proteinlerden biri olan Atg5'in CDKi türevlerinin terapotik etkinliklerini nasıl etkilediğinin ortaya konması esas alınmıştır. Dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücreleri, purvalanol ve roskovitin için model olarak seçilmiştir.

Öncelikli olarak kullanılan hücre modellerinin amaca uygunluğunu belirlemek üzere dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerindeki Atg5 protein seviyeleri irdelenmiş (Şekil 3.1.1) ve gerçekten de Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde bu proteinin bulunmadığı sonucu ortaya konmuştur.

Çalışmada kullanılan CDKi türevleri olan purvalanol ve roskovitin hücre canlılığını doza bağlı olarak düşürdüğü daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [21,22,23]. Bu ilaçların her iki MEF hücre hattındaki bağıl hücre canlılığına olan etkisi araştırıldığında (Şekil 3.2.1) Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde 24 saatlik 20 µM purvalanol ve 30 µM roskovitin uygulamasıyla hücre canlılığının %50'ye yakın bir değere indirildiği, dt hücrelerin ise aynı dozlardan %30'a kadar daha az etkilendiği belirlenmiştir ve bu sebeple çalışma boyunca bu dozlar kullanılmıştır.

Bunun yanı sıra ilaçların zamana bağlı etkinliği incelenip purvalanolün dt hücrelerde 48, Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde 24 saat itibariyle sitotoksik bir etkiye sahip olduğu; roskovitin ise doğal tip hücrelerde 48 saat itibariyle etkinliği azalırken Atg5<sup>-/-</sup>

hücrelerde 48 saatten sonra sitostatik bir etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.2.2). Böylece bu ilaçların Atg5 ifadesinden yoksun olan hücrelerde daha yüksek bir terapötik etkinliğinin olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Purvalanol ve roskovitin hücrelerde otofajiyi tetikleyebildiği bazı çalışmalarda ortaya konmuştur [22,24]. Bu nedenle 24 saat purvalanol veya roskovitin uygulandığında her iki MEF hücre hattında oluşan otofaji cevabı immunoblotlama yöntemiyle irdelenmiştir (Şekil 3.3.1). Purvalanol Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde daha fazla olmak üzere her iki hücre hattında da Beklin-1 protein seviyesinin artmasına ve yine iki hücre hattında da LC3 proteininin kesilimi ile p62 proteininin degradasyonuna neden olmuştur. Bu da purvalanolün Atg5 ifadesinden bağımsız olarak otofajiyi tetiklediğini düşündürmektedir. Roskovitin uygulanan hücrelere bakıldığında ise dt hücrelerde Beklin-1 seviyesinde bir değişimin olmadığı ancak Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde bu proteinin ifadesinin arttığı; bununla birlikte her iki hücre hattında da LC3 kesilimi ile p62 yıkımının gerçekleştiği görülmüştür. Burada ortaya çıkan otofaji cevabı Beklin-1'den bağımsız olabileceği gibi söz konusu cevabın daha erken zamanda gerçekleşmiş ve Beklin-1 protein seviyesindeki artışın 24 saate belirlenememiş olabileceği de düşünülmüştür. Ayrıca her iki ilacın da Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde p62 yıkımına neden olması burada otofajinin Atg5'ten bağımsız bir yolak üzerinden gerçekleşmiş olabileceğine işaret etmiştir [25].

Yapılan immünoblotlama ile LC3-I ve LC3-II formlarının ikisi aynı anda görüntülenemediği için ek olarak immunofloresan yöntemi ile hücrelerdeki LC3 proteini görüntülenmiştir (Şekil 3.3.2). Sitoplazmik LC3-I formu hücrenin her bölgesinde görülebilirken otofagozom zarına bağlı halde bulunan lipide olmuş LC3-II formu hücrede otofagozomların bulunduğu bölgelere işaret eden noktasal görüntüler oluşturur [15]. Bu noktaların ortaya çıkmasıyla da hücrede otofaji cevabının oluştuğu kabul edilir. 24 saat ilaç uygulamaları sonucunda özellikle purvalanolün LC3'ün otofagozom membramlarına lokalize olmasını tetiklediği görülmüştür.

24 saat roskovitin uygulanan dt hücrelerde Beklin-1 seviyesinde kontrol hücrelerine kıyasla bir fark belirlenememesinden yola çıkılarak her iki hücre hattında da daha erken zamandaki değişimler immunoblotlama yöntemiyle irdelenmiştir (Şekil 3.3.3). Roskovitin dt hücrelerde 3. saatte Beklin-1'in bir miktar artmasına yol açarken  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde 12 saate kadar bu miktar azalmıştır. Purvalanol ile birlikte dt hücrelerde 12. saatte artan Beklin-1  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde roskovitinde olduğu gibi 12. saate kadar azalmıştır.

Yapılan hücre sağkalım analizi (Şekil 4.2.2) ile birlikte düşünüldüğünde otofajinin hücre sağkalımında rolünün olduğu düşünülmektedir. Purvalanol uygulanması ile dt hücrelerde 12. saat itibariyle gerçekleşen Beklin-1 artışı  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde ancak 24 saatte görülmektedir ve bu ilaç dt hücrelerde 48 saatte sitotoksik etki gösterirken  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde aynı etkiye 24 saatte ulaşmaktadır. Ayrıca dt hücrelerde roskovitin etkisiyle 3. saatte görülen Beklin-1 artışı  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde 24 saatte gerçekleşmiş, dt hücrelerde 48 saat itibariyle etkinliğini yitiren roskovitin  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde 48. saat itibariyle sitostatik bir etki oluşturmuştur. Ayrıca p62 proteininin her kondüsyonda en geç 6. saat itibariyle azalması bu zaman dilimlerinde Beklin-1'den bağımsız bir otofaji cevabının söz konusu olabileceğini düşündürmektedir [26].

Bcl-2 proteininin Beklin-1 ile bağlandığı durumda otofajiyi inhibe ettiği bilindiğinden [27,28,29] buradaki Bcl-2 miktarının otofajinin Beklin-1'den bağımsız olarak gerçekleşmesinde etkisinin olabileceği düşünülmüştür [13,30]. Bu sebeple ko-immunopresipitasyon yöntemi kullanılarak hücrelerdeki Bcl-2 proteini izole edilmiş ve bunlara bağlı bulunan Beklin-1 protein miktarları immunoblotlama yöntemiyle tayin edilmiştir (Şekil 3.3.4). Dt hücrelerde purvalanol ile 12. saatte bu proteinlerin etkileşimi azalırken  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde %20 civarında artmıştır. Roskovitin ile dt hücrelerde 3. saatte etkileşim azalırken yine  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde bir değişim belirlenmemiştir. Bu veriler de purvalanol ve roskovitin otofaji cevabını dt hücrelerde sırasıyla 12. ve 3. saatlerde;  $Atg5^{-/-}$  hücrelerde ise daha sonra (24. saatte) tetiklediğini desteklemektedir.

Hücrelerde otofajinin kontrolünde aslen protein sentezi ve hücre büyümesi ile ilişkili bir kinaz olan mTOR önemli bir role sahiptir. Otofajinin baskılanmasında etkili olan mTOR sinyali hücrel stres koşullarında kesilir ve bu durumda otofaji gerçekleşir [31,32,33]. Bu nedenle MEF hücre hatlarında CDKi türevlerinin mTOR ile ilişkili proteinler üzerindeki etkisi irdelenmiştir (Şekil 3.4.1). Hücrede AMP/ATP oranının artmasıyla Thr172 fosforilasyonu üzerinden aktive olan AMPK $\alpha$  proteininin dt MEF hücrelerinde CDKi türevleriyle birlikte artış gösterdiği fakat Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde böyle bir etkinin bulunmadığı görülmüştür. Hem mTOR proteinini doğrudan fosforile ederek hem de mTOR inhibitörü olan Tsc2'yi inhibe ederek hücre büyümesinde rol oynayan fosfo-Akt (Ser473) roskovitin etkisiyle her iki hücre hattında da önemli ölçüde azalmıştır. Ser2448 fosforilasyonu ile aktive olup hücre büyümesinde rol alan mTOR proteininin bu fosforilasyonu iki ilacın etkisiyle de değişim göstermemiştir. Ancak Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerdeki toplam mTOR protein seviyesi ilaç uygulamalarıyla birlikte önemli ölçüde azalmıştır. Ser792 fosforilasyonu üzerine mTORC1 kompleksinden ayrılarak mTOR sinyalinin durmasına neden olan Raptor proteini yalnızca otofajiyi tetiklediği bilinen tunikamisin ile artış gösterirken CDKi türevlerinden etkilenmemiştir. Otofajinin gerçekleşmesinde önemli rolü olan ve mTOR tarafından Ser757 fosforilasyonu gerçekleştirerek inhibe olan ULK-1 proteininin [40] seviyesi purvalanol uygulaması üzerine bir değişim göstermemiş ancak roskovitin uygulaması ile önemli ölçüde azalmıştır. Özetle CDKi türevlerinin uygulanmasıyla Atg5 ifadesi bulunan hücrelerde mTOR ile ilişkili olan proteinler üzerinde önemli bir değişim belirlenmemiş ancak Atg5 ifadesinden yoksun hücrelerde bu sinyal yolağı baskılanmıştır.

Hücrelerde Atg proteinleri otofagozomların oluşmasında görev alırlar. Burada iki ubikuitin benzeri bağlanma sistemi esastır. Bunlardan ilki Atg3 aracılığıyla gerçekleşen LC3-PE lipidasyonu, ikincisi ise Atg7 aracılığıyla gerçekleşen Atg5-Atg12-Atg16L1 konjugasyonudur [5,34]. Atg proteinlerinin durumları açısından irdelenen dt ve Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinin her ikisinde de bu konjugasyon sistemlerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.5.1). Ayrıca dt hücrelerde Atg12 ve Atg16L1 proteinleri 24 saat ilaç uygulamaları ile artış gösterirken Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde bu proteinlerin varlığı tespit edilememiştir.



Kullanılan CDKi türevlerinin MEF hücrelerindeki apoptotik etkilerinin incelenmesi için de immünoiblota yapılmıştır (Şekil 3.6.1) [23,35]. Apoptozda kesilerek aktif hale gelen kaspazlar ve bu aktif kaspazlar tarafından kesilime uğrayan PARP proteini önemli apoptoz belirteçleridir. Deney sonucuna göre her iki hücre hattında da 24 saat ilaç uygulanmasıyla birlikte kaspaz 3 ve PARP kesilimleri gerçekleşmektedir. Ayrıca anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub> proteinlerinin de her iki hücre hattındaki seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir.

Ayrıca Annexin V-PI boyaması ile MEF hücre popülasyonları akış sitometrisinde gösterilmiştir (Şekil 3.6.2). Buna göre purvalanol ve roskovitin uygulanan dt hücrelerin 24 saat sonunda %50-70 arasında nekrotik, Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerin ise %15-25 arasında geç apoptotik evrede bulunduğu, geri kalan hücrelerin ise genellikle canlı popülasyonu oluşturduğu gözlenmiştir. Otofajinin yanında apoptotik hücre ölümünde de önemli rol oynayan Atg5 proteininin buradaki hücre profili ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [36,38,39].

Sonuç olarak purvalanol ve roskovitin dt MEF hücrelerinde Beklin-1 ve Atg5'e bağımlı otofaji cevabını oluşturduğu, Atg5<sup>-/-</sup> MEF hücrelerinde ise bunu Atg5'ten bağımsız olarak gerçekleştirdiği görülmüştür [42]. Ayrıca Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerde otofajinin AMPKα proteininden bağımsız olarak gerçekleşmesi söz konusudur [43]. Her iki MEF hücre hattında da hem otofajinin hem de apoptozun gerçekleşmesine karşılık dt hücrelerinde sağkalım Atg5<sup>-/-</sup> hücrelere göre daha fazladır. Bu nedenle Atg5 bağımlı klasik otofaji yolağının hücre sağkalımında etkili olduğu düşünülmektedir. Atg5<sup>-/-</sup> hücrelerdeki klasik olmayan otofaji yolağının hangi hücresel mekanizmalar ve sinyal yolları ile ilişkili olduğunun araştırılması, sağkalıma olan etkisinin aydınlatılması açısından önem arz etmektedir. Ayrıca bu iki hücre hattında apoptozun gerçekleştiği ilk zaman dilimlerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması önem taşımaktadır. Atg5 proteininden bağımsız olarak gerçekleşen otofajide mitokondrilerin parçalanmaması ve buna bağlı olarak sitoplazmik kalsiyum seviyelerinin artması ile ilişkili olarak apoptotik cevabın daha erken oluşması ve hücre sağkalımını bu nedenle düşürmesi olası görünmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Mizushima, Noboru and Beth Levine. "Autophagy In Mammalian Development And Differentiation". *Nature Cell Biology* 12.9 (2010): 823-830.
2. Kundu, Mondira and Craig B. Thompson. "Autophagy: Basic Principles And Relevance To Disease". *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 0.0 (2006): 071005114816001.
3. Ouyang, L. et al. "Programmed Cell Death Pathways In Cancer: A Review Of Apoptosis, Autophagy And Programmed Necrosis". *Cell Proliferation* 45.6 (2012): 487-498.
4. Scott, Ryan C., Gábor Juhász, and Thomas P. Neufeld. "Direct Induction Of Autophagy By Atg1 Inhibits Cell Growth And Induces Apoptotic Cell Death". *Current Biology* 17.1 (2007): 1-11.
5. Glick, Danielle, Sandra Barth, and Kay F. Macleod. "Autophagy: Cellular And Molecular Mechanisms". *The Journal of Pathology* 221.1 (2010): 3-12.
6. Kerr, J F R, A H Wyllie, and A R Currie. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics". *British Journal of Cancer* 26.4 (1972): 239-257. Web.
7. Eisenberg-Lerner, A et al. "Life And Death Partners: Apoptosis, Autophagy And The Cross-Talk Between Them". *Cell Death and Differentiation* 16.7 (2009): 966-975.
8. "Life in the Balance - a Mechanistic View of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis." *Journal of Cell Science*. U.S. National Library of Medicine, 2012.
9. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S et al. "Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis." *Genes Dev*, 2007.
10. Kim K, Hwang M, Moretti L, Jaboin J, Cha Y, Lu B. "Autophagy

- upregulation by inhibitors of caspase-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer.” *Autophagy*, 2008.
11. Shinohara E, Cao C, Niermann K, Mu Y, Zeng F, Hallahan D et al. “Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors.” *Oncogene*, 2005.
  12. Bae D, Lu S, Taglienti C, Mercurio A. “Metabolic stress induces the lysosomal degradation of neuropilin-1 but not neuropilin-2.” *J Biol Chem*, 2008.
  13. Green, Jeff and Thomas Ried. *Genetically Engineered Mice For Cancer Research*. 1st ed. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2012.
  14. Dai, Y. "Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors". *Current Opinion in Pharmacology* 3.4 (2003): 362-370.
  15. Kuma, Akiko, Makoto Matsui, and Noboru Mizushima. "LC3, An Autophagosome Marker, Can Be Incorporated Into Protein Aggregates Independent Of Autophagy: Caution In The Interpretation Of LC3 Localization." *Autophagy* 3.4 (2007): 323-328.
  16. Smith, Paul J and Eddy W Yue. *Inhibitors Of Cyclin-Dependent Kinases As Anti-Tumor Agents*. 1st ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis, 2007.
  17. Villerbu, Nathalie et al. "Cellular Effects Of Purvalanol A: A Specific Inhibitor Of Cyclin-Dependent Kinase Activities". *International Journal of Cancer* 97.6 (2002): 761-769.
  18. Stewart, Bernard W and Christopher P Wild. *World Cancer Report 2014*. 1st ed.
  19. "Purvalanol A, Olomoucine II and Roscovitine Inhibit ABCB1 Transporter and Synergistically Potentiate Cytotoxic Effects of Daunorubicin in Vitro." *PloS One*. U.S. National Library of Medicine, 2013.
  20. "The Regulation of Autophagy - Unanswered Questions." *Journal of Cell Science*. U.S. National Library of Medicine, 2011.
  21. Obakan, Pinar et al. "Purvalanol A Is A Strong Apoptotic Inducer Via Activating Polyamine Catabolic Pathway In MCF-7 Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Cells". *Molecular Biology Reports* 41.1 (2013): 145-154.

22. Coker-Gurkan, Ajda et al. "Roscovitine-Treated Hela Cells Finalize Autophagy Later Than Apoptosis By Downregulating Bcl-2". *Molecular Medicine Reports* (2014): n. pag.
23. Villerbu, Nathalie et al. "Cellular Effects Of Purvalanol A: A Specific Inhibitor Of Cyclin-Dependent Kinase Activities". *International Journal of Cancer* 97.6 (2002): 761-769.
24. Coker-Gurkan, Ajda et al. "Purvalanol Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis And Autophagy In A Time-Dependent Manner In HCT116 Colon Cancer Cells". *Oncology Reports* (2015): n. pag.
25. Nishida, Yuya et al. "Discovery Of Atg5/Atg7-Independent Alternative Macroautophagy". *Nature* 461.7264 (2009): 654-658.
26. Scarlatti, F et al. "Role Of Non-Canonical Beclin 1-Independent Autophagy In Cell Death Induced By Resveratrol In Human Breast Cancer Cells". *Cell Death and Differentiation* 15.8 (2008): 1318-1329.
27. Pattingre, Sophie et al. "Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy". *Cell* 122.6 (2005): 927-939.
28. Erlich, S., et al. (2007). Differential Interactions Between Beclin 1 and Bcl-2 Family Members. *Autophagy*, 3(6), 561-568.
29. Maiuri, M. C., et al. (2007). BH3-Only Proteins and BH3 Mimetics Induce Autophagy by Competitively Disrupting the Interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-XL. *Autophagy*, 3(4), 374-376.
30. "The Autophagy Effector Beclin 1: A Novel BH3-only Protein." *Oncogene*. U.S. National Library of Medicine, 2009.
31. "ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery." *Molecular Biology of the Cell*. U.S. National Library of Medicine, n.d.
32. "mTOR Regulation of Autophagy." *FEBS Letters*. U.S. National Library of Medicine, 2010.
33. "Essential Roles of Atg5 and FADD in Autophagic Cell Death: Dissection of Autophagic Cell Death into Vacuole Formation and Cell Death." *The Journal of Biological Chemistry*. U.S. National Library of Medicine, 2005.
34. "Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy." *Annual*

- Review of Genetics*. U.S. National Library of Medicine, 2009.
35. "Roscovitine-induced Up-regulation of P53/AIP1 Protein Precedes the Onset of Apoptosis in Human MCF-7 Breast Cancer Cells." *Molecular Cancer Therapeutics*. U.S. National Library of Medicine, 2004.
  36. "Calpain, Atg5 and Bak Play Important Roles in the Crosstalk between Apoptosis and Autophagy Induced by Influx of Extracellular Calcium." *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*. U.S. National Library of Medicine, 2012.
  37. "Ubiquitin-dependent Lysosomal Membrane Protein Sorting and Degradation." *Molecular Cell*. U.S. National Library of Medicine, 2014
  38. "Inhibiting the Cyclin-dependent Kinase CDK5 Blocks Pancreatic Cancer Formation and Progression through the Suppression of Ras-Ral Signaling." *Cancer Research*. U.S. National Library of Medicine, 2010.
  39. "Knockdown of Autophagy-related Protein 5, ATG5, Decreases Oxidative Stress and Has an Opposing Effect on Camptothecin-induced Cytotoxicity in Osteosarcoma Cells." *BMC Cancer*. U.S. National Library of Medicine, 2013.
  40. "AMPK and MTOR Regulate Autophagy through Direct Phosphorylation of Ulk1." *Nature Cell Biology*. U.S. National Library of Medicine, 2010.
  41. "Role of PI3K/AKT/mTOR Signaling in the Cell Cycle Progression of Human Prostate Cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. U.S. National Library of Medicine, 2003.
  42. Nishida, Yuya, Satoko Arakawa, Kenji Fujitani, Hirofumi Yamaguchi, Takeshi Mizuta, Toku Kanaseki, Masaaki Komatsu, Kinya Otsu, Yoshihide Tsujimoto, and Shigeomi Shimizu. "Discovery of Atg5/Atg7-independent Alternative Macroautophagy." *Nature* 461.7264 (2009): 654-58.
  43. Grottemeier, Antje, Sebastian Alers, Simon G. Pfisterer, Florian Paasch, Merle Daubrawa, Alexandra Dieterle, Benoit Viollet, Sebastian Wesselborg, Tassula Proikas-Cezanne, and Björn Stork. "AMPK-independent Induction of Autophagy by Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Increase." *Cellular Signalling* 22.6 (2010): 914-25.
  44. White, E. et al. "Autophagy, Metabolism, and Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer*

*Research*. U.S. National Library of Medicine, 2015.

45. Fleming, Angeleen et al. "Chemical Modulators of Autophagy as Biological Probes and Potential Therapeutics." *Nature Chemical Biology*, 2010.
46. Jaber, N, and WX Zong. "Class III PI3K Vps34: Essential Roles in Autophagy, Endocytosis, and Heart and Liver Function." *Annals of the New York Academy of Sciences.*, U.S. National Library of Medicine, 2013.
47. Antonioli, Luca et al. "Immunity, Inflammation and Cancer: a Leading Role for Adenosine." *Nature Reviews Cancer*, 2013.
48. Strasser, Andreas. "The Role of BH3-Only Proteins in the Immune System." *Nature Reviews Immunology*, 2005.
49. Eisenberg-Lerner, A et al. "Life and Death Partners: Apoptosis, Autophagy and the Cross-Talk between Them." *Cell Death and Differentiation*, 2009.
50. Nabel, Elizabeth G. "CDKS and CKIS: Molecular Targets for Tissue Remodelling." *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002.
51. Bukanov, Nikolay O. et al. "CDK Inhibitors R-Roscovitine and S-CR8 Effectively Block Renal and Hepatic Cystogenesis in an Orthologous Model of ADPKD." *Cell Cycle*, Landes Bioscience, 2012.

## 6. EKLER

### Ek A: Cihazlar

*Tablo 6.1: Laboratuvarda kullanılan cihazlar*

Adı	Ürün Kodu	Firma
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
Derin dondurucu	2041D	Arçelik
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore Direct q-5UV
Dondurucu (-80°C)	U725	New Brunswick Scientific
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
Elektroforez sistemi	1658004	Bio-Rad
Akış sitometri cihazı	AC6531180147	BD Biosciences
Floresan mikroskopu	1X71	Olympus
Güç kaynağı	1645050	Bio-Rad
Hassas tartı	LE6202S	Sartorius
HPLC cihazı	120	Agilent Technologies
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific
İnverted mikroskop	XDS-1B	SOIF
Laminar flow	12469 2000	Thermo Scientific
Laminar flow	LN090	Nüve
Manyetik karıştırıcı	SB162	Stuart Equipment
Mikropipet (0,5-10 µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200 µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200-1000 µl)	T27274	Thermo Scientific
Optik mikroskop	701	Ivymen
Otoklav cihazı	OT40L	Nüve
pH metre	N315	SEM BIO Technologies
Rotasyon cihazı	SRT9D	Stuart Equipment
Santrifüj cihazı	5417R	Eppendorf

Santrifüj cihazı	5810R	Eppendorf
Santrifüj cihazı	22331	Eppendorf
Soğutmalı etüv	ES120	Nüve
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Spektrofotometre	2100	Amershan Biosciences
Stereo mikroskop	V12	Zeiss
Transfer cihazı	10016505C	Bio-Rad
Vorteks	SA8	Stuart Equipment



## Ek B: Hücre Kültürü Donanımları

*Tablo 6.2: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler*

Adı	Ürün Kodu	Firma
100 mm petri	93100	TPP
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
25 cm <sup>2</sup> hücre büyütme kabı	90026	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
75 cm <sup>2</sup> hücre büyütme kabı	90076	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
DMEM	D5671	Sigma-Aldrich
Enjektör	21G	ASTRAJECT
FBS	10500-064	Gibco
Hemositometre	640110	Marienfeld-Superior
Kriyovial tüp	V7634	Thermo Scientific
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Steril pipet (10 ml)	94010	TPP
Steril pipet (5 ml)	94005	TPP
Şırınga filtresi (0,22 mm)	99722	TPP
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco

## Ek C: Kimyasallar

*Tablo 6.3: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler*

Adı	Ürün Kodu	Firma
2-merkaptöetanol	S4805940 517	Merck
2-merkaptöetanol	M7522	Sigma-Aldrich
Agaroz	A9539	Sigma-Aldrich
Akrilamid/Bis-akrilamid %30 Çözelti	A9099	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Ampisilin	P06-07100	PAN-Biotech
Asetik asit	27225	Sigma-Aldrich
Bakır sülfat	02791	Merck
Coomasie mavisi	A3480	Applichem
Çinko sülfat	08883	Merck
Disodyum EDTA	2937	Applichem
Disodyum fosfat	A4229	Applichem
DMSO	K46505343 517	Merck
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich
Etanol	CAS 64-17-5	AlkoMed
Floksuridin	F0503	Sigma-Aldrich
Glisin	3570	Calbiochem
Hidrojen peroksit	K39218400838	Merck
Hidroklorik asit	K43804717239	Merck
İzopropanol	K44518295321	Merck
Kalsiyum klorür	02382	Merck
Luminol	A2185	Applichem
Magnezyum sülfat	05886	Merck
Manganaz klorit	2087	Applichem
M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent	78501	Thermo Scientific
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT	M2128-5G	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Scientific

p-Kumarik asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Propidyum iyodür	P4170	Sigma-Aldrich
Ponceau kırmızısı	A1405	Applichem
Potasyum dihidrojen fosfat	A2946	Applichem
Potasyum sitrat	89306	Sigma-Aldrich
Saf etanol	32221	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	UN1888	Applichem
Sığır serum albumin	A2153	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	A2941	Applichem
SuperBlock™ T20 Blocking Buffer	37536	Thermo Scientific
TEMED	A1148 0100	Applichem
Tris-baz	648310	Calbiochem
Tris-HCl	648317	Calbiochem
Tween 20	S6740684 348	Merck
Yağsız süt tozu	SC-2325	Santa-Cruz Biotechnology

## Ek D: Çözeltiler

**Tablo 6.4: 10X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH 7,4**

1 L için;	
Sodyum klorür (NaCl)	80,0 gr
Potasyum klorür (KCl)	2,0 gr
Disodyum hidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	14,4 gr
Mono potasyum fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,4 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 7,4'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır.

**Tablo 6.5: Hücre Dondurma Medyası**

10 ml için;	
Fetal sığır serumu (FBS)	9 ml
Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)	1 ml

Hücre kültürüne uygun DMSO kullanılarak hazırlanan medya 0,22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir. Dondurulan hücreler sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanır.

**Tablo 6.6: 1,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH 8,8**

500 ml için;	
Tris-baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	90,8 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 8,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

**Tablo 6.7: 0.5 M Tris-Baz Çözeltisi, pH 6,8**

500 ml için;	
Tris-baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	30,25 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	500 ml

Tris-baz 800 ml suyun içinde belirtilen miktarda çözülerek pH 6,8'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

**Tablo 6.8: Hücre Lizis Tamponu (CLB)**

10 ml için;	
M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent	10 ml
Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli	1 tablet
Roche® proteaz inhibitör kokteyli	1 tablet

Hazırlanan CLB +4°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.9: 5X Laemmlı Tamponu**

10 ml için;	
1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8)	2,0 ml
%1 (ağırlık/hacim) bromofenol mavisi	0,5 ml
Gliserol	5,0 ml
β-merkaptoetanol	2,5 ml
Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	2,0 gr

Hazırlanan Laemmlı tamponu -20°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.10: %10 (ağırlık/hacim) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi**

100 ml için;	
Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	10,0 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	100 ml

Hazırlanan SDS çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilir.

**Tablo 6.11: %30 (hacim/hacim) Akrilamid/Bis-Akrilamid Çözeltisi**

100 ml için;	
Akrilamid (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	29,2 gr
Bis-Akrilamid (C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,8 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	100 ml

Hazırlanan akrilamid/bisakrilamid çözeltisi +4°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.12: %10 (ağırlık/hacim) Amonyum Persülfat (APS)**

10 ml için;	
Amonyum persülfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	1,0 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	10 ml

Hazırlanan APS çözeltisi -20°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.13: %12 (hacim/hacim) Poliakrilamid Jel**

	Alt jel	Üst jel
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	3,4 ml	3,075 ml
Tris-Baz çözeltisi	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,125 ml (0,5 M, pH 6,8)
%10 (ağırlık/hacim) SDS	0,1 ml	0,05 ml
%30 (hacim/hacim) Akrilamid/Bis-akrilamid	4,0 ml	0,67 ml
%10 (ağırlık/hacim) APS	0,05 ml	0,025 ml
Tetrametiletildiamin (TEMED)	0,005 ml	0,005 ml

**Tablo 6.14: 10X Yürütme Tamponu, pH 8,3**

1 L için;	
Tris-baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	30,3 gr
Glisin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	144,0 gr
Sodyum dodesil sülfat (SDS, NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	10,0 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	1000 ml

Tris-baz ve glisin 800 ml distile su içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. SDS bu aşamadan sonra eklenir ve çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır.

**Tablo 6.15: 10X Transfer Tamponu, pH 8,3**

1 L için;	
Tris-baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	30,3 gr
Glisin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	144,0 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 8,3'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır. %20 metanol içerir.

**Tablo 6.16: 10X Tris Tampon Çözeltisi (TBS), pH 7,6**

1 L için;	
Tris-baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	12,11 gr
Sodyum klorür (NaCl)	86,6 gr
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	1000 ml

Kimyasallar 800 ml suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek pH 7,6'ya ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır. TBS-Tween çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 (hacim/hacim) oranında Tween eklenir.

**Tablo 6.17: %5 (ağırlık/hacim) Süt Çözeltisi**

50 ml için;	
Yağsız süt tozu	2,5 gr
1X TBS-T çözeltisi	50 ml

Hazırlanan süt çözeltisi -20°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.18: Bradford Çözeltisi**

250 ml için	
Coomassie mavisi (C <sub>47</sub> H <sub>50</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> )	25,0 mg
%95 (hacim/hacim) etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	12,5 ml
%85 (hacim/hacim) asetik asit (CH <sub>3</sub> COOH)	25,0 ml
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	212,5 ml

Hazırlanan süt çözeltisi +4°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.19: 1 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH 8,5**

500 ml için;	
Tris-baz (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	60,5 g
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	500 ml

Hazırlanan 1 M Tris-baz çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilir.

**Tablo 6.20: Kumarik Asit Çözeltisi**

10 ml için;	
p-Kumarik asit (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	0,15 gr
Dimetilsülfoksit (DMSO, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)	10 ml

Hazırlanan kumarik asit çözeltisi +4°C'de muhafaza edilir.



**Tablo 6.21: Luminol Çözeltisi**

10 ml için;	
Luminol (C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	0,44 gr
Dimetilsülfoksit (DMSO, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO)	10 ml

Hazırlanan Luminol çözeltisi -20°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.22: Kemiluminesans Çözeltisi**

Kemiluminesans A Çözeltisi	
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Kumarik asit çözeltisi	45,0 µl
Luminol çözeltisi	100,0 µl
Kemiluminesans B Çözeltisi	
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	6,0 µl

A ve B çözeltileri hazırlandıktan sonra karıştırılır ve karanlık koşullarda kullanılır.

**Tablo 6.23: PBS/BSA Çözeltisi**

50 ml için;	
BSA	0,5 gr
1X PBS çözeltisi	50 ml

Hazırlanan PBS/BSA çözeltisi +4°C'de muhafaza edilir.

**Tablo 6.24: Blok Çözeltisi**

50 ml için;	
BSA	0,5 gr
%10 (ağırlık/hacim) SDS çözeltisi	2,5 ml
1X PBS çözeltisi	50 ml

Hazırlanan Blok çözeltisi +4°C'de muhafaza edilir.

**Ek E: Antikorlar****Tablo 6.25: Çalışmada kullanılan antikorlar**

<b>Adı</b>	<b>Ürün Kodu</b>	<b>Firma</b>
$\beta$ -Actin (13E5)	4970	Cell Signaling Technology
Akt (pan) (C67E7)	4691	Cell Signaling Technology
AMPK $\alpha$ (D63G4)	5832	Cell Signaling Technology
Atg12 (B88H11)	4180	Cell Signaling Technology
Atg16L1 (D6D5)	8089	Cell Signaling Technology
Atg3	3415	Cell Signaling Technology
Atg5 (D5F5U)	12994	Cell Signaling Technology
Atg7 (D12B11)	8558	Cell Signaling Technology
Bcl-2	610538	BD Biosciences
Bcl-x	610209	BD Biosciences
Beclin-1	612112	BD Biosciences
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E)	9664	Cell Signaling Technology
LC3A/B (D3U4C) XP®	12741	Cell Signaling Technology
mTOR (7C10)	2983	Cell Signaling Technology
PARP	9542	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP®	4060	Cell Signaling Technology
Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172) (40H9)	2535	Cell Signaling Technology
Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP®	5536	Cell Signaling Technology
Phospho-Raptor (Ser792)	2083	Cell Signaling Technology
Phospho-ULK1 (Ser 757)	6888	Cell Signaling Technology
SQSTM1/p62	5114	Cell Signaling Technology