



**MİTOKONDRIYAL-TÜREVLİ PEPTİD (MOTS-C)'İN  
İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE SERİSİNDE  
ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ:  
İN VİTRO BİR ÇALIŞMA**

**Yavuz ERDEN**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Süleyman SANDAL**

**Doktora Tezi-2022**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİTOKONDRIYAL-TÜREVLİ PEPTİD (MOTS-C)'İN İNSAN MEME  
KANSERİ HÜCRE SERİSİNDE ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN  
BELİRLENMESİ: İN VİTRO BİR ÇALIŞMA**

**Yavuz ERDEN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Süleyman SANDAL**

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu  
(Proje no: 318S235) tarafından desteklenmiştir.

**MALATYA  
2022**

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

**ETİK BEYANI**

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Süleyman SANDAL danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “MİTOKONDRIYAL-TÜREVLİ PEPTİD (MOTS-C)’İN İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE SERİSİNDE ANTİKANSEROJENİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ: İN VİTRO BİR ÇALIŞMA” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 27/01/2022

Yavuz ERDEN

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. MOTS-c .....	4
2.1.1. Biyokimyasal Yapısı.....	4
2.1.2. MOTS-c'nin Doku Dağılımı.....	5
2.1.3. MOTS-c'nin Türler Arasında Korunumu .....	5
2.1.4. MOTS-c'nin Fizyolojik Etkileri .....	6
2.2. Meme Kanseri.....	7
2.2.1. Epidemiyoloji.....	8
2.2.2. Tedavi Yaklaşımları.....	9
2.4. Hüresel Ölüm Süreçleri.....	9
2.4.1. Apoptoz.....	9
2.4.1.1. Apoptozun İçsel Yolu .....	12
2.4.1.2. Apoptozun Dışsal Yolu.....	13
2.5. Otofaji .....	14
3. MATERYAL VE METOT .....	17
3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez .....	17
3.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Serileri ve Kültür Ortamları .....	17
3.2.1. MCF-7 Hücre Serisi (ATCC HTB-22) .....	17
3.2.2. MCF-10A Hücre Serisi (ATCC CRL-10317) .....	17
3.3. Kültür Şartları .....	18
3.4. Hücre Kültürü .....	18
3.4.1. Hücrelerin Açılması .....	18
3.4.2. Hücrelerin Alt Kültüre Alınması .....	18
3.4.3. Hücrelerin Stoklanması.....	19
3.5. Bileşiklerin Hazırlanması .....	19

3.6. Sitotoksisite Analizi .....	20
3.7. Genotoksisite Analizi.....	21
3.7.1. Analiz Öncesi Hazırlıklar .....	21
3.7.2. Comet analizlerinin yapılması .....	23
3.8. TUNEL Analizi.....	25
3.9. Real Time PCR Analizleri .....	27
3.9.1. Hücrelerin Büyütülmesi ve Bileşiklerle Muamelesi .....	28
3.9.2. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini .....	28
3.9.3. cDNA Sentez Protokolü.....	28
3.9.4. Real Time PCR analizi .....	29
3.10. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	29
3.10.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	29
3.10.2. Örneklerin Hazırlanması.....	31
3.10.3. Western Blot Analizleri .....	32
3.11. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. MTT Analiz Sonuçları .....	35
4.1.1. MOTS-c'nin MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	35
4.1.2. 5-FU'nun MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	36
4.1.3. MOTS-c'nin MCF-10A Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	38
4.1.4. 5-FU'nun MCF-10A Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	40
4.2. Comet Analiz Sonuçları .....	43
4.2.1. MCF-7 Comet Analiz Sonuçları .....	43
4.2.2. MCF-10A Comet Analiz Sonuçları .....	45
4.3. TUNEL Analiz Sonuçları .....	47
4.3.1. MCF-7 Hücreleri TUNEL Analiz Sonuçları .....	47
4.3.2. MCF-10A hücreleri TUNEL analiz sonuçları .....	47
4.4. Real Time PCR Analiz Sonuçları .....	50
4.4.1. Akt mRNA İfadesindeki Değişimler .....	50
4.4.2. AMPK mRNA İfadesindeki Değişimler.....	50
4.4.3. Bax mRNA İfadesindeki Değişimler.....	51
4.4.4. Bcl-2 mRNA İfadesindeki Değişimler .....	52
4.4.5. Beclin1 mRNA İfadesindeki Değişimler.....	52
4.4.6. Kaspaz-3 mRNA İfadesindeki Değişimler .....	53

4.4.7. mTOR mRNA İfadesindeki Değişimler .....	54
4.4.8. p53 mRNA İfadesindeki Değişimler .....	54
4.4.9. TSC2 mRNA İfadesindeki Değişimler .....	55
4.4.10. ULK1 mRNA İfadesindeki Değişimler .....	56
4.5. Western Blot Analiz Sonuçları .....	56
4.5.1. MCF-7 Hücrelerinde Uygulamalar Sonrası Protein İfade Seviyeleri .....	56
4.5.2. MCF-10A Hücrelerinde Uygulamalar Sonrası Protein İfade Seviyeleri .....	59
5. TARTIŞMA .....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR .....	67
EKLER.....	78
EK-1. Özgeçmiş.....	78
EK-2. Etik Kurul Belgesi.....	90

## TEŐEKKÜR

Doktora tez çalıŐmama maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (Proje No: 318S235) ve proje ekibinde görev alan kıymetli araŐtırmacılara,

Tez araŐtırmamı destekleyen ve akademik gelişim sürecimin tüm aşamalarında katkı ve yardımlarını esirgemeyen tez danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a, Fizyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ındaki tüm hocalarıma, çalışma süresince desteklerini esirgemeyen İnönü niversitesi ğretim yesi Sayın Doç. Dr. Suat TEKİN'e,

Hayatım boyunca benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen aileme, tez çalıŐmalarım süresince gösterdiği anlayıŐ ve desteğinden dolayı sevgili eŐim Dr. Öğr. Gör. BüŐra AKSOY ERDEN'e,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teŐekkür ederim.

**Yavuz ERDEN**

## ÖZET

### **Mitokondriyal-Türevli Peptid (MOTS-c)'in İnsan Meme Kanseri Hücre Serisinde Antikanserojenik Etkisinin Belirlenmesi: *In vitro* Bir Çalışma**

**Amaç:** Mitokondriyal-türevli peptid (MOTS-c), mitokondriyal DNA tarafından kodlanan ve AMP-aktive protein kinazı (AMPK) aktive ederek hücrel enerji metabolizmasında görev alan bir peptittir. AMPK'nın diyabet, yaşlanma ve kanser gibi birçok patolojik durumda inhibe edildiği bildirilmektedir. AMPK'yı hedef alan yeni tedavi yaklaşımları söz konusu hastalıkların tedavisine katkı sağlayabilir. Bu çalışmayla MOTS-c'nin insan meme kanseri hücre serisi üzerine sitotoksik etkilerini biyokimyasal ve moleküler düzeyde açıklamayı amaçladık.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada MOTS-c ve referans ilaç 5-Florourasilin (5-FU) insan meme kanseri hücre serisi ve normal insan meme epitel hücre serisi (sırasıyla MCF-7 ve MCF10A) üzerine uygulamaları farklı zaman dilimlerinde gerçekleştirildi. Hücre canlılığındaki değişimler 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizleri ile belirlendi. Peptidin DNA hasarı ve apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ve TUNEL analizleriyle araştırıldı. MOTS-c'nin apoptoz ve otofaji yollarında görev alan genler üzerine etkileri moleküler analizlerle saptandı.

**Bulgular:** MOTS-c uygulamasından 72 saat sonra MCF-7 hücrelerinde canlılık önemli düzeyde azaldı ( $p < 0.05$ ). MOTS-c ve 5-FU uygulaması MCF-7 hücrelerinde DNA hasarına neden olurken, MCF-10A hücrelerinde ise her iki bileşiğin DNA hasarına neden olmadığı belirlendi. MOTS-c MCF-7 hücrelerinde AMPK, TSC2, ULK1 ve Beclin1 gen ifadelerini arttırdı ancak p53, pro-apoptotik Bax ve kaspaz-3 gen ifadelerini değiştirmedi. Bunun aksine 5-FU hücrelerde p53 ifadesini yukarı düzenledi ve Bax ve kaspaz-3 gen ifadelerini arttırdı, Bcl-2 gen ifadesini baskıladı.

**Sonuç:** Bu sonuçlar 5-FU'nun apoptozdan kaynaklanan hücre ölümüne neden olduğunu, MOTS-c'nin ise AMPK, TSC2 ve ULK1 aktivasyonu ile sonuçlanan otofaji aracılı hücre ölümüne neden olduğunu gösterdi. Yapılacak çalışmalar sonrası klinik uygulamalarda MOTS-c'nin meme kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik aday olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** MOTS-c, Kanser, Sitotoksikite, Genotoksikite, Apoptoz, Otofaji



## ABSTRACT

### **Determination of Anticarcinogenic Effects of Mitochondrial-Derived Peptide (MOTS-c) in Human Breast Cancer Cell Lines: An *in vitro* Study**

**Aim:** Mitochondrial-derived peptide (MOTS-c) is a peptide encoded by mitochondrial DNA and plays a role in cellular energy metabolism by activating AMP-activated protein kinase (AMPK). It is reported that AMPK is inhibited in many pathological conditions such as diabetes, aging, and cancer. New treatment approaches targeting AMPK may contribute to the treatment of these diseases. In this study, we aimed to explain the cytotoxic effects of MOTS-c on human breast cancer cell lines at the biochemical and molecular levels.

**Material and Method:** In this study, applications of MOTS-c and reference drug 5-Fluorouracil (5-FU) on human breast cancer cell line and non-tumorigenic human breast epithelial cell line (MCF-7 and MCF10A, respectively) were performed in different time periods. Changes in cell viability were determined by 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. The effects of the peptide on DNA damage and apoptotic cell death were investigated by single cell gel electrophoresis (Comet) method and TUNEL analysis. The effects of MOTS-c on genes acted role in apoptosis and autophagy pathways were determined by molecular analyses.

**Results:** 72 hours after MOTS-c application, the viability of MCF-7 cells decreased significantly ( $p < 0.05$ ). It was determined that MOTS-c and 5-FU applications caused DNA damage in MCF-7 cells while both compounds did not cause DNA damage in MCF-10A cells. MOTS-c increased AMPK, TSC2, ULK1, and Beclin1 gene expressions in MCF-7 cells but did not change p53, pro-apoptotic Bax, and caspase-3 gene expressions. In contrast, 5-FU upregulated p53 expression in cells and increased Bax and caspase-3 gene expressions, suppressed Bcl-2 gene expression.

**Conclusion:** These results showed that 5-FU caused apoptosis-induced cell death, while MOTS-c caused autophagy-mediated cell death resulting in activation of AMPK, TSC2, and ULK1. We think that MOTS-c can be used as a potential therapeutic candidate for breast cancer treatment in clinical applications after further studies.

**Keywords:** MOTS-c, Cancer, Cytotoxicity, Genotoxicity, Apoptosis, Autophagy

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>5-FU</b>	: 5-Florourasil
<b>AICAR</b>	: 5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid
<b>AMPK</b>	: 5' adenosin momofosfat ile aktive edilen protein kinaz
<b>APAF</b>	: Apoptotik proteaz aktive edeci faktör 1
<b>CARD</b>	: Kaspaz toplama alanı
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>ER</b>	: Östrojen reseptör
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>gr</b>	: Gram
<b>HER2</b>	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
<b>IAP</b>	: Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörleri
<b>MAPK</b>	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>MPT</b>	: Mitokondriyal geçirgenlik geçiş porları
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>mTOR</b>	: Rapamisin memeli hedefi
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu solüsyon
<b>PI3P</b>	: Fosfatidilinositol 3-fosfat
<b>PR</b>	: Progesteron reseptör
<b>sORF</b>	: Mitokondriyal DNA kısa açık okuma çerçevesi
<b>T2D</b>	: Tip 2 diyabet
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial büyüme faktör

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Sekil No</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. MOTS-c peptidinin açık okuma çerçevesi .....	5
Şekil 2.2. MOTS-c'nin farklı türlerde çoklu peptit dizisi hizalaması .....	6
Şekil 2.3. Apoptotik sinyal yolları .....	11
Şekil 2.4. Makrotofaji (otofaji) sürecini ve ana düzenleyici mekanizmaların şematik gösterimi .....	16
Şekil 3.1. MTT'nin canlı hücrelerde kimyasal reaksiyon sonucu formazona dönüşmesi (A) ve 96 kuyucuklu plakada optik yoğunluğun görseli (B) .....	20
Şekil 3.2. Comet deneyinin basamakları .....	25
Şekil 3.3. Western blot analiz basamakları.....	33
Şekil 4.1. MOTS-c uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%).....	35
Şekil 4.2. 10 µM MOTS-c uygulamasından 48 ve 72 saat sonra MCF-7 hücre canlılık düzeyi (%).....	36
Şekil 4.3. 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). .....	37
Şekil 4.4. 100 µM 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları.....	38
Şekil 4.5. MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). .....	39
Şekil 4.6. 10 µM MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları.....	40
Şekil 4.7. 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). .....	41
Şekil 4.8. 100 µM 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları.....	42
Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 72 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. ....	44
Şekil 4.10. MCF-10A hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 72 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. ....	46
Şekil 4.11. MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. ....	48

<b>Şekil 4.12.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. ....	49
<b>Şekil 4.13.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Akt mRNA seviyeleri. ....	50
<b>Şekil 4.14.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde AMPK mRNA seviyeleri.....	51
<b>Şekil 4.15.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Bax mRNA seviyeleri.....	51
<b>Şekil 4.16.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Bcl-2 mRNA seviyeleri.....	52
<b>Şekil 4.17.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Beclin1 mRNA seviyeleri.....	53
<b>Şekil 4.18.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde kaspaz-3 mRNA seviyeleri. ....	53
<b>Şekil 4.19.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde mTOR mRNA seviyeleri. ....	54
<b>Şekil 4.20.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde p53 mRNA seviyeleri. ....	55
<b>Şekil 4.21.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde TSC2 mRNA seviyeleri. ....	55
<b>Şekil 4.22.</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde ULK1 mRNA seviyeleri. ....	56
<b>Şekil 4.23.</b> MCF-7 hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri.....	58
<b>Şekil 4.23.</b> MCF-10A hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri.....	60

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1.</b> Meme kanseri alt tipleri .....	8
<b>Tablo 2.2.</b> İnsan ölüm reseptörleri ve ligantları .....	14
<b>Tablo 3.1.</b> Comet analizlerinde kullanılan doz ve inkübasyon süreleri .....	24
<b>Tablo 3.2.</b> TUNEL boyama solüsyonunun hazırlanması .....	26
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışmada kullanılan genlere ait primer dizi bilgileri .....	27
<b>Tablo 3.4.</b> Western blot analizlerinde kullanılan antikor bilgileri .....	34
<b>Tablo 4.1.</b> MOTS-c ve 5-FU'ya ait IC <sub>50</sub> değerlikleri (µM) .....	42
<b>Tablo 4.2.</b> MCF-7 hücresi Comet analiz sonuçları. ....	43
<b>Tablo 4.3.</b> MCF-10A hücresi Comet analiz sonuçları. ....	45

# 1. GİRİŞ

Kanser, milyonlarca insanı etkileyen önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir ve anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve yayılmasından kaynaklanmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yapılan tahminler, 2018 yılında dünya çapında 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümünün meydana geleceği ön görülmüştür (1). Yapılan araştırmalar ve gelişen teknoloji ile bu hastalık grubunun tedavisinde gün geçtikçe mesafe kaydedilmektedir. Son yıllarda, hastalara daha seçici ve daha az zarar veren yeni tedaviler oluşturmaya yönelik çabalar sarf edilmektedir. Buna rağmen, günümüzde cerrahi ve kemoterapi gibi mevcut tedaviler, nispeten düşük başarı oranlarına sahiptir ve aynı zamanda tedavi sonrası hastalığın tekrarlama riski vardır (2).

Kanser tedavisinde kullanılan terapötikler, doğal ürünler, DNA-alkilleyici maddeler, hormon agonistleri/antagonistleri ve antimetabolitleri de içerisine alan geniş bir alanı kapsar. Ancak bunların birçoğu, normal hücreler üzerine de istenmeyen etkiler oluşturmaktadır (3, 4). Kanser tedavisi için modellenen ilaçlar, normalde kontrolsüz bölünen kanser hücrelerini hedef alırken aynı zamanda normal memeli hücreleri üzerine de benzer etkiler sergiler. Sonuç olarak tedavi gören bu kişilerde kan hücrelerinin üretiminde azalma, sindirim sistemi üzerindeki enflamasyon süreçlerin meydana gelmesi ve saç dökülmesi gibi istenmeyen yan etkiler görülür (5). Dahası, terapötik olarak kullanılan bu bileşiklerin birçoğu hücre zarından geçtikten ve sitoplazmaya girdikten sonra, kanserli hücrelerde görülen bir direnç mekanizmasının ardından hücrenin dışına geri taşınırlar (6). Bütün bu istenmeyen durumların meydana gelmesi ve hücrelerin tedaviye karşı göstermiş olduğu direnç neticesinde, bilim insanları kanserin tedavisi için yeni yöntemlere ve ilaç tasarımına/geliştirilmesine yönelmişlerdir. Kanser tedavisinde yeni ilaçların ve biyoaktif molekülerin keşfine ek olarak, bunların kanser hücreleri üzerine moleküler etki mekanizmalarının ve biyouyumluluklarının (normal hücreleri korumaları) aydınlatılması oldukça önemlidir. Özellikle kanser karşıtı biyomoleküller yüksek düzeydeki biyouyumlulukları ile dikkat çeken moleküllerdir ve hedefe yönelik kanser tedavisi için umut vadetmektedir. Etkin bir tedavi için ilgili bileşiklerin hücresel etkilerini aydınlatmak, bu bileşiklerin hücrede hangi yollar/yolaklar üzerinden etkilerini ortaya koyduğunu belirlemek gerekmektedir.

Mitokondriyal-türevli peptid (MOTS-c), mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan ve 16 aminoasitten oluşan bir peptiddir. İlk defa 2015 yılında tanımlanan bu peptid, mitokondri içerisinde lokalizedir. MOTS-c kemirgenlerin beyin, kas, karaciğer, kalp, böbrek, testis ve barsak dokularında ve insan plazmasında sentezlenir. Bu peptidin hem hücre üzerine otonom etkilere hem de dolaşımda hormonal etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (7). MOTS-c hakkında yapılan az sayıda araştırma, bu peptidin özellikle hücre metabolizmasında önemli roller üstlenebileceğini bildirmektedir. Lee vd. MOTS-c'nin hücrede folat siklusunu ve *de novo* purin biyosentezini inhibe ettiğini bildirmektedir (7). Araştırmacılar MOTS-c'ye yanıt olarak hücrede 5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid (AICAR) seviyesinin arttığını ve bunun da AMP-aktive protein kinaz (AMPK) ifadesinde artış ve aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir.

AMPK, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde mevcut olan bir hücresel enerji sensörüdür ve artan AMP/ATP oranı, AMPK'yı harekete geçirir. Bu durum enerji tüketimini engeller ve hücrenin içindeki enerji homeostazını geri kazanmak için ATP üreten katabolik olayları tetikler (8, 9). Ancak AMPK'nın hücresel etkileri bu kadarla sınırlı değildir. Bazı araştırmalar, AMPK'nın çeşitli metabolik yolları düzenlediğini ve kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini belirtmiştir (10, 11). Kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı metabolik değişiklikler vardır ve AMPK kanserdeki bu düzensiz süreçleri önleyebilir. AMPK hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, otofaji, stres tepkileri ve hücre polaritesi modülasyonu yoluyla tümör oluşumunu inhibe edebilir (9). AMPK'nın en iyi bilinen yollarından biri, tüberoz skleroz gen kompleksi (TSC1 / TSC2 kompleksi) ile gerçekleşir (12) ve bu da fosfinodosit-3-kinaz/Akt (PI3K-Akt) ve Ras-Raf-MEK-ERK sinyalizasyon yollarının akış yönünde aktive edilebilen mTOR (rapamisin memeli hedefi)'un aşağı-regülasyonuna yol açar (9, 11). mTOR yolu, p53 ve p27 tümör baskılayıcıları üzerindeki etkisiyle apoptozisi bastırır ve UNC-51 benzeri kinaz 1'i (ULK1) ve ULK2'yi (ULK1/2; otofagozom formasyonu için gerekli bir anahtar sinyalleme kompleksidir) baskılayarak otofajiyi inhibe eder (9, 13, 14). AMPK, mTOR'un bu etkilerini azaltarak, apoptoz ve otofaj aracılı hücre ölümünün artmasına neden olur. Ayrıca AMPK, mTOR'dan bağımsız olarak da ULK1 ve ULK2'yi fosforile edebilir ve aktive olan bu proteinler otofajiyi tetikler. AMPK'nın, bazı insan kanserlerinin ve enflamatuar bozuklukların patofizyolojik ilerlemesine katkıda bulunan siklooksijenaz (COX)-2'nin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (9). Hücresel

enerji regülasyonunda kavşak bir konumda olan bu molekülün sergilediği metabolik etkiler, kanser tedavisinde kilit bir rol alabileceğini göstermektedir.

Mevcut bilgiler, MOTS-c'nin hücredeki AMPK seviyesini arttırdığını ve kanser hücrelerinde AMPK'nın apoptoz ve otofaji yollarını modüle edebileceğini göstermektedir. Bu çalışma, MOTS-c'nin meme kanseri hücreleri üzerine muhtemel sitotoksik ve genotoksik etkilerini ortaya koyarak, hücre ölüm yolları (apoptoz ve otofaji) üzerinde görev alan genlerin nasıl etkileneceğini belirlemek amacıyla yapıldı. Çalışma sonucunda söz konusu peptidin (MOTS-c) potansiyel bir antikanser etkisinin olup-olmadığı konusunda ilk bilgiler elde edildi.





## 2. GENEL BİLGİLER

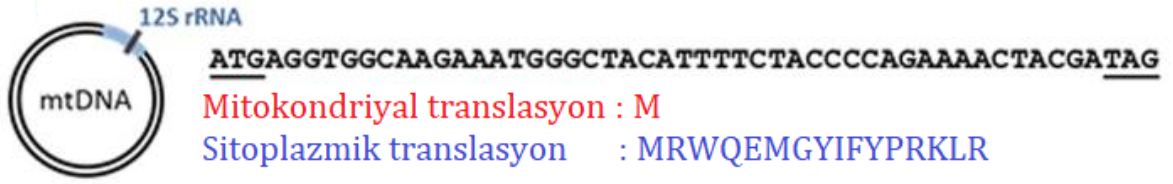
### 2.1. MOTS-c

Mitokondri, hücrel değişiklikleri algılayan ve bunlara yanıt olacak mesajları çekirdek, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve lizozomlar gibi diğer hücrel bileşenlere ileten önemli bir organeldir. Mitokondri ve çekirdek arasındaki etkileşim, her ikisi de hücrel genomun bir kısmını barındırdıkları için özel bir ilgi konusudur. mtDNA’da yalnızca 13 protein kodlayan gen bulunur ve bu da mitokondriyal proteinlerin >%98’inin nükleer genomda kodlanmasını gerektirir. Bununla birlikte, mtDNA’da kodlanan ve düzenleyici rollere sahip olan küçük peptitlerin veya mikroproteinlerin yakın zamanda keşfedilmesi (15), daha karmaşık bir mitokondriyal transkriptoma işaret etmektedir (16). Bu nedenle, genom taşıyan organeller arasındaki iletişim, hücrel faaliyetlerin devamını sağlamak adına muhtemelen gen ekspresyon düzenlemesini de içeren karmaşık bir süreçtir.

Bir sinyal peptidi olan humanini kodlayan mtDNA’da kısa bir açık okuma çerçevesinin (sORF) tanımlanması, mtDNA’da ilave sORF’lerin olası varlığını akıllara getirmektedir. Yakın zamanda Lee vd. tarafından tanımlanmış olan MOTS-c (12S ribozomal RNA tip-c’nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi), mitokondriyal genomdan kodlanan ve hücrel DNA üzerine etkiler gösteren önemli bir peptid olarak literatüre kazandırılmıştır.

#### 2.1.1. Biyokimyasal Yapısı

MOTS-c, mitokondriyal 12S rRNA’da kodlanan ve 51 baz çifti ve 16 amino asit büyüklüğüne sahip bir peptiddir. Molekül ağırlığı 2174.61 Da’dır ve amino asit dizisi “Met-Arg-Trp-Gln-Glu-Met-Gly-Tyr-Ile-Phe-Tyr-Pro-Arg-Lys-Leu-Arg” şeklindedir. mtDNA tarafından ifade edilen MOTS-c’nin sentezi sitoplazmada gerçekleşir (17). MOTS-c’nin mitokondriyal translasyonunun şematik gösterimi Şekil 2.1’de sunulmuştur.



Şekil 2.1. MOTS-c peptidinin açık okuma çerçevesi (17)

### 2.1.2. MOTS-c'nin Doku Dağılımı

İnsanda ve kemirgenlerde, dolaşımında (plazma) ve çeşitli dokularda MOTS-c'nin varlığı gösterilmiştir. Dolaşımında MOTS-c'nin tespit edilmesi, bu peptidin sadece hücre içerisinde gen regülasyonunda görev almadığını, aynı zamanda bir sinyal peptidi olarak kan aracılığıyla başka doku ve organlarda gen ifadesini düzenleyebileceğini göstermektedir. Lee vd. özellikle açlık durumunda metabolik olarak aktif ve mitokondriden zengin dokularda (iskelet kası ve testisler) ve ayrıca plazmada MOTS-c'nin endojen ekspresyonunu düşüğünü, homeostatik dokularda ise (beyin ve kalp gibi) kararlı bir düzeyde bulunduğunu bildirmektedir (17).

### 2.1.3. MOTS-c'nin Türler Arasında Korunumu

Mitokondri ökaryotik hücrelerde evrenseldir (18). Memeli mtDNA'sı, mitokondriyal translasyon için kilit olan iki ribozomal RNA genini (12S ve 16S rRNA) ifade eder. Filogenetik ağaç boyunca çok çeşitli mtDNA dizileri mevcuttur ve 12S ve 16S rRNA genleri tür tanımlaması için moleküler belirteçler olarak kullanılır (19). Mitokondriyal genom, nükleer genoma kıyasla nispeten daha yüksek bir değişim hızına sahiptir. Bu durum muhtemelen daha yüksek mutasyon oranı ile açıklanabilir. Bununla birlikte, mitokondriyal 12S ve 16S rRNA'daki bazı bölgeler türler arasında yüksek oranda korunmuştur. MOTS-c'nin ilk 11 amino asit kalıntısı (toplam 16 amino asit), 14 memeli türünde yüksek oranda korunmuştur (17). Farklı canlı türlerine özgü MOTS-c'nin sekans dizilim karşılaştırması Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

İnsan MRWQEMGYIFYPRK---LR-----  
 Şempanze MRWQEMGYIFYPRK---LR-----  
 Cüce şempanze MRRQEMGYIFYPRK---LR-----  
 Orangutan MEWQEMGYIFYPRK---LR-----  
 Fare MKWEEMGYIFL-----  
 Sıçan MKRKEMGYIFFSQR---TLRNPL-----  
 Tüysüz köstebek faresi MKWEEMGYIFLYKN----INDSYHEI-----  
 Köpek MRWEEMGYIFYP-R---TFHECFYEIKN----  
 İnek MKWEEMGYILYTKR---IKHESYYETNNQRR  
 Zebra balığı MKWEEMGYTFYPRIYENVT-----  
 Aslan MRWEAMGYIFYN-----  
 Ayı MGWEEMGYIFYS-R---TTYESFYETKN----  
 At MGWREMGYIFYPKKNFNPDES LHETGD----  
 Yunus MDWEEMGYIFYNKN---TP-----

Şekil 2.2. MOTS-c'nin farklı türlerde çoklu peptid dizisi hizalaması (17)

#### 2.1.4. MOTS-c'nin Fizyolojik Etkileri

Lee ve ark. MOTS-c'yi metabolik homeostazın mitokondriyal kodlu düzenleyicisi olarak tanımladıkları çalışmalarında, MOTS-c'nin farelerde yaşa bağlı kas insülin direncini ve diyetle bağlı obezite/insülin direncini tersine çevirdiğini bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar bu peptidin hücre sel glikoz, nükleotid ve yağ asidi metabolizmasını 5' adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) ve folat döngüsü üzerinden düzenlediğini ortaya koymuştur (17). Bu çalışma MOTS-c'nin özellikle hücre sel ve hormonal etkiler sergileyerek enerji metabolizmasında ve homeostazında görevler üstlendiğini gösteren ilk verileri literatüre kazandırmıştır. Sonrasında yapılan çalışmalarda MOTS-c'nin obez olmayan yetişkin kişilerde insülin duyarlılığına pozitif katkı sağladığı (20), buna karşın obez erkek çocuklarda/ergenlerde dolaşımdaki MOTS-c seviyesinin düşük olduğu ve bu kişilerde MOTS-c'nin insülin direnci ve obezite ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (21). Bunlara ilave olarak MOT-c ve diyabet arasındaki muhtemel ilişkiyi inceleyen verilerde mevcuttur. Ramanjaneya vd. Tip 2 diyabet (T2D) hastalarında önemli ölçüde azalmış serum MOTS-c seviyesini bildirmektedir. Araştırmacılar ayrıca serum MOTS-c seviyesinin, HbA1c ve yaş ile negatif korelasyon gösterdiğini rapor etmektedir (22).

MOTS-c ve AMPK arasındaki ilişkiyi irdeleyen birçok çalışma, bu peptidin sadece enerji metabolizmasında görevli olmadığına kanıtlarını literatüre kazandırmıştır. Kim vd. mitokondriyal genomda kodlanan MOTS-c'nin çekirdeğe yer değiştirdiğini ve glikoz kısıtlamasına yanıt olarak aralarında nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 gibi antioksidan tepki elemanlarında bulunduğu çok sayıda geni regüle ettiğini gösterdi (23). Bu sonuç MOTS-c'nin metabolik strese karşı hücrel stres direncini artırabileceğini göstermektedir. Diğer bir çalışmada farelerde formalinle indüklenen nosisepsiyon üzerine MOTS-c'nin koruyucu rolü incelenmiştir. Yin vd. yaptıkları bu araştırmada MOTS-c ile tedavi sonrasında fare serum pro-inflamatuar sitokin seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını ve anti-inflamatuar sitokin seviyelerinin ise yükseldiğini ortaya koymuştur. Çalışma sonucunda MOTS-c'nin AMPK yolunu aktive ederek ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/c-fos sinyal yolunu inhibe ederek antinositif ve anti-inflamatuar etkiler sergilediği bildirilmektedir (24). Diğer çalışmalarda ise söz konusu peptidin dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) aracılı hücrel süreçlere aracılık ettiği ortaya konmuştur. MOTS-c, TGF- $\beta$ /SMAD yolu aracılığıyla tip I kollajen sentezlemek için osteoblastları destekler (25) ve kemik mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasına katkı sunar (26, 27). Bu sonuçlar MOTS-c'nin nükleer gen düzenlenmesinde önemli bir kavşak olan AMPK aracılı farklı birçok moleküler ve fizyolojik süreçte rol alabileceğini göstermektedir. Bu alanda yapılan yeni çalışmalar ile söz konusu peptidin hücrel ve sistemsel fizyolojik süreçlerdeki farklı rolü/rolleri aydınlatılabilir.

## 2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, tümör morfolojisi, moleküler özellikler ve klinik yanıtta geniş çeşitlilik gösteren heterojen bir hastalıktır. İnvaziv duktal karsinom, tümörlerin yaklaşık %70'ini oluşturan en yaygın meme kanseri türüdür ve tümörlerin yaklaşık %15-20'si invaziv lobüler karsinomlardır.

Hem moleküler hem de histolojik kanıtlara dayanarak, meme kanseri üç gruba ayrılabilir: (A) Hormon reseptörü (östrojen reseptörü (ER) veya progesteron reseptörü (PR)) ekspres eden meme kanseri alt tipleri, (B) insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'yi (HER2) ekspres eden kanseri alt tipleri ve (C) bu reseptörleri ekspres etmeyen üçlü negatif meme kanseri alt tipi (28, 29). Meme kanseri alt tipleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tedavi yaklaşımları meme kanserinin moleküler özelliklerine dayanmalıdır. ER, PR ve HER2 ekspresyon durumunun değerlendirilmesi, klinik karar vermede uzun yıllardır kullanılmaktadır. Tümör moleküler alt tipleri daha sonra, örneğin prognostik multigen sınıflandırıcılar bazında, en azından lümen A, luminal B, HER2 ile zenginleştirilmiş ve bazal benzeri sınıflandırmaları türetmek üzere tanımlanmıştır.

**Tablo 2.1.** Meme kanseri alt tipleri (30)

Meme kanseri alt tipi	Reseptör profili	Alt tip prevalansı	Alt katagoriler
<b>Hormon pozitif</b>	ER+ ve/veya PR+	%60	Luminal A & B
<b>HER2 pozitif</b>	HER2+	%20	-
<b>Üçlü negatif meme kanseri</b>	ER-, PR- ve HER2-	%10-20	Bazal benzeri 1 (BL-1), bazal benzeri 2 (BL-2), immünomodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) ve luminal androjen reseptörü (LAR)

### 2.2.1. Epidemiyoloji

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir ve akciğer ve kolon kanseri ile dünya genelinde en sık görülen üç kanserden biridir. 2018’de dünya çapında tahmini 2.1 milyon yeni meme kanseri vakası görülürken, bu yıl içerisinde meme kanserinden 627.000 ölüm meydana geldi (31). 2017 yılı verilerine göre Ülkemizde kadınlarda görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları sıralamasında meme kanseri 47.7 (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) ile ilk sırada yer almaktadır (32).

Yaşamları boyunca her sekiz ila on kadından birinin meme kanserine yakalanacağı öngörülmektedir (33). Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği (AB) gibi gelişmişlik düzeyi yüksek popülasyonlarda meme kanserinden ölüm oranı azalmıştır ve bu azalma çoğunlukla erken teşhis ve etkili sistemik tedavilere bağlanabilir. Bununla

birlikte, kısmen son teknoloji tanı ve tedaviye erişim eksikliği nedeniyle meme kanseri hala az gelişmiş ülkelerde kanserden ölümlerin en yaygın nedenidir (31).

### **2.2.2. Tedavi Yaklaşımları**

Meme kanserinin başladığı kesin mekanizmalar net değildir (34). Hormon reseptör ifade eden meme kanseri, meme kanserinin en yaygın türüdür ve gelişmiş ülkelerde yalnızca menopoz öncesi kadınlarda meme kanseri vakalarının %60-70'ini oluşturur. Bu nedenle hormonoterapi en sık kullanılan tedavi yaklaşımıdır (35). En sık kullanılan ilaçlar östrojen blokeri olarak tamoksifen, ovaryumdan hormon üretimini engelleyen letrozol, anastrozol ve eksemestan gibi aromataz inhibitörleridir (36). HER2+ olan meme kanseri hastaları için standart tedavi, anti-HER2 monoklonal antikor ve kemoterapinin kombinasyon tedavisidir (37). Üçlü negatif meme kanseri türlerinin tedavisi, diğer meme kanseri gruplarına kıyasla en zorlu tedavidir. Bu grup için standart tedavi kemoterapidir. Alternatif tedavi kemoterapi ve vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) karşı rekombinant insanlaştırılmış monoklonal antikor olan bevacizumab kombinasyon tedavisi olabilir (28, 38). Mevcut duruma ek olarak tedavi sürecinin iyileştirilmesi/hızlandırılması için araştırmacılar çok sayıda yeni bileşik ve güncel tedavi yaklaşımları tanımlamaktadır. Tedavide kullanılan terapötiklerin sağlıklı hücrelere düşük düzeyde etki gösteren istenilen en önemli özelliktir.

## **2.4. Hücresel Ölüm Süreçleri**

Hücre ölümü, fazla ve istenmeyen hücreleri yok ederek organizmanın iç homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynar. Hücreler genellikle apoptoz olarak bilinen kaspaz bağımlı bir yol kullanarak hayatlarını sonlandırır. Bunun yanı sıra gelişim ve homeostaz sırasında meydana gelen nekroptoz (programlanmış nekroz olarak da adlandırılır) ve otofajiye bağlı hücre ölümleri de bu dengenin korunmasında önemli roller üstlenir (39).

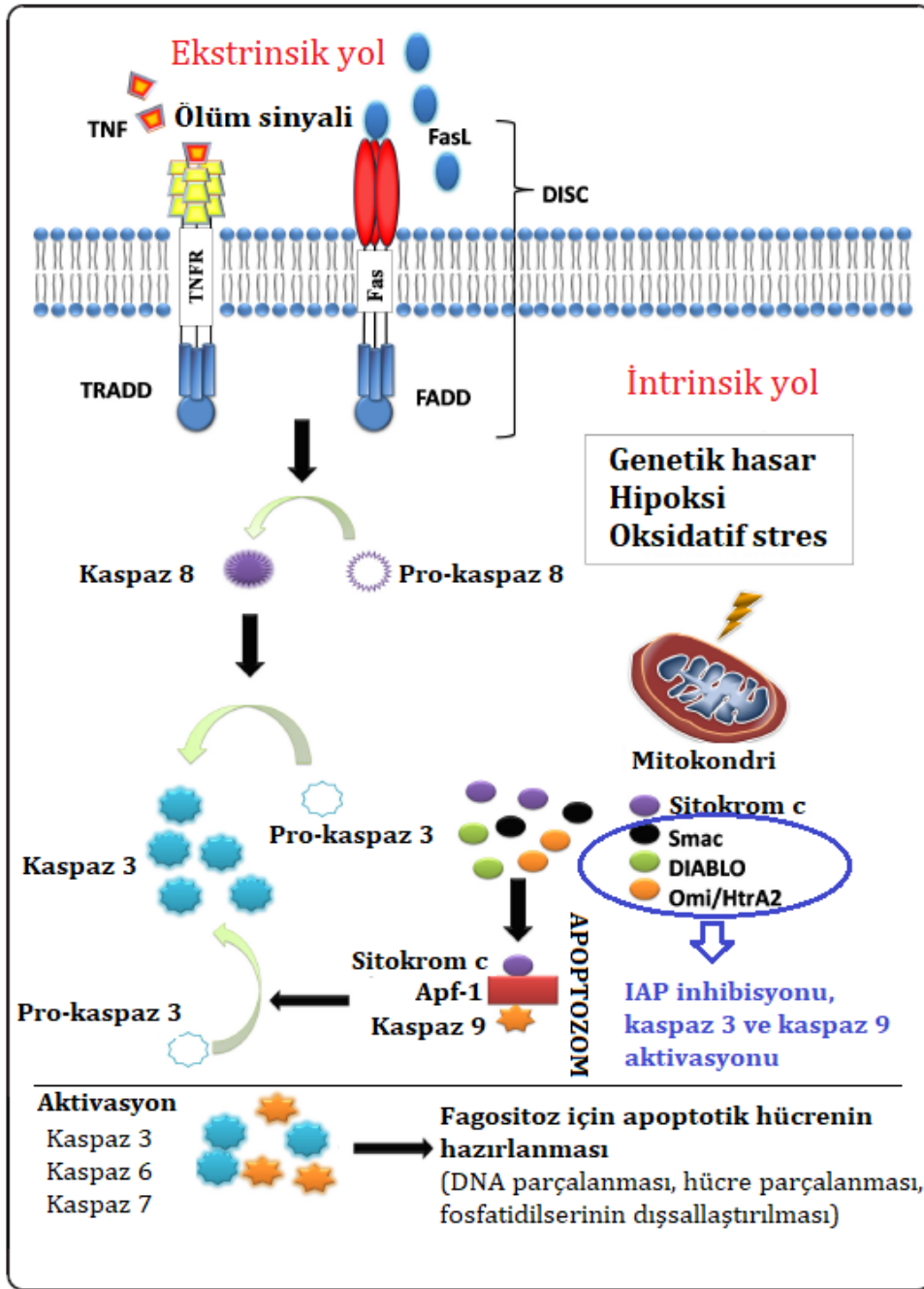
### **2.4.1. Apoptoz**

Apoptoz sözcüğü ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tipini tanımlamak için kullanılmıştır (40).

Apoptoz, bir hücrenin büyümesini ve bölünmesini durdurduğu ve bunun yerine, içeriğinin çevreye dökülmeden hücrenin kontrollü ölümüyle sonuçlanan bir sürece girdiği yoldur. Apoptoz, bazen programlanmış hücre ölümü (veya daha yaygın olarak hücrel intihar) olarak da adlandırılır. Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki kategoride kaspazlar vardır (41, 42).

Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9) aktif olmayan prokaspazlardan aktive edilir ve cellat kaspazlarını (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive etmeye devam eder. Cellat kaspazların aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan DNA parçalanması, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile sonuçlanan bir olaylar dizisi başlatır (43, 44). Apoptozda, ölü hücrenin içeriğini bulandıran apoptotik cisimler, apoptotik hücreyi çevreleyen diğer hücreler tarafından fagosite edilir (41). Bu davranış öncelikle hücre kültüründe gözlenmesine rağmen, makrofajlar gibi in vivo hücreler genellikle apoptotik hücreleri parçalanmadan önce çıkarır. Bu, yaralanan dokunun çevrelenmesiyle sonuçlanır ve sonuç olarak çevredeki hücrelere ikincil hasar riskini azaltır.

Apoptoz süreci, çok hücreli organizmalarda yüksek oranda korunur ve genetik olarak kontrol edilir. Apoptoz, hücre içi bir dizi sensörün görev aldığı ve hücrenin kendi hasarını tespit etmesiyle başlatılan içsel yol (intrinsik) mekanizmasıyla gerçekleşebilir. Öte yandan, diğer bir mekanizma olan dışsal yolda (ekstrinsik) bağışıklık sisteminin bir hücresi ile hasarlı bir hücre arasındaki etkileşim sonucu apoptoz başlayabilir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Apoptotik sinyal yolları (45). (Ekstrinsik yolağın aktivasyonu için dışsal ölüm sinyallerine ihtiyaç vardır. Ölüm reseptörü aktivasyonu öncü kaspazların (kaspaz 8 veya kaspaz 10) aktivasyonu ile sonuçlanır. Bunun sonucunda prokaspaz -3,-6 ve -7 aktif formları olan kaspaz -3, -6 ve -7'ye dönüşür. Sonuç olarak hücre apoptoza uğrar. İntrensik uyarılar mitokondri zar geçirgenliğini artırır ve sitokrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 salınımı gerçekleşir. Sitokrom c ve Apf1 etkileşerek pro-kaspaz 9'u aktive eder ve sonuçta kaspaz 3 aktive olur. Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 bağımsız olarak kaspaz 3 ve kaspaz 9'u aktifleştirir ama bu apoptoz için tek başına yeterli değildir.)



### 2.4.1.1. Apoptozun İçsel Yolu

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen içsel yol, hücre içinde birden fazla hedef üzerinde hareket eden çeşitli uyarınları içerir. Apoptozun bu formu, mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif uyarınlara yanıt olarak başlatılır. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin yokluğundan kaynaklanır. Bu hayatta kalma yanlısı sinyaller olmadan, normal olarak inhibe edilen puma, noxa ve bax gibi hücre içindeki proapoptotik moleküller aktif hale gelir ve apoptozu başlatır. Apoptozu başlatan diğer faktörler doğada pozitifdir ve hipoksiye, toksinlere, radyasyona, reaktif oksijen türlerine, virüslere ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmayı içerir (46).

Apoptozun içsel yolunu kontrol eden başlatıcı kaspaz, kaspaz 9'dur. Bu molekül apoptoz başlangıcında adaptör bir protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1)'e bağlanır. Apoptotik olmayan bir hücredeki APAF1 genellikle, kaspaz toplama alanı (CARD) bloke edilecek ve aynı zamanda bir CARD alanı içeren procaspaz 9 ona bağlanamayacak şekilde katlanır. Apoptoz, pozitif veya negatif uyarınlarla indüklendiğinde, mitokondriyal membranda değişiklikler tetiklenir ve bunun sonucunda mitokondriyal geçirgenlik geçiş porları (MPT) açılır. MPT gözenek açıldıktan sonra, proapoptotik proteinler (sitokrom c, Smac/Diablo ve HtrA2/Omi dahil) mitokondriden sitoplazmaya sızabilir ve apoptozu aktive edebilir (47). Sitokrom c, APAF1 monomerlerinin WD alanına bağlanarak apoptozu indükler. Bu APAF1'de deoksi ATP'yi bağlayabilen bir nükleotid bağlama ve oligomerizasyon alanını açığa çıkaran bir konformasyonel değişiklikte sonuçlanır. Bu bağlanma, APAF1'de hem CARD'ını hem de oligomerizasyon alanlarını açığa çıkaran ek bir konformasyonel değişikliği indükler, böylece birkaç APAF1'in apoptozom olarak bilinen bir kompleks halinde birleşmesine izin verir (48). Apoptozom, açık merkezinde birkaç CARD alanını içerir ve bu alanlar birkaç procaspaz 9 proteinini toplar ve aktive eder. Bu aktive edilmiş kaspaz 9 enzimleri, apoptozu indükleyebilen cellat procaspaz 3'ü aktif kaspaz 3 formuna dönüştürür (47). Smac/Diablo ve HtrA2/Omi, apoptoz proteinlerinin inhibitörlerini (IAP) inhibe ederek apoptozu başlatmaya yardımcı olur. Buna karşın sitokrom c salınımı olmaksızın, IAP'leri tek başına inhibe etmek apoptozu başlatmak için yetersizdir (49).

#### 2.4.1.2. Apoptozun Dışsal Yolu

Apoptozun ölüm reseptörü yolu olarak da bilinen dışsal yol, doğal öldürücü hücreler veya makrofajlardan salınan ölüm ligandlarının hedef hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması sonrasında gerçekleşen kaspaz 8'in aktivasyonu sonucu başlatılır (50).

Apoptoz ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin üyeleridir (Tablo 2.2) ve bu reseptörler kendilerine özgü bir ölüm ligandına sahiptir (51, 52). Uyarılar reseptöre bağlandıktan sonra, reseptörün sitoplazmik ucunda bulunan ölüm indükleyici (DED) alan, adaptör protein FADD ile prokaspaz-8 proteinlerini bir araya getirir ve ölüm indükleyici sinyal kompleksine (DISC) oluşumu tamamlanır. Birkaç prokaspaz 8 monomerinin DISC'e alınması, bunların dimerizasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır. Sonuçta ortaya çıkan kaspaz 8, iki farklı alt-yoldan apoptozu indükleyebilir. İndüklenen alt yol, hücrelerin tip I veya tip II hücreler olarak sınıflandırılmasına bağlıdır (53). Tip I hücrelerde kaspaz 8, cellat kaspazları doğrudan böler ve bu nedenle doğrudan apoptozu başlatır. Tip II hücrelerde, IAP'ler, mitokondriden salınan proteinler tarafından inhibe edilmediği sürece, cellat kaspazlarının doğrudan kaspaz 8 aktivasyonunu inhibe eder (54).

Aktif kaspaz-8'in önemli hedefleri arasında BID proteini yer almaktadır. BID'nin kesilimi sonrasında tBID'in mitokondrinin dış zarında yerleştiği ve BH3 bölgesi aracılığıyla, anti-apoptotik BCL-2 ve/veya BCL-XL proteinlerinin denetleyici görevini inhibe edip, mitokondrinin dış zarında Bax/Bak oluşmasını sağlamaktadır (55). Bu aşamada oluşan kanallardan sitokrom c salımı gerçekleşir ve dış yoldan başlayan apoptoz sinyali mitokondriyal apoptotik yolak ile birleşir.

Apoptozu etkileyen bu mekanizmanın yanında, DISC'nin çalışmasına apoptozu önleme göreviyle bağlanan FLIP proteinleri de mevcuttur. Bu proteinlerin bağlanması prokaspaz-8'in DISC kompleksinde aktif formunun oluşumunu engeller. Bu şekilde ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptoz engellenmiş olur (56).

**Tablo 2.2.** İnsan ölüm reseptörleri ve ligantları (52)

Ölüm reseptörleri	Ölüm ligantı
TNF reseptör 1 (TNFR1)	TNF
CD95 (Fas ve APO-1 olarak da bilinir)	CD95-ligantı (Fas-L olarak da bilinir)
Ölüm reseptör 3 (DR3)	TLIA
TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligant reseptörü 1 (TRAIL-R1, aynı zamanda DR4 olarak da bilinir)	TRAIL (Apo2-L olarak da bilinir)

## 2.5. Otofaji

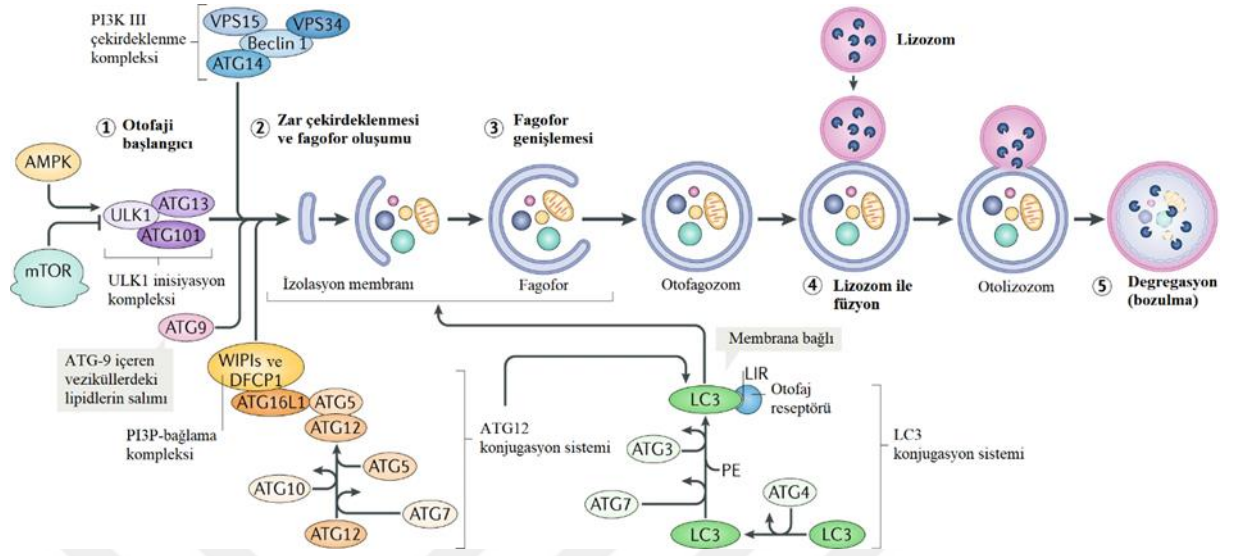
Otofaji, endojen veya eksojen kaynaklı sitoplazmik materyali bozunma (degradasyon) için lizozoma ileten süreçtir. Makrotofaji (otofaji olarak isimlendirilir), mikrootofaji ve şaperon aracılı tofaji olarak bilinen üç ana tofaji formu vardır. Mikrootofaji, sitozolik kargo bileşenlerinin membran invaginasyonları yoluyla doğrudan lizozoma transferini içerir. lizozomal membran boyunca KFERQ benzeri motif içeren proteinlerin seçici translokasyonunu içerir (39).

Otofajinin baskın işlevi, temel hücresel bileşenleri geri dönüştürerek stres/besin sınırlamasının ardından hücre hayatta kalmasını teşvik etmektir (57, 58). Otofajiyi genetik veya kimyasal olarak bloke etmek, genellikle stres koşulları altında hücrelerin ölümünü teşvik eder (59). Bununla birlikte, belirli şartlar altında tofaji ayrıca hücre ölümüne de yol açar (60).

Otofajik hücre ölümünde, hücre ölüm sürecinin erken safhasında, sitoplazmada otofagozomların ve otolizozomların birikimi gözlenmektedir (Şekil 2.4). Evrimsel olarak iyi bir şekilde korunan tofaji süreci, orijinal olarak mayada genetik taramalardan tanımlanan Otofajiyile-ilişkili (Autophagy-related; Atg) genler tarafından kodlanan moleküler bir makine tarafından gerçekleştirilir (61-63). Otofaji yolu, besin eksikliği (açlık) ve enerji yükü kaybı başta olmak üzere, farklılaşma, nörodejeneratif hastalıklar, stres, enfeksiyon ve kanser gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerle de ilişkili olarak düzenlenir (64-66). Açlık, bir multiprotein kompleksi olan mTORC1'de bulunan mTOR'un inhibisyonu yoluyla tofajiyi indükler. Besinler veya büyüme faktörleri tarafından uyarılmaya yanıt olarak, mTORC1, ULK1, ATG13, ATG101 ve FIP200'ü

(RB1CC1) içeren bir makromoleküler substrat kompleksini negatif olarak düzenler ve bu da otofaji baskılanmasıyla sonuçlanır (67-69). Otofajiyi uyaran enerji tükenmesi, kısmen AMPK aktivasyonu yoluyla mTORC1'i inhibe ederek, otofajide önemli bir başlangıç adımı olan ULK1'in aktivasyonuna yol açar (70, 71).

Otofaji ayrıca sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz (VPS34) ve bir dizi ilave uyarıcı veya engelleyici çekirdek düzenleyici protein (ATG14L, UVRAG, Ambra1 ve Rubicon) ile bağlantılı Beclin 1'den oluşan bir multiprotein kompleksi tarafından da düzenlenir (72). Prootofajik uyarılara yanıt olarak, bu kompleks tarafından artan fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) üretimi, otofagozom oluşumunu düzenler (72, 73). Beclin 1 kompleksi, PI3K/Akt yolu tarafından (74) ve ayrıca antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri (75) ile bağlanma etkileşimleri sonucu negatif düzenlemeye tabidir. Fagofor oluşumunun ardından, otofagozom zarının uzaması, iki ubikuitin benzeri konjugasyon sisteminin etkisini gerektirir. Bunlar (i) Atg5-Atg12 konjugasyon sistemi ve (ii) mikrotübül ile ilişkili protein-1 hafif zincir 3 (LC3, Atg8) konjugasyon sistemi (76, 77). Atg4B, LC3B'nin proformunu sitozolik serbest formuna (LC3-I) dönüştürür. Memelilerde, LC3-I'in (ve diğer Atg8 homologlarının) fosfatidiletanolamin-konjuge ve otofagozom membran bağlantılı formuna (yani, LC3-II) dönüştürülmesi, otofajide bir başlangıç adımıdır (78-80). Otofajideki son adım, hücrel bileşenlerin parçalanması/geri dönüşümü için bir otolizozom oluşturmak üzere otofagozomun lizozomla füzyonudur (81).



**Şekil 2.4.** Makrotofaji (otofaji) sürecini ve ana düzenleyici mekanizmaların şematik gösterimi (82). mTOR ve AMPK önemli metabolik sensörlerdir ve hücre ömrünün belirleyicilerindedir. Otofajide mTOR bir inhibitör olarak ve AMPK bir aktivatör olarak görev yapar. Otofaji başlangıcında, sitoplazmik materyal (otofajik kargo), fagofor adı verilen fincan şeklindeki bir yapı ile çevrelenir. Daha sonra otofagozomlar olarak adlandırılan çift zarlı veziküller meydana gelir ve bunlar asidik lizozomlarla kaynaşarak sitoplazmik materyalin bozulacağı otolizozomları oluşturulur. Otofaji, (1) başlatma, (2) zar çekirdeklenmesi ve fagofor oluşumu, (3) fagofor genişlemesi, (4) lizozomla füzyon ve (5) bozunmayı içeren kompleks bir olaydır. Bu süreç otofaji ile ilgili proteinler (ATG'ler) olarak adlandırılan çoklu proteinler tarafından düzenlenir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ile Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Serileri ve Kültür Ortamları

Hücre serileri, laboratuvar araştırmalarının birçok alanında ve özellikle kanser araştırmalarında *in vitro* modeller olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok kanser türü için sunulan hücre serileri kanser araştırmalarının başlangıcında önemli bir modeldir. Çalışmamızda insan meme kanseri epitel hücre serisi (MCF-7) ve sağlıklı insan meme epitel hücresi (MCF-10A) kullanıldı.

##### 3.2.1. MCF-7 Hücre Serisi (ATCC HTB-22)

Çalışmada meme kanseri modeli olarak MCF-7 hücreleri kullanıldı. MCF-7 hücreleri için besleme medyumunu olarak yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Katalog No: DMEM-HA; Capricorn Scientific GmbH, Almanya) kullanıldı. Ham medyum içerisine %10 fetal sıgır serumu (FBS; Katalog No: S181G-500; Serox GmbH, Almanya), %1 penisilin-streptomisin solüsyonu (Katalog No: 03-031-1B; Biological Industries, İsrail), 0.01 mg/ml insan rekombinant insülini (Humulin-R, Lilly, ABD) ve %1 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (Katalog No: P08-32100; Pan Biotech GmbH, Almanya) ilave edildi. Hazırlanan besleme medyumunu 0.22 µm por çapına sahip vakum filtrasyon sisteminden (Katalog No: 343001; NEST Biotechnology, Çin) süzüldü ve MCF-7 hücreleri için bütün deneysel basamaklarda kullanıldı.

##### 3.2.2. MCF-10A Hücre Serisi (ATCC CRL-10317)

MCF-10A hücre serisi, tümörojenik olmayan bir meme epitel hücre serisidir. MCF-10A hücreleri için besleme medyumunu olarak DMEM/Ham's F-12 (Katalog No:

DMEM-12-A; Capricorn Scientific GmbH, Almanya) kullanıldı. Ham medyum içerisine %10 FBS (Katalog No: S181G-500; Serox GmbH, Almanya), 20 ng/ml insan epidermal büyüme faktörü (Katalog No: PHG0311L; Thermo Fisher, ABD), 0.5 mg/ml hidrokortizon (Katalog No: H0888-1G; Sigma-Aldrich, Almanya), 100 ng/ml kolera toksini (Katalog No: BML-G117-0001, ENZO Life Sciences, ABD), % 1 penisilin-streptomisin solüsyonu (Katalog No: 03-031-1B; Biological Industries, İsrail), 0.01 mg/ml insan rekombinant insülini (Humulin-R, Lilly, ABD) ilave edildi. Hazırlanan besleme medyumunu 0.22 µm por çapına sahip vakum filtrasyon sisteminden (Katalog No: 343001; NEST Biotechnology, Çin) süzüldü ve MCF-10A hücreleri için bütün deneysel basamaklarda kullanıldı.

### **3.3. Kültür Şartları**

Tüm hücre serileri inkübatörde (Model No: 3131, Thermo Fisher Scientific, AD), standart koşullar altında (37 °C, %5 CO<sub>2</sub>) kültüre edildi. Çalışmaların her adımı steril ortamın muhafazası için biyolojik emniyet kabini (Model No: BIF2000; Bilser, Türkiye) içerisinde gerçekleştirildi.

### **3.4. Hücre Kültürü**

#### **3.4.1. Hücrelerin Açılması**

Hücre vialleri, sıvı azot tankı içerisinden çıkartıldıktan sonra 37 °C sıcaklığa ayarlı su banyosu içerisinde hızlıca çözüldü. 15 ml'lik falkon tüpleri içerisine bir miktar besleme medyumunu konuldu ve viallerdeki hücreler kısa bir pipetaj yapıldıktan sonra tüplere transfer edildi. Tüpler 1500 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi ve üst faz uzaklaştırıldı. Hücre peleti üzerine 1-2 ml medyum aktarıldı ve pipetaj yapıldıktan sonra hücreler 25 cm<sup>2</sup> kültür flasklarına ekildi ve inkübatöre alındı. Hücrelerin haftada iki defa besi ortamları değiştirildi.

#### **3.4.2. Hücrelerin Alt Kültüre Alınması**

Flasktaki hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Öncelikle medyumları aspire edilen flaskların tabanları bir defa fosfat tamponu (PBS;

Katalog No: L0615-500; Biowest, Fransa) ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu (Katalog No: 325-043-EL, Wisent Inc., Kanada) eklendi ve flakslar 5-10 dakika inkübatöre bırakıldı. Flask tabanından kalkan hücrelerin üzerine tripsin-EDTA solüsyonu kadar medyum eklendi ve hücreler bir falkon tüpüne toplandı. 1500 rpm’de 8 dakika santrifüjden sonra tüpün içerisindeki üst faz atıldı ve hücre peleti bir miktar medyum içerisinde yeniden süspanse edildi. Hücre miktarının belirlenmesinde tripan mavisini kullanıldı ve hücre sayımı bir inverted mikroskop (Optec BSD400, Çin) aracılığıyla gerçekleştirildi. Hücreler daha sonra 75 cm<sup>2</sup> kültür flakslarına ekildi (yaklaşık 2x10<sup>6</sup> hücre) ve inkübatöre alındı. Hücrelerin haftada iki defa besi ortamları değiştirildi.

### **3.4.3. Hücrelerin Stoklanması**

Çalışma kapsamında olası kontaminasyon riskine karşı hücrelerin dondurularak stoklanması işlemleri de gerçekleştirildi. Bu kapsamda pasaj işlemi sonrası sayılan hücreler (yaklaşık 2x10<sup>6</sup> hücre) 1 ml dondurma medyumunu (besleme medyumunu + %10 DMSO) içerisinde süspanse edildi ve cryoviale alındı. Vialler içerisinde 2-propanol bulunan hücre dondurma kabına alınarak -80 °C’ye bırakıldı. Hücre dondurma kabı vial içerisindeki sıcaklığı 1 °C/dakika düşürerek daha kontrollü bir hücre dondurma süreci oluşturmaktadır. Ertesi gün -80 °C’de bulunan vialler sıvı azot tankı içerisine transfer edildi.

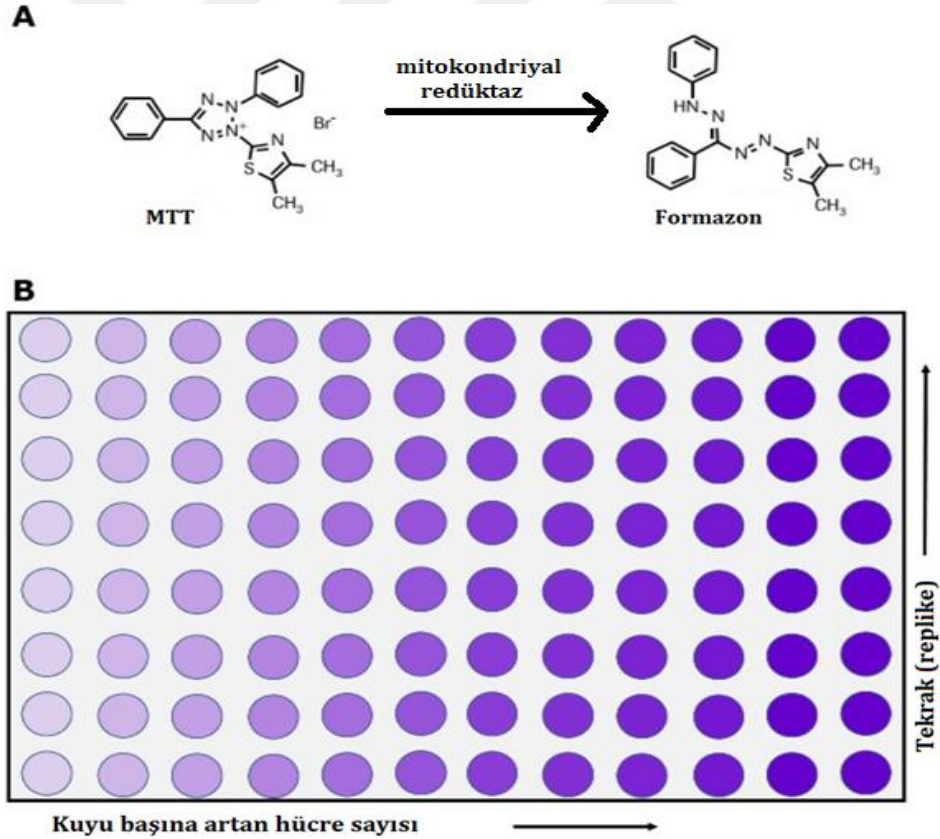
### **3.5. Bileşiklerin Hazırlanması**

Çalışma kapsamında MOTS-c (Katalog No: 9697-1; BioVision, ABD)’nin 0.001, 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM ve referans ilaç 5-Fluorourasil (5-FU; Katalog No: F6627-1G; Sigma-Aldrich, Almanya)’in 1, 5, 25, 50 ve 100 µM’lık konsantrasyonları kullanıldı. Öncelikle her iki bileşiğin yüksek konsantrasyonları (MOTS-c 10 µM ve 5-FU 100 µM) besleme medyumları içerisinde hazırlandı ve bu stoklar 0.22 µm enjektör filtresi kullanılarak süzüldü. Sonrasında bileşiklerin diğer konsantrasyonları hazırlanan stoklardan seyreltilerek elde edildi.



### 3.6. Sitotoksite Analizi

Bileşiklerin hücre serileri üzerine muhtemel sitotoksik etkisi, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın bir yöntem olan 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizleri ile gerçekleştirildi (83). MTT analizi, hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücrel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. Bu kolorimetrik tahlil, metabolik olarak aktif hücreler tarafından sarı bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanır (84, 85). Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri içerir (86). Formazan kristalleri, bir çözündürme solüsyonu kullanılarak çözülür ve elde edilen renkli solüsyon bir spektrofotometre kullanılarak optik yoğunluğu belirlenir ve canlılık düzeyi hesaplanır (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** MTT'nin canlı hücrelerde kimyasal reaksiyon sonucu formazona dönüşmesi (A) ve 96 kuyucuklu plakada optik yoğunluğun görseli (B).

Çalışmada öncelikle 96 kuyucuklu plakalara (Katalog No: 92096; TPP, İsviçre) hücre ekimi (her bir kuyucuğa  $15 \times 10^3$  hücre) yapıldı. Ertesi gün kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırıldı ve hazırlanan bileşiklerin uygulamaları yapıldı. Plakalar 1, 8, 16, 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırıldı ve 0.5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT (Katalog No: M2128; Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonundan 50 µl pipetlendi. 3 saat inkübasyondan sonra MTT solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) her bir kuyucuğa eklendi. Kuyucuklardaki hücrelerin optik densisitetleri ELISA plaka okuyucuda (Thermo MultiskanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 hücre canlılığı olarak değerlendirildi. Kuyucuklardaki hücrelerin optik densisitetleri ELISA plaka okuyucuda (Thermo MultiskanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda okutuldu (83). Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 hücre canlılığı olarak değerlendirildi. Referans ilaç ve MOTS-c uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık değerleri hesaplandı.

### **3.7. Genotoksisite Analizi**

Tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi, ökaryotik hücrelerde DNA iplik kopmalarını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde mikroskop lamı üzerinde agaroz içine gömülü hücreler, nükleer matrise bağlı süper sarmal DNA döngüleri içeren nükleoidler oluşturmak için deterjan ve yüksek tuz ile parçalanır. Yüksek pH'da elektroforez, floresan mikroskobu ile gözlemlenen ve kuyruklu yıldızlara benzeyen yapılarla sonuçlanır. Kuyruklu yıldızın başa göre yoğunluğu, DNA kırılmalarının düzeyini yansıtır (87).

#### **3.7.1. Analiz Öncesi Hazırlıklar**

##### **a) Lizis çözeltilisinin hazırlanması**

2.5 M NaCl	146.1 gr
100 mM EDTA	37.2 gr
10 mM Tris-Base	1.2 gr

Bileşikler tartıldıktan sonra 900 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü ve bu şekilde stok solüsyon hazırlandı. Çalışmada kullanılacak lizis solüsyonu için stok solüsyondan 89 ml alındı ve üzerine 10 ml DMSO ile 1 ml Triton-X ilave edildi (toplam hacim 100 ml, pH:10).

#### **b) Alkali elektroforez solüsyonunun hazırlanması**

10 N NaOH çözeltisi : 200 gr NaOH 500 ml dH<sub>2</sub>O'da çözüldü.

200 mM EDTA : 14.89 gr EDTA 200 ml dH<sub>2</sub>O'da çözüldü.

1X Alkali elektroforez solüsyonunu hazırlamak için 30 ml 10 N NaOH ve 5 ml 200 mM EDTA alındı ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlandı (pH>13).

#### **c) Nötralizasyon solüsyonunun hazırlanması**

0.4 M Tris-Base	48.5 gr
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Öncelikle tartılan Tris bileşiği 600 ml dH<sub>2</sub>O çözüldü ve pH'sı 7.5'e ayarlandı. Sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

#### **d) Etidyum bromür solüsyonunun hazırlanması (10X)**

Etidyum bromür	10 mg
dH <sub>2</sub> O	50 ml

1X çalışma solüsyonu hazırlamak için 1 ml stok solüsyondan alındı ve üzerine 9 ml dH<sub>2</sub>O eklendi.

#### **e) Mikroskop lamalarının normal melting agaroz (NMA) ile kaplanması**

2 gr NMA (Katalog No: 2267.4; Carl Roth GmbH, Almanya) tartıldı ve 250 ml'lik bir beher içerisine alındı. Üzerine 200 ml dH<sub>2</sub>O konuldu (son konsantrasyon %1) ve mikrodalga cihazında NMA eritildi. Sonrasında hazırlanan çözelti ısı proplu bir manyetik

karıştırıcı üzerine alındı ve sıcaklık 85 °C'ye ayarlandı. Mikroskop lamaları NMA içerisine 2-3 saniye süreyle daldırıldı ve sonrasında lamaların alt tarafı bir peçete ile silindi. Lamalar düz bir zemin üzerinde, oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda kurutuldu.

#### **f) Low melting agaroz (LMA) çözeltisinin hazırlanması**

%1'lik LMA (Katalog No: BP165-25; Fisher BioReagents, Belçika) PBS içerisinde eritildi. Çözelti 1 ml ependorf tüplere pay edildi ve bu örnekler kullanılmaya kadar 4 °C'de saklandı. Çalışma öncesi tüpler blok ısıtıcıya alındı ve LMA'nın erimesi için sıcaklık 65 °C'ye ayarlandı. Tüpler içerisindeki LMA eriyince ısıtıcının sıcaklığı 35 °C'ye getirildi.

#### **3.7.2. Comet analizlerinin yapılması**

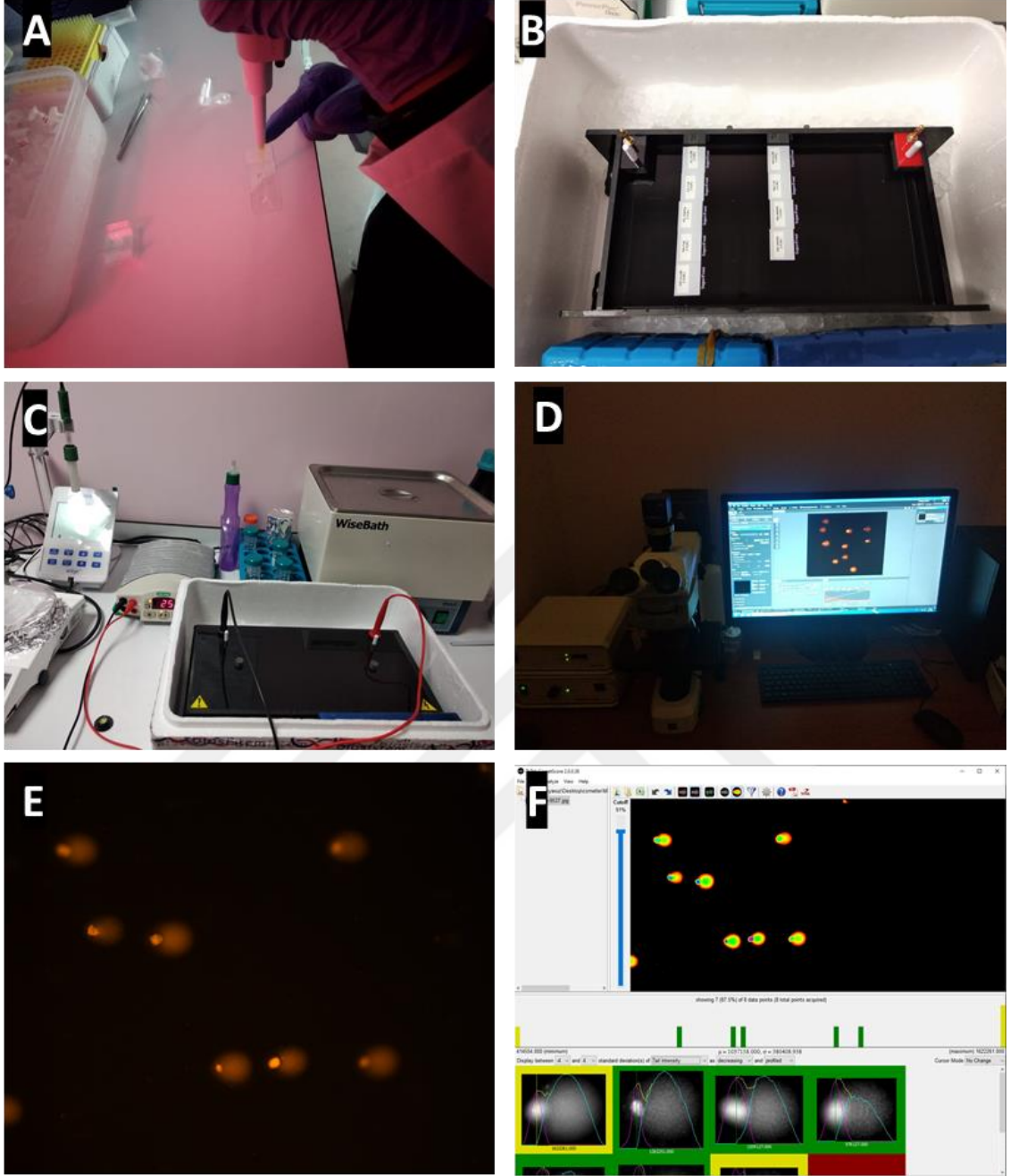
DNA hasar analizi, Singh vd. tarafından belirtilen alkali Comet analiz yöntemine göre belirlendi (88). Comet analizlerinde, MTT analizleri sonrası canlılığın yaklaşık %70 olduğu dozlar (89) ve bileşiklerin canlılık üzerine etkili olduğu inkübasyon süreleri kullanıldı (Tablo 3.1.).

İlk olarak hücreler 6 kuyucuklu plakalara (Katalog No: 92006; TPP, İsviçre) ekildi. Ertesi gün MOTS-c ve 5-FU uygulaması gerçekleştirilen plakalar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında kuyucuklardaki medyumlar uzaklaştırıldı ve hücreler iki defa 37 °C sıcaklıktaki PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 1 ml soğuk PBS eklendi ve bir kazıyıcı yardımıyla hücreler ependorf tüplere toplandı ve hücreler sayıldı. Örneklerdeki hücre miktarı belirlendikten sonra 10 µl'de  $10 \times 10^3$  hücre üzerine %1'lik 80 µl LMA ile karıştırıldı. Hücre+LMA karışımı NMA kaplı lamlara aktarıldı ve lamel ile kapatılarak preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar 4 °C'de 15 dakika bekletildi ve böylelikle LMA'nın donması sağlandı. Lameller dikkatli bir şekilde lamlardan sıyrıldı ve bir dikey şale içerisine yerleştirildi. Şale içerisine hazırlanan soğuk lizis solüsyonu konuldu ve 4 °C'de 1 saat lizis işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında lamalar yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific, İngiltere) içerisine aynı yönde yerleştirildi. Lamaların üzerlerini örtecek düzeyde soğuk alkali elektroforez solüsyonunu konuldu ve sonrasında 25 voltta (maksimum 300mA) 20 dakika elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası lamalar 3 defa 5 dakika süreyle nötralizasyon solüsyonuyla yıkandı. Her bir preparat 20 dakika etidyum bromür ile boyandı. Preparatlardaki arka planın

netliğini arttırmak ve fazla boyayı uzaklaştırılması için lamalar soğuk PBS içerisinde kısa süreli bekletildi ve üzerleri tekrardan lamel ile kapatıldı. Hücre DNA'sında meydana gelen hasar floresans mikroskopta (Zeiss Axioscope A1, Almanya) incelendi (Şekil 3.2.). Skorlama işlemi TriTek Comet Score programı kullanılarak yapıldı. Her lamdan rastgele en az 25 hücre sayıldı, grupların tail intensity (TI), tail length (TL) ve tail moment (TM) parametreleri belirlendi. TI, TL ve TM parametrelerinde meydana gelen değişimler DNA hasarının varlığını ve oranını ortaya koymamızı sağladı. Deneysel çalışmalar karanlık ortamda gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1.** Comet analizlerinde kullanılan doz ve inkübasyon süreleri

Hücre serileri	MOTS-c		5-FU	
	Seçilen Doz	Hücre Canlılığı (%)	Seçilen Doz	Hücre Canlılığı (%)
MCF-7 (72 saat)	0.1 µM	68.18±2.47	5 µM	68.86 ± 2.38
MCF-10A (72 saat)	1 µM	72.37±0.42	50 µM	75.12±2.51



**Şekil 3.2.** Comet deneyinin basamakları. Slaytların hazırlanması (A), elektroforez (B,C), DNA hasarının floresans mikroskopla görüntülenmesi (D) ve görüntülerin bilgisayar yazılımı ile analizi (E,F).

### 3.8. TUNEL Analizi

Terminal deoksinükleotidil transferaz deoksinükleotitlerin (dUTP) çentik-uç etiketleme (TUNEL) yöntemi, DNA parçalanmasının saptanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. TUNEL analizlerinde kullanılan ve bir endonükleaz olan terminal

deoksinükleotidil transferaz (TdT) yöntemin temelini oluşturur. Bu enzim modifiye edilmiş dUTP DNA zincir kırıklarının serbest -OH terminaline eklenmesini katalize eder ve böylelikle DNA kırıklarına işaretli nükleotidler bağlanır (90). TUNEL analizi, programlanmış hücre ölümünün sonraki aşamalarında hücre süspansiyonlarından, yapışık hücre dizilerinden ve dokulardan apoptotik hücrelerin saptanması ve miktarının belirlenmesi için standart histokimyasal yöntemlerden biri olarak kabul edilebilir (91, 92).

MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, etkin zaman aralığında hücrelere uygulanan MOTS-c ve 5-FU bileşiklerinin IC<sub>50</sub> değerlikleri hesaplandı (93). Elde edilen bu dozlar TUNEL analizi, Real Time PCR ve Western Blot çalışmalarında kullanıldı.

Çalışmamızda TUNEL analizleri için Tunel Assay Kit-FITC (Katalog No: ab66108; Abcam, İngiltere) kullanıldı. Hücreler 8 kuyucuklu kültür slaytlarına (Katalog No: 230108; NEST Biotechnology, Çin) ekildi ve 24 saat inkübasyon sonrasında MOTS-c ve 5-FU'nun belirlenen dozları ile muamele edildi. İnkübasyon süresi sonrasında kuyucuklardaki medyumlar çekildi ve hücreler PBS ile iki defa yıkandı. PBS'de hazırlanan %4 paraformaldehit (pH:7.4) solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edilen hücreler, sonrasında %0.1 Triton X-100 ile muamele edildi ve bu şekilde hücre geçirgenliği sağlandı. Kit protokolüne göre hazırlanan TUNEL reaktifi (Tablo 3.2) ile 1 saat 37 °C'de inkübasyon sonrası yıkama işlemleri yapıldı. Son olarak hücre çekirdekleri yine analiz kiti ile gelen propidyum iyodür (PI) ile 30 dakika süreyle boyandı. Kuyucuklar slayttan ayrıldı ve lamel kapatılarak hazırlanan preparatlar floresans mikroskop altında görüntülendi.

**Tablo.3.2.** TUNEL boyama solüsyonunun hazırlanması

DNA etiketleme solüsyonu	1 örnek
Reaksiyon tamponu	10 µl
TdT enzimi	0.75 µl
FITC-dUTP	8 µl
dH <sub>2</sub> O	32.25 µl
Toplam hacim	51 µl

### 3.9. Real Time PCR Analizleri

MOTS-c ve 5-FU uygulamalarından sonra bütün hücre hatlarında hücre ölüm süreçlerinde roller üstlenen gen ifadelerinde meydana gelen değişimler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon analizleri (Real Time PCR) ile belirlendi. Analizlerde mRNA ifadeleri ilgili gene spesifik primerler kullanılarak belirlendi. Çalışmalarda kullanılan primer dizilimleri Tablo 3.3'te sunuldu.

**Tablo 3.3.** Çalışmada kullanılan genlere ait primer dizi bilgileri

Gen	Oligonükleotid Dizisi	Gen Bank Numarası
<b>Beta-aktin</b>	F AGCAAGGGCATCCTCACC	NM_001101.5
	R ACAGGGATAGCACAGCCTGGA	
<b>Bax</b>	F GACATTGGACTTCCTCCGGGA	NM_001291428.2
	R ACAAAGATGGTCACGGTCTGC	
<b>Bcl-2</b>	F TGGACAACATCGCCCTGTGGA	NM_000633.3
	R TCACTTGTGGCCAGATAGGC	
<b>Beclin-1</b>	F TCTCGCAGATTCATCCCCCA	NM_003766.4
	R ATCCACATCTGTCTGGCCCGA	
<b>Akt-1</b>	F CAACACCTTCATCATCCGCTG	NM_005163.2
	R CGACCGGAAGTCCATCTCCTC	
<b>AMPK</b>	F AGTTCCTGGAGAAAGATGGCG	NM_006251.5
	R CCTACCACATCAAAGCTCCGA	
<b>Caspase-3</b>	F GCTCCTAGCGGATGGGTGCTA	NM_004346.4
	R GATTTCAAGGCGACGCCAACC	
<b>mTOR</b>	F GCCAATGAGAGGAAAGGTGGC	NM_004958.4
	R AGCGGTAAAAGTGTCCCCTGC	
<b>p53</b>	F AAACCTACCAGGGCAGCTACG	AB082923.1
	R CTCACAACCTCCGTCATGTGC	
<b>TSC2</b>	F TCTGTTGGGACTGGGAACAAC	NM_000548.5
	R GGATGCGATTGTTGAGGCCAC	
<b>ULK1</b>	F GGCTTCTGCACAGCAAAGGCA	NM_003565.4
	R TGATGACCTCGGGGGCCATGT	



### **3.9.1. Hücrelerin Büyütülmesi ve Bileşiklerle Muamelesi**

25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarında büyütülen hücreler MOTS-c ve 5-FU ile muamele edildi. Sonrasında PBS ile yıkanan hücreler hücre kazıyıcı kullanarak kaldırıldı ve DNase, RNase içermeyen tüplere toplandı. Tüpler 2000 rpm'de, 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre peletlerini içeren tüpler buz üzerine alındı.

### **3.9.2. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini**

Hücrelerdeki total RNA, EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep Kit (BioBasic, Kanada) kullanılarak elde edildi. İzolasyon kiti ile birlikte gelen lizis solüsyonundan 0.5 ml tüpler içerisinde konuldu ve yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı. Tüpler üzerine ½ hacim miktarınca (0.25 ml) etanol eklendi ve ependorf tüpler elle alt üst edilerek karıştırıldı. Tüpler içerisinde bulunan bütün karışım 2 ml'lik spin kartüj içeren koleksiyon tüplerine alındı ve tüpler oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüj edildi. Kolona 0.5 ml "RW Solüsyonu" eklendi ve sonrasında oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında kalan sıvı boşaltıldı. 0.5 ml "Universal PRE Solution" eklenen kolonlar, oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüjlendi ve yine tüplerin altında kalan sıvı kısım atıldı. Bu aşama iki defa tekrarlandı ve sonrasında kolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dakika bekletildi. Tüpler bu süre sonunda 30 saniye boyunca 12000×g'de santrifüjlendi. Bu işlem sonrasında dokulardaki toplam RNA izolasyonu tamamlandı. Örneklerin total RNA miktarları nanodrop ile A260/A280nm ölçümleri yapılarak belirlendi. cDNA sentezi için RNA miktarının eşitlenmesi amacıyla en düşük RNA değeri standart alındı. cDNA sentezi için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı.

### **3.9.3. cDNA Sentez Protokolü**

RNA örneklerden cDNA sentezi iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. Sentez için tüplere 10 µl RNA örneği, 4 µl 5X iScript Reaction mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase ve 5 µl nükleaz içermeyen su ilave edildi. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. Cihazın inkübasyon ayarları; 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 30

dakika, 85 °C’de 5 dakika ve 4 °C’de ∞ olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C’de saklandı.

### **3.9.4. Real Time PCR analizi**

Elde edilen cDNA’lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time PCR ile amplifiye edildi. Analizlerinde 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı (BioRad, ABD). Analiz için plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2 µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5 µl SYBR Green Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Platedeki cDNA örneklerinin üzerine 8 µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Gen ifade seviyeleri, BioRad CFX Connect sistemi ile ölçüldü. Çalışmada β-aktin kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Sıcaklık koşulları 50 °C’de 2 dakika, 95 °C’de 10 dakika X 45 siklüs, 95 °C’de 15 saniye ve 60 °C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı. Real Time-PCR analizleri sonucunda ilgili genlerin mRNA ifadelerindeki değişimler  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi kullanılarak hesaplandı (94).

### **3.10. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi**

Çalışmada, MOTS-c ve 5-FU uygulaması sonrasında hücrel apoptoz ve otofaji süreçlerinde görevli markırların düzeyi Western blot analizleri ile belirlendi. Uygulama sonrasında bu süreçlerde grev alan proteinlerin düzeyinin belirlenmesi, sitotoksisitenin hangi mekanizma veya mekanizmalar üzerinden gerçekleştiğini açıklamamızda yardımcı oldu.

#### **3.10.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

##### **a) 1.5 M Tris-HCl (pH: 8.8)**

27.23 gr Tris-base öncelikle 80 ml dH<sub>2</sub>O’da çözüldü. Sonrasında pH’sı 8.8’e ayarlandı ve çözeltinin toplam hacmi 150 ml’ye tamamlandı. Çözelti 4 °C’de saklandı.

**b) 0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)**

6.06 gr Tris-base öncelikle 60 ml dH<sub>2</sub>O'da çözüldü. Sonrasında pH'sı 6.8'e ayarlandı ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'de saklandı.

**c) %30 Akrilamid/Bis-akrilamid solüsyonu**

29.2 gr akrilamid ve 0.8 gr bis-akrilamid tartıldı ve 100 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Çözelti 4 °C'de saklandı.

**d) SDS-Page Running Buffer (10X)**

250 mM	Tris-base	30.3 gr
1.92 M	Glisin	144.1 gr
%1	SDS	10 gr

Tüm kimyasallar tartıldı ve yaklaşık 700 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Sonrasında solüsyonun pH'sı 8.3'e ayarlandı ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

**e) Tris buffer saline (TBS, 10X)**

20 mM	Tris-base	24.2 gr
150 mM	NaCl	87.6 gr

Tüm kimyasallar tartıldı ve yaklaşık 700 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Sonrasında solüsyonun pH'sı 7.4-7.6'ya ayarlandı ve hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

**f) TBS-Tween20 (TBS-T, 1X)**

Hazırlanan stok TBS (10X) solüsyonundan 100 ml alındı. Bunun üzerine 899 ml dH<sub>2</sub>O ve 1 ml Tween-20 (final konsantrasyon %0.1) eklendi.

### g) Transfer solüsyonu (Towbin Buffer, 1X)

25 mM	Tris-base	3.02 gr
190 mM	Glisin	14.4 gr
%1	SDS	1 gr
%20	Metanol	200 ml
	dH <sub>2</sub> O	800 ml

İlk olarak Tris-Glisin-SDS tartıldı ve 600 ml dH<sub>2</sub>O'da çözüldü. Sonrasında 200 ml metanol eklendi ve çözelti 1000 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Transfer solüsyonunun pH'sı 8.1 - 8.5 arasında ölçüldü. pH ayarlamak için asit veya baz kullanılmadı.

### h) Lizis solüsyonu (RIPA buffer)

50 mM	Tris-base	0.605 gr
150 mM	NaCl	0.877 gr
%0.1	Triton X-100	100 µl
%0.5	Sodyum deoksikolat	0.5 gr
%0.1	SDS	0.1 gr

Tüm kimyasallar tartıldı ve yaklaşık 70 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Sonrasında solüsyonun pH'sı 7.4-7.6'ya ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu lizis solüsyonuna kullanımdan önce taze hazırlanan fenilmetilsülfonil florür (1 mM), sodyum florür (5 mM) ve sodyum ortovanadat (1 mM) eklendi. Proteaz inhibitörü olarak Roch cOmplete™ Proteaz inhibitör tablet kullanıldı.

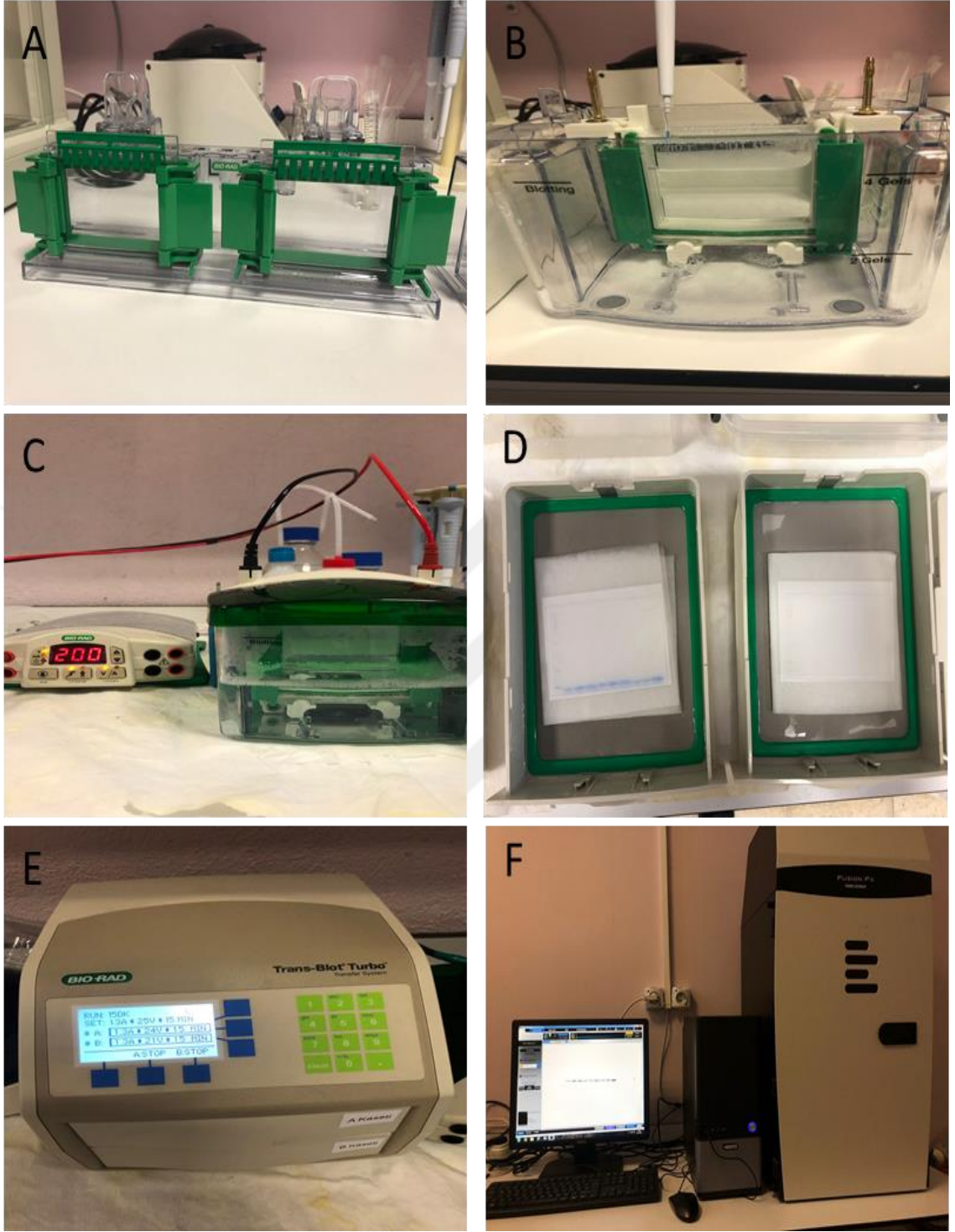
### 3.10.2. Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan hücre serileri 100 mm kültür petrilere ekildi. Hücrelere MOTS-c ve 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değerleri etkin zaman süreleri boyunca uygulandı. Sonrasında besleme medyumları çekildi ve hücreler iki defa soğuk PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 500 µl RIPA lizis buffer petrilere konuldu ve hücreler kazıyıcı yardımıyla toplandı. Ependorf tüplerine toplanan örnekler buz içerisinde bekletildi ve her 5 dakikada bir tüpler vortekslendi. 30 dakika lizis sonrası her bir örnek 5 saniye süreyle

3 defa sonike (QSonika 500, ABD) edildi. Ependorf tüplerde yer alan örnekler önceden soğutulmuş ultrasantrifüje yerleştirildi (SL8R, Thermo Scientific, ABD) ve 30 dakika 14500 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni tüplere alındı. Örneklerin protein seviyesi BCA protein analiz kiti (Model no: orb90411, Biorbyt, İngiltere) kullanılarak belirlendi. Yüklemelemlerde kullanılacak örnekler 4X Laemmli örnek tamponu kullanılarak 30µg/20µl olacak şekilde hazırlandı. Çalışma süresince örnekler -80 °C'de muhafaza edildi.

### 3.10.3. Western Blot Analizleri

Hazırlanan protein örnekleri eşit miktarda ve hacimde SDS jellere yüklendi. Yükleme işleminden sonra proteinler öncelikle 100V' da yaklaşık 10 dakika, sonrasında ise 200V'da jel sonuna kadar (yaklaşık 75 dakika) elektroforez işlemine tabi tutuldu ve proteinlerin ayrışması sağlandı. Yürütme işleminden sonra cam kasetler ayrıldı ve SDS jel transfer solüsyonu içerisine aktarıldı. Önceden transfer solüsyonu (Towbin Buffer) içerisinde dengelenmiş olan transfer pedleri ve PVDF membran (PVDF membran 30-60 saniye metanolde aktive edilip sonra transfer buffer içerisine alındı) kullanılarak transfer yığını hazırlandı. Jeldeki proteinlerin transfer işlemi Bio Rad Trans Blot Turbo aktarım sistemi kullanılarak yapıldı. Aktarımdan sonra membranlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca %5'lik yağsız süt tozunda (TBS-T ile hazırlanan) blokladı. Sonrasında ilgililenilen proteinlere spesifik primer antikolar ile gece boyu inkübe edildi. İnkübasyondan sonra membranlar 3 defa 5 dakika süreyle TBS-T ile yıkandı. Membranlar bloklayıcı solüsyonu içerisinde hazırlanan ve primer antikora uygun HRP konjugat sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu basamaktan sonra 3 defa 5 dakika süreyle TBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak membranların üzerine ECL solüsyonu (Clarity ECL Substrate, BioRad, ABD) konuldu ve Fusion FX (Vilber, Almanya) görüntüleme cihazında membranların görüntüleri alındı (Şekil 3.3). Proteinlerin optik yoğunluk düzeyleri Image J programında belirlendi. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanıldı. Çalışma kapsamında kullanılan antikorun bilgileri Tablo 3.4'te özetlendi.



**Şekil 3.3.** Western blot analiz basamakları. Öncelikle SDS-page için jeller hazırlandı (A) ve örnekler yüklendi (B). Elektroferez ile proteinler ayrıştırıldı (C). Jeldeki proteinler PVDF membrana aktarıldı (E) ve protokol sonunda membrandaki bantlar görüntülendi (F).

**Tablo 3.4.** Western blot analizlerinde kullanılan antikor bilgileri

Ürün Kodu	Ürün adı	Firma
9662	Caspase-3	Cell Signaling
2603	AMPK $\alpha$	Cell Signaling
4691	Akt (pan)	Cell Signaling
2983	mTOR	Cell Signaling
7074	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling
sc-126	p53	Santa Cruz
sc-7382	Bcl-2	Santa Cruz
sc-20067	Bax	Santa Cruz
sc-390904	ULK1	Santa Cruz
sc-271314	Tuberin (TSC2)	Santa Cruz
sc-48341	BECN1 (Beclin 1)	Santa Cruz
sc-81178	$\beta$ -actin	Santa Cruz
sc-516102	m-IgGk BP-HRP - Seconder antibody anti-mouse	Santa Cruz

### 3.11. İstatistiksel Analiz

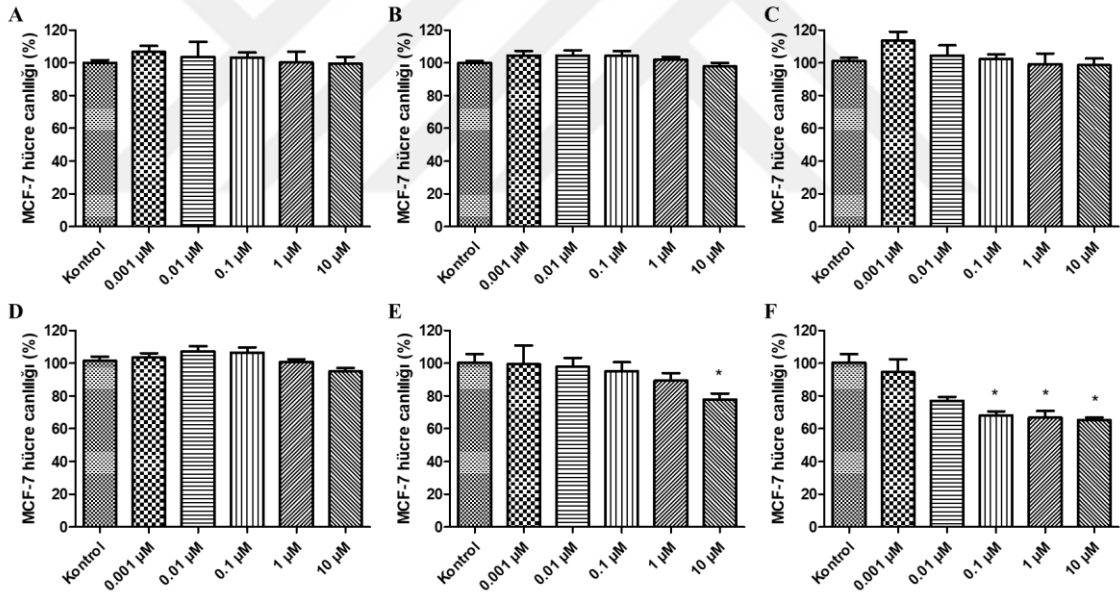
Verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS 21.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarında Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. İki değişken arasındaki farkın incelenmesinde ise bağımsız örneklerde Student' s t testi kullanıldı. Comet analiz sonuçları ortanca (%25-75) olarak ifade edildi. Sitotoksisite, TUNEL analizi, Real Time PCR ve Western blot analiz sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi ve bu veriler çubuk grafik çizilerek özetlendi. İstatistiksel olarak  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MTT Analiz Sonuçları

#### 4.1.1. MOTS-c'nin MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MOTS-c uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.1'de gösterildi. Uygulamadan 1-24. saat sonra gerçekleştirilen MTT analizleri sonrasında, ilgili peptidin MCF-7 hücre canlılığında anlamlı bir değişime neden olmadığı belirlendi. MOTS-c'nin uygulanan en yüksek dozu 48 saat sonra hücre canlılığında anlamlı düzeyde azalmaya neden oldu ( $p<0.05$ ). Buna ek olarak, 0.1, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  dozların uygulanmasından 72 saat hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde düşüktü ( $p<0.05$ ).

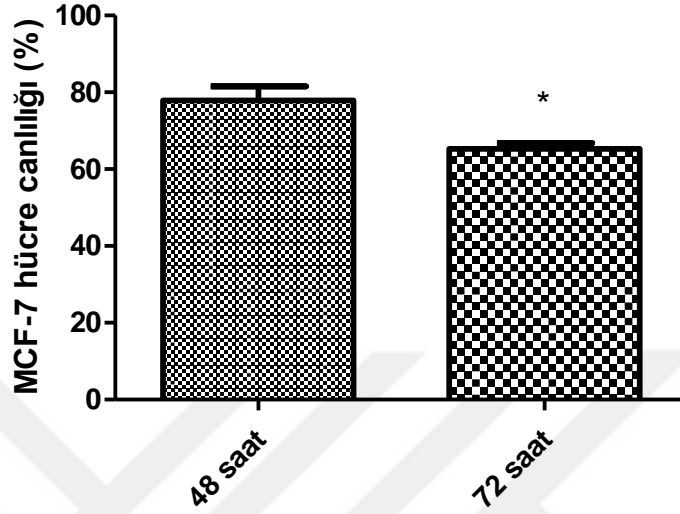


**Şekil 4.1.** MOTS-c uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). A: 1 saat sonra; B: 8 saat sonra; C: 16 saat sonra; D: 24 saat sonra; E: 48 saat sonra ve F: 72 saat sonra hücre canlılık düzeyleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar.

Elde edilen sonuçlardan sonra etkin uygulama süresini belirleyebilmek için en yüksek dozun (10  $\mu\text{M}$ ) 48. saat ve 72. saatte hücre canlılık düzeyleri karşılaştırıldı. Sonuç



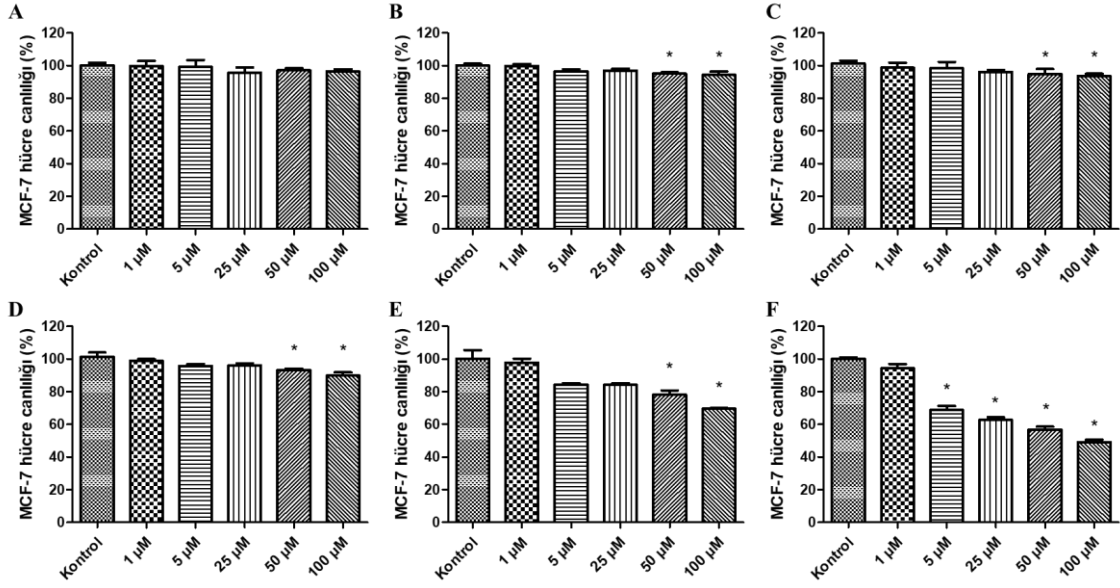
olarak, 10  $\mu$ M MOTS-c uygulaması 72. saatte hücre canlılığını 48. saate kıyasla daha fazla etkiledi (Şekil 4.2;  $p<0.05$ ). Bu sonuçlar MOTS-c'nin MCF-7 hücreleri için etkin zaman döneminin 72. saat olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.2.** 10  $\mu$ M MOTS-c uygulamasından 48 ve 72 saat sonra MCF-7 hücre canlılık düzeyi (%). MCF-7 hücrelerine uygulanan MOTS-c'nin 10  $\mu$ M'lık dozu sonrasında hücre canlılığı 72. saatte daha belirgin düzeyde düşük bulundu. İkili karşılaştırmalar t-testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  diğer gruba kıyasla.

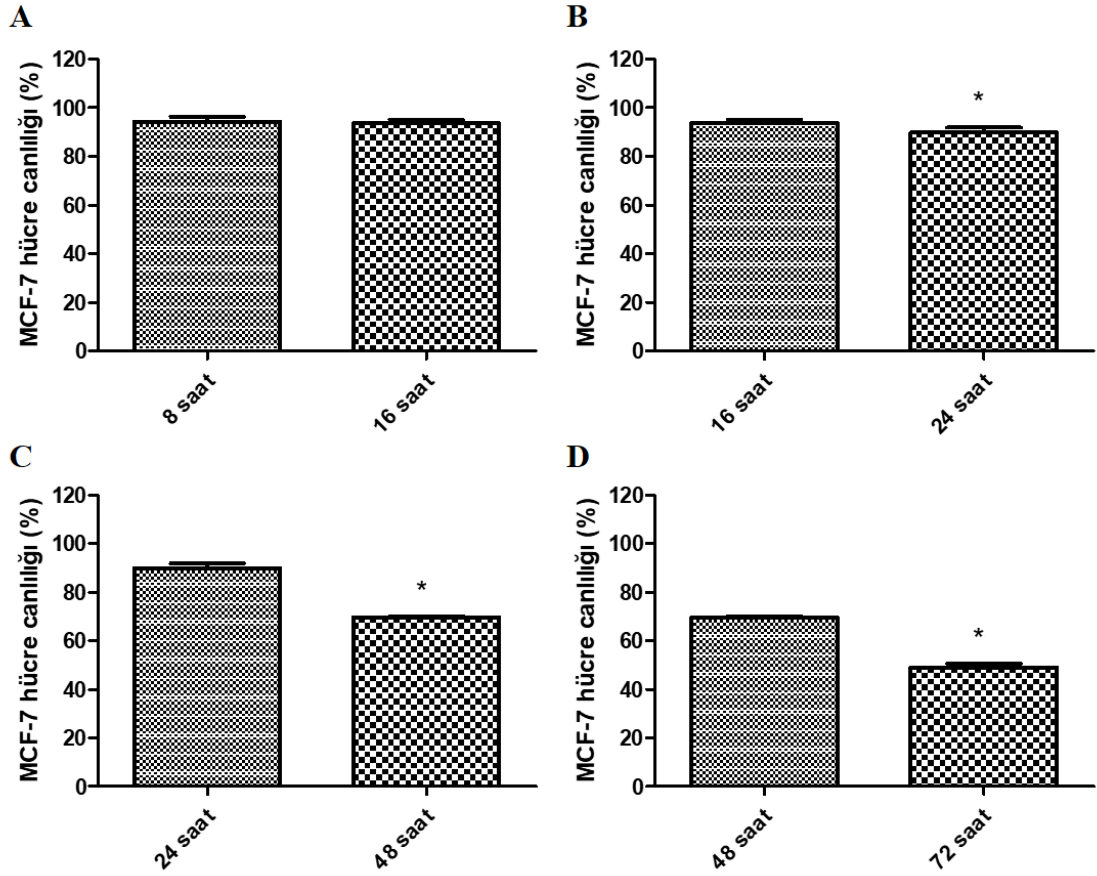
#### 4.1.2. 5-FU'nun MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

5-FU uygulamasından 1-72 saat sonra MCF-7 hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.3'te gösterildi. 5-FU'nun uygulanan 50 ve 100 $\mu$ M'lık dozları 8-48. saatler arasında kontrol grubuna kıyasla canlılığı anlamlı düzeyde düşüktü ( $p<0.05$ ). Buna ek olarak 72. saatte 5  $\mu$ M ve üzeri dozların hepsi hücre canlılığını önemli düzeyde azalttı ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.3.** 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). A: 1 saat sonra; B: 8 saat sonra; C: 16 saat sonra; D: 24 saat sonra; E: 48 saat sonra ve F: 72 saat sonra hücre canlılık düzeyleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 5-FU'nun MCF-7 hücre canlılığını artıran muamele süresine bağlı olarak önemli düzeyde düşürdüğünü söyleyebiliriz (Şekil 4.4). 8, 16, 24, 48 ve 72. saatlerde 5-FU'nun en yüksek dozunun etkileri kıyaslandı. Buna göre 8 ve 16. saatte hücre canlılık düzeyleri benzer seviyedeydi ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. 5-FU uygulamasından 24 saat ve sonrası zaman dönemlerinde hücre canlılığı bir önceki zaman dilimine kıyasla önemli düzeyde düşük bulundu (Şekil 4.4).

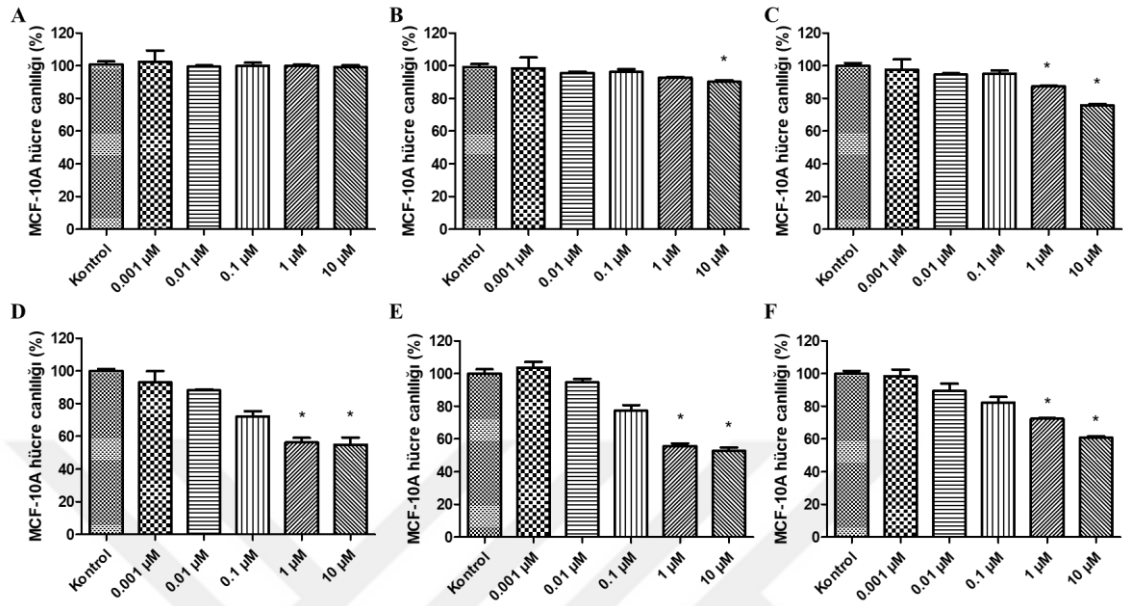


**Şekil 4.4.** 100 µM 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. MCF-7 hücreleri ile muamele edilen 100 µM 5-FU sonrasında en düşük hücre canlılığı 72 saat sonra tespit edildi. A: 8 ve 16. saatler, B: 16 ve 24. saatler, C: 24 ve 48. saatler ve D: 48-72 saatlerde MCF-7 hücre canlılık düzeyleri. İkili karşılaştırmalar t-testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  diğer gruba kıyasla.

#### 4.1.3. MOTS-c'nin MCF-10A Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

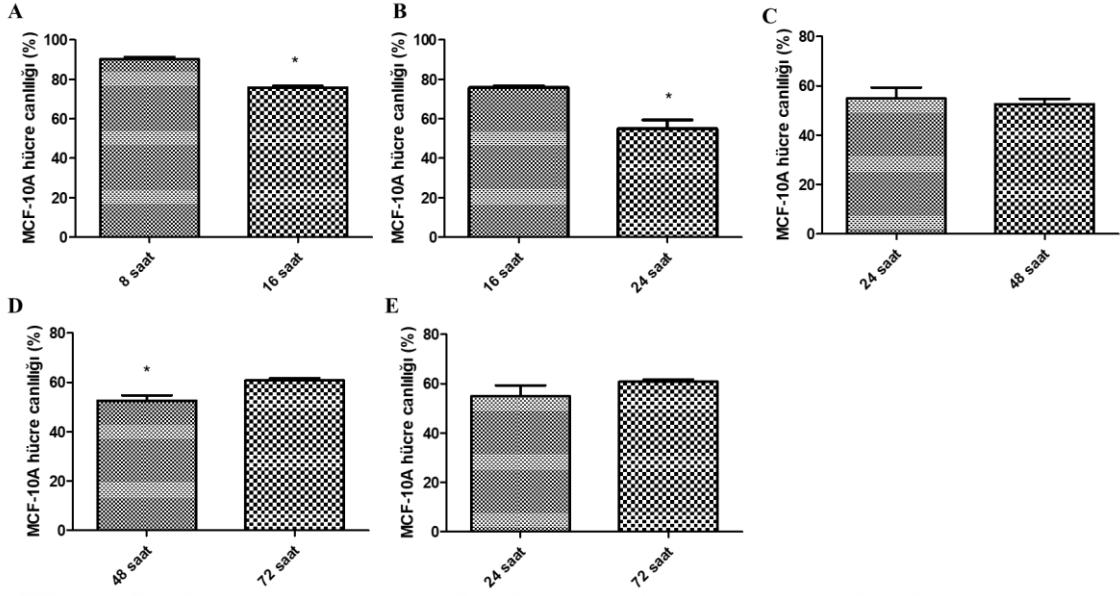
MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.5'te gösterildi. MOTS-c uygulamasından 1 saat sonra yapılan MTT analizleri sonrasında hücre canlılığında meydana gelen değişimlerin anlamlı düzeyde olmadığı görüldü. 8. saatte ise MOTS-c'nin uygulanan en yüksek dozu canlılığı azalttı ( $p < 0.05$ ). Buna karşın 16. saat ve sonrasında (24, 48 ve 72. saatler) MOTS-c'nin uygulanan 1 ve 10 µM dozları kontrol grubuna kıyasla MCF-10A hücrelerinde canlılığı önemli düzeyde azalttı. Bu dört zaman periyodu içerisinde özellikle 24. saat ve sonrasında

meydana gelen canlılık değişimleri daha belirgindi. Bütün zaman aralıklarında 1 ve 10  $\mu$ M dozlarda meydana gelen değişimler arasında önemli bir farklılık saptanmadı.



**Şekil 4.5.** MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). A: 1 saat sonra; B: 8 saat sonra; C: 16 saat sonra; D: 24 saat sonra; E: 48 saat sonra ve F: 72 saat sonra hücre canlılık düzeyleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar.

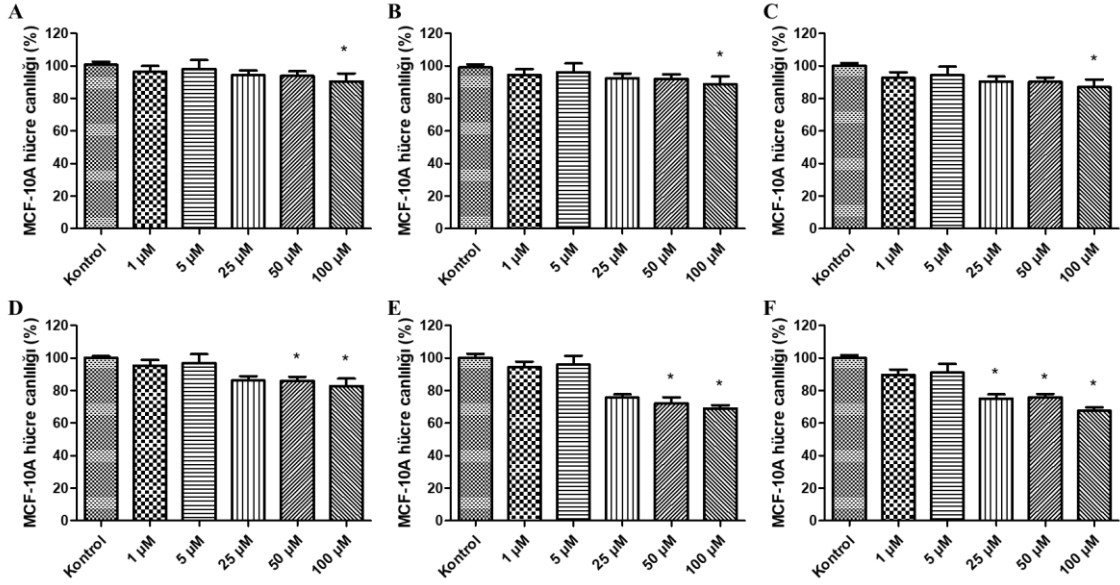
MOTS-c'nin MCF-10A hücre canlılığı 8. saatte 10  $\mu$ M dozda, 16, 24, 48 ve 72. saatlerde ise 1 ila 10  $\mu$ M dozda hücre canlılığını önemli düzeyde azalttı (Şekil 4.6). MOTS-c'nin hücre canlılığını azaltan bu iki dozu arasında ise anlamlı bir farklılık görülmedi. 10  $\mu$ M MOTS-c uygulamasından sonra zaman dönemleri arasında yapılan ikili karşılaştırmalar, 8. saate kıyasla 16. saatin, 16. saate kıyasla da 24. saatteki hücre canlılığının anlamlı düzeyde düşük olduğunu gösterdi ( $p < 0.05$ .) Uygulamadan 24 ve 48 saat sonraki hücre canlılık düzeyleri arasında anlamlı bir fark belirlenmedi. Son olarak 48. saat ve 72. saatteki hücre canlılık düzeyleri kıyaslandı ve bu iki zaman döneminde 48. saatteki hücre canlılığı anlamlı düzeyde daha düşük bulundu ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar MCF-10A hücreleri için MOTS-c'nin en fazla 48. saatte hücre canlılığını azalttığını, sonrasında ise (72. saat) canlılığın artarak devam edebildiğini göstermektedir.



**Şekil 4.6.** 10 µM MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. MCF-10A hücreleri ile muamele edilen 10 µM MOTS-c sonrasında en düşük hücre canlılığı 48 saat sonra tespit edildi. A: 8 ve 16. saatler, B: 16 ve 24. saatler, C: 24 ve 48. saatler, D: 48-72. saatler ve E: 24-72 saatlerde MCF-10A hücre canlılık düzeyleri. İkili karşılaştırmalar t-testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \*p<0.05 diğer gruba kıyasla.

#### 4.1.4. 5-FU'nun MCF-10A Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.7'de gösterildi. 5-FU'nun uygulanan 100 µM'lık dozu 1, 8 ve 16 saatler sonrasında MCF-10A hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalttı (p<0.05). 24 ve 48. saatlerde ise en yüksek iki doz (50 ve 100 µM) hücre canlılığında anlamlı azalmaya neden oldu. 72. saatte ise 5-FU'nun uygulanan 25 µM ve üzeri dozları kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını önemli düzeyde düşürdü (p<0.05).

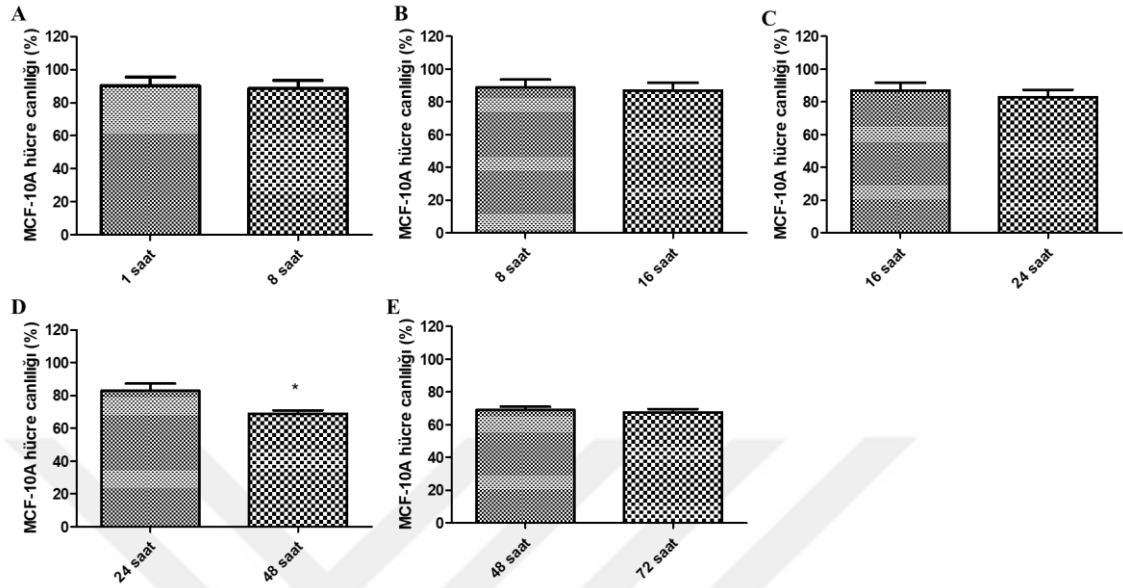


**Şekil 4.7.** 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). A: 1 saat sonra; B: 8 saat sonra; C: 16 saat sonra; D: 24 saat sonra; E: 48 saat sonra ve F: 72 saat sonra hücre canlılık düzeyleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar.

5-FU'nun 100µM uygulamasından birbirini takip eden muamele süreleri arasındaki ilişki Şekil 4.8'de gösterildi. Buna göre 1-8, 8-16 ve 16-24. saatler birbiriyle kıyaslandı ve bu ikili dönemler arasında herhangi bir farklılık görülmedi. 5-FU'nun MCF-10A hücreleri üzerine 24 saatlik muameleye kıyasla 48 saatlik muamelenin hücre canlılığını önemli düzeyde azalttığı görüldü ( $p < 0.05$ ). Ancak uygulamadan 48 saat sonra ve 72 saat sonraki hücre canlılık düzeyleri benzerdi. Bu sonuçlar 5-FU'nun MCF-10A hücreleri için 48. saatte hücre canlılığını azaltıcı yönde güçlü etki sergilediğini göstermektedir.

MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, MOTS-c uygulamasının farklı hücre serilerinde zamana bağlı olarak etkilerinin değişkenlik gösterdiğini söyleyebiliriz. Bu projenin öncelikli amacı, MOTS-c'nin potansiyel bir antikanser peptid olup-olmadığını belirlemektir. Bu kapsamda yapılan MTT analizleri MCF-7 hücrelerine uygulanan MOTS-c'nin 48 ve 72 saatte önemli düzeyde sitotoksik etki sergilediğini gösterdi. MOTS-c uygulamasından 72 saat sonra MCF-7 hücrelerinde canlılık düzeyinde azalma diğer zaman periyotlarına kıyasla en anlamlı seviyede idi. Elde edilen veriler

doğrultusunda MOTS-c'nin ve referans kanser ilacı 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değerlikleri etkin zaman dönemi dikkate alınarak hesaplandı ve Tablo 4.1'de gösterildi.



**Şekil 4.8.** 100 µM 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. MCF-10A hücreleri ile muamele edilen 100 µM 5-FU sonrasında en düşük hücre canlılığı 48 saat sonra tespit edildi. A: 1 ve 8. saatler, B: 8 ve 16. saatler, C: 16 ve 24. saatler, D: 24 ve 48. saatler ve E: 48 ve 72 saatlerde MCF-10A hücre canlılık düzeyleri. İkili karşılaştırmalar t-testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \*p<0.05 diğer gruba kıyasla.

**Tablo 4.1.** MOTS-c ve 5-FU'ya ait IC<sub>50</sub> değerlikleri (µM)

	MOTS-c	5-FU
MCF-7 (72 saat)	11.70	177.07
MCF-10A (72 saat)	11.14	199.73

## 4.2. Comet Analiz Sonuçları

Hücre serileri üzerine uygulanan MOTS-c'nin etkin zaman ve doz seviyeleri belirlendikten sonra hücrelerdeki DNA hasar seviyeleri tek hücre jel elektroforezi (Comet) analizleri ile belirlendi. Hücre serilerine uygulanan bileşiklerin (MOTS-c ve referans kanser ilacı 5-FU) hücre DNA hasarına etkileri Comet analizleri yapılarak floresans mikroskop ile görüntülendi ve görüntüler bilgisayar ortamında değerlendirildi. DNA hasar düzeyi belirlenirken tail intensity (TI), tail length (TL) ve tail moment (TM) parametreleri hasarın değerlendirilmesinde kullanıldı. Yapılan analizlere ait sonuçlar ayrıntılı şekilde aşağıda verilmiştir.

### 4.2.1. MCF-7 Comet Analiz Sonuçları

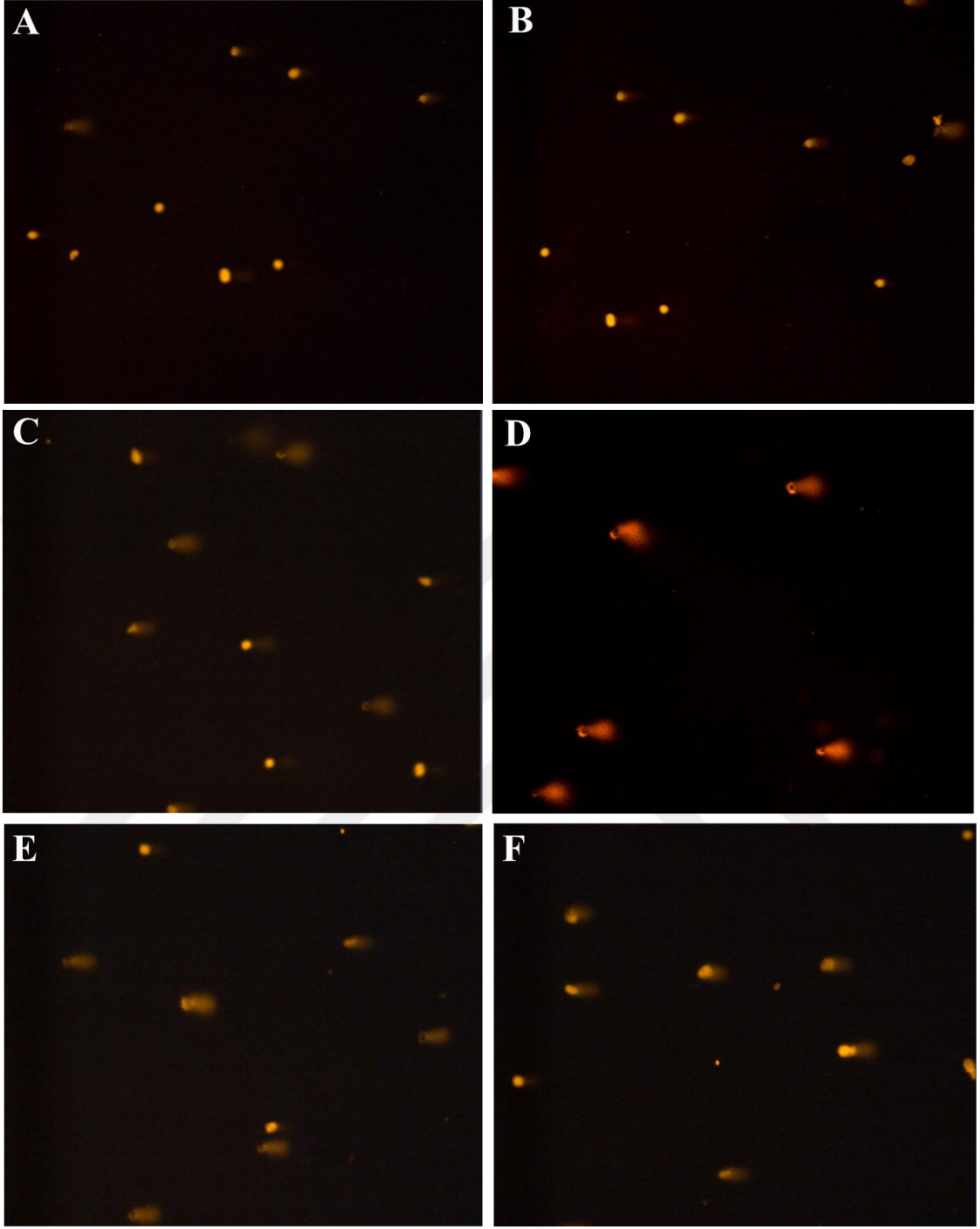
MOTS-c ve 5-FU ile 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinin Comet analiz sonuçları Tablo 4.2'de ve analize ait örnek görseller de Şekil 4.9'da gösterildi. MOTS-c uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinin Comet analizlerinde TL, TI ve TM ölçümlerinin kontrole kıyasla önemli seviyede arttığı görüldü ( $p < 0.05$ ). Benzer şekilde 5-FU uygulaması sonrasında da DNA hasar parametrelerinin üçü de kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttı ( $p < 0.05$ ). MOTS-c ye kıyasla 5-FU uygulaması sonrasında DNA hasar parametrelerinin arasında herhangi bir anlamlı farklılık belirlenmedi.

**Tablo 4.2.** MCF-7 hücresi Comet analiz sonuçları

MCF-7 (72 saat)	Kontrol	MOTS-c	5-FU
TL (px)	25 (7.75 – 38.5)	82 (52.75 – 118.25)*	65.5 (42.5 – 87.5)*
TI (px)	46994 (18768.25-111024.75)	302306 (97293 – 580653.5)*	271855 (117650.75 – 370410.5)*
TM (px)	4.2 (0.49 – 9.23)	33.48 (9.31 – 80.38)*	31.23 (8.94 – 55.96)*

(Sonuçlar Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Değerler Ortanca (%25-%75) olarak verildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar)





**Şekil 4.9.** MCF-7 hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 72 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. A ve B: Kontrol hücreler, C ve D: 72 saat MOTS-c uygulaması sonrası, E ve F: 72 saat 5-FU uygulaması sonrası. X100.

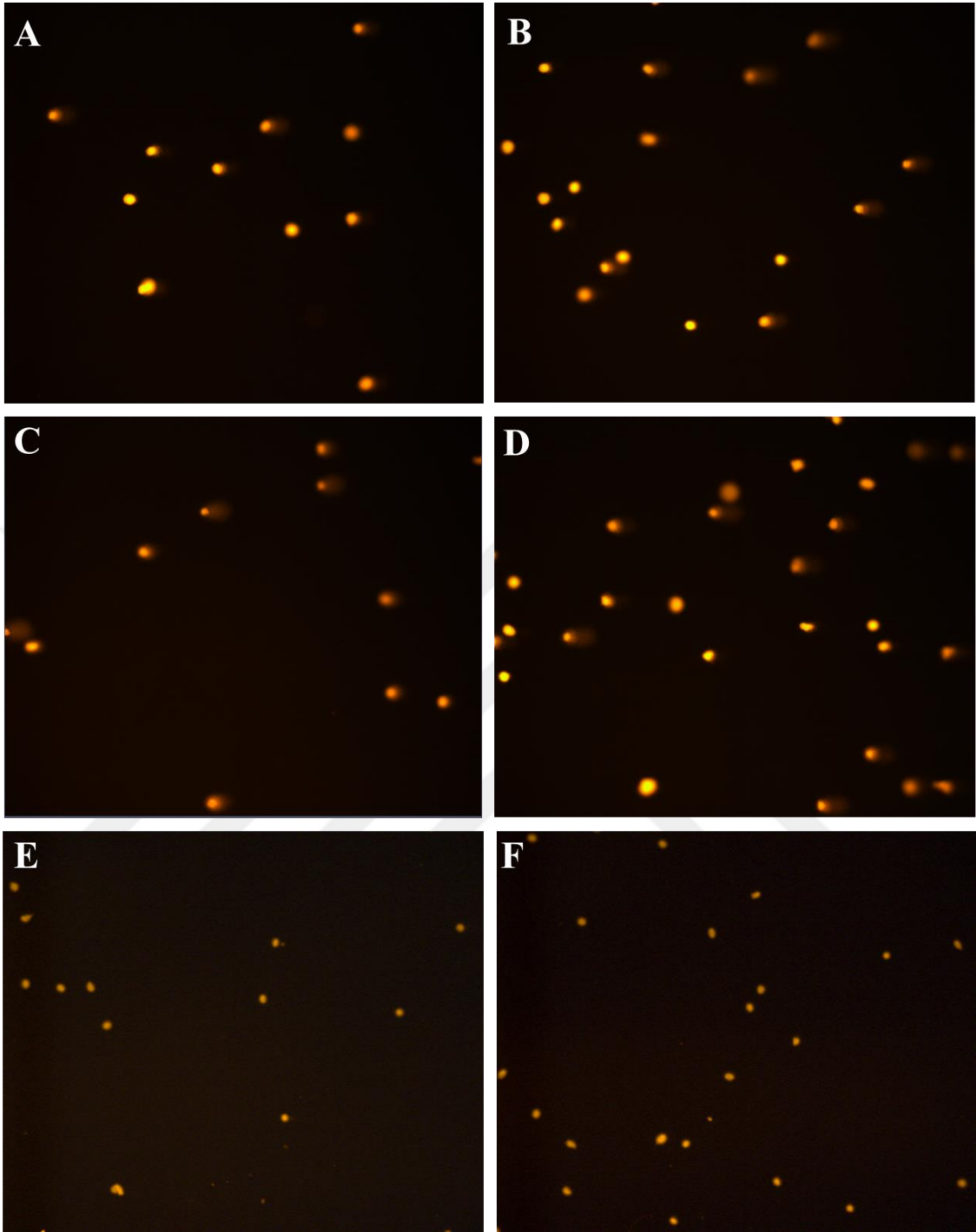
#### 4.2.2. MCF-10A Comet Analiz Sonuçları

MOTS-c ve 5-FU ile 72 saat muamele edilen MCF-10A hücrelerinin Comet analiz sonuçları Tablo 4.3'te, analize ait örnek görseller de Şekil 4.10'da gösterildi. MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücre DNA'sında meydana gelen değişimler kontrol grubu ile benzer düzeydeydi. MOTS-c ve 5-FU uygulaması sonrasında analiz edilen TI, TL ve TM değerleri kontrole kıyasla anlamlı bir farklılık sergilemedi.

**Tablo 4.3.** MCF-10A hücresi Comet analiz sonuçları

<b>MCF-10a (72 saat)</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Mots-c</b>	<b>5-Fu</b>
<b>TL (px)</b>	3.00 (1.00 – 6.75)	2.00 (0.00 – 4.00)	2.00 (0.00 – 4.00)
<b>TI (px)</b>	18765.5 (13296.75- 27614.25)	18349 (11395 – 25609)	17326 (12785 – 21827)
<b>TM (px)</b>	0.34 (0.09 – 0.59)	0.15 (0.00 - 0.63)	0.108 (0.00 – 0.39)

(Sonuçlar Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Değerler ortanca (%25-%75) olarak verildi.)



**Şekil 4.10.** MCF-10A hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 72 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. A ve B: Kontrol hücreler, C ve D: 72 saat MOTS-c uygulaması sonrası, E ve F: 72 saat 5-FU uygulaması sonrası. X100.

### **4.3. TUNEL Analiz Sonuçları**

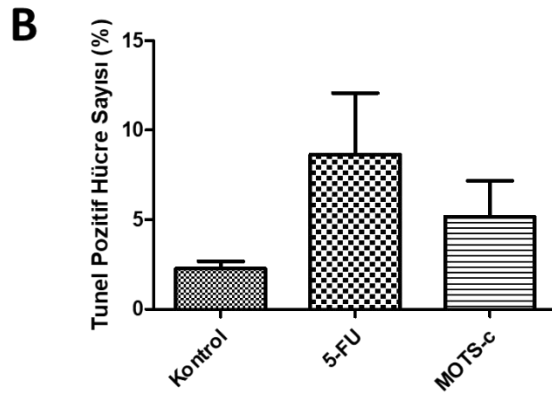
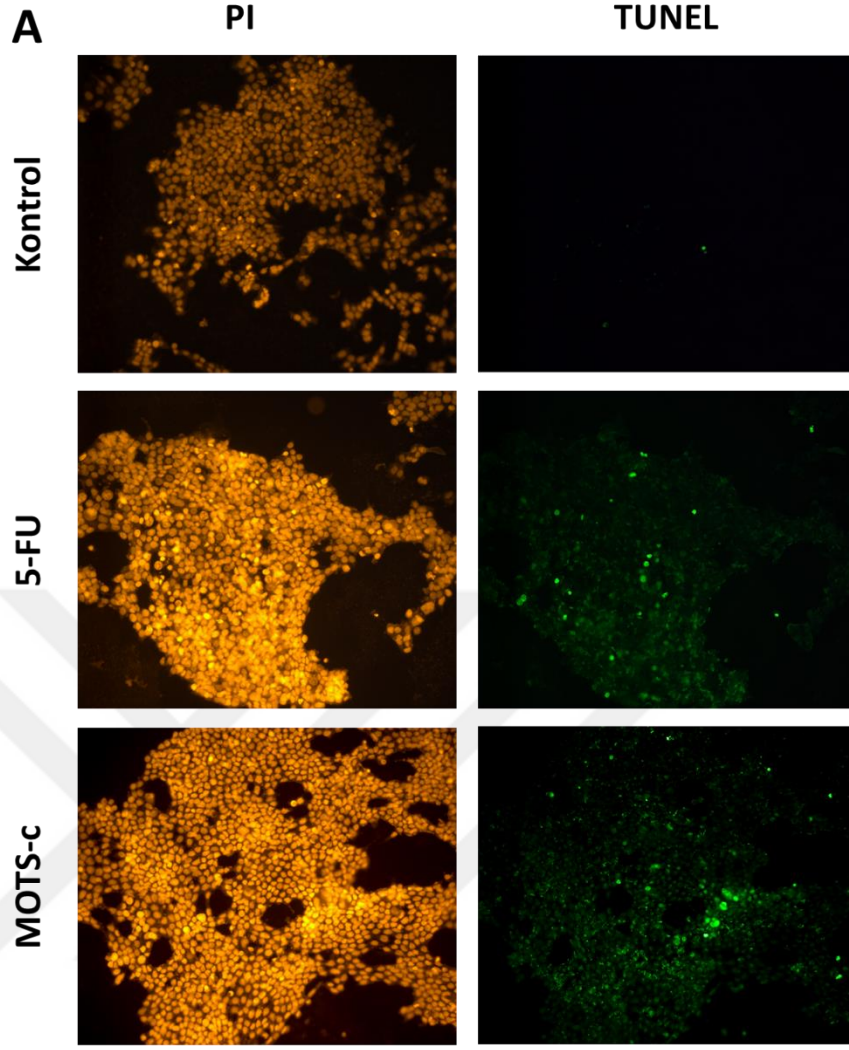
Hücre serileri üzerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU'nun etkin zaman ve doz seviyeleri belirlendikten sonra, bu bileşiklerin hücrelerde apoptotik ölüm sürecine etkilerini belirlemek amacıyla TUNEL analizleri gerçekleştirildi. Bu yöntem apoptozdaki en spesifik bulgulardan biri olarak DNA fragmantasyonunu saptamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. TUNEL testi, programlanmış hücre ölümünün sonraki aşamalarında hücre süspansiyonlarından, yapışık hücre dizilerinden ve dokulardan apoptotik hücrelerin saptanması ve miktarının belirlenmesi için standart histokimyasal yöntemlerden biri olarak kabul edilir. Uygulamalar sonrası yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar sırasıyla aşağıda sunulmuştur.

#### **4.3.1. MCF-7 Hücreleri TUNEL Analiz Sonuçları**

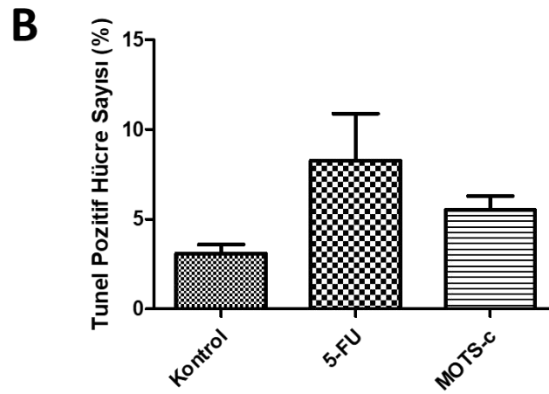
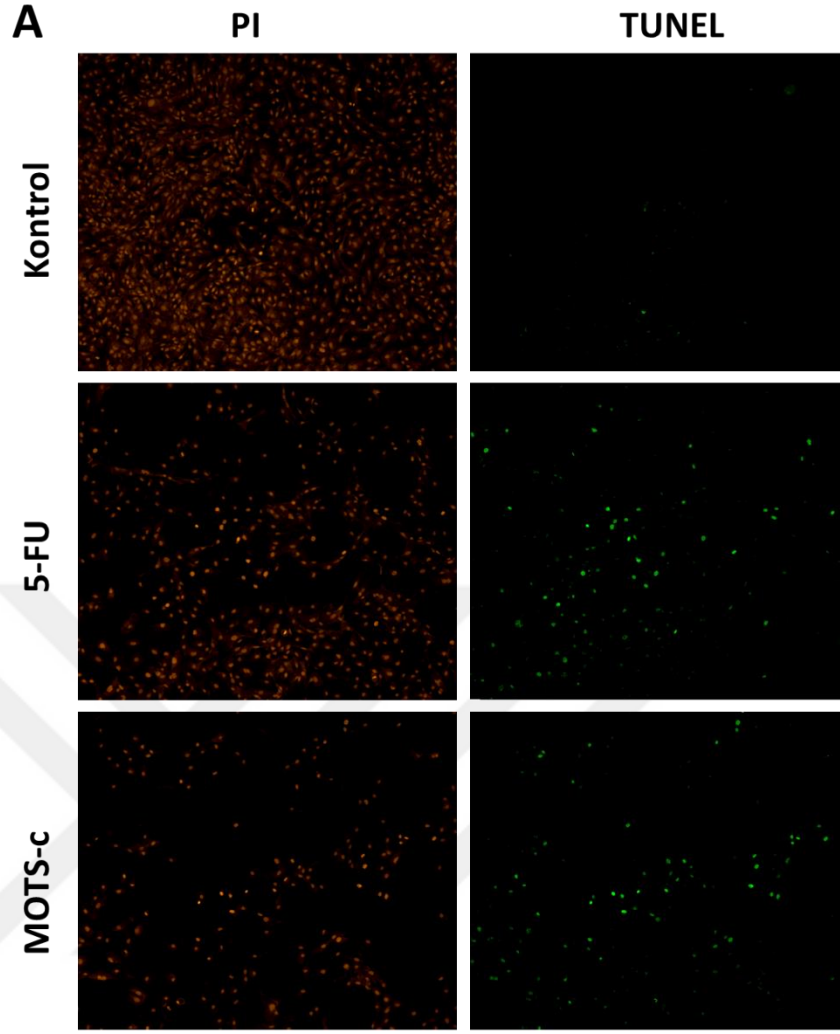
MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerdeki TUNEL boyama sonuçları Şekil 4.11'de gösterildi. Uygulamadan 72 saat sonra kontrol grubuna kıyasla 5-FU ve MOTS-c uygulanan gruplarda TUNEL pozitif hücre sayısı artış gösterse de bu değişim anlamlı değildi. 5-FU uygulaması sonrası gözlemlenen TUNEL pozitif hücre sayısı MOTS-c uygulamasına kıyasla fazla olsa da bu iki grup arasında da anlamlı bir fark bulunmadı.

#### **4.3.2. MCF-10A hücreleri TUNEL analiz sonuçları**

MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerdeki TUNEL boyama sonuçları Şekil 4.12'de gösterildi. Uygulamadan 72 saat sonra kontrol grubuna kıyasla 5-FU ve MOTS-c uygulanan gruplarda TUNEL pozitif hücre sayısı artış gösterse de bu değişim anlamlı değildi. 5-FU uygulaması sonrası gözlemlenen TUNEL pozitif hücre sayısı MOTS-c uygulamasına kıyasla fazla olsa da bu iki grup arasında da anlamlı bir fark bulunmadı.



**Şekil 4.11.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. A) Uygulama sonrası grupların floresans mikroskop görüntüleri, 100X. B) Uygulama sonrasında belirlenen grupların Tunel pozitif hücre sayıları (%). Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. PI: propidyum iyodür.

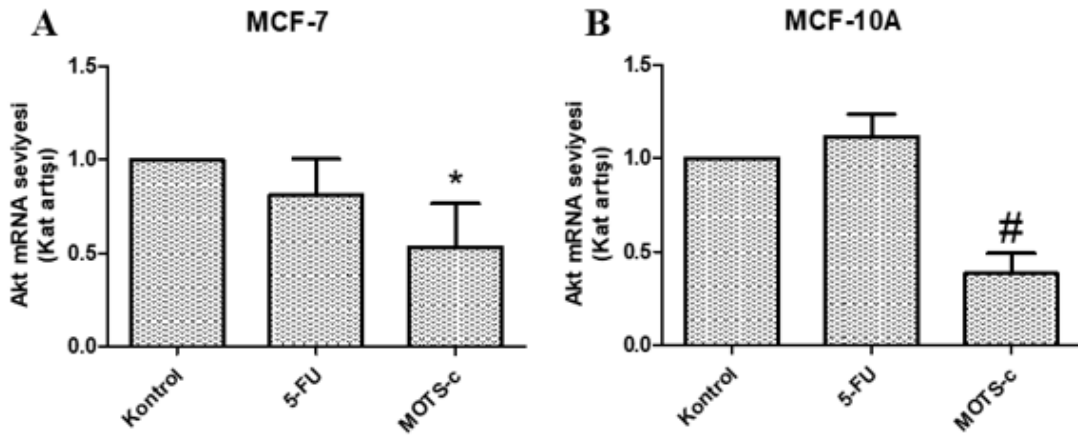


**Şekil 4.12.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. A) Uygulama sonrası grupların floresans mikroskop görüntüleri, 100X. B) Uygulama sonrasında belirlenen grupların Tunel pozitif hücre sayıları (%). Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. PI: propidyum iyodür.

#### 4.4. Real Time PCR Analiz Sonuçları

##### 4.4.1. Akt mRNA İfadesindeki Değişimler

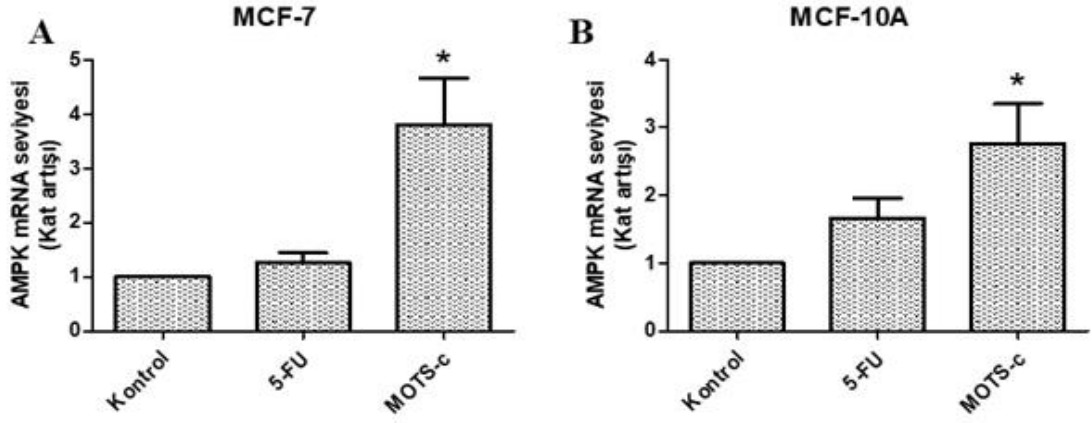
MOTS-c ve 5-FU uygulaması sonrasında hücre serilerindeki Akt mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.13'te gösterildi. Buna göre her iki hücre serisinde de MOTS-c uygulaması Akt mRNA ifadesinde azalmaya neden oldu. MCF-7 hücrelerinde görülen bu azalma kontrol grubuna kıyasla anlamlıydı ( $p<0.05$ ). Buna karşın 5-FU uygulaması hücre serilerinde Akt mRNA ifadesi üzerine anlamlı bir değişiklik oluşturmadı.



**Şekil 4.13.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Akt mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla, # $p<0.05$  5-FU grubuna kıyasla.

##### 4.4.2. AMPK mRNA İfadesindeki Değişimler

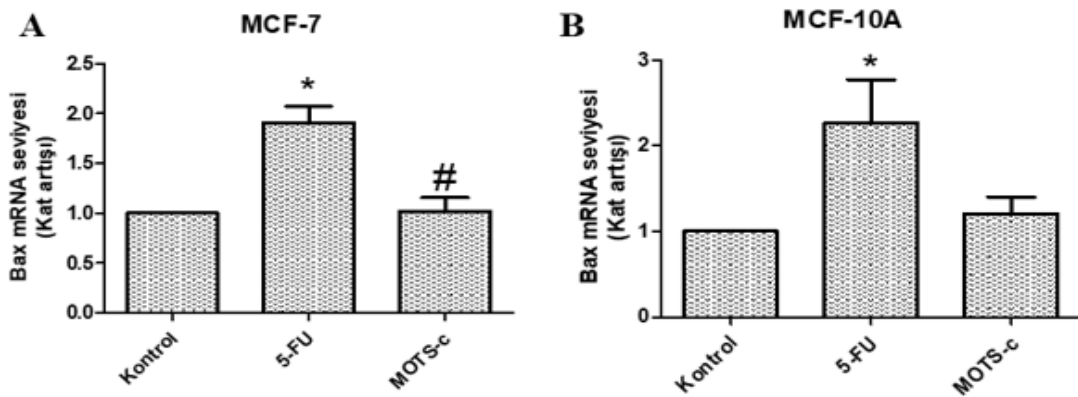
MOTS-c uygulaması sonrasında hücre serilerindeki AMPK mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.14'te gösterildi. MOTS-c MCF-7 ve MCF-10A hücre serilerinde kontrol grubuna kıyasla AMPK mRNA ifadesinde artışa neden oldu. Meydana gelen bu artış kontrole kıyasla yaklaşık olarak 3-4 kat düzeyindeydi ve bu durum istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0.05$ ). 5-FU uygulaması sonrasında MCF-7 ve MCF10A hücre serilerinde AMPK mRNA düzeyi kontrol ile benzer seviyeydi.



**Şekil 4.14.** MOT5-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde AMPK mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

#### 4.4.3. Bax mRNA İfadesindeki Değişimler

MOT5-c uygulaması sonrasında hücre serilerinde Bax mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.15'te gösterildi. MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine uygulanan 5-FU, Bax mRNA ifadesinde önemli düzeyde artışa neden oldu ve bu artış kontrole kıyasla yaklaşık 2 kat düzeyinde gerçekleşti ( $p<0.05$ ). MOT5-c uygulaması iki hücre serisinde de Bax mRNA ifadesini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde değiştirmede.

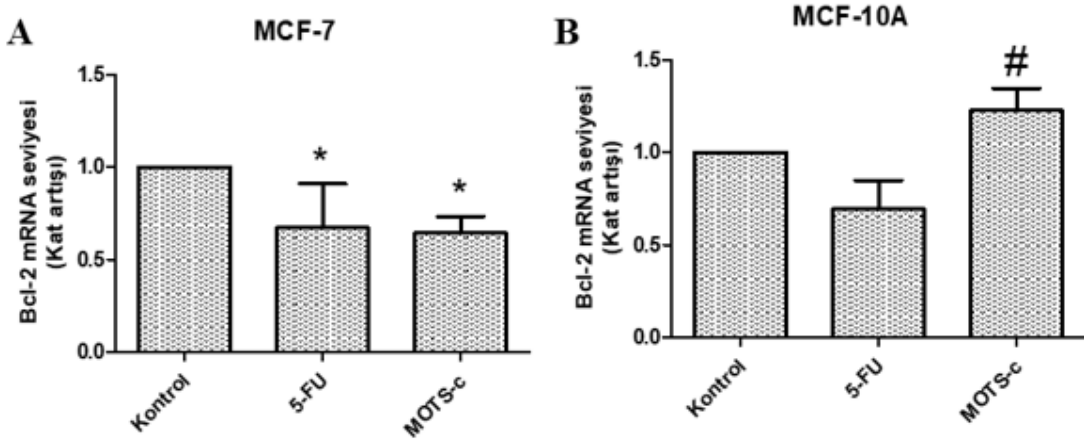


**Şekil 4.15.** MOT5-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Bax mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla, # $p<0.05$  5-FU grubuna kıyasla.



#### 4.4.4. Bcl-2 mRNA İfadesindeki Değişimler

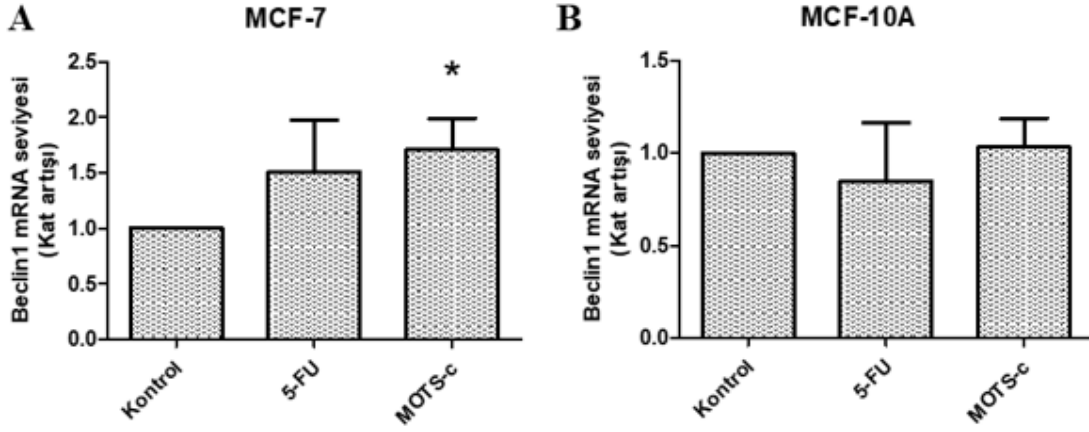
MOTS-c ve 5-FU uygulaması MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 mRNA ifadesini anlamlı düzeyde azalttı (Şekil 4.16A;  $p<0.05$ ). MCF-10A hücrelerinde ise 5-FU ve MOTS-c uygulaması Bcl-2 mRNA ifadesinde kontrole kıyasla anlamlı bir değişime neden olmadı. Bu hücre serisinde Bcl-2 mRNA seviyesi MOTS-c uygulanan grupta 5-FU uygulanan gruba kıyasla daha yüksekti (Şekil 4.16B;  $p<0.05$ ).



Şekil 4.16. MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Bcl-2 mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla, # $p<0.05$  5-FU grubuna kıyasla.

#### 4.4.5. Beclin1 mRNA İfadesindeki Değişimler

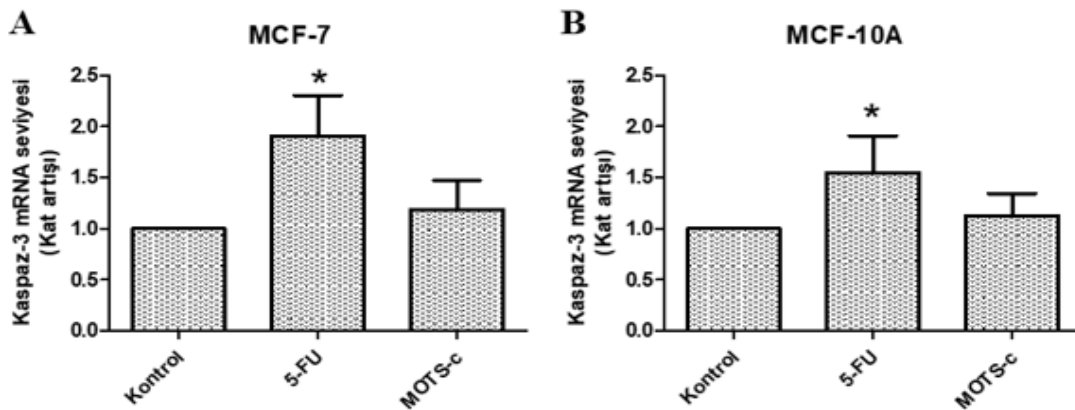
5-FU ve MOTS-c uygulaması sonrasında hücre serilerinde Beclin1 mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.17’de gösterildi. MOTS-c uygulaması MCF-7 hücre serisinde Beclin1 mRNA ifadesini kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 1.5 kat arttırdı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.17A;  $p<0.05$ ). MCF-10A hücre serisinde ise MOTS-c uygulaması Beclin1 mRNA ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. 5-FU uygulaması her iki hücre serisinde Beclin1 mRNA ifadesi üzerine anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (Şekil 4.17B).



**Şekil 4.17.** MOT5-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde Beclin1 mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

#### 4.4.6. Kaspaz-3 mRNA İfadesindeki Değişimler

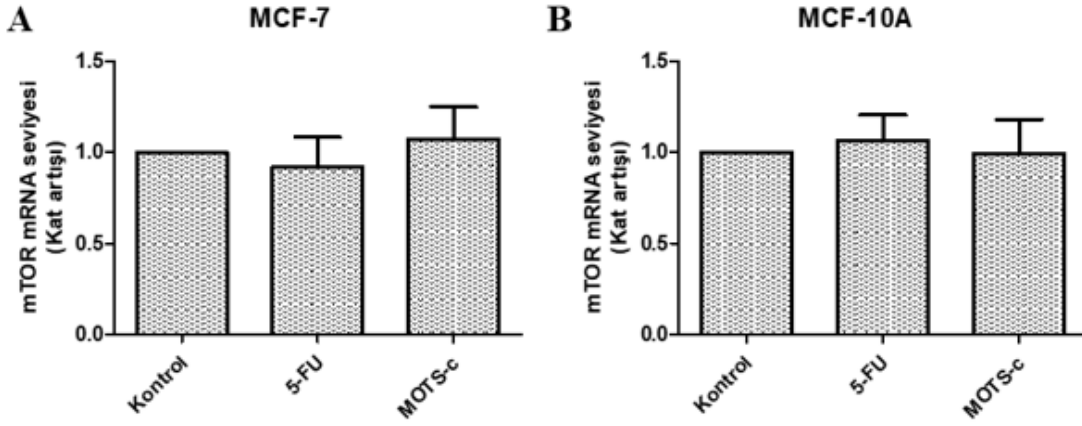
Uygulamalardan sonra hücre hatlarındaki kaspaz-3 mRNA ifadelerinde gözlenen değişimler Şekil 4.18’de özetlendi. 5-FU uygulaması hem sağlıklı hem de kanserli meme epitel hücre serilerinde kaspaz-3 mRNA ifadesini arttırdı ( $p < 0.05$ ). Buna karşın MOT5-c uygulaması sonrasında kaspaz-3 mRNA ifadesi her iki hücre serisinde de kontrole kıyasla anlamlı düzeyde değişim sergilemedi.



**Şekil 4.18.** MOT5-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde kaspaz-3 mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

#### 4.4.7. mTOR mRNA İfadesindeki Değişimler

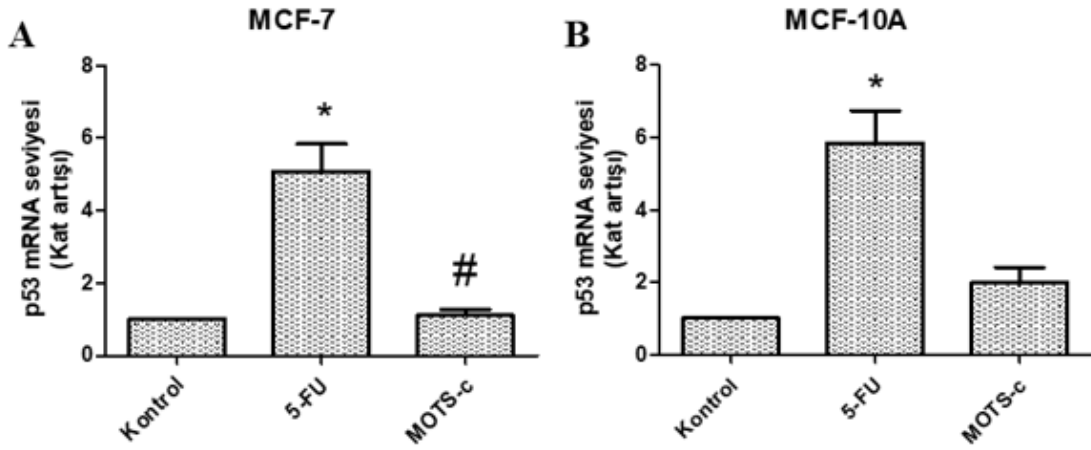
Uygulamalardan sonra hücre serilerinde mTOR mRNA ifadelerinde gözlenen değişimler Şekil 4.19’da özetlendi. 5-FU ve MOTS-c uygulaması sonrasında MCF-7 ve MCF10A hücre serilerinde gözlenen mTOR mRNA düzeyi kontrol grubuna kıyasla benzer düzeydeydi.



**Şekil 4.19.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde mTOR mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi.

#### 4.4.8. p53 mRNA İfadesindeki Değişimler

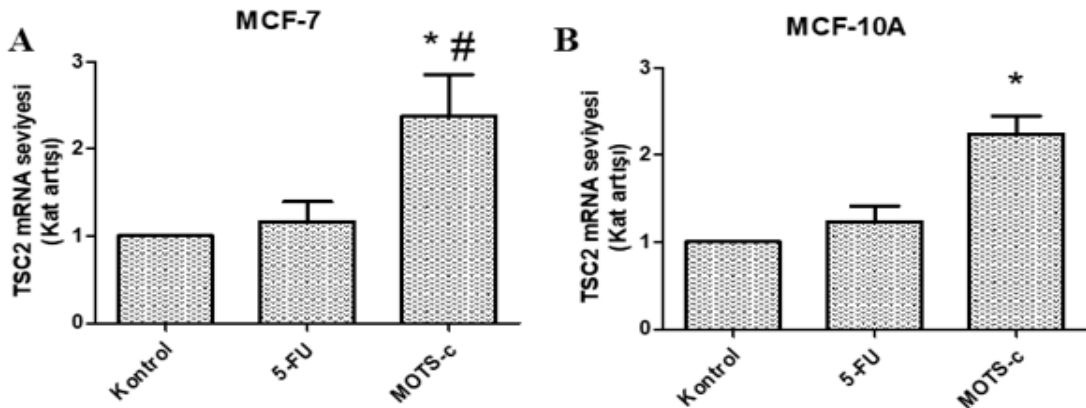
5-FU uygulamasından sonra p53 mRNA düzeyi hem sağlıklı hem de kanserli meme hücre serilerinde kontrole kıyasla önemli düzeyde artış sergiledi (Şekil 4.20;  $p < 0.05$ ). 5-FU uygulamasından sonra gözlemlenen bu artış kontrol grubuna kıyasla MCF-7 hücrelerinde yaklaşık 5 kat, MCF-10A hücrelerinde ise yaklaşık 6 kat fazlaydı. Hücre hatlarına uygulanan MOTS-c sonrasında ise kontrole kıyasla p53 ifadelerinde kısmen bir artma eğilimi gözlemlense de bu artış anlamlı düzeyde gerçekleşmedi.



**Şekil 4.20.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde p53 mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla, # $p<0.05$  5-FU grubuna kıyasla.

#### 4.4.9. TSC2 mRNA İfadesindeki Değişimler

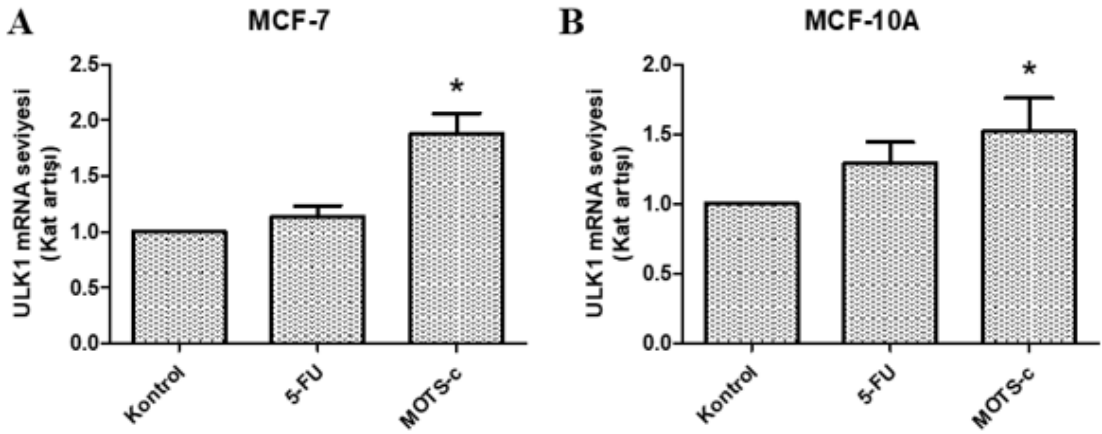
MOTS-c uygulamasından sonra MCF-7 hücre serisinde TSC2 mRNA düzeyi kontrol ve 5-FU gruplarına kıyasla önemli düzeyde artış sergiledi (Şekil 4.21;  $p<0.05$ ). MOTS-c, MCF-10A hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla TSC-2 ifadesini yaklaşık 2 kat arttırdı ( $p<0.05$ ). 5-FU uygulamasından sonra belirlenen TSC2 mRNA ifadeleri bütün hücre serilerinde kontrole benzer düzeydeydi (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde TSC2 mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla, # $p<0.05$  5-FU grubuna kıyasla.

#### 4.4.10. ULK1 mRNA İfadesindeki Değişimler

MOTS-c ve 5-FU uygulaması sonrasında hücre serilerinde ULK1 mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.22’te gösterildi. MOTS-c uygulamasından sonra ULK1 mRNA düzeyi her iki hücre serisinde kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artış sergiledi ( $p<0.05$ ). MOTS-c uygulamasından gözlenen bu artışa karşın, 5-FU uygulaması sonrasında MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde ULK1 mRNA seviyesinde belirlenen değişim miktarı kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde gerçekleşmedi.



**Şekil 4.22.** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 (A) ve MCF-10A (B) hücre serilerinde ULK1 mRNA seviyeleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

#### 4.5. Western Blot Analiz Sonuçları

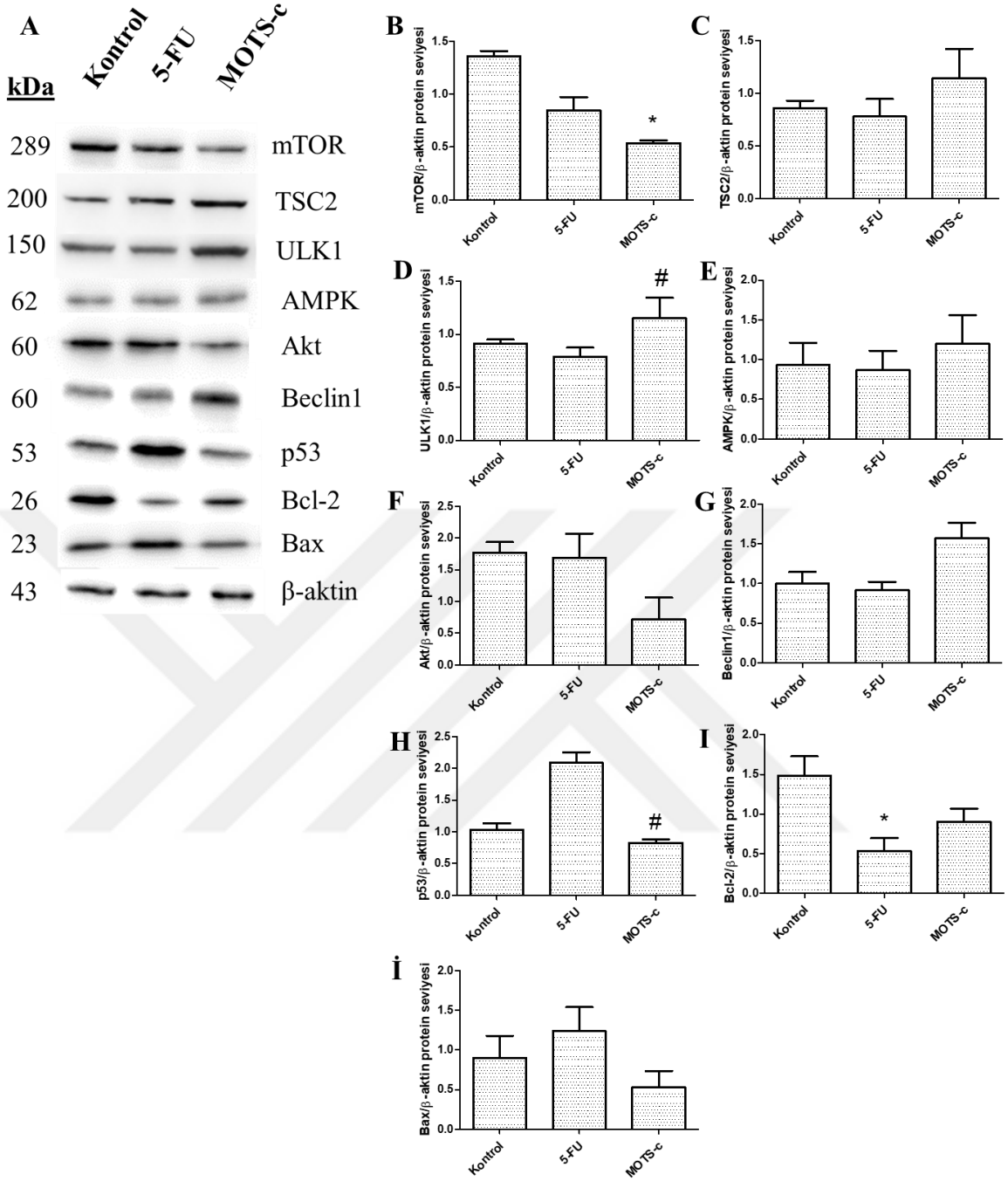
##### 4.5.1. MCF-7 Hücrelerinde Uygulamalar Sonrası Protein İfade Seviyeleri

MOTS-c ve 5-FU uygulamasından 72 saat sonra MCF-7 hücrelerindeki apoptoz ve otofajide rol alan protein ifadelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.23’te sunuldu. MCF-7 hücrelerine uygulanan 5-FU, anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2 ifadesini kontrole kıyasla önemli düzeyde azalttı (Şekil 4.23I;  $p<0.05$ ). Buna ek olarak pro-apoptotik Bax seviyesi kısmen artış sergiledi ancak bu değişim anlamlı düzeyde değildi.

(Şekil 4.23İ). 5-FU uygulanan grupta p53 ifadesini kontrole ve MOTS-c uygulanan gruba kıyasla yaklaşık 2 kat fazlaydı (Şekil 4.23H). Diğer protein ifadeleri 5-FU uygulaması sonrası kontrol ile benzer seviyedeydi (Şekil 4.23).

MOTS-c uygulaması sonrasında MCF-7 hücrelerinde yapılan analizlerde pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzeyleri (sırasıyla Bax ve Bcl-2) ve p53 seviyesi kontrol grubuna kıyasla kısmen azalma sergiledi ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.23H-İ). MOTS-c uygulaması mTOR ve Akt protein ifadelerini kontrol grubuna kıyasla yaklaşık ½ oranında azalttı ve mTOR'da belirlenen bu azalma anlamlı seviyedeydi (Şekil 4.23B ve F;  $p < 0.05$ ). AMPK seviyesi uygulamadan 72 saat sonra kısmen artmış olsa da bu değişim anlamlı değildi. Buna karşın Beclin1, ULK1 ve TSC2 protein ifadeleri MOTS-c uygulanan grupta belirgin şekilde yükseldi ve ULK1 seviyesindeki bu değişim istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.35C, D ve G;  $p < 0.05$ ).

Kaspaz-3 protein düzeyi hariç, proje başlangıcında hedeflenen gen ifadeleri MCF-7 için tamamlandı ve sonuçlar sunuldu. MCF-7 hücrelerinde (ATCC, ABD) mevcut olan CASP3 gen mutasyonu pre-mRNA'nın daha kısa bir şekilde transkripte olması ile sonuçlanır ve bu durum kaspaz-3 protein ifadesinin gerçekleşmemesine neden olur (95, 96). Bu nedenle MCF-7 hücrelerinde yapmış olduğumuz Western blot analizlerinde görüntü elde edilemedi.



**Şekil 4.23.** MCF-7 hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri. A: Western blot membran görüntüleri, B-İ: Protein miktarlarının grafiksel gösterimi. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, #  $p < 0.05$  5-FU grubuna kıyasla diğer gruplar.

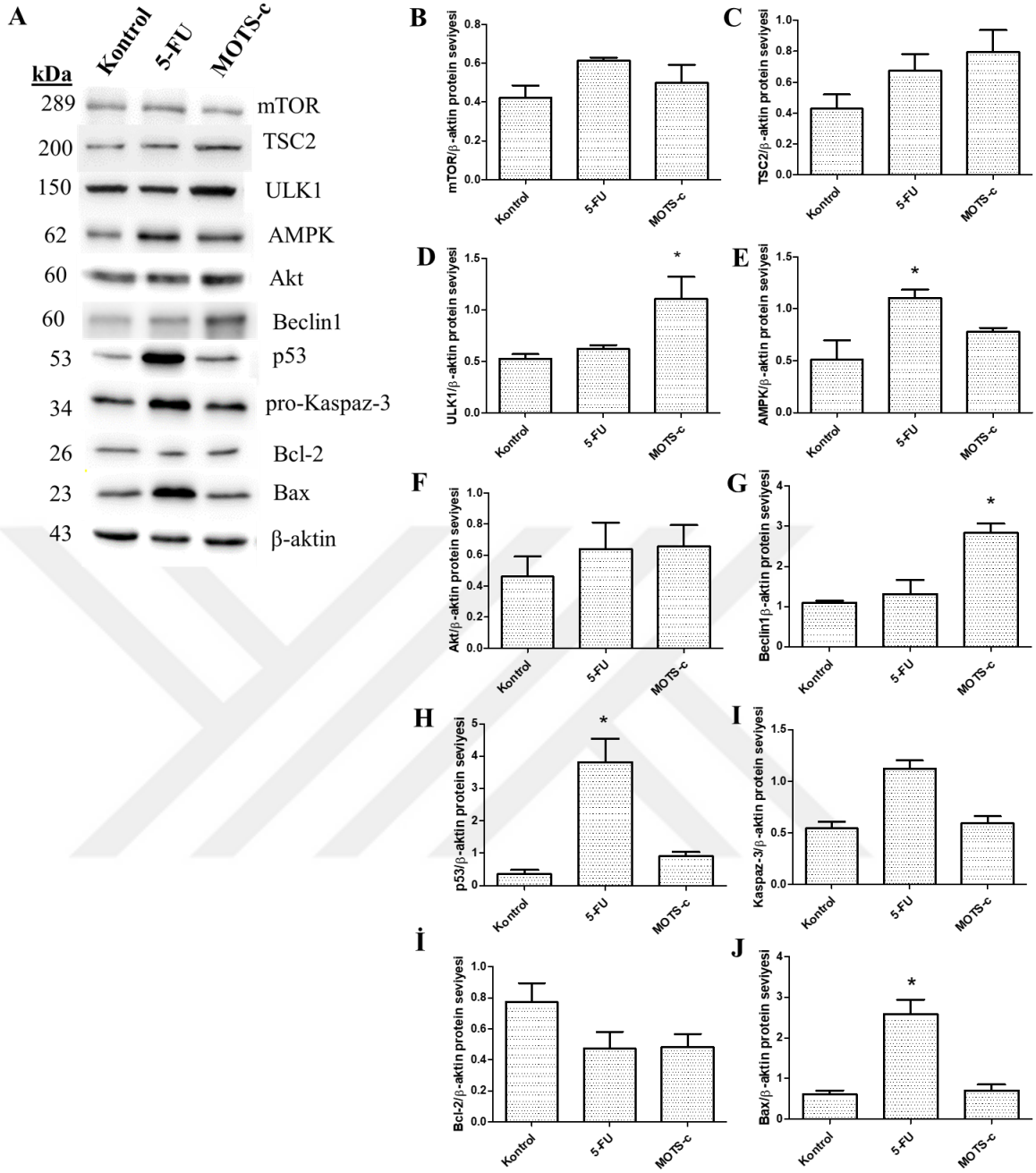
#### 4.5.2. MCF-10A Hücrelerinde Uygulamalar Sonrası Protein İfade Seviyeleri

Uygulamalar sonrasında MCF-10A hücrelerindeki protein değişimleri Şekil 4.24'te gösterildi. 5-FU uygulaması sonrasında kontrole kıyasla AMPK ifadesi yaklaşık 2 kat, p53 ifadesi yaklaşık 6 kat ve Bax ifadesi ise yaklaşık 3 kat artış gösterdi (Şekil 4.24 E, H ve J;  $p < 0.05$ ). Buna ek olarak 5-FU uygulaması kaspaz-3 ifadesini kontrole kıyasla yaklaşık olarak 2 kat arttırdı ve Bcl-2 ifadesini ise azalttı. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.24I ve İ). 5-FU uygulaması sonrasında mTOR, TSC2, Akt, Beclin1 protein ifadeleri kontrole benzer düzeyde belirlendi (Şekil 4.24).

MOTS-c uygulamasından sonra MCF-10A hücrelerinde ULK 1 ve Beclin1 protein ifadeleri kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazlaydı (Şekil 4.24D ve G;  $p < 0.05$ ). TSC2, AMPK ve Akt protein ifadeleri MOTS-c uygulamasından sonra kısmen bir artış sergilediyse de bu değişim kontrole kıyasla anlamlı bulunmadı (Şekil 4.24C). MOTS-c uygulaması sonrasında mTOR, p53, pro-apoptotik proteinler Bax ile kaspaz-3 ve anti-apoptotik protein Bcl-2 düzeyleri kontrol grubuyla kıyaslandığında benzer seviyedeydi (Şekil 4.24).

MCF-10A hücrelerinden elde edilen bu sonuçlar uygulanan 5-FU'nun p53 ve Bax ifadesini artırarak apoptoz aracılı hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. MOTS-c uygulamasının ise ULK1 aracılı otofaji yolağını aktive ederek hücre ölümüne yol açtığını işaret etmektedir.





**Şekil 4.23.** MCF-10A hücrelerine uygulanan MOTs-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri. A: Western blot membran görüntüleri, B-İ: Protein miktarlarının grafiksel gösterimi. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, #  $p < 0.05$  5-FU grubuna kıyasla diğer gruplar.

## 5. TARTIŞMA

Mitokondriyal türevli peptitler (MDP), hücre metabolizmasını değiştiren yeni bir biyoaktif mikroprotein sınıfıdır. Tanımlanan sekiz MDP (humanin, MOTS-c, SHLPs1-6) Alzheimer hastalığı (97), prostat kanseri (98), maküler dejenerasyon (99), kardiyovasküler hastalık (100) ve diyabet (20, 21) dahil olmak üzere hastalık patolojisini hafifletir. MDP'lerde hastalık ve insan genetik varyasyonu arasındaki ilişki yeterince araştırılmamıştır, ancak humanin ve MOTS-c'deki iki polimorfizm, sırasıyla bilişsel gerileme ve diyabet ile ilişkilendirilerek MDP'lerin hastalık modifikasyonunda kesin bir rolü olduğunu düşündürmektedir (101). MOTS-c üzerine bugüne kadar yapılan çalışmalar genel olarak obezite ve T2D üzerine yoğunlaşmış olsa da (15, 20, 21), bu molekülün hücre metabolizma ve gen regülasyonu süreçlerinde önemli bir kavşak olarak ifade edilen AMPK üzerinden farklı hücre metabolizma süreçlerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. AMPK'nın enerji homeostazını kontrol etmedeki kilit rolü göz önüne alındığında, T2D, obezite ve kanser dahil olmak üzere metabolik hastalıklar için potansiyel bir terapötik hedef olarak yaygın ilgi gördüğü söylenebilir (102, 103). Ayrıca MOTS-c, folat/metionin döngüsünü kısıtlayarak metiyonin metabolizmasında bir azalmaya neden olur. Kemirgenlerde, metiyonin kısıtlaması ömrü yaklaşık %45 artırabilir, kanser gibi yaşa bağlı hastalıkların görülme sıklığını azaltabilir, lens bozulmasını geciktirebilir, visceral yağ azaltabilir ve glutatyon gibi ana antioksidan moleküllerin seviyesini artırabilir (104-107). MOTS-c'nin AMPK ifadesini stimüle etmesi ve folat/metionin döngüsünü inhibe etmesi, bu peptidin kanser terapisinde roller üstlenebileceğini akıllara getirmektedir. Mevcut literatürde MOTS-c ve kanser arasındaki ilişkiyi irdeleyen bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada MOTS-c'nin kanser hücreleri üzerine etkilerini gösteren ilk bulguları içermektedir.

Çalışmada MOTS-c uygulamasının MCF-7, MCF-10A, Caco-2 ve FHC hücrelerinde hücre canlılık düzeyi üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık. Bu amaç için MOTS-c uygulaması sonrasında MTT analizleri yapıldı ve peptidin kanserli ve sağlıklı hücrelerdeki canlılık düzeyine etkileri ortaya konuldu. Sonrasında muhtemel hücre ölüm mekanizmasının nasıl ve hangi yollar üzerine gerçekleştiğini açıklama için genotoksikite analizleri yapıldı ve hücre ölüm yollarındaki genlerin ifade seviyeleri belirlendi.

Sonuçlarımız MOTS-c'nin MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisini 72. Saatte gerçekleştiğini gösterdi. Sitotoksikite çalışmalarında, MOTS-c'nin ve referans ilaç 5-

FU'nun genel olarak yüksek dozları hücre canlılığında anlamlı değişime neden oldu. Çalışmamızda MOTS-c uygulamasının genotoksisite üzerine ne gibi bir etkisinin olduğunu Comet ve TUNEL analizleri ile belirledik. Comet analizi, ökaryotik hücrelerde test edilen bileşiğin DNA hasarına neden olup-olmadığını ve muhtemel hasarın düzeyini açıklamak için kullanışlı bir yöntemdir (87). TUNEL analizi ise apoptozun geç aşamalarında kapsamlı DNA bozulmasına uğrayan apoptotik hücreleri saptamak için tasarlanmıştır. Yöntem, TdT'nin bir şablondan bağımsız olarak çift sarmallı DNA kırılmalarının kör uçlarını etiketleme yeteneğine dayanmaktadır (92).

MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar dikkate alınarak hücre canlılığını %70 civarında (sağ kalım düzeyi) etkileyen MOTS-c ve 5-FU dozları Comet analizlerinde kullanıldı. Comet sonuçları MCF-7 hücrelerinde 5-FU ve MOTS-c'nin benzer düzeyde DNA hasarına neden olduğunu gösterdi. Ayrıca bu bileşiklerin belirlenen IC<sub>50</sub> dozları TUNEL analizlerinde kullanıldı ve böylelikle MOTS-c ve 5-FU'nun apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri belirlendi. MOTS-c uygulaması sonrasında yapılan TUNEL analizleri, MOTS-c'nin TUNEL pozitif hücre sayısını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde değiştirmedini gösterdi. Buna karşın 5-FU'nun TUNEL pozitif hücre sayısını kontrol ve MOTS-c grubuna kıyasla arttırdığı görülsede, bu artış anlamlı düzeyde değildi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar MOTS-c'nin sitotoksik etkisinin apoptotik süreçlerden başka ölüm mekanizmaları ile gerçekleşebileceğini, 5-FU'nun ise apoptoz aracılı hücre ölümüne neden olabileceğini işaret etmektedir.

5-FU kolorektal, meme ve solunum-sindirim sistemi kanserleri dahil olmak üzere bir dizi kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre proliferasyonunu önlemek için bir antimetabolit olarak çalışarak, öncelikle DNA sentezi için gerekli olan timidin oluşumunu bloke eden timidilat sentaz enzimini inhibe eder (108). 5-FU farklı kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olur. He vd. HCT-8 hücrelerine uygulanan 10 µg/ml 5-FU sonrası apoptozun arttığını yaptıkları TUNEL analizleri ile ortaya koymuştur (109). Diğer bir çalışmada ise 5-FU uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde canlılığın azaldığı ve apoptotik hücre ölümünün arttığı bildirilmektedir (110). 5-FU'nun kanser hücreleri üzerine gösterdiği bu apoptotik etkinin Bcl-2 protein ailesi aracılığıyla ortaya çıktığını bildiren çalışmalar rapor edilmiştir (111, 112).

Çalışmamızda MOTS-c'nin ve 5-FU'nun neden oldukları hücre ölüm apoptoz aracılı gerçekleşip-gerçekleşmediğini ortaya koymak için p53, Bcl-2, Bax, kaspaz-3 gen ifadelerindeki değişimleri belirlemeyi amaçladık. Yaptığımız çalışmalar sonucu MOTS-

c ve referans ilaç 5-FU uygulamalarından sonra gen ifadelerinin değişimleri mRNA ve protein düzeylerinin belirlenmesiyle ortaya konuldu. Elde edilen sonuçlar MOTS-c uygulamasının apoptotik süreçte görev alan p53, kaspaz-3, Bax, ve Bcl-2 genlerine ait mRNA ve protein ifadelerini kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde değiştirmediğini (sadece MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 mRNA düzeyi kontrole kıyasla anlamlı düzeyde azalma sergiledi) gösterdi. 5-FU uygulaması sonrasında ise p53, Bax ve kaspaz-3 gen ifadelerinde önemli artışların olduğu, anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesinin ise azaldığı belirlendi.

Tümör baskılayıcı p53, hücrel genomik bütünlüğün ve kontrollü hücre büyümesinin korunmasında hayati öneme sahiptir. p53 ifadesi hücrel strese, DNA'ya zarar veren maddelere ve kronik mitojenik uyarıya yanıt olarak artar. Hücre tipi, hücre ortamı ve onkojenik değişikliklere bağlı olarak gerçekteşen p53 aktivasyonu, hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonuna, yaşlanmanın indüksiyonuna, farklılaşmaya veya apoptozise yol açar (113, 114). Çalışmalar, p53'ün Bcl-2 aile üyelerinin aktivitesini düzenleyerek mitokondride transkripsiyondan bağımsız apoptozu düzenlediğini göstermektedir (115). Bcl-2 ailesinin üyeleri, apoptozun içsel yolağının (mitokondriyal apoptotik süreç) anahtar düzenleyicileridir. Bcl-2 protein ailesinin apoptozu başlattığı veya önlediği ana kontrol mekanizmasının altında sitokrom C'nin ve diğer pro-apoptotik faktörlerin mitokondride sitoplazmaya geçişini kontrol etmesi yatar. Sitokrom-c sitoplazmada Apaf-1 ve kaspaz-9 proenzimi ile birleşerek "apoptozom" adı verilen kompleksi oluşturur (116). Bu kompleks efektör kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün önemli araçlarıdır ve apoptozun tipik morfolojik özelliklerinin görölmesinden sorumlu proteazlardır (117). Mevcut bilgiler kaspaz-3'ün hücrelerde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanmasında rol aldığını göstermektedir (118). Xavier vd. HCT-15 ve Co115 hücre serilerine uyguladıkları 5-FU sonrası hücre canlılığının azaldığını bildirmiştir. Yaptıkları moleküler analizler sonucu 5-FU'nun p53 ve Bax gen ifadelerinde artışa neden olduğunu, Bcl-2 ifadesinde ise azalmanın meydana geldiğini rapor etmektedirler (119). 5-FU'nun meme kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, bu bileşiğin apoptotik hücre ölümünü indüklediğini bildirmektedir. Mawalizadeh vd. 5-FU ile tedavi ettikleri MCF-7 hücrelerinde özellikle 100 µM'dan sonra canlılığın önemli düzeyde azaldığını ve 5-FU kaynaklı sitotoksitenin doz bağımlı gerçekteştiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar 5-FU uygulaması sonrasında Bax ve p53 gen ifadelerinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 ve 4 kat (sırasıyla) arttırdığını, buna karşın anti-apoptotik Bcl-2

ifadesini ise azalttığını rapor etmişlerdir. Dahası 5-FU uygulaması MCF-7 hücrelerinde kaspaz-9 aktivasyonunu ve apoptotik hücre sayını önemli düzeyde arttırmıştır (120). Chumakova vd. MCF-7 hücrelerine uyguladıkları 5-FU'nun, pro-apoptotik Bax ve hücre proliferasyonunda görevli p27<sup>kip1</sup> ifadesinin arttırarak hücre canlılığının azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (121). Bu sonuçlar 5-FU uygulamasının apoptozu indükleyerek kanser hücre serilerinde sitotoksositeye neden olduğunu göstermektedir. Bizim sonuçlarımızda mevcut literatüre benzer şekilde 5-FU'nun pro-apoptotik gen ifadelerinde artışa neden olarak apoptozu indüklediğini ortaya koydu. Bunun aksine MOTS-c uygulamasının p53, Bax ve kaspaz-3 gen ifadelerinde bir değişime neden olmadığı göz önüne alındığında, hücre ölümünü apoptozdan farklı bir yol kullanarak gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.

Çalışmada MOTS-c'nin muhtemel sitotoksik etkisini daha iyi anlayabilmek için hücrel otofaji süreçlerinde rol alan genlerin ifade düzeylerini de araştırdık. Lee vd. MOTS-c'nin hücrede folat siklusunu ve *de novo* purin biyosentezini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar MOTS-c'ye yanıt olarak hücrede AICAR seviyesinin arttığını ve bunun da AMPK ifadesinde artış ve aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir (7). AMPK, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde mevcut olan bir hücrel enerji sensörüdür ve artan AMP/ATP oranı AMPK'yı harekete geçirir. Bu durum enerji tüketimini engeller ve hücrenin içindeki enerji homeostazını geri kazanmak için ATP üreten katabolik olayları tetikler (8, 9). Ancak AMPK'nın hücrel etkileri bu kadarla sınırlı değildir. Bazı araştırmalar, AMPK'nin çeşitli metabolik yolları düzenlediğini ve kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini belirtmiştir (10, 11). AMPK'nin en iyi bilinen yollarından biri, TSC1/TSC2 kompleksi aracılığıyla ile gerçekleşir (12). AMPK'nin stimülasyonu sonrası aktive olan bu süreç PI3K-Akt ve Ras-Raf-MEK-ERK sinyalizasyon yollarının akış yönünde aktive edilebilen mTOR'un aşağı-regülasyonu ile sonuçlanır (9, 11). mTOR yolu, p53 ve p27 tümör baskılayıcıları üzerindeki etkisiyle apoptozu bastırır ve ULK1 ve ULK2'yi (ULK1/2; otofagozom formasyonu için gerekli bir anahtar sinyalleme kompleksidir) baskılayarak otofajiyi inhibe eder (9, 13, 14). AMPK, mTOR'un bu etkilerini azaltarak apoptoz ve otofaji aracılı hücre ölümlerinin artmasına neden olur. Mevcut çalışmalar farklı bileşiklerin AMPK aktivasyonunun mTOR ifadesini baskılayarak farklı kanser hücrelerinde antitümör etki ortaya koyduğunu rapor etmektedir (70, 122, 123). Ayrıca AMPK, mTOR'dan bağımsız olarak da ULK1'i fosforile edebilir ve aktive olan bu protein otofajiyi tetikler (124, 125).

Çalışmamız kapsamında MOTS-c ve 5-FU'nun hücre serilerinde sergilediği sitotoksik etkinin AMPK aracılı otofaji süreciyle ilişkili olup-olmadığını belirlemeyi hedefledik. Bu kapsamda bileşiklerin uygulamaları sonrasında AMPK/otofaji ilişkisini açıklamak için mTOR, TSC2, ULK1 ve Beclin1 gen ifadelerindeki değişimleri moleküler analizler ile ortaya koyduk. Yaptığımız analizler MOTS-c'nin hücrelerde AMPK mRNA seviyesini yukarı doğru düzenlediğini gösterdi. AMPK'da görülen bu artışa yanıt olarak MOTS-c uygulamasından sonra Beclin1, TSC2 ve ULK1 mRNA ifadelerinin de arttığını tespit ettik. Buna karşın Akt mRNA düzeyi ise bütün hücrelerde kontrol grubuna kıyasla daha düşük düzeyde belirlendi. Ayrıca Western blot analizleri MOTS-c uygulaması sonrası hücre hatlarında TSC2 ve ULK1 protein ifadelerinin kontrol grubuna kıyasla artmış olduğunu gösterdi. Uygulamalar sonrası mTOR protein ifadesindeki değişim sadece MCF-7 hücresinde, Beclin1 protein ifadesindeki değişim ise sadece MCF-10A hücresinde anlamlı düzeyde gerçekleşti. Buna karşın 5-FU uygulaması mTOR, TSC2, ULK1 ve Beclin1 mRNA ve protein ifadelerinde bir değişime neden olmadı. 5-FU uygulaması p53 ve proapoptotik Bax ve kaspaz-3 ifadelerini arttırdı, anti-apoptotik Bcl-2 ifadesini ise baskıladı. Bu sonuçlar MOTS-c'nin apoptotik hücre ölümünden ziyade otofaji aracılığıyla sitotoksositeye neden olduğunu göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

2015 yılında tanımlanan MOTS-c'nin literatürde yer alan fizyolojik etkileri genel olarak enerji metabolizması, T2D, obezite, kardiyovasküler sistem ve kas-iskelet sistemi üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Bu peptidin söz konusu sistemler üzerine etkilerinin birçoğuna AMPK aracılık etmektedir ve bu molekülün hücrel etkileri bunlarla sınırlı değildir. AMPK'nın iltihaplanma, diyabet, yaşlanma ve kanser gibi birçok patolojik durumda inhibe edildiğini ve AMPK'nın aktivasyonunun bu tür hastalıkları tedavi etmek için faydalı olabileceği bildirilmektedir (126). MOTS-c'nin AMPK ifadesi üzerine pozitif etkisi kanser tedavisinde bu peptidin potansiyel rolünü akıllara getirmiştir. Bu çalışmamızda MOTS-c'nin kanser hücre serileri üzerine potansiyel sitotoksik etkisini ortaya koymayı amaçladık. Elde ettiğimiz mevcut sonuçlar dikkate alındığında MOTS-c'nin meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığını ortaya koydu. MOTS-c'nin sergilediği bu sitotoksik etkinin AMPK aktivasyonuna yanıt olarak artan TSC2/ULK1 aracılı otofaji yolağının aktivasyonu ile gerçekleştiğini gösterdik. Yapılacak çalışmalarla MOTS-c'nin *in vivo* kanser modelleri üzerine nasıl bir etki sergileyeceğinin belirlenmesi, bu peptidin kanser tedavisindeki potansiyelini güçlendirecektir. Yapılacak çalışmalar sonrası klinik uygulamalarda MOTS-c'nin meme kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik aday olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018, 68(6): 394-424.
2. Harris F, Dennison SR, Singh J, Phoenix DA. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Med Res Rev* 2013, 33(1): 190-234.
3. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002, 234(1): 119-24.
4. Al-Benna S, Shai Y, Jacobsen F, Steinstraesser L. Oncolytic activities of host defense peptides. *Int J Mol Sci* 2011, 12(11): 8027-51.
5. Riedl S, Zweytick D, Lohner K. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem Phys Lipids* 2011, 164(8): 766-81.
6. Ricardo P-T. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. *Curr Med Chem* 2006, 13(16): 1859-76.
7. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim SJ, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R, Cohen P. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 2015, 21(3): 443-54.
8. Adachi Y, De Sousa-Coelho AL, Harata I, Aoun C, Weimer S, Shi X, Gonzalez Herrera KN, Takahashi H, Doherty C, Noguchi Y, Goodyear LJ, Haigis MC, Gerszten RE, Patti M-E. l-Alanine activates hepatic AMP-activated protein kinase and modulates systemic glucose metabolism. *Mol Metab* 2018, 17: 61-70.
9. Kim I, He YY. Targeting the AMP-Activated Protein Kinase for Cancer Prevention and Therapy. *Front Oncol* 2013, 3: 175.
10. Sager RA, Woodford MR, Mollapour M. The mTOR Independent Function of Tsc1 and FNIPs. *Trends Biochem Sci* 2018, 43(12): 935-937.
11. Han F, Li CF, Cai Z, Zhang X, Jin G, Zhang WN, Xu C, Wang CY, Morrow J, Zhang S, Xu D, Wang G, Lin HK. The critical role of AMPK in driving Akt activation under stress, tumorigenesis and drug resistance. *Nat Commun* 2018, 9(1): 4728.



12. Howell JJ, Hellberg K, Turner M, Talbott G, Kolar MJ, Ross DS, Hoxhaj G, Saghatelian A, Shaw RJ, Manning BD. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab* 2017, 25(2): 463-71.
13. Kochetkova EY, Blinova GI, Bystrova OA, Martynova MG, Pospelov VA, Pospelova TV. Targeted elimination of senescent Ras-transformed cells by suppression of MEK/ERK pathway. *Aging (Albany NY)* 2017, 9(11): 2352-75.
14. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Butein Activates Autophagy Through AMPK/TSC2/ULK1/mTOR Pathway to Inhibit IL-6 Expression in IL-1beta Stimulated Human Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2018, 49(3): 932-46.
15. Kim SJ, Xiao J, Wan J, Cohen P, Yen K. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *J Physiol* 2017, 595(21): 6613-21.
16. Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA, Filipovska A, Mattick JS. The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 2011, 146(4): 645-58.
17. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim S-J, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 2015, 21(3): 443-54.
18. Embley TM, Martin W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 2006, 440(7084): 623-30.
19. Yang L, Tan Z, Wang D, Xue L, Guan MX, Huang T, Li R. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci Rep* 2014, 4: 4089.
20. Cataldo LR, Fernandez-Verdejo R, Santos JL, Galgani JE. Plasma MOTS-c levels are associated with insulin sensitivity in lean but not in obese individuals. *J Investig Med* 2018, 66(6): 1019-22.
21. Du C, Zhang C, Wu W, Liang Y, Wang A, Wu S, Zhao Y, Hou L, Ning Q, Luo X. Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes* 2018; 19: 1058-1064.
22. Ramanjaneya M, Bettahi I, Jerobin J, Chandra P, Abi Khalil C, Skarulis M, Atkin SL, Abou-Samra AB. Mitochondrial-Derived Peptides Are Down Regulated in Diabetes Subjects. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019, 10: 331.

23. Kim KH, Son JM, Benayoun BA, Lee C. The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress. *Cell Metab* 2018, 28(3): 516-24 e7.
24. Yin X, Jing Y, Chen Q, Abbas AB, Hu J, Xu H. The intraperitoneal administration of MOTS-c produces antinociceptive and anti-inflammatory effects through the activation of AMPK pathway in the mouse formalin test. *Eur J Pharmacol* 2020, 870: 172909.
25. Che N, Qiu W, Wang JK, Sun XX, Xu LX, Liu R, Gu L. MOTS-c improves osteoporosis by promoting the synthesis of type I collagen in osteoblasts via TGF-beta/SMAD signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019, 23(8): 3183-9.
26. Hu BT, Chen WZ. MOTS-c improves osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via TGF-beta/Smad pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018, 22(21): 7156-63.
27. Weng FB, Zhu LF, Zhou JX, Shan Y, Tian ZG, Yang LW. MOTS-c accelerates bone fracture healing by stimulating osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via positively regulating FOXF1 to activate the TGF-beta pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019, 23(24): 10623-30.
28. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008, 26(8): 1275-81.
29. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011, 121(7): 2750-67.
30. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol* 2020, 84: 106535.
31. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. Lyon, France, IARC Press, 2020.
32. Kara F, Keskinliç B. Türkiye kanser istatistikleri 2017. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2017.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf) Son Erişim Tarihi: 17.11.2021.

33. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *The Lancet* 2017, 389(10074): 1134-50.
34. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014, 2014: 149185.
35. Chen X, Xu D, Li X, Zhang J, Xu W, Hou J, Zhang W, Tang J. Latest Overview of the Cyclin-Dependent Kinases 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: The Past, the Present and the Future. *J Cancer* 2019, 10(26): 6608-17.
36. Reinert T, Barrios CH. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Ther Adv Med Oncol* 2015, 7(6): 304-20.
37. Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials* 2017, 12(2): 81-92.
38. Berrada N, Delalogue S, Andre F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Ann Oncol* 2010, 21 Suppl 7: vii30-5.
39. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death & Differentiation* 2019, 26(4): 605-16.
40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26(4): 239-57.
41. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007, 35(4): 495-516.
42. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol* 2021, 81(4): 1133-43.
43. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005, 22(3): 355-70.
44. Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 2014, 14(3): 166-80.
45. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, 30: 87.
46. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009, 21(6): 871-7.
47. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002, 84(2-3): 203-14.

48. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002, 9(2): 423-32.
49. Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 2005, 17(6): 626-30.
50. Kim JH, Lee SY, Oh SY, Han SI, Park HG, Yoo MA, Kang HS. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep* 2004, 12(6): 1233-8.
51. Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer JL, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 2006, 281(20): 13964-71.
52. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019, 43(6): 582-92.
53. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006, 281(40): 29652-9.
54. Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 2009, 459(7245): 428-32.
55. Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A, Kawanishi S. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 265(1): 130-3.
56. Baran Y. *Kanser Moleküler Biyolojisi*. Ankara, Kısayol Yayıncılık, 2018.
57. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010, 40(2): 280-93.
58. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6(6): 439-48.
59. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005, 25(3): 1025-40.
60. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* 2012, 19(1): 87-95.

61. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1993, 333(1-2): 169-74.
62. Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1994, 349(2): 275-80.
63. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011, 147(4): 728-41.
64. Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. *Adv Exp Med Biol* 2019, 1206: 67-83.
65. White E, Mehnert JM, Chan CS. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin Cancer Res* 2015, 21(22): 5037-46.
66. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010, 584(7): 1287-95.
67. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010, 22(2): 132-9.
68. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL, Mizushima N. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008, 181(3): 497-510.
69. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 2013, 9(2): 124-37.
70. Shui L, Wang W, Xie M, Ye B, Li X, Liu Y, Zheng M. Isoquercitrin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Aging (Albany NY)* 2020, 12(23): 24318-32.
71. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011, 13(9): 1016-23.
72. He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* 2010, 22(2): 140-9.
73. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008, 19(12): 5360-72.
74. Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 2012, 338(6109): 956-9.

75. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005, 122(6): 927-39.
76. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(12): 2503-18.
77. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2(3): 211-6.
78. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000, 19(21): 5720-8.
79. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 13): 2805-12.
80. Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J* 2009, 28(9): 1341-50.
81. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* 2018, 14(2): 207-15.
82. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018, 19(9): 579-93.
83. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65(1-2): 55-63.
84. Slater TF, Sawyer B, Sträuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 1963, 77: 383-93.
85. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 1991, 51(10): 2515-20.
86. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993, 303(2): 474-82.

87. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 2004, 26(3): 249.
88. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175(1): 184-91.
89. Sasaki YF, Nakamura T, Kawaguchi S. What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity. *Jap Soc Altern Anim Exp* 2007: 499-504.
90. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 2008, 44(3): 250-4.
91. Cuello-Carrion FD, Ciocca DR. Improved detection of apoptotic cells using a modified in situ TUNEL technique. *J Histochem Cytochem* 1999, 47(6): 837-9.
92. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 2012, 887: 41-7.
93. Bioquest A. "Quest Graph™ IC50 Calculator." AAT Bioquest, Inc. <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> Son Erişim Tarihi: 14.04.2021.
94. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001, 25(4): 402-8.
95. Janicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 117(1): 219-21.
96. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, Sapino A, Zhang F, Sharma D, Yang XH, Tora AD, Mehta K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002, 21(57): 8843-51.
97. Niikura T. Humanin and Alzheimer's disease: The beginning of a new field. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2022, 1866(1): 130024.
98. Xiao J, Howard L, Wan J, Wiggins E, Vidal A, Cohen P, Freedland SJ. Low circulating levels of the mitochondrial-peptide hormone SHLP2: novel biomarker for prostate cancer risk. *Oncotarget* 2017, 8(55): 94900-9.
99. Nashine S, Cohen P, Chwa M, Lu S, Nesburn AB, Kuppermann BD, Kenney MC. Humanin G (HNG) protects age-related macular degeneration (AMD) transmitochondrial ARPE-19 cybrids from mitochondrial and cellular damage. *Cell Death Dis* 2017, 8(7): e2951.

100. Qin Q, Delrio S, Wan J, Jay Widmer R, Cohen P, Lerman LO, Lerman A. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol* 2018, 254: 23-7.
101. Miller B, Kim S-J, Kumagai H, Mehta HH, Xiang W, Liu J, Yen K, Cohen P. Peptides derived from small mitochondrial open reading frames: Genomic, biological, and therapeutic implications. *Exp Cell Res* 2020, 393(2): 112056.
102. Li W, Saud SM, Young MR, Chen G, Hua B. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget* 2015, 6(10): 7365-78.
103. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2017, 45: 31-7.
104. Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 2003, 38(1-2): 47-52.
105. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005, 4(3): 119-25.
106. Richie JP, Jr., Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 1994, 8(15): 1302-7.
107. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 1993, 123(2): 269-74.
108. Wigmore PM, Mustafa S, El-Beltagy M, Lyons L, Umka J, Bennett G. Effects of 5-FU. *Adv Exp Med Biol* 2010, 678: 157-64.
109. He L, Zhu H, Zhou S, Wu T, Wu H, Yang H, Mao H, SekharKathera C, Janardhan A, Edick AM, Zhang A, Hu Z, Pan F, Guo Z. Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Exp Mol Med* 2018, 50(8): 1-12.
110. Li X, Kong X, Kong X, Wang Y, Yan S, Yang Q. 53BP1 sensitizes breast cancer cells to 5-fluorouracil. *PLoS One* 2013, 8(9): e74928.
111. Ponce-Cusi R, Calaf GM. Apoptotic activity of 5-fluorouracil in breast cancer cells transformed by low doses of ionizing alpha-particle radiation. *Int J Oncol* 2016, 48(2): 774-82.
112. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998, 78(8): 986-92.



113. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(8): 594-604.
114. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003, 22(56): 9030-40.
115. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(9): 647-56.
116. Wawryk-Gawda E, Chylinska-Wrzos P, Lis-Sochocka M, Chlapek K, Bulak K, Jedrych M, Jodlowska-Jedrych B. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma* 2014, 251(3): 525-33.
117. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999, 6(2): 99-104.
118. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 1998, 12(6): 806-19.
119. Xavier CP, Lima CF, Rohde M, Pereira-Wilson C. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011, 68(6): 1449-57.
120. Mawalizadeh F, Mohammadzadeh G, Khedri A, Rashidi M. Quercetin potentiates the chemosensitivity of MCF-7 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Mol Biol Rep* 2021, 48(12): 7733-42.
121. Chumakova OV, Liopo AV, Evers BM, Esenaliev RO. Effect of 5-fluorouracil, Optison and ultrasound on MCF-7 cell viability. *Ultrasound Med Biol* 2006, 32(5): 751-8.
122. Castillo-Pichardo L, Dharmawardhane SF. Grape polyphenols inhibit Akt/mammalian target of rapamycin signaling and potentiate the effects of gefitinib in breast cancer. *Nutr Cancer* 2012, 64(7): 1058-69.
123. Yang Y, Wang Q, Song D, Zen R, Zhang L, Wang Y, Yang H, Zhang D, Jia J, Zhang J, Wang J. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2020, 39(1): 197.
124. Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, Fisher CC, Zhang M, Saucerman JJ, Goodyear LJ, Kundu M, Yan Z. Ampk phosphorylation

- of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat Commun* 2017, 8(1): 548.
125. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011, 13(2): 132-41.
  126. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* 2016, 48(7): e245.



## EKLER

### EK-1. Özgeçmiş

Adı Soyadı : Yavuz Erden

#### Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Fırat Üniversitesi	2009
Y. Lisans	Biyoloji	Fırat Üniversitesi	2009-2011
Y. Lisans	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi	2012-2015
Doktora	Biyoloji	Fırat Üniversitesi	2011-2014
Doktora	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi	2015-2022

#### Yönetilen Yüksek Lisans Tezleri

Rabia Top (2018). Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin araştırılması, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

#### Projelerde Yaptığı Görevler

- 1. Yavuz ERDEN (Yürütücü)**, Nida ASLAN, Burak BİRCAN, Zeynep KARABOĞA, “In vitro şartlarda bazı bitkisel yağların varlığında oluşturulan lipid peroksidasyonu üzerine Pistacia terebinthus & Punica granatum ekstraktlarının antioksidan etkisinin araştırılması” (2008-2009, TÜBİTAK 2209-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı)
- 2. Sevda KIRBAĞ, Yavuz ERDEN (Araştırmacı)**, “Bazı Scorzonera türlerinin fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması” (2009-2011, Fırat Üni. BAP - 2061)
- 3. Sevda KIRBAĞ, Yavuz ERDEN (Araştırmacı)**, Ebru ÖNALAN, Suat TEKİN, Süleyman SANDAL, “Sıçanlarda intraserebroventriküler irisin uygulamasının beyindeki eşleşme bozucu (uncoupling) protein ailesi üzerine etkileri” (2013-2014, Fırat Üni. BAP FF.13.26)

4. Süleyman SANDAL, Suat TEKİN, **Yavuz ERDEN (Araştırmacı)**, “Erkek sıçanlarda periferik apelin-13 infüzyonunun hipotalamus-hipofiz-testiküler aks üzerine etkisi” (2013-2015, İnönü Üni. BAP-207)
5. Süleyman SANDAL, **Yavuz ERDEN (Araştırmacı)**, Suat TEKİN, “Sıçanlarda intraserebroventriküler apelin-13 uygulamasının hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerine etkisi” (2013-2015, İnönü Üni. BAP -180)
6. Suat TEKİN, Yılmaz ÇİĞREMİŞ, İbrahim TEKEDERELİ, Cemil ÇOLAK, Fatma ÖZYALIN, **Yavuz ERDEN (Bursiyer)**, “Beslenmenin hipotalamik kontrolünde irisin hormonunun etkilerinin araştırılması” (2014-2015, TÜBİTAK-1002, Proje No:114S138)
7. Süleyman SANDAL, Yılmaz ÇİĞREMİŞ, İbrahim TEKEDERELİ, Cemil ÇOLAK, Fatma ÖZYALIN, **Yavuz ERDEN (Bursiyer)**, “Obezitenin Kontrolünde İrisin Yeni Bir Aktör Olabilir mi?” (2014-2017, TÜBİTAK-1001, Proje No: 214S205)
8. Süleyman SANDAL, Suat TEKİN, **Yavuz ERDEN (Araştırmacı)**, “Sağlık bilimleri immünofloresans araştırma alt yapısının güçlendirilmesi” (2015-2017 İÜBAP-2015/53)
9. Yavuz ERDEN (Yürütücü), Sevda KIRBAĞ, Kevser BETÜL CEYLAN, Çiğdem TEKİN, “Bazı Fungal Metabolitlerin Antikanser, Antimikrobiyal Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması” (2016-2017, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2016-FEN-A-011)
10. Yavuz ERDEN (Yürütücü), Yonca SURGUN ACAR, Rabia İŞKİL, “Bor Eksikliği ve Toksikitesi Üzerine 24-Epibrassinolid Uygulamasının Arabidopsis Thaliana (L.) Heynh’Da Antioksidan Sistem İlgili Bazı Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması” (2017-2018, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2017-FEN-A-017)
11. Yavuz ERDEN (Yürütücü), Rabia TOP, “Bazı Önemli Tıbbi Bitkilerin Antioksidan, Antimikrobiyal ve Antikanser Etkilerinin Araştırılması” (2017-2018, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2017-FEN-CY-003)
12. Fatma HAMURCU, Yavuz ERDEN (Araştırmacı), “Yeni Schiff Baz Geçiş Metal Komplekslerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antikanser Aktivitesi” (2018-2019, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2018-FEN-A-016)
13. Ersen ERASLAN, Yavuz ERDEN (Araştırmacı), “Bir karotenoid olan Kapsantin insan prostat kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması, (2019-2020, Yozgat Bozok Üni. BAP, Proje No: 6602c-TF/19-243)
14. Yavuz ERDEN (Yürütücü), “Tümör Hücreleri Apoptoz Faktörü (Tcapf)’Nin İnsan Prostat ve Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi” (2019-2020, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2019-FEN-A-003)

15. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU, Yavuz ERDEN (Araştırmacı), Ahmet KARAKUŞ, “Bir Karotenoid Olan Kapsantin’İN Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” (2019-2020, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2019-FEN-A-001)

16. Fatma HAMURCU, Yavuz ERDEN (Araştırmacı), “Fenoksi-İmin İçeren yeni Schiff Baz Ligandlarının Sentezi, Karakterizasyonu Ve Biyolojik Etkilerinin Araştırılması” (2019-2020, Bartın Üni. BAP, Proje No: 2019-FEN-A-004)

17. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU, **Yavuz ERDEN (Araştırmacı)**, Rizvan İMAMOĞLU, Busenur ÇELEBİ, “Probiyotik Bir Bakteri Olan Lactobacillus acidophilus'a Ait Sekretomun ve Pirüvat Kinazın İnsan Kolon Kanseri Hücrelerine Etkisinin Araştırılması” (2019- Devam ediyor, TÜBİTAK-1002 Proje No: 119Z016).

18. **Yavuz ERDEN (Yürütücü)**, Suat TEKİN, Çiğdem TEKİN, Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU, Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ, Sevilay GÜNAY, Tuba KESKİN, “Mitokondriyal-Türevli Peptid (Mots-C)'in İnsan Kolon ve Meme Kanseri Hücre Serilerinde Antikanserojenik Etkilerinin Belirlenmesi: İn vitro Bir Çalışma” (2019- Devam Ediyor, TÜBİTAK-3501, Proje No: 318S235)

### İdari Görevler

Bölüm Başkan Yardımcılığı : Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2015-2016  
Eğitim Komisyonu Üyesi : Bartın Üniversitesi 2017-2020  
Senato Üyesi : Bartın Üniversitesi 2019-Devam Ediyor

### Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Türkiye.

### Ödüller

1. Sözlü Sunum İkincilik Ödülü: Hatipoğlu İ., Çıtak S., Alıcı M., Aslan Z, İnan A.B., Büyüköztürk H., Savuran D., Dolaş D., Benzer E., Özcan U.D., Orakçı A., Akatay M., Tekin S., **Erden Y.**, Sandal S. (2015). Meme Kanseri Üzerine Sigara İçmenin Etkileri: Sarımsak İle İlişkisi, 7. KDTU Günleri & Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, 8-10 Mayıs, Malatya, S15/2015.
2. Sözlü Sunum Birincilik Ödülü: Tekin S., **Erden Y.**, Sandal S., Cigremis Y., Tekedereli I., Colak C. (2015). “Beslenmenin hipotalamik Kontrolünde İrisin

Hormonunun Etkilerinin araştırılması” 9-13 Eylül 2015, 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi.

3. Best Poster Award: (A.5.64.) **Erden Y.**, Tekin S., Çağlayan A. B., Özyalın F., Çiğremiş Y. (2018). “Effects of central infusion of irisin on the energy metabolism and glucose uptake in rats.” *Neuroendocrinology* 107, Supplement 1, 28-28. Doi: 10.1159/000493383.

## **ESERLER**

### **A. SCI, SCI-Exp. Kapsamındaki dergilerde yayınlanan makaleler**

- A1.** Yılmaz O, Ozsahin AD, Bircan B, **Erden Y**, Karaboga Z. (2010). Radical scavenging activity of the *Pistacia terebinthus* in Fenton reagent environment and its protective effects on the unsaturated fatty acids, *Asian Journal of Chemistry*, 22, 7949-7958.
- A2.** Ozsahin AD, Kirecci OA, Yılmaz O, **Erden Y**, Bircan B, Karaboga Z. (2012). Investigating inhibitory effects of Punica granatum fruit extracts on lipid peroxidation in the Fenton reagent environment, *Asian Journal of Chemistry*, 24, 1010-1014.
- A3.** **Erden Y**, Kırbağ S, Yılmaz O. (2013) Phytochemical composition and antioxidant activity of some *Scorzonera* species, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 83(2): 271-276.
- A4.** **Erden Y.**, Tekin S., Sandal S., Önalın E., Tektemur A., Kirbag S. (2016). “Effects of central irisin administration on the uncoupling proteins in rat brain” *Neuroscience Letters*, 8;618:6-13, Doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.046.
- A5.** Tekin S., **Erden Y.**, Sandal, S., Onalan E., Ozyalın F., Ozen H., Yılmaz, B. (2017). “Effects of apelin on reproductive functions: Relationship with feeding behavior and energy metabolism.” *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1 (123) 9-15.
- A6.** Tekin S., **Erden Y.**, Ozyalın F., Cigremis Y. Colak C., Sandal S. (2017). “The effects of intracerebroventricular infusion of irisin on feeding behaviour in rats” *Neuroscience Letters*, 645, 25-32. Doi:10.1016/j.neulet.2017.02.066.
- A7.** **Erden Y.**, Tekin S., Tekin C., Ozyalın F., Yılmaz U., Onalan Etem E., Cigremis Y., Colak C., Sandal S. (2017). “Effect of Intracerebroventricular Administration of Apelin-13 on the Hypothalamus–Pituitary–Thyroid Axis and Peripheral Uncoupling Proteins” *Int J Pept Res Ther.* 24(4): 511-517. Doi 10.1007/s10989-017-9638-9.
- A8.** Tekin S., **Erden Y.**, Ozyalın F., Onalan EE., Cigremis Y., Colak C., Tekedereli I., Sandal S. (2018) “Central irisin administration suppresses thyroid hormone

- production but increases energy consumption in rats.” *Neurosci Lett.* 674:136-141. Doi: 10.1016/j.neulet.2018.03.046.
- A9.** Çakır M., Tekin S., Doğanyığıt Z., **Erden Y.**, Soytürk M., Çiğremiş Y., Sandal S. (2019). “Cannabinoid type 2 receptor agonist JWH-133, attenuates Okadaic acid induced spatial memory impairment and neurodegeneration in rats” *Life sciences* 217, 25-33. Doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.058
- A10.** Tekin S., Beytur A., **Erden Y.**, Beytur A., Cigremis Y., Vardi N., Turkoz Y., Tekedereli I., Sandal S. (2019) “Effects of intracerebroventricular administration of irisin on the hypothalamus–pituitary–gonadal axis in male rats” *Journal of cellular physiology* 234 (6), 8815-8824.
- A11.** Mamedova G., Mahmudova A., Mamedov S., **Erden Y.**, Taslimi P., Tüzün B., Tas R., Farzaliyev V., Sujayev A., Alwasel SH., Gulçin İ. (2019) “Novel tribenzylaminobenzolsulphonylimine based on their pyrazine and pyridazines: Synthesis, characterization, antidiabetic, anticancer, anticholinergic, and molecular docking studies” *Bioorganic Chemistry* 93 (2019), 103313. Doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103313
- A12.** Tekin S., Beytur A., Cakir M., Taslıdere A., **Erden Y.**, Tekin C., Sandal S. (2020) “Protective effect of saxagliptin against renal ischaemia reperfusion injury in rats” *Archives of Physiology and Biochemistry* DOI: 10.1080/13813455.2020.1715442
- A13.** Torğut G., Pıhtılı G., Sönmez Erecevit P., **Erden Y.**, Kırbağ S. (2020) “Synthesis, and antimicrobial and anticancer activities of sodium acrylate copolymer” *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 1-10. Doi: 10.1177/0883911520913910
- A14.** Türkan F., Taslimi P., Abdalrazaq SM., Aras A., **Erden Y.**, Celebioglu HU., Tuzun B., Ağırtaş MS., Gülçin İ. (2020) “ Determination of anticancer properties and inhibitory effects of some metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, alpha glycosidase of some compounds with molecular docking study” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* DOI: 10.1080/07391102.2020.1768901
- A15.** Taslimi P., **Erden Y.**, Mamedov S., Zeynalova L., Ladokhina N., Tas R., Tuzun B., Sujayev A., Sadeghian N., Alwasel SH., Gulcin I. (2020) “The biological activities, molecular docking studies, and anticancer effects of 1arylsulphonylpyrazole derivatives” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* DOI: 10.1080/07391102.2020.1763838

## **B. SCI, SCI-Exp. Kapsamı dışında diğer uluslararası indeksli dergilerde yayınlanan makaleler**

- B1. Erden Y**, Bircan B, Yılmaz Ö, Erecevit P. (2013). Antioxidative activity and phytochemical composition of dried apricot, *Turkish Journal of Science & Technology*, 8(2), 107-113.
- B2. Erden Y**, Kırbağ S. (2015). Chemical and biological activities of some *Scorzonera* species: an in vitro study, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1): 319-326.
- B3. Tekin S, Erden Y**, Sandal S, Yılmaz B. (2015). Is irisin an anticarcinogenic peptide?, *Medicine Science*, 4(2): 2172-2180.
- B4. Erden Y**, Tekin S, Kirbag S, Sandal S. (2015). Mitochondrial uncoupling proteins in the brain: Their structure, function and physiological roles, *Medicine Science*, 4(2): 2289-2307.

## **C. Ulakbim TR-Dizin dergilerde yayımlanan makaleler**

- C1. Çöteli E., Erden Y., Karataş F.** (2013) “Yarpuz (*Mentha pulegium* L.) Bitkisindeki Malondialdehit, Glutasyon ve Vitamin Miktarları ile Total Antioksidan Kapasitesinin Araştırılması” Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 17(2), 4-10, 2013
- C2. Acar Surgun Y., İşkil R. Erden Y.** (2018) “Bor stresi altında *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh’da süperoksit dismutaz genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi” Bor Dergisi 3(3), 145-150. DOI: 10.30728/boron.409349
- C3. Top R., Erden Y., Tekin S.** (2019) “Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan ve antikanser etkilerinin araştırılması” Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 8 (2), 435-442.
- C4. Erden Y., Tekin S., Betül Ceylan K., Tekin C., Kırbağ S.** (2019) “Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of the Aspergillin PZ and Terphenyllin Secondary Metabolites: An in vitro Study” Gazi University Journal of Science 32(3): 792-800. DOI: 10.35378/gujs.467166 (*Bu dergi E-SCI ve TR dizindir*)
- C5. Çakır M., Erden Y.** (2019) “MCF-7 ve PC-3 hücre hatlarında, hücre canlılığı ve DNA hasarı üzerine TRPV4 antagonisti RN 1734’ün etkileri” Bozok Tıp Dergisi 9(3):134-39. DOI: 10.16919/bozoktip.588740
- C6. Celebioglu HU., Celebi B., Erden Y., Evin E., Adalı O.** (2020) “Cytotoxic Effects of Probiotic Bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* Grown



in the Presence of Oleuropein on Human Prostate Cancer Cells” Celal Bayar University Journal of Science 16(1): 55-59. Doi: 10.18466/cbayarfbe.633237

**D. SCI, SCI-Exp. ve diğer indeksler kapsamındaki dergilerde yayınlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi, özet türünden yayınlar**

- D1.** Yılmaz U., **Erden Y.**, Tekin S., Sandal S., (2014) “Does apelin-13 affect the development of brown fat?” Acta Physiologica, Volume 211, Supplement s697, Pages139, DOI: 10.1111/apha.12362
- D2.** Tekin S., **Erden Y.**, Colak C., Sandal S. (2014) “Effects of chronic central administration of irisin on food intake, body weight and body temperature in the rats” Acta Physiologica, Volume 211, Supplement s697, Pages138, DOI: 10.1111/apha.12362
- D3.** Tekin S., **Erden Y.**, Etem E., Sandal S., Colak C. (2014). “Can apelin-13 be a new actor in control of obesity?” Acta Physiologica, Volume 211, Supplement s697, Pages137, DOI: 10.1111/apha.12362
- D4.** Tekin S., **Erden Y.**, Etem E., Tektemur A., Kirbag S., Sandal S. (2014) “Effect of intracerebroventricular irisin application on the uncoupling protein expression in rat brain” Acta Physiologica, Volume 211, Supplement s697, Pages157, DOI: 10.1111/apha.12362
- D5.** Tekin S., Colak C., **Erden Y.**, Sandal S. (2014) “Estimation of the relationships between irisin concentration and food intake, body weight and body temperature using polynomial regression models in the rats” Acta Physiologica, Volume 211, Supplement s697, Pages138, DOI: 10.1111/apha.12362
- D6.** Sandal S., **Erden Y.**, Tekin S., Etem E. (2014) “Effects of intracerebroventricular infusion of apelin-13 on the metabolism rate and energy expenditure” Acta Physiologica, Volume 211, Supplement s697, Pages139, DOI: 10.1111/apha.12362
- D7.** **Erden Y.**, Tekin S., Ozyalin F., Çiğremiş Y., Sandal S., (2015). “Effects of central Apelin-13 infusion on the hypothalamic TRH mRNA and serum TSH levels in rats” Anatomy, Volume 9, Supplement 1, Pages52.
- D8.** **Erden Y.**, Tekin S., Ozyalin F., Ozen H., Colak C., Sandal S. (2015). “The effects of apelin-13 on puberty in female rats” Acta Physiologica, Volume 215, Supplement s704, Pages107, DOI: 10.1111/apha.12591
- D9.** **Erden Y.**, Tekin S., Colak C., Sandal S., Tektemur A., Onalan Etem E., Kirbag S. (2015). “Radial basis function artificial neural networks can predict UCP2 mRNA

- levels according to irisin dose and time of application in the cerebellum of rats” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s704, Pages107, DOI: 10.1111/apha.12591
- D10.** Tekin S., **Erden Y.**, Ozyalin F., Colak C., Sandal S. (2015). “Prediction of the relationships between irisin concentration and serum leptin and ghrelin levels by quadratic polynomial regression models in the rats” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s704, Pages 55, DOI: 10.1111/apha.12591
- D11.** Tekin S., **Erden Y.**, Sandal S., Cigremis Y., Tekedereli I., Colak C. (2015). “Investigation of the effects of irisin hormone on the hypothalamic control of feeding” *Acta Physiologica*, Volume 27, Supplement s704, Pages139, DOI: 10.1111/apha.12590
- D12.** **Erden Y.**, Tekin S., Sandal S., Cigremis Y., Colak C., Ozyalin F. (2015). “Prediction of apelin-13 concentration based on the levels of thyroid hormones in rats” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s705, Pages8, DOI: 10.1111/apha.12626
- D13.** Tekin S., **Erden Y.**, Sandal S., Etem E., Colak C. (2015). “Predictive models forecast relationships of apelin-13 concentrations with UCP1 in WAT and BAT, and UCP3 in muscle ” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s705, Pages83, DOI: 10.1111/apha.12626
- D14.** Sandal S., Vardi N., Tekin S., **Erden Y.**, Beytur A. (2015). “The relationship between irisin and testicular functions: A morphological approach” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s705, Pages92, DOI: 10.1111/apha.12626
- D15.** Tekin S., **Erden Y.**, Sandal S., Ozyalin F., Colak C. (2015). “The alterations in serum ghrelin and leptin levels after intracerebroventricularly irisin infusion in rats” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s705, Pages93, DOI: 10.1111/apha.12626
- D16.** Sandal S., Tekin S., **Erden Y.**, Ozyalin F., (2015). “Is there any relationship between irisin and thyroid hormones?” *Acta Physiologica*, Volume 215, Supplement s705, Pages131, DOI: 10.1111/apha.12626
- D17.** Tekin S., **Erden Y.**, Beytur A., Cigremis Y., Sandal S., Turkoz Y., Tekedereli I., Beytur A. (2016). “A Novel Effective Myokine in the Control of Reproduction Behaviour; Irisin” *Acta Physiologica*, Volume 218, Supplement s709, Pages 24, DOI: 10.1111/apha.12778

- D18.** Tekin S., Sandal S., **Erden Y.**, Önalın E., Çolak C., (2016). “Does Irisin Affect Uncoupling Protein Levels in Fat and Muscle Tissues?” *Acta Physiologica*, Volume 218, Supplement s709, Pages 49, DOI: 10.1111/apha.12779
- D19.** Tekin S., **Erden Y.**, Çolak C., Sandal S., Cigremis Y., (2016). “Forecasting hypothalamic NPY, POMC and UCP2 mRNA levels according to different irisin concentrations using polynominal regression models” *anatomy*, Volume 10, Supplement 1, Pages 74, DOI:10.2399/ana.16.Sv
- D20.** **Erden Y.**, Tekin S., Çağlayan A. B., Özyalın F., Çiğremiş Y. (2018). “Effects of central infusion of irisin on the energy metabolism and glucose uptake in rats.” *Neuroendocrinology* 107, Supplement 1, 28-28. Doi: 10.1159/000493383
- D21.** Sandal S., Tekin S., **Erden Y.**, Caglayan A.B., Ozyalin F., Cigremis Y., Colak C. (2018). “Effects of Peripheral Irisin Infusion on the Glucose Uptake in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats” *Acta Physiologica* 225, 64-64.
- D22.** Cakir M., Doganyigit Z., Tekin S., **Erden Y.**, Cigremis Y., Sandal S. (2018) “Effect of Cannabinoid Type 2 Receptor Activation in Okadaic Acid Induced Rat Alzheimer's Disease Model” *Acta Physiologica* 225, 41-41.
- D23.** Eraslan E., **Erden Y.** (2019) “Cytotoxic effect of Capsanthin, a carotenoid, on human prostate cancer cell lines” *Acta Physiologica* 227(S722), 67.

**E. Uluslararası kongre ve sempozyumlarda sunulan ve tam metin olarak yayımlanmış bildiriler**

- E1.** Karakuş A., **Erden Y.**, Hamurcu F., Gündüzalp AB. (2018) “Cytotoxic effect of furan-2-carboxamide derivatives and Co (III) compounds on the human prostate cancer cell line” VI. IMCOFE, Rome/Italy
- E2.** Kesici A., **Erden Y.**, Taş R. (2019) “İnsan over kanseri hücre serisi üzerine zakkum bitkisinin (*Nerium oleander*) sitotoksik etkisinin incelenmesi” Uluslararası Marmara Fen ve Sosyal Bilimler Kongresi (Bahar), Kocaeli/Türkiye.

**F. Uluslararası kongre ve sempozyumlarda sunulan ve kongre kitabında yayımlanmış bildiriler (Sözlü/Poster)**

- F1. Erden Y., Karakus A., Tekin S. (2018).** “4-Hidroksi Alternariol Sekonder Metabolitinin İnsan Prostat, Over ve Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi” 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 161, Ankara, Turkey.
- F2. Erden Y., Top R., Tekin S. (2018).** “Bazı Önemli Tıbbi Bitkilerin Antioksidan ve Antikanser Etkilerinin Araştırılması” 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 1253, Ankara, Turkey.
- F3. Erden Y., Tekin S., Ceylan K.B., Tekin C., Kırbağ S. (2018).** “Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activity of the Aspergillin PZ: An In Vitro Study” 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 235, Ankara, Turkey.
- F4. Sandal S., Tekin S., Erden Y., Caglayan A.B., Ozyalin F., Colak C., Cigremis Y. (2018)** “Does Irisin Affect the Hypothalamic Regulation of Feeding Behavior in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats” Europhysiology2018, London, UK.
- F5. Karakuş A., Erden Y., Erdoğan O. (2019)** “Investigation of the cytotoxic effect of AKY-IV inhibitor on human ovarian cancer cell line” 2st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), 97, Ankara, Turkey.
- F6. Eraslan E., Ünal S., Erden Y. (2019)** “Histamin-1 reseptör antagonisti olan desloratadin’in insan meme kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik ve genotoksik etkisi” 2st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), 365, Ankara, Turkey.
- F7. Çakır M., Erden Y. (2019)** “İnsan over ve meme kanseri hücre canlılığı üzerine 8-bromo-cadp-riboz’un etkisi” 1st International Ahi Evran Medicine and Health Science Congress, SS427, Kırşehir, Turkey.
- F8. Hamurcu F., Erden Y., Kaya K. (2020)** “Pentaflorofenil grubu içeren yeni Schiff bazının sentezi, karakterizasyonu ve antikanser aktivitesinin belirlenmesi” 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), 405, Ankara, Turkey.
- F9. Erden Y. (2020)** “İnsan over kanseri hücre hattında TRPV4 antagonisti olan RN1734’ün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi” 3rd International

Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), 419, Ankara, Turkey.

**F10. Erden Y.,** Günay S. (2020) “Tümör hücreleri apoptoz faktörü (TCApF)’nin insan prostat ve meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi” 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), 730, Ankara, Turkey.

**G. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

**G1.** Özşahin AD, Aslan A, Yılmaz Ö, Baydaş Z, Gençoğlu H, **Erden Y,** Tuzcu M. “Hidrojen peroksit ve Fe<sup>++</sup> iyonu varlığında beyin dokusundaki bazı biyomoleküllere kayısı ve üzüm ekstraktlarının etkisi”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010 Denizli, PA-054.

**G2.** Ozsahin AD, Yılmaz Ö, Kirecci OA, Tuzcu M, **Erden Y.** “*Prunus armeniaca* L. CV. Hacihaliloglu fruits extracts prevent lipid peroxidation and protect the unsaturated fatty acids in the Fenton reagent environment”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010 Denizli, PA-077.

**G3.** Bircan B, Yılmaz Ö, **Erden Y,** Özşahin AD, Karaboğa Z. “*Punica granatum* L. meyve ekstraktının *in vitro* ortamda oluşturulan lipid peroksidasyonu ve DPPH serbest radikale karşı antioksidan etkisinin araştırılması”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010 Denizli, PA-080.

**G4.** **Erden Y,** Yılmaz Ö, Bircan B, Özşahin AD, Tuzcu M, Karaboğa Z. “*Pistacia terebinthus* L. ekstraktlarının soya ile mısırözü yağının bulunduğu *in vitro* ortamda LPO oluşumuna karşı antioksidan etkisinin araştırılması”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010 Denizli, PA-090.

**G5.** Yılmaz Ö, Önganer AN., Erecevit P, Kırbağ S, **Erden Y.** “*Triticum saivum* (Buğday) ekstraktlarının minimal besiyeri ortamında geliştirilen *Lactobacillus plantarum* üzerindeki yağ asidi ve vitamin biyosentezine etkisi”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010 Denizli, PG-066.

**G6.** Tekin S, Çolak C, **Erden Y,** Sandal S. “Farklı irisin konsantrasyonları ile bazı kan parametreleri arasındaki ilişkinin polinom regresyon modelleri ile tahmin edilmesi, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P018.

**G7.** Tekin S, **Erden Y,** Sandal S. “Sıçanlara periferel apelin-13 uygulamasının bazı kan parametreleri üzerine etkileri”, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P044.

- G8. Erden Y, Tekin S, Sandal S.** “Sıçanlara intraserebroventriküler apelin-13 uygulaması kan kolesterol, LDL ve Trigliserit düzeyini arttırır”, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P045.
- G9. Tekin S, Erden Y, Sandal S.** “Sıçanlara intraserebroventriküler irisin infüzyonunun serum LDL, HDL, trigliserit ve total kolestrol üzerine etkisi”, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P046.
- G10. Tekin S, Sandal S, Erden Y, Özyalın F, Özen H.** “Apelinin üreme fonksiyonları üzerine etkileri: Obezite ile ilişkisi”, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P063.
- G11. Tekin S, Erden Y, Sandal S.** “Farklı tip insan prostat kanseri hücre serilerinde irisin hormonunun etkileri, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P090.
- G12. Erden Y, Tekin S, Tektemur A, Etem E, Kırbağ S, Sandal S.** “Sıçanlarda intraserebroventriküler irisin enjeksiyonunun farklı beyin bölgelerindeki uncoupling protein ekspresyonu üzerine etkisi”, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2-6 Eylül 2014 Kayseri, P199.
- G13. Hatipoğlu İ, Çıtak S, Alıcı M, Aslan Z, İnan AB, Büyüköztürk H, Savuran D, Dolaş D, Bender E, Diyar U, Orakçı A, Atalay M, Tekin S, Erden Y.** “Meme kanseri üzerine sigara içmenin etkileri: sarımsak ile ilişkisi”, 7. KDTU Günleri ve Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, 8-10 Mayıs 2015 Malatya, S15.
- G14. Erden Y.** (2017) “4-Hidroksi alternariol sekonder metabolitinin antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi” 6.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 05-07 Ekim 2017, Adana, Özet34.Kandemir E. Ceylan Betül K.,
- G15. Erden Y., Tekin C.** (2018) “Enerji metabolizmasında etkin roller üstlenen İrisin ve Mts-c insan kolorektal kanser hücre hatlarında proliferasyonu azalttı” 1. Gastrointestinal Araştırma Kongresi, 10 Mart 2018, Malatya, SS145.

## EK-2. Etik Kurul Belgesi

### İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Danışmanı olduğum Yavuz ERDEN'in "Mitokondriyal-Türevli Peptid (MOTS-c)'in İnsan Meme Kanseri Hücre Serisinde Antikanserojenik Etkisinin Belirlenmesi: İn vitro Bir Çalışma" başlıklı TÜBİTAK destekli (Proje no:318S235) doktora tez çalışmasının deneysel aşamaları *in vitro* şartlarda hücre serileri üzerine gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle söz konusu çalışmanın etik kurul onayı almasına gerek yoktur.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof. Dr. Süleyman SANDAL

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı