

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEK293 HÜCRE HATTINDA AŞIRI İFADE
ETTİRİLEN FOXO3 GENİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

BURAK KARABEY

MOLEKÜLER TIP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2015970123

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEK293 HÜCRE HATTINDA AŞIRI İFADE
ETTİRİLEN FOXO3 GENİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

MOLEKÜLER TIP

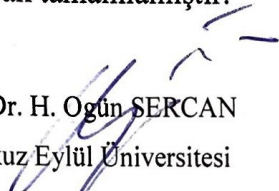
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK KARABEY

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. H. Ogün SERCAN
İkinci Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. G. Hüray İŞLEKEL

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2015970123

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Burak KARABEY '**HEK293 HÜCRE
HATTINDA AŞIRI İFADE ETTİRİLEN FOXO3 GENİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**' konulu Yüksek Lisans tezini 01/07/2019 tarihinde başarılı
olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. H. Oğün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
BAŞKAN


Prof. Dr. Hüseyin İŞLEKEL
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
ÜYE


Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN
Katip Çelebi Üniversitesi
SHMYO
ÜYE

Doç Dr. Çığır Biray AVCI
Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi
YEDEK ÜYE


Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
ÜYE

Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR
Dokuz Eylül Üniversitesi
SHMYO
ÜYE

Doç. Dr. Zeynep YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	i
TEŞEKKÜR.....	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	2
1.1. Problemin Tanımı Ve Önemi.....	2
1.2. Araştırmanın Amacı.....	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. FOXO.....	3
2.2. FOXO'nun Önemi.....	4
2.3. FOXO Proteininin Fonksiyonel Düzenlenmesi.....	6
2.4. FOXO Proteinlerinin İşlevi.....	9
2.5. FOXO3 ve Apoptoz.....	13
2.6. FOXO ve Kanser.....	16
2.6.1. Kromozomal Translokasyonlar ve Füzyon Proteinleri.....	16
2.6.2. Hücre Hattı ve Fare Deneyleri.....	18
2.6.3. FOXO ve p53 Arasındaki İlişki.....	19
2.6.4. Kanserde FOXO'nun Fizyolojik Fonksiyonları.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Araştırmanın tipi.....	23
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	23
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme.....	23
3.4. Çalışma materyali.....	23
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	23
3.6. Veri toplama araçları.....	23
3.6.1. Vektör ve Insert DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Eldesi.....	23
3.6.2. Agaro Jel Elektroforezi.....	26
3.6.3. Ürünlerinin Agaro Jel Den Saflaştırılması.....	26

3.6.4. Vektör Plazmidin Defosforilasyonu	28
3.6.5. Ligasyon	28
3.6.6. FOXO3 geninin PCR ile Çoğaltılması	29
3.6.7. Transformasyon	30
3.6.8. Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu	32
3.6.9. Maxiprep Plasmid DNA İzolasyonu	34
3.6.10. Hücre Kültürü	36
3.6.11. Transfeksiyon	36
3.6.12. Protein Lizatının Hazırlanması	37
3.6.13. Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi	38
3.6.14. Western Blot	39
3.6.14.1. SDS Page	39
3.6.14.2. Membrana Transfer	40
3.6.14.3. Blotlama	41
3.6.14.4. Deteksiyon	42
3.6.15. PARP ile Apoptoz Deteksiyonu	42
3.7. Araştırma planı	43
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	43
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	44
3.10. Etik Kurul Onayı	44
4. BULGULAR	45
4.1. Vektör ve Insert DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Eldesi	45
4.2. Ligasyon	46
4.3. Transformasyon	47
4.4. Western Blot	48
4.5. PARP ile Apoptoz Deteksiyonu	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
7. KAYNAKLAR	52
8. EKLER	60

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. FOXO proteinlerinin regüle ettiği işlemler ve hedef genleri.....	10
Tablo 2. Kanserde mikro-RNA'ların FOXO'ları hedeflemesi	12
Tablo 3. XbaI ve ApaI restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri.....	23
Tablo 4. FOXO3 için kullanılan PCR Primerler.....	28
Tablo 5. FOXO3 için PCR içeriği.....	29
Tablo 6. FOXO3 için PCR ısı profili.....	29
Tablo 7. BCA protein assay ile protein konsantrasyon ölçümü için hazırlanan standart ve örneklerin miktarları.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Forkhead bölgesinin üç boyutlu yapısı.....	3
Şekil 2. Homeostaz regülatörleri olarak FOXO'lar.....	5
Şekil 3. FOXO proteinlerinin regüle ettiği fonksiyonlar.....	6
Şekil 4. FOXO proteinlerinin regülasyonu.....	8
Şekil 5. FOXO proteinlerinin sinyal yolağı ve fonksiyonları.....	9
Şekil 6. Hücre döngüsüne giriş ve çıkışın kontrolünde PKB-FOXO anahtarı.....	15
Şekil 7. FOXO geninin diğer genlerle füzyon etkileşimleri.....	17
Şekil 8. FOXO'nun dahil olduğu fizyolojik işlemler.....	20
Şekil 9. pUC57 plazmidinin haritası.....	23
Şekil 10. pcDNA3.1 plazmidinin haritası.....	24
Şekil 11. XbaI ve ApaI ile kesilen pUC57 plazmidi.....	43
Şekil 12. XbaI ve ApaI ile kesilen pcDNA3.1 plazmidi.....	44
Şekil 13. Ligasyon sonrası plazmid.....	44
Şekil 14. FOXO3 PCR ürünü.....	45
Şekil 15. Kompetan <i>E.coli</i> bakterisinin belirli ampisilin konsantrasyonlarında zon oluşturması..	45
Şekil 16. FOXO3 ve β -aktin'in transfekte olan ve olmayan hücrelerde western blot yöntemiyle gösterimi.....	46
Şekil 17. PARP proteininin transfekte olan ve olmayan hücrelerde western blot yöntemiyle gösterimi.....	47

KISALTMALAR

AFX: Atypical Fibroxanthoma

Akt: PKB, Protein kinase B

AMPK: AMP-activated protein kinase

Bim: Bcl-2-like protein 11

CK1: Casein Kinase 1

DNA: Deoxyribonucleic acid

DYRK1A: Dual specificity tyrosine- phosphorylation-regulated kinase 1A

EGF: Epidermal Growth Factor

ERK: The extracellular-signal-regulated kinase

FasL: Fas Ligand

FKHR: Forkhead Homologue in Rhabdomyosarcoma

FOXO: Forkhead box protein O

HEK293: Human embryonic kidney 293

IKK: The $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase

JNK: c-Jun N-terminal kinase

Kip1: Kinesin-like protein

KO: Knockout

MLL: Mixed lineage leukemia

mRNA: Messenger ribonucleotide acid

MST1: Macrophage-stimulating 1

mTORC: Mammalian target of rapamycin complex

P13K: Phosphoinositide 3-kinase

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PKB: Protein kinase B

PTEN: induced putative kinase 1

PUMA: p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

SGK: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase

TCF: T-cell factor



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans danışmanım olmayı kabul eden ve bu süreçte hem eğitimim hem de geleceğim için bana yol gösteren, bilimsel katkılarını ve manevi desteğini esirgemeyen Prof. Dr. H. Ogün SERCAN'a,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilimsel katkılarını ve manevi desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca işteki yüklerimi omuzlayan ve hiçbir zaman bundan yakınmayan iş arkadaşlarıma, tezdeki deneysel katkılarından ve yardımlarından dolayı laboratuvar arkadaşım Nazlı ŞİRİN'e

İlerlemem için bana güç veren ve tez yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen Kayahan COŞKUN'a, tüm zor zamanlarımda beni destekleyen, maddi ve manevi yanımda olan annem Nilüfer CURA ve kardeşim Melisa KARABEY'e teşekkürü borç bilirim.

HEK293 HÜCRE HATTINDA AŞIRI İFADE ETTİRİLEN FOXO3 GENİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Burak Karabey, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD.,
35340, İnciraltı, İzmir**

ÖZET

Amaç: FOXO proteinleri hücre homeostazı, oksidatif stres yanıtı ve apoptoz gibi fonksiyonların regülasyonunda görev yapan önemli transkripsiyon faktörleridir. Ayrıca FOXO proteinleri tümör baskılayıcılar olarak tanımlanmalarına rağmen, FOXO genlerinin yaptığı translokasyonların kanser oluşumunu desteklediği de gösterilmiştir. FOXO3 geninin MLL geni ile yaptığı translokasyon, ikincil akut lösemi ile ilişkilendirilmiştir. FOXO proteinlerinin kanser oluşumunda rol alması ve belirli hücre tiplerinde FOXO3'ün apoptoz sürecini başlatması nedeniyle bu genin HEK293 hücre hattında yapay olarak aşırı ifade ettirildiğinde, apoptoz mekanizması üzerine etkisi incelenecektir.

Yöntem: Çalışmada FOXO3 geni mRNA kodlayıcı dizileri, yüksek gen ifadesi sağlayan aktif promotör barındıran pcDNA3.1 ekspresyon vektörüne PCR klonlama stratejileri kullanılarak takılmıştır. Elde edilen FOXO3/pcDNA3.1 vektörü ile HEK293 hücreleri geçici transfekte edilmiştir. Transfekte hücrelerden protein izolasyonu yapılarak western blot yöntemiyle FOXO3, beta-aktin ve PARP proteinlerine bakılmıştır.

Bulgular: HEK293 hücre hattı ile gerçekleştirilen geçici transfeksiyon sonrasında, oluşturduğumuz pcDNA3.1/FOXO3 vektörü barındıran hücre hattının, kontrol hücre hattına göre 1.5 katlık bir FOXO3 ifade artışı gösterdiğini saptadık. Aynı transfeksiyon sonrasında hücre kültürüne herhangi bir apoptotik uyarı vermeden, kendiliğinden bir apoptotik uyarısı oluşturup oluşturmadığını test ettiğimizde ise FOXO3 ile transfekte hücrelerde apoptotik uyarının kontrol hücre hattına göre gerçekleştiğini PARP analizi ile saptadık.

Sonuç: Gerçekleştirdiğimiz deneyler sonrasında FOXO3 geninin vektör yardımı ile aşırı ifade ettirilmesinin hücrede apoptozu uyardığını gösterdik.

Anahtar Sözcükler: FOXO3, Apoptoz, PARP

EXAMINATION OF THE EFFECTS OF OVEREXPRESSED FOXO3 GENE IN HEK293 CELL LINE

ABSTRACT

Objective: FOXO proteins are important transcription factors involved in the regulation of functions such as cell homeostasis, oxidative stress response and apoptosis. Also, FOXO proteins have been identified as tumor suppressors and translocations of FOXO genes have been linked to carcinogenesis. The translocation of FOXO3 gene with MLL gene has been associated with secondary acute leukemia. FOXO proteins are involved in carcinogenesis and FOXO3 initiates apoptosis in certain cell types. Hence apoptosis process will be examined by overexpression of FOXO3 gene in HEK293 cell line.

Method: In this study, FOXO3 gene were inserted into the expression vector pcDNA3.1 with using PCR cloning strategies. mRNA coding sequences of pcDNA3.1 vector contains active promoter providing high gene expression. HEK293 cells were transiently transfected with the FOXO3 / pcDNA3.1 vector. The protein isolates obtained from the transfected cells therefore analyzed for FOXO3, beta-actin and PARP proteins by western blotting.

Results: Hek293 cell line transfected with pcDNA3.1 / FOXO3 vector. We showed 1.5-fold increase in FOXO3 expression in transfected cells against to the control cells. When we examined spontaneous apoptosis without giving any apoptotic stimulation to the cell culture after the same transfection, we found apoptotic stimulation occurs in FOXO3 transfected cells by PARP analysis.

Conclusion: Our experiments showed that overexpression of FOXO3 gene induces apoptosis in the cell.

Key Words: FOXO3, Apoptosis, PARP

1. GİRİŞ VE AMAC

1.1. Problemin Tanımı Ve Önemi

Forkhead Box Grup O (FOXO) aile üyeleri önemli transkripsiyon faktörleridir. Hücre kaderi ve hücre homeostazisini kontrol eden tümör baskılayıcılardır. Hücre döngüsü, apoptoz, DNA hasar yanıtı, oksidatif detoksifikasyon, kök hücre idamesi, hücre diferansiyasyonu dahil birçok süreçte rol oynarlar (1). FOXO ailesindeki genlerin deregülasyonu konjenital rahatsızlıklara, şeker hastalığına ve kanser oluşumuna sebep olmaktadır (1). FOXO ailesindeki genlerin genetik ve epigenetik değişiklikleri ve ekspresyon profilleri ayrıca bu ailedeki transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri ve bunlara bağlanan proteinlerin araştırılması insan hastalıkları için yeni ilaçların ve önlemlerin geliştirmesine katkı sağlayacaktır. FOXO alt ailesi kanserle ilişkili genler (tümör baskılayıcı) olarak tanımlanmıştır (2). FOXO1 geni rhabdomyosarcoma, FOXO3 ve FOXO4 geni hematolojik maligniteler ile ilişkilendirilmiştir (3). Ayrıca FOXO3 geninin MLL geni ile yaptığı translokasyon, ikincil akut lösemi ile ilişkilendirilmiştir (4). FOXO ailesinin kanser oluşumunda rol alması ve FOXO3'ün apoptoz sürecini başlatması nedeniyle bu genin kanser oluşum mekanizmalarını aydınlatmasına ve kanserde tedaviye yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Daha önceki mRNA array çalışmalarında mRNA düzeyinde değişim saptanmış olan FOXO3 geni klonlanarak, Hek293 hücre hattında genin aşırı ifade ettirilmesi sağlanacak ve hücrede apoptoz açısından farklılıkları incelenerek yorumlanacaktır.

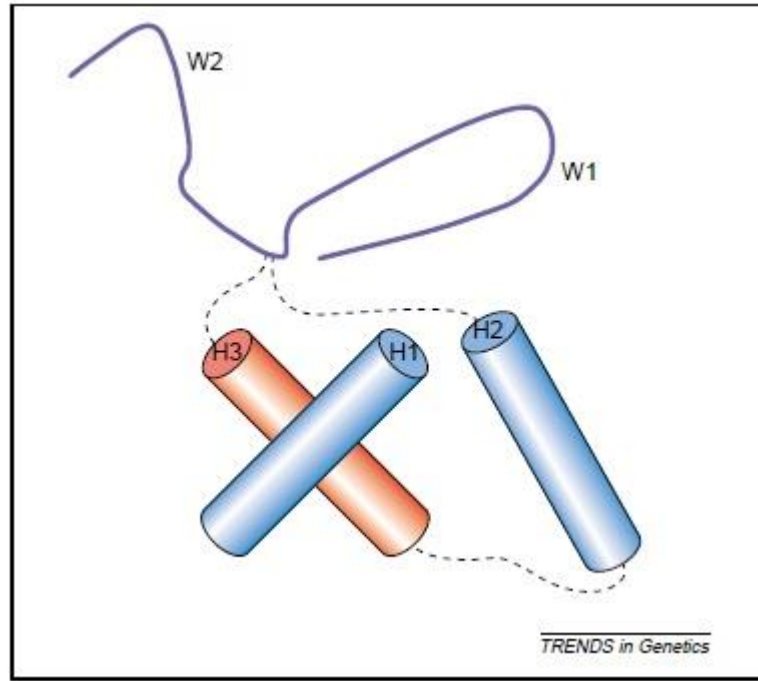
1.3. Araştırmanın Hipotezleri

FOXO3 geni HEK-293 hücre hattında aşırı ifade ettirildiğinde apoptoz süreci tetiklenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FOXO

Tüm ailenin kurucu üyesi olan Forkhead (şu anda FOXA olarak sınıflandırılmıştır), ilk olarak *Drosophila*'da, mutasyonu bir çatal 'Forkhead' gibi görünen ektopik kafa yapılarına neden olan bir gen olarak tanımlandı. Forkhead proteinlerine bazen "kanatlı heliks" proteinleri de denir, çünkü X ışını kristalografisi, DNA bağlama alanının, kelebek kanatlarına benzeyen iki karakteristik ilmekle çevrili üç α -heliks ile üç boyutlu bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 1) (5).



Şekil 1.Forkhead bölgesinin üç boyutlu yapısı (6).

İnsanlarda Forkhead ailesi, 17 alt gruba ayrılan 43 farklı üyeden oluşur ('Forkhead Box' FOX A-Q) (6). 'O' sınıfına ait üyeler insülin/PI3K/Akt sinyal yolağı ile regülasyon gibi karakteristik bir özelliği paylaşırlar (5). Forkhead/winged helix box geni, grup O (FOXO) proteinleri, birçok önemli hücre içi etkileşimin merkezinde bulunan evrimsel olarak da korunmuş transkripsiyon faktörleridir. FOXO proteinleri özellikle strese cevap olarak homeostatik regülatör olarak görev yaparlar, yaşlanma ve hücre ömrüne potansiyel etkileri bulunmaktadır. Regülatör olarak işlev gördüğü hücresel mekanizmalar ise glikoneogenesis, DNA tamiri, hücre döngüsünü

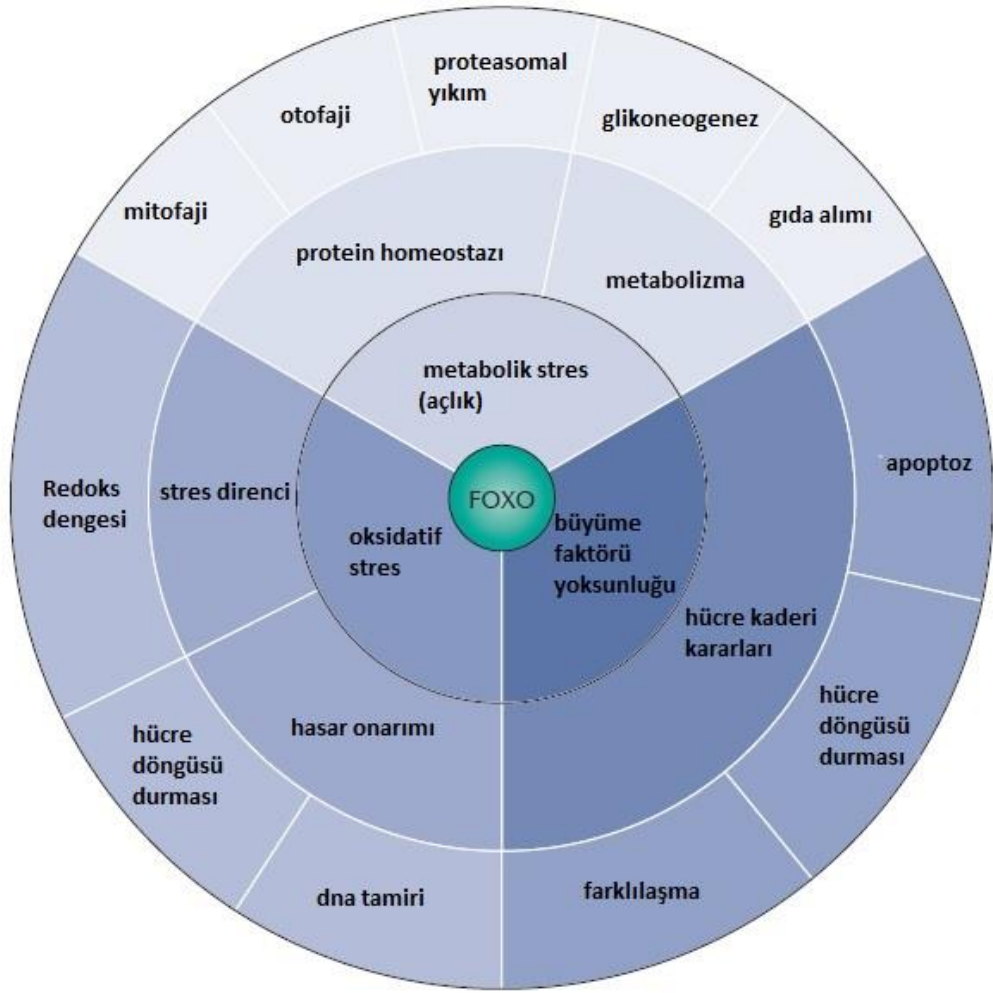
durdurma, kök hücre homeostazisi, immün sistem modülasyonu, hücre farklılaşması, hücre ölümünün regülasyonu, apoptozun indüklenmesi, redoks dengesi, reaktif oksijen türlerinin yıkımı, lipofaji, mitofaji, otofaji ve proteostazi şeklinde özetlenebilir (1).

FOXO proteinleri hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive ederler ya da baskırlar. Bu regülasyonu çekirdekte DNA'ya bağlanan FOX domaini ile yapmaktadırlar. Kendi nükleositol plazmik hareketlerini ise kendilerine özgü nükleer içeri/dışarı sinyal sekansı ile düzenlemektedirler. FOXO proteinlerinin hücre içi yerleşimi ve transkripsiyonel fonksiyonları sıklıkla fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonlar ile düzenlenir (2).

Omurgasızlarda bir tane FOXO geni bulunmaktadır. Solucanlarda *daf-16*, sineklerde *dFOXO* olarak adlandırılır. Memelilerde ise dört tane FOXO geni vardır, bunlar FOXO 1, 3, 4 ve 6'dır. FOXO2 ile FOXO3 aynıdır, biri diğerinin psödojenidir. FOXO5 ise FOXO3'ün balık ortoloğudur (5). Bu genler ilk keşfedildiklerinde farklı bir adlandırmaya sahiptiler: FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FKHRL1), FOXO4 (AFX) ve FOXO6 (2). FOXO 1, 3 ve 4 dokuya bağlı olarak farklı seviyelerde, sıkça ifade edilir (7, 8). FOXO6 ise sadece merkezi sinir sisteminde ifade edilir (9). Belirgin veya gereksiz işlev gösterip göstermediklerini belirlemek için, farklı FOXO ailesi üyeleri için nakavt (KO) fareler üretilmiştir. *FOXO1*^{-/-} embriyolar eksik damar gelişiminden dolayı ölmüştür; *FOXO3*^{-/-} dişi fareler anormal over folikülü gelişiminden dolayı kısırdırlar; *FOXO4*^{-/-} farelerde belirgin bir anormallik gözlenmemiştir (10). Bu fenotip farklılıkları, FOXO izoformları arasındaki fonksiyonel farklılıkların yanı sıra farklı ifade modelleriyle ilgili olabilir (4).

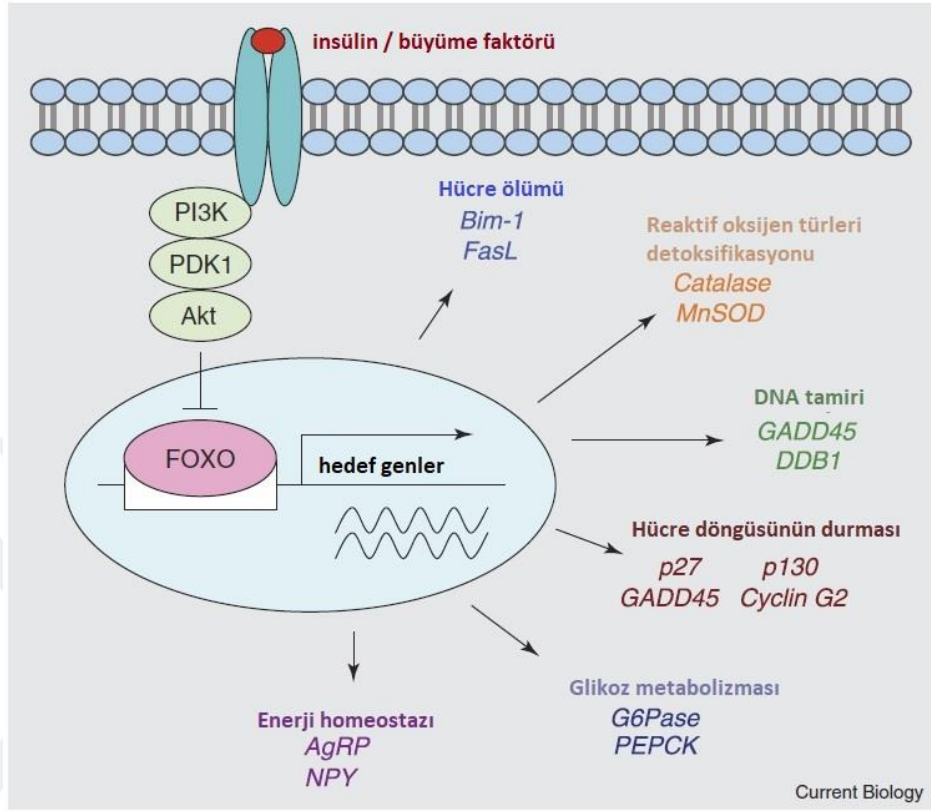
2.2. FOXO'nun Önemi

FOXO proteinleri çevresel değişikliklere duyarlıdırlar ve dışarıdan gelen sinyalleri entegre edebildiklerinden, FOXO'lar temel olarak çevresel değişikliklere cevap verme ve bunları engelleme işlevi görebilir. Bu homeostatik rol, üç ana dış değişime verilen cevaba aracılık eder: metabolik stres (açlık), oksidatif stres ve büyüme faktörü yoksunluğudur. Hücre döngüsünün regülasyonu gibi bazı FOXO kaynaklı gen programları, homeostatik mekanizmaların bir parçasıdır (Şekil 2) (11).



Şekil 2. Homeostaz regülatörleri olarak FOXO'lar (11).

Genel olarak FOXO proteinlerinin kilit rolü, dış kökenli, çeşitli sinyallerden gelen bilgileri birleştirerek, stres durumunda organizmanın doku homeostazını sürdürmesini sağlamaktır(11). Bu amaçta FOXO proteinleri bir ara eleman olarak görev görür. Apoptoz, hücre döngüsü ve oksidatif stres direnci gibi fonksiyonların hedef genlerin regülasyonlarını programlar ( ekil 3) (5).



Şekil 3. FOXO proteinlerinin regüle ettiği fonksiyonlar (5).

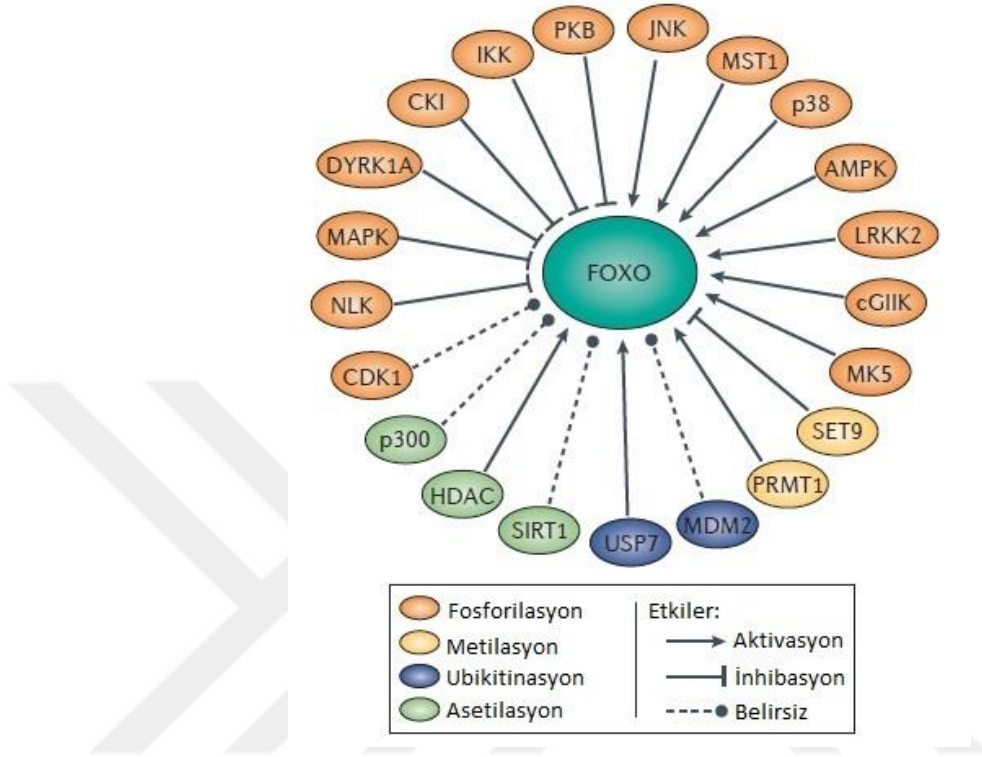
FOXO proteinlerinin organizmanın yaşam süresinin uzamasına olan katkısı da göz ardı edilmemelidir. Bunun en iyi örneğini bir su polipi olan *Hydra* üzerinde yapılan çalışmalar göstermektedir. *Hydra*'da tek bir FOXO geni bulunmaktadır. Bu durum su poliplerine devamlı bir hücre yenilenmesi özelliğini bir nevi ölümsüzlüğü verir (1). *Hydra*'da, FOXO ekspresyonu, kök hücreleri ve doğal bağışıklık sistemini kontrol eder. FOXO'nun sürekli kök hücre çoğalmasına ve yenilenmesine neden olması, bağışıklık sisteminin devamlı olarak etkin olmasını sağlamadaki yeteneği, bu organizmaya ölümsüzlüğü veren yegâne etkindir (12). Ancak daha karmaşık organizmalar evrimleştikçe, daha spesifik dokularda ve yollaklarda FOXO'ya olan ihtiyaç artmıştır. Bunun sonucunda FOXO'nun rolü değişmiş ve FOXO alt tiplere ayrılmıştır. Bu durum ise memelilerde FOXO'nun dört alt tipinin varlığı ile de desteklenmektedir (1).

2.3. FOXO Proteininin Fonksiyonel Düzenlenmesi

Hücresinin çevresel etkenlere hızlı bir şekilde cevap vermesi önemlidir. Bu cevapta rol oynayan genlerin transkripsiyonundan ise FOXO proteinleri sorumludur. Bu yüzden FOXO

proteinleri, bu genleri sıkı bir şekilde regüle eder (5). FOXO proteinlerinin ekspresyonu ve aktivitesi, fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarla güçlü bir şekilde kontrol edilir (Şekil 4) (13). Bu regülasyonların büyük çoğunluğunu insülin veya büyüme faktörlerine cevap olarak Akt-aracılı fosforilasyon oluşturur. FOXO'nu korunan üç residüsindeki (T32, S253, S315) fosforilasyonu, FOXO proteinlerine 14-3-3 proteinlerinin bağlanmasına ve FOXO proteinlerinin çekirdekten sitoplazmaya aktarılmasına ve dolayısıyla FOXO'ya bağlı transkripsiyonun inhibe edilmesine neden olur (5, 14, 15). FOXO proteinlerinin sitoplazmada bulunması, onları inaktif bir durumda tutar ve gerektiğinde bu durum hızlıca tersine çevrilebilir (4). FOXO1, 3 ve 4'ten farklı olarak, FOXO6 Akt tarafından sadece iki residüde fosforilasyona uğrar, bu özellik ile FOXO6 çekirdekten sitoplazmaya taşınmadan inaktive edilir (9). FOXO6'nın sınırlı bir ifade biçimi olduğu ve diğer üç izoformdan farklı bir şekilde regüle edildiği için, genel olarak 'FOXO'lar' denildiğine FOXO1, 3 ve 4 kastedilir (4).

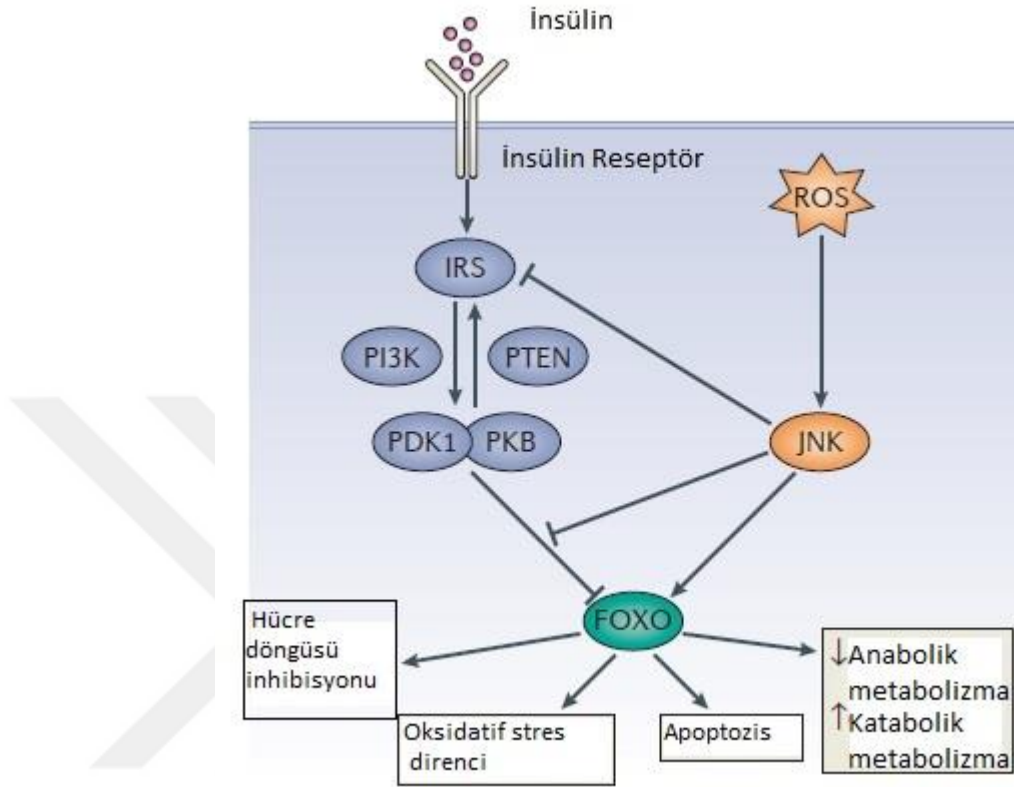
Ek olarak, FOXO proteinlerinin çekirdekten sitoplazmaya aktarılmasına takiben, FOXO proteinleri proteazomlar tarafından ubiquitinasyona ve degradasyona uğrayabilirler. FOXO proteinlerini elde tutmak yerine yıkıma yönlendiren mekanizmalar çekirdekten sitoplazmaya aktarılmasını tetikleyen sinyalin yoğunluğu ile ilgili olabilir (13).



Şekil 4. FOXO proteinlerinin regülasyonu (11).

Akt'ye ek olarak, diğer kinazlar, SGK, CK1, DYRK1A ve yakın bir zamanda, ERK ve IKK (15) FOXO proteinlerinin negatif regülatörleri olarak gösterilmiştir. Buna karşılık, FOXO proteinleri JNK, MST1 ve AMPK ile aktive edilebilir. Oksidatif stres koşulları altında, MST1 ve JNK, FOXO proteinlerini fosforile eder, sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonunu tetikler. Benzer şekilde, AMPK'da besin stresine cevap olarak, enerji metabolizması ve stres direncine dahil olan genlerin ekspresyonunu uyarmak için FOXO proteinlerini fosforilasyon ile aktive eder (Şekil 5) (11, 16). Fosforilasyona ek olarak, FOXO proteinleri aynı zamanda co-aktivatör veya co-represör komplekslerine bağlanarak asetillenir veya deasetillenir (5).

FOXO proteinleri ayrıca oksidatif stres altında monoubikitinlenir ve FOXO'nun transkripsiyonel aktivitesini artırır. FOXO proteinleri aynı zamanda poliubikitinlenerek protein yıkımı için hedeflenebilir. FOXO'nun spesifik çevresel şartlar altında benzersiz fosforilasyon, asetilasyon ve ubikitinasyon ile regülasyonu, FOXO hedef genlerinin regülasyonunda çeşitlilik sağlayabilir (5).



Şekil 5. FOXO proteinlerinin sinyal yolağı ve fonksiyonları (11).

2.4. FOXO Proteinlerinin İşlevi

FOXO proteinlerinin nükleer lokalizasyonu transkripsiyonel aktivitenin göstergesidir (17). Bütün FOXO proteinleri aynı konsensüs DNA dizisine (5'-TTGTTTAC-3') bağlanırlar. Ayrıca konsensüs dizileri kısa olduğu için genom içindeki birçok bölgeye bağlanabilirler (11, 12). FOXO proteinlerinin promotörlere bağlanmasıyla belirli genlerin transkripsiyonu aktifleşir ve bu aktifleşme diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi zorunlu kılar. FOXO proteinleri, enhancer dizilerine bağlanarak transkripsiyonu doğrudan aktive edebilirler aynı zamanda transkripsiyonu baskılayabilme yetenekleri DNA bağlanmasını içermeyen dolaylı mekanizmalar (başlatma kompleksinin oluşumunu ve polimeraz II 'nin DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek (18)) yoluyla da gerçekleşebilirler. Bu mekanizmalar FOXO3-spesifik transkriptomca-geniş RNA polimeraz II profillemesi ile gösterilmiştir(19). Örneğin reaktif oksijen türlerinin, β -katenin/TCF

birlikteliğini bozarak β -katenini FOXO proteinlerine yönlendirir, böylelikle kanonikal WNT yollağı etkisizleşmiş olur (11).

FOXO proteinlerinin genomik DNA'ya her bağlanması mutlaka gen aktivasyonu ile sonuçlanmayabilir. FOXO proteinleri dolaylı olarak, DNA'ya bağlanmadan gen transkripsiyonunu düzenleyebilir ve bu düzenlemeyi diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşime geçerek veya onların aktivitelerini regüle ederek yapabileceği önerilmiştir (20). Bu nedenle, FOXO hedef genlerinin, FOXO proteinleri tarafından doğrudan düzenlenmesi şart değildir. Buna rağmen, FOXO proteinlerinin çoklu ve çeşitli fonksiyonları düzenlediği açıktır. Aşağıdaki tabloda, FOXO proteinlerinin farklı fizyolojik durumlarda hangi genleri etkilediği kısaca özetlenmiştir (11).

Tablo 1. FOXO proteinlerinin regüle ettiği işlemler ve hedef genleri (11).

Regüle edilen işlem	Hedef genler
Hücre kaderi kararları	
Hücre döngüsünü durdurma	CDKN1B; CDKN1A; CDKN2B; CDKN2A; CCND1; CCNG2; RBL2
Apoptoz	BCL2L11; BCL6; PMAIP1; BBC3; FASLG; TNFSF10; TNF
Metabolizma	
Glikoneogenez	PEPCK; G6PC; APOC3
Gıda alımı	AGRP; NPY; GPR17
Redoks dengesi	SOD2; CAT; PRDX3; SENP
Protein homeostazisi	
Mitofaji	PINK1
Proteozomal yıkım	FBXO32; TRIM63
Otofaji	GABARAPL1; ATG12; BNIP3; BCEN1
Sinyal yolları	
Artan PI3K sinyalleşmesi	PI3K; IRS2
Artan EGF sinyalleşmesi	EGFR
Azalan mTORC1 sinyalleşmesi; Artan mTORC2 sinyalleşmesi	SESN3; RICTOR; RAPTOR
Azalan MYC sinyalleşmesi	MXI1
Hücre tipine özgü fonksiyonlar	
Pluripotensiyel bakım	OCT4, SOX2
Bağışıklık sistemi	IL7R; CCR7; SELL; RAG1; RAG2; FOXP3; IFNG; IRF7

FOXO proteinlerinin diğerk transkripsiyon faktörleriyle etkileşimlerinin ürünü, FOXO'nun hücre tipi varyasyonuna göre belirlenir. Bu etkileşimler, FOXO proteinlerindeki post-translasyonel modifikasyonlar ve/veya FOXO'nun DNA bağlanma partnerleri ile yönlendirilebilir, alternatif olarak FOXO proteinleri, bir hedef gendeki regülatör sekanslara eşzamanlı bağlanma yoluyla diğerk transkripsiyon faktörleriyle işbirliği yapabilir (11).

FOXO3'ün tüm genom düzeyinde DNA'ya bağlanma profili üzerine yapılan çalışmada, FOXO3'ün hedef gen ekspresyonunu, transkripsiyon başlatma yoluyla düzenleyen bir transkripsiyonel aktivatör olarak görev yaptığı gösterilmiştir (19).

FOXO proteinleri, çeşitli mikroRNA'ları da regüle eder ve bunlar da FOXO ekspresyonunu düzenler (11). miR-96, miR-182 ve miR-183 dahil olmak üzere çeşitli mikro-RNA'lar, farklı kanser tiplerinde FOXO ekspresyonunun düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır (Tablo 2). Hücre kültürü çalışmalarına dayanarak, bu mikro-RNA'ların kanser hücresi çoğalmasını ve hayatta kalmasını desteklediği gösterilmiştir (4).

Tablo 2. Kanserde mikro-RNA'ların FOXO'ları hedeflemesi (4).

Kanser	mikro-RNA	FOXO	Etkileşimin İşlevi
Meme	miR-27a	FOXO1	Hücre çoğalmasına ve canlılığına yardımcı olur
	miR-96		
	miR-182		
Endometriyum	miR-9	FOXO1	Endometrial kanser hücrelerinde düzensiz hücre döngüsü kontrolü ve bozulmuş apoptotik tepkiye neden olur
	miR-27		
	miR-96		
	miR-153		
	miR-182		
	miR-183		
	miR-186		
Melanoma	miR-182	FOXO3	Melanom hücrelerinin göçünü ve hayatta kalmasını teşvik eder
Meme	miR-96	FOXO3	Meme kanseri hücre proliferasyonuna aracılık eder
Hodgkin Lenfoması	miR-96	FOXO1	cHL hücrelerinin otonom büyümesine ve hayatta kalmasına dahil olur
	miR-182		
	miR-183		
Prostat	miR-370	FOXO1	İnsan prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını sağlar
Mesane	miR-96	FOXO1	FOXO1 kaynaklı apoptozu düzenler
Osteosarkom	miR-135b	FOXO1	Osteosarkom hücrelerinin çoğalmasını ve istilasını teşvik eder
Hepatosellüler Karsinoma	miR-1269	FOXO1	Hücre proliferasyonunu teşvik eder
Akciğer Kanseri	miR-411	FOXO1	Hücre büyümesini arttırır

FOXO proteinlerinin memelilerdeki işlevini bulmak için fare modelleri tasarlanmıştır. Bu modellerdeki temel amaç tek bir FOXO geninden yoksun farelerin nasıl bir fenotip geliştirdiğini gözlemlemektir. FOXO1-null fareler, anjiyogenezdeki kusurlardan kaynaklı 10.5'inci embriyonik günde ölmüşlerdir. FOXO3-null, FOXO4-null fareler ise üretilmişlerdir ve yaşamaktadırlar: FOXO3-null farelerde dişiler yaşa bağımlı bir kısırılık sergilerken, FOXO4-null farelerde belirgin bir fenotipik değişiklik gözlemlenmemiştir. FOXO6-null fareler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. FOXO'nun dört memeli izoformu, hem farklı hem de çakışan fonksiyonlara sahip olabilirler. Bir FOXO üyesinin fonksiyonunun, diğer bir FOXO üyesi tarafından telafi edilmesi, FOXO üyelerinin özgül fonksiyonlarını belirlemeyi zorlaştırabilir. FOXO proteinlerinin yaşam

süresi ve tümör baskılamadaki rolünün araştırılabilmesi için birden fazla FOXO geninin silindiği daha karmaşık fare modellerine ihtiyaç duyulmaktadır (5).

2.5. FOXO3 ve Apoptoz

Morfolojik değişiklikliklerine dayanarak hücre ölümünün üç formu vardır; Apoptoz, otofaji ve nekroz. Apoptoz, hücrel morfolojideki değişiklikler (büzülme, plazma zarının şişmesi, apoptotik cisimlerin oluşumu), nükleer distorsiyonlar (kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması) ve daha az karakteristik sitoplazmik değişiklikler ile karakterize edilir (21). Geleneksel olarak, apoptoz iki ana yoldan meydana gelir: Mitokondri aracılı intrinsik yol, kaspaz 9 aktivasyonuna neden olurken, ekstrinsik yol ise ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (Fas ve TNFR) ve kaspaz 8 aktivasyonunu içerir (22, 23). FOXO proteinleri FasL transkripsiyonunu ve pro-apoptik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bim'i aktive ederek apoptozu başlatır (5) ve hücre büyüme inhibitörlerini, apoptoz sinyal yollarını destekler. Bunu iki mekanizma ile yaparlar; Birincisi mitokondriyal hedef proteinlerinden Bcl-2 ailesinin birçok pro-apoptik üyesini indüklerler, ikincisi FasL gibi ölüm reseptör ligandının ekspresyonunu uyararak ve tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand (TRAIL) veya çeşitli CDK inhibitörlerinin ekspresyonunu artırarak yaparlar (24).

Bcl-2 protein ailesi, apoptozun iyi karakterize edilen düzenleyicileridir ve paylaştıkları BH (Bcl-2 homolojisi) domaini sayısına göre üç alt grupta toplanırlar (25). BH3-tek grubu, BIK, EGl-1, Bim, BMF, NOXA, BID, BAD, BNIP3, PUMA ve Beclin-1'i içeren proapoptotik proteinlerden oluşur. İlk araştırmalar, FOXO proteinlerinin nükleer formlarının ifadesinin, farklı hücre tiplerinde pro-apoptik BH3-tek proteinlerinin en az iki üyesinin (Bim, BNIP3) transaktivasyonunu uyararak hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir (26-29). Ayrıca FOXO proteinleri, büyüme faktörlerinden yoksun hematopoetik hücrelerde Bim ekspresyonunu indüklemektedirler (28, 29).

FOXO proteinleri, doğrudan FasL ve TRAIL gibi proapoptotik faktörlerin transkripsiyonunu güçlendirerek ekstrinsik apoptotik yolu düzenlemektedirler. FasL promotörü üç FBHE (Forkhead Binding Element) içermektedir. Fas/FasL etkileşimi tuzak (decoy) bir füzyon proteini olan Fas-Fc tarafından bloke edildiğinde serebral nöronların FOXO3 kaynaklı apoptozu azalmaktadır. Yapısal olarak aktif bir FOXO3 formunun aşırı ekspresyonu, Fas sinyalleşme kaskadı boyunca serebral granül nöronlarında apoptozu tetiklemektedir (14).

Ek olarak, prostat kanseri hücrelerinde FOXO1 ve FOXO3'ün aşırı ekspresyonu apoptoz ve TRAIL ekspresyonunun artması ile sonuçlanır. TRAIL promotorunda, FOXO3 DNA-bağlanma elementleri bulunmaktadır. Bu durum ise TRAIL'in, FOXO3'ün doğrudan bir hedefi olduğunu göstermektedir (30).

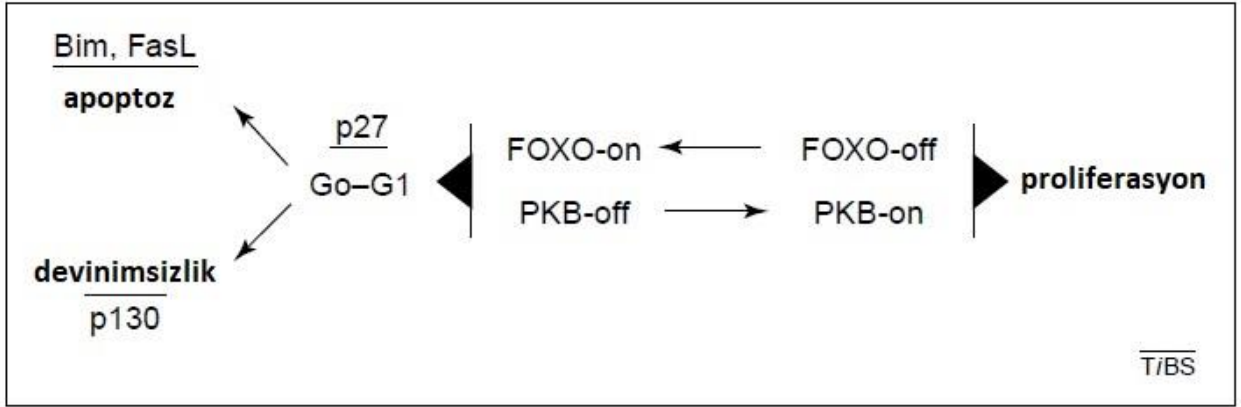
Farklı hücre hatlarında gerçekleştirilen deneylerde, FOXO hedef genlerinin yüksek oranda seçici ifadesi gözlemlenmiştir, FOXO proteinlerinin transkripsiyonel hedeflerinin dokuya ve uyarıcıya özgü olduğunu düşündürmektedir. Örneğin, HIV ile enfekte CD4⁺ T hücreleri FOXO3'ün indüklenmesine yol açar. Gözlenen enfekte hücrelerde bu indüklenme G₀ fazına girişi için kritik olan çoklu hedef genlerini ve apoptozun intrinsik/ekstrinsik yollarındaki aktif oyuncularını modüle eder (31). Ancak, kesin mekanizma belirsizdir. Birlikte ele alındığında FOXO proteinleri, otokrin ve parakrin yollarında görev yapan BH3-tek proteinlerinin (Bim ve BNIP3) ve ölüm reseptör ligandlarının (FasL ve TRAIL) ekspresyonunu modüle ederek hücre ölümünü regüle etmektedir (24).

Tümör oluşumunda hayatta kalma proteinlerinin ekspresyon seviyelerini düzenleyen faktörlerin çok önemli bir rolü olabilir. Örneğin, PI3K/Akt sinyalinin anormal aşırı aktivasyonu birçok insan kanserinin ayırt edici özelliğidir. PI3K/Akt'nin hücre sağ kalımını arttırmasının ana yollarından biri, FOXO proteinlerini apoptotik genlerin promotörlerinden uzakta tutmaktır. Bu nedenle FOXO proteinleri, çoklu apoptotik gen ekspresyonu yöneterek PI3K/Akt sinyalinin önemli bir efektör kolu olarak ortaya çıkmışlardır (2).

Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalar, FOXO1, FOXO3 ve FOXO4'ün aşırı ekspresyonunun, hücre döngüsünün durması veya apoptoz ile sonuçlandığını göstermiştir (32). Bir siklin-bağımlı kinaz inhibitörü olan p27^{kip1}, hücre döngüsünün G1 fazını kontrol etmektedir (33). FOXO proteinleri, p27^{kip1}'in üretimini artırarak, hücre döngüsünün G1 fazında, hücre döngüsünün durmasına neden olur (32). p27^{kip1} seviyelerinin düzenlenmesinin, ağırlıklı olarak transkripsiyon sonrası seviyede ubiquitin-aracılı degradasyon ile regülasyonla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, FOXO üyelerinin doğrudan *kip1* geninin transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir (3, 32).

Hücreler erken G1 fazında büyüme faktörü almadığında, PKB aktif değildir ve FOXO üyeleri aktif hale gelir. Bu *Kip1* ve *Rb2* genlerinin yukarı doğru düzenlenmesiyle sonuçlanır, bu da hücre döngüsünden çıkmaya ve devinimsizliğe “*Quiescence*” yol açar (32, 34). Ek olarak,

Bim ve FasL ekspresyonunda FOXO kaynaklı artış hücrede apoptoz ile sonuçlanmaktadır. PKB'nin reseptör tirozin kinazlar vasıtasıyla aktivasyonu, FOXO proteinlerinin çekirdekten çıkarılması yoluyla etkisizleştirilmesine ve dolayısıyla hücre döngüsünün yeniden başlamasına neden olur. Hücre döngüsüne tekrar giren hücreler PKB'ye bağlı mekanizmalar tarafından korunur (Şekil 6) (35, 36).



Şekil 6. Hücre döngüsüne giriş ve çıkışın kontrolünde PKB-FOXO anahtarı (37).

FOXO proteinlerinin üretimi apoptoz ile hücre ölümüne neden olabilir. İlginç bir şekilde, apoptoz indüksiyonunun çoğunlukla transforme olmamış hematopoetik hücrelerle (UT-7/EPO lösemi hücreleri, birincil insan eritroid progenitör hücreleri, Ba/F3 öncü-B hücreleri ve Jurkat hücreleri gibi) sınırlı olduğu görülmektedir. Buna karşın bazı hücre tiplerinde (CHO-K1, LNCaP, CCL39; 293T ve postmitotik nöronlar gibi) hücre döngüsünün durmasına, hücre ölümünün başlaması eşlik edebilir (37). Bu fark, sadece kinetik bir fark olabilir ve bazı hücre tiplerinde hücre döngüsünün durması apoptozdan önce gerçekleşebilir(3).

Bununla birlikte, son çalışmalar bunun olmayabileceğini ve bunun aksine, FOXO proteinlerinin indüklenabilir üretimi ile hücre döngüsü duran hücrelerin devinimsizliğe veya G0 fazına girdiğini göstermektedir (34). G0 için bir belirteç olan retinoblastoma ailesi proteini p130, FOXO proteinleri tarafından transkripsiyonel olarak kontrol edilmesi buna bir örnektir (34). En önemlisi, indüklenabilir FOXO-protein aktivitesi tarafından hücre döngüsü duran hücreler, FOXO aktivitesinden kurtulduğunda, hücre döngüsüne tekrar girerler ve çoğalmaya başlarlar (34). Bu nedenle, bu sonuçlar FOXO proteinlerinin PKB tarafından negatif olarak

düzenlenmesinin, hücre döngüsü girişi ve çıkışı için bir anahtarı temsil ettiğini göstermektedir (Şekil 6) (4).

Şu anda, bazı hücrelerin neden hücre döngüsünün durduğu ve bazı hücrelerin ise apoptotik hale geldiğini belirleyen mekanizma belirsizdir. Muhtemel bir açıklama, pro- ve/veya anti-apoptotik genlerin hücreye özgü gen regülasyonudur. FOXO proteinlerinin FasL ve Bim gibi pro-apoptotik genleri transkripsiyonel olarak düzenlediği gösterilmiştir (14, 28).

2.6. FOXO ve Kanser

FOXO proteinlerinin kanser ilerlemesinde paradoksal rolleri yakın zamanda açıklanmıştır. FOXO proteinleri akut ve kronik myeloid lösemide, lösemiye başlatan hücrelerin korunmasına katkıda bulunurlar. Bu proteinler ayrıca kolon ve meme kanseri alt gruplarının istila ve metastazını da teşvik edebilir. Tedaviye direnç, hedefli tedaviler dahil olmak üzere birçok durumda FOXO aktivasyonuna atfedilmiştir (4).

Artan kanıtlar, FOXO alt ailesinin üyelerinin, organlardaki doku homeostazının korunmasında çok önemli olduğunu ve kanser hücrelerinde sıklıkla düzensiz regüle edildiğini göstermektedir. FOXO proteinlerinin tümörjenezdeki rolü ilk olarak insan kanserlerinde kromozomal translokasyonlara katılımıyla keşfedilmiştir (38-40).

2.6.1. Kromozomal Translokasyonlar ve Füzyon Proteinleri

FOXO1, FOXO3 ve FOXO4 genleri, myeloid/lenfoid, MLL ve alveoler rabdomiyosarkom gibi bazı lösemi formlarında kromozomal kopma noktalarında bulunmuşlardır. Yapılan çalışmalarda FOXO1 geni rabdomiyosarkomlarda $t(2,13)(q35;q14)$ ve $t(1,13)(p36;q14)$ kromozomal translokasyonları tanımlanmıştır. FOXO3 geni, bir akut myeloid lösemi hastasında $t(6;11)(q21; q23)$ kromozomal translokasyonunda bulunurken, FOXO4 akut lenfoblastik lösemide $t(x;11)(q13; q23)$ translokasyonunda bulunmuştur (41).

FOXO proteinlerinin yaptığı translokasyonları, FOXO genlerin keşfedilmesinde önem arz etmektedir. FOXO1 ilk önce alveoler rabdomiyosarkomda (ARMS) bir $t((2; 13)$ translokasyonu sonucu olarak PAX3'e kaynaşmış bir forkhead domain geni olarak tanımlanmıştır. Bu gen, rabdomiyosarkomda (FKHR) forkhead daha sonra ise FOXO1 olarak adlandırılmıştır (42). PAX7 ve FOXO1 arasında bir füzyon da $t(1;13)$ translokasyonu olarak tanımlanmıştır(38). Ek olarak, PAX3-FOXO1 füzyon proteini onkogeneze katkıda bulunmasına rağmen, güçlü bir onkogen değildir ve tümörjenezi teşvik etmek için yüksek seviyede eksprese edilmelidir (43). FOXO3 ve

İçeren füzyonlarda ise FOXO'nun korunmuş transaktivasyonu, onkogenik potansiyeli için kritik gözükmemektedir (Şekil 7) (10). Örneğin, MLL-FOXO4 füzyon proteininin endojen FOXO3 geni baskılayarak, FOXO3'ün antiproliferatif etkisini antagonize ettiği ve apoptozu indüklenme kabiliyetini baskıladığı gösterilmiştir (11).



Şekil 7. FOXO geninin diğer genlerle füzyon etkileşimleri (4).

Yapılan ileri gözlemler, MLL-FOX4 birleşiminin, el değmemiş diğer allelden eksprese edilen Wild tip FOXO'nun transdominant baskılanması ile sonuçlandığını göstermiştir (47). Bu ilk bulgular, FOXO'ların gen translokasyonlarına bağlı oluşan fonksiyon kaybının, tümör gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği, hatta FOXO genlerinin tek bir allelinin, tümör oluşumunu önlemek için yeterli olabileceğini göstermektedir (48).

2.6.2. Hücre Hattı ve Fare Deneyleri

FOXO'nun aşırı ekspresyonu, meme kanserinde in vivo'da tümör boyutunu ve in vitro'da tümör gelişmesini inhibe etmektedir. FOXO proteinlerinin sitoplazmik lokalizasyonu meme kanseri hastalarında daha zayıf hayatta kalım ile koreledir (49, 50). Buna karşılık, FOXO'ların nükleer lokalizasyonu hücre döngüsünü askıya alır (32), apoptozu teşvik eder (51) ve anjiyogenezi negatif yönde regüle eder (52). FOXO proteinlerinin antitümoral aktivitesinin önemi ayrıca lösemi (53), prostat kanseri (54-56) ve glioblastom (57) ile yapılan çalışmalarla vurgulanmaktadır.

Üçlü nakavt fare modelleri FOXO proteinlerinin tümör baskılayıcı özelliklerini kanıtlamıştır. Bu çalışmalarda eşzamanlı olarak FOXO alt ailesinin temel üyelerinden yoksun olan farelerin (FOXO1, FOXO3 ve FOXO4) hemanjiyomlar ve lenfoproliferatif hastalıklar geliştirmeye eğilimli olduğu gözlenmiştir(47). Tümör baskılayıcılar olarak kabul görmelerine rağmen, insan kanserlerinde FOXO'ların genetik inaktivasyonu nadiren görülmüştür. Son araştırmalar, farelerde kanserojen kaynaklı insan akciğer adenokarsinomasında (LAC) ve insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hatlarında FOXO3'ün silindiğini, bu FOXO3 kaybının, NSCLC patogeneze katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (58, 59).

FOXO3 geni, insan akciğer adenokarsinomunda yeni bir delesyon hedefi olarak tanımlanmıştır. Sigara içen erken evre LAC hastalarının 8/33'ünde (% 24.2) FOXO3'ün biallelik veya homozigot silindiği tespit edilmiştir (60). FOXO proteinleri, insan kanserlerinin çoğunda, PI3K/Akt yolunun aşırı aktifleşmesi nedeniyle ve ek olarak da RAS, PTEN veya PI3K genlerindeki mutasyonlardan kaynaklı inaktif haldedirler (61). FOXO proteinleri iyi huylu tümör baskılayıcıları olduğu için terapötik hedef olmaya uygundur ancak FOXO3'ün klinik meme kanserindeki erken bir araştırması, FOXO3 aktivasyonunun lenf nodal metastazı ve kötü prognozla ilginç bir şekilde ilişkili olduğunu öne sürmektedir (62).

FOXO3 üzerine yapılan birçok çalışma aktif FOXO3 proteinin kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir (63, 64). Bununla birlikte, β -katenin ve FOXO3 geninin birlikte aktivasyonunun, hücre ölümünü önlediği ve farelerde ksenograftların metastazı indüklediği gösterilmiştir (64). Benzer şekilde, β -katenin, FOXO genlerini aktive eden PI3K ve Akt inhibitörlerine de direnç göstermiştir (65). İnsan kolon karsinomunda yüksek nükleer FOXO3 ve β -katenin düzeyleri metastatik evre ve daha kısa sağkalım ile ilişkilidir. FOXO3 proteini β -katenin varlığında bir tümör baskılayıcıdan ziyade bir metastaz uyarıcısı olarak görev yapmaktadır. Bu durum, FOXO'nun pro-tümöral faaliyetlerini potansiyel olarak açıklayabilir(4).

2.6.3. FOXO ve p53 Arasındaki İlişki

FOXO ve p53 genlerinin regülasyon fonksiyonları ve modlarında birçok paralellik vardır. FOXO proteinleri, hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive ederek metabolik stabiliteyi korumak için hücre döngüsü durdurma, hücre ölümü ve oksidatif strese aracılık etmektedir. Tümör baskılayıcı p53 ise, DNA onarımını sağlamak ve genomik stabiliteyi korumak için benzer işlevleri yerine getirir (61). FOXO ve p53 tarafından hücre döngüsünün durması, p16, p21^{WAF1/CIP1} ve p27^{kip1} gibi hedef genleri indükleyerek meydana gelmektedir (66).

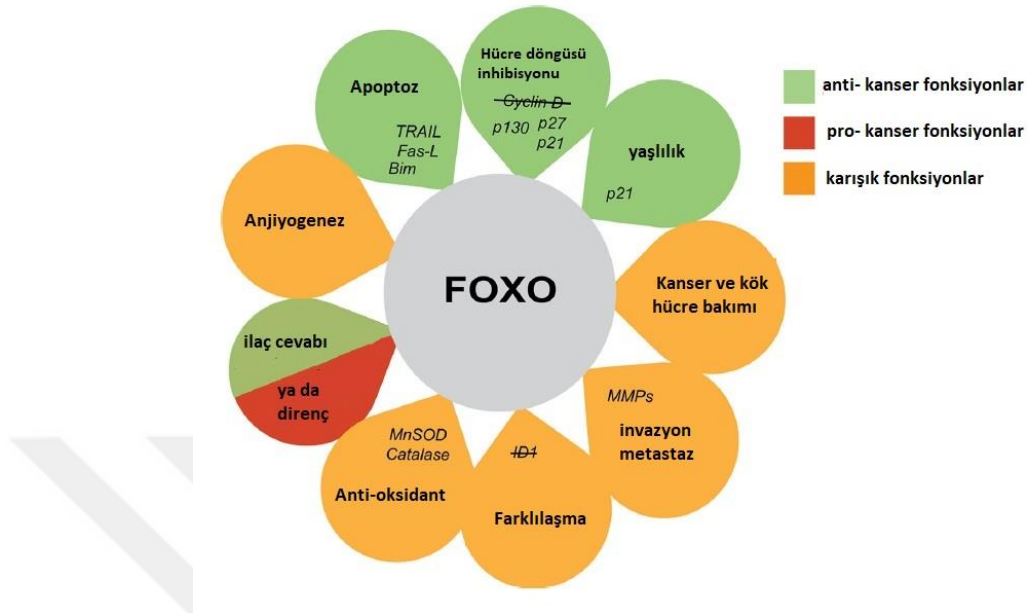
FOXO ve p53, çoklu mekanizmalarla apoptozu yönetir. FOXO proteinlerinin Bim ve PUMA'yı yukarı regüle ettiği, ayrıca PUMA'nın da transkripsiyonel olarak p53 tarafından yukarı regüle edildiği bilinmektedir. FOXO'ların p21^{WAF1/CIP1}, GADD45, WIP1 ve PA26 da dahil olmak üzere bir dizi geni hedeflemesi ve bunların p53 tarafından regüle edilmesi, FOXO proteinlerinin ve p53'ün tümör baskılama sinyalinin koordine ettiğini önermektedir(2).

FOXO ve p53'ün örtüşen fonksiyonlarını daha da gösteren ilginç örnekler, transgenik farelerdeki çalışmalardan elde edilmiştir. p53 geni bulunmayan fareler normal olarak gelişirler, ancak timik lenfoma ve hemanjiyom dahil olmak üzere geniş bir kanser spektrumu geliştirmeye yatkınlar ve genellikle bu fareler doğumdan 3-6 ay sonra malignitelerden kaynaklı olarak ölürlər (67, 68). Benzer şekilde, FOXO geni içermeyen üçlü nakavt fareler (FOXO1, 3 ve 4) hemanjiyom ve timik lenfoma geliştirmeye eğilimlidirler ve PI3K sinyal yolağının deregülasyonunun yıkıcı sonuçları ile karşılaşmışlardır. Öte yandan, FOXO1, FOXO3 veya FOXO4'ün tekli veya çiftli inaktivasyonunun daha az şiddetli bir fenotipe neden olduğu gözlemlenmiştir (48). Bu gözlemler, FOXO ve p53 genlerinin hedef gen regülasyonlarının çakışmasıyla, tümörjenez baskılamasında benzer roller oynadıklarını göstermiştir.

FOXO3 ve p53 genleri, diğer partnerlerle birlikte hücreleri DNA hasarından korumak için güçlü bir tümör baskılayıcı ağ sağlarlar. Bunun sonucunda klonal oluşumu ve genişlemeyi önlemek için genomik stabilitenin korunmasında önemli bir rol oynarlar(24). Farklı çalışmalar, FOXO3'ün, farklı seviyelerde tümör baskılayıcı p53 ile etkileşime girdiğini göstermiştir. FOXO3 ve p53 geni fiziksel olarak etkileşime girebilirler, FOXO3 proteini, p53 genini stabilize edebilir veya dolaylı olarak, p53 geninin upstream düzenleyicisi olan p19ARF geninin (CDKN2A) yukarı regülasyonu ile dolaylı olarak aktif hale getirebilir (69, 70). Ayrıca, fibroblastlarda, p53 geni, DNA hasarı sırasında FOXO3'ün ikinci intronundaki bir bölgeye bağlanarak FOXO3 ekspresyonunu uyarır. Bununla birlikte, p53 kaynaklı apoptoz için FOXO3 proteini kısmende olsa gereklidir. Ek olarak, FOXO3 kaybı, p53 eksikliği olan farelerde tümör gelişim oranını arttırmaz fakat tümör spektrumunu etkiler. p53^{-/-} farelerde sıklıkla görünmeyen tümörler (adenokarsinomlar ve anjiyopomlar) hem p53 hem de FOXO3 geni silindiğinde ortaya çıkmaktadırlar (71).

2.6.4. Kanserde FOXO'nun Fizyolojik Fonksiyonları

FOXO proteinleri, onkogen, anjiyogenez, oksidatif strese direnç ve hücre istilasının kontrolü gibi etkenlerle indüklenen senesensi engelleyerek, önemli bir anti-tümoral aktivite sergiler. FOXO proteinleri çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda yer alırlar. Bunlar, hücre döngüsünü önleme, apoptoz ve onkogene bağlı yaşlanma gibi, tümör gelişimini önleyen ve çeşitli ilaçlar tarafından kanser hücresinin öldürülmesine katkıda bulunan anti-tümöral fonksiyonlardır. Buna karşılık, FOXO proteinleri, bazı tedavilere dirençli olarak pro-tümöral rollerde oynarlar. FOXO proteinlerinin belirsiz fonksiyonlarına, anjiyogenez, oksidatif stres direnci, hücre farklılaşması, kanser kök hücresi bakımı, hücre istilas ve metastazının kontrolü örnek verilebilir. Anahtar hedef genler daha küçük harflerle belirtilmiştir. Bastırılmış genlerin üstü çizilidir (Şekil 8) (4).



Şekil 8. FOXO'nun dahil olduğu fizyolojik işlemler (4).

FOXO'ların hücre göçü ve istilasının kontrolünde oynadığı rol, farklı hücresel modellerde araştırılmıştır. Prostat kanserinde, AEG1 geni (astrosit yükseltilmiş gen-1, metadherin veya MTDH) sıklıkla aşırı eksprese edilir ve hücre istilasında rol oynar. AEG1 nakavtı, hücre canlılığını ve istilacılığını azaltırken FOXO3 geninin ekspresyonunu ve nükleer lokalizasyonunu artırır. AEG1 geninin pro-invaziv etkisi kısmen FOXO3 proteinin baskısından kaynaklanabilir(55). İnvaziv ürotelyal kanserde FOXO3 geninin ekspresyonu azalır ve hastanın sağkalımı ile koreledir (72).

Onkogene bağlı senesens, iyi huylu lezyonların gelişimini sınırlayarak organizmaları tümör oluşumundan korur. Bu süreçte yer alan mekanizmaları netleştirmek için Courtois-Cox ve ark. Ras'ın anormal aktivasyonunun, Ras ve PI3K sinyalini baskılayan ve FOXO1 ve FOXO3 geninin aktivasyonuna yol açan negatif bir geri besleme döngüsüyle senesensi tetiklediğini göstermiştir (73). Aktive edilmiş bir FOXO mutantının aşırı ifadesi, insan fibroblastlarının senesensini indüklemek için yeterlidir (74). Bu çalışmalar FOXO'ların bir onkogene cevaben senesensi organize eden tümör baskılayıcılar olarak rolünü göstermiştir (4).

FOXO proteinleri anjiyogenezi de düzenlerler. Anjiyogenez, yeni kılcal damarların önceden var olan kan damarlarından oluştuğu ve tümör büyümesi için gerekli olan fizyolojik bir işlemdir. Anjiyogenez mekanizması, endotel hücrelerinin çoğalma, göç ve tüp oluşumunu teşvik

etmek için anjiyogenik faktörler (örn. VEGF) ile uyarılmasını içerir (75). FOXO proteinleri hem pro- antianjiyogenik hem de antianjiyogenik faktörler olarak bu sürece dahil olmuşlardır. FOXO proteinlerinin tümöral anjiyogenezdaki rolleri henüz net bir şekilde tanımlanmamıştır (4).

FOXO proteinleri oksidatif strese yanıtta yer alırlar. Bu süreçte, süperoksit dismutaz (SOD2) ve katalaz ekspresyonunun indüksiyonu yoluyla hücrel detoksifikasyonunu desteklerler. FOXO proteinleri hücreleri aşırı ROS birikiminden koruyarak, kanser gelişimini önleyebilir. Bu durum, hematopoetik kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, FOXO proteinlerinin ROS homeostazını korumak için gerekli olduğu gösterilmiştir. FOXO3^{-/-} farelerde, ROS birikimi miyeloproliferatif sendroma yol açmaktadır. Bu sendroma ROS ile artırılmış sitokin sinyalleşmesi aracılık eder. Bu oluşum N-asetilsistein gibi antioksidanların eklenmesi ile önlenabilir (76, 77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi

Araştırmanın tipi deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırma kapsamında deneyler Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. 'da, Nisan 2017 – Mayıs 2019 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme

FOXO3 geni için ticari olarak alınan PCR primerleri ile ilgili gen izole edildi. Bu gen bir vektör vasıtasıyla Hek293 hücrelerine transfekte edildi ve genin/genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

3.4. Çalışma materyali

Çalışma materyali olarak araştırmada elimizde daha önceki çalışmalar için -ticari olarak- almış olduğumuz Hek293 hücre hattı ve kompetan *E.coli* (*Promega JM109*) suşu kullanılmıştır. Deneylerimizde, insan, deney hayvanı ve bunlardan elde edilecek olan doku, organ, biyopsi materyali, kan vs. kullanılmamıştır.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Araştırmanın bağımsız değişkeni FOXO3 protein miktarıdır, bağımlı değişkenleri ise PARP proteinidir.

3.6. Veri toplama araçları

Tez çalışmasında kullanılan yöntemler aşağıda verilmiştir. Çalışmada hücre kültürü, cDNA eldesi, plazmid DNA eldesi, PCR, Western-blot gibi yöntemler kullanılmıştır.

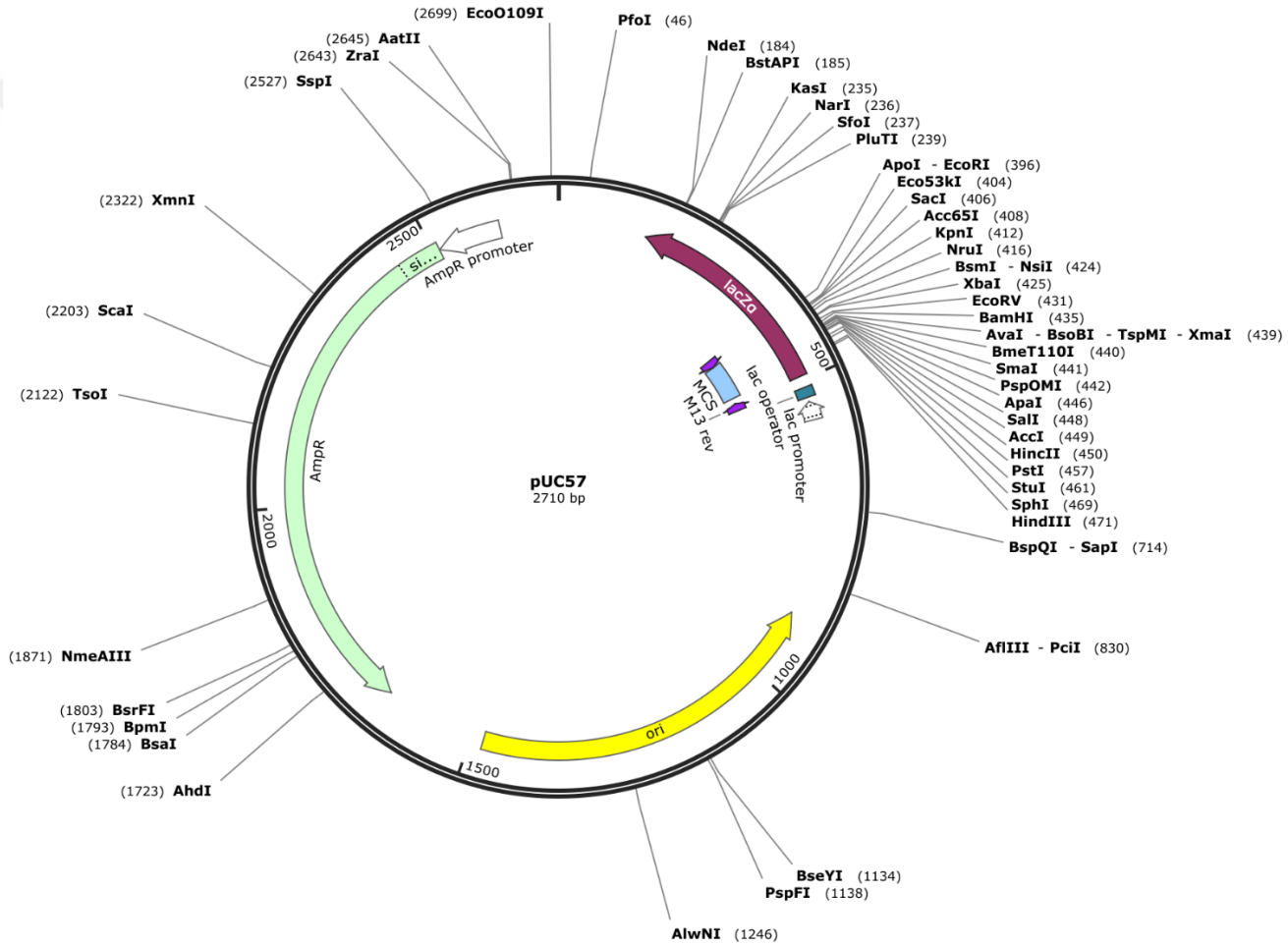
3.6.1. Vektör ve Insert DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Eldesi

Insert için ticari olarak satın alınan FOXO3 geni kullanılmıştır. FOXO3 geni EcoRV restriksiyon enzimi ile pUC57 plazmidi içerisine eklenmiş olarak gelmiştir. Vektör olarak pcDNA3.1 kullanılmıştır. Bu iki plazmidin restriksiyon enzimi bölgeleri araştırıldığında XbaI-ApaI bölgelerinin ortak ve deney için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3. XbaI ve ApaI restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri

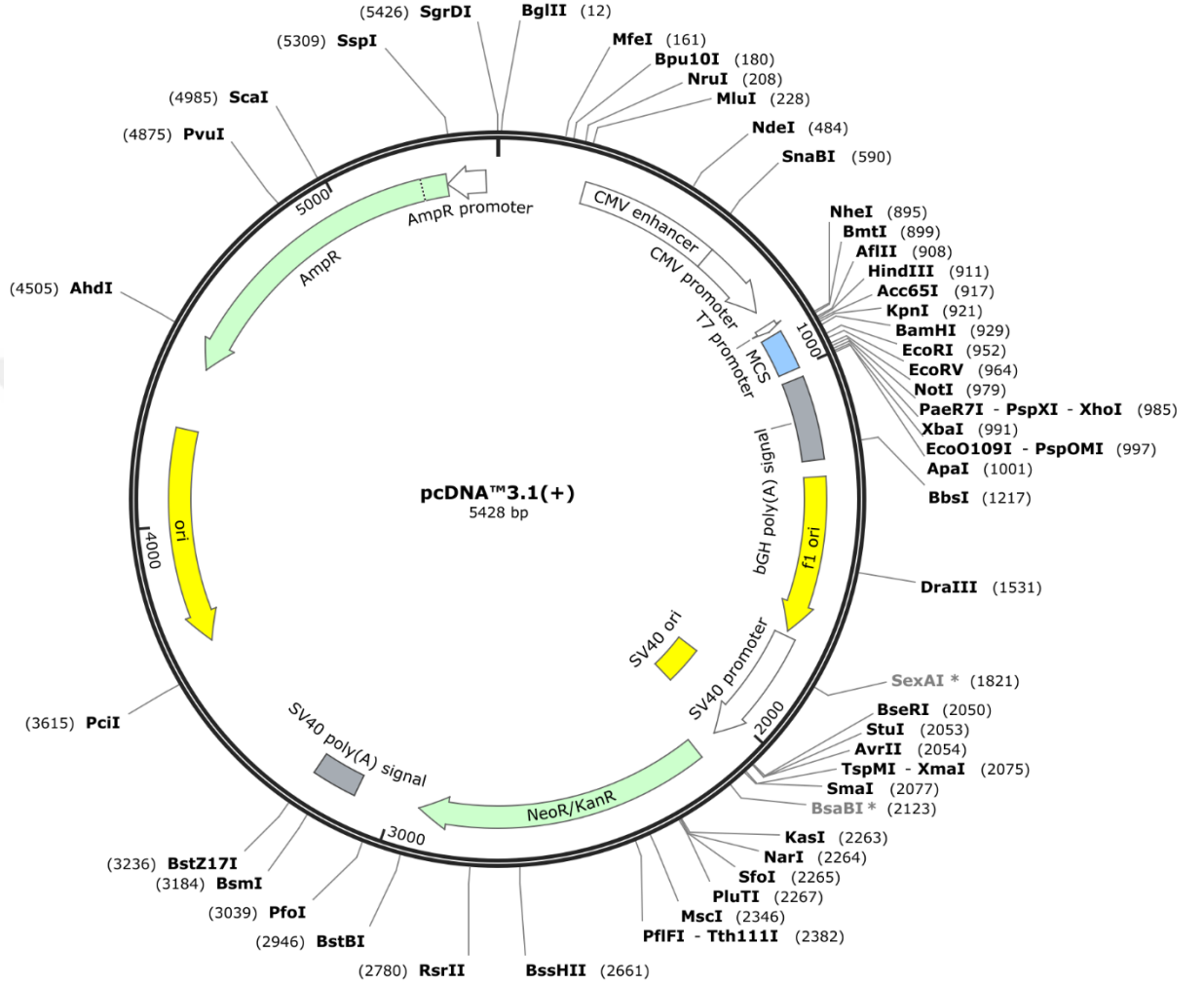
XbaI	5'-T [↓] CTAGA-3' 3'-AGATC [↑] T-5'
ApaI	5'-GGGCC [↓] C-3' 3'-C [↑] CCGGG-5'

Created with SnapGene®



Şekil 9. pUC57 plazmidinin haritası (78).

pUC57 plazmidinin uzunluğu 2710bç, FOXO3'ün ise 2019bç, toplamda 4729bç'dir. Bu plazmidi XbaI-ApaI bölgelerinden kestiğimizde 2040bç uzunluğunda FOXO3 gen bölgesi (insert) elde edilir.



Şekil 10. pcDNA3.1 plazmidinin haritası (79).

pcDNA3.1 plazmidinin uzunluğu 5428bp'dir. Bu plazmidi XbaI-ApaI bölgelerinden kestiğimizde 5418bp uzunluğunda vektör bölgesi elde edilir.

Gereçler:

- pUC57 plazmidi
- pcDNA3.1 plazmidi
- XbaI Restriksiyon Enzimi (Biolabs, R0145S)
- ApaI Restriksiyon Enzimi (Biolabs, R0114S)
- Cut Buffer (Biolabs, B7204S)
- dH₂O

- Thermal Cycler

Yöntem:

Aşağıdaki basamaklar her plazmid için ayrı tüplerde gerçekleştirilmiştir.

1. Mikrosantrifüj tüpüne 10µL Plazmid, 2µL ApaI, 5µL Cut Buffer, 33µL dH₂O eklenerek karıştırıldı.
2. Karışım Thermal Cycler cihazında 25°C’de 15 dakika inkübe edildi.
3. Daha sonra karışıma 2µL XbaI, 5µL Cut Buffer eklendi.
4. Karışım Thermal Cycler cihazında 37°C’de 15 dakika inkübe edildi.
5. Daha sonra 65°C’de 20 dakika inkübe edilerek restriksiyon enzimleri inaktive edildi.

3.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Restiriksiyon enzimleri ile kesim sonrası elde edilen ürünler özgülük ve büyüklük açısından değerlendirmek için %0.8’lik agaroz jelde 100 volt gerilim altında yürütülmüştür. 0.24 g agaroz tartılarak 30mL 0.5X Tris-Borik asit-EDTA (0,5X TBE) tamponuna eklenmiştir. Mikrodalga fırında 1 dakika yüksek ısıda agaroz iyice çözündürülmüştür. Agaroz çözeltisine son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenerek homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Hazırlanan jel, jel yükleme kabına dökülmüştür ve kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Jelin soğuması için yaklaşık 15-20 dakika beklenildikten sonra tarak dikkatlice, donuk haldeki jele zarar vermeden çıkarılmıştır. Hazırlan jel, içerisinde 0.5X TBE tampon çözeltisi bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

Jeldeki kuyucuklara uygun belirteç (*Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder*) ile örnekler yüklenmiştir. Jele yüklenecek olan örnekler yaklaşık 1µL 6X Loading Dye eklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra ~100 voltluk sabit gerilim altında elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrasında jeldeki bantlar UV ışık altında incelenmiştir.

3.6.3. Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

Elektroforez sonrası uygun olan bantlar jelden kesilmiştir. *MN Nucleospin Extract II* (ürün kodu:740 609 50) kiti kullanılarak ve kitin protokolüne uygun olarak örnekler saflaştırılmıştır.

Gereçler:

- Steril Bisturi
- MN Nucleospin Extract II

- 1.5 mL’lik tüp
- 50°C’ye ısıtılmış su banyosu
- Vorteks
- Mikrosantrifüj (Eppendorf Mini Spin)

Kit İçeriği:

- NTI Bağlama tamponu
- NT3 Yıkama tamponu
- NE Elüsyon tamponu
- 2mL’lik toplama tüpleri
- Kolonlar

Yöntem:

Çalışmaya başlamadan önce, kit içerisinde bulunan tamponlar kit protokolüne uygun bir şekilde hazırlanmıştır. NT3 tamponuna 24mL %96’lık etanol eklenmiştir.

1. Uygun olan bant parçası UV ışık altında seçilerek, steril bisturi yardımıyla jelden kesilmiştir ve 1.5mL’lik tüp içerisine aktarılmıştır.
2. Tüp içerisindeki jel parçasının tartılmıştır ve 100mg jele 200µL NTI tamponu olacak şekilde oranlanarak NTI tamponu eklenmiştir.
3. Jel parçasını ve NTI tamponunu içeren tüp 50°C’ye ayarlanmış su banyosunda 5-10 dakika inkübe edilmiştir. Jel tamamen çözünene kadar 3 dakika bir vortekslenmiştir.
4. Toplama tüpü içerisine yerleştirilen kolona 700µL örnek yüklenmiştir ve 11000g’de 30 saniye boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü içerisindeki çözelti atılmıştır.
5. Kolon içerisine 700µL NT3 Yıkama tamponu yüklenmiştir ve 11000g’de 30 saniye boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü içerisindeki çözelti atılmıştır. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlanmıştır.
6. Kolon içerisindeki silika membranı kurutmak için hiçbir yükleme yapılmadan kolon 11000g’de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü içerisindeki çözelti atılmıştır.

Elüsyon işlemi için kolon yeni bir tüpe aktarılarak, daha öncesinde 70°C’de ısıtılmış 25µL NE Elüsyon tamponu eklenmiştir ve 70°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 50g’de 1 dakika, sonrasında 11000g’de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış örnek kolondan geri kazanılmıştır

3.6.4. Vektör Plazmidin Defosforilasyonu

Vektör DNA’nın ligasyon sırasında tekrar halkasallaşmaması için ligasyon öncesi vektör DNA defosforile edilmelidir. Alkalın fosfataz enzimi DNA, RNA ve nükleotidlerin 5’ ve 3’ uçlarındaki fosfat gruplarının serbest bırakılmasını katalizler.

Gereçler:

- FastAP Isıya Duyarlı Alkalın Fosfataz (Fermentas, EF06)
- 10X FastAP Tamponu (Fermentas, EF06)
- Vektör (pcDNA 3.1)
- dH₂O
- Thermal Cycler

Yöntem:

1. Mikrosantrifüj tüpü içerisine 1µg(~10µL) pvDNA 3.1, 2µL 10X FastAP Buffer, 1µL FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 7µL dH₂O eklendi.
2. Karışım hafifçe çalkalandı ve spin edildi.
3. Thermal Cycler cihazında 37°C’de 20 dakika daha sonra inaktivasyon için 75°C’de 5 dakika inkübe edildi.

3.6.5. Ligasyon

Yapışkan uçlara sahip olan vektör DNA ve insert DNA birbiriyle eşleşmektedir. Ligasyon işleminde ise ligaz enzimi ile bu uçlar arası kimyasal bağlanma gerçekleştirilir. *Roche Rapid DNA Ligation Kit* (ürün kodu:11 635 379 001) kiti kullanılarak ve kitin protokolüne uygun olarak vektör ve insert oranları ayarlanmıştır.

Gereçler:

- 2X T4 DNA Ligasyon Tamponu
- 5X DNA Dilüsyon Tamponu
- T4 DNA Ligaz
- Vektör

- Insert

Yöntem:

1. Mikrosantrifüj tüpüne 30µL vektör, 5µL insert ve 2µL 1X DNA dilüsyon tamponu eklenerek karıştırılmıştır.
2. Karışıma daha sonra 10µL 2X T4 DNA ligasyon tamponu eklenmiştir. (Tampon kullanılmadan önce karıştırılmıştır.)
3. 1µL T4 DNA ligaz enzimi eklenerek, karıştırılmıştır.
4. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.6.6. FOXO3 geninin PCR ile Çoğaltılması

FOXO3 geninin PCR için gerekli olan İleri/Geri Primer dizileri NCBI veri tabanından yararlanılarak belirlenmiştir.

Tablo 4. FOXO3 için kullanılan PCR Primerler

Gen	Primer Dizisi	PCR Ürünü
FOXO3	İleri: 5'-ATGGCAGAGGCACCGGCTT-3'	2028 bç
	Geri: 5'-ATCCTTCAGCCTGGCACCCA-3'	

Gereçler:

- *Thermal Cycler*
- Mikrosantrifüj (Eppendorf Mini Spin)
- 0.2 mL'lik tüp
- Otomatik pipet seti
- Primerler
- Quick-Load One Taq PCR seti

Yöntem:

FOXO3 için Tablo 5'deki kimyasallar belirtilen hacimlerde 0.2mL'lik tüpe aktararak karışım hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımını içeren tüpler, reaksiyonun gerçekleşmesi için *Thermal Cycler* cihazına konulmuştur ve Tablo 6'daki ısı değerleri kullanılarak cihaz çalıştırılmıştır.

Tablo 5. FOXO3 için PCR içeriği

Kimyasal	Hacim (μL)	Son Konsantrasyon
OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	12.5	1X
10 μM İleri Primer	0.5	0.2 μM
10 μM Geri Primer	0.5	0.2 μM
DNA Örneği	3.0	
dH ₂ O	8.5	
Toplam Hacim	25.0	

Tablo 6. FOXO3 için PCR ısı profili

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	20 saniye	25
Bağlanma	58 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika 30 saniye	
Son Uzama	72 °C	5 dakika	1

3.6.7. Transformasyon

FOXO3 genini içeren vektör kompetan hücreye aktarılmıştır. Bu sayede FOXO3-pcDNA 3.1 plasmidinin bakteri hücresi tarafından kopyalanması ve çoğaltılması sağlanmıştır. Transformasyon işlemi için kullanılan *E.coli* kompetan hücrenin (*Promega JM109*) protokolü takip edilmiştir.

Gereçler:

- Kimyasal kompetan *E.coli* (*Promega JM109*)
- Çalkalayıcılı inkübatör
- Buz

- LB besiyeri içeren petriler
- LB broth besiyeri içeren 5mL'liktüpler
- SOC besiyeri
- Ampisilin
- 2mL'lik steril tüp
- Alev
- 42°C'ye ayarlanmış su banyosu
- Öze
- Spatül

Yöntem:

1. Transformasyon işleminde kullanılacak olan 2mL'lik steril tüp ısı şokunu önlemek amacıyla buz içerisine yerleştirilmiştir.
2. Kimyasal kompetan *E.coli* içeren tüp -80°C'den çıkarıldı ve buz içerisine yerleştirilmiştir.
3. Buz üzerinde yaklaşık 5-10 dakika beklenilerek hücreler çözdürülmüştür.
4. Çözünen hücrelerin bulunduğu tüpten 50µL alınarak buz içerisindeki 2mL'lik steril tüpe aktarılmıştır. Hızlıca 2µL ligasyon ürününden de ekledikten sonra tüpe 3 kez vurularak karıştırma işlemi yapılmıştır.
5. Tüp hızlıca tekrar buza koyularak 20 dakika buzda inkübe edilmiştir.
6. Hücreleri ısı ile şoklamak için tüp 42°C'deki su banyosunda 45-50 saniye tutulmuştur ve hemen arkasından buz üzerine alınarak 2 dakika bekletilmiştir.
7. Tüpe oda sıcaklığındaki SOC besiyerinden 950µL aktarılmıştır.
8. 37°C'de 150rpm'de 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
9. Çalkalanan bakteri süspansiyonundan 50 ve 100µL hacimler alınarak 1mg/mL ampisilin içeren LB besiyerli petrilere inokülasyon yapılmıştır.
10. Petriler 37°C'de 14 saat inkübe edilmiştir.
11. İnkübasyon sonrası seçilen koloniler 5mL LB broth içeren tüplere ayrı ayrı inoküle edilmiştir.
12. Tüpler 37°C'de 170rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir.

13. Ertesi gün üreme gözlenen tüplerden 2mL bakteri süspansiyonu alınarak miniprep DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.6.8. Miniprep Plasmid DNA İzolasyonu

Bakteriler ile birlikte çoğalan plasmidler için izolasyonu için *Invitrogen PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits* kiti kullanılmıştır ve işlemler için kitin protokolü takip edilmiştir.

Gereçler:

- Resuspension Tamponu (R3)
- RNase A
- Lizis Tamponu (L7)
- Precipitation Tamponu (N3)
- Equilibration Tamponu (EQ1)
- Yıkama Tamponu (W8)
- Elution Tamponu (E4)
- TE Tamponu (TE)
- HiPure Kolon
- 15mL'lik tüpler
- Steril mikrosantrifüj tüpleri
- %70'lik Etanol
- Isopropanol
- Soğutuculu mikrosantrifüj

Yöntem:

1. Resuspension tamponunu (R3) hazırlamak için kit içerisinde bulunan RNase A, tampona eklenmiştir ve tamponun üstünde bulunan etiket işaretlenmiştir.
2. Lizis tamponunda (L7) çökelti olup olmadığı kontrol edilmiştir, varsa çözülmesi için 37°C'de ısıtılmıştır.
3. Kolon, 15mL'lik tüpe yerleştirilerek sabitlenmiştir ve kolonun içerisine 2mL Equilibration tampon eklenerek, yerçekimi ile tamponun kolondan atılımı beklenilmiştir.

4. Transformasyon sonrası elde edilen bakteri süspansiyonundan 2mL alınarak 4000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant atılmıştır.
5. Çökelti üzerine 0.4mL Resuspension tamponu (R3) eklenmiştir ve çözelti tüp içerisinde homojen bir şekilde dağılana kadar yavaşça pipetaj yapılmıştır.
6. 0.4mL Lizis tamponu (L7) eklenmiştir ve karışım homojen olana kadar tüp alt-üst edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
7. 0.4mL Precipitation tamponu (N3) eklenmiştir ve hemen ardından karışım homojen olana kadar tüp alt-üst edilmiştir.
8. Elde edilen lizat 17000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
9. Lizatın supernatant kısmı dikkatlice alınarak kolona yüklenir ve yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
10. Kolon iki kez 2.5mL Yıkama tamponu (W8) ile yıkılmıştır. Solüsyonun yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
11. Kolonun altına mikrosantrifüj tüpü yerleştirilmiştir. Saflaştıracak olan DNA buraya toplanacaktır.
12. Kolona 0.9mL Elution tamponu (E4) eklenmiştir ve yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
13. Mikrosantrifüj tüpü içerisine toplanan DNA'ya 0.63mL isopropanol eklemiştir ve homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır.
14. 4°C'de 17000g'de 30 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında supernatant kısmı dikkatlice alınıp, atılmıştır.
15. DNA çökeltisi 1mL %70'lik etanol ile sulandırılmıştır.
16. Karışım 4°C'de 17000g'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında supernatant kısmı dikkatlice alınıp, atılmıştır.
17. DNA çökeltisinin kuruması için 10 dakika boyunca beklenmiştir.
18. Çökelti 50µL TE tamponu ile sulandırılmıştır. Elde edilen DNA örneği PCR ile kontrol edilerek doğru koloninin seçilip seçilmedi test edilmiştir. Daha yüksek oranda plasmid DNA elde etmek için maxiprep plasmid DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.6.9. Maxiprep Plasmid DNA İzolasyonu

Maxiprep plasmid izolasyonu ile daha büyük hacimde ve yüksek konsantrasyonda plasmid DNA'ları elde edilmiştir. Bu plasmid DNA'lar bir sonraki adım olan transfeksiyonda kullanılmıştır. İzolasyon için *QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi* kiti kullanılmıştır ve işlemler için kitin protokolü takip edilmiştir.

Gereçler:

- P1 Tamponu
- P2 Tamponu
- P3 Tamponu
- QBT Tamponu
- QC Tamponu
- ER Tamponu
- QN Tamponu
- RNase A
- Isopropanol
- %70 etanol
- Kolon
- Kartuş
- Kartuş kapağı
- LB Broth
- Çalkalayıcı inkübatör
- Soğutmalı Santrifüj
- 50mL Falcon tüpleri
- Vorteks
- Buz

Yöntem:

1. Bakteri süspansiyonundan 200µL alınarak 100mL LB Broth besiyeri içerisine inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrası örnek 37°C'de yaklaşık 300rpm'de 12-16 saat inkübe edilmiştir.

2. P1 tamponunu hazırlamak için kit içerisinde bulunan RNase A, tampona eklenmiştir ve tamponun üstünde bulunan etiket işaretlenmiştir.
3. Lizis tamponunda (P2) çökelti olup olmadığı kontrol edilmiştir, varsa çözülmesi için 37°C’de ısıtılmıştır.
4. P3 tamponu kullanılmadan önce 4°C’de soğutulmuştur.
5. İnkübasyon sonrası örnekler 50mL’lik Falcon tüplerinde 6000g’de 4 °C’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
6. Çökelti 10mL P1 tamponu ile sulandırılmıştır. Homojen hale gelene kadar vortekslenmiştir.
7. Karışıma 10mL P2 tamponu eklenmiştir. Elde kabaca 4-6 kez karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon sırasında kartuşları hazırlamak için; kartuşlara kapakları takılmıştır.
9. 10mL soğutulmuş P3 tamponu eklenmiştir ve hemen arkasından kabaca 4-6 kez karıştırılmıştır.
10. Lizat kartuşun içerisine aktarılmıştır ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında protein, genomik DNA ve deterjanlar yüzeye çıkıp bir tabaka oluşturacaktır.
11. Kartuşların kapakları çıkartılmıştır ve pompa yavaşça kartuşa yerleştirilerek lizat 50mL’lik falcon tüpüne filtrelenmiştir.
12. Filtrelenmiş lizata 2.5mL ER tamponu eklenmiştir ve yaklaşık 10 kez alt-üst yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Buzda 30 dakika inkübe edilmiştir.
13. Kolona 10mL QBT tamponu eklenmiştir ve yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
14. İnkübasyon sonrası lizat kolona aktarılmıştır ve yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
15. Kolon iki kez 30mL QC tamponu ile yıkılmıştır. Solüsyonun yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
16. Kolonun altına 50mL’lik falcon tüpü yerleştirilmiştir. Saflaştıracak olan DNA buraya toplanacaktır.

17. Kolona 15mL QN tamponu eklenmiştir ve yer çekimi ile kolondan geçmesi beklenmiştir.
18. Tüp içerisine toplanan DNA'ya 10.5mL oda sıcaklığındaki isopropanol eklemiştir ve homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır.
19. 4°C'de 17000g'de 30 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında supernatant kısmı dikkatlice alınıp, atılmıştır.
20. DNA çökeltisi 5mL %70'lik endotoksin-free etanol ile sulandırılmıştır.
21. Karışım 4°C'de 17000g'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında supernatant kısmı dikkatlice alınıp, atılmıştır.
22. DNA çökeltisinin kuruması için 10 dakika boyunca beklenmiştir.
23. Çökelti 500µL steril su ile sulandırılmıştır.
24. Konsantrasyonu spektrofotometrik ölçümle belirlenmiştir ve transfeksiyonda kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.6.10. Hücre Kültürü

Çalışmanın ilerleyen safhalarında kullanmak üzere, HEK293 hücre hattının büyütülmesi ve devamlılığı sağlanmıştır. HEK293 hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren DMEM içerisinde tek tabaka olarak üretilmiştir. Hücreler kültür flasklarının yüzeyini % 70 oranında kapladıkça pasajlanmıştır. Hücre pasajlamalarında, hücreleri kaldırmak için Tripsin /EDTA (%0.05 / %0.02) solüsyonu kullanılmıştır. Tüm işlemler, steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu, 37 °C'de ve % 5 oranında CO2 bulunan etüvde yapılmıştır.

3.6.11. Transfeksiyon

HEK293 hücreleri, hazırlanan vektör ile transfekte edildi. Hücrelin transfeksiyonu için *Thermo Fisher Lipofectamine LTX with Plus Reagent* (ürün kodu: 15338-100) kullanılmıştır.

Gereçler:

- Hücre hattı
- CO₂ inkübatör
- Petri kabı
- Serumlu / Serumsuz hücre kültür ortamı
- PBS

- Plazmid DNA
- Lipofectamine LTX Reagent
- PLUS Reagent

Yöntem:

1. Hücreler transfeksiyon işleminin yapılacağı petri kaplarına pasajlandı.
2. Hücreler petri kabının yüzeyinin %60-70'ini kaplayana kadar CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.
3. Transfeksiyon öncesi hücre kültür ortamı 4mL serumlu ortam ile yenilendi.
4. Transfekte edilecek plazmid karışımı hazırlandı. Bunun için 1000µL serumsuz besi ortamı, 5 µg Plazmid (~10 µL), 10 µL PLUS reagent, 25 µL Lipofectamine LTX reagent karışımı hazırlandı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Hazırlanan hücreler üzerine karışım eklenerek, petri kabı hafifçe karıştırıldı ve 37°C'de CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.6.12. Protein Lizatının Hazırlanması

İnkübasyondan sonra protein eldesi için gerekli kimyasallar hazırlanmış ve aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

Gereçler:

- Hücre hattı
- Isıtıcı Blok
- PYLB Tamponu (Son konsantrasyonları belirtilmiştir): 50 mM HEPES (pH: 7,6) çözeltisi, 50 mM NaF, 5mM EDTA, 10 mM Sodyum pirofosfat (NaPP_i), %1 Triton-X 50 mM NaCl, H₂O
- Proteaz ve Fosfataz inhibitörleri (Son konsantrasyonları belirtilmiştir): 1mM Serin proteaz inhibitörü (PMSF), 1 mM Tirozin fosfataz inhibitörü (Na₃VO₄), 15 µg/mL Aprotinin, 15 µg/mL Leupeptin, 1X Complete Mini-EDTA-Free
- Lizis tamponu: 5mL PYLB tamponu, 3,75µL Leupeptin, 3,75µL Aprotinin, 25µL PMSF, 25µL Na₃VO₄
- Örnek Tamponu: 950µL 2X Laemmli tamponu, 50µL 2-Merkaptoetanol

Yöntem:

1. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

2. Flasktaki var olan besiyeri çekilerek atıldı.
3. Hücreler iki kez buz soğuşu PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı.
4. Hücreler üzerine 500 µL soğuk lizis tamponu eklendi.
5. Lizis tamponu ile birlikte hücreler scrapper yardımıyla flaskın tabanından kazındı.
6. İyice köpürüp, homojenize olana kadar pipet ile pipetaj yapıldı.
7. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
8. 20 dakika 20000 g'de 4 °C' de santrifüjlendi.
9. Üst faz önceden buzda soğutulmuş temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
10. Elde edilen protein lizatından 100µL ile 100µL örnek tamponu yeni bir tüpte karıştırıldı.
11. Karışım 95°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta 10 dakika inkübe edildi.
12. Tüp soğuduktan sonra Western Blot'ta kullanılmak üzere -80°C'ye ayarlanmış dondurucuya kaldırıldı.

3.6.13. Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

BIO-RAD Protein assay (500-0006), kolorimetrik olarak total protein konsantrasyonu ölçülmesi için formüle edilmiş bir testtir. Konsantrasyonu bilinen standartların 595 nm' de verdiği absorbanslardan yararlanılarak standart grafiği çizilir. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin verdiği absorbansların standart grafikten karşılığı okunarak, protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

Yöntem:

1. BCA solüsyonu, 1/5 oranında dH₂O ile sulandırıldı.
2. Tablo 7'de gösterildiği gibi 5 ayrı standart reaksiyonu, bir kör ve örnekler hazırlandı.
3. Bütün tüpler 5 dakika 37°C'de inkübe edildi.
4. Oda sıcaklığına gelmesi için beklendi.
5. Spektrofotometrede 595nm'de absorbansları ölçüldü.
6. Konsantrasyonları bilinen standartların absorbanslarından yararlanılarak standart grafiği çizildi.
7. Standart grafiği kullanılarak örneklerin absorbanslarına karşılık gelen konsantrasyonları belirlendi.

Tablo 7. BCA protein assay ile protein konsantrasyon ölçümü için hazırlanan standart ve örneklerin miktarları

	Standart 1	Standart 2	Standart 3	Standart 4	Standart 5	Kör	Örnek
BSA (5mg/ml)	1 µl	2 µl	5 µl	10 µl	20 µl	-	2 µl
dH ₂ O	99 µl	98 µl	95 µl	90 µl	80 µl	100 µl	98 µl
BCA	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

3.6.14. Western Blot

3.6.14.1. SDS Page

SDS-Page jel elektorforezindeki temel amaç molekülleri büyüklüklerine göre ayırmaktır. Bunun için iki farklı jel kullanılır. Yükleme jeli örneklerin yüklendiği üstteki jeldir. Ayırıştırma jeli ise moleküllerin büyüklüklerine göre ayrıştığı alttaki jeldir. Denatüre edilmiş protein lizatu jele yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirilir.

Gereçler:

- Yükleme jeli: 0,25mL %40'lık Acr/Bis (Bio-Rad, Cat No: 1610146), 2.2mL dH₂O, 0,25mL 1M TRİS HCL (pH:6,8), 20µL %10'luk SDS, 20µL %10 APS, 2µL TEMED
- Ayırıştırıcı jel: 2mL %40'lık Acr/Bis (Bio-Rad, Cat No: 1610146), 5,3mL dH₂O, 2,5mL 1,5M TRİS HCL (pH:8,8), 0,1mL %10'luk SDS, 0,1mL %10 APS, 6µL TEMED
- Yürütme Tamponu: 1X SDS-TRİS-Glycine
- Cam kaplar
- Yürütme tankı

Yöntem:

1. Elektroforez için kullanılacak olan camlar önce distile su ile sonrasında %70'lik alkol ve izopropanol ile hiçbir leke kalmayacak şekilde yıkandı ve kurutuldu.
2. Jeller hazırlandı. APS ve TEMED jelin polimerleşmesini başlattığı için en son, jel dökülmeden önce eklenmelidir.

3. Ayırıştırıcı jel bir pipet yardımıyla hava kabarcığı oluşturulmasına dikkat edilerek cam kalıbın arasına aktarıldı.
4. Ayırıştırıcı jelin üst kısmının pürüzsüz olması için üstüne bir miktar izopropanol konuldu ve jelin donması için yaklaşık 30-45 dakika beklenildi.
5. Ayırıştırıcı jel donduktan sonra üstünde bulunan izopropanol, jele zarar vermeden dökülerek veya kurutma kâğıdı ile uzaklaştırıldı.
6. Donmuş haldeki ayırıştırıcı jelin üzerine yükleme jeli döküldü ve taraklar yerleştirilerek 25-30 dakika donması beklenildi.
7. Yükleme jeli de donunca cam kalıp elektroforez kabına taşındı.
8. Cam kalıp kaba yerleştirilirken yükleme yapılacak kısmın kabın iç haznesine bakacak şekilde olmasına dikkat edildi.
9. Cam kalıp yerleştirildikten sonra iç haznenin ağzına kadar, dış haznenin ise üçte ikisi dolacak şekilde yürütme tamponu eklendi.
10. Yürütme tamponu eklendikten sonra taraklar yavaşça çıkarıldı.
11. Örnekler yüklenmeden önce jelin ısınması için tank sistemi 5 dakika çalıştırıldı.
12. Kuyucuklara marker (5 μ L) ve örnekler (20 μ L) yerleştirildi.
13. 125V'da yaklaşık 2 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi.

3.6.14.2. Membrana Transfer

Jelde üzerinde proteinler moleküler ağırlıklarına göre yürüdükten sonra, proteinler jelden PVDF membrana transfer edilir.

Gereçler:

- Transfer Tamponu: 3g TRİS, 14,4g Glisin, 200mL Metanol, 1000mL dH₂O
- Sandviç Aparatı
- Transfer Tankı
- Metanol
- PVDF Membran
- Filtre kâğıdı

Yöntem:

1. Geniş bir kaba bir miktar transfer tamponu dökülür ve içerisine sünger, filtre kâğıdı yerleştirilerek, bu malzemeler ıslatıldı.

2. PVDF membran kullanılmadan önce metanol içerisinde 5 dakika bekletilerek aktifleştirildi ve kullanılmadan önce sudan geçirildi.
3. Cam kap içerisinde jel dikkatlice çıkarıldı. Jelin yönüne dikkat edildi.
4. Kap içerisine sandviç aparatının siyah kısmı zemine gelecek şekilde yerleştirildi.
5. Zeminden yukarıya doğru sırasıyla; sünger, 3 tane filtre kâğıdı, jel, membran, 3 tane filtre kâğıdı ve sünger üst üste konuldu ve sandviç aparatı klipslenerek kapatıldı.
6. Sandviç aparatının saydam kısmı tankın kırmızı bölgesiyle aynı yöne bakacak şekilde yerleştirildi.
7. Transfer işleminde çok fazla ısı ortaya çıkacağı için tankın içerisine buz aküsü konuldu.
8. Transfer işlemi 300mA'de 1 saatte gerçekleştirildi.

3.6.14.3. Blotlama

Jelden membran üzerine transfer olan proteinleri görüntülemek için proteine özgü antikorlar ile blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Gereçler:

- 10X TBS (pH:7,6): 24g Trizma, 88g NaCl, 1000mL H₂O
- 1X TBST (Tris Buffered Saline – Tween 20): 1000mL 1X TBS, 10mL Tween 20
- %5'lik Süt tozu: 5g Süt tozu, 100mL 1X TBST
- FOXO3a antikor (1:1000): 5µL FOXO3a antikor, 10ml Süt tozu
- β-aktin antikor (1:1000): 5µL β-aktin antikor, 10ml Süt tozu
- İkincil antikor (1:1000): 5µL Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 10ml Süt tozu
- Çalkalayıcı

Yöntem:

1. Membran küçük bir kaba alınarak TBST ile yıkandı.
2. Membran aynı kaptaki %5'lik süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca hafif düzeyde çalkalanmaya bırakıldı.
3. Membran, marker referans alınarak FOXO3a ve β-aktin'in bulunacağı bölgeye göre ikiye kesildi ve yönlerinin karışmaması için köşe kısmından işaretlendi.

4. FOXO3a antikoru içeren falkona FOXO3a bakılacak olan membran parçası yerleştirildi.
5. β -aktin antikoru içeren falkona β -aktin bakılacak olan membran parçası yerleştirildi.
6. Her iki falkonda +4°C’de bir gece boyunca hafif düzeyde çalkalanarak inkübe edildi.
7. Ertesi gün membranlar TBST ile 4 kez 4 dakika yıkandı.
8. Membranlar ikincil antikor içeren falkonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.
9. İnkübasyon sonrası membranlar TBST ile 4 kez 4 dakika yıkandı.

3.6.14.4. Deteksiyon

Birincil ve ikincil antikorlar ile işaretlenen proteinler deteksiyon için kullanılan özel kimyasallar ile film üzerinde gösterilmiştir.

Gereçler:

- Merck Deteksiyon solüsyonu
- Kaset
- Film

Yöntem:

1. Membranlar deteksiyon solüsyonu ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
2. Membran üzerindeki solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra bir poşet dosya içerisine aktarıldı ve yansıtıcı yüzeyli (intensify screen) radyolojik kaset içerisine yerleştirildi.
3. Karanlık odada, kasetin içerisine radyolojik film yerleştirildi.
4. Uygun görüntü alınana kadar (10 saniye – 30 dakika) farklı zaman aralıklarında filmler membran ile ekspozite edildi.
5. Filmler banyo edildi ve ardında kurutuldu. Kullanılan marker’a göre işaretlenen proteinlerin büyüklükleri saptandı.

3.6.15. PARP ile Apoptoz Deteksiyonu

Western blot ile edilen jelden membran üzerine transfer olan PARP proteinlerini görüntülemek için bu proteine özgü antikor ile blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Gereçler:

- 10X TBS (pH:7,6): 24g Trizma, 88g NaCl, 1000mL H₂O
- 1X TBST (Tris Buffered Saline – Tween 20): 1000mL 1X TBS, 10mL Tween 20
- %5’lik Süt tozu: 5g Süt tozu, 100mL 1X TBST
- PARP antikoru: 10µL PARP antikoru, 20ml Süt tozu
- İkincil antikor (1:1000): 5µL Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 10ml Süt tozu
- Çalkalayıcı

Yöntem:

1. Membran küçük bir kaba alınarak TBST ile yıkandı.
2. Membran aynı kapta %5’lik süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca hafif düzeyde çalkalanmaya bırakıldı.
3. PARP antikoru içeren falkona membran yerleştirildi.
4. Falkon oda sıcaklığında 2 saat boyunca hafif düzeyde çalkalanarak inkübe edildi.
5. Membranlar TBST ile 4 kez 4 dakika yıkandı.
6. Membranlar ikincil antikor içeren falkonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası membranlar TBST ile 4 kez 4 dakika yıkandı.

3.7. Araştırma planı

İş Paketi	AYLAR											
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Konu Seçimi	X											
Literatür Taranması	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Malzeme Siparişi ve Takibi	X	X	X									
Deneylerin Gerçekleştirilmesi			X	X	X	X	X	X	X			
Sonuçların Karşılaştırılması ve Değerlendirilmesi						X	X	X	X	X	X	
Tezin Yazılması									X	X	X	X

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Verilerin değerlendirilmesi, istatistiksel çalışma yapılmayacaktır.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Araştırmanın sınırlılıkları, apoptoz deteksiyonu için tek bir parametreye (PARP) bakılmasıdır.

3.10. Etik Kurul Onayı

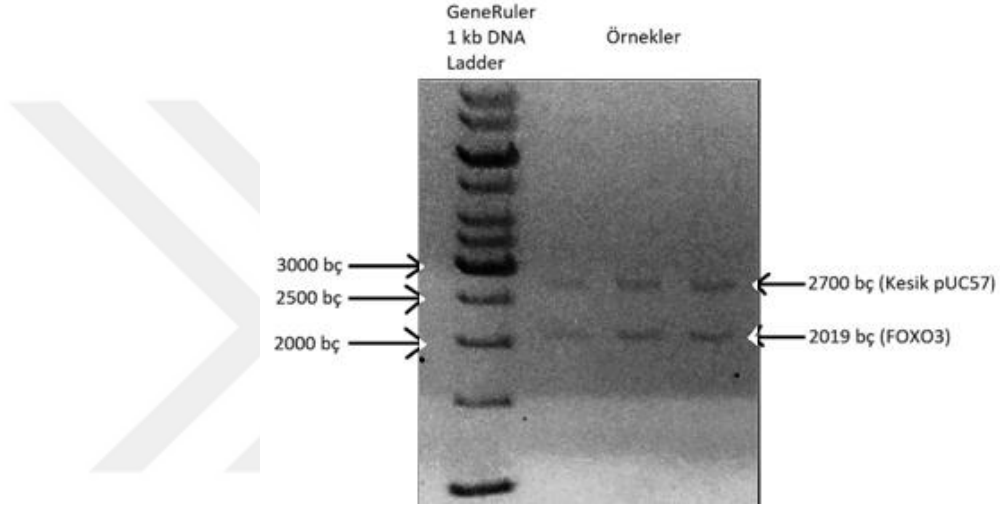
Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulundan 13.04.2017 tarihinde 2017/08-19 karar numarası ile onay alınmıştır. (EK-1)



4. BULGULAR

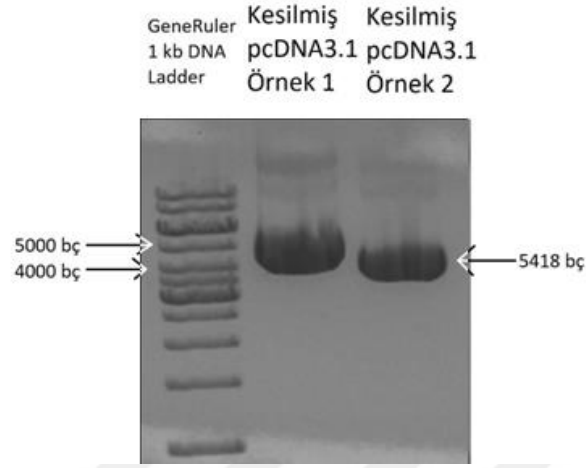
4.1. Vektör ve Insert DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Eldesi

pUC57 plazmidinden (4729 bç) FOXO3 genini çıkarmak için plazmid XbaI-ApaI restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim sonrası FOXO3 geni (2019 bç) ve kesik pUC57 plazmidi (2710 bç) elde edildi. %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 11). FOXO3 geni jelden izole edilerek vektör ile ligasyonda kullanıldı.



Şekil 11. XbaI ve ApaI ile kesilen pUC57 plazmidi

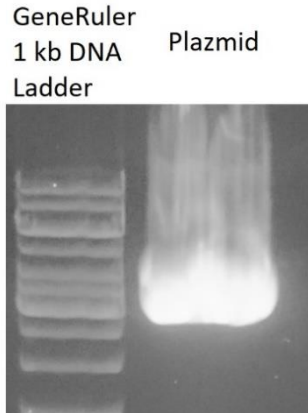
pcDNA3.1 plazmidinden (5428 bç) vektör olacak bölgeyi çıkarmak için plazmid XbaI-ApaI restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim sonrası vektör bölgesi (5418 bç) ve kesik pcDNA3.1 bölgesi (10 bç) elde edildi. %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 12). Vektör olacak bölge jelden izole edilerek FOXO3 ile ligasyonda kullanıldı.



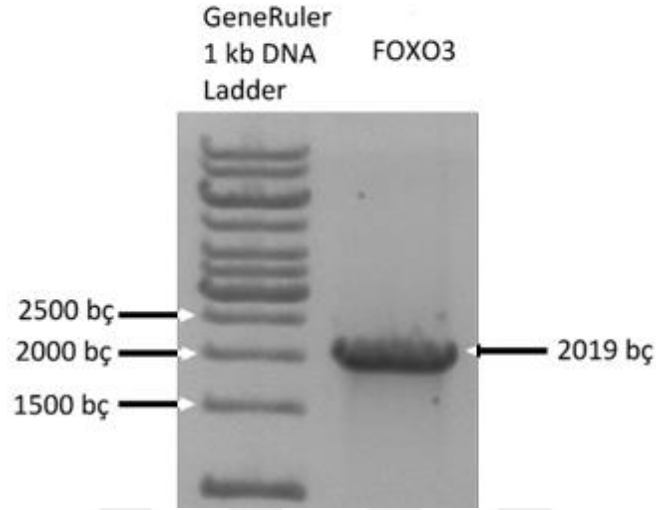
Şekil 12. XbaI ve ApaI ile kesilen pcDNA3.1 plazmid

4.2. Ligasyon

FOXO geni (2019 bp) ve pcDNA3.1 vektörü (5418 bp) ligasyon işlemi ile bir araya getirildi. Bunun sonucunda 7437 bp boyutunda bir vektör elde edildi. Vektörün büyüklüğü %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 13). Ligasyonun gerçekleştiğini doğrulamak için FOXO3' e özgü primerler kullanılarak PCR yapıldı ve PCR ürünü %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 14).



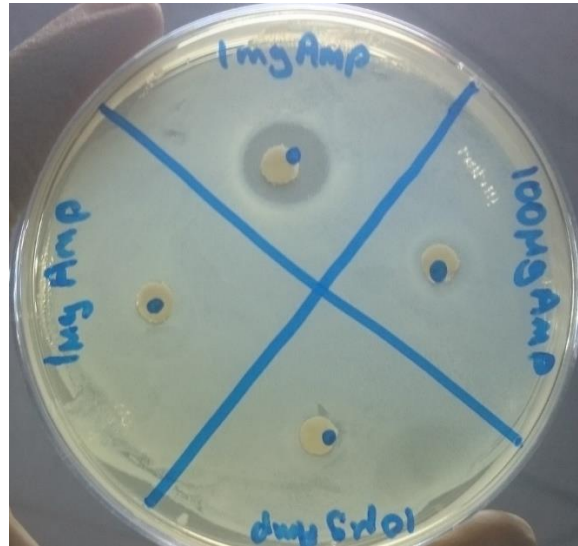
Şekil 13. Ligasyon sonrası plazmid



Şekil 14. FOXO3 PCR ürünü

4.3. Transformasyon

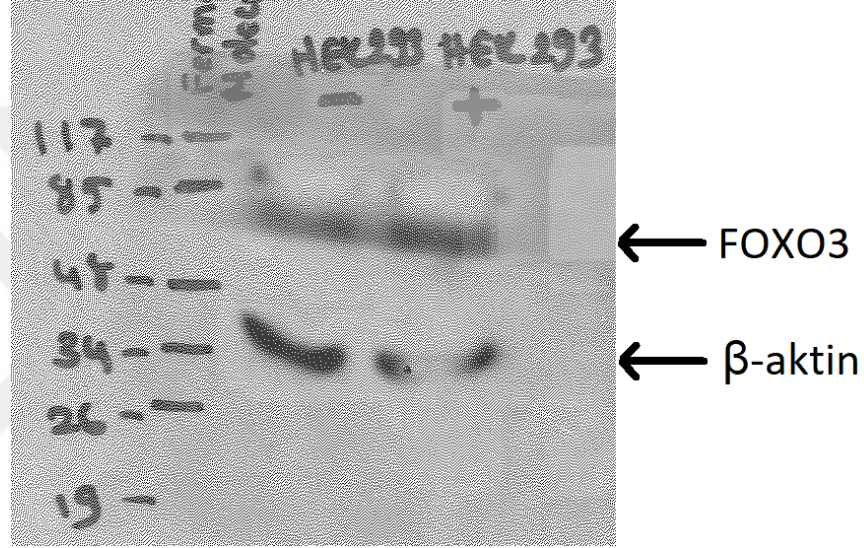
Transformasyonda kullanılan kompetan *E.coli* (*Promega JM109*) bakterileri için besiyerinde önerilen ampisilin konsantrasyonu 100µg/mL'dir. Yapılan çalışmalarda bu konsantrasyonun yeterli olmadığı gözlemlenmiştir ve uygun konsantrasyonu bulmak için emici diskler belirli konsantrasyondaki ampisilin ile ıslatılarak bakteri üremesi ve zon oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 15). Bu işlem sonucunda uygun konsantrasyonu 1mg/mL olduğu bulunmuştur ve deneyin ilerleyen safhalarında bu konsantrasyon kullanılmıştır.



Şekil 15. Kompetan *E.coli* bakterisinin belirli ampisilin konsantrasyonlarında zon oluşturmaları

4.4. Western Blot

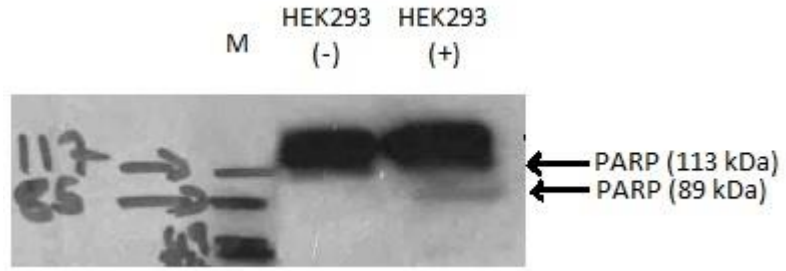
Transfekte olmayan (-) ve transfekte olan (+) hücrelerden elde edilen protein lizatı ile western blot yapıldı. FOXO3 (94 kDa) ve β -aktin (42 kDa) antikorları kullanıldı. Transfekte olan ve olmayan hücrelerin FOXO3 proteini seviyeleri incelenmiştir. ImageJ programı ile yapılan analizde tranfekte olan hücrelerde FOXO3 protein seviyesinde 1,5 katlık artış tespit edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. FOXO3 ve β -aktin'in transfekte olan ve olmayan hücrelerde western blot yöntemiyle gösterimi, Marker: Fermentas Prestained Protein Molecular Weight Marker

4.5. PARP ile Apoptoz Deteksiyonu

PARP proteini normal bir hücrede bütün halde bulunur ve boyutu 113 kDa'dır. Apoptoz sırasında aktifleşerek 89 kDa ve 24 kDa olmak üzere iki parçaya ayrılır. Bu iki parçanın bulunması erken apoptozun işaretçisidir (21). Western blot sonucunda transfekte olmayan hücreyle karşılaştırdığımızda PARP proteinin az miktarda da olsa iki parçaya ayrıldığı görülmektedir. PARP proteinin bütün halinin ve 89 kDa'luk parçasının bantları birbirlerine çok yakındır. Bu durum apoptoz sürecinin başladığına yönelik bir belirteç olduğu düşünülmektedir (Şekil 17).



Şekil 17. PARP proteininin transfekte olan ve olmayan hücrelerde western blot yöntemiyle gösterimi, Marker: Fermentas Prestained Protein Molecular Weight Marker

5. TARTIŞMA

FOXO3 proteini hücre homeostazının korunmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden biridir (1). Aynı zamanda tümör baskılayıcı özelliği de vardır ve apoptoz sürecinde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu regüle etmektedir (1, 24).

Çalışmanın temelinde, FOXO3 geninin aşırı ifadesi durumunda hücrede, apoptoz açısından ne gibi değişiklikler olacağını gözlemlemek vardır. Daha önceki yapılan çalışmalarda belirli hücre tiplerinde FOXO3 geninin aşırı ifade ettirilmesinin apoptoz ile sonuçlandığı bulunmuştur (14, 30, 32). Bu çalışmada transfeksiyona yatkınlığı sebebiyle HEK293 hücre hattını kullanılmıştır. Literatür taramasına istinaden HEK293 hücre hattında FOXO3 ifadesinin artırılarak apoptoz süreci izlenen ilk çalışmadır.

Yapılan deneyler sonucunda transfekte olan ve olmayan hücreler arasındaki FOXO3 ifade seviyesi arasında yaklaşık olarak 1.5 katlık bir artış gözlenmiştir. Transfekte olan hücrelerde FOXO3 eifade düzeyinde artış vardır. Apoptoz sürecini gözlemlemek için PARP proteinine bakılmıştır. PARP proteinin parçalanmış olması erken apoptoz belirtisidir (21). Transfekte olmayan hücrelerde PARP proteini parçalanmamış halde bulunurken, transfekte olan hücrelerde parçalanmış halde bulunmuştur (Şekil 17). Bu veri, transfekte olan hücrelerde her hangi bir apoptotik uyarı olmadan da FOXO3 ifadesinin artmasına dayalı apoptoz sürecinin başladığı düşünülmektedir.

PARP için elde edilen western blot sonucunda transfekte olan hücrelerde PARP proteini hem bir bütün hem de parçalanmış haldedir. Bu parçalardan 24 kDa'luk olan gözükmemektedir. Bunun sebebi kuyucuklara az miktarda (10 µL) örnekleme yapılmasıdır. Kuyucuklara daha yüksek miktarda (20 µL) örnekleme yapıldığında, yoğunluktan dolayı PARP proteininin bütün hali 89 kDa'luk parçasını baskılamaktadır ve ikisinin ayrımı yapılamamaktadır.

PARP proteininin çoğunluğunun parçalanmamış olması hücrenin apoptoz sürecine yeni girdiğini gösteriyor olabilir. Buradaki veriyi güçlendirmek için mikroskopik yöntemlerle hücre morfolojisi incelenerek apoptoz hakkında daha detaylı bir yorumlama yapılabilir.

FOXO3 ve apoptoz arasındaki ilişki için tek başına PARP proteinine bakmak yeterli değildir. Bu ikisi arasındaki ilişkiyi güçlendirmek için ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, HEK293 hücre hattında FOXO3 geninin aşırı ifade ettirilmesi ve apoptoz süreci araştırılmıştır. Çalışma sonucunda transfekte olan hücrelerde FOXO3 ekspresyonu seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Apoptoz indikatörü olarak PARP proteinine bakılmıştır. Transfekte olmayan hücrelerde PARP proteini parçalanmamış halde bulunurken, transfekte olan hücrelerde parçalanmış halde bulunmuştur. Bu verilere dayanarak transfekte olan hücrelerde herhangi bir apoptotik uyaran olmadan FOXO3 ifadesinin artmasına dayalı apoptoz sürecinin başladığı bulunmuştur.

Bu çalışmadan elde edilen bilgilere dayanarak aşağıdaki faktörlerin araştırılmasının FOXO3 ve apoptoz arasındaki ilişkiye katkı sağlayacağı düşünülmektedir:

- Normal bir hücrede FOXO3 ekspresyonu mevcuttur ve FOXO3 proteinleri genellikle inaktif formda sitoplazmada bulunmaktadır (5). FOXO3 ve apoptoz arasındaki ilişkinin daha da netleştirilmesi için FOXO3 proteinin seviyesine bakılırken nükleer ve sitoplazmik lokalizasyonuna yönelik bir ayırım yapılabilir.
- Apoptoz sürecinin daha iyi bir gözlemlenmesi için PARP dışında başka apoptoz belirteci olan genlerin (Bim, Bcl-2, FasL, TRAIL vb.) ifade düzeylerine bakılabilir.
- Apoptoz varlığının mikroskopik, kolorimetrik ve immünohistokimyasal gibi çeşitli yöntemlerle de gösterilmesinin apoptoz sürecini daha da detaylandıracaktır.
- Hücre döngüsünden sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerine ve FOXO3 ile karşılaştırılmasına bakılabilir.

Sonuç olarak FOXO3 geninin aşırı ifadesi ile FOXO3 protein seviyesinin arttığı ve apoptozu tetiklediği HEK293 hücre hattında gösterilmiştir. Karmaşık hücre hattı modelleri ve apoptoz ile ilişkili diğer faktörlerin daha derinlemesine incelenmesinin, FOXO3 ve apoptoz arasındaki ilişkinin güçlendirilmesi adına yararlı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Morris BJ, Willcox DC, Donlon TA, Willcox BJ. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;61(6):515–25.
2. Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(16):2312–9.
3. Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NSB, Lam EW-F, vd. Forkhead Transcription Factor FKHR-L1 Modulates Cytokine-Dependent Transcriptional Regulation of p27KIP1. *Mol Cell Biol*. 2002;20(24):9138–48.
4. Coomans De Brachène A, Demoulin JB. FOXO transcription factors in cancer development and therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(6):1159–72.
5. Carter ME, Brunet A. Quick guide FOXO transcription factors. *Curr Biol*. 2007;17(4):113–4.
6. Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet*. 2003;19(6):339–44.
7. Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J [Internet]*. 2000;349(Pt 2):629–34.
8. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics*. 1998;47(2):187–99.
9. Jacobs FMJ, Van der Heide LP, Wijchers PJEC, Burbach JPH, Hoekman MFM, Smidt MP. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem*. 2003;278(38):35959–67.
10. Hosaka T, Biggs WH, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, vd. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(9):2975–80.
11. Eijkelenboom A, Burgering BMT. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]*. 17 Şubat 2013;14(2):83–97.

12. Boehm AM, Khalturin K, Erxleben FA, Hemmrich G, Klostermeier UC, Lopez-Quintero JA, vd. FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal Hydra. *Ann Neurosci*. 2013;20(1):17.
13. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJPL, Lens SMA, Coffey PJ, Burgering BMT, vd. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* [Internet]. 2002;168(10):5024–31.
14. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, vd. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor 1991). These cytokines, by binding to their cognate cell surface receptors, may in turn induce caspase cascades and thereby propagate the process of apoptosis (*Na. Cell*. 1999;96:857–68).
15. van der HEIDE LP, HOEKMAN MFM, SMIDT MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*. 2004;380(2):297–309.
16. Wang Y, Zhou Y, Graves DT. FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. *Biomed Res Int*. 2014;2014(Figure 1):1–13.
17. Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet*. 2001;28(2):139–45.
18. Bouchard C, Marquardt J, Brás A, Medema RH, Eilers M. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J*. 2004;23(14):2830–40.
19. Eijkelenboom A, Mokry M, De Wit E, Smits LM, Polderman PE, Van Triest MH, vd. Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2013;9(638):1–15.
20. Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*. 2002;2(1):81–91.
21. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*. 2017;22(2):306–23.
22. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: Biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta*. 2002;326(1–2):27–45.

23. Khan KH, Blanco-Codesido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2014;90(3):200–19.
24. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2011;1813(11):1978–86.
25. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* [Internet]. 30 Aralık 2008;27(S1):S2–19.
26. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EWF, Shaun B Thomas N, Lammers JWJ, Koenderman L, vd. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: Protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol.* 2002;156(3):531–42.
27. Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol.* 2003;162(4):613–22.
28. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JWJ, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol.* 2000;10(19):1201–4.
29. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJPL, Lens SMA, Coffey PJ, Burgering BMT, vd. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* [Internet]. 2002;168(10):5024–31.
30. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J. FOXO Proteins Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand Expression. *J Biol Chem.* 2002;277(49):47928–37.
31. Dabrowska A, Kim N, Aldovini A. Tat-Induced FOXO3a Is a Key Mediator of Apoptosis in HIV-1-Infected Human CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 15 Aralık 2008;181(12):8460–77.
32. Medema RH, Kops GJPL, Bos JL, Burgering BMT. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27(kip1). *Nature.* 2000;404(6779):782–7.
33. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1B>, 09 Haziran 2019

34. Kops GJPL, Medema RH, Glassford J, Essers MAG, Dijkers PF, Coffey PJ, vd. Control of Cell Cycle Exit and Entry by Protein Kinase B-Regulated Forkhead Transcription Factors. *Mol Cell Biol.* 2002;22(7):2025–36.
35. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J [Internet].* 2000;346 Pt 3:561–76.
36. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: A hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(11):657–64.
37. Burgering BMT, Kops GJPL. Cell cycle and death control: Long live Forkheads. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(7):352–60.
38. Davis RJ, D’Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res [Internet].* 01 Haziran 1994;54(11):2869–72.
39. Declue MS, Monnard PA, Bailey JA, Maurer SE, Collis GE, Ziock HJ, vd. Nucleobase mediated, photocatalytic vesicle formation from an ester precursor. *J Am Chem Soc.* 2009;131(3):931–3.
40. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics.* 1998;47(2):187–99.
41. Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene.* 2001;20(40 REV. ISS. 4):5736–46.
42. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, Emanuel BS, vd. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet [Internet].* Kasım 1993;5(3):230–5.
43. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, Emanuel BS, vd. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet [Internet].* Kasım 1993;5(3):230–5.
44. Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, vd. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene.* 1997;14(2):195–202.

45. Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* [Internet]. 1997;90(9):3714–9.
46. Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Rabbitts TH. Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene MII and the bacterial lacZ gene. *EMBO J*. 2000;19(5):843–51.
47. So CW, Cleary ML. MLL-AFX Requires the Transcriptional Effector Domains of AFX To Transform Myeloid Progenitors and Transdominantly Interfere with Forkhead Protein Function. *Mol Cell Biol*. 2002;22(18):6542–52.
48. Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, vd. FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell*. 2007;128(2):309–23.
49. Yang J-Y, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, vd. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* [Internet]. Şubat 2008;10(2):138–48.
50. Hu MC-T, Lee D-F, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang J-Y, vd. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* [Internet]. 16 Nisan 2004;117(2):225–37.
51. Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Brühl T, Potente M, vd. FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J*. 2005;19(8):974–6.
52. Tang TTL, Lasky LA. The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 α by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278(32):30125–35.
53. Jagani Z, Singh A, Khosravi-Far R. FoxO tumor suppressors and BCR–ABL-induced leukemia: A matter of evasion of apoptosis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. Ocak 2008;1785(1):63–84.
54. Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* [Internet]. 25 Mayıs 2006;441(7092):523–7.

55. Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, vd. Knockdown of astrocyte-elevated gene-1 inhibits prostate cancer progression through upregulation of FOXO3a activity. *Oncogene*. 2007;26(55):7647–55.
56. Cornforth AN, Davis JS, Khanifar E, Nastiuk KL, Krolewski JJ. FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene*. 2008;27(32):4422–33.
57. Seoane J, Le H-V, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* [Internet]. 16 Nisan 2004;117(2):211–23.
58. Herzog CR, Blake DC, Mikse OR, Grigoryeva LS, Gundermann EL. FoxO3a gene is a target of deletion in mouse lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* [Internet]. Ekim 2009;22(4):837–43.
59. Blake DC, Mikse OR, Freeman WM, Herzog CR. FOXO3a elicits a pro-apoptotic transcription program and cellular response to human lung carcinogen nicotine-derived nitrosaminoketone (NNK). *Lung Cancer*. 2010;67(1):37–47.
60. Mikse OR, Blake DC, Jones NR, Sun YW, Amin S, Gallagher CJ, vd. FOXO3 encodes a carcinogen-activated transcription factor frequently deleted in early-stage lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(15):6205–15.
61. Dansen TB, Burgering BMT. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol*. 2008;18(9):421–9.
62. Jin GS, Kondo E, Miyake T, Shibata M, Takashima T, Liu YX, vd. Expression and intracellular localization of FKHRL1 in mammary gland neoplasms.
63. Prabhu V V, Allen JE, Dicker DT, El-Deiry WS. Small-Molecule ONC201/TIC10 Targets Chemotherapy-Resistant Colorectal Cancer Stem-like Cells in an Akt/Foxo3a/TRAIL-Dependent Manner. *Cancer Res* [Internet]. 01 Nisan 2015;75(7):1423–32.
64. Tenbaum SP, Ordóñez-Morán P, Puig I, Chicote I, Arqués O, Landolfi S, vd. β -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat Med* [Internet]. 20 Haziran 2012;18(6):892–901.
65. Arques O, Chicote I, Puig I, Tenbaum SP, Argiles G, Dienstmann R, vd. Tankyrase Inhibition Blocks Wnt/ β -Catenin Pathway and Reverts Resistance to PI3K and AKT

- Inhibitors in the Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 01 Şubat 2016;22(3):644–56.
66. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell* [Internet]. 23 Ocak 2004;116(2 Suppl):S67-9, 1 p following S69.
67. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, vd. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* [Internet]. 19 Mart 1992;356(6366):215–21.
68. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, vd. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*. 1994;4(1):1–7.
69. Wang F, Marshall CB, Yamamoto K, Li GY, Plevin MJ, You H, vd. Biochemical and Structural Characterization of an Intramolecular Interaction in FOXO3a and Its Binding with p53. *J Mol Biol* [Internet]. 2008;384(3):590–603.
70. Bouchard C, Lee S, Paulus-Hock V, Loddenkemper C, Eilers M, Schmitt CA. FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* [Internet]. 01 Kasım 2007;21(21):2775–87.
71. Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, Kenzelmann Broz D, vd. The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* [Internet]. 21 Temmuz 2011;30(29):3207–21.
72. Shiota M, Song YH, Yokomizo A, Kiyoshima K, Tada Y, Uchino H, vd. Foxo3a suppression of urothelial cancer invasiveness through twist1, Y-box-binding protein 1, and E-cadherin regulation. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5654–63.
73. Courtois-Cox S, Genther Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, vd. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* [Internet]. Aralık 2006;10(6):459–72.
74. de Keizer PLJ, Packer LM, Szypowska AA, Riedl-Polderman PE, van den Broek NJF, de Bruin A, vd. Activation of Forkhead Box O Transcription Factors by Oncogenic BRAF Promotes p21cip1-Dependent Senescence. *Cancer Res* [Internet]. 01 Kasım 2010;70(21):8526–36.
75. Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. *Mediators Inflamm*. 2013;2013(1):1–11.

76. Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, Zhang X, Tong W, Sellers R, vd. ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3 ^{-/-} mice. EMBO J [Internet]. 2010;29(24):4118–31.
77. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, vd. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell [Internet]. 2007;128(2):325–39.
78. https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pUC57, 09 Haziran 2019
79. [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pcDNA3.1\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pcDNA3.1(%2B)) , 09 Haziran 2019

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

	Karar No:2017/08-19	Tarih:13.04.2017
KARAR BİLGİLERİ	Prof.Dr.H.Ogün SERCAN'ın sorumlusu olduğu "Hek293 Hücre Hatında Aşırı İfade Ettirilen FOXO3 Geninin Etkilerinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Banu
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Ş.Reyhan
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	N.Ş.
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katlanmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katlanmadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katlanmadı
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	katlanmadı
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	Sülen
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Bilge
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	S.K.
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M.A.
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	A.A.
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	M.B.
Uzm.Dr.Ahmet Can BILGIN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	A.C.
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	M.E.

EK-2. Özgeçmiş



BURAK KARABEY

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	20153283464
Doğum Tarihi	26/12/1993
İletişim Adresi	275 Sokak No:6 Daire:10
Telefon	(553) 949 69 89
E-posta	burakkarabey93@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

26 Ocak 2016 - Şu Anda (3 yıl 5 ay) Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ) Diploma Numarası: - Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.15 / 4.0
15 Ekim 2014 - 02 Ocak 2017 (2 yıl 3 ay) Ön Lisans, Açıköğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ, LABORANT VE VETERİNER SAĞLIK PR. (AÇIKÖĞRETİM) Diploma Numarası: -
05 Eylül 2011 - 19 Haziran 2015 (3 yıl 10 ay) Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ANKARA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE FEN FAKÜLTESİ, BİYOLJİ PR. Diploma Numarası: 2015-05-0204 Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.1 / 4.0

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0