

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ONKOGENİK WİP1 FOSFATAZIN METABOLİK STRES
İNDÜKLÜ OTOFAJİ AKTİVASYONUNDA ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

NAZLİCAN KAYGUSUZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-20045 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca bilimsel ve akademik desteğiyle yanımda duran danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Tezimi değerlendirilmeleri ve vermiş oldukları tavsiyeler başta olmak üzere yoğun çalışmalarına rağmen tez jüriliğini kabul ederek beni onurlandıran Sayın Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI ve Prof. Dr. Sevin KIRDAR hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresi boyunca desteğini hep hissettiğim laboratuvar arkadaşım doktora öğrencisi Ayfer Karlitepe'ye teşekkür ederim.

Bunun yanında laboratuvar çalışma arkadaşlarım Ceylan Ak, Hatice Pilevneli ve Fevziye Özdemir Şimşek'e manevi destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam sırasında laboratuvarlarından faydalandığım Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez süresince beni yalnız bırakmayan ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarıyla beni şanslı kılan annem Feruze Aldemir ve kız kardeşim Şule Kaygusuz başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi TPF-20045 nolu proje ile çalışmamı desteklediği için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Otofaji	2
2.1.1. Otofajinin Sınıflandırılması	2
2.1.1.1. Makrotofaji.....	3
2.1.1.2. Mikrotofaji	3
2.1.1.3. Şaperon aracılı otofaji (CMA)	4
2.1.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması	5
2.1.2.1. İzolasyon Membranının Oluşmaya Başlaması	5
2.1.2.2. Nükleasyon.....	6
2.1.2.3. Fagofor Uzaması.....	9
2.1.2.4.Otofagozomun Lizozom İle Birleşmesi.....	10
2.2. Otofaji Regülasyonunu Etkileyen Metabolik Stres Tipleri.....	10
2.2.1. Hipoksi İndüklü Otofaji.....	10
2.3. Otofaji ve İnsan Patolojileri	12
2.3.1. Otofaji ve Kanser İlişkisi.....	13

2.3.1.1. Tümöröenezin Baskılanmasında Otofajinin Rolü	14
2.3.1.2. Tümöröenezin İndüklenmesinde Otofajinin Rolü	14
2.3.1.3. Kanserde Otofajinin Hedeflenmesi	16
2.4. Wip1 Fosfataz.....	17
2.5. Çalışmanın Yapılmasının Amacı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1.Gereç	20
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Dizisi.....	20
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar	20
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar.....	21
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	22
3.1.5. Kullanılan Kitler ve Problar	22
3.1.6. Kullanılan Cihazlar ve Aletler.....	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	24
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması.....	24
3.2.3. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği.....	25
3.2.4. Hücrelerin Çözdürölüp Kullanılması	25
3.2.5. Hücrelerin Sayım Yöntemi.....	26
3.2.6. İlaç Stoklarının Hazırlanması.....	26
3.2.7. Hücrelerin İnkübasyon Koşullarının Hazırlanması.....	27
3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı.....	27
3.2.8.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Otofaji İndüksiyonun Hazırlanışı	28
3.2.8.2. MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında MTT Analizi.....	30
3.2.8.3. Annexin V apoptozis testi	31
3.2.8.4. Western Blot analizi için yapılan çalışmalar.....	32

3.2.8.4.1. Protein izolasyonu	32
3.2.8.4.2. Protein miktar tayini.....	33
3.2.8.4.3. Western Blot analizi	33
3.2.8.5. İmmün Çöktürme Tekniği İle İlgili Yapılan Çalışmalar	37
3.2.8.5.1. Beat- Antikor Etkileşiminin Sağlanması.....	37
3.2.8.5.2. Beat- Antikor Karışımının Proteinlerle Etkileşiminin Sağlanması	37
3.2.8.5.3. Western Blot Tekniği İle Etkileşimin Gözlemlenmesi	38
3.2.8.6. İmmünfloresan Boyama İle İlgili Çalışmalar.....	38
3.2.8.7. Kolonojenik Assay İle İlgili Yapılan Çalışmalar	39
3.2.8.8. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi	39
4. BULGULAR	40
4.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Otofaji İndüksiyonu.....	40
4.1.1 MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Besin Yoksunluğu ile Otofaji İndüksiyonu.....	40
4.1.1.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Besin Yoksunluğu İle Otofaji İndüksiyonunda LC3 Punkta Oluşumu Formasyonu	42
4.1.1.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Besin Yoksunluğu İle Otofajinin Hücre Canlılığına Olan Etkileri	45
4.1.1.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Besin Yoksunluğu İle Otofajinin Hücre Ölümüne Etkileri	46
4.1.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Hipoksi ile Otofaji İndüksiyonu.....	50
4.1.2.1. MCF-7 Ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Hipoksi İle Otofaji İndüksiyonun LC3 Nokta Ya Da Punkta Oluşumu.....	51
4.1.2.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi İndüklü Otofajinin Hücre Canlılığına Olan Etkileri.....	54
4.1.2.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi İndüklü Otofajinin Hücre Ölümüne Etkileri	55
4.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Metabolik Stres İle Otofaji Aktivasyonuna Etkileri.....	58

4.2.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Açlık İle Otofaji Aktivasyonuna Etkisi	58
4.2.1.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Otofaji aktivasyonunda ULK1-WIP1 Etkileşimi	62
4.2.2.MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Hipoksi İle İndüklenen Otofaji Aktivasyonuna Etkisi	64
4.2.2.1 MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi Koşullarında ULK1-WIP1 Etkileşiminin İmmünoçöktürme Yöntemi ile Gösterilmesi.....	68
4.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Otofaji İnhibisyonunun Koloni Oluşumuna Etkileri	70
4.3.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Açlıkla İndüklenen Otofaji İnhibisyonunun Koloni Oluşumuna Etkileri	70
4.3.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi ile indüklenen Otofaji İnhibisyonunun Koloni Oluşumuna Etkileri	72
5. TARTIŞMA	75
5.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Metabolik Stres İndüklü Otofaji.....	78
5.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Metabolik Stres İle İndüklenen Otofaji Aktivasyonuna Etkileri.....	80
5.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Metabolik Stres Koşullarında Koloni Oluşumuna Etkileri.	81
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR.....	85
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	97
ÖZ GEÇMİŞ	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	: Amper
ATG	: Otofaji ile ilişki protein ailesi
BSA	: Bovin serum albumin
CQ	: Klorokin
DDR	: DNA hasarı cevabı
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E2F	: Transkripsiyon uzama faktörü 2
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal bovin serum
FIP200	: 200 kDa'da fokal adezyon kinaz ailesi etkileşim proteini
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz
HORMA	: (Hop/Rev7/Mad2) motiflerini içeren domain
m-TOR	: Rapamisinin memelilerdeki hedefi (Mammalian target of rapamycin)
mmHg	: Milimetre Civa
µm	: Mikro metre
µM	: Mikro molar
O₂	: Oksijen
PAS	: Otofaji öncesi yapısı
P53	: Tümör protein 53
PBS	: Fosfat tuzu tamponu

PPM1D	: Protein fosfataz 1D magnezyum bağımlı
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen
TP53	: Tümör protein 53 geni
ULK	: Unc-51-benzeri kinaz proteini
V	: Volt
VPS43	: Vakuolar protein 34
Wip1	: Wild type p53 indüklü fosfataz 1
WIPI2B	: WD tekrar domaini fosfoinositid- etkileşim proteini 2
<i>wt</i>	: Yabanıl tip (wild type)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Otofajinin Sınıflandırılması	4
Şekil 2. Besin yoksunluğunda otofaji indüksiyonunun moleküler mekanizması	6
Şekil 3. Otofajinin Moleküler Mekanizması	7
Şekil 4. Otofajinin insan patolojilerine etkisi	13
Şekil 5. Kanserde otofajinin tümör baskılayıcı ve tümör indükleyici rolünün gösterilmesi.	13
Şekil 6. SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji varlığının WB analizi	41
Şekil 7. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunun WB analizi	42
Şekil 8. SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunda LC3 punkta oluşumu	43
Şekil 9. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunda LC3 punkta oluşumu	44
Şekil 10. SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunun hücre canlılığına etkisi	45
Şekil 11. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile indüklenen otofajinin hücre canlılığına etkisi	46
Şekil 12. SH-SY5Y hücrelerinde besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji varlığında total apoptozis grafiği	47
Şekil 13. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji varlığında total apoptozis grafiği	48
Şekil 14. Şekil 12 ve 13’da grafiği verilen MCF-7 ve SH-SY5Y hücrelerinin Annexin V/7AAD sonuçlarının apoptozis profilleri	49
Şekil 15. SH-SY5Y hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığı WB analizi	50
Şekil 16. MCF-7 hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji indüksiyonu WB analizi	51

Şekil 17. MCF-7 hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığının LC3 punkta formasyonuna olan etkilerinin immünfloresan yöntemi ile gösterilmesi.	52
Şekil 18. SH- SY5Y hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığının LC3 punkta formasyonuna olan etkilerinin immünfloresan yöntemi ile gösterilmesi.	53
Şekil 19. SH-SY5Y hücre hattında, hipoksi indüklü otofajinin hücre canlılığına etkileri ...	54
Şekil 20. MCF-7 hücre hattında, hipoksi indüklü otofajinin hücre canlılığına etkileri	55
Şekil 21. SH-SY5Y hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji total apoptoz grafiği.....	56
Şekil 22. MCF-7 hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji total apoptoz grafiği	56
Şekil 23. Şekil 21 ve 22’te verilen MCF-7 ve SH-SY5Y hücrelerinin Annexin V/ 7AAD sonuçlarının apoptoz profilleri.....	57
Şekil 24. SH-SY5Y hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve açlık aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi	59
Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve açlık aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi..	61
Şekil 26. SH-SY5Y hücre hattında açlık koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünoçöktürme yöntemi ile gösterilmesi.....	64
Şekil 27. MCF-7 hücre hattında açlık koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünoçöktürme yöntemi ile gösterilmesi.....	65
Şekil 28. SH-SY5Y hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve hipoksi aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi.....	66
Şekil 29. MCF-7 hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve hipoksi aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi.....	68
Şekil 30. SH-SY5Y hücre hattında hipoksi koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünoçöktürme yöntemi ile gösterilmesi.	69
Şekil 31. MCF-7 hücre hattında hipoksi koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünoçöktürme yöntemi ile gösterilmesi	70
Şekil 32. MCF-7 hattında açlık muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri	71

Şekil 33. SH-SY5Y hattında açlık muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri	72
Şekil 34. MCF-7 hücrelerinde hipoksi muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri	73
Şekil 35. SH-SY5Y hattında hipoksi muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri	74



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan kimyasalların ve besiyerinin listesi.....	20
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan antikorların listesi	21
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan malzemelerin listesi	22
Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kitlerin listesi	22
Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi	23
Tablo 6. Çalışmada kullanılan hücrenin özellikleri ve tipi	24
Tablo 7. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları.....	34
Tablo 8. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon katsayıları	35
Tablo 9. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon katsayıları	36

ÖZET

ONKOGENİK WIP1 FOSFATAZIN METABOLİK STRES İNDÜKLÜ OTOFAJİ AKTİVASYONUNDA ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Kaygusuz N. 2022, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022

Amaç: Bu çalışmada Wip1 'i aşırı ifade eden nöroblastom (SH-SY5Y) ve meme kanseri (MCF-7) hücreleri kullanılarak hipoksi ve açlık ile metabolik stres aracılı otofajide Wip1 'in rolü araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarına Western Blot, MTT analizi, Annexin V/7AAD analizi, immün çöktürme ve immün floresan teknikleri uygulanmış olup elde edilen verilerin istatistiksel analizi 'one-way ANOVA' ile yapılmıştır.

Bulgular: Yapılan Western blot ve immün floresan yöntemi ile belirlenen konsantrasyonların otofaji indüksiyonunu sağladığı saptandı. MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında otofaji indüksiyonu için belirlenen konsantrasyonların MTT ve Annexin V/7AAD analizi aracılığıyla hücre ölümünü tetiklemediği gösterilmiştir. Wip1-ULK1 ilişkisi ise immünçöktürme ve western blot teknikleri aracılığıyla gösterilmiştir.

Sonuç: Yapılan deneyler sonucunda Wip1 fosfatazın otofaji başlangıç kompleksinde görevli temel bir protein olan ULK regülasyonunda etkili bir fosfataz olduğu açığa çıkarılmıştır. Yapılan Western blot ve immün çöktürme yöntemleri ile elde edilen veriler, Wip1 fosfatazın ULK defosforilasyonunda rol aldığına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, MCF7, Metabolik Stres İndüklü Otofaji, SH-SY5Y, Wip1 fosfataz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF ONCOGENIC WIP1 PHOSPHATASE IN ACTIVATION OF METABOLIC STRESS-INDUCED AUTOPHAGY

**Kaygusuz N. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Clinical
Biology Program Master Thesis, Aydın, 2022**

Objective: In this study, hypoxia and starvation-related stress-mediated autophagy from Wip1 was investigated for Wip1 overexpressing neuroblastoma (SH-SY5Y) and breast cancer (MCF-7).

Materials and Methods: Western blot, MTT analysis, Annexin V/7AAD analysis, immunoprecipitation and immune fluorescence techniques were applied to MCF-7 and SH-SY5Y cell lines, and the statistical analysis of the obtained data was made by 'one-way ANOVA'.

Results: It was determined that the concentrations determined by Western blot and immunofluorescence method provided autophagy induction. It was shown that the concentrations determined for autophagy induction in MCF-7 and SH-SY5Y cell lines did not trigger cell death by MTT and Annexin V/7AAD analysis. Wip1-ULK1 association was demonstrated by immunoprecipitation and western blot techniques.

Conclusion: As a result of the experiments, it was revealed that Wip1 phosphatase is an effective phosphatase in the regulation of ULK, an essential protein involved in the autophagy initiation complex. The data obtained by Western blot and immunoprecipitation methods indicate that Wip1 phosphatase plays a role in ULK dephosphorylation.

Key words: Hypoxia, MCF7, Metabolic-Stress Induced Autophagy, SH-SY5Y, Wip1 phosphatase

1. GİRİŞ

Otofaji hücre içinde doğru çalışmayan organeller, yanlış katlanmış proteinler gibi çeşitli hücresel bileşenlerin lizozomlar vasıtasıyla parçalanmasını ve tekrar kullanılmasını sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji, açlık ve oksijen yoksunluğu gibi metabolik stres faktörleri ile etkinleşebilmektedir. Wip1 solid tümörlerde aşırı ekspresyon sonucu onkogenik karaktere sahip olan ve genotoksik stresle aktive olan apoptozis, senesens gibi hücresel cevapların negatif regülasyonunda görev alan bir fosfatazdır. Wip1 fosfatazın DNA hasarı cevabının regülasyonunda görev alan onkogenik bir fosfataz olan bir fosfatazdır.

Son çalışmalar Wip1'in sağlıklı hücrelerde genotoksik stres indüklü otofajiye aracılık ettiğine işaret etmektedir. Ancak onkogenik Wip1'in açlık ya da hipoksi gibi metabolik streslerde otofajiye aracılık edip etmediği konusu literatürde bir boşluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada Wip1'i aşırı ifade eden nöroblastom (SH-SY5Y) ve meme kanseri (MCF-7) hücreleri kullanılarak hipoksi ve açlık ile metabolik stres aracılı otofajide Wip1 'in rolü araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otofaji

Stres adaptif bir cevap olan otofaji, açlık, hipoksi, doğru katlanmayan protein etkisi, yanlış çalışan mitokondri, ER vb. organellerin sebep olduğu stres gibi eksternal şartlar altında indüklenen bir mekanizmadır. Genel olarak otofaji, hücrede degrede edilecek kargonun otofagozom adı verilen çift zarlı membran içerisine alınarak lizozoma taşınması ardında lizozom ile birleşerek kargonun parçalanmasını sağlayan katabolik bir mekanizmadır. (Yun ve Lee 2018) Bu süreç, sitozolik bileşenlerin geri dönüşümünü sağlayarak öncü proteinlerin hücre içinde belirli bir seviyede tutulmasını sağlamaktadır. (Parzych ve Klionsky, 2014)

Otofaji ile ilgili çalışmalar 1950'li yıllara dayansa da Otofaji terimi ilk olarak 1966'te de Duve'un lizzozom üzerine yaptığı çalışmalarda açığa çıkmıştır. (De Duve ve Wattiaux, 1966) 1974 yılında yılında mayalarla yapılan deneyler sonucunda otofaji çalışmaları hızlanmıştır. (Edelman, 1974) 1982 yılında Seglen'in yaptığı çalışmalarda otofajinin fosfotidilinositol 3 fosfat kinaz (bu noktadan sonra PIP3K olarak bahsedilecektir.) inhibisyonu aracılığıyla regüle edilebileceğini açığa çıkarmıştır. 1997 yılına gelindiğinde, Yoshinori mayalarda otofaji ile ilişkili genleri (bu noktadan sonra ATG olarak bahsedilecektir) açığa çıkarmıştır. (Mamet-Bratley ve Karska-Wysocki, 1982) Buna ek olarak, 1992 yılında Takeshige tarafından yapılan bir çalışmada ilk defa, mayalarda besin yoksunluğunun otofaji indüksiyonunu tetiklediğini göstererek otofajinin mayaların sağ kalımı için gerekli bir mekanizma olduğunu açığa çıkarmıştır. (Takeshige ve diğerleri. 1992) Otofaji alanında yapılan bütün çalışmalar zaman içerisinde derinlik kazanarak otofajinin canlılardaki önemi gün yüzüne çıkarılmaya çalışılmıştır.

2.1.1. Otofajinin Sınıflandırılması

Otofaji en basit şekliyle otogozom membranının oluşması ve degrede edilmesini içerenkatabolik bir olaydır. Oluşan membran yapısının kaynağı henüz tam olarak bilinmese de

bu konudaki yaygın kanı ER kaynaklı olduğuna işaret etmektedir. Otofagozom yapısı meydana geldiğinde, kargonun lizozoma taşınmasında izlenen yolların farklılığından dolayı üç ana otofaji türü bulunmaktadır. Mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olarak adlandırılan bu türlerin her birinin indüklenme tipi, morfolojileri farklılık gösterse de bütün otofaji tipleri otofagozomun lizozom ile birleşerek otolizozom halini almasıyla sonuçlanmaktadır. (Park ve diğerleri, 2020)

2.1.1.1. Makrotofaji

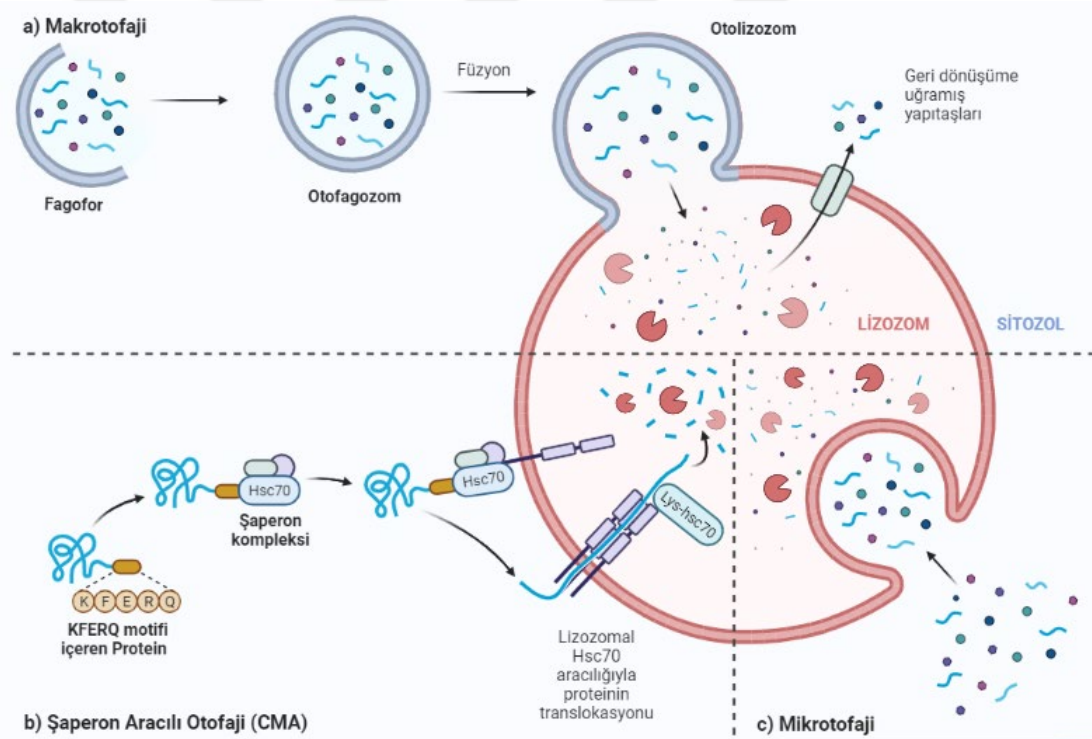
Makrotofaji, endoplazmik retikulum kökenli membran aracılığıyla degrede edilecek materyalin lizozoma taşınmasını ve lizozomda parçalanmasını hedeflemektedir. Makrotofajinin substratları, gereksiz ve hasarlı organelleri, sitozolik proteinleri içermektedir. Degradasyonu takiben, makromolekülleri geri dönüştürmek ve olumsuz koşullar altında hücre canlılığını sürdürmek amacıyla enerji üretmek için yapıtaşlarına ayrılan ürünler sitozole geri salınmaktadır. (bu noktadan sonra otofaji olarak bahsedilecektir.) (Stavoe ve Holzbaur, 2020)

2.1.1.2. Mikrotofaji

Mikrotofaji, hücre içerisinde bulunan protein gibi küçük bileşenlerin fagositoz aracılığıyla direk olarak lizozomun içerisine alınmasını ve degradasyonunu içeren mekanizmadır. Mikrootofaji hücrede lipit açısından zengin kargonun degradasyon için lümene taşınmasını sağlarken aynı zamanda lizozomal yüzeydeki lipit-protein oranının düzenlenmesinde de görevlidir. Bu nedenle lipit metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, mikrotofaji endositoz tarafından oluşturulan kargo parçalarını, endozomdaki hücre zarı proteinlerinin yeniden düzenlenmesini de kontrol etmektedir. Dahası mikrotofajinin lizozoma glikojen taşınmasında da görev aldığı bilinmektedir. Mikrotofajinin; organellerin boyutunu belirlemede, membran içeriğinin ayarlanmasında, nitrojenin sınırlandırıldığı ortamlarda hücre canlılığını sağlamada görevli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, mikrotofajinin sadece makrotofaji yerine kullanılan bir mekanizma olup olmadığı hala tartışmalıdır (Schuck, 2020)

2.1.1.3. Şaperon Aracılı Otofaji (CMA)

Şaperon aracılı otofaji, çözünebilen hücre içi proteinlerin moleküler şaperonlara bağlanarak lizozoma taşınmasını ve lizozomik enzimler aracılığıyla degrade edilmesini içeren mekanizmadır. CMA, KFERQ- benzeri bir pentapeptit sekansı içeren ısı şoku proteini (HSC70; 71-kDa, ayrıca HSPA8 olarak da bilinir) içermektedir. CMA yolağı, lizozomla ilişkili membran proteinini tip 2A (LAMP-2A) ile etkileşime girerek hedef proteinleri lizozomal membranlardan lizozomal lümene iletmektedir. Bu nedenle, CMA veziküler yollar gerektirmediği için mikrotofaji ve makrotofajiden farklı olmasına karşın memeli hücrelerinde yapılan çalışmalarda makrotofajnin baskılandığı durumlarda CMA indüksiyonunun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu durum otofaji tipleri arasında dinamik bir akış olduğuna işaret etmektedir. (Oshima ve diğerleri, 2019; Khandia ve diğerleri, 2019)



Şekil 1. Otofajinin Sınıflandırılması

Buna ek olarak parçalanacak kargonun tipine bağlı olarak seçici ya da seçici olmayan otofaji biçimdeki kategorizasyonlar da mevcuttur. Seçici otofaji, besin miktarının hücre içerisinde yeterli seviyede olduğunda meydana gelen bir otofaji tipidir. (Lamark ve Johansen, 2021) Mitokondriyel otofaji (mitofaji), (Hasnat ve diğerleri, 2019) ERfaji, ribofaji, agregat

otofaji (agrefaji), (Janssen ve diğ erleri, 2018) peroksizom otofaji (Eun ve diğ erleri, 2018) vb. türleri olan seçici otofaji temelde doğ ru çalışmayan organelleri hedeflemektedir. Bu yolda meydana gelen aksamanın insanlarda yaşlanma, kanser, n rodejenereasyon gibi çeşitli hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir.(Hurley ve Young, 2017) Seçici olmayan otofaji ise genellikle açlık durumlarında meydana gelmektedir. Hücrede lipid, aminoasit, karbondhidrat ve nükleotid gibi temel yapıtaşlarının belirli bir seviyede kalmasını hedeflemektedir. (Takats ve diğ erleri, 2019) Seçici ve seçici olmayan otofaji birbirinden farklı sinyaller aracılığıyla indüklenmektedir. Başlangıç sinyalleri temelde farklılık göstermesine karşın otogozom kompleksinin oluşabilmesi için gerekli olan faktörlerin tek bir yolda aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Hem mikro hem de makrootofaji seçici veya seçici olmayan otofaji olarak ayrılabilir.

2.1.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji, substratların otofagozomlar olarak adlandırılan sitozolik çift membranlı veziküller içinde değrede edildiği bir tür katabolik süreçtir. Hem morfolojik olarak hem de otofaji yolağını oluşturan ana protein bileşenleri açısından mayadan memelilere kadar yüksek oranda korunmuş bir mekanizmaya sahip olan otofaji mekanizması 4 ana basamaktan oluşmaktadır: (Raj ve diğ erleri, 2020)

- 1- İzolasyon membranının oluşmaya başlaması
- 2- Nükleasyon
- 3- Otofagozom oluşturabilmek için çift zarlı membran yapısının uzaması
- 4- Otolizozom oluşturabilmek için lizozom ile birleşme

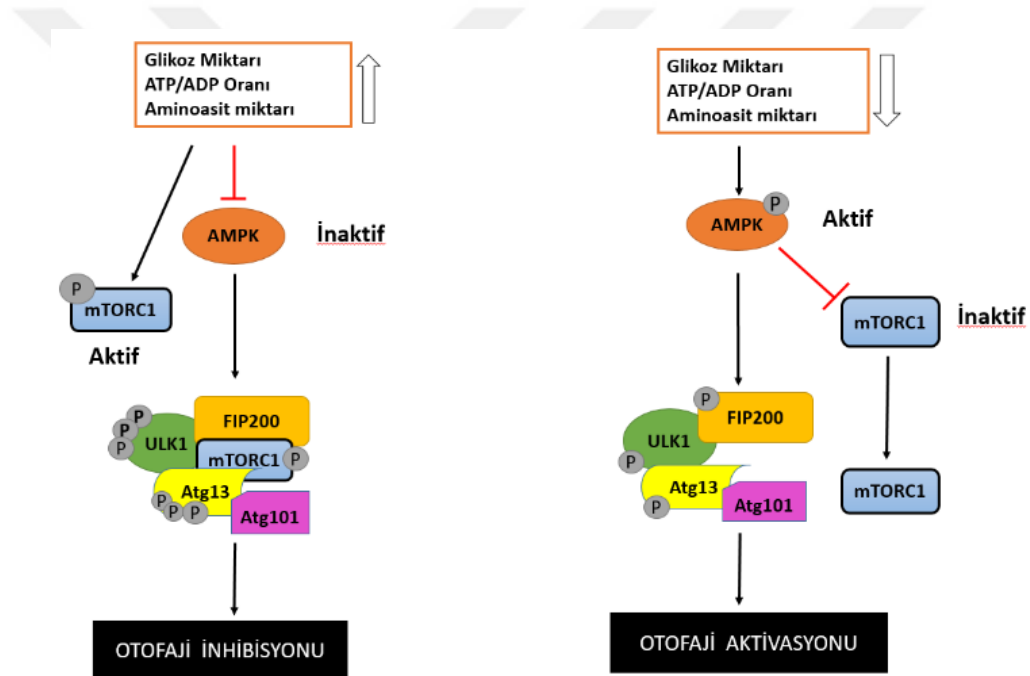
2.1.2.1. İzolasyon Membranının Oluşmaya Başlaması

Otofaji indüksiyonu mayalarda otofagozom-öncesi yapılar (bu noktadan sonra PAS olarak adlandırılacaktır) adı verilen noktasal yapı ile başlamaktadır. Memelilerde ise bu basamak, omegazom adı verilen lipid fosfotidillinositol-3fosfat (Bu noktadan sonra PI(3)P olarak adlandırılacaktır) bakımından zengin ER ile ilişkilidir. PAS ve omegazomun

oluşumundan itibaren nükleasyon olarak adlandırılan otofaji başlangıç komplekslerinin aktifleştiği basamağa geçilmektedir. (Axe ve diğerleri 2008; Lazarus ve diğerleri, 2015)

2.1.2.2. Nükleasyon

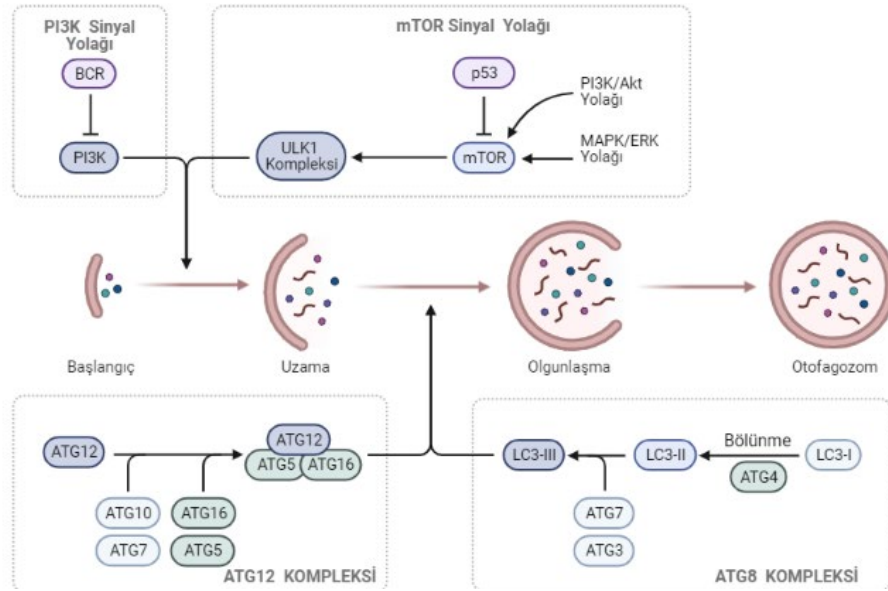
Otofaji başlangıç belirteçlerinden biri olan otofagozom oluşumu genellikle ULK kompleksine bağımlı ilerleyen bir yolaktır. Serin/treonin kinaz aktivitesine sahip olan ULK1, 12q24.33 bölgesine lokalize olmaktadır. (Casas ve diğerleri, 2004) Fosforilasyon, übikütinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara sahip olan ULK1 otofaji indüksiyonunda önemli role sahiptir.



Şekil 2. Besin yoksunluğunda otofaji indüksiyonunun moleküler mekanizması

ULK1 kinaz aktivitesi, mTORC1 ve AMPK aracılığıyla regüle edilmektedir. (Losier ve diğerleri, 2019) Besin miktarının yüksek olduğu koşullarda, büyüme faktörlerinden gelen sinyaller ve besin mevcudiyeti mTORC1 aktivasyonuna sebep olmaktadır. Aktifleşmiş mTORC1, RAPTOR üzerinden ULK1'i birden fazla noktadan fosforile etmektedir. (farede Ser757/637, insanda Ser758) Bu fosforilasyon aracılığıyla, ULK1 kompleksi inaktif hale gelmekte ve otofaji baskılanmaktadır. (Fritzen ve diğerleri, 2016) Ancak besin yoksunluğu durumunda, hücre içerisinde enerji sensörü olarak görev yapmakta olan AMPK, LKB1 kinazı

aracılığıyla fosforillenerek aktifleşmektedir. (Bujak ve diğerleri, 2015) AMPK; hem ULK1 proteinini Ser555, Ser 757 bölgelerinden defosfosforile hale getirmek koşuluyla direk olarak, hem de bir mTORC1 inhibitörü olan TSC2'yi Ser1345 bölgesinden fosforilleyerek mTOR inhibisyonunun sağlanması aracılığıyla dolaylı olarak otofaji indüksiyonunu sağlamaktadır. Buna ek olarak AMPK'nın, RAPTOR üzerinden mTOR inhibisyonu sağlayabilmek için RAPTOR proteinini Ser792/722 bölgelerinden fosforillemek gibi farklı etki mekanizmaları da bulunmaktadır. (Bach ve diğerleri, 2011; Lazarus ve diğerleri, 2015) AMPK-bağımlı ULK1 regülasyonu otofaji indüksiyonu için önemli bir cevap olmasının yanında mitokondriyal homeostaz, besin stresi altında hücre sağ kalımı açısından da önemli bir cevaptır. (Corona ve Jackson, 2018; Gross ve Graef, 2020)



Şekil 3. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Memeli hücrelerinde otofaji indüksiyonu için aktifleşmesi gereken otofaji başlangıç kompleksi ULK1-FIP200-ATG13-ATG101 proteinlerini içermektedir. Otofaji indüksiyonu gerçekleştiğinde ilk olarak ATG13-ULK1 stabilizasyonu sağlanmaktadır. ATG13 stabilizasyonu ATG101 proteininde bulunan WF finger motifi aracılığıyla sağlanmasına ek olarak hem ATG13 hem de ATG101, birbirleriyle heterodimerize olan HORMA (Hop/Rev7/Mad2) alanları içerir. (Joshi ve diğerleri, 2016) ATG13, HORMA alanını takip eden uzun bir IDR (intrinsically disordered region) bölgesinin C-terminal kısmı, ULK1 proteinin C-terminal EAT/tMIT alanına bağlanarak ULK1-ATG13 kompleksini meydana getirmektedir. (Lazarus ve diğerleri, 2015; Michel ve diğerleri, 2015)

ATG13, HORMA alanını takip eden uzun bir IDR (intrinsically disordered region) bölgesinin C-terminal kısmı, ULK1 proteinin C-terminal EAT/tMIT alanına bağlanmasını sağlayan motifler içermektedir. Böylelikle ULK1- ATG kompleksi meydana gelmektedir. ATG13 ve ULK1 stabilizasyonunun sağlanmasında görevli ATG101 bu stabilizasyonu WF finger motifi ile sağlamaktadır. ULK ve ATG13 proteinin stabilizasyonu sağlandıktan sonra, hem ULK1 hem de ATG13 proteininde bulunan LIR/AIM motifi aracılığıyla LC3 ailesi proteinlerinin etkileşimi gözlemlenmektedir. (Grasso ve diğerleri, 2018) ULK kompleksinin en son üyesi olan FIP200, bu kompleksteki en büyük proteindir. ATG11 ve ATG17 adında iki yapısal alt birim içermektedir. ULK-ATG13 kompleksine en FIP200 proteinin de katılmasının ardından ULK kompleksi aktifleşmektedir. Besin yoksunluğu durumunda otofaji indüksiyonunun ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 kompleksi üzerinden ilerlediği yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır. Buna ek olarak, ULK1 proteini Beclin1(Bu noktadan sonra BECN1 olarak bahsedilecektir), VPS34 gibi otofaji ile ilişkili birçok hedefin fosforilasyon yoluyla aktivasyonunu indüklemektedir. (Michel ve diğerleri, 2015; Ragusa ve diğerleri, 2012) Otofaji indüksiyonu sonucu ULK kompleksi aktifleştğinde ilk olarak ULK1 Thr180/1046 ve Ser1042 bölgelerinden kendi kendini fosforillemektedir. Buna ek olarak kompleksin diğer üyeleri olan Atg13; Ser318/203 bölgesinden, FIP200; Ser943/986/1323 ve son olarak ATG101; Ser11/203 bölgelerinden fosforillenmektedir. Böylelikle, Beclin1- ATG14L-Vps15-Vps34 kompleksi aracılığıyla fagofor oluşumunu indüklemektedir.

Otofajide nükleasyonun başlangıç evrelerinde önemli bir yere sahip olan BECN1, mayalarda bulunan VPS30/Atg6 kompleksinin homoloğu olup VPS34 ile birleşerek otofagozom formasyonunu indüklemektedir. BECN1, otofaji indüksiyonunun yanında apoptoz, inflamasyon ve başka birçok yolağın regülasyonunda merkezi bir rol oynamasından dolayı birden fazla bağlanma bölgesi içermektedir. (Salminen ve diğerleri, 2013) Bu bölgelerin içerisinde BECN1'i pozitif yönde indükleyen UV radyasyonuna direnç geni olarakta bilinen UVRAG, (UV irradiation resistance-associated gene) ATG14L/Barkor ve AMBRA1 gibi bölgeler bulunmaktadır. UVRAG fagofor membranının eğimlenmesine yol açan ve otofagozom-lizozom füzyonunu hızlandıran SH3GLB1/Bif-1 (bir N-BAR alanı proteini) ile etkileşime girmektedir. BECN1'in pozitif düzenleyicilerine ek olarak, BCL-2, BCL-xL, Rubicon (RUN alanı ve sistein açısından zengin alan içeren, Beclin 1-etkileşimli protein), AKT ve EGFR gibi Beclin 1/VPS34 kompleksinin negatif düzenleyicileri de bulunmaktadır. (Goldsmith ve diğerleri, 2014)

ULK1 kompleksinin aktifleşmesinin ardından, ULK1, BECN1; Ser14'ten, ATG14L; Ser29'dan fosforillenmektedir. Bu fosforillenme aracılığıyla, ATG14L proteini, VPS34 kompleksinin lokalizasyonunun dolayısıyla fagofor çekirdeklenmesinin meydana geleceği bölgenin yerinin belirlenmesini sağlamaktadır. Buna ek olarak, BECN1 fosforilasyonu aracılığıyla BECN1'de bulunan BH3 domaini ile bir trans membran proteini olan VMP1'in ATG domaini etkileşime girmektedir.(Grasso ve diğerleri, 2018) Bu durum, WIPI2B (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2) ve DFCP1 (double FYVE containing protein 1) gibi PI3P-bağlanma proteinlerini aktifleştirmektedir. VPS34, diğer bir ismi de memeli tip III fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3KC3), fosfotidilinositolü fosforilleyerek PI3P üretimini indüklemektedir. Bu fosforillenme sayesinde PI3P üretiminde artış meydana gelmektedir. .(Zachari ve Ganley, 2017) Ardından PI3P, FVYE finger proteinine bağlanarak otofagozom ve endozomal membran formasyonunu indüklemektedir. (Michel ve diğerleri, 2015; Ragusa ve diğerleri, 2012)

2.1.2.3. Fagofor Uzaması

Fagofor oluşumu ve uzaması basamaklarının moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemesine rağmen uzamanın meydana gelebilmesi için iki temel protein kompleksinin aktifleşmesi gerektiği düşünülmektedir. İlk olarak, ATG7 ve ATG10 (sırasıyla E1 ve E2 benzeri enzimler) ATG12 ve ATG5'e konjuge olmaktadır. ATG5-ATG12 kompleksi, ATG16'ya bağlanmaktadır. ATG16L kompleksi adı verilen bu büyük multimerik kompleks yeni oluşan fagoforun uzaması için gereklidir. İkinci kompleks ise, aktivasyon reaksiyonları için gerekli olan ATG8 proteinin C terminal ucundaki glisin bölgesinin açığa çıkarılması hedeflenmektedir. ATG4 proteazı sayesinde meydana gelen bu süreç kompleksin aktifleşmesine sebep olmaktadır. Son olarak LC3, ATG7 ve E2 benzeri olan ATG3 yoluyla lipid fosfatidiletanolamin (PE) ile konjuge olmaktadır. Bu durum LC3'ün otofagozomal membranın hem dış hem de iç yüzeyine alınımını sağlamaktadır. LC3 ve diğer ATG8 ailesi üyeleri, otofagozomun uçlarının birleşerek kapanmasında önemli olan hemifüzyona aracılık edebilmektedir. (Herhaus ve diğerleri, 2020) Buna ek olarak, LC3 otofajik degradasyon için kargo seçiciliğinde önemli bir düzenleyicidir. p62/SQSTM1, NBR1, NDP52 gibi çeşitli übikütün-bağlanma proteinleri kargo reseptörleri olarak adlandırılmaktadır. Bu kargo reseptörleri, otofagozomun spesifik olarak hedeflenmesi için gerekli olan LIR (LC3-etkileşim bölgesi) adı verilen iyi korunmuş doğrusal bir aminoasit motifi içerir. (Weidberg ve diğerleri, 2010; Weidberg ve diğerleri, 2011)

2.1.2.4. Otofagozomun Lizozom İle Birleşmesi

Otofagozom oluştuktan sonra, endozom ya da lizozom ile birleşerek otofagozom içerisindeki bileşiklerin degradasyonu gerçekleşmektedir. Otofagozomun lizozoma ilerlemesi dinein adı verilen mikrotübüller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Otofagozomun lizozom ile birleşebilmek için ESCRT, SNARE'ler, özellikle syntaxin 17 —VPS ailesi proteinleri ve RAB7 proteinlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Lizozom ile füzyon basamağı, otofajinin son basamağıdır. Otolizozom oluştuktan sonra lizozomik enzimler aracılığıyla kargo yapıtaşlarına ayrılmaktadır. En yaygın otofaji inhibitörlerinden biri olan klorokin otofajinin bu son basamağını baskılamaktadır. Lizozomun pH'ını arttırarak lizozomik enzimlerin yapısını bozmakta böylelikle otolizozom oluşumu engellenerek otofaji modülasyonu gerçekleşmektedir. (Kimura ve diğerleri, 2013)

2.2. Otofaji Regülasyonunu Etkileyen Metabolik Stres Tipleri

2.2.1. Hipoksi İndüklü Otofaji

Hücresinin çevresindeki atmosferik basıncın % 0.1–1 O₂ olduğu durumlar hipoksik koşullar olarak adlandırılmaktadır. Oksijen eksikliği halinde hipoksi ile indüklenen faktörler (bu noktadan sonra HIFs olarak bahsedilecektir) ailesi HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α ve HIF1 β (ARNT olarakta bilinir) üyelerinden oluşmaktadır. Hipoksi ile ilişkili birçok yolda HIF1 α ve HIF2 α 'nın HIF1 β ile nükleusta heterodimerizasyona uğradığı gösterilirken HIF3 α 'nın hipoksi ile ilişkili genlerdeki rolü henüz açığa çıkmamıştır. (Soni ve Padwad, 2017)

Oksijen miktarının yüksek olduğu bölgelerde HIF1 α 'nın korunmuş prolin bölgelerinin prolin hidroksilazlar tarafından hidoksilasyonu katalizlenmektedir. Hidroksillenmiş HIF1 α , Von Hippel Lindau (Bu noktadan sonra VHL olarak bahsedilecektir) ile etkileşime girmektedir. Bu durum, HIF1 α 'nın ubiquitinasyonu indüklemekte ve ilerleyen süreçlerde degradasyonu sağlanmaktadır. Oksijen miktarı düştüğünde ise prolin hidroksilazlar için oksijen bulunmadığından dolayı HIF1 α 'nın nükleer translokasyonu ve stabilizasyonu gerçekleşmektedir. Hücresinin nükleusuna geçen HIF1 α ve HIF1 β heterodimerizasyona uğrar.

Ardından bu kompleks DNA’da bulunan hipoksi cevap bölgesine(bu noktadan sonra HRE olarak adlandırılacaktır) bağlanmaktadır. Bu durum hedef genlerin transkibe olmasını sağlamaktadır. (Wang ve diğerleri, 1995; Eales ve diğerleri, 2016) HIF-1 α , oksijen miktarının değişimine karşı hücrenin temel düzenleyicisidir. Bu bağlamda, hücre homeostazının sağlanmasında rol oynayan hücre çoğalması, apoptoz, metabolizma, genomik instabilite, vaskülarizasyon, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere birçok hücresel yanıtta önemli bir yere sahiptir. (Wigerup ve diğerleri, 2016)

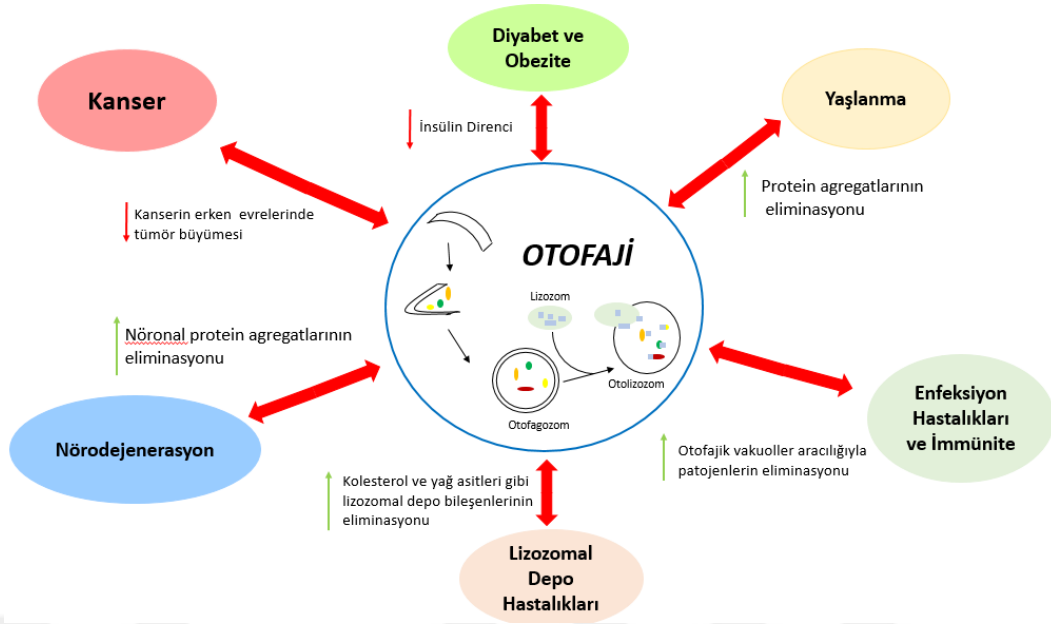
Bir metabolik stres durumu olan hipoksi otofaji indüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Hipoksi indüklü otofaji; HIF1-bağımlı ve HIF1-bağımsız olmak üzere iki temel gruba ayrılır. HIF- bağımlı otofajide HIF1’in aktivasyonu yoluyla Bcl-2/ E1B 19 kDa- etkileşimli protein 3 (bu noktadan sonra BNIP3 olarak bahsedilecektir) (Azad ve Gibson, 2010) BNIP3- benzeri protein (bu noktadan sonra BNIP3L olarak bahsedilecektir) proteinlerini aktifleştirmektedir. (Wang ve diğerleri, 1995) Bu duruma ilk kanıt 2007 yılında Tracy ve arkadaşlarının fare embriyonik fibroblastlarda (MEFs) yaptığı deneylerle açığa çıkmıştır. Hipoksik koşullara maruz bırakılan MEF’lerde hipoksik koşulların apoptotik olmayan hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Daha sonra yapılan deneylerde bu hücre ölümünün otofajik olduğu belirtilmiştir.(Tracy ve diğerleri, 2007) Azad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise glioma ve meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda hipoksi indüklü hücre ölümünün otofajik olduğunu ayrıca bu sürecin BNIP3 üzerinden indüklendiği kanıtlanmıştır. (Azad ve diğerleri, 2008) Daha sonra MEFs yapılan çalışmalarda HIF- bağımlı BNIP3 ekspresyonunun mitofaji için gerekli olduğu gösterilmiştir.(Band ve diğerleri, 2009) Aktifleşen BNIP3 ve BNIP3L proteinleri BH3- domaini içeren Bcl-2/Beclin1 ve Bcl-XL/Beclin1 kompleksleri ile etkileşime girerek Bcl-XL ve Bcl-2 proapoptotik proteinlere bağlanmaktadır. Ortamda serbest hale geçen Beclin-1 proteini otofaji indüksiyonunu sebep olmaktadır.(Bellot ve diğerleri, 2009)

Hipoksi indüklü otofajide HIF1 her zaman rol oynamamaktadır. HIF-bağımsız otofaji indüksiyonunda, hipoksi hücrede aminoasit ve glikoz yoksunluğunu indükleyerek otofajinin temel düzenleyici olan mTOR yolağının aktivasyonuna sebep olmaktadır. Hipoksi varlığında, REDD2 proteini üzerinden TSC1-TSC2 kompleksi aktifleşmekte ve bu durum mTORC1 modülasyonuna sebep olmaktadır. (Jung ve diğerleri, 2010) Buna ek olarak, hipoksi ile otofaji indüksiyonuna sebep olan bir başka yolak ise doğru katlanmayan proteinlerin (UPR) sebep olduğu stres cevabıdır. UPR stresi aracılığıyla indüklenen REDD2 proteini aynı zamanda ER stresi üzerinden de otofaji indüksiyonuna sebep olmaktadır. (Sofer ve diğerleri, 2005; Whitney ve diğerleri, 2009; Wolff ve diğerleri, 2011)

Hipoksi ile indüklü otofaji çalışmaları görece yeni çalışılan bir konu olmasından dolayı etki mekanizması henüz tam olarak açığa çıkarılamamış olup bu durum literatürde boşluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3. Otofaji ve İnsan Patolojileri

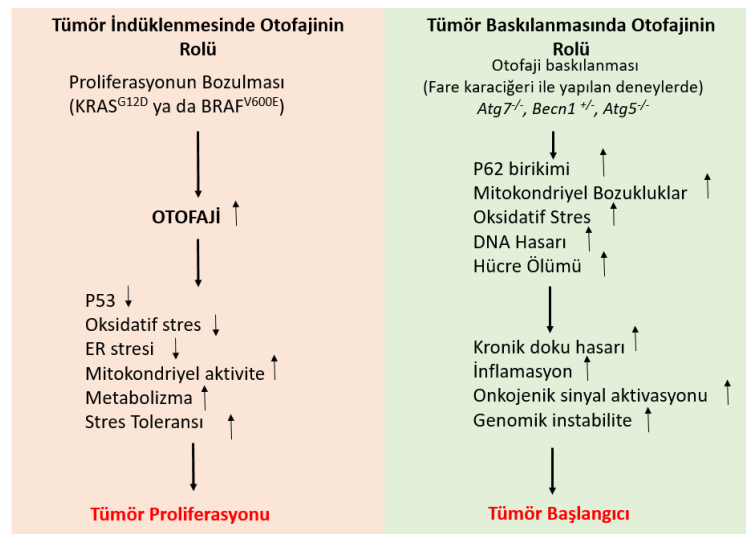
Değişen stres koşullarına adaptasyon için hücrenin metabolik yollarını yeniden düzenlemesi gerekmektedir. Metabolik değişikliğe sebep olan en temel yollardan biri makrotafaji yolağıdır. Hücre homeostazında görevli otofajinin doğru çalışmadığı durumlarda nörodejeneratif rahatsızlıklar, Tip2 diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıklar meydana gelmektedir. Özellikle doğru çalışmayan proteinlerin birikimi sonucunda meydana gelen nörodejeneratif hastalıklar, genellikle otofaji mekanizmasının doğru çalışmaması sonucunda indüklenmektedir. Hastalığın başlangıç evresinde doğru çalışmayan proteinlerin eliminasyonunda etkili bir rolü olan otofajinin, hastalığın ilerleyen evrelerinde proteinlerin birikimi sonucunda etkisini yitirdiği gözlemlenmektedir. Aşırı birikmiş olan protein agregatlarının yarattığı stres sonucunda, lizozomal degradasyon hassasiyeti düşmekte, protein agregatlarının eliminasyonu gerçekleşmemektedir. Alzheimer, (Houtman ve diğerleri, 2019) Huntington (Aron ve diğerleri, 2020) ve Parkinson (Chang ve diğerleri, 2017) gibi nörodejeneratif rahatsızlıkların karakteristik özelliği olarak bilinmekte olan nöronal ölüm, protein agregatlarının aşırı birikimi ile otofajik hücre ölümünün indüksiyonu sonucunda meydana gelmektedir. Nörodejeneratif rahatsızlıklara ek olarak otofajinin hücre yaşlanması ile de ilişkili bir mekanizma olduğu bilinmektedir. Özellikle beyin hücrelerinin yaşlanması- otofaji ekseninde yapılan çalışmalar, insülin inhibisyonu ve besin sınırlandırılmasının yaşlanma karşıtı etkisi olduğunu göstermektedir. (Keller ve diğerleri, 2004) Bu durum, geçici süreyle düşük insülin seviyesine maruziyetin, vücutta otofaji gibi yaşlanma karşıtı hücre tamir mekanizmalarını indüklediğine işaret etmektedir. Bütün bunlara ek olarak otofajinin miyopati, (Nemazany ve diğerleri, 2013) metabolik rahatsızlıklar, (Lim ve diğerleri, 2018) kanser, (Katheder ve diğerleri, 2017) immünite rahatsızlıkları (Liu ve diğerleri, 2019) gibi pek çok hastalıkla da ilişkilidir.



Şekil 4: Otofajinin insan patolojilerine etkisi

2.3.1. Otofaji ve Kanser İlişkisi

Birçok metabolik rahatsızlığa ek olarak kanser çalışmalarında da önemli bir yere sahip olan otofajinin kanser mekanizmasına etkisi henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Otofaji-kanser araştırmalarında, otofajinin hem kanser lehine hem de aleyhine çalıştığına dair yayınlar bulunmaktadır. Kanser başlangıç evresinde tümörogenezi inhibe etmede etkili bir yere sahip olan otofaji; kanserin ilerleyen evrelerinde tümörogenezi indüklemektedir. (Mulcahy ve Thorburn, 2020)



Şekil 5: Kanserde otofajinin tümör baskılayıcı ve tümör indükleyici rolünün gösterilmesi

2.3.1.1. Tumorogenezin Baskılanmasında Otofajinin Rolü

Otofajinin insan kanserlerindeki rolü ile ilgili ilk yayınlar fagofor oluşumunda önemli bir yere sahip olan BECN1 proteini üzerindendir. İnsan meme, ovaryum ve prostat kanserlerinde yapılan çalışmalarda BECN1 proteininin yeterli miktarda üretilmediği saptanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda BECN1 geninin genetik haplo yetersizliğe sahip olduğu için yeterli miktarda üretilmediği açığa çıkmıştır. Heterozigot BECN1 fare modeli ile yapılan bir çalışmada, hepatik, meme ve lenfoid neoplaziye karşı hassasiyet geliştirdiği gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, endojen HER2 proteininin BECN1 ile etkileşime girerek otofajiyi inhibe ettiği ve tümörogenezi indüklediği gösterilmiştir. Buna ek olarak, BECN1F121A farelerinde artmış otofaji indüksiyonu HER2 aracılı kanser ilerlemesinin modülasyonu sağlanmıştır. Böylelikle, BECN1'in anti-tümörojenik etkisi gösterilmiştir. (Takamura ve diğerleri, 2011) UVRAG ve Bax-etkileşim faktörü-1 (bu noktadan sonra Bif-1 olarak bahsedilecektir) proteinleri ile BECN1 etkileşiminin otofajiyi pozitif yönde regüle ederek tümör baskılanmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır. Buna ek olarak UVRAG protein miktarının azalması ve Bif-1 eksikliği aracılığıyla otofagozom formasyonunda düşüş meydana gelmesi kolon, gastrit, meme ve prostat kanserlerinde hücre proliferasyonunu ve dolayısıyla tümörogenezi indüklediği gösterilmiştir. (Kung ve diğerleri, 2011; Kim ve diğerleri, 2008) Buna ek olarak bu alanda yapılan klinik öncesi çalışmalar, otofaji ile ilişkili genlerin kaybının tümörogenezi indüklediğini göstermektedir. Bu bağlamda, Atg5'in hepatik ablasyonu, farelerde hepatotoksisite, inflamasyon ve iyi huylu karaciğer tümörlerinin gelişmesine yol açtığına dair yayınlar bulunmaktadır. (Takamura ve diğerleri, 2011) Bütün bunlara ek olarak, doğru çalışmayan otofajik yollarda otofagozomun lizozom ile birleşmemesinden dolayı otofajik kargo reseptörü olan p62 birikimi meydana gelmektedir Bu durum NF- κ B ve Nrf2 gibi hücre sağ kalımını, anjiyogenezi ve inflamasyonu indükleyen yolları aktive etmektedir. (Mathew ve diğerleri, 2009; Inami ve diğerleri, 2011)

2.3.1.2. Tumorogenezin İndüklenmesinde Otofajinin Rolü

Otofaji-kanser ekseninde çalışmalar arttıkça kanserin başlangıç evresinde, otofajiyi tümör baskılayıcı olarak görev yaparken tümörün ilerleyen evrelerinde tümör lehine çalışmaktadır. Bu

durum temelde, ilerlemiş tümörlerin sahip olduğu hipoksik çevre ya da besin yetersizliği gibi stres koşulları ile ilişkilendirilmektedir. Otofaji kanser hücrelerinin bu stres koşullarına adaptasyonunu sağlayan en temel yollardan biridir. BECN1 delesyonu aracılığıyla baskılanan otofaji kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklemektedir. (White ve DiPaola, 2009) Buna ek olarak, tümör proliferasyonu için ihtiyaç duyulan büyük miktardaki enerji hücre içi bileşenlerin otofaji yoluyla degrade edilmesiyle sağlanmaktadır. Buna ek olarak, otofaji tümör hücrelerinin stres toleransını arttırmakta tümör hücrelerinin sağ kalımını indüklemektedir. Bu bağlamda yapılan deneyler sonucunda, otofaji inhibisyonunun tümör hücrelerinin ölümü ile sonuçlandığı kanıtlanmıştır. RAS mutasyonu aracılığıyla indüklenen kanserlerde bazal otofaji seviyesinin yüksek olması, otofajinin tümör büyümesi, sağ kalım ve onkogeneizde etkili bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, tümör hücrelerinde RAS aktivasyonuna bağlı hücre sağ kalımında otofajinin önemli bir role sahip olduğu açıkça görülmektedir. (Guo ve diğerleri, 2011; Goel ve diğerleri, 2015)

Anti-kanser ilaçlar aracılığıyla uygulanan kemoterapi tümör hücrelerinin bölünmesini baskılayarak hücre ölümünü indüklemeyi hedeflemektedir. Ancak kemoterapi tedavilerinde başarı oranı oldukça düşüktür. Bu durum, kanser hücrelerinin kemoterapiye karşı geliştirdikleri direnç ile açıklanmaktadır. Anti-kanser bir ilaç olarak kullanılan 5-florourasil (Bu noktadan sonra 5-FU olarak bahsedilecektir) meme, pankreas ve kolorektal kanserlerde oldukça yaygın kullanılan bir ajandır. 5-FU DNA sentezinde görevli timidil sintazı inhibe ederek DNA sentezini baskılamaktadır. (Liang ve diğerleri, 2014) Ancak bu tedavi yönteminin başarı oranı otofaji aracılığıyla kemoterapiye direnç gelişiminden dolayı oldukça düşüktür. Aynı etki, DNA hasarını indükleyerek mitokondriyel apoptoza sebep olan cisplatine de meydana gelmektedir. Ovaryum kanserlerinde ERK yolağı aracılığıyla indüklenen BECN1 otofaji indüksiyonuna sebep olmaktadır. Böylelikle kemoterapiye direnç kazanılarak tümör baskılanması engellenmektedir. (Guclu ve diğerleri, 2018)

Bütün bu veriler göz önüne alındığında otofajinin, tümör adaptasyonunu ve büyümesini indüklemenin yanında tümörde ilaç dirençliğine de sebep olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle kanser çalışmalarında otofajinin hedeflenmesi önemli bir yere sahiptir.

2.3.1.3. Kanserde Otofajinin Hedeflenmesi

Otofajinin kanserdeki rolü ile ilişkili yayınlar otofajinin hem tümör baskılanmasında hem de tümör indüksiyonunda rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Otofaji modülasyonu, kanser terapilerinin başarı oranını arttırmada ümit vadeden bir stratejidir. Bölüm 2.3.1.2’de ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi kemoterapi aracılığıyla indüklenen otofajinin hücre ölümünü baskıladığı, kanserli hücrelerin sağ kalımını arttırdığı, anti-kanser ilaçlara karşı direnç gelişimini indüklediği ve hepatosellüler karsinomlarda kök hücre benzeri özelliklere sahip hücrelerin indüksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kanser çalışmalarında anti-kanser ajanlar ile birlikte otofaji inhibisyonun sağlanmasının hasta sağ kalımını arttıracakı düşünülmektedir. (Belounis ve diğerleri, 2016) Buna paralel olarak, otofajinin genetik ya da farmakolojik olarak inhibisyonun tümör büyümesini yavaşlattığı birçok modelde gösterilmiştir. Bu bağlamda, Lizozom ile otofagozom birleşmesini engelleyerek otofaji modülasyonunda görevli CQ ve hidroksi klorokin (bu noktadan sonra HCQ olarak adlandırılacaktır) uygulanmasının, mesane kanseri ve pankreatik adenokarsinomlarda kanser hücre büyümesini baskıladığı klinik öncesi çalışmalarla gösterilmiştir. Ek olarak, kolorektal kanser hücrelerine CQ muamelesinin apoptoz indüksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir. (Rangwala ve diğerleri, 2014) HCQ’nun suda çözünebilen analogu olan Lys05 en yeni lizozotropik ajandır. Yapılan melanoma ve kolon kanseri zenograf modelleri ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar Lys05’in HCQ’dan daha yüksek anti-kanser etkisi olduğunu açığa çıkarmıştır. Buna ek olarak, yapılan bir in vivo çalışmada, Lys05’in BRAF inhibitörü ile kombin olarak kullanıldığında kanser inhibisyonunda oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. (Cechakova ve diğerleri, 2019) Bütün bunlara ek olarak, sınıf III PI3Kinaz kompleksinin eliminasyonunda görevli Spautin-1, (Schott ve diğerleri, 2018) otofagozomal uzamada görev olan Vps18 ve Vps34’ün inhibisyonunda görevli SAR405, otofajinin genel düzenleyicilerinden olan mTOR baskılanmasında görevli rapamisin gibi inhibitörler de kanser tedavilerinde önemli bir yere sahiptir.

Bu bağlamda kanser çalışmalarında otofajinin hedeflenmesi umut vadeden bir yaklaşımdır. Ancak otofaji mekanizmasında görevli bütün elemanların açığa çıkarılamamış olması bu alanda yapılan çalışmaları sınırlandırmaktadır. Otofaji mekanizmasının aydınlatılması kanser çalışmalarında daha etkili olabilecek inhibitörlerin keşfedilmesine olanak sağlayacağı gibi hali hazırda varolan inhibitörlerin kanser çalışmalarındaki etkinliği

arttırılabilir. Bütün bunlar göz önüne alındığında, kanser çalışmalarında otofaji inhibisyonunun önemli bir yer tuttuğu açıkça görülmektedir.

2.4. Wip1 fosfataz

PP2C ailesinin serin/treonin fosfatazları, hücre stres tepki yollarının evrimsel olarak korunmuş negatif düzenleyicileridir. Korunmuş bir N terminal fosfataz alanından ve katalitik olmayan C-terminal kısmından oluşan monomerik enzimler olarak işlev görmektedirler. Protein fosfataz 2C delta izoformu, bazal seviyelerde eksprese edilmektedir. Protein fosfataz 2C delta izoformu ekspresyonu, hücrelerin p53'e bağımlı bir şekilde genotoksik strese maruz kalmasından sonra kuvvetli bir şekilde indüklenmektedir. Yabani tip p53 ile indüklenen protein 1 (Bu noktadan sonra WIP1 olarak adlandırılacaktır) DNA hasar cevabı ile birlikte aktifleşerek p53'ün negatif regülasyonunu sağlamakta görevli bir fosfatazdır.(Pechackova ve diğerleri, 2017)

DNA hasar cevabı çeşitli stres cevapları ile aktifleşen PI3-kinaz benzeri protein ailesiyle indüklenmektedir. Çift zincir kırıklarında S1981 bölgesinden otofosforilasyonunu sağlayarak aktif forma geçen ATM ile tek zincir kırıklarında S482 bölgesinden otofosforilasyona uğrayarak aktif forma geçen ATR, CHK1'i S317 ve S345 bölgelerinden CHK2'yi ise Thr68 bölgesinden fosforilleyerek aktifleştirmektedir. Bu durum DNA hasar cevabında merkezi bir transkripsiyonel hedef olan p53 aktivasyonunu indüklemektedir. Aktif forma geçen p53 gelen sinyale bağlı olarak kısa zamanlı hücre döngüsü tutuklanması, otofaji, senesens, apoptoz gibi birbirinden farklı yolları aktif hale getirmektedir. (Blackford ve Jackson, 2017) WIP1 DNA hasar cevabını sonlandırmak için p53'ü direk olarak Ser15'ten defosforile ederek inaktif hale getirmektedir. Buna ek olarak, dolaylı yollardan da p53 inaktivasyonunu sağlayabilmek adına; Chk1 Ser345 bölgesinden, ATM Ser1981 ve S367 bölgelerinden, Chk2 Thr 68 bölgesinden defosforile hale getirmektedir. (Boutelle ve Attardi, 2021)

Apoptozun ve senesensin ana düzenleyicisi olan p53'ün, DDR proteinlerinin etkisizleştirilmesini takiben Wip1 aracılı inhibisyonun apoptozu ve senesensi baskıladığı dolayısıyla hücre sağ kalımını indüklediği bilinmektedir.(Lowe ve diğerleri, 2012) Bu nedenle meme, kolon gibi solid tümörlerde etkin bir rol oynayan Wip1, P53 modülasyonu üzerinden tümörögenezi indüklemektedir. Gen ismi PPM1D olarak bilinen Wip1 meme kanserlerinin yaklaşık %11inde aşırı eksprese edilen bir onkogendir. PPM1D ekspresyonu sadece meme

değil pankreas, kolon ovaryum gibi pek çok kanser tipinde ekspresyonu artmıştır. Bu nedenle kanser çalışmalarında PPM1D geninin baskılanması kanser çalışmalarında yeni bir perspektif olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bağlamda PPM1D modülasyonunda görevli M321237, SL-176, GSK2830371 gibi birçok inhibitör kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. (Deng ve diğerleri, 2020)

WIP1 fosfatazin p53 baskılaması aracılığıyla apoptoz inhibisyonuna ve hücre sağ kalımına sebep olduğu bilinirken Wip1'in otofajideki rolü literatürde belirsizliğini koruyan bir konudur. Özellikle otofaji başlangıç kompleksinde ihtiyaç duyulan ULK defosforilasyonunda WIP1 fosfatazin rolü açığa çıkarılmış değildir. 2016' da Torii ve ark. Sağlıklı hücre hatlarında genotoksik stres aracılığıyla indüklenen otofajide ULK defosforilasyonunu Wip1 aracılığıyla indüklediğinin gösterilmesi bu alanda yapılan ilk ve tek çalışmadır. Literatürde büyük bir boşluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.5. Çalışmanın Yapılmasının Amacı

Bir Ser/Thr fosfataz olan PPM1D/Wip1, normal hücrelerde genotoksik stresle p53'e bağlı olarak indüklenen DNA hasarı cevabında merkezi rolü olan anahtar faktörlerden biridir. Wip1'in insan kanserlerinin birçoğunda (meme, ovaryum, pankreatik, nöroendokrin, medulloblastoma, nöroblastoma, kolon karsinoma, NHL, non-hodgkin's lymphoma) regülasyonunun bozulduğu, amplifiye olduğu ve aşırı ifade edildiği görülmektedir. Regülasyonu bozulan ve aşırı ekspresse edilen Wip1'in ATM/ATR aracılı DNA hasarı cevabını, DNA tamirini, hücre döngüsü kontrol noktalarını, apoptozis, ve hücre senesens gibi global hücre stres cevaplarını negatif yönde regüle etmektedir. Wip1 diğer önemli bir hücre stres cevabı olan otofajiyi ise teşvik etmektedir.

Otofaji hücre içinde doğru çalışmayan organeller, yanlış katlanmış proteinler gibi çeşitli stres faktörlerine karşı lizozomla birleşerek enzimler vasıtasıyla parçalanmayı ve parçalanmış materyallerin tekrar kullanılmasını sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji doğru çalışmayan organellerin degradasyonu aracılığıyla aktifleştirebileceği gibi açlık ve oksijen yoksunluğu gibi metabolik stres faktörleri ile de etkinleştirebilmektedir. Tümör gelişiminin erken evrelerinde otofaji tümör baskılayıcı bir mekanizma iken ilerleyen süreçlerde tümör hayatta kalımı ve metastazın artmasında görevli olduğu gösterilmektedir.

Yapılan son çalışmalar otofaji sürecinin modülasyonu, ve otofajinin hedeflenmesinin anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi için umut verici olduğuna işaret etmektedir. Bu bağlamda özellikle kanserlerde onkogenik Wip1-otofaji ilişkisinin araştırılması daha da önem kazanmaktadır. Normal hücrelerde DNA hasarıyla aktifleşen Wip1 otofajinin aktivasyonunda önemli bir protein olan ULK1'i defosforile ederek DNA hasarına cevaben otofaji aktivasyonunu teşvik etmektedir. Kanserlerde ise herhangi bir genotoksik stres olmaksızın zaten aktif halde bulunan Wip1'in otofajiyi teşvik edip etmediği bilinmemektedir. Özellikle metabolik stres indüklü otofajinin bir türü olan besin yoksunluğuyla indüklü otofaji, ULK1'in defosforile olmasıyla aktifleşen bir mekanizmadır. Bu mekanizmayla aktifleşen otofaji yolu net bir şekilde karakterize edilmişken bu yolun aktivasyonunda Wip1'in rolü olup olmadığı henüz araştırılmamış bir konu olmayı sürdürmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Dizisi

Tez çalışması boyunca, ATCC tarafından ticari olarak üretilmiş meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve nöroblastoma olan SH- SY5Y kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan kimyasalların ve besiyerinin listesi

Ürün	Firma
Proteaz İnhibitör Cocktail	
Sodyum Hidroksit	SIGMA-ALDRICH
DMEM-HA	Gibco
HBSS	Gibco
Fetal Bovin Serum	Gibco
Penisilin Streptomisin	MultiCell
Tris-base	AppliChem
Glycine	ChemCruz®
Sodyum Dodesil Sülfat	BioShop®
Sodyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Potasyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)	SIGMA®

Gliserol	BioShop
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS),	SIGMA®
Merkaptoetanol	SIGMA®
Magnezyum Klorür	SIGMA
Amonyum Persülfat	SIGMA
Bromfenol Blue	SIGMA-ALDRICH
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
Skim Milk	Fluka®
Bowin Serum Albumin	ChemCruz
Sodyum Deoksikolat	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Ortovanadat	SIGMA-ALDRICH

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan antikorların listesi

Ürün	Firma
LC3 I/II	ProteinTech
P62	ProteinTech
ULK, p-ULK(Ser555)	Cell Signaling
ULK, p-ULK(Ser757)	Cell Signaling
ULK, T-ULK	Cell Signaling
Wip1	SantaCruz
HIF-1 α	BD Transduction Laboratories
GAPDH	Proteintech
Anti-mouse IgG	Proteintech
Anti-rabbit IgG	Proteintech

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan malzemelerin listesi

Ürün	Firma
75'lik Steril Flask	SARSTEDT
1,5 ml'lik Eppendorf	AXYGEN
15 ml'lik Steril Falkon	Greiner
50 ml'lik Steril Falkon	Greiner
1,8 ml'lik Steril Dondurma Tüpü	Thermo Scientific
12 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
24 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
48 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
96 Kuyucuklu Steril Plate	Corning
20cm'lik steril petri	Grainer
10cm'lik Steril Petri	SARSTEDT
5 ml'lik Steril Tek Kullanımlık Pipet	SARSTEDT
10 ml'lik Steril Tek Kullanımlık Pipet	SARSTEDT
25 ml'lik Steril Tek Kullanımlık Pipet	SARSTEDT
PVDF Membran	Bio-Rad
75'lik Steril Flask	SARSTEDT
Filtre Kağıdı	Macherey- Nagel

3.1.5. Kullanılan Kitler

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan kitlerin listesi

Ürün	Firma
BCA Assay Kit	TaKaRa

Annexin V Muse Kit	Muse
--------------------	------

3.1.6. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Tablo 5. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi

Ürün	Firma
Steril Kabin	AirStream
İnkübatör	NUAIRE
Su Banyosu	Nüve
Muse Hücre Analiz Cihazı	Muse
Otoklav	HIRAYAMA
Sıvı Azot Tankı	MRC
Dikey Jel Elektroforezi	BIO-RAD
Görüntüleme Cihazı	Chemidoc-It ² 510 İmager
Transfer Cihazı	BIO-RAD
Güç Kaynağı	Thermo
Inverted Mikroskop	Euromex
Vorteks	Iso-Lab
Manyetik Karıştırıcı	IKA
pH Metre	Hanna Instruments
Mikro Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Kriyo-Dondurucu Kap	Nalgene
Modüler İnkübatör Chamber	Billups Rottenberg
Spektrofotometre	Thermo
Floresan Mikroskop	Olympos

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tablo 6. Çalışmada kullanılan hücrenin özellikleri ve tipi

Kullanılan Hücre Tipleri ve Özellikleri		
Hücre Adı	MCF-7	SH-SY5Y
ATCC Kodu	HTB 22 TM	CRL-2266
Büyüme Özelliği	Adherent	Adherent ve Süspanse
Organizma	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Hücre Tipi	Epitelyal	Epitelyal
Doku	Meme Salgı Bezi	Kemik İliği
Hastalık	Adenokarsinom	Nöroblastoma

Çalışma boyunca kullanılan MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatları %89 DMEM-HA besiyeri ortamında %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve % 1 Penisilin-Streptomisin ile kültüre edilmiştir. Hücreler yukarıda ifade edildiği biçimde tamamlanmış DMEM-HA besiyeri ve % 5 CO₂ içeren 37°C ısı inkübatör aracılığı ile kültüre edilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması 75 cm² flasklar ile sağlanmıştır. Flaskın hücre yoğunluğu %70'e ulaştığında hücreler ATCC'de belirtilen oranlarda (MCF7 için 2-6 arası; SH-SY5Y için 4-10 arası) haftada 2-3 kez pasajlanmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

MCF-7 hücreleri kullanılan flask yüzeyinin %70'ine ulaştığında 2-6 aralığında pasajlanmıştır. SH-SY5Y hücrelerinde ise hücre yoğunluğu 1x10⁶'ya ulaştığında 4-10 arasında pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde ilk olarak kullanılmış besi yeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmalı ve PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücreler inkübatörde bekletilmiştir. Kullanılan hücre tipine göre inkübatörde bekleme süresi değişmekle beraber MCF-7 için bu süre 4-5 dakika iken SH-SY5Y

için bu süre 2-3 dakika aralığındadır. Daha sonra Trypsin-EDTA solüsyonun aktivasyonunu durdurmak ve hücreleri kaldırmak adına tamamlanmış DMEM-HA besi yeri ile pipetaj yapılmıştır. Bu basamaktan sonra hücreler istenilen oranda blnmştir ve dondurularak saklanmıştır..

3.2.3. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği

Dondurma besi yeri içeriği: %42 DMEM- HA (complete medium)

%50 Fetal Bovin Serum (FBS)

%8 DMSO

Deneylerin devamlılığının sağlanabilmesi için kültürde bulunan sağlıklı hücrelerin bir kısmı dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Bu işlem için bölüm 3.2.2’de 1X Trypsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılan hücrelerin üzerine eklenen tamamlanmış DMEM-HA besiyerinin uzaklaştırılabilmesi için hücreler steril falkona alınmıştır. Ardından 1300 rpm, 4°C’de, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından pelet dondurma besi yeri ile süspanse hale getirilmiştir. Bu basamaktan sonra, dondurma tüplerine 1’er ml olacak şekilde eklenmiştir. Dondurma tüpü -80°C’de Mr. Frostie’de bir gece muhafaza edilmektedir. Daha sonra dondurma tüpü sıvı azot tankına alınarak -196°C’de saklanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin zdrlp Kullanılması

Sıvı azotta stoklanmış olan hücreler 37 °C’lik su banyosunda hızlıca zdrlmştir. zlmş olan hücreler 15 ml’ lik steril falkona aktarılmıştır. zerine 2ml tamamlanmış DMEM-HA besiyeri ilave edilerek 1300rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. zerine tamamlanmış DMEM-HA besiyeri eklenerek hücreler süspanse hale getirilmiştir. Süspanse haldeki hücrelerin bir kısmı hücre sayımı için ayrılmıştır. Yapılan sayımdan sonra hücre yoğunluğuna bağlı olarak uygun boyuttaki flaska ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Hücrelerin Sayım Yöntemi

Hücre kültürü çalışmalarında gerek yeni açılan hücrelerin canlılığına bakılabilmesi gerek yapılan deneylerin optimizasyonunun sağlanabilmesi için hücre sayımı yapılmaktadır. Kültür ortamındaki hücrelerin ölü ve canlı oranlarının belirlenmesi için hücre süspansiyonu ve tripan mavisi 1:1 (v:v) oranında birbirine karıştırılmıştır. Daha sonra karışımdan 10µl alınarak Neubauer lamına mikro pipet yardımıyla aktarılmıştır. Neubauer lamı ışık mikroskopunda görüntülenmektedir. Canlı hücreler şeffaf görünürken, ölü hücreler ise tripan mavisinin hücre içine girmesinden dolayı koyu mavi görülmektedir. 4 ayrı büyük kare içerisine düşen hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra bu sayıların ortalamaları alınmıştır. Bu işlemin ardından ortalama değer dilüsyon faktörü ve 10^4 sabiti çarpılarak 1 ml’de ne kadar canlı hücre olduğu bulunmuştur. Ölü ve canlı hücre sayısı birbirine oranlanarak canlılık yüzdesi bulunmuştur.

3.2.6. İlaç Stoklarının Hazırlanması

Klorokin (CQ), ilk olarak sıtma karşıtı bir ajan olarak üretilmiş olup süreç içerisinde otofajiyi düzenlemedeki rolü keşfedilmiştir. Bir otofaji inhibitörü olarak kullanılan CQ, lizozom ve çevresinde protonlanarak lizozomun pH’nı arttırmaktadır. Bu durumda lizozomik enzimler çalışmamaktadır. Böylelikle CQ, otofajinin son basamağı olan otolizozom oluşumunu otofagozom ile lizozomun birleşmesini engelleyerek inhibe etmektedir. Buna ek olarak, otofaji inhibisyonunda sıkça kullanılan bir ajan olan CQ’nun pankreas ve meme gibi çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklediğine dair yayınlar bulunmaktadır. (Jia, Xue et al. 2018)

Wip1’in spesifik antagonisti olan GSK2830371, Gilmartin ve Ark. Tarafından 2014 yılında keşfedilmiş bir moleküldür. Wip1 üzerindeki RRA (Wu ve ark, 2018) VA peptidine spesifik olarak bağlandığı bilinmektedir. Buna ek olarak, GSK2830371 übikütün bağımlı Wip1 degradasyonuna sebep olduğu için Wip1’i protein seviyesinde inhibe etmekteesine karşın mRNA seviyesinde bir değişiklik olmamaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan klorokin ve GSK2830371 ticari olarak temin edilmiştir. GSK2830371 konsantrasyonu 100mM olacak şekilde DMSO’da çözülerek -20’de 1 ay kadar saklanacak şekilde stoklanmıştır. Ancak klorokinin çözgen maddesi su olduğu için kullanılan

ajanın tazeliğini koruyabilmesi açısından stok hazırlanmamış olup her denemede taze olarak hazırlanmıştır.

3.2.7. Hücrelerin İnkübasyon Koşullarının Hazırlanması

Hipoksi indüklü otofajinin varlığı ve yokluğunun kanser hücrelerindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatları normoksik ve hipoksik ortamlarda inkübe edilmiştir. Hücrelerin inkübe edildiği normoksik koşullar %20 oksijen, %5 CO₂ ve %90 nem oranını içermektedir. Hipoksik koşullar ise yaklaşık %1 oksijen, %5 CO₂ ve %90 nem oranını içermektedir. Bu koşullar modüler inkübatör chamber ile sağlanmaktadır. Hipoksik koşulunun sağlanabilmesi için hücreleri chamber'a yerleştirmeden chamber tabanına distile su ile ıslatılmış peçete konulmaktadır. Hücrelerin bu peçetenin üstüne yerleştirilmesinin ardından chamber kapatılmaktadır. Kapatılan chamberın ucunda iki hortumunda kapağı açılarak yaklaşık 10 dakika %95'lik N ve %5'lik CO₂ karışım gaz muamelesi başlamaktadır. 10 dakikanın sonunda gaz çıkış hortumu kapatılarak 2-3 dakika chamber karışım gaza maruz bırakılır. Ardından gaz giriş hortumu da kapatılarak hipoksik ortam hazır hale getirilmektedir.

Açlık ortamının hazırlanabilmesi için ise ticari olarak temin edilen kalsiyum ve magnezyumlu 1x HBSS kullanılmaktadır. Tamamlanmış besiyeri uzaklaştırılmış hücreler 1x PBS ile yıkandıktan sonra hücreler belirlenen sürelerde HBSS ile muamele edilmiştir.

3.2.8. Hücre Kültürü Çalışmalarının ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanışı

Yapılan çalışmada, MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatları iki farklı metabolik stres ile muamele edilmiştir. Buna ek olarak, iki farklı metabolik stres tipinde de hücre hatları; otofaji inhibitörü olan Klorokin ve Wip1 inhibitörü olan GSK2830371 muamele edilmiştir. Yapılan ön denemeler ve literatür araştırmaları göz önüne alındığında otofaji indüksiyonu için gerekli olan hipoksik koşullar hem MCF-7 hem de SH-SY5Y hücre hatları için 24 saat olarak belirlenmiştir. Aynı biçimde açlık ile indüklenen otofaji koşulları; MCF-7 için 8 saat, SH-SY5Y için ise 4 saat olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak yapılan denemeler ve literatür taramalarının sonunda MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında klorokin ve GSK2830371 dozları belirlenmiştir. Dozların

ve sürelerin belirlenmesinin ardından MTT, Annexin V, western blot analizi, immünflorasan, immünpresipitasyon, koloni formasyonu teknikleri uygulanmıştır.

3.2.8.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Otofaji İndüksiyonun Hazırlanışı

Çalışmalarda kullanılan steril sarf malzemeler çalışmanın türüne göre değişiklik göstermektedir. Annexin V analizi için 48 kuyucuklu plaklarda, MCF-7 için her kuyucukta 1ml içerisinde 1×10^4 , SH-SY5Y için ise 1×10^5 hücre olacak şekilde ayarlanmaktadır. Western blot analizleri için; 10cm'lik petride 6ml içerisinde 1×10^6 hücre, immünçöktürme yöntemi için ise 20cm'lik petride 1×10^{12} hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. Koloni formasyonu deneyi için ise 12 kuyucuklu plaklarda her bir kuyucukta 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmalıdır. LC3 A/B immünfloresan boyaması için 48 kuyucuklu plaklara 25×10^3 , vakuol boyaması için ise 12 kuyucuklu plaklara 3×10^4 hücre ekilmelidir.

Yapılan çalışmada, normoksik ve hipoksik koşullar altında hücreler 24 saat muamele edilmiştir. Normoksik ve hipoksik koşullar için optimize edilen gruplar her bir hücre hattı için aşağıdaki gibidir;

MCF-7 için;

1. Kontrol
2. Dmso
3. CQ (10 μ M)
4. GSK2830371 (5 μ M)

SH-SY5Y için;

1. Kontrol
2. Dmso
3. CQ (10 μ M)
4. GSK2830371 (1 μ M)

DMSO bu çalışmada GSK2830371'nin çözücü kontrol grubu olarak kullanılmıştır. DMSO çözücü miktarı, gruplar arasında son konsantrasyonu en yüksek olan GSK2830371 grubu baz alınarak hesaplanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlar stok ilaç çözeltisi içerisinde besiyeri ile seyreltilerek hücrelere verilmektedir. Hücreler normoksik ve hipoksik ortamlarda 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Yapılan çalışmada, açlık koşulları altında hücreler MCF-7 için 8 saat, SH-SY5Y için ise 4 saat muamele edilmiştir. Açlık koşulları için optimize edilen gruplar her bir hücre hattı için aşağıdaki gibidir.

MCF-7 için;

1. Kontrol
2. Dmso
3. CQ (10 μ M)
4. GSK2830371 (5 μ M)
5. HBSS
6. HBSS+ CQ
7. HBSS+ GSK

SH-SY5Y için;

1. Kontrol
2. Dmso
3. CQ (10 μ M)
4. GSK2830371 (5 μ M)
5. HBSS
6. HBSS+ CQ
7. HBSS+ GSK

İmmün çöktürme (IP) yöntemi için açlık indüksiyonunda MCF-7 ve SH-SY5Y için belirlenen gruplar:

1. Kontrol
2. CQ
3. HBSS olarak belirlenmiştir.

Hipoksi indüklü otofaji için belirlenen IP grupları:

Normoksi;

1. Kontrol
2. CQ

Hipoksi;

1. Kontrol
2. CQ Olarak belirlenmiştir.

3.2.8.2. MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında MTT Analizi

MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi, metabolik aktivite ölçen kolorimetrik, non-radyoaktif, spektrofotometrik bir analizdir. Canlı hücrelerde bulunan mitokondriyel süksinat dehidrojenaz enzimi aracılığı ile tetrazolium tuzlarının formazona dönüşmesi ile sarı renkli MTT boyası mora dönmektedir. Bu dönüşüm spektrofotometrede 500-600 nanometre aralığında ölçülerek yapılmaktadır.

MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında, GSK2830371 (GSK) ve Klorokin (CQ)'in normoksik, hipoksik ve açlık koşullarına verdiği yanıt gözlemlenmiştir. Bu test ile GSK ve CQ'nun ilgili süre ve konsantrasyonlarda metabolik aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. 96 kuyucuklu steril plaklarda her bir deney grubu için ayrı ayrı üçer kuyucuk belirlenmiştir. Her bir kuyucuğa 100µl tamamlanmış besiyeri içerisinde MCF-7 için 8×10^3 SH-SY5Y için ise 9×10^3 hücre aktarılmıştır. Açlık indüklü otofaji için hücreler bölüm 3.2.8.1. de bahsedildiği şekilde ilgili gruplar tamamlanmış besiyeri ve HBSS ile muamele edilmiştir. MCF-7 için 8 saat, SH-SY5Y için ise 4 saat 37 °C'de açlık indüksiyonu sağlanmıştır. Süre sonunda 10µl MTT

solüsyonu eklenerek 37°C’de %5 CO₂ içeren ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kristalleri çözmek için her bir kuyucuğa 100µl DMSO eklenerek kristallerin çözülmesini kolaylaştırmak adına plate çalkalayıcıda 2 dakika en yüksek hızda çalkalanmıştır. Ardından örnekler 570nm dalga boyunda spektrofometrede ölçülmüştür.

Hipoksi indüklü otofaji için ise hücreler bölüm 3.2.8.1. de bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu steril plaklara hücre ekimi yapıldıktan sonra gruplar hipoksik ve normoksik koşullarda 37 °C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu eklenmiş ve hücreler tekrar ilgili koşullara yaklaşık olarak 4 saat maruz bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kristalleri çözmek için her bir kuyucuğa 100µl DMSO eklenmiştir. Kristallerin çözülmesini kolaylaştırmak adına plate çalkalayıcıda 2 dakika en yüksek hızda çalkalanmıştır. Ardından örnekler spektrofometrede 570nm dalga boyunda ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri % Canlılık = $(A_{İLAC} \times 100 / A_{KONTROL})$ formülüne göre hesaplanmıştır. Bu değerler daha sonra ‘Origin 2019b’ programı aracılığıyla grafiğe aktarılarak değerlendirilmiştir. ($A_{İLAC}$: İlaç uygulanan grubun absorbans değeri, $A_{KONTROL}$: Kontrol grubunun absorbans değeri)

3.2.8.3. Annexin V apoptozis testi

Hücre sitozolik kısmında bulunan fosfatidilserin, apoptotik hale gelen hücrelerde çift zarlı membran yapısının ekstrasellüler kısmına doğru flip-flop hareketi yapmaktadır. Annexin V testi ise ekstrasellüler kısma lokalize olan fosfatidilserinlere bağlanarak apoptotik hücre sayısını belirlemeye yarayan bir uygulamadır. Apoptotik ve sağlıklı hücrelerin kantitatif analizi muse hücre analizörü kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Bölüm 3.2.8.1.’de anlatıldığı üzere HBSS ve hipoksi ile hücreler belirtilen sürelerde muamele edildikten sonra (MCF-7; HBSS ile 8 saat, hipoksi ile 24 saat/ SH-SY5Y; HBSS ile 4 saat, hipoksi ile 24 saat) hücrelerin üzerlerindeki besi yerleri ependorflara toplanır. Hücreler 1X PBS ile yıkanır ve PBS uzaklaştırılır. Her kuyucuğa 100µl 1X tripsin eklenerek 37°C’de 3 dakika inkübe edilir. Ependorflara ayrılmış besi yerleri aracılığı ile tripsin aktivitesine son verilerek, hücreler kaldırılır ve ependorflara toplanır. Ependorflara toplanan hücreler 300xg’de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatanttan 100 µl kalacak şekilde pellete dokunmadan alınır. Her bir örneğin üzerine 100 µl ‘Annexin V’ solüsyonundan eklendikten sonra pelletler pipetaj yardımıyla yavaşça süspanse edilir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe

edildikten sonra muse hücre analiz cihazında ölçümü yapıldı. Ölçüm sonucunda elde edilen değerler daha sonra 'Origin 2019b' programı aracılığıyla istatistik analizleri yapılmış ve grafiğe aktarılarak değerlendirilmiştir.

3.2.8.4 Western Blot analizi için yapılan çalışmalar

3.2.8.4.1. Protein İzolasyonu

Western blot analizi için Bölüm 3.2.8.1'de belirtildiği gibi hazırlanarak belirlenen sürelerde (MCF-7; HBSS ile 8 saat, hipoksi ile 24 saat/ SH-SY5Y; HBSS ile 4 saat, hipoksi ile 24 saat) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 1X PBS ile 1 kez yıkanmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Petrilerin her birine 150µl olacak şekilde RİPA lizis tamponundan eklenmiştir. Buz üzerine alınan petriler 5 dakika orbital çalkalayıcıda sallanmıştır. Daha sonra petri üzerindeki hücreler scraperla kazınarak eppendorflara toplanmıştır. Ardından eppendorflar, 4°C'de 450 rpm'de 45 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalanmıştır. Son basamakta ise örnekler 4°C'de 13500 rpm'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben çöken DNA pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylece protein izolasyonu tamamlanmış olur.

Protein izolasyonu için kullanılan RİPA lizis bufer içeriği aşağıda verilmiştir.

RİPA Lizis Buffer İçeriği (100 ml Stok İçin): 5 ml Tris-HCl (50Mm, pH: 7,4), 0,876 ml NaCl (150mM), 0,2 ml EDTA (1mM), 0,1 g SDS, 0,5 g Sodyum deoksikolat, 1 ml NP40

Kullanmadan önce stok içerisinden 12ml bir falkona alınır. İçersine 120 µl 100mM Na₃VO₄ ve yarım tablet proteaz inhibitör kokteyl eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

3.2.8.4.2. Protein Miktar Tayini

Protein izolasyonu yapılan örneklerin total protein miktarının belirlenmesi için TaKaRa BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır. Bu kit içerisinde bulunan BSA standart olarak kullanılmak üzere $\mu\text{g/ml}$ değerleri sırasıyla 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50 ve 0 olacak şekilde seyreltilerek distile su içerisinde hazırlanmıştır.

Miktar tayini yapılacağı zaman 96 kuyucuklu plate içerisinde iki tekrar şeklinde her bir standarttan 20 μl eklenir. Ardından miktarı belirlemek için örnekler 1:10 dilüsyonu yapılarak iki tekrar şeklinde 20 μl eklenir. Kör olarak ise protein izolasyonu RİPA lizis tamponu içerisinde yapıldığı için aynı şekilde o da örnek gibi 1:10 dilüsyonundan 20 μl alınarak iki tekrar şekilde eklenir. Kit içerisinde bulunan A ve B solüsyonundan miktarı örnek sayısına bağlı olarak 100:1 oranında karıştırılır. Her bir standart, örnek ve körün üzerine 200 μl eklenerek etüv içerisinde 20 dakika 37 °C’de inkübe edilir. Ardından plate 562nm’de spektrofotometrede ölçümü yapılır.

Yapılan ölçümün ardından örnekler 150 μg olacak şekilde hesaplanır. Ardından ependorfpların içerisindeki örneklere 6X loading dye ilave edilir. Daha sonra örnekler 95 °C’de 5 dakika inkübe edilir bu sayede proteinlerin denatürasyonu sağlanmış olur.

6X Loading Dye (10 ml) : 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH: 6,8), 5 ml Gliserol+H₂O (4:1), 1 g SDS, 900 μl Merkaptotanol, % 0,06 Bromfenol blue, Distile su

3.2.8.4.3. Western Blot analizi

SDS-PAGE (SDS- Poliakrilamid Gel) elektroforezi elektrik akımı aracılığı ile proteinler molekül ağırlıklarına göre ayırmaktadır. Camlar temizlendikten sonra stand üzerine yerleştirilir. İzopropanol ile sızıntı yapıp yapmadığı kontrol edildikten sonra, bakılacak proteinin molekül ağırlığı baz alınarak hazırlanan ayırıcı jel dökülür. Jel kırıkları oluşmasın diye alt jel döküldükten sonra izopropanol eklenerek 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerleşme reaksiyonunun meydana gelmesi beklenir. Ardından üst jel Tablo 7’deki gibi hazırlanır. İzopropanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra, üst jel dökülür. Dökülmesinin hemen ardından hızlı bir biçimde camlar arasına taraklar yerleştirilir ve üst jel polimerizasyonu için beklenir.

Tablo 7. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları

Bileşenler	2X Paketleyici Jel	2X Ayırıcı jel konsantrasyonları		
	%3	%8	%10	%15
Distile su	2,862 ml	6,230 ml	5,55 ml	4,8 ml
Upper Buffer	1,134 ml	-	-	-
Lower Buffer	-	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml
%40 Akrilamid/bisakrilamid	0,450 ml	3,6 ml	4,5 ml	6,75 ml
%10 SDS	45 µl	180 µl	180 µl	180 µl
Gliserol	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	5,6 µl	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl
%40 APS	4,5 µl	9 µl	9 µl	9 µl

Jeller hazır olduktan sonra yürütme işlemine geçilir. Camlar kasetlere dikkatli bir biçimde yerleştirilir. Dikey jel elektroforezine yerleştirilen kasetlerin ardından, 1X Running Buffer eklenir ve taraklar dikkatli bir biçimde çıkarılır. Ardından örneklerin kuyucuklara yüklenmesi basamağına geçilir. Bölüm 3.2.8.4.2’de hesaplandığı şekilde örnekler kuyucuklara yüklenir. Tankın kapağı kapatılarak yürütme basamağına geçilir. Örnekler stacking jelden seperating jele gelene kadar 90 voltta 40 dakika seperating jelde ise 120 voltta 100 dakika yürütülür.

Molekül ağırlıklarına göre jelde ayrılmış olarak bulunan proteinler daha sonra nitroselüloz veya polivinilidin difluorid (PVDF) membrana transfer edilmektedir. Blotlama olarak adlandırılan bu basamak yarı kuru (semi-dry) blotlama metodu ile yapılmış olup bu basamağın sonunda proteinler membrana aktarılmış olur. Yürütme işleminin sonunda kasetler dikkatli bir biçimde tanktan çıkarılır. 9 cm eni 7 cm boyu olacak şekilde kesilen PVDF membran 5 dk aktifleşmesi için %100 metanollü ortamda bekletilir. Bu sırada blotlama kağıtlarından 11cm eni 15cm boyu olacak şekilde 12 adet kesilir. 6’şar 6’şar ayrılan bu kâğıtlar %20 metanollü towbin buffer ile ıslatılır ve blotlama kasedine yerleştirilir. Aktifleşen membran nemli blotlama kağıtlarının üzerine yerleştirilir. Ardından kasetten ve camdan ayrılmış olan ayırıcı jel membranının üzerine düz olacak şekilde yerleştirilir. Kalan 6 nemli blotlama kağıdı da jelin üzerine, jeli oynatmayacak şekilde yerleştirildikten sonra blotlama

kasedi dikkatli bir biçimde kapatılır. Blotlama işleminin süresi jel konsantrasyonuna göre artmakla birlikte, %15'lik jel için 0,4A° akım ve 25V'da 41 dakika, %8-10'luk jel için ise 0,4A° akım ve 25V'da 37 dakika olarak belirlenmiştir.

Blotlama işleminin ardından, membranda primer antikorların non-spesifik bölgelere bağlanarak kirlilik yaratmamasını sağlamak adına membran oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda %6 yağsız süt ile muamele edilir. Bu basamak bloklama olarak adlandırılmaktadır. Primer antikor muamelesinden önce, membran 2 dk 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcıda yıkanarak yağsız süt kalıntıları ortamdan uzaklaştırılır.

Tablo 8. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon katsayıları

Antikor	Dilüsyon Oranı
p-ULK (Ser555)	1:1000
p-ULK (Ser757)	1:1000
HIF-1 α	1:1000
T-ULK	1:1000
Wip1	1:500
LC3 I/II	1:1000
GAPDH	1:10000
P62	1:2000

LC3 A/B, p62, WIP1, p-ULK (Ser555), p-ULK (Ser757), HIF1 α , T-ULK ve internal kontrol olarak GAPDH antikorları primer antikor olarak kullanılmıştır. Primer antikor %5 BSA ile Tablo 8' de belirtilen oranlarda seyreltildikten sonra membran 16 saat +4°C'de orbital çalkalayıcıda sallanır. 16 saatlik inkübasyon süresinin sonunda primer antikor uzaklaştırılır. Membran oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika 1X TBS-T ile orbital çalkalayıcıda sallanır.

Primer antikor muamelesinin ardından, membran sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda sallanır. Sekonder antikor dilüsyonu % 6'lık yağsız süt ile Tablo 9' da gösterildiği gibidir. Sekonder uzaklaştırıldıktan sonra membran oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika 1X TBS-T ile orbital çalkalayıcıda sallanır. Yeni 1X TBS-T eklendikten sonra membran görüntülenmesi basamağına geçilir. Membran üzerine 1:1 oranında eklenen ECL

solüsyonu ile membran 5 dakika kadar karanlıkta inkübe edilir. Ardından ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazı ile görüntülenir.

Tablo 9. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyon katsayıları

Antikor	Dilüsyon
Anti-Mouse IgG-HRP	1:2000
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:2000

Western Blot için kullanılan tamponlar ve solüsyonlar aşağıda belirtildiği gibidir.

Lower Buffer (500 ml): 91 g Tris-base, 20 ml %10'luk SDS, 14 ml HCl (6N) üzeri 500ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve pH'ı 8,8'e ayarlanır.

%40 Amonyum persülfat: 0,4 g APS, 1 ml Distile su

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml): 3.03 g Tris-base, 14,4 g Glycin, 5 ml %10'luk SDS, Distile su (pH: 8,1-8,5) **Not:** Blotlama işleminden önce %20 metanol ilave edilmektedir.

10X Running Buffer (1L): 30 g Tris-base, 144 g Glisin, 15 g SDS, Distile su (pH: 8,6)

Upper Buffer (500 ml): 30,5 g Tris-base, 20 ml %10'luk SDS, 30 ml HCl (6N) üzeri 500ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve pH'ı 6,7'e ayarlanır.

1X Running Buffer (1L): 100 ml 10X Running Buffer, 900 ml Distile su (pH: 8,6)

10X TBS (1L): 30,2 g Tris-base, 43,8 g NaCl, 932 mg KCl

1X TBS-t (1L) : 100 ml 10X TBS, 900 ml Distile su, 1 ml Tween 20

%6' lık Süt Tozu (Skim Milk) Solüsyonu: 20 ml 1X TBS-t, 1,2 g Skim Milk

%5'lik Bovin Serum Albümin (BSA) Solüsyonu: 10 ml 1X TBS-t, 0,5 g BSA

PBS: 8 g NaCl, 1.43 g of $N_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 g of KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , distile su ile 1L'ye tamamlanır ve pH: 7,5 olacak şekilde ayarlanır.

3.2.8.5. İmmün Çöktürme Tekniği İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Bölüm 3.2.8.1’de bahsedildiği gibi hücreler 20 cm’lik petrilere ekilmiştir. Hipoksi ile hücreler 24 saat, HBSS ile MCF-7 6 saat, SH-SY5Y 4 saat muamele edilmiştir. İlaç süresinin bitiminden 1 gün önce beatler antikora muamele edilmelidir. Bu nedenle İlaç süresinin bitiminin bir gün önce her bir IP grubu için 20’şer µl beat pipet ucu kesilerek ependorflara alınır.

3.2.8.5.1. Beat- Antikor Etkileşiminin Sağlanması

Her bir ependorfun üzerine 1000 µl 1X PBS konur. 5200 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılır ve beatlere dokunmadan süpernatant ependorftan uzaklaştırılır. Daha sonra ependorfların üzerine 1000 µl RİPA konulur ve 5200 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant ortamdan uzaklaştırılır. 1000 µl RİPA (+) konulur 5200 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılır.

Santrifüjün sonunda ependorflarda 300 µl RİPA (+) kalacak şekilde bırakılır ve üzerine 7,5 µl Wip1 antikoru eklenir. Ependorfların kapakları parafilmle sıkıca kapatıldıktan sonra 16 saat +4°C’de rotatörde inkübe edilir.

3.2.8.5.2. Beat- Antikor Karışımının Proteinlerle Etkileşiminin Sağlanması

Belirlenen sürelerde ilaç muamelesinin tamamlanmasının ardından bölüm 3.2.8.4.1’de belirtildiği şekilde protein izolasyonu yapılır. Ardından bölüm 3.2.8.4.2’de belirtildiği gibi protein miktar tayini ile 2mg’a denk gelecek protein miktarı hesaplanır. Hesaplanan miktar kadar başka bir ependorfa alınarak etiketlenir. Yapılan hesaplamada 2 mg’a denk gelecek protein miktarı 300 µl’den az ise 300 µl’ye kadar RİPA (+) ile tamamlanmalıdır. Rotatörde dönmekte olan bead/antikor karışımı bölüm 3.2.8.5.1’de belirtildiği gibi 1’er dakikalık yıkamalara geçilir. Yıkamaların ardından protein lizatı beat/antikor karışımı ile birleştirilir. Ependorfların kapakları parafilmle sıkıca kapatıldıktan sonra 16 saat +4°C’de rotatörde inkübe edilir.

RİPA Lizis Buffer içeriği bölüm 3.2.8.4.1’de belirtildiği gibidir. Ancak proteaz inhibitör ve NaVO₃ eklenmemiş halidir. RİPA (+) buffer ise RİPA lizis buffera proteaz inhibitör eklenmiş halidir. (Her 10 ml RİPA lizis buffer için 100 µl proteaz inhibitör konulur.)

3.2.8.5.3. Western Blot Tekniği İle Etkileşimin Gözlemlenmesi

Rotatörde dönmekte olan ependorflar alınarak Bölüm 3.2.8.5.1’de belirtildiği şekilde seri yıkamalara maruz bırakılır. Son yıkama olan RİPA(+)'tan sonra ependorflarda 10 µl kalana kadar süpernatant çekilir ve 10 µl 6X loading dye eklenir. Daha sonra örnekler 95 °C’de 5 dakika inkübe edilir bu sayede proteinlerin denatürasyonu sağlanmış olur. Bölüm 3.2.8.4’te belirtilen western blot protokolü uygulanarak protein etkileşimleri gözlemlenir.

3.2.8.6. İmmüno Floresan Boyama İle İlgili Çalışmalar

Bölüm 3.2.8.1’de belirtildiği şekilde hücreler ekilmiş ve belirtilen sürelerde ve konsantrasyonlarda ilaç muamelesi yapılmıştır. Sürenin sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri ortamdan uzaklaştırılır. Kuyucuklar 1X PBS ile yıkanır. Ardından hücrelerin fiksasyonu için %100’lük soğuk metanol ile hücreler -20°C’de 5 dakika inkübe edilir. Sürenin sonunda metanol ortamdan uzaklaştırılır. Hücreler 1X PBS ile yıkanır. Ardından blokama basamağı için 1X PBS’te çözölmüş %2’lik BSA solüsyonu hazırlanır. Kuyucukların üzerlerini kaplayacak kadar BSA solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. Ardından LC3 immüno floresan boyası 1X PBS’te çözölmüş %1’lik BSA ‘ da 200:1 oranında dilüe edilmiştir. Ardından her bir kuyucuğa 50 µl antikor konulduktan sonra 16 saat +4°C’de inkübe edilir. Ertesi gün antikor ortamdan uzaklaştırılır. Hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Bu basamağın ardından DAPI boyamasına geçilmiştir. (dH₂O ile 1:2000 dilüsyon yapılmıştır.) Kuyucukların üzerlerini kaplayacak kadar DAPI konulduktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından DAPI ortamdan uzaklaştırılır. Floresan Mikroskopta görüntü alınmıştır.

3.2.8.7. Kolonojenik Assay İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Kolonojenik assay tek bir hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetini ölçen bir tekniktir. En az 50 hücreyi kapsayan topluluklar koloni olarak adlandırılmaktadır. Oluşan koloni miktarının büyüklüğü ve sıklığına bakılarak deney sonlandırılmalıdır. Yanlış sonuç almamak için deney başlangıcında belirlenen hücre sayısının hücre tipine göre değişmekle birlikte 10.000- 20.000 aralığında olmasına dikkat edilmelidir. Daha az hücre ekilmesi hücrelerin büyüme performansını etkilerken fazla hücre ekimi koloni oluşumunun gözlemlenmesine engel olmaktadır.

3.2.8.1’de bahsedildiği gibi 12 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler HBSS ve hipoksik ortama belirtilen sürelerde maruz bırakılmıştır. İlaç süresinin sonuna gelindiğinde besi yeri ortamdan uzaklaştırılır. Taze besi yeri ortama eklenir. Bu işlem her iki günde bir tekrarlanır. Her bir koloni en az 50 hücre içerdiğinde deney sonlandırılmalıdır. Bu süreç hücre tipine ve ekilen hücre sayısına göre değişmekle birlikte yaklaşık 10-15 gün aralığında değişmektedir. 10-15 günün ardından koloni boyamasına geçilir. Hücrelerin üzerlerindeki besi yeri uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerlerini kaplayacak kadar %100 soğuk metanol eklenir. Hücreler - 20°C’de 15 dakika fikse edilir. Bu sırada %20 metanol içeren solüsyona %0,5 gr crystal violet eklenerek boyama solüsyonu elde edilir. 15 dakikalık fiksasyonun ardından hücrelerin üzerlerindeki metanol ortamdan uzaklaştırılır. Üzerlerini kaplayacak kadar boyama solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında hücrelerin boyanması için inkübe edilir. Yaklaşık 10-15 dakikanın ardından kuyucuklar distile su ile birkaç defa yıkanır. Böylelikle ortamda bulunan boyama solüsyonunun fazlası uzaklaştırılmış olur. 12 kuyucuklu plaka kurumaya bırakılır. Ardından oluşan kolonilerin görüntülenmesi kolaylaşsın diye ters çevrilerek görüntülenir.

3.2.8.8. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi

Grafikler birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak ‘Origin 2019b’ programıyla hazırlanmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde ise; gruplar arasında ki anlamlı farklılıklar ‘One-Way ANOVA’ kullanılarak belirlenmiş olup $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Otofaji İndüksiyonu

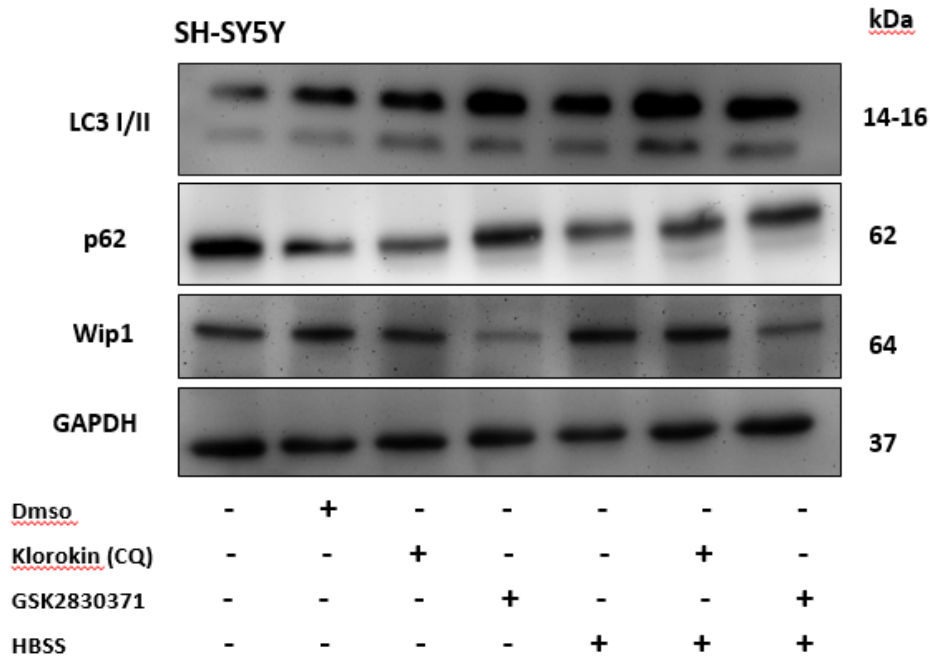
4.1.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Besin Yoksunluğu ile Otofaji İndüksiyonu

Metabolik stres indüklü otofaji, aminoasit yoksunluğu, total besin yoksunluğu, serum yoksunluğu gibi farklı stres koşullarında indüklenebilmektedir. Glikoz ve büyüme faktörlerinin bulunduğu hücre besiyerinin HBSS/ EBSS gibi solüsyonlarla yer değiştirmesi sonucu meydana gelen total besin yoksunluğu, açlık indüklü otofaji çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Buna ek olarak, otofaji indüksiyonu deneylerinin klorokin veya Baf A1 gibi otofaji inhibitörleri ile kurulması son derece büyük bir öneme sahiptir. (Cocco ve diğerleri, 2020) Bazı hücre tiplerinde görülen agregat eğilimli proteinlerin ekspresyonundaki artış otofajinin önemli bir belirteci olan LC3 nokta yapısıyla inkorpore olarak otofajinin indüklendiğini gösteren yanlış bir sinyal meydana getirmektedir. Dolayısıyla bu durumun önüne geçmek için otofaji deneylerinde bir otofaji inhibitörü olan klorokin varlığında gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Klorokin özellikle otofagozom ve lizozomun birleşmesini engelleyerek otofaji inhibisyonu sağlayan bir kimyasal inhibitördür. Literatürde yaygın şekilde otofaji inhibitörü olarak birçok çalışmada kullanılmıştır. (Yoshii ve Mizushima, 2017) Buna ek olarak, DNA hasar cevabında önemli bir yere sahip olan p53'ün inhibitörü Wip1 fosfatazin otofajiye olan etkileri tezin temel sorularından biridir. Literatürde yaygın şekilde Wip1 inhibitörü olarak kullanılan küçük allosterik inhibitör GSK2830371 (GSK) bu çalışmada da kullanılmıştır. GSK konsantrasyonu yapılan literatür analizi ve denemeler ile SH-SY5Y için 1µM, MCF-7 için 5µM olarak belirlenmiş olup kullanılan GSK dozunun Wip1 inhibisyonunda etkili olduğu western blot (bu noktadan sonra WB olarak bahsedilecektir) analizi ile Şekil 6 ve 7'de gösterilmiştir.

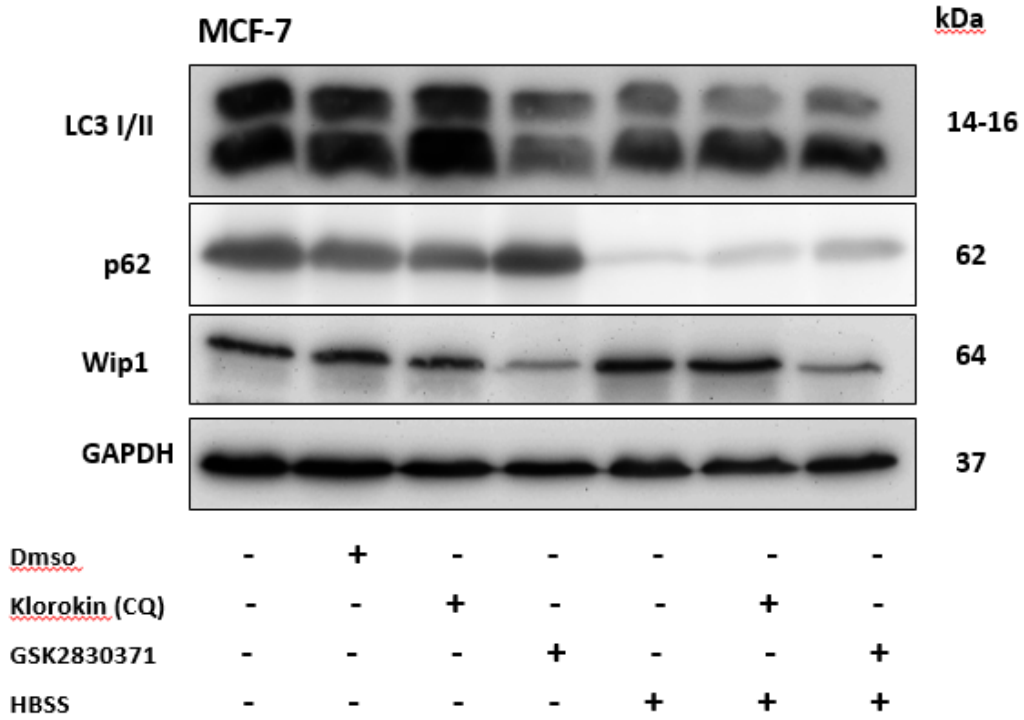
SH-SY5Y ve MCF-7 hücre hatlarında açlık indüklü otofaji varlığı HBSS ile sağlanmıştır. Yapılan literatür taramaları ve optimizasyon sonucunda MCF-7 hücrelerinde büyüme besiyerinin uzaklaştırılması ve yerine HBSS eklenerek 8 saatlik inkübasyonu ile otofaji indüksiyonu sağlanırken aynı yöntemle SH-SY5Y için 4 saatlik HBSS inkübasyonunun yeterli olduğu belirlenmiştir. Otofajik akış, otofaji kargo reseptörü olan p62(SQSTM1) gibi LC3I-II ile etkileşime giren ve Lys63-ubikitillenmiş proteinlere bağlanarak bunların otofajik degradasyona hedeflenmesini sağlayan spesifik otofajik substratların degradasyonunun gösterilmesine ek olarak LC3 I/II dönüşümü ile gösterilmiştir.

Şekil 6’da SH-SY5Y için Şekil 7’de ise MCF-7 hücre hattı için otofaji indüksiyonu LC3I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu için WB analizi ile gösterilmiştir. Yapılan literatür analizi ve optimizasyon çalışmaları sonucunda her iki hücre hattı için de inhibisyonu sağlayacak klorokin konsantrasyonu 10µM olarak belirlenmiştir. Klorokin varlığında otofaji inhibisyonunun gerçekleştiği p62 birikimi ve LC3 I/II dönüşümünün WB analizi ile test edilmiştir.(Şekil 6 ve 7)

Hem MCF-7 hem de SH-SY5Y hücre hatlarında tek başına ve HBSS+ GSK kombinasyon grubunda hem p62 akümüasyonunu hem de LC3I/II dönüşümünü indüklediği açıkça görülmektedir (Şekil 6 ve 7).



Şekil 6. SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji varlığının WB analizi



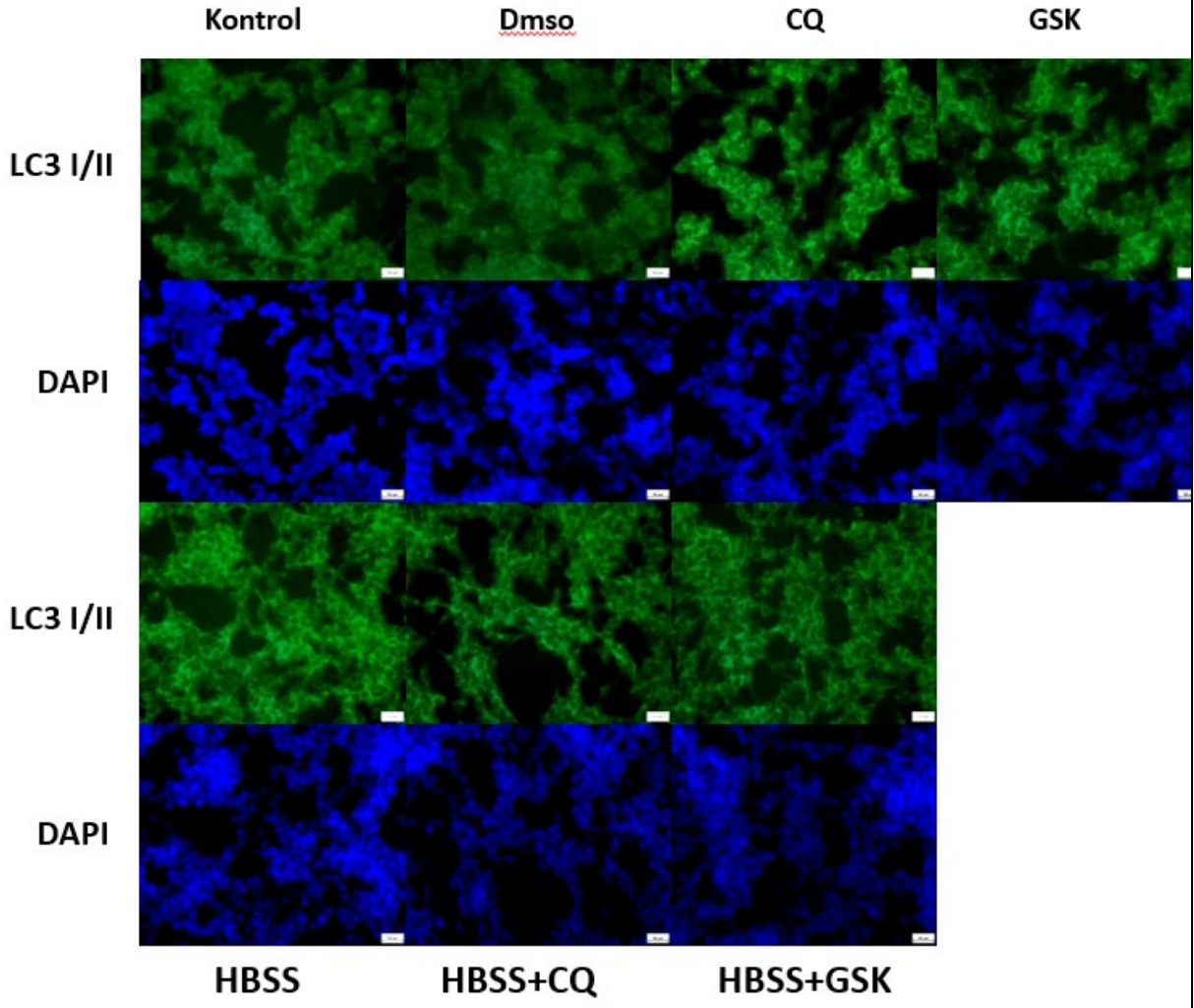
Şekil 7. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunun WB analizi

Yapılan western blot analizi ile her iki hücre hattı için de; belirlenen HBSS muamalesinin açlık indüklü otofajiyi tetiklediği, kullanılan CQ konsantrasyonunun otofaji inhibisyonu için yeterli olduğu ve kullanılan GSK konsantrasyonunun Wip1'i baskılamada etkili olduğu gösterilmiştir.

4.1.1.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Besin Yoksunluğu İle Otofaji İndüksiyonunda LC3 Punkta Oluşumu Formasyonu

Bölüm 4.1.1'de uygulanan WB analizine ek olarak, otofaji varlığını işaret eden bir başka temel belirteç olan LC3 nokta oluşumu immünfloresan yöntemi ile gösterilmiştir. Şekil 8'de SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığıyla LC3 punkta oluşumugösterilmiştir. LC3 I/II punkta oluşumunun kontrole kıyasla HBSS, CQ ve HBSS+CQ gruplarında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Tek başına GSK uygulamasının yapıldığı grupla kontrol arasında farklılık gözlemlenmemesine karşın HBSS+GSK grubu ile HBSS grubu kıyaslandığında LC3 I/II sinyalinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir.

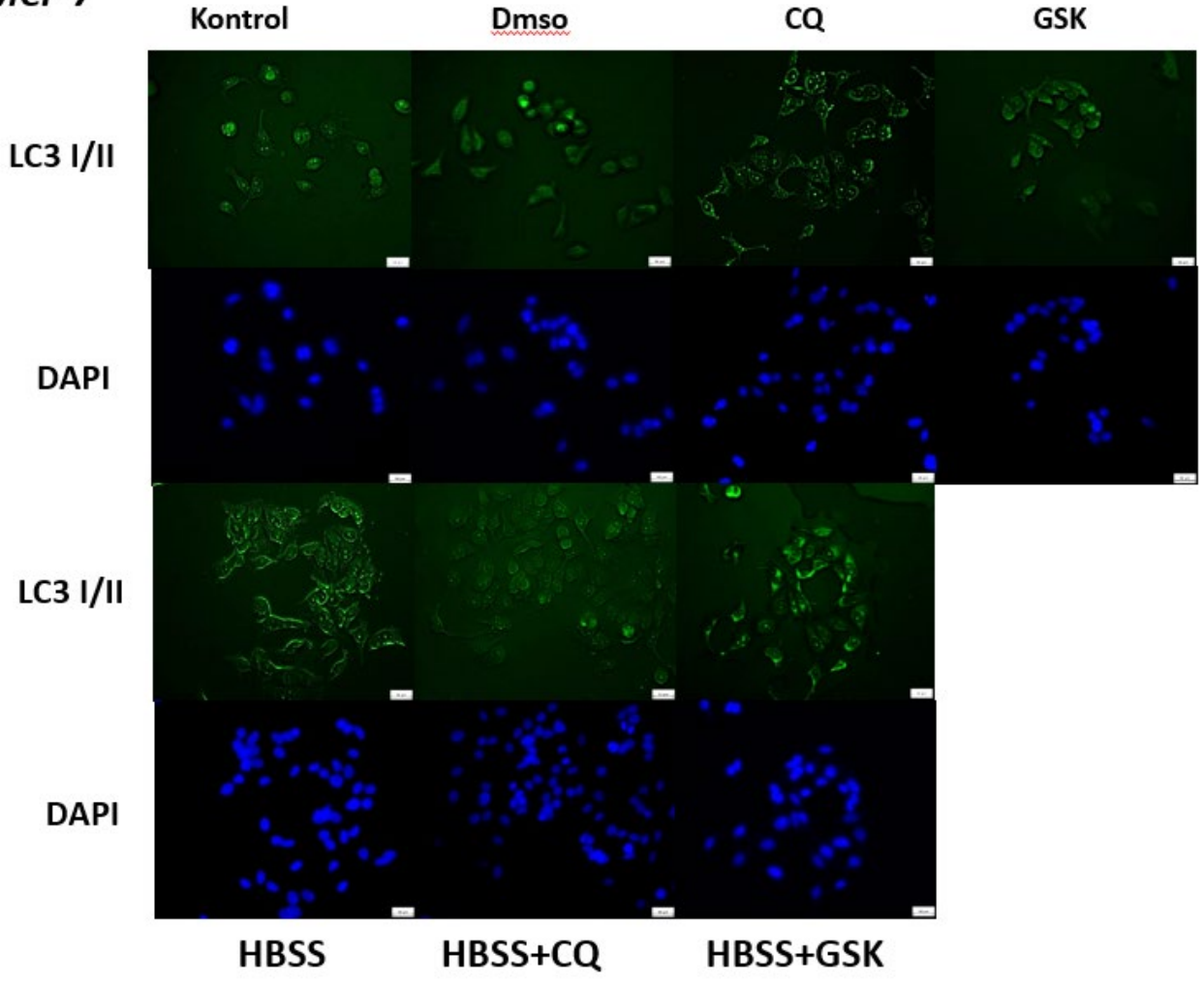
SH-SY5Y



Şekil 8. SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunda LC3 punkta oluşumu

Şekil 9’de MCF-7 hücre hattında HBSS uygulamasının LC3 punkta formasyonuna olan etkileri gösterilmiştir. MCF-7 hücre hattında LC3 dönüşümünün kontrole kıyasla HBSS, CQ ve HBSS+CQ gruplarında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Kontrole kıyasla GSK grubunda LC3 I/II nokta formasyonunda artış gözlemlenmezken HBSS+GSK grubu ile HBSS grubu kıyaslandığında LC3 sinyalinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir.

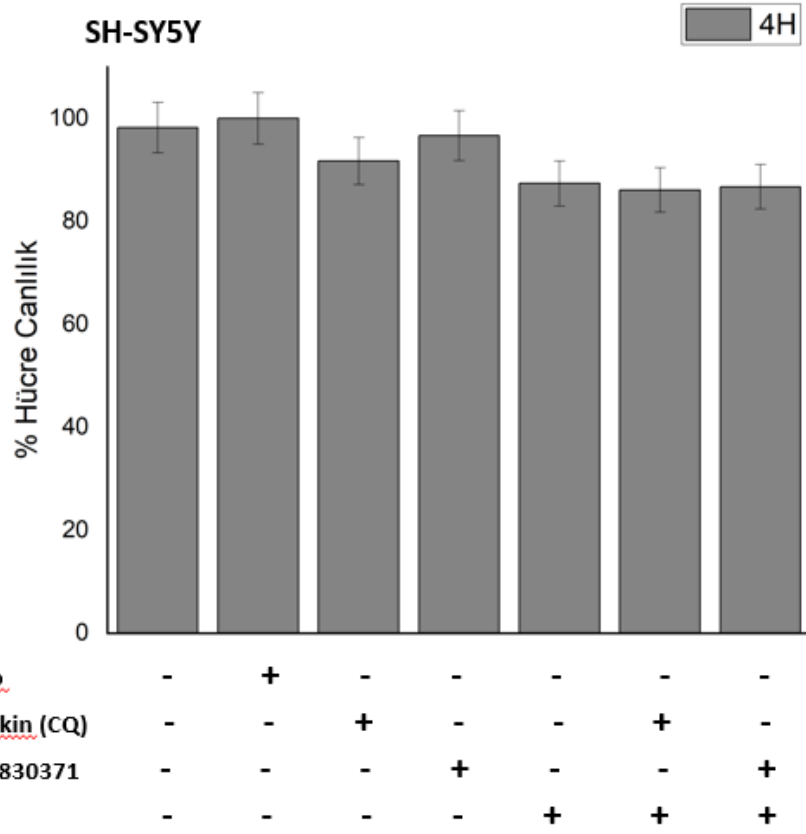
MCF-7



Şekil 9. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunda LC3 punkta oluşumu

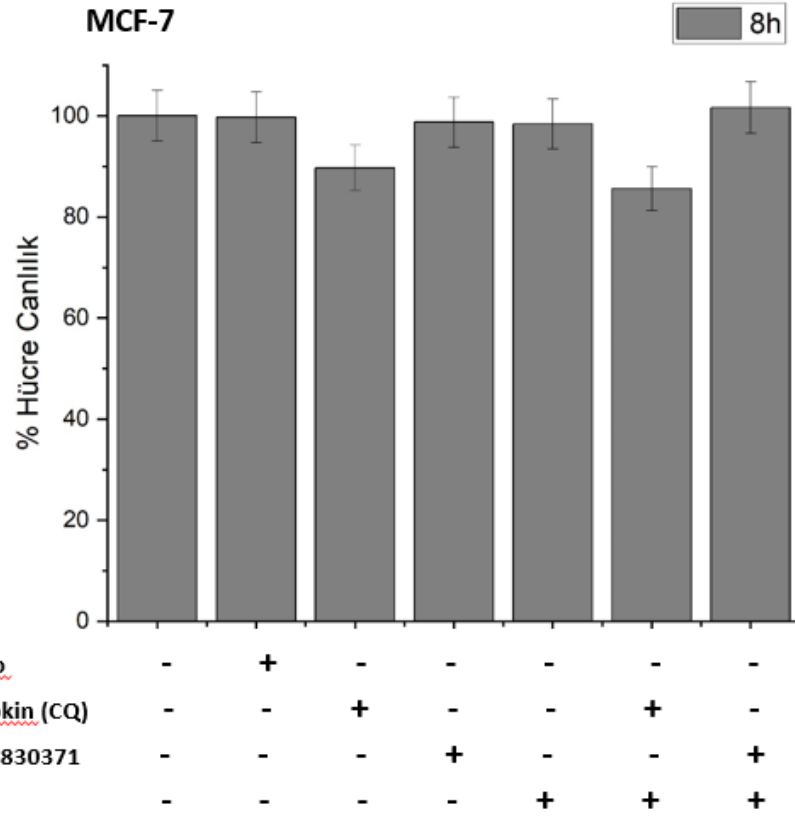
4.1.1.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Besin Yoksunluğu İle Otofajinin Hücre Canlılığına Olan Etkileri

MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatları ile ilgili yapılan literatür analizi sonucunda belirlenen süre ve konsantrasyonların hücre canlılığına olan etkileri MTT analizi ile ölçülmüştür.



Şekil 10. SH-SY5Y hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji indüksiyonunun hücre canlılığına etkisi

SH-SY5Y hücrelerinde otofaji indüksiyonunun canlılığa etkileri ise Şekil 10'da histogram grafiği ile gösterilmiş olup elde edilen veriler incelendiğinde HBSS, CQ, GSK uygulamalarının hücre canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir.



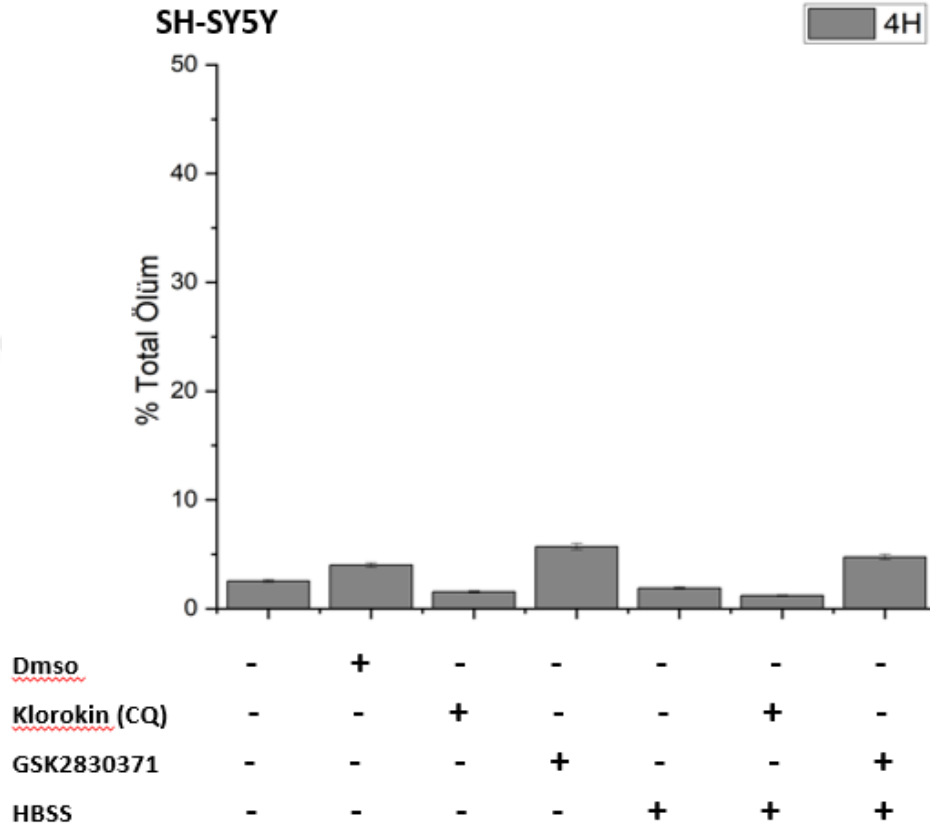
Şekil 11. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile indüklenen otofajinin hücre canlılığına etkisi

MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonunun canlılığa etkileri ise Şekil 11’de histogram grafiği ile gösterilmiş olup elde edilen veriler incelendiğinde HBSS, CQ, GSK uygulamalarının hücre canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir.

4.1.1.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Besin Yoksunluğu İle Otofajinin Hücre Ölümüne Etkileri

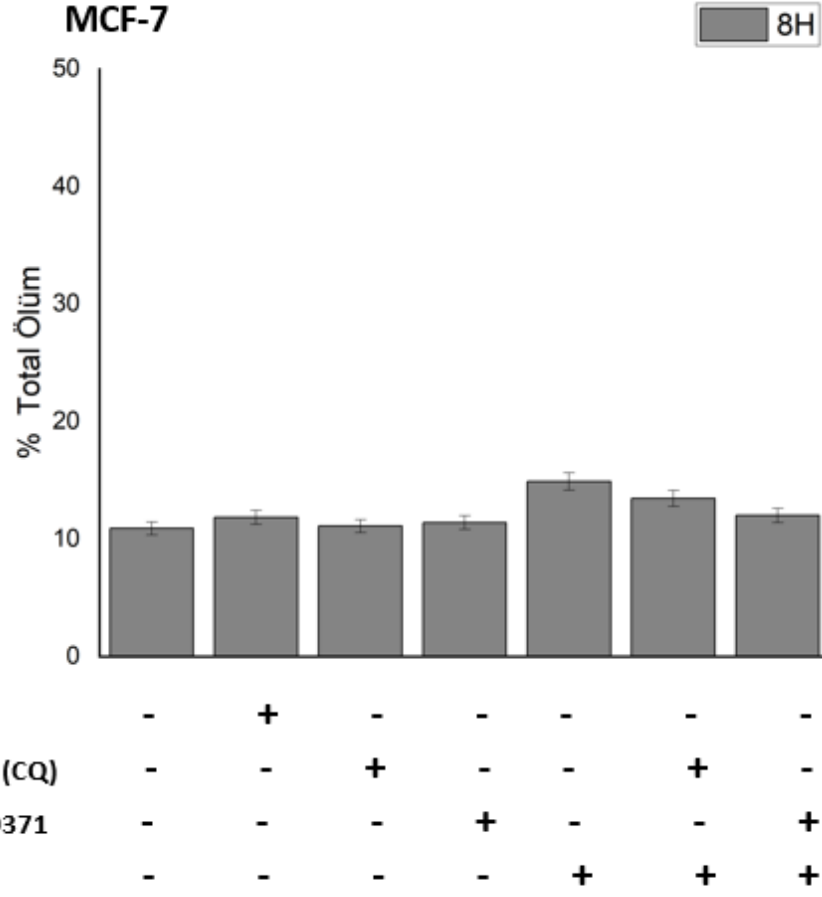
Besin yoksunluğu ile sağlanan otofaji indüksiyonunun hücre ölümüne yol açıp açmadığını araştırılması için Annexin V/7AAD apoptoz testi uygulanmıştır. Annexin V/7AAD, erken ve geç apoptotik ölümü göstermesinin yanında nekrotik ölümün tespit edilmesinde kullanılan yaygın bir yöntemdir. Her iki hücre hattında uygulanan HBSS muamelesinin (MCF-7 için 8 saat, SH-SY5Y için 4 saat) GSK ve CQ ile tek başına ya da kombin uygulamalarından sonra Annexin V/7AAD testi uygulanmıştır.

Erken ya da geç apoptoz miktarları total ölüm miktarı olarak hesaplanmıştır. Bağımsız tekrarlardan oluşan veriler grafiğe Origin programı aracılığıyla aktarılmıştır. Tek yönlü Varyans analizi aracılığıyla (One-way ANOVA) verilerin istatistiksel analizi yapılmıştır.



Şekil 12. SH-SY5Y hücrelerinde besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji varlığında total apoptozis grafiği

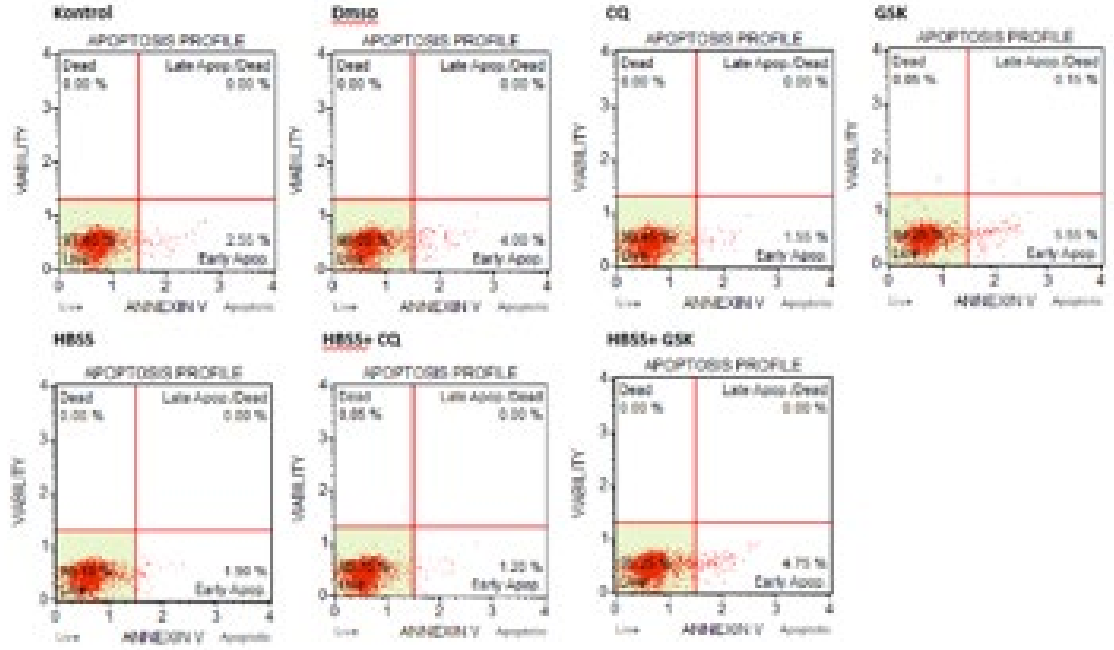
SH-SY5Y hücre hattında kontrolde total apoptoz miktarı % 2.55, DMSO'da % 4, HBSS grubunda ise % 1,9 olarak ölçülmüştür. 4 saat CQ (10 μ M) uygulamasında total apoptoz % 1.55, HBSS+ CQ kombin grubunda ise % 1.20 olarak gösterilmiştir. Buna ek olarak, 4 saat GSK (1 μ M) tek başına % 5,7, HBSS+GSK kombin grubunda ise % 4.75 total apoptoz gösterilmiştir. Uygulanan Annexin V/7AAD testinin apoptoz histogram profili Şekil 6'da gösterilmiştir. (Şekil 12).



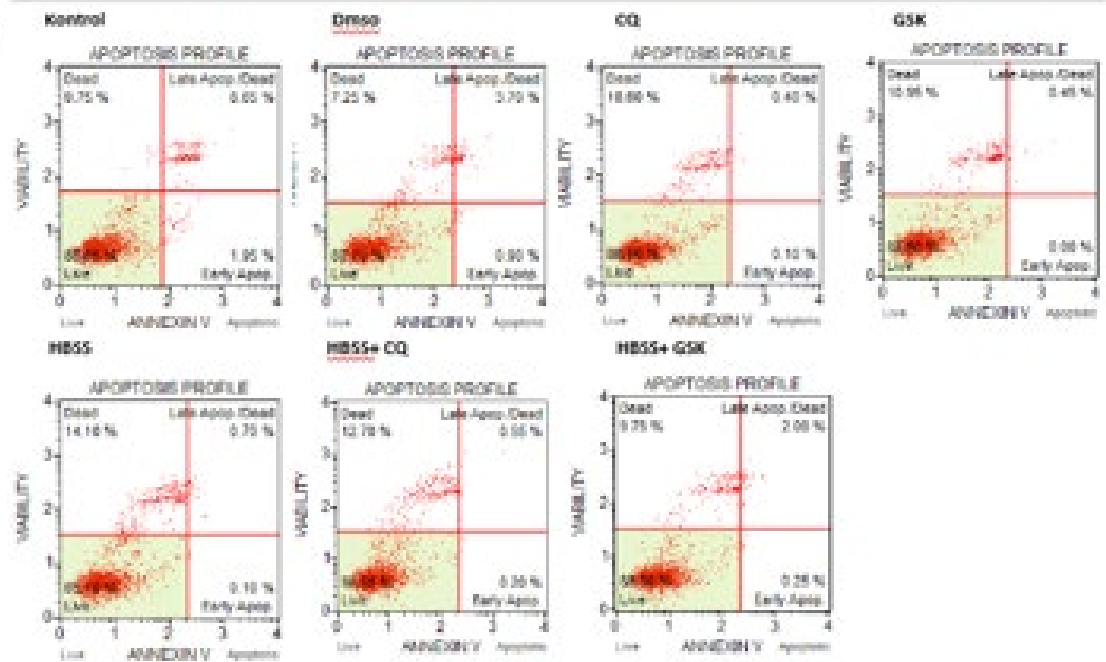
Şekil 13. MCF-7 hücre hattında besin yoksunluğu aracılığı ile otofaji varlığında total apoptoz grafiği

MCF-7 hücre hattında; kontrol grubunda total apoptozis % 11.35, DMSO grubunda % 11.85, HBSS grubunda ise %14,1 olarak ölçülmüştür. 8 saat CQ (10 μ M) uygulamasında total ölümün % 11,1, HBSS+CQ kombin grubunda ise % 13.45 olduğu gösterilmiştir. 8 saat GSK (5 μ M) uygulamasında ise total ölüm % 11.4, HBSS+GSK kombin grubunda ise % 12 olarak ölçülmüştür.. Uygulanan Annexin V/7AAD testinin apoptoz histogram profili Şekil 14’de gösterilmiştir. MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında uygulanan apoptoz testi sonucunda HBSS, CQ ya da GSK muamelesinin apoptoz indüksiyonunu sağlamadığı gösterilmiştir.

SY5Y



MCF-7

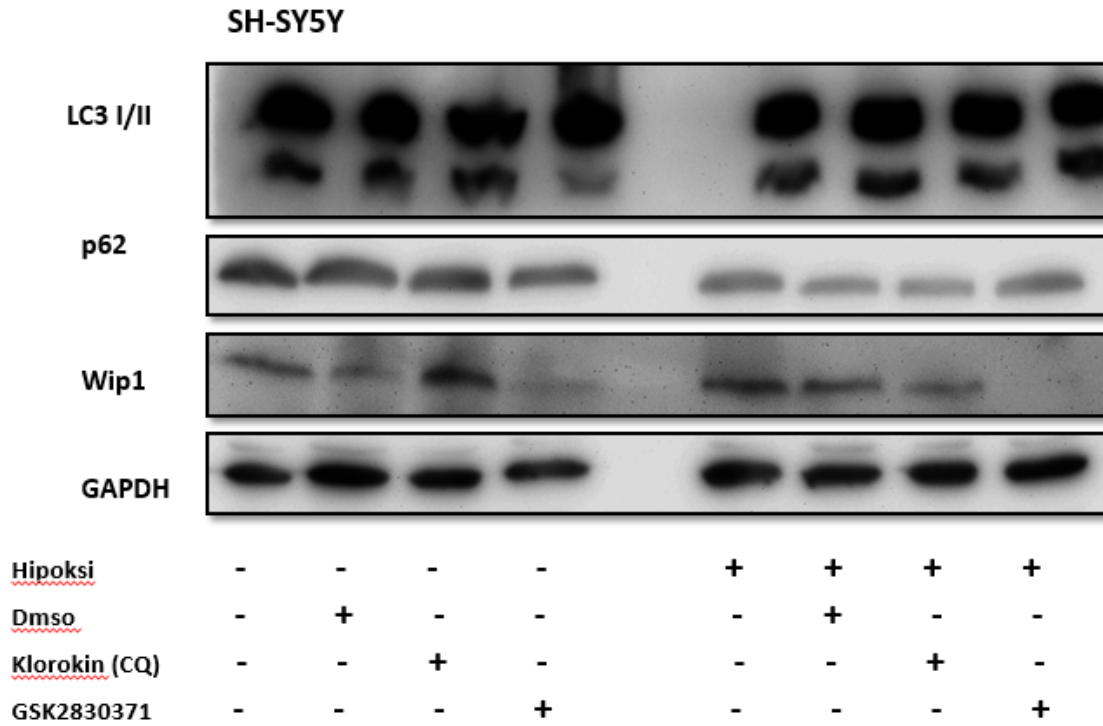


Şekil 14. Şekil 12 ve 13’da grafiği verilen MCF-7 ve SH-SY5Y hücrelerinin Annexin V/7AAD sonuçlarının apoptoz profilleri

4.1.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Hipoksi ile Otofaji İndüksiyonu

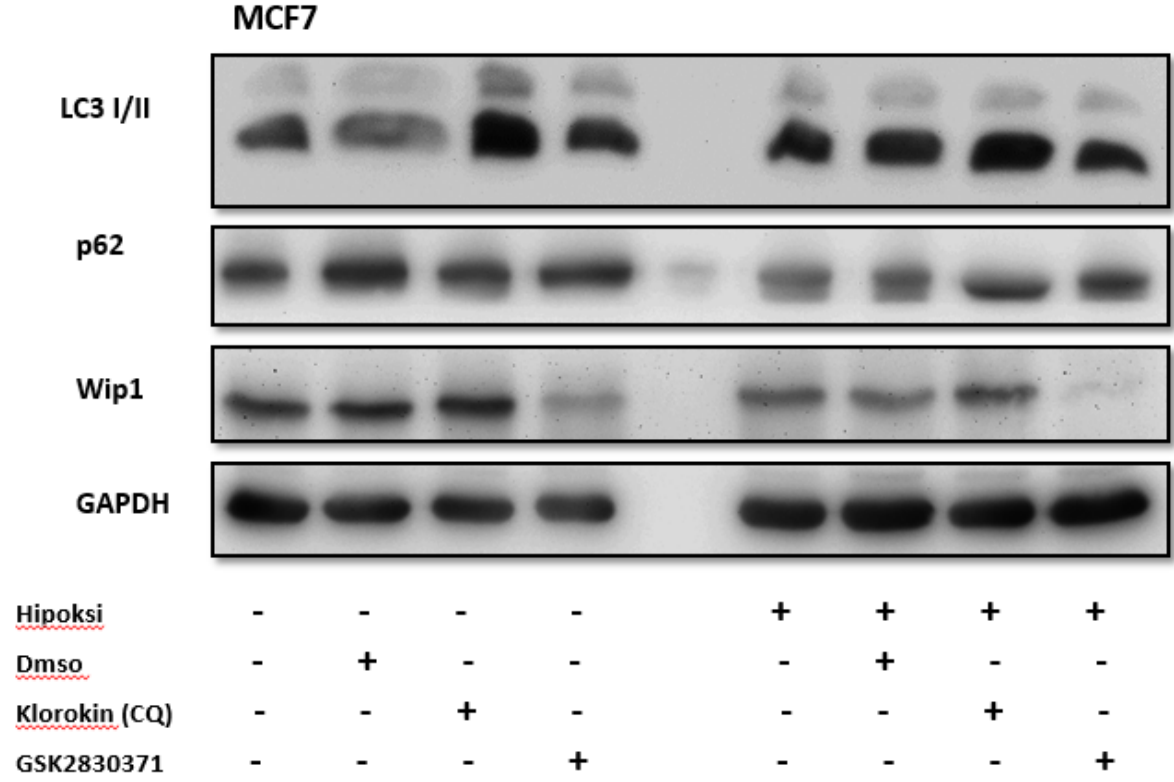
Otofaji indüksiyonu için bir başka metabolik stres kaynağı olan hipoksi muamelesi süresi yapılan literatür analizi ve optimizasyon çalışmaları sonucunda her iki hücre hattı için 24 saat olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak LC3 I/II agregat oluşumunda otofajiye ait olmayan sinyellerin elimine edilebilmesi için kullanılan otofaji inhibitörü CQ konsantrasyonu her iki hücre hattında da 10 μ M olarak belirlenmiştir. Wip1 inhibitörü olan GSK'nın konsantrasyonu ise, SH-SY5Y için 1 μ M, MCF-7 için 5 μ M olarak belirlenmiştir.

Otofaji varlığı LC3 I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu ile gözlemlenmektedir. Bu bağlamda Şekil 15 ve 16' da görüldüğü üzere hipoksik gruplarda normoksik gruplara kıyasla artan LC3 I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu WB analizi ile saptanmıştır. Böylelikle belirlenen hipoksi muamelesinin otofaji indüksiyonu sağlamada yeterli olduğu WB analizi ile doğrulanmıştır.



Şekil 15. SH-SY5Y hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığı WB analizi.

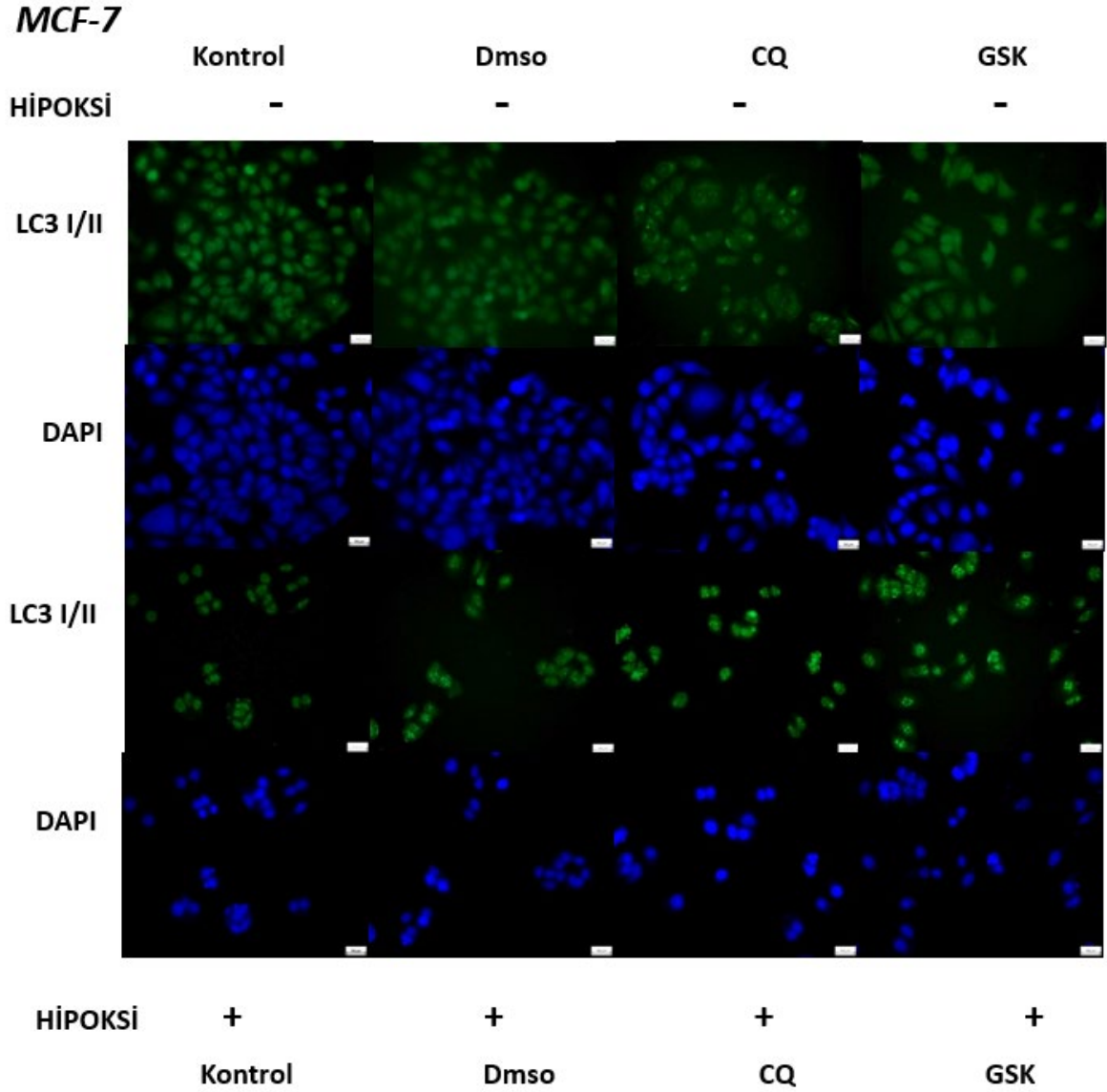
Buna ek olarak, kullanılan CQ konsantrasyonunun otofaji inhibisyonunda yeterli olduğu hipoksik koşullarda p62'nin birikimi ile gösterilmiştir. Kullanılan GSK konsantrasyonunun Wip1'i baskılamada yeterli olduğu her iki hücre hattı için gösterilmiştir (Şekil 15 ve 16)



Şekil 16. MCF-7 hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji indüksiyonu WB analizi

4.1.2.1. MCF-7 Ve SH-SY5Y Hücre Hatlarında Hipoksi İle Otofaji İndüksiyonun LC3 Nokta Ya Da Punkta Oluşumu

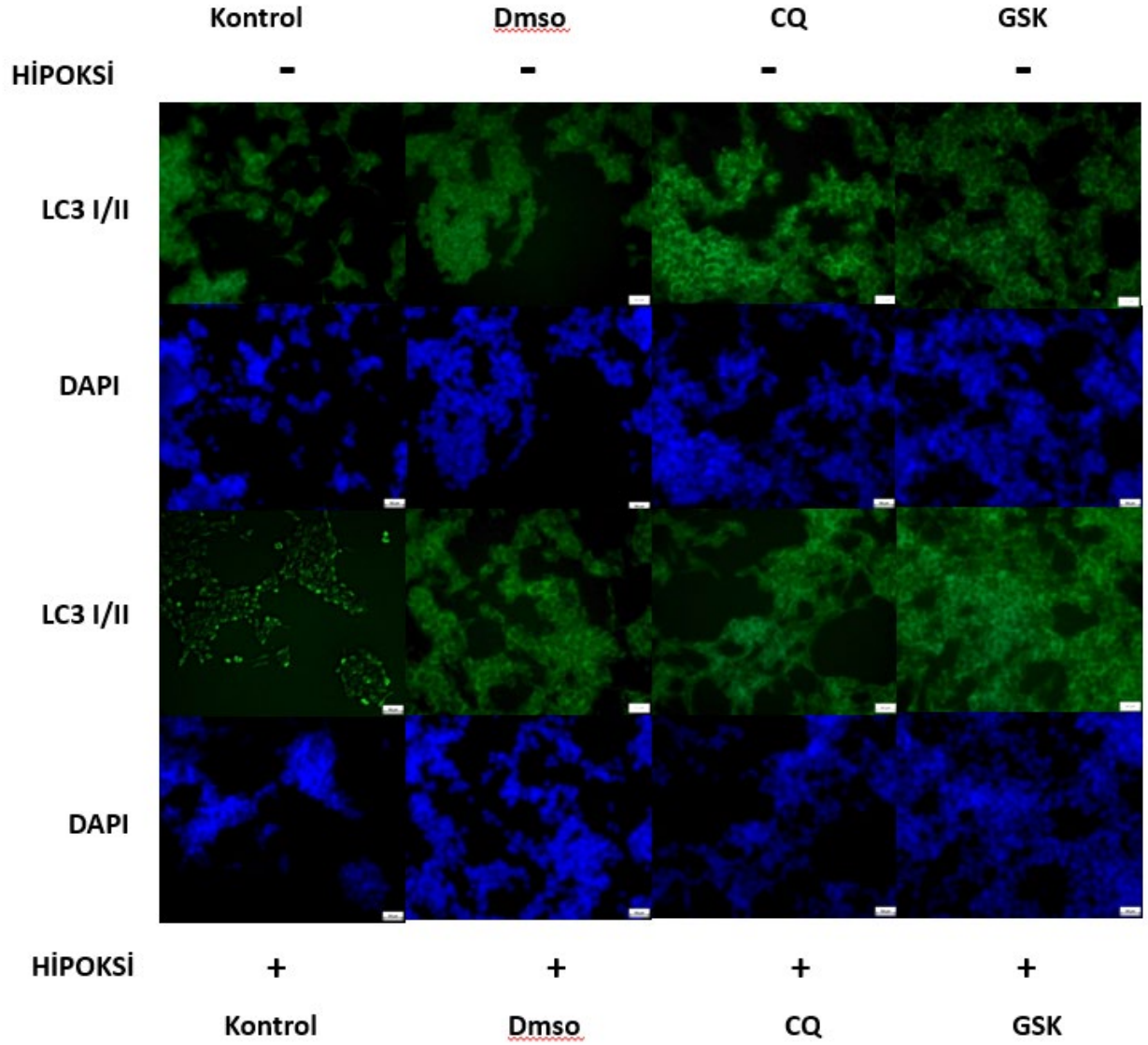
Otofaji proteinlerin WB analizi ile tespitinin yanında bir başka otofaji belirteci olan LC3 I/II nokta oluşumu immünfloresan boyama yöntemi ile analizi yapılmıştır. Şekil 17’de MCF-7 hücre hatlarında hipoksik ve normoksik şartlarda CQ ve GSK uygulamasının LC3 punkta oluşumuna etkileri gösterilmiştir. Normoksik hipoksik gruplar karşılaştırıldığında hipoksik kontrol, Dms, CQ ve GSK gruplarında LC3 nokta oluşumuna artış gözlemlenmiştir.



Şekil 17. MCF-7 hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığının LC3 punkta formasyonuna olan etkilerinin immünfloresan yöntemi ile gösterilmesi.

Şekil 18’de SH-SY5Y hücre hatlarında hipoksik ve normoksik şartlarda CQ ve GSK uygulamasının LC3 punkta oluşumuna etkileri gösterilmiştir. Normoksik hipoksik kontrol, CQ ve GSK grupları karşılaştırıldığında hipoksik gruplarda LC3 nokta formasyonunda artış gözlenmiştir. (Şekil 18)

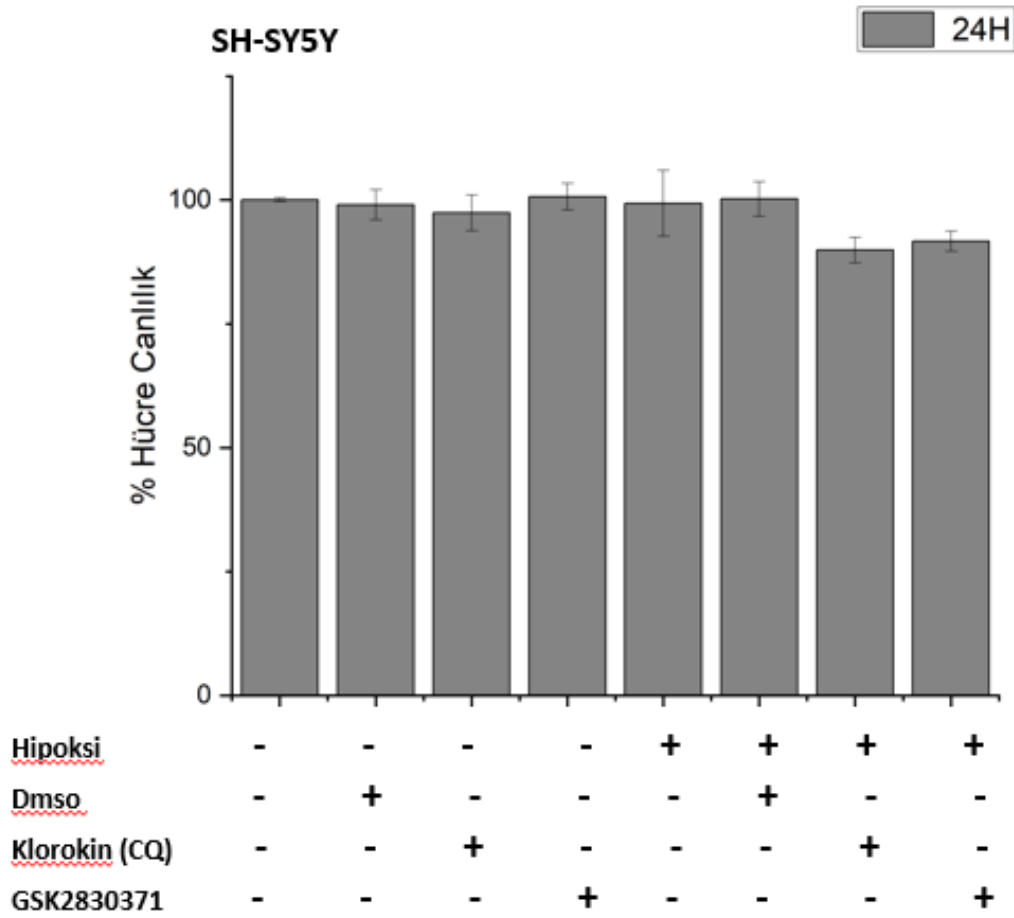
SH-SY5Y



Şekil 18. SH- SY5Y hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığının LC3 punkta formasyonuna olan etkilerinin immünfloresan yöntemi ile gösterilmesi.

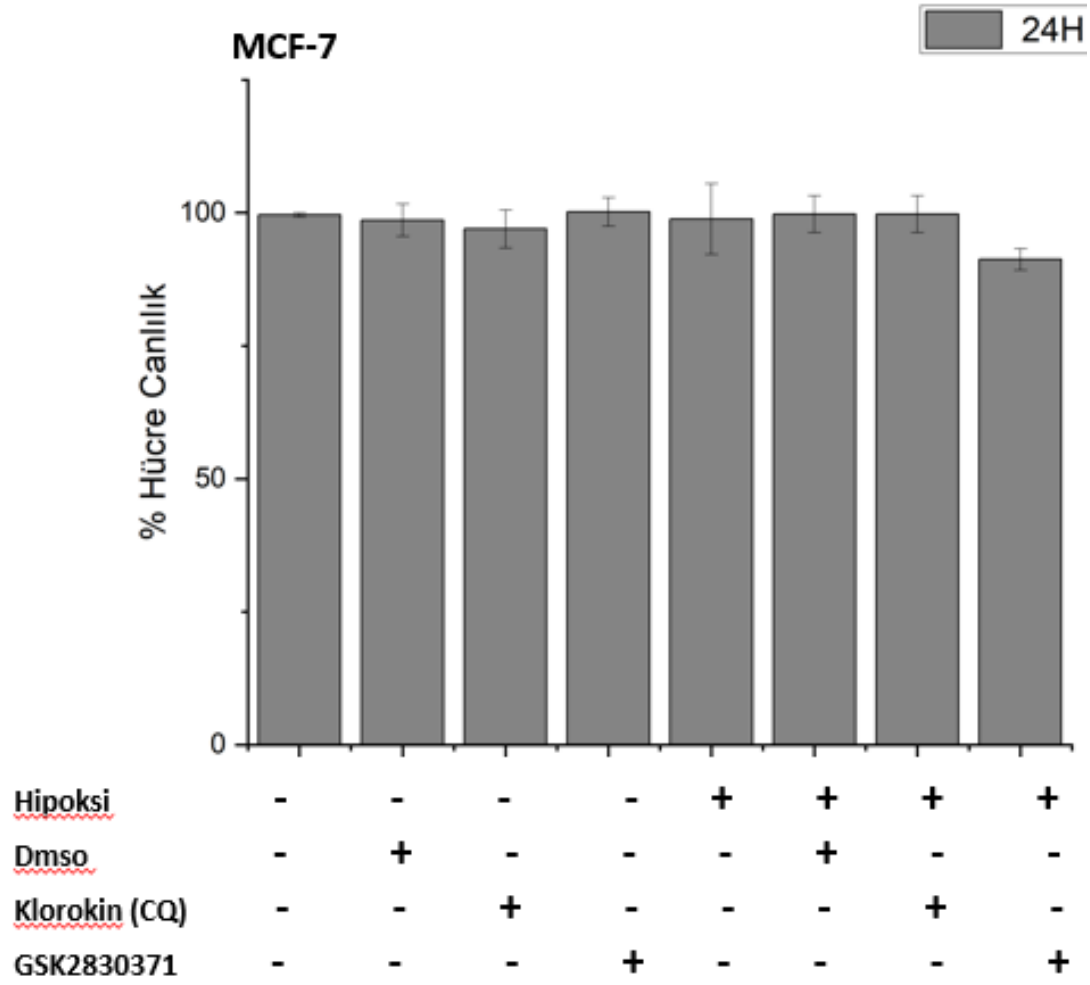
4.1.2.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi İndüklü Otofajinin Hücre Canlılığına Olan Etkileri

MCF-7 ve SH-SY5Y hücrelerinde Wip1 inhibisyonunda görevli GSK ve otofaji inhibitörü CQ'nun hipoksi indüklü otofaji de hücre canlılığına olan etkileri MTT analizi ile incelenmiştir.



Şekil 19. SH-SY5Y hücre hattında, hipoksi indüklü otofajinin hücre canlılığına etkileri

SH-SY5Y ve MCF-7 hücre hatlarında belirlenen grupların hipoksik ve normoksik koşullarda değişen hücre canlılığı grafiği şekil 19 ve 20'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde her iki hücre hattında da hipoksi indüksiyonunun hücre canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir. Ancak hipoksiste GSK uygulamasının hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir.

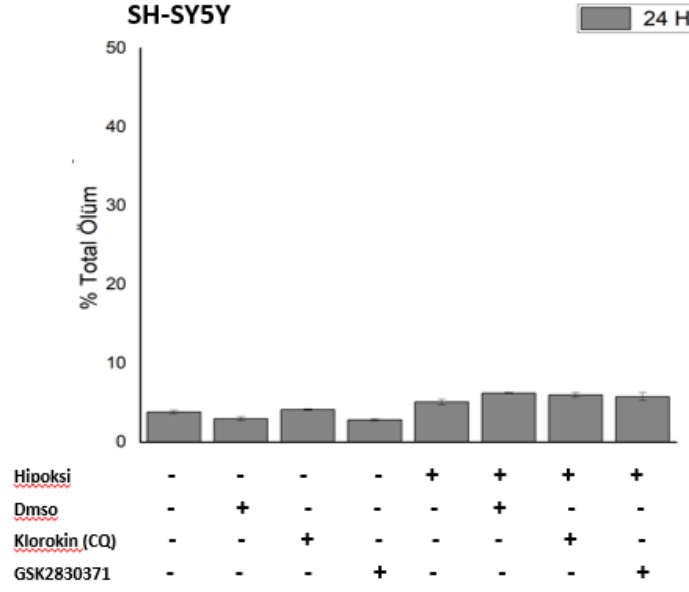


Şekil 20. MCF-7 hücre hattında, hipoksi indüklü otofajinin hücre canlılığına etkileri

4.1.2.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi İndüklü Otofajinin Hücre Ölümüne Etkileri

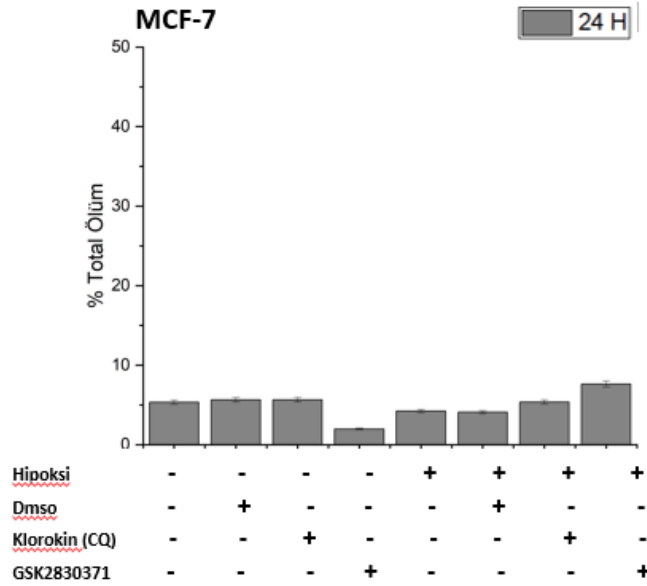
MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında, hipoksi indüklü otofajinin hücrede apoptoz indüksiyonuna sebep olup olmadığı Annexin V/ 7AAD testi kullanılarak tespit edilmiştir.

Şekil 21’de SH-SY5Y hücre hattı için normoksi gruplarında total ölüm yüzdeleri sırasıyla; kontrol % 3.805, DMSO % 2.97, CQ % 4.115, GSK ise % 2.81 olarak ölçülmüştür. 24 saat hipoksi muamelesi sonrası hipoksi gruplarında total ölüm yüzdeleri sırasıyla; kontrol % 5.09, DMSO % 6.22, CQ % 5.98, GSK ise % 5.775 olarak ölçülmüştür.



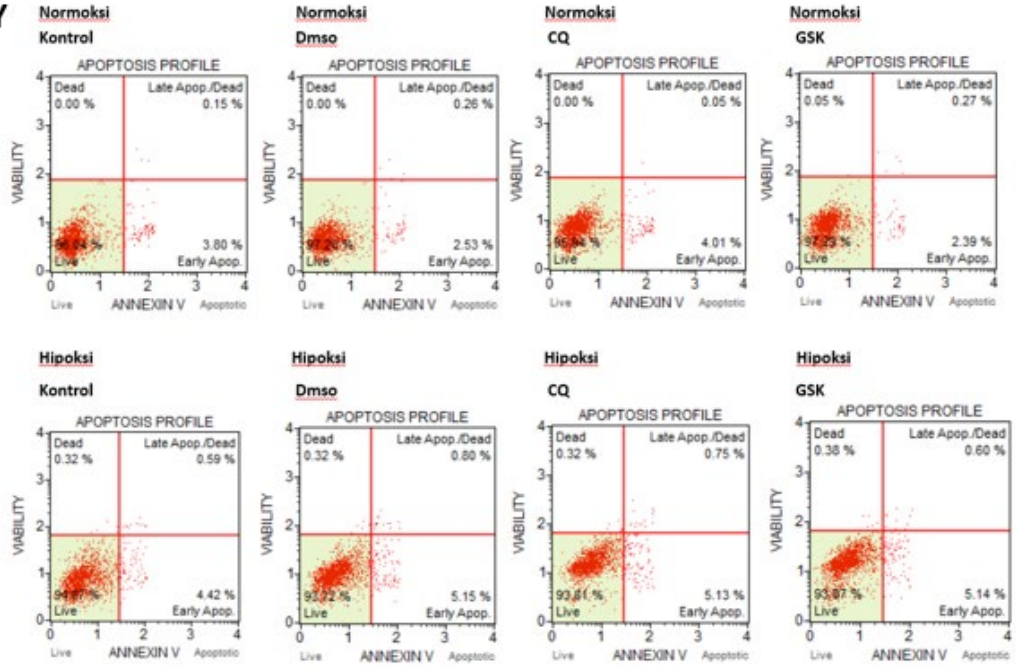
Şekil 21. SH-SY5Y hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji total apoptoz grafiğı

Şekil 22’te MCF-7 hücre hattı için normoksi gruplarında total ölüm yüzdeleri sırasıyla; kontrol % 5.34, DMSO % 5.62, CQ % 5.63, GSK ise % 1,98 olarak ölçülmüştür. 24 saat hipoksi muamelesi sonrası hipoksi gruplarında total ölüm yüzdeleri sırasıyla; kontrol % 4.23, DMSO % 4.09, CQ% 5.38, GSK ise % 7.64 olarak ölçülmüştür. Yapılan Annexin V/7AAD testinin apoptoz histogram profilleri Şekil 23’de gösterilmiş olup uygulanan hipoksik koşulların apoptoz indüksiyonuna sebep olmadığı gösterilmiştir (Şekil 22).

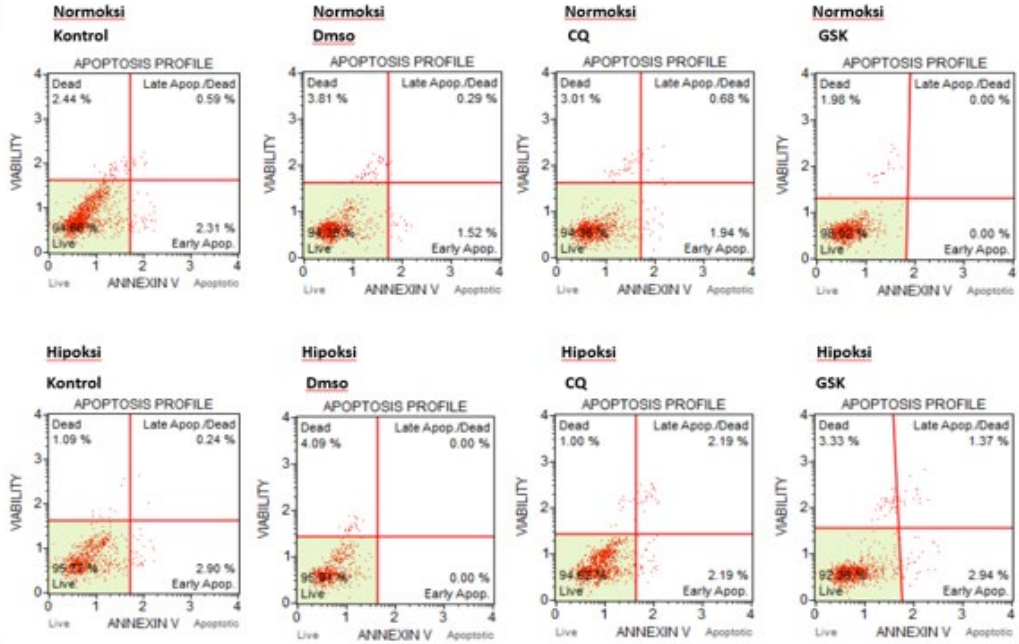


Şekil 22. MCF-7 hücre hattında hipoksi aracılığı ile otofaji varlığının total apoptoz grafiğı

SH-SY5Y



MCF-7



Şekil 23. Şekil 21 ve 22’te verilen MCF-7 ve SH-SY5Y hücrelerinin Annexin V/ 7AAD sonuçlarının Apoptoz profilleri

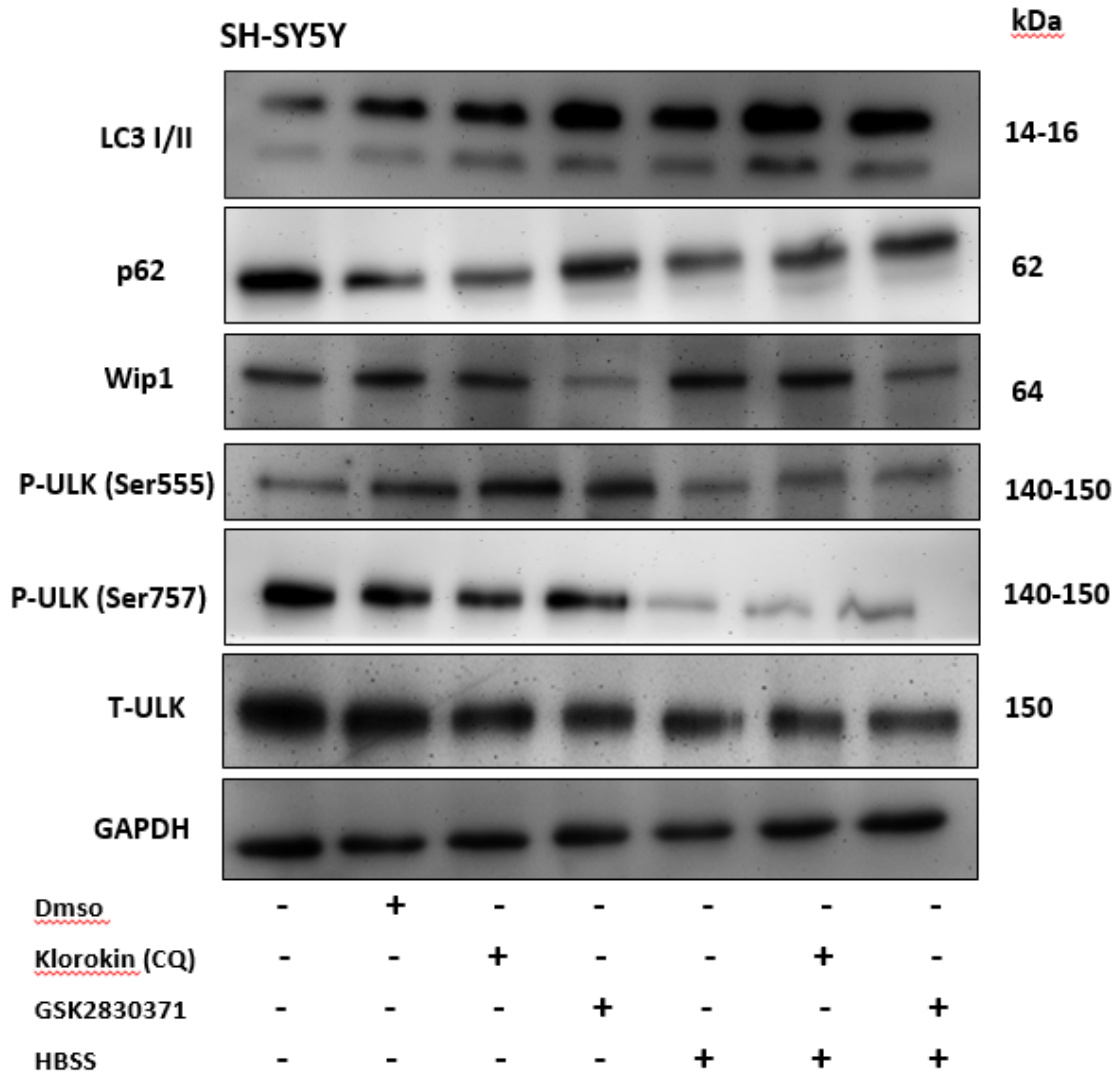
4.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Metabolik Stres İle Otofaji Aktivasyonuna Etkileri

4.2.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Açlık İle Otofaji Aktivasyonuna Etkisi

Açlık ile otofaji aktivasyonunun sağlandığı koşullarda aynı zamanda Wip1'in GSK ile inhibisyonu da sağlanarak, otofajinin Wip1'e bağlı olarak baskılanıp baskılanmadığı LC3I/II, p62, proteinleri, aynı zamanda Wip1 ve Ulk1 arasında bir defosforiasyon ilişkisi olup olmadığı da total ve fosforile ULK1 (p-ULK1 (Ser555)ve p-ULK1 (Ser757) düzeyleri ve Wip1 protein düzeyi de WB analizi ile test edilmiştir.

LC3 I/II dönüşümünün indüklenmesi ve p62 degradasyonuna ek olarak otofaji başlangıç kompleksinde görevli ULK1 proteininin birden fazla noktadan defosforile hale gelmesi otofaji varlığında gözlenen modifikasyonlardan biridir.

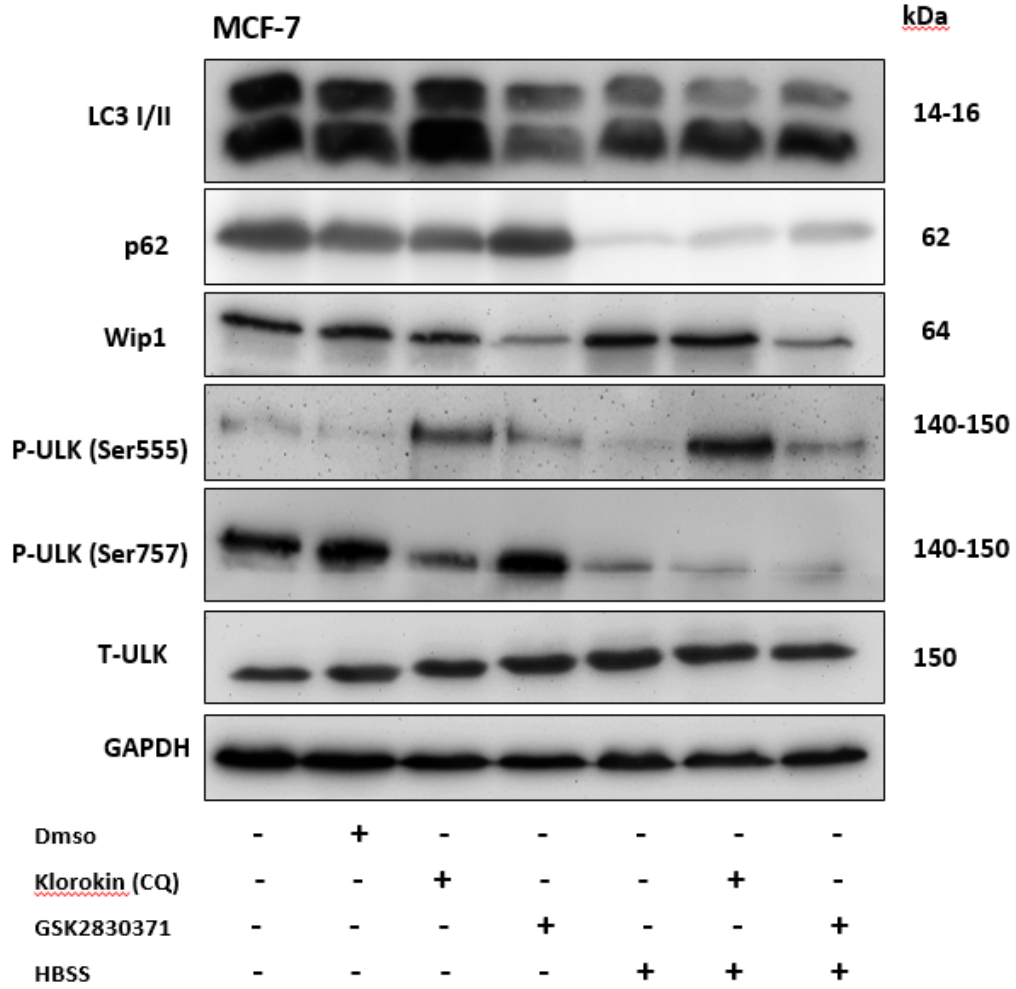
Şekil 24'de SH-SY5Y hücre hattında tek başına HBSS uygulanan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında HBSS uygulamasının LC3 I/II dönüşümünü kontrole kıyaslaartırdığı görülmektedir.. Buna ek olarak açlık ile otofaji indüksiyonunda görevli temel fosforilasyon bölgesi olan p-ULK1(Ser555)'in ve otofaji başlangıç kompleksinde görevli bir başka fosforilasyon bölgesi olan p-ULK1(Ser757)'nin de kontrole kıyasla HBSS uygulanan gruplarda protein miktarındaki düşüş gösterilmiştir. HBSS uygulanan gruplarda kontrole kıyasla p62'nin ve T-ULK1'un protein seviyesinde azalma gözlemlenirken Wip1 protein miktarı değişme gözlenmemiştir.



Şekil 24. SH-SY5Y hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve açlık aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi

Tek başına, CQ uygulanan grupta kontrole kıyasla LC3 I/II dönüşümü gözükmemektedir. Buna ek olarak, özellikle açlık indüklü otofajide temel fosforilasyon bölgesi olan p-ULK1(Ser555) başta olmak üzere, p-ULK1(Ser757)'de de protein miktarında birikim gözlenmiştir. Bununla beraber, tek başına CQ uygulanan grupta T-ULK1 ve Wip1 protein düzeyinin sabit kaldığı gözlenirken, p62'de beklenenin tersine daha az protein miktarı gözlenmektedir. HBSS+CQ grubunda ise tek başına CQ grubunda meydana gelen dönüşümden daha yüksek bir LC3 I/II dönüşümü gözlenmektedir. P62 protein miktarı da HBSS+ CQ uygulanan grupta tek başın CQ uygulanan gruptan daha fazladır. Bununla beraber, HBSS+CQ grubunda tek başına HBSS uygulamasında gözlenenden daha yüksek p-ULK1(Ser555) ve p-ULK1(Ser757) bandı gözlenmiştir. T-ULK1 protein miktarı CQ grubunda HBSS+CQ grubuna göre daha yüksektir. Wip1 protein miktarı incelendiğinde ise, HBSS+CQ grubunda tek başına CQ uygulanan gruba kıyasla daha yüksek protein varlığı açıkça gözükmemekte iken HBSS grubu ile kıyaslandığında protein miktarı değişmemektedir. Tek başına GSK uygulanan grupta p62, p-ULK1(Ser555) ve p-ULK1(Ser757) protein miktarı kontrole kıyasla daha yüksektir. Wip1 ve T-ULK1 proteinlerinde ise GSK uygulanan grupta kontrole kıyasla daha düşük protein miktarı gözlenmektedir.

Tek başına GSK uygulanan grupta LC3 I/II dönüşümü incelendiğinde kontrole kıyasla daha yüksek bir dönüşüm gözlenirken, CQ grubuyla kıyaslandığında sabit kaldığı gözlenmektedir. HBSS+GSK grubuna gelindiğinde ise HBSS grubu ile yapılan kıyaslamada LC3 I/II dönüşümünün neredeyse aynı seviyede olduğu gözlenmiştir. HBSS+GSK grubunda P62 protein seviyesi tek başına HBSS uygulanan gruptan daha yüksektir. Aynı biçimde HBSS+GSK ile HBSS uygulanan gruplar kıyaslandığında p-ULK1(Ser555) ve p-ULK1(Ser757) protein seviyeleri HBSS+GSK grubunda daha yüksektir. T-ULK1 protein miktarı açısından HBSS+GSK ile HBSS grupları incelendiğinde gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Wip1 proteinin de ise HBSS+GSK grubunda tek başına GSK grubuna kıyasla daha yüksek protein miktarı gösterilmesine karşın Wip1 baskılanmasında yeterli olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve açlık aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi

Şekil 25’de MCF-7 hücre hattında Wip1’in küçük molekül inhibitörü olan GSK’nın açlık indüklü otofajiye etkileri WB analizi ile gösterilmiştir. Bu bağlamda tek başına HBSS uygulanan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında LC3 I/II dönüşümü HBSS grubunda daha yüksektir. P62 protein miktarı ise, kontrole kıyasla HBSS grubunda daha düşüktür. Buna ek olarak, açlık ile otofaji indüksiyonunda görevli temel fosforilasyon bölgesi olan p-ULK1(Ser555)’in ve otofaji başlangıç kompleksinde görevli bir başka fosforilasyon bölgesi olan p-ULK1(Ser757)’nin kontrole kıyasla HBSS uygulanan gruplarda protein miktarında azalma meydana geldiği gözlenmiştir.

HBSS uygulanan gruplarda, Wip1 ve T-ULK1 protein miktarı kontrole göre artış göstermiştir. Tek başına CQ uygulanan gruba gelindiğinde ise, LC3 I/II dönüşümünde ve p62 protein miktarında kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. CQ uygulanan gruplarda, kontrole kıyasla p-ULK1(Ser555)'in protein miktarında ciddi bir artış gözlemlenirken p-ULK1(Ser757)'de protein miktarı daha az artmıştır. Bu durum CQ'nin otofaji inhibisyonunda etkili bir biçimde çalıştığına işaret etmektedir. T-ULK1 protein miktarı CQ uygulanan grupta kontrole kıyasla daha yüksektir. CQ uygulamasının Wip1 protein miktarını değiştirmedığı gözlenmiştir. HBSS+CQ gruplarında ise LC3 I/II dönüşümü HBSS grubuna kıyasla aynı iken p62 protein miktarı HBSS grubunda kıyasla artış göstermiştir. Buna ek olarak, p-ULK1(Ser555)'in protein miktarı tek başına HBSS uygulamasında olduğundan çok yüksek olmasına karşın aynı etki p-ULK1(Ser757)'de gözlenmemiştir. HBSS+CQ uygulamasının Wip1 ve T-ULK1 proteinlerinin miktarını değiştirmedığı gösterilmiştir.

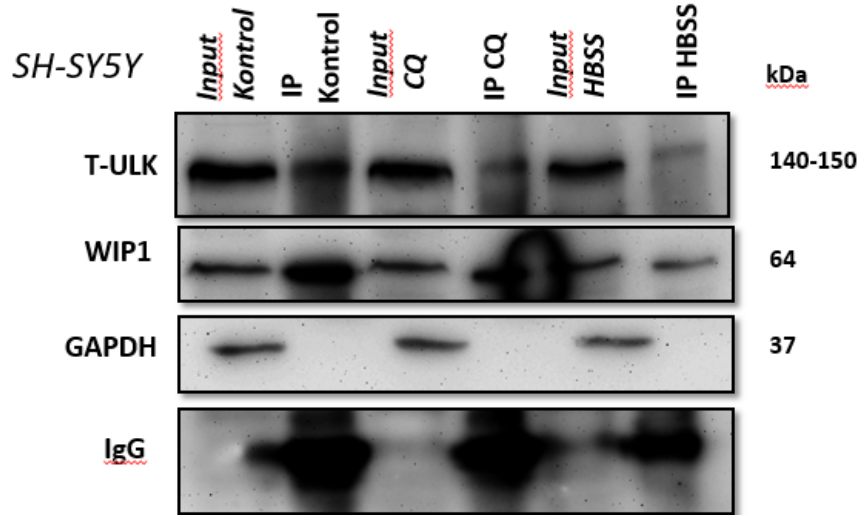
Wip1 küçük inhibitörü olan GSK'nın uygulandığı gruplarda Wip1 miktarında azalma gözlenmiştir. Tek başına GSK uygulanan gruplarda LC3 I/II dönüşümünde azalma gözlenirken, p62 protein miktarında ise artış gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, p-ULK1(Ser757)'nin protein miktarı GSK uygulanan grupta kontrole kıyasla bir değişim göstermezken, p-ULK1(Ser555)'in ve T-ULK1'un protein miktarı kontrole kıyasla daha yüksek olması Wip1-ULK1 etkileşiminin varlığına işaret etmektedir. HBSS+GSK grubu ele alındığında ise, tek başına HBSS uygulanan gruba kıyasla LC3 I/II dönüşümü farklılık göstermemiştir. P62 protein miktarı ise HBSS grubuna kıyasla artış göstermiştir. Buna ek olarak, p-ULK1(Ser757)'nin aksine, p-ULK1(Ser555)'in protein miktarında artış gözlenmektedir. Wip1'in protein miktarı HBSS grubu ile kıyaslandığında azalma göstermesine karşın tek başına GSK grubundaki kadar etkili değildir. T-ULK1 protein miktarı ise HBSS ile kıyaslandığında azalma göstermiştir.

4.2.1.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Otofaji aktivasyonunda ULK1-WIP1 Etkileşimi

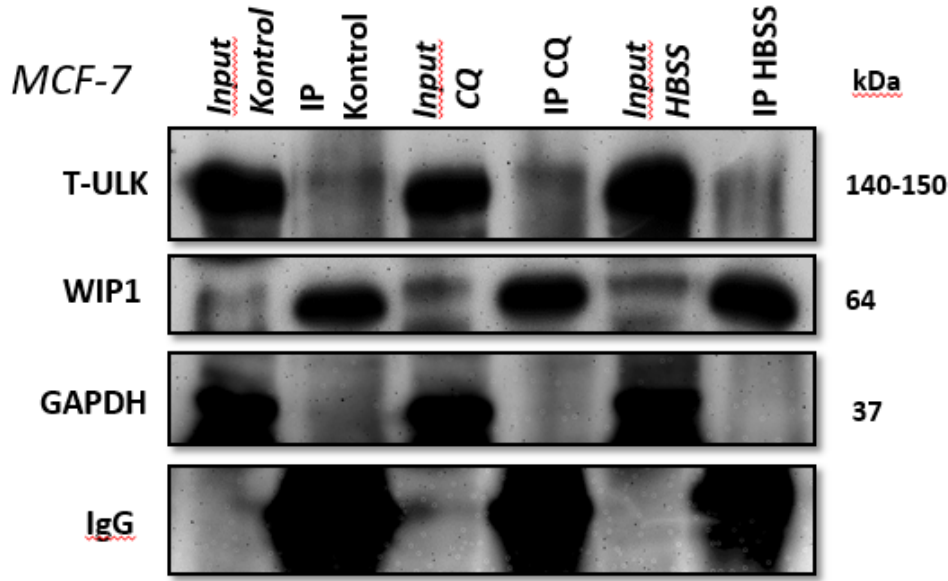
İmmün çöktürme protein-protein etkileşimini belirlemede kullanılan önemli bir tekniktir. Bu teknikte belirli bir hedef proteine karşı monoklonal ya da poliklonal bir antikor agoroz beadler etkileşim kurmakta bu etkileşim sonucunda protein lizati içerisinde hedef protein- bead etkileşimi sağlanmaktadır. Ardından bu etkileşim SDS- PAGE gibi teknikler

aracılığı ile tespit edilerek ilgili iki protein arasındaki fiziksel etkileşimin varlığı açığa çıkarılmaktadır. (Idris 2012)

Şekil 26’da SH-SY5Y hücre hattında Wip1-ULK1 etkileşimi immün çöktürme yöntemi ile gösterilmiştir. Input grupları kendi içinde incelendiğinde kontrol ile HBSS grubu arasında ULK1 protein miktarı açısından bir değişim gözlemlenmezken CQ gruplarında protein düzeyinde artış gözlemlenmiştir. IP grupları incelendiğinde kontrol ve CQ’ya kıyasla HBSS grubunda ULK1 protein düzeyinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak hem IP gruplarında hem de Input gruplarında yüklenen protein miktarı ile doğru orantılı olarak Wip1 protein varlığı gözlemlenmektedir. Input gruplarının internal kontrolü olarak GAPDH, IP gruplarının internal kontrolü olarak IgG kullanılmıştır.



Şekil 26. SH-SY5Y hücre hattında açlık koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünçöktürme yöntemi ile gösterilmesi



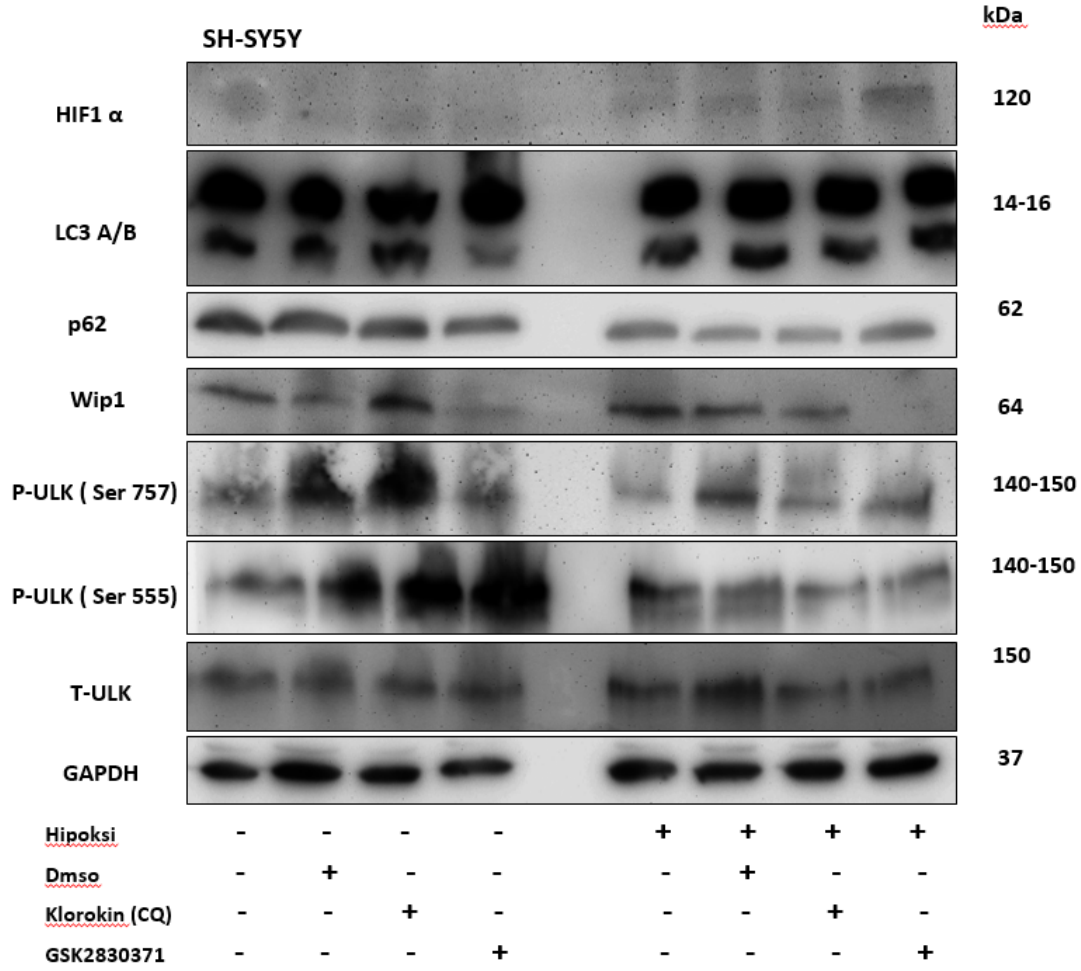
Şekil 27. MCF-7 hücre hattında açlık koşullarında Wip1- ULK1 etkileşiminin İmmünöktürme yöntemi ile gösterilmesi

MCF-7 hücre hattında bead ile muamele edilmeyen Input grupları kendi içinde kıyaslandığında kontrol ve CQ'ya kıyasla input HBSS grubunda T-ULK protein seviyesinde artış gözlemlenmiştir. IP grupları kendi içinde kıyaslandığında ise HBSS grubunda kontrol grubuna kıyasla ULK1 miktarında artış gösterilmiştir. Buna ek olarak hem IP gruplarında hem de Input gruplarında yüklenen protein miktarı ile doğru orantılı olarak Wip1 protein varlığı gözlemlenmektedir. Input gruplarının internal kontrolü olarak GAPDH, IP gruplarının internal kontrolü olarak IgG kullanılmıştır. (Şekil 27)

Her iki hücre hattı ile yapılan immünöktürme analizi sonucunda açlık koşullarında artan T-ULK1 miktarı ve Wip1 bandı Wip1-ULK1 etkileşiminin varlığına işaret etmektedir.

4.2.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Hipoksi İle İndüklenen Otofaji Aktivasyonuna Etkisi

Wip1'in inhibitörü GSK2830371 (GSK)'nın bir metabolik stres türü olan hipoksi indüklü otofaji varlığında cevabı WB analizi ile araştırılmıştır.



Şekil 28. SH-SY5Y hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve hipoksi aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi

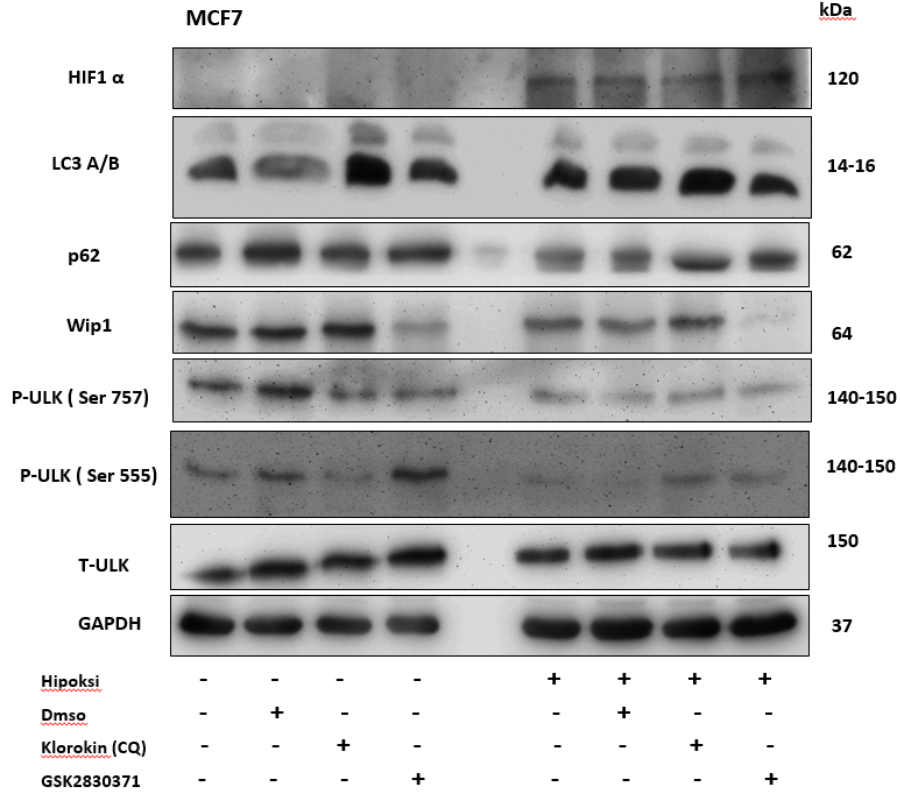
Şekil 28’ de SH-SY5Y hücre hattında belirlenen gruplar 24 saat hem hipoksi hem de normoksi koşullarında muamele edildikten sonra WB analizi yapılmıştır. Hipoksik ortamın doğrulanabilmesi için, oksijensiz ortamda stabilize olan temel transkripsiyonel faktör olan HIF1 α kullanılmıştır. Şekil 28’de hipoksik ortamda HIF1 α gözlemlenirken normoksik koşulda gözlemlenmemiş olması hipoksik koşulların oluştuğuna işaret etmektedir. Hipoksik ve normoksik koşullardaki kontrol grupları karşılaştırıldığında hipoksik ortamda LC3 I/II dönüşümünde artış; p62, p-ULK1(Ser757) ve p-ULK1(Ser555)’in protein miktarında azalma gözlenmektedir. Buna ek olarak, hipoksik koşullarda T-ULK1’un protein miktarında artış gözlenirken Wip1’in protein miktarında değişme gözlenmemektedir. Hipoksik koşullarda uygulanan CQ konsantrasyonunun p62 protein miktarını azalttığı gözlenirken LC3 I/II dönüşümünü değiştirmemiştir. Buna ek olarak, p-ULK1(Ser757) protein miktarı hipoksi kontrol ve hipoksiCQ uygulandığında bir miktar arttığı ancak bu artışın normoksi CQ grubu ile

kıyaslandığında oldukça az olduğu gözükmemektedir. p-ULK1(Ser555) protein miktarı incelendiğindeyse normoksi kontrole kıyasla normoksi CQ grubundaki artış net bir şekilde gözükmemekle birlikte aynı etki hipoksik ortamda gözlenmemektedir. T-ULK1 protein miktarı normoksi gruplarında değişim göstermezken hipoksi CQ grubunda azalma göstermiştir. Wip1'in protein miktarı ise, normoksi kontrol ile normoksi CQ kıyaslandığında artış göstermiştir ancak aynı artış hipokside gözlenmemiştir. Hipoksik ve normoksik gruplarda GSK'nın otofaji proteinlerine etkisi gözlemlendiğinde LC3 I/II dönüşümü normoksi GSK'da azalırken hipoksi GSK'da artış göstermiştir. Hipoksi kontrol ile hipoksi GSK kıyaslandığında p62 protein miktarı hipoksi GSK'da artış göstermiştir. Beklenildiği gibi, Wip1 protein miktarı hem normoksi de hem de hipoksi de azalma göstermiştir. p-ULK1(Ser555) ve p-ULK1(Ser757) protein miktarları hipoksi kontrole kıyasla artış göstermiştir. GSK'nın bu etkisi normoksi kontrol ile normoksi GSK arasında da gözlemlenmektedir. Bu durum, hipoksi indüksiyonu aracılığıyla Wip1-ULK1 etkileşiminin olduğuna işaret etmektedir. Yapılan GSK uygulamasının T-ULK1 üzerine bir etkisi gözlemlenmemiştir.

Şekil 29' da MCF-7 hücre hattında belirlenen gruplarda 24 saat hem hipoksi hem de normoksi koşullarında muamele edildikten sonra WB analizi yapılmıştır. Hipoksik ortamın doğrulanmasında kullanılan HIF1 α proteini hipoksik ortamda gözlemlenirken normoksik koşulda gözlemlenmemiştir.

Hipoksik ve normoksik koşullarda kontrol grupları karşılaştırıldığında hipoksi gruplarında LC3 I/II dönüşümünün arttığı gözlenmektedir. Buna ek olarak, p62, p-ULK1(Ser555) ve p-ULK1(Ser757) protein miktarları kıyaslandığında hipoksi gruplarında normoksi gruplarına kıyasla daha düşük protein miktarı gözlemlenmiştir. Bu durum, uygulanan hipoksik koşulların otofaji indüksiyonuna sebep olduğuna işaret etmektedir. T-ULK1 protein miktarı hipoksi ve normoksi kontrol grupları arasında farklılık göstermemektedir. Wip1 protein miktarı hipoksi kontrolde normoksiye kıyasla azalma göstermiştir.

CQ uygulamasının normoksi ve hipoksi grupları arasındaki farklılığı incelendiğinde; normoksi kontrole kıyasla normoksi CQ grubunda LC3 I/II dönüşümü daha yüksek olmakla birlikte hipoksi kontrol ile hipoksi CQ arasında bu dönüşüm daha azdır. p62 protein miktarları karşılaştırıldığında hipoksi kontrole kıyasla hipoksi CQ grubunda artış daha yüksek olmasına karşın normoksi CQ ile hipoksi CQ kıyaslandığında normoksi grubunda P62 protein miktarı daha yüksektir. CQ uygulamasının hem normoksi uygulamasında hem de hipoksi uygulamasında Wip1 protein miktarını arttırdığı gözlemlenmektedir. p-ULK1 (Ser555) ve p-ULK1 (Ser757) proteinlerine gelindiğinde ise, hipoksi CQ grubunda hipoksi kontrole kıyasla daha yüksek protein miktarı gözlenirken normoksi gruplarında bu etki daha düşük düzeylerde gözlemlenmektedir. Uygulanan CQ konsantrasyonu normoksi ya da hipoksi T-ULK1 protein miktarını etkilememektedir. Wip1'in küçük inhibitörü olan GSK'nın uygulandığı gruplardaki değişim incelendiğinde beklenildiği gibi Wip1 protein miktarı hem hipoksi hem de normoksi gruplarında azalmıştır. Hem normoksi hem de hipoksi GSK gruplarında LC3 I/II dönüşümünde azalma meydana gelmiştir. Hem hipoksi hem de normoksi gruplarında kontrole kıyasla GSK grubunda p62 protein miktarında artış gözlemlenmektedir. Kontrol grupları ile GSK grupları kıyaslandığında hem normoksi hem de hipoksi de GSK uygulanan gruplarda p-ULK1 (Ser555) ve p-ULK1(Ser757) proteinlerinin miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir. Wip1-ULK etkileşimine işaret etmektedir. T-ULK1 protein miktarı hipoksi GSK grubunda değişme göstermezken normoksi GSK grubunda normoksi kontrol grubuna kıyasla daha yüksektir. (Şekil 29)

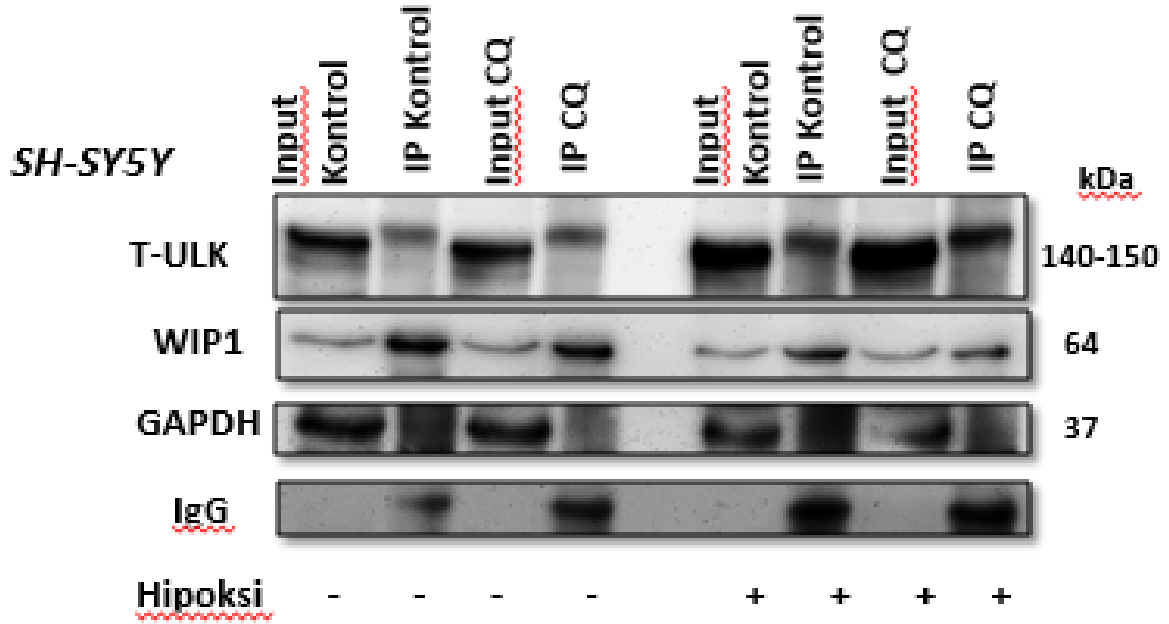


Şekil 29. MCF-7 hücrelerinde Wip1 inhibisyonu ve hipoksi aracılı otofaji proteinlerinin WB analizi

4.2.2.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi Koşullarında ULK1-WIP1 Etkileşiminin İmmünçöktürme Yöntemi ile Gösterilmesi

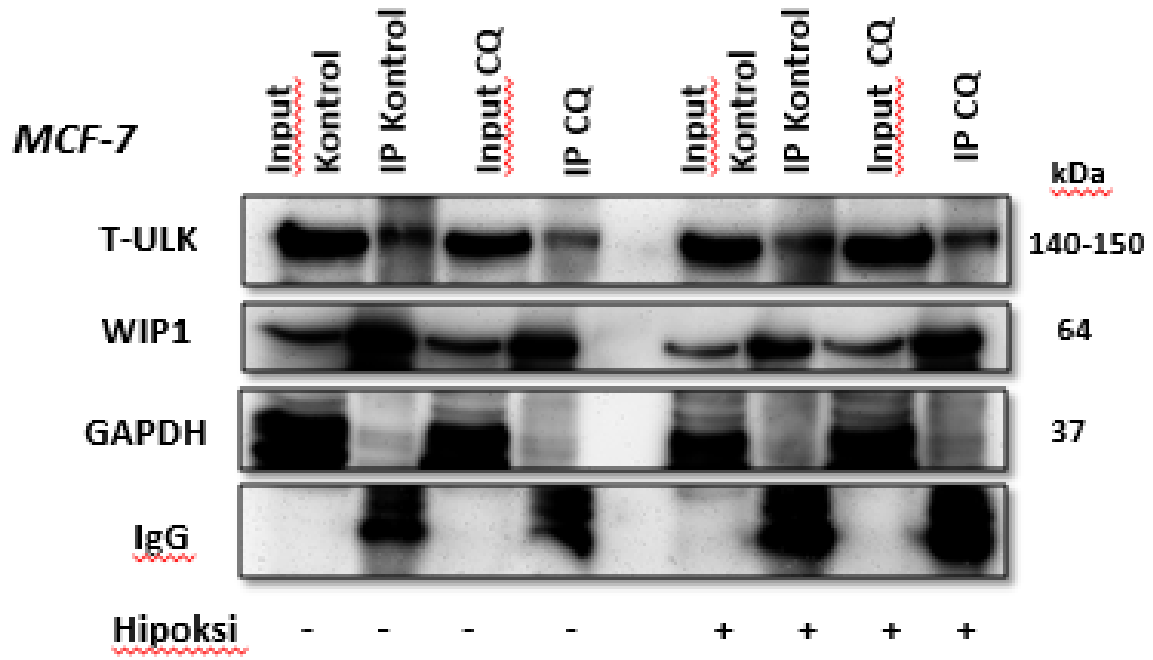
Şekil 30'de SH-SY5Y hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda Wip1- ULK1 etkileşimi immün çöktürme yöntemi ile gösterilmiştir. SH-SY5Y hücre hattında bead ile muamele edilmeyen input grupları kendi içinde kıyaslandığında T-ULK1 protein miktarı normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubunda artış göstermektedir. Aynı biçimde normoksi input grupları kendi içinde kıyaslandığında normoksi CQ grubunda normoksi kontrole kıyasla T-ULK1 protein miktarında artış gözlenmektedir. Aynı etki hipoksi CQ ile hipoksi kontrol grupları arasında da gözlemlenmiştir. IP grupları kıyaslandığında normoksi CQ grubunda normoksi kontrole kıyasla artış gözlenmiştir. Aynı etki hipoksi IP gruplarında da görülmektedir. Normoksi IP grupları ile hipoksi IP grupları kıyaslandığında hipoksi gruplarında T-ULK1 protein miktarı normoksiye artış göstermiştir. Buna ek olarak hem IP gruplarında hem de Input gruplarında yüklenen protein miktarı ile doğru orantılı olarak Wip1 protein varlığı

gözlemlenmektedir. Input gruplarının internal kontrolü olarak GAPDH, IP gruplarının internal kontrolü olarak IgG kullanılmıştır.



Şekil 30. SH-SY5Y hücre hattında hipoksi koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünoçöktürme yöntemi ile gösterilmesi.

Şekil 31’de MCF-7 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda Wip1- ULK1 etkileşimi immün çöktürme yöntemi ile gösterilmiştir. MCF-7 hücre hattında bead ile muamele edilmeyen input grupları kendi içinde kıyaslandığında T-ULK1 protein miktarı normoksi grubuna kıyasla hipoksi grubunda artış göstermektedir. Normoksi IP grupları ile hipoksi IP grupları kıyaslandığında hipoksi gruplarında T-ULK1 protein miktarı normoksiye artış göstermiştir. Buna ek olarak hem IP gruplarında hem de Input gruplarında yüklenen protein miktarı ile doğru orantılı olarak Wip1 protein varlığı gözlemlenmektedir. Input gruplarının internal kontrolü olarak GAPDH, IP gruplarının internal kontrolü olarak IgG kullanılmıştır.



Şekil 31. MCF-7 hücre hattında hipoksi koşullarında WIP1- ULK1 etkileşiminin İmmünöçöktürme yöntemi ile gösterilmesi

Her iki hücre hattı ile yapılan immünöçöktürme analizi sonucunda hipoksi koşullarında artan T-ULK1 miktarı ve Wip1 bandı Wip1-ULK1 etkileşiminin varlığına işaret etmektedir.

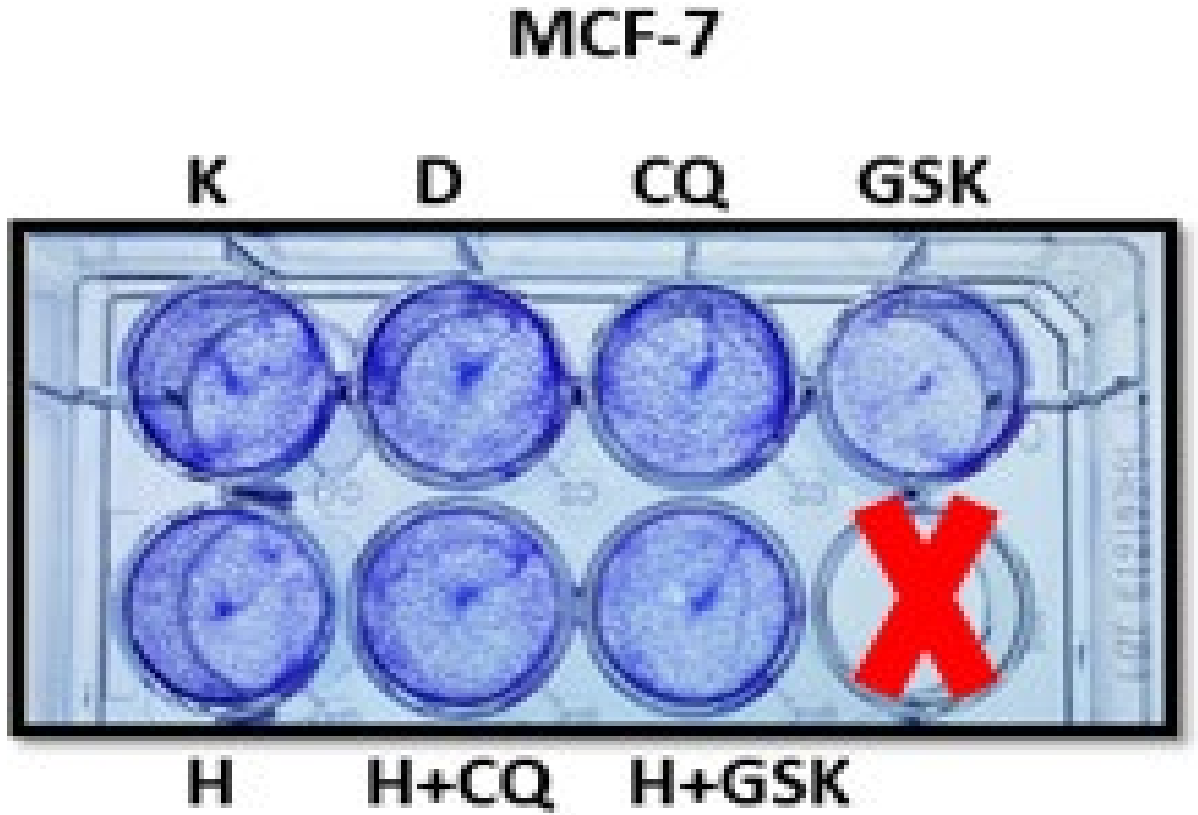
4.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Otofaji İnhibisyonunun Koloni Oluşumuna Etkileri

4.3.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Açlıkla İndüklenen Otofaji inhibisyonunun Koloni Oluşumuna Etkileri

Kolonojenik assay, tek bir hücrenin koloniye dönüşme yeteneğine dayanan bir in vitro yöntemdir. Kolonojenik assay, esas olarak popülasyonda ki her hücreyi "sınırsız" bölünme geçirme yeteneği açısından test etmektedir. Bu bağlamda inhibisyonu HBSS ile açlıkla indüklenen otofaji veya Wip1 inhibisyonu koşullarında SH-SY5Y ve MCF-7 hücre hatlarının koloni oluşturmakabiliyeti ölçülmüştür.

Şekil 32 'de MCF-7 hücre hattında yapılan kolonojenik assay sonucunda HBSS grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında her iki hücre hattında da HBSS uygulaması ile kontrol grubu arasında farklılık gözlemlenmezken GSK uygulanan gruplarda koloni miktarında azalma gözlenmiştir.

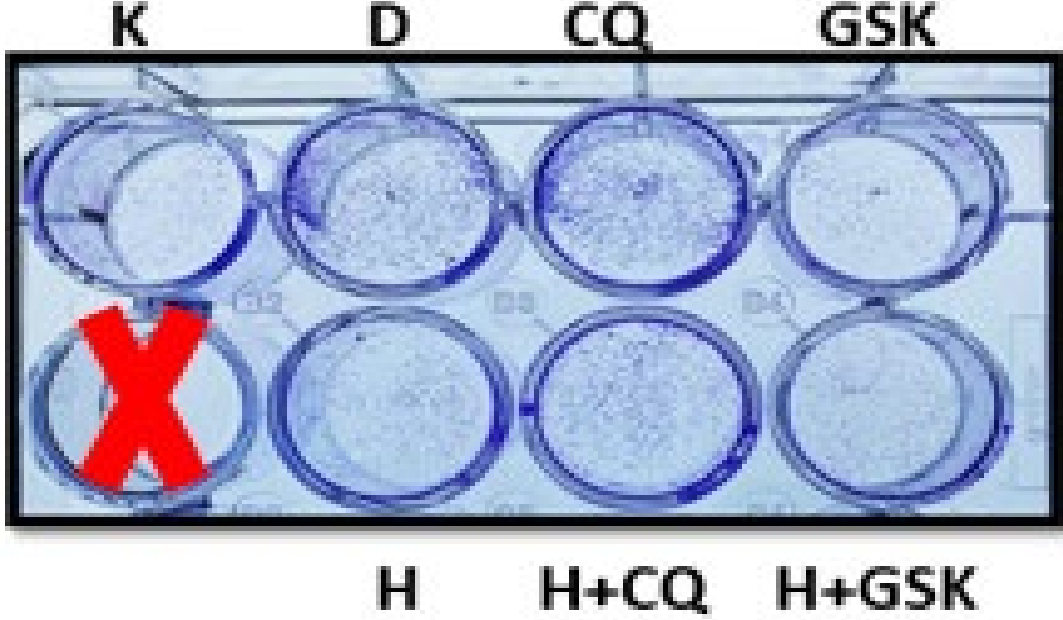
HBSS+GSK grubu ile tek başına GSK grubu; HBSS+CQ grubu ile CQ grubu kıyaslandığında ise koloni sayıları arasında bir farklılık gözlenmemiştir. (Şekil 32)



Şekil 32. MCF-7 hattında açlık muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri.

Şekil 33'de SH-SY5Y hücre hattında yapılan kolonojenik assay sonucunda GSK ve HBSS+ GSK uygulanan gruplarda hücrenin koloni miktarının azaldığı gözlenirken aynı etki CQ ve HBSS+CQ grubunda gözlenmemiştir.

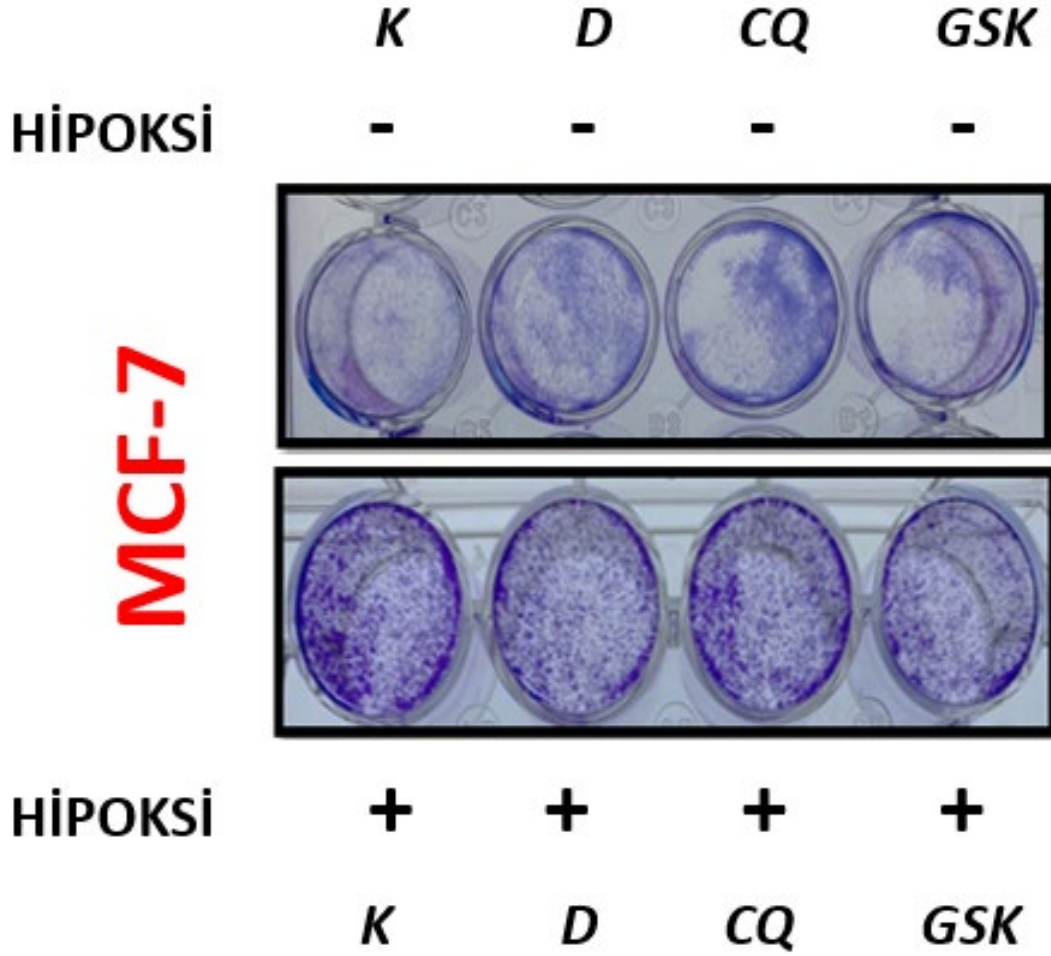
SH-SY5Y



Şekil 33. SH-SY5Y hattında açlık muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri.

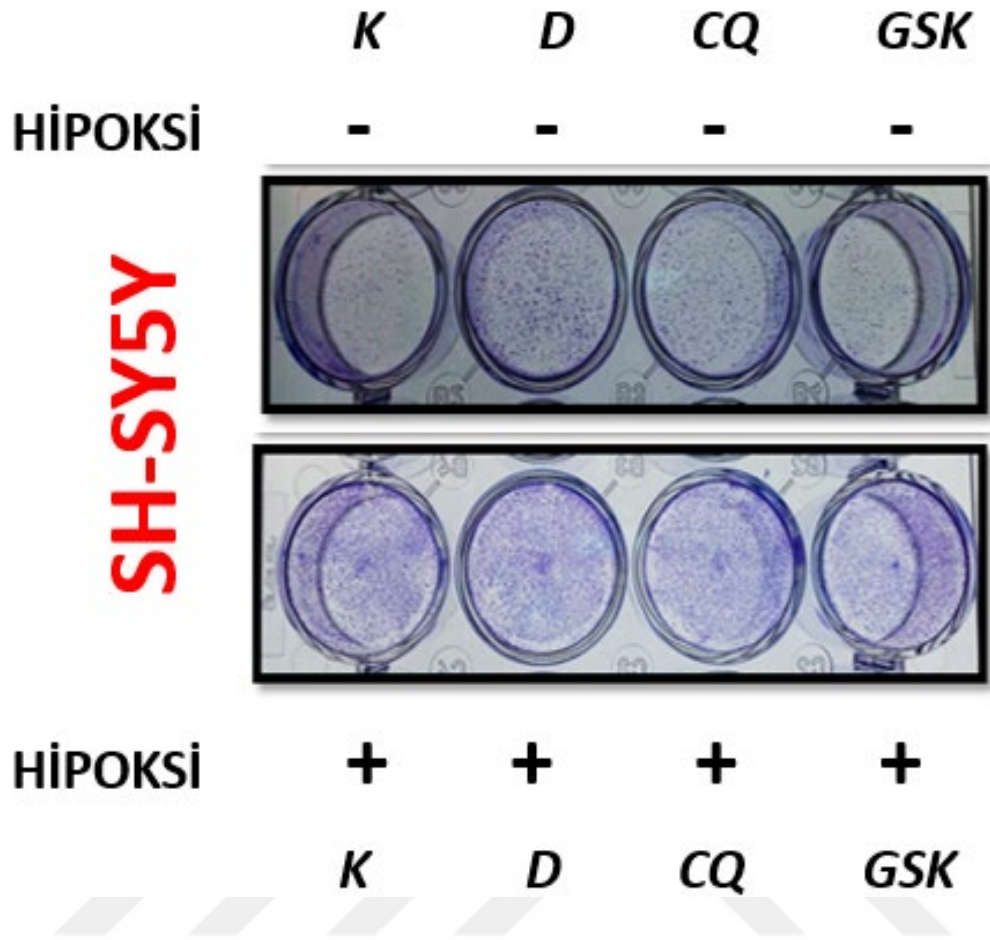
4.3.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Hipoksi ile indüklenen Otofaji inhibisyonunun Koloni Oluşumuna Etkileri

Tek bir hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetini ölçmeye yarayan kolonojenik assay deneyinde MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında hipoksik ve normoksik koşullarda otofaji ve Wip1 inhibisyonu gerçekleştiğinde koloni oluşturabilme kabiliyetleri incelenmiştir. Şekil 34’de MCF-7 hücre hattında, hipoksi ve normoksi grupları incelendiğinde normoksi kontrole kıyasla hipoksi kontrol grubunda koloni oluşturabilme kabiliyetinde artış gözlenmiştir. Aynı etki normoksi CQ ile hipoksi CQ; normoksi GSK ile hipoksi GSK arasında da gözlenmiştir.



Şekil 34. MCF-7 hücrelerinde hipoksi muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri.

Benzer şekilde, Şekil 35’de SH-SY5Y hücre hattında normoksi gruplarına kıyasla hipoksi gruplarında koloni miktarında artış gözlemlenmektedir. Normoksi kontrole kıyasla hipoksi kontrol; normoksi CQ’ya kıyasla hipoksi CQ; normoksi GSK’ya kıyasla hipoksi GSK’da koloni miktarı daha yüksektir.



Şekil 35. SH-SY5Y hattında hipoksi muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine olan etkileri.

5.TARTIŞMA

Otofaji hücrede enerji ihtiyacını karşılayarak hücre homeostazına katkı sağlayan, hücre sağ kalımını indükleyen temel bir yolaktır. Otofaji indüksiyonu, birden fazla sinyal aracılığı ile meydana gelmektedir. Otofaji aracılığı ile hücre içerisinde mitokondri miktarının aşırı artması engellenmekte olup, özellikle doğru çalışmayan mitokondrilerin eliminasyonu gerçekleşmektedir. Buna ek olarak, doğru çalışmayan mitokondrilerin sebep olduğu hücre içerisinde aşırı artış gösteren ROS miktarı, DNA hasarını ve buna bağlı olarak p53 aktivasyonunu indüklemektedir. (Hamanaka ve Chandel, 2010) Otofaji artan mitokondri degradasyonu aracılığı ile artan ROS miktarını elimine etmekle kalmayıp aynı zamanda hücrede yanlış çalışan ER, yanlış katlanmış proteinler, gibi hücre homeostazını bozan durumları da elimine etmektedir. (Hoyer-Hansen ve Jaattela, 2007) Otofajide, degrade edilecek materyal otofagozom adı verilen çift zarlı membran yapısı içerisine hapsedilerek lizozomda degradasyona uğratılır. Böylelikle yapıtaşlarına ayrılan kargo tekrar kullanılmak üzere hücre içerisinde ilgili yerlere gönderilir. Otofaji hipoksik koşulların varlığı, ATP: AMP oranında değişim gibi metabolik streslerle indükleneceği gibi etoposid, doxorubusin gibi genotoksik ajanlar aracılığı ile de indüklenebilen bir yolaktır. (Kaushik ve diğerleri, 2010; Torii ve diğerleri, 2016)

Metabolik stres tiplerinden biri olmasının yanında tümörlerde de karakteristik bir özellik olan glikoz yoksunluğu, otofajinin en çok çalışılan konularından biridir. Mekanizması en iyi bilinen otofaji tipi olmasına karşın açlık indüklü otofaji yolağı ile ilgili kesin mekanizma henüz tam olarak çözülebilmemiş değildir. Buna rağmen, otofaji başlangıç kompleksi olarak adlandırılan ULK1 kompleksinin mTORC1 aracılığı ile fosforile hale gelmesi ile aktifleştiği bilinmektedir. mTORC1'un otofajiyi negatif yönde regülasyonu glikoz yoksunluğu, aminoasit eksikliği ve ATP: AMP oranında değişim gibi çeşitli açlık faktörleri ile indüklenen AMPK kinaz aracılığıyla inhibe edilmektedir. Aktif hale geçen AMPK TSC2 aracılığıyla indirek yoldan mTORC1 inhibisyonunu indüklemenin yanında; ULK1 proteininin otofosforilasyonunu indüklemek, RAPTOR proteini aracılığıyla mTORC1'un direk baskılanmasını indüklemek gibi stratejilere de sahiptir. (Canto ve Auwerx, 2010; Lazarus ve diğerleri, 2015) ULK1 defosforilasyonu otofaji başlangıç kompleksinin oluşması için gerekli olan bir basamaktır. Ancak bu basamakta mTORC1 haricinde başka hangi fosfatazların otofaji indüksiyonuna dahil olduğu gizemini korumaya devam etmektedir.

Bir başka metabolik stres tipi olan hipoksinin otofaji indüksiyonunda etkili olduğu görece yeni bir konudur. Özellikle solid tümörlerde karşımıza çıkan hipoksik ortam otofaji indüksiyonunda HIF-bağımlı ve HIF-bağımsız olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Her iki yolağın mekanizmasında da büyük boşluklar bulunmasında karşın HIF-bağımlı yolağın HIF-bağımsız yolağa kıyasla moleküler mekanizması daha net bilinen bir yoldur. HIF-bağımlı yolda aktifleşen HIF1 α transkripsiyonel hedeflerinden biri olan BNIP3/BNIP3L proteinlerini aktifleştirmektedir. Aktifleşen BNIP3/BNIP3L proteinleri Beclin1/Bcl-2 Beclin1/Bcl-xL komplekslerini bozarak pro-apoptotik proteinlerle etkileşime girmekte Beclin1 proteinlerinin serbest hale geçmesine sebep olmaktadır. Serbest hale geçen Beclin1 proteinleri aracılığıyla otofaji indüksiyonu sağlanmaktadır.(Mazure ve Pouyssegur, 2010) Buna ek olarak, mTORC1 aktivitesinin regülasyonu sadece besin yetersizliği üzerinde değil oksijen yetersizliği üzerinden de kontrol edilmektedir. Azalan oksijen seviyesine bağlı olarak mTORC1 seviyesi düşmekte bu durum otofaji indüksiyonuna neden olmaktadır.(Zaarour ve diğerleri, 2021) Bu durum oksijen miktarının düşük olduğu solid tümörlerde artmış otofaji indüksiyonuyla paralellik göstermesinin yanında otofajinin HIF1 α stabilizasyonunu regüle etmesi otofajinin kanserde tartışmalı rolünü açığa çıkarmada önemli bir yere sahiptir. (DePavia ve diğerleri, 2016)

Otofaji-kanser eksenindeki çalışmalar çeşitlilik göstermekte birlikte elde edilen son veriler ışığında otofajinin kanserin ilerleyen evrelerinde kanser lehine çalışarak kemoterapötik ajanlara direnç, immün cevabın baskılanması, inflamasyonu indüklemeye gibi cevaplar oluşturduğu bilinmektedir. (Zaarour ve diğerleri, 2021) Wu ve arkadaşlarının kanser hücreleriyle yapmış olduğu bir in vitro çalışmada, HIF1 α aracılığıyla indüklenen otofajide BNIP3 ve Beclin1 proteinlerinde artış gözlenmiştir. Bu durumun bir kemoterapötik ajan olan cisplatin uygulamasına karşı direnç geliştirdiği saptanmıştır. olup otofaji indüksiyonunun solid tümörlerde ilaç direncini indüklediği gösterilmiştir. (Wu ve diğerleri, 2015) Buna ek olarak, solid tümörlerin otofaji indüksiyonuna bağımlı olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Gou ve arkadaşları besin yoksunluğunda indüklenen otofajide mitokondrinin Ras-bağımlı transformasyonu desteklediğini göstermektedir. (Guo ve diğerleri, 2011) Ras-transformasyonuna uğramış meme epitel hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise otofajinin glikoz geçişini glikoliz aracılığı ile arttırdığını dolayısıyla hücre sağ kalımını indüklediği gösterilmiştir.(Lock ve diğerleri, 2011) Bütün bunlar göz önüne alındığında, otofaji kanser ekseninin daha iyi aydınlatılabilmesi için otofaji yolağının moleküler mekanizmasının net bir biçimde araştırılması gerektiği açıktır.

Otofaji indüksiyonunda görevli komplekslerin bilinmesine rağmen bu komplekslerin aktifleşmesinin ardındaki elemanların hepsi henüz gün yüzüne çıkarılamamıştır. Torii ve ark. 2016'da yayınladığı bir çalışmaya göre sağlıklı hücrelerde genotoksik stres aracılığı ile indüklenen otofaji varlığında DNA hasarının düzenlenmesinde önemli bir fosfataz olan Wip1 fosfatazın, otofaji başlangıç kompleksinde yer alan ULK1'in defosforilasyonunda görev aldığı gösterilmiştir. (Torii ve diğerleri, 2016). Sağlıklı hücrelerde genotoksik stresle indüklenerek apoptoz, senesens, geçici hücre döngüsü tutuklanması gibi birçok yolağın indüklenmesinde görev olan p53'ün negatif yönde düzenleyicisi olan Wip1'in solid tümörlerde amplifiye olması ve aşırı ekspresyonu otofaji- kanser ekseninin açıklanmasında yeni bir perspektif kazandırmıştır. Ancak Torii vd. tarafından yapılan bu çalışma sağlıklı hücreler ile sınırlı kalmış olup solid tümörlerdeki Wip1-otofaji ilişkisi araştırılmamıştır. Buna ek olarak, solid tümörlerin karakteristik özelliklerinden olan hipoksi ya da glikoz sınırlandırılması gibi metabolik streslerin varlığında otofaji indüksiyonu ve Wip1 ilişkisi literatürde karşımıza boşluk olarak çıkmaktadır. Bu sorulara yanıt bulmak amacıyla, yapılan bu tez çalışmasında, Wip1'i aşırı eksprese eden meme kanseri (MCF-7) ve nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre dizileri kullanılmıştır. Otofaji, hipoksi ve glikoz yoksunluğu gibi metabolik stresler aracılığı ile indüklenebilmektedir. (Altman ve Rathmell, 2012). Hücrelerde açlıkla otofaji indüksiyonu HBSS tamponu ile sağlanmış olup hücrelerin metabolik indüklü otofajiye verdikleri yanıt WB, immünoçöktürme (IP), immünfloresan, annexin V/7AAD, MTT gibi tekniklerle gösterilmiştir. Otofaji inhibisyonunda CQ'nun etkin bir inhibitör olduğu bilinmektedir. (Maycotte ve diğerleri, 2012) CQ otofaji yolağının son basamağı olan otofagozom ile otolizozomun birleşmesini inhibe ederek lizozomun pH'ını arttırmakta ve lizozom içerisindeki enzimlerin aktivitesini bozmaktadır. Böylelikle, otofagozom ile lizozom birleşmesi inhibe edilerek otofaji baskılanmaktadır. Spesifik bir Wip1 antagonisti olan küçük molekül GSK2830371 (GSK) allosterik bir inhibitördür. GSK'nın Wip1 üzerindeki etkisini Wip1 proteininin flap alt bölgesine bağlanarak fosfataz aktivitesini inhibe ederek göstermektedir. (Gilmartin ve diğerleri, 2014) Bu çalışma hem Wip1 inhibitörü hem de otofaji inhibitörü kullanılarak Wip'in metabolik stres indüklü otofajide etkileri konusunda yapılan ilk kapsamlı çalışma olup otofaji-Wip1 ilişkisinin açığa çıkarılması konusunda literatüre yapacağı katkılar açısından önemli bir yere sahip olacaktır.

Yapılan analizler sonucunda elde edilen tüm veriler ayrıntılı olarak aşağıda başlıklar altında tartışılmıştır ve buna bağlı olarak çeşitli öneriler sunulmuştur.

5.1. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Metabolik Stres İndüklü Otofaji

SH-SY5Y ve MCF-7 hücre hatlarında açlık ve hipoksi ile otofaji indüksiyonunun sağlanabilmesi için HBSS ve hipoksi uygulamalarında süre ayarlaması literatür taramaları aracılığı ile belirlenmiştir. SH-SY5Y hücre hattında otofaji indüksiyonu Şekil 6'da gösterildiği gibi otofaji proteinleri aracılığı ile test edilmiştir. SH-SY5Y hücre hattı ile ilgili yapılan literatür taramasında GSK konsantrasyonuna yapılan literatür taramasında HBSS muamelesinin 2-4 saat aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.(Manganelli ve diğerleri, 2021) SH-SY5Y hücrelerine yapılan 4 saat HBSS muamelesinin otofaji indüksiyonunu tetiklediği LC3 I/II dönüşümü ve p62 protein miktarındaki azalma ile gösterilirken kullanılan CQ konsantrasyonunun otofaji baskılanmasında etkili olduğu hem p62 protein miktarındaki artış hem de LC3 I/II dönüşümündeki birikim ile gösterilmiştir. Buna ek olarak, kullanılan GSK konsantrasyonunun Wip1 baskılamasında etkili olduğu ilgili gruplarda azalan Wip1 miktarı ile gösterilmiştir. Bu bağlamda elde edilen sonuçlar literatür ile paralellik göstermekte olup 4 saat HBSS, CQ (10 μ M), GSK (1 μ M) uygulamasının etkili olduğu gösterilmiştir

MCF-7 hücrelerinde HBSS muamelesi 8 saat maruz bırakılmasına 2017 yılında Zhu ve ark. açlık indüklü otofaji ile ilgili yayını aracılığıyla karar verilmiş olup Şekil 7'de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. HBSS muamelesine maruz bırakılan gruplarda 8 saat muamelenin otofaji indüksiyonu için yeterli geldiği hem LC3 I/II dönüşümü ile hem de p62 degradasyonu ile gösterilmiş olup elde edilen veriler literatürde MCF-7 hücrelerinin açlık indüksiyonuna maruz bırakıldığı yayınlarla paralellik göstermiştir.(Zhu ve diğerleri, 2017) Buna ek MCF-7 hücrelerinde yapılan literatür taraması sonucunda otofaji inhibisyonu için en etkili CQ konsantrasyonunun 10 μ M olduğu saptanmıştır. (Bai ve diğerleri, 2016) Belirlenen CQ dozunun etkili olduğu Şekil 7'de hem tek başına CQ hem de HBSS+CQ gruplarında p62 protein miktarındaki artış ile gösterilmiştir. Belirlenen GSK konsantrasyonunun Wip1 proteinini baskılamada etkili olduğu hem tek başına GSK hem de HBSS+GSK gruplarında azalan Wip1 miktarıyla gösterilmiştir. Bu bağlamda, Şekil 7'de MCF-7 hücre hattı için 8 saat HBSS muamelesinin açlık indüksiyonunda yeterli olduğunun gösterilmesinin yanında uygulanan CQ ve GSK konsantrasyonlarının etkili olduğu gösterilmektedir.

LC3 dönüşümünün immün floresan yöntemi ile belirlenmesi otofaji çalışmalarında yaygın kullanılan bir tekniktir. Otofaji indüksiyonunun gerçekleştiği ya da baskılandığı gruplarda LC3 punkta oluşumunda artış meydana gelir. (Eng ve diğerleri, 2010) Şekil 8 ve 9'da MCF-7 ve SH-SY5Y hücrelerinde açlık indüksiyonu sonucunda LC3 punkta yapısındaki

değişim gösterilmiştir. CQ ve HBSS uygulamalarının ayrı ayrı ya da kombin formlarında kontrole kıyasla punkta yapısında artış gözlemlenmesi HBSS uygulamasının otofaji indüksiyonunda etkili olduğunu gösterirken CQ uygulanan gruplarda artan punkta oluşumu otofaji baskılanması ile ilişkilendirilmektedir. (Pugsley, 2017) GSK'nın tek başına uygulandığı gruplara gelindiğinde ise kontrole aynı etkinin gözlemlenmiş olup HBSS+GSK gruplarında ise tek başına HBSS grubuna kıyasla punkta oluşumunda azalmaların meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışması boyunca MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında besin yoksunluğunun hücre canlılığına etkisi olmadığı ve elde edilen verilerin sadece otofaji indüksiyonundan kaynaklandığının gösterilmesi adına MTT sitotoksosite ve annexin V/7AAD apoptoz testi uygulanmıştır. Yapılan sitotoksosite testi ile hücre canlılığının düşmediği şekil 10 ve 11'de gösterilmiştir. Buna ek olarak, şekil 12 ve şekil 13'de yapılan annexin V/7AAD uygulamasının sonuçları gösterilmiştir. Elde edilen veriler ışığında total ölüm oranının % 14'ü geçmediği göz önüne alınarak uygulanan konsantrasyonların hücrede apoptoz indüksiyonunu tetiklemediği gösterilmiştir. Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında, MCF-7 hücrelerinde 8 saat HBSS, CQ (10 μ M) ve GSK (5 μ M); SH-SY5Y hücrelerinde 4 saat HBSS, CQ (10 μ M) ve GSK (1 μ M) uygulamalarının apoptozu indüklediği gösterilirken aynı zamanda hücre canlılığına etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Hipoksi ile otofaji indüksiyonu süreleri yapılan literatür taramaları sonucunda MCF-7 (Tan ve diğerleri, 2016) ve SH-SY5Y (Tan ve diğerleri, 2018) için 24 saat olarak belirlenmiştir. Otofaji proteinleri ile yapılan western blot deneyinde Şekil 15'de SH-SY5Y hücre hattında hipoksi uygulamasının otofaji indüksiyonunu sağladığı hem LC3 I/II dönüşümü aracılığıyla hem de p62 protein miktarındaki azalma ile tespit edilmiştir. Ek olarak, kullanılan CQ konsantrasyonunun otofaji inhibisyonunda etkili olduğu hem normoksi hem de hipoksi gruplarında p62 birikimi ile tespit edilmiştir. GSK konsantrasyonunun hem normoksi hem de hipoksi koşullarında etkili olduğu azalan Wip1 protein miktarı ile gösterilmiştir. Şekil 16'da aynı etki MCF-7 hücre hattında da gözlenmiştir.

Otofaji indüksiyonunun bir başka belitreci olan LC3 punkta oluşumu hipoksik şartlarda uygulandığında elde edilen sonuçlar şekil 17 ve 18'de gösterilmiştir. Analiz ayrıntılı incelendiğinde normoksik şartlarda CQ uygulaması ile LC3 punkta yapısında artış gözlemlenmiş olup bu etkinin hipoksi CQ gruplarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak aynı etki normoksi GSK gruplarında gözlenmemiştir. Hipoksi GSK grubunda ise artmış LC3 punkta formu gözlenmektedir. Buna ek olarak normoksi ile hipoksi grupları

kıyaslandığında tüm hipoksi gruplarında artan LC3 yapısı her iki hücre hattında da gözlenmiş olup elde edilen veriler literatürle paralellik göstermektedir.

ULK1-Wip1 ilişkisinin açığa çıkarılmasına yönelik yapılan bu tezde elde edilecek verilerin sadece otofaji indüksiyonu sonucu elde edildiğinin gösterilmesi için hipoksi koşullarında da MTT ve Annexin V/7AAD testi uygulanmıştır. Şekil 19 ve 20’de MTT analizi sonucunda hipoksik ya da normoksik koşulların hücre canlılığı üzerine etkili olmadığı gösterilmiştir Buna ek olarak, şekil 21 ve Şekil 22’de hem SH-SY5Y hem de MCF-7 hücre hattında hipoksi ve normoksi uygulamalarının apoptozu indüklediği gösterilmiştir. . Bu bağlamda, SH-SY5Y hücre hattında 24 saat hipoksi, CQ (10 µM), GSK (1 µM) uygulamasının; MCF-7 hücre hattında ise 24 saat hipoksi, CQ (10 µM), GSK (5 µM) uygulamasının otofaji indüksiyonunda etkili olduğu gösterilirken apoptoz ve hücre canlılığına etkileri olmadığı tespit edilmiştir.

5.2. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Metabolik Stres İle İndüklenen Otofaji Aktivasyonuna Etkileri

Açlık ve hipoksi indüklü otofaji varlığı sağlanan koşullarda Wip1 inhibisyonu da sağlanarak otofajinin Wip1’e bağlı inhibe edilip edilmediği LC3 I/II, p62, total T-ULK1 ve fosfo —p-ULK1 (Ser 555), p-ULK1 (Ser757) ve protein düzeylerindeki değişimi analiziyle incelenmiştir. Şekil 24 ve 25’te HBSS uygulanan gruplarda her iki fosforillenme bölgesinde de meydana gelen defosforilasyon otofaji indüksiyonunun meydana geldiğine işaret etmekte olup elde edilen sonuçlar bu alanda literatürde bulunan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. (Kang ve diğerleri, 2013; Puente ve diğerleri, 2016) Buna ek olarak otofajinin son basamağını baskılayan bir inhibitör olan CQ varlığından özellikle MCF-7 hücre hattında ULK fosforilasyonunun Ser 555 bölgesinde birikim gösterdiği gözlemlenmiştir. Açlık indüklü otofajide birincil defosforilasyon hedefi olan Ser555 bölgesi AMPK tarafından defosforile hale getirilmektedir. (Egan ve diğerleri, 2011) HBSS+CQ grubunda gözlemlenen bu etki tek başına CQ grubunda da gözlemlenmesinin yanında aynı etki bir başka fosforillenme bölgesi olan Ser 757’te gözlemlenmemiştir. Ancak bu alanda yapılan çalışmaların yetersizliği bu durumun etki mekanizmasını açıklamada yetersiz kalmış olup literatürde boşluk olarak karşımıza çıkmaktadır. GSK aracılığı ile Wip1’inhibisyonu sağlandığında metabolik stres indüklü otofajide ULK fosforilasyonundaki değişim (Ser555 ve Ser757) WB ile analiz edilmiştir. MCF-

7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında Wip1 inhibisyonu sağlandığında ULK fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir. (Şekil 24, 25) Literatürde konu ile ilgili tek yayının sağlıklı hücrelerde genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonundan elde edilen veriler olmasına karşın paralel sonuçlar elde edilmiştir. (Torii ve diğerleri, 2016) Ayrıca, GSK uygulanan gruplarda p62 birikiminin meydana geldiği sonucunun elde edilmesi Wip1 inhibisyonunun aynı zamanda otofaji baskılanmasına neden olduğuna işaret etmektedir.

ULK1 defosforilasyonunun Wip1'e bağlı gerçekleştiğini Wip1 ve ULK1 etkileşimini göstermek amacıyla MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında immünçöktürme yöntemi de uygulanmış ve açlık indüklü otofaji sırasında ULK1 ve Wip1 birlikte çöktürülüp Wip1-ULK1 her iki hücre hattı için de gösterilmiştir. (Şekil 26, 27)

Bir başka metabolik stres tipi olan hipoksi indüklü otofaji varlığında Wip1-ULK ilişkisi WB analizi ile incelenmiştir. Oksijen yoksunluğunda stabilize hale geçen, hipoksi markeri olan HIF1 α 'nın (Seront ve diğerleri, 2013) varlığı MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında gösterilmiştir. Buna ek olarak, hipoksi ile otofaji indüksiyonunun sağlandığı hipoksi gruplarında artan LC3 I/II dönüşümü, azalan p62 miktarı ile gösterilmesinin yanında İki farklı ULK1 bölgesinden (Ser555 ve Ser757) defosforile hale geçildiği gösterilmiştir. (Şekil 28, 29) Normoksik ya da hipoksik koşullarda uygulanan GSK aracılığıyla Wip1 inhibisyonu sağlandığında ULK1 fosforilasyonunun arttığı özellikle Ser555 bölgesinde açıkça görülmektedir. Buna ek olarak GSK uygulanan gruplarda özellikle hipoksik koşullarda artan p62 birikimi görülmekte olup bu durum GSK aracılığıyla otofajinin baskılanmasına işaret etmektedir.

Hipoksik ve normoksik koşullarda ULK1-Wip1 etkileşimi açığa çıkarılabilmek için immünçöktürme yöntemi kullanılmıştır. Şekil 30 ve Şekil 31'de açıkça gösterildiği gibi normoksik koşullarda Wip1-ULK1 etkileşimi görülmesine ek olarak hipoksik koşullarda da her iki proteinin miktarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler kapsamında hipoksi ile indüklü otofaji de Wip1 varlığının ULK1 defosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir.

5.3. MCF-7 ve SH-SY5Y Hücrelerinde Wip1 İnhibisyonunun Metabolik Stres Koşullarında Koloni Oluşumuna Etkileri

Şekil 32 ve şekil 33'de MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında açlık muamelesinin hücrenin koloni oluşturabilme kabiliyetine etkileri olup olmadığı test edilmiştir. Elde edilen

veriler doğrultusunda her iki hücre tipinde de açlık uygulamasının hücrenin proliferasyon yeteneğini etkilemediği gözlemlenmiş olup GSK ve HBSS+ GSK uygulanan gruplarda koloni miktarının azaldığı gözlenmiştir. Bu durum otofajinin koloni oluşturma yeteneğinin teşvik ettiğine işaret etmektedir. Şekil 34 ve 35’de hipoksi indüklü otofajinin hücrelerin koloni oluşturabilme kabiliyetlerine etkileri gösterilmiştir. Hem MCF-7 hemde SH-SY5Y hücre hatlarında hipoksik şartlardaproliferasyon yeteneğinin daha yüksek olduğu gözlenmiş olup hipoksik CQ ve hipoksik GSK gruplarında da normoksik gruplara kıyasla daha yüksek proliferasyon gözlemlenmiştir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada, onkogenik Wip1'i aşırı ifade eden MCF-7 meme ve SH-SY5Y nöroblastoma hücre hatlarında açlık ve hipoksi indüklü otofajide Wip1'in rolü araştırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen en önemli sonuçlar;

- 1) Hem normoksi hem hipoksi hem de açlık koşullarında her iki hücre hattında da Wip1'inhibisyonu ile ULK1' Ser 555 ve Ser757 rezidularından fosforilasyonun arttığı WB yöntemi ile gösterilmiştir. Wip1 ve ULK1'in interaksyonu da immünçöktürme yöntemi ile gösterilmiştir.
- 2) Wip1'in GSK ile inhibisyonu sonrasında hem normoksik hem hipoksik hem de açlık koşullarında MCF-7 ve SH-SY5Y hücre hatlarında p62 akümüasyonunun artışı otofaji inhibisyonuna dolayısıyla Wip1'in otofajinin indüklenmesinde rolü olduğuna işaret etmektedir.
- 3) Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler ilk defa Wip1'in ULK1'un birden fazla bölgeden defosforilasyonuna aracılık edebileceğine ve hedefleri arasında bulunabileceğine işaret etmiştir.

Literatürde bu konuda kanser hücre hatlarında açlık ve hipoksi gibi kanserin karakteristik özellikleri arasında olan metabolik stresler aracılığıyla otofaji indüksiyonunda Wip1 –ULK1-etkileşiminin varlığı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmaması ve ilk defa bu tez kapsamında araştırılmış olması bu çalışmayı oldukça özgün kılmaktadır.

Elde edilen veriler sonucunda Wip1-ULK etkileşimi açığa çıkarılmasına karşın Wip1 fosfatazın otofajide diğer basamaklarında etkili olup olmadığı bilinmemektedir. Özellikle hipoksi indüklü otofajide aktif forma geçen BNIP3 ve BNIP3L gibi ULK kompleksinden önce aktif forma geçen proteinlerinin Wip1 inhibisyonuna verdiği cevap literatürde boşluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu duruma ek olarak, hem açlık hem de hipoksi indüklü otofajide önemli bir yere sahip olan BECN1 proteinin Wip1 inhibisyonuna verdiği cevap bilinmemektedir.

Tez çalışması boyunca elde edilen veriler otofaji başlangıç kompleksinde bulunan ULK defosforilasyonunda Wip1 fosfatazın etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Ancak başlangıç

kompleksinde bulunan Atg13,Atg101 gibi proteinlerin defosforilasyonunda Wip1'in etkili bir fofataz olup olmadığı bilinmemektedir. Bütün bunların yanında Wip1 inhibisyonu aracılığıyla baskılanan otofajinin invazyona etkileri bilinmemektedir.

Bütün bunlara ek olarak otofaji modülasyonu ile kanser inhibisyonunun umut vadeden bir yaklaşım türü olması; Wip1 aracılı otofajinin invazyon ve metastaza etkilerinin araştırılmaya değeri olduğuna işaret etmektedir.



KAYNAKLAR

- Altman, B. J. , J. C. Rathmell (2012). "Metabolic stress in autophagy and cell death pathways." *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 4(9):a008763. doi:10.1101/cshperspect.a008763
- Aron, R., Pellegrini, P. ,Green, E. W. , Maddison, D. C., Opoku-Nsiah, K., Oliveira, A. O., Wong, J. S., Daub, A. C., Giorgini, F., Muchowski, P., Finkbeiner, S. (2020). "Publisher Correction: Deubiquitinase Usp12 functions noncatalytically to induce autophagy and confer neuroprotection in models of Huntington's disease." *Nature Communications* 11(1): 2374. doi: 10.1038/s41467-020-16216-6
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N. T. (2008). "Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum." *Journal Cell Biology* 182(4): 685-701. doi: 10.1083/jcb.200803137
- Azad, M. B., Chen, Y., Henson, E. S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S. J., Gibson, S. B. (2008). "Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3." *Autophagy* 4(2): 195-204. doi: 10.4161/auto.5278
- Azad, M. B., S. B. Gibson (2010). "Role of BNIP3 in proliferation and hypoxia-induced autophagy: implications for personalized cancer therapies." *Annals of the New York Academic of Sciences* 1210: 8-16. doi: 10.4161/auto.5278
- Bai, L. Y., Chiu, C. F. Chu, P. C., Lin, W. Y., Chiu, S. J., Weng, J. R. (2016). "A triterpenoid from wild bitter gourd inhibits breast cancer cells." *Scientific Reports* 6: 22419. doi: 10.1038/srep22419
- Band, M., Joel, A., Hernandez, A., Avivi, A. (2009). "Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: in vivo comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*." *FASEB Journal* 23(7): 2327-2335. doi: 10.1096/fj.08-122978
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., Mazure, N. M. (2009). "Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor

- induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains." *Molecular and Cellular Biology* 29(10): 2570-2581. doi: 10.1128/MCB.00166-09
- Belounis, A., Nyalendo, C., Le Gall, R., Imbriglio, T. V., Mahma, M., Teira, P., Beaunoyer, M. Cournoyer, S., Haddad, E., Vassal, G., Sartelet, H. (2016). "Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma." *BMC Cancer* 16(1): 891. doi: 10.1186/s12885-016-2906-9
- Blackford, A. N. , S. P. Jackson (2017). "ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response." *Molecular Cell* 66(6): doi:801-817. 10.1016/j.molcel.2017.05.015
- Boutelle, A. M., L. D. Attardi (2021). "p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network." *Trends Cell Biology* 31(4): 298-310. doi: 10.1016/j.tcb.2020.12.011
- Bujak, A. L., Crane, J. D., Lally, J. S., Ford, R. J., Kang, S. J., Rebalka, I. A., Green, A. E., Kemp, B. E., Hawke, T. J., Schertzer, J. D., Steinberg, G. R. (2015). "AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging." *Cell Metabolism* 21(6): 883-890. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.016
- Canto, C., J. Auwerx (2010). "AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(20): 3407-3423. doi: 10.1007/s00018-010-0454-z
- Casas, K., Bykhovskaya, Y., Mengesha, E., Wang, D., Yang, H., Taylor, K., Inbal, A., Fischel-Ghodsian, N. (2004). "Gene responsible for mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MSA) maps to chromosome 12q24.33." *American Journal of Medical Genetics Part A* 127A(1): 44-49. doi: 10.1002/ajmg.a.20652
- Cechakova, L., Cechakova, L., Ondrej, M., Pavlik, V., Jost, P., Cizkova, D., Bezrouk, A., Pejchal, J., Amaravadi, R. K., Winkler, J. D., Tichy, A. (2019). "A Potent Autophagy Inhibitor (Lys05) Enhances the Impact of Ionizing Radiation on Human Lung Cancer Cells H1299." *International Journal of Molecular Sciences* 20(23). doi: 10.3390/ijms20235881
- Chang, D., Chang, D., Nalls, M. A., Hallgrimsdottir, I. B., Hunkapiller, J., van der Brug, M., Cai, F., International Parkinson's Disease Genomics Consortium and Me Research Team, Kerchner, G. A., Ayalon, G., Bingol, B. Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T. W., Singleton, A. B., Bhangale, T. R., Graham, R. R.. (2017). "A meta-analysis of genome-

- wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci." *Nature Genetics* 49(10): 1511-1516. doi: 10.1038/ng.3955
- Cocco, S., Leone, A., Piezzo, M., Caputo, R., Di Lauro, V., Di Rella, F., Fusco, G., Capozzi, M., Gioia, G. D., Budillon, A., De Laurentiis, M. (2020). "Targeting Autophagy in Breast Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 21(21). doi: 10.3390/ijms21217836
- Corona Velazquez, A. F., W. T. Jackson (2018). "So Many Roads: the Multifaceted Regulation of Autophagy Induction." *Molecular and Cellular Biology* 38(21). doi: 10.1128/MCB.00303-18
- Czarny, P., Pawlowska, E., Bialkowska-Warzecha, J., Kaarniranta, K., Blasiak, J. (2015). "Autophagy in DNA damage response." *International Journal of Molecular Sciences* 16(2): 2641-2662 doi: 10.3390/ijms16022641
- De Duve, C., R. Wattiaux (1966). "Functions of lysosomes." *Annual Review of Physiology* 28: 435-492. doi: 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
- Deng, W., Li, J., Dorrah, K., Jimenez-Tapia, D., Arriaga, B., Hao, Q., Cao, W., Gao, Z., Vadgama, J., Wu, Y. (2020). "The role of PPM1D in cancer and advances in studies of its inhibitors." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 125: 109956. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109956
- DePavia, A., Jonasch, E., Liu, X. D. (2016). "Autophagy degrades hypoxia inducible factors." *Molecular & Cellular Oncology* 3(2): e1104428. doi: 10.1080/23723556.2015.1104428
- Eales, K. L., Hollinshead, K. E., Tennant, D. A. (2016). "Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells." *Oncogenesis* 5: e190. doi: 10.1038/oncsis.2015.50
- Edelman, G. M. (1974). "Origins and mechanisms of specificity in clonal selection." *Society of General Physiologists Series* 29: 1-38.
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R. J. (2011). "Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy." *Science* 331(6016): 456-461. doi: 10.1126/science.1196371

- Eng, K. E., Panas, M. D., Karlsson Hedestam, G. B., McInerney, G. M. (2010). "A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy." *Autophagy* 6(5): 634-641. doi: 10.4161/auto.6.5.12112
- Eun, S. Y., Lee, J. N., Nam, I. K., Liu, Z. Q., So, H. S., Choe, S. K., Park, R. (2018). "PEX5 regulates autophagy via the mTORC1-TFEB axis during starvation." *Experimental & Molecular Medicine* 50(4): 1-12. doi: 10.1038/s12276-017-0007-8
- Fritzen, A. M., Madsen, A. B., Kleinert, M., Treebak, J. T., Lundsgaard, A. M., Jensen, T. E., Richter, E. A., Wojtaszewski, J., Kiens, B., Frosig, C. (2016). "Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation." *The Journal of Physiology* 594(3): 745-761. doi: 10.1113/JP271405
- Gilmartin, A. G., Faitg, T. H., Richter, M., Groy, A., Seefeld, M. A., Darcy, M. G., Peng, X., Federowicz, K., Yang, J., Zhang, S. Y., Minthorn, E., Jaworski, J. P., Schaber, M., Martens, S., McNulty, D. E., Sinnamon, R. H., Zhang, H., Kirkpatrick, R. B., Nevins, N., Cui, G., Pietrak, B., Diaz, E., Jones, A., Brandt, M., Schwartz, B., Heerding, D. A., Kumar, R. (2014). "Allosteric Wip1 phosphatase inhibition through flap-subdomain interaction." *Nature Chemical Biology* 10(3): 181-187. doi: 10.1038/nchembio.1427
- Goel, S., et al. (2015). "K-Ras, intestinal homeostasis and colon cancer." *Current Clinical Pharmacology* 10(1): 73-81. doi: 10.2174/1574884708666131111204440
- Goldsmith, J., Levine, B., Debnath, J. (2014). "Autophagy and cancer metabolism." *Methods in Enzymology* 542: 25-57. doi: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00002-9
- Grasso, D., Renna, F. J., Vaccaro, M. I. (2018). "Initial Steps in Mammalian Autophagosome Biogenesis." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 146. doi: 10.3389/fcell.2018.00146
- Gross, A. S., M. Graef (2020). "Mechanisms of Autophagy in Metabolic Stress Response." *Journal of Molecular Biology* 432(1): 28-52. doi: 10.1016/j.jmb.2019.09.005
- Guclu, H., Doganlar, Z. B., Gurlu, V. P., Ozal, A., Dogan, A., Turhan, M. A., Doganlar, O. (2018). "Effects of cisplatin-5-fluorouracil combination therapy on oxidative stress, DNA damage, mitochondrial apoptosis, and death receptor signalling in retinal pigment epithelium cells." *Cutaneous and Ocular Toxicology* 37(3): 291-304. doi: 10.1080/15569527.2018.1456548

- Guo, J. Y. , Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M., Karantza, V., Collier, H. A., Dipaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., White, E. (2011). "Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis." *Genes & Development* 25(5): 460-470. doi: 10.1101/gad.2016311
- Hamanaka, R. B., N. S. Chandel (2010). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes." *Trends in Biochemical Sciences* 35(9): 505-513. doi: 10.1016/j.tibs.2010.04.002
- Hasnat, M., Yuan, Z., Naveed, M., Khan, A., Raza, F., Xu, D., Ullah, A., Sun, L., Zhang, L. Jiang, Z. (2019). "Drp1-associated mitochondrial dysfunction and mitochondrial autophagy: a novel mechanism in triptolide-induced hepatotoxicity." *Cell Biology and Toxicology* 35(3): 267-280. doi: 10.1007/s10565-018-9447-8
- Herhaus, L., Bhaskara, R. M., Lystad, A. H., Gestal-Mato, U., Covarrubias-Pinto, A., Bonn, F., Simonsen, A., Hummer, G., Dikic, I. (2020). "TBK1-mediated phosphorylation of LC3C and GABARAP-L2 controls autophagosome shedding by ATG4 protease." *EMBO Reports* 21(1): e48317. doi: 10.15252/embr.201948317
- Houtman, J., Freitag, K., Gimber, N., Schmoranzer, J., Heppner, F. L., Jendrach, M. (2019). "Beclin1-driven autophagy modulates the inflammatory response of microglia via NLRP3." *EMBO Journals* 38(4). doi: 10.15252/emboj.201899430
- Hoyer-Hansen, M., M. Jaattela (2007). "AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy?" *Autophagy* 3(4): 381-383. doi: 10.4161/auto.4240
- Hurley, J. H., L. N. Young (2017). "Mechanisms of Autophagy Initiation." *Annual Review of Biochemistry* 86: 225-244. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044820
- Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadata, M., Yamamoto, M., Lee, M. S., Tanaka, K., Komatsu, M. (2011). "Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells." *Journal of Cell Biology* 193(2): 275-284. doi: 10.1083/jcb.201102031
- Janssen, A. F. J., Katrukha, E. A., van Straaten, W., Verlhac, P., Reggiori, F., Kapitein, L. C. (2018). "Probing aggrephagy using chemically-induced protein aggregates." *Nature Communications* 9(1): 4245. doi: 10.1038/s41467-018-06674-4

- Jia, B., Xue, Y., Yan, X., Li, J., Wu, Y., Guo, R., Zhang, J., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., Sun, L. (2018). "Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress." *Oncology Letters*__16(3): 3509-3516. doi: 10.3892/ol.2018.9131
- Joshi, A., Iyengar, R., Joo, J. H., Li-Harms, X. J., Wright, C., Marino, R., Winborn, B. J., Phillips, A., Temirov, J., Sciarretta, S., Kriwacki, R., Peng, J., Shelat, A., Kundu, M. (2016). "Nuclear ULK1 promotes cell death in response to oxidative stress through PARP1." *Cell Death & Differentiation*_23(2): 216-230. doi: 10.1038/cdd.2015.88
- Kang, S. A., Pacold, M. E., Cervantes, C. L., Lim, D., Lou, H. J., Ottina, K., Gray, N. S., Turk, B. E., Yaffe, M. B., Sabatini, D. M. (2013). "mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin." *Science* 341(6144): 1236566. doi: 10.1126/science.1236566
- Katheder, N. S., Khezri, R., O'Farrell, F., Schultz, S. W., Jain, A., Rahman, M. M., Schink, K. O., Theodossiou, T. A., Johansen, T., Juhasz, G., Bilder, D., Brech, A., Stenmark, H., Rusten, T. E. (2017). "Microenvironmental autophagy promotes tumour growth." *Nature* 541(7637): 417-420. doi: 10.1038/nature20815
- Kaushik, S., Singh, R., Cuervo, A. M. (2010). "Autophagic pathways and metabolic stress." *Diabetes, Obesity and Metabolism*_12 Suppl 2: 4-14. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01263.x
- Keller, J. N., Dimayuga, E., Chen, Q., Thorpe, J., Gee, J., Ding, Q. (2004). "Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain." *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*_36(12): 2376-2391. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.003
- Khandia, R., Dadar, M., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Iqbal, H., M. N., Singh, K. P., Joshi, S. K., Chaicumpa, W. (2019). "A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy." *Cells* 8(7). doi: 10.3390/cells8070674
- Kim, M. S., Jeong, E. G., Ahn, C. H., Kim, S. S., Lee, S. H., Yoo, N. J. (2008). "Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability." *Human Pathology*__39(7): 1059-1063. doi: 10.1016/j.humpath.2007.11.013

- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Isaka, Y. (2013). "Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy." *Cancer Research* 73(1): 3-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2464
- Kung, C. P., Budina, A., Balaburski, G., Bergenstock, M. K., Murphy, M. (2011). "Autophagy in tumor suppression and cancer therapy." *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 21(1): 71-100. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v21.i1.50
- Lamark, T., T. Johansen (2021). "Mechanisms of Selective Autophagy." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 37: 143-169. doi: 10.1146/annurev-cellbio-120219-035530
- Lazarus, M. B., Novotny, C. J., Shokat, K. M. (2015). "Structure of the human autophagy initiating kinase ULK1 in complex with potent inhibitors." *ACS Chemical Biology* 10(1): 257-261. doi: 10.1021/cb500835z
- Liang, X., Tang, J., Liang, Y., Jin, R., Cai, X. (2014). "Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells." *Cell&Biosciences* 4(1): 10. doi: 10.1186/2045-3701-4-10
- Lim, H., Lim, Y. M., Kim, K. H., Jeon, Y. E., Park, K., Kim, J., Hwang, H. Y., Lee, D. J., Pagire, H., Kwon, H. J., Ahn, J. H., Lee, M. S. (2018). "A novel autophagy enhancer as a therapeutic agent against metabolic syndrome and diabetes." *Nature Communications* 9(1): 1438. doi: 10.1038/s41467-018-03939-w
- Liu, D., Wu, H., Wang, C., Li, Y., Tian, H., Siraj, S., Sehgal, S. A., Wang, X., Wang, J., Shang, Y., Jiang, Z., Liu, L., Chen, Q. (2019). "STING directly activates autophagy to tune the innate immune response." *Cell Death & Differentiation* 26(9): 1735-1749. doi: 10.1038/s41418-018-0251-z
- Lock, R., Roy, S., Kenific, C. M., Su, J. S., Salas, E., Ronen, S. M., Debnath, J. (2011). "Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation." *Molecular Biology of the Cell* 22(2): 165-178. doi: 10.1091/mbc.E10-06-0500
- Losier, T. T., Akuma, M., McKee-Muir, O. C., LeBlond, N. D., Suk, Y., Alsaadi, R. M., Guo, Z., Reshke, R., Sad, S., Campbell-Valois, F. X., Gibbings, D. J., Fullerton, M. D., Russell, R. C. (2019). "AMPK Promotes Xenophagy through Priming of Autophagic Kinases upon Detection of Bacterial Outer Membrane Vesicles." *Cell Reports* 26(8): 2150-2165 e2155. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.062

- Lowe, J., Cha, H., Lee, M. O., Mazur, S. J., Appella, E., Fornace, A. J., Jr. (2012). "Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response." *Frontiers in Bioscience-Landmark* 17(4): 1480-1498. doi: 10.2741/3999
- Mamet-Bratley, M. D., B. Karska-Wysocki (1982). "Role of 3-methyladenine-DNA glycosylase in host-cell reactivation of methylated T7 bacteriophage." *Biochimica et Biophysica Acta* 698(1): 29-34. doi: 10.1016/0167-4781(82)90180-4
- Manganelli, V., Salvatori, I., Costanzo, M., Capozzi, A., Caissutti, D., Caterino, M., Valle, C., Ferri, A., Sorice, M., Ruoppolo, M., Garofalo, T., Misasi, R. (2021). "Overexpression of Neuroglobin Promotes Energy Metabolism and Autophagy Induction in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells." *Cells* 10(12). doi: 10.3390/cells10123394
- Mathew, R., Karp, C. M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H. Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R. S., Karantza-Wadsworth, V., White, E. (2009). "Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62." *Cells* 137(6): 1062-1075. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.048
- Maycotte, P., Aryal, S., Cummings, C. T., Thorburn, J., Morgan, M. J., Thorburn, A. (2012). "Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy." *Autophagy* 8(2): 200-212. doi: 10.4161/auto.8.2.18554
- Mazure, N. M., J. Pouyssegur (2010). "Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?" *Current Opinion in Cell Biology* 22(2): 177-180. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.015
- Michel, M., Schwarten, M., Decker, C., Nagel-Steger, L., Willbold, D., Weiergraber, O. H. (2015). "The mammalian autophagy initiator complex contains 2 HORMA domain proteins." *Autophagy* 11(12): 2300-2308. doi: 10.1080/15548627.2015.1076605
- Mulcahy Levy, J. M., A. Thorburn (2020). "Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients." *Cell Death & Differentiation* 27(3): 843-857. doi: 10.1038/s41418-019-0474-7
- Nemazanyy, I., Blaauw, B., Paolini, C., Caillaud, C., Protasi, F., Mueller, A., Proikas-Cezanne, T., Russell, R. C., Guan, K. L., Nishino, I., Sandri, M., Pende, M., Panasyuk, G. (2013). "Defects of Vps15 in skeletal muscles lead to autophagic vacuolar myopathy and lysosomal disease." *EMBO Molecular Medicine* 5(6): 870-890. doi: 10.1002/emmm.201202057

- Oshima, M., Seki, T., Kurauchi, Y., Hisatsune, A., Katsuki, H. (2019). "Reciprocal Regulation of Chaperone-Mediated Autophagy/Microautophagy and Exosome Release." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 42(8): 1394-1401. doi: 10.1248/bpb.b19-00316
- Park, S., Zuber, C., Roth, J. (2020). "Selective autophagy of cytosolic protein aggregates involves ribosome-free rough endoplasmic reticulum." *Histochemistry and Cell Biology* 153(2): 89-99. doi: 10.1007/s00418-019-01829-w
- Pasquier, B. (2015). "SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells." *Autophagy* 11(4): 725-726. doi: 10.1080/15548627.2015.1033601
- Pechackova, S., Burdova, K., Macurek, L. (2017). "WIP1 phosphatase as pharmacological target in cancer therapy." *Journal of Molecular Medicine* 95(6): 589-599. doi: 10.1007/s00109-017-1536-2
- Puente, C., Hendrickson, R. C., Jiang, X. (2016). "Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy." *Journal of Biological Chemistry* 291(11): 6026-6035. doi: 10.1074/jbc.M115.689646
- Pugsley, H. R. (2017). "Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry." *Methods* 112: 147-156. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.05.022
- Ragusa, M. J., Stanley, R. E., Hurley, J. H. (2012). "Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis." *Cell* 151(7): 1501-1512. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.028
- Raj, S., Chandel, V., Kumar, A., Kesari, K. K., Asthana, S., Ruokolainen, J., Kamal, M. A., Kumar, D. (2020). "Molecular mechanisms of interplay between autophagy and metabolism in cancer." *Life Sciences* 259: 118184. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118184
- Rangwala, R., Chang, Y. C., Hu, J., Algazy, K. M., Evans, T. L., Fecher, L. A., Schuchter, L. M., Torigian, D. A., Panosian, J. T., Troxel, A. B., Tan, K. S., Heitjan, D. F., DeMichele, A. M., Vaughn, D. J., Redlinger, M., Alavi, A., Kaiser, J., Pontiggia, L., Davis, L. E., O'Dwyer, P. J., Amaravadi, R. K. (2014). "Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma." *Autophagy* 10(8): 1391-1402. doi: 10.4161/auto.29119

- Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., Ojala, J., Haapasalo, A., Soininen, H., Hiltunen, M. (2013). "Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome." *Progress in Neurobiology* 106-107: 33-54. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.06.002
- Schott, C. R., Ludwig, L., Mutsaers, A. J., Foster, R. A., Wood, G. A. (2018). "The autophagy inhibitor spautin-1, either alone or combined with doxorubicin, decreases cell survival and colony formation in canine appendicular osteosarcoma cells." *PLoS One* 13(10): e0206427. doi: 10.1371/journal.pone.0206427
- Schuck, S. (2020). "Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes." *Journal of Cell Science* 133(17). doi: 10.1242/jcs.246322
- Seront, E., Boidot, R., Bouzin, C., Karroum, O., Jordan, B. F., Gallez, B., Machiels, J. P., Feron, O. (2013). "Tumour hypoxia determines the potential of combining mTOR and autophagy inhibitors to treat mammary tumours." *British Journal of Cancer* 109(10): 2597-2606. doi: 10.1038/bjc.2013.644
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M., Ellisen, L. W. (2005). "Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1." *Molecular and Cellular Biology* 25(14): 5834-5845. doi: 10.1128/MCB.25.14.5834-5845.2005
- Soni, S., Y. S. Padwad (2017). "HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor." *Acta Oncologica* 56(4): 503-515. doi: 10.1080/0284186X.2017.1301680
- Stavoe, A. K. H., Holzbaur, E. L. F. (2020). "Neuronal autophagy declines substantially with age and is rescued by overexpression of WIPI2." *Autophagy* 16(2): 371-372. doi: 10.1080/15548627.2019.1695401
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., Mizushima, N. (2011). "Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors." *Genes & Development* 25(8): 795-800. doi: 10.1101/gad.2016211
- Takats, S., Toth, S., Szenci, G., Juhasz, G. (2019). "Investigating Non-selective Autophagy in Drosophila." *Methods in Molecular Biology* 1880: 589-600. doi: 10.1007/978-1-4939-8873-0_38

- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., Ohsumi, Y. (1992). "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction." *Journal of Cell Biology* 119(2): 301-311. doi: 10.1083/jcb.119.2.301
- Tan, Q., Wang, M., Yu, M., Zhang, J., Bristow, R. G., Hill, R. P., Tannock, I. F. (2016). "Role of Autophagy as a Survival Mechanism for Hypoxic Cells in Tumors." *Neoplasia* 18(6): 347-355. doi: 10.1016/j.neo.2016.04.003
- Tan, X., Azad, S., Ji, X. (2018). "Hypoxic Preconditioning Protects SH-SY5Y Cell against Oxidative Stress through Activation of Autophagy." *Cell Transplantation* 27(12): 1753-1762. doi: 10.1177/0963689718760486
- Torii, S., Yoshida, T., Arakawa, S., Honda, S., Nakanishi, A., Shimizu, S. (2016). "Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy." *EMBO Reports* 17(11): 1552-1564. doi: 10.15252/embr.201642565
- Tracy, K., Dibling, B. C., Spike, B. T., Knabb, J. R., Schumacker, P., Macleod, K. F. (2007). "BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy." *Molecular and Cellular Biology* 27(17): 6229-6242. doi: 10.1128/MCB.02246-06
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(12): 5510-5514. doi: 10.1073/pnas.92.12.5510
- Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., Elazar, Z. (2011). "LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis." *Developmental Cell* 20(4): 444-454. doi: 10.1016/j.devcel.2011.02.006
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., Elazar, Z. (2010). "LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis." *EMBO Journals* 29(11): 1792-1802. doi: 10.1038/emboj.2010.74
- White, E., R. S. DiPaola (2009). "The double-edged sword of autophagy modulation in cancer." *Clinical Cancer Research* 15(17): 5308-5316. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5023
- Whitney, M. L., Jefferson, L. S., Kimball, S. R. (2009). "ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379(2): 451-455. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.079

- Wigerup, C., Pålman, S., Bexell, D. (2016). "Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer." *Pharmacology & Therapeutics*__164: 152-169. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.04.009
- Wolff, N. C., Vega-Rubin-de-Celis, S., Xie, X. J., Castrillon, D. H., Kabbani, W., Brugarolas, J. (2011). "Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia." *Molecular and Cellular Biology* 31(9): 1870-1884. doi: 10.1128/MCB.01393-10
- Wu, H. M., Jiang, Z. F., Ding, P. S., Shao, L. J., Liu, R. Y. (2015). "Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells." *Scientific Reports*_5: 12291. doi: 10.1038/srep12291
- Yoshii, S. R., N. Mizushima (2017). "Monitoring and Measuring Autophagy." *International Journal of Molecular Sciences* 18(9). doi: 10.3390/ijms18091865
- Yun, C. W., S. H. Lee (2018). "The Roles of Autophagy in Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 19(11). doi: 10.3390/ijms19113466
- Zaarour, R. F., Azakir, B., Hajam, E. Y., Nawafleh, H., Zeinelabdin, N. A., Engelsens, A. S. T., Thiery, J., Jamora, C., Chouaib, S. (2021). "Role of Hypoxia-Mediated Autophagy in Tumor Cell Death and Survival." *Cancers (Basel)* 13(3). doi: 10.3390/cancers13030533
- Zachari, M., I. G. Ganley (2017). "The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation." *Essays Biochemistry*_61(6): 585-596. doi: 10.1042/EBC20170021
- Zhu, W., Qu, H., Xu, K., Jia, B., Li, H., Du, Y., Liu, G., Wei, H. J., Zhao, H. Y. (2017). "Differences in the starvation-induced autophagy response in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells." *Animal cells and systems*_21(3): 190-198. doi: 10.1080/19768354.2017.1330763