



**SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRESİNDE  
SOĞUK STRESİN TRANSKRİPTOMİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nazmi ÖZGEN**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL**

**Doktora Tezi-2026**

T.C  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRESİNDE SOĞUK STRESİN  
TRANSKRİPTOMİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nazmi ÖZGEN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALI

Doktora Tezi

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL

Tez Jüri Üyeleri  
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Prof. Dr. Şengül YÜKSEL  
Prof. Dr. Ahmet KOÇ  
Prof. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR  
Prof. Dr. Ebru ÖNALAN

Bu araştırma YÖK 100/2000 Doktora bursu kapsamında Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Tedavisi ve Genom çalışmaları öncelikli alan ve İnönü Üniversitesi Bilimsel araştırma Projeleri Birimi Tarafından TDK-2024/ 3525 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2026

**T.C.**  
**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne**

**ETİK BEYANI**

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak “Prof. Dr. Şengül YÜKSEL” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “SH-SY5Y Nöroblastoma Hücresinde Soğuk Stresin Transkriptomik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Doktora Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.  
20/01/2026

Nazmi ÖZGEN

İmza

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	ix
ABSTRACT.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Nöroblastoma ve SH-SY5Y Hücre Hattı .....	3
2.2. Hüresel Stres .....	4
2.3. Kanser Mikroçevresi ve Bileşenleri .....	5
2.3.1. Soğuk stresi .....	5
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi .....	8
2.5. Ubikitin .....	10
2.5.1. The Ubikitin-Proteozom Sistemi .....	11
2.6. RNA Dizileme.....	11
2.7. Transkriptom Analizi .....	13
2.8. Apoptoz.....	14
2.9. Hücre Kültürü .....	15
2.10. Hücre Kültürü Ortamlarının Bileşenleri .....	15
2.10.1. Amino Asitler.....	16
2.10.2. Vitaminler .....	16
2.10.3. Glukoz ve Enerji Kaynağı.....	16
2.10.4. Hormonlar ve Büyüme Faktörler .....	16
2.10.5. Tamponlar .....	17
2.11. PCR .....	17
2.11.1. Kantifikasyon (Nicel Analiz) .....	18
2.11.2. Problar .....	19
2.11.3. Floroforlar ve FRET Mekanizması .....	19
2.11.4. Uygulama Alanları .....	20
2.12. Western Blot .....	20
3. MATERYAL VE METOT .....	22

3.1. Materyal .....	22
3.1.1. Cihazlar ve Kimyasallar .....	22
3.2. Metot .....	23
3.2.1. Hücre Kültürü .....	23
3.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması .....	23
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi .....	23
3.2.4. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması .....	24
3.2.5. Hücrelerin Dondurulması .....	24
3.2.6. Deney Grupları ve Soğuk Stresi Uygulaması .....	24
3.2.7. RNA İzolasyonu ve RNA Sekanslama .....	25
3.2.8. cDNA Eldesi ve Real Time PCR .....	27
3.2.9. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi .....	28
3.2.10. Apoptoz Analizi .....	30
3.2.11. Hücre Döngüsü Analizleri .....	31
3.2.12. İstatistiksel Analiz .....	32
4. BULGULAR .....	33
4.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi .....	33
4.2. RNA Sekans Analizi .....	34
4.2.1. Kalite Kontrolü .....	35
4.2.2. Isı Haritası .....	36
4.2.3. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi .....	37
4.2.4. PCA (Temel Bileşenler Analizi) .....	38
4.2.5. Gen Ontolojisi ve Yolak Zenginleştirme analizi .....	39
4.2.6. Sekans Ekspresyon Verileri .....	48
4.3. RT-qPCR ile Gen İfadeleme Analizi .....	50
4.3.1. ATF 6 Gen İfadeleme .....	50
4.3.2. Carhsp1 Gen İfadeleme .....	50
4.3.3. Hsp90 Gen İfadeleme .....	51
4.3.4. Lin28A Gen İfadeleme .....	52
4.3.5. P53 Gen İfadeleme .....	52
4.3.6. Uba52 Gen İfadeleme .....	53
4.3.7. Xbp1 Gen İfadeleme .....	53
4.3.8. Ybx1 Gen İfadeleme .....	54
4.4. Western Blot ile Protein İfadeleme Analizi .....	54

4.4.1. Atf6 Protein İfadelenmesi .....	54
4.4.2. Hsp90 Protein İfadelenmesi .....	55
4.4.3. Xbp1 Protein İfadelenmesi.....	56
4.4.4. P53 Protein İfadelenmesi .....	57
4.4.5. Uba52 Protein İfadelenmesi.....	58
4.4.6. Ybx1 Protein İfadelenmesi.....	59
4.4.7. Carhsp1 Protein İfadelenmesi .....	60
4.4.8. Lin28A Protein İfadelenmesi .....	61
4.5. Apoptoz Analizi .....	63
4.6. Hücre Döngüsü Analizi.....	64
5. TARTIŞMA .....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR .....	71
EKLER.....	82
EK-1. Özgeçmiş.....	82
EK-2. Etik Kurul Onay Formu Geremediğine Dair Yazı .....	83

## TEŐEKKÜR

Tez araştırmam ve Doktora eğitimim süre zarfında bilgi, birikim ve deneyimleriyle yardımda bulunan ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli ve kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Şengül YÜKSEL'e tez çalışması sırasında değerlendirme ve yöntemlerde tavsiyelerde bulunan Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, tez izleme komitesinde yer alan değerli katkılarıyla yol gösteren Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e, doktora süresince her türlü tecrübe ile destek olan Prof. Dr. Cüneyt Asım ARAL ve Doç. Dr. Kübra ARAL'a teőekkür ederim. Doktora sürecim boyunca yalnızca akademik anlamda değeril, manevi desteği ve yol gösterici duruşuyla da bana güç veren Prof. Dr. Ahmet KIZILAY'a değerli katkıları için teőekkür ederim. Doktora döneminde bana ev sahipliği yapıp kapılarını aralayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki Öğretim Üyelerine, laboratuvar çalışmalarımnda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Muhammed DÜNDAR, İrem Nur MENEVŐE, İlayda ŐEKEROĐLU, Eda UĞUR, Melike ALP ve Nefsun DANIŐ'a teőekkür ederim.

Nazmi ÖZGEN

## ÖZET

### SH-SY5Y Nöroblastoma Hücresinde Soğuk Stresin Transkriptomik Etkilerinin Araştırılması

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı soğuk stresinin nöroblastoma hücreleri üzerine etkilerinin transkriptomik ve protein seviyeleri düzeyinde araştırmaktır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanıldı. Soğuk stres modelinde kullanılan hücreler 37°C (Kontrol), 31°C ve 25°C sıcaklıklarında ve 3, 6, 12, 24 saat sürelerinde inkübe edildi. Her sürenin sonunda RNA sekans verileri ve gen ekspresyonu için RNA izolasyonu, western blot için protein ekspresyonu, apoptoz düzeyleri için Annexin-V FITC yöntemi, hücre döngüsü için PI analizi yapıldı. İstatistiksel veriler için tek yönlü ANOVA testi uygulanıp sonuçlar değerlendirildi.

**Bulgular:** SH-SY5Y hücrelerinde düşük sıcaklığın etkileri değerlendirildi ve özellikle 25 °C’de hücre morfolojisinin belirgin şekilde bozulduğu görüldü. RNA-seq analizleri, soğuk stresinin özellikle 31 °C 3 saat ve 25 °C 24 saat koşullarında anlamlı gen baskılanmasına neden olduğu saptandı. qPCR ve Western blot seviyeleri ATF6, HSP90 ve LIN28A’nın bazı koşullarda arttığını, CARHSP1, TP53, UBA52 ve XBP1’in ise çoğunlukla azaldığı saptandı. 25 °C’de inkübasyon süresi uzadıkça apoptoz oranlarının arttığı ve hücre döngüsü fazlarında belirgin değişimler meydana geldiği belirlendi.

**Sonuç:** Çalışmamız da düşük sıcaklık stresinin SH-SY5Y hücrelerinde morfoloji, gen/protein ifadesi, apoptoz ve hücre döngüsü üzerinde belirgin etkiler oluşturduğunu özellikle 25 °C’de hem hücresel bütünlük bozulmuş hem de genetik yanıtlar güçlü şekilde değişmiş olup soğuk stresinin SH-SY5Y hücrelerinde hem moleküler hem de fonksiyonel düzeyde yeniden programladığını ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, Mikroçevre, Soğuk stresi, SH-SY5Y

## ABSTRACT

### Investigation of the Transcriptomic Effects of Cold Stress in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells

**Aim:** The aim of this study is to investigate the effects of cold stress on neuroblastoma cells at the transcriptomic and protein levels.

**Materials and Methods:** The SH-SY5Y neuroblastoma cell line was used in this study. Cells were incubated at 37°C (Control), 31°C, and 25°C for 3, 6, 12, and 24 hours under a cold stress model. At the end of each time point, RNA isolation was performed for sequencing and gene expression analysis, protein expression was evaluated by Western blot, apoptosis levels were measured using the Annexin-V FITC method, and cell cycle distribution was assessed using PI analysis. Statistical evaluation was conducted using one-way ANOVA.

**Results:** The effects of low temperature on SH-SY5Y cells were evaluated, and cell morphology was found to be markedly impaired, particularly at 25 °C. RNA-seq analyses revealed that cold stress led to large-scale, significant gene suppression, especially under the conditions of 31 °C for 3 hours and 25 °C for 24 hours. qPCR and Western blot results showed that ATF6, HSP90, and LIN28A increased under certain conditions, whereas CARHSP1, TP53, UBA52, and XBP1 mostly decreased. It was determined that the rate of apoptosis increased and significant alterations occurred in cell cycle phases as the incubation time at 25 °C was extended.

**Conclusion:** This study demonstrates that cold stress induces notable changes in morphology, gene/protein expression, apoptosis, and cell cycle dynamics in SH-SY5Y cells. Particularly at 25°C, both cellular integrity and genetic responses were markedly affected, indicating that cold stress leads to molecular and functional reprogramming in SH-SY5Y cells.

**Key Words:** Cancer, Microenvironment, Cold stress, SH-SY5Y

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µl</b>	:Mikrolitre
<b>µM</b>	:Mikromolar
<b>ATF6</b>	:Aktive edici transkripsiyon faktör-6
<b>Ca</b>	:Kalsiyum iyonu
<b>CARHSP1</b>	:Kalsiyum ile düzenlenen ısıya dayanıklı protein 1
<b>DMEM</b>	:Dulbecco's modified eagle medium
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik asit
<b>ER</b>	:Endoplazmik retikulum
<b>ERAD</b>	:Endoplazmik retikulum ile ilişkili degradasyon
<b>FBS</b>	:Fetal bovin serum
<b>HSP90</b>	:Isı şoku proteini 90
<b>Kb</b>	:Kilo baz
<b>LIN28A</b>	:Lin-28 homolog A
<b>miRNA</b>	:MikroRNA
<b>mM</b>	:Milimolar
<b>mRNA</b>	:Mesajcı RNA
<b>ncRNA</b>	:Kodlanmayan RNA
<b>PCR</b>	:Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PERK</b>	:PKR benzeri endoplazmik retikulum kinaz
<b>piRNA</b>	:Piwi etkileşimli RNA
<b>RNA</b>	:Ribonükleik asit
<b>RT-PCR</b>	:Reel time PCR
<b>TP53</b>	:Tümör proteini p53
<b>UBA52</b>	:Ubiquitin A-52 kalıntısı ribozomal protein füzyon ürünü 1
<b>UPR</b>	:Katlanmamış protein cevabı
<b>XBP-1</b>	:X box bağlayıcı protein
<b>YBX1</b>	:Y-kutu bağlayıcı protein 1

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil No</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 4.1. Kontrol 37 °C ve 31 °C 3,6,12 ve 24. Saatlerde hücre morfolojik görüntüsü.....	33
Şekil 4.2. Kontrol 37 °C ve 25 °C 3,6,12 ve 24. Saatlerde hücre morfolojik görüntüsü.....	34
Şekil 4.3. Diferansiyel Ekspresyon Gösteren Genlerin Isı Haritası .....	37
Şekil 4.4. PCA (Temel Bileşenler Analizi) grafiği .....	39
Şekil 4.5. B grubu /A grubu Gen Ontolojisi .....	40
Şekil 4.6. B grubu /A grubu Yolak Analizi .....	41
Şekil 4.7. C grubu /A grubu Gen Ontolojisi .....	42
Şekil 4.8. C grubu/A grubu Yolak Analizi .....	43
Şekil 4.9. D grubu /A grubu Gen Ontolojisi .....	44
Şekil 4.10. D grubu /A grubu Yolak Analizi.....	45
Şekil 4.11. E grubu/A grubu Yolak Analizi .....	46
Şekil 4.12. E grubu /A grubu Yolak Analizi .....	47
Şekil 4.13. Soğuk stresinin ATF 6 gen ifadenmesi üzerine etkileri .....	50
Şekil 4.14. Soğuk stresinin CARHSP1 gen ifadenmesi üzerine etkileri .....	51
Şekil 4.15. Soğuk stresinin HSP90 gen ifadenmesi üzerine etkileri.....	51
Şekil 4.16. Soğuk stresinin LİN28A gen ifadenmesi üzerine etkileri.....	52
Şekil 4.17. Soğuk stresinin P53 gen ifadenmesi üzerine etkileri.....	52
Şekil 4.18. Soğuk stresinin UBA52 gen ifadenmesi üzerine etkileri .....	53
Şekil 4.19. Soğuk stresinin XBP1 gen ifadenmesi üzerine etkileri .....	54
Şekil 4.20. Soğuk stresinin YBX1 gen ifadenmesi üzerine etkileri.....	54
Şekil 4.21. Soğuk stresinin ATF6 protein miktarı üzerine etkileri .....	55
Şekil 4.22. Soğuk stresinin HSP90 protein miktarı üzerine etkileri.....	56
Şekil 4.23. Soğuk stresinin XBP1 protein miktarı üzerine etkileri .....	57
Şekil 4.24. Soğuk stresinin P53 protein miktarı üzerine etkileri .....	58
Şekil 4.25. Soğuk stresinin UBA52 protein miktarı üzerine etkileri.....	59
Şekil 4.26. Soğuk stresinin YBX1 protein miktarı üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.27. Soğuk stresinin CARHSP1 protein miktarı üzerine etkileri.....	61
Şeki 4.28. Soğuk stresinin LİN28A protein miktarı üzerine etkileri .....	62

**Şekil 4.29.** Soğuk stresinin apoptoz etkileri ..... 63

**Şekil 4.30.** Soğuk stresinin hücre döngüsüne etkileri..... 64



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Laboratuvarında kullanılan cihazlar .....	22
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan moleküler test kitleri, solüsyonlar ve markaları .....	23
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışma grupları ve uygulama şartları .....	25
<b>Tablo 3.4.</b> RT -qPCR primer sekans verileri. ....	28
<b>Tablo 3.5.</b> SDS-PAGE ayırıcı jel bileşenleri .....	30
<b>Tablo 3.6.</b> SDS-PAGE istifleme jel bileşenleri .....	30
<b>Tablo 3.7.</b> Western Blot Analizinde Kullanılan Antikorlar .....	30
<b>Tablo 4.1.</b> Karşılaştırmalarda tespit edilen gen sayıları .....	35
<b>Tablo 4.2.</b> Deney gruplarının kırılma öncesi ve sonrası kalite verileri .....	36
<b>Tablo.4.3.</b> Karşılaştırmalara göre zenginleştirilmiş kategorilerin sayısı .....	38
<b>Tablo 4.4.</b> B Grubu/A Grubu gen ifadesi verilerinin karşılaştırılması .....	48
<b>Tablo 4.5.</b> C Grubu /A Grubu gen ifadesi verilerinin karşılaştırılması .....	48
<b>Tablo 4.6.</b> D Grubu /A Grubu gen ifadesi verilerinin karşılaştırılması .....	49
<b>Tablo 4.7.</b> E Grubu/ A Grubu gen ekspresyon verilerinin karşılaştırılması .....	50

# 1. GİRİŞ

Kanser, 20. yüzyılda en çok korkulan hastalıklardan biri olmuş ve 21. yüzyılda görülme sıklığı giderek artarak küresel ölçekte ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Yaşam süresinin uzaması, çevresel faktörlerdeki değişim ve modern yaşam biçiminin getirdiği yeni alışkanlıklar, kanser insidansının endişe verici düzeyde artmasına neden olmaktadır. Güncel veriler, her dört bireyden birinin yaşamı boyunca kanser gelişme riski taşıdığını ve insanların giderek artan şekilde çeşitli kanserojen bileşiklere maruz kaldığını göstermektedir (1). Kanser hücreleri; bağımsız büyüme sinyalleri üretme, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, sınırsız replikatif kapasite, metastatik potansiyel ve bağışıklık sisteminden kaçış gibi temel özellikler göstermektedir. Ayrıca güncel çalışmalar, tümör mikroçevresi ve çevresel faktörlerin de kanserin oluşumu ve ilerlemesinde belirleyici olduğunu göstermektedir (2).

Kanser mikroçevresi; tümör hücreleri, stromal hücreler, bağışıklık sistemi elemanları, fibroblastlar, endotel hücreleri, ekstraselüler matriks (ECM) ve tümörün metabolik-fiziksel koşullarını içeren karmaşık bir yapıdır. Bu mikroçevre tümör gelişimi, ilerlemesi, metastazı ve tedavi yanıtını belirleyen en önemli unsurlardan biridir. Kanser mikroçevresinin temel özelliklerinden biri, çeşitli fiziksel ve kimyasal stres faktörlerine maruz kalmasıdır. Bu stres faktörleri arasında hipoksi, asidik pH, oksidatif stres, mekanik basınç ve sıcaklık değişimleri yer alır (3-6). Kanser, hücrelerin normal büyüme ve bölünme mekanizmalarını kaybetmesi sonucunda ortaya çıkan anormal proliferasyonla karakterizedir. Hücrelerde oluşan malign transformasyonunun yanı sıra, hücrelerin mikroçevresindeki fiziksel değişimler de kanserleşme prosesinde önemli rol oynamaktadır (7,8).

Çevresel sıcaklıktaki dalgalanmalar, bakterilerden yüksek organizma düzeyindeki ökaryotlara kadar geniş bir canlı yelpazesinde görülen temel stres faktörleri arasında yer almaktadır. Prokaryotik ve ökaryotik sistemlerin ısı şoku stresine verdiği yanıt, çok sayıda organizma ve model hücre sistemi üzerinde kapsamlı şekilde araştırılmış ve ısı şoku proteinlerin temel işlevleri, ısı stresi tarafından hücreye uygulanan yükü azaltmaya ve hücrede oluşan bu stresle başa çıkmaya yardımcı olmaktır. Isı şoku proteinlerinin hücresel stres yükünü azaltma ve protein homeostazını koruma gibi işlevlere sahip olduğu bilinmektedir. Buna karşın, soğuk stres yanıtı üzerine yapılan çalışmalar nispeten sınırlı olup, özellikle memeli hücrelerinde soğuk stresine adaptasyonu düzenleyen moleküler

mekanizmalar hâlâ tam olarak çözülememiştir (9,10). Mevcut veriler, tüm organizmalarda soğuk şoka karşı benzer hücrel yanıtın ortaya çıktığını; özellikle soğuk şok proteinlerinin (CSP'ler) hızlı ve güçlü şekilde indüklenerek adaptif bir yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Düşük sıcaklık uygulamaları, son yıllarda yalnızca hücre canlılığı ve rekombinant proteinlerin üretkenliğini artırma amacıyla değil, aynı zamanda soğuk koşullarda gerçekleşen biyolojik süreçlerin moleküler düzeyde anlaşılmasına katkı sağlamak amacıyla da kullanılmaktadır (11). Memeli hücrelerinde soğuk stresine bağlı olarak hücre döngüsünün duraksaması, apoptozun ertelenmesi, protein sentezindeki değişiklikler, belirli mRNA'ların miktar ve stabilitesindeki artış ve transkripsiyon faktörlerinin soğuk-indüklenmiş promotörlerle etkileşimleri gibi çeşitli moleküler mekanizmaların aktif olduğu bilinmektedir (11, 12).

Bu bağlamda, soğuk stresinin kanser hücrelerinde oluşturduğu transkriptomik değişikliklerin anlaşılması hem kanser biyolojisine hem de stres fiziolojisine ilişkin yeni yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Özellikle nöroblastoma gibi agresif tümörlerde soğuk stresinin hücrel yanıtları tetikleme biçiminin aydınlatılması, yeni tedavi stratejilerine yönelik potansiyel hedeflerin belirlenmesine de zemin hazırlayabilir.

Bu tez çalışması, kanser mikroçevresi bileşenlerinden biri olan soğuk stresinin hücrelerin transformasyonu, kanserin ilerlemesi ve yayılması süreçlerinde baskılayıcı rol oynayabileceği hipotezi üzerine kurgulanmıştır. Bu kapsamda çalışmamızda SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde soğuk stresinin oluşturduğu transkriptomik yanıtların kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulguların hem soğuk stresinin moleküler mekanizmalarının hem de kanser hücrelerinin çevresel streslere verdiği adaptif yanıtların anlaşılmasına bilimsel açıdan önemli katkılar sunması beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nöroblastoma ve SH-SY5Y Hücre Hattı

Sinir sistemi, elektriksel ve kimyasal sinyallere son derece duyarlı olup vücut işlevlerinin ve tepkilerinin çoğunu düzenleyen kompleks bir yapıdan oluşmaktadır. Sinir sistemi, beyin ve omuriliği içeren merkezi sinir sistemi (MSS) ve gangliyonları MSS'ne bağlayan periferik sinir sisteminden (PNS) oluşmaktadır. Sinir sistemi hücreleri, elektrokimyasal sinyaller yoluyla bilginin iletilmesinden sorumlu olan nöronlar ve çeşitli görevlere sahip yardımcı glial hücreleridir (13).

SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı geliştirilen ilk in vitro modellerden biri olup, nörotoksisite deneylerinde yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Hücreler nöroblast olarak uygun koşullarda muhafaza edilebilir ya da nöron benzeri morfolojilere de farklılaştırılabilir. Bu özelliğe sahip olmaları in vitro koşullarda çoğalma ve farklılaşmayla beraber hücreler üzerinde toksisite gibi durumların incelemek için bir model haline getirir (14). SH-SY5Y hücre hattı 1970 yılında 4 yaşındaki bir kız çocuğundan metastatik kemik iliği alınan biyopsisinden elde edilmiş olan SK-N-SH hücre hattının 3 kez klonlanmış bir alt klonudur. SK-N-SH hücre hattı, morfolojik olarak hem nöroblast benzeri hem de epitel benzeri fenotip içermektedir ve her iki hücre grubuna da dönüşüm yeteneği vardır. SH-SY5Y hücreleri, 46 kromozom barındıran stabil bir karyotipe sahiptir. Retinoik Asit, forbol esterleri ve nörotrofik faktör gibi bazı spesifik nörotrofinlerin kullanımı yoluyla nöroblastik formdan olgun insan nöronlarına farklılaştırılabilirler. Yapılan bazı çalışmalarda, SH-SY5Y hücrelerinin çeşitli yöntemler ile nöronlara özgü kolinerjik, adrenerjik ve dopaminerjik fonksiyonları kazanabilecekleri gösterilmiştir (15,16). SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşma ve farklılaşmamasının hücre morfolojisi ve fonksiyonları üzerinde oldukça önemli olduğu çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri farklılaşmadığında, hızla çoğalır ve kutuplaşmamış morfolojik özellik gösterirler. Genellikle kümeler halinde büyürler ve olgunlaşmamış nöron hücrelerini gösteren belirteçleri sergilerler. Farklılaştıklarında ise bu hücrelerin uzun proliferasyonu düşük olur ve uzun dallanmış uzantılar oluştururlar, bazı durumlarda ise polarize olurlar. Tamamen farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin büyümeyle ilişkili protein (GAP-43), sinaptofizin (SYN), nöron spesifik enolaz (NSE) nöronal çekirdekler (NeuN), sinaptik vezikül proteini II (SV2) ve mikrotübül ilişkili protein (MAP) dahil olmak üzere olgun nöronların çeşitli farklı markerlarını ifade ettiği ve glial fibriller asidik protein

(GFAP) 4 gibi glial markerların ifadesinden yoksun olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (17). Farklılaşmış SH-SY5Y hücrelerinin homojen bir nöronal popülasyonu temsil ettiği yönündeki bulgulara ek olarak, nörotrofik faktörün ortamdan uzaklaştırılması hücrel apoptozla sonuçlanmaktadır. Bu sayede SH-SY5Y hücrelerinin farklılaşması sonucunda olgun nöronlara benzer şekilde nörotrofik faktörlere bağlı olduğunu düşündürmektedir (15,18,19).

SH-SY5Y nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı) başta olmak üzere viral enfeksiyonların (poliovirüs, enterovirüs 71, varisella-zoster virüsü) patogenezinin araştırılmasında da kullanılmaktadır. Nörovirolojik araştırmalar için SH-SY5Y hücrelerinin hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış formları kullanılmaktadır (20).

## **2.2.Hücrel Stres**

Hücrel stres, normal hücrel koşulların dışındaki bir değişimden dolayı, hücrenin iç yapısına ya da işlevlerine zarar veren durum olarak tanımlanabilir. Stres hem hücre içi hem de hücre dışından kaynaklanabilir. Hücrel stres tepkisi (HST), hücrenin kendi üzerinde oluşabilen zararı önlemeyi, bunlarla başa çıkmayı ve hasarı onarmayı hedef haline getiren fizyolojik bir tepki mekanizmasıdır. HST hücreleri veya organizmayı olumsuz koşullarda korumakla birlikte sağkalım durumları yetersiz olursa hasarlı hücreleri apoptoza yönlendirir (21). Sonuç olarak hücrel stres durumu stres tepkisi ile hücrel sağkalım arasında oluşan denge belirler.

Ökaryotik hücreler, yaşam boyunca farklı türdeki farklı fizyolojik streslere karşı evrimleşmişlerdir. Isı Şoku Protein (HSP) yolları ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) savunma mekanizmaları gibi bazı HST yolları evrimsel olarak korunmuştur. Bununla beraber hücrel stres tepkisi genellikle hücrenin hayatta kalması veya hücre ölümü arasında ki homeostatik dengelenme sürecinde proteomik ürünlerde aktif değişiklikler gerektirir. Hücrel stres oluşumu başladığında belirli bir proteinin üretimindeki bu tür değişiklikler hücrel boyutta sıkı bir şekilde düzenlenir ve oluşan stresin seviyesine, zamanlamasına ve türüne bağlı olarak kromatin yeniden şekillenmesi, mRNA sentezi, translasyon, protein modifikasyonu ve protein degradasyonu gibi hücrel düzeyde fonksiyonel değişimler meydana gelebilir (22).

Gen ifadesinin translasyonel kontrolü, adaptasyon ve stres tepkisi için benzersiz katkılar sunar (23). Protein sentezi, bir hücrede en fazla enerji tüketen süreç olduğundan bu sürecin hızlı ve stres altında baskılanması hücrel enerji rezervlerinin etkin şekilde

kullanmasına neden olur. Bu yüzden elde edilen enerji kaynakları, hücrenin gerek adaptasyonu gerekse hayatta kalması için kullanılabilir hale gelir. Stres koşullarında hücrenin transkriptomu ve proteomu arasında sınırlı bir şekilde korelasyon vardır. Hücresel strese hayatta kalma ve adaptif proteinleri kodlayan mRNA'ların translasyonu artırılırken, temel hücresel proteinleri kodlayan mRNA'ların translasyonu güçlü bir şekilde baskılanır bu da stres altında olan hücrenin protein sentezi için yeniden programlanmasını gerektirir.

Hücresel stres yanıtının önemli bir diğer yönü, stresin ortadan kalkması ya da hafiflemesi durumunda hücreyi yeniden bir denge durumuna döndürebilme yeteneğidir. Hücrenin normal fizyolojik aralığa geri dönememesi durumunda ortaya çıkan hücresel değişiklikler çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar. Translasyonun yeniden programlanması, stres adaptasyonu ya da stresin çözülmesi sonrasında oluşan fizyolojik durumlarda homeostatik koşulların yeniden kurabilme kapasitesi hücrenin translasyonel kontrolünde çok önemli bir diğer temel özelliğini oluşturur (24-26).

### **2.3. Kanser Mikroçevresi ve Bileşenleri**

Kanser mikroçevresi ısı, pH, hipoksi, besin düzeyi, bağışıklık hücreleri, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi birçok faktörün etkileşimiyle oluşan dinamik bir sistemdir. Bu faktörlerde ki değişiklikler tümör hücreleri üzerinde proliferasyon, metabolizma, apoptoza karşı direnç veya ölüm gibi durumları belirler (27-29)

#### **2.3.1. Soğuk stresi**

Organizmalar ortam sıcaklığındaki değişimlere yanıt olarak çeşitli fizyolojik modifikasyonlar geliştirmişlerdir. Bu konuda ilk olarak *Drosophila*'da bir dizi protein olan, ısı şoku proteinlerinin (HSP) çevresel sıcaklık değişimlerine bağlı olarak hücresel tepki mekanizmasını indüklediği ortaya kondu (30). Sonraki dönemlerde diğer prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda çeşitli HSP'ler keşfedildi. HSP indüksiyonunu sağlayan sıcaklık aralıkları organizmalar arasında değişmekle birlikte genellikle organizmanın fizyolojik sıcaklık aralığıyla ilişkili olduğu görülmektedir. Örneğin memeli ve kuşlar için bu değer 40-50 °C, maya hücreleri için 35-37 °C ve bitki hücreleri için de 35-40 °C olarak belirlenmiştir (31). HSP indükleyen sıcaklık değerleri sadece organizmalar arasında değil aynı zamanda aynı organizmanın hücre tiplerinde de farklılık gösterebilmektedir (32). HSP'ler sıcaklık stres değişim koşullarının yanı sıra normal sıcaklık koşullarında da protein katlanması, parçalanması ve taşınması gibi süreçlerde de fonksiyon görürler (33).

## **Isı Şok Proteinleri**

Hem ökaryotik hem de prokaryotik canlılarda iyi bir şekilde korunmuş ısı şoku proteinleri (HSP) proteostazın düzenlenmesinde görev alan büyük bir protein ailesidir. Yeni sentezlenen polipeptit zincirlerin düzgün katlanması, metastabil olan proteinlerin yeniden katlanması, protein agregatlarının çözülmesi, yanlış katlanan proteinlerin parçalanması gibi birçok süreçte aktif olarak rol oynarlar (34,35). Normal fizyolojik şartlarda HSP'ler, hücrede bulunan toplam proteinin yaklaşık %5–10'unu oluşturur ve proteostazi hücrenin işlevi için koordineli bir şekilde çalışırlar. Ancak aşırı stres altında, ısı şoku transkripsiyon faktörleri (HSF) aktive olur ve bu durum strese yanıt olarak hücreyi korumak amacıyla HSP genlerinin yüksek düzeyde transkripsiyonuna neden olur (36,37). Bununla birlikte küçük moleküller ağırlığa sahip şaperon proteinleri HSP'lerle beraber ökaryotik organizmada hücrel pek çok sürece katılırlar ve pek çok hastalıkta HSP'lerin işlevsel bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir (38). HSP'ler yalnızca konstitutif düzenlemede değil DNA hasarı, oksidatif stres, ısı, hipoksi gibi durumlarda da hücrel homeostaziyi korumak için gerek hücrel yapı gerekse hücrel işlevlerde de önemli roller üstlenir (39).

HSP90; farklı hücre yüzey reseptörleri ve sinyal yolları sayesinde hem bağışıklık yanıtı için düzenleyici hem de uyarıcı etkiler gösterebilen çok yönlü fonksiyona sahip bir şaperondur. Antijen sunan hücrelerde (APC), HSP90 belirli reseptörlerle örneğin; CD36, CD91 ve TLR2/4 etkileşime girdiğinde, sitotoksik T lenfositlerin (CD8<sup>+</sup> T hücreleri) proliferasyonunu baskılayarak T hücresi yanıtlarını düzenler. Ayrıca hsp90 diğer bazı reseptörlere bağlandığında otoimmün otoimmün yanıtların oluşmasını da sağlar (40, 41).

## **Soğuk Şok Proteinleri**

Ortam sıcaklığının düşük olması durumunda soğuk stresine maruz kalan mikroorganizmalarda, bazı soğuk şoku proteinlerinin sentezlendiği gösterilmiştir (42). Soğuk stresine yanıt olarak bitkilerde de soğuk şok proteinlerinin aktive olduğu bilinmektedir (43). Memeli hücrelerinde ise soğuk stresine yanıt olarak soğuk toleransı, adaptif termojenez gibi kısıtlı alanlarda yapılmış bazı sınırlı sayıda araştırmaya ulaşabildik. Memeliler gibi çok hücreli organizmaların soğuk stresi ile başa çıkmak için bakteri ve bitkilerden farklı savunma mekanizmaları geliştirdikleri gösterilmiştir. Bununla beraber kültür hücrelerinin ek hücreli organizmalarla benzer moleküler mekanizmalara sahip olduğu bildirilmiştir (31).

Soğuk şok proteinleri soğuk stresi maruziyetinde spesifik olarak sentezlenen ve evrimsel olarak korunan proteinlerdir. Bu proteinler bir veya birkaç soğuk domain alanı içerirler ve DNA'ya bağlanabilirler. Soğuk şok proteinleri ilk olarak bakterilerde tanımlanmıştır. Ani sıcaklık düşmelerine karşı hızlı bir şekilde sentezlenirler. Örnek olarak sıcaklığın 37 °C'den 10 °C'ye düşüşü, yalnızca birkaç dakika içinde soğuk şok proteini A (CspA) ekspresyonunun yaklaşık 200 kat artmasına sebep olur (44). Bu ani artış transkripsiyonel aktiviteden bağımsız olarak gerçekleşir ve bu hızla gerçekleşen indüklenebilirlik özellik farklı türlerde korunmuştur. Son yapılan çalışmalar genom çapında analiz sonucunda RNase R ve CspA'nın soğuk stres yanıtında başlıca roller üstlendiği ortaya konmuştur. Hatalı katlanmış RNA'ları parçalayarak hücrel homeostasiyi sağlayan RNase R, çift sarmallı RNA moleküllerinin yapısını çözerek translasyon işlevini kolaylaştıran CspA çok önemli yapılara sahiptir. RNase R, yanlış katlanmış RNA'ları parçalamaktan sorumlu gibi görünürken CspA, translasyonu etkinleştirmek için çift sarmallı RNA'ları eritir (45-49). Y-kutusu protein ailesi, insanlarda soğuk şok domaini (CSD) içeren proteinlerin en belirgin grubunu oluşturmaktadır. YBX1 geni tarafından kodlanan ve DNA bağlayıcı protein B (DbpB) olarak da tanınan Y-kutusu bağlayıcı protein-1, bu ailenin temel üyesidir. Aynı zamanda YBX3 geni tarafından kodlanan DNA bağlayıcı protein A (DbpA) ve YBX2 geni tarafından kodlanan DNA bağlayıcı protein C (DbpC) de bu ailede bilinen iki üye arasında yer alır (50-53). Gelişimsel açıdan önemli olan ve insanlarda ifade edilen bir diğer soğuk şok proteini *Caenorhabditis elegans*'ta gelişimsel düzenleyici olan lin28'dir. Bu proteini öne çıkaran özellik hücrel yeniden programlama kapasitesine sahip olmasıdır. Nanog, Oct3, Soc2 gibi pluripotent durumu düzenleyen faktörlerle beraber lin28, farklılaşmış hücrelerin pluripotent duruma geri döndürülmesinde rol alabilir. Bunun yanı sıra en dikkat çekici özelliklerinden biri let-7 ailesine ait miRNA'ları baskılayabilmesidir. Bu özellik glikoz metabolizması gibi temel hücrel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynar. Let-7 miRNA'lar da lin28'i hedef alarak iki yönlü negatif geri bildirim döngüsünü oluşturur. Lin 28 proteini sadece miRNA'larla değil aynı zamanda mRNA'larla da etkileşime girer. Bu etkileşim doğrultusunda translasyonel durumları düzenleme amacıyla stres granülleri ve P-cisimcikleri gibi ribonükleoprotein komplekslerine katılarak mRNA'lara bağlanır (53-58). İnsanlara ait soğuk şok protein ailesinin bir diğer üyesi ise kalsiyumla düzenlenen ısıya dayanıklı protein 1 (CARHSP1)'dir. CRHSP-24 olarak da tanımlanan bu protein, yaklaşık 24 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Başlangıçta, kalsiyum/kalmodulin yoluyla düzenlenen protein fosfataz kalsinörünün bir substratı olarak

tanımlanmıştır. Yapısal olarak, beyne özgü bir soğuk şok proteini olan PIPPin'in paralogu olarak kabul edilmektedir. CARHSP1'in fonksiyonel olarak önemi, özellikle tümör nekroz faktörü (TNF) mRNA'sı ile olan etkileşiminde ortaya çıkar. Bu protein P-cisimcikleri ve ekzosomlar içerisinde tümör nekroz faktörü (TNF) mRNA'sına bağlanarak onun hücrel stabilitesini artırır. Bu özelliği sayesinde CARHSP1'i post-transkripsiyonel gen ifadesinin düzenlemesinde önemli bir yapı haline getirmektedir (59-61).

#### **2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi**

Proteostaz hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi açısından temel bir mekanizmadır. Bu dengenin bozulması durumunda kardiyovasküler, nörodejeneratif ve onkolojik hastalıklar olmak üzere çeşitli patolojik durumlara yol açabilir. Bu sürecin işlenmesinde Endoplazmik Retikulum (ER), sentezlenen protein polipeptitleri için kalite kontrol birimi olarak önemli bir rol oynar (62,63).

Stres koşullar altında sentezlenen yanlış katlanmış olan proteinler, ER içindeki katlanma işleyişinden çıkarılarak sitozole taşınır ve bu sitozolde ubikuitin-proteazom sistemi üzerinden çeşitli yollarla parçalanır. Bu işleyiş, genel olarak ER ile ilişkili protein yıkımı (ER-associated degradation, ERAD) olarak tanımlanır. Fakat yanlış katlanmış proteinlerin hücrede kalıcı olarak birikmesi sonucunda ER stresi oluşur ve bu strese bağlı olarak katlanmamış protein yanıtı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen bir adaptif yanıt başlatılır. UPR aktivasyonu ile genel hücrel translasyonun baskılanması, strese ilişkili gen ifadelerinin düzenlenmesi ve hücrel protein homeostazisi için dengelenemeyen durumlarda programlı hücre ölümü (Apoptozis) kararların alınması bu sistemde yer alır (64,65,66,67).

Katlanmamış protein yanıtı (UPR), ER'de yer alan üç sensör aracılığıyla; PKR-benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve inozitol gerektiren enzim 1 (IRE1) hücrel düzenleme sağlar. Protein katlanması, oksidatif stres yanıtı, otofaji, mitokondriyal disfonksiyon, ERAD, çeşitli metabolik yollarında bulunan süreçlerde UPR'nin hedef genleri ile ilişkilidir. Bu hedef proteinlerin ekspresyon düzeyi, hücrenin bulunduğu dokuya tipik farklılıklar gösterebilir (68-70). Normal koşullarda bu sensörler, şaperon protein olan Binding İmmunoglobulin Protein (BİP)'e bağlı halde inaktif durumda bulunurlar (71). Yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesi, bu proteinlerin BİP ile rekabete girerek sensörlere bağlandığı düşünülmektedir PERK,

ATF6 ve IRE1 aktif hale gelmesi için BIP'in reseptörlerden ayrılması gerekir ve bu ayırım sonrasında UPR aktivasyonu gerçekleşir.

IRE1–XBP1 yolağı; Hücrede oluşan ER stresine karşı ortaya çıkan katlanmamış protein yanıtının (UPR) temel mekanizmalarından biridir. IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), hem ribonükleaz hem de protein kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteindir. IRE1, aktive edildiğinde dimerize ya da oligomerize olur ve bu yapı değişikliğinden dolayı protein kinaz domainindeki pozitif düzenleyici bölgelerin transfosforilasyonunu uyarır. Bu fosforilasyondan olayından sonra, IRE1'in aktif formu olan IRE1p'nin oluşumunu sağlar. Adenozin nükleotidleri (ATP/ADP) gibi yardımcı etkenler aracılığıyla ribonükleaz aktivitesi meydana gelir. IRE1'in nükleaz aktivasyonundan sonra, metazoonlarda UPR'ye özgü bir transkripsiyon faktörü olan XBP1'in (X-box binding protein 1) mRNA'sında bulunan 26 nükleotidlik bir intron bölgesi kesilerek çıkarılır. Bu özgü olan bölgedeki kesimin sonucunda, translasyonel olarak aktif olmayan eklenmemiş XBP1 (XBP1u) formu, aktif izoform olan eklenmiş XBP1 (XBP1s)'e dönüşür. Bu dönüşüm neticesinde, UPR'nin transkripsiyonel düzenleyici kolunun etkinleşmesinde önemli bir rol oynar (72-74). ATF6-ATF6f-bZip yolağı; ATF6 (Activating Transcription Factor 6), 90 kDa moleküler ağırlığında sürekli olarak ifade edilen bir proteindir. ATF6, tip II transmembran protein yapısında olup, ER lümeninde ve sitozolik kısımda NH<sub>2</sub>-terminal bölgesi ile karakterize yapıya sahiptir. Bazik-lösin fermuar (bZIP) ailesine ait bir transkripsiyon faktörü işlevi görebilecek yapıdadır. ATF6, normal fizyolojik şartlarda inaktif halde iken, ER stresi oluştuğunda Site-1 proteaz ve Site-2 proteaz'ları tarafından kesilirler, bu kesim işleminden sonra, XBP1'in transkripsiyonunu kontrol eden olarak aktif olan sitozolik parça (ATF6f) halinde serbest olurlar (75-77).

ATF6 $\alpha$  (Activating Transcription Factor 6 alpha); Memelilerdeki katlanmamış protein yanıtı (UPR) mekanizmasını yöneten temel bir düzenleyici ve transmembran proteindir. Aynı zamanda ATF6 $\beta$ , OASIS, CREBH, LUMAN ve BBF2H7 gibi üyeleri barındıran bir transmembran ER stres sensörleri ailesinin de tipik model örneğidir. IRE1 $\alpha$  ve PERK gibi UPR bileşenlerinin geniş doku ifadesinden farklı olarak, bu gelişmekte olan stres yanıt protein ailesinin çoğu hücre tipi ya da dokuya özgü olarak ifade edilmektedir. Hücrel ER stresi altında, ATF6 $\alpha$  ER'den golgi aparatına taşınır. Bu bölümde, spesifik golgi aygıtında işlev gören proteazlar tarafından transmembran bölgesinden kesilerek sitozolik kısmı (ATF6 $\alpha$ f) serbest bırakılır. Bu aktif yapı, daha sonra çekirdeğe transloke olup burada XBP1 ve ATF4 tarafından düzenlenen UPR hedef

genlerinin ifadelerini artırarak bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Bu süreçte, hücrenin ER stresine karşı adaptif bir yanıt geliştirmesine olanak sağlar ve hücreyi proteotoksik hasara karşı koruduğu da ayrıca düşünülmektedir. Bununla beraber, ATF6α'nın işlevi sadece koruyucu mekanizmalarla sınırlı kalmamaktadır. Aynı zamanda bazı çalışmalar diferansiyasyona yönlendirilmiş bir miyoblast hücre hattında, ATF6α aktivasyonunun sadece ölmeye eğilimli hücrelerde seçici olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu da ATF6α'nın proapoptotik bir rol üstlenebileceğini öne sürmektedir. Ayrıca buna takiben, ATF6α aktivitesinin inhibisyonu bu hücrelerin hayatta kalma oranını artırmıştır. Yine benzer şekilde, bir makrofaj hücre hattında, lipopolisakkarit (LPS) ve interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ile tetiklenen hücre ölümü esnasında ATF6α aktivitesi artmış, ancak ATF6α'nın dominant negatif formunun ekspresyonu, bu dış etkenlerle indüklenen hücre ölümünü baskılamıştır (76,78-83).

ATF4; PERK aracılı yolda ve mRNA yapısı bakımından özgünlüğe sahip en iyi tanımlanmış protein üyesidir. Bu mRNA zinciri, ATF4 açık okuma çerçevesinden (ORF) önce konumlanmış pek çok yukarı akış açık okuma çerçevesi (upstream ORF, uORF) içerir. Bu alışılmadık moleküler organizasyon yapısı, normal fizyolojik şartlarda ribozomal yeniden birleştirmenin etkili ve verimli olması halinde ATF4'ün translasyonunu baskılar; bundan dolayı ribozomlar uORF'leri tanıyarak ana ORF'ye ulaşmadan translasyon işlemini başlatır. Bununla beraber, Endoplazmik Retikulum stresi oluştuğunda PERK aktivasyonu ile birlikte mRNA üzerindeki ribozomal birleştirme etkinliği azalır. Bu durumla birlikte, ribozomların uORF'leri göz ardı edilmesi ve böylece ATF4'ün başlangıç kodonuna ulaşmasına olanak tanır. Bunun sonucunda ise stres şartlarında ATF4 protein düzeyleri artar. Proapoptotik transkripsiyon faktörlerinden biri olan CHOP geninin transkripsiyonunu da aynı zamanda ATF4 artırır. Bu sebeple ATF4'ün sadece hücre için bir koruyucu mekanizmanın olmanın yanı sıra, programlı hücre ölümünü destekleyen (apoptoz) bir uyarıcı faktör olarak ta bir rol üstlenebileceğini göstermektedir (66,84).

## 2.5. Ubikitin

Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), hücrel metabolizmanın gerek fizyolojik gerekse patolojik süreçlerle ilişkili tüm yönlerine doğrudan veya dolaylı olarak dahil olan merkezi bir düzenleyici ağıdır. UPS'yi oluşturan çok sayıda bileşenin yüksek düzeyde düzenlenmiş ve koordineli etkileşimi, sistemin işleyişine dair henüz tam olarak aydınlatılmamış düzenleyici mekanizmaların anlaşılmasını güçleştirmektedir. Bununla

birlikte, bu yapısal ve işlevsel karmaşıklık, sistemin farklı bileşenlerinin çevresel ve hücrel koşullara bağlı olarak seçici şekilde hedeflenmesine olanak tanır. Bu durum, UPS'nin tamamı üzerinde hassas ve özgül düzenlemelerin gerçekleştirilmesini mümkün kılmaktadır (85).

### **2.5.1. The Ubikitin-Proteozom Sistemi**

Ökaryotik hücrelerde hücre içindeki proteinlerin büyük bir kısmı, ubikitin-proteozom sistemi (UPS) aracılığıyla düzenli protein yıkımını ve proteostazın sürdürülmesini sağlayarak parçalanmaktadır. Bu sistem iki temel aşamadan ile gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki; Küçük ve evrimsel açıdan oldukça korunaklı bir protein olan ubikitin, yıkıma hedeflenen spesifik protein substratlarına kovalent olarak bağlanır. Bu işleyiş, sırasıyla E1 (ubikitin-aktifleştirici enzim), E2 (ubikitin-konjugatlayıcı enzim) ve E3 (ubikitin ligaz) olarak adlandırılan üç farklı enzim sınıfına ait koordinasyonla gerçekleştirilir. Bu enzim molekülleri, substrat protein üzerine ubikitin zincirlerinin eklenmesini sağlar ve bu şekilde protein, proteazomal yıkım için işaretlenmiş olur. Bir diğer aşama ise küçük molekül olan ubikitin ile işaretlenmiş proteinler, büyük ve multikatalitik bir proteolitik kompleks yapısı olan 26S proteozom tarafından tanınarak degradasyona uğratılır. Proteozom sistemi substratı tanıdıktan sonra protein üzerindeki ubikitin zincirleri, proteazoma bağlı deubikitinaz (DUB) enzimleri tarafından geri dönüştürülmek üzere uzaklaştırılır. Sonrasında hedef protein, proteozomun içindeki proteolitik boşluğa aktarılarak burada kısa peptit zincirlerine ayrılır. Ayrılan peptitlerin bir kısmı, immün denetim mekanizmaları kapsamında hücre yüzeyinde major histocompatibility complex (MHC) sınıf I molekülleri aracılığıyla sunulabilirken, diğer kalan kısımlar ise sitoplazmik aminopeptidazlar tarafından daha küçük parçalara ayrılarak serbest amino asitlere dönüşüm sağlanır. Böylelikle hem protein dengesi sağlanır hem de hücre içindeki amino asit döngüsü verimli bir şekilde tamamlanmış olur (86-88).

### **2.6. RNA Dizileme**

RNA dizilemesi (RNA-sekanslama), moleküler araştırmalarda on yıldan biraz daha uzun bir süre önce geliştirilmiş olup, o tarihlerden bu yana moleküler biyolojide yaygın biçimde kullanılan ve genomik işlevlerin anlaşılmasında hemen hemen her yönüyle önemli katkılar sağlayan kapsamlı transkriptom analizine dayanan bir araç haline gelmiştir. RNA dizilemesi çoğunlukla farklı gen ifadesi (Differential Gene Expression,

DGE) analizlerinde kullanılmaktadır. Bir gen ifadesi analizinin temel aşamaları, RNA-seq protokolünün temel basamakları önemli ölçüde sabit kalmış, bu süreçte yalnızca teknik seviyelerde bazı optimizasyonlar gerçekleşmiştir. Standart analiz süreci, laboratuvar ortamında RNA ekstraksiyonu ile başlayıp, mRNA zenginleştirme veya ribozomal RNA'nın uzaklaştırılması, sonrasında cDNA sentezi ve adaptörlerle ligasyon işlemiyle dizileme kütüphanesinin hazırlanması işleyişi takip eder. Oluşturulan kütüphane, sıklıkla *Illumina* gibi yüksek verimli platformlar kullanılarak, her örnek için 10 ila 30 milyon okuma derinliğine ulaşacak şekilde dizileme işlemi yapılır. Analiz sürecinden sonraki aşamaları biyoinformatik analizleri içermektedir. Bu aşamalarda elde edilen dizileme okumaları bir referans transkriptoma hizalanır ve/veya yeniden birleştirilir; transkriptlerle eşleşen okumalar sayısal olarak ifade edilir (niceleme), ardından örnekler arasında filtreleme ve normalizasyon işlemleri gerçekleştirilir. Son aşamada, örnek grupları arasında bireysel gen veya transkriptlerin ifade düzeylerindeki anlamlı farklılıklar istatistiksel modelleme yaklaşımları yoluyla değerlendirilir. İlk RNA dizileme uygulamaları, tüm doku örneklerinden yani hücre türü ayrıştırılmamış doku örneklerinden elde edilen DGE verilerine dayanmakta olup, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mus musculus* ve *Homo sapiens* gibi çeşitli model organizmalarda kullanılarak yöntemin evrenselliği ortaya konmuştur. Her ne kadar “RNA-seq” terimi, zamanla farklı yönetsel yaklaşımlar ve biyolojik uygulamaları kapsayan kapsayıcı bir kavram haline gelmiş olsa da DGE analizi, RNA-seq teknolojisinin öncelikli ve en yaygın kullanım alanı olmaya devam etmektedir. Günümüzde RNA-seq analizi, standart bir analiz aracı olarak kabul edilmekte ve çok çeşitli biyolojik sistemlerin gerek yapısal gerek fonksiyonel olarak farklı sorulara yanıt aramak amacıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır (89-94).

Moleküler biyolojide genetik bilginin akışı santral dogma olarak tanımlanır. DNA'da saklanan bilgi, RNA'ya transkribe edilir ve ardından proteinlere translasyon yoluyla aktarılır. Bu DNA molekülündeki genetik bilginin çevresel faktörlerle etkileşimi sonucunda organizmanın fenotipi, yani gözlemlenebilir özellikleri ortaya çıkar. Hücre içindeki biyolojik süreçlerin düzenlenmesi, bir hücrenin kimliğinin belirlenmesi, genlerin bir alt kümesinin tamamlayıcı RNA molekülleri bütününe transkriptom denir (95) Transkriptom mekanizması oldukça kompleks bir yapıya sahiptir ve çeşitli kodlayan (*coding*) ve kodlamayan (*noncoding*) RNA türlerini barındırır. Tarihsel açıdan bakıldığında RNA molekülleri, moleküler biyolojinin santral dogmasında genler ile proteinler arasında sıradan bir ara ürün olarak görülmüştür. Bu sebeple, genetik kod

üzerinden protein sentezini sağlayan mesajcı RNA (mRNA) molekülleri RNA türleri arasında en çok incelenen tür olmuştur. Fakat protein kodlayan mRNA'ların yanında, hücrel fonksiyonlara sahip olan çeşitli kodlanmayan RNA (*ncRNA*) molekülleri de bu alanda yer edinmektedir. Daha son yıllara kadar ncRNA'ların çoğu, temel hücrel işlevleri yerine getiren bir yapı olduğu biliniyordu. Bu işlevler; Ribozomal RNA'lar (rRNA) ve taşıyıcı RNA'lar (tRNA); protein sentezinde görev alması, Küçük çekirdek RNA'lar (snRNA); RNA kesip birleştirme (*splicing*) işleminde rol oynaması, Küçük çekirdekçik RNA'lar (snoRNA); ribozomal RNA'ların kimyasal olarak değiştirilmesinde görev alması ncRNA'ların özelliğini içermektedir (96).

Son yıllar da moleküler biyoloji alanında ki gelişmelerle beraber kodlanmayan RNA'ların yeni sınıfları keşfedilerek RNA çeşitliliği de artmıştır. Örneğin; gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesi yine küçük kodlanmayan RNA'lar arasında yer alan mikroRNA ve piwi ile etkileşim halinde olan piRNA'lar da bu sınıfta yer alır (97). bir diğer grupta uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA) dır. Bu sınıfa ait RNA'lar ilk kez ökaryotik organizma olan farelerde büyük ölçekli cDNA kütüphanelerinin dizilemesinde tanımlanmıştır (98). LncRNA'lar, transkripsiyonel düzenleme, transkripsiyon sonrası işleme ve kromatin yeniden yapılandırması gibi birçok moleküler işlevde rol alabilir. Fakat bu RNA türlerinin büyük çoğunluğu henüz tam olarak tanımlanmamıştır (99-101).

## 2.7. Transkriptom Analizi

RNA-Sekansı aracılığıyla yapılan gen ifadesinin profillenmesi, hücrenin genel transkripsiyonel yapısına benzersiz bir bakış sunar. Dizileme teknolojileri ve deney protokolleri sürekli olarak gelişmekte, bu da RNA sekans alanında yeni bilişimsel (informatik) zorluklar ve uygulama alanlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. RNA-*seq*, sadece gen ekspresyon düzeylerini incelemekle kalmaz aynı zamanda yeni keşfedilen genlerin yapıları, *splice* varyasyonları sonucu oluşan izoformların tespit edilmesi ve allel spesifik gen ekspresyonu (ASE) gibi kompleks biyolojik süreçlerin çözümlenmesinde de kullanılır. Ayrıca RNA sekans tabanlı çalışmalar, gen ifadesi, allel-spesifik gen ekspresyonu ve *splays* varyasyonları genetik olarak ilişkili değişkenliklerin de bulunduğunu göstermiştir (102-105).

## 2.8. Apoptoz

Apoptoz (programlı hücre ölümü), gelişimsel ve fonksiyonel bozuklukları olan veya yaşlanmış hücrelerin genetik kontrol altında programlı bir süreç içerisinde ortadan kaldırılmasını sağlayan hücre ölüm mekanizmasıdır (106). Apoptoz ayrıca embriyonik dönemde organogenez mimari için fazla hücrelerin atrofisini de sağlamaktadır.

Hücrede apoptoz süreci, temel olarak iki ana yol üzerinden başlatılabilir:

- Kaspaz aracılı ekstrinsik (dıştan gelen sinyallere bağlı) yol
- İntrinsik (hücre içi stres kaynaklı) yol

Apoptoz süreci genel olarak hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalinin alınması yardımcı kaspazların etkisi ile efektör kaspazların aktifleşmesi, efektör kaspazların hedef proteinleri ve DNA'yı parçalaması, hücre içi yapısal ve biyokimyasal değişimlerin olması, hücrenin apoptotik cisimcik formunu alması ve bağışıklık hücreleri tarafından hücrenin fagositozu aşamaları ile gerçekleşir (107).

Bir hücrenin hayatta kalıp kalmayacağı veya apoptoz mekanizması ile ölüp ölmeyeceği, hücre içi ve çevresindeki pro-apoptotik (stres veya ölüm) sinyaller ile anti-apoptotik (mitojenik veya hayatta kalma) sinyaller arasındaki denge tarafından belirlenmektedir. Oksijen eksikliği, ısı stresi, kimyasal ajanlar, radyasyon, enfeksiyöz etkenler, genetik bozukluklar, beslenme dengesizlikleri, immünolojik reaksiyonlar (ör. anafilaksi) ve diğer şiddetli hücresel stres türleri hücre hasarına yol açarak pro-apoptotik yolları başlatır. Apoptozda meydana gelen düzensizleşme, hücre büyümesi ile hücre ölümü arasındaki homeostaziyi bozarak çeşitli fonksiyon bozukluğuna sebep olabilir (108). Pro-apoptotik proteinler (Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa) apoptozu destekler iken Anti-apoptotik proteinler ise (Mcl-1, Bfl-1, Bcl-XL, Bcl-2, Bcl-w ve Bcl-B) apoptozu engellemektedir (109).

Genel olarak bir hücrenin apoptoza girip girmeyeceği, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki denge ile sağlanmaktadır. DNA hasarına bağlı olarak prekanseröz lezyonlarda apoptozun devreye girmesi, potansiyel olarak zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak tümör gelişimini engelleyebilir. Ancak bu ölüm sürecinin bozulması, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açabilir ve bu da kanserin gelişimi, ilerlemesi ve tedavilere karşı direnç kazanmasıyla ilişkilidir. Bu sebeple apoptoz mekanizmasındaki bir bozulma, kanserin temel özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir (110-112).

Apoptoza dirençli molekülleri hedef alan tedavi stratejileri, kanser hücrelerini yeniden apoptoza karşı duyarlı hale getirmek ve mevcut tedavilerin yetersizliğini aşmak bakımından önemli bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (113,114).

## **2.9. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü, moleküler biyoloji ve mikrobiyolojide en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Kültür ortamı ökaryotik hücreler, bakteri ve birçok mikroorganizmanın büyümesi için gerekli besinleri içeren jel veya sıvı formda bir ortamdır. Hücre kültürü, belirli bir organın dokusundan alınan hücrelerin yapay olarak oluşturulan bir ortama yerleştirilmesini tanımlar. Bu yapay olan ortam, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan besinleri içerir.

Bu ortamın temel gereksinimleri şunlardır;

- Kontrollü bir çevrenin olması
- Doğru pH düzeyi ve ozmolalite değerlerinin korunması.

Hücre kültürü ortamı, hücrelerin yaşam döngüsünü sürdürebilmesi için; Doğru enerji kaynağını ve hücre döngüsünü yöneten birçok bileşiği içerir.

## **2.10. Hücre Kültürü Ortamlarının Bileşenleri**

Hücre kültürü ortamı; vitaminler, proteinler, glukoz, amino asitler, karbonhidratlar ve diğer birçok besin maddesinin karışımından oluşur. Bu bileşenler ya toz formda ya da hazır sıvı halde sağlanabilir. Kültür ortamındaki her bir bileşen, belirli bir biyolojik işlevi yerine getirir. Hücre kültürü ortamı, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan besinleri, tuzları ve büyüme faktörlerini sağlayan çeşitli bileşenleri içerir.

Bazal tuzlar; Hücre kültürü ortamındaki bazal tuz bileşenleri, hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümesi ve işlevlerini sürdürebilmesi için gerekli olan inorganik iyonları sağlar. Bu tuzlar sayesinde;

- Osmotik dengenin korunması
- Hücresel işlevlerin desteklenmesi
- Çeşitli metabolik süreçlerde kofaktör olarak görev yapma gibi temel

rollere sahiptir.

Bazal tuzlar, kültür ortamının temel bileşenlerinden biri olup, hücre büyümesi için in vivo fizyolojik koşulları simüle eden bir mikroçevre oluştururlar. Bu tuzların ortam içindeki konsantrasyonları özenle dengelenmiştir, böylece belirli hücre tipleri için

optimal büyüme koşulları sağlanabilir. Araştırmacılar yaptıkları hücre kültürü sonuçlarına göre, bazal tuz formülasyonlarını seçebilir veya özelleştirebilirler (115).

### **2.10.1. Amino Asitler**

Hücre kültürü ortamının hayati bileşenlerinden biri de amino asitlerdir. Bunlar, protein sentezinin yapı taşları olarak görev yapar ve birçok metabolik yolda rol alırlar. Hücre kültürü ortamları genellikle hücre büyümesi ve çoğalmasını desteklemek amacıyla, Esansiyel (vücut tarafından sentezlenemeyen) ve Non-esansiyel (vücut tarafından sentezlenebilen) amino asitlerin bir kombinasyonunu içerir. Bu amino asitlerin kültür ortamındaki konsantrasyonlarının dikkatlice dengelenmesi, hücrelerin özgül metabolik ihtiyaçlarına uygun bir çevrenin sağlanması açısından kritik öneme sahiptir.

### **2.10.2. Vitaminler**

Vitaminler, hücrelerdeki çeşitli biyokimyasal süreçler için az miktarda gerekli olan önemli organik bileşiklerdir. Hücre kültürü ortamında vitaminler, hücrelerin: büyümesini, metabolizmasını ve genel hücresel işlevlerini desteklemede önemli rol oynar. Bu vitaminlerin kültür ortamına dahil edilmesi, hücrelerin optimal büyümesi ve fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereken fizyolojik koşulları simüle eden bir ortamın oluşturulmasına yardımcı olur (116).

### **2.10.3. Glukoz ve Enerji Kaynağı**

Glukoz ve diğer enerji kaynakları, hücre kültürü ortamının hayati bileşenleridir. Bu maddeler, hücrelerin metabolizmasını sürdürebilmesi ve büyüebilmesi için gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır. Kültür ortamında kullanılacak enerji kaynaklarının seçimi, büyük ölçüde kültür ortamına alınan hücre tipinin metabolik tercihlerine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin; Bazı hücreler enerjiyi öncelikli olarak glikoliz yoluyla üretirken, diğerleri ise oksidatif fosforilasyon ya da alternatif enerji yollarını tercih edebilir. Hem hücrelerin metabolik özelliklerine hem de deneysel amaçlara göre, araştırmacılar glukoz ve diğer enerji kaynaklarının konsantrasyonlarını optimize ederler (115).

### **2.10.4. Hormonlar ve Büyüme Faktörler**

Hücre kültürü ortamındaki hormonlar ve büyüme faktörleri, hücresel aktivitelerin düzenlenmesinde ve büyümesinde kritik bir rol oynarlar. Hücrelerin büyümesini desteklemek ve belirli hücresel işlevlerin korunmasını sağlamak amacıyla kültür

ortamlarına sıklıkla ve yaygın olarak İnsülin, Epidermal büyüme faktörü (EGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi bileşenler hücrelerin metabolizmasını, sinyal iletim yollarını ve genel hücresel sağlığının düzenlenmesinde yardımcı eklenir. Aynı zamanda bu bileşenler vücut içi mikroçevreyi taklit ederek, hücrelerin kültür ortamında yaşamını sürdürmesi ve özgül fonksiyonlarını koruması için gerekli sinyalleri sağlar. Hangi hormon ve büyüme faktörlerinin kullanılacağı yine hücre tipine ve deneyin amacına göre belirlenir (117).

### 2.10.5. Tamponlar

Hücre kültürü ortamlarında bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) ve karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) en yaygın kullanılan tampon sistemidir. Bu tampon sistemi, stabil bir pH düzeyinin korunmasına yardımcı olur ve bu da hücrelerin sağlıklı büyümesi ve fonksiyonlarını sürdürebilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

- Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ); pH değişimlerine karşı direnç sağlayan birincil tampon görevi görür.
- Karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ); Bikarbonat dengesini düzenler ve ortam pH'nın stabil kalmasında rol oynar.

Bu iki yapısal bileşen arasındaki denge, pH'nın fizyolojik sınırlar içinde (genellikle 7.2-7.4) kalmasını sağlar. pH dengesinin korunması, hücresel süreçlerin sağlıklı bir şekilde devam etmesi ve in vitro deneylerin başarısı için hayati öneme sahiptir (118).

### 2.11. PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), biyolojik bilimler ve tıp alanının en güçlü araştırma araçları haline gelip, belirli DNA dizilerini çoğaltmak için kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Bu tekniğin RNA çalışmalarına uyarlanması ile öncelikle ters transkriptaz enzimi aracılığıyla RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) elde edilmesine ve ardından bu cDNA'nın PCR ile çoğaltılmasına dayanır; bu yöntem Ters Transkripsiyon PCR (RT-PCR) olarak tanımlanır. Fakat klasik PCR, güvenilir bir kantitatif analiz aracı olmadığı için geliştirilmiş ve günümüzde Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) adıyla anılan güçlü bir analiz yöntemi olarak ortaya çıkmıştır (119,120).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real-time PCR), kantitatif PCR olarak da tanımlanır ve PCR yönteminin bir modifikasyonudur. Bu metot, PCR sürecinin ilerleyişinin gerçek zamanlı olarak izlenmesine olanak tanır. Real-time PCR, in vitro

ortamda seçilen bir DNA bölgesinin birçok kez çoğaltılmasıyla binlerce hatta milyonlarca kopyasının üretilmesini sağlayan enzimatik bir süreçte rol alır.

Bu işlemde kullanılan temel bileşenler şunlardır:

- Şablon DNA
- Özgül primerler
- Nükleotitler (dNTP'ler)
- DNA polimeraz enzimi

Real-time PCR'ın klasik PCR'a göre avantajlarından biri sadece gelişmiş doğruluk, hassasiyet ve hız sağlaması değil; aynı zamanda başlangıçtaki hedef DNA miktarı ile belirli bir PCR döngüsünde biriken ürün, yani ampikon miktarı arasında güvenilir bir nicel ilişki kurabilmesidir (121,122).

Bu özelliğe sahip olunması;

- Gen ekspresyon analizlerinde mRNA miktarının doğru ölçümü (123).
- Klinik örneklerde viral genom tayini gibi uygulamalarda son derece önemlidir.

Ek olarak real-time PCR'da PCR sonrası ek analiz adımlarına gerek kalmadığı için, önceki ampikondan kaynaklanabilecek kontaminasyon riski en aza indirilmiş olur (121). Tüm bu nedenler sonucunda, Real-time PCR yöntemi hedef nükleik asitlerin tespit ve kantitatif analizinde bir yenilik yaratmış ve çok geniş bir uygulama alanı kazanmıştır (124).

### **2.11.1. Kantifikasyon (Nicel Analiz)**

Başlangıç PCR karışımında bulunan DNA moleküllerinin sayısı, belirli sayıda PCR döngüsünden sonra oluşacak ürün (ampikon) miktarını belirler. Eğer PCR işlemine başlarken yalnızca az sayıda DNA molekülü mevcutsa, oluşan ürün miktarı da az olacaktır. Buna karşılık başlangıçta çok sayıda DNA molekülü varsa, elde edilen ürün miktarı da daha fazla olacaktır. Bu doğrusal bağlantı sayesinde, üretilen ürün miktarı ölçülerek örnekteki başlangıç DNA miktarı hesaplanabilir. Geleneksel PCR yönteminde ürünler PCR işlemi tamamlandıktan sonra ölçüldüğü için, başlangıçtaki DNA miktarı ile ürün miktarı arasındaki nicel ilişki hassasiyetini kaybeder. DNA polimeraz reaksiyonunu engelleyen inhibitörlerin varlığı, reaktif miktarlarının sınırlı olması ve reaksiyon sırasında pirofosfat moleküllerinin birikmesi gibi faktörler doğruluğun azalması nedenleri arasında gösterilebilir. Real-time PCR, ürünün oluşumunu gerçek zamanlı olarak izleyebilme özelliği sayesinde özellikle eksponansiyel (üstel) fazda güvenilir bir kantitatif yöntem

haline gelmiştir. Ekspansiyel fazda oluşan ampikon miktarını tespit ederek, başlangıç karışımındaki DNA miktarına geri dönük bir hesaplama yapılabilir. Bu sayede, orijinal örnekteki nükleik asit konsantrasyonu doğru bir şekilde belirlenebilir (120,121).

### 2.11.2. Problar

Real-time PCR sistemlerinde, hedef DNA'nın tespiti ve kantifikasyonu için floresan bir belirteç taşıyan problar kullanılır. Genel olarak problar, kullanılan floresan ajana ve PCR'daki özgüllük düzeyine göre iki ana gruba ayrılır;

- Çift sarmallı DNA'ya bağlanan araya giren moleküllere dayalı problar:

Bu gruba *SYBR Green I* ve *EvaGreen* gibi ajanlar dahildir.

Bu moleküller yapılar, özgül ve özgül olmayan tüm ampikonları tespit eder.

- Oligonükleotidlere bağlanmış florofor içeren problar:

Bu grup sadece özgül ampikonları tespit eder.

Örnekler arasında;

Hidroliz probları (örneğin: TaqMan probu)

- İkili hibridizasyon probları
- Moleküler işaretçiler
- Scorpion probları yer alır

Aynı zamanda nükleik asit analoglarına dayanan özel problar da tanımlanmıştır (121, 125).

### 2.11.3. Floroforlar ve FRET Mekanizması

Florofor, belirli bir dalga boyundaki ışık enerjisini absorbe eden ve ardından bu enerjiyi daha uzun dalga boyunda floresan ışık olarak yeniden yayan bir moleküldür. Floroforlar genellikle iki temel gruba ayrılır;

- Donör (raportör)
- Akseptör (quencher, sönmüleyici)

Donör florofor, ışık enerjisini emdiğinde uyarılmış bir enerji seviyesine geçer. Bu molekül tekrar temel (ground) enerji seviyesine dönerken floresan ışık yayar. Eğer bu donör floroforun yakınında bir akseptör florofor bulunuyorsa, yayılan enerji bu ikinci moleküle aktarılabilir. Bu enerji aktarım süreci "floresan rezonans enerji transferi (FRET)" olarak adlandırılır (125).

FRET Mekanizmaları (FRET ve FRET-Sönümlenme), FRET iki farklı mekanizmaya göre gerçekleşebilir. Bunlara baktığımızda FRET-Sönümlenme (FRET-

quenching), Aktarılan enerji, floresan ışık olarak değil ısı şeklinde serbest bırakılır. Bu durumda akseptör molekül genellikle floresan olmayan bir sönmüleyicidir. FRET ise Eğer akseptör molekül floresan bir bileşense, aktarılan enerji floresan ışık olarak yeniden yayılır (125).

#### 2.11.4. Uygulama Alanları

Yüksek duyarlılık (*sensitivite*) ve özgüllük (*spesifisite*) sunmasının yanı sıra real-time PCR yöntemi hem niteliksel (kalitatif) hem de niceliksel (kantitatif) analizler için kullanılabilir. Bu sebeple, biyolojik örneklerdeki nükleik asitlerin hızlı ve hassas bir şekilde tespiti ve miktar tayini için tercih edilen yöntem haline gelmiştir.

Real-time PCR birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Bunlar;

- Gen ifadesi analizi
- Mutasyon tespiti
- Kanseri tanısı ve durumu belirleme
- MikroRNA analizi
- Genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) tespiti
- Bakteri tanısı ve kantifikasyonu
- Virüs tayini ve kantitatif viral analiz

Real-time PCR tekniği, sahip olduğu esneklik ve çok yönlü multidisipliner kullanım imkânı sayesinde; biyomedikal araştırmalar, mikrobiyoloji, veterinerlik, tarım, farmakoloji, biyoteknoloji ve toksikoloji gibi birçok bilim alanında yaygın şekilde kullanılmaktadır (125).

#### 2.12. Western Blot

İki boyutlu elektroforez ve kütle spektrometrisi gibi proteomik teknolojiler, yarı kantitatif protein profillemeye çalışmalarında kullanılan değerli araçlardır. Bu teknolojiler, geniş protein ekspresyon paternlerini belirlemeye olanak tanıyarak, moleküler olayların, sinyal iletim yollarının ve mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlar. Bu yöntemlerle elde edilen veriler doğrultusunda, bağımsız ve doğrulayıcı bir ikinci yöntem olan western blotting ile teyit edilir. Western blotting, ilk kez Towbin ve arkadaşları tarafından 1979 yılında tanıtılmıştır ve bu keşiften sonra karmaşık hücre homojenatlarında spesifik proteinlerin immüntenpiti ve kantifikasyonu için dünya çapında yaygın olarak araştırma laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Son yıllarda western blot analizinde kullanılan gösterge sistemlerinin

duyarlılığı, güvenilirliği ve esnekliği önemli ölçüde artış göstermektedir. Bu sistemler sayesinde hem düşük hem de yüksek düzeyde ifade edilen proteinlerin aynı blot üzerinde geniş dinamik aralıkta tespitine olanak sağlayarak, sinyallerin kesin ve doğru kantifikasyonunu mümkün kılmıştır. Western blotlardan kantitatif veri elde edebilmek için titiz bir metodoloji uygulanması gereklidir (126). Kısaca özetlemek gerekirse, antikorların (Ab) doğrulanması, hem antijen-antikor etkileşiminin özgül ve doğru olduğunu garanti altına almak, hem de her antikor için kantitatif doğrusal dinamik aralıkta protein yüklemesini sağlayacak örnek seyreltme oranını belirlemek açısından kritiktir. Buna ek olarak, uygun normalizasyon yönteminin seçimi de büyük önem taşır.

Bu normalizasyon; ya immünojenik boyamadan sonra tespit edilen konstitutif proteinler temel alınarak ya da membran üzerinde yapılan total protein (TP) boyaması sonrası toplam protein sinyali baz alınarak yapılabilir. Hedef proteine ait kat değişimlerinin referans sinyalden kaynaklanan yapay sonuçlar olmaması için gereklidir. Bu nedenle verilerin doğru normalizasyonu, deneysel hataların saptanması ve düzeltilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu durum özellikle, örnekler arasında hedef protein ifadesinde küçük farklılıklar ölçülüyorsa daha da önem kazanmaktadır. Her kuyucuğa az yada çok miktarda protein lizati yüklendiğinde kontrol proteinleri olan Gapdh, aktin ve tübülün gibi konstitutif'ler aşırı doymuş (*overloaded*) hale gelir ve bu nedenle normalizasyon işlevini doğru şekilde yerine getiremez (127, 128). Aynı zamanda bu konstitutifler'ler deney sırasında uygulanan tedavi koşullarından etkilenebilir ve bu da hedef protein ekspresyonunu çarpıtılmış bir şekilde yansıtarak, gerçek biyolojik durumu göstermeyen sonuçlara sebep olabilir (128-130).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Cihazlar ve Kimyasallar

Deney sürecinde kullanılan temel cihazlar tablo 3.1.'de verildi.

**Tablo 3.1.** Laboratuvarında kullanılan cihazlar

<b>CİHAZLAR</b>	<b>MARKA</b>
Hassas terazi	OHAUS
Elektronik terazi	Shimadzu ATX224
Vorteks	VWR
Mikrosantrifüj	VWR
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Nüve- NF 800R
pH ölçer	Hanna
Agaroz Jel elektroforez Ekipmanları	BIORAD, VWR
Güç kaynakları	VWR
Jel Görüntüleme Cihazı G:BOX	Syngene
İnkübatör	PHCBI
- 80 °C Buz dolabı	Thermo Scientific
Distile Deiyonize Su Ünitesi	Millipore
Otoklav	Nüve
- 20 °C Buz dolabı	Uğur-Arçelik
Nanodrop	Biospec
Mikrodalga fırın	Vestel
Mikroskop	BAB-TAM-F
Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı	Daihan
UltraSaf Su Cihazı	Millipore
Real-Time PCR	StepOnePlus
Isı Bloğu	Thermo Scientific

Deney süresince kullanılan temel kimyasallar analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasallar Tablo 3.2'de verildi. Ayrıca, çalışma kapsamında hazırlanan tüm sulu çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlandı.

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan moleküler test kiti, solüsyonlar ve markaları

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
RNA İzolasyon Kiti	Ecotech
RT PCR için Genious 2x SYBR Green Fast Qpcr mix	Abdonal
Tripsin-EDTA	Cytiva
DMSO	Fisher Scientific
Pen/Strep.	Gibco
PBS	Biowest
Trypan Blue	BI
DMEM (High Glukoz)	Nutriculture
HCl	IsoLab
NaOH	Panreac AppliChem
Etil Alkol	Sigma
Tris base	Sigma
PVDF Membran	GVS
cDNA Synthesis Kit	abm
Power Blot Casset	Thermo Scientific

### **3.2. Metot**

#### **3.2.1. Hücre Kültürü**

Çalışmada SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanıldı. Hücreler ATCC (American Type Culture Collection, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)'dan daha önce temin edildi. Hücre hatları uygun şekilde çözündürülüp kültür şartlarına alıştırdıktan sonra hücre sayımı ve canlılık tespiti yapılarak kültür başlatıldı. Flask yüzeyini dolduran hücrelerin morfolojik özellikleri boyanmadan, hücre görüntüleme cihazı kullanılarak değerlendirildi.

#### **3.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması**

Çalışmada SH-SY5Y hücre hattı için %10 fetal sığır serumu, L-glutamin, sodyumpruvat ve %1 penicilin-streptomisin ile destekli Dulbecco's Modife Eagle Medium (DMEM) hazırlandı. Hazırlanan besiyerleri 50 ml falcon tüplere konulup +4°C dondurucuda saklandı.

#### **3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi**

Öncelikle -80 °C dondurucuda stoklanan kriyojenik tüplerdeki hücreler çıkartılıp oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilerek çözümleri sağlandı. Dondurma çözeltisi içinde

bulunan DMSO'nun hücrelerin membranına zarar vermemesi için çözünme işleminden önce besiyerleri 30 dk süre ile 37 °C inkübatörde bekletildi. Viallerdeki yaklaşık 1 ml hücre süspansiyonları hızlıca steril kabinde 5 ml besiyeri içeren tüplere konularak yavaş bir şekilde pipetaj yapıp tüm hücrelerin flask yüzeyine eşit dağılımı sağlandı.

#### **3.2.4. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması**

Çözünmüş olan hücreler 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet kısmında kalan hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri eklenip, hücrelerin homojen dağılımını sağlamak amacıyla pipetaj yapıldı. Yeterli canlı hücre konsantrasyonunun sağlanıp sağlanmadığı Thoma lamında hücre canlılık testi yapılarak gözlemlendi. Sonraki aşamada 25 cm<sup>2</sup> flasklara 3x10<sup>5</sup> / 5 ml sayıda hücre ekimi yapıldı. Tüm hücreler %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş hava ortamında 37 °C kültüre edildi. Hücrelerin tutunması ve kontaminasyon açısından uygunluğu için her gün hücre görüntüleme cihazı ile takip edildi. Hücreler flask tabanında yeterli yoğunluğa ulaştığında pasajlama yapıldı. Bunun için öncelikle eski besi yerleri uzaklaştırıldı. Flasklara Mg<sup>+2</sup> ve Ca<sup>+2</sup> içermeyen 3 ml PBS eklenip 2 defa yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin flask tabanından kalkabilmesi için her flaska 2 ml %25'lik 1X Tripsin EDTA eklenip 5-15 dakika süre ile inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmalarına bakıldı ve yüzen hücreler pipet yardımıyla 15 ml'lik steril falcon tüplere aktarıldı. Üzerine 5 ml besi yeri eklendikten sonra 1250 rpm 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellette kalan hücrelerin üzerine 5 ml taze besiyeri eklenip yeni flasklara ekim yapıldı.

#### **3.2.5. Hücrelerin Dondurulması**

Tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılan hücreler steril falcon tüplere aktarıldıktan sonra üzerine 4.5 ml besiyeri eklenip 1500 rpm 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Sonraki aşama için hücre peleti üzerine 900 µl soğuk besiyeri ve 100 µl DMSO eklenerek kriyoprotektan tüplere aktarıldıktan önce 20 dk -20 °C dondurucuda bekletildi sonrasında ise -80 °C dondurucuda saklanılmak üzere sonraki çalışmalar için donduruldu.

#### **3.2.6. Deney Grupları ve Soğuk Stresi Uygulaması**

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri DMEM besiyerinde (%10 ısıtılmış FBS, %1 Pen/Strep) 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında rutin kültüre edildi ve deneyden 24 saat önce 6

kuyucuklu plakalara ekildi. Hücreler ekildikten ve plaka yüzeyine tutunduktan sonra soğuk stresi uygulanmaya başlandı. Çalışmada 9 uygulama grubu oluşturuldu (Tablo 3.3). Çalışma grupları ve uygulama şartları Tablo 3.3.'de verildi. pH stabilitesinin korunması amacıyla soğuk stresi boyunca besiyeri değiştirilmedi. Deney gruplarında belirlenen farklı sıcaklık ve farklı sürelerin sonunda (RNA, protein, hücre canlılığı/apoptozu, hücre döngüsü) analizler için hücreler deney içeriğine göre gerekli işlemler yapıldı.

**Tablo 3.3.** Çalışma grupları ve uygulama şartları

Gruplar	Sıcaklık derecesi (°C)	Uygulama süresi (Saat)	RNA Sekanslama için Grup Adı
Kontrol	37	0	A
1. Grup	31	3	B
2. Grup	31	6	-
3. Grup	31	12	-
4. Grup	31	24	C
5. Grup	25	3	D
6. Grup	25	6	-
7. Grup	25	12	-
8. Grup	25	24	E

### 3. 2.7. RNA İzolasyonu ve RNA Sekanslama

Tüm çalışma gruplarında RNA izolasyonu yapıldı. Tüm grupların RNA örnekleri RT-PCR çalışmaları için kullanılırken RNA sekanslama için 5 gruba ait RNA'lar kullanıldı.

Hücreler belirlenen çalışma sıcaklıklarında 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 2'er defa PBS ile yıkanma işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında, yıkanmış olan her kuyucuğa 700'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 4 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Ardından hücrelerin üzerine 1,5 ml taze besi yeri eklenerek steril ependorf tüplere alındı. 1250 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre peletinden toplam RNA, RNA izolasyon kiti kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak izole edildi. Toplam RNA miktarı spektrofotometre kullanılarak tayin edildi.

## RNA Sekanslama

Çalışma gruplarına ait hücrelerde RNA sekanslama yapmak için 5 grup oluşturuldu. Gruplar Kontrol Grubu (A Grubu), 31 °C- 3 Saat Grubu (B Grubu), 31 °C- 24 Saat Grubu (C Grubu), 25 °C- 3 Saat Grubu (D Grubu) ve 25 °C- 24 Saat Grubu (E Grubu) olarak belirlendi. İzole edilen RNA örnekleri Her grup için 2 alikuat şeklinde hazırlandı. 1. tüpler 5 µl hacimli RNA kontrolü için, 2.tüpler ise 500 ng/µl konsantrasyonda ve 25 µl hacimde olacak şekilde hazırlandı ve uygun şartlarda transferi sağlanarak hizmet alımı yolu ile analiz için GENOKS firmasına iletildi.

RNA degradasyonu jel elektroforezi ve Fragment Analyzer Sistemi ile kontrol edildi. RNA örnekleri Qubit ve/veya Bioanalyzer/TapeStation ile ölçülerek kalite kontrolleri yapıldı. RNA kütüphaneleri hazırlandıktan sonra dizileme BGI-G400 platformu ile gerçekleştirildi. Dizileme sonrasında veriler kalite kontrol için filtrelendi. Adapter dizileri ile düşük kaliteli ve kısa (< 30 baz) okumalar FASTQC aracı kullanılarak temizlendi. Temiz veriler (10 MB), HiSat2 hizalayıcısı kullanılarak insan referans genomuna (Gencode v34) hizalandı.23 Diferansiyel olarak eksprese edilen genler (DEG'ler) *edge* R paketi kullanılarak nicelendirildi.

### 1) Kütüphane Hazırlama

Toplam RNA örnekleri Illumina® Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero™ Plus (Cat. No: 20040529) kiti kullanılarak üretici talimatına uygun şekilde işlendi. Öncelikle tür-agnostik prob karışımı ile rRNA fraksiyonu uzaklaştırılıp, mRNA + lncRNA + diğer non-coding RNA'lar korundu. rRNA-depleted RNA, Fragmentation Master Mix ile ~94 °C'de 6–8 dk inkübasyonla ~200–300 bp insert boyutuna fragmente edildi. Buna takiben rastgele primerler ile birinci iplik cDNA sentezi, ardından dUTP-tabanlı reverse-stranded ikinci iplik sentezi gerçekleştirildi.

Uç düzeltme ve A-tailing sonrası Illumina-uyumlu Unique Dual Index (UDI) adaptörleri ligate edildi. dUTP içeren iplik PCR amplifikasyonunda baskılanarak yönelim korundu. Giriş miktarına göre 10–12 PCR döngüsü uygulanmış ve aşırı amplifikasyondan kaçınıldı. SPRI bazlı arındırma sonrası kütüphane boyutu ~320–420 bp olarak hedeflendi. Kütüphane konsantrasyonu Qubit dsDNA HS ile; dağılımı Bioanalyzer HS DNA veya TapeStation D1000 ile doğrulandı. Primer/adapter dimeri <5% ve verim ≥5–10 nM olan kütüphaneler eşit molar olarak havuzlandı.

### 2) Dizileme

Hazırlanan havuz Illumina NovaSeq 6000 platformunda, proje kapsamına göre S1/S2/S4 flow-cell ve paired-end 2×150 bp (alternatif 2×100 bp) okuma modunda

dizilenip, örnek başına  $\geq 50$  milyon eşlenmiş okuma çifti (PE) hedeflendi. Yükleme sırasında üretici parametreleri gözötilmiş olup; PhiX %1–2 spike-in ve run kalite metrikleri ( $Q30 \geq \%85$ ) doğrulandı.

### 3) Biyoinformatik Analiz

Ham veriler ISO uyumlu Linux ortamında sürüm kontrollü (Conda/Docker) pipeline ile analiz edildi. Başlangıç QC FastQC + MultiQC ile yapıldı; düşük kaliteli bazlar ve adaptör kontaminasyonu Trim Galore/fastp ile temizlendi. Okumalar STAR (alternatif HISAT2) ile GRCh38 referans genomuna reverse-stranded (RF/fr-first-strand) parametresi ile hizalandı. Özellik sayımı feature Counts/HTSeq-count ( $-s$  2 reverse-stranded) ile uygun GTF/GFF3 anotasyonuna karşı yapıldı. QC metrikleri Picard CollectRnaSeqMetrics ve RSeQC (gene-body coverage, junction saturation vb.) ile değerlendirildi. Normalizasyon TPM/CPM ile diferansiyel ifade analizi DESeq2 veya edgeR ile yapılarak FDR Benjamini-Hochberg  $< 0.05$  olarak alındı. İstenen durumlarda GSEA/fgsea ve GO/KEGG zenginleştirme uygulandı. Sonuçlar MultiQC raporları, sayım tabloları (counts/TPM),  $\log_2FC$ -FDR çıktıları ve PCA, MA-plot, ısı haritası görselleştirmeleri ile raporlandı.

#### 3.2.8. cDNA Eldesi ve Reel Time PCR

Tüm gruplara ait hücrelerden izole edilen RNA örnekleri cDNA eldesi ve Reel Time PCR çalışmaları için kullanıldı. RNA örneklerinden tamamlayıcı DNA (cDNA) sentez kiti kullanılarak 580 ng toplam RNA ile cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA'lar StepOne™ Plus v2.3 yazılımı ile StepOnePlus™ Real-Time PCR Sisteminde (Applied Biosystems (AB)) çalışıldı. RT-qPCR sırasında her bir reaksiyon için 8,28 ng cDNA, 5  $\mu$ L Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (High ROX Premixed), 200 nM (ileri ve geri) primer (Probe Synthesis) ve toplam hacmi 10  $\mu$ L tamamlayacak şekilde nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O kullanıldı. PCR başlangıcında çift sarmal olan cDNA'lar 95 °C'de 3 dakika boyunca ısıtılıp tek zincir haline getirildikten sonra, reaksiyon 40 döngü boyunca 95 °C'de 5 saniye, 60°C'de 30 saniye (ileri ve geri primerler için üretici firmanın sunmuş olduğu sıcaklık değerlerinin  $\pm 4$  °C sıcaklık değerleri denererek primer bağlanma sıcaklığı optimize edildi ve 9 primer için ortak olarak 60 °C belirlenip 1 primer için ise 62 °C sıcaklık uygulandı. RT-qPCR'da kullanılan primerlerin sekans bilgileri Tablo 3.4'te verilmiştir. qPCR işleminden sonra, StepOne™ Plus v2.3 yazılımı her reaksiyon için bir CT değeri üretti ve bu CT değerleri kullanılarak hedef genler ifadelenemeleri açısından analiz edildi. İlgili genlerin relatif ekspresyonlarının farklı hücre grupları arasında

karşılaştırılması livak metodu ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) ile yapıldı. İnternal kontrol olarak  $\beta$ -Aktin geni referans alındı. Hesaplama sırasında öncelikle ( $2^{CT(\text{kontrol grubu hedef gen})} / 2^{CT(\text{kontrol grubu GAPDH})}$ )<sup>-1</sup> =  $2^{-\Delta CT}$  formülü ile kontrol grubu için hedef gen (YBX1, CARHSP1, LIN28A, ATF6, ATF4, XBP1, UBA52, P53) /  $\beta$ -Aktin oranı hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun her bir hedef geni için ayrı ayrı olmak üzere  $2^{-\Delta CT}$  değerleri toplamının kontrol deney tekrar sayısına bölünmesiyle kontrol grubunda her bir hedef gen için ortalama  $2^{-\Delta CT}$  değeri hesaplandı. Bunun beraberinde aynı hücre hattına ait her hücre grubu için de kontrolde olduğu gibi her bir hedef gen için  $2^{-\Delta CT}$  değeri hesaplandı.

**Tablo 3.4.** RT -qPCR primer sekans verileri.

Gen	Geri primer (5' - 3')	İleri primer (5' - 3')	GENBANK ERİŞİM NUMARASI
YBX1	CTTCATTGCCGTCCTCTCTAGG	GCAGGAGAACAAGGTAGACCAG	NM_004559
CARHSP1	TATAGGTGACCTCGTCGCCTTC	CCCGTCTACAAAGGAGTCTGCA	NM_014316
LIN28A	GTGACACGGATGGATTCCAGAC	CCAGTGGATGTCTTTGTGCACC	NM_024674
ATF6	GCAGAACTCCAGGTGCTTGAAG	CAGACAGTACCAACGCTTATGCC	NM_007348
ATF4	CTCCAACATCCAATCTGTCCCG	TTCTCCAGCGACAAGGCTAAGG	NM_001675
XBP1	CTCCTGGTCTCAACTACAAGGC	CTGCCAGAGATCGAAAGAAGGC	NM_005080
UBA52	TTCTTGCGGCAGTTGACAGCAC	GCCTGCGAGGTGGCATTATTGA	NM_003333
P53	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	NM_000546,
HSP90	CGTTCACAAAGGCTGAGTTAGC	TCTGCCTCTGGTGATGAGATGG	NM_005348,
ACTB	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC	NM_001101,

### 3.2.9. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizi

Hürelere belirlenen çalışma sıcaklıkları uygulandıktan sonra, %1 proteaz ve fosfataz eklenmiş RIPA tamponu (1X RIPA: 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, %1 (v/v) NP-40, %0.5 (w/v) sodyum deoksikolat, 1.0 mM EDTA ve %0.1 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) pH 7.4) kullanılarak protein izolasyonu yapıldı. Hücreler, protein izolasyonundan önce 2 defa 1 ml PBS ile yıkandıktan sonra, buzun içinde bekletilen önceden hazırlanan RIPA tamponu ile 6 kuyucuklu kültür plakasından uzaklaştırıldı ve steril eppendorf tüplere alındı. Daha sonra, mikrosantrifüj cihazında 14,800 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemiyle elde edilen süpernatant kısmında çözülmüş proteinler her grup 3'er adet tüplere alikuotlanarak daha sonraki deneysel aşamalarda kullanılmak üzere -80°C 'de saklandı. Western Blot analizi için, hücrelerden

izole edilen proteinlerin BCA testi (ABP Biosciences) kullanılarak üretici firmanın sağlamış olduğu protokol ile miktar tayini yapıldı. Eşit miktarlarda protein (15-35 µg) içeren solüsyon eşit hacimde 2X Laemmli tamponu ( 0.125M Trizma baz, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2- merkaptoetanol ve %0.02 bromophenol blue ile karıştırılıp jelle yüklendikten sonra, SDS-PAGE yürütme sistemi (MiniPROTEAN Tetra Cell) kullanılarak SDS yürütme tamponu (%3.03 Trizma baz, %14.44 Glisin ve %1 SDS içerisinde 100 V'de 90 dakika boyunca yürütme işlemi uygulandı. SDS-PAGE jel içerikleri Tablo 3.5 ve 3.6'da belirtilmiştir. SDS-PAGE sonrası proteinler jelden Western Blot protokolüne uygun transfer tamponu kullanılarak (1X yarı-kuru (Semi-Dry) transfer tamponu: %0.58 Trizma baz, %0.29 glisin, %0.037 SDS ve %20 metanol, Western Blot transfer sistemi (Thermo Scientific™ Pierce™ Power Blotter) ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre 5-10 dakika arasında 25 V ve 1.3 A uygulanarak PVDF (GVS) membrana transfer edildi. Protein transfer edilmiş membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında 1X TBS-T (Tris buffered saline: Tris tamponlu tuz çözeltisi; 20 mM Trizma baz, 150 mM NaCl, %0.1 Tween 20, pH 7.4) ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu solüsyonuyla hafifçe çalkalanarak bloklandı. Bloklama işleminden sonra, membranlar, membran yüzeyindeki hedef proteinlere spesifik antikolar (birincil antikor, 1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5 süt tozu solüsyonunda 1/1000 oranında seyreltilmiş) ile gece boyunca +4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, membranlar 1X TBS-T ile 10'ar dakika boyunca 4'er defa yıkandı. Ardından, membranlar birincil antikora bağlanacak olan HRP (At Kestanesi Peroksidazı) enzimi ile konjuge edilmiş ikincil antikor (1X TBS-T içerisinde hazırlanmış %5 süt tozu solüsyonunda 1/5000 oranında seyreltilmiş) ile 2 saat boyunca hafifçe çalkalanarak oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar yeniden 1X TBS-T ile 10'er dakika boyunca 3'er defa yıkandı ve hedef proteinler, HRP enziminin süstratı olan ECL (Enhanced Chemiluminescence, Geliştirilmiş Kemilüminesans) görüntüleme kiti kullanılarak immünokimyasal olarak görüntülenip (G:BOX Chemi XRQ, Syngene) GeneTools yazılımı (Syngene) ile analiz edildi. İnternal kontrol olarak β-Aktin proteini kullanıldı. Analiz sırasında GeneTolls yazılımının sunmuş olduğu protein bant yoğunlukları kıyaslanarak farklı hücre grupları arasında her bir protein ekspresyon ilişkisi rölatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme sırasında öncelikle kontrol grubu için hedef protein (Lin 28a, Carhsp1, Ybx1 vb. ) / β-Aktin protein bant yoğunluğu oranı hesaplandı. Daha sonra kontrol grubunun her bir hedef proteini için ayrı ayrı olmak üzere bu oranların toplamının kontrol deney tekrar sayısına bölünmesiyle kontrol grubunda her bir hedef protein için ortalama protein bant yoğunluk oranı hesaplandı. Bunun beraberinde aynı

hücre hattına ait her hücre grubu için de kontrolde olduğu gibi her bir hedef protein için protein bant yoğunluk oranı hesaplandı. Son olarak, aynı hedef proteinlerin farklı hücre grupları arasında kontrol grubuna kıyasla protein ifadenmeleri belirlendi. Western Blot analizlerinde kullanılan birincil ve ikincil antikor bilgileri Tablo 3.7’de verildi.

**Tablo 3.5.** SDS-PAGE ayırıcı jel bileşenleri

Ayrıcı jel ( %10)	
Kimyasal (içerik)	µL (mikrolitre)
1.5 Tris HCl pH 8.8	1250
ddH <sub>2</sub> O	2000
%30 akrilamid/bis akrilamid (37.5:1)	1670
%20 SDS	25
%10 APS	25
TEMED	2.5

**Tablo 3.6.** SDS-PAGE istifleme jel bileşenleri

İstifleme jeli (%5)	
Kimyasal (içerik)	µL (mikrolitre)
1M Tris HCl pH 6.8	375
ddH <sub>2</sub> O	2088
%30 akrilamid/bis akrilamid (37.5:1)	506
%20 SDS	15
%10 APS	15
TEMED	1.5

**Tablo 3.7.** Western Blot Analizinde Kullanılan Antikorlar

ANTİKOR	KATALOG NO
Anti-p53	AB131442
Anti-CARHSP1	OAGA00211
Anti- UBIQUITİN	BS-1549R
Anti-XBP1	AF5110
Anti-HSP90	E-AB-31752
Anti-LİN28A	BS-8443R
Anti-YB1	BS-5921R
Anti-ATF-6	SC-166659
Anti-BETA ACTİN	E-AB-40338

### 3.2.10. Apoptoz Analizi

Soğuk şok stresi uygulanmasıyla, belirlenen sürelerin sonunda ilgili apoptoz kit testi üretici firma protokolüne göre yapıldı. 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve plakanın her kuyucuğu 2’er defa PBS ile yıkandı. Sonrasında, yıkanmış olan her kuyucuğa 400’er µL 0.25’lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C’lik inkübatörde 4

dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1.2'er ml taze besi yeri eklenerek önceden otoklavlanmış steril 2 ml'lik ependorf tüplere alındı. 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre pelleti ependorf tüpler içerisinde kit tarafından sağlanan 100 µL Annexin V bağlama tamponu ile yeniden süspanse edildi ve üzerine 5 µL Annexin V-FITC konjugatı ve 2 µL PI boyası eklenip hafif pipetaj yapıldıktan sonra 15 dakika boyunca ışık görmeyen ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından son durumdaki hücre solüsyonunun üzerine 400 µL daha Annexin V bağlama tamponu eklendi ve apoptoz ve nekrozu saptamak için hücre örnekleri BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer cihazı kullanılarak analiz edildi. Aynı hücre hattına ait her hücre grubu başına maksimum 20.000 olay (hücre) analiz edildi ve hücre kalıntıları, ileri (FSC) ve yan saçılım (SSC) ışık geçişine dayalı olarak analizden çıkartıldı. Analizler sonucunda, farklı sıcaklık ve farklı sürelerin apoptoza uyarıp uyarmadığı gruplar arasında karşılaştırıldı.

### **3.2.11. Hücre Döngüsü Analizleri**

Soğuk stres deney grupları oluşturulan 6 kuyucuklu kültür plakasından besi yeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 2'er defa 0.5 ml PBS eklenip yıkanma işlemi yapıldı. Ardından, yıkanmış olan her kuyucuğa 400'er µL %0.25'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 4 dakika bekletildi ve hücrelerin kültür plakası tabanından kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1.2 ml taze besi yeri eklenerek steril 2 ml'lik eppendorf tüplere alındı. 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra her bir hücre peleti ependorf tüplerde hafifçe çalkalanarak %70 etanol ile çözüldü ve +4 °C'de 2 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler, 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, 600 µL PBS içerisinde seyreltilmiş 0.1 mg/mL RNaz A ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Santrifüj edilerek elde edilen hücre peleti, daha sonra PBS içerisinde hazırlanmış 0.05 mg/ml propidyum iyot (PI) ile yeniden süspanse edildi ve ışıktan korunarak +4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Son olarak, PI ile inkübe edilmiş hücreler BD Accuri™ C6 Plus akış sitometrisi (BD Life Sciences) kullanılarak analiz edildi. Aynı hücre hattına ait her hücre grubu başına maksimum 20.000 olay (hücre) analiz edildi ve hücre kalıntıları, ileri saçılım (FSC) ve yan saçılım (SSC) ışık geçişine dayalı olarak analizden çıkartıldı. Analizler sonucunda, farklı sıcaklık ve farklı sürelerin hücre döngüsü üzerindeki etkisi değerlendirilerek hücre döngüsü safhaları karşılaştırıldı.

### 3.2.12. İstatistiksel Analiz

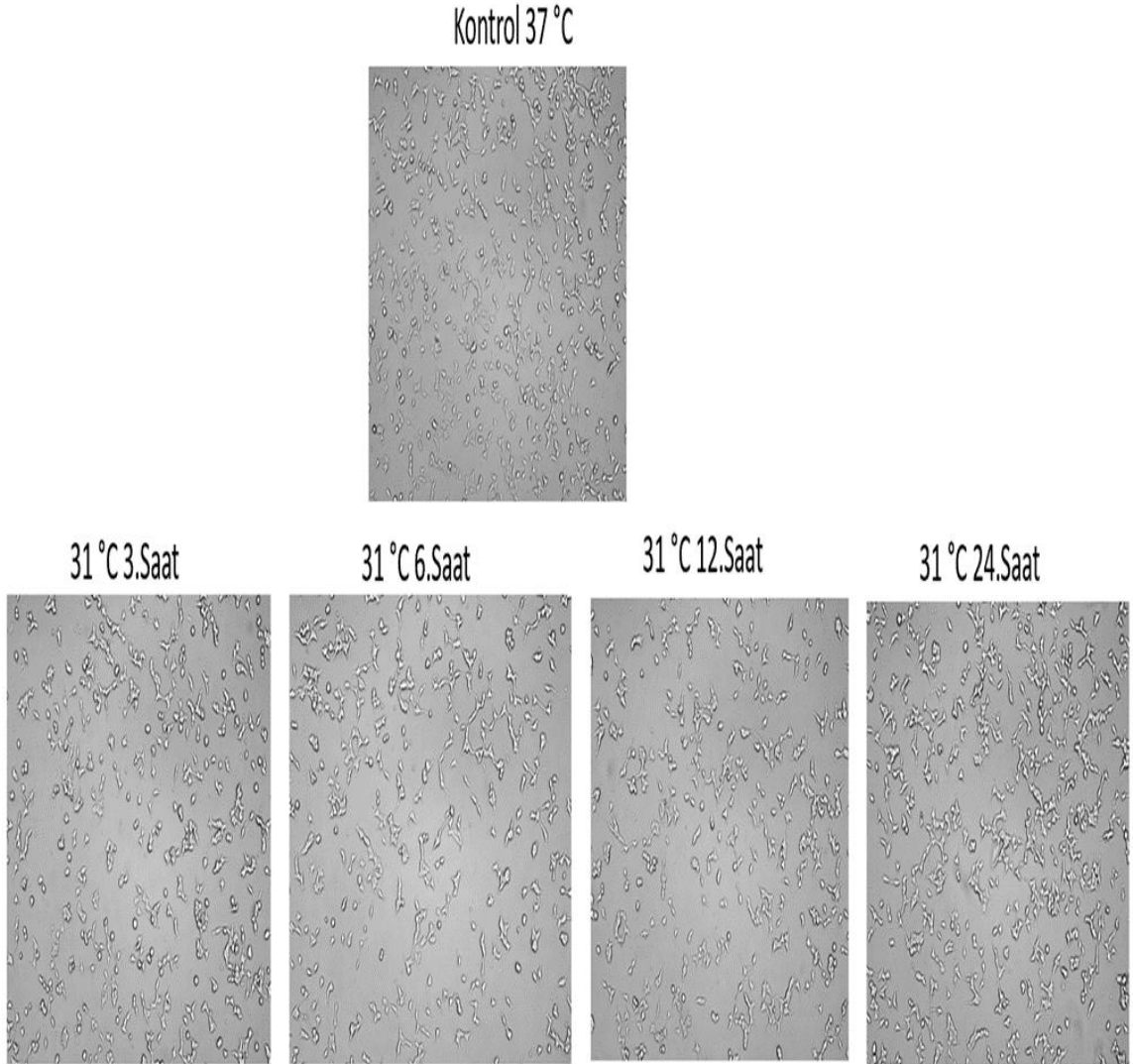
Her deneysel çalışma için aynı hücre hattına ait kontrol hücre grubu ile farklı sıcaklık gruplarının arasında karşılaştırılarak kıyaslama verileri elde edildi. Aynı hücre hattına ait aynı sıcaklık farklı sürelerde yapılan uygulama grubu arasındaki deneysel farklılık düzeyi Tek yönlü ANOVA testi uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda elde edilmiş olan  $p < 0.05$  değeri deney sonuçları açısından gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslamalarda anlamlı farkı ifade etmek için “\*” simgesi kullanıldı. İstatistiksel analiz için her bir deneysel grup 3 defa biyolojik tekrar olarak sonuçlar değerlendirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi

Çalışmada kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin morfolojik görüntüleri JuLI™ Br hücre görüntüleme cihazı ile 1X büyümede gözlemlendi. Düşük sıcaklık uygulaması hücre morfolojisini olumsuz etkiledi. 25 °C’de hücrelerde belirgin büzülme, yuvarlaklaşma ve yüzeyden ayrılma izlenirken, 31 °C’de bu değişiklikler daha hafif izlendi. Düşük sıcaklığın hücre bütünlüğü ve canlılığını dereceye bağlı olarak azalttığını göstermektedir. Şekil 4.1 ve 4.2’de gösterildi.



**Şekil 4.1.** Kontrol 37 °C ve 31 °C 3,6,12 ve 24. Saatlerde hücre morfolojik görüntüsü

Kontrol 37 °C

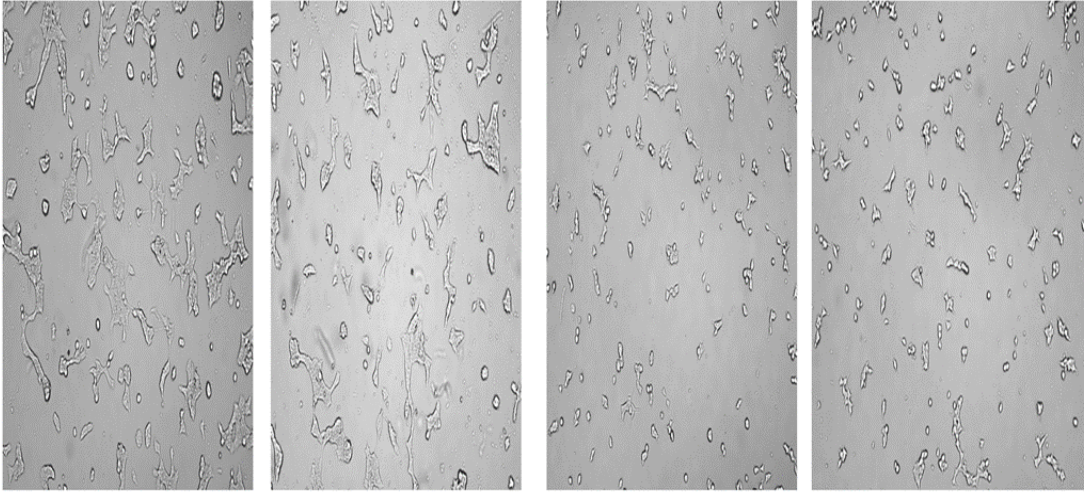


25 °C 3.Saat

25 °C 6.Saat

25 °C 12.Saat

25 °C 24.Saat



**Şekil 4.2.** Kontrol 37 °C ve 25 °C 3,6,12 ve 24. Saatlerde hücre morfolojik görüntüsü

#### **4.2. RNA Sekans Analizi**

SH-SY5Y hücrelerinde soğuk stresin şiddetine ve maruziyet zamanına bağlı olarak gruplar arasındaki gen ifade değişim profilleri RNA-sekans tekniği ile belirlendi. RNA sekans çalışmasında, kontrol grubu 37°C ile birlikte dört deney grubu analiz edildi. A grubu (kontrol) B grubu (31 °C 3 Saat), C grubu 31°C 24 Saat, D grubu (25 °C 3 Saat) ve E grubuna ait (25 °C 24 Saat) 29 bin civarında gen sekanslama yapıp ve yalnızca çok güçlü değişimler (4 kat artış veya azalma) değerlendirmeye alındı. Yapılan analiz sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uygulama gruplarında gen ifadesi azalmalarının daha fazla olduğu görüldü. İfadesi azalan gen sayısı bakımından B grubunun (3667 gen) önemli farklılık gösterdiği bulundu. C grubunda 2540 genin ve E grubunda ise 2535 genin ifadesi azalmış olmakla birlikte B'ye göre daha dengeli bir profil

izlediği belirlendi. D grubu (1942 gen) ise en az farklılık gösteren grup olup kontrol grubuna en yakın gen ekspresyon paternine sahip olduğu görüldü. Tablo 4.1’de değişen gen sayıları verildi.

**Tablo 4.1.** Karşılaştırmalarda tespit edilen gen sayıları

Karşılaştırma	Analiz edilen toplam gen sayısı	Yukarı düzenlenen gen sayısı (Kat Değişimi > 4)*	Aşağı düzenlenen gen sayısı (Kat Değişimi < 1/4)*
B / A	29160	1729	3667
C / A	29705	1998	2540
D / A	29104	1648	1942
E / A	29655	1881	2535

#### 4.2.1. Kalite Kontrolü

RNA-*seq* örneklerine ait ham verilerde kalite kontrol (QC) değerlendirmesi yapıldı. FASTQ dosyalarındaki toplam okuma sayıları örnek başına 43,9 milyon ile 122 milyon arasında değişmekte olup, tüm örnekler yüksek veri derinliğine sahip olup. kalite skorlarına göre, tüm örneklerde Q20 değeri %99,7 ve üzeri, Q30 değeri ise %96,2 ile %99,9 arasında bulundu. Bu oranlar, okuma başına sırasıyla %99 ve %99,9 doğruluk seviyelerine karşılık gelmekte olup, genel olarak verilerin çok yüksek kalitede olduğunu görüldü. Ek olarak, ortalama GC içerikleri %48–52 arasında değişmekte olup, insan genomu için beklenen değer aralığına uygun olduğu tespit edildi. Tüm bu bulgular, verilerin hizalama ve diferansiyel gen ekspresyon analizleri için biyolojik açıdan güvenilir olduğu gözlemlendi.

Bu aşağıda ki tabloda, pre-alignment QC (hizalama öncesi kalite kontrol) sonuçlarını özetleyip kırpma (düşük kaliteli bazların ve adaptörlerin temizlenmesi) öncesi ve sonrası ölçümlerin karşılaştırılması yapıldı.

- Okuma Sayısı: Kırpma sonrası her örnekte okuma sayısı doğal olarak biraz azalma olup bu düşük kaliteli veya gereksiz dizilerin çıkarıldı.
- Q20 ve Q30: Tüm örneklerde Q20 (%≥99 baz çağırma doğruluğu) ve Q30 (%≥99.9 baz çağırma doğruluğu) oranları hem kırpma öncesinde hem sonrasında çok yüksek (%97–100 arası) olup, bu verinin genel olarak çok kaliteli olduğu saptandı.

- %GC: GC oranı örnekler arasında %48.5–%52.0 aralığında ve kırpma sonrası belirgin bir değişim gözlemlenmedi. Kalite kırpma işleminin dizilerin genel bileşimini bozmadığı saptandı.

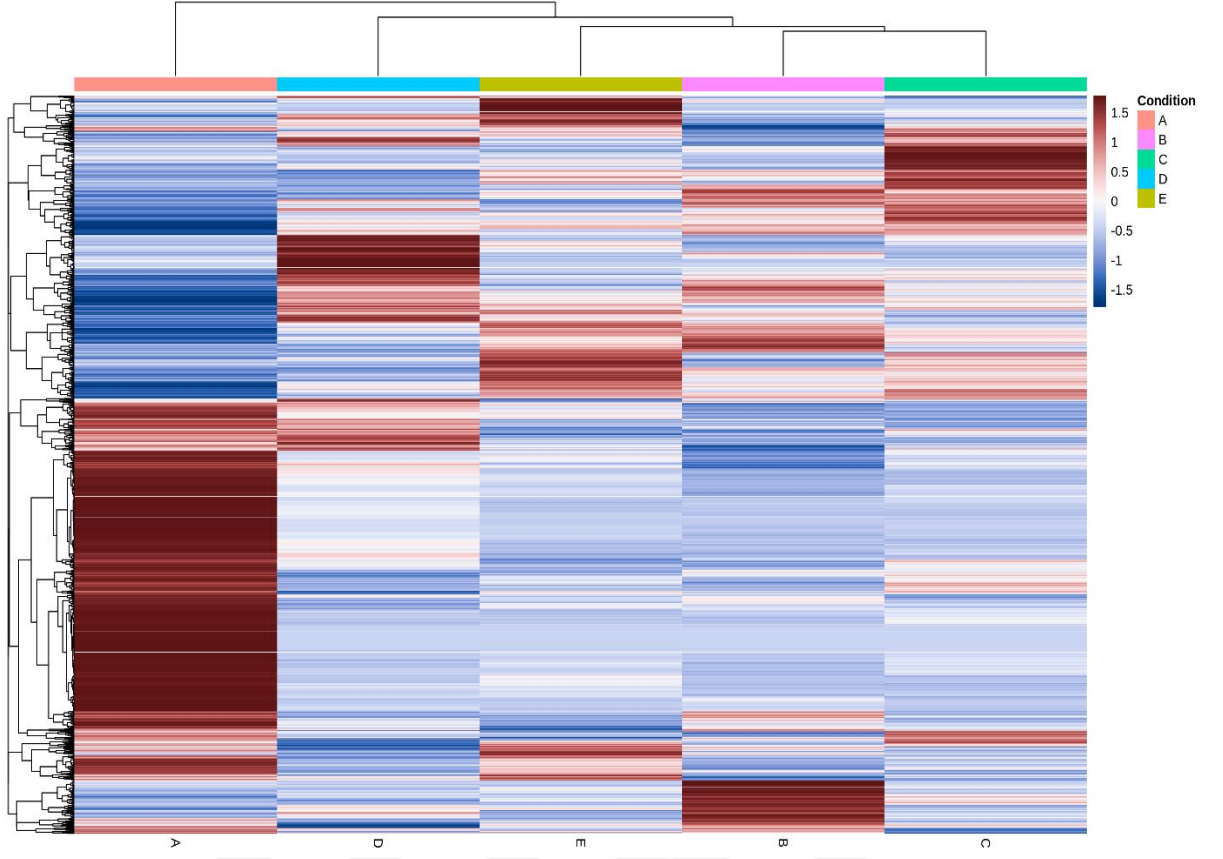
Özetle, bu QC sonuçları kırpma işleminin veri kalitesini koruduğunu, hatta düşük kaliteli bölgeleri temizleyerek daha güvenilir bir veri seti oluşturduğu saptandı. Bu sayede hizalama aşamasına yüksek kaliteli ve temiz okuma verileriyle geçiş sağlandı. Tablo 4.2.'te gösterildi.

**Tablo 4.2.** Deney gruplarının kırpılma öncesi ve sonrası kalite verileri

<b>Deney Grubu</b>	<b>Okuma Sayısı</b>	<b>Q20</b>	<b>Q30</b>	<b>%GC</b>
A Kalite kırpma öncesi	49.223.320	99.7	96.2	48.5
A Kalite kırpma sonrası	43.913.355	100.0	99.8	48.0
B Kalite kırpma öncesi	88.133.645	100.0	97.4	51.0
B Kalite kırpma sonrası	83.888.026	100.0	99.7	51.0
C Kalite kırpma öncesi	94.909.957	100.0	97.5	50.5
C Kalite kırpma sonrası	90.434.446	100.0	99.7	50.5
D Kalite kırpma öncesi	77.031.790	100.0	97.8	52.0
D Kalite kırpma sonrası	73.351.138	100.0	99.8	52.0
E Kalite kırpma öncesi	122.083.122	100.0	97.5	51.0
E Kalite kırpma sonrası	115.980.416	100.0	99.7	51.0

#### 4.2.2 Isı Haritası

Isı haritası, kat değişimi >4 eşiğiyle tanımlanan farklı ekspres genlerin (DEG) kontrol grubu (A) ile karşılaştırıldığında nasıl değiştiğini göstermektedir (Şekil 4.3). Kırmızı tonlar gen ekspresyonunun arttığını (up-regülasyon), mavi tonlar ise azaldığını (*down-regülasyon/baskılanma*) ifade etmektedir. Görselde A grubunda yüksek düzeyde olan geniş bir gen kümesinin B, C, D ve özellikle B grubunda belirgin şekilde baskılandığı görüldü. Buna karşılık B ve kısmen E grubunda, kontrol grubuna göre ekspresyonu artmış ayrı bir gen altkümesi de saptandı. Genel desen B grubunun diğer gruplara kıyasla en güçlü ve yaygın baskılanma eğilimi gösterdiğini, E grubunun ise B'ye benzer bir profile sahip olduğu tespit edildi.



**Şekil 4.3.** Diferansiyel Ekspresyon Gösteren Genlerin Isı Haritası

### 4.2.3. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

Tablo 4.3.'de A grubu ile diğer gruplar arasındaki karşılaştırmalarda zenginleştirilmiş biyolojik terimlerin dağılımını göstermektedir. Tüm karşılaştırmalarda GO:BP (Gen Ontolojisi: Biyolojik Süreç) terimleri en yüksek sayıda zenginleşme göstermiş olup, özellikle aşağı regüle genler için (örn; B / A'da 411, C / A'da 405) belirgin bir fazlalık saptandı. GO:CC (Hüresel Bileşen) ve GO:MF (Moleküler Fonksiyon) kategorilerinde de genel olarak aşağı regüle genlerin zenginleşmesi, yukarı regüle genlere kıyasla daha yüksek tespit edildi. KEGG, *Reactome* (REAC) ve *WikiPathways* (WP) analizleri de benzer şekilde, çoğunlukla aşağı regüle genlerde anlamlı yolak zenginleşmelerinin olduğu gözlemlendi.

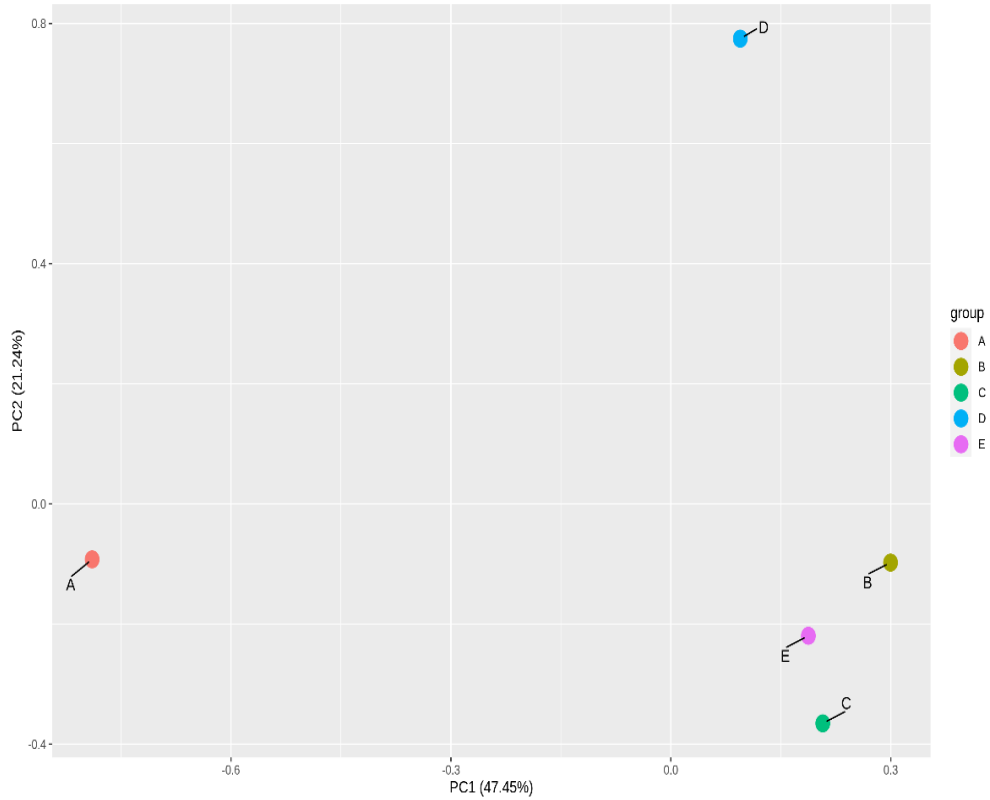
**Tablo.4.3.** Karşılaştırmalara göre zenginleştirilmiş kategorilerin sayısı

Karşılaştırma	Kaynak	Tüm Genler için Zenginleştirme	Yukarı Regüle Genler için Zenginleştirme	Baskılanmış Genler için Zenginleştirme
B/A	GO:BP	341	13	411
	GO:CC	32	6	31
	GO:MF	32	2	37
	KEGG	14	1	18
	REAC	25	9	17
	WP	5	1	9
C/A	GO:BP	309	7	405
	GO:CC	24	1	47
	GO:MF	27	12	36
	KEGG	8	1	11
	REAC	39	8	16
	WP	12	1	13
D/A	GO:BP	270	6	298
	GO:CC	19	9	28
	GO:MF	18	3	17
	KEGG	9	2	12
	REAC	19	10	13
	WP	3	ND	2
E/ A	GO:BP	302	3	303
	GO:CC	21	7	27
	GO:MF	21	1	28
	KEGG	6	1	9
	REAC	30	6	14
WP	19	1	21	

ND: Tespit Edilmedi

#### 4.2.4. PCA (Temel Bileşenler Analizi)

Bu PCA grafiği, beş deneysel grubun (A–E) gen ekspresyon profillerine göre nasıl ayrıştığını gösteren iki ana eksen üzerinden özetlenmiştir. PC1 ekseni, toplam varyansın %47,45’ini açıklayarak gruplar arasındaki en baskın farkı temsil ederken PC2 ekseni, %21,24’lük oranla ikinci en önemli fark olarak gözlemlendi. Grafik incelendiğinde, A grubu PC1’in negatif tarafında tek başına konumlanarak diğer tüm gruplardan belirgin şekilde ayrılmakta D grubu ise PC2’nin pozitif ucunda yer alarak ikinci temel farklılık yönünde en uç noktada bulundu. B, C ve E grupları PC1’in pozitif tarafında birbirine yakın konumlanmış olup, bu durum onların gen ekspresyon profillerinin birbirine daha benzer olduğu saptandı. Genel olarak PC1 ve PC2 toplamda verideki değişimin yaklaşık %69’unu açıklamakta ve bu da gruplar arasındaki ilişkilerin büyük ölçüde bu iki eksenle net şekilde görselleştirilebildiği tespit edildi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** PCA (Temel Bileşenler Analizi) grafiği

#### 4.2.5. Gen Ontolojisi ve Yolak Zenginleştirme analizi

Gruplar arasında hangi biyolojik yolların etkilendiğini ortaya koymak için diferansiyel olarak eksprese edilen genler moleküler fonksiyonlara göre anotlandı. Uygulama grupları genlerinin kontrol grubu genlerine göre fonksiyonel dağılım karşılaştırmaları yapıldı. Buna göre;

##### **GO: B Grubu (31 °C 3 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması**

31 °C 3 saat süre ile soğuk stresine maruz bırakılan hücreler kontrole göre karşılaştırıldığında, hücresel stres koşullarında farklılaşan genlerin özellikle immün yanıt, hücre iletişimi ve inflamasyonla ilişkili biyolojik süreçlerde anlamlı şekilde zenginleştiğini gösterdi. Moleküler düzeyde (*Toll-like* reseptör bağlanması, kemokin ve sitokin bağlanması gibi immün sistemiyle ilişkili fonksiyonlar öne çıkarken, hücresel bileşenlerde plazma membranı bölgesi, inflammasom kompleksi ve veziküler yapılar dikkat çekici bulundu. Biyolojik süreçlerde ise virüse yanıt, hücreler arası sinyal iletimi, apoptotik süreçlerin düzenlenmesi, nörogenez ve kollajen metabolizması gibi çeşitli işlevler şekil anlamlı bulundu (Şekil 4.5).



Grafik, R yazılımı (v4.x) ve ggplot2 paketi (v3.4.2) kullanılarak oluşturulmuştur

#### Şekil 4.5. B grubu /A grubu Gen Ontolojisi

##### Yolak: B Grubu (31 °C 3 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması

Bu yolak özellikle immün yanıtla ilişkili, COVID-19 da Foxp 3, T hücre reseptör sinyal yolları, makrofaj markerları, PD-1 sinyalleşmesi, Kemokin sinyal yolları ve Sitokin-Sitokin reseptör etkileşimi gibi yollar dikkat çekici bulundu. Bu soğuk stresin, bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonu ve regülasyonu üzerinde etkili olduğunu gösterdi. Ayrıca yanık yara iyileşmesi, Sinyal iletimi, Wnt sinyali ve Östrojene bağımlı gen ifadesi gibi yolların da anlamlı çıkması, oluşan stresin doku yenilenmesi, hücresel iletişim ve hormon yanıtları gibi süreçleri de etkileyebileceği gözlemlendi. KEGG, REAC ve WP veri tabanlarından elde edilen bilgiler bu yolların özellikle sitokin sinyalleşmesi ve adaptif immün yanıtın düzenlenmesi gibi süreçlerin merkezinde aktif bir rol oynadığı belirlenip hücresel stresin bağışıklık fonksiyonlarını ve rejeneratif yanıtları tetikleyebileceği gözlemlendi. Şekil 4.6.'te gösterildi.

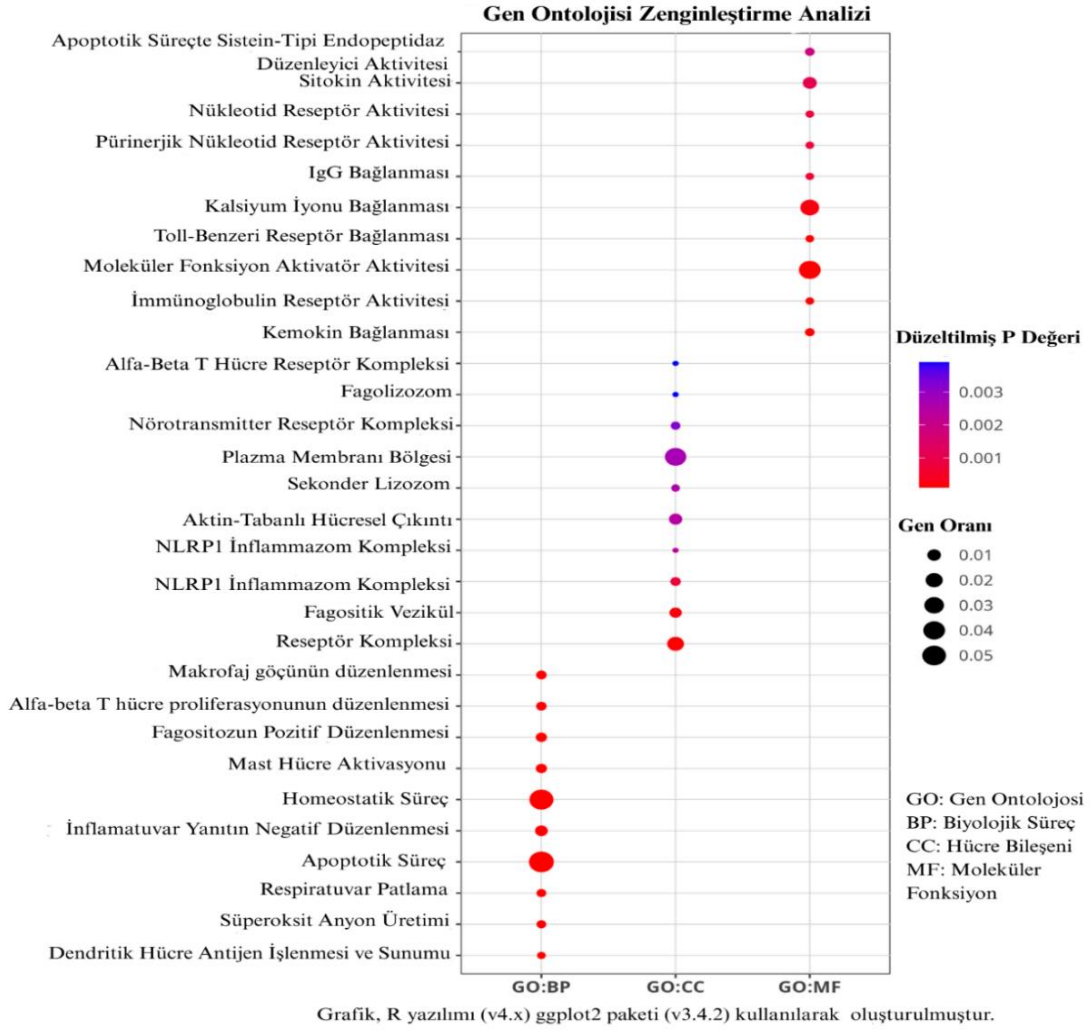


**Şekil 4.6.** B grubu /A grubu Yolak Analizi

### GO: C Grubu (31 °C 24 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması

31 °C 24 saat soğuk stresine maruz bırakılan hücrelerin analiz sonuçları; strese maruz kalan hücrelerde özellikle bağışıklık yanıtı, apoptoz ve inflamasyon düzenlenmesiyle ilişkili genlerin anlamlı şekilde değiştiği tespit edildi. Sitokin aktivitesi, Kemokin bağlanması ve *Toll* benzeri reseptör bağlanması gibi süreçlerin aktifleşmesi, hücrelerin bağışıklık sinyal yolaklarını artırdığı gözlemlendi. Ayrıca fagolizozom, plazma membran bölgesi ve aktin dayalı hücresel çıkıntı gibi yapılar fagositoz ve hücre hareketliliğinin aktif olduğu saptandı. Mast hücre aktivasyonu, Alfa-beta T hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve dentritik hücre antijen sunumu süreçlerinin de ön

planda olması, stresin özellikle doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sistemlerini birlikte etkilediği tespit edildi (Şekil 4.7).

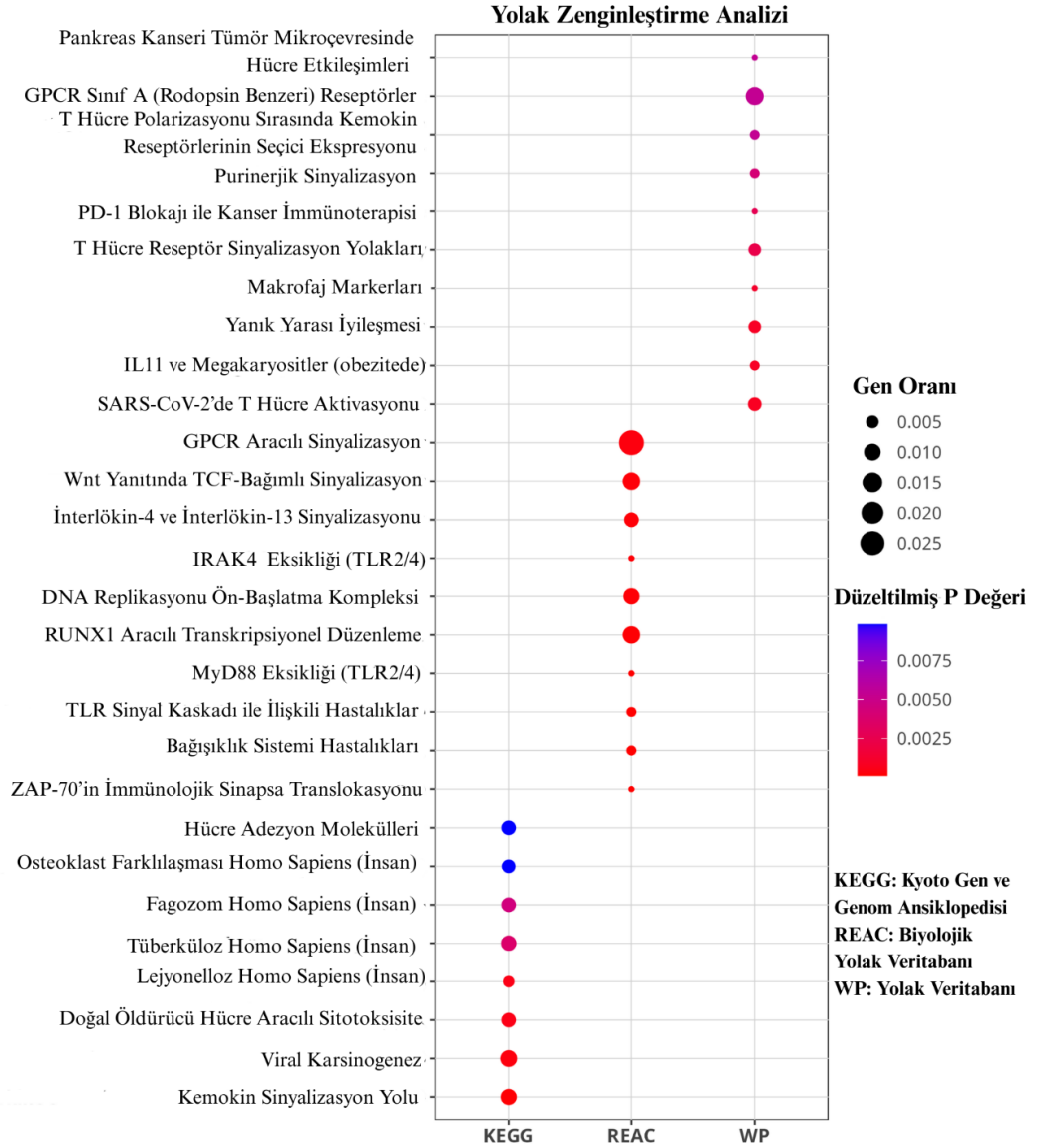


**Şekil 4.7.** C grubu /A grubu Gen Ontolojisi

#### **Yolak: C Grubu (31 °C 24 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması**

Analiz sonuçlarına göre stres koşullarında özellikle bağışıklık yanıtı, inflamasyon ve sinyal iletimi ile ilişkili birçok yolak anlamlı şekilde aktive olduğu tespit edildi. T hücre reseptör sinyal yolağı, PD-1 sinyali, interlökin 4 ve 13 sinyali, kemokin sinyal yolağı gibi terimlerin zenginleşmesi hücrelerin özellikle adaptif bağışıklık yanıtlarını ve sitokin sinyalleşmesinde bir artış olduğu tespit edildi. Ayrıca “Pürinerjik sinyali, GPCR aracılı sinyalizasyon ve WNT yanıtında TCF bağımlı sinyalizasyon gibi yollar da hücrel stres algılama, farklılaşma ve sinyal iletiminde artış olduğu saptandı. Yanık yarısı iyileşmesi, makrofaj markerları ve NK aracılı hücrel sitotoksiste gibi terimlerin

de dahil olması hem doku onarımı hem de doğuştan bağışıklık yanıtlarının stresle birlikte aktive edildiği tespit edildi. Şekil 4.8’de gösterildi.



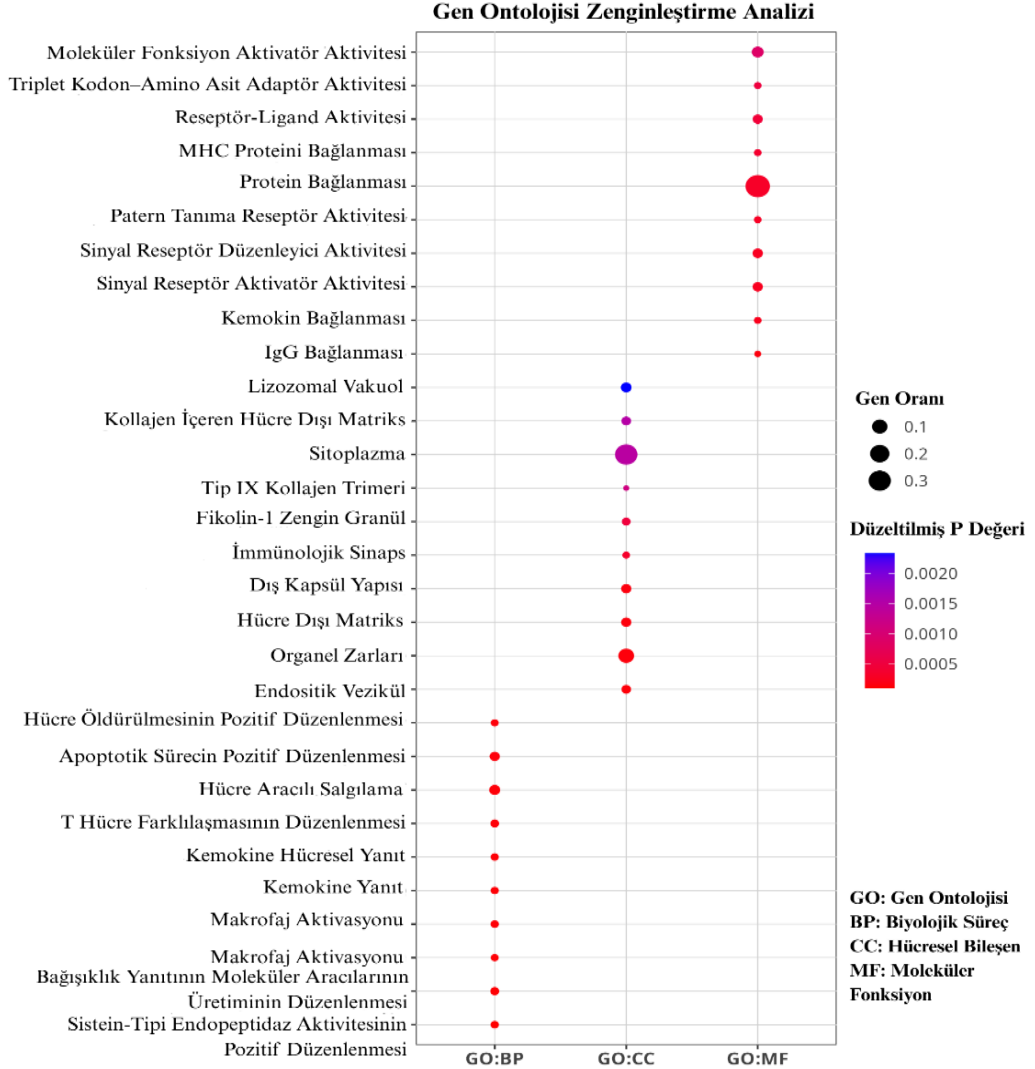
Grafik, R yazılımı (v4.x) ve ggplot2 paketi (v3.4.2) kullanılarak oluşturulmuştur.

#### Şekil 4.8. C grubu/A grubu Yolak Analizi

#### GO: D Grubu (25 °C 3 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması

Grafiğe bakıldığında, özellikle MHC protein bağlanması, protein bağlanması ve reseptör-ligand aktiviteleri gibi moleküler fonksiyon terimlerinde büyük ve kırmızı noktaların öne çıktığı tespit edildi. Bu çalışmandaki genlerin önemli bir kısmının bağlanma ve reseptör aktiviteleri ile ilişkili olduğunu ve bu terimlerin istatistiksel olarak oldukça anlamlı (düşük p-değerli) çıktığı tespit edildi. Hücresel bileşen tarafında sitoplazma, kollajen içeren hücre dışı matriks ve lizozomal koful gibi yapılar öne

çıkarken, biyolojik süreç tarafında kemokin yanıtı, hücre öldürülmesinin pozitif düzenlenmesi, T hücre farklılaşması gibi immün ve hücreyel yanıt süreçlerinin anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** D grubu /A grubu Gen Ontolojisi

### **Yolak: D Grubu (25 °C 3 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması**

Grafikte özellikle İnterlökinler aracılı sinyalizasyon, TLR sinyal kaskadı ile ilişkili hastalıklar, bağışıklık sistemi hastalıkları, Wnt aracılı sinyalizasyon ve viral proteinlerin sitokin ve sitokin reseptörleri ile etkileşimi gibi yollarda büyük ve kırmızı noktalar dikkat çekici şekilde görüldü. Bu durum, genlerinizin bağışıklık yanıtı, sinyal iletimi, enflamasyon ve enfeksiyon süreçleri gibi temel biyolojik mekanizmalarla güçlü biçimde ilişkili olduğu tespit edildi. KEGG, REAC ve WP veri tabanlarının ortak bulgusu,

genlerinin özellikle immün yanıt ve sinyal yolları ile hastalık ilişkili süreçlerde anlamlı şekilde zenginleştiği belirlendi. Özetle grafik, çalışmanızdaki genlerin bağışıklık sistemi, sinyal iletimi ve hastalıkla ilişkili yollarda yoğunlaştığını ve bu yolların istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu tespit edildi. Şekil 4.10'da gösterildi.



Grafik, R yazılımı (v4.x) ve ggplot2 paketi (v3.4.2) kullanılarak oluşturulmuştur

**Şekil 4.10.** D grubu /A grubu Yolak Analizi

### **GO: E Grubu (25 °C 24 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması**

Grafikte özellikle MHC Sınıf II protein kompleksi bağlanması, Toll-benzeri reseptör bağlanması, sitokin ve T hücre reseptörü aktiviteleri gibi bağışıklık sistemi ve reseptör etkileşimiyle ilgili moleküler fonksiyonların öne çıktığı görüldü. Hücresel

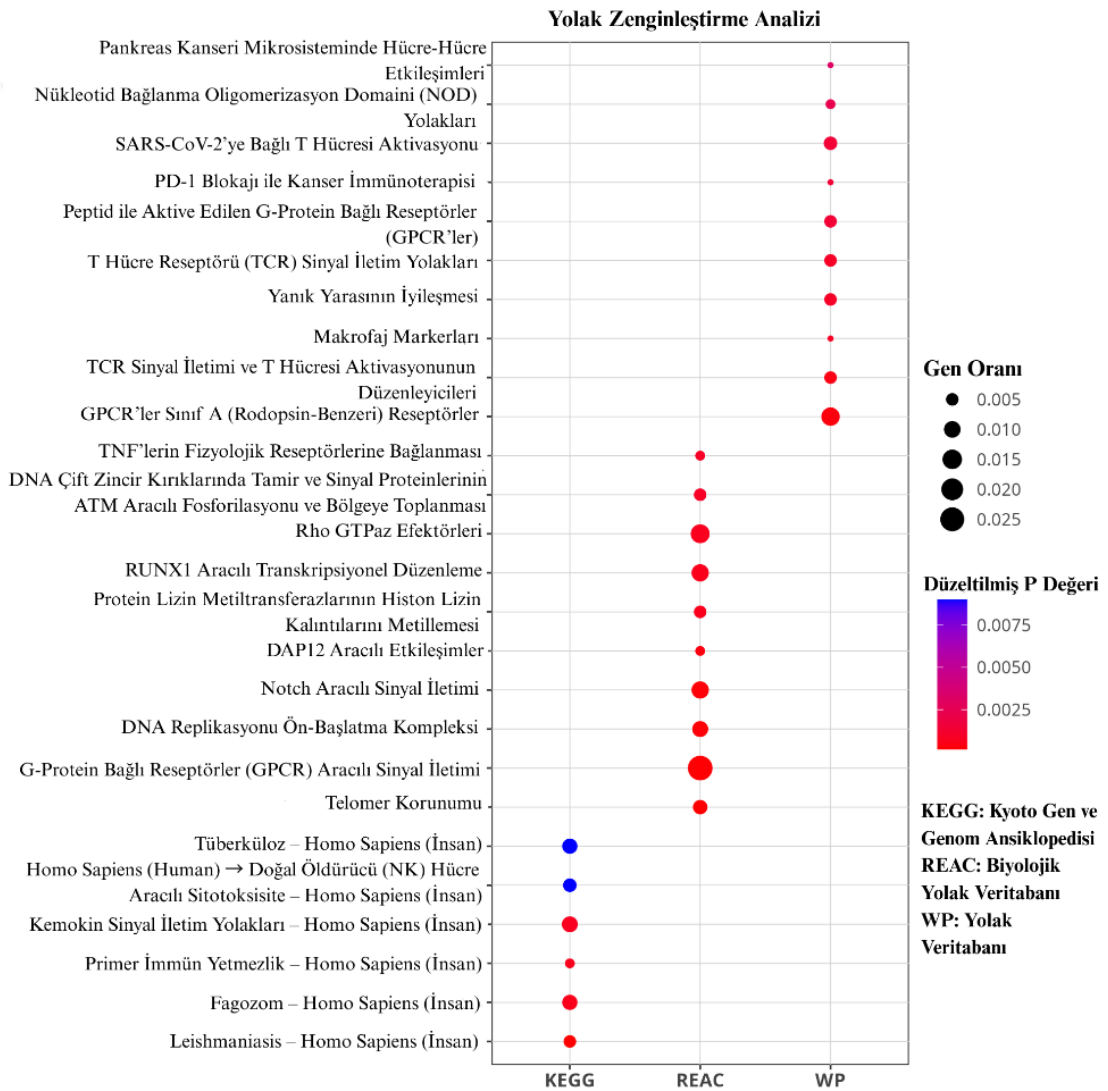
bileşen tarafında lizozomal zar, golgi aygıtı, fagositoz uzantıları ve spesifik granül lümeni gibi hücre içi taşıma ve bağışıklıkla ilişkili organeller anlamlı biçimde zenginleşmiş durumda olup, biyolojik süreç kategorisinde ise NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörü aktivitesinin düzenlenmesi, akut inflamatuvar yanıtın pozitif düzenlenmesi, kanonik inflamamazom kompleksi oluşumu ve hidrolaz/peptidaz enzim aktivitelerinin düzenlenmesi gibi immün yanıt ve inflamasyon süreçlerinin dikkat çektiği saptandı. Özetle grafik, genlerinizin hem reseptör bağlanması ve immün fonksiyonlar hem de lizozomal ve granüler yapılar ile inflamatuvar süreçlerde yoğunlaştığını ve bu kategorilerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde zenginleştiği tespit edildi. Şekil 4.11’de gösterildi.



**Şekil 4.11.** E grubu/A grubu Yolak Analizi

## Yolak: E Grubu (25 °C 24 Saat) /A Grubu (Kontrol) Karşılaştırması

Grafikte en dikkat çekici bulgular arasında SARS-CoV-2'ye bağlı T hücresi aktivasyonu, PD-1 blokajı ile kanser immünoterapisi, T hücre reseptörü (TCR) sinyal iletimi, GPCR aracılı sinyal iletimi, TNF'lerin fizyolojik reseptörlerine bağlanması, DNA çift zincir kırıklarının onarımı ve ATM aracılı fosforilasyon gibi bağışıklık yanıtı, inflamasyon, DNA onarımı ve hücre sinyalizasyonu ile ilgili kritik yolların yer aldığı saptandı. Ayrıca doğal öldürücü (NK) hücre aracılı sitotoksinite, kemokin sinyal iletimi, fagosom ve leishmaniasis gibi KEGG veri tabanında tanımlı bağışıklıkla ilişkili yollarda da anlamlı zenginleşmenin bulunduğu belirlendi (Şekil 4.12).



Grafik, R yazılımı (v4.x) ve ggplot2 paketi (v3.4.2) kullanılarak oluşturulmuştur

**Şekil 4.12.** E grubu /A grubu Yolak Analizi

#### 4.2.6. Sekans Ekspresyon Verileri

##### B (31 °C 3 Saat) /A (Kontrol) Sekans Ekspresyon Verileri

Tablo 4.4.'te ki değerlere göre yer alan genlerin deney (B) ve kontrol (A) gruplarındaki ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, ATF6 geninin ekspresyonunun 1.68 kat arttığı, HSP90AA1 geninin 2.63 kat arttığı, XBP1 geninin 0.77 kata düştüğü, TP53 geninin 0.49 kata gerilediği, YBX1 geninin 1.05 kat arttığı, UBA52 geninin 0.39 kata düştüğü, CARHSP1 geninin 0.31 kata gerilediği ve LIN28A geninin ise yalnızca deney grubunda ifade edilerek kontrol grubunda saptanmadığı belirlendi.

**Tablo 4.4.** B Grubu/A Grubu gen ifadesi verilerinin karşılaştırılması

Gen Kimliği	Gen Biyotipi	Gen Adı	Kat Değişim	Göreceli Kat Değişimi	B Ham Okuma Sayısı	A Ham Okuma Sayısı	B Normalize Okuma Sayısı	A Normalize Okuma Sayısı
ENSG00000118217	Protein Kodlayan	ATF6	1.687	1.687	1213	2797	2392.07	1418.34
ENSG00000080824	Protein Kodlayan	HSP90AA1	2.633	2.633	55645	82200	109733.42	41683.01
ENSG00000100219	Protein Kodlayan	XBP1	0.766	1.305	714	3623	1408.03	1837.2
ENSG00000141510	Protein Kodlayan	TP53	0.488	2.05	417	3325	822.34	1686.08
ENSG00000065978	Protein Kodlayan	YBX1	1.053	1.053	16877	62354	33281.89	31619.25
ENSG00000221983	Protein Kodlayan	UBA52	0.391	2.555	1011	10046	1993.72	5094.25
ENSG00000153048	Protein Kodlayan	CARHSP1	0.31	3.226	150	1882	295.8	954.35
ENSG00000131914	Protein Kodlayan	LIN28A	0	Inf	0	7	0	3.55

##### C (31 °C 24 Saat) /A (kontrol) Sekans Ekspresyon Verileri

Tablo 4.5.'te ki karşılaştırmalara genel olarak bakıldığında, ATF6 geninin 1.47 kat, HSP90AA1 geninin 1.50 kat, YBX1 geninin 1.08 kat ve LIN28A geninin 2.02 kat arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, XBP1 geninin ekspresyonu 0.59 kata, TP53 geninin 0.36 kata, UBA52 geninin 0.44 kata ve CARHSP1 geninin 0.32 kata düştüğü saptandı.

**Tablo 4.5.** C Grubu /A Grubu gen ifadesi verilerinin karşılaştırılması

Gen Kimliği	Gen Biyotipi	Gen Adı	Kat Değişim	Göreceli Kat Değişimi	C Ham Okuma Sayısı	A Ham Okuma Sayısı	C Normalize Okuma Sayısı	A Normalize Okuma Sayısı
ENSG00000118217	Protein Kodlayan	ATF6	1.474	1.474	2045	2797	2903.96	1969.68
ENSG00000080824	Protein Kodlayan	HSP90AA1	1.502	1.502	61246	82200	86971.12	57886.13
ENSG00000100219	Protein Kodlayan	XBP1	0.596	1.678	1071	3623	1520.85	2551.36
ENSG00000141510	Protein Kodlayan	TP53	0.364	2.748	600	3325	852.02	2341.5

ENSG00000065978	Protein Kodlayan	YBX1	1.083	1.083	33492	62354	47559.62	43910.36
ENSG00000221983	Protein Kodlayan	UBA52	0.439	2.28	2185	10046	3102.76	7074.5
ENSG00000153048	Protein Kodlayan	CARHSP1	0.325	3.08	303	1882	430.27	1325.32
ENSG00000131914	Protein Kodlayan	LIN28A	2.016	2.016	7	7	9.94	4.93

#### D (25 °C 3 Saat) /A (Kontrol) Sekans Ekspresyon Verileri

Tablo 4.6.'da ki D grubu/A grubu karşılaştırmasında yer alan genlerin deney (D) ve kontrol (A) gruplarındaki ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; ATF6 geninin 1.44 kat, HSP90AA1 geninin 1.14 kat, YBX1 geninin 1.03 kat ve LIN28A geninin 1.18 kat arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, XBP1 geninin 0.80 kata, TP53 geninin 0.63 kata, UBA52 geninin 0.48 kata ve CARHSP1 geninin 0.54 kata düştüğü saptanmıştır. Bu bulgular, deney grubunda bazı genlerin ekspresyonunda artış, bazılarında ise azalmanın meydana geldiği saptandı.

**Tablo 4.6.** D Grubu /A Grubu gen ifadesi verilerinin karşılaştırılması

Gen Kimliği	Gen Biyotipi	Gen Adı	Kat Değişim	Göreceli Kat Değişimi	D Ham Okuma Sayısı	A Ham Okuma Sayısı	D Normalize Okuma Sayısı	A Normalize Okuma Sayısı
ENSG00000118217	Protein Kodlayan	ATF6	1.441	1.441	974	2797	1981.55	1374.82
ENSG00000080824	Protein Kodlayan	HSP90AA1	1.141	1.141	22660	82200	46100.56	40404.11
ENSG00000100219	Protein Kodlayan	XBP1	0.801	1.249	701	3623	1426.15	1780.83
ENSG00000141510	Protein Kodlayan	TP53	0.63	1.588	506	3325	1029.43	1634.35
ENSG00000065978	Protein Kodlayan	YBX1	1.029	1.029	15497	62354	31527.82	30649.12
ENSG00000221983	Protein Kodlayan	UBA52	0.485	2.06	1178	10046	2396.58	4937.95
ENSG00000153048	Protein Kodlayan	CARHSP1	0.539	1.856	245	1882	498.44	925.07
ENSG00000131914	Protein Kodlayan	LIN28A	1.183	1.183	2	7	4.07	3.44

#### E (25 °C 24 Saat) /A (Kontrol) Sekans Ekspresyon Verileri

E grubu/A grubu karşılaştırılmasında Tabloda yer alan genlerin deney (E) ve kontrol (A) gruplarındaki ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında; ATF6 geninin 1.56 kat, HSP90AA1 geninin 1.88 kat, TP53 geninin 2.03 kat, UBA52 geninin 2.43 kat, CARHSP1 geninin 2.12 kat ve LIN28A geninin 2 kat arttığı belirlenmiştir. Buna karşılık, XBP1 geninin 0.91 kata, YBX1 geninin ise 0.99 kata düştüğü saptandı (Tablo 4.7.).

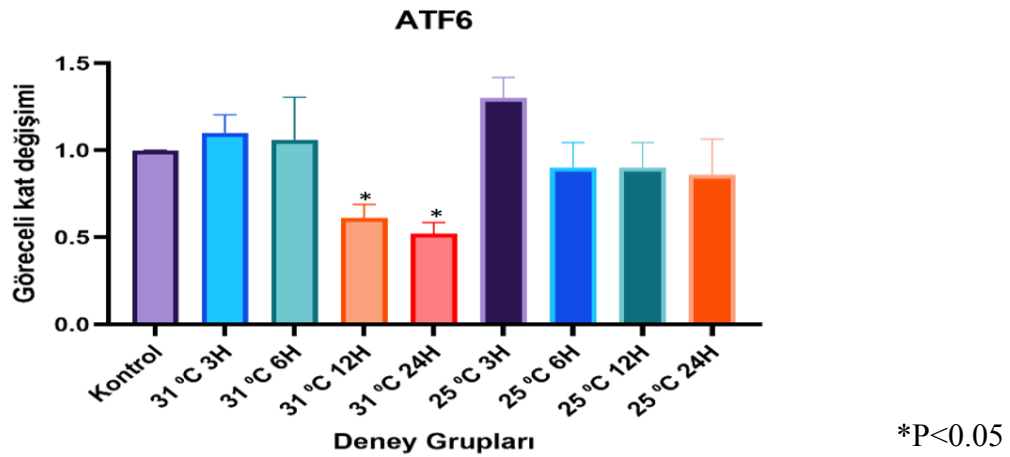
**Tablo 4.7.** E Grubu/ A Grubu gen ekspresyon verilerinin karşılaştırılması

Gen Kimliği	Gen Biyotipi	Gen Adı	Kat Değişim	Göreceli Kat Değişimi	E Ham Okuma Sayısı	A Ham Okuma Sayısı	E Normalize Okuma Sayısı	A Normalize Okuma Sayısı
ENSG00000118217	Protein Kodlayan	ATF6	1.56	1.56	2182	2797	3085.81	1977.78
ENSG00000080824	Protein Kodlayan	HSP90AA1	1.879	1.879	77226	82200	109214.06	58124.18
ENSG00000100219	Protein Kodlayan	XBP1	0.909	1.101	1646	3623	2327.8	2561,85
ENSG00000141510	Protein Kodlayan	TP53	0.493	2.03	819	3325	1158.24	2351.13
ENSG00000065978	Protein Kodlayan	YBX1	0.99	1.01	30870	62354	43656.77	44090.94
ENSG00000221983	Protein Kodlayan	UBA52	0.412	2.427	2070	10046	2927.42	7103.59
ENSG00000153048	Protein Kodlayan	CARHSP1	0.473	2.115	445	1882	629.33	1330.77
ENSG00000131914	Protein Kodlayan	LIN28A	2	2	7	7	9.9	4.95

### 4.3. RT-qPCR ile Gen İfadeleme Analizi

#### 4.3.1. ATF 6 Gen İfadeleme

Kontrol grubuna göre C grubu (31 °C 12. Saat) (0.61) kat ve 24. saatte (0.52) kat inkübasyon uygulanan gruplarda ATF6 gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ( $p < 0.05$ ). Diğer gruplarda (31 °C 3 saat, 31 °C 6 saat, 25 °C 3 saat, 25 °C 6 saat, 25 °C 12 saat, 25 °C 24 saat) ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). Şekil 4.13'te gösterildi.

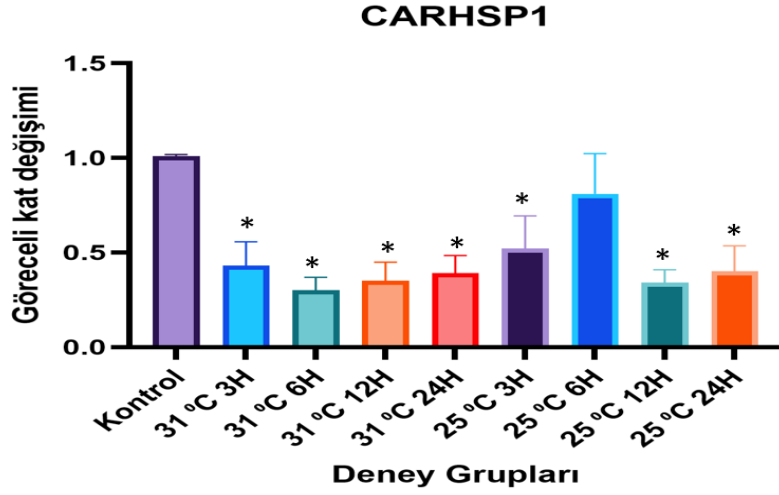


Şekil 4.13. Soğuk stresinin ATF 6 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.2. Carhsp1 Gen İfadeleme

CARHSP1 gen ekspresyon düzeyleri kontrol grubu (37 °C) ile karşılaştırıldığında, düşük sıcaklık uygulamalarında genel olarak anlamlı bir azalma saptandı. 31 °C grubunda 3. Saatte (0,43 kat) 6. saatte (0.30 kat), 12. saatte (0.35 kat) ve 24.saatte (0.39 kat)

CARHSP1 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azalma görüldü ( $p < 0.05$ ). Yine benzer şekilde 25 °C grubunda da 3. saatte (0.52 kat), 12. saatte (0.34 kat) ve 24. saatte (0.40 kat) gen ekspresyonunda anlamlı azalma görüldü. Ancak, 25 °C’de 6. saatte kontrol grubuna göre kısmi bir artış eğilimi gözlemlenmiş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Şekil 4.14’te gösterildi.

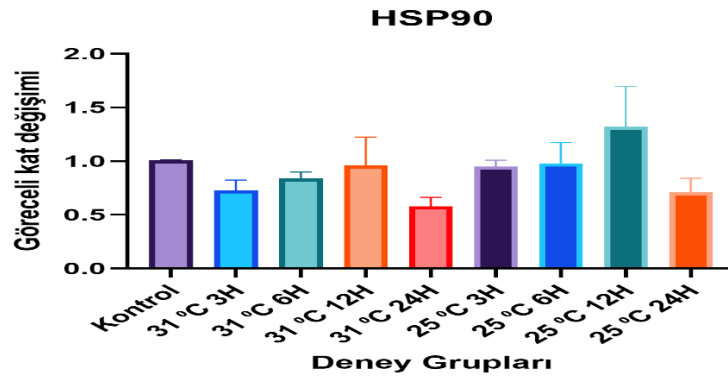


\* $P < 0.05$

Şekil 4.14. Soğuk stresinin CARHSP1 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.3. Hsp90 Gen İfadenmesi

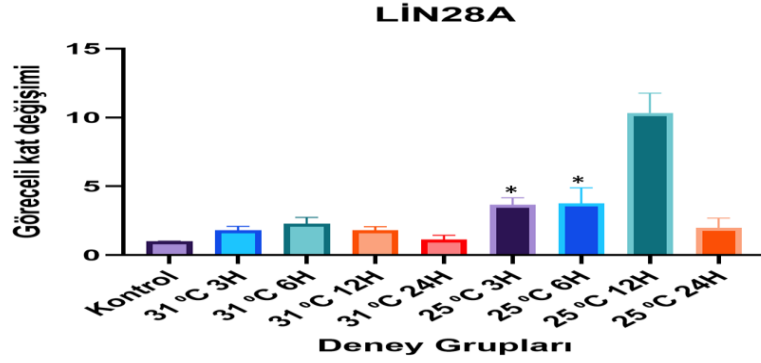
HSP90 gen ekspresyon düzeyleri ise 31 °C grubunda erken dönemde 3. ve 6. saatler de kontrol grubuna kıyasla düşüş gözlenip, 12. saatte kontrol seviyelerine yaklaşır, 24. saatte ise belirgin şekilde azalma gözlemlendi. 25 °C grubunda ise 3. ve 6. saatlerde zaman noktalarında kontrol düzeyine yakın ekspresyon değerleri gözlenirken, 12. saatte en yüksek artış saptanıp, 24. saatte ise yeniden düşüş eğilimi izlenildi. Şekil 4.15’te gösterildi.



Şekil 4.15. Soğuk stresinin HSP90 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.4. Lin28A Gen İfadelemesi

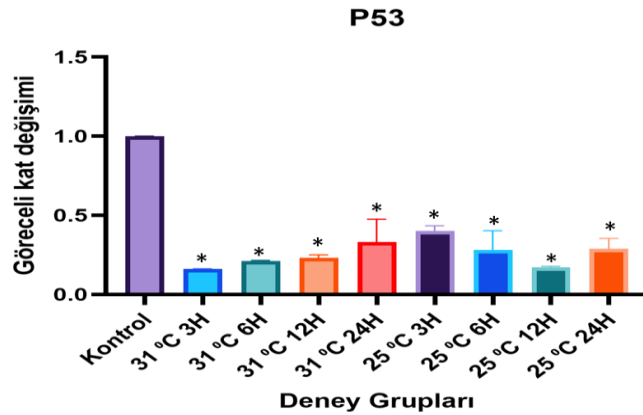
LİN28A gen ekspresyonu, 31 °C grubunda kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir değişim gözlenmedi. Buna karşın 25 °C grubunda ekspresyon düzeyi 3. Saatte (3.65 kat) ve 6. Saatte (3.77 kat) anlamlı şekilde artmış ( $p<0.05$ ), 12. saatte en yüksek seviyeye ulaşarak yaklaşık 10 kat artış göstermiş olup, 24. saatte ise gen ekspresyon düzeyi tekrar azalarak kontrol seviyelerine yaklaştığı saptandı. Şekil 4.16’da gösterildi.



Şekil 4.16. Soğuk stresinin LİN28A gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.5. P53 Gen İfadelemesi

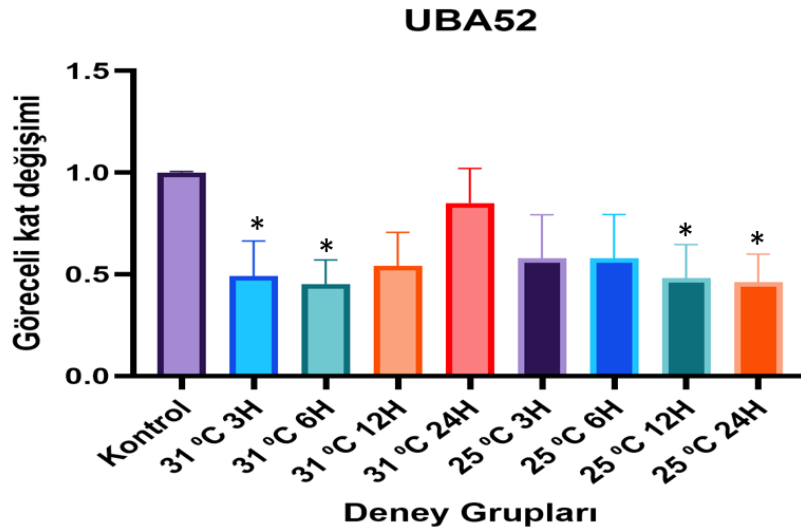
P53 gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla hem 31 °C hem de 25 °C gruplarında belirgin olarak azalmıştır. 31 °C grubunda 3. Saatte (0.16 kat), 6. Saatte (0.21 kat) ve 12. Saatte (0.23 kat) anlamlı düşüş gözlenirken, 24. Saatte (0.33 kat) ekspresyonda kısmi bir toparlanma eğilimi saptandı. 25 °C grubunda ise 3. Saatte (0.40 kat), 6. Saatte (0.28 kat), 12. Saatte (0.17 kat) ve 24. Saatte (0.29 kat) kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma devam ettiği gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Şekil 4.17’de gösterildi.



Şekil 4.17. Soğuk stresinin P53 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.6. Uba52 Gen İfadelemesi

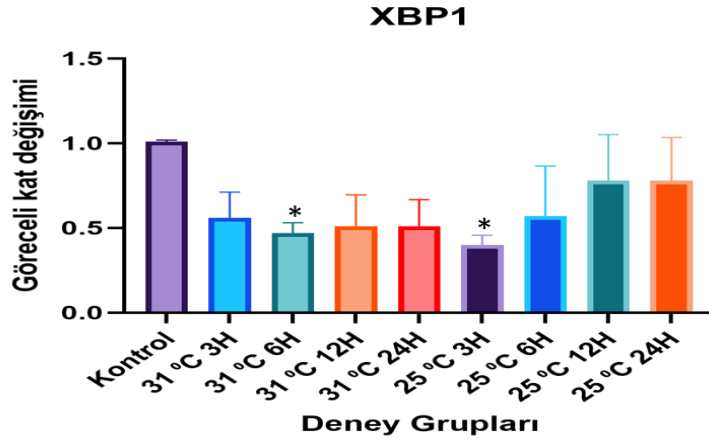
UBA52 gen ekspresyon düzeyleri, 31 °C grubunda 3. Saatte (0.49 kat) ve 6. Saatte (0.45 kat) saatlerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). 12. saatte ekspresyonda kısmi bir azalma görülmüş olup, 24. saatte ise kontrol seviyelerine yakın değerler elde edildi. 25 °C grubunda ise 12. Saatte (0.48 kat) ve 24. Saatte (0.46 kat) saatlerde ekspresyon düzeyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. ( $p<0.05$ ). Şekil 4.18’de gösterildi.



Şekil 4.18. Soğuk stresinin UBA52 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.7. Xbp1 Gen İfadelemesi

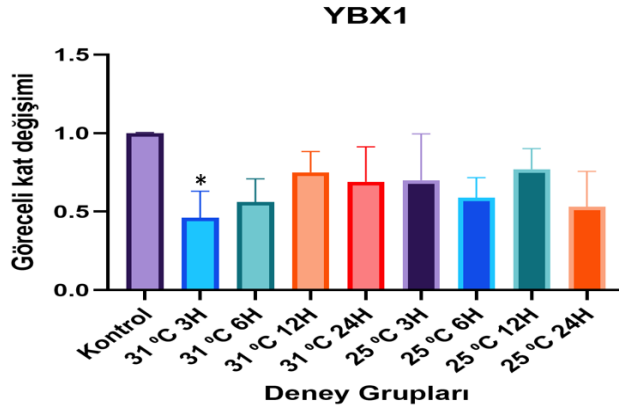
XBPI gen ekspresyon düzeyleri, 31 °C grubunda 6. saatte (0.47 kat) ve 25 °C 3. saatte (0.40 kat) kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ( $p<0.05$ ). 25 °C grubunda ise 3h ve 6h’de ekspresyon düzeyi düşük seyrettiği saptanıp, 12. ve 24. saatlerde ise kontrol seviyelerine yaklaşan bir artış eğilimi gözlemlendi. Şekil 4.19’da gösterildi.



Şekil 4.19. Soğuk stresinin XBP1 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.3.8. Ybx1 Gen İfadenmesi

YBX1 gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla 31 °C’de 3. saatte anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.05$ ). 31 °C’nin diğer zaman noktalarında ve 25 °C grubunun tüm zamanlarında ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre düşük seyrettiği saptanıp, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi. Şekil 4.20’de gösterildi.



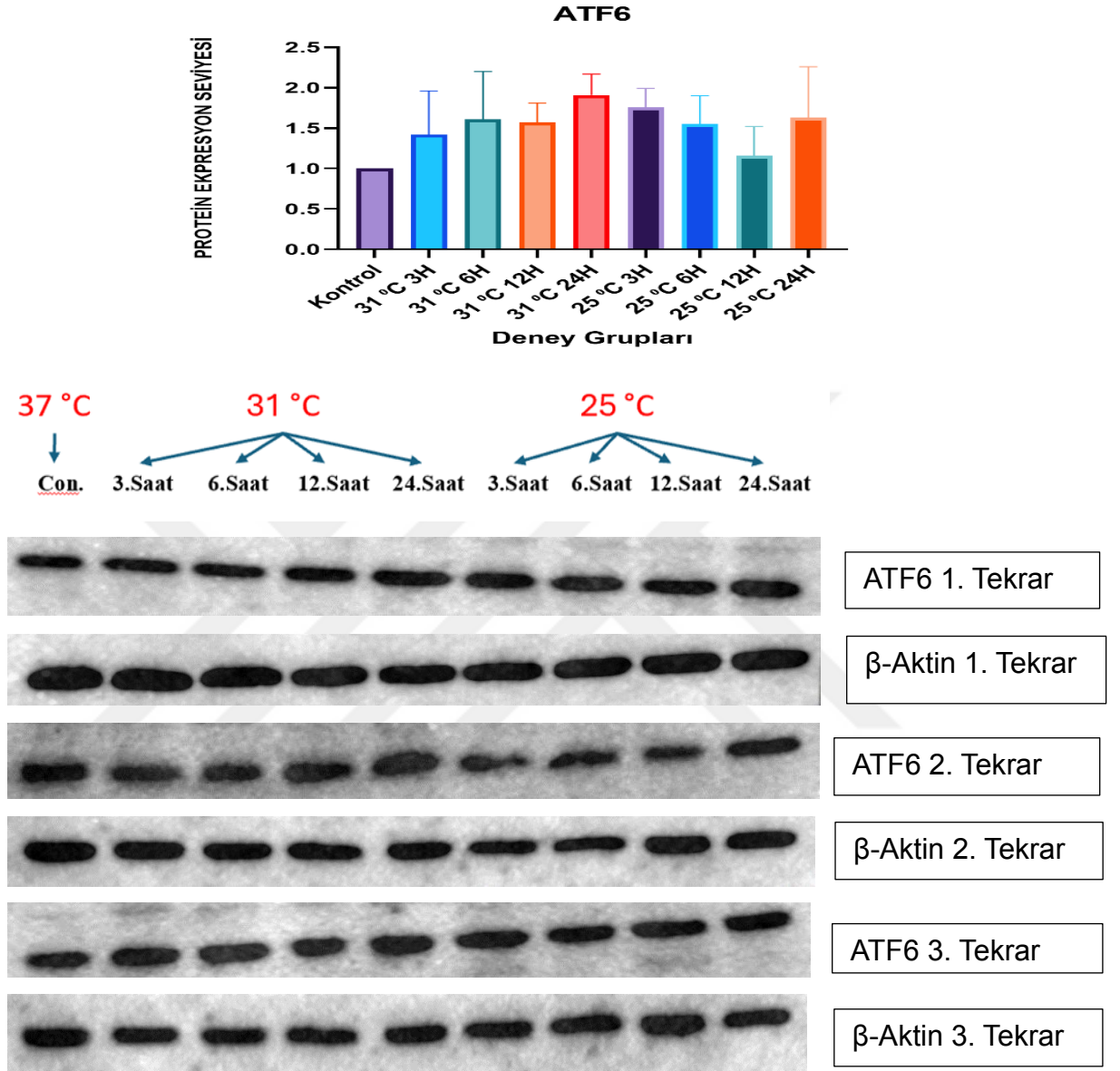
Şekil 4.20. Soğuk stresinin YBX1 gen ifadenmesi üzerine etkileri

#### 4.4. Western Blot ile Protein İfadenme Analizi

##### 4.4.1. Atf6 Protein İfadenmesi

ATF6 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla 31 °C’de tüm zaman noktalarında artış göstermiş olup, özellikle 6. ve 24. saatte bu artış daha belirgin gözlemlendi. 25 °C grubunda ise 3. saatte kontrol grubuna kıyasla artış izlenirken, 6. ve

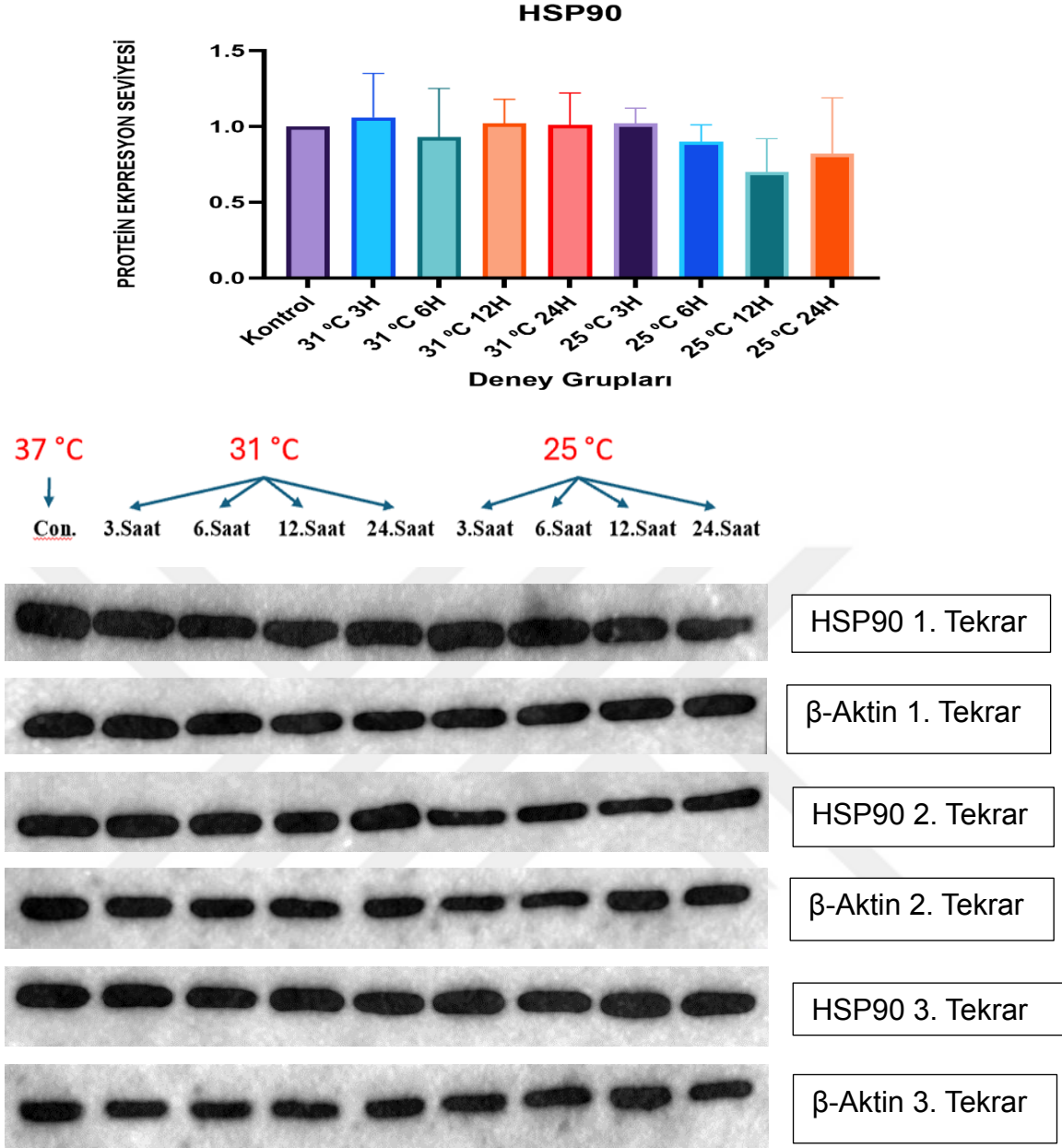
12. saatlerde ekspresyon nispeten daha düşük bulunup, 24. saatte ise tekrar artış eğilimi saptandı. Şekil 4.21’de gösterildi.



Şekil 4.21. Soğuk stresinin ATF6 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.2. Hsp90 Protein İfadelemesi

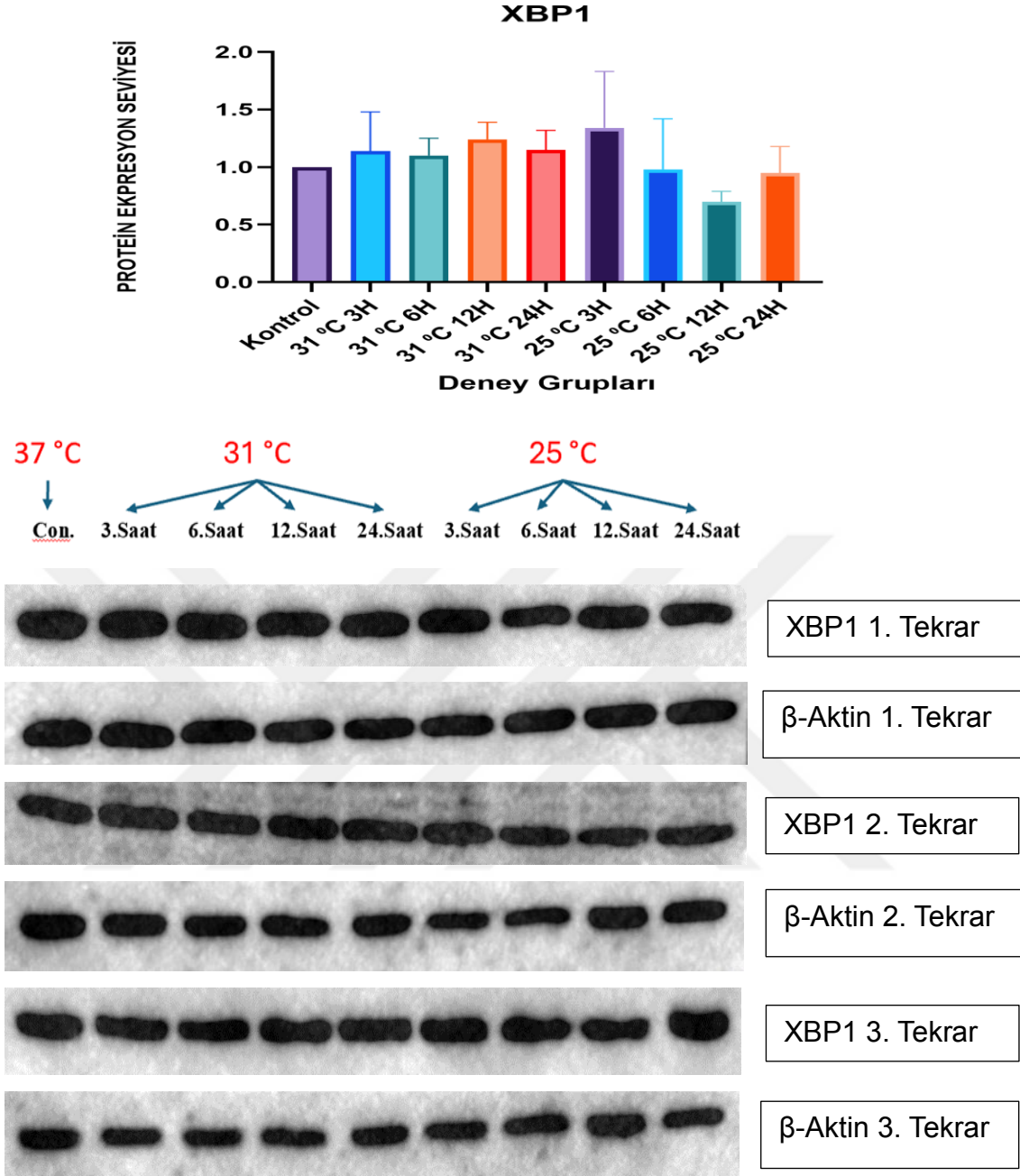
HSP90 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla 31 °C’de genel olarak stabil olup 3, 12 ve 24 saatlerde hafif artış gözlemlendi. 25 °C grubunda ise 6 ve 12 saatlerde zaman noktalarında ekspresyon düzeyi kontrol grubunun altında bulunup 24 saatte ise yeniden artış eğilimi görüldü. Şekil 4.22’de gösterildi.



Şekil 4.22. Soğuk stresinin HSP90 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.3. Xbp1 Protein İfadenmesi

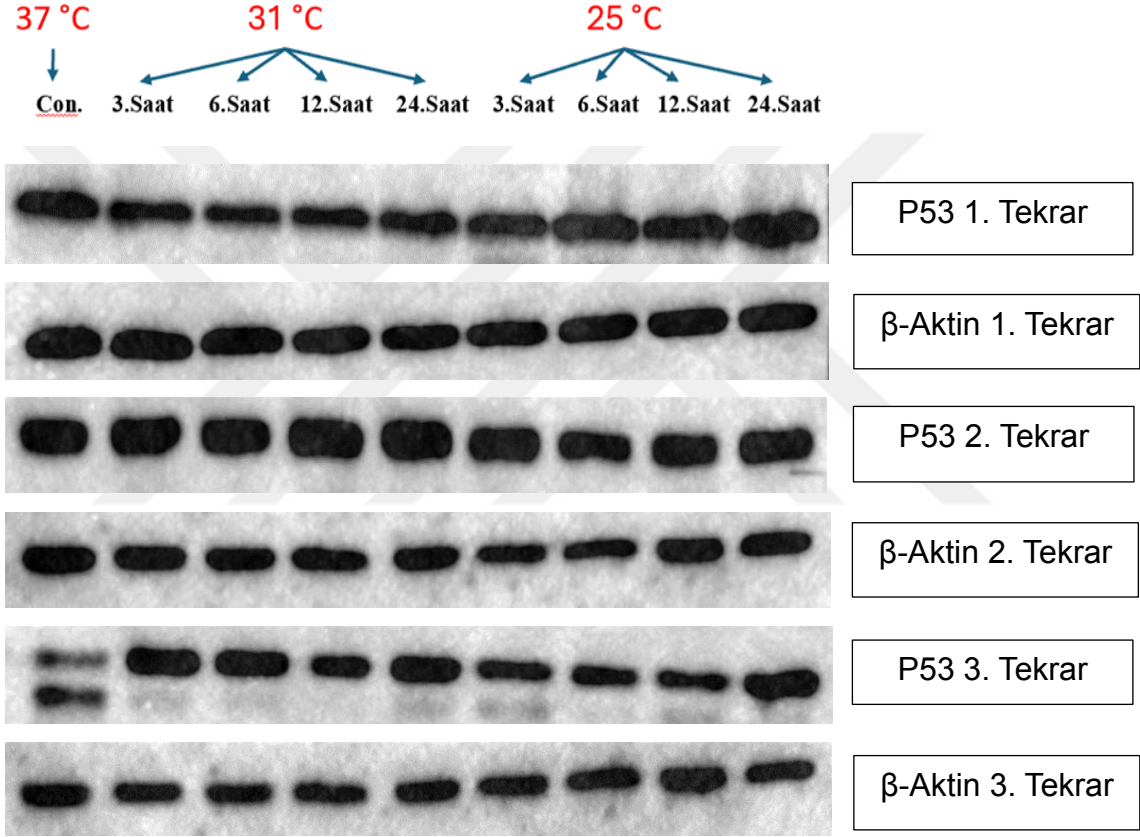
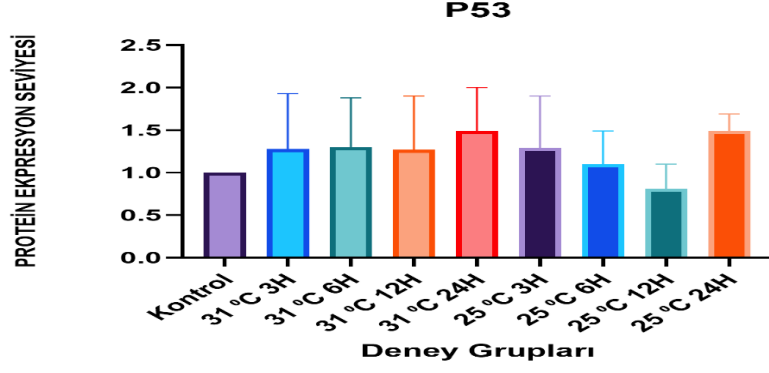
XBP1 protein ekspresyon düzeyleri, 31 °C’de genel olarak kontrol grubuna yakın veya hafif yüksek gözlenip, özellikle 12. ve 24. saatlerde artış eğilimi tespit edildi. 25 °C grubunda ise 3. saatte ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre artmış olup, 6. ve 12. saatlerde belirgin şekilde azalma ve 24. saatte ise tekrar toparlanma eğilimi gözlemlendi. Şekil 4.23’te gösterildi.



Şekil 4.23. Soğuk stresinin XBP1 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.4. P53 Protein İfadenlenmesi

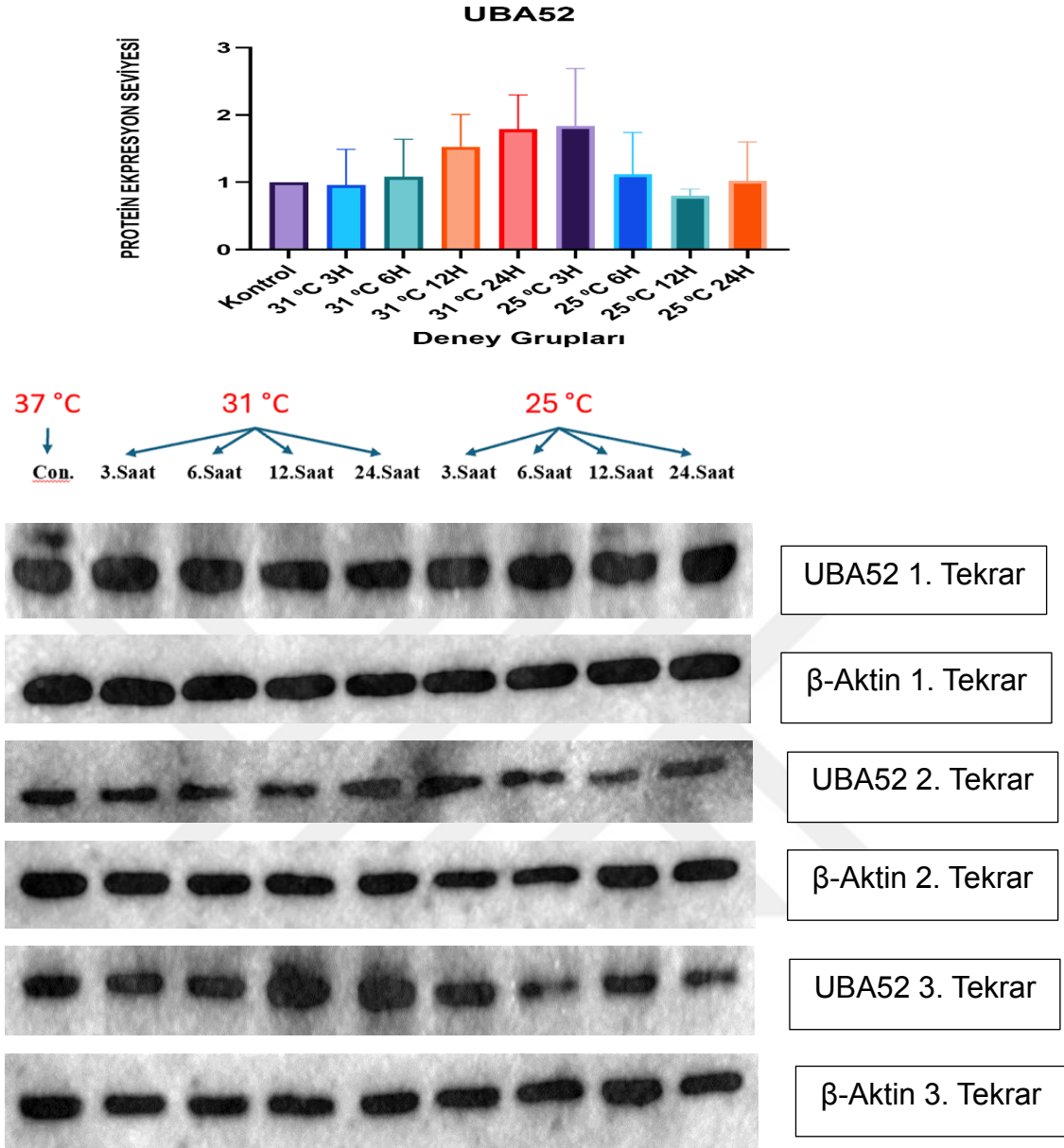
P53 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla 31 °C’de tüm zaman noktalarında artış göstermiş olup, en belirgin yükselme 24. saatte belirlendi. 25 °C grubunda ise 3. saatte hafif bir artış, 6. ve 12. saatlerde kontrolün altında azalma ve 24. saatte ise belirgin bir artış gözlemlendi. Şekil 4.24’te gösterildi.



**Şekil 4.24.** Soğuk stresinin P53 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.5. Uba52 Protein İfadelenmesi

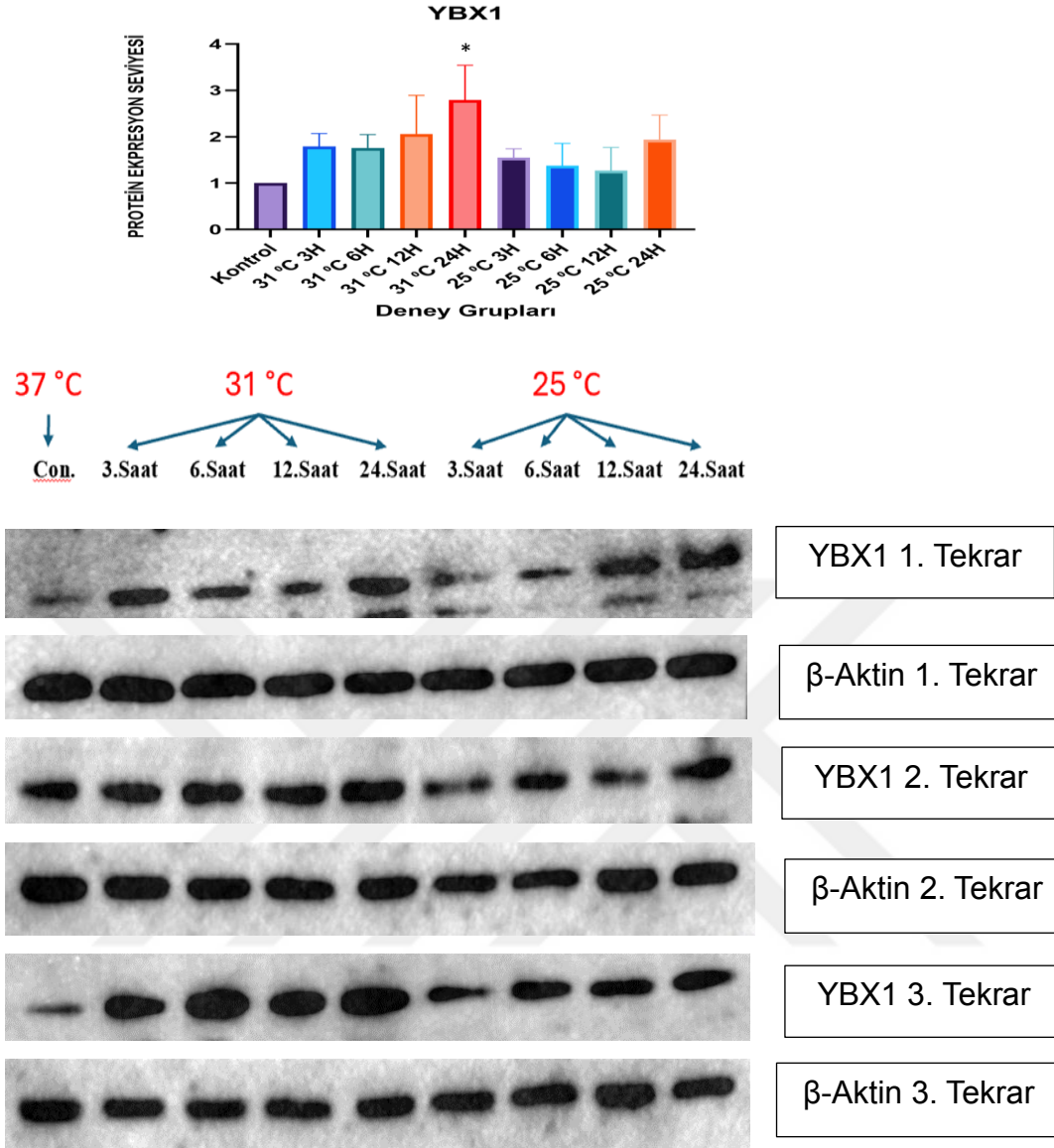
UBA52 protein ekspresyon düzeyleri, 31 °C grubunda 3 ve 6 saatte kontrol grubuna yakın bulunup, 12 saatte artış eğilimi göstermiş ve 24 saatte bu artma belirgin şekilde tespit edildi. 25 °C grubunda ise 3 saatte ekspresyon kontrol grubunun üzerinde bulunup 6 saatte ve özellikle 12 saatte azalma, 24 saatte ise yeniden kontrol seviyelerine yaklaşma tespit edildi. Şekil 4.25'te gösterildi.



**Şekil 4.25.** Soğuk stresinin UBA52 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.6. Ybx1 Protein İfadenmesi

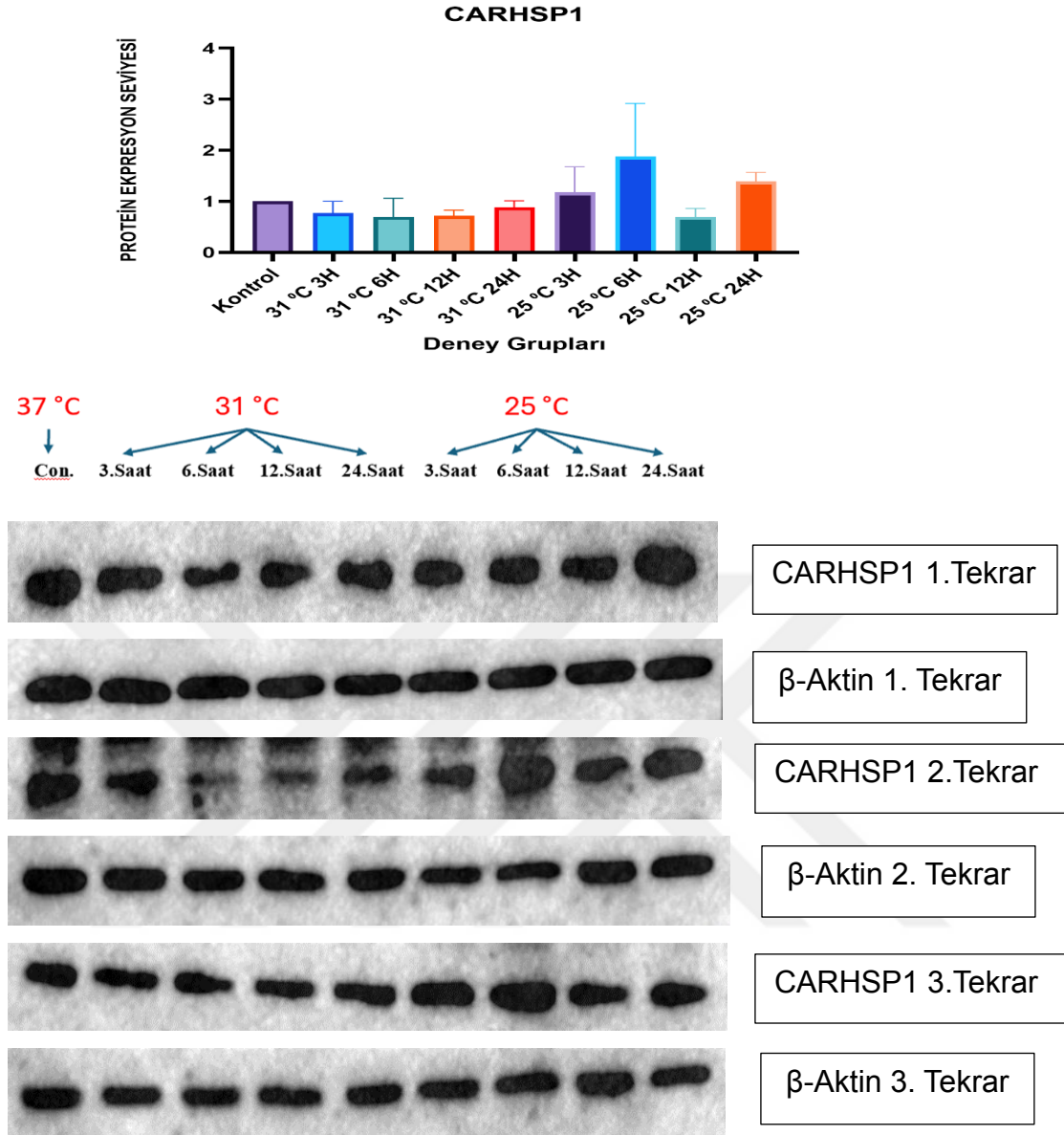
YBX1 protein ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla 31 °C’de süreye bağlı bir artış gösterip, özellikle 24. Saatte (2.79 kat) yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). 25 °C grubunda ise 3 saatte ve 6 saatte kontrol seviyelerine yakın değerler saptanmış olup, 12 saatte ekspresyon da düşüş, 24 saatte ise yeniden artış eğilimi gözlemlendi. Şekil 4.26’te gösterildi.



**Şekil 4.26.** Soğuk stresinin YBX1 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.7. Carhsp1 Protein İfadenmesi

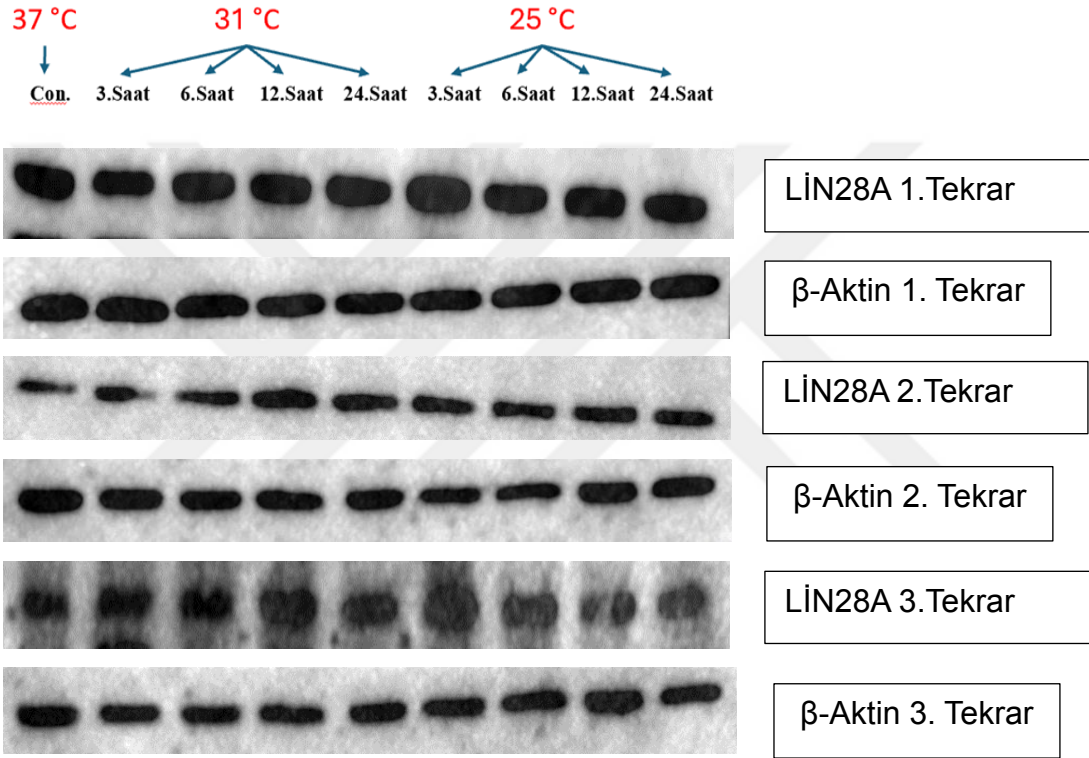
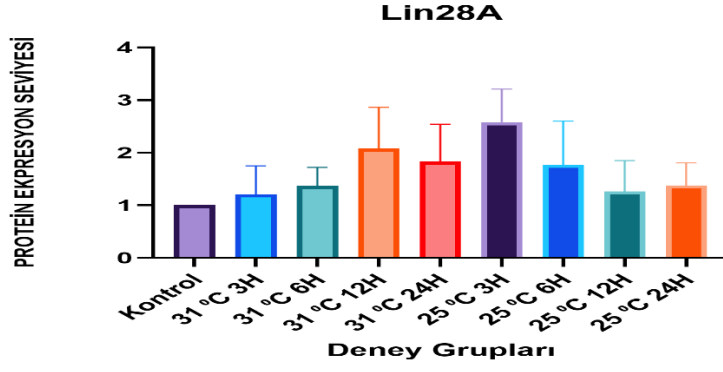
CARHSP1 proteininin kontrol grubuna kıyasla 31 °C’de 3, 6, 12. ve 24. saatlerde belirgin bir düşüş gösterdiği gözlemlendi. Bu azalma özellikle 6. ve 12. saatlerde daha belirgin düzeydedir. Öte yandan 25 °C’de 3. saatte hafif bir artış gözlenirken, 6. saatte belirgin bir yükselme tespit edildi. Ancak 12. saatte kontrolün altında bir düzeye gerilemiş olup, 24. saatte ise kontrolün üzerinde olduğu gözlemlendi. Şekil 4.27’de gösterildi.



**Şekil 4.27.** Soğuk stresinin CARHSP1 protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.4.8. Lin28A Protein İfadelenmesi

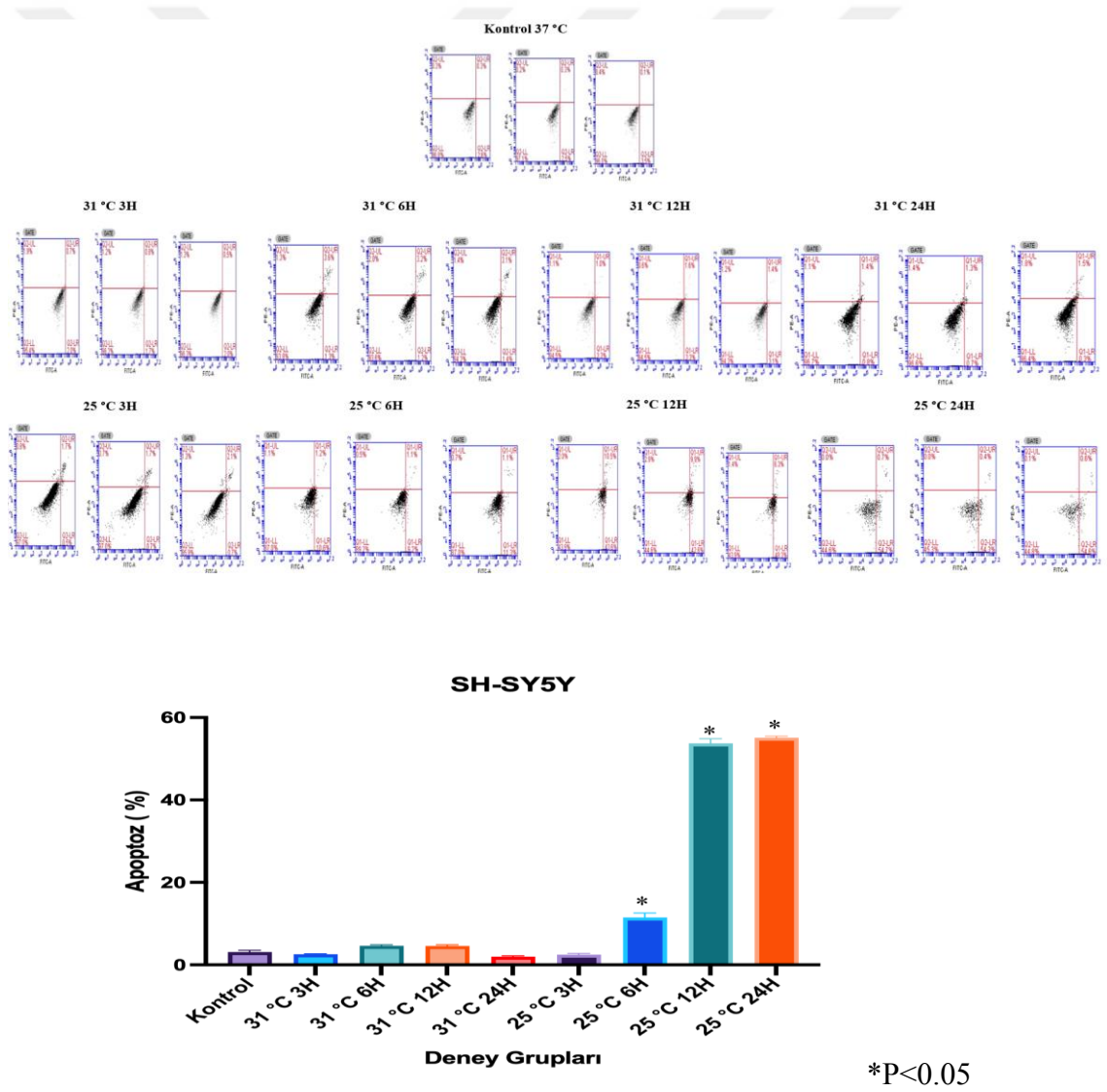
Lin28A protein ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla hem 31 °C hem de 25 °C uygulamalarında artış gözlemlendi. 31 °C koşullarında özellikle 12. ve 24. saatlerde anlamlı düzeyde yükselme tespit edildi. Buna karşılık, 25 °C koşullarında erken dönemde (3. saat) belirgin bir artış gözlemlendi ancak ilerleyen saatlerde ekspresyon seviyelerinde düşüş eğiliminin olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.28’de gösterildi.



Şeki 4.28. Soğuk stresinin LIN28A protein miktarı üzerine etkileri

#### 4.5. Apoptoz Analizi

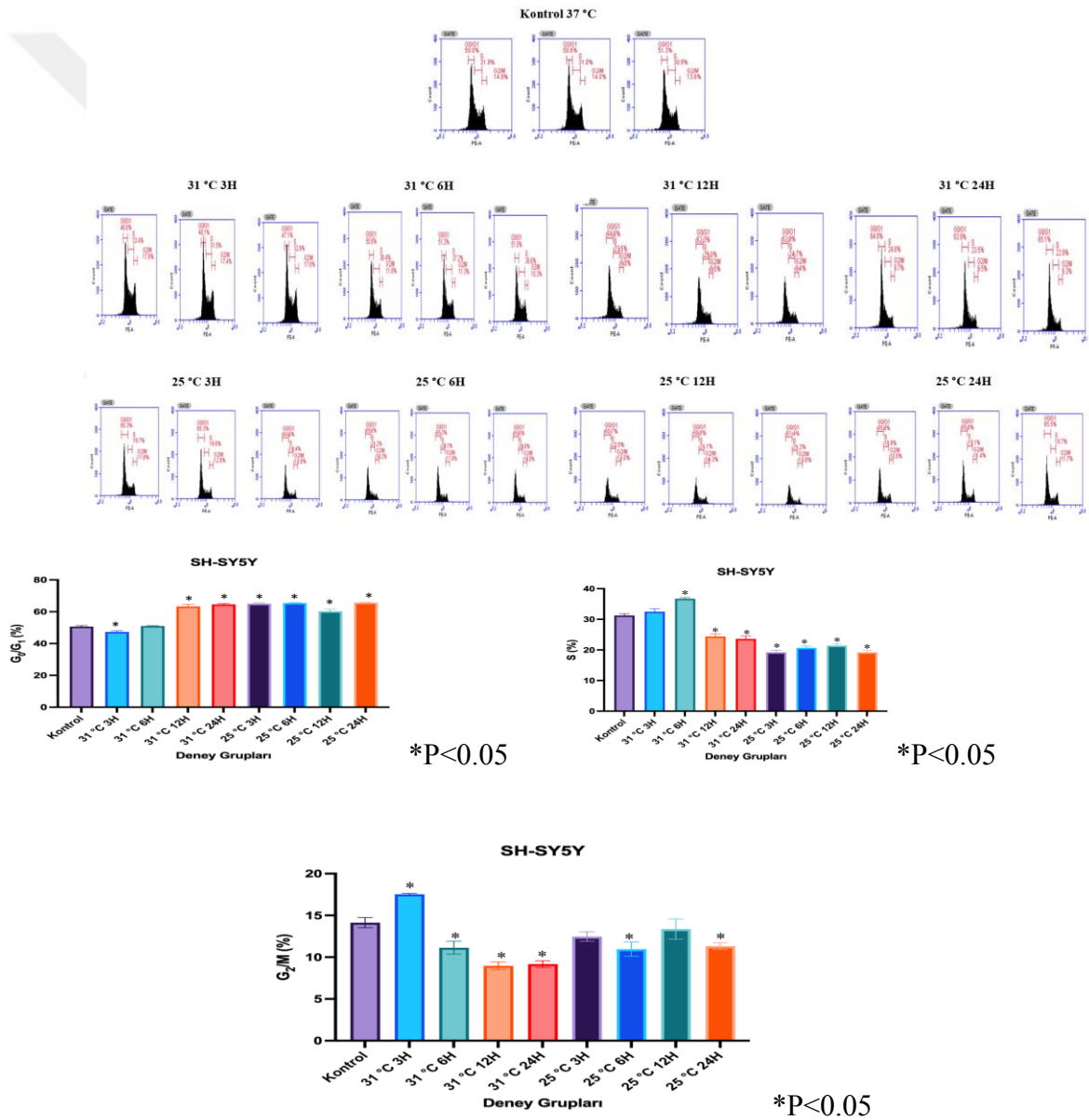
Apoptoz oranları incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla sıcaklık ve inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. 31 °C’de uygulanan tüm sürelerde apoptoz oranında kontrol grubuna göre belirgin bir değişim gözlemlenmedi. Buna karşın 25 °C’de yapılan inkübasyonlarda, apoptoz oranının sürenin uzamasına bağlı olarak anlamlı biçimde arttığı saptandı. Özellikle 25 °C’de 6 saatlik uygulamada apoptoz oranı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Bu artış 12 ve 24 saatlik inkübasyonlarda çok daha belirgin hale gelmiş olup, apoptoz oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Apoptoz testi sonuçları şekil 4.29’da gösterildi.



Şekil 4.29. Soğuk stresinin apoptoz etkileri

#### 4.6. Hücre Döngüsü Analizi

SH-SY5Y hücrelerinde farklı sıcaklık ve inkübasyon sürelerinin hücre döngüsü üzerindeki etkileri incelendiğinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. 31 °C’de 3 saatlik inkübasyon, G<sub>2</sub>/M fazında anlamlı bir artış gözlemlendi (p <0.05). 31 °C’de 6, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlarda ise G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında artış, buna karşılık S ve G<sub>2</sub>/M fazlarında azalma gözlemlendi (p <0.05). 25 °C’de gerçekleştirilen uygulamalarda da süreye bağlı olarak benzer değişimler saptandı. Özellikle 25 °C’de 6 saatlik inkübasyonda G<sub>2</sub>/M fazında anlamlı bir azalma tespit edildi (p <0.05). Hücre döngüsü analizi şekil 4.30’da gösterildi.



Şekil 4.30. Soğuk stresinin hücre döngüsüne etkileri

## 5. TARTIŞMA

Çeşitli organizmalarda soğuk şoku tepkisi hücrel ve moleküler seviyede araştırılmasına karşın özellikle memeli hücrelerinde soğuk stresine adaptasyonu yöneten moleküler mekanizmalar hakkında nispeten az şey bilinmektedir. Yine de soğuk stresine hücrel yanıtın transkripsiyon, translasyon, hücre iskeletinin, hücre döngüsünün ve metabolik süreçlerin modülasyonunu içeren koordineli bir dizi olayı içerdiğine dair genel bir kabul vardır. Hücrelerin kanser yönünde transforme olmalarına neden olan moleküler süreçler metabolik, genetik, proteomik ve epigenetik yönleriyle kapsamlı şekilde çalışılmaktadır. Son yıllarda hücre içi dinamiklerin yanı sıra hücre mikroçevresi bileşenlerinin de transformasyon süreçlerinde etkin olduğu anlaşılmıştır (131). Soğuk stresi kanser hücreleri için de önemli bir mikroçevre bileşenidir. Soğuk maruziyetinin kanser oluşumu, ilerlemesi veya durdurulması süreçlerindeki etkileri üzerine yeterli literatür bilgisine ulaşamadık. Nöroblastom, klinik seyri değişken olan ve hem hastalar arasında hem de tek bir tümörde belirgin heterojenite gösteren pediatrik bir sinir sistemi kanseridir. Hastaların yaklaşık yarısında tanı anında metastatik ve yüksek riskli hastalık bulunur. Tümör mikroçevresinin, tümör hücreleri dışında bağışıklık ve stromal hücreleri de içeren yapısıyla, nöroblastomda ilaç direnci ve immün kaçışın önemli bir dışsal belirleyicisi olduğu giderek daha fazla kanıtlanmaktadır (132). Bu bağlamda zamana bağlı olarak farklı derecelerde soğuk stresi uygulamalarının nöroblastom hücreleri üzerine etkilerini çok yönlü olarak araştırmak tez çalışmamızın konusunu oluşturmuştur.

Çeşitli raporlar, *in vitro* kültür sıcaklığı düşürüldüğünde hücre zarının sertliğinin arttığını ve bunun da zarla ilişkili hücrel işlevlerin bozulmasına yol açtığını göstermiştir. Dahası, soğuk stresi zarla bağlı enzimleri önemli ölçüde engellediği, difüzyon hızlarını yavaşlattığı ve integral zarlı proteinlerin küme oluşumunu başlattığı bildirilmiştir (133)Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinde soğuk uygulamasına bağlı olarak hücrelerde küçülme, büzüşme gibi morfolojik değişimler izlendi. Özellikle 24 saatlik maruziyetlerde kontraksiyon, yuvarlaklaşma, hücre yoğunluğunda azalma ve yapışma kaybı, soğuk stresinin ilerleyici etkisini destekleyici niteliktedir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada 25 °C soğuğa maruz bırakılan U-87 MG insan glioblastoma hücrelerinde yuvarlaklığın artıp, hücre boyutunda küçülme gözlemlendiği bildirilmiştir (134).

Araştırmalar, soğuk stresine yanıt olarak prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin genellikle bazı soğuk şok proteinleri dışında genlerin transkripsiyonunu ve ardından gelen translasyonunu baskıladığını raporlamışlardır (135). Çalışmamızda, soğuk stresi durumunda çeşitli yolaklar üzerinden hüresel adaptasyonda görev alan en önemli genlerden YBX1, CARHSP1, LIN28A, ATF6, ATF4, XBP1, UBA52, P53 genlerinin ifade değişimlerini hem transkripsiyonel hem de translasyonel sonuçları yönüyle araştırdık. Bunlardan RNA bağlayıcı protein *Y-box binding* protein 1 (YBX1)'in bazı çalışmalarda soğuk stresine duyarlı olduğu, kahverengi yağ dokusunda yüksek düzeyde bulunduğu ve hem soğuğa maruziyet hem de  $\beta$ -adrenerjik uyarı ile farelerde belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. (136). Bir başka çalışmada ise farelerde 29 °C de tutulduktan sonra 5 °C de proteomik analiz ile soğuk sonrası subkutan beyaz yağ dokusunda YBX1'in akut olarak arttığı (pik 24 saatte) gösterilmiş; ayrıca soğukla birlikte kahverengi yağ dokusunda YBX1 artışı olduğu gösterilmiştir (137). Çalışmamızda YBX1'in gen düzeyinde erken dönemde kısa süreli bir azalma görölürken protein düzeyinin 31 °C'de 24 saat sonunda belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Bu farklılık, YBX1'in stres altında daha çok translasyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla düzenlendiğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bulgularımız, soğuk stresine yanıt olarak YBX1'in protein düzeyinde gecikmeli fakat belirgin bir artış gösterdiğini ve bunun soğuk adaptasyonunda rol oynayan bir düzenleme olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda LIN28A gen ifadesinin özellikle 25°C 12 saat grubunda belirgin bir şekilde arttığı, LIN28A proteininin ise özellikle 25°C 3 saat grubunda arttığı görölüdü. Yapılan bir çalışmada farklı sıcaklık koşullarının LIN28A'nın toplam ekspresyon seviyesini etkilemediği, ancak soğuk şok (25 °C, 30 dk) uygulamasının LIN28A'nın çekirdekten sitoplazmaya yeniden dağılımına yol açtığı bildirilmiştir (138). Bu bulgular, bu genin transkripsiyonel aktivasyonunun erken dönemde translasyonel olarak da desteklendiğini göstermektedir.

CARHSP1'in fonksiyonel olarak soğuk şok protein ailesinde yer almasına karşın, soğuk stres altında ekspresyon seviyelerinin artış veya azalış yönündeki değişimi çalışmalarda ayrıntılı olarak rapor edilmemiştir. Gen düzeyinde inhibisyon olmasına rağmen protein seviyesindeki artış, CARHSP1'in soğuk şok proteini olarak translasyon sonrası düzenlenen bir faktör olduğunu desteklemektedir. Sıcaklık değişimlerinin hücrelerde hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel düzeyde çok katmanlı bir yanıt mekanizmasını tetiklediğini ortaya koymaktadır. Çalışmamız CARHSP1'in soğuk stresin nasıl düzenlendiğini göstererek bu bilgi eksikliğini kısmen tamamlamaktadır

p53 tümör baskılayıcı proteinin aktive edilmesi; DNA hasarı oluşturan ajanlar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi artmış reaktif oksijen türleri (ROS) dâhil olmak üzere çeşitli hücrel streslere yanıt olarak tetiklenir (139). Çalışmamızda soğuk uygulamasına bağlı olarak p53 gen ifadesi azalmasına karşın P53 protein miktarı artış eğilimi göstermiştir. Bu sonuç, P53'ün post-transkripsiyonel stabilizasyonu ve çevresel stres koşullarında translasyon sonrası koruyucu mekanizmalarla düzenleme ile açıklanabilir.

Mevcut literatürde memeli hücrelerinde soğuk stres altında UBA52'nin gen ve protein düzeylerinde artış ya da azalış yönündeki değişimi doğrudan inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda UBA52 gen ekspresyonundaki azalmaya karşın proteinin artması, ribozomal stres altında translasyonel kontrolün devreye girdiğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada bir karides türü olan, *Litopenaeus vannamei*'de düşük sıcaklık stresi altında hsp90 ekspresyonunun zamanla kademeli olarak arttığı ve özellikle soğuk-tolerant bireylerde bu artışın belirgin şekilde daha güçlü olduğu rapor edilmiştir (140). Yaptığımız çalışmada ise HSP90'nin hem gen ifadesi hem gen protein düzeyinde genel olarak stabil seyretmiştir. Bu da hücrelerin protein dengesinin korunmasına yönelik stabil bir ekspresyon profili sergilediğini göstermektedir.

Hafif hipotermi (32 °C) koşullarının hücrelerde *unfolded protein response* (UPR) yanıtını tetiklemediği gösterilmiştir. Bu bulgu, UPR'nin temel kollarından olan ATF6 ve IRE1/XBP1 yollarının hipotermi altında belirgin şekilde aktive olmadığını göstermektedir (141). Çalışmamızda ise ATF6 ve XBP1 gen düzeylerinde özellikle 31 °C'de belirgin azalmaya yol açarken, protein düzeylerinde ise genel olarak hafif artışlar görülmüş; bu durum soğuk stresinde her iki molekülün transkripsiyonel olarak baskılanmasına karşın translasyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde korunup arttırıldığına işaret etmektedir.

Bu çalışmada soğuk stresi uygulamasından sonra genel olarak seçili genlerin mRNA düzeylerinin RT-PCR ve RNA-seq ile azaldığı, ancak protein düzeylerinin Western blot analizinde değişmediği görülmüştür. Bu durum birkaç biyolojik mekanizma ile açıklanabilir.

İlk olarak, transkripsiyon baskılansa bile mevcut mRNA'ların hücre içinde daha stabil hale gelmiş olması protein sentezinin sürmesine yol açabilir. mRNA yarı ömründeki artış, RNA-bağlayıcı proteinlerin aktivasyonu veya yıkım yollarının baskılanmasıyla ilişkilidir (142).

İkinci olarak, hücre translasyonel düzeyde kompensasyon geliştirmiş olabilir. Özellikle stres koşullarında mTOR sinyal yolu veya translasyon başlatma faktörleri aracılığıyla sınırlı sayıdaki mRNA'nın daha verimli çevrildiği bilinmektedir. Bu durumda mRNA azalmasına rağmen protein miktarı korunabilir (143).

Üçüncü bir olasılık, protein yıkımının azalmasıdır. Ubiquitin–proteazom sistemi veya otofaji baskılandığında, yeni sentez azalsa bile protein havuzu uzun süre sabit kalabilir (144).

Son olarak, zamanlama faktörü de önemlidir. Transkripsiyonel değişiklikler saatler içinde ortaya çıkabilirken, protein düzeylerinde anlamlı düşüşlerin görülmesi daha uzun sürebilir. Bu nedenle erken zaman noktalarında mRNA azalması saptanırken protein düzeyleri henüz etkilenmemiş olabilir (145).

Yapılan bazı çalışmalar 28 ile 34 °C arasındaki hafif hipotermik kültür sıcaklıklarının, memeli hücrelerinde apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyerek apoptozu geciktirdiğini ortaya koymaktadır (146). Yapılan bir çalışmada, kültür sıcaklığı 37'den 30 °C'ye düşürüldüğünde Çin hamster yumurtalık hücrelerinin (CHO) % 87'sinin G<sub>1</sub>'de büyümeyi durdurduğunu ve apoptozisin başlangıcının önemli ölçüde geciktiğini göstermiştir (147). Bizim çalışmamızda sıcaklık değişimlerinin apoptoz üzerinde belirgin etkileri gözlemlendi. 31 °C'de 6 ve 12 saatlik uygulamalar apoptozu hafif artırırken, 25 °C'de 12 ve 24 saatlik inkübasyonlar apoptoz oranında belirgin yükselişe neden oldu. Apoptozis'deki gecikme hücrel metabolizmanın azalmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Ancak diğer karmaşık savunma mekanizmalarının varlığı ve apoptozu yönelme konusunda hücre tiplerinin farklılık göstermesi farklı sonuçlara ulaşmamıza neden olmaktadır.

Son yıllarda hücrelerin sıcaklık düşüşüne verdiği yanıt üzerine yapılan çalışmalar, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında hücre döngüsü durmasının, hücre canlılığını artırarak kültür süresinin uzamasına ve rekombinant proteinlerin (r-protein) özgül üretkenliğinin artmasına olanak sağladığını göstermiştir (146). Bizim çalışmamız da sıcaklık değişimlerinin hücre döngüsü üzerine belirgin etkiler oluşturduğu görüldü. 31 °C'de kısa süreli uygulama, hücrelerin G<sub>2</sub>/M fazında artışla mitotik aktiviteyi artırırken, uzun süreli inkübasyonlar G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında birikim ve S ile G<sub>2</sub>/M fazlarında azalma ile sonuçlandı. 25 °C uygulamaları ise G<sub>2</sub>/M fazındaki hücre oranını azaltarak hücre döngüsünün ilerleyişini yavaşlattı.

Araştırmamızda çalışma gruplarını oluşturan hücrelerde RNA sekans analizi de yaptık. Çok yönlü analiz sonucunda genel olarak kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarında gen ifadelerinde belirgin değişiklikler saptadık. Gen ifadesi en çok hafif

hipotermi grubu olan 31 C- 3 saat uygulama grubunda olduğunu belirledik. Tüm gruplarda gen ifadeleri artıştan çok azalma yönünde oldu. Sıcaklık düşüşü ve maruziyet süresi arttıkça genlerin ifade değişimlerinin daha az olduğunu bulduk. Hücrelerde diğer stresörlere verilen yanıtta benzer şekilde başlangıçta total transkripsiyon verimliliğinin azalması beklenir. Ancak özellikle soğuk şok proteinleri hedef genleri uyararak transkripsiyonları yukarı yönde düzenleyebilir ve transkript seviyelerini artırabilir. Ayrıca düşük sıcaklık alternatif promotorları da etkileyebilir. Çok kısıtlı bazı çalışma verileri bu çıkarımlarımızı destekler niteliktedir (148).

Gen ontolojisi ve yolak zenginleştirme analizlerinin genel değerlendirmesi, analiz edilen genlerin özellikle bağışıklık yanıtı, inflamasyon, hücre ölümü, oksidatif stres yanıtı ve epigenetik düzenleme süreçlerinde etkin rol oynadığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, bu genlerin sitokin üretimi, reseptör aktivasyonu, fagositoz, lizozomal yıkım ve sinyal iletimi gibi süreçler üzerinden hücrel yanıtın düzenlenmesine katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Ek olarak NF- $\kappa$ B, TLR, inflammasom ve interlökin aracılı yolların zenginleşmesi, bu süreçlerin immün homeostaz ve stres yanıtı mekanizmalarında merkezi rol oynadığını göstermektedir. Bu elde edilen veriler, gen ekspresyonundaki değişimlerin immün düzenleme, hücre sağkalımı ve inflamatuvar süreçlerin koordinasyonuna doğrudan etki ettiğini dolayısıyla çalışmanın biyolojik olarak anlamlı bir immün ve hücrel yeniden programlanmayı yansıttığını düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, farklı sıcaklık koşulları SH-SY5Y hücrelerinde stres, proliferasyon ve translasyonel kontrol ile ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyonunu farklı yönlerde etkilemiştir. Soğuk stresine adaptif yanıtın önemli bir parçasını LIN28A, YBX1 ve CARHSP1 gibi proteinlerdeki artış sağlarken; P53, UBA52, XBP1 ve ATF6 genlerindeki baskılanma, stres yanıtı ve apoptoz süreçlerinin translasyonel düzeyde yeniden dengelendiğini göstermektedir. Sıcaklık değişimlerinin sinir hücrelerinde epigenetik ve post-transkripsiyonel düzenleme ağları üzerinden hücresel dengeyi şekillendirdiğini ortaya koymaktadır. Sıcaklık değişimlerinin hücre döngüsü üzerine belirgin etkileri gözlemlendi; 31 °C’de uzun süreli inkübasyonlar hücrelerin G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazında birikimine neden olurken, 25 °C uygulamaları G<sub>0</sub>/M fazındaki hücre oranını azaltarak hücre döngüsünün ilerleyişini yavaşlattı. Sıcaklık değişimlerinin hücre ölümü üzerinde de belirgin etkileri gözlemlendi; özellikle 25 °C’de 12 ve 24 saatlik inkübasyonlar, apoptoz oranında anlamlı bir artış oluşturarak düşük sıcaklığın hücre canlılığını olumsuz etkilediğini gösterdi.

Bu bulgular, sıcaklık değişimlerinin hücre döngüsü kontrolünü bozabileceğini ve hücre stres yanıtı mekanizmalarının devreye girdiğini göstermektedir. Ayrıca, inkübasyon süresi ile sıcaklık etkisinin birleşik bir modülasyon oluşturduğu, yani yalnızca derece değil süre parametresinin de kritik olduğu anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen gen ve protein bulguları, biyoinformatik analizlerle moleküler düzeyde değerlendirmelerle desteklenmiştir. Gen ifadesi, protein seviyesindeki değişimler ve yolak analizleri beraber incelendiğinde, hücresel yanıtın immün sistem düzenleme, oksidatif stres, apoptoz ve epigenetik kontrol mekanizmaları üzerinden şekillendiği saptanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak; gen ve proteinlerdeki değişimlerin post-transkripsiyonel düzenlemelerin araştırmak, farklı hücre hatlarında değişimi araştırmak, proteomik düzeyde elde edilen verilerle post-translasyonel modifikasyonların incelenmesi, bu çalışmada belirlenen genlerin in vitro modellerde test edilmesi gibi çalışmalara yönelik öneriler sunulabilir.

Bu çalışmada tek hücre hattı kullanılması nedeniyle, gelecekte farklı nöral hücre hatları ve primer/iPSC-türetilmiş hücrelerle doğrulama yapılması ayrıca 3D modellerin yanı sıra deney hayvanlarında ve gen düzenleme yaklaşımlarında benzer analizlerin uygulanarak genetik mekanizmaların daha kapsamlı değerlendirilmesi önerilir.

## KAYNAKLAR

1. Mackay J. The cancer atlas. Atlanta (GA): American Cancer Society; 2006.
2. Ellerman JE. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(10):2836-48.
3. Zayani Z. Exploring stressors: impact on cellular organelles and implications for cellular functions. *Stresses.* 2025;5(2):26.
4. De Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell.* 2023;41(3):374-403.
5. Ma W. Oxidative stress in aquaculture: pathogenic mechanisms and preventive strategies in farmed aquatic animals. *Curr Issues Mol Biol.* 2025;47(11):873.
6. Michl J, Park K, Swietach P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Commun Biol.* 2019;2:144.
7. Wang Q. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Med.* 2023;12(10):11149-65.
8. Spill F. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;40:41-48.
9. Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012;190(4):1157-95.
10. Efeoğlu B. Heat shock proteins and heat shock response in plants. *Gazi Univ J Sci.* 2009;22(2):67-75.
11. Becerra S. Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochem Eng J.* 2012;60:1-8.
12. Borrell DM, Gerdtzen ZP. Mild hypothermia: insights and implications for productivity in mammalian and insect cell cultures. *Biotechnol Adv.* 2025; (no volume/issue):108625.
13. Thau L, Reddy V, Singh P. *Anatomy, central nervous system.* 2019.
14. Lopez-Suarez L. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: focus on organic pollutants. *Neurotoxicology.* 2022;92:131-55.
15. Pählman S. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differ.* 1984;14(2):135-44.

16. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J*. 2010;123(8):1086-92.
17. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp*. 2016;(108):53193.
18. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. In: *Neuronal cell culture: methods and protocols*. 2013. p. 9-21.
19. Encinas M. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic-factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 2000;75(3):991-1003.
20. Leblanc P, Vorberg IM. Viruses in neurodegenerative diseases: more than just suspects in crimes. *PLoS Pathog*. 2022;18(8):e1010670.
21. Poljšak B, Milisav I. Clinical implications of cellular stress responses. *Bosn J Basic Med Sci*. 2012;12(2):122-29.
22. Bhattar N, Dmitriev SE, Ivanov P. Cell death or survival: insights into the role of mRNA translational control. *Semin Cell Dev Biol*. 2024; (no volume/issue available).
23. Advani VM, Ivanov P. Translational control under stress: reshaping the translome. *Bioessays*. 2019;41(5):1900009.
24. Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J*. 1995;312(1):163-67.
25. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*. 2016;165(3):535-50.
26. Luan Y. Deficiency of ribosomal proteins reshapes the transcriptional and translational landscape in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(12):6601-17.
27. Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW. Temperature matters! And why it should matter to tumor immunologists. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(4):210-16.
28. Lobel GP, Jiang Y, Simon MC. Tumor microenvironmental nutrients, cellular responses, and cancer. *Cell Chem Biol*. 2023;30(9):1015-32.
29. Hosonuma M, Yoshimura K. Association between pH regulation of the tumor microenvironment and immunological state. *Front Oncol*. 2023;13:1175563.
30. Tower J. Heat shock proteins and Drosophila aging. *Exp Gerontol*. 2011;46(5):355-62.

31. Fujita J. Cold shock response in mammalian cells. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999;1(2):243-55.
32. Singh MK. Heat shock response and heat shock proteins: Current understanding and future opportunities in human diseases. *Int J Mol Sci.* 2024;25(8):4209.
33. Sadura I, Janeczko A. Are heat shock proteins important in low-temperature-stressed plants? A minireview. *Agronomy.* 2024;14(6):1296.
34. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 2011;475(7356):324-32.
35. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(10):630-42.
36. Murshid A, et al. Role of heat shock factors in stress-induced transcription. In: *Chaperones: Methods and Protocols.* 2018. p. 23-34.
37. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:1151-91.
38. Hu C. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm.* 2022;3(3):e161.
39. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(1):4-19.
40. Androvitsanea A. The pathophysiological role of heat shock response in autoimmunity: a literature review. *Cells.* 2021;10(10):2626.
41. Conroy S. Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Rheumatology.* 1994;33(10):923-26.
42. Li H. Cold shock proteins mediate transcription of ribosomal RNA in *Escherichia coli* under cold-stress conditions. *Biomolecules.* 2025;15(10):1387.
43. Guy C. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999;1(2):231-42.
44. Ghosh M, Shin M, Son YO. Cold shock proteins: Orchestrating cellular defense in response to low temperatures. *Jeju J Isl Sci.* 2024;1(1):12-19.
45. Wolffe A. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol.* 1992;4(4):290-98.
46. Jones PG, Inouye M. The cold-shock response—a hot topic. *Mol Microbiol.* 1994;11(5):811-18.

47. Lindquist JA. The role of cold shock domain proteins in inflammatory diseases. *J Mol Med.* 2014;92:207-16.
48. Brandt S. Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(6-7):464-71.
49. Gottesman S. Chilled in translation: adapting to bacterial climate change. *Mol Cell.* 2018;70(2):193-94.
50. Lima WR. ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(3):478-88.
51. Hasegawa SL. DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic-site-containing DNAs. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(18):4915-22.
52. Zhu C. Cold shock proteins mediate GN with mesangioproliferation. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(12):3678-89.
53. Fan L. Nuclease sensitive element binding protein 1 gene disruption results in early embryonic lethality. *J Cell Biochem.* 2006;99(1):140-45.
54. Yu J. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-20.
55. Thornton JE, Gregory RI. How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends Cell Biol.* 2012;22(9):474-82.
56. Zhu H. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell.* 2011;147(1):81-94.
57. Rybak A. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):987-93.
58. Mayr F, Heinemann U. Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation—a structural and functional perspective. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16532-53.
59. Groblewski GE. Purification and characterization of a novel physiological substrate for calcineurin in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22738-44.
60. Schafer C. CRHSP-24 phosphorylation is regulated by multiple signaling pathways in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(4):G726-34.
61. Pfeiffer JR. CARHSP1 is required for effective tumor necrosis factor alpha mRNA stabilization and localizes to processing bodies and exosomes. *Mol Cell Biol.* 2011;31(2):277-86.

62. Balch WE. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 2008;319(5865):916-19.
63. Hurtley SM. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol*. 1989;108(6):2117-26.
64. Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 2011;334(6059):1086-90.
65. Travers KJ. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 2000;101(3):249-58.
66. Harding HP. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-110.
67. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.
68. Bertolotti A. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000;2(6):326-32.
69. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016;529(7586):326-35.
70. Dombroski BA. Gene expression and genetic variation in response to endoplasmic reticulum stress in human cells. *Am J Hum Genet*. 2010;86(5):719-29.
71. Chen X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):352.
72. Lee KP. Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell*. 2008;132(1):89-100.
73. Credle JJ. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):18773-84.
74. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 1997;90(6):1031-39.
75. Zhu C, Johansen F-E, Prywes R. Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):4957-66.
76. Haze K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3787-99.

77. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-6.
78. Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, Ogata M, Kanemoto S, Otori K, et al. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol*. 2005;7(2):186-94.
79. Kondo S, Saito A, Asada R, Kanemoto S, Imaizumi K. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol*. 2007;27(5):1716-29.
80. Stirling J, O'Hare P. CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):413-26.
81. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 2000;6(6):1355-64.
82. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. ATF6 activated by proteolysis binds to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):6755-67.
83. Nakanishi K, Sudo T, Morishima N. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol*. 2005;169(4):555-60.
84. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000;5(5):897-904.
85. Chondrogianni N, Gonos ES. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: modulation of components. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;109:41-74.
86. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002;82(2):373-428.
87. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:477-513.
88. Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(8):550-63.
89. Emrich SJ, Barbazuk WB, Li L, Schnable PS. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2007;17(1):69-73.

90. Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, et al. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell*. 2008;133(3):523-36.
91. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;320(5881):1344-9.
92. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5(7):621-8.
93. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res*. 2008;18(9):1509-17.
94. Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods*. 2008;5(7):613-9.
95. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 1970;227(5258):561-3.
96. Liu J, Wan L, Lu K, Sun M, Pan X, Zhang P, et al. The long noncoding RNA MEG3 contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015;10(5):e0114586.
97. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):219-30.
98. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*. 2002;420(6915):563-73.
99. Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*. 2009;23(13):1494-504.
100. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):155-9.
101. Guttman M, Garber M, Levin JZ, Donaghey J, Robinson J, Adiconis X, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 2009;458(7235):223-7.
102. Montgomery SB, Sammeth M, Gutierrez-Arcelus M, Lach RP, Ingle C, Nisbett J, et al. Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature*. 2010;464(7289):773-7.

103. Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, Degner JF, Engelhardt BE, Nkadori E, et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature*. 2010;464(7289):768-72.
104. Lappalainen T, Sammeth M, Friedländer MR, Häggblom A, et al. Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. *Nature*. 2013;501(7468):506-11.
105. Battle A, et al. Characterizing the genetic basis of transcriptome diversity through RNA-sequencing of 922 individuals. *Genome Res*. 2014;24(1):14-24.
106. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 2011;147(4):742-58.
107. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
108. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care*. 2008;18(6):572-85.
109. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Derg*. 2011;20(3):145-58.
110. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem*. 2008;104(4):1124-49.
111. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*. 2009;124(3):511-5.
112. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
113. Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9(3):320-40.
114. Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015;35(Suppl):S26-S29.
115. Price PJ. Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017;53(8):673-81.
116. Schnellbaecher A, Binder D, Bellmaine S, Zimmer A. Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116(6):1537-55.
117. Mather J, Sato G. Hormones and growth factors in cell cultures: problems and perspectives. In: *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology*. New York: Elsevier; 1977. p. 619-30.

118. Duruel HEE. Hücre kültürlerine genel bakış. Selçuk Univ Fen Fak Fen Derg. 2021;47(2):136-49.
119. Templeton NS. The polymerase chain reaction history, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol*. 1992;1(1):58-72.
120. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
121. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-19.
122. Artika IM, Wiyatno A, Ma'roef CN. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect Genet Evol*. 2020;81:104215.
123. Rocha AJ. Guidelines for successful quantitative gene expression in real-time qPCR assays. *PCR Biomed Appl*. 2016:1-13.
124. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr Genomics*. 2007;8(4):234-51.
125. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 2015;439:231-50.
126. Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol*. 2013;55:217-26.
127. Hammond M. A method for greater reliability in Western blot loading controls—Stain-Free total protein quantitation. *Bio-Rad Bull*. 2013;6360.
128. Dittmer A, Dittmer J.  $\beta$ -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis*. 2006;27(14):2844-5.
129. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):250-4.
130. Rocha-Martins M, Njaine B, Silveira MS. Avoiding pitfalls of internal controls: validation of reference genes for analysis by qRT-PCR and Western blot throughout rat retinal development. *Mol Vis*. 2012;18:1040-54.
131. Agrawal A. Mechanical signatures in cancer metastasis. *NPJ Biol Phys Mech*. 2025;2(1):3.
132. Louault K, De Clerck YA, Janoueix-Lerosey I. The neuroblastoma tumor microenvironment: from an in-depth characterization towards novel therapies. *EJC Paediatr Oncol*. 2024;3:100161.

133. Hazel JR. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol.* 1995;57:19-42.
134. Enam SF. Cytostatic hypothermia and its impact on glioblastoma and survival. *Sci Adv.* 2022;8(47):eabq4882.
135. Gualerzi CO, Giuliadori AM, Pon CL. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol.* 2003;331(3):527-39.
136. Wu R. RNA-binding protein YBX1 promotes brown adipogenesis and thermogenesis via PINK1/PRKN-mediated mitophagy. *FASEB J.* 2022;36(3):e22219.
137. Rabiee A. White adipose remodeling during browning in mice involves YBX1 to drive thermogenic commitment. *Mol Metab.* 2021;44:101137.
138. Tan T. Dynamic nucleolar phase separation influenced by non-canonical function of LIN28A instructs pluripotent stem cell fate decisions. *Nat Commun.* 2024;15(1):1256.
139. Shi T. DNA damage and oxidant stress activate p53 through differential upstream signaling pathways. *Free Radic Biol Med.* 2021;172:298-311.
140. Peng M. Identification and expression analysis of heat shock proteins Hsp70, Hsp90, and Hsp90b in *Litopenaeus vannamei* under low-temperature stress. *Aquac Rep.* 2025;40:102591.
141. Eskla K-L. Hypothermia augments stress response in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2018;121:157-68.
142. Garneau, N.L., Wilusz, J., & Wilusz, C.J.. The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007;8(2):113-126.
143. Sonenberg, N., & Hinnebusch, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009;136(4):731-745.
144. Ciechanover, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2005;6(1):79-87.
145. Vogel, C., & Marcotte, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics*, 2012;13(4):227-232.
146. Morales-Borrell D, Gerdtzen ZP. Mild hypothermia: insights and implications for productivity in mammalian and insect cell cultures. *Biotechnol Adv.* 2025;83:108625.

147. Al-Fageeh MB, Smales CM. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem J.* 2006;397(2):247-59.
148. Fujikake N. Alternative splicing regulates the transcriptional activity of *Drosophila* heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. *FEBS Lett.* 2005;579(17):3842-8.



## **EKLER**

### **EK-1. Özgeçmiş**



**EK-2. Etik Kurul Onay Formu Gerekmediğine Dair Yazı**

