T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YUMURTALIK KANSERİNDE LC3B VE BEKLİN-1 PROTEİNLERİNİN HÜCRE ÇOĞALMASI VE KLON OLUŞUMUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Nesrin DELİBAŞI

Danışman
Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2018
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YUMURTALIK KANSERİNDE LC3B VE BECLİN-1 PROTEİNLERİNİN HÜCRE ÇOĞALMASI VE KLON OLUŞUMUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Nesrin DELİBAŞI

Danışman
Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2017-7017 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Temmuz 2018
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Nesrin DELİBAŞI

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"Yumurtalık Kanserinde LC3B ve BEKLİN-1 Proteinlerinin Hücre Çoğalması ve Klon Oluşumuna Etkisinin Araştırılması" Adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Nesrin DELİBAŞI

Danışman

Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Doç. Dr. Zuhal HAMURCU danışmanlığında **Nesrin DELİBAŞI** tarafından hazırlanan **"Yumurtalık Kanserinde LC3B ve BEKLİN-1 Proteinlerinin Hücre Çoğalması ve Klon Oluşumuna Etkisinin Araştırılması"** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

..../.../ 2018

JÜRİ: **İmza**

Danışman : Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Züleyha DOĞANYİĞİT

(Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../..../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi hazırlamamda sonsuz sabrı ve iyi niyetiyle bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini aktararak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezin fikir aşamasından somut deneylere dökülmesine ve nihayete ermesine kadar her aşamasında öncülük yapan değerli hocam Doç. Dr. Zuhal HAMURCU'ya,

Öğrencinin her halinden anlayan ve samimiyetle yardımına koşan, hocalarım Doç. Dr. Elif Funda ŞENER'e ve değerli hocam Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye,

Yüksek Lisans ders ve tez süreci boyunca beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım başta Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ'a ve diğer tüm hocalarıma;

Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında beni yüreklendiren güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen değerli sağlık teknikeri Fatma DAL'a,

Değerli çalışma arkadaşlarım Nursultan NURDİNOV'a ve Venhar ÇINAR'a,

Yüksek Lisans Tez çalışmamın yapılmasında maddi katkı sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne (Proje No: TYL-2017-7017),

Çalışmamı yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) ve çalışanlarına,

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, benim bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Nesrin DELİBAŞI

Temmuz , 2018 KAYSERİ

YUMURTALIK KANSERİNDE LC3B VE BEKLİN-1 PROTEİNLERİNİN HÜCRE ÇOĞALMASI VE KLON OLUŞTURMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nesrin DELİBAŞI

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2018
Danışman: Doç. Dr. Zuhal HAMURCU

ÖZET

Yumurtalık kanserleri jinekolojik kanserler arasında en yaygın ikinci sırayı alan kanserler olarak bilinmektedir. Dünyada her yıl 200.000'den daha fazla kadını etkilemektedir. Bu yüzden bu kanserlerin erken teşhisi ve gelişimini takip edebilmek için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Otofaji hücre ölümü ve yaşaması gibi farklı sonuçlar doğurabilen iki yönlü etkiye sahiptir. Bazı çalışmalar kanser hücrelerinde otofajinin hücre ölümüne yol açarak tümör süpressör olarak davrandığını, bazıları ise otofajinin tümör hücrelerini yaşamaya ve çoğalmaya teşvik ederek onkogen olarak davrandığını ortaya koymuşlardır. Dolayısıyla kanser hücrelerinde otofajinin rolü ile ilgili bir çelişkili vardır.

Bu çelişkiden dolayı, sunulan tez çalışmasında, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin rolünü açıklığa kavuşturulması amaçlandı. Bu amaç için öncelikle, yumurtalık kanser hücre hücre hattı olan SKOV3 hücrelerinde, hem siRNA'lar aracılığı ile otofaji baskılanması, hem de açlıkla otofajinin tetiklenmesi sağlandı. Daha sonra bu hücrelerde, hücre canlılığı, klon oluşumu ve apoptoz oranı analiz edildi. Analiz verilerimize göre, LC3 ve Beklin-1 siRNA aracılı otofajinin baskılanmasının ve açlıkla otofajinin indüklenmesinin SKOV3 hücrelerinin canlılığını/proliferasyonunu, klon oluşumunu ve apopitoz oranını bir katkısının olmadığı bulundu.

Sonuçlarımız, otofajinin SKOV3 hücrelerinin klon oluşumu ve apoptoza direnç kazanmasında bir rol oynamadığını ve yumurtalık kanser hücrelerinin tedavisi için bir hedef olmadığını işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Otofaji, Yumurtalık kanseri, LC3 , Beklin-1, siRNA, apoptoz, hücre proliferasyonu, klon oluşumu

INVESTIGATION OF LC3B AND BECLIN-1 PROTEIN IN OVARIAN CANCER CELLS OF PROLIFERATION AND CLON FORMATION

Nesrin DELİBAŞI

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
M.Sc. Thesis, July 2018
Supervisor: Assoc. Prof. Zuhal HAMURCU

ABSTRACT

Ovarian cancer is the second most common cancer among gynecological cancers. Every year in the world, more than 200,000 women are affected. Therefore, new treatment methods are needed to follow the early diagnosis and development of these cancers.

Autophagy has a bi-directional effect which can lead to different consequences such as cell death and survival. Some studies have shown that autophage in cancer cells acts as a tumor suppressor by causing cell death, while others have shown that autophagy behaves as oncogen by encouraging tumor cells to survive and multiply. Therefore, there is a contradiction in the role of autophagy in cancer cells.

Because of this controversy, the proposed thesis was intended to clarify the role of autophagy in ovarian cancer cells. For this purpose, primarily in ovarian cancer cell line SKOV3 cells, both autophagy suppression through siRNAs and starvation of autophagy were induced. Cell viability, clonality and apoptosis rate were then analyzed in these cells. Based on our data, we found that suppression of LC3 and Beklin-1 siRNA mediated autophagy and induction of fasting autophagy did not contribute to viability / proliferation of SKOV3 cells, clonal formation and apoptosis rate.

Our results indicate that autophagy does not play a role in clonogenesis and apoptosis resistance gain of SKOV3 cells and that ovarian cancer cells are not a target for treatment.

Keywords: Autophagy, Ovarian Cancer, LC3, Beclin-1 ,siRNA, apoptosis, cell proliferation, clonal formation

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii
ONAY iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR x
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER 3
2.1. Yumurtalık Kanseri 3
2.2. Yumurtalık Kanseri Araştırmaları ve Epidemiyolojisi 3
2.3. Yumurtalık Kanseri Histogenezi 4
2.4. Yumurtalık Kanserlerinin Östrojen Reseptörleri İle İlişkisi 4
2.4.1. SKOV3 (Sloan-Kettering ovarian cancer 3/insan yumurtalık adenokarsinoma hücresi 3) 4
2.5. Otofaji 5
2.5.1. Otofajinin Mekanizmaları 5
2.5.1.1. Mikro-otofaji 5
2.5.1.2. Şaperon Aracılı Otofaji 6
2.5.1.3. Makro-Otofaji 6
2.5.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması 7
2.5.2.1. Başlama, indüksiyon veya sinyal oluşumu evresi 7
2.5.2.3.Olgunlaşma evresi 9
2.5.2.4. Otofagozom tamamlanması ve füzyon 10
2.5.3. Sunulan Tez Çalışmasında Hedeflenen Otofajik Genler 10
2.5.3.1. LC3B geni (Lıght Chance-3B) 10
2.5.3.2. Beklin-1 geni 11
2.6. siRNA İle Gen Susturma 11
3.YÖNTEM VE GEREÇLER 12

3.1. GEREÇLER 12
3.1.1. Demirbaş Malzemeler 12
3.1.2. Sarf Malzemeler 13
3.2. YÖNTEM 14
3.2.1. Kullanılan Hücre Hattı 14
3.2.2. Kullanılan Small Interfering RNA (siRNA)' lar 14
3.2.3. Western Blot Analizi 15
3.2.4. Hücre Proliferasyon/Büyüme Analizi 15
3.2.5. Asidik Veziküllerin (Otofajik Veziküllerin) Tespiti 16
3.2.6. Klonojenik Tespit 16
3.2.7. Apoptoz (Annexin-V) Analizi 16
3.2.8. Hücre Döngü Analizi 17
3.3 İstatistiksel Değerlendirme 17
4. BULGULAR 18
4.1. İki farklı LC3 ve iki farklı Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde , LC3 ve Beklin-1'in ekspresyon seviyeleri 18
4.2. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde asidik veziküler oluşumların analizi 19
4.3. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde LC3 ve Beklin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri 20
4.5. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde hücre proliferasyon oranı 21
4.6. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde hücre proliferasyon oranı 22
4.7. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı ve kaspaz sinyal yolağının aktivasyonu 22
4.8. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde apopitoz oranı ve kaspaz sinyal yolağının aktivasyonu 24
4.9. İki Farklı LC3 ve İki Farklı Beklin-1 siRNA'larla Transfekte Edilen SKOV3 Hücrelerinde Klon Oluşumu Ve Klon Oluşumdan Medyatör Olan Proteinlerin Ekpresyon Seviyeleri 26

4.10. İki Farklı LC3 ve İki Farklı Beklin siRNA'larla Transfekte edilen hücrelerde hücre döngü analizi ve hücre döngüsünde rol alan proteinlerin ekspresyonları seviyeleri..... 29
5.TARTIŞMA VE SONUÇ..... 31
6.KAYNAKLAR..... 36
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

BEC-1/ATG6/BCN1 : Beklin-1/ otofaji ilişkili gen 6

LC3-I : Hafif zincir 3-I

LC3-II : Hafif zincir 3-II

ER+ : Östrojen reseptör pozitif

SKOV3 : Yumurtalık kanser hücre hattı

siRNA : Küçük kodlanmayan RNA

HGSC : İleri Derece Seröz Yumurtalık Kanseri

CCC : Berrak Temiz Hücreli Yumurtalık Kanseri

MC : Endometrioid Müsinöz Yumurtalık Kanseri

LGSC : Düşük Derece Seröz Yumurtalık Kanseri

LC3B : LC3 Proteinini kodlayan gen

ATG1 : Otofaji ilişkili gen 1

ATG13 : Otofaji ilişkili gen 13

ATG17 : Otofaji ilişkili gen 17

ATG31 : Otofaji ilişkili gen 31

BRIP1 : BRCA1 etkileşimli protein 1

RB1 : Retinoblastoma-1

VDR : D vitamini reseptörü

HER : İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü

ESR1 : Östrojen reseptör gen 1

ESR2 : Östrojen reseptör gen 2

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Otofaji tipleri ve otofagozom oluşum sürecinin ana basamakları şematik gösterimi. 6

Şekil 2. Otofajinin indüksiyonu. 8

Şekil 3. Otofagozomun çekirdeklenmesi. 8

Sekil 4. Otofagozom uzaması ve olgunlaşması. 9

Şekil 5. Kontrol, LC3 ve Beklin-1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde bu siRNA'ların hedef aldıkları genlerin ürünü olan proteinlerin ekspresyon seviyeleri. 18

Şekil 6. LC3 ve Beklin-1 ve kontrol siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde asidik veziküler oluşumlar. 19

Şekil 7. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan hücrelerde LC3 ve Beklin-1 protein ekspresyon seviyeleri. 20

Şekil 8. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde asidik veziküler oluşumlar. ... 21

Şekil 9. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde proliferasyon oranı. 21

Şekil 10. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinin canlılık oranı. 22

Şekil 11. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı. 23

Şekil 12. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde kaspaz proteinlerinin ekspresyonları. 24

Şekil 13. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı. 25

Şekil 14. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde aktif-kaspaz-8 kaspaz-8 ve aktif-kaspaz-9, kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri. 26

Şekil 15. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde klon oluşumu. 27

Şekil 16. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile trasfekte edilen hücrelerde hücre çoğalmasında görev alan medyatör proteinlerin ekspresyon seviyeleri. 28

Şekil 17. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile trasfekte edilen hücrelerde hücre döngüsü analizi. 29

Şekil 18. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile trasfekte edilen hücrelerde hücre döngüsünde rol alan Siklin-D1 proteinin ekspresyon seviyesi. 30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yumurtalık kanseri jinekolojik kanserler içinde en ölümcül olanıdır. Bunun nedeni erken dönemde herhangi bir belirti vermemesi sinsi bir şekilde ilerlemesi ve erken tanı için günümüzde etkili bir tanı yönteminin olmamasıdır (1, 2).

Yumurtalık kanserinin iyi karakterize edilen ve farklı hastalıklar olduğu kabul edilen 5 alt tipi vardır. Bunlar en sık görülenden en az görülene doğru sırasıyla; ileri derecede seröz (HGSC), berrak temiz hücreli (CCC), endometrioid, müsinöz (MC) ve düşük derecede seröz (LGSC) yumurtalık kanseridir (3).

Dünyada her yıl 200.000'den daha fazla kadın yumurtalık kanserinin bu türlerinden birinden etkilemektedir. Yumurtalık kanserinin semptomları spesifik olmayıp, vakaların 3/2'si ileri safhalarda teşhis edilmektedir. Tüm bu olaylar göz önüne alınırsa bu kanserlerin erken teşhisi ve gelişimini takip edebilmek için yeni biyomarkerlar, belirteçler ve yeni terapötik ajanların geliştirilmesi gerekli olduğu aşikardır (2, 4) .

Otofaji; hasarlı organellerin, uzun ömürlü proteinlerin, yanlış katlanmış proteinlerin ve sitoplazmik parçacıkların yıkımından sorumlu fizyolojik bir olaydır (6, 28).

Otofaji, kanser hücrelerinde, hücreleri koruyucu bir rol üstlenerek hücrelerin apopitoza direnç kazanmalarına, invazyon ve metastaz yapmalarına katkı sağlarken, tam tersi bir mekanizma ile hücre canlılığının inhibisyonuna , metastazın baskılamasına ve apopitozu indüklenmesine yol açmaktadır. Dolayısıyla otofaji, kanser hücrelerinde çift yönlü bir etkiye sahip olup henüz rolü açıklığa kavuşturulamamıştır (5, 25, 27).

Literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, siRNA'ların spesifik olarak hedef genlerin susturulmasında ve bu yönüyle çeşitli hastalıkların tedavisinde umut verici bir etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (3, 5). Sunulan tez çalışmasında östrojen ve progesteron reseptör pozitif olan SKOV3 (Sloan-Kettering ovarian cancer 3) yumurtalık kanser hücre hatlarında hem otofajide rol oynayan ve otofajinin belirteci kabul edilen LC3 ve Beklin-1 genlerinin ekspresyonları siRNA aracılığıyla baskılanarak, baskılanmış otofajinin hem de hücreler aç bırakılarak, uyarılmış otofajinin bu hücrelerin çoğalması ve klon oluşturma özelliği üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Böylece otofajinin kanser hücrelerindeki karmaşık rolünün açıklığa kavuşturulması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yumurtalık Kanseri

Kanser vücuttaki hücrelerin programsız ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması, morfolojilerinin değişmesi ve yayılmasıyla ortaya çıkan bir malignitedir. Yumurtalık kanseri jinekolojik kanserler içinde en fazla ölüm oranına sahip olan kanser türüdür. Bunun nedeni erken dönemde herhangi bir belirtilerinin olmayışı, çok sinsi bir şekilde ilerlemesi ve erken tanı için günümüzde etkili bir tanı yönteminin olmamasıdır (3). Bu yüzden, yılda 200.000'den fazla kadını etkilemektedir. Yumurtalık kanseri semptomları spesifik yani belirleyici değildir, bu nedenle vakaların üçte ikisi ileri safhalara kadar teşhis edilmez. Tanı konmuş kadınların ise %50'sinin 5 yıllık ömürlerinin olduğu rapor edilmiştir (5).

2.2. Yumurtalık Kanseri Araştırmaları ve Epidemiyolojisi

Yumurtalık kanseri kadın sağlığını ciddi şekilde etkileyen habis bir kanserdir. Yumurtalık kanseri tanılarının yüzde doksanın üzerinde kökeni 'epitelyal' olarak sınıflandırılır ve yumurtalık karsinoması ve benzeri bir şekilde aile öyküsü gibi risk faktörlerinden dolayı yumurtalık epitelinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yumurtalık kanserinin erken teşhisinin pek mümkün olmamasından dolayı orantısız derecede ölümcüldür ve ileri evrelerde teşhisi konan 70 over kanserinin 5 yıllık sağ kalım oranı yüzde 50 dir (6-9).

Ayrıca ülkemizde de yapılan bazı araştırmalara göre, jinekolojik kanserler arasında yumurtalık kanserinin en ölümcül olan jinekolojik kanser tipi olduğu bildirilmiştir (8).

Günümüzde yumurtalık kanseri tedavisinde başlıca kemoterapi, cerrahi ve radyoterapi . tedavi yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Yumurtalık kanserlerinin tedavisi için, birçok yeni yaklaşım uygulanmasına rağmen, hastaların sağ kalma oranında da

yıllar boyunca büyük ölçüde ilerleme kaydedilmemiştir. Dolayısıyla sonuçları iyi duruma getirebilmek için yeni tedavi stratejilerine acil ihtiyaç duyulmaktadır (10).

2.3. Yumurtalık Kanseri Histogenezi

Yumurtalık kanserinin iyi karakterize edilen 5 alt tipi vardır. Bunlar en sık görülenden en az görülene doğru sırasıyla; ileri derecede seröz (HGSC), berrak temiz hücreli (CCC), endometrioid, müsinöz (MC) ve düşük derecede seröz (LGSC)'dür (5-7).

2.4. Yumurtalık Kanserlerinin Östrojen Reseptörleri İle İlişkisi

Özellikle aile ve ikizlerle yapılan çalışmalarda, genetik faktörlerin yumurtalık kanserinin önemli nedenlerinden biri olduğu öne sürülmüştür (11). En iyi belgelenmiş kalıtsal faktörler BRCA1 (breast cancer 1) ve BRCA12 (breast cancer 12) genleri olup, bu iki genin, yumurtalık kanseri riskinin % 40'ından sorumlu olduğu bilinmektedir (12, 13).

Son zamanlarda bir dizi gen BRCA1 etkileşimli protein 1 (BRIP1)(14), Retinoblastoma-1 (RB1) (14), östrojen reseptör genler (ESR1 ve ESR2) (15,16) ve D vitamini reseptörü (VDR) genlerin (17) yumurtalık kanseri yatkınlık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (14-17). Yapılan araştırmalar, artan östrojen seviyelerinin, ESR1 tarafından kodlanan ER-a'ya bağlanarak yumurtalık kanseri riskini artırabildiğini göstermiştir (18, 19). Ayrıca HER reseptör tirozin kinaz familyasının bir üyesi olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin ER ile etkileştiği ve tümör hücresi proliferasyonunu ve hayatta kalmayı düzenlediği bildirilmiştir (20).

2.4.1. SKOV3 (Sloan-Kettering ovarian cancer 3/insan yumurtalık adenokarsinoma hücresi 3)

Adenokarsinom epitelyal kanseri (SKOV3) hücre hattı, 1973 yılında 64 yaşında Kafkas etnik kökenli B RH+ kan grubu olan bir kadından izole edilen adenokarsinom epitel hücre hattıdır (21). İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) SKOV3 hücre hattında aşırı ifade olduğu için çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır (20). SKOV3 hücreleri Erα ve progesteron reseptör için pozitiftir. ER'nin aktivasyonu, doğrudan transkripsiyonel hedeflerinin değişmesine sebep olur, SKOV3 hücrelerinin ER pozitif olması hücrenin proliferasyonunu ve biyolojik aktivitesini

etkiler. Bununla birlikte, östrojenin yumurtalık tümör hücrelerinin davranışı üzerindeki düzenleyici etkileri hala tam olarak aydınlatılamamıştır (19, 22). SKOV3 hücreleri tümör nekroz faktörüne ve difteri toksini, cis-platinum ve adriamisin dahil olmak üzere birçok sitotoksik ilaca dirençlidir (21, 23, 24).

2.5. Otofaji

Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelir ve hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara doğru yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek lizozomlarda parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır (25, 26). Otofaji, sağlıklı hücrelerde bazal seviyede devamlı olarak gerçekleşen; yanlış katlanmış proteinleri, hasarlı organelleri, hücrenin hasar görmüş bileşenlerin yıkımını sağlayarak tekrar hücreye kazandıran geri dönüşüm mekanizması olarak görev yapar (28).

Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğunu göstermiştir (26, 27).

Son on yıl süresince yapılan çalışmalarda otofajinin; hücre ve metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin ve zararlı maddelerin yıkımında da etkili bir rol oynadığı ortaya konmuştur (26, 28).

Otofaji; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılıklı otofaji şeklinde en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (29) (Şekil 1).

2.5.1. Otofajinin Mekanizmaları

2.5.1.1. Mikro-otofaji

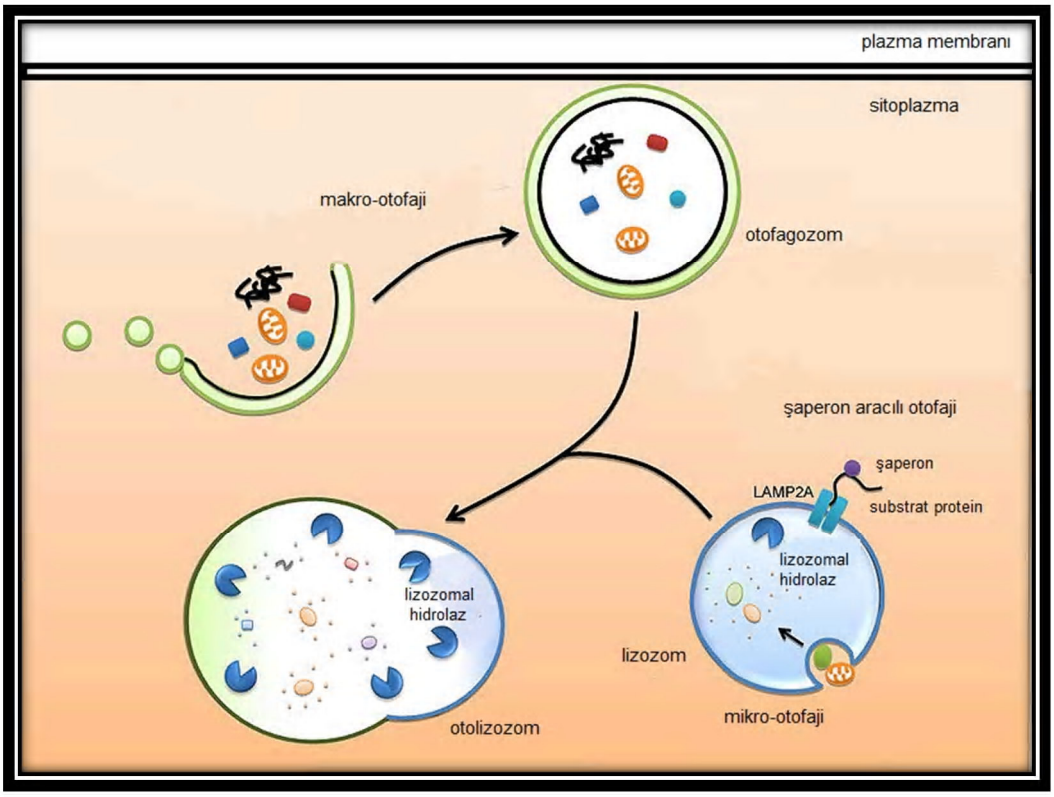
Mikrootofaji, lizozom membranın içe doğru çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yenilmesi ve içeriğinin lizozom içinde sindirime uğramasıdır (30). Mikrootofaji besin azlığı durumlarında gözlenir (26, 31) (Şekil 1).

2.5.1.2. Şaperon Aracılı Otofaji

Şaperon aracılı otofaji lizozom zarında gerçekleşir. Katlanmamış KFERQ işaretli proteinlerin lizozom zarına seçici şekilde taşınması ve buradan lizozom lümenine geçerek bu proteinlerin yıkımının gerçekleşmesine yol açan otofaji türüdür (29) (Şekil 1).

2.5.1.3. Makro-Otofaji

Otofajik hücre ölümünü oluşturan başlıca mekanizmadır. Makrootofaji, çift zarlı otofagozomların oluşumu ile ilgili birçok basamaktan oluşan kompleks bir otofaji tipidir (32). Makromoleküllerin, organellerin fagozom içine alınıp daha sonra olgunlaşan otofagozomların lizozomlarla yıkılmasıdır. Literatürde en sık çalışılan ve mekanizması en iyi aydınlatılmış olan otofaji tipidir. Bu nedenle çalışmalarda makro otofaji yerine otofaji kullanılmaktadır (Şekil 1). Bu tez çalışmasında da makro otofaji çalışılmış olup literatürde kullanıldığı gibi makro otofaji terimi yerine otofaji terimi kullanılmıştır (26, 28).



Şekil 1. Otofaji tipleri ve otofagozom oluşum sürecinin ana basamakları şematik gösterimi.

Makro-otofaji, çift membranlı bir vaküol olan fagofor tarafından sitozol ve organellerin çevrelerinin sarılmasını, ardından otofagozom oluşmasını ve daha sonra da otofagozomun bir lizozom ile birleşmesini ve asit hidrolazlar tarfaından otofagozom içeriğininin tamamen parçalanmasını sağlayan bir mekanizmadır. Mikro-otofaji süreci, doğrudan lizozom tarafından invaze edilen sitoplazmik materyalin bozulmasını ifade eder. Şaperon aracılı otofaji ise şaperon proteini olan HS70, KFERQ denilen özel aminoasit dizisiyle işaretlenmiş ve katlanmamış substrat proteinini tanır ve bağlanır ve onu lizozom membranına taşır ve lizozomal reseptör Lamp-2A reseptörüne birleştirir ve substrat protein lizozom içine doğrudan translokasyon yapar ve lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanır Böylece üç farklı otofaji tipiylede hücrenin enerji ihtiyacı karşılanmış olur (29).

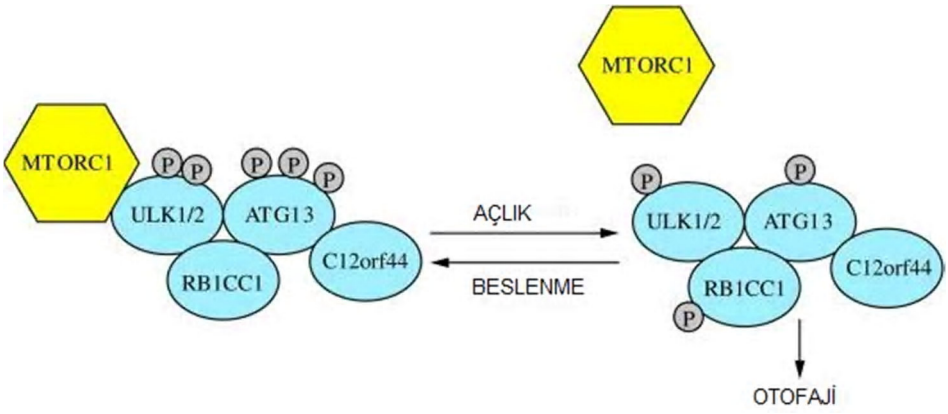
2.5.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji mekanizması oldukça karmaşık bir süreçtir. Ve genel olarak 4 basamak altında incelenir. Bu basamaklar sırasıyla

1. Başlama, indüksiyon veya sinyal oluşumu evresi
2. Çekirdeklenme evresi
3. Olgunlaşma uzama evresi
4. Otofagozom tamamlanması ve füzyon evresi

2.5.2.1. Başlama, indüksiyon veya sinyal oluşumu evresi

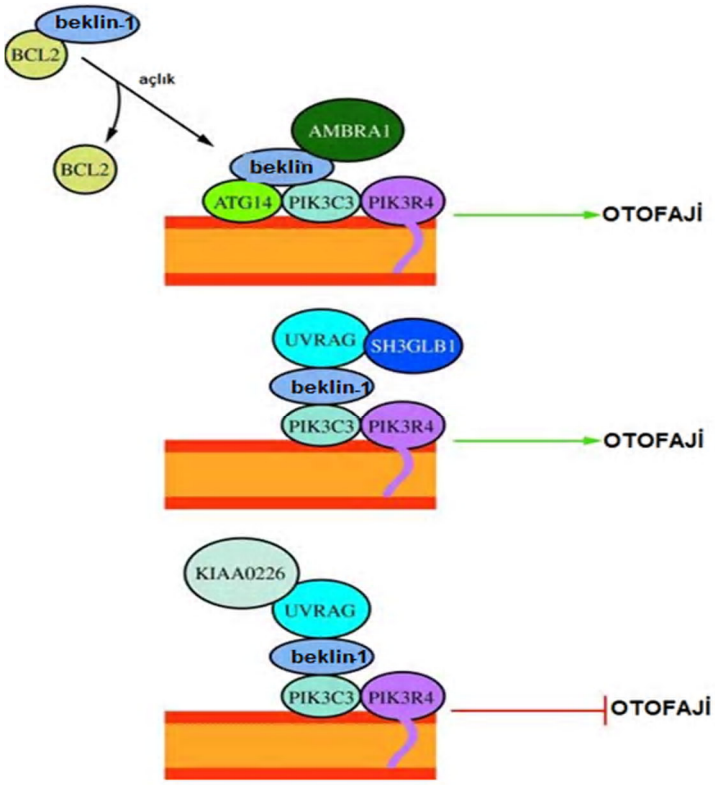
Makro-otofajide, otofagozom formasyonunun indüksiyonu, Atg1 (otofaji ilişkili gen1), Atg13 (otofaji ilişkili gen13), Atg17 (otofaji ilişkili gen17), Atg31 (otofaji ilişkili gen31), Atg29 (otofaji ilişkili gen29) kinaz kompleksiyle düzenlenir (32) (Şekil 2).



Şekil 2. Otofajinin indüksiyonu; İndüksiyon kompleksi ULK1 / 2, ATG13, RB1CC1 ve C12orf44'ten oluşur (33).

2.5.2.2. Çekirdeklenme evresi

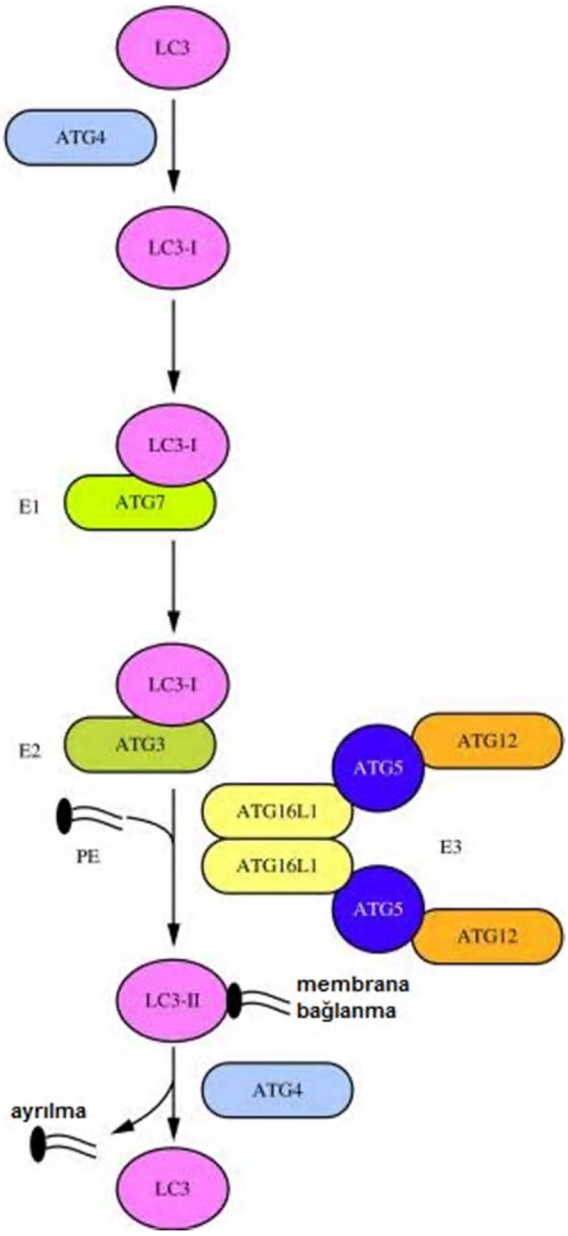
Otofagozom oluşumunda rol alan bir sonraki kompleks, ATG14 içeren sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz kompleksidir (42). Bu kompleks fagoforun çekirdeklenmesinde yer alır ve PIK3C3 / VPS34, PIK3R4 / p150 (mayada Vps15) ve Beklin-1 içerir (34-40) (Şekil 3).



Şekil 3. Otofagozomun çekirdeklenmesi (33).

2.5.2.3. Olgunlaşma evresi

Hem maya hem de memelilerde, fagoforun genişlemesine katkıda bulunan ubikuitin benzeri (UBL) proteinleri içeren iki konjugasyon sistemi ve çok sayıda Atg proteinleri görev alır (41) (Şekil 4).



Sekil 4. Otofagozom uzaması ve olgunlaşması (33).

LC3, bir C-terminal glisinini (LC3-I) ortaya çıkarmak için ATG4 tarafından işlenir. E1-benzeri bir enzim olan ATG7, LC3-I'yi aktive eder ve onu E2-benzeri enzim ATG3'e aktarır. ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksi, AF3-II'yi oluşturmak için

fosfatidiletanolamin'in LC3-I ile konjugasyona bir f3o-ligaz olarak katılır, bu da fagofor ile birleşen LC3-II'yi oluşturur. LC3-II daha sonra LC3'ü (dekonjügasyon) serbest bırakmak için ATG4 ile parçalanabilir (41).

2.5.2.4. Otofagozom tamamlanması ve füzyon

Otofajide son basamak, olgunlaşmış otofagozomların, endolizozom membranı ile birleşmesidir (42) .Bu basamak olgun otofagozom membranınından Atg proteinlerinin ayrılmasını gerektirir. Bu işlem de Atg4 olmak üzere yine birkaç Atg proteinleri tarafından düzenlenir. Otofagozomun lizozomla birleşmesinden sonra, vezikül içeriğinin yıkımı lizozomda bulunan asit-hidrolaz enzimlerince gerçekleştirilir. Yıkımdan sonra oluşan küçük moleküller özellikle amino asitler açlıkta hücresel fonksiyonların korunabilmesi için tekrar sitoplazmaya transfer edilir. Otofagozomların lizozomlara hareketi mikrotübüllere bağlıdır (43-46). Son çalışmalar ise, endozom / lizozom ile tamamlanmış otofagozomların füzyonu için, SNAP29 gibi çok sayıda tanımlanmış SNARE proteinlerinin görev aldığını göstermiştir (47-50).

2.5.3. Sunulan Tez Çalışmasında Hedeflenen Otofajik Genler

2.5.3.1. LC3B geni (Lıght Chance-3B)

Mikrotübülle ilişkili protein 1A / 1B-hafif zincir 3 (LC3), maya da tanımlanan Atg8'in memeli homoloğudur. LC3B geni otofajinin anahtar bir regülatörüdür ve memeli hücrelerinde otofagozomların oluşumu için temel oluşturur (53, 54). Bu genin oluşturduğu LC3 proteini, sitozolde LC3-I (lokalize olan LC3-I) veya otofagozomal membranlarda LC3-II (LC3-I'in proteolitik türevi olan LC3-II) şeklinde olmak üzere iki biçimde bulunur. Otofagozom oluşumu sırasında sitozolik LC3-I, fosfatidiletanolamine (PE) konjuge edilerek membrana bağlı LC3-II'ye dönüştürülür; bu işlem E1-benzeri enzim Atg7 ve E2 benzeri enzim Atg3 ile katalize edilmektedir (51, 52, 56). Otofagozomal LC3-II, lizozomla otofagozomların füzyonu sırasında lizozomal hidrolazlar tarafından otofagozom membranından ayrıştırılır.

Otofajinin indüklenmesi, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesini uyarır. Bu nedenle, LC3-II otofajiye özgü bir belirteç olarak kullanılmaktadır (55, 56).

2.5.3.2. Beklin-1 geni

Otofaji, çok sayıda otofaji ile ilişkili genler aracılığıyla düzenlenen kompleks bir süreçtir. Beklin-1 mayalarda bulunan Atg6'nın homologu olup, insanlarda otofajik yolakta yer alan ilk tanımlanmış bir gendir (51, 52).

Beklin-1, hücre farklılaşması, apoptoz ve otofajide önemli bir rol oynayan çok fonksiyonlu bir proteindir. Beklin-1 birden fazla yardımcı faktörler ile (Atg14L, UVRAG, Bif-1, Rubicon, Ambra1, HMGB1, IP3R) etkileşim oluşturarak otofajiyi tetikler, bu açıdan otofajik yolakta önemi büyüktür (33, 51).

2.6. siRNA İle Gen Susturma

İnterferans RNA (RNAi) mekanizması mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlar tarafından kullanılan bir mekanizmadır. Gen ifadesinin susturulmasını sağlayan RNAi yolakları, "small interfering RNA (siRNA)" ve mikro RNA (miRNA) adı verilen küçük kodlanmayana RNA'lar ile gerçekleşir (53). Hücrenin gelişimi, farklılaşması, hücre çoğalması ve apopitoz gibi önemli biyolojik olayların düzenlenmesinde görevlidirler (54). Özelllikle siRNA'lar hedef dizilerine mükemmel eşleşme gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı, hedef genlerin fonksiyonlarını araştırmak için üretilen sentetik siRNA'lar son yıllarda son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. siRNA'lar, lipozom veya benzeri sistemler aracılığıyla işlemi ile kültürdeki hücrelere aktarılabildiği gibi, doğrudan gelişmiş canlı sistemlere de uygulanmaktadır (54). Ayrıca siRNA'lar hedef geni etkili bir şekilde susturulabildiği için, bu teknoloji çeşitli hastalıklarda özellikle de kanser tedavisinde büyük bir terapötik potansiyele sahip olarak görülmekte ve hatta faz II ve III denemeleri yapılan siRNA'lar bulunmaktadır (54-56).

3.YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. Laminar Akım Kabini (Clean Air)

2. CO_2 'Li İnkübatör (Panasonic, MCO-19 A/C(UV))

3. Soğutmalı Santrifüj (Beckman Counter)

4. Hassas Terazi (Sanyo)

5. Su Banyosu (Sanyo)

6. Çalkalayıcı (Heidolph)

7. Derin Dondurucu -20 (Uğur)

8. Buzdolabı +4 (Siemens)

9. Invert Mikroskop (Leica)

10. Otoklav (Alp, CL-40M)

11. Pipet Tabancası (Gilson)

12. Mikropipet Seti (Gilson)

13. Vorteks (Heidolph)

14. Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)

15. Biorad Western Görüntüleme Cihazı (ChemiDocMP)

16. Floresan Mikroskop (Nicon TI)

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. RPMI 1640 (Gıbco)

2. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gıbco)

3. L-Glutamin (Gibco)

4. Penisilin-Streptomisin (Gibco)

5. Tripsin-EDTA (%0,05) (Gibco)

6. Serolojik Pipet 5 ml, 10 ml, 25 ml (Grenier)

7. Steril 6-24-96 Kuyucuklu Plaklar (Grenier)

8. Pipet Ucu 0,1-10 µl, 5-200 µl, 200-1000 µl (Greiner)

9. Hücre Kültür Plakları 25 cm^2 (Grenier)

10. Hücre Kültür Plakları 75 cm^2 (Grenier)

11. Cryo Tüp Steril (Isolab)

12. Fosfat Buffer Saline (PBS) (Biochrom)

13. Metanol (Merck)

14. Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck)

15. Blotting Grade Blocker (Biorad,)

16. Tween 20 (Biorad, kat-no.)

17. Glycine (Sigma)

18. Tris (Merch-milipore)

19. Membran (Bio Rad, Biorad Immun Blot Pvdf)

20. Jel (Mini-Protean TGX, Precast Gel)

21. Filtre (Biorad Thick Blot Paper)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmamızda epitelyal yumurtalık kanser hücre hattı olarak SKOV3 hücre hattı kullanıldı.

Hücre Kültürü

Kültür işlemleri ve kültür işelemi için gerekli olan hazırlıklar steril ortamda Laminar air flow kabinde yapıldı.

Besiyeri Hazırlanması

RPMI 1640 medyum içerisine, inaktive edilmiş FBS, L-Glutamin ve Penisilin/Streptomisin ilave edilerek hücrelerin çoğalması için uygun besiyeri hazırlandı. Hazırlanan medyum kullanıncaya kadar +4 °C' de muhafaza edildi, kullanmadan önce çıkartılarak su banyosunda 37 °C' ye getirildi, daha sonra çalışmalarda kullanıldı.

Hücrelerin Pasajlanması

Etüvden çıkarılan flasklardan medyumları uzaklaştırıldı. Sonra Tripsin-EDTA flasklara eklenerek yapışan hücrelerin kaldırılması sağlandı. hücreler flasktan kaldırıldıktan sonra falkona alındı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldı.Dipte kalan pellet medyumla çözdürüldü ve medyum içeren yeni T-75' lik flasklara transfer edilerek hücrelerin pasajlanması sağlandı.

3.2.2. Kullanılan Small Interfering RNA (siRNA)' lar

SKOV3 hücrelerinde LC3 ve Beklin-1 genlerini baskılamak amacıyla iki farklı LC3 siRNA ve iki farklı Beklin siRNA kullanıldı. Ayrıca tüm deneylerimizde negatif kontrol olarak (herhangi bir geni baskılamayan) iki farklı kontrol-siRNA da kullanıldı.

Amacımıza uygun siRNA' lar, SASI_Hs numaralarına göre Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

Hücrelerin siRNA İle Transfeksiyonu

Hücrelerin siRNA ile transfeksiyonu için, transfeksiyon ajanı olarak hyperfect kullanıldı. Tüm siRNA transfeksiyon deneylerinde hücrelerin bulunduğu ortama hücre sayısına göre ayarlanarak siRNA eklendi ve hücrelerin siRNA ile 72 saat transfeksiyonu sağlandı. Tüm işlemler steril şartlarda laminar air flow kabinde yapıldı.

Hücrelerin Aç bırakılması

Bilindiği gibi açlık otofajiyi indükleyici majör bir etkendir. Bu nedenle otofajiyi indüklemek ve pozitif kontrol olarak kullanmak için, çalışmamızda kullanılan hücrelerin bir kısmı da serum içermeyen (FBS -) besiyerinde aç bırakılarak çoğaltıldı. Tüm bu işlemler steril ortamda laminar air flow kabin kullanılarak yapıldı.

3.2.3. Western Blot Analizi

Western blot analizi hedef proteinlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Western blot analizi hedef proteinlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir.

Western blot analizi için, amaca uygun şartlarda çoğaltılan hücreler toplandı. Toplanan hücreler, hücre liziz tamponu kullanarak parçalandı ve bu hücrelerden proteinler izole edildi. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı ve tüm hücrelerden elde edilen proteinler eşit konsantrasyonlarda SDS-PAGE jele yüklendi, yürütme tamponu varlığında elektroforez tankında elektrik akım varlığında 2-3 saat jelde proteinlerin yürümesi (ayrılması) sağlandı. Daha sonra proteinler, jelden membrana transfer edildi. Sonra hazırlanan membranlarda hedeflenen proteinlerin ekspresyonları görüntüleme sistemi (Bio-Rad) kullanılarak analiz edildi.

3.2.4. Hücre Proliferasyon/Büyüme Analizi

Methods For Testingand specification (MTS) hücrelerin canlılık/proliferasyon oranlarını analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda kullanılan hüreler 96'lık plate'lere ekildi. İnkübasyonlarının 24. saatinde LC3, Beklin-1 ve kontrol

siRNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyonların 72. saatinde hücrelerin inkübasyonları sonlandırıldı. Bir kısım hücreler ise inkübasyonlarının 96. saatinde, 0, 2 ve 4 saat serum içermeyen medyum içerisinde inkübe edilerek aç bırakıldı. Daha sonra tüm hücrelerin canlılık oranları PMS/MTS solusyonu kullanılarak ELISA reader'da ölçümü yapıldı.

3.2.5. Asidik Veziküllerin (Otofajik Veziküllerin) Tespiti

Akridin oranj, asidik veziküler oluşumları (otofajik veziküller, lizozom, endozom, otofagozom vb.) belirlemek için kullanılan floresan bir boyadır. Akridin oranj, asidik veziküler yapıların etrafında birikerek sarı-turuncu görüntü oluştururken, sitoplazmayı da yeşile boyar. Çalışmamızda asidik veziküler oluşumları belirlemek için, hücreler medya içeren 6'lık kaplara ekildi ve 37 °C'lik etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun 24. saatinde hücreler LC3, Beklin-1 ve kontrol siRNA'larla transfekte edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde inkübasyon sonlandırıldı. Bir kısım hücrelerde inkübasyonlarının 96. saatinde serum içermeyen medyum içerisinde 0, 2 ve 4 saat inkübe edilerek aç bırakıldı. Sonra, tüm hücreler için, ortamdan medyum uzaklaştırıldı ve akridin oranj ile boyandı ve hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri alınarak otofajik veziküler oluşumlar analiz edildi.

3.2.6. Klonojenik Tespit

Hücreler, kontrol siRNA, LC3 ve Beklin-1 siRNA'lar ile transfekte edildi ve transfeksiyon sonrası bu hücrelerde klon oluşumu araştırıldı. Bunun için; medyum bulunan 6'lık plate'lere uygun miktarlarda hücreler ekildi ve kültürün 48. saatinde hücrelere siRNA (LC3, Beklin-1 ve kontrol siRNA) transfekte edildi ve sonra 10-12 gün 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, ortamdan medyum uzaklaştırıldı ve hücreler metanolle hazırlanmış %10'luk kristal-viyole ile boyandı.

3.2.7. Apoptoz (Annexin-V) Analizi

Apoptoza giden hücrelerin membran yapısında değişiklikler meydan gelir. Normalde hücre membranın sitozole bakan yüzünde (iç yüzünde) bulunan fosfotidil serin, apopitoza giden hücrelerde membranın iç yüzünden dış yüzüne taşınır. Annexin-V

membranın dış yüzünde bulunan fosfotidil serini boyar. Bu nedenle yaygın olarak apopitoz analizinde Annexin-V yöntemi kullanılır.

Bir kısım hücreler medyum içeren kültür flasklarına ekildi ve inkübasyonlarının 24. saatiinde siRNA'lar (kontrol siRNA, LC3, Beklin-1) ile transfekte edildi. 72 saatlik siRNA transfeksiyonu sonrası hücreler toplandı. Bir kısım hücreler ise inkübasyonlarının 96. saatinde, 0, 2 ve 4 saat serum içermeyen medyum içerisinde inkübe edilerek aç bırakıldı ve açlık sonrası hücreler toplandı. Daha sonra,annexin-V kit içeriğine uygun şekilde hücreler işlemlerden geçirildi ve Muse cihazında apoptoz oranı ölçüldü.

3.2.8. Hücre Döngü Analizi

Hücreler medyum içeren kültür flasklarına ekildi ve inkübasyonlarının 24. saatinde siRNA'lar (kontrol siRNA, LC3, Beklin-1) ile transfekte edildi. siRNA'lar ile 72 saat muamele edildikten sonra hücreler toplandı. Hücre döngüsü analizi için kullanılan kitin içeriğine uygun şekilde hücreler işlemlerden geçirildi ve Muse cihazında analiz edildi.

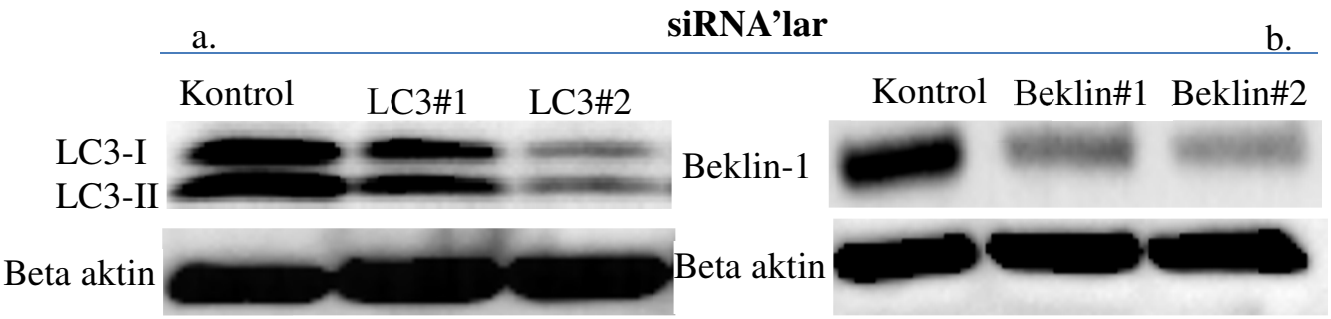
3.3 İstatistiksel Değerlendirme

Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerden elde ettiğimiz verilerle, LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte ettigimiz hücrelerden, ayrıca normal şartlarda çoğaltılan hücrelerle aç bırakılan hücrelerden elde ettiğimiz verileri karşılaştırmak amacıyla istatistik analizi yapıldı. Gruplar arasındaki farkı göstermek amacıyla non-parametrik-t testi kullanıldı. p degeri $p<0.05$'ten küçük çıkan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler için Graph Pad Prism 5 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. İki farklı LC3 ve iki farklı Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde , LC3 ve Beklin-1'in ekspresyon seviyeleri

Öncelikle çalışmamızda kullanılacak olan siRNA'ların hedefleri olan LC3, Beklin-1, ekpresyonlarını baskılayıp baskılamadığını belirlemek için hücreler LC3-1, LC3-2 ve Beklin-1, beklin-2 siRNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücrelerden proteinler izole edilerek westen blot analizi yapıldı. İki faklı LC3 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde LC3 protein ekpresyonunun (Şekil 5a) iki faklı Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde Beklin-1 protein ekpresyonunun (Şekil 5b), kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre azaldığı bulundu. Beta aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

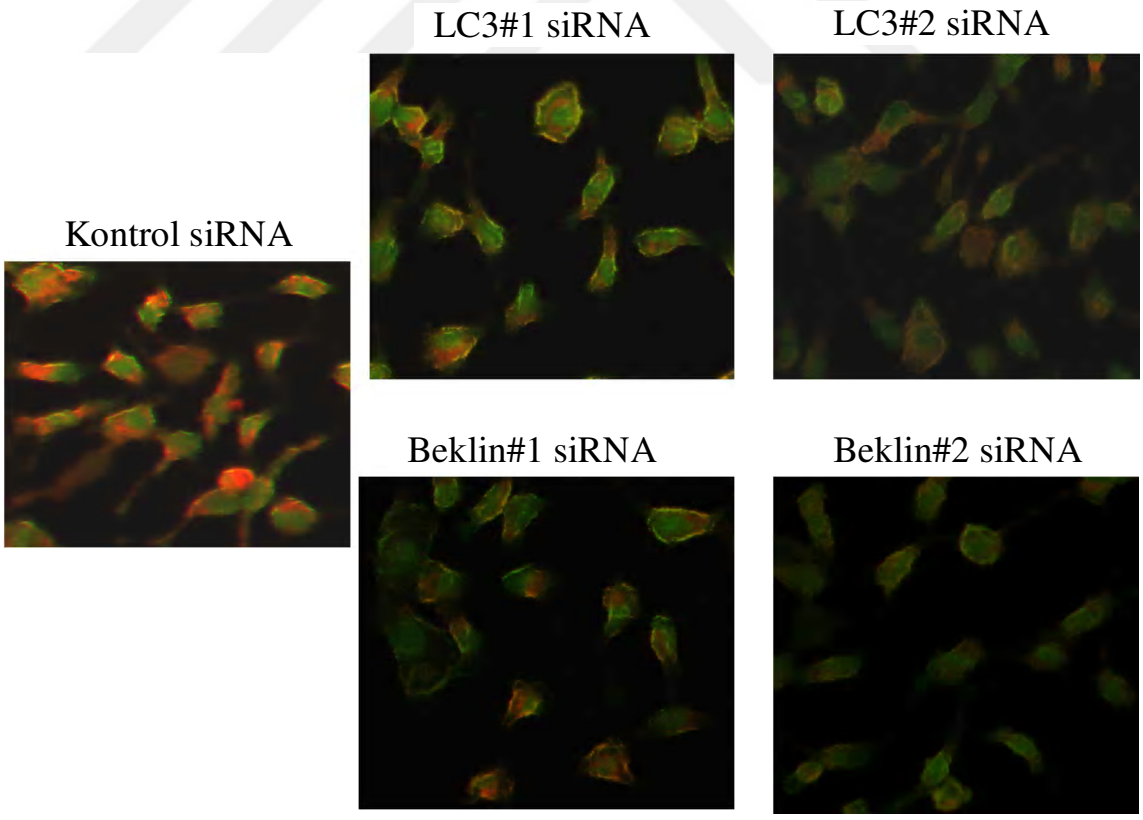


Şekil 5. Kontrol, LC3 ve Beklin-1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde bu siRNA'ların hedef aldıkları genlerin ürünü olan proteinlerin ekspresyon seviyeleri.

Western blot analiz sonuçlarımıza göre seçtiğimiz siRNA'ların hedefimiz olan genlerin ürünü olan proteinlerin ekspresyonlarını baskıladığı için seçtiğimiz bu siRNA'ların uygun siRNA olduğuna karar verildi ve bu aşamadan sonraki tüm deneylerimizde seçtiğimiz bu siRNA'lar kullanıldı.

4.2. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde asidik veziküler oluşumların analizi

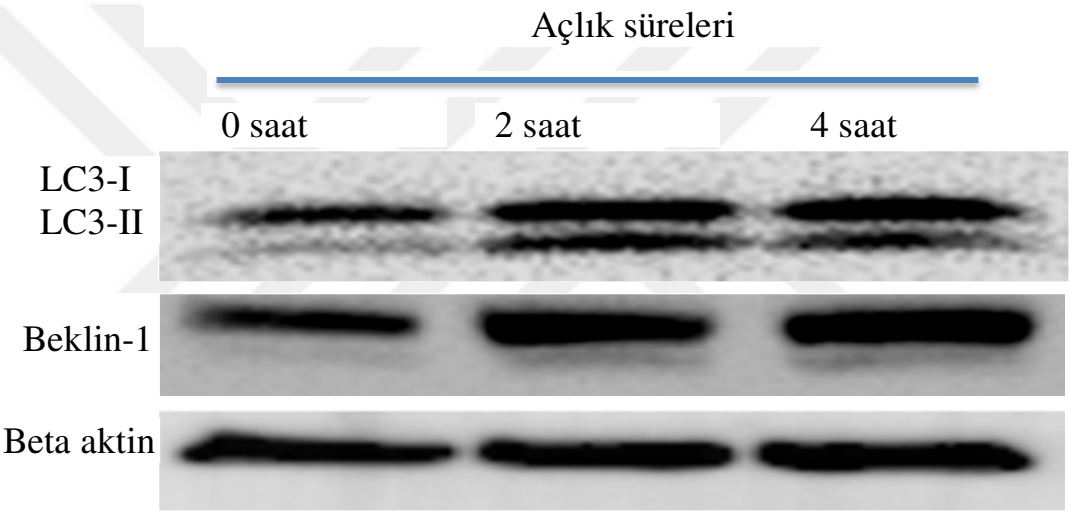
LC3, Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde otofajinin (asidik veziküler oluşumların) baskılanıp baskılanmadığını kontrol etmek amacıyla, bu siRNA'larla 72 saat transfekte edilen hücrelerde, transfeksiyon sonrası akridin oranjla boyama yapıldı ve floresan mikroskopta otofajik veziküller oluşumlar analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerde yoğun bir biçimde asidik veziküler oluşumlar tespit edilirken, LC3 ve Beklin1-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde asidik vezikülerin oluşumunda belirgin bir şekilde azalma tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. LC3 ve Beklin-1 ve kontrol siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde asidik veziküler oluşumlar.

4.3. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde LC3 ve Beklin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri

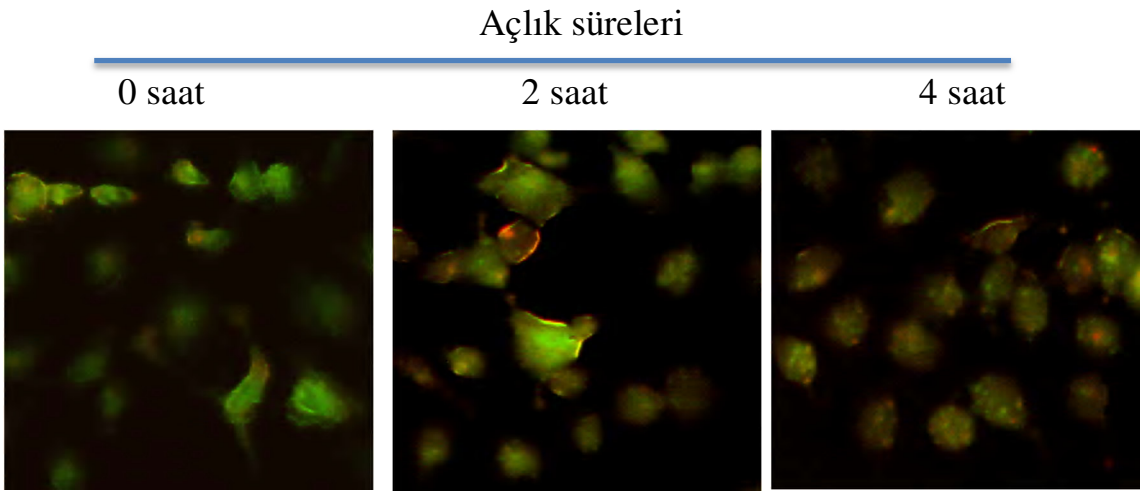
Bilindiği gibi açlık otofajiyi indükleyici major etkendir. Bu nedenle serum içermeyen kültür ortamında SKOV3 hücreleri aç bırakılarak otofajinin tetiklenmesi sağlandı ve daha sonra bu hücrelerde otofajinin belirteci kabul edilen LC3 ve Beklin-1 proteinlerinin ekspresyonları analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre 0. saate göre 2 ve 4 saat aç bırakılan hücrelerde LC3 ve Beklin-1 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı bulundu (Şekil 7). Bu sonuç bize hücreleri maruz bıraktığımız açlık ortamının otofajinin tetiklenmesi için uygun olduğunu gösterdi.



Şekil 7. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan hücrelerde LC3 ve Beklin-1 protein ekspresyon seviyeleri.

4.4. Farklı zaman aralıklarına aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde asidik veziküler oluşumların analizi

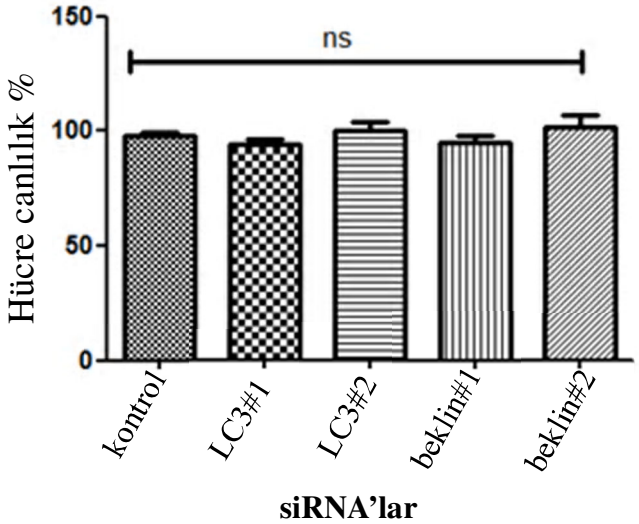
SKOV3 hücreleri 0, 2, 4 saat olmak üzere farklı zaman aralıklarında serum içermeyen medyumlu ortamda inkübe edildi ve sonra otofajinin tetiklenip tetiklenmediğini kontrol etmek amacıyla asidik veziküler oluşumlar analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre 0. Saate göre 2 ve 4 saat aç bırakılan hücrelerde asidik veziküler oluşumların arttığı bulundu (Şekil 8).



Şekil 8. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde asidik veziküler oluşumlar.

4.5. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde hücre proliferasyon oranı

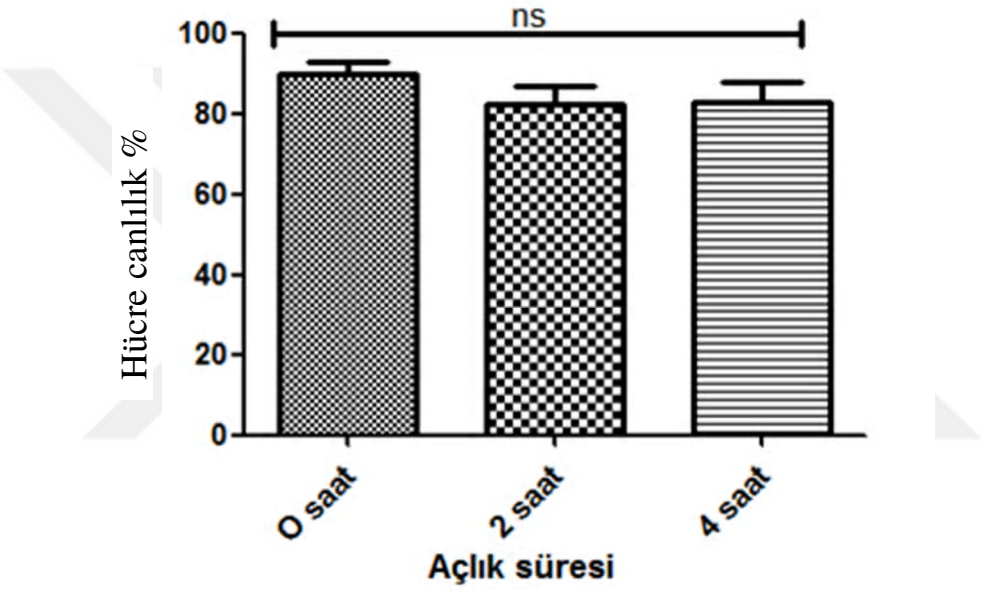
Hücreler hücre sayısına uygun olacak şekilde iki farklı LC3 siRNA, Beklin- siRNA ve kontrol siRNA ile 72 saat transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası, hücrelerin proliferasyon/canlılık oranı. MTS analiz ile belirlendi. Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, kontrol siRNA ve hedefimiz olan siRNA'larla transfekte edilen hücreler arasında, canlılık oranı açısından anlamlı bir fark olmadığı bulundu (Şekil 9).



Şekil 9. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde proliferasyon oranı.

4.6. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde hücre proliferasyon oranı

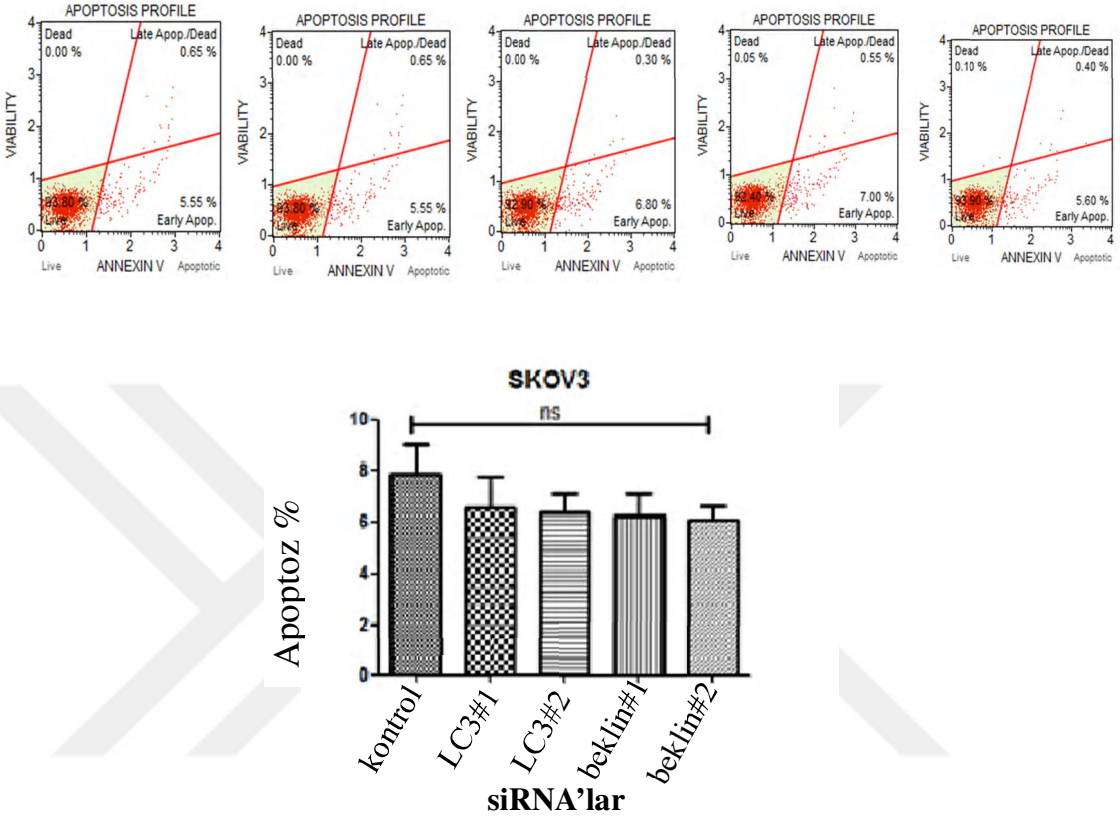
Hücreler inkübasyonlarının 96. saatinde 0, 2 ve 4 saat süreyle serum içemeyen ortama maruz bırakılarak aç kalmaları sağlandı. Daha sonra açlık süreleri dolan hücrelerde hücre canlılık oranını belirlemek için MTS analiz yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre, açlığın SKOV3 hücrelerinin canlılığını/proliferasyonununu azalttığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu (Şekil 10).



Şekil 10. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinin canlılık oranı.

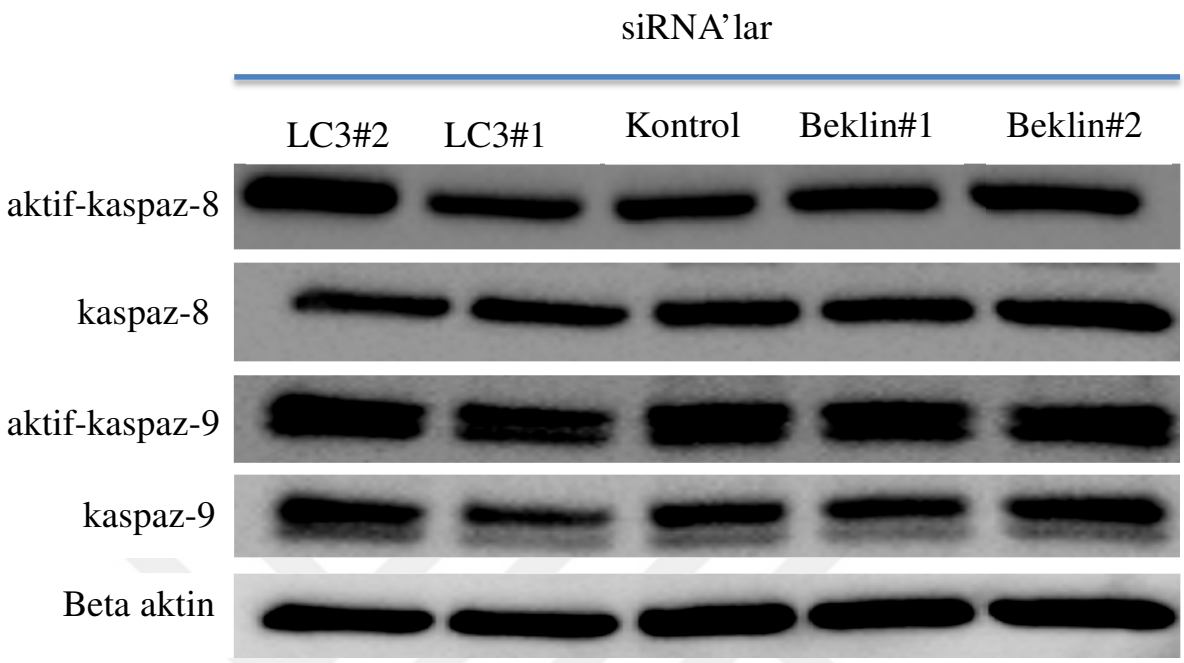
4.7. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı ve kaspaz sinyal yolağının aktivasyonu

Hücreler hücre sayısına uygun olacak şekilde iki farklı LC3 siRNA, Beklin- siRNA ve kontrol siRNA ile 72 saat transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası, hücrelerde apoptoz oranını test etmek için Anneksin-V analizi yapıldı. Yapılan analiz sonuçlarımıza göre, LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, apoptoz oranının kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre kısmen azaldığı bulundu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu (Şekil 11).



Şekil 11. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı.

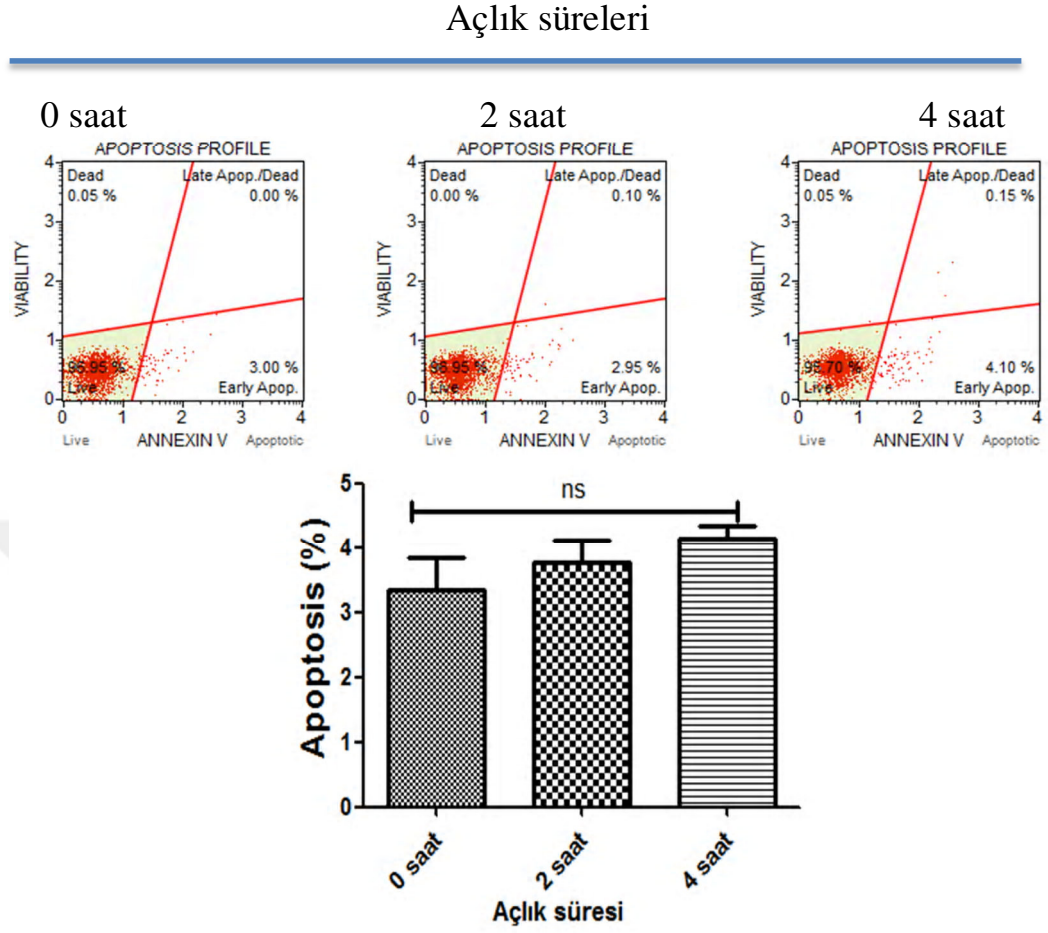
LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde apoptoz sinyal yolağında görev yapan kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin ekpresyon seviyeleri western blot analiz ile değerlendirildi. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle hedeflediğimiz siRNA'larla transfekte edilen hücreler arasında kaspaz proteinlerinin ekspresyonu açısından fark olmadığı bulundu (Şekil 12).



Şekil 12. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde kaspaz proteinlerinin ekspresyonları.

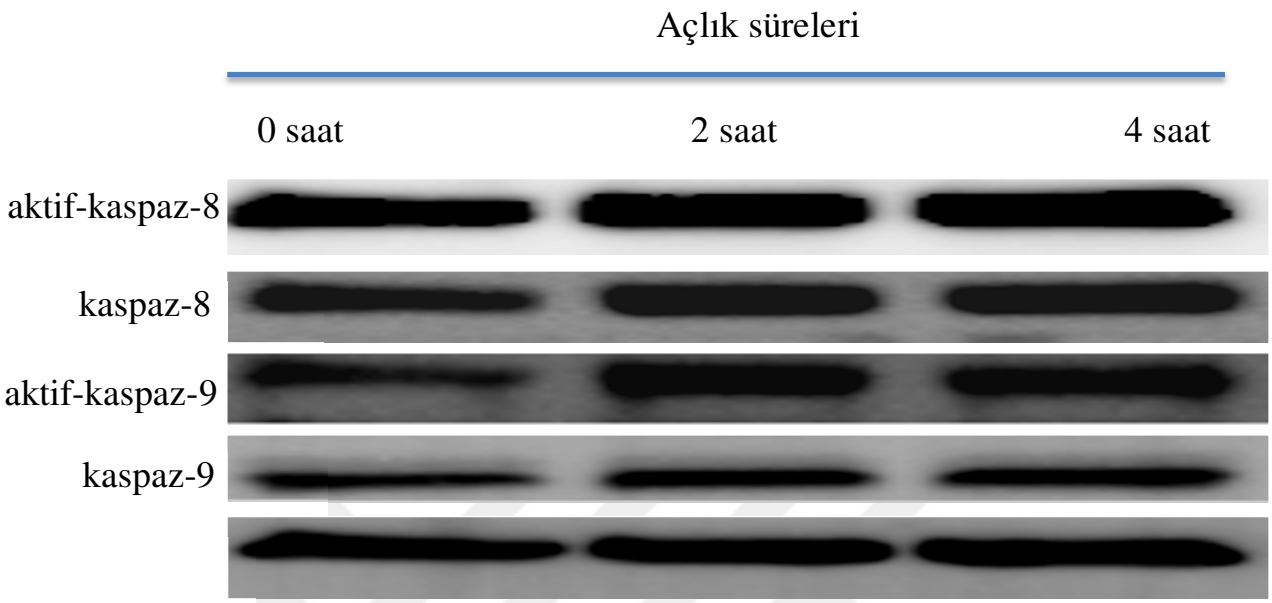
4.8. Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı ve kaspaz sinyal yolağının aktivasyonu

SKOV3 hücreleri inkübasyonlarının 96. saatinde 0, 2 ve 4 saat süreyle serum içermeyen ortamda maruz bırakılarak aç kalmaları sağlandı. Daha sonra açlık süreleri dola hücrelerde apoptoz oranını belirlemek için Anneksin-V analizi yapıldı. Analiz sonuçalarımıza göre, aç kalma süresine bağlı olarak hücrelerde apoptoz oranının kısmen arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olamadığı bulundu (Şekil 13).



Şekil 13. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde apoptoz oranı.

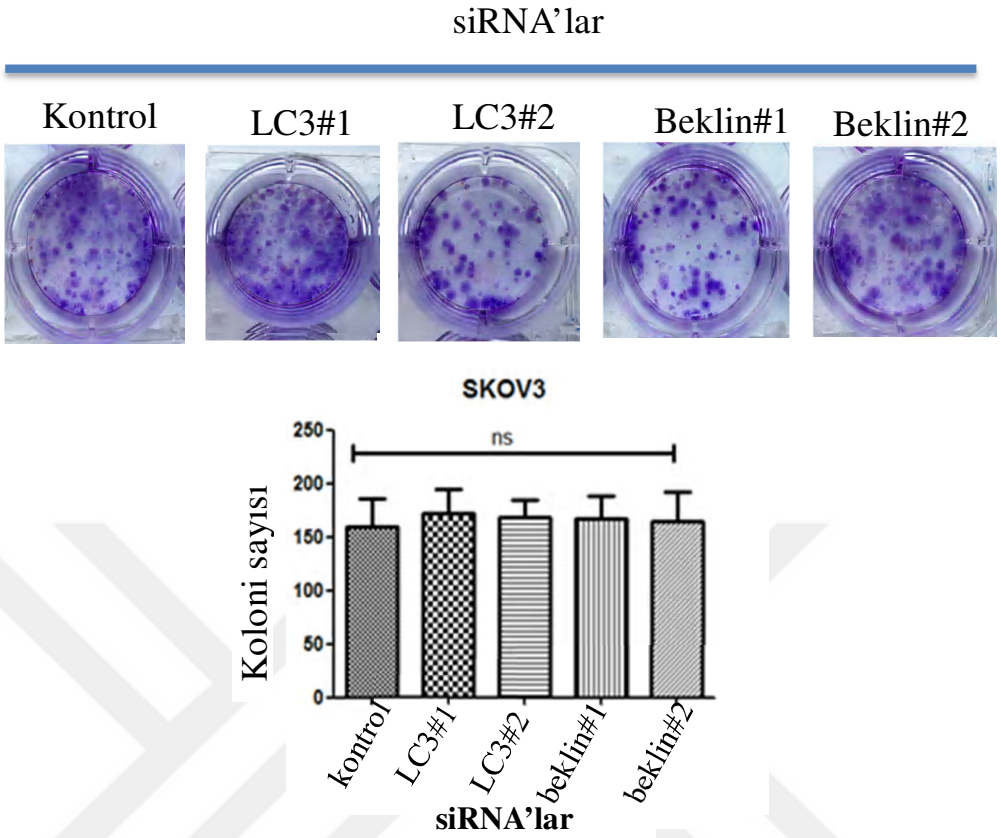
Farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde apoptoz sinyal yolağında görev yapan kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin ekpresyon seviyelerinde açlığa bağlı olarak değişim olup olmadığını analiz etmek için western blot analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre, SKOV3 hücrelerine açlığın kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekpresyon seviyesini etkilemediği bulundu (Şekil 14).



Şekil 14. 0, 2 ve 4 saat aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde aktif-kaspaz-8 kaspaz-8 ve aktif-kaspaz-9, kaspaz-9 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri.

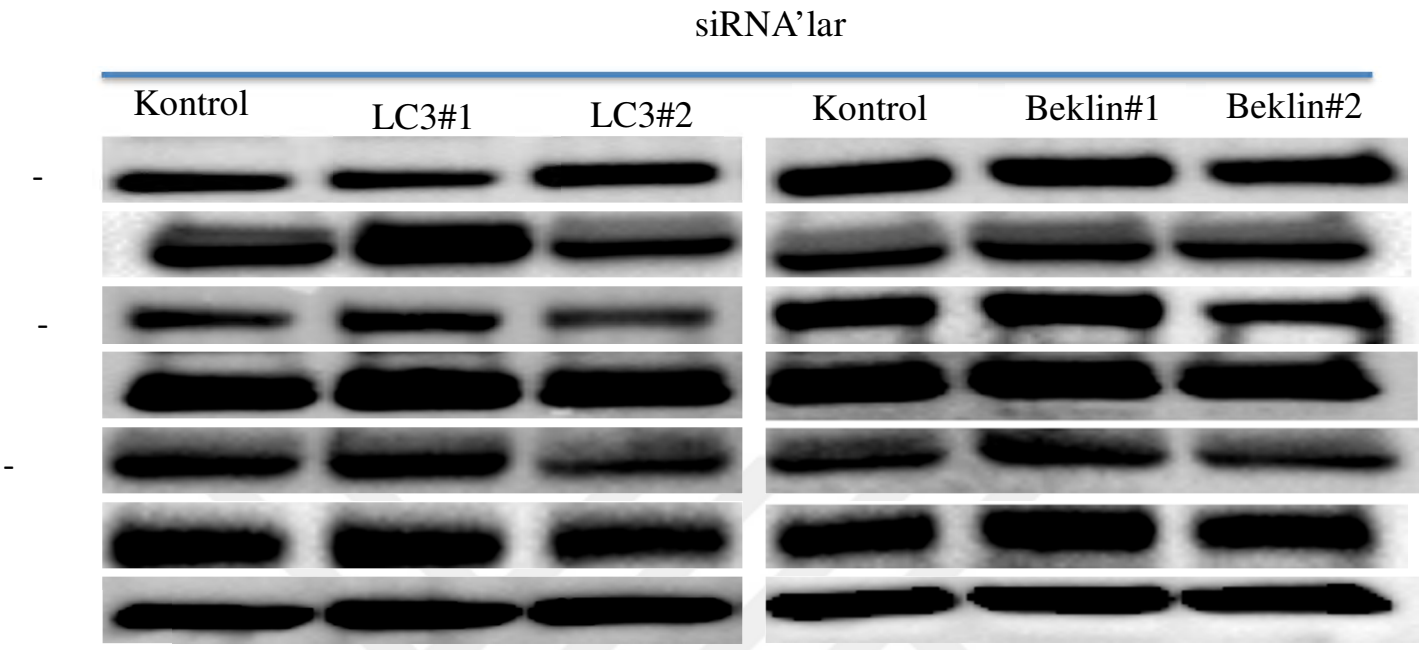
4.9. İki Farklı LC3 ve İki Farklı Beklin-1 siRNA'larla Transfekte Edilen SKOV3 Hücrelerinde Klon Oluşumu Ve Klon Oluşumdan Medyatör Olan Proteinlerin Ekpresyon Seviyeleri

SKOV3 hücreleri iki farklı LC3 ve iki farklı Beklin-1 siRNA ve kontrol siRNA kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası klon oluşumu analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre LC3 ve Beclin-1 siRNA'larla transfekte edilen hücrelerle kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler arasında klon oluşumu açısından fark bulunamadı (Şekil 15).



Şekil 15. LC3 ve Beklin-1 siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde klon oluşumu.

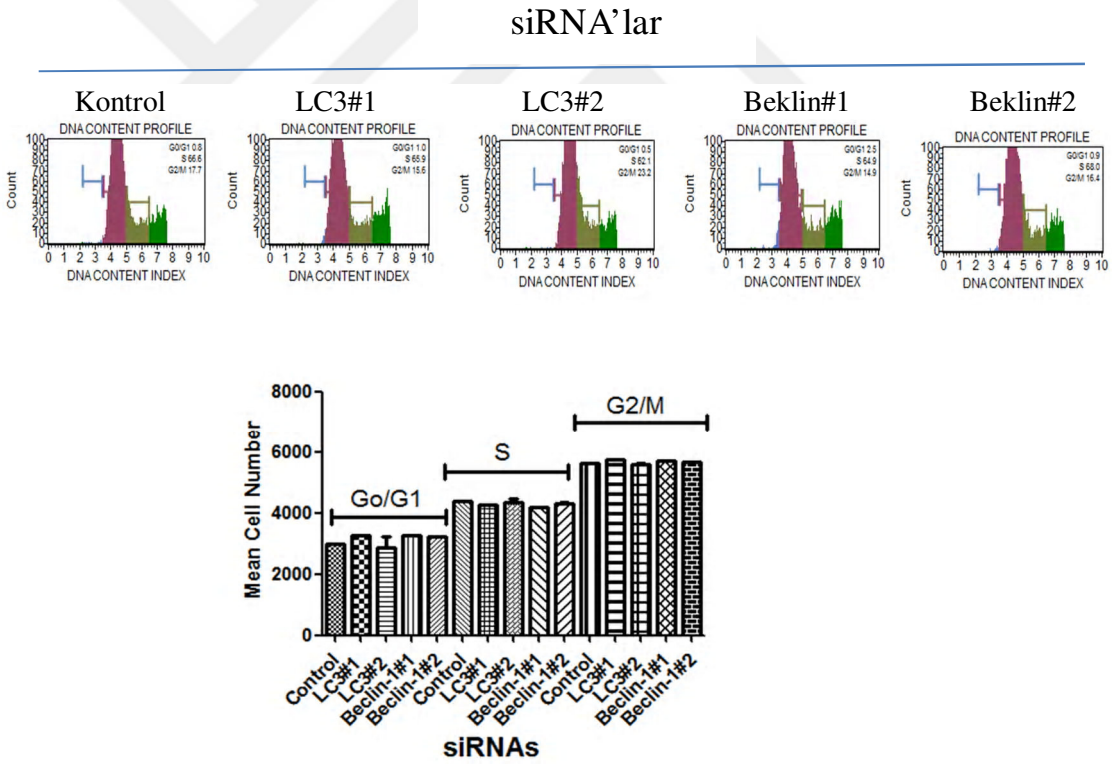
LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde hücre çoğalmasında onkogen (ERK, Src) ve tümör süpressör (PTEN) olarak görev yapan proteinlerin ekpresyon seviyeleri western blot ile analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre kontrol siRNA ve hedefimiz olan LC3 ve Beklin siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde ERK, Src ve PTEN proteinlerinin ekpsresyon seviyeleri açısından fark olmadığı bulundu (Şekil 16).



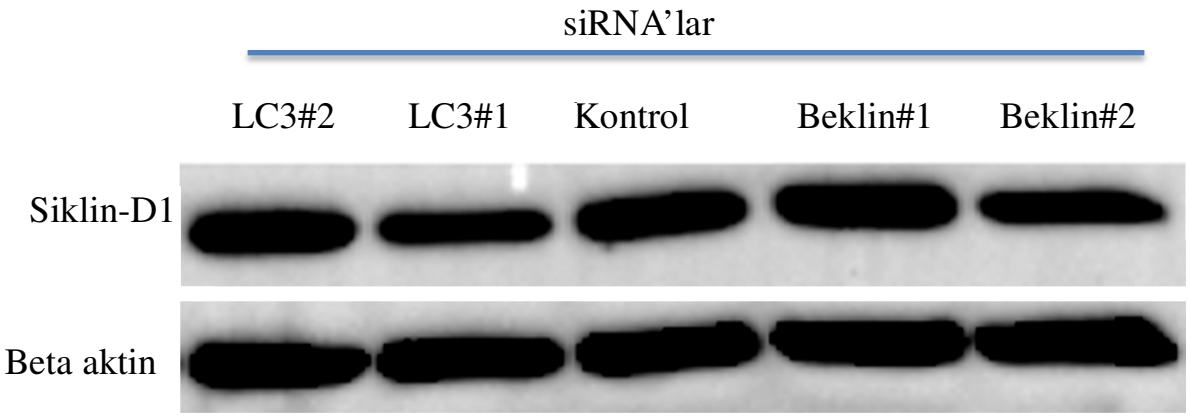
Şekil 16. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile trasfekte edilen hücrelerde hücre çoğalmasında görev alan medyatör proteinlerin ekspresyon seviyeleri.

4.10. İki Farklı LC3 ve İki Farklı Beklin siRNA'larla Transfekte edilen hücrelerde hücre döngü analizi ve hücre döngüsünde rol alan proteinlerin ekspresyonları seviyeleri

SKOV3 hücreleri iki farklı LC3 ve iki farklı Beklin-1 siRNA ve kontrol siRNA kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücrelerde hücre döngü analizi yapıldı. Analiz sonuçlarımıza göre, kontrol siRNA ve hedef siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde, hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan ortalama hücre sayılarının birbiri ile benzer olduğu bulundu (Şekil 17). Hem kontrol siRNA ile hem de LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde G0/G1 fazında bulunan hücre sayısının az olduğu, hücrelerin büyük bir çoğunluğunun G2/M fazında olduğu tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile trasfekte edilen hücrelerde hücre döngüsü analizi.



Şekil 18. LC3 ve Beklin-1 siRNA ile trasfekte edilen hücrelerde hücre döngüsünde rol alan cyclin-D1 proteinin ekspresyon seviyesi.

LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde hücre döngüsünün G1 evresinde görev yapan Siklin-D1 proteinin ekspresyon seviyesi western blot ile analiz edildi. Analiz sonuçlarımıza göre kontrol siRNA ve hedefimiz olan LC3 ve Beklin-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde Siklin-D1 ekspresyon seviyesinin benzer olduğu bulundu (Şekil 18).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yumurtalık kanserleri dünyada görülen kanserler arasında en yaygın ikinci sırayı alan kanserler olarak bilinmektedir. Dünyada heryıl 200.000'den daha fazla kadını etkilemektedir. (4). Yumurtalık kanserler spefisik semptomlar göstermez bu nedenle vakaların 2/3 ü ileri evreye gelinceye kadar teşhis edilemez. Ameliyat gibi klasik tedavi yöntemleri ve yeni geliştirilen kemoterapik ajanlar kısmen iyileşmeye yol açmaktadır. Ancak yumurtalık kanser hücreleri kemoteröpatik ajanlara karşı direnç geliştirdikleri için ve agresif tipleri diğer dokulara metastaz yaptığı için iyileşme oranının % 75'i geçmediği bildirilmektedir (46).

Yumurtalık kanseri teşhis konduktan sonra tip-I'lerin %90, tip-II'ler %75 ve daha ileri derecede olan tip-III-IV tipte olanların % 25'i en fazla 5 yıllık bir ömre sahip olduğu rapor edilmiştir (4). Bu yüzden bu kanserlerin erken teşhisi ve gelişimini takip edebilmek için yeni biyomarkerlar ve yeni terapötik ajanların geliştirilmesi gerektiği önerilmektedir (4, 9, 47).

Otofaji, evrimsel olarak korunmuş bir lizozomal yıkım yoludur ve hücrelerin metabolik stres şartlarında adaptasyonunu sağlar. Bunun yanısıra, indüklenmiş aşırı otofaji, otofajik hücre ölümüne yol açabilir ve bu da tip II programlı hücre ölümü olarak bilinir (56-59). Otofajinin hücrelerde çift yönlü etki göstermesinden dolayı, çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda, otofajinin işlevinin hala tartışmalı olduğu rapor edilmektedir. Benzer şekilde, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin rolü incelendiğinde; Yumurtalık kanser hücrelerinde, otofajinin aktivasyonunun kemoterapiye rezistansta önemli rol oynadığı ve otofajinin baskılanmasının terapötik ilaçlara karşı kanser hücrelerinde duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (60-62). Yine, kemoterapik ajanların yumurtalık kanser hücrelerinde otofajiyi uyardığı ve uyarılan otofaji baskılandığı zaman, bu hücrelerde proliferasyonunun baskılandığı gösterilmiştir (47). Tersine, yumurtalık kanser hücrelerinde , artmış otofaji seviyesinin bu hücrelerin

agresif davranışını azalttığı ve kemoterapiye cevabı artırdığı gösterilmiştir (48). Yine yapılan başka bir çalışmada da, yumurtalık kanser hücrelerinde otofaji uyarıldığı zaman hücre çoğalmasının baskılandığı apopitozun uyarıldığı gösterilmiştir ve bu çalışma grubu yumurtalık kanser hücrelerinde II. Programlanmış ölüm mekanizması olarak görev yaptığı ileri sürülmüştür (4). Bizim verilerimize göre ise, hem açlıkla uyarılmış otofajinin hem de Beklin-1 ve LC3 aracılı baskılanmış otofajinin SKOV3 hücrelerinin klon oluşumu ve apopitozda bir rolünün olamdığını göstermiştir. Hem bizim çalışma verilerimiz hem de literatür bilgileri, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin rolü ile ilgili bir çelişkinin olduğunu ve yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin rolünün aydınlatılması için çalışmaların devam etmesi gerektiğini düşündürtmektedir.

Birçok hücrede otofajik aktiviteyi değerlendirmek için LC3 ve Beklin1 yaygın olarak kullanılmaktadır (63). Sunulan çalışmada da, LC3 ve Beklin-1 genlerini hedef alan siRNA'larla transfekte edilen SKOV3 hücrelerinde, siRNA'lar aracılığıyla bu genler baskılandığında asidik veziküler oluşumların ve dolayısıyla bu siRNA'lar aracılığıyla otofajik aktivitenin baskılandığı bulundu. Elde ettiğimiz sonuçlarımız, literatürdeki verilerle benzer olup, LC3 ve Beklin-1 genlerinin SKOV3 hücrelerinde de otofajik aktivitenin düzenlenmesinde rol oynadığını ve SKOV3 hücrelerinde otofajik aktivitenin belirteci LC3 ve Beklin-1'in olarak kullanılabileceği bulundu.

Otofaji açlıkla tetiklenen bir mekanizma olarak bilinmektedir (59, 64-67). Bu nedenle, çalışmamızda SKOV3 hücreleri farklı zaman aralıklarında serum içermeyen ortamlarda aç bırakıldı ve açlıktan sonra hücrelerde otofajik aktivite değerlendirildi. Hücrelerde otofaji indüklendiği zaman, sitozolik LC3-I'e fosfatidetetanolamin (PE) ilave edilerek LC3-II'ye dönüştürülür ve LC3-II otofagozom membranlarına lokalize olur. Dolayısıyla, LC3-II ekspresyonu otofaji indüksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (49, 68). Bu nedenle, çalışmamızda, aç kalan SKOV3 hücrelerinde otofajik aktiviteyi değerlendirmek için LC3-II proteininin ekspresyon düzeyleri incelendi. Aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde birkaç saat içinde LC3-II ekspresyonunun arttığı dolayısıyla açılığın SKOV3 hücrelrinde otofajinin aktivasyonu uyardığı bulundu. Benzer şekilde, Beklin-1 ekspresyonu serum açlığına yanıt olarak arttığı bulundu. Elde ettiğimiz verilerimiz, literatür verileri ile benzer olup, SKOV3 hücrelerinde de açlıkla otofajik aktivitenin uyarıldığını yani yumurtalık kanser hücrelerinde de serum açlığı ile oluşturulan stresin otofajik aktiviteyi uyardığını gösterdi. Ayrıca, SKOV3 hücrelerinde

açlık aracılığıyla otofajik aktivitenin uyarıldığı asidik vezikül oluşumundaki artışlarla da doğrulandı.

Yumurtalık kanser hücrelerinde, Beklin-1 genin de heterozigotluk kaybı olduğu ve Beklin-1 genin mono allel olarak bulunduğu bilinmektedir (69-73). Ancak yapılan bir çalışmada, Beklin-1 ekspresyonun hem yumurtalık kanser hastalarında hem de sağlıklı normal hastalarda benzer olduğu bulunmuştur. Fakat ilginç bir şekilde, aynı çalışmada bu hastalarda Beklin-1 ekspresyonunun baskılanmasının otofaji üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, yumurtalık kanser hücre hattı olan CaOV3, OVCAR8, SKOV3 ve HeyA8 hücrelerinde yapılan çalışmalarda da Beklin-1 ekspresyonun otofajik aktivite de bir rol oynamadığı gösterilmiştir (74). Halbuki bizim souçlarımız, Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde otofajik veziküler oluşumlar azaldığı, açlık şartlarında Beklin-1 ekpresyonunun arttığı dolayısıyla SKOV3 hücrelerinde Beklin-1'in otofajik aktivite de rol oynadığını göstermektedir. Ancak, akridin oranj boyama ile otofajik veziküller dışında endozom, lizozom gibi asidik veziküler oluşumlar da tespit edilmektedir. Bu nedenle Beklin-1 geninin SKOV3 hücrelerinde otofajik aktivite de rol alıp almadığını doğrulamak için, otofajik aktiviyeti gösteren kantitatif bir analizin yapılamasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Yumurtalık kanser hücrelerinde, Beklin-1 ekspresyonunun tanımlanmamış bir mekanizma ile hücre canlılığına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (74). Bizim çalışmamızda ise yapılan MTS ve apopitoz analiz sonuçlarımıza göre Beklin-1'in SKOV3 hücrelerinde, hücre canlılığında ve apoptozda bir rolünün olmadığı gösterilmiştir.

Yumurtalık kanseri olan hastalarda, LC3 ve Beklin-1 ekspresyonlarının normal sağlıklı kişilere göre yüksek olduğu ve LC3 ve Beklin-1 ekspresyon seviyesi ile yumurtalık kanser hastalarının kötü prognozu arasında bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (75). Benzer şekilde, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajik aktivitenin yüksek olduğu ve artmış otofajik aktivitenin hücrelerin metastaz yapmasında katkıda bulunduğu gösterilmiştir (76, 77). Halbuki, bizim çalışmamızda, LC3 ve Beklin-1 siRNA aracılı ile otofaji baskılandığında, kanser hücrelerinin en temel özelliklerinden biri olan klon oluşumunda ve apopitoz oranında bir değişiklik olmadığı bulunmuştur.

Otofaji rolünden dolayı aç kalan hücrelerin enerji ve besin talebini karşılar. Ancak hücrelerde sürekli devam eden otofajinin, otofajiye bağlı hücre ölümüne yol açtığı ileri sürülmektedir (69). Bizim daha önce yaptığımız çalışmada ise, normal epitel hücrelerinde açlık sonrasında hücre canlılığının/proliferasyonun azaldığı bulunurken, agresif meme kanser hücrelerinde ise açlık sonrası hücre canlılığının daha da arttığı gösterildi (70). Tam tersi olarak, sunulan bu çalışmamız da ise, açlığın SKOV3 hücrelerinde hücre büyümesi ve çoğalması üzerinde bir etkiye sahip olmadığı bulundu.

Bu durum, açlık şartlarında hem farklı kanser tiplerinde hem de normal/sağlıklı epitel hücrelerinde farklı sinyal yolaklarının devreye girdiğini ve hücrelerde farklı cevapların oluşmasına yol açtığını göstermektedir.

Besin kıtlığı hücrelerde önemli bir stres kaynağıdır. Besin kıtlığına normal hücrelere göre kanser hücreleri çok hızlı çoğaldıkları için daha fazla maruz kalırlar. Ancak, kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak, sürekli olarak çoğaldıkları için normal hücrelerden daha fazla besine ihtiyaç duyarlar ve özellikle de agresif ve hızlı büyüyen tümör hücreleri çok ciddi besin eksikliğine maruz kalırlar. Kanser hücreleri canlı kalabilmek ve bu stres şartlarının üstesinden gelebilmek için farklı mekanizmalar geliştirirler. Bu yüzden kanser hücreleri ve normal hücreler açlık şartlarıyla özellikle de serum eksikliğiyle karşılaştıklarında farklı cevap verirler (69). Bizim daha önce yaptığımız çalışmada serum içermeyen ortamda inkübe edilen normal hücrelerde açlık apopitozu tetiklerken, agresif meme kanser hücrelerinde açlık apopitozu baskıladı (70). Oysa SKOV3 hücrelerinde açlığın apopitoz oranını etkilemediği bulundu.

Bu veriler, normal epitel hücrelerinde açlıkla uyarılmış otofajinin, normal epitel hücrelerinde bir ölüm mekanizması olarak davrandığını, agresif meme kanser hücrelerinde hücre canlılığını koruyucu bir mekanizma olarak görev yaptığını, farklı bir kanser tipi olan SKOV3 hücrelerinde ise otofajinin hücre canlılığında ve ölümünde bir rolünün olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, aynı strese karşı farklı hücrelerin farklı tepki göstermelerinin, farklı sinyal yolaklarının aktifleşmesine veya baskılanmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Hücre proliferasyonu, apopitoz ve hücre döngüsü biriyle yakından ilişkilidir. Bu yüzden çalışmaızda LC3 ve Beklin-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde hücre döngüsü analizi yapıldı. Kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerle benzer şekilde hücre döngüsünün S ve G2/M fazında oldukları tespit edildi. Bu sonuclarımız, MTS, apoptoz verilerimizi doğruladı.

Aynı zamanda, apopitoz ve hücre dögüsü verilerimizle uyumlu olarak, hem LC3 ve Beklin-1 ekspresyonlarının susturulduğu SKOV3 hücrelerinde hem de farklı zaman aralıklarında aç bırakılan SKOV3 hücrelerinde, kaspaz aracılı apopitozda rol oynayan kaspaz ve hücre döngüsünde görev yapan Siklin-D1 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin değişmediği bulundu. Ayrıca bu hücrelerde onkogenik protein olan ve hücre çoğalmasında medyatör olarak görev yapan pSrc , pERK proteinlerinin ve tümör süpressör olarak görev yapan PTEN proteinin ekspresyon seviyesinde değişiklik olmadığı bulundu.

Literatürde, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin rolü ile ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalar, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin koruyucu bir rol oynadığını, hücre canlılığın katkıda bulunduğunu, otofaji inhibitörleri aracılığıyla otofaji baskılandığı zaman hücre ölümünün indüklendiğini bildirmiştir (78-81). Bazı çalışmalar ise, yumurtalık kanser hücrelerinde, indüklenmiş otofajinin hücre ölüm mekanizması olarak görev yaptığını ve hücre canlılığını baskıladığını (82-84), hatta baskılanmış otofajinin yüksek invazyon ve migrasyonla ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (84).

Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm sonuçlarımız ise, LC3 ve Beklin-1 siRNA aracılı otofajinin baskılandığı SKOV3 hücrelerinde veya açlıkla otofajik aktivitenin uyarıldığı SKOV3 hücrelerinde, hücre canlılığının, klon oluşumunun ve apopitoz oranının değişmediğini ortaya koydu. Bu verilerimiz, yumurtalık kanser hücrelerinde otofajinin koruyucu ve ya hücre ölümünü tetikleyici bir fonksiyon yapmadığını ve dolayısıyla bu kanserlerin tedavisi için otofajinin teröpatik bir hedef olmadığına işaret etmektedir. Ancak otofajinin karmaşık fonksiyonundan dolayı farklı kanser türlerinde farklı rol oynamaktadır. Bu nedenle, yumurtalık kanserlerinin başta ilaç dirençli tipleri olmak üzere başka tiplerinde otofajin rolü ile ilgili araştırmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Longuespée R, Boyon C, Desmons A. Ovarian cancer molecular pathology. Cancer Metastasis Rev 2012; 31(3-4): p. 713-732.
2. Parker LP, Taylor DD, Kesterson S, et al. Gene expression profiling in response to estradiol and genistein in ovarian cancer cells. Cancer Genomics Proteomics 2009; 6(3): p. 189-194.
3. Gurung A, Hung T, Morin J, et al. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. Histopathology 2013; 62(1): p. 59-70.
4. Liu Y, Tao X, Jia L, Cheng KW. et al. Knockdown of RAB25 promotes autophagy and inhibits cell growth in ovarian cancer cells. Mol Med Rep 2012; 6(5): p. 1006-1012.
5. Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A et al. Delivery materials for siRNA therapeutics. Nat Mater 2013; 12(11): p. 967-977.
6. Piek JM, van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis: an alternative hypothesis. Adv Exp Med Biol 2008; 622: p. 79-87.
7. Bandera, C.A. Advances in the understanding of risk factors for ovarian cancer. J Reprod Med 2005; 50(6): p. 399-406.
8. Gultekin M, Dundar S, Kucukyildiz I, et al. Survival of gynecological cancers in Turkey: where are we at? J Gynecol Oncol 2017; 28(6): p. e85.
9. Zhang, C. and Qiu X. Andrographolide radiosensitizes human ovarian cancer SKOV3 xenografts due to an enhanced apoptosis and autophagy. Tumour Biol 2015; 36(11): p. 8359-8365.

10. Agarwal R, and Kaye S.B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. Nat Rev Cancer 2003; 3 (7): p. 502-516.

11. Valente G, Morani F, Nicotra G, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. Biomed Res Int 2014; 2014: p. 462658.

12. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, et al. Histological classification of ovarian cancer. Med Electron Microsc 2003; 36(1): p. 9-17.

13. Pharoah, P.D, and B.A, Ponder. The genetics of ovarian cancer. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2002; 16(4): p. 449-468.

14. Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, et al. Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. PLoS One 2007; 2(3): p. e268.

15. Song H, Ramus SJ, Shadforth D, et al. Common variants in RB1 gene and risk of invasive ovarian cancer. Cancer Res 2006; 66(20): p. 10220-10226.

16. Doherty JA, Rossing MA, Cushing-Haugen KL, et al. ESR1/SYNE1 polymorphism and invasive epithelial ovarian cancer risk: an Ovarian Cancer Association Consortium study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010; 19(1): p. 245-250.

17. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, et al. Estrogen receptor beta rs1271572 polymorphism and invasive ovarian carcinoma risk: pooled analysis within the Ovarian Cancer Association Consortium. PLoS One 2011; 6(6): p. e20703.

18. Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, et al. Lurie, G., et al., Vitamin D receptor rs2228570 polymorphism and invasive ovarian carcinoma risk: pooled analysis in five studies within the Ovarian Cancer Association Consortium. Int J Cancer 2011; 128(4): p. 936-943.

19. Zhou H, Luo MP, Schönthal AH, et al., Effect of reproductive hormones on ovarian epithelial tumors: I. Effect on cell cycle activity. Cancer Biol Ther 2002; 1(3): p. 300-306.

20. Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, et al. Estrogen receptor {beta}1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. J Endocrinol 2007; 193(3): p. 421-33.

21. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-77html (12.07.18)

22. Li AJ, Baldwin RL, Karlan BY. Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures. Am J Obstet Gynecol 2003; 189(1): p. 22-27.

23. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, De Duve, C, et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem J 1955; 60(4): p. 604-617.

24. Shintani, T. and D.J. Klionsky. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science 2004; 306(5698): p. 990-995.

25. Mizushima, N, Yoshimori T. and Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol 2011; 27: p. 107-132.

26. Tuttle, D.L. and W.A. Dunn, Jr. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. J Cell Sci 1995; 108 (Pt 1): p. 25-35.

27. Kawamura N, Sun-Wada GH, Aoyama M, et al. Kawamura, N., et al., Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. Nat Commun 2012; 3: p. 1071.

28. Uttenweiler A, Schwarz H, Neumann H, et al. The vacuolar transporter chaperone (VTC) complex is required for microautophagy. Mol Biol Cell 2007; 18(1): p. 166-175.

29. Dice, J.F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. Trends Biochem Sci 1990; 15(8): p. 305-309.

30. Cheung, Z.H. and N.Y. Ip. The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. Mol Brain 2009; 2: p. 29.

31. He, C. and D.J. Klionsky. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet 2009; 43: p. 67-93.

32. Hara T, Takamura A, Kishi C, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. J Cell Biol 2008; 181(3): p. 497-510.

33. Itakura, E. and N. Mizushima. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. Autophagy 2010; 6(6): p. 764-776.

34. Burman, C. and N.T. Ktistakis. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. FEBS Lett 2010; 584(7): p. 1302-1312.

35. Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S. et al. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. Autophagy 2005; 1(1): p. 46-52.

36. Itakura E, Kishi C, Inoue K, et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. Mol Biol Cell 2008; 19(12): p. 5360-5372.

37. Kihara A, Noda T, Ishihara N, et al. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol 2001; 152(3): p. 519-530.

38. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 1999; 402(6762): p. 672-676.

39. Yan Y, Flinn RJ, Wu H, et al. hVps15, but not Ca2+/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells. Biochem J 2009; 417(3): p. 747-755.

40. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. Annu Rev Biochem 2011. 80: p. 125-156.

41. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. J Cell Sci 2003; 116(Pt 9): p. 1679-1688.

42. Itoh T, Fujita N, Kanno E, et al. Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. Mol Biol Cell 2008; 19(7): p. 2916-2925.

43. Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, et al. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. J Biol Chem 2003; 278(51): p. 51841-51850.

44. Mariño G, Uría JA, Puente XS, et al. Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. J Biol Chem 2003; 278(6): p. 3671-3678.

45. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. EMBO J, 2010; 29(11): p. 1792-1802.

46. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. J Cell Sci 2004; 117(Pt 13): p. 2805-2812.

47. Klionsky D. J, Abdalla F. C. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Journal of autophagy 2012; 4: 445-544.4.

48. Gewirtz DA., The four faces of autophagy: implications for cancer therapy cancer research. 2014; 1;74(3):647-651.

49. Fulda S. Autophagy in Cancer Therapy. Frontiers Oncology 2017 15;7:128

50. Ozpolat B, Benbrook DM. Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments. Cancer Manag Res 11;7:291-299

51. Levine, B., S. Sinha, and G. Kroemer, Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. Autophagy 2008; 4(5): p. 600-606.

52. Lee JW, Jeong EG, Lee SH, et al., Somatic mutations of BECN1, an autophagy-related gene, in human cancers. APMIS 2007; 115(6): p. 750-756.

53. Shan, G., RNA interference as a gene knockdown technique. Int J Biochem Cell Biol, 2010; 42(8): p. 1243-1251.

54. 4. Tekedereli I, Alpay SN, Akar U et al. Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. Mol Ther Nucleic Acids 2013; 2: p. e121.

55. Ozpolat B, Akar U, Mehta K et al. PKC delta and tissue transglutaminase are novel inhibitors of autophagy in pancreatic cancer cells. Autophagy 2007; **3**(5): p. 480-483.

56. Thorburn A, Thamm DH and Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy. Mol Pharmacol 2014; 85(6): p. 830-838.

57. Mizushima N. The exponential growth of autophagy-related research: from the humble yeast to the Nobel Prize. FEBS Lett. 591(5):681-689

58. He J, Yu J, Xu Q, et al. Downregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. Autophagy 2015; 11:2 373-384.

59. Wang Q, Xue L, Zhang X, et al. Autophagy protects ovarian cancer-associated fibroblasts against oxidative stress. Cell Cycle 2016; 15: 1376-1385.

60. Bao L, Jaramillo M. C, at all. Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cell moleculer medicine reports 2014; 16: 91-98.

61. Liu X, Xu Y, Zhang L, et al. Prucalopride Inhibits Proliferation of Ovarian Cancer Cells via Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signaling Pathway. Med Sci Monit. 2018; 17;24:4137-4145.

62. Zhao YG and Zhang H. The Incredible ULKs: Autophagy and Beyond. Mol Cell 2016; 19;62(4):475-476.

63. Jung S, Li C, Duan J, Lee S, et al. TRIP-Br1 oncoprotein inhibits autophagy, apoptosis, and necroptosis under nutrient/serum-deprived condition. Oncotarget 2015 6;6(30):29060-29075.

64. Xu DW, Zhang GQ, Wang ZW, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer treatment. Asian Pac J Cancer Prev 2015;16(6):2167-2175.

65. Liu H, He Z, Simon HU. Targeting autophagy as a potential therapeutic approach for melanoma therapy. Semin Cancer Biol 2013;23(5):352-360

66. Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. BMB Rep 2016 Aug;49(8):424-430.

67. Kögel D, Fulda S, Mittelbronn M. Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma. Anticancer Agents Med Chem 2010;10(6):438-449.

68. Hamurcu Z., Delibaşı N., Geçene S., Şener EF., Dönmez-Altuntaş H., Özkul Y, Canatan H., Ozpolat B. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol 2018;144(3):415-430.

69. Cliby W, Ritland S, Hartmann L, at all. Human epithelial ovarian cancer allelotype. Cancer Res 1996; 15;53:2393-2398.

70. Eccles DM, Russell SE, Haites NE, at all. Early loss of heterozygosity on 17q in ovarian cancer. The Abe Ovarian CancerGenetics Group. Oncogene 1992; 7(10):2069-72.

71. Russell SE, Hickey GI, Lowry WS, Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. Oncogene 1990; 5(10):1581-1583.

72. Tangir J, Muto MG, Berkowitz RS, at all. A 400 kb novel deletion unit centromeric to the BRCA1 gene in sporadic epithelial ovarian cancer Oncogene. 1996; 15;12(4):735-740.

73. Correa RJ, Valdes YR, Peart TM, et al Combination of AKT inhibition with autophagy blockade effectively reduces ascites-derived ovarian cancer cell viability. Carcinogenesis 2014 Sep;35(9):1951-1961.

74. Miyamoto M, Takano M, Aoyama T et al. Inhibition of autophagy protein LC3A as a therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas J Gynecol Oncol 2017 ;28(3):e33.

75. Correa RJ, Valdes YR, Peart TM, et al. Combination of AKT inhibition with autophagy blockade effectively reduces ascites-derived ovarian cancer cell viability. Carcinogenesis 2014 ;35(9):1951-1961.

76. Lu Z, Yang H, Sutton MN, et al. ARHI (DIRAS3) induces autophagy in ovarian cancer cells by downregulating the epidermal growth factor receptor, inhibiting PI3K and Ras/MAP signaling and activating the FOXo3a-mediated induction of Rab7. Cell Death Differ 2014 Aug;21(8):1275-1289

77. Zhao X, Fang Y, Yang Y, et al. Elaiophylin, a novel autophagy inhibitor, exerts antitumor activity as a single agent in ovarian cancer cells. Autophagy 2015; 11(10):1849-1863

78. He J, Yu JJ, Xu Q, et al. ownregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. Autophagy 2015;11(2):373-384

79. Zhu L, Liu X, Li D, et al. Autophagy is a pro-survival mechanism in ovarian cancer against the apoptotic effects of euxanthone. Biomed Pharmacother. 2018 Jul;103:708-718.

80. Peng H, Wang Q, Qi X, et al. rlistat induces apoptosis and protective autophagy in ovarian cancer cells: involvement of Akt-mTOR-mediated signaling pathway. Arch Gynecol Obstet. 2018.

81. Weng Z, Gao H, Hu J, et al. Isoalantolactone induces autophagic cell death in SKOV3 human ovarian carcinoma cells via upregulation of PEA-15. Oncol Rep. 2016 ;35(2):833-840.

82. Feng S, Jin Y, Cui M, et al. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitor S2101 Induces Autophagy via the AKT/mTOR Pathway in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. Med Sci Monit 2016 Dec 3;22:4742-4748.

83. Zhang C, and Qiu X, Andrographolide radiosensitizes human ovarian cancer SKOV3 xenografts due to an enhanced apoptosis and autophagy. Tumour Biol. 2015 Nov;36(11):8359-8365.

84. Bai H, Li H, Li W, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway is a potential predictor of distinct invasive and migratory capacities in human ovarian cancer cell lines. Oncotarget 2015; 22;6(28):25520-25532

EK 1. İntihal Raporu



YUMURTALIK KANSERİNDE LC3B VE BEKLİN-1 PROTEİNLERİNİN HÜCRE ÇOĞALMASI VE KLON OLUŞTURMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%3	%3	%0	%
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
2	emeklibirsen.com İnternet Kaynağı	%1
3	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nesrin DELİBAŞI

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 03.08.1990, Kayseri.

Medeni Durumu: Bekâr

email: nesrin_delibasi@hotmail.com

EĞİTİM

2004-2007 **:**Sümer Lisesi

2008-2010 **:**Ahi Evran Üniversitesi Kaman Meslek Yüksekokulu Bilgisayar Programcılığı Bölümü (Onur Listesine Girerek Mezuniyet)

2010-2014 **:**Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Onur Listesine Girerek Mezuniyet)

2014 **:**Erciyes üniversitesi - Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimi

2015 **:**Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. Yüksek Lisans tez dönemi- Devam-ediyor)

İŞ DENEYİMİ:

6/ 2013- 8/2014 Hüma kadın hastalıkları ve doğum hastanesi stajyer biyolog

9/ 2014- 6/ 2015 Kayseri Final Dershanesi Biyoloji Öğretmeni

YABANCI DİL

İngilizce

Bilgisayar

Windows 8 , Microsoft Office programları, C+ programlama, Visual Basic görsel programlama, İnternet Programcılığı, Web Tasarımı, Script Kullanımı

Yayınlar

1- Hamurcu Z., Delibaşı N., Geçene S., Şener EF., Dönmez-Altuntaş H., Özkul Y, Canatan H., Ozpolat B. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol. 2018;144(3):415-430.

2- Hamurcu Z., Delibaşı N., Nalbantoğlu U., Şener EF., Nurdinov N., Taşçı B., Taheri S., Ozkul Y., Dönmez H.A., canatan H., Ozpolat B. FOXM1 plays a role in autophagy by transcriptionally regulating Beclin-1 and LC3 genes in human triple negative breast cancer cells (yayın aşamasında)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1-Zuhal Hamurcu, ***Nesrin Delibaşı*****,** Seda Geçene, Çağrı Şakalar, Huriye Aksu, Halit Canatan. Meme Kanser Hücrelerinde Timokinon ve FoxM1 siRNA'nın Sinerjik Etkisinin Onkogenik Transkripsiyon Faktör Proteini Olan FoxM1 Sinyal Yolağındaki Rolü. III. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Hilton- Kayseri, 5-8 Mayıs 2016.

2-Zuhal Hamurcu, Çağrı Şakalar, ***Nesrin Delibaşı***, Seda Geçene, Huriye Aksu, Büşra Kurt, Halit Canatan. Ulusal Moleküler Tıp Sempozyumu, Marmara Üniversitesi-İstanbul, 1-3 Haziran 2016.

Görev Aldığı Projeler

1-Meme Kanser Hücre Hatlarında Thmoquinone(TQ) ve Transkripsiyon Faktörü Fork Head BoxM1 (FOXM1)siRNA'nın Sinerjik Etkisinin Src-FAk Yolağı Üzerine Araştırılması (**TÜBİTAK**, 3001, proje kodu: 214S660).

2-Meme Kanser Hücre Hatlarında Transkripsiyon Faktör Proteini Olan FoxM1'in Otofaji Sinyal Yolağında Rolünün Araştırılması (**TÜBİTAK**, 1001, proje kodu: 214S2014)

3- Nöroendokrin Tümörlerde DNA Hasarı ve Hasar Onarım Kapasitesinin Araştırılması (Erciyes Üniversitesi **BAP Projesi**, proje kodu: TOA-2013-4619).

4- Meme kanser hücre hatlarında transkripsiyon faktör proteini olan FOXM1in otofaji sinyal yolağında rolünün araştırılması. (Erciyes Üniversitesi **BAP Projesi**, proje kodu: TDA-2016-6415).

5- Meme Kanser Hücre Hatlarında FOXM1 siRNA ile baskılanmış FOXM1 geninin mikro RNA Profilleri Üzerine Etkisinin Araştırılması. (Erciyes Üniversitesi **BAP Projesi**, proje kodu: TSA-2017-7204).

Katıldığı Sertifika Programları, Kongre Ve Sempozyumlar

1-2015-**Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası.** SBY 000 Deney Hayvanları ve Uygulama Yöntemleri Erciyes Üniversitesi. 2015, Kayseri, Türkiye.

2-2015- **II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi.** Deneysel Hematoloji Derneği. 16-19 Nisan 2015, Kayseri, Türkiye.

3-2015-**Uygulamalı Yoğunlaştırılmış Biyoinformatik Kursu. Genom ve kök hücre merkezi Erciyes Üniversitesi.** 30 Haziran- 3 Temmuz 2015, Kayseri, Türkiye.

4-2015-**Fourth International Workshop on cAMP signaling, Protein Kinase A, and phosphodiesterases: from genetics to function and human diseases.** Genom ve kök hücre merkezi Erciyes Üniversitesi. 3- 5 Eylül 2015, Kayseri, Türkiye.

5-2016- **3**. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi. **Deneysel Hematoloji Derneği. 5-8 Nisan 2016, Kayseri, Türkiye.**

6-2016- Uluslararası Katılımlı Gevher Nesibe Tıp Günleri, **11-13 Şubat 2016, Kayseri, Türkiye.**

7-2016**- Abdullah Gül Üniversitesi- 1.Yaşam Bilimleri Sempozyumu.** 23-25 Şubat 2016**,** Kayseri, Türkiye.

8-2017- **Abdullah Gül Üniversitesi- 2.Yaşam Bilimleri Sempozyumu.** 23-25 Şubat 2017**,** Kayseri, Türkiye.