



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CERULENİN UYGULANMIŞ U87 GLİOBLASTOMA HÜCRE
HATTINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Şefika Beyza METE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ**

Ocak, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 18.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Cenk KIĞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

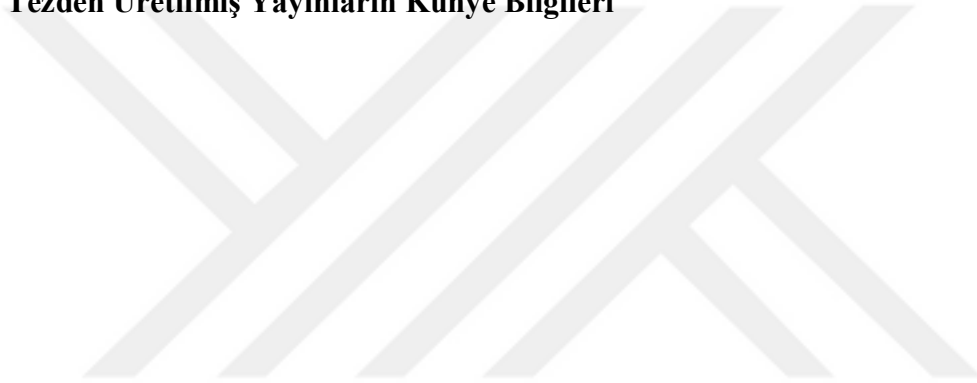
İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2019-34990 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri



ÖNSÖZ

Kendisiyle lisans dönemim dahil olmak üzere 6.5 yıl geçirdiğim ve geçen tüm bu sürede çok şey öğrendiğim, her zaman saygısını, ilgisini ve desteğini hissettiğim, etkili iletişim ve çözüm odaklı yaklaşımıyla karşılaşılan sorunların üstesinden gelmeme yardımcı olan, akademik açıdan örnek olduğu kadar kişiliğini de örnek aldığım kıymetli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ**'e,

Tanıştığım ilk günden beri güler yüzünü ve sevgisini eksik etmeyen, akademik açıdan yetişmemde çok büyük emeği olan, derslerini her zaman büyük bir keyifle dinlediğim sevgili hocam **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya; yüksek lisans sürecinde daha yakından tanıma şansı bulduğum ve laboratuvarın hem içi hem de dışında bir durum geliştiğinde severek yardımcı olduğu için değerli hocam **Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**'a; lisans dönemimde birçok dersin uygulamasında özveriyle eğitim veren ve yüksek lisans sürecinde yardımlarını esirgemeyen hocalarım **Arş. Gör. Dr. Elif MERTOĞLU KAMALI**, **Arş. Gör. Dr. Merve YILMAZER**, **Arş. Gör. Burcu KARTAL SURAL**'a ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki tüm öğretim üyelerine,

Laboratuvara geldiğim ilk günden beri sevgilerini, güler yüzlerini, yardımlarını esirgemeyen; gerektiği durumlarda ablalık-abilik yapan, sorduğum her soruyu hiçbir zaman çekinmeden cevaplayan, hem akademik hem de sosyal yönden gelişmemde çok büyük emekleri ve katkıları olan kıymetli hocalarım **Ashhan ŞENGELEN** ve **Yunus AKSÜT**'e; sabahları gönderdiği motivasyon mesajları ile güne güzel başlamamı sağlayan, ihtiyacım olduğunda her zaman koşan canım dostum ve çalışma arkadaşım **Alper ÇALIŞKAN**'a, güler yüzüyle her zaman mutlu bir diyalog kurduğum kıymetli hocam **Arş. Gör. Burcu ARIKAN**'a ve yüksek lisans öğrenimim boyunca beni ağırlayan **Proteomik ekibine**,

Hayatımın her köşesinde ve anında varlıklarını, sevgilerini ve koşulsuz desteklerini hissettiğim değerli dostlarım **Gözde ÖZCAN**'a, **Deniz AKBULUT**'a, **Serra Nur MERDOĞLU**'na, **Gizem ELMALI**'ya ve **Burçin DEBRELİOĞLU**'na,

Bugüne gelmemdeki en büyük pay sahibi olan, hayatımın mihenk taşları biricik annem **Hatice KOÇİBAR**'a, babam **Hasan METE**'ye, canım kardeşim **Hamza Kürşat METE**'ye ve dedem **Ahmet KOÇİBAR**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Ocak 2022

Şefika Beyza METE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. KANSER.....	3
2.2. BEYİN TÜMÖRLERİ	4
2.2.1. Glioma	4
2.3. CERULENİN	5
2.3.1. Yağ Asit Sentaz	6
2.4. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	8
2.4.1. IRE1 α	9
2.4.2. PERK.....	10
2.4.3. ATF6.....	10
2.4.4. TMED4.....	11
2.4.5. Endoplazmik Retikulum Stresinin Belirlenmesi	13
2.4.5.1. Floresan Yöntemler	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	16
3.1. CERULENİN UYGULAMASI VE CANLILIĞIN BELİRLENMESİ.....	16
3.1.1. Hücre Kültürünün Oluşturulması	16
3.1.2. Hücre Çoğalma Eğrisinin Oluşturulması.....	16
3.1.3. Sitotoksosite Testi	17
3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	18
3.2.1. Cerulenin Uygulaması	18
3.3. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN BELİRLENMESİ.....	18
3.3.1. Floresan Mikroskop Analizi	18

3.3.2.	TMED4 Protein Düzeyindeki Değişimin İncelenmesi.....	20
3.3.2.1.	Protein İzolasyonu.....	20
3.3.2.2.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	20
3.3.2.3.	Sodyum dodesil sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	21
3.3.2.4.	Western Blot Analizleri.....	23
3.4.	TMED4 GENİNİN EKSPRESYON SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİMİN İNCELENMESİ.....	26
3.4.1.	RNA İzolasyonu.....	26
3.4.2.	RNA'ların Konsantrasyon ve Safılık Kontrolü.....	27
3.4.3.	cDNA Sentezi.....	27
3.4.4.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	28
3.4.5.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
3.5.	HÜCRESEL ÖLÜM MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ.....	30
3.5.1.	Western Blot Analizleri.....	30
3.6.	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	30
4.	BULGULAR.....	31
4.1.	HÜCRE ÇOĞALMA EĞRİSİ ANALİZİ.....	31
4.2.	SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ.....	31
4.3.	PROTEİN ANALİZLERİ.....	32
4.3.1.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	32
4.3.2.	Protein Elektroforezi.....	33
4.3.3.	Western Blot Analizleri.....	33
4.4.	FLORESAN MİKROSKOPİ ANALİZİ.....	36
4.5.	TMED4 GEN ANLATIMI ANALİZLERİ.....	36
4.5.1.	RNA İzolasyonu.....	36
4.5.2.	cDNA Sentezi.....	37
4.5.3.	RT-PCR ile TMED4 Gen Anlatım Düzeyinin İncelenmesi.....	38
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
	KAYNAKLAR.....	43
	ÖZGEÇMİŞ.....	50

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).	3
Şekil 2.2: Cerulenin'in kimyasal yapı gösterimi.....	6
Şekil 2.3: <i>FASN</i> geninin kromozom üstünde gösterimi (GeneCards, 2021c).....	6
Şekil 2.4: <i>FASN</i> 'nin yapısı (Deepa ve diğ., 2010).	7
Şekil 2.5: ER stresinin şematik olarak gösterimi (da Silva ve diğ., 2020).....	8
Şekil 2.6: <i>ERN1</i> geninin kromozom üzerinde gösterimi (GeneCards, 2021e).	9
Şekil 2.7: <i>EIF2AK3</i> geninin kromozom üstünde gösterimi (GeneCards, 2021b).....	10
Şekil 2.8: <i>ATF6</i> geninin kromozom üstünde gösterimi (GeneCards, 2021a).	11
Şekil 2.9: <i>TMED4</i> geninin kromozom üzerinde gösterimi (GeneCards, 2021d).....	12
Şekil 2.10: <i>TMED4</i> proteininin aminoasit dizisi (UniProt, 2021).....	12
Şekil 2.11: Tiyoflavin T (ThT)nin iki boyutlu gösterimi (Sigma-Aldrich, 2021).	14
Şekil 4.1: U87MG hücre hattının çoğalma eğrisi grafiği.....	31
Şekil 4.2: Cerulenin'in U87MG hücreleri üzerindeki 48 saatlik etkisi (ns : Anlamalı değil (Not significant), $R^2=0.097$; $****p<0.0001$).	32
Şekil 4.3: BCA yöntemi ile oluşturulan standart grafik ($R^2=0.9966$).	32
Şekil 4.4: SDS-PAGE yöntemi kullanılarak ayrıştırılan proteinlerin Coomassie mavisi ile boyama sonrası jeldeki görünümü. (M : Marker, A : Kontrol grubu, B : IC_{20} grubu, C : IC_{50} grubu).	33
Şekil 4.5: ER proteinlerinin Western blotlama sonuçları. A) Western sonrası elde edilen protein bantları. B) Elde edilen sonuçların istatistiksel analiz sonrası oluşturulan grafikleri (K : Kontrol grubu; $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$).....	34
Şekil 4.6: <i>TMED4</i> proteininin Western blotlama sonucu. A) Blotlama sonrası saptanan protein bantları. B) İstatistiksel analizle oluşturulan grafik.	35
Şekil 4.7: <i>Bax</i> proteininin Western blotlama sonucu. A) Blotlama sonrası saptanan protein bantları. B) İstatistiksel analizle oluşturulan grafik ($**p<0.01$; $****p<0.0001$).	35

Şekil 4.8: Tiyo flavin T ile boyanan U87MG hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri. Hücreler, 20x büyütme oranında GFP-FITC filtresi kullanılarak fotoğraflandı.	36
Şekil 4.9: Total RNAların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü (A: Kontrol grubu, B: IC ₂₀ grubu, C: IC ₅₀ grubu).	37
Şekil 4.10: cDNAların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü (A: Kontrol grubu, B: IC ₂₀ grubu, C: IC ₅₀ grubu).	37
Şekil 4.11: <i>TMED4</i> geninin, RT-PCR yöntemiyle saptanan ekspresyon değişimleri (ns = Anlamlı değil "Not significant", ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).	38



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Floresan görüntüleme yönteminde kullanılan solüsyonlar.....	20
Tablo 3.2: SDS-PAGE jel bileşenleri (1 jel için).	22
Tablo 3.3: SDS-PAGE yönteminde kullanılan solüsyonlar.	22
Tablo 3.4: Western blotlama yönteminde kullanılan solüsyonlar.	24
Tablo 3.5: Western blotlama yönteminde kullanılan antikorlar.	25
Tablo 3.6: cDNA sentezi için hazırlanan PCR tüpü bileşenleri.	27
Tablo 3.7: cDNA sentezi protokolü.....	28
Tablo 3.8: RT-PCR yönteminde kullanılan primerler.	28
Tablo 3.9: RT-PCR yönteminde hazırlanan PCR tüpü bileşenleri.	28
Tablo 3.10: RT-PCR protokolü.	29
Tablo 3.11: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar.	30

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	:Yüzde
/	:Ayırma işareti
g	:Gram
L	:Litre
M	:Molar
mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
nm	:Nanometre
°C	:Derece santigrat
rpm	:Dakika başı devir (“Revolutions per minute”)
s	:Saniye
β	:Beta
v	:Volt
w/v	:Ağırlık/hacim
μg	:Mikrogram
μL	:Mikrolitre
μM	:Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
Apaf-1	:Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APS	:Amonyum persülfat
AT	:Asetil Transaçilaz
ATF4	:Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4 (“Activating Transcription Factor 4”)
ATF6	:Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 Alfa (“Activating Transcription Factor 6 Alpha”)
BCA	:Bisinkoninik asit
BSA	:Bovin serum albumin
CHOP	:C/EBP homolog proteini (“C/EBP Homologous Protein”)

CO₂	:Karbondioksit
Co-A	:Koenzim A
COOH	:Karboksil grubu
DAPI	:4', 6-diamidino-2-fenilindol
ddH₂O	:Ultra saf su
DEPC	:Dietil pirokarbonat
DH	:Beta Hidroksi Açıl Dehidrataz
dH₂O	:Distile su
dk	:Dakika
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetilsülfoksit
DPBS	:Dulbecco's phosphate buffered-saline
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EC	:Enzim Kodu ("Enzyme Code")
EDTA	:Etilen diamin tetraasetik asit
eIF2α	:Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Faktör 2 ("Eukaryotic Translation Initiation Factor 2")
ER	:Endoplazmik Retikulum
ERAD	:ER-ilişkili degradasyon ("ER-Associated Degradation")
FASN	:Yağ Asit Sentaz ("Fatty Acid Synthase")
FBS	:Fetal bovin serum
GBM	:Glioblastoma multiforme
HCl	:Hidroklorik asit
HIV	:İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ("Human Immunodeficiency Virus")
Hsp	:Isı Şoku Proteinleri ("Heat Shock Proteins")
IC₂₀	:%20 inhibisyon dozu
IC₅₀	:%50 inhibisyon dozu
IRE1α	:İnositol gerektiren enzim 1 Alfa ("Inositol-requiring enzyme 1 Alpha")
JNK	:c-Jun N-terminal Kinaz
KR	:Beta Ketoaçıl Redüktaz
KS	:Beta Ketoaçıl Sentaz
MAT	:Malonil Transaçılaz
MTT	:3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NADPH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	:Nükleer Faktör Kappa-B

NH₂	:Amino grubu
NH₄Cl	:Amonyum klorür
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans
Örn	:Örneğin
PAGE	:Poliakrilamid jel elektroforezi
PERK	:Protein Kinaz R Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (“PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase”)
PFA	:Paraformaldehit
PMSF	:Fenilmetilsülfonil florür
qPCR	:Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Real Time Polymerase Chain Reaction”)
RIPA	:RadioImmunoPrecipitation Assay
SDS	:Sodyum dodesil sülfat
shRNA	:Short hairpin RNA
TAE	:Tris-asetat-EDTA
TBS	:Tris-buffered saline
TBST	:Tris-buffered saline ve Tween-20
TE	:Tiyosteraz
TEMED	:Tetrametiletilendiamin
ThT	:Tiyoflavin T
TMED4	:Transmembran emp24 domain-containing protein 4
UPR	:Katlanmamış Protein Yanıtı (“Unfolded Protein Response”)
vb	:Ve benzeri
XBP1	:X-kutu Bağlanma Proteini (“X-box Binding Protein”)
XBP1s	:Kırpılmış (“Spliced”) XBP1

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CERULENİN UYGULANMIŞ U87 GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ARAŞTIRILMASI

Şefika Beyza METE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ

Glioblastoma, yüksek malignansi özelliği, tıbbi yöntemlerle saptanmasının zor ve tedavi başarısının düşük oranda olması nedeniyle en ölümcül kanser türlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, glioblastomadaki moleküllerin ve/veya hücreyel yolakların karsinogenez sürecindeki değişimleri ve bunların anlatımlarındaki değişimler, glioblastomanın hem tanı hem tedavisi için çeşitli hedeflerin belirlenmesine olanak sağlayabilmektedir. Buna örnek olarak, kanser hücrelerinde yüksek oranda anlatımı yapılan yağ asit sentaz ve onun inhibitörü Cerulenin verilebilir. Cerulenin maddesi bir antifungal ajan olup lipit biyosentez yolağında yağ asit sentaz enzimini inhibe ederek malonil koenzim A'nın palmitik aside dolayısıyla yağ asitlerine dönüşümünü engeller. Yağ asitlerinin oluşmadığı bir hücrede stres durumu gelişir ve stresin önlenmesi durumunda ölüm mekanizmaları aktifleşerek hücre ölebilir.

Yapılan tez çalışmasında; Cerulenin'in U87MG hücre hattına çeşitli dozlarda uygulanmasıyla hücre canlılığındaki değişim, MTT testiyle belirlenip sonraki deneyler için iki doz grubu seçilmiştir. MTT testinden elde edilen verilerden sonucunda seçilen ilk grubun (IC₂₀) konsantrasyonu 3.6 µg/mL; ikinci grubun (IC₅₀) konsantrasyonu ise 5.55 µg/mL olarak belirlendi. Sitotoksik dozları belirlenmiş hücrelerde Cerulenin'in neden olabileceği stres koşulunda endoplazmik retikulumun (ER) ne düzeyde etkilendiği, ER'nin hücreyel strese ve/veya ölüm mekanizmalarının işleminde nasıl katkı sağladığı ve Cerulenin'in veya ER stresinin gen düzeyindeki etkileri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve

Western blot teknikleri ile incelenmiştir. RT-PCR sonucunda; *TMED4* geninin anlatımı, madde uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla IC₂₀ ve IC₅₀ grubunda sırasıyla 0.31 ve 0.48 kat azalmıştır. Protein ekspresyonunda ise *TMED4* proteininde kontrole göre 1.26 ve 1.38 kat artış saptanmıştır. Endoplazmik retikulum proteinlerinde ise, ER şaperonu olarak bilinen Grp78 proteininde kontrole kıyasla IC₂₀ grubunda 1.5 kat; IC₅₀ grubunda ise 1.12 kat artış; IRE1 α 'nın IC₂₀ ve IC₅₀ gruplarında sırasıyla 1.04 ve 1.22 kat artış; ATF6'nın doz gruplarında sırasıyla 0.91 ve 0.84 kat azalış ve fosforile PERK proteininde ise kontrole oranla 1.32 ve 1.16 kat artış gözlenmiştir. ER proteinlerinin yanı sıra, hücre ölümünde görev alan proteinlerden biri olan Bax'ın ekspresyonu, kontrole göre sırasıyla 1.09 ve 1.35 kat artmıştır. ER stresini görüntülemek için Tiyoflavin T adlı floresan boya ile boyanan U87MG hücrelerinde, dozun öldürücülüğü ile floresan ışımının pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmadan elde edilen verilerin, glioblastoma ile ilgili tanı ve tedaviye yönelik strateji geliştirilmesinde veri bakımından katkı sağlaması hedeflenmektedir.

Ocak 2022, 66 sayfa.

Anahtar kelimeler: Glioma, endoplazmik retikulum, cerulenin.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS in CERULENIN TREATED U87 GLIOBLASTOMA CELL LINE

Şefika Beyza METE

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Murat PEKMEZ

Glioblastoma remains as one of the most fatal cancer types due to its high malignancy, insufficient diagnostic methods and poor rate of overall survival. Recent studies indicate that alterations in molecules and/or metabolic pathways during carcinogenesis may come forward as potential targets in regards to prognosis and cure of glioblastoma. Fatty acid synthase, the enzyme which is responsible for converting malonyl coenzyme A to palmitate, and its inhibitor, Cerulenin are one of the most prominent examples of such targets. Cerulenin, an antifungal agent, blocks lipid synthesis pathway via blocking fatty acid synthase and induces cellular stress due to lack of fatty acids. In addition to that, fatty acid deficiency-related stress may cause cells undergo death via activation of death pathways.

In this study, MTT assay results revealed that Cerulenin treatment in various concentrations significantly alters U87MG cell viability. Based on the results, one untreated control group and two treated groups were selected for following experiments. One of the treated groups (IC_{20}) was found as 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The latter group (IC_{50}) was determined as 5.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Western blotting and qPCR were used to analyze changes in protein and gene expressions as a result of Cerulenin-induced ER stress. qPCR data displayed that *TMED4* gene expression significantly reduced, with being 0.31 times for IC_{20} group and 0.48 times for IC_{50} cells. However, *TMED4* protein expression increased 1.26 times and 1.38 times, respectively. In endoplasmic reticulum proteins; expression of ER chaperone Grp78 increased 1.5 and 1.12 times, *IRE1 α* expression increased 1.04 and 1.22 times, *ATF6* expression slightly decreased 0.91 times and 0.84 times, respectively. Phosphorylated PERK, another ER protein, increased 1.32 and 1.16 times

compared to untreated cells. In addition to ER stress proteins, changes in Bax expression, one of the proteins that take part in cell death, was analyzed with Western blotting. Blotting results displayed that Bax expression increased 1.09 and 1.35 times, respectively. Lastly, ER stress was visually assessed by using fluorescent microscopy. A fluorescent dye named Thioflavin T was used to stain Cerulenin-treated U87MG cells. Microscopy results indicated that dose-dependent inhibition and fluorescent signal were positively correlated.

Data obtained from the study are expected to contribute in terms of developing novel strategies related to diagnosis and cure of glioblastoma.

January 2022, 66 pages.

Keywords: Glioma, endoplasmic reticulum, cerulenin.



1. GİRİŞ

Kanser, ölüm nedeni olarak dünya çapında kardiyovasküler hastalıkların ardından ikinci sırada bulunmaktadır. Temelde genetik bir bozukluk olan kanserin tanı ve tedavisinde elde edilen tüm gelişmelere rağmen, her yıl binlerce insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir (World Cancer Report, 2020). 2020 yılında, kanserden kaynaklanan ölümler incelendiğinde ilk sıralarda akciğer, kolon ve meme kanseri bulunmaktadır. Akciğer, meme ve kolon kanserlerindeki ölüm oranının fazla görülmesinin nedenlerinden biri, tespit edilen vaka sayıları ile pozitif korelasyon göstermesi olarak düşünülebilir (Sung ve diğ., 2021). Ancak düşük vaka sayısına rağmen ölümcüllük düzeyi yüksek kanser tipleri de bulunmaktadır. Bu kanser tiplerinin en iyi örneklerinden biri beyin ve merkezi sinir sistemi kanserleridir.

Glioblastoma multiforme (GBM), beyin ve merkezi sinir sistemi kanserleri içinde en yüksek mortaliteye sahiptir. Tanısı çok zor olmakla beraber tedavisine yönelik çözümlerin yetersizliği nedeniyle, ortalama yaşam süresi 5-14 ay arasında değişiklik göstermektedir (Salazar-Ramiro ve diğ., 2016).

Kanserin tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda, temeli hücrenin öldürülmesine dayanan çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Çalışmalar, hedeflenen molekül veya metabolik yollara göre şekillenmekte olup kanserin türüne ve gelişim evrelerine göre farklılık gösterebilmektedir. Kanser hücrelerinde, kontrolsüz bölünme sonucu artan lipit ve lipit türevleri talebini karşılamak için lipit metabolizmasının yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir (Santos ve diğ., 2012). Bu nedenle lipit metabolizması, kanserin tedavisi için kullanılacak hedeflerden biri olarak gösterilebilir. Lipit metabolizmasının herhangi bir basamağını bloke etmek, kanser hücrelerinin strese girip ölüm yollarına yönlenmesine yol açabilir. Bunun için, bloke edilmek istenen molekül veya molekülü kodlayan gen inhibe edilebilir. Kanser hücrelerinde yüksek aktivite gösteren ve yağ asidi sentezinde malonil koenzim-A'nın palmitik aside dönüşümünden sorumlu yağ asit sentaz (FASN) enzimi inhibe edildiğinde, hücrede yağ asidi eksikliği nedeniyle stres oluştuğu bilinmektedir (Menendez ve Lupu, 2007; Kridel ve diğ., 2007). FASN'nin inhibitörlerinden biri olan Cerulenin, bu konuda en iyi bilinen moleküllerden biridir (Kuhajda, 2006).

Cerulenin, FASN'nin keto-açıl sentaz alt birimine bağlanarak yağ asidi sentezini bloke eder. Yapılan bir çalışmada, ZR-75-1 insan meme kanseri hattına Cerulenin uygulaması sonucu hücrede FASN ekspresyonunun azaldığı ve hücrenin apoptoza gittiği gözlenmiştir (Jeong ve Yoo, 2011). Başka bir çalışmada ise, HT29 ve LoVo insan kolorektal kanser hatlarına Cerulenin uygulaması sonrasında her iki hücre hattında da hücre sayısını azalttığı, migrasyonu kısmen engellediği ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği saptanmıştır (Chang ve diğ., 2016). Cerulenin'in lipit metabolizmasını engellemesi nedeniyle hücreye ve hücredeki organellere yeteri kadar lipit kökenli molekül sağlanamaması, ilerleyen süreçlerde organellerde de stres görülmesine neden olabilmektedir. Bu tür stresin en iyi bilinen türlerinden biri de endoplazmik retikulumda gerçekleştirilmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER) stresi, metabolik işleyişin aksadığı durumlarda ortaya çıkabilir ve ER'de katlanması tamamlanmış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin aşırı birikimi ile indüklenebilir (Kaneko ve diğ., 2017). Stres koşulları dışında inaktif olan IRE1 α , PERK ve ATF6 adlı üç proteinin aktifleşmesi ile başlatılan ve bir tür "sinyal kaskadı" olarak değerlendirilebilecek bu süreçte, stres düzeyi azaltılarak homeostaz sağlanabildiği gibi hücrede ölüm yollarının aktivasyonu da görülebilir (Markouli ve diğ., 2020). Bu üç proteinin yanı sıra; ER ile Golgi arasında yer alan ve salgı yolağında iş gören transmembran emp24 domain (TMED) ailesindeki TMED4'ün de ER stresinde işlevsel olabileceği düşünülmektedir (Aber ve diğ., 2019; Schuiki ve Volchuk, 2012).

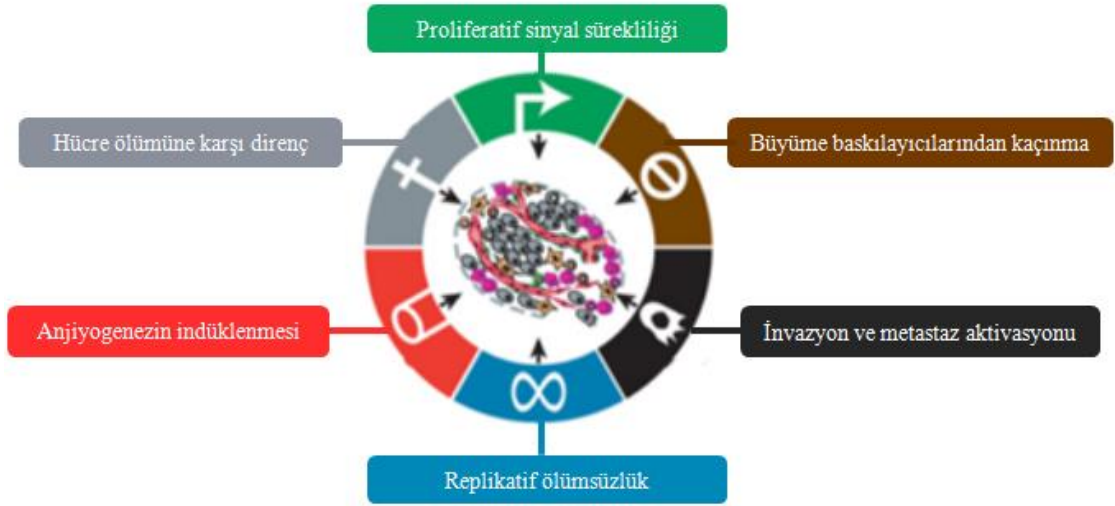
Endoplazmik retikulum stresi, çeşitli moleküler teknikler kullanılarak incelenebilmektedir. Bu yöntemlerden biri olan floresan boyama işleminde, ER'de biriken protein agregatlarına bağlanarak yeşil renkte ışımaya yapan Tiyoflavin T (ThT) adlı floresan boya kullanılmaktadır (Beriault ve Werstuck, 2013).

Bu çalışmanın hedefi, FASN enzimini inhibe ettiği bilinen Cerulenin maddesinin, insan glioblastoma multiforme (U87MG) hücre hattındaki etkilerinin incelenmesidir. Bu kapsamda; *TMED4* geninin anlatım düzeyinin incelenmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR); *TMED4*, Grp78, IRE1 α , PERK, ATF6 ve Bax proteinlerinin anlatımlarındaki değişimi gözlemlenmek için Western blotlama, ER stresinin kalitatif analizi için Tiyoflavin T ile floresan boyama yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Hücresel sistemin düzgün işlemesi; hem doku hem de organ ve organizma boyutunda hayati öneme sahiptir ve bu sistemde meydana gelebilecek herhangi bir aksaklık, geri dönülemez boyutlara ulaşarak ciddi sonuçlara yol açabilir. Bu tehditlerin en büyük ve ölümcüllerinden biri olan kanser, temel olarak genetik düzeyde rastgele bir bozukluk olup kontrolsüz hücre bölünmesi ile ayırt edilebilir. Başka bir deyişle kanser; hücre yaşam döngüsünün parçaları olan yaşlanma ve hücre ölümünden olabildiğince kaçınır (Şekil 2.1). Tüm bunlara ek olarak, köken aldığı yerden başka bölgelere göç ederek –bu mekanizmalara “invazyon” ve “metastaz” adı verilir- orada da yayılım gösterip organizmanın hayatını tehdit edebilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.1: Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)nün açıklamasına göre kanser, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon kişinin hayatını kaybetmesine yol açmıştır (WHO, 2022). Bazı kanser türleri; akciğer, kolon, meme kanseri gibi sık görülmemesine rağmen ciddi mortalite düzeyi gösterebilir (Sung ve

diğ., 2021). Bu tür kanserlerden biri beyin ve merkezi sinir sistemiyle ilişkili tümörler ve kanserlerdir.

2.2. BEYİN TÜMÖRLERİ

Beynin konumu ve korunaklı yapısı (kan-beyin bariyeri), beyinde fizyolojik koşulların dışında bir durum meydana geldiğinde etkin tedavi şansını düşürmektedir. Bu durum, beyin kanserleri için de geçerli olup kanserin görülme sıklığı az olmasına rağmen tedavi sonrası hayatta kalım şansının düşük olması şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Beyinde oluşan tümörler genel olarak tehlike oluşturur ve tümörün beyindeki konumu, tehlikenin büyüklüğü hakkında birtakım bilgiler verebilir. Başka bir deyişle, tümörün yeri, tümörün benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olması fark etmeksizin hayati tehlikeye hatta ölüme neden olabilir. Beyin tümörleri, köken aldıkları bölge bakımından primer ve sekonder (metastatik) olarak ikiye ayrılır. Primer tümörler, beyin ve merkezi sinir sisteminde yer alan glial hücrelerden türevlenirken (Aldape ve diğ., 2018; Lapointe ve diğ., 2018) sekonder tümörler ise akciğer, meme, kolon vb. organlardan metastaz yoluyla gelerek beyinde gelişen tümörlerdir (Lassman ve DeAngelis, 2003).

2.2.1. Glioma

Gliomalar; primer beyin tümörleri grubuna dâhildir ve %75 oranında görülme sıklığı ile en sık karşılaşılan beyin tümörü türüdür. Gliomalar; astrositom, oligodendrom ve glioblastomaları kapsar (Louis ve diğ., 2021; Lapointe ve diğ., 2018). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2007'de yaptığı sınıflandırmaya göre gliomalar, malignansi düzeyine göre dört farklı derecede değerlendirilmektedir. Histolojik özelliklere göre oluşturulan derece 1 ile 4 arası olan bu sınıflandırmada 1. ve 2. derece gliomalar olan astrositomların malignitesi genellikle düşüken, glioblastomaların dahil olduğu 4. derece astrositomlara doğru gelindiğinde yüksek maligniteye ek olarak tedaviye yanıt ve hayatta kalma şansı azalmaktadır (Wu ve diğ., 2016; Louis ve diğ., 2007).

Glioblastoma multiforme (GBM), gliomaların en agresif ve en sık görüleni olması ile beraber yüksek yayılım hızı, kan-beyin bariyerinin getirdiği fiziksel handikap ve tedavi prosedürlerine karşı düşük yanıtı nedeniyle aynı zamanda en ölümcül glioma türüdür. Tedavi sonrası 5 yıllık süreç incelendiği zaman sağkalım oranı sadece % 6.8 olan (Ostrom ve diğ., 2019) –hastaların

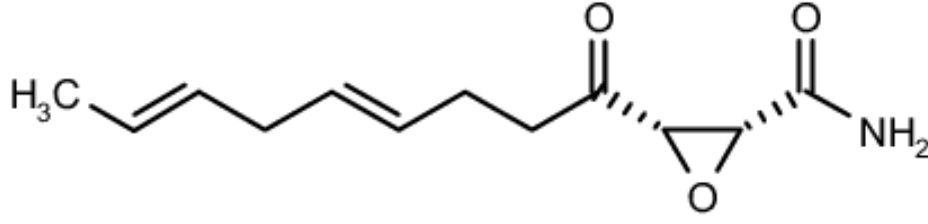
çoğunun tanı konulduğu andan itibaren 2 yıl içinde hayatını kaybettiği- GBM, tanı aşamasındaki zorluğu nedeniyle tedavi şansı en düşük kanser türlerinden biri olmaya devam etmektedir (Stupp ve diğ., 2005).

2.3. CERULENİN

Kanser tedavisinde çeşitli yöntemler ve hedefler kullanılmaktadır. Bu stratejilerden biri, hücrelerde –özellikle kanser hücrelerinde- sıkça aktif olan metabolik yolların kısmî ve/veya tamamen inhibisyonu yoluyla hücreleri ölüm mekanizmalarına yönlendirmektir. Bunun en iyi aydınlatılan örneklerinden biri kanser hücrelerindeki kontrolsüz bölünme ihtiyacından doğan lipit gereksinimidir. Bu gereksinimi karşılamak için, kanser hücrelerinde yağ asidi üretiminden sorumlu “yağ asit sentaz (FASN – Fatty Acid Synthase)” adlı enzim görev alır (Menendez ve diğ., 2004).

FASN'nin, inhibisyon sonucu işlev göremediği durumlarda hücrelerde yağ asidi üretimi sekteye uğrar ve bu nedenle hücrel stres baş gösterir. İnhibisyondan sorumlu moleküllerin en eski ve iyi bilinen örneği ise Cerulenin'dir (Omura, 1976; Murata ve diğ., 2010).

Cerulenin, *Cephalosporium caerulens* adlı fungus türünden elde edilen doğal bir antimikotik olup (Şekil 2.2) FASN'nin beta-keto açıl sentaz alt ünitesini inhibe ederek malonil Co-A'nın palmitata dönüşümünü ve dolaylı yoldan yağ asidi üretimini geri dönülemez bir biçimde sekteye uğratır (Funabashi ve diğ., 1989). Bu sebeple, keşfedildiği ilk yıllarda kanser tedavisi için iyi bir strateji olarak düşünülmesine rağmen, hücre içinde stabilite kaybı yaşamasının anlaşılmasının ardından (Parrish ve diğ., 1999), kesin bir tedavi adayı olmaktan çıkarılarak daha çok FASN ile ilgili çalışmalarda referans madde olarak kullanılmayı sürdürmektedir.

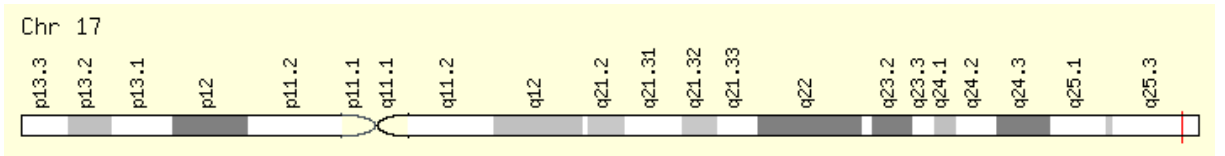


Şekil 2.2: Cerulenin'in kimyasal yapı gösterimi.

2.3.1. Yağ Asit Sentaz

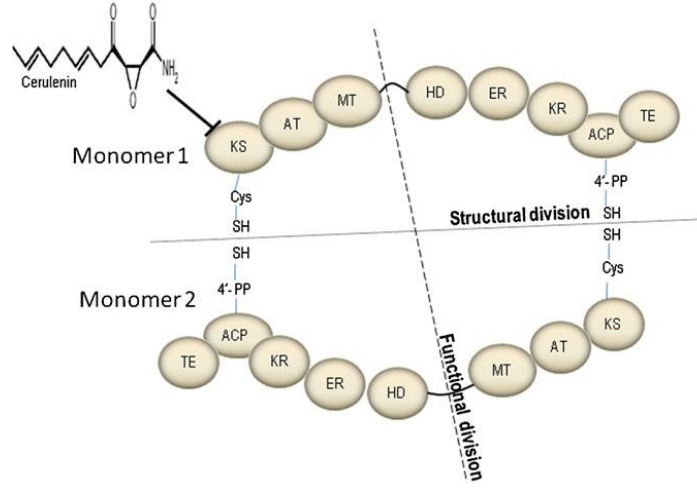
Lipit metabolizması, hücre ve organel membranlarının, dolayısıyla hem hücrenin hem de organellerin bütünlüğü açısından kolesterol, fosfolipit gibi lipit yapılarının sağlanmasında hayati önem taşır. Bunlardan biri olan yağ asitleri, diğer gruplar kadar işlevsel olup membran yapısının korunmasında büyük rol oynar. Yağ asitleri, besinlerle dışarıdan alınabildiği gibi hücrede dış kaynaklı yağ asidi eksikliğinde/yokluğunda (Little ve diğ., 2007) “*de novo* lipojenez” yoluyla lipit kökenli olmayan (Örn; Pirüvat) moleküllerden de üretilebilir. Bu iki yolağın ortak noktası ise, Krebs döngüsünde yer alan asetil koenzim-A (asetil Co-A)nın malonil Co-A'ya; onun da yağ asit sentaz (fatty acid synthase; FASN) aracılığıyla palmitik aside dönüşümüdür (Menendez ve Lupu, 2007).

FASN (EC:2.3.1.85), “*de novo* lipojenez”i katalizleyen tek enzim olup 273.4 kiloDalton (kDa) molekül ağırlığında, 2511 aminoasit uzunluğunda olup FASN'nin kodlanmasından sorumlu aynı isimli gen, 17. kromozomun uzun kolunda 25.3 bölgesinde bulunur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: FASN geninin kromozom üstünde gösterimi (GeneCards, 2021c).

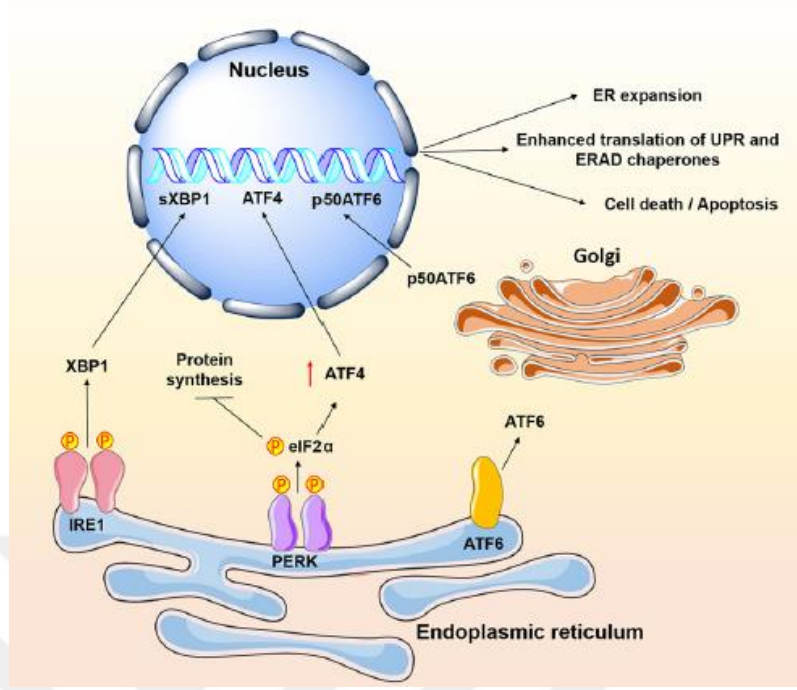
Yağ asit sentaz, her ne kadar tek bir enzim olarak bilinse de aslında 7 farklı işlev görebilen bir enzim kompleksidir (Şekil 2.4). Bu alt birimler sırasıyla beta-ketoaçil sentaz (KS), asetil transaçilaz (AT), malonil transaçilaz (MAT), beta-hidroksi açil dehidrataz (DH), enoil redüktaz, beta-ketoaçil redüktaz (KR) ve tıyoesteraz (TE) olup her bir alt ünite, malonil Co-A'nın nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) aracılığıyla palmitata dönüşmesinde görev alır (Angeles ve Hudkins, 2016; Deepa ve diğ., 2010).



Şekil 2.4: FASN'nin yapısı (Deepa ve diğ., 2010).

Yağ asitlerinin hüresel açıdan yeterli düzeyde olduğu durumlarda FASN ekspresyonu nispeten düşük seviyede ilerlerken yağ asidi yetersizliğinde ekspresyonu artar. Bu duruma ek olarak; en bilinen özelliği kontrolsüz bölünme olan kanser hücrelerindeki FASN anlatımı, yüksek lipid ve lipid türevleri ihtiyacı nedeniyle normal hücelere kıyasla oldukça fazladır (Kridel ve diğ., 2007).

FASN'nin kanser hücrelerinde görülen overekspresyonu, kanser tedavisi yaklaşımları için cazip bir hedef haline gelmesine neden olmuştur (Angeles ve Hudkins, 2016). Bunun için, çeşitli doğal veya sentetik türevli inhibitör maddeleri kullanarak enzimin inaktive edilmesi ve bu sayede hücelerde stres oluşturarak hücre ölümünün tetiklenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 2.5: ER stresinin şematik olarak gösterimi (da Silva ve diğ., 2020).

2.4. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Stres, metabolik sistemlerin düzgün çalışmasını kısmen veya tamamen engellemekle beraber yolakların çalışmasında etkili olan organellere de hasar vererek hücrenin işleyişinin tamamen durmasına neden olabilir. Endoplazmik retikulum (ER), strese bağlı organel hasarının incelenmesi için iyi bir örnek olarak karşımıza çıkmaktadır. Cerulenin'in FASN enzimini inhibe etmesine bağlı olarak hücrede meydana gelen palmitik asit eksikliğinden kaynaklanan (Kridel ve diğ., 2007) yağ asidi miktarı yetersizliği, yağ asidi dışındaki birtakım lipid bileşenlerinin üretimini de aksatması nedeniyle hücre içerisinde stresi tetiklemektedir.

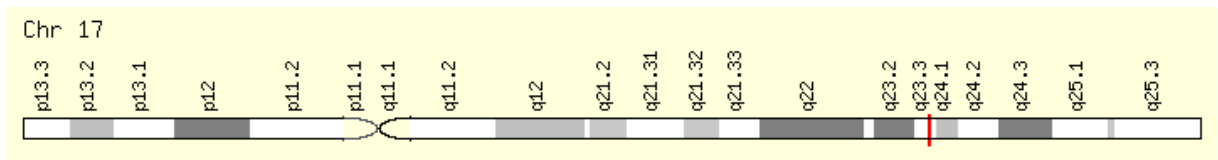
Endoplazmik retikulum; ökaryotik hücrelerde nükleusu kısmen çevreleyen, hücre membranından kökenlenen ve hücrenin “taşıma sistemi” olarak bilinen bir organeldir. Yapısında ribozom bulundurup bulundurmamasına göre “granüllü” veya “granülsüz” ER olarak adlandırılır. Granüllü ER, protein sentezinin tamamlanmasında kilit öneme sahiptir: Bir nevi “kalite kontrol birimi” olarak iş gören ER, sentez sürecinde katlanamamış veya yanlış katlanmış proteinlerin hücre içine salgılanmasını engelleyerek onları doğru konformasyona getirmeye çalışır. (Hotamışlıgil, 2010; Wang ve Kaufman, 2012). Ancak bu durum her zaman gerçekleşmeyebilir ve hücresel stresin baş gösterdiği koşullardan ER'nin de etkilendiği

senaryolar mevcuttur. ER'nin etkilenmesi, "Endoplazmik Retikulum Stresi" kavramını ortaya çıkarır (Şekil 2.5).

ER stresi sonucu meydana gelen değişimlerden organelin kendisi kadar organelde bulunan proteinler de etkilenir. Bunlardan en iyi bilinenleri, ER membranında yer alan iki transmembran protein ve bir transkripsiyon faktörü olup sırasıyla inositol gerektiren enzim 1 alfa (IRE1 α), protein kinaz R benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)dır. ER stresi kaynaklı katlanmamış protein yanıtının (Unfolded Protein Response; UPR) üç büyük sinyal yolağını oluşturan –başka bir deyişle ER stresinin simgesi olan- bu proteinler, ER membranında bulunup stres koşullarında ER homeostazının sağlanmasında görev alırlar. Homeostazi (iç denge)nin sağlanamadığı durumlarda ise UPR mekanizmasını başlatıp diğer molekülleri bir tür "sinyal kaskadı" yoluyla aktive ederek hücreyi hayatta kalmaya veya gereken durumlarda apoptoza yönlendirebilirler (Walter ve Ron, 2011).

2.4.1. IRE1 α

İnositol gerektiren enzim 1 adıyla bilinen IRE1 α , ER membranında yer alan ve UPR'nin ana sensörlerinden biri olarak iş gören 977 aminoasit uzunluğunda olup 109.7 kDa ağırlığa sahiptir. IRE1 α 'nın kodlanmasından sorumlu *ERN1* geni 17. kromozomun uzun kolunun 23.3 bölgesinde bulunur (Şekil 2.6).



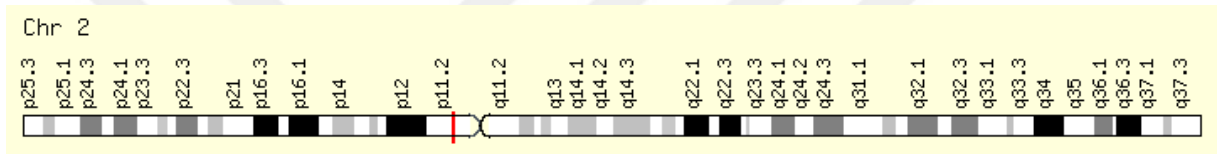
Şekil 2.6: *ERN1* geninin kromozom üzerinde gösterimi (GeneCards, 2021e).

IRE1 α , tip 1 ER transmembran proteinidir. Başka bir deyişle, amino (-NH₂) terminali ile ER lümeninde yer alan IRE1 α , sentezle ilgili mekanizmalarda protein kinaz ve endoribonükleaz – RNaz- aktivitesi gösterirken (Corazzari ve diğ., 2017) aynı zamanda stres durumunda UPR'yi yöneten üç ana proteinden biridir. IRE1 α ve katalizlediği sinyal yolağı, UPR yolları arasında en yüksek korunmuşluğa sahip olup mayalardaki yolak ile de büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Tirasophon ve diğ., 1998). Hücrede ER stresi tetiklendiğinde; X-box binding protein (X-box bağlanma proteini) 1'e (XBP1) ait mRNAların kırılmasıyla oluşan XBP1s, ER homeostazının yeniden sağlanmasına yönelik çalışarak şaperon, lipid biyosentezi ve ER-

ilişkili degradasyondan (ERAD – ER-associated degradation) sorumlu genlerin anlatım yapmasını indükler (Walter ve Ron. 2011; Wang ve Kaufman, 2012). Buna ek olarak, bazı durumlarda, XBP1 yerine c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ile etkileşerek hücrel ölüm yollarının aktifleşmesini sağlayabilir (Corazzari ve diğ., 2017; Hotamışlıgil, 2010).

2.4.2. PERK

Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz adıyla bilinen PERK, ER membranında yer alan ve UPR'nin ana sensörlerinden biri olarak iş gören 1116 aminoasit uzunluğunda olup 125.2 kDa ağırlığa sahiptir. PERK'in kodlanmasından sorumlu *EIF2AK3* geni 2. kromozomun kısa kolunun 11.2 bölgesinde bulunur (Şekil 2.7).

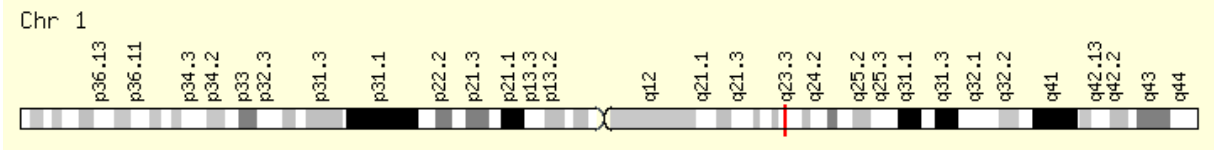


Şekil 2.7: *EIF2AK3* geninin kromozom üstünde gösterimi (GeneCards, 2021b).

IRE1 α gibi tip 1 transmembran proteini olan PERK; ER stresi ve UPR koşullarında protein translasyonunu, ökaryotik translasyon başlatıcı faktör (eIF2 α – Eukaryotic Translation Initiation Factor) adlı proteinin 51. pozisyonda bulunan serin amino asidini fosforilleyerek inhibe eder. Bu sayede ER homeostazının geri kazanılmasına katkı sağlamakla beraber aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4) proteininin sentezlenmesine neden olur (Dufey ve diğ., 2015; Smith ve Wilkinson, 2017). ATF4 proteini; UPR'nin strese karşı yetersiz kaldığı durumlarda, bir tür transkripsiyon faktörü olan C/EBP homolog proteini (CHOP) ekspresyonunda görev alır. CHOP'ın pro-apoptotik proteinlerle etkileşmesi ise hücrede ER stresi ile indüklenmiş apoptoz sürecinin başlamasına neden olabilir (Corazzari ve diğ., 2017; Smith ve Wilkinson, 2017).

2.4.3. ATF6

Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 alfa adıyla bilinen ATF6, ER membranında yer alan ve UPR'nin ana sensörlerinden biri olarak iş gören 670 aminoasit uzunluğunda olup 74.5 kDa ağırlığa sahiptir. ATF6'nın kodlanmasından sorumlu gen, proteinle aynı ismi taşımakta ve 1. kromozomun uzun kolunun 23.3 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 2.8).



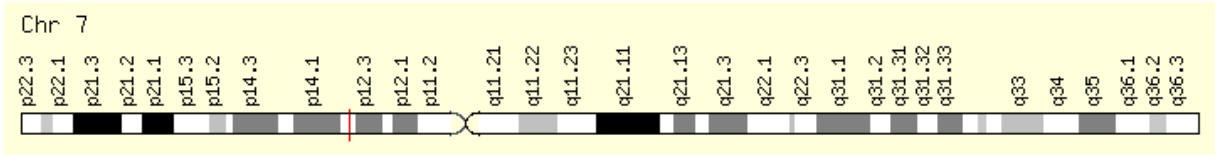
Şekil 2.8: *ATF6* geninin kromozom üstünde gösterimi (GeneCards, 2021a).

ATF6; *IRE1 α* ve *PERK*'ten farklı olarak tip 2 transmembran proteini olup karboksil (-COOH) terminali ER lümeninde bulunur (Shen ve diğ., 2002). Fizyolojik koşullarda ER'de bulunmasına karşın stres ve UPR durumlarında ise Golgi aygıtına giderek orada proteazlarca kesildikten sonra aktifleşerek (*ATF6N*) -*IRE1 α* 'nın işlevine paralel olarak- birtakım UPR genlerinin ekspresyonunu indükler (Hotamışlıgil, 2010; Walter ve Ron, 2011). Buna ek olarak, *XBP1* aracılığıyla *CHOP* ile etkileşerek hücrenin ölüm yolağına yönlendirilmesinde etkili olmaktadır (Schleicher ve diğ., 2010).

2.4.4. *TMED4*

Lipit biyosentezinin inhibisyonu sonucu oluşan stresin ER üzerindeki etkisi ve yol açtığı sonuçlar, metabolik süreçler kadar ER'nin kendisi açısından da önem taşır. ER membranında yer alan proteinlerin anlatımları, strese karşı oluşturulan yanıtı değiştirebilir. *IRE1*, *PERK*, *ATF6* gibi transmembran proteinlerin yanı sıra başka proteinlerin de strese karşı yanıt oluşturulmasında etkili olabilir. Bu proteinlere örnek olarak *TMED4*, diğer adlarıyla p24 α 3 veya *ERS25*, verilebilir.

Transmembran emp24 domain-containing protein 4 (*TMED4*); 227 aminoasit uzunluğunda ve 25.9 kDa ağırlığında bir proteindir (Şekil 2.10). Proteinin kodlanmasından sorumlu olan aynı isimli gen, 5 eksona sahip olmakla beraber 7. kromozomun kısa kolunun 13 bölgesinde bulunur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: *TMED4* geninin kromozom üzerinde gösterimi (GeneCards, 2021d).

10	20	30	40	50
MAGVGAGPLR	AMGRQALLLL	ALCATGAQGL	YFHIGETEKR	CFIEEIPDET
60	70	80	90	100
MVIGNYRTQM	WDKQKEVFLP	STPGLGMHVE	VKDPDGKVVV	SRQYGSEGRF
110	120	130	140	150
TFTSHTPGDH	QICLHSNSTR	MALFAGGKLR	VHLDIQVGEH	ANNYPEIAAK
160	170	180	190	200
DKLTEQLRA	RQLLDQVEQI	QKEQDYQRYR	EERFRLTSES	TNQRVLWWSI
210	220			
AQTVILILTG	IWQMRHLKSF	FEAKKLV		

Şekil 2.10: *TMED4* proteininin aminoasit dizisi (UniProt, 2021).

TMED4 proteininin, ER-Golgi aygıtı arasındaki transportta, hücre içi taşınmada, golginin organizasyonu vb. süreçlerde görevli olduğu düşünülmektedir ve bu işlevleri nedeniyle, filogenetik ve biyoinformatik çalışmalarda, çeşitli türler arasında yüksek korunmuşluk oranına sahip olduğuna dair bulgulara ulaşılabilmektedir (Matsuda ve diğ., 2003; Gaudet ve diğ., 2011; amigo.geneontology.org). Tüm bunlara ek olarak; insan bağışıklık yetmezlik virüsü olarak bilinen HIV (human immunodeficiency virus) nin protein kompleksi oluştururken etkileştiği proteinlerden biri olması (Jäger ve diğ., 2011) ve nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) nin aktifleşmesinde ve dolaylı yoldan enflamasyon yanıtı oluşmasında etkili genlerden biri olmasına rağmen (Matsuda ve diğ., 2003), günümüzde *TMED4*'ün hücre sel akışta –ve ER ile ilgili süreçlerde- nerede ve nasıl rol aldığı tam olarak aydınlatılamamıştır.

TMED4 ile ilgili literatür bilgisinin belirli bir bölümü Hwang ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmayla elde edilmiştir. Çalışmaya göre *TMED4*'ün, mayalarda (ve aynı zamanda birçok omurgalı türünde) ER-Golgi arası protein transportunda görevli (ve yüksek oranda korunmuş) p24 protein ailesinin (Strating ve diğ., 2009) insandaki homologu olduğu belirtilmektedir. Hwang ve diğ. (2008)nin; bu çalışmada fare fibroblast (NIH3T3) ve insan osteosarkoma (U2OS) hücre hatlarında yaptıkları deneyler neticesinde *TMED4* (ERS25)ün, ER'de lokalize olmakla beraber ısı şoku, ultraviyole (UV), oksidatif stres ve/veya

Thapsigargin, Brefeldin A gibi ER stresini indükleyici ajanların varlığında ekspresyonunun arttığı ve katlanmamış/yanlış katlanmış protein yanıtının (Unfolded Protein Response- UPR) oluşumuna katkı sağladığı proteomik ve mikroskopik analizlerle ortaya konmuştur. Çalışmada TMED4'ün susturucu özellikli kısa hairpin (saç tokası) yapılı RNA molekülleri ile (short hairpin RNA – shRNA) gen anlatımı baskılanmıştır. Baskılama sonucunda ise, ısı şokuna yanıt olarak ekspresyonları artan ve hücrenin hayatta kalması yönünde rol oynayan ısı şoku proteinlerinden (Heat shock proteins – Hsp) biri olan Hsp70'in ekspresyonunun artarak apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) molekülüne bağlandığı görülmüştür. Bu bağlanma ile hücreyi hayatta kalmaya doğru yönlendirdiği tespit edilmiştir.

2.4.5. Endoplazmik Retikulum Stresinin Belirlenmesi

Endoplazmik retikulum stresi, hücrenel metabolizmanın stres altında geliştirebileceği yanıtları ve izleyebileceği stratejileri inceleme açısından büyük önem taşır. Bu sayede; kanser, Alzheimer, Parkinson vb. hastalıkların tedavisine dair seçenekleri artırma ihtimalinin yanı sıra hücrelerin çalışma prensiplerine yönelik karanlıkta kalan noktalara da ışık tutulabilir. ER stresini net olarak belirleyebilmek için birden fazla moleküler yöntem kullanılabilir. Bu yöntemlere örnek olarak; ER ile ilişkili proteinlerin anlatım düzeylerinde herhangi bir değişim olup olmadığını gözlemleyebilmek için Western blotlama, ilgili proteinleri gen düzeyinde incelemek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve floresan metotlar verilebilir.

2.4.5.1. Floresan Yöntemler

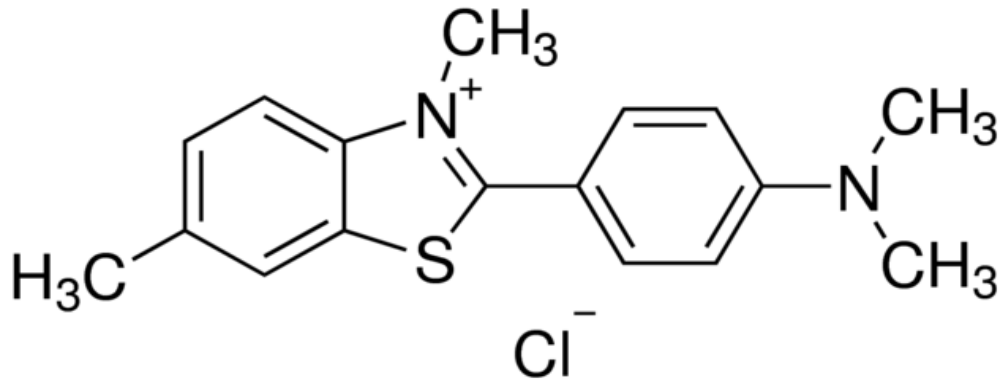
Hücrenel stres ile gelişen katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış protein birikimini/agregasyonunu inceleyebilmek; stresin yol açabileceği patolojik, moleküler vb. süreçleri anlamada ve agregasyonun oluşmasını önleme veya oluşan agregatları uzaklaştırma/elimine etme yönünde strateji geliştirme açısından önem taşır. Bunun için proteinlerin yapısını detaylı bir şekilde anlamamıza olanak sağlayabilecek X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi yüksek teknolojiye yöntemlerin yanı sıra floresan boya aracılığıyla mikroskopik ve spektroskopik yöntemler gibi daha basit teknikler de uygulanabilir.

Floresan yöntemler, boyama veya immün çöktürme prensibiyle işleyip temel olarak boyaların veya ilgili antikörün ER ile ilişkili proteinlerin bakiyelerine bağlanarak reaksiyon verme veya

belirli dalga boyunda ışığa özelliğine sahip olması üzerine kurulabilir. Bu yöntemlerin en bilinen örnekleri yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein – GFP) ile işaretleme (Samali ve diğ., 2010), ER lümeninde bulunan çeşitli proteinlerdeki spesifik lizin-aspartik asit-glutamik asit-lösin (KDEL) dizisini tanıyan reseptör ve ona uygun antikorla immün çöktürme (Yamamoto ve diğ., 2001), 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) veya tiyoflavin T (ThT) gibi belirli dalga boyu aralıklarında ışığa veren boyalar olup ER stresine ilişkin analizlere görsel açıdan destek sunmasına olanak sağlar.

ER stresi ve strese bağlı katlanmamış protein yanıtı ile beraber gelişen ilk durumlardan biri olan protein agregasyonunu gözlemlemede, çoğunlukla floresan boya temelli teknikler kullanılmaktadır. Boyalar, agregat içerisinde bulunan proteinlerin çeşitli bölgelerine bağlanır ve belirli dalga boylarında floresan ışığa yaparak hücresel düzeyde veya doku düzeyinde protein birikimi hakkında fikir edinilmesine olanak sağlar. Bu boyalar arasında, literatürde en sık rastlanılanlardan biri ise Tiyoflavin T (ThT)dir (Şekil 2.11).

Tiyoflavin T; protein agregatlarına- agregatlardaki beta-amiloid fibrillere – bağlanan ve bağlanma sonucu floresan ışığa veren bir tür benzotiyazol tuzudur (Vassar ve Culling, 1959). Gerek dokularda gerekse hücre içindeki amiloid yoğunluğu ile pozitif korelasyon gösteren floresan özelliği nedeniyle amiloid birikimi kaynaklı ve/veya birikimin önemli ölçüde etkili olduğu Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklardaki patolojik sürecin aydınlatılmasında oldukça fazla kullanılır (LeVine III, 1999).



Şekil 2.11: Tiyoflavin T (ThT)nin iki boyutlu gösterimi (Sigma-Aldrich, 2021).

ThT'nin floresan ışımalarının ardındaki mekanizma; benzotiyazol ile anilin halkaları arasındaki merkezî karbon-karbon (C-C) bağının, rotasyonel immobilizasyon ile amiloid plaklara – amiloidlerin yan zincirlerinde bulunan β -ipliklerine- bağlanması ve bunun sonucunda 450 nanometre (nm) dalga boyunda eksitasyon, 482 nm'de ise artan emisyon olarak açıklanabilir (LeVine III, 1993; Oborocenu ve diğ, 2011; Xue ve diğ., 2017).

ThT, her ne kadar ağırlıklı olarak protein fibrilasyonu ve bununla ilişkili inhibisyon çalışmalarında kullanılsa da protein dışındaki moleküllere de bağlanarak floresan ışımaya verme özelliğine sahiptir. Örneğin, yapısındaki hidrofobik gruplar sayesinde DNA'daki tirozin bakiyelerine bağlanarak DNA'da da ışımaya yapabilme potansiyeline sahiptir (Biancardi ve diğ., 2014; Gade Malmos ve diğ., 2017).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. CERULENİN UYGULAMASI VE CANLILIĞIN BELİRLENMESİ

3.1.1. Hücre Kültürünün Oluşturulması

U87MG insan glioblastoma hücre hattı (İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul Üniversitesi); %10 fetal bovin serum (FBS; Gibco) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco) eklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM; Gibco) besiyerinde kültürlendi. Hücreler, %5 karbondioksit (CO₂) içeren 37 °C'a ayarlı inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Scientific) çoğaltıldı ve 2-3 günde bir alt kültürleme yapıldı. Alt kültürleme işleminde besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 1X Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco) ile yıkama yapılarak besiyeri artıkları temizlendi. DPBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin, tutundukları kültür kabıyla ilişkisini kesmede tripsin/EDTA (steril 1X DPBS içinde %0.2 (w/v) tripsin ve %0.04 (w/v) EDTA) kullanıldı. Tripsin aktivitesi besiyeri ile inhibe edildikten sonra tripsin-hücre-besiyeri içeren süspansiyonun bir bölümü kültür kabında bırakıldı ve üstüne yeni besiyeri eklenerek inkübasyona kaldırıldı.

3.1.2. Hücre Çoğalma Eğrisinin Oluşturulması

U87MG hücrelerinin ortalama yaşam sürelerini belirlemek için 24 kuyucuklu hücre kültür kabına hücre ekimi yapıldı. Hücre ekimi aşamasında; canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırt etmek için 20 µL hücre süspansiyonu ile 20 µL tripan mavisi (Gibco) boyası, lam üzerinde pipetaj yoluyla karıştırıldıktan sonra hemositometrede (ISOLAB) hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı sonrasında, çoğalma eğrisini oluşturabilmek adına kültür kabının yarısına, başlangıç olarak kuyu başına 50.000 hücre/mL; diğer yarısına ise 100.000 hücre/mL ekildi. Her gün ve sayı grubu için 1'i teknik tekrar olmak üzere 2 kuyu kullanıldı. Ertesi günlerde, kuyulara ilk ekim saati gözetilerek, çoğalan hücreler hemositometre ile sayıldı. Onuncu günün sonunda bitirilen deneyde elde edilen sonuçlar, Denklem 3.1 ve 3.2'ye göre hesaplandıktan sonra GraphPad Prism 7.0 programında analiz edildi.

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2 \quad (3.1)$$

n : Jenerasyon sayısı

N_2 : Logaritmik bölünme evresinin sonundaki hücre sayısı

N_1 : Logaritmik bölünme evresinin başlangıcındaki hücre sayısı

$$S_t = (T_2 - T_1) / n \quad (3.2)$$

S_t : Jenerasyon süresi

T_2 : Logaritmik bölünme evresinin bitiş zamanı

T_1 : Logaritmik bölünme evresinin başlangıç zamanı

3.1.3. Sitotoksiste Testi

Cephalosporium caerulens'ten elde edilen bir antifungal ajan olan Cerulenin (Sigma-Aldrich C2389)in U87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi uygulandı (Mosmann, 1983). 96 kuyucuklu hücre kültür kabına madde uygulanmayacak kontrol grubu ve uygulanacak Cerulenin konsantrasyonları gözetilerek, her bir deney grubu için 6 teknik tekrar olacak şekilde kuyu başına 15.000 hücre olacak şekilde 200'er μ L ekim yapıldı. Ekim işleminin ertesi gününde kontrol grubunda besiyerleri değiştirildi. Deney gruplarına ait hücrelerin üzerine ise 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 ve 15 μ g/mL dozları (10 mg/mL konsantrasyondaki stoktan seri sulandırma yoluyla elde edildi) konsantrasyonlarında Cerulenin uygulandı. Uygulamaların ardından hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittiğinde besiyerleri uzaklaştırıldı ve karanlık ortamda MTT (Sigma-Aldrich M5655) testi yapıldı. 5 mg/mL konsantrasyondaki MTT stoğundan kör örnek için 2 kuyu ve hücre bulunan diğer kuyulara 30'er μ L MTT eklenmesinin ardından kültür kabı, MTT'nin ışığa duyarlı yapısı nedeniyle karanlıkta 37 °C'ta 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından kuyulara 150'şer μ L DMSO uygulandı. DMSO uygulaması sonrası kültür kabı, formazan kristalinin çözünmesi için 1 saat boyunca çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri (Eon, Bio-Tek) elde edildi. Elde edilen sonuçlar ilk olarak Microsoft Office Excel programında kullanılarak oluşturulan denklem ile (Denklem 3.3) elde edilen veriler GraphPad Prism 7.0 programında analiz edildi.

$$\% \text{ Canlılık} = \left(\frac{\text{Deney grubu absorbanı}}{\text{Kontrol grubu absorbanı}} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

3.2. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

3.2.1. Cerulenin Uygulaması

Bölüm 3.1.3.'te anlatılan sitotoksosite testi sonrasında belirlenen konsantrasyonlarda Cerulenin deney gruplarına uygulandıktan sonra, hücrelerdeki ER stresi protein düzeyinde incelendi. İlk aşamada hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Sayılan hücreler, Bölüm 3.1.3'te ekilen hücre sayısı ve kültür kabının alanı gözetilerek, 6 kuyucuklu hücre kültür kabına, kuyu başına 225.000 hücre/mL olacak şekilde 2'şer mL ekildi. Madde uygulanmamış kontrol grubu ve diğer örnek grupları için ikişer kuyu kullanıldı. Hücre ekiminin bir gün sonrasında kontrol gruplarında besiyeri değişimi; doz gruplarında ise madde uygulaması yapılarak kültür kabı, 48 saatlik inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyonun bitiminde ise hücre toplama prosedürü uygulandı. İlk aşamada kültür kabındaki besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra kuyular 1'er mL soğuk 1X DPBS ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrası uzaklaştırılan DPBS yerine kuyu başına 200 µL tripsin eklendi ve kültür kabı, 2-3 dk boyunca inkübe edildi. Tripsinizasyon işlemi sonlandırmak için kuyulara 400'er µL besiyeri eklendikten sonra kuyularda pipetaj yapılarak süspansiyonun toplanması ve 1.5 mL hacimli santrifüj tüplerine alınması sağlandı. Her bir örnek grubu için ayrı tüpler kullanıldı. Toplanan hücreler +4°C'de 5000xg'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi (Sigma, 4-40K). Santrifüj sonrası üst sıvı (süpernatant) uzaklaştırıldı ve pelletler 1'er mL soğuk 1X DPBS ile süspansiyon edildikten sonra tekrar santrifüjlendi ve oluşan pelletler bir kez daha süspansiyon edildi. Üçüncü santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelletlerinin bulunduğu tüpler, -20°C'de muhafaza edildi.

3.3. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN BELİRLENMESİ

3.3.1. Floresan Mikroskop Analizi

Cerulenin'in U87MG hücrelerinde oluşturduğu hasarı görsel olarak inceyebilmek için Tiyoflavin T (ThT) boyası ile floresan görüntüleme protokolü uygulandı. Protokolün ilk aşamasında hemositometre aracılığıyla sayılan hücreler, 6 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilen lamellere (ISOLAB) 30.000 hücre/mL'ye denk gelen hacimde ekildi. Ekimin ardından 20-25 dk boyunca bekletilen hücrelerin üstüne 2'şer mL besiyeri ilâvesinin ardından

kültür kabı kapatılarak inkübatöre kaldırıldı. Madde uygulanmamış kontrol grubu, Bölüm 3.1.3'te yapılan test sonrası belirlenen IC₂₀ ve IC₅₀ dozları için ikişer kuyu kullanıldı. Ekimin ertesi gününde kontrol grubu kuyularında 2'şer mL besiyeri değişimi yapılırken doz gruplarında ise madde uygulaması yapılarak kültür kabı, 48 saatlik inkübasyona kaldırıldı. 48 saatin ardından floresan mikroskopla görüntüleme işlemi için hazırlanan protokol işleme konuldu. Deneyde kullanılan solüsyonların içerikleri, Tablo 3.1'de verildi.

1. Kuyulardaki eski besiyerleri uzaklaştırıldı.
2. Kuyular 1'er mL 1X PBS ile 1 kez yıkandı, sonrasında PBS uzaklaştırıldı.
3. Kuyulara 2'şer mL %4 paraformaldehit (PFA) solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 10 dk boyunca bırakılarak fiksasyon yapıldı. Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırıldı.
4. Kuyulara 2'şer mL 50 mM amonyum klorür (NH₄Cl) solüsyonu eklendi ve PFA'nın etkisini inhibe etmek ("quenching") için 37 °C'a 10 dk boyunca bırakıldı. Sonrasında NH₄Cl uzaklaştırıldı.
5. ThT uygulaması öncesi hücre geçirgenliğini artırmak (permeabilizasyon) için kuyulara 2'şer mL %0.1 Triton X-100 solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 8 dk boyunca bırakılarak permeabilizasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Sonrasında Triton X-100 kuyulardan uzaklaştırıldı.
6. Kuyulara (2 mL PBS içinde) 20'şer µM ThT uygulaması yapıldı. Kültür kabı folyo ile kapatıldıktan sonra 37 °C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Uygulama bitiminde ThT uzaklaştırıldı.
7. Kuyular 1'er mL 1X PBS ile 1 kez yıkandı, sonrasında PBS uzaklaştırıldı.
8. Kültür kabının içindeki lameller, şırınga ucu yardımıyla kaldırıldıktan sonra pensele ters çevrilerek lamaların üstüne kapatıldı.

Protokole uygun hazırlanan preparatlar, Olympus BX-53 mikroskobunda GFP-FITC filtresi kullanılarak 20X büyütme oranıyla incelendi ve fotoğraflandı. Preparatlar, çekim sonrasında ışıkla teması engellemek için folyoya sarılarak -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1: Floresan görüntüleme yönteminde kullanılan solüsyonlar.

Solüsyonlar	Bileşenler
%4 Paraformaldehit (PFA) Solüsyonu (pH: 7.4-7.6)*	Paraformaldehit (Merck 1014005).....2 g 1X PBS ile 55-60°C'de çözündürülmeye başlanan paraformaldehite bir miktar sodyum hidroksit (NaOH) eklenir. Solüsyonun berraklık kazanmasının ardından oda sıcaklığında soğutulur ve sonrasında pH'ının 7.4-7.6 aralığına düşürülmesi sağlanır. Solüsyon, 1X PBS ile 50 mL'ye tamamlanır. Solüsyon, deney günü taze hazırlanmalıdır.
50 mM Amonyum Klorür (NH₄Cl) Solüsyonu	Amonyum klorür (Merck 101142) 0.13 g Solüsyon, ddH ₂ O ile 50 mL'ye tamamlanır.
%0.1 Triton X-100 Solüsyonu	Triton X-100 (Sigma T8787)..... 40 µL Solüsyon, 1X PBS ile 40 mL'ye tamamlanır.
5 mM ThT Stok Solüsyonu*	Tiyoflavin T (Sigma-Aldrich T3516) 1.59 mg %70 etanol 1 mL Solüsyonun etrafı folyoyle sarılarak karanlıkta muhafaza edilir. Solüsyon, deney günü taze hazırlanmalıdır.

3.3.2. TMED4 Protein Düzeyindeki Değişimin İncelenmesi

3.3.2.1. Protein İzolasyonu

ER stresini analiz edebilmek için ilk olarak Bölüm 3.2.1.'de açıklanan protokole uygun elde edilen hücrelerden protein izolasyonu yapıldı. Bunun için 500 µL 1X "RadioImmunoPrecipitation Assay" (RIPA; 25 mM Tris-HCl pH:7.6, 150 mM sodyum klorür [NaCl], %1 Nonidet P-40, %1 sodyum deoksikolat, %0.1 sodyum dodesil sülfat [SDS]) tamponu kullanıldı ve izolasyon öncesi 0.2 mg fenilmetilsülfonil florür (PMSF; AppliChem A0999,0005), tampona eklenerek çözündürüldükten sonra tüp başına 150'şer µL 1X RIPA eklendikten sonra mikropipet ile protein izolasyonu yapıldı. Tüm işlemleri buzda gerçekleştirilen izolasyonda; set başına 40 kez pipetaj olmak üzere 3 set pipetajdan sonra 1 dakika boyunca sonikatörde (Wisd) tutulan tüpler, 1 set daha pipetaj yapılmasının ardından +4°C'ta 20.000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üst sıvılar yeni tüplere alındı.

3.3.2.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzolasyon sonrası elde edilen proteinlerin konsantrasyon tayini için bisinkoninik asit (BCA) yöntemi uygulandı. Bu yöntemin temelinde, bakır iyonlarının proteinlerin peptit bağlarındaki

azot ile redoks tepkimesi sonucu renk değişimi prensibi bulunur. BCA yönteminde; bovin serum albumin (BSA) stoğundan son konsantrasyonları sırasıyla 2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 25 ve blank (kör örnek) için 0 µg/mL olacak şekilde standartlar oluşturulur. Standartlar, kültür kabına en az 2 tekrarlı ve kuyu başına 25 µL olacak biçimde dağıtılır. Konsantrasyonu bilinmeyen proteinlerin de aynı şekilde yüklenmesinin ardından 37°C’de 30 dk boyunca inkübe edilen standartlar ve örnekler, 562 nm’de spektrofotometrik ölçümün ardından analiz edilir. Analiz yapılırken, standartların konsantrasyonları ve absorbanları kullanılarak “standart grafik” oluşturulur. Grafikten elde edilen “standart denklem” ile diğer proteinlerin konsantrasyonları hesaplanır. Günümüzde bu tür manuel yöntemler kullanılabildiği gibi kitlerle de sonuç alınması mümkün olmaktadır (Smith ve diğ., 1985; Olsen ve Markwell, 2007).

Protein izolasyonu sonucu elde edilen örnekler 10 kat sulandırıldı. Sonrasında “SMART™ BCA Protein Assay Kit (Intron Biotechnology)” protokolüne göre, konsantrasyon tayininde kullanılacak kit bileşenlerinden A ve B solüsyonları alındı. İlk olarak A solüsyonunun alınmasının ardından B solüsyonu, A solüsyonunun 1/50 hacminde olacak şekilde kitten alınarak A solüsyonuna eklendi. Tüp karıştırıcı kullanılarak karıştırılan solüsyonlar 96 kuyucuklu kültür kabına kuyu başına 200’er µL olacak şekilde dağıtıldı. Üstlerine ise 25’er µL örnek ve tampon 2 tekrarlı olacak şekilde pipetaj yoluyla eklendi. Sonrasında kültür kabı, boyanın ışıkla temasını engellemek amacı ile folyoya sarılarak 37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

3.3.2.3. Sodyum dodesil sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hücrelerden izole edilen protein örneklerini ayırtırmak için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. “Bio-Rad Mini Protean Tetra System” adlı elektroferez sisteminin kullanım talimatlarına göre yapılan uygulamada ilk olarak jellerin hazırlandığı sistem kuruldu. Sonrasında Tablo 3.2’de belirtilen miktarlarda sodyum dodesil sülfat (SDS), akrilamid, amonyum persülfat (APS), distile su, Tris-hidroklorik asit (Tris-HCl) tamponu ve tetrametiletildiamin (TEMED) içeren iki farklı jel (ayırma ve yükleme jeli) hazırlandı. İlk olarak ayırma jeli hazırlanıp jel sistemine döküldükten sonra jelin polimerizasyonu beklendi. Sonrasında yükleme jeli hazırlandı ve jelin polimerizasyonu sona erdiğinde Bölüm 3.2.2.3’te konsantrasyonları belirlenen protein örneklerinden 40’ar µg ve 4 µL protein markerı (GangNam-STAIN™ prestained protein

ladder, Intron Biotechnology S24052), 2X örnek yükleme boyasıyla karıştırılıp jele yüklendi. 100 volt (V) ile başlatılan elektroforez süreci, proteinlerin ayırma jeline geçmesiyle 200 V'de devam edip proteinlerin örnek boyası çizgi hattı jelin sonuna geldiğinde sonlandırıldı.

Tablo 3.2: SDS-PAGE jel bileşenleri (1 jel için).

Bileşenler	Ayırma Jeli (pH: 8.8)	Yükleme Jeli (pH:6.8)
Tris-HCl tamponu	1 mL	250 µL
%30 Akrilamid Solüsyonu	1662 µL	337.5 µL
dH ₂ O	2262 µL	1875 µL
%10 SDS	50 µL	25 µL
%10 APS*	25 µL	12.5 µL
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

*: APS ilavesinin ardından; jel karışımındaki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için karışımın bulunduğu beher, yaklaşık olarak 1 dk boyunca sonikatörde tutulmalıdır.

Tablo 3.3: SDS-PAGE yönteminde kullanılan solüsyonlar.

Solüsyonlar	Bileşenler
10X Tank (Yürütme) Tamponu	Trizma baz (Sigma-Aldrich T1503) 30.3 g
	Glisin (BioShop GLN001) 144 g
	SDS (Sigma-Aldrich 75746) 10 g
	Solüsyon, dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır.
	Tris-HCl tamponu (pH: 6.8) 25 mL
2X Örnek Yükleme Boyası (100 mL için)	% 10 SDS Solüsyonu..... 40 mL
	Gliserol 20 mL
	β-merkaptotanol (AppliChem A1108) 10 mL
	Bromofenol mavisi (Merck) 0.2 g
	Solüsyon, dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır.

3.3.2.4. Western Blot Analizleri

SDS-PAGE jel elektroforezinde ayrılan proteinlerin Cerulenin uygulaması sonrası glioblastoma hücrelerindeki anlatım seviyelerinin değişimini gözlemlemek için Western blot analizi yapıldı. Analizde polivinilidinden florür (PVDF) membran ve “Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell” sistemi kullanıldı. Bunun için SDS-PAGE elektroforezinde yürütülen jel, 15 dakika boyunca 1X transfer tamponunda çalkalandı. Sonrasında; deney protokolüne “wet blotting-ıslak aktarım” veya “semi dry blotting-yarı kuru aktarım” yoluyla jeldeki proteinler, PVDF membrana (Thermo Scientific 88520) aktarıldı. Islak aktarım protokolüne göre; iki adet emici sünger arasında sırasıyla bir adet Whatman kâğıdı, proteinlerin bulunduğu poliakrilamid jel, aktarım yapılacak membran ve bir adet Whatman kâğıdı yerleştirildi ve +4°C’de 100 voltta 1 saat 15 dk boyunca aktarım yapıldı. Yarı kuru aktarımda ise, aktarım cihazına (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad) bir miktar 1X transfer tamponu sürüldükten sonra sırasıyla üç adet Whatman kâğıdı, PVDF membran, proteinlerin olduğu poliakrilamid jel ve tekrardan üç adet Whatman kâğıdı yerleştirildi ve cihazın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 25 V’de 30 dk boyunca aktarım yapıldı.

Aktarım sonrası membranın, antikorla muamele sonrası istenmeyen bölgelere de bağlanmasını önlemek amacıyla 1,5 saat boyunca %5’lik yağsız süt tozunda bloklandı. Bloklama sonrasında membran, +4°C’te gece boyu primer antikorla ile muamele edildi. Ertesi gün primer antikordan alınan membran, 1X TBST (Tris-buffered saline ve Tween-20) solüsyonu 5 dakikada bir yenilenecek biçimde 5 defa yıkandı ve yıkama sonrası primer antikorun konak organizmasına (host) uygun sekonder antikorla oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikorla inkübasyon sonrasında 1X TBST ile yıkanan membran, “Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)” görüntüleme kiti ve cihazı ile (ChemiDoc XRS+ System, Bio-Rad) görsel olarak analiz edildi.

Membrandaki farklı proteinleri işaretlemek, bu nedenle membranı tekrar kullanmak için “stripping” adlı yöntem uygulandı. Bu yöntem kapsamında membran, 60°C’de yarım saat boyunca Tablo 3.4’te açıklanan “Stripping Solüsyonu” ile inkübe edildikten sonra ultra saf su (ddH₂O) ile 5 dakikada bir yenileme kaydıyla 5 defa yıkandıktan sonra, 5 dakikada bir olmak üzere 5 kez 1X TBST ile yıkandı. Yıkama işleminin son bulmasını takiben membran, %5’lik süt tozunda 1.5 saat boyunca bloklandıktan sonra incelenmek istenen proteinin primer antikoruyla muamele edildi. Primer antikorun ardından 1X TBST ile yıkanan membran,

primer antikorun konağına uygun sekonder antikorla 2 saat muamelenin ardından tekrar 1X TBST ile yıkandı ve görüntüleme işlemine tabi tutuldu.

Elde edilen protein bantlarının Image Lab (Bio-Rad) programında analizinde, normalizasyon için hücre içinde sürekli anlatım yaptığı bilinen (Tristan ve diğ., 2011) gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimine spesifik antikorla uygulama yapıldı. Protein bantlarının Image Lab ile analizinin ardından anlatım seviyelerinde ortaya çıkan kat değişimi (fold change) ilk olarak Microsoft Office Excel; sonrasında ise GraphPad Prism 7.0 programında tek yönlü (one-way) ANOVA testi ile incelendi.

Tablo 3.4: Western blotlama yönteminde kullanılan solüsyonlar.

Solüsyonlar	Bileşenler
10X Transfer Tamponu	Trizma baz (Sigma-Aldrich T1503) 30.3 g
	Glisin (BioShop GLN001) 144 g
	Solüsyon, dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır.
1X Transfer Tamponu	10X Transfer Tamponu100 mL
	Metanol200 mL
	Solüsyon, dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır.
%5'lik Süt Tozu (100 mL için)	Süt tozu (Skim Milk Powder, Sigma-Aldrich)5 g
	Solüsyon, 1X TBST ile 100 mL'ye tamamlanır.
10X TBS Tamponu (pH:7.5)	Trizma baz (Sigma-Aldrich T1503) 24.2 g
	dH ₂ O ile çözdürülmeye başlanan trizma bazın pH'ı, 1N HCl ile 7.5'e düşürülür.
	Sodyum klorür (Merck 567440) 87.7 g
1X TBST Tamponu	Solüsyon, dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır.
	10X TBS Tamponu100 mL
	Tween-20* 1 mL
Stripping Solüsyonu (100 mL için)	Solüsyon, dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır.
	*: Tween-20, total solüsyon hacminin %0.1'i olacak şekilde eklenir.
	%10 SDS Solüsyonu 20 mL
	0.5 MTris-HCl tamponu (pH: 6.8)12.5 mL
	Ultra saf su (ddH ₂ O)67.5 mL
	β-merkaptotanol (AppliChem A1108)0.8 mL

Tablo 3.5: Western blotlama yönteminde kullanılan antikorlar.

Protein	Marka/Kod	Konak Organizma (Host)	Dilüsyon (μL antikor/μL süt tozu)
Anti-TMED4	Novus Biologicals NB100-56393	Tavşan (Rabbit)	1:250
Anti-IRE1α	Novus Biologicals NB100-2324	Tavşan	1:1000
Anti-PERK	Novus Biologicals NBP1-51661	Fare (Mouse)	1:1000
Anti-ATF6	Novus Biologicals NBP1-40256	Fare	1:1000
Anti-Grp78	Novus Biologicals NBP2-16749	Tavşan	1:1000
Anti-Bax	Boster Biological Technology A00183	Tavşan	1:1000
Anti-GAPDH	Invitrogen MA5-15738	Fare	1:2500
Anti-mouse IgG*	Boster Biological Technology BA1050	Keçi (Goat)	1:2500
Anti-rabbit IgG	Boster Biological Technology BA1054	Keçi	1:2500

*IgG: İmmünoglobulin G

3.4. *TMED4* GENİNİN EKSPRESYON SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİMİN İNCELENMESİ

3.4.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılacak hücreler, Bölüm 3.2.1.'de açıklanan protokole göre hazırlandı. Protokolden farklı olarak RNA'nın kırılma ihtimaline karşın hücre pelletlerinin olduğu tüpler -80°C 'de muhafaza edildi. İzolasyon sürecinde kullanılacak pipet ucu, dH_2O vb. malzemeler, izolasyonun öncesinde ve sonrasında otoklavlanarak steril edildi. İzolasyonda "Total RNA Miniprep Purification Kit (GeneMark)"inin önerdiği protokol uygulandı. İlk aşamada, hücre pelletlerinin bulunduğu 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine tüp başına 350 μL RNA "Lysis Solution" eklendikten sonra tüp karıştırıcı yardımıyla solüsyon ve pelletin karışması sağlandı. Deney grupları için ayrı hazırlanan insülin iğnesi (1 mL) yardımıyla tüp başına 10'ar kez pipetaj yaparak mekanik parçalama yapıldı. Parçalama sonrasında tüp başına 350 μL %70'lik soğuk etanol çözeltisi eklenerek tekrardan pipetajlanan ve tüp karıştırıcıda karıştırılan örnekler; "RNA Spin Column with Collection Tube" adı verilen kolonlara aktararak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Sonrasında kolonun alt kısmındaki sıvı uzaklaştırılarak tüp başına 500 μL "RNA Wash Solution I" solüsyonu eklendi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Bu aşamaya paralel olarak, ayrı bir tüpte, 3 tüp için, tüp başına 80 μL DNaz inkübasyon tamponu ve 2 μL DNaz enzimi olacak şekilde ayrı bir solüsyon hazırlandı. Santrifüj işlemi sonrasında çıkarılan kolonların altındaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra; bir önceki aşamada hazırlanan solüsyon, çok yavaş pipetaj yapılarak karıştırılmasının ardından her tüpe 82'şer μL olacak şekilde paylaştırıldı. Sonrasında ağzı kapatılan tüpler, oda sıcaklığında kapalı bir yerde 45 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüplere 500'er μL "RNA Wash Solution I" solüsyonu eklendi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası alt sıvının bulunduğu toplama tüpleri uzaklaştırıldı. RNAların bulunduğu kolonlar yeni tüplere aktarıldıktan sonra üstlerine tüp başına 600 μL "RNA Wash Solution II" solüsyonu eklenerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Sonrasında kolonun alt kısmındaki sıvı uzaklaştırıldı ve aşama iki kere tekrarlandı. Son santrifüjden sonra alt tüpteki sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar, boş olarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası alt tüpler, 1.5 mL'lik santrifüj tüpleri ile değiştirildi ve her kolona 25'er μL dietil pirokarbonat (DEPC) içeren su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk boyunca inkübe edildi ve kolonlar, inkübasyonu

takiben +4°C’de 14.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Alt tüpteki sıvıda biriken RNAlar, konsantrasyon tayini için ölçüme alındıktan sonra -80°C’de muhafaza edildi.

3.4.2. RNA’ların Konsantrasyon ve Saflık Kontrolü

Bölüm 2.3.1’de izole edilen RNAların konsantrasyonu ve saflığı, spektrofotometrik cihaz (Thermo NanoDrop, NanoDrop 2000c) ile ölçüldü. İlk aşamada; RNAların çözdürüldüğü DEPC’li sudan 1.5 µL alınarak kör (blank) ölçümü yapıldıktan sonra örnek gruplarından da 1.5 µL alınarak konsantrasyon tayini için 260 nm’deki absorbansları ölçüldü. RNAların saflığı için ise 260 ve 280 nm’de alınan absorbansların birbirine oranlanmasıyla oluşturulan A_{260}/A_{280} değeri kullanıldı (Warburg ve Christian, 1942).

3.4.3. cDNA Sentezi

Bölüm 3.3.1’de izole edilen RNAlardan cDNA sentezi için, “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)”inin önerdiği protokol uygulandı. cDNA sentezi için gereken bileşenler, 200 µL hacimli PCR tüpünde Tablo 3.6’da gösterilen şekilde hazırlandıktan sonra Tablo 3.7’de belirtilen protokol uygulandı. cDNA sentezinin ardından tüpler, -20°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.6: cDNA sentezi için hazırlanan PCR tüpü bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
RNA	Konsantrasyonu 1000 veya 500 nanogram olacak biçimde ayarlanır.
Reverse transkriptaz tamponu (10X)	2 µL
Primer (10X)	2 µL
dNTP Mix	1 µL
Enzim (Reverse transkriptaz)	1 µL
Otoklavlı (veya nükleaz-free) su	20 µL’ye tamamlanır.

Tablo 3.7: cDNA sentezi protokolü.

Sıcaklık	Zaman
25 °C	10 dk
37 °C	120 dk
85 °C	5 dk

3.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Cerulenin uygulanmış U87MG hücrelerinde *TMED4* geninin anlatım düzeyinde herhangi bir değişiklik olup olmadığını kantitatif olarak incelemek için, Bölüm 3.3.3'te elde edilen cDNA'lar, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle çoğaltıldı. PCR reaksiyonunda, Tablo 3.8'de verilen primer dizileri kullanıldı. Primerler, reaksiyon protokolüne göre belirli bir dilüsyonda hazırlandı. Örnekler ve cDNA içermeyen negatif kontrol grupları, Tablo 3.9'da açıklandığı belirtildiği miktarlarda hazırlandıktan sonra PCR cihazına (Bio-Rad, CFX96 Real Time System) yerleştirildi ve Tablo 3.10'da belirtilen protokole göre PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: RT-PCR yönteminde kullanılan primerler.

Gen Adı	Primer Dizileri
<i>TMED4</i>	Forward primer: 5' TGCATCTCGACATCCAGGTT 3' Reverse primer: 5'ACAGTCTGAGCAATGGACCA 3'
<i>ACTB</i> (β -aktin)	Forward primer: 5' CTGGAGAAGAGCTACGA 3' Reverse primer: 5'AGGTAGTTTCGTGGATG 3'

Tablo 3.9: RT-PCR yönteminde hazırlanan PCR tüpü bileşenleri.

Bileşenler	Miktar	
	Örnek	Negatif Kontrol
Nükleaz-free su	7 μ L	8 μ L
Forward primer	1 μ L	1 μ L
Reverse primer	1 μ L	1 μ L
SYBR Green	10 μ L	10 μ L
cDNA*	1 μ L	-

*:Stoktan alınıp sulandırılmış cDNA, sadece örnek gruplarına eklenir.

Tablo 3.10: RT-PCR protokolü.

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95 °C	3 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 s	40
Bağlanma	60 °C	30 s	
Uzama	72 °C	30 s	
Melting Curve	65 °C - 95 °C	5 s	1

3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi

RNA izolasyonu, cDNA dönüşümü ve RT-PCR işleminin sonrasında oluşan ürünleri incelemek için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. İlk olarak %1 (w/v) lik agaroz jel için 0.4 g agaroz (HiMedia MB002) tartıldı ve agaroz, 40 mL 1X tris-asetat-EDTA (TAE) tamponunda kısa süre kaynatılarak çözdürüldü. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra jel sıcaklığı orta dereceye geldiğinde 10 mg/mL etidyum bromür (EtBr) stoğundan 3.5 µL alınarak jele eklendi ve jel, polimerizasyon için sisteme yavaşça döküldü. Polimerizasyon sonrasında jel sistemindeki tarak tek hamlede dikkatli bir biçimde çekildi ve jel, 1X TAE tamponu içeren elektroferez tankına (Atto) yerleştirildi. Elektroferez sisteminin hazırlanmasının ardından ilk kuyuya 3 µL DNA marker (Biomatik M7123-100) yüklendi. Her protokol sonrasında, elde edilen örneklerden 5'er µL alındı ve her bir örnek 1'er µL 6X yükleme boyası (Thermo Scientific R0611) ile karıştırıldıktan sonra kuyulara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jel, 90 voltta 45 dk boyunca yürütüldü. Elektroferez sonrası jeldeki bantlar, translüminatör ile incelendi. Elektroferez sürecinde kullanılan solüsyonların içerikleri Tablo 3.11'de açıklandı.

Tablo 3.11: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar.

Solüsyonlar	Bileşenler
50X TAE Tamponu	Trizma baz (Sigma-Aldrich T1503) 242 g
	Glasiyel asetik asit (Merck 1000562500) 57.1 mL
	EDTA (AppliChem A5097,0500) 14.61 g
	Solüsyon, dH ₂ O ile 1L'ye tamamlanır ve 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edilir.
1X TAE Tamponu	50X TAE Tamponu 20 mL
	Solüsyon, 1L'ye dH ₂ O ile tamamlanır.

3.5. HÜCRESEL ÖLÜM MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ

3.5.1. Western Blot Analizleri

Cerulenin uygulanan hücrelerde apoptotik yolakla ilgili birtakım proteinlerin düzeylerindeki değişimi saptamak için Bölüm 3.2.2.5'te açıklanan prosedür uygulandı. Prosedürde uygulanandan farklı olarak bu aşamada Bax proteinine özgü antikor kullanılarak hücrede ilgili proteinin ekspresyonel değişimi incelendi.

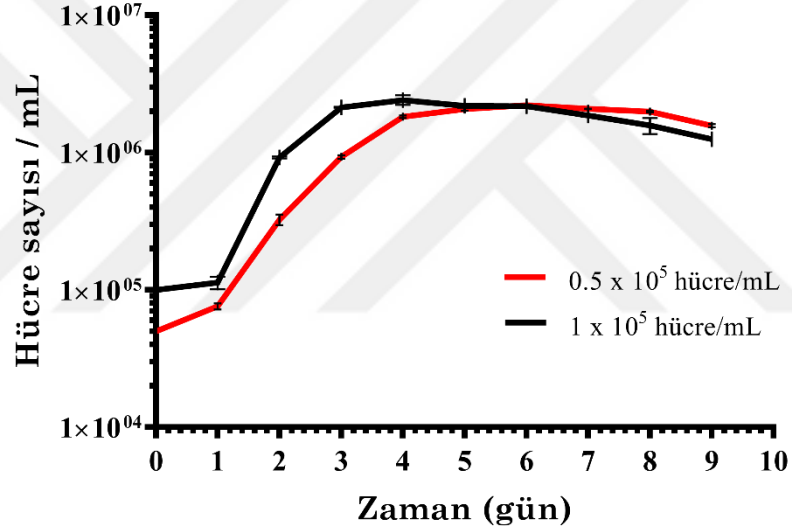
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez çalışması kapsamında yapılan ve en az 3 tekrardan oluşan deney setlerinden elde edilen veriler, verilerin aritmetik ortalama ve standart sapmaları, GraphPad Prism 7.0 programında tek yönlü (one-way) ANOVA testi ile analiz edildi. Analiz sonrası elde edilen sonuçların anlamlılık düzeyi, $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE ÇOĞALMA EĞRİSİ ANALİZİ

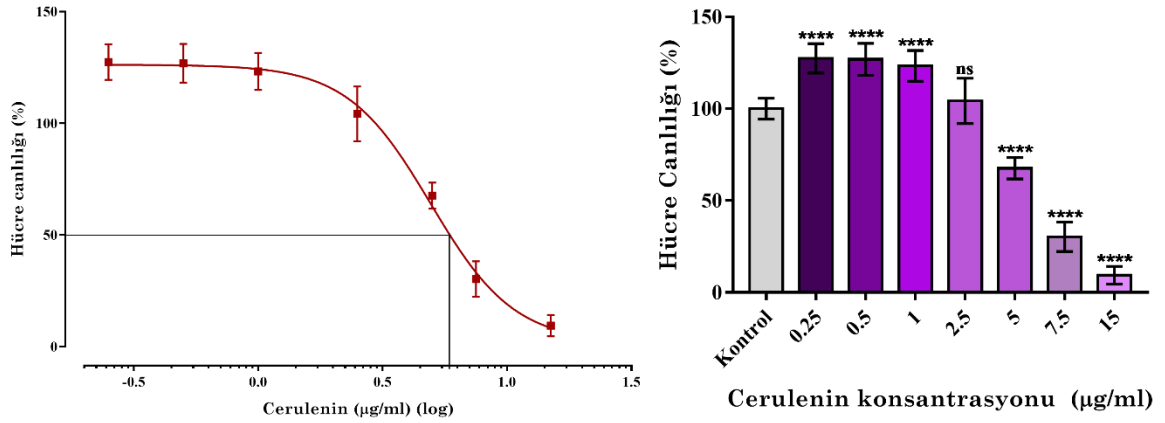
U87MG hücre hattının çoğalma süresini tespit edebilmek için yapılan hücre çoğalma eğrisi deneyi (Bölüm 3.1.2) sonucunda, U87MG hücrelerinin 9 gün boyunca yaşadığı ve 2. günün sonunda logaritmik faza geçtiği görülmüştür. Deney sonucunda elde edilen veriler ile doğrusal olmayan (nonlinear) regresyon grafiği çizilen U87MG hattında, jenerasyon süresi 24 saat olarak saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: U87MG hücre hattının çoğalma eğrisi grafiği.

4.2. SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ

Cerulenin'in U87MG hücre hattındaki sitotoksik etkisini incelemek için yapılan ve Bölüm 3.1.3'te açıklanan MTT testi sonucu; doza bağımlı inhibisyon modeli, Cerulenin uygulamasından 48 saat sonra görülmesi nedeniyle ileriki çalışmalarda kullanılacak deney grupları, 48 saatte alınan sonuçlara göre üç grup olarak belirlendi. Cerulenin uygulanmamış kontrol grubuna ek olarak iki farklı Cerulenin konsantrasyonu grubu seçildi. İkinci grup, %20 öldürücülüğe karşılık gelen (IC₂₀) 3.6 µg/mL konsantrasyonu olurken üçüncü ve son grup ise hücrelerin %50'sini inhibe eden (IC₅₀) 5.55 µg/mL olarak belirlendi (Şekil 4.2).

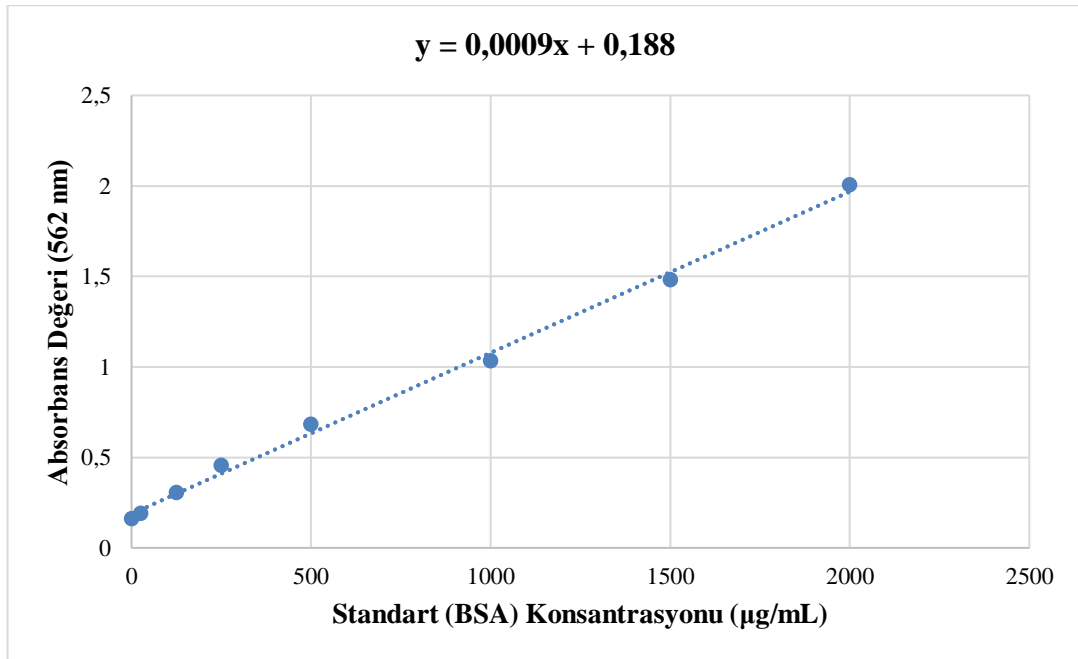


Şekil 4.2: Cerulenin'in U87MG hücreleri üzerindeki 48 saatlik etkisi (ns: Anlamlı değil (Not significant), $R^2=0.097$; **** $p<0.0001$).

4.3. PROTEİN ANALİZLERİ

4.3.1. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

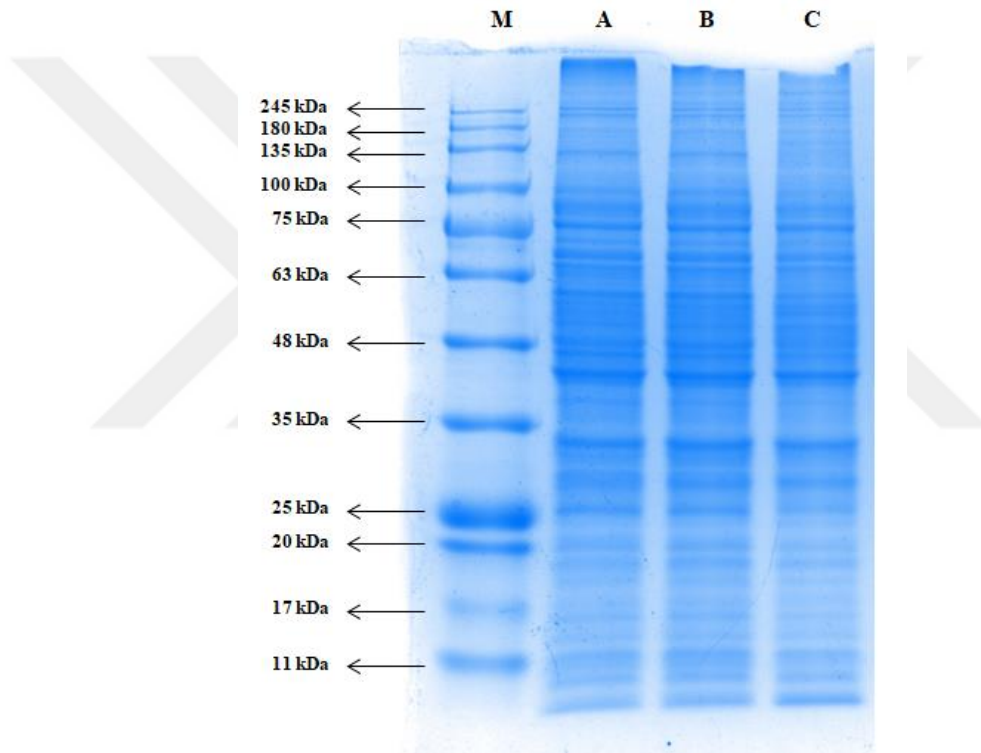
BCA yöntemi, Bölüm 3.2.2.3'te anlatılan süreçlere uygun olarak gerçekleştirildi. Protokolün uygulanmasının ardından, deney gruplarına ait proteinlerin konsantrasyonlarının hesaplamasında, Şekil 4.3'te verilen standart grafik kullanıldı.



Şekil 4.3: BCA yöntemi ile oluşturulan standart grafik ($R^2=0.9966$).

4.3.2. Protein Elektroforezi

BCA yöntemi ile protein konstrasyonu tayini sonrasında, her bir deney grubunda (Kontrol, IC₂₀ ve IC₅₀) 40 µg proteine karşılık gelen miktarlar belirlenerek, protein markeri ile birlikte poliakrilamid jele yüklendi ve proteinlerin elektroforetik ortamda ayrıştırılması sağlandı. Elektroferez sonrası Coomassie boyama yöntemiyle boyanan jelin görüntüsü alındı (Şekil 4.4).

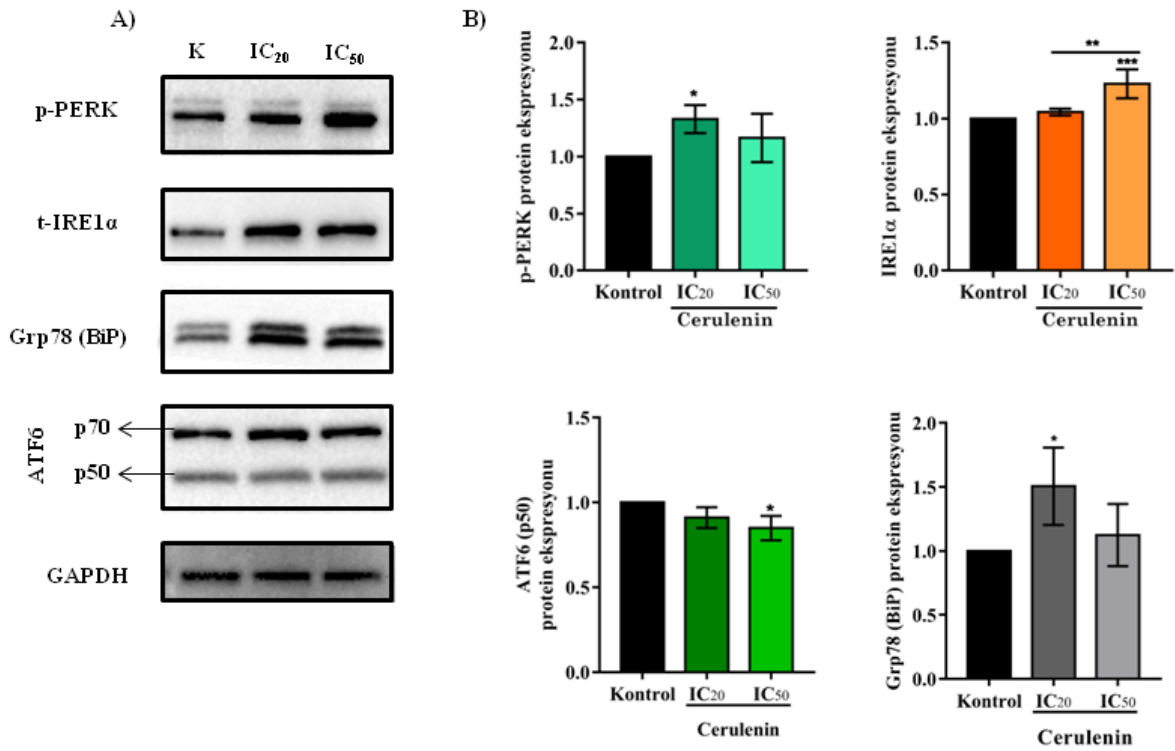


Şekil 4.4: SDS-PAGE yöntemi kullanılarak ayrıştırılan proteinlerin Coomassie mavisi ile boyama sonrası jeldeki görünümü. (M: Marker, A: Kontrol grubu, B: IC₂₀ grubu, C: IC₅₀ grubu).

4.3.3. Western Blot Analizleri

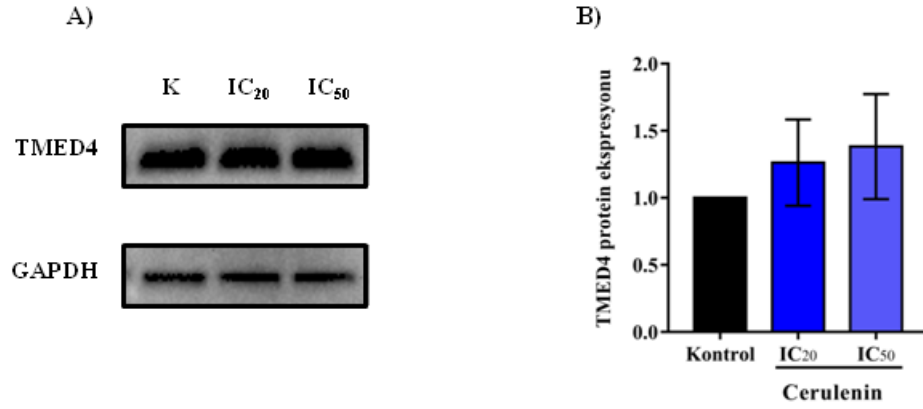
Cerulenin'in U87MG hücrelerinde oluşturduğu etkinin protein anlatımları düzeyinde karşılığını incelemek için, Bölüm 3.2.2.5'te açıklanan Western blot yöntemi uygulandı. Ekspresyonel değişimlerinin hesaplanmasında ise normalizasyon için GAPDH proteini, tekrarlar arasındaki tutarlılığı belirlemek için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Western blot

analizi sonucu elde edilen verilerin analizinden hareketle; Endoplazmik retikulum proteinlerinde madde uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla total IRE1 α (t-IRE1 α)nın IC₂₀ grubunda 1.04 kat; IC₅₀ grubunda ise 1.22 kat artmıştır. Fosforile PERK (p-PERK) proteininde ise IC₂₀ grubunda 1.32 kat; IC₅₀ grubunda ise 1.16 kat artış saptandı. Kırpılmış ATF6'nın (p50) anlatımı IC₂₀ grubunda 0.91 kat; IC₅₀ grubunda ise 0.84 kat değişim gözlemlendi. ER şaperonu olarak bilinen Grp78 (BiP) ise kontrole kıyasla IC₂₀ grubunda 1.5 kat değişirken bu oran IC₅₀ grubunda 1.12 kat olarak hesaplandı.(Şekil 4.5).



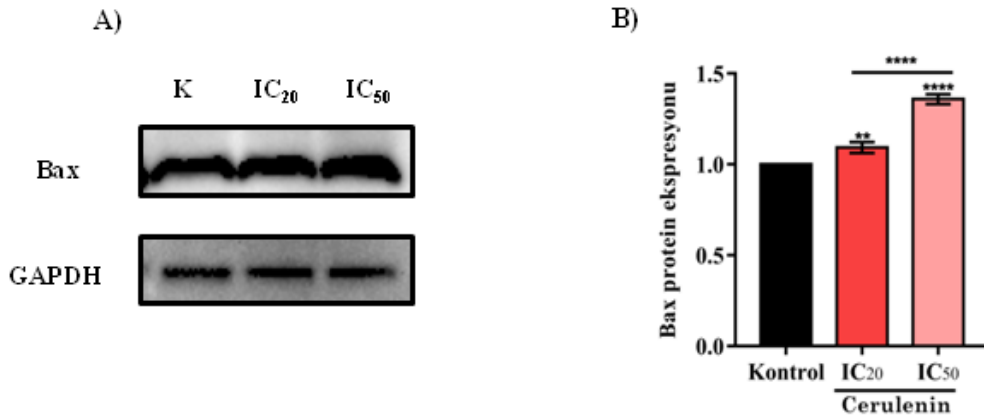
Şekil 4.5: ER proteinlerinin Western blotlama sonuçları. **A)** Western sonrası elde edilen protein bantları. **B)** Elde edilen sonuçların istatistiksel analiz sonrası oluşturulan grafikleri (**K:** Kontrol grubu; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Endoplazmik retikulum ve Golgi arasında bulunan TMED4 proteininde, Cerulenin uygulaması sonrası kontrol grubuna kıyasla IC₂₀ grubunda 1.26; IC₅₀ grubunda ise 1.38 kat değişim gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: TMED4 proteininin Western blotlama sonucu. **A)** Blotlama sonrası saptanan protein bantları. **B)** İstatistiksel analizle oluşturulan grafik.

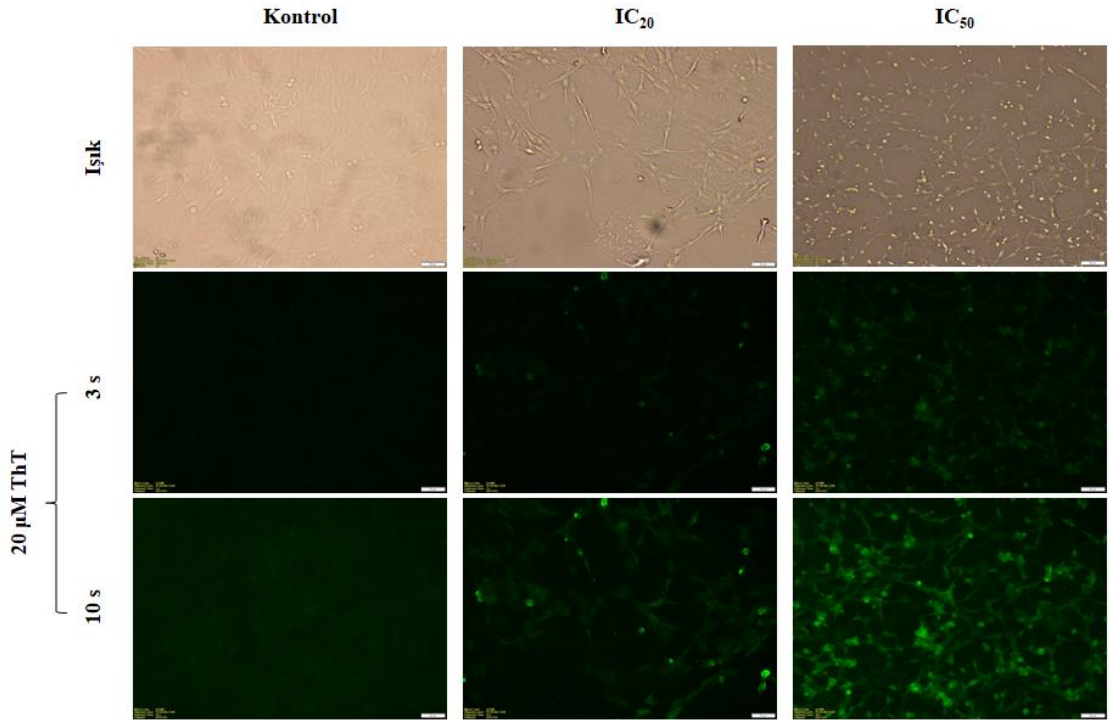
U87MG hücrelerinde, Cerulenin ve ER stresinin indüklediği ölüm yollarını incelemek için yapılan Western blotlama sonucunda; pro-apoptotik özellikli olduğu bilinen Bax proteininde, kontrol grubuna kıyasla IC₂₀ grubunda 1.09 kat ve IC₅₀ grubunda 1.35 kat artış elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Bax proteininin Western blotlama sonucu. **A)** Blotlama sonrası saptanan protein bantları. **B)** İstatistiksel analizle oluşturulan grafik (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

4.4. FLORESAN MİKROSKOPİ ANALİZİ

U87MG hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini görsel olarak incelemek için, Bölüm 3.2.1’de açıklanan ThT boyası ile boyama yapıldı. Boyanın verdiği ışımaya, floresan mikroskopla 3 saniye ve 10 saniye boyunca gözlemlenerek kayıt altına alındı. Kontrol ve doz grupları arasında ışımaya farkının, uygulanan Cerulenin dozu ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı (Şekil 4.8).

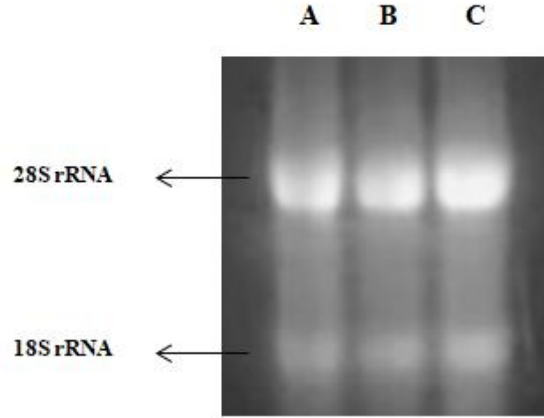


Şekil 4.8: Tiyo flavin T ile boyanan U87MG hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri. Hücreler, 20x büyütme oranında GFP-FITC filtresi kullanılarak fotoğraflandı.

4.5. *TMED4* GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

4.5.1. RNA İzolasyonu

U87MG hücrelerinden izole edilen RNA molekülleri, Bölüm 3.3.5’te anlatılan protokole uygun olarak agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Total RNAların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü (A: Kontrol grubu, B: IC₂₀ grubu, C: IC₅₀ grubu).

4.5.2. cDNA Sentezi

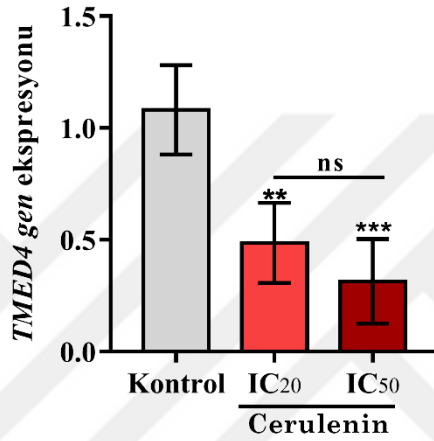
RNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi sonuçlarının ardından total RNA molekülleri, Bölüm 3.3.3'te anlatılan protokolle cDNA sentezi için kullanıldı. Reaksiyon sonrası oluşan cDNA molekülleri, agaroz jel elektroforezi ile elektroforetik alanda yürütüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: cDNaLarın %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü (A: Kontrol grubu, B: IC₂₀ grubu, C: IC₅₀ grubu).

4.5.3. RT-PCR ile *TMED4* Gen Anlatım Düzeyinin İncelenmesi

Cerulenin'in, *TMED4* genine olan etkisini incelemek için Bölüm 3.3.4.2'de anlatılan qPCR yöntemi uygulandı. Sonuçların hesaplamasında normalizasyon için β -aktin dizisi ve delta-delta C_t (Livak ve Schmittgen, 2001) yöntemi kullanıldı. RT-PCR sonrası yapılan hesaplamaların ışığında, *TMED4* ekspresyonunun, IC₂₀ grubunda kontrole göre 0.48 kat; IC₅₀ grubunda ise kontrole kıyasla 0.31 kat azalış görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: *TMED4* geninin, RT-PCR yöntemiyle saptanan ekspresyon değişimleri (ns= Anlamli değil "Not significant", ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser hücrelerinde farklı metabolik yolları veya hücre kompartımanlarını hedefleyerek tanı ve tedaviye yönelik çözümler üretmek, kansere karşı daha etkin sonuçlar alınmasını sağlayabilir. Bu tez çalışması kapsamında, lipit metabolizmasını inhibe ederek hücre ölümünü tetiklediği bilinen Cerulenin adlı antifungal ajanın U87MG insan glioblastoma multiforme hücrelerindeki etkisi çeşitli yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

İlk aşamada, U87MG'nin davranışını daha net anlayabilmek adına hücre çoğalma eğrisi oluşturuldu ve jenerasyon süresi 24 saat olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Ulaşılan sonuç, literatür bilgisi ile uyum sağlamaktadır (Kato ve diğ., 2011).

Cerulenin'in U87MG hücrelerinde sitotoksositeye neden olup olmadığını gözlemlemek için MTT testi uygulanmıştır. MTT testi sonucunda, 48 saatlik inkübasyon sonrası madde uygulanmamış kontrol dozuna ek olarak %20 ve %50 öldürücülüğe sahip dozlar, üçlü deney grubu olarak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenmiştir (Bölüm 4.2). Cerulenin'in doza bağımlı inhibisyonu, U87 dahil olmak üzere U251, SNB-19, U118 insan ve C6 sıçan glioma hücrelerinde de zamana bağlı olarak benzer etkiyi göstermiştir (Zhao ve diğ., 2006).

Cerulenin'in lipit sentezini inhibe etmesi sonucu ortaya çıkan hücresel stresten etkilenen endoplazmik retikulumda bulunan proteinlerin anlatımı, Cerulenin'in etkisine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin; ER stresine verilen yanıttan sorumlu üç protein olan IRE1 α , PERK ve ATF6, stres koşulları altında aktifleşip ekspresyon düzeylerinin artması ile protein katlanmasını normale çevirmeye ve bu sayede stres nedeniyle oluşan protein agregatlarını düzeltmeye çalışırlar (Le Reste ve diğ., 2016). Ancak stresin, hücrenin düzeltemeyeceği kadar yüksek olduğu durumlarda ise çeşitli sinyal yollarını tetikleyerek hücrenin ölüm mekanizmalarını aktifleştirirler (Kara ve Öztaş, 2019; Jin ve diğ., 2017).

Lipit biyosentezi inhibisyonunun endoplazmik retikulumdaki (ER) transmembran proteinlere etkisi Western blot yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmaların ışığında; ER proteinlerinden IRE1 α 'da doza bağımlı ekspresyon artışı, ATF6'nın p50 proteininde (aktif formu) doza bağımlı kısmi azalma ve fosforile PERK proteininde ise IC₂₀ grubunda artış gözlemlenirken IC₅₀ grubunda ekspresyonun azaldığı görülmüştür.

IRE1 α ve PERK'in ekspresyonlarındaki değişim literatürdeki benzer bulgularla örtüşmektedir. Bununla birlikte, hücre ölümünün IRE1 α 'nın aktive ettiği Xbp-1 proteini ve Xbp-1'in, kaspaz-2'yi aktiveleştirerek hücreyi apoptoza yönlendirme potansiyeline dair çalışmalar da bulunmaktadır (Chen ve Brandizzi, 2013).

ATF6; ER stresi sinyalini aldıktan sonra Golgi'ye giderek orada ikinci bir kırılma geçirir ve aktif formunu alır. Aktif ATF6, nükleusa giderek ER homeostazının geri kazanılmasını sağlamasında görev alan Grp78 gibi proteinlerin transkripsiyonunu indükler (Jin ve diğ., 2017). Ancak tez çalışmasında elde edilen sonuca göre; Cerulenin dozu arttıkça aktif ATF6'nın ekspresyonu azalmıştır, Grp78 ekspresyonu ise IC₂₀ grubunda artarken IC₅₀ grubunda azalmıştır. Aktif ATF6'nın ekspresyonundaki azalma -hatta ATF6 anlatımının baskılanması- nedeniyle ER homeostazı ile ilişkili proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşmeyen (Yamamoto ve diğ., 2007) ya da translasyonu azalan hücrede homeostaz sağlanamayarak hücre ölümü gerçekleşmiştir. D54 insan glioblastoma hücre hattında ATF6'nın siRNA aracılığı ile baskılandığı durumda, Grp78 protein ekspresyonu uygulanan doza bağlı olarak 0.79 ve 1.79 kat azalmıştır (Dadey ve diğ., 2016). Grp78'in IC₅₀ grubunda azalmasının nedeni, ATF6'nın azalması ile ilişkilendirilebilir.

Cerulenin'in ER stresini tetiklemesi sonucu hücrede tetiklenen ölüm mekanizmalarını incelemek amacıyla Western blotlama yöntemi kullanılmıştır. Blotlama sonuçlarına göre; programlı hücre ölümü olan apoptozu teşvik edici özelliğe sahip proteinlerden biri olan Bax'ın anlatımı, uygulanan Cerulenin dozu ile pozitif korelasyon gösterecek şekilde artmıştır. Bax anlatımında oluşan değişim, literatürle uyum göstermektedir (Liu ve diğ., 2006). Bax'taki artış, U87MG hücrelerinde Cerulenin tarafından indüklenen bir apoptotik sürece doğru gidildiğine dair bir ipucu olarak değerlendirilebilir. Apoptoz sürecinde, Cerulenin uygulamasına bağlı olarak Bax haricinde kaspaz-3, kaspaz-9, PARP gibi proteinlerin anlatım düzeylerinde artış gözlemlenebilir (Heiligtag ve diğ., 2002).

ER ile Golgi arasında proteinlerin veziküler transportunda ve salgı yolağında görev aldığı bilinen TMED/p24 ailesinin farklı organizmalarda çeşitli etkilere sahip olduğu bazı çalışmalarda gözlemlenmiştir. Örneğin; mayalarda delesyon sonucu hücrede anlatımının durması sonucu oluşan hasarı ve ER stresini hafifletmek için UPR'yi tetiklediği gözlemlenmiştir (Belden ve Barlowe, 2001; Pastor-Cantizano ve diğ., 2016). TMED ailesinin,

Drosophila melanogaster'de delesyon sonucu anlatım yapmadığı durumlarda ise dişilerde infertiliteye neden olmaktadır (Carney ve Taylor, 2003).

TMED4'ün gen anlatımındaki değişim RT-PCR ile incelenirken protein düzeyindeki ekspresyonel değişimi saptamak için Western blotlama yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, Cerulenin uygulaması sonucu TMED4 proteini artarken *TMED4* geninin anlatımı azalmıştır. Bu durumun nedeni, hücrede stres yanıtı oluştuğunda ihtiyaç duyulan protein miktarının ve buna paralel olarak gen anlatımının da artmıştır. Ancak ihtiyaç duyulan protein miktarına ulaşıldığında, TMED4'ün translasyonunu durdurabilmek amacıyla translasyona girmeyen mRNA'ları degrade ettiği düşünülebilir.

ER stresinin tespiti için moleküler tekniklere destek olarak görsel sonuç sağlayan boyama teknikleri de kullanılabilir. Floresan boyama, ER'de oluşan değişimlerin tespitinde görsel olarak iyi bir perspektif sağlamakla beraber kullanılan boya da sürecin verimini önemli oranda etkiler. Bu boyalardan biri, Tiyoflavin T (ThT) olup hücresel stres sürecinde oluşumu artan protein agregatlarının (amiloid fibrillere) β -tabaka yönünden zengin bölümlerine bağlanarak yeşil floresan ışımaya verir. Bu özelliği nedeniyle Alzheimer, Huntington gibi hastalıklar ile ilgili çalışmalarda görüntüleme amacıyla kullanılmaktadır (Caron ve diğ., 2014; Naiki ve diğ., 1989; Sundaram ve diğ., 2018). Fibril oluşumu ve protein agregatlarının artışı, ER stresinde de görüldüğü için ThT, stresin ER'deki etkisini gözlemlemek için hücre kültürü sistemlerinde kullanılabilir. Örnek olarak, OVCAR3 ve SKOV3 insan over kanser hücre hatlarında bir inhibitör ajanın çeşitli dozlarda uygulanması ve 18 saatlik inkübasyon sonucu tetiklenen ER stresi, ThT boyaması ile gözlenmek istenmiştir. OVCAR3 hücre hattında 1.71 kat ve SKOV3 1.65 katlık floresan ışımaya artışı, uygulanan ajanın dozundaki artışına bağlı olarak artan protein agregasyonu, ER stresi ve stres artışı ile doğru orantılı ThT ışımaya saptanmıştır (Barez ve diğ., 2020).

Anlatılan bilgilerin ışığında, tez çalışmaları kapsamında Tiyoflavin T boyasının Cerulenin uygulanmış U87MG hücrelerindeki etkisi, floresan mikroskop ile analiz edilmiştir (Bölüm 3.3.1). Elde edilen sonuçlara göre; ThT ışımaya, Cerulenin dozuna ve hücrelerin boyaya maruz kalma süresine bağlı olarak artış göstermektedir (Şekil 4.8). Cerulenin uygulanmamış kontrol grubunda çok soluk bir ışımaya görülürken, doz gruplarında saptanan ışımaya artmış olup hücrede ER stresinin görsel olarak saptanması sağlanmıştır. Bu sayede elde edilen sonuçların literatür bilgisi ile örtüştüğü tespit edilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen veriler, U87MG hücresinde oluşan strese hangi proteinlerin Cerulenin etkisi ile ne tür yanıt verdiğini ortaya koymuştur. Ancak inkübasyon süresinin tek saat diliminde (48 saat) olması, kontrol olarak sağlıklı beyin (astrozit) hücrelerinin ve incelenen yolakta (ER stresi) direkt etkisi olduğu bilinen pozitif kontrol ajanının eksikliği, *TMED4*'ün transkript ve protein düzeyindeki ekspresyonel farkların daha net olarak saptanması için hem sağlıklı hem de kanserli hücre hattında fizyolojik koşullarda ne düzeyde anlatım yaptığı, *TMED4* gen anlatımının susturulduğu ve/veya overeksprese edildiği durumların incelenmesi, *TMED4* proteininin hücresel işleyişte nasıl rol aldığına aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır. Ayrıca, bahsedilen koşulların farklı kanser türlerine ait hücrelerde denenmesi de *TMED4*'ün diğer kanser tiplerinde nasıl bir işlevi olduğuna dair bilginin artmasını sağlayabilir.

Yapılan tez çalışmasından alınan sonuçlar; glioblastoma multiforme tedavisi için ER ile ilişkili transmembran proteinlerin hedeflenebilmesine dair bir olasılık sunmuştur. Lipit veya başka bir metabolizmanın inhibe edildiği durumlarda farklı inkübasyon sürelerinde ilgili proteinlerin/genlerin ekspresyonlarındaki değişimlerinin incelenmesi, yapılan çalışmanın; hayvan deneyleri, aynı veya farklı yollarda etki gösteren çeşitli bileşenler ile kombine terapi, nanopartiküller ile ajan iletimi, genetik mühendisliği vb. yöntemler kullanılarak desteklenmesi durumunda GBM'nin tanısında ve/veya tedavisinde ileriye dönük başarı sağlanmasına olanak sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Aber, R., Chan, W., Mugisha, S., & Jerome-Majewska, L., 2019, Transmembrane emp24 domain proteins in development and disease, *Genetics Research*, 101, E14, doi:10.1017/S0016672319000090.
- Aldape, K., Brindle, K. M., Chesler, L., Chopra, R., Gajjar, A., Gilbert, M. R., Gottardo, N., Gutmann, D. H., Hargrave, D., Holland, E. C., Jones, D., Joyce, J. A., Kearns, P., Kieran, M. W., Mellinghoff, I. K., Merchant, M., Pfister, S. M., Pollard, S. M., Ramaswamy, V., Rich, J. N., ... Gilbertson, R. J., 2019, Challenges to curing primary brain tumours, *Nature reviews, Clinical oncology*, 16(8), 509–520, https://doi.org/10.1038/s41571-019-0177-5.
- Angeles, T. S., & Hudkins, R. L., 2016, Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors, *Expert opinion on drug discovery*, 11(12), 1187–1199, https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1245286.
- Barez, S. R., Atar, A. M., & Aghaei, M., 2020, Mechanism of inositol-requiring enzyme 1-alpha inhibition in endoplasmic reticulum stress and apoptosis in ovarian cancer cells, *Journal of cell communication and signaling*, 14(4), 403–415, https://doi.org/10.1007/s12079-020-00562-7.
- Belden, W. J., & Barlowe, C., 2001, Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response, *Molecular biology of the cell*, 12(4), 957–969, https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.957.
- Biancardi, A., Biver, T., Burgalassi, A., Mattonai, M., Secco, F., & Venturini, M., 2014, Mechanistic aspects of thioflavin-T self-aggregation and DNA binding: evidence for dimer attack on DNA grooves, *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 16(37), 20061–20072, https://doi.org/10.1039/c4cp02838d.7.
- Carney, G. E., & Bowen, N. J., 2004, p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities, *Biology of the cell*, 96(4), 271–278, https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.01.004.
- Carney, G. E., & Taylor, B. J., 2003, Logjam encodes a predicted EMP24/GP25 protein that is required for *Drosophila* oviposition behavior, *Genetics*, 164(1), 173–186, https://doi.org/10.1093/genetics/164.1.173.
- Caron, N. S., Hung, C. L., Atwal, R. S., & Truant, R., 2014, Live cell imaging and biophotonic methods reveal two types of mutant huntingtin inclusions, *Human molecular genetics*, 23(9), 2324–2338, https://doi.org/10.1093/hmg/ddt625.
- Chen, Y., & Brandizzi, F., 2013, IRE1: ER stress sensor and cell fate executor, *Trends in cell biology*, 23(11), 547–555, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.005.

- Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M., & Piacentini, M., 2017, Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate, *Frontiers in oncology*, 7, 78, <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00078>.
- Dadey, D. Y., Kapoor, V., Khudanyan, A., Urano, F., Kim, A. H., Thotala, D., & Hallahan, D. E., 2016, The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma, *Oncotarget*, 7(2), 2080–2092, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6712>.
- da Silva, D. C., Valentão, P., Andrade, P. B., & Pereira, D. M., 2020, Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer and neurodegenerative disorders: Tools and strategies to understand its complexity, *Pharmacological research*, 155, 104702, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104702>.
- Deepa, P. R., Vandhana, S., Muthukumaran, S., Umashankar, V., Jayanthi, U., & Krishnakumar, S., 2010, Chemical inhibition of fatty acid synthase: molecular docking analysis and biochemical validation in ocular cancer cells, *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*, 3(4), 117–128, <https://doi.org/10.1007/s12177-011-9065-7>.
- Dufey, E., Urra, H., & Hetz, C., 2015, ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts, *Seminars in cancer biology*, 33, 40–47, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.04.003>.
- Funabashi, H., Kawaguchi, A., Tomoda, H., Omura, S., Okuda, S., & Iwasaki, S., 1989, Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase, *Journal of biochemistry*, 105(5), 751–755, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122739>.
- Gade Malmos, K., Blancas-Mejia, L. M., Weber, B., Buchner, J., Ramirez-Alvarado, M., Naiki, H., Otzen, D., 2017, ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation, *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 24(1), 1–16, <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1304905>.
- Gaudet, P., Livstone, M. S., Lewis, S. E., & Thomas, P. D., 2011, Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium, *Briefings in bioinformatics*, 12(5), 449–462, <https://doi.org/10.1093/bib/bbr042>.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144(5), 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Heiligtag, S. J., Bredehorst, R., & David, K. A., 2002, Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis, *Cell death and differentiation*, 9(9), 1017–1025, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401055>.
- Hotamisligil G. S., 2010, Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease, *Cell*, 140(6), 900–917, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.034>.

- GeneCards, 2021a, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATF6&keywords=atf6>, [Ziyaret Tarihi: 12 Ekim 2021].
- GeneCards, 2021b, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EIF2AK3&keywords=eif2ak3>, [Ziyaret Tarihi: 12 Ekim 2021].
- GeneCards, 2021c, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FASN&keywords=fasn>, [Ziyaret Tarihi: 25 Mayıs 2021].
- GeneCards, 2021d, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMED4>, [Ziyaret tarihi: 17 Mayıs 2021].
- GeneCards, 2021e <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERN1>, [Ziyaret tarihi: 17 Mayıs 2021].
- Sigma-Aldrich, 2021, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3516?lang=en®ion=TR>, [Ziyaret Tarihi: 10 Ekim 2021].
- UniProt, 2021, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z7H5>, [Ziyaret tarihi: 17 Mayıs 2021].
- Hwang, S. O., Boswell, S. A., Seo, J.-S., & Lee, S. W., 2008, Novel Oxidative Stress-responsive Gene ERS25 Functions as a Regulator of the Heat-shock and Cell Death Response, *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13063–13069, <https://doi.org/10.1074/jbc.m709656200>.
- Jäger, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J. R., McGovern, K. E., Clarke, S. C., Shales, M., Mercenne, G., Pache, L., Li, K., Hernandez, H., Jang, G. M., Roth, S. L., Akiva, E., Marlett, J., Stephens, M., D'Orso, I., Fernandes, J., Fahey, M., Mahon, C., ... Krogan, N. J., 2011, Global landscape of HIV-human protein complexes, *Nature*, 481(7381), 365–370, <https://doi.org/10.1038/nature10719>.
- Jin, J. K., Blackwood, E. A., Azizi, K., Thuerauf, D. J., Fahem, A. G., Hofmann, C., Kaufman, R. J., Doroudgar, S., & Glembotski, C. C., 2017, ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart, *Circulation research*, 120(5), 862–875, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310266>.
- Kaneko, M., Imaizumi, K., Saito, A., Kanemoto, S., Asada, R., Matsuhisa, K., & Ohtake, Y., 2017, ER Stress and Disease: Toward Prevention and Treatment, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 40(9), 1337–1343, <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00342>.
- Kara, M., Öztaş, E., 2019, *Endoplasmic reticulum stres-mediated cell death*, Programmed Cell Death, In: Gali-Muhtasib, H., Rahal, O. N. (ed), Chapter 3, IntechOpen, A division of INTECHOPEN LIMITED, London, United Kingdom, ISBN: 978-1-78984-749-9, 51-64.
- Kato, T. A., Tsuda, A., Uesaka, M., Fujimori, A., Kamada, T., Tsujii, H., & Okayasu, R., 2011, In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs, *Radiation oncology (London, England)*, 6, 116, <https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-116>.

- Kridel, S. J., Lowther, W. T., & Pemble, C. W., 4th, 2007, Fatty acid synthase inhibitors: new directions for oncology, *Expert opinion on investigational drugs*, 16(11), 1817–1829, <https://doi.org/10.1517/13543784.16.11.1817>.
- Lapointe, S., Perry, A., & Butowski, N. A., 2018, Primary brain tumours in adults, *Lancet (London, England)*, 392(10145), 432–446, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5).
- Lassman, A. B., & DeAngelis, L. M., 2003, Brain metastases, *Neurologic clinics*, 21(1), 1–vii, [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(02\)00035-x](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(02)00035-x).
- LeVine H., III, 1993, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein science: a publication of the Protein Society*, 2(3), 404–410, <https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>.
- LeVine, H., III, 1999, Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T, *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*, 274–284, doi:10.1016/s0076-6879(99)09020-5.
- Little, J. L., Wheeler, F. B., Fels, D. R., Koumenis, C., & Kridel, S. J., 2007, Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells, *Cancer research*, 67(3), 1262–1269, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1794>.
- Liu, X., Shi, Y., Giranda, V. L., & Luo, Y., 2006, Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis, *Molecular cancer therapeutics*, 5(3), 494–501, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0049>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method, *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., & Kleihues, P., 2007, The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta neuropathologica*, 114(2), 97–109, <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W., 2021, The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Neuro-oncology*, noab106, Advance online publication, <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
- Markouli, M., Strepkos, D., Papavassiliou, A. G., & Piperi, C., 2020, Targeting of endoplasmic reticulum (ER) stress in gliomas, *Pharmacological research*, 157, 104823, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104823>.

- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G. *et al.*, 2003, Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways, *Oncogene* 22, 3307–3318 <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206406>.
- Menendez, J. A., & Lupu, R., 2007, Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis, *Nature reviews. Cancer*, 7(10), 763–777, <https://doi.org/10.1038/nrc2222>.
- Menendez, J. A., Mehmi, I., Atlas, E., Colomer, R., & Lupu, R., 2004, Novel signaling molecules implicated in tumor-associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: Role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-kappaB, *International journal of oncology*, 24(3), 591–608.
- Mosmann T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Murata, S., Yanagisawa, K., Fukunaga, K., Oda, T., Kobayashi, A., Sasaki, R., & Ohkohchi, N., 2010, Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice, *Cancer Science*, 101(8), 1861–1865, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01596.x>.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda, T., 1989, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Analytical biochemistry*, 177(2), 244–249, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8).
- Oborocanu, D., Wang, L., Kroes-Nijboer, A., Brodkorb, A., Venema, P., Magner, E., & Auty, M. A. E., 2011, The effect of high pressure microfluidization on the structure and length distribution of whey protein fibrils, *International Dairy Journal*, 21(10), 823–830, doi:10.1016/j.idairyj.2011.03.015.
- Olson, B. J. S. C., & Markwell, J., 2007, Assays for Determination of Protein Concentration, *Current Protocols in Protein Science*, 3.4.1–3.4.29, doi:10.1002/0471140864.ps0304s48.
- Omura S., 1976, The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis, *Bacteriological reviews*, 40(3), 681–697.
- Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S., 2019, CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016, *Neuro-oncology*, 21(Suppl 5), v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>.
- Parrish, N. M., Kuhajda, F. P., Heine, H. S., Bishai, W. R., & Dick, J. D., 1999, Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 43(2), 219–226, <https://doi.org/10.1093/jac/43.2.219>.

- Pastor-Cantizano, N., Montesinos, J. C., Bernat-Silvestre, C., Marcote, M. J., & Aniento, F., 2016, p24 family proteins: key players in the regulation of trafficking along the secretory pathway, *Protoplasma*, 253(4), 967–985. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0858-6>.
- Schleicher, S. M., Moretti, L., Varki, V., & Lu, B., 2010, Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: implications for future therapeutic approaches, *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 13(3), 79–86, <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.04.002>.
- Schuiki, I., & Volchuk, A., 2012, Diverse roles for the p24 family of proteins in eukaryotic cells, *Biomolecular concepts*, 3(6), 561–570, <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0028>.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R., 2002, ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals, *Developmental cell*, 3(1), 99–111, [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00203-4).
- Smith, M., & Wilkinson, S., 2017, ER homeostasis and autophagy, *Essays in biochemistry*, 61(6), 625–635, <https://doi.org/10.1042/EBC20170092>.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85, doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Strating, J. R. P. M., van Bakel, N. H. M., Leunissen, J. A. M., & Martens, G. J. M., 2009, A Comprehensive Overview of the Vertebrate p24 Family: Identification of a Novel Tissue-Specifically Expressed Member. *Molecular Biology and Evolution*, 26(8), 1707–1714, <https://doi:10.1093/molbev/msp099>.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *The New England journal of medicine*, 352(10), 987–996, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- Sundaram, G., Binz, K., Sharma, V., Yeung, M., & Sharma, V., 2018, Live-cell fluorescence imaging: assessment of thioflavin T uptake in human epidermal carcinoma cells, *MedChemComm*, 9(6), 946–950, <https://doi.org/10.1039/c8md00101d>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., & Kaufman, R. J., 1998, A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells, *Genes & development*, 12(12), 1812–1824, <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1812>.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., & Sawa, A., 2011, The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments, *Cellular Signalling*, 23(2), 317–323, doi:10.1016/j.cellsig.2010.08.003.
- Vassar, P. S., Culling, C. F., 1959, Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues, *Archives of pathology*, 68, 487–498.
- Walter, P., & Ron, D., 2011, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation, *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), 1081–1086, <https://doi.org/10.1126/science.1209038>.
- Wang, S., & Kaufman, R. J., 2012, The impact of the unfolded protein response on human disease, *The Journal of cell biology*, 197(7), 857–867, <https://doi.org/10.1083/jcb.201110131>.
- Warburg, O. & Christian W., 1942, "Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase", *Biochemische Zeitschrift*, 310: 384–421.
- Wessel, D., & Flügge, U. I., 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141–143, doi:10.1016/0003-2697(84)90782-6.
- WHO, 2022, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Ziyaret Tarihi: 1 Ocak 2022].
- World Health Organization, 2020, *World Cancer Report*, World Health Organization, Lyon.
- Wu, M., Zhang, C., Li, X. J., Liu, Q., & Wanggou, S., 2016, Anti-Cancer Effect of Cap-Translation Inhibitor 4EGI-1 in Human Glioma U87 Cells: Involvement of Mitochondrial Dysfunction and ER Stress. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(5), 1013–1028, <https://doi.org/10.1159/000453158>.
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., Guo, Z., 2017, Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation, *Royal Society Open Science*, 4(1), 160696, doi:10.1098/rsos.160696.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., & Mori, K., 2007, Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1, *Developmental cell*, 13(3), 365–376, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.018>.
- Zhao, W., Kridel, S., Thorburn, A., Kooshki, M., Little, J., Hebbar, S., & Robbins, M., 2006, Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy, *British journal of cancer*, 95(7), 869–878, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603350>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Şefika Beyza METE
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
<p>1. Pekmez, M., Tarhan, C., Zeytinluoğlu, A., Turan, M., Mete, S.B., Koseler, A., 2021, Effects of <i>Scilla autumnalis</i> extracts on U87-MG human glioblastoma cells, <i>Kafkas Journal of Medical Sciences</i>, 11 (2), 299-306. doi: 10.5505/kjms.2021.75688.</p>	