



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BESİN AÇLIĞI DURUMUNDA SIÇAN İNCE BARSAK
DOKUSUNDA BECN1 (BECLİN 1) İMMÜN LOKALİZASYONU**

Seyit Ali BAYTAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Jale ÖNER**

BURDUR-2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BESİN AÇLIĞI DURUMUNDA SIÇAN İNCE BARSAK
DOKUSUNDA BECN1 (BECLİN) 1 İMMÜN LOKALİZASYONU**

Seyit Ali BAYTAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Jale ÖNER**

Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0516-YL18 proje numarası ile desteklenmiştir.

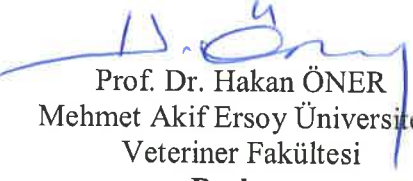
BURDUR-2019

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Seyit Ali BAYTAR tarafından *Prof. Dr. Jale ÖNER* yönetiminde hazırlanan **“Besin Açlığı Durumunda Sıçan İnce Barsak Dokusunda BECN1 (Beclin 1) İmmün Lokalizasyonu”** başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

29/07/2019


Prof. Dr. Hakan ÖNER
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Başkan


Prof. Dr. Jale ÖNER
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Prof. Dr. Artay YAĞCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür ve Enstitü Yönetim Kurulu 16/10/2019 tarih ve 41... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Doga TEMİZSOY
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sabır ve ilgiyle bana kılavuzluk eden danışman hocam sayın Prof. Dr. Jale ÖNER'e, çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Hakan ÖNER'e, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Duygu MUTLUAY'a, üstümde büyük emeği olan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÖZBEK'e, bu süreçte tecrübelerini ve samimiyetlerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Cevat SİPAHİ, Dr. Öğr. Üyesi Savaş Volkan GENÇ ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cumhur AKIN'a, Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, halihazırda eğitimine devam eden ve birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım değerli dostum Vet. Hek. Zübeyde DARCAN'a, her koşulda yanımda olup beni destekleyen müstakbel eşim Hasret HAZİNELİ'ye ve son olarak bana her zaman inanan, sabreden, beni her koşulda destekleyen ve motive eden aileme teşekkürlerimi sunarım.

Seyit Ali BAYTAR

ETİK BEYAN

“Besin Açlığı durumunda Sıçan İnce Barsak Dokusunda BECN1 (Beclin 1) İmmün Lokalizasyonu” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Jale ÖNER danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.


Seyit Ali BAYTAR

29.07.2019

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Otofaji	3
2.1.1. Otofaji Çeşitleri	4
2.1.1.1. Makrootofaji	4
2.1.1.2. Mikrotofaji	4
2.1.1.3. Şaperon Aracılı Otofaji	5
2.2. Otofaji Genleri	6
2.3. Otofajinin Morfolojik Aşamaları ve Düzenlenmesi	6
2.4. Selektif Otofaji	9
2.5. Otofaji-Apoptosis Bağlantısı	11
2.6. Açlık ve Otofaji	14
2.7. Otofaji ve İntestinal Homeostazis	17
2.8. Beclin 1	20
2.9. Otofajinin Başlatılmasında Beclin 1'in Rolü	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. İmmunohistokimyasal Prosedür	27
3.2. İmmunohistokimyasal Prosedürde Kullanılan Kimyasal Çözelti ve Malzemeler	28

4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	59



ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Otofajiye genel bakış (Anding ve Baehrecke, 2015).	4
Şekil 2.2.	Otofajinin farklı tipleri (Karadağ, 2016).	5
Şekil 2.3.	Otofaji aşamalarının şematik gösterimi (Galluzzi ve ark., 2008).	7
Şekil 2.4.	Açlıkla indüklenen otofaji ve selektif otofajinin düzenlenmesi (Guillebaud ve Germain, 2016).	10
Şekil 2.5.	Otofaji-Apoptozis ilişki şeması (Eisenberg ve ark., 2009).	13
Şekil 2.6.	Otofaji sistemindeki kusurların defektif intestinal homeostazis ile ilişkisi (Baxt ve Xavier, 2015).	18
Şekil 2.7.	Beclin 1 protein yapısı ve pozitif ve negatif düzenleyicileri (Toton ve ark., 2014).	22
Şekil 4.1.	Kontrol grubu sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	31
Şekil 4.2.	12 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	31
Şekil 4.3.	24 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	32
Şekil 4.4.	36 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	32
Şekil 4.5.	48 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	33
Şekil 4.6.	Kontrol grubu sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	34
Şekil 4.7.	12 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	34
Şekil 4.8.	24 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	35
Şekil 4.9.	36 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	35
Şekil 4.10.	48 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	36
Şekil 4.11.	Kontrol grubu sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	37
Şekil 4.12.	12 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	37
Şekil 4.13.	24 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	38
Şekil 4.14.	36 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	38
Şekil 4.15.	48 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu.	39
Şekil 4.16.	Deney gruplarına ait duodenum Beclin 1 ekspresyon şiddeti.	40
Şekil 4.17.	Deney gruplarına ait jejunum Beclin 1 ekspresyon şiddeti.	40
Şekil 4.18.	Deney gruplarına ait ileum Beclin 1 ekspresyon şiddeti.	41

TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Deney grupları	26
Tablo 3.2.	İmmünohistokimyasal prosedürde kullanılan malzemeler	28
Tablo 3.3.	Sitrat tampon solüsyonu (500 ml için)	28
Tablo 3.4.	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (1000 ml için)	28
Tablo 3.5.	PBS+%0,2 Tween 20 solüsyonu (500 ml için)	29
Tablo 3.6.	PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu (500 ml için)	29



SİMGELER ve KISALTMALAR

Atg	Otofaji Bağlantılı Gen
AV	Otofajik Vakuol, Otofagozom
Bif-1	Bax Etkileşimli Faktör-1
BECN1	Beclin 1
CCD	Coiled-Coil Domain (Çift Sarmal Alanı)
CMA	Chaperone Mediated Mutophagy (Şaperon Aracılı Otofaji)
CRC	Kolorektal Kanser
ECD	Evolutionary Conserved Domain (Evrimsel Olarak Korunmuş Alan)
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
HD	Hirschprung Hastalığı
IBD	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
IHC	İmmünohistokimya
kDa	Kilodalton
NEC	Nekrotize Enterekolit
NES	Nükleer Eksport Sinyali
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PI3KC	Sınıf III Fosfotidilinositol 3-kinaz
PI3P	Fosfotidilinositol 3-fosfat
PS	Fosfotidilserin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskop
TOR	Target of Rapamycin (Rapamisin Hedefi)
UVRAG	UV Işınlama Direnci İlişkili Gen
VMP	Vakuol Membran Proteini
Vps	Vacuolar Protein Sorting (Vakuolar Protein Sınıflandırması)

ÖZET

Besin Açlığı Durumunda Sıçan İnce Barsak Dokusunda BECN1 (Beclin 1) İmmün Lokalizasyonu

Maya Atg6'nın memeli ortoloğu olan Beclin 1, hücrel stres periyotları sırasında artan, programlı bir hücre sağkalım süreci olan otofajide merkezi role sahip bir proteindir. Açlık, ökaryotik organizmalarda hücrel homeostaziyi sağlamak için otofajiyi uyarmaktadır. Yapılan çalışmalar otofaji proteinlerinin bağırsak bağışıklığı, bariyer görevi ve bağırsak homeostazında temel bir role sahip olduğunu göstermektedir. Ancak açlık ile uyarılan otofajide sıçan ince bağırsak dokusunda Beclin 1'in immün ekspresyonuna dair bilgiye rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile 12, 24, 36 ve 48 saat açlığa maruz bırakılan sıçanların ve ad libitum beslenen kontrol grubunun ince bağırsak dokularında Beclin 1 immün ekspresyonu araştırılmıştır. Çalışmada kontrol ve açlık gruplarındaki sıçanlardan immünohistokimya (IHC) analizleri için ince bağırsak doku örnekleri toplanmış, Beclin 1 immün lokalizasyonları belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar semikuantitatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda kontrol grubu ve açlık gruplarının hepsinin ince bağırsak dokularında Beclin 1 immün ekspresyonlarının pozitif olduğu ancak gruplar arası anlamlı ekspresyon farklarının olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: BECN1 (Beclin 1), Besin açlığı, İnce bağırsak, Otofaji, Rat

Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 0516-YL-18

ABSTRACT

Immun Localization of BECN1 (Beclin 1) in the Rat Small Intestine Tissue in Nutrient Starvation

Beclin 1, the mammalian ortholog of yeast Atg6, is a protein that plays a central role in autophagy, a programmed cell survival process which increased upon periods of cellular stress. Starvation stimulates autophagy to maintain cellular homeostasis in eucaryotic organisms. Studies have shown that autophagy related proteins have a major role in intestinal immunity, barrier function and intestinal homeostasis. However, there was no information on the expression of Beclin 1 in rat small intestine tissue in starvation-induced autophagy. In this study, Beclin 1 immune expression was investigated in small intestine tissues of rats which fasted for 12, 24, 36 and 48 hours along with an ad-libitum fed control group. In the study, small intestine tissue samples had collected for immunohistochemistry (IHC) analysis from control and fasting rats, Beclin 1 immune localizations were determined and the results were evaluated semiquantitatively. As a result of the study, it was found that all of the control and fasting groups had positive Beclin 1 immune expressions in the small intestine tissues but there were no significant expression differences between the groups.

Key Words: Autophagy, BECN1 (Beclin 1), Nutrient starvation, Rat, Small intestine,

This study was supported by Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research
Projects Unit. Project Number: 0516-YL18

1. GİRİŞ

Otofaji, çeşitli stres koşulları altında, hücrenin sitoplazmik içeriklerini otofagozom adı verilen çift membranlı bir vezikülde hapsettiği ve bu içerikleri yıkım için lizozoma verdiği evrimsel olarak korunmuş hücresel bir yoldur (Levine ve Klionsky, 2004). Bu yolak açlık süresince hücresel enerji dengesinin korunmasını sağlar, gelişim boyunca dokunun yeniden şekillenmesine katkıda bulunur ve gereksiz hücresel organelleri, kümeleşmeye meyilli proteinleri ve hücreler arası patojenleri ortadan kaldırır (Levine ve Kroemer, 2008).

Otofajinin moleküler alanına giden yol otofaji ile ilgili genlerin tanımlanmasıyla başlamıştır. Otofaji mekanizmalarında rol oynayan genlerin çoğu otofaji ilişkili genler ya da “Atg” olarak mayada yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır.

Beclin 1 fare beyninden izole edilen, 450 amino asit içeren 60 kDa’luk (Pattingre ve ark., 2008) bir proteindir ve mayalardaki Atg6’nın memeli homoloğu olup otofajide merkezi bir rol oynamaktadır. Sınıf III PI3K, UVRAG, Ambra1, Bif1 ve anti apoptotik Bcl-2 aile üyeleri de dahil diğer proteinlerle birlikte bir kompleksin parçasıdır. Beclin 1-Sınıf III PI3K kompleksinin otofaji fonksiyonu UVRAG, Ambra1, ve Bif 1 ile aktive edilip; Bcl-2 ve Bcl-xL tarafından inhibe edilir. Beclin 1 ve Bcl-2 arasındaki etkileşimin besin koşullarıyla düzenlendiği, besin yokluğunda otofajiyi indüklemek üzere Beclin 1 ve Bcl-2’nin bağlanmasının minimal olduğu, besin fazlalığında ise otofajiyi inhibe etmek üzere maksimal düzeyde olduğu bildirilmektedir (Wei ve ark., 2008).

Bağırsak besin maddelerinin absorpsiyonunun gerçekleştiği bir organ olup, yüksek mikrobiyal yüklere karşı savunma ve tolerans arasındaki dengeyi sağlamaktadır (Baxt ve Xavier, 2015).

Bağırsak epiteli, bağırsak mukozası ve lümen çevresi arasında fiziksel ve interaktif bir bariyer oluşturulmasında hayati bir rol oynar. Bağırsak bariyerindeki kusurların neden olduğu artan bağırsak geçirgenliği, bağırsak inflamasyonu gelişimi için önemli bir faktör olarak kabul edilir (Al-Sadi ve ark., 2011; Cadwell ve ark.,

2008). Bağırsak bariyerindeki kusurlar antijenik penetrasyonun artmasına izin vererek inflamatuvar bağırsak hastalığında (IBD), çölyak hastalığında, nekrotizan enterekolitte ve iskemi-reperfüzyon hasarında artmış inflamatuvar yanıtla sonuçlanır (Al-Sadi ve ark., 2011, Balda ve ark., 1996). Bunun aksine bağırsak bariyerinin güçlendirilmesi veya yeniden sıkılaştırılmasının hem insan hem de hayvan modellerindeki IBD’de bağırsak iltihabının sona ermesine faydası olduğu gösterilmiştir. Otofaji disfonksiyonu IBD’nin patogenezi ile ilişkilendirilmiş olup yapılan çalışmalar otofaji proteinlerinin bağırsak bağışıklığı ve bariyer işlevinde temel bir role sahip olduğunu göstermektedir (Cadwell ve ark., 2008; Cao ve ark., 2007).

Beclin 1’in fizyolojik koşullar, stres mevcudiyeti ve çeşitli patolojilere ilişkin olarak araştırıldığı, açlık durumlarında Bcl-2 ile olan etkileşimi dolayısıyla otofajiyi uyarma kabiliyeti olduğu çalışmalarla bildirilmiş olup, farklı açlık periyotlarında sıçan ince bağırsak dokusundaki immün ekspresyonuna ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması ile farklı açlık sürelerine maruz bırakılan sıçanların ince bağırsak dokularında Beclin 1, immünohistokimyasal teknik ile araştırılarak açlığın otofaji seviyelerine olan etkileri hakkındaki bilgilere katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

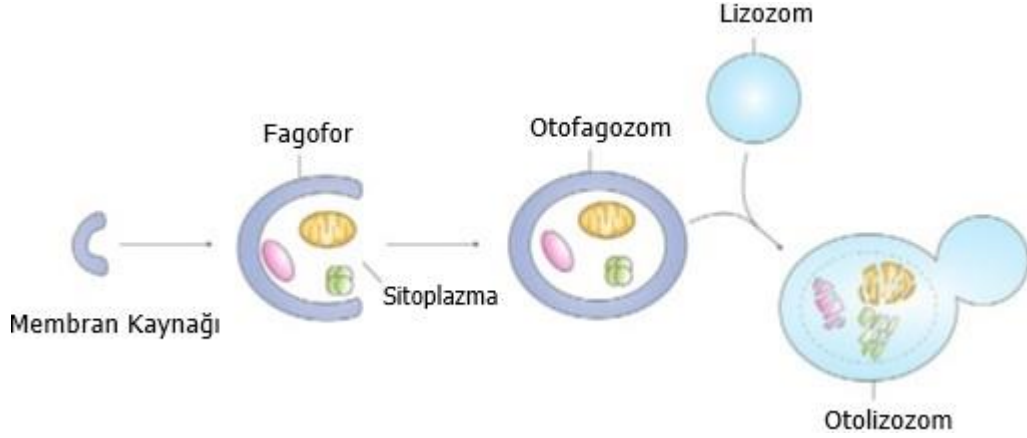
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otofaji

Otofaji, gelişimsel morfogenezis, doku homeostazı ve patojenlere karşı savunma gibi çeşitli hayati fonksiyonlarda rol oynayan çok hücreli organizmalarda hücre içi makromoleküllerin, organellerin ve çeşitli hücre içi patojenlerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomlarla birleşerek burada parçalanmasıyla sonuçlanan bir mekanizmadır (Biazik ve ark., 2015; Mizushima ve ark., 2008).

Otofajideki en belirgin morfolojik değişim sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili, sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum gibi organelleri kapsayan veziküllerin varlığıdır. Bu veziküller lizozomla kaynaşp içinde taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalanmasını sağlarlar (Gozuacik ve Kimchi, 2007). (Şekil 2.1).

Sitozolik bileşenlerin birçoğu otofaji adı verilen “kendini yeme” sürecinde bir dereceye kadar geri dönüştürülebilmektedir. Otofaji süreci, amino asit, glikoz veya oksijen açlığı, büyüme faktörü eksikliği ve sitotoksik hasarın eşlik ettiği diğer hücresel stres formları ile indüklenebilir ve hasarlı proteinlerin ve organellerin yeniden kullanılmasına izin verir (Mathew ve ark., 2007; White, 2012). Hasar görmüş veya işlevsiz hücre içi bileşenleri, otofaji reseptörleri tarafından tanınır (Clauge ve Urbe, 2010). Bu şekilde tanımlanan hasarlı bileşenler otofajik yıkım için lizozomlara aktarılır ve sonra geri dönüşümlerinin sağlanacağı sitoplazmaya verilir. Proteinlerin ve organellerin bütünlüğünü sağlamanın yanı sıra enerji homeostazı için vazgeçilmez olan otofaji (Levine ve Kroemer, 2008; White, 2012); makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir.



Şekil 2.1. Otofajiye genel bakış (Anding ve Baehrecke, 2015).

2.1.1. Otofaji Çeşitleri

2.1.1.1 Makrootofaji

Otofajinin bu tipinde sitozolün tüm bölgeleri bu olay için ayrılmakta ve bozunma için lizozomlara verilmektedir. Yükün hapsedilmesi, kendiliğinden üretilen bir membranın (izolasyon membranı) uzaması ve sınırlayıcı ve sızdırmaz bir hal almasıyla oluşan çift membranlı otofagozomda meydana gelir. Otofagozom, oluşumu tamamlandıktan sonra hapsedilen yükün yıkımı için lizozomlarla birleşir (Şekil 2.2).

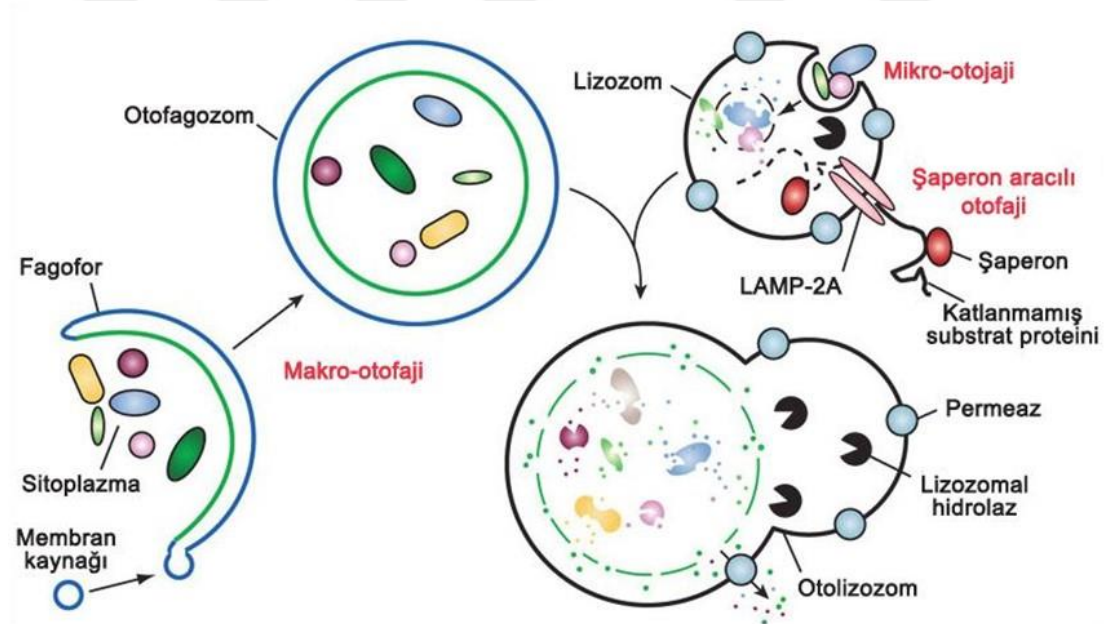
2.1.1.2. Mikrotofaji

Makrootofajiye benzer bir sitozolik hapsedme süreci mikrotofaji vasıtasıyla da gerçekleşmektedir fakat sınırlayıcı membran, yıkımlanacak materyali taşıyan tübüleri veya vezikülleri oluşturmak için invajine olan lizozomal membranın kendisidir (Ahlberg ve Glaumann, 1985). (Şekil 2.2). Mikrotofaji memelilerde hala çok zayıf bir şekilde anlaşılmaktadır ve aslında bu işlemin lizozomlardan ziyade geç endozomlarda multiveziküler cisimciklerin oluşumu ile gerçekleşebileceği ihtimali bildirilmektedir (Fader ve Colombo, 2009).

2.1.1.3. Şaperon Aracılı Otofaji

Yükün Şaperon Aracılı Otofaji (CMA, Chaperone Mediated Autophagy) aracılığıyla iletilmesi için makro ve mikrootofajinin aksine, ara vezikül kompartıman oluşumu, membran füzyonu veya membran deformitesi gerekmez (Dice, 2007; Massey ve ark., 2004). Bunun yerine, bu tip otofajinin substratları, bir translokasyon protein kompleksinin aracılık ettiği bir süreçte, doğrudan sitozolden lizozomal lümene geçer (Bandyopadhyay ve ark., 2008; Bento ve ark., 2016; Biazik ve ark., 2015; Salvador ve ark., 2000). (Şekil 2.2). Bu iletimin özel karakteristiğinden dolayı sadece çözünebilir proteinler CMA vasıtasıyla yıkımlanabilir, bir bütün halindeki organeller yıkımlanamaz.

Mikrootofaji ve Şaperon Aracılı Otofaji hücre içi organellerin seçici bozunumuna katılmadığından ve memeli hücrelerinde hücre ölümüne katkıları kapsamlı olarak karakterize edilmediğinden yaygın kullanımda otofaji terimi sadece makrotofajiyi kapsar.



Şekil 2.2. Otofajinin farklı tipleri (Karadağ, 2016).

2.2. Otofaji Genleri

Otofajinin moleküler alanına giden yol otofaji ile ilgili genlerin tanımlanmasıyla başlamıştır (Klionsky ve ark., 2003). Otofaji mekanizmalarında rol oynayan genlerin çoğu “otofaji ilişkili genler” (autophagy related genes) ya da kısaca ATG olarak mayada yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır (Xzie ve Klionsky, 2007).

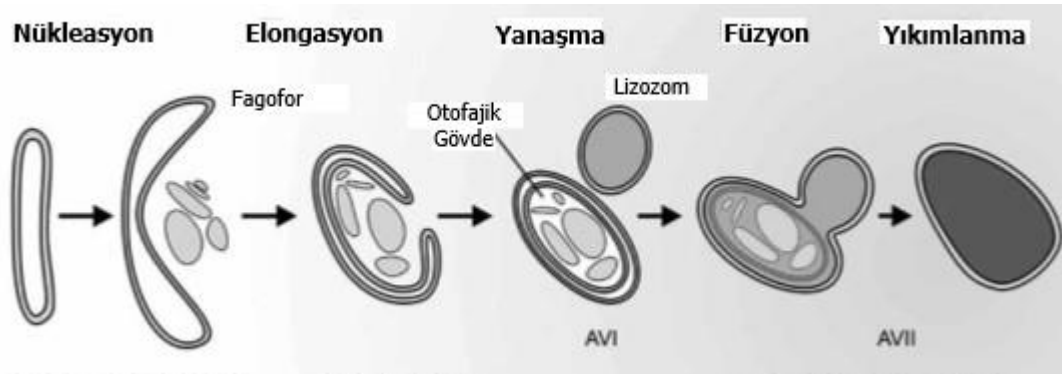
Günümüze dek maya model sistemlerinde bağımsız genetik taramalar, otofajinin çeşitli alt tiplerinde yer alan, otofajinin farklı aşamalarında (örneğin; vezikül oluşumu ve bunların genişlemesi, otofajik veziküllerin lizozomlarla füzyonu ve yıkılma gibi) görev alan otuzdan fazla ATG genini tespit etmişlerdir. Daha sonra bu maya genlerinin; *Dictyostelium*, *C. elegans*, *Drosophila*, fare ve insan da dahil olmak üzere birçok organizmadaki homologları tespit edilmiştir (Klionsky ve ark., 2003). Yüksek organizmalarda tanımlanan otofajik genler, otofajinin hücre ölümü ve sağkalımı üzerindeki rolünü incelemenin yolunu açmıştır.

2.3. Otofajinin Morfolojik Aşamaları ve Düzenlenmesi

Otofaji; indüksiyon, uzama, yavaşma, yapışma-füzyon ve yıkılma olmak üzere beş adımda gerçekleşmektedir (Karadağ, 2016). (Şekil 2.3). Otofagozom biyogenezindeki erken olaylar hala belirsizdir; fakat otofagozom öncülleri için membrana katkıda bulunabilecek plazma membranı, golgi, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi değişik hücresel kompartımanların tanımlanması, bir otofagozomun oluşması için gerekli olan membran kaynağının tek bir kaynak olmadığını, bu yapıların birçok bölümden elde edilebilir olduğunu ileri sürmektedir (Moreau ve Rubinsztein, 2012).

Morfolojik düzeyde otofaji, sitoplazmik bileşenleri sıkıca tutan ve yıkım için onları lizozomlara aktaran, otofagozomlar veya otofajik vakuoller (AVs, autophagic vacuoles) olarak bilinen çift veya çok membranlı moleküllerin oluşumu ile karakterizedir.

Otofajide karakterize edilen ilk olaylardan biri, fincan şeklindeki bir izolasyon membranı olan fagoforun oluşumudur. Önce fagofor zarlarının kenarları uzar, böylece sitoplazma parçalarını yutar. Zar kenarlarının kaynaşmasından sonra yapı, tamamlanmış bir otofagozom haline gelir (Moreau ve Rubinsztein, 2012). Bu aşamada otofagozom (AV), bozulmuş bileşenleri içerir ve erken otofajik vakuol (AVI) olarak adlandırılır (Tallóczy ve ark., 2002). (Şekil 2.3). AVI'ler ve lizozomlar arasındaki müteakip kaynaşma, lizozomal asidik hidrolazların otofaji vakuolü lümenine erişmesini sağlar ve içeriğin yıkımını artırır. Erken otofajik vakuol-lizozomal füzyonunda oluşan ve kısmen sindirilmiş materyal içeren bu veziküller geç otofajik vakuoller (AVII), otofagolizozomlar veya otolizozomlar olarak adlandırılmaktadırlar (Maiuri ve ark., 2007; Yarimitsu ve Klionsky, 2005). Transmisyon elektron mikroskopuyla gözlemlendiğinde, geç otofajik vakuol (AVII) yoğun bir elektron içeriği olan vakuoller olarak görünür ve erken otofajik vakuollerin tipik çift membranlı yapısına sahip değildirler (Tallóczy ve ark., 2002). (Şekil 2.3). Geç otofajik vakuol, otofajik vakuollerin dış zarının lizozomlarla füzyonundan sonra AVI iç vezikülünün (otofajik gövde olarak da bilinir) bozunumu sonrası oluşur. Sonuç olarak, otofajik gövdenin bozunumuyla üretilen metabolitler, metabolizma reaksiyonuna tekrar girebilecekleri sitosole bırakılırlar (Maiuri ve ark., 2007; Yarimitsu ve Klionsky, 2005).



Şekil 2.3. Otofaji aşamalarının şematik gösterimi (Galluzzi ve ark., 2008).

Fizyolojik koşullar altında otofaji; açlık sırasında amino asit havuzunun korunması preimplantasyon gelişimi, nörodejenerasyondan korunma ve doğuştan ve adaptif bağışıklığın düzenlenmesi gibi hayati rollere sahiptir (Levine ve Kroemer, 2008; Mizushima ve ark., 2008; Rubinshtein, 2006). Otofajinin karakteristik özelliklerinden biri otofajinin dinamik regülasyonudur. Hücresel otofajik aktivite bazal düzeylerde genellikle düşüktür; fakat çok sayıda uyaran aracılığıyla kayda değer bir biçimde aktive edilebilir. Mayalardan insanlara kadar hem kültüre edilmiş hücrelerde hem de intakt organizmalarda otofajinin bilinen en iyi uyarıcısı besin açlığıdır. Otofaji, hipoksi, enerji tükenmesi, endoplazmik retikulum stresi, yüksek sıcaklık gibi diğer fizyolojik stresler, hormonal stimülasyon, çeşitli farmakolojik ajanlar ve doğal immün sinyaller ile aktive edilmesinin yanı sıra bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonlar, akut pankreatit, kalp hastalığı ve protein agregopatileri gibi hastalıklarda da aktive edilebilir. Bunun aksine otofaji baskılanması sıklıkla bir kanser alt kümesi, nörodejeneratif hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar ve enflamatuar bağırsak hastalıkları gibi bazı hastalıklarla da ilişkilidir ve otofaji fonksiyonundaki bir düşüş yaşlanmanın yaygın bir özelliğidir. Otofaji ve farklı fizyolojik ve patofizyolojik süreçler arasındaki bu güçlü bağlantıya bakılırsa otofaji araştırmalarında, belirli bir biyolojik bağlamda otofajinin olup olmadığını, aktive edildiğini veya bastırıldığını güvenilir bir şekilde belirleyen ve bazal otofajinin ve / veya değiştirilmiş otofajinin fizyolojik veya patofizyolojik süreçlere katkıda bulunup bulunmadığını belirleyen bilimsel yöntemlere artan bir ihtiyaç vardır (Galluzzi ve ark., 2008).

Hücrede protein sentezi ve hücresel büyümeyi kontrol eden TOR (rapamisin hedefi) protein kompleksi, mayalarda otofajinin en önemli negatif düzenleyicisidir ve besinin bol olduğu durumlarda maya TOR proteini, otofaji proteinlerinden Atg13'ü fosforile ederek otofajiyi baskılamaktadır. Açlık durumundaysa, TOR aktivesinin hızla düşmesi sonucu otofaji için gerekli proteinlerden Atg13 defosforile olur ve Atg1 adlı serin-treonin kinaza bağlanır ve otofajinin uyarılmasına izin verilir. Atg1 kinazının aktivasyonu direkt olarak otofajiyi indüklemektedir (Kamada ve ark., 2000; Noda ve Oshumi, 1998).

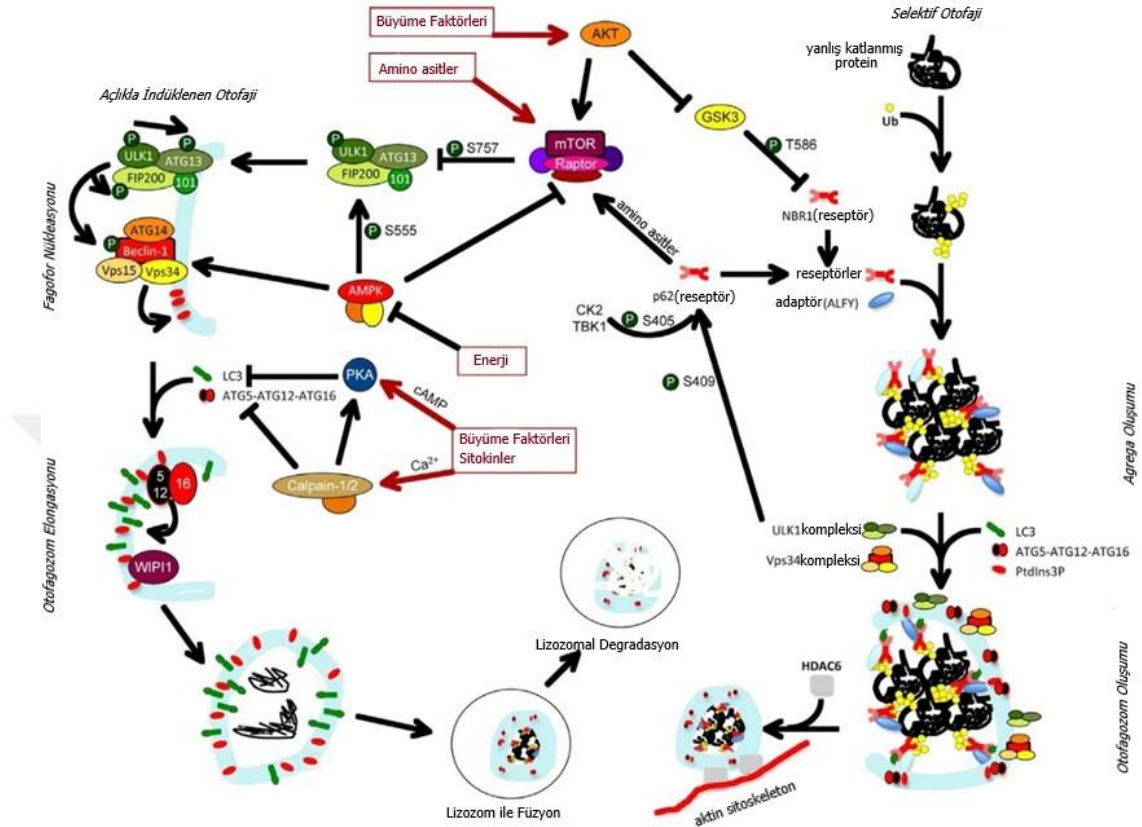
2.4. Selektif Otofaji

Otofaji açlık durumlarında, besin geri dönüşümünü ve açlık süresince hücresel sağkalımı desteklemek için uyarılır. (Mehrpour ve ark., 2010; Mizushima ve Komatsu, 2011). Bununla birlikte, hasarlı organellerin ve büyük protein kümeleşmelerinin yıkımlanmasından sorumlu olan tüm hücrelerde bulunan bazal otofaji seviyesidir, otofajinin bu formu “kalite kontrol” ya da “selektif otofaji” olarak adlandırılmaktadır. (Mizushima ve Komatsu, 2011; Rogov ve ark., 2014). makrotofajinin bu rolleri farklı biyolojik şartlarda etkilidir. Örneğin, açlıkla indüklenen otofaji kanser hücrelerinin sağkalımını desteklerken, selektif otofaji toksik olabilecek hasarlı hücresel bileşenlerin birikimini önleyerek nöronlarda hayatta kalmayı desteklemektedir. Aslında bazı kanıtlar açlıkla indüklenen otofajinin nöronlar için zararlı olduğunu göstermektedir, bu da selektif otofaji ve açlıkla indüklenen otofajinin, otofajinin birbirinden farklı iki formu olduğu ihtimalini artırmaktadır (Guillebaud ve Germain, 2016).

Açlık sırasında oluşan otofagozomların, hücre sağkalımı için gerekli besin maddelerini sağlamak üzere lizozomlarda yıkımlanacak olan spesifik olmayan sitoplazmik yükü içerdği düşünülmektedir (Mehrpour ve ark., 2010; Mizushima ve Komatsu, 2011). Bunun aksine selektif otofaji sırasında otofagozomlar, otofaji reseptörleri aracılığı ile spesifik olarak yük etrafında oluşturulurlar. Bunlar dolayısıyla otofaji mekanizmasını yeni oluşan otofagozoma yönlendirir (Birgisdottir et al., 2013; Isakson ve ark., 2013; Rogov ve ark., 2014). (Şekil 2.4).

Otofaji sırasında, hücre içi materyal otofagozoma paketlenir ve yıkımlanma için lizozomlara iletilir (Şekil 2.4). Açlıkla indüklenen otofaji durumunda yükün hücre içi besin havuzunun sürdürülmesi için yıkımlanacak spesifik olmayan sitoplazmik materyalden oluştuğu düşünülmektedir. Bunun aksine selektif otofaji, bir otofagozom içinde kendi inklüzyonunu uyaracak olan otofaji reseptörleri ve adaptörleri tarafından spesifik yükün tanınmasını gerektirmektedir. (Mehrpour ve ark., 2010; Mizushima ve Komatsu, 2011; Rogov ve ark., 2014). Bu farklılıklara rağmen temel otofaji mekanizması her iki tip otofaji için de aynıdır ve yüksek

derecede korunmuş protein dizisinin faaliyetini gerektirmektedir (Guillebaud ve Germain, 2016).



Şekil 2.4. Açlıkla indüklenen otofaji ve selektif otofajinin düzenlenmesi. Açlıkla indüklenen otofaji mTOR ve PKA'nın (protein kinaz A) aktivasyonu aracılığıyla büyüme faktörü ve sitokinler ile engellenmektedir. mTOR otofaji başlatıcı kompleksin (ULK1) aktivasyonunu inhibe etmektedir. mTOR'un inhibe edilmesi üzerine de ULK1 aktive edilir ve Vps34 kompleksinin aktive edilmesiyle otofagozom oluşumunu başlatan bir fagofor oluşturucu bölgede aktive edilir. Bunun aksine selektif otofaji genellikle, otofaji mekanizmasını çalıştıran p62 ve NBR1 otofaji reseptörleri tarafından ubiquitine olmuş substratların belirlenmesiyle başlatılır. p62 ve NBR1'in protein kümeleşmelerine doğru yönlendirilmesi fosforilasyon ile düzenlenmektedir (Guillebaud ve Germain, 2016).

2.5. Otofaji-Apoptozis Bağlantısı

Hücresel strese karşı hücrenin hayatta kalmasını sağlamak üzere fonksiyon gösteren otofaji, gereğinden fazla gerçekleştiği durumlarda hücreyi atrofiye uğratması bakımından hücre ölümü şekillerinden biri olarak da tanımlanmış ve bu bağlamda programlı hücre ölümü olan apoptozis ile benzerlikleri, farklılıkları ve ilişkisi araştırılmıştır.

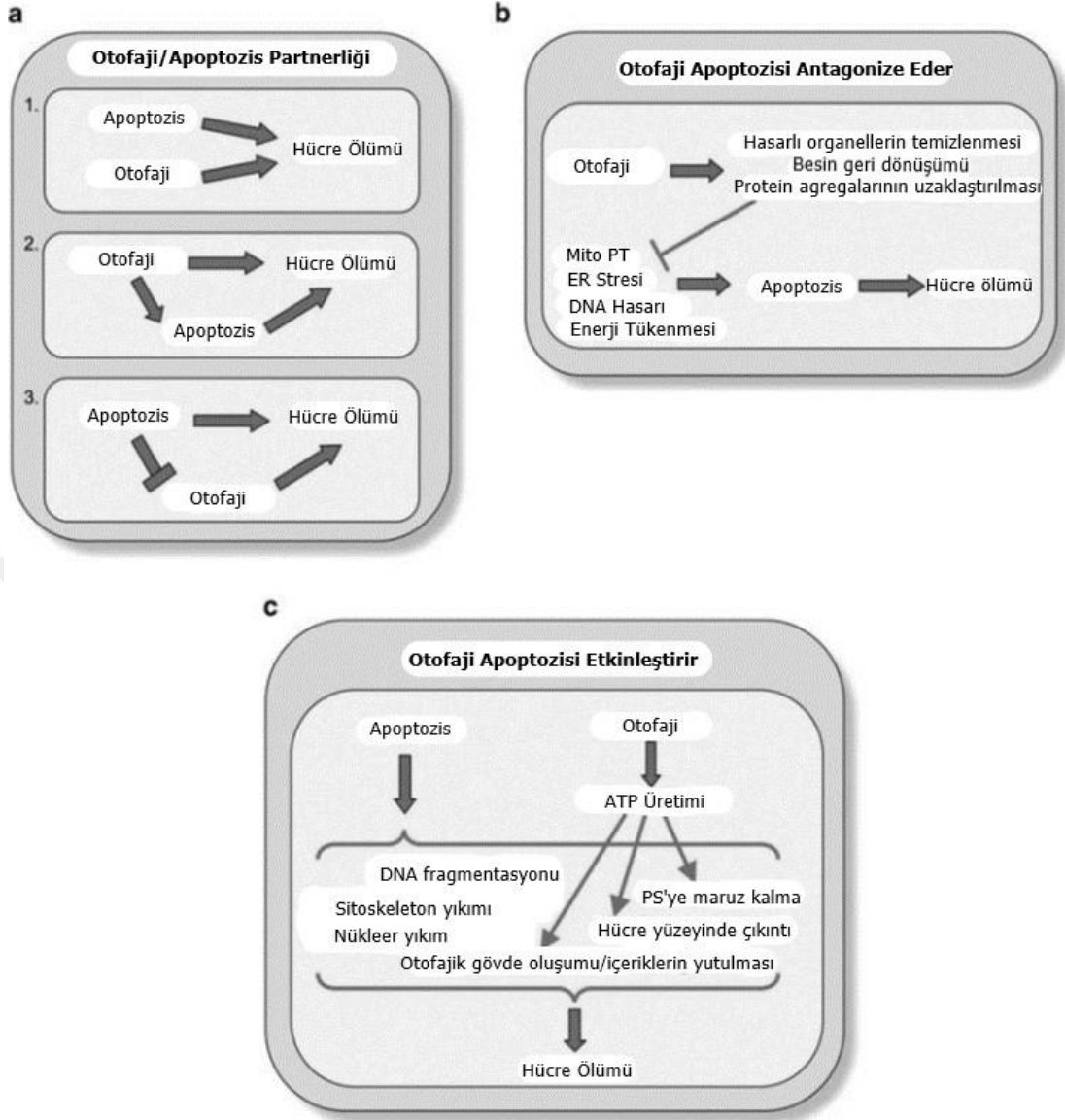
Apoptozis, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve en son da apoptotik cisimlerin parçalara ayrılmasıyla karakterizedir (Clarke, 1990). Kaspaz adı verilen proteazlar bu tip hücre ölümünün en önemli aracı olup hücrede gözlemlenen birçok morfolojik değişiklik, kromatin DNA'sının ve hücre yaşamı için önemli proteinlerin bu proteazlar tarafından kesilmesine bağlanmıştır. Bu apoptotik cisimlerin son durakları fagositlerin lizozomları veya heterofagositoz sonrası komşu hücrelerin lizozomlarıdır.

Otofajide ise en belirgin morfolojik değişiklik sitoplazmada oluşan iki veya daha çok katmanlı zarla çevrili keseciklerin oluşmasıdır. Bu kesecikler sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum gibi organelleri içerirler. En sonda otofaji kesecikleri lizozomla kaynaşıp taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalanmasını sağlarlar. Otofajide ölüm kaspaz bağımlı olmadığından ne DNA merdivenleri ne de apoptotik cisim oluşumu gözlenmemektedir. Ayrıca otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozdakinden çok daha geç ve düzensiz bir şekilde olmaktadır (Arslan ve ark., 2011).

Otofajik hücre ölümü sitoplazmada gerçekleşirken, apoptozisin en önemli hedefi DNA'nın barındırdığı hücre çekirdeğidir. Lenfositler gibi küçük sitoplazmalı hücrelerin yok edilmesi için apoptoz çoğunlukla yeterli olmaktadır. Fakat büyük sitoplazmalı hücrelerin yok edilmesi birden fazla mekanizmanın aynı anda aktivasyonunu gerektirebilir. Böylece, apoptotik moleküler mekanizmalar çekirdeği yok ederken, otofaji sitoplazmayı ve buradaki organelleri temizleyerek ölümü hızlandırabilmektedir. (Kroemer ve ark., 2010; Merphour ve ark., 2010).

Farklı temel mekanizmalar tarafından kontrol edilseler de (apoptozis için kaspaz şelaleleri, otofaji için Atg proteinleri) bu iki programlı hücre ölümü arasında bir çeşit bağlantı ve iletişim olduğu yapılan çalışmalar tarafından gösterilmektedir (Gozuacık ve Kimchi, 2004).

Otofaji ve apoptozis, ortak hareket ederek hücre ölümüne yol açabildikleri gibi birbirlerini engelleyici tarzda çapraz düzenleme de gösterebilirler. Otofaji, özellikle apoptozun baskılandığı koşullarda apoptozla ölmesi mümkün olmayan hücrenin ölümüne yol açabilir ve bu özelliğiyle, apoptoz yanında bir “hücre ölümü B planı” olarak görev yapabilir. Bunun yanında, otofaji ve apoptoz arasında bazı farklı bağlantılar gözlenmiştir (Şekil 2.5) (Eisenberg ve ark., 2009).



Şekil 2.5. Otofaji-apoptozis ilişki şeması. **(a)** Otofaji ve apoptozis ortak hareket eder ve her ikisi de hücre ölümüne neden olur. 1'de paralel yollarla bağımsız olarak hareket edebildikleri gösterilmiştir. 2'de otofajinin apoptotik hücre ölümü için gerekli olduğu, apoptozisi artırdığı ve aynı anda bağımsız bir ölüm aracı olarak da hareket ettiği gösterilmiştir. 3'te apoptozisin otofajiyi baskılayabildiği ve otofaji gerçekleşmesi için apoptozisin engellenmesi gerektiği belirtilmiştir. **(b)** Otofaji, örneğin, genotoksik ROS (reaktif oksijen türleri) kaynağı olan zarar görmüş organellerin ortadan kaldırılması ya da aç bırakılmış hücre için bir besin maddesi ve enerji kaynağı sağlamak üzere hücrel makromoleküllerin katabolize edilmesi ile ya da katlanmamış protein kümelerinin parçalanması yoluyla ER stresini sınırlandırarak hücre sağkalımını sağlayıp apoptozise antagonist etki yapmaktadır. Bu işlevler bir apoptotik yanıtı tetikleyecek uyarıları bloke etmektedir. **(c)** Otofaji, kendiliğinden hücre ölümüne yol açmasa da PS'ye (fosfatidilserin) maruz kalma ve membran salgısı gibi ATP'ye bağlı olaylar gibi bazı morfolojik değişikliklere katılarak apoptotik programı etkinleştirmektedir (Eisenberg ve ark., 2009).

2.6. Açlık ve Otofaji

Otofajinin temel bir fonksiyonu nütrisyonel strese hücresel adaptasyondur. Sitoplazmik yükün hapsedilmesi ve otofajik yıkımı takiben bozunmuş ürünler makromoleküler sentez ve ATP enerji üretimini sürdürebilmek için yeniden kullanılabileceği sitoplazmaya verilir. Otofaji çeşitli organizmalarda açlığa adaptasyonla ilişkilendirilir (Levine ve Klionsky, 2004).

Açlık hemen hemen tüm ökaryotik organizmalarda hücresel homeostaziyi korumak için otofajiyi indüklemektedir. Fakat açlıkla indüklenen otofajinin mekanizmaları tam olarak anlaşılmış değildir. Memeli hücrelerinde açlığın olmadığı durumlar sırasında antiapoptotik protein Bcl-2, Beclin1 e bağlanmakta ve Beclin1'in otofaji fonksiyonunu inhibe etmektedir (Wei ve ark., 2008).

Otofajinin nütrisyonel strese hücresel ve organizmal adaptasyondaki temel rolü göz önüne alındığında akla gelen önemli bir soru otofajinin amino asit açlığı tarafından nasıl uyarıldığıdır. Birçok  alışma otofajinin güçlü bir inhibitörü olan mTOR'un aktivasyonu üzerindeki insüline bağlı sinyalizasyon ve amino asitlerin rolü üzerine yoğunlaşmıştır (Meijer ve Codogno, 2006).

Otofaji hem selektif hem de non-selektif olabilmektedir. Selektif olmayan otofaji; açlık sırasında metabolizmayı destekleyecek materyal sağlamak üzere sitoplazmanın ve organellerin otofaji aracılığı ile toplu degradasyonunu ifade eder. Aynı zamanda, *Drosophila* morfojeninde olduğu gibi, kapsamlı olarak doku yeniden biçimlenmesine de katkıda bulunur (Berry ve Baehreckle, 2007).

Proteinlerin ve mitokondri (mitofaji), ribozomlar (ribofaji), endoplazmik retikulum (retik lofaji), peroksizomlar (peksifaji) ve lipidler (lipofaji) gibi organellerin selektif otofajisi spesifik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Memelilerde, otofaji veya proteazom yolakları tarafından degradasyon için proteinleri hedefleme sinyali ubiquitinasyondur. Pek çok protein, otofaji defekti olan memeli hücrelerinde birikerek, otofajinin hücresel proteomun kontrolünde önemli bir rolü olduğunu ve

proteazom aracılı bozunmanın defektif otofajiyi düzeltemediğini göstermektedir (Mathew ve ark., 2009).

Bütün hücrelerin açlık sırasında kullanmak için iç besin depoları vardır. Glikojen ve lipid damlacıkları bu amaç için tasarlanmıştır. İçeriklerine öncelikle glikojen fosforilaz ve hormona duyarlı lipaz gibi özel enzimlerin faaliyetleri yolu ile erişilir. Diğer birçok hücre sel bileşenin besin deposu olarak ikili bir işlevi vardır. Örneğin, ribozomlar hızla büyüyen mikropların kuru ağırlığının% 50'sini kaplar. Besin koşulları uygun olduğunda hızlı protein sentezinin sağlanmasına ek olarak, koşullar kötüye gittiğinde proteomeun yeniden şekillenmesi için bir amino asit deposu sağlar. Otofajinin bu gibi tanımlanmamış besin depolarına erişim sağlamada kilit bir rolü vardır. Başlıca temel besinlerin herhangi birinin kısıtlanması mayada otofajiyi tetikler, azot kısıtlaması en güçlü uyarımı sağlamaktadır (Takeshige ve ark., 1992). Azot uzaklaştırıldığında, otofaji defekti olan maya, dahili amino asitlerden ciddi derecede yoksunlaşır. Bu durum da azot açlığından kurtulmak için önemli proteinlerin sentezini olanaksız hale getirir ve hücre ölümünü hızlandırır (Onedora ve Oshumi, 2005). Buradan hareketle otofaji açlık sırasında nitrojene ulaşmanın temel yolunu sağlamaktadır.

Organizma düzeyinde memeli gelişiminin birçok aşamasında otofaji gereklidir. Maternal kan kaynağına ulaşmadan önce gelişmekte olan embrioyu beslemek için oosit fertilizasyonunun hemen sonrasında, direkt olarak otofajinin varlığı gereklidir. Otofaji defektli embriyolar blastosist aşamasına ulaşamamaktadır (Tsukamoto ve ark., 2008). Maternal olarak sağlanan otofaji proteinleri, otofaji eksikliği olan yavruların embriyojenezi tamamlamaları için olanak sağlar ve otofaji için ikinci bir gereksinimi ortaya çıkarır: anne kanına erişimin doğum nedeniyle aniden kaybedilmesi. Otofaji defektif yavrular doğumdan sonraki 24 saat içinde ölürlür. Dolaşımdaki ve dokudaki amino asit seviyeleri azalır ve şiddetli miyokard enfarktüsünde gözlenenlere benzer elektrokardiyografik değişiklikler gösteren kalpte AMPK aktive olur (Kuma ve ark., 2004). Erişkin açlıkta otofajinin ayrıca karaciğer, pankreas, böbrek, beyin, iskelet kası ve kalpte 24 saat içinde artan merkezi bir rolü vardır (Mizushima ve ark., 2004). Otofajinin farmakolojik blokajı, açlıkta erken dönemde kalp fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Kanomori ve ark., 2009).

Otofaji düzeyleri karaciğerde 2 gün açlıktan sonra normale dönmesine rağmen, hem kalp hem de iskelet kasında artmaya devam etmektedir. Bununla birlikte karaciğer kütlesi, kas veya toplam vücut kütesinden kalıcı olarak daha hızlı düşmektedir. Bu düşüş biyosentezdeki bir aksamının, karaciğerin bazal tüketimini otofaji vasıtası ile dengelemesi ile tutarlıdır (Komatsu ve ark., 2005). Karaciğer kütlesi düştükçe, kas ve yağ dokusunun parçalanması karaciğeri beslemektedir, karaciğer de beynin ihtiyaç duyduğu glikoz ve keton cisimlerini beyne eksport etmektedir (Robinowitz ve White, 2010).

Klinik öncesi çalışmalarda diyet kısıtlamasının yaşam süresini uzattığı ve diyabet, kanser ve nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşa bağlı hastalıkların gelişimini azalttığı gösterilmiştir (O'Flanagan ve ark., 2017). Diyet kısıtlaması, organizmalarda, prokaryotlardan insanlara, sınırlı besin bulunabilirliği dönemlerine uyum sağlayan metabolik ve hücrel değişiklikleri teşvik eder (Longo ve Mattson, 2014). Temel değişiklikler, azalmış kan glikoz seviyelerini ve büyüme faktörü sinyalini; hücre büyümesini ve enerji metabolizmasını etkileyen stres direnci yolağının aktivasyonunu ve oksidatif strese, inflamasyona ve hücre ölümüne karşı korumayı içermektedir (Longo ve Mattson, 2014; Mattson ve ark., 2016). Besin açlığı ayrıca, karaciğer ve kas gibi kültürlenmiş hücrelerin ve organların çoğunda stresli koşullara uyartılabilir bir mekanizma olarak otofajiyi harekete geçirir (Kroemer ve ark., 2010; Mizushima ve ark., 2017).

Araştırmalar diyet müdahalelerinin, tümör insidansını azaltabileceğini ve farklı tümör modellerinde kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini güçlendirdiğini ve bu durumun standart kanser tedavilerine olası bir ek diyet manipülasyonuna dikkat çektiğini göstermektedir (Mattson ve ark., 2016; O'Flanagan ve ark., 2017).

2.7. Otofaji ve İntestinal Homeostazis

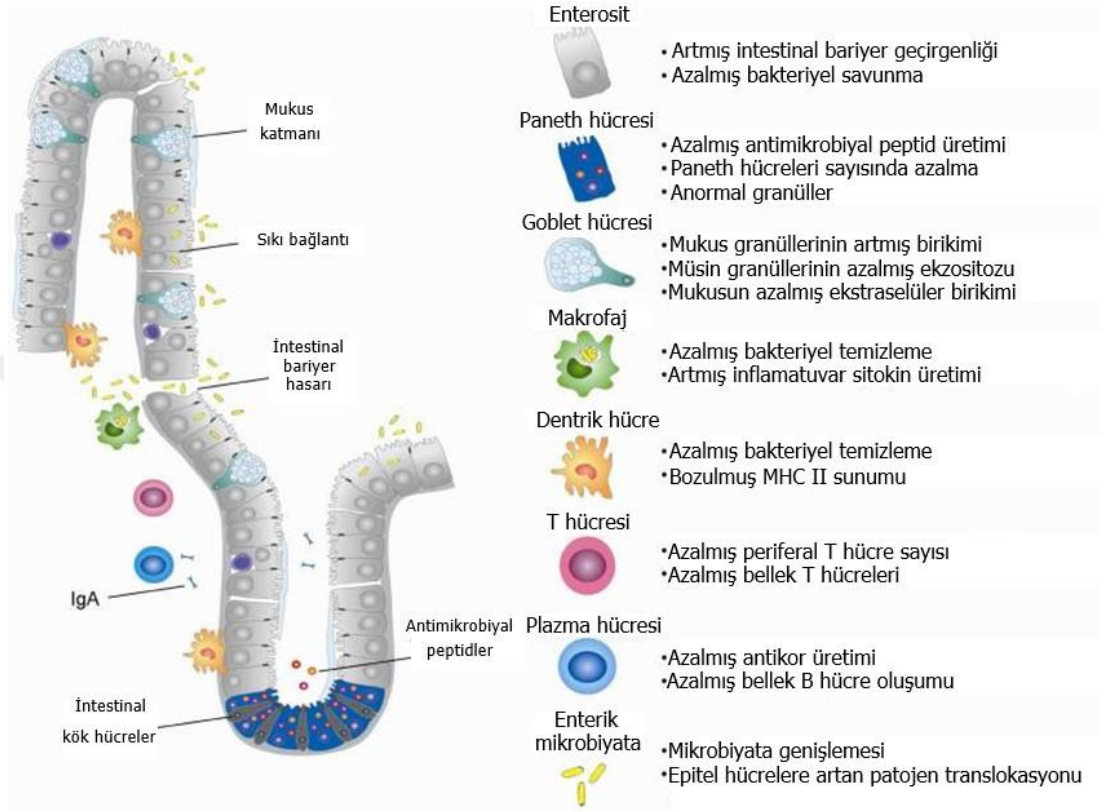
Bağırsak, ağız yoluyla alınan gıda ve besinleri sindiren ve absorbe eden en önemli organ olarak işlev görür. Bu belirgin fonksiyonların yanı sıra, bağırsak lümeni her zaman çok sayıda mikroorganizma barındırdığı için bağırsak bir organizmanın en büyük bağışıklık organlarından biri olarak kabul edilir. Sonuç olarak, bağırsağın bu farklı mikrobiyal toplulukla barış içinde bir arada yaşamasını sürdürmesi ve patojenik mikroorganizmaların tespiti ve yok edilmesi için inflamatuvar ve immün reaksiyonu tetiklemesi gerekir (Goto ve Kiyono, 2012; Wells ve ark., 2011). Bu işlem sırasında etkili bir bağırsak mukozası bariyeri, mikrobiyal homeostazın korunmasında ve ilk savunma hattını sağlayan patojenik mikroorganizmalarla mücadelede kritik öneme sahiptir. Genel olarak bağırsak mukozal bariyeri, bağırsak mukus tabakası ve epitel dahil olmak iki katmandan oluşur (Antoni ve ark., 2014).

Lümen ve bağırsak mukozası arasındaki bariyer olan bağırsak epiteli, sürekli olarak gıda ve mikroplara maruz kalır ve mikrobiyal istilaya karşı ilk savunma hattı görevi görür (Lassen ve Xavier, 2018; Randall-Demllo ve ark., 2013). Bağırsak epitel hücrelerinin yanı sıra enteroendokrin hücreleri, goblet hücreleri, Paneth hücreleri, M (microfold) hücreleri ve tuft hücreleri gibi özel epitel hücreleri, sindirim ve emilim bölgesi olarak işlev gören epitel katmanını oluşturur (Elshaer ve ark., 2017).

Mikrobiyal homeostazisin bozukluğu ve intestinal mukozal bariyerin hasarı, intestinal duvarda inflamatuvar yanıtları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini ve mitokondriyal bozukluğu büyük ölçüde uyarır ve sonuç olarak patogeneze ve inflamatuvar bağırsak hastalığının (IBD) ilerlemesine neden olur (Ke ve ark., 2017).

Bu bariyer, çoklu epitel hücre tiplerinin özel fonksiyonları, paraselüler geçirgenliği koruyan sıkı kavşaklar ve bağırsak kök hücre nişinin aracılık ettiği hücresel farklılaşma olmak üzere çeşitli savunma katmanlarına sahiptir (Barker, 2014). Fagositik hücreler, epiteldeki yarıklardan geçen herhangi bir mikrobiyotanın

izlenmesi ve ortadan kaldırılması için epitel tabakasının altında bulunur. IBD'de bariyer geçirgenliği, bağırsak mikrobiyotası ile etkileşimlerinde savunma ve tolerans arasındaki dengesizlikle sonuçlanır ve savunma azalır. (şekil 2.6) (Baxt ve Xavier, 2015).



Şekil 2.6. Otofaji sistemindeki kusurların defektif intestinal homeostazis ile ilişkisi. Otofaji sistemindeki bozukluklar, intestinal homeostazın korunmasını destekleyen doğal ve adaptif bağışıklığın birçok yönden bozulmasına neden olur. Bu şema, otofaji sistemindeki bozukluklara bağlı olarak bağırsak epitelinin durumunu göstermektedir. Değişiklikler arasında kusurlu bir mukus tabakası, azalmış antimikrobiyal peptid üretimi, artan bakteri translokasyonu, mikrobiyata genişlemesi, kusurlu antijen sunumu ve adaptif bağışıklık ve azalmış IgA üretimi ile sonuçlanan paraselüler geçirgenlik artışı bulunur. Otofaji ve immün hücreler arasındaki iletişim bağırsak homeostazını destekler ve bu iletişimdeki arızalar defektif bağırsak bariyer fonksiyonu ile ilişkilidir. (Baxt ve Xavier, 2015).

Bağırsak epitelı doğrudan farklı bakteri topluluğu ile etkileşime girer ve konakçı dokuların bakteri istilasına karşı ilk savunma hattıdır. Bu nedenle epitel, bakteriyel bağlanma ve istilaya karşı çeşitli savunma dizileriyle donatılmalıdır. Epitelin bakteriyel penetrasyona karşı savunduğu bir mekanizma, epitelyal yüzeyle bakteriyel teması sınırlayan antimikrobiyal proteinlerin salgılanmasıdır (Vaishnava ve ark., 2011). Bununla birlikte, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*) gibi belirli bağırsak patojenleri veya *Enterococcus faecalis* gibi fırsatçı olarak istilacı kommensal bakteriler bu ilk savunma hattını aşabilir ve epitel hücrelerine girebilir. (Eichelberg ve Galán, 1999; Klare ve ark., 2001; Müller ve ark., 2012) Bu istilacı bakterileri tespit eden ve daha fazla yayılmalarını sınırlayan epitel hücre içi immün mekanizmaların olup olmadığı sorusunu gündeme getirmektedir.

Bağırsak immün homeostazında “inflamatuvar bağırsak hastalığının” (IBD) genetik çalışmaları, otofaji yolağı proteinleri için önemli roller ortaya koymuştur. IBD, dirençli mikrobiyota ile düzensiz etkileşimlerden kaynaklanan, bağırsakta görülen kronik enflamatuvar bir hastalıktır. (Xavier ve Podolsky, 2007). Son araştırmalar, bir IBD tipi olan Crohn hastalığına bağlı otofaji yolağı genlerinde polimorfizmler tanımlamıştır. Kritik öneme sahip otofaji geni ATG16L1'deki mutasyonlar, insanlarda Crohn hastalığına yatkınlıkla ilişkilidir (Hampe ve ark., 2007; Rioux ve ark., 2007). Bununla birlikte, Crohn hastalığı ile ilişkili Atg16L1 polimorfizmleri farelerde otofaji defektlerine sebebiyet vermez, bu da enflamatuvar fenotiplerin Atg16L1'in otofajiden bağımsız fonksiyonlarından kaynaklandığını gösterir (Cadwell ve ark., 2008). Bunun aksine mutasyonlar, bol miktarda antimikrobiyal proteinle salgılayan özel bir epitel hücre kökeni olan Paneth hücrelerinde granül oluşumunda defektlere neden olur (Cadwell ve ark., 2008; 2010).

Bağırsak homeostazının korunmasında rol oynayan çoklu yolları anlamak için, bu organ sisteminde sağlık veya hastalık durumlarını belirlemek üzere birleşen birkaç yolak göz önünde bulundurulmalıdır. Birçok hücre sel, besinsel ve patolojik stres faktörleri otofajiye neden olmaktadır. Aynı zamanda transkripsiyonel düzenleme, bu yollara katılan birçok faktörün ekspresyonunu etkilemektedir (Baxt ve Xavier, 2015).

2.8. Beclin 1

Moleküler düzeyde otofaji, otofaji ilişkili genler (ATG) ve ilgili Atg proteinleri tarafından kontrol edilir. Maya hücrelerinde bu grubun otuz dört farklı proteini (Atg1-Atg34) tanımlanmıştır ve memeli hücrelerinde de bu 34 proteinin ortologları bulunmaktadır. Bunların 18'i (Atg1-10, Atg12-14, Atg16-18, Atg29 ve Atg31) tüm otofaji çeşitlerinde vardır (memeli,maya vs...). (Longatti ve Tooze, 2009; Weidberg ve ark., 2011). Bunlar 6 fonksiyonel gruba ayrılmıştır. İlk grup ULK1 kinaz kompleksidir (ULK-mAtg13- FIP200 Atg101), mAtg13 ile otofaji için başlama uyararı olarak görev yapan ana bileşendir. İkinci grup lipid transportunu destekleyen ve böylece fagoforun birleştirilmesine yardımcı bir protein olan Atg9'dur. Üçüncü grup, Vps34-Beclin-1-Vps15-mAtg14'ten oluşan sınıf III PI3-kinaz kompleksidir ve bunun görevi bir fagofor oluşturmaktır. Dördüncü grup Atg9'un preotofagozomal yapılardan geriye taşınması için gerekli olan PI3K-Atg2-Atg18'dir, hala olgunlaşmamış fagofor membranını uzatır. Beşinci grup, büyüyen fagoforda kıvrım oluşumuna neden olan Atg12-Atg5-Atg16L kompleksidir. Son grup C-terminaline bağlanarak, otofagozom oluşumuna neden olan fosfatidiletanolamin modifikasyonlarını indükleyen Atg8 proteinleridir (Reggiori ve ark., 2005; Mizushima, 2010).

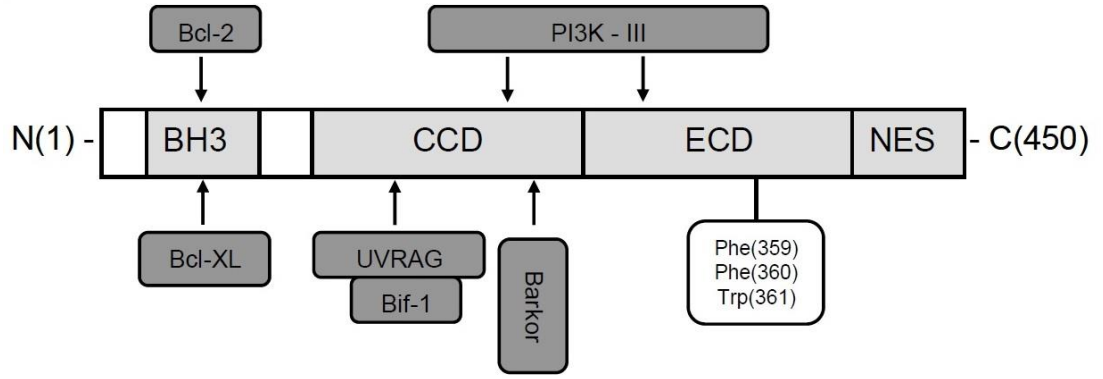
Mayada Atg6/vacuolar protein sınıflandırması-30 (Vps30) proteininin bir ortoloğu olan memeli otofaji geni Beclin 1, 1998'de Beth Levine grubu tarafından bir maya iki-hibrit taraması vasıtasıyla klonlanmıştır (Liang ve ark., 1998).

Yaklaşık 60 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip, 450 amino asitlik doğrusal bir dizilime sahip bir proteini kodlar (şekil 2.7). Beclin-1 sitoplazmik yapılarda, yani endoplazmik retikulum, mitokondri ve nükleer membran içinde lokalizedir (Li ve ark., 2010, Li ve ark., 2009).

Beclin 1, sınıf III tip fosfoinositid 3-kinaz (PI3KC3)/Vps34 ile etkileşimine bağlı olarak, otofajik proteinlerin pre-otofagozomal bir yapıya lokalizasyonu için önemlidir. Bu yapılar birlikte Beclin1/VPS34/VPS15 çekirdek kompleksini oluştururlar (He ve Levine, 2010).

Beclin1, otofajinin düzenlenmesinin merkezinde bulunmaktadır (Cao ve Klionsky). Genetik analizler tümör baskılanması, yaşam süresinin uzaması, hücre ölümünün düzenlemesi, embriyo gelişimi ve immün savunmasının yanı sıra ayrıca nörodejenerasyonu ve kalp hastalıklarını önleme işlevlerini göstermiştir (Levine ve Kroemer). Beclin 1, fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) üretmek üzere fosfatidilinositolün inositol halkasının 3 pozisyonlu hidroksil grubunun fosforilasyonunu katalize eden, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3KC3) temel bir bileşenidir (Backer, 2008). Bu üç PI3K sınıfı arasında PI3KC3, mayadan insanlara yüksek oranlarda korunan tek komplekstir; PI3KC3 (Vps34), p150 (Vps15) ve Beclin 1 (Vps30/Atg6) içeren bir çekirdek kompleksinden oluşur. PI3KC3, otofaji ve vakuolar protein sınıflandırmasında (Vps) pleiyotropik bir rol oynar. Bu kompleksin farklı hücresel süreçler arasında nasıl farklılaştığı ile ilgili bir netlik yoktur. Mayada Atg14 ve Vps38, çeşitli kompleks oluşumuna, sub-selüler lokalizasyona ve otofaji ve Vps'de işlev gören merkezi PI3K kinazın lipid fosforilasyonuna aracılık eder (Kihara ve ark., 2001).

Beclin 1, her biri farklı bir işlevi olan üç temel alan içerir. N-ucunda lokalize olan BH3 alanı (Bcl-2 homoloji alanı) 125 amino asit içerir ve anti-apoptotik protein ailesinin üyelerini, örneğin; Bcl-XL, Bcl-2 bağlayabilme özelliğine sahiptir. Merkezi çift kıvrımlı alan (CCD, amino asit 144- 269), UV ışınlama direnci-ilişkili gen (UVRAG) ve sınıf III PI3 kinaza bağlanır. Hem in vivo hem de in vitro olarak kendi kendine birleşmeyi ve dimerizasyonu düzenler (Adi ve ark., 2010; Shi ve Kehrl, 2010). Üçüncü alan evrimsel olarak korunan alandır (ECD), sınıf III PI3 kinaza bağlanır ve hücre organellerinin lipid membranlarının bağlanmasına katılır. Bu alan içerisinde kardiyolipin ile zenginleştirilmiş lipid membranların, örneğin mitokondride, tercih edilmesiyle bir hidrofobik parmak oluşturan üç ardışık aromatik amino asit tanımlanmıştır (Phe359-Phe360-Trp361) (Huang ve ark., 2012). Beclin-1 ayrıca etkili bir nükleer eksport sinyali (NES) sağlayan C-terminalinde lokalize kısa bir lösin-zengini amino asit dizisine sahiptir. BECN1/ATG6'de NES'in mutasyonları, besin yoksunluğuna yanıt olarak otofajiyi indüklemeye özelliğini olumsuz yönde etkiler (Liang ve ark., 2001).



Şekil 2.7. Beclin1 proteininin yapısı ve pozitif ve negatif düzenleyicileri. Beclin-1, Bcl-2 homoloji motifi (BH3), çift kıvrımlı(çift sarmal) alan (CCD) ve evrimsel olarak korunmuş bir alan (ECD) olmak üzere üç tanımlayıcı alan içerir. (Toton ve ark., 2014).

Beclin-1 hücrede çok işlevli rol oynayan özel bir moleküldür. Beclin-1 doğrudan otofajinin başlamasına dahil olmasıyla; dolaylı olarak gelişme, endositoz, strese karşı adaptasyon, yaşlanma ve hücre ölümü gibi birçok biyolojik hücresel süreçte önemli bir rol üstlenmektedir (Levine ve Kroemer, 2001; Geng ve ark., 2012). Beclin 1 disfonksiyonu birçok hastalık ile örneğin; nörodejeneratif hastalıklar (Huntington, Parkinson veya Alzheimer) ve kardiyomiyopati ile ilişkilendirilmiştir (Peng ve ark., 2013; Shibata ve ark., 2006). Ayrıca Beclin-1, ısı şok proteinleri, interferon-g, TRAP ve TBP proteini ile etkileşime girerek bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı immün tepkiye katılmaktadır; ancak, bu işlemlerin kesin mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır (Toton ve ark., 2014).

2.9. Otofajinin Başlatılmasında Beclin 1'in Rolü

Beclin-1, otofajiyi düzenleyen temel proteinlerden biridir ve otofajide önemli roller oynamasının yanında otofaji aktivitesinin dinamik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Ruck ve ark., 2011; Wang ve ark., 2013) Temel sinyal başlatma kompleksinin (sınıf III PI3 kinaz, Beclin 1 ve p150 proteini) bir parçası olduğu için, otofagolizozom oluşumunda yer alan bir protein dizisini tetikleyerek doğrudan etki edecek şekilde rol oynamaktadır (Mizushima, 2010).

Beclin-1'in otofaji başlatmasındaki rolü, kendi alanlarına bağlı olan kendine özgü proteinlerin varlığına bağlıdır. CCD ve ECD alanları içerisindeki en önemli protein, ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae* mayasında tanımlanmış olan bir vakuoler protein sınıflandırması (Vps34) homologu olan sınıf III fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K III) 'dır (Klionsky, 2007). Memeli hücrelerinin sınıf I, II ve III PI3 kinaz içerdiği gösterilmiştir. Sınıf I ve III PI3K kinazları otofajiye dahil olmaktadır. Bunların birincisi hücre zarının bir bileşenidir ve mTOR kinazı uyarmak adına sinyal iletim yolağının bir parçasıdır. Sınıf III PI3 kinaz hücre çoğalmasını ve hücre içindeki hücre iskeleti elemanlarının yer değiştirmesini destekler (Merhpour ve ark., 2010; Kang ve ark., 2011). Sınıf III PI3 kinaz, sadece Beclin-1 ile bir kompleks oluştururken faaliyet gösterebilir. Beclin-1/PI3K-III kompleksi trans-golgi aygıtında lokalizedir ve artan fosfatidilinositol 3-fosfat (PIP3) üretimini destekleyerek fagoforun uzamasını artırır ve diğer Atg proteinlerinin fagoforlara dahil edilmesine izin verir (Hoyer-Hansen ve Jaattela, 2007). PI3 kinazın aktivitesinin wortmannin veya 3 metiladenin gibi inhibitörlerle bloke edilmesi PI3K'nın stratejik rolünü doğrulayan otofajiyi baskılamaktadır (Matsunaga ve ark., 2009).

UV ışınlama direnci-ilişkili gen proteini (UVRAG), Beclin-1'in CCD bölgesine bağlanır. İki protein fagofor olgunlaşması ve otofagozom oluşumu için çok önemli olan bir kompleks oluşturur. Buna ek olarak, kompleksin PI3K aktivitesini büyük ölçüde arttırdığı ve böylece otofajiyi tetiklediği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2010). UVRAG ve Atg14'ün hem sınıf III PI3K-Beclin1 kompleks stabilitesi için gerekli olduğu hem de bunlardan herhangi birinin yıkılmasının Beclin1 seviyesinin düşmesine yol açtığı gösterilmiştir Itakura ve ark., 2008). Bax etkileşimli faktör-1 (Bif-1), Beclin 1'in bir başka pozitif regülatörüdür ve Beclin1 ile UVRAG aracılığı ile etkileşime girer. Farelerde yapılan çalışmalar, Bif-1 siliniminin otofagozom oluşumunu baskıladığını ve bu hayvanlarda önemli derecede daha yüksek kanser oranlarına yol açtığını göstermiştir (Takahashi ve ark., 2007).

Barkor / Atg14 (L) proteini de CCD bölgesine bağlanır. PI3 kinazın erken otofagozomu hedeflemesinde rol oynadığından otofajiyi tetiklemek için gereklidir (Fan ve ark., 2011; Sun ve ark., 2008). Ambra1, Beclin-1 ile kompleks oluşturan diğer bir proteindir. Bu protein Beclin-1'in, PI3K'nın en yüksek seviyede eksprese

edildiği endoplazmik retikulumla taşınmasını destekler. Bu, hücrel sitoskeleton ve otophagosome oluşumu arasındaki ilişkiyi açıklar (Di Bartolomeo ve ark., 2010; He ve Levine, 2010).

Vakuol membran proteini 1 (VMP1), sınıf III PI3K-Beclin1 kompleksinin oluşumunu uyarmak için Beclin1'in BH3 alanına bağlanır. Bu faktörün otofajiyi olumlu yönde etkilediğine inanılmaktadır çünkü bu kompleksin hücrede eksikliği durumunda otofaji tamamen engellenmektedir (Molejon ve ark., 2013).

Anti-apoptotik protein ailesi üyeleri, BH3 alanı yoluyla Beclin-1'e bağlanır. Proteinlerin bağlanması veya ayrışması, sürecin bastırılması veya aktive edilmesi ile sonuçlanır. Sürecin aşırı ilerlemesini önlemek için düzenleyici olarak işlev görürler ve aynı zamanda proliferasyon ve büyümeyi sağlamak için besin alımını kolaylaştırırken hücreyi bozulmaya karşı korurlar (Wei ve ark., 2008).

Geçtiğimiz birkaç yılda Beclin 1 ile Bcl-2/Bcl-XL etkileşimlerinin düzenlenmesinin, çeşitli hücrel uyarılara cevap olarak otofajinin etkinleştirildiği ya da devre dışı bırakıldığı merkezi bir mekanizmayı temsil ettiği yönünde artan kanıtlar vardır (Levine ve ark., 2008). Bu gibi etkileşimleri yöneten moleküler mekanizmaları anlamada da çok sayıda ilerleme kaydedilmiştir: Bcl-2 veya Beclin 1'in translyasyon sonrası modifikasyonları Bcl-2/Bcl-XL-Beclin 1 etkileşimlerini değiştirebilir; BH3-özgü peptidleri veya proteinleri Bcl-2/Bcl-XL-Beclin 1 etkileşimlerini rekabetçi bir şekilde bozabilir ve farklı membran tutucu reseptörler veya bunların adaptör proteinleri Bcl-2 ve Beclin 1 arasındaki etkileşimi de düzenleyebilirler. Henüz tanımlanmamış olan bu ve diğer düzenleyici mekanizmalar birlikte, Bcl-2/Bcl-XL – Beclin 1 etkileşimlerinin düzenlenmesi yoluyla otofaji aktivitelerine olumlu katkı yapabilmektedirler. Bcl-2/Bcl-XL – Beclin 1 etkileşimlerinin bozulması, hücrelerin besin yoksunluğu, hipoksi veya hücre dışı matriksten ayrılması gibi stres koşullarında otofajiyi ve hücre yaşamını desteklemek için kullandığı bir mekanizma olabilir (Degenhardt ve ark., 2006; Fung ve ark., 2008). Otofajinin bilinen en güçlü fizyolojik indükleyicisi açlıktır ve besin durumunun Bcl-2 ve Beclin 1 endojenlerinin etkileşimini düzenlediği bildirilmiştir (Pattingre ve ark., 2005).

Beclin 1, otofagozom oluşumundan otofagozom / endozom olgunlaşmasına kadar otofajik yolaklarda her temel adıma müdahale edebilir. Bu etkilerin çoğuna, otofajik indktarler ve otofajik inhibitörler dahil olmak üzere spesifik Beclin 1-bağlayıcı proteinlerin aktivasyonu aracılık eder. Bununla birlikte, Beclin 1 komplekslerinin birleşmesi hücreye veya dokuya bağlı bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Beclin 1 muhtemelen otofaji dışında ek fonksiyonlara da sahiptir. Daha ileri çalışmalar, tanımlanan Beclin 1 komplekslerinin her birinin otofaji ve spesifik hastalık bağlamında kesin rolünü ortaya çıkaracak ve otofajinin uyarılmasının m inhibe edilmesinin m daha faydalı olup olmadığını belirleyecektir (Kang ve ark., 2011)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Burdur Mehmet akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen, her grupta 6 adet olmak üzere toplam 30 adet (180-200gr ağırlığında, 10-12 haftalık) yetişkin erkek wistar albino cinsi sıçan kullanıldı. Açlık grupları son doyurulmayı takiben 12,24,36 ve 48 saat aç bırakılan gruplar şeklinde düzenlendi; su ad libitum olarak verildi ve tüm gruplar 12 saat karanlık-aydınlık ortamlarda tutuldu. Açlık süreleri sonunda rompun ketamin kombinasyonu ile sağlanan genel anestezi altında servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanarak gruplara ait sıçanlardan ince bağırsak örnekleri toplandı. Toplanan örnekler her deney grubu için taze olarak hazırlanan Bouin solüsyonunda tespit edilip rutin histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5µm kalınlığındaki doku kesitlerine streptavidin-biyotin metodu ile immunohistokimyasal prosedür uygulanarak Beclin 1 immünlökalisasyonları belirlendi. İnce bağırsak dokularında Beclin 1 immün reaksiyon şiddeti 3 üzerinden skorlanarak elde edilen veriler gruplar arası farklılığın incelenmesi için SPSS Windows Paket Programı ile değerlendirildi. İstatistiksel ilişkinin tespitinde Tek Yönlü Varyans Analizi ve alt gruplar arasındaki ilişkinin önemlilik kontrolünde Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi kullanıldı. Çalışmada kullanılan sıçanlar aşağıdaki tabloda olduğu gibi deney gruplarına dahil edildi.

Tablo 3.1. Deney grupları.

Deney Grupları	
Grup I	Kontrol grubu. Ad libitum yem ve su verildi.
Grup II	12 saat aç bırakılan grup. Ad libitum su verildi, yem verilmedi.
Grup III	24 saat aç bırakılan grup. Ad libitum su verildi, yem verilmedi.
Grup IV	36 saat aç bırakılan grup. Ad libitum su verildi, yem verilmedi.
Grup V	48 saat aç bırakılan grup. Ad libitum su verildi, yem verilmedi.

3.1. İmmunohistokimyasal Prosedür

1. Parafin bloklarından 5µm kalınlığında alınan kesitler dehidrasyon için alkol serilerinden geçirildi.
2. Daha sonra kesitler antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için 0,01M sitrat tamponu (ph:6) ile mikrodalga fırında (750W) 2 kez, 5'er dakika işleme tutuldu.
3. Daha sonra kesitler oda ısısında (20dk) soğutuldu. Kalem ile sınırlandırılan kesitler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) + % 0,2 Tween 20 solüsyonu ve distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için, oda ısısında, nemli ortamda, %3'lük H₂O₂ solüsyonunda (25dk) bekletildi.
4. Tekrar PBS + %0,2 Tween 20 solüsyonu ile yıkandı. Ardından dokular Protein Blocking Agent içinde oda ısısında, nemli ortamda (15 dk) tutuldu.
5. Daha sonra kesitler, 1/400 µ oranında dilue edilen primer goat Beclin1 antikoru ile +4 °C'de nemli ortamda bir gece bekletilerek inkübasyonu sağlandı. Negatif kontroller primer antikorun işlemlerden çıkarılması ile elde edildi.
6. Ertesi sabah dokular PBS + %0,1 Tween 20 solüsyonu ile yıkandıktan sonra Biotinle Konjuge Universal LSAB Kit ile oda ısısında nemli ortamda (30dk) inkübe edildi.
7. Tekrar PBS + %0,1 Tween 20 solüsyonu ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında ve nemli ortamda HRP solüsyonunda (30dk) bekletildi
8. Uygulama sonunda kesitler PBS + %0,1 Tween 20 solüsyonu ile yıkandı ve akabinde mikroskop altında DAB kromojeni (10dk) uygulandı.
9. Daha sonra kesitler distile suda (5dk) yıkandı ve Hemotoksilen (5dk) ile zıt boyama yapıldı. Ardından alkol serilerinden geçirilerek kapatılan preperatlar Olympus BX51 ışık mikroskobu ile görüntülendi.
10. Gruplara ait doku örneklerinin immün boyama alanları iki farklı gözlemci tarafından belirlendi ve boyama şiddeti açısından negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olmak üzere semikuantitatif olarak skorlandı.

3.2. İmmunohistokimyasal Prosedürde Kullanılan Kimyasal Çözelti ve Malzemeler

Tablo 3.2. İmmunohistokimyasal prosedürde kullanılan malzemeler

Kimyasal Malzemenin Adı	Markası	Kodu
Beclin 1 Antibody Polyclonal Rabbit	Novus Biologicals	NB500-249
Biotnylated Goat Anti-Rabbit	Vector Lab	BP-9100
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Lab	SP-2002
2.5% Normal Goat Serum Blocking Solution	Vector Lab	S-1012
Streptavidin, Horseradish Peroxidase, R.T.U.	Vector Lab	SA-5704

Tablo 3.3. Sitrat Tampon Solüsyonu (500ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
Citric asit	0,96 gr
Distile su	500ml
10N NaOH	Ph:6 olana kadar eklenir.

Tablo 3.4. Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (1000ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
Na₂HPO₄	1,48gr
KH₂PO₄	0,43
NACL	7,2gr
Distile su	1000ml

Tablo 3.5. PBS+ %0,2 Tween 20 solüsyonu (500ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
PBS	500ml
Tween 20	0,5ml

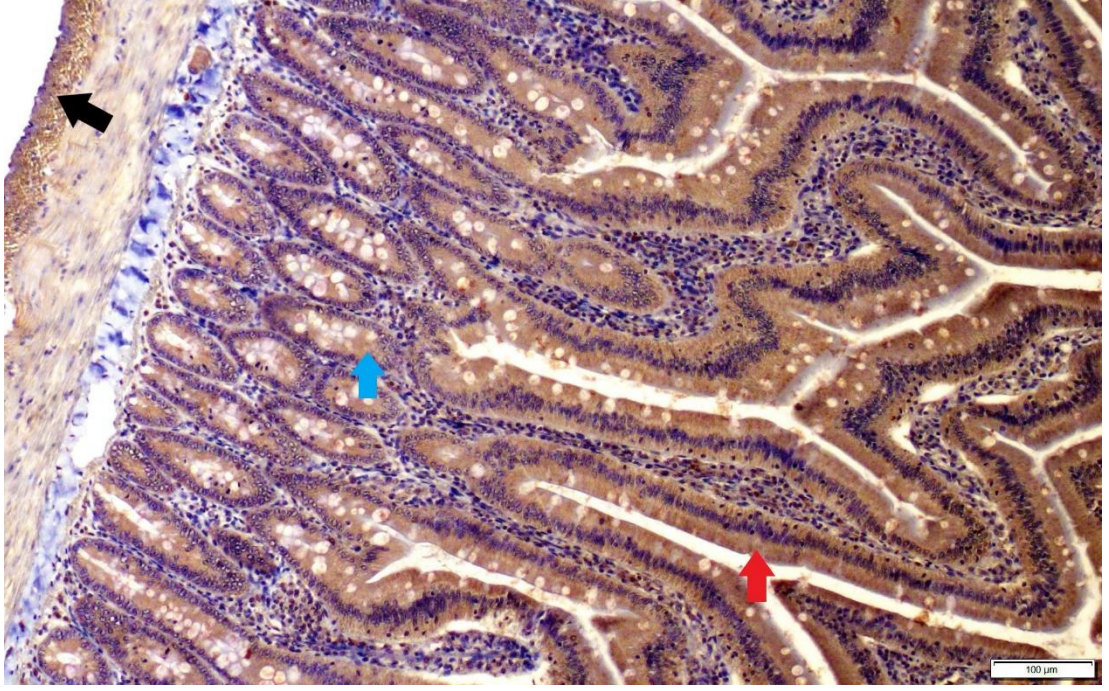
Tablo 3.6. PBS+%0,1 Tween 20 solüsyonu (500ml için)

Kimyasal Malzemenin Adı	Miktarı
PBS	500ml
Tween 20	0,25ml

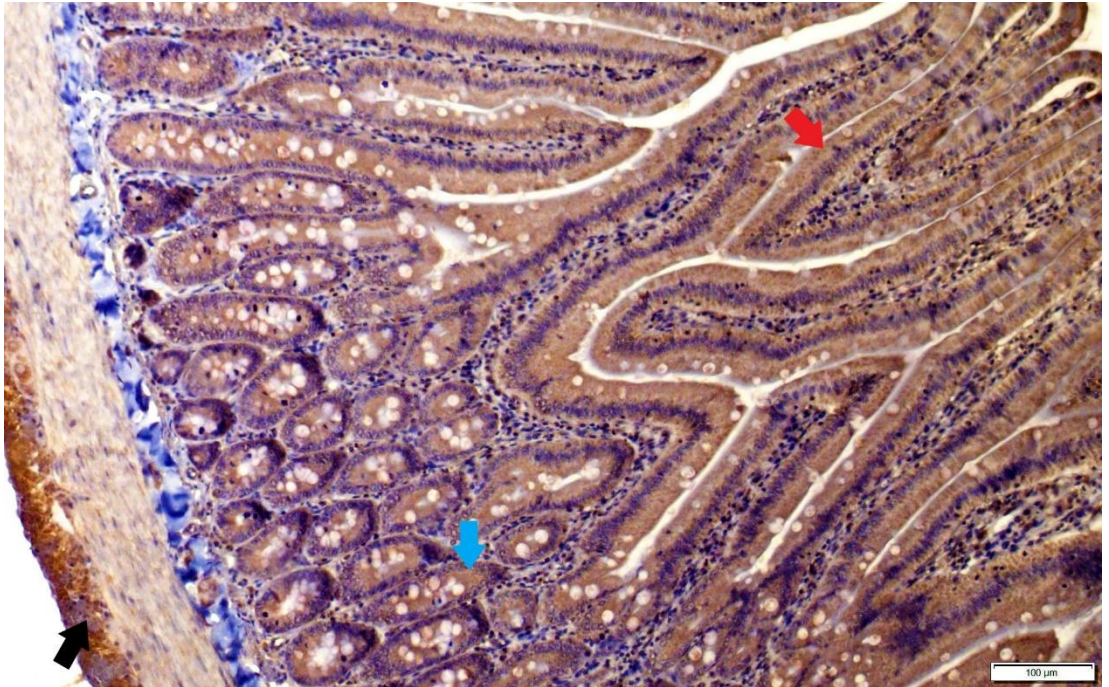
4. BULGULAR

Yapılan çalışmada kontrol grubu ile birlikte açlık gruplarında son doyurulmayı takiben 12, 24, 36 ve 48 saat açlık süreleri sonunda alınan ince bağırsak doku kesitleri (duodenum, jejunum, ileum) Beclin 1'in dokulardaki ekspresyonlarını belirlemek için immunohistokimyasal olarak boyandı. Olympus BX51 ışık mikroskop ile incelenen boyalı doku örnekleri farklı gözlemciler tarafından incelendi ve boyama şiddetleri; - (boyanma yok), + (zayıf), ++ (orta) ve +++ (güçlü) olarak değerlendirildi. Gruplara ait boyanma örnekleri Şekil 4.1.-4.15. arasında gösterildi.

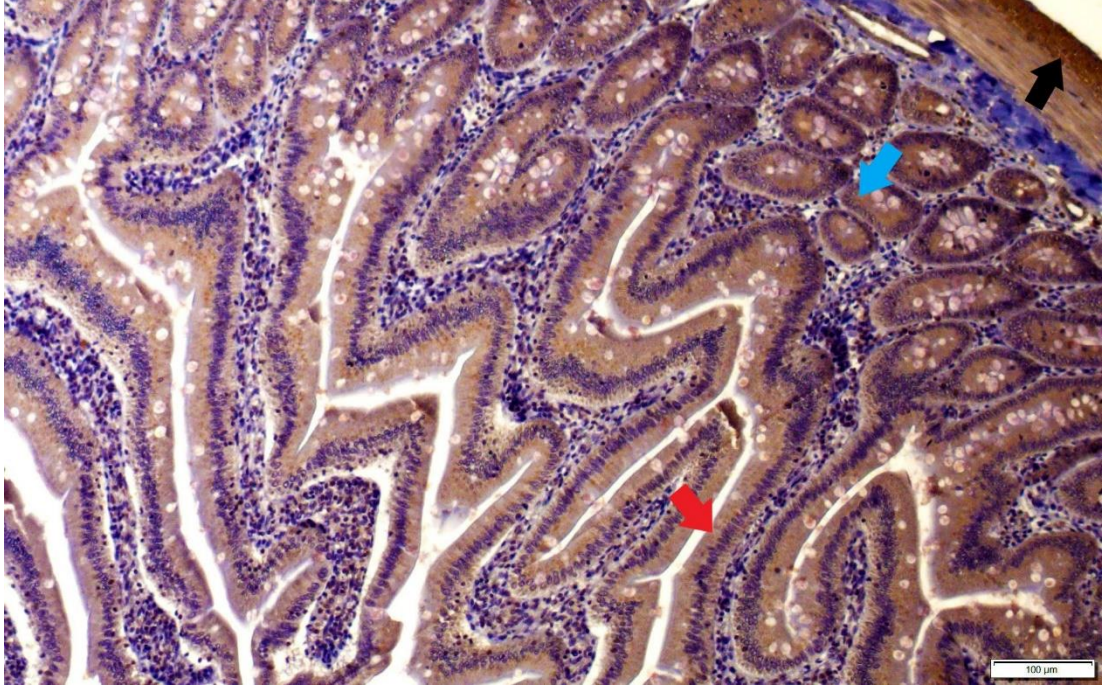
İnce bağırsağın bölümleri grup bazında kendi aralarında değerlendirildi ve ekspresyonları skorlandı. Kontrol ve açlık grupları karşılaştırıldığında ince bağırsağın tüm bölümlerinde (duodenum, jejunum, ileum) ışık mikroskopik düzeyde yapısal farklılıkların olmadığı gözlemlendi. Beclin 1 ekspresyonları incelendiğinde ise, tüm gruplarda immün lokalizasyonun bütün ince bağırsak bölümlerinde villus epitel hücrelerinde, glandular epitel hücrelerinde ve tunika muscularis katmanında olduğu ve boyanma şiddetinin de orta derecede (++) olduğu belirlendi (Şekil 4.1. ve 4.15. arası). Boyanma şiddeti açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi ($p>0.05$). Grupların boyanma şiddeti grafikleri Şekil 4.16.-4.18. arasında gösterildi.



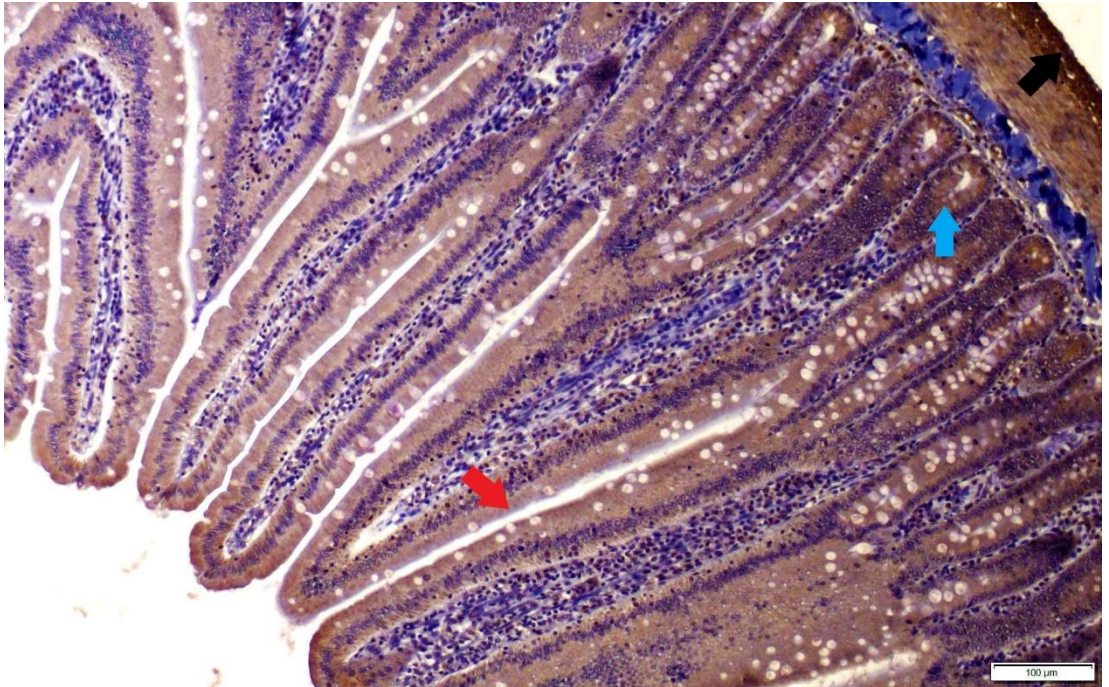
Şekil 4.1. Kontrol grubu sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



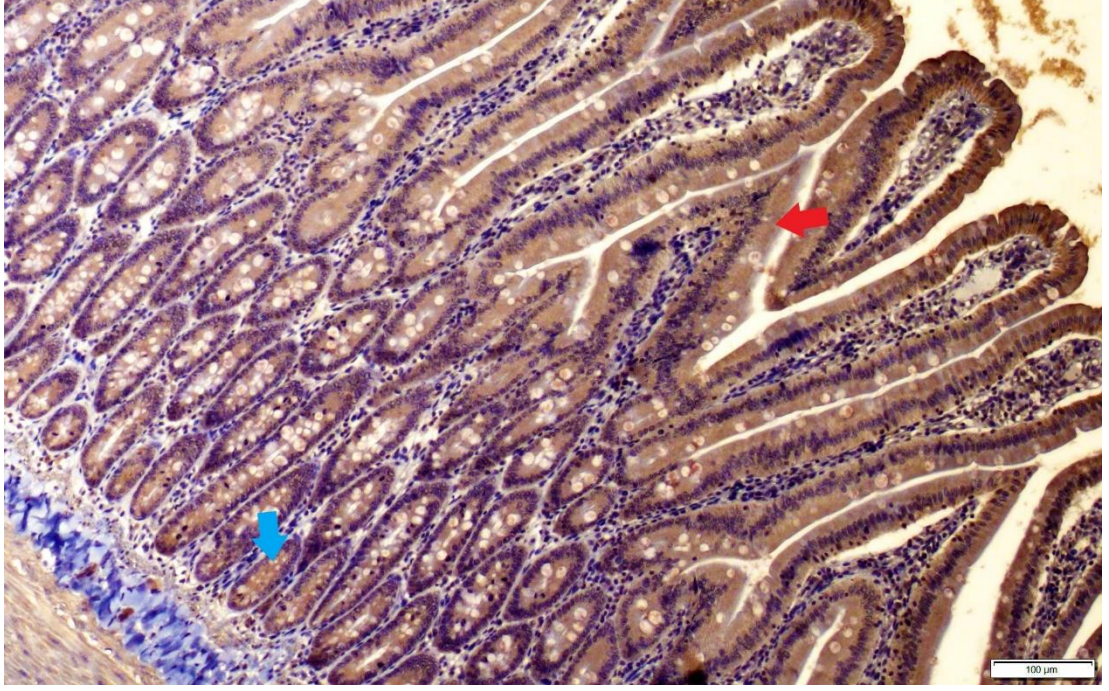
Şekil 4.2. 12 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



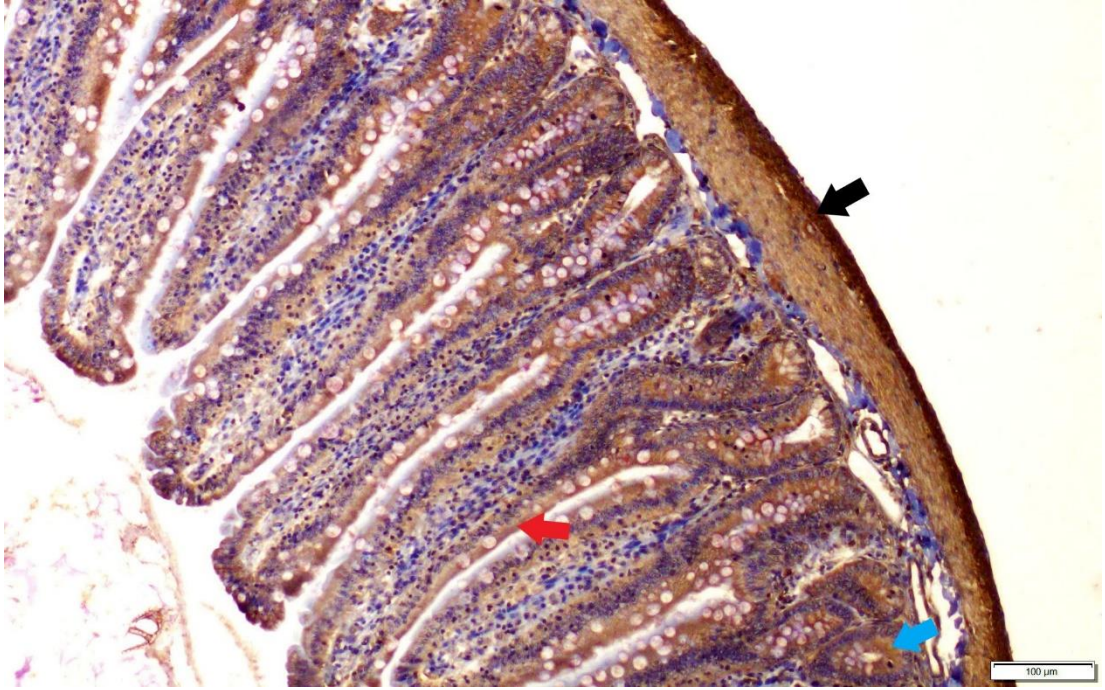
Şekil 4.3. 24 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



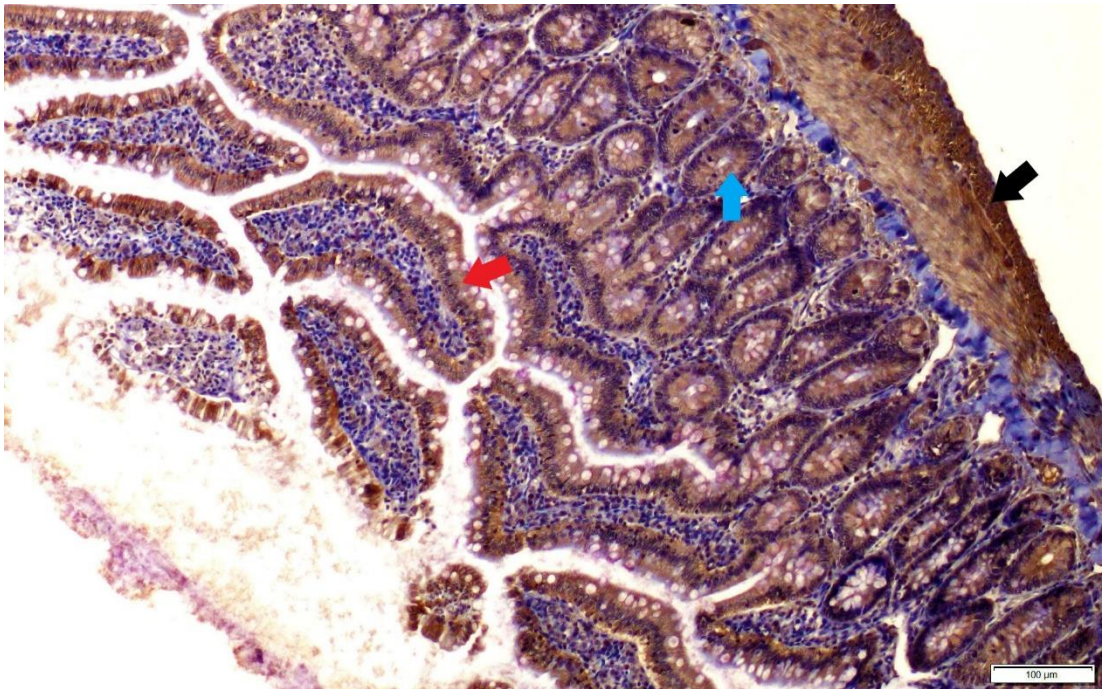
Şekil 4.4. 36 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



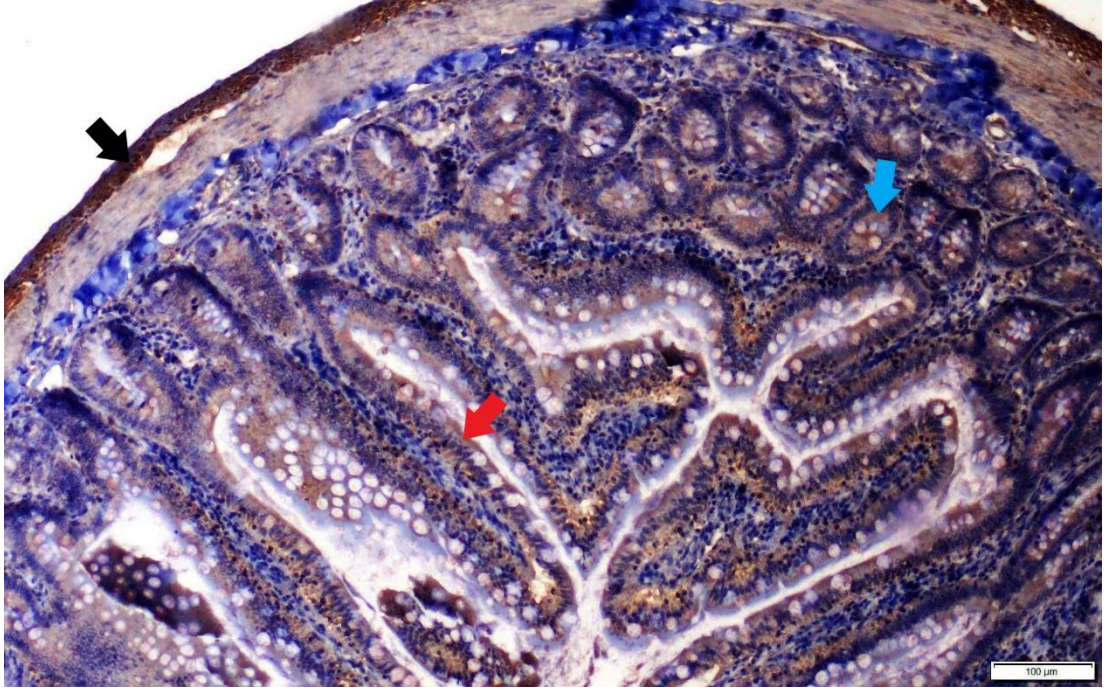
Şekil 4.5. 48 saat aç bırakılan sıçan duodenum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli.



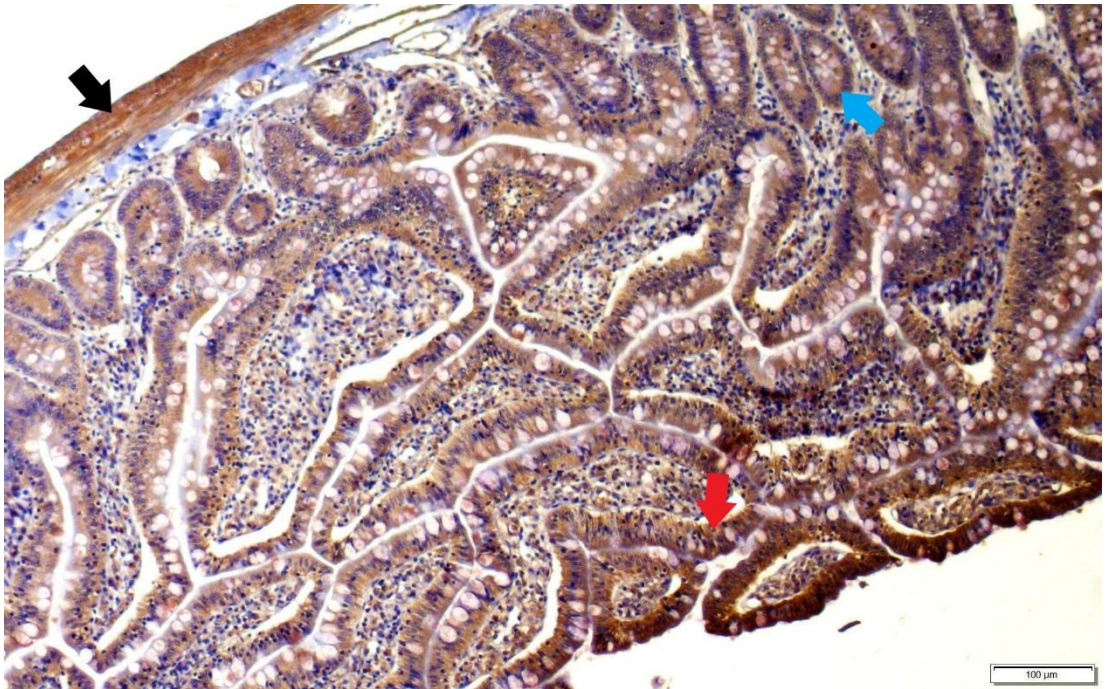
Şekil 4.6. Kontrol grubu sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



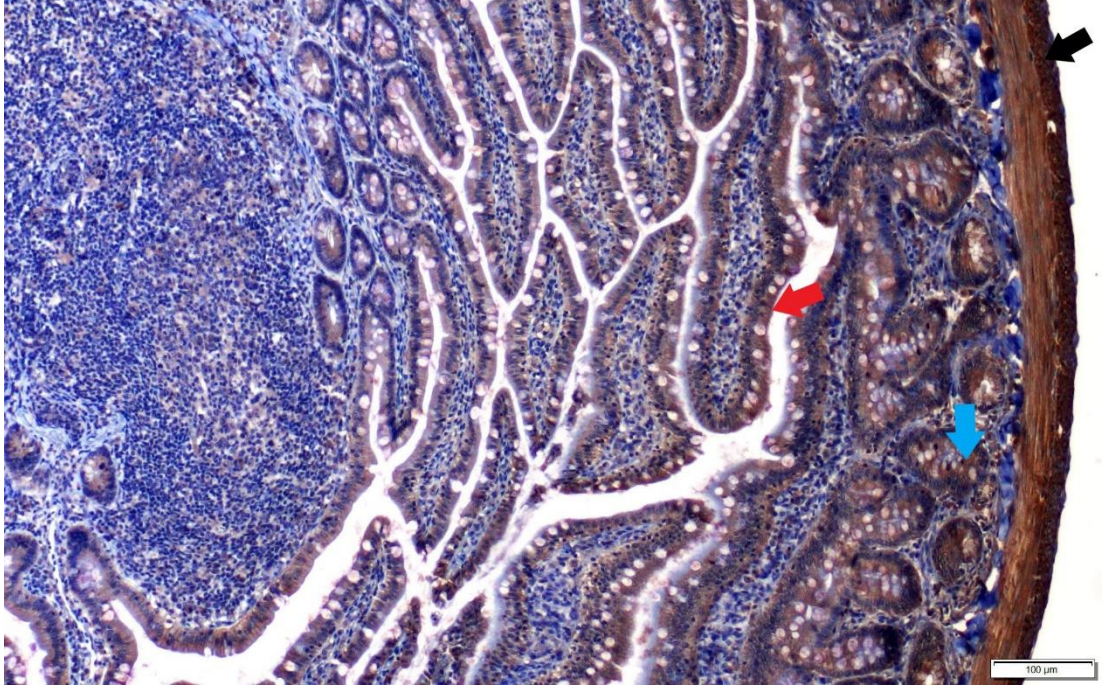
Şekil 4.7. 12 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



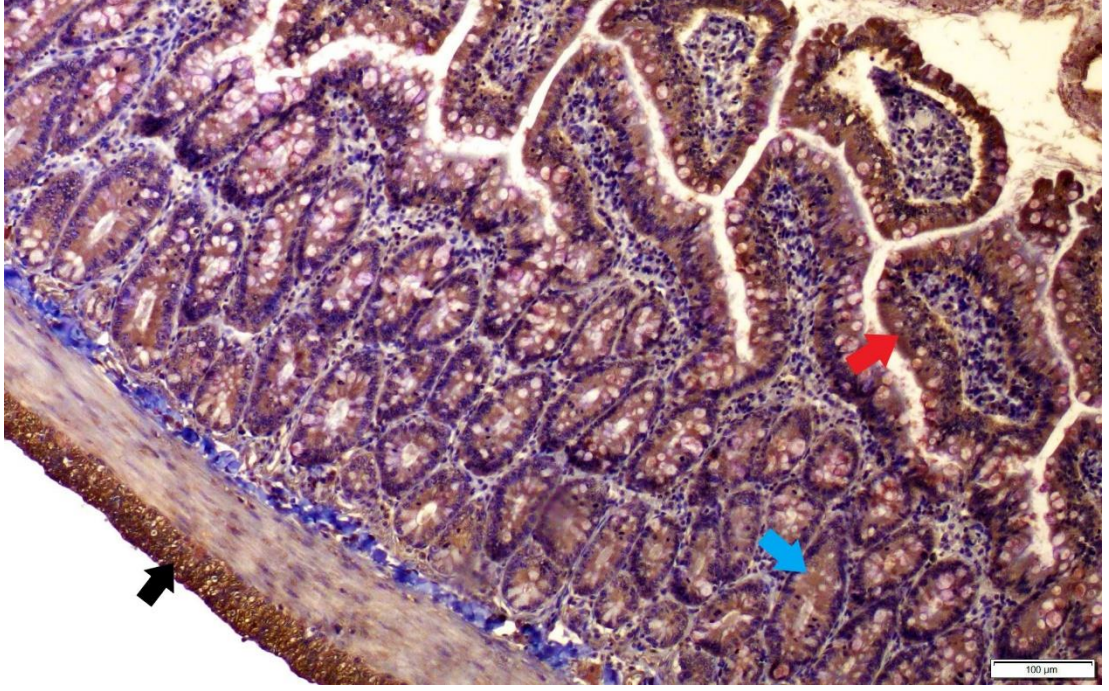
Şekil 4.8. 24 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



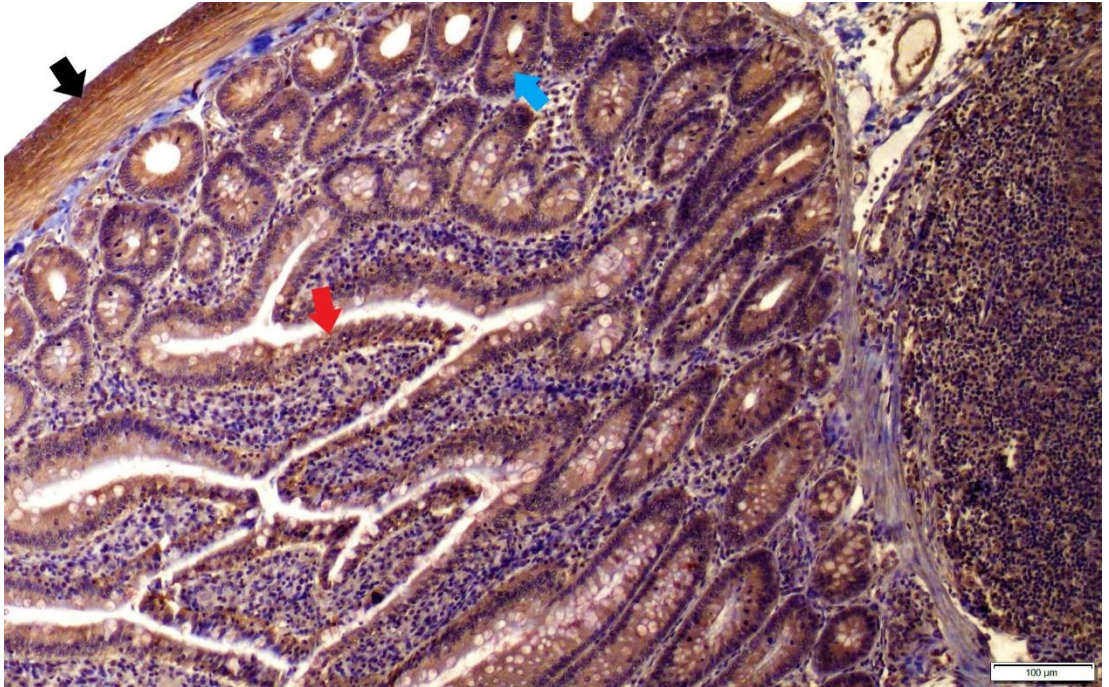
Şekil 4.9. 36 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



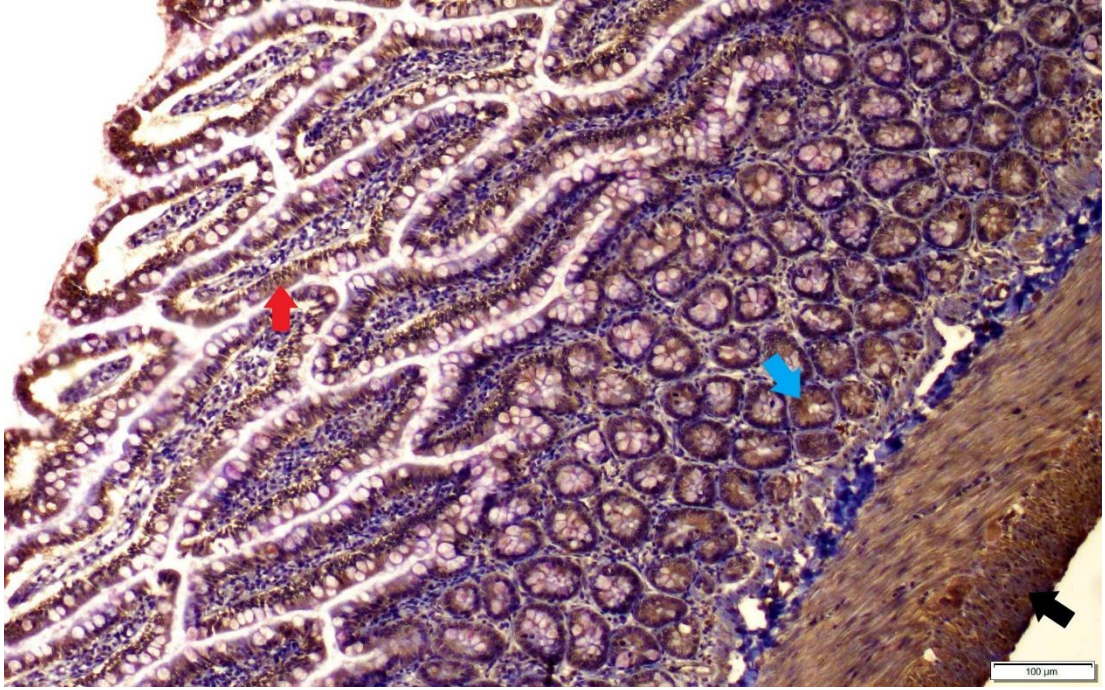
Şekil 4.10. 48 saat aç bırakılan sıçan jejunum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



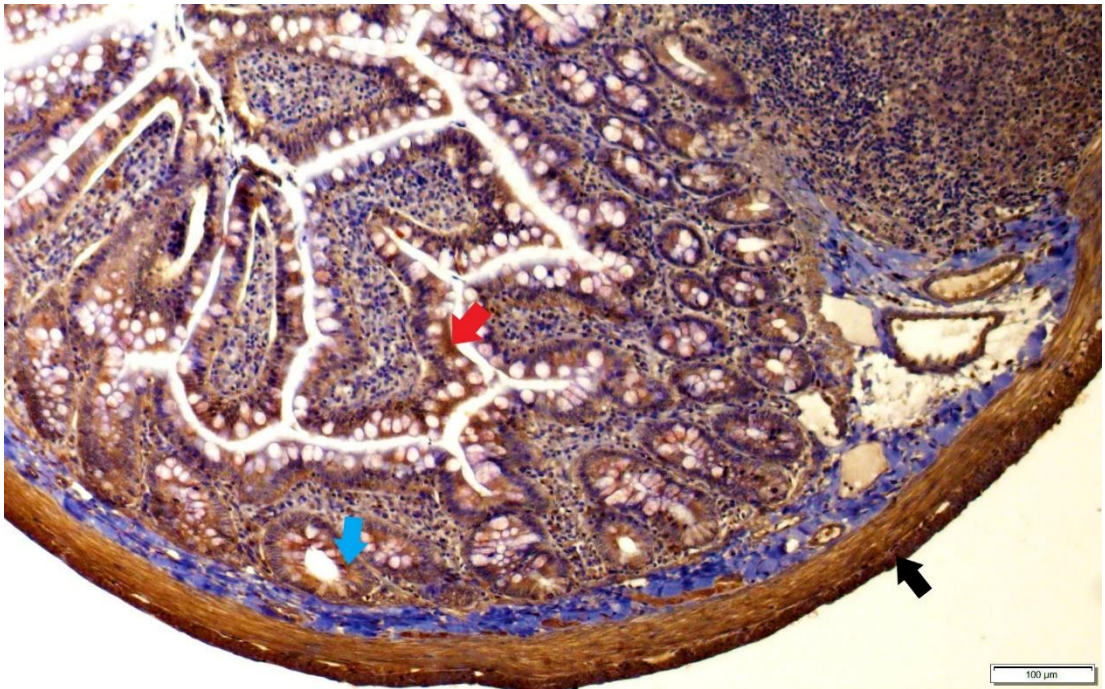
Şekil 4.11. Kontrol grubu sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



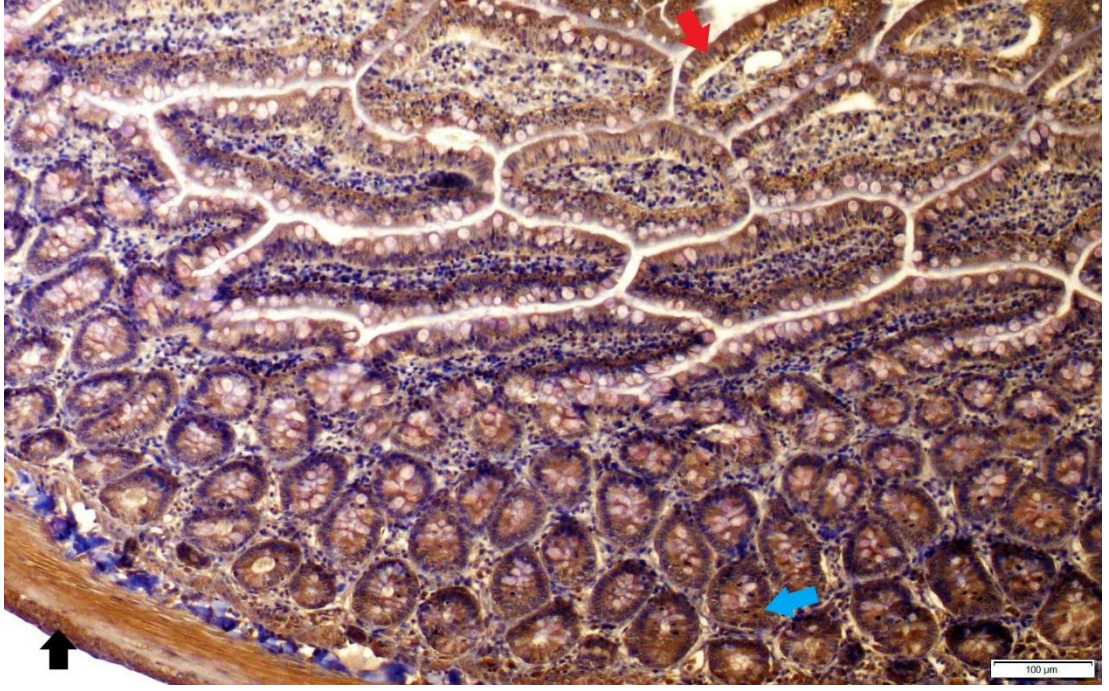
Şekil 4.12. 12 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



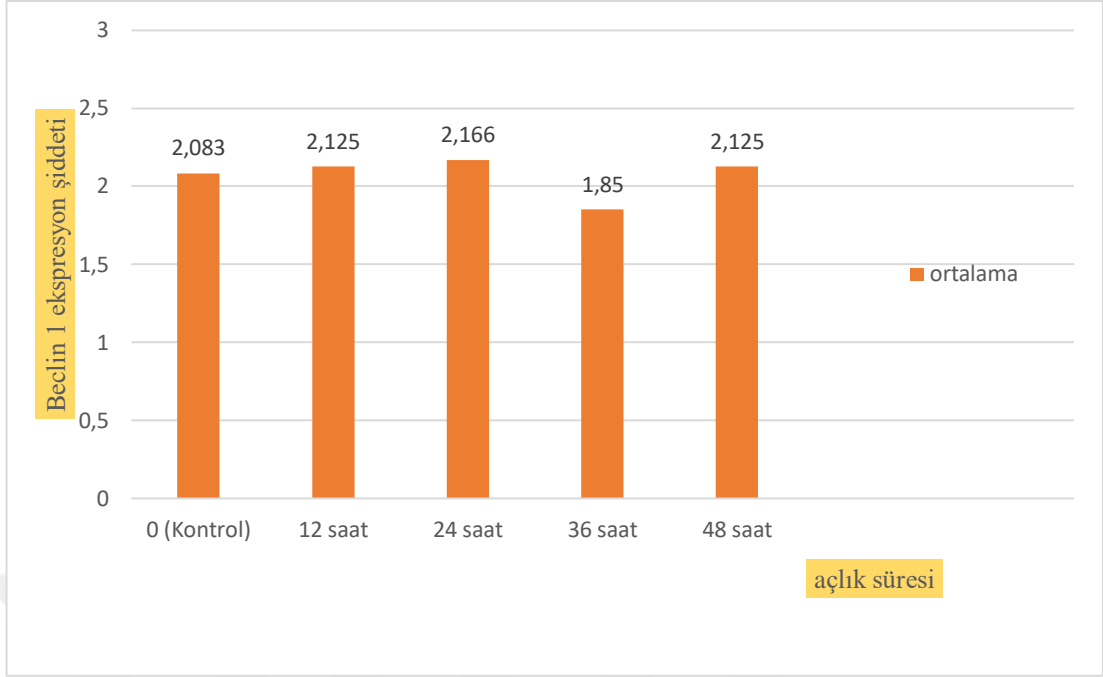
Şekil 4.13. 24 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



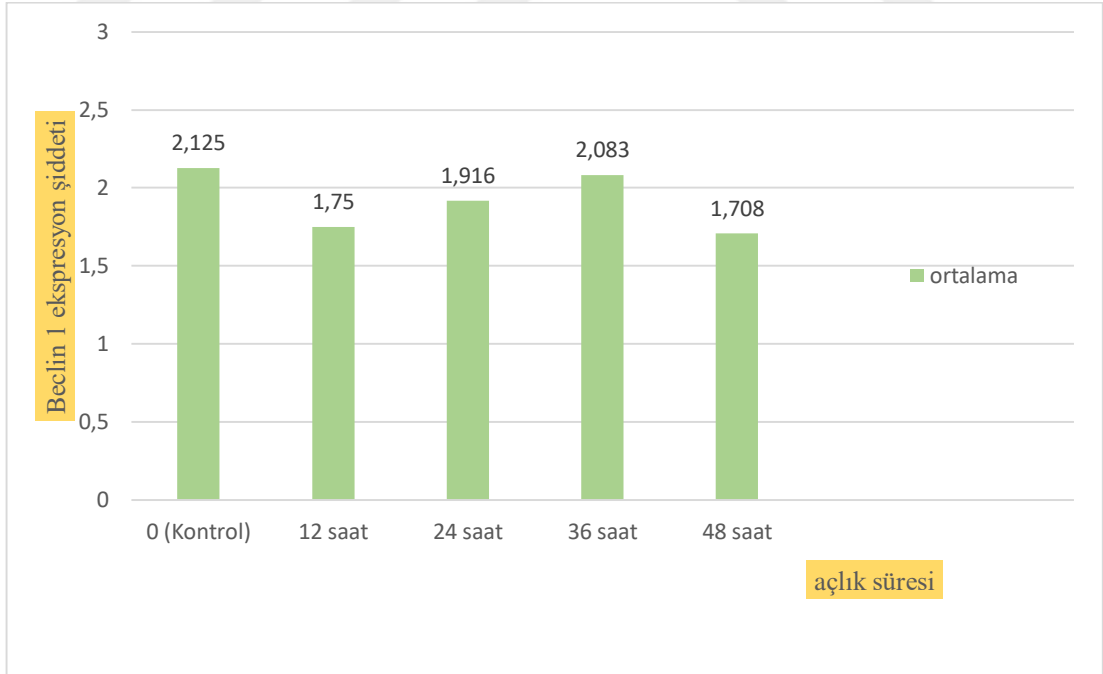
Şekil 4.14. 36 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



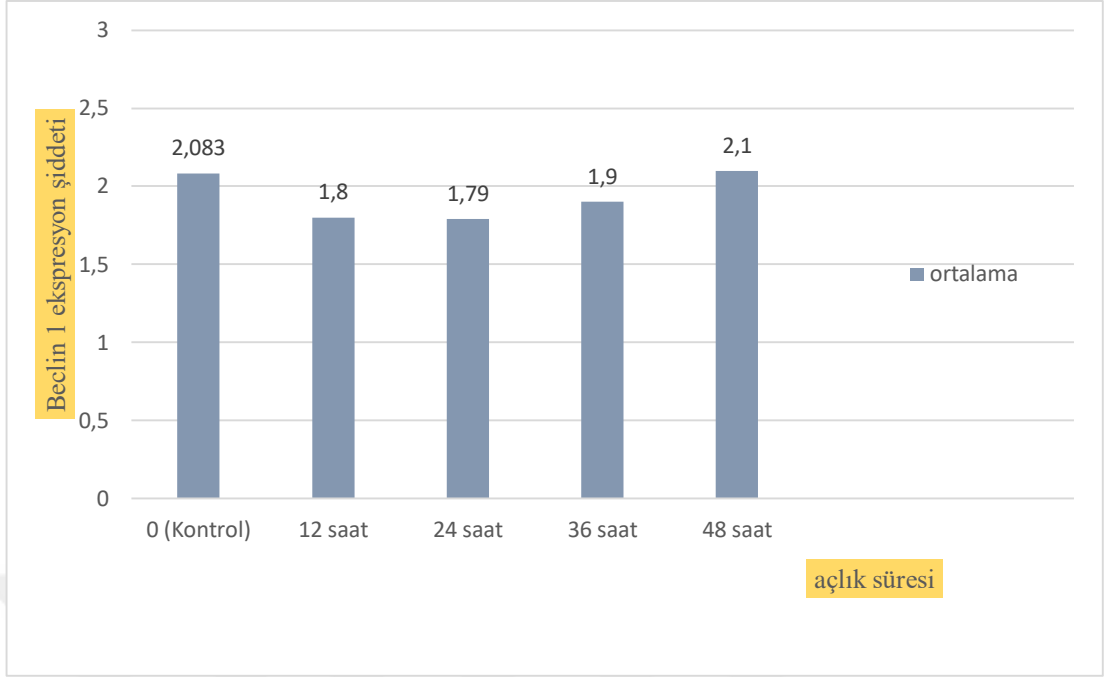
Şekil 4.15. 48 saat aç bırakılan sıçan ileum dokusunda Beclin 1 immün reaksiyonu. Kırmızı ok: yüzey epiteli; Mavi ok: bez epiteli; Siyah ok: Kas tabakası.



Şekil 4.16. Deney gruplarına ait duodenum Beclin 1 ekspresyon şiddeti ($P>0.05$).



Şekil 4.17. Deney gruplarına ait jejunum Beclin 1 ekspresyon şiddeti ($P>0.05$).



Şekil 4.18. Deney gruplarına ait ileum Beclin 1 ekspresyon şiddeti ($P>0.05$).

5. TARTIŞMA

Beclin 1 otofaji düzeyini yansıtabilen ilk tanımlanan otofaji ilişkili gendir (Cao ve Klionsky, 2007; Zeng ve ark., 2006) ve tümör oluşumu sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Beclin 1'in mide kanseri, pankreas adenokarsinomu ve hepatoselüler hücreli karsinom dahil olmak üzere birçok kanser türünde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (Geng ve ark., 2012; Kim ve ark., 2011; Song ve ark., 2004). Giatromanolaki ve arkadaşları LC3A ve BECN1 (Beclin 1) proteinlerinin meme, akciğer, endometriyal, ürotelyal ve prostat tümörlerinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve bu proteinlerin ekspresyonunun tümör agresifliği ve kötü prognoz ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Giatromanolaki ve ark., 2013).

In vitro deneyler, Beclin 1'in prognozun takibinde güvenilir bir marker olabileceğini rapor etmiştir. Bununla birlikte farklı laboratuvarlardan çelişkili sonuçlar da bildirilmiştir (Guo ve ark., 2011; Li ve ark., 2009).

Kolorektal kanserli (CRC) hastalarda Beclin 1 immun ekspresyonunu belirleyen bir çalışmada, Beclin 1 ekspresyonunun tümör uzak metastazı ve genel sağkalım açısından kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte yüksek ekspresyonu ile tümör farklılaşması arasında bir ilişki bulunmadığı kaydedilmiştir. Yapılan çalışma sonunda Beclin 1'in CRC'de etkin bir prognostik gösterge olabileceği ve CRC tedavisinde yeni bir moleküler hedef olabileceği bildirilmiştir (Zheng ve ark., 2018).

Benzer çalışmalar Beclin 1'in aşırı ekspresyonunun CRC hücre büyümesini baskıladığını ve yüksek Beclin 1 ekspresyonunun uzun yaşama ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermesine rağmen (Li ve ark., 2009) Beclin 1'in CRC'deki fonksiyonu hala tartışmalıdır ve kesin sonuçlar tam olarak belirlenememiştir (Zheng ve ark., 2018).

Yukarıdaki çalışmadan farklı bir sonuç bildiren bir çalışmada CRC ile otofaji proteinlerinin ekspresyonlarının prognostik önemi araştırılmış, Beclin 1

ekspresyonunun iyi histolojik farklılaşma ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak otofajiye bağlı proteinlerin ekspresyon seviyeleri ile klinopatolojik parametreler (histolojik farklılaşma, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı) arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenememiştir. Bu çalışmanın sonunda araştırmacılar, Beclin 1 ve diğer bazı önemli otofaji ilişkili proteinlerin prognoz ile ilişkili olmadığını ileri sürmüşlerdir (Choi ve ark., 2014).

Benzer şekilde Ahn ve arkadaşları sağlıklı insan mide ve kolon mukozal hücrelerinde çok az ya da hiç immün ekspresyon olmayan Beclin 1'in 103 CRC vakasının %95'inde, 60 gastrik adenokarsinom örneğinin ise %83'ünde yüksek derecede ekspresyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar bu bulgulara dayanarak Beclin 1'in invazyon, metastaz ve evreleme gibi klinopatolojik süreçlerde etkili olmamakla beraber hem kolorektal hem de gastrik tümör oluşumunda rol oynayabileceğini ifade etmişlerdir (Ahn ve ark., 2007).

Yukarıda belirtilen CRC'li hastalarda Beclin 1 ekspresyonuna ilişkin elde edilen sonuçlarla çelişkili olan başka bir çalışmada, insan meme kanserinde Beclin 1 protein ekspresyon seviyeleri western blot analizi ile araştırılmış, Beclin 1 protein ekspresyonunun genellikle meme kanserlerinde azaldığı sonucuna varılmıştır. Bu azalmış ekspresyonun stroma veya epitelden ziyade özellikle kansinom hücrelerinde olup olmadığını belirlemek için immunohistokimyasal olarak boyanmış doku kesitleri incelenmiştir. Vakaların hepsinde tüm normal meme epitel hücrelerinde Beclin 1 immün reaktivitesinin güçlü olduğu, tersine meme kanseri hücrelerinde anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu veriler eşliğinde araştırmacılar, Beclin 1'in memeli hücre büyümesi ve tümör oluşumunda negatif regülatör olarak işlev görebileceğini ve otofajiye destekleyici ve büyümeyi önleyici etkileri ile birleştirildiğinde, işlevsel olarak etkisizleştirilmesinin meme kanseri gelişimi veya ilerlemesinde önemli olabileceğini ifade etmişlerdir (Liang ve ark., 1999).

Gastrik kanserde, otofajinin klinopatolojik önemini değerlendiren başka bir çalışmada primer gastrik kanserli 510 hastadan alınan örneklerde otofaji durumunu belirlemek için tek bir marker kullanmak yeterince güvenilir olamayabileceğinden

LC3, Beclin 1 ve p62 olmak üzere üç otofaji ilişkili protein ekspresyonu IHC ile belirlenmiştir. Üç proteinin en az ikisinin pozitif olduğu örneklerde otofajinin varlığı tanımlanmıştır. Otofaji pozitif vakalar %22,1 olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular, LC3, Beclin 1 ve p62 ile belirlenen otofajinin lenf nodu metastazı, damar invazyonu ve hepatik metastaz ile anlamlı korelasyonda olduğunu, özellikle evre 1'deki gastrik kanserli hastaların düşük sağkalımının önemli derecede otofaji ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgular araştırmacılara otofajinin, özellikle erken klinik bir aşamada gastrik kanserin ilerlemesini desteklediğini ve LC3, Beclin 1 ve p62 ekspresyonunun belirlediği otofaji durumunun gastrik kanserli hastalarda prognozu tahmin etmede yardımcı bir faktör olabileceğini düşündürmüştür (Masuda ve ark., 2016).

Mide kanseri hastaların doku ve hücrelerinde Beclin 1 ekspresyonu ve hastalığın prognozu ile ilişkisini araştıran benzer bir çalışmada, Beclin 1 ekspresyonu IHC ile lenf nodu pozitif mide kanseri hastalarının tamamında tespit edilmiştir. Beclin 1 ekspresyonlarının klinopatolojik özelliklerle ilişkisi ve mide kanseri sağkalımı incelenmiştir. Hastaların %84,5'inde Beclin 1 ekspresyonu, normal gastrik mukoza hücrelerine kıyasla mide kanserli hücrelerinde yüksek olarak belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında araştırmacılar, Beclin 1'in mide kanseri oluşumunda potansiyel bir rolü olduğunu ve lenf nodu pozitif mide kanserli hastaların prognozunu öngörmeye ümit verici bir biyomarker olabileceğini, dolayısıyla da mide kanseri tedavisi için yeni bir terapötik hedef görevi görebileceğini düşünmüşlerdir (Geng ve ark., 2012).

Beclin 1'in tümör patogenezisindeki rollerini belirlemeye yönelik çalışmalar dışında, çeşitli hastalıklarda aktivitesini araştıran çalışmalar da mevcuttur. Trinitrobenzen sülfonik asidin intrarektal enjeksiyonu ile oluşturulan fare IBD modelinde, bağırsak dokularında dekorinin ekspresyonunu ve bunun otofaji ile ilişkisini araştıran bir çalışmada, dekorinin ve otofajiye bağlı proteinler olan Beclin 1 ve LC3B'nin ekspresyonları IHC kullanılarak tespit edilmiştir. Oluşturulan IBD modelinde dekorinin yanı sıra otofajiye bağlı proteinler Beclin 1 ve LC3B'nin ekspresyonlarının fare bağırsak dokularında arttığı bildirilmiştir. Ayrıca dekorin ilave edilmiş normal kolon mukozal hücrelerinde Beclin 1 ve LC3B protein

ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Elektron mikroskopunda dekorinin aşırı eksprese olduğu hücrelerde, hücre içi otofagozomların ve dolayısıyla otofajinin arttığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar ile araştırmacılar, IBD'nin ortaya çıkması ve gelişmesi sırasında dekorinin otofajiyi indükleyebileceği ve böylece bağırsak hücrelerini koruyabileceğini ileri sürmüşlerdir (Zhao ve ark., 2016).

Epidermal büyüme faktörünün (EGF) sıçan nekrotizan enterekolit (NEC) modelinde bağırsak otofajisi ve epitel hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendiren ve NEC hastalarında otofaji seviyelerini belirleyen bir çalışmada, hem in vivo hem de in vitro modellerde bağırsak epitelindeki Beclin 1 ve LC3II protein seviyeleri ölçülmüştür. NEC'li hastalardan alınan biyopsi örneklerinde, bağırsak epitel hücrelerinde güçlü Beclin 1 ve LC3II protein ekspresyonları gözlemlenmiştir. Daha sonra, kültüre edilen bağırsak hücrelerine EGF ilave edilmiş, bunun sonucunda EGF müdahalesinin ileal epitelde Beclin 1 ve LC3II ekspresyonunu azalttığı ve otofajiyi bloke ettiği görülmüştür. Bu çalışma ile EGF'nin NEC'li intestinal otofajinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Maynard ve ark., 2010).

İlk 5 gün boyunca hipoksi stresine maruz bırakılarak deneysel NEC oluşturulmuş neonatal sıçanlarda otofaji ve apoptozis aktivitesini inceleyen bir çalışmada otofajinin belirleyicisi olarak Beclin 1 ve LC3 protein ekspresyonları, apoptozis belirlenmesi için de TUNEL ile kaspaz 3 immün ekspresyonu incelenmiştir. Ayrıca bu çalışma ile NEC insidansını azalttığı, bağırsak bariyer fonksiyonunu koruduğu ve otofaji ve apoptozis üzerinde etkileri olduğu bilinen eritropoetinin etkisi araştırılmıştır. NEC'li sıçan ileumunda kontrol grubuna göre Beclin 1 ve LC3 immün ekspresyonunun önemli derecede arttığı, kaspaz 3 boyaması ile apoptozisin hızla indüklendiği, eritropoetin ilavesinin ise hem otofajiyi hem de apoptozisi azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışma ile eritropoetinin deneysel NEC'de intestinal epitel aşırı otofaji ve apoptozisten koruduğu sonucuna ulaşılmıştır (Yu ve ark., 2013).

Distal rektumdan proksimal bağırsağa kadar gangliyon hücrelerinin eksikliği ile karakterize kongenital bir gastrointestinal malformasyon olan Hirschsprung hastalığının (HD) patogenezisini araştıran bir çalışmada otofajinin

etkileri değerlendirilmiştir. HD hastalığına sahip insanlardan elde edilen doku örnekleri, elektron mikroskopik olarak dar segment, geçiş segmenti ve genişlemiş segment olmak üzere üç segmentte incelenmiştir. Ayrıca PCR ve IHC tekniği ile incelenen doku örneklerinde Beclin 1 ve LC3 mRNA seviyelerinin dar segmentte en yüksek olduğu bulunmuştur. IHC analizleri mRNA seviyeleri ile tutarlı sonuçlar ortaya koymuştur. Bu bulgular ile HD'li hastaların bağırsaklarında otofajinin gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca dar segmentteki otofaji genlerinin en yüksek ekspresyonunun tespitine dayanarak otofajinin nöron ölümüne sebep olarak nöron sayısında azalmaya neden olabileceği belirtilmiştir (Huang ve ark., 2015).

Genetik bir otoimmün hastalık olan çölyak hastalığında otofaji ilişkili Atg7 ve Beclin 1 proteinlerin ince bağırsak dokusundaki ekspresyonları araştırılmıştır. Araştırmada çölyak hastası olduğu bilinen hastalardan intestinal biyopsi veya gerçek zamanlı PCR analizi ile elden edilen örnekler incelenmiştir. İnce bağırsak dokularında Atg7 ve Beclin 1 protein ekspresyonlarının normal dokulara kıyasla azaldığı gözlemlenmiş ve buna paralel olarak çölyak hastalığında otofajinin azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlar ile sindirim ve otoimmün ilişkili bozukluklarda otofaji sürecinin aktifleştirilmesinin hastalık ve hastalık süreçlerine katkı sağlayacağı fikrini ortaya koymuşlardır (Comincini ve ark., 2017).

Beclin 1'in tümör oluşumu ve hastalıklardaki rolünü belirlemeye yönelik çalışmalar dışında besin alımının otofaji üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalar genellikle besin kısıtlaması yönündedir. 48 saat açlığa maruz bırakılan farelerde karaciğer dokusunda Beclin 1, katepsin D ve Atg5 ekspresyon seviyelerini IHC olarak inceleyen bir çalışmada, Atg5 ve katepsin D ekspresyon şiddetinin aç bırakılmayan kontrol grubu ile farklılık göstermediği, Beclin 1 ekspresyonunun ise zayıf bir artış gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışma ile Beclin 1'in IHC düzeyde otofajinin tespitinde ideal ve güçlü bir hedef olmayacağı sonucuna varılmıştır. Yine aynı çalışmada, genetiği değiştirilmiş GFP/LC3 transjenik sıçanlarda 48 saat açlığa maruz bırakma sonunda sıçanların karaciğer, kalp, böbrek, kas ve bağırsak dokularında LC3B protein ekspresyonları düzenli olarak beslenen kontrol grubunun dokularıyla karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu dokularında LC3B ekspresyonu gözlemlenmezken, aç bırakılan grubun incelenen tüm dokularında

LC3B'nin güçlü ekspresyonu bildirilmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında LC3B'nin otofaji seviyelerinin belirlenmesinde bir hedef olabileceği bildirilmiştir (Martinet ve ark., 2013).

Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM), mevcut yöntemler arasında otofajiyi in situ gözlemlemek için en güvenilir yöntemdir. TEM'e alternatif olarak, kolorimetrik, immunohistokimyasal ve floresan teknikleri ile dokuda otofajinin açıkça belirlenmesi adına güvenilir marker'ların bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bir çalışmada otofaji başlatma modeli olarak, aç bırakılmış kültüre edilmiş insan HepG2 hepatositleri ve besin yoksunluğuna maruz bırakılmış karaciğer dokusu kullanılmış ve katepsin D, Beclin 1, DAPk, p70-S6 kinaz, LC3 ve IgG ekspresyonları incelenmiştir. Çalışmanın sonunda araştırmacılar, HepG2 hücrelerinde açlığa bağlı otofajinin, ne farklılık gösteren mRNA ekspresyonu ile ne de bilinen otofaji ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerle ilişkili olmadığını, aynı zamanda transkripsiyon ve translasyonun inhibe edildiğini görmüşler ve bu sonuçlara dayanarak dokuda otofaji marker'larının tanımlanmasının oldukça zor olduğunu bildirilmişlerdir (Martinet ve ark., 2006).

Çeşitli patolojilere ve bazı insan kanserlerine ilişkin olarak Beclin 1 varlığı değişik çalışmalarda bildirilmiş fakat normal ve açlık durumundaki sıçan ince bağırsak dokusundaki immün ekspresyonuna ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışma ile açlığın sıçan ince bağırsak dokusunda Beclin 1 aracılı otofaji üzerine etkileri immunohistokimyasal düzeyde araştırılarak yeni bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular immunohistokimyasal düzeyde ve semikuantitatifdir. İmmunohistokimyasal düzeydeki bu çalışmamızda, normal ve açlık gruplarındaki Beclin 1 ekspresyon düzeyinde gruplar arası anlamlı farklılıklar bulunamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile otofaji marker'ı olarak Beclin 1 proteini kullanılmış, farklı açlık sürelerinde Beclin 1'in sıçan ince bağırsak dokusundaki immun ekspresyonları araştırılarak açlığın otofaji aktivasyonu üzerindeki etkisi hakkında bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen bulgular immünohistokimyasal düzeyde olup semikuantitatifdir. Beclin 1 immün ekspresyonunun bir otofaji belirteci olarak ele alındığı bu çalışmamızda kontrol grubu ve açlık grupları arasında anlamlı bir ekspresyon farkı bulunamamıştır. Fizyolojik koşullar altında hücrelerde otofaji gerçekleşmekte ve buna bazal otofaji seviyesi denilmektedir. Bununla birlikte besin açlığının varlığında otofaji uyarılmakta ve otofaji seviyeleri artmaktadır. Bu bilgiler verilerimizle kıyaslandığında Beclin 1 proteininin immünohistokimyasal olarak tek başına bir otofaji belirteci olarak kabul edilmesinin yeterince güvenilir olamayabileceği ve otofaji seviyelerini belirlemede Beclin 1 ile yakın ilişkiye giren bazı proteinlerin kombine edilerek araştırılması ile daha güvenilir sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Bunun yanı sıra çalışmamızın devamında mevcut yöntemimiz Western Blot tekniği ile desteklenmek suretiyle daha ayrıntılı quantitatif sonuçlar elde edilebilir ve bu konudaki bilgilerimizi genişletmemize yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Adi-Harel S, Erlich S, Schmukler E et al (2010).** Beclin 1 selfassociation is independent of autophagy induction by amino acid deprivation and rapamycin treatment. *J Cell Biochem.*, **110**, 1262-1271.
- Ahlberg J, Glaumann H (1985).** Uptake--microautophagy--and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis. *Exp Mol Pathol.*, **42**, 78–88.
- Ahn CH, Jeong EG, Lee JW (2007).** Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS*, **115** (5), 1344–1349.
- Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T (2011).** Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **300**: G1054-1064.
- Anding AL, Baehrecke EH (2015).** Autophagy in cell life and cell death. *Curr Top Dev Biol.*, **114**, 67-91.
- Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF (2014).** Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, **20**, 1165–1179.
- Arslan D, Korkmaz G, Gozuacik D (2011).** Otofaji: Bir hücresel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *ACU Sağlık Bil Derg.*, **2**,4.
- Backer JM (2008).** The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J.*, **410**, 1–17.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, and Matter K (1996).** Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.*, **134**, 1031-1049,.
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM (2008).** The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol.*, **28**, 5747–5763.
- Barker N (2014).** Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **15**,19–33.
- Baxt LA, Xavier RJ (2015).** Role of autophagy in the maintenance of intestinal homeostasis. *Gastroenterology*, **149**, 553-562.
- Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC (2016).** Mammalian autophagy: How does it work? *Annu Rev Biochem.*, **85**, 685-713.

Berry DL, Baehrecke EH (2007). Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell*, **131** (6), 1137-1148.

Biazik J, Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL (2015). Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles, *Autophagy*, **11**, 439-451.

Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T (2013). The LIR motif-crucial for selective autophagy. *J Cell Sci.*, **126**, 3237–3247.

Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, et al. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**, 259-263.

Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu T-C, Ng ACY, Storer CE, Head RD, Xavier R, Stappenbeck TS, Virgin HW (2010). Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*, **141**, 1135–1145.

Cao H, Chen J, Awoniyi M, Henley JR, McNiven MA (2007). Dynamin 2 mediates fluid phase micropinocytosis in epithelial cells. *J Cell Sci.*, **120**, 4167-4177.

Cao Y, Klionsky DJ (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res.*, **17**, 839–849.

Choi JH, Cho YS, Ko YH, Hong SU, Park JH, Lee MA (2014). Absence of autophagy-related proteins expression is associated with poor prognosis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterol Res Pract.*, **2014**, 179586.

Clague MJ, Urbe S (2010): Ubiquitin: Same molecule, different degradation pathways. *Cell*, **143**, 682–685.

Clarke PG (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol.*, **181**, 195-213.

Comincini S, Manai F, Meazza C, Pagani S, Martinelli C, Pasqua N, Pelizzo G, Biggiogera M, Bozzola M (2017). Identification of Autophagy-Related Genes and Their Regulatory miRNAs Associated with Celiac Disease in Children. *Int J Mol Sci.*, **18** (2). pii: E391.

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, et al (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, **10**, 51-64.

Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, et al (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol.*, **191**, 155-168.

- Dice J (2007).** Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. **3**, 295–299.
- Eichelberg K, Galán JE (1999).** Differential regulation of Salmonella typhimurium type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA. *Infect Immun.*, **67**, 4099–4105.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A (2009).** Life and death partners. apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.*, **16**, 966-975.
- Elshaer D, Begun J (2017).** The role of barrier function, autophagy, and cytokines in maintaining intestinal homeostasis. *Semin Cell Dev Biol.*, **61**, 51–59.
- Fader CM, Colombo MI (2009).** Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.*, **16**, 70–78.
- Fan W, Nassiri A, Zhong Q (2011).** Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc Natl Acad Sci.*, **108**, 7769-7774.
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J (2008).** Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell.*, **19**, 797-806.
- Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G (2008).** To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med.*, **8** (2), 78-91.
- Geng QR, Xu DZ, He LJ, et al (2012).** Beclin-1 expression is a significant predictor of survival in patients with lymph nodepositive gastric cancer. *PLoS One*, **7**, e45968.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Mendrinou S, Koutsopoulos AV, Koukourakis MI (2013).** Autophagy proteins in prostate cancer: relation with anaerobic metabolism and Gleason score. *Urol Oncol.*, **32** (1), 39.e11-39.e18.
- Goto Y, Kiyono H (2012).** Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev.*, **245**, 147–163.
- Gozuacik D, Kimchi A (2007).** Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol.*, **78**, 217-245.
- Gozuacik D, Kimchi A (2004).** Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, **23**, 2891-2906.
- Guillebaud G, Germain M (2016).** Is Selective Autophagy Distinct from Starvation-Induced Autophagy? *Autophagy*, **8**, 113-125.
- Guo GF, Jiang WQ, Zhang B, et al (2011).** Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol.*, **17**, 4779-4786.

- Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, La Vega De FM, Briggs J, et al (2007).** A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.*, **39**, 207–211.
- He C, Levine B (2010).** The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol.*, **22**, 140–149.
- Hoyer-Hansen M, Jaattela M (2007).** Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.*, **14**, 1576–1582.
- Huang Q, Ge X, Li P, Duan Y, Guo Z, Zheng B, Wu X, Guo X, Gao Y (2015).** Detection of autophagy in Hirschsprung's disease: implication for its role in aganglionosis. *Neuroreport*, **26** (17), 1044–1050.
- Huang W, Choi W, Hu W, et al (2012).** Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. *Cell Res.*, **22**, 473–489.
- Isakson P, Holland P, Simonsen A (2013).** The role of ALFY in selective autophagy. *Cell Death Differ.*, **20**, 12–20.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008).** Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell.*, **19**, 5360–5372.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000).** Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.*, **150**, 1507–1513.
- Kanamori H, Takemura G, Maruyama R, Goto K, et al. (2009).** Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. *Am J Pathol.*, **174** (5), 1705–1714.
- Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D (2011).** The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.*, **18**, 571–580.
- Karadağ A (2016).** Otofaji: Programlı hücre ölümü. *ASHD.*, **15**, 2, 19–26.
- Ke P, Shao BZ, Xu ZQ, Chen XW, Liu C (2017).** Intestinal autophagy and its pharmacological control in inflammatory bowel disease. *Front Immunol.*, **7**, 695.
- Kim HS, Lee SH, Do SI, et al (2011).** Clinicopathologic correlation of beclin-1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.*, **207**, 247–252.
- Klare I, Werner G, Witte W. Enterococci (2001).** Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. *Contrib Microbiol.*, **8**, 108–122.

Klionsky DJ (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **8**, 931-937.

Klionsky DJ , Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.*, **5**, 539–545.

Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Shigeo M, et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol.*, **169**(3), 425-434.

Kroemer G, Marino G, Levine B (2010). Autophagy and integrated stress response. *Mol Cell.*, **40**, 280-293.

Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432** (7020), 1032-1036.

Lassen KG, Xavier RJ (2018). Mechanisms and function of autophagy in intestinal disease. *Autophagy*, **14** (2), 216–220.

Levine B, Klionsky DJ (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.*, **6**, 463–477.

Levine B, Kroemer G (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, **132**, 27-42.

Li BX, Li CY, Peng RQ, et al (2009). The expression of Beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy*, **5**, 303-306.

Li BX, Li CY, Peng RQ, et al (2009). The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy*, **5**, 303-6.

Li Z, Chen B, Wu Y, Jin F, Xia Y, Liu X (2010). Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors. *BMC Cancer.*, **10**: 98.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, **402** (6762), 672-676.

Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol.*, **72**, 8586–8596.

Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B (2001). Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res.*, **61**, 3443-3449.

Liu B, Cheng Y, Liu Q, Bao J, Yang JM (2010). Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacol Sin.*, **31**, 1154-1164.

Longatti A, Tooze SA (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ.*, **16**, 956-965.

Longo VD, Mattson MP (2014). Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab.*, **19** (2), 181–192.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **8**, 741-752.

Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM (2006). In situ detection of starvation-induced autophagy. *J Histochem Cytochem.*, **54** (1), 85-96.

Martinet W, Schrijvers DM, Timmermans JP, Bult H, De Meyer GR (2013). Immunohistochemical analysis of macroautophagy: Recommendations and limitations. *Autophagy*, **9** (3), 386-402.

Massey A, Kiffin R, Cuervo AM (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.*, **36**, 2420–2434.

Masuda GO, Yashiro M, Kitayama K, Miki Y, Kasashima H, Kinoshita H, et al (2016). Clinicopathological correlations of autophagy-related proteins LC3, Beclin 1 and p62 in gastric cancer. *Anticancer Res.*, **36** (1), 129-136.

Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.*, **7**, 961–967.

Mathew R, Karp C, Beaudoin B, Vuong N, et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, **137** (6), 1062-1075.

Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, et al (2009). Two Beclin 1- binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biology.*, **11**, 385-396.

Mattson MP, Longo VD, Harvie M (2017). Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.*, **39**, 46–58.

Maynard AA, Dvorak K, Khailova L, Dobrenen H, Arganbright KM, et al (2010). Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **299** (3), G614-G622.

Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, et al (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.*, **20**, 748–762.

Meijer AJ, Codogno P (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med.*, **27**, 411–425.

Mizushima N (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol.*, **22**, 132-139.

Mizushima N, Komatsu M (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147**, 728–741.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **451**, 1069-1075.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a Fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.*, **15** (3), 1101-1111.

Molejon MI, Ropolo A, Re AL, Boggio V, Vaccaro MI (2013). The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci Rep.*, **3**, 1055.

Moreau K, Rubinsztein DC (2012). The plasma membrane as a control center for autophagy. *Autophagy*, **8**, 861-863.

Müller AJ, Kaiser P, Dittmar KEJ, Weber TC, Haueter S, Endt K, Songhet P, Zellweger C, Kremer M, Fehling HJ, et al (2012). Salmonella gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe*, **11**, 19–32.

Noda T, Ohsumi Y (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.*, **273**, 3963- 3966.

O’Flanagan CH, Smith LA, McDonell SB, Hursting SD (2017). When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy. *BMC Med.*, **15**(1), 106.

Onodera J, Oshumi Y (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem.*, **280**(36), 31582-31586.

Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.*, **90**, 313-23.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, **122**, 927-939.

Peng W, Liu Y, Xu WJ, Xia QH (2013). Role of Beclin 1-dependent autophagy in cardioprotection of ischemic preconditioning. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.*, **33**, 51-56.

Randall-Demllo S, Chieppa M, Eri R (2013). Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Front Immunol.*, **4**, 301.

Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ (2005). Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy*, **1**, 101-109.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, et al (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.*, **39**, 596–604.

Robinowitz JD, White E (2010). Autophagy and metabolism. *Science*, **330** (6009), 1344-1348.

Rogov V, Dotsch, V, Johansen, T, et al. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.*, **53**, 167–178.

Rubinsztein DC (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, **443**, 780–786.

Ruck A, Attonito J, Garces KT, Núñez L, Palmisano NJ, Rubel Z, Bai Z, Nguyen KC, Sun L, Grant BD, et al (2011). The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*, **7**, 386–400.

Salvador N , Aguado C, Horst M, Knecht E (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *Journal of Biological Chemistry.*, **275**, 27447–27456.

Shi CS, Kehrl JH (2010). TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal.*, **3**, ra42.

Shibata M, Lu T, Furuya T, et al (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem.*, **281**, 14474-14485.

Song H, Xia SL, Liao C, et al (2004). Genes encoding Pir51, Beclin 1, RbAp48 and aldolase b are up or down-regulated in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, **10**, 509-513.

Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagyspecific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci.*, **105**, 19211-19216.

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.*, **9**, 1142-1151.

Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Oshumi Y (1992). Autophagy in Yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.*, **119** (2), 301-311.

Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW 4th, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci.*, **99**, 190-195.

Toton E, Lisiak N, Sawicka P, Rybczynska M (2014). Beclin-1 and its role as a target for anticancer therapy. *J Physiol Pharmacol.*, **65** (4), 459-467.

Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science*, **321** (5885), 117-120.

Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV (2011). The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, **334**, 255–258.

Wang W, Fan H, Zhou Y, Duan P, Zhao G, Wu G (2013). Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line. *Mol Med Rep.*, **7**, 1501–1505.

Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.*, **30**, 678-688.

Weidberg H, Shvets E, Elazar Z (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem.*, **80**, 125-156.

Wells JM, Rossi O, Meijerink M, Van Baarlen P (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci.*, **108**, 4607–4614.

White E (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.*, **12**, 401–410.

Xavier RJ, Podolsky DK (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, **448**, 427–434.

Xie Z, Klionsky DJ (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol.*, **9**, 1102-1109.

Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.*, **12** (2), 1542-1552.

Yu Y, Shiou SR, Guo Y, Lu L, Westerhoff M, Sun J, Petrof EO, Claud EC (2013). Erythropoietin protects epithelial cells from excessive autophagy and apoptosis in experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*, **8** (7), e69620.

Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci.*, **119**, 259-270.

Zhao H, Xi H, Wei B, Cai A, Wang T, Wang Y, et al (2016). Expression of decorin in intestinal tissues of mice with inflammatory bowel disease and its correlation with autophagy. *Exp Ther Med.*, **12** (6), 3885-3892.

Zheng T, Li D, He Z, Feng S, Zhao S (2018). Prognostic and clinicopathological significance of Beclin-1 in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.*, **11**, 4167-4175.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Seyit Ali BAYTAR
Doğum Yeri ve Yılı : HATAY/ 14.02.1993
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : T.C.
Telefon No : 534 659 8756
Elektronik Posta : seyitabaytar73@gmail.com
İletişim Adresi : Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi, Histoloji ve
Embriyoloji Anabilim Dalı,
Burdur.



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik (2012-2016)

Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı (2017-2019).

