

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**MEME KANSERİNDE PRİON PROTEİNLERİNİN OTOFAJİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zübeyde ÖZTEL

**Danışman
Prof. Dr. Erdal BALCAN**

**İkinci Danışman
Dr. Öğr. Üyesi H. Ayşegül MENDİ**



MANİSA-2025

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, tezin yazımında akademik ve etik kurallara aykırı herhangi bir yapay zeka ve program kullanmadığımı beyan ederim.

Zübeyde ÖZTEL



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLO DİZİNİ.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT	XI
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kanser	4
2.1.1. Meme Kanseri	5
2.2 Prion Proteini	6
2.3 Otofaji	9
2.4 Endoplazmik Retikulum Stresi	10
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	13
3.2 Hücre Hatlarının Temini ve İdamesi.....	14
3.3 Hücrelerde ER Stresi Oluşturma	15
3.4 MTT ile Hücre Canlılığı Takibi	16
3.5 RNA interference Yöntemi ile PrP ^c Kodlayan Genin Susturulması	17
3.6 siRNA Transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop ile Doğrulanması	19
3.7 İmmunofloresan Yoğunluk Analizi.....	20

3.8 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir reaksiyonu (RT Q-PCR)	21
3.9 İstatistiksel Analiz.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	25
4.1 Bulgular.....	25
4.1.1 MTT ile Hücre Canlılığı Takibi	25
4.1.2 RNA interference Yöntemi ile PrP ^c Kodlayan Genin Susturulması	26
4.1.3 Real-Time Kantitatif PCR (qRT-PCR) Analizi	27
4.1.3.1 4T1 Hücre Hattında Genlerin İfadeleme Düzeyleri	28
4.1.3.2 4T1-HER2 ⁺ Hücre Hattında Genlerin İfadeleme Düzeyleri	39
4.2. Tartışma.....	49
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	Protein Kinaz B
ATF	Aktifleştirici Transkripsiyon Faktörü
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	Eşik Döngüsü
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMSO	Dimetilsülfooksit
dsRNA	çift iplikli RNA
DTHF	Düzeltilmiş Total Hücre Floresan Yoğunluğu
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Endoplazmik Retikulum
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FITC	Fluorecein İzotiyosinat
GADPH	Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz
GPI	Glikozilfosfatidilinositol
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IC₅₀	Yarı Maksimal İnhibitör Konsantrasyon
IP3R	<i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor</i>
IRE1	İnositol-Requiring Enzyme 1
JNK	c-Jun N-Terminal Kinazlar
LC3II	Light Chain 3B
MDR	Çoklu İlaça Direnç
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	Metil Tiyazolil Tetrazolyum
ÖR	Östrojen Reseptörü
P62	SQSTM1 sequestosome1
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PERK	Protein Kinaz RNA-benzeri ER Kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PR	Progesteron Reseptörü
PrP^C	Hücrel Prion Proteini

RNAi	RNA interferans
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
siRNA	short interferans RNA
TME	Tümör Mikro Çevresi
TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri
UPR	Yanlış Katlanmış Protein Yanıt
VCX	Venetoclax
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XBP-1	X-Box Bağlayıcı Protein 1



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hücresel Prion Proteinin yapısı.	7
Şekil 2.2 Kanser tiplerine göre Hücresel Prion Proteinin direnç ve duyarlılık bilgileri	8
Şekil 2.3 Otofajik sürecin özeti.....	10
Şekil 2.4 ER stresinin oluşumunda etkili olan mekanizmalar.	11
Şekil 3.1. 4T1 ve 4T1-HER2+ hücre hatlarının 4X'lik büyütmedeki mikroskop görüntüsü.....	15
Şekil 4.1 4T1 ve 4T1 HER2+ hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT testi.....	25
Şekil 4.2 a) siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde konfokal mikroskop görüntüsü.....	27
Şekil 4.3 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>P62</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	29
Şekil 4.4 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>LC3II</i> geninin ekspresyon düzeyleri.	31
Şekil 4.5 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>Bax</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	33
Şekil 4.6 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>Bcl-2</i> geninin ekspresyon düzeyleri.	35
Şekil 4.7 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>PrP</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	37
Şekil 4.8 4T1 hücre hattına dair gen ifade düzeyleri.	38
Şekil 4.9 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>P62</i> geninin ekspresyon düzeyleri.	40
Şekil 4.10 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>LC3II</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	41
Şekil 4.11 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>Bax</i> geninin ekspresyon düzeyleri.	43
Şekil 4.12 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>Bcl-2</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	45
Şekil 4.13 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>PrP</i> geninin ekspresyon düzeyleri.	47
Şekil 4.14 4T1-HER2+ hücre hattına dair gen ifade düzeyleri.....	48

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan materyaller.....	13
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri.....	14
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan fare meme kanser hücre hatlarının özellikleri.	15
Tablo 3.4 cDNA sentezi döngüsel sıcaklık ve süreleri.....	22
Tablo 3.5 Primer dizileri tabloda verilmiştir.	22
Tablo 4.1 Tasarlanan deney grupları ve çalışmada kullanılan kısaltmaları.	26
Tablo 4.2 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>P62</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	29
Tablo 4.3 4T1 Hücre hattında <i>P62</i> genine ait p değeri değişimleri.....	30
Tablo 4.4 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>LC3II</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	31
Tablo 4.5 4T1 Hücre hattında <i>LC3II</i> genine ait p değeri değişimleri.	32
Tablo 4.6 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>Bax</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	33
Tablo 4.7 4T1 Hücre hattında <i>Bax</i> genine ait p değeri değişimleri.....	34
Tablo 4.8 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>Bcl-2</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	35
Tablo 4.9 4T1 Hücre hattında <i>Bcl-2</i> genine ait p değeri değişimleri	36
Tablo 4.10 4T1 Hücre hattına ait gruplarda <i>PrP</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	37
Tablo 4.11 4T1 Hücre hattında <i>PrP</i> genine ait p değeri değişimleri.....	38
Tablo 4.12 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>P62</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	40
Tablo 4.13 4T1-HER2+ Hücre hattında <i>P62</i> genine ait p değeri değişimleri.....	40
Tablo 4.14 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>LC3II</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	41
Tablo 4.15 4T1-HER2+ Hücre hattında <i>LC3II</i> genine ait p değeri değişimleri.....	42
Tablo 4.16 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>BAX</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	43
Tablo 4.17 4T1-HER2+ Hücre hattında <i>BAX</i> genine ait p değeri değişimleri	44
Tablo 4.18 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>Bcl-2</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	45

Tablo 4.19 4T1-HER2+ Hücre hattında <i>Bcl-2</i> genine ait p değeri değışimleri.....	46
Tablo 4.20 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda <i>PrP</i> ifadelenmesinin istatistiksel verileri.	47
Tablo 4.21 4T1-HER2+ Hücre hattında <i>PrP</i> genine ait p değeri değışimleri.....	48



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana her zaman destek olan aileme ve değerli danışmanım Prof. Dr. Erdal BALCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ başta olmak üzere, desteklerini esirgemeyen tüm akademik personele teşekkür ederim. Avrasya Üniversitesi'ndeki tüm çalışma arkadaşlarıma süreç boyunca verdikleri manevi destek için minnettarım. Bu çalışmanın yürütülmesinde katkı sağlayan ve gerekli finansal desteği sunan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TCD-2023-8382) teşekkür ederim.

Zübeyde ÖZTEL
Manisa, 2025



ÖZET

Doktora Tezi

Zübeyde ÖZTEL
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman:
Prof. Dr. Erdal BALCAN

İkinci Danışman:
H. Ayşegül MENDİ

MEME KANSERİNDE PRİON PROTEİNLERİNİN OTOFAJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser hücreleri, zorlu çevre koşullarına karşı hayatta kalmak ve tedaviye direnç geliştirmek için çeşitli hücresel adaptasyon mekanizmaları geliştirir. Bu süreçte otofaji ve apoptoz gibi programlı hücre yanıtları önemli rol oynar. Bu yanıtlar, hücrelerin stres altında denge kurmasına ve hayatta kalma şansını artırmasına yardımcı olur. Otofaji, hücresel bileşenlerin geri dönüştürülmesini sağlarken, apoptoz hasarlı ya da işlevsiz hücrelerin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlar. Son yıllarda, hücresel Prion proteini (PrP^c), sağkalım, stres yanıtı ve çoklu ilaca direnç (MDR) mekanizmalarıyla ilişkisi nedeniyle dikkat çekmiş, ancak otofaji-apoptoz dengesindeki rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada, PrP^c'nin otofaji ve apoptozla ilişkili gen ekspresyonları üzerindeki etkileri, triple negatif meme kanseri (4T1) ve human epidermal growth factor receptor 2 pozitif alt türü (4T1-HER2+) hücre hatlarında, endoplazmik retikulum stresörü Tunikamisin ve PrP^c siRNA uygulamalarıyla birlikte değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında, her iki hücre hattında: kontrol, IC₅₀ dozu ve IC₅₀ +0.010 µMol/mL doz Tunikamisin (0.063 µM/mL, 0.073 µM/mL), sadece PrP^c siRNA uygulaması ve siRNA+Tunikamisin uygulanan kombinasyon grupları oluşturulmuştur. Uygulamalar sonrasında *p62*, *LC3-II*, *Bax*, *Bcl-2* ve *PrP^c* genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle analiz edilmiştir.

Elde edilen bulgular, stres koşullarında PrP^c baskılanmasının hücresel yanıt mekanizmalarını farklı şekillerde etkileyebileceğini göstermiştir. Özellikle 4T1 hücre hattında PrP^c nin baskılanmasıyla birlikte IC₅₀ dozunda Tunikamisin uygulandığında *p62*, *LC3-II*, *Bax* ve *Bcl-2* gen ekspresyonların anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. HER2 pozitif hücre hattında ise benzer uygulamalar daha sınırlı etki göstermiştir; bu durum, PrP^c nin hücre tipine özgü farklı mekanizmalarla etkileşimde bulunabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, PrP^c nin baskılanmasının özellikle stres koşulları altında otofaji ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu etkileyerek tümör hücrelerinin adaptif yanıtlarını şekillendirebileceği gösterilmiştir. Bu veriler PrP^c'nin potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini ve PrP^c odaklı stratejilerin meme kanseri tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pion Proteini, ER Stres, Otofaji, Kanser

2025, 90 Sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

Zübeyde ÖZTEL
Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Education
Department of Biology

Supervisor:
Prof. Dr. Erdal BALCAN

Co-Supervisor:
H. Ayşegül MENDİ

INVESTIGATION OF THE AUTOPHAGIC EFFECTS OF PRION PROTEINS IN BREAST CANCER

Cancer cells develop various cellular adaptation mechanisms to survive under harsh environmental conditions and to develop resistance to therapies. In this process, programmed cellular responses such as autophagy and apoptosis play a critical role. These responses help cells maintain homeostasis under stress and enhance their chances of survival. While autophagy facilitates the recycling of cellular components, apoptosis ensures the controlled elimination of damaged or dysfunctional cells. In recent years, the cellular prion protein (PrP^c) has attracted attention due to its association with survival, stress response, and multidrug resistance (MDR) mechanisms; however, its precise role in regulating the autophagy-apoptosis balance remains unclear.

In this study, the effects of PrP^c on the expression of autophagy- and apoptosis-related genes were investigated in triple-negative breast cancer (4T1) and human epidermal growth factor receptor 2-positive (4T1-HER2+) cell lines through the application of the endoplasmic reticulum stressor tunicamycin and PrP^c-targeting siRNA. Experimental groups were established in both cell lines as follows: control, IC₅₀ dose and IC₅₀+0.010 µMol/mL tunicamycin doses (0.063 µM/mL and 0.073 µM/mL), PrP^c siRNA alone, and siRNA combined with tunicamycin. Following treatment, the expression levels of *p62*, *LC3-II*, *Bax*, *Bcl-2*, and *PrP^c* genes were analyzed using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

The findings demonstrated that PrP^c suppression under stress conditions may differentially influence cellular response mechanisms. In particular, in the 4T1 cell line, co-treatment of PrP^c knockdown and IC₅₀ dose of tunicamycin led to significant changes in the expression of *p62*, *LC3-II*, *Bax*, and *Bcl-2* genes. In contrast, the HER2-positive cell line exhibited more limited changes under similar treatments, suggesting that PrP^c may interact with distinct mechanisms in a cell type-specific manner.

In conclusion, PrP^c suppression was shown to influence the expression of autophagy- and apoptosis-related genes under stress conditions, potentially modulating the adaptive responses of tumor cells. These results suggest that PrP^c may serve as a potential therapeutic target and that PrP^c -centered strategies could offer novel approaches for breast cancer treatment.

Keywords: Pion Protein, ER Stress, Autophagy, Cancer

2025, 90 Page

1.GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı'nın (IARC) 2022 yılında yayımladığı veriler, kanserin küresel ölçekte halk sağlığı üzerindeki yıkıcı etkisini belirgin bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu verilere göre, dünya genelinde en fazla ölüme neden olan kanser türleri sırasıyla akciğer, meme ve kolorektal kanserdir. Akciğer kanseri, hem erkekler hem de kadınlar arasında en ölümcül kanser türü olmayı sürdürürken, meme kanseri özellikle kadın bireyler için en büyük tehditlerden biri haline gelmiştir.

Kadınlarda, meme kanseri yalnızca en sık teşhis edilen kanser türü olmakla kalmayıp aynı zamanda en fazla ölüme yol açan kanser türü olarak dikkat çekmektedir. 2022 yılında dünya genelinde 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve bu hastalık nedeniyle 670.000 ölüm gerçekleşmiştir. (WHO,2022) Bu istatistikler, meme kanserinin yalnızca bireylerin yaşamlarını değil, aynı zamanda sağlık sistemlerini, aileleri ve toplumları derinden etkileyen bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir.

Meme kanserinin bu denli yaygın ve ölümcül olmasının ardındaki nedenler arasında genetik faktörler, çevresel etmenler, yaşam tarzına bağlı riskler ve erken teşhis yetersizlikleri yer almaktadır. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde, erken teşhis ve etkili tedaviye erişim konusundaki eksiklikler, bu kanser türüne bağlı ölüm oranlarının yüksek seyretmesine katkıda bulunmaktadır. Bu veriler, meme kanserinin küresel sağlık üzerindeki ciddi etkisini ve bu hastalıkla mücadelede erken teşhis, etkin tedavi yöntemleri ve farkındalık çalışmalarının hayati önem taşıdığını bir kez daha gözler önüne sermektedir. Ayrıca, araştırmaların ve sağlık politikalarının bu alana yoğunlaşması gerektiğini vurgulamaktadır.

Otofaji, hücresel homeostazı sağlamak için çeşitli hücresel kargoların bozunmasını ve geri dönüşümünü sağlayan kritik bir mekanizmadır. Kansere bağlamında otofaji, erken tümör gelişimini önlerken yerleşik ve metastatik tümörlerin sürdürülmesi ve metabolik adaptasyonuna destek vererek birbirinden farklı roller üstlenebilmektedir. Yapılan araştırmalar, otofajinin tümör hücrelerinde ve mikroçevredeki işlevlerini ortaya koyarak, otofajiye dayalı kanser tedavileri geliştirilmesine yönelik yeni yollar açmıştır. (Debnath, Gammoh, & Ryan, 2023)

Hücresel prion proteini (PrP^c), glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapası ile hücre yüzeyine bağlı bulunan bir glikoproteindir. Membran mikro bölgelerinde (lipid rafts) lokalize olan bu protein, nöronal hücreler başta olmak üzere birçok hücre tipinde eksprese edilir ve hücre sinyalleşmesi, adezyon, anti-apoptotik mekanizmalar, oksidatif stres yanıtı ve protein homeostazı gibi çeşitli hücresel işlevlerde rol oynar.

PrP^c, N-glikan modifikasyonları taşıyan bir proteindir ve bu modifikasyonlar, hücre dışı sinyalleri algılamada ve protein-protein etkileşimlerinde kritik öneme sahiptir. Özellikle GPI çapası, PrP^c'nin hücre membranında hareket etmesini, farklı reseptörler ve hücre dışı matris proteinleriyle etkileşime girmesini sağlar. Bu özellikleri sayesinde sinaptik plastisite, nöroproteksiyon ve hücresel stres yanıtı gibi önemli biyolojik süreçlerde görev alır (C. Yang et al., 2023).

PrP^c, patolojik koşullarda proteazlara dirençli formu olan PrP^{Sc}'ye dönüşerek nörodejeneratif hastalıklara neden olabilir. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar PrP^c'nin kanser, otofaji, metastaz ve ilaç direnci gibi süreçlerde de rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Abi Nahed et al., 2023).

Prion proteininin metabolik süreçlerdeki rolü büyük ölçüde açıklığa kavuşmuş olsada, kanser biyolojisindeki işlevi halen araştırılmaktadır. Bu bağlamda, prion proteini ve otofaji arasındaki karşılıklı etkileşimin derinlemesine incelenmesi, bu iki mekanizmanın karşılaştırmalı değerlendirilmesi yoluyla yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (Limone, Maggisano, Sarnataro, & Bulotta, 2023).

Hücresel Prion proteininin (PrP^c), meme kanseri hücre hatlarında endoplazmik retikulum (ER) stresi altındayken otofajik süreçlerle etkileşimini ortaya koymayı amaçlayan bir çalışma planlanmıştır. Literatürde PrP^c'nin çeşitli insan meme kanseri hücre hatlarında ER stresi ile ilişkili olabileceği gösterilmiş olsa da, bu ilişkinin otofaji mekanizmaları üzerindeki etkisi detaylı biçimde araştırılmamıştır. Ayrıca, fare kaynaklı meme kanseri hücre hatlarında – gerek normal koşullarda gerekse ER stresine maruz bırakıldığında – PrP^c düzeyleri ve bunun otofaji üzerindeki potansiyel düzenleyici etkileri henüz netlik kazanmamıştır.

Bu kapsamda oluşturulan çalışmanın temel hipotezi, PrP^c'nin hücre içi stres koşullarında otofajik süreçleri modüle ederek tümör hücrelerinin hayatta kalmasını etkileyebileceği yönündedir. Bu hipotez doğrultusunda, PrP^c'nin otofaji üzerindeki düzenleyici rolünün hem hücre tipine hem de uygulanan stres koşullarına bağlı olarak farklılık gösterebileceği varsayılmıştır. Fare meme kanseri kökenli 4T1 ve 4T1-HER2+ hücre hatları kullanılmıştır. Araştırmanın ilk aşamasında, her iki hücre hattında normal fizyolojik koşullar altında, Programlanmış hücre ölümü süreçlerinde görev alan temel genler olan *p62*, *LC3II*, *Bax* ve *Bcl-2* genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Ardından, hücrede endoplazmik retikulum (ER) stresini oluşturmak amacıyla bir stres etmeni olarak Tunikamisin uygulanmış ve bu koşullar altında söz konusu genlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiştir. Son olarak, ER stresi altında PrP^c ifadesi siRNA transfeksiyon yöntemi aracılığıyla baskılanmış ve bu baskılamanın otofaji ve apoptozis belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Her hücre hattı için kontrol, Tunikamisin (0.063 µMol/mL ve 0.073 µMol/mL), PrP^c siRNA ve kombinasyon (siRNA + Tunikamisin) uygulamalarını içeren deney grupları oluşturulmuştur. Uygulamalar sonrası *p62*, *LC3II*, *Bax*, *Bcl-2* ve *PrP^c* genlerinin ekspresyon düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, $2^{-\Delta\Delta Cq}$ yöntemi ile değerlendirilmiş ve istatistiksel analizler yöntemi olarak One Way ANOVA kullanılmıştır. Tüm analizler IBM SPSS® Statistics (Sürüm 30) yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiş olup, anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Bu yöntemsel yaklaşım sayesinde, ER stresi–PrP^c–otofaji ekseninde bir ilişki olup olmadığına dair yeni bulgular elde edilmesi hedeflenmiştir. Elde edilecek verilerin, özellikle solid tümörlerin hayatta kalmasını destekleyen metabolik adaptasyon mekanizmalarından biri olan otofajide PrP^c'nin üstlendiği potansiyel rolü aydınlatması ve PrP^c'yi hedefleyen yeni nesil kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, genetik ve fenotipik çeşitliliği nedeniyle karmaşık bir hastalık olup, tedavi sürecinde önemli zorluklar oluşturmaktadır. Bu zorluklardan biri olan tümör içi heterojenlik, tek bir tümör içinde genetik ve epigenetik olarak farklı hücre popülasyonlarının bir arada bulunmasıyla karakterizedir. Bu çeşitlilik, tümörün büyüme dinamiklerini, metastaz potansiyelini ve tedaviye karşı geliştirdiği direnci doğrudan etkilemektedir.

Heterojenliğin oluşumunda hücresel plastisite kritik bir rol oynar; kanser hücreleri, çevresel faktörlere ve tedaviye bağlı baskılara uyum sağlayarak yeni fenotipler geliştirme yeteneğine sahiptir. Bu süreç, epigenetik mekanizmalar (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar) ve genetik değişiklikler (mutasyonlar, silmeler, kromozomal yeniden düzenlemeler) tarafından düzenlenmektedir. Özellikle epigenetik değişimler, genetik kodda kalıcı bir değişiklik yapmadan gen ekspresyonunu etkileyerek kanserin ilerlemesine katkıda bulunur (Babar et al., 2022; Remsik et al., 2018).

Kanser hücreleri, dış sinyal gereksinimi olmaksızın otokrin yollarla büyüme faktörleri üreterek ve tümör mikro çevresini şekillendirerek sınırsız çoğalma yeteneği kazanırlar. Bu hücrelerin apoptozise karşı direnci ise çoğunlukla p53 tümör baskılayıcı proteinde meydana gelen işlev kaybı ile ilişkilidir (Judasz, Lisiak, Kopczynski, Taube, & Rubis, 2022).

Otofaji, hücresel ve organel düzeyde homeostazı sağlayan temel bir mekanizma olup kanser biyolojisinde hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici roller üstlenebilir. Erken evrelerde tümör gelişimini engellerken, ilerleyen evrelerde tümör hücrelerinin metabolik adaptasyonunu ve hayatta kalmasını destekleyebilir. Bu çift yönlü rol, kanser tedavisinde otofajinin hedeflenmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Debnath et al., 2023).

Tüm bu faktörler birlikte ele alındığında, tümör içi heterojenliğin kanser tedavisine yönelik yaklaşımları büyük ölçüde etkilediği görülmektedir (Cordani, Dando, Ambrosini, & Gonzalez-Menendez, 2024). Bu nedenle, kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve bireyselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi, hastalığın yönetimi açısından kritik bir öneme sahiptir.

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, yüksek görülme sıklığı nedeniyle küresel bir sağlık sorunu olup, erken tanı ve etkili tedavi stratejileri gerektirmektedir. Hastalığın moleküler ve morfolojik düzeyde gösterdiği heterojenlik (Kashyap et al., 2022), farklı alt tipler için özelleştirilmiş terapötik yaklaşımları zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle, gelişmiş moleküler testler ve hassas tarama yöntemleri, erken teşhis ve hasta prognozunun iyileştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Kashyap et al., 2022).

Meme kanseri, gen ekspresyon profilleri ve immünohistokimyasal belirteçlere dayanarak farklı alt tipler halinde sınıflandırılan (Akram, Iqbal, Daniyal, & Khan, 2017; Senkus et al., 2015) heterojen bir hastalıktır. Bu sınıflandırma, hastalığın biyolojik özelliklerini anlamak ve etkili tedavi stratejileri geliştirmek açısından büyük önem taşımaktadır (Yersal & Barutca, 2014).

- Lümenal A Alt Tipi

Lümenal A meme kanseri, östrojen reseptörü (ÖR) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif, ancak HER2 negatif olan bir alt tiptir. Düşük proliferasyon indeksi (düşük Ki-67) ile karakterizedir ve genellikle iyi prognoza sahiptir. Tedaviye duyarlılığı yüksektir (J. J. Gao & Swain, 2018).

- Lümenal B Alt Tipi

Lümenal B alt tipi, ÖR pozitif ve HER2 negatif olabileceği gibi HER2 pozitif de olabilir. Yüksek proliferasyon indeksi (yüksek Ki-67) nedeniyle Lümenal A'ya göre daha agresif bir seyir gösterir ve prognozu daha kötüdür. Tedavi yaklaşımında hormonal tedaviye ek olarak kemoterapi önerilmektedir. Eğer tümör HER2 pozitifse, HER2 hedefli tedaviler (trastuzumab gibi) de tedavi protokolüne dahil edilir.

- HER2 Zengin (ErbB2 Pozitif) Alt Tipi

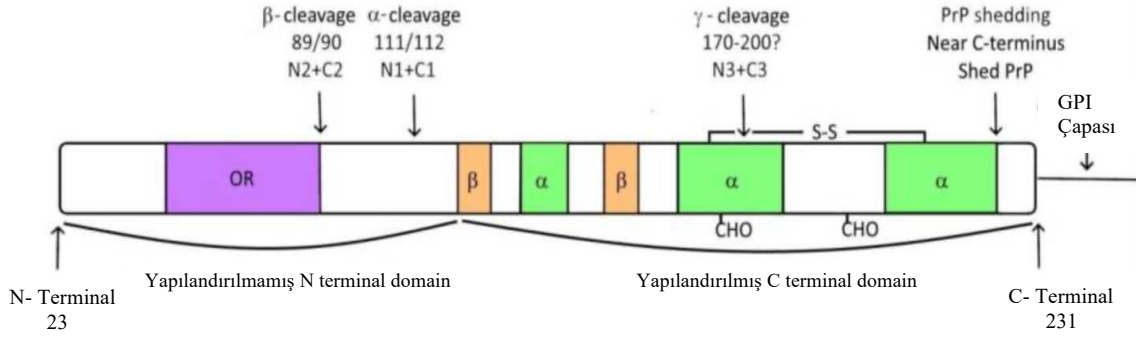
Bu alt tip, HER2 gen amplifikasyonu nedeniyle yüksek HER2 ekspresyonu gösterirken, ÖR ve PR negatif olup, genellikle agresif bir seyir izler. HER2 pozitif tümörler erken metastaz yapma eğilimindedir, ancak HER2 hedefli tedavilerin kullanıma girmesiyle bu alt tipin prognozu önemli ölçüde iyileşmiştir. Tedavi yaklaşımı genellikle HER2 hedefli tedaviler ve kemoterapi kombinasyonunu içerir.

- Üçlü Negatif (Bazal Benzeri) Alt Tip

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), ÖR, PR ve HER2'nin ekspresyon göstermediği bir alt tip olup, sıklıkla bazal sitokeratinler ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) pozitifliği ile karakterizedir. Bu tümörler yüksek proliferasyon oranına sahip olup agresif seyirlidir ve erken nüks riski taşır. Üçlü negatif tümörler için hormonal veya HER2 hedefli tedavi seçenekleri bulunmadığından, kemoterapi genellikle ana tedavi yöntemi olarak uygulanmaktadır.

2.2 Prion Proteini

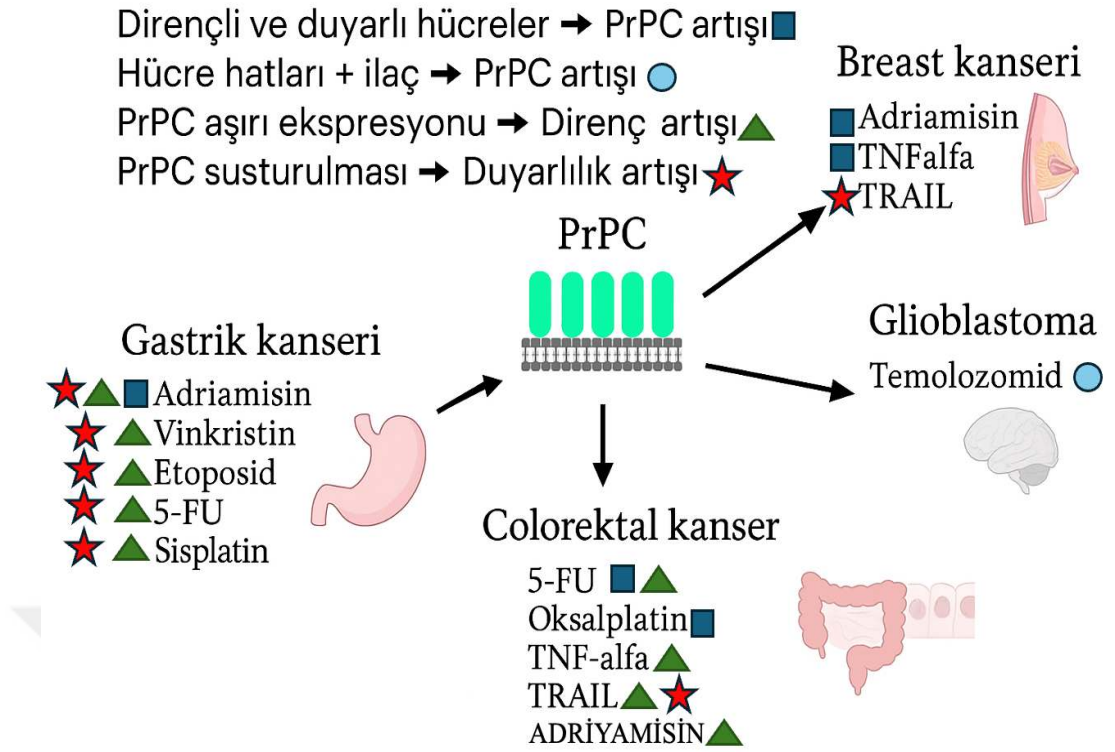
Hücrel prion proteini (PrP^c), 20. kromozomda bulunan PRNP geni tarafından kodlanan ve glikofosfatidilinositol (GPI) çapası ile hücre yüzeyine tutunan 208 amino asitlik bir proteindir (Hirsch, Martin-Lannere, & Mouillet-Richard, 2017)(Şekil 2.1). Başlangıçta pre-pro-PrP^c olarak sentezlenir ve endoplazmik retikulumla yönlendirilerek burada sinyal peptidinin ayrılmasıyla pro-PrP^c formuna dönüşür (Hara & Sakaguchi, 2020). Daha sonra N bağlı glikozilasyon, GPI çapası eklenmesi ve Golgi'de işleme süreçlerinden geçerek olgun PrP^c formunu kazanır ve hücre yüzeyine taşınır (Legname, 2017).



Şekil 2.1 Hüresel Prion Proteinin yapısı. N-terminalde yapılandırılmamış alan ve oktapeptid tekrarları, C-terminalde ise α -sarmallar, β -tabakalar, disülfid bağı, N-glikanlar ve hücre membranına tutunmasını sağlayan GPI çapa yapısı yer alır. (Kovac & Curin Serbec, 2022)

PrP^c sadece hücre zarında bulunmaz; geri dönüşüm endozomları aracılığıyla sürekli içselleştirilerek golgi, çekirdek ve mitokondri gibi hücre içi bölgelere de taşınır. İlk olarak nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilen PrP^c'nin, stres yanıtı, hüresel farklılaşma, mitokondriyal homeostaz, bağışıklık düzenlenmesi ve miyelin dengesi gibi birçok önemli hüresel işlevde rol oynadığı bilinmektedir (Sigurdson, Bartz, & Glatzel, 2019). Prion hastalıklarının patofizyolojisinde temel olay, normal prion proteini (PrP^c)'nin anormal ve β -tabaka açısından zengin bir form olan PrP^{Sc}'ye dönüşümüdür (Requena, 2020). Bu dönüşüm süreci, prion hipotezinin temelini oluşturur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, PrP^c'nin tümör ilerlemesi ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir (Go & Lee, 2020). Kanser ayırt edici özelliklerinden biri olan hücre proliferasyonundaki değişiklikler, hücrelerin daha hızlı çoğalmasına ve büyümeyi durduran sinyallere yanıt vermemesine neden olur. PrP^c hücre proliferasyonuna etki ederek kanser hücrelerinin daha hızlı çoğalmasına katkı sağladığı belirlenmiştir (Mouillet-Richard, Ghazi, & Laurent-Puig, 2021).



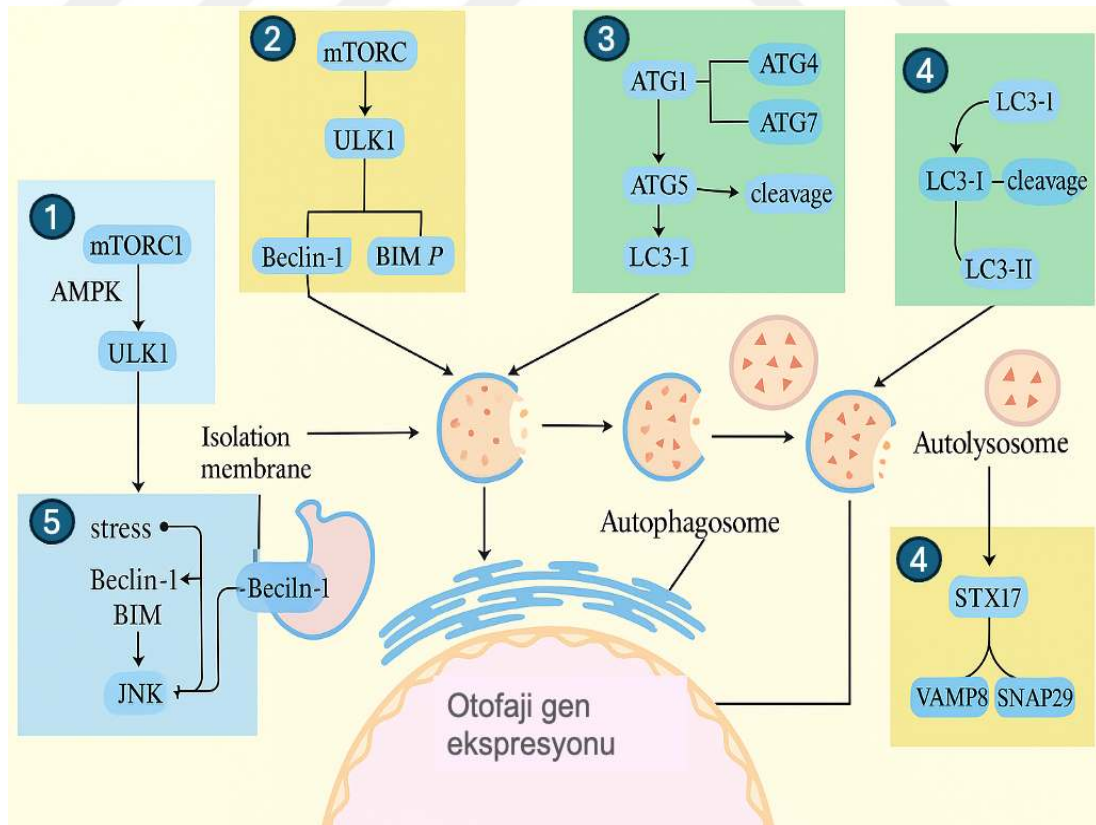
Şekil 2.2 Kanser tiplerine göre Hücresel Prion Proteinin direnç ve duyarlılık bilgileri ((Mouillet-Richard et al., 2021) kaynağından düzenlenerek alınmıştır.)

Farklı kanser hücre türlerinde PrP^c'nin aşırı ekspresyonu, sinyal iletim mekanizmalarını ve apoptozis inhibitörlerini etkileyerek tedavi direncine neden olur ve kanser hücrelerinin belirli ilaçlara karşı hayatta kalmasını sağlar (Şekil 2.2) (Yousaf et al., 2022). PrP^c ekspresyonu, metastatik mide kanseri vakalarında, metastatik olmayan mide kanserine kıyasla belirgin şekilde daha yüksektir. Bu artış, tümör hücrelerinin invazyon, destekleyerek hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabilir (Go & Lee, 2020). Seçici PrP^c downregülasyonunun, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumundan bağımsız bir mekanizma aracılığıyla Adriamisin dirençli insan kanser hücrelerini TRAIL ile indüklenen apoptozise duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Meslin et al., 2007).

Yüksek PrP^c ekspresyon seviyelerinin, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu kolaylaştırdığı, proliferasyonu teşvik ettiği ve hücrelerel sinyal yolları aracılığıyla farklılaşmayı artırdığı gösterilmiştir (Cha & Kim, 2023).

2.3 Otofaji

Otofaji, hücrelerin proteinleri ve organelleri parçalayarak yeniden kullanmasını sağlayan ve hücresel homeostazın sürdürülmesine katkıda bulunan bir mekanizmadır. Otofajiye ait mekanizma şekil 2.3’de verilmiştir. Normal koşullarda hücreyi koruyucu bir işlev üstlenirken, otofajinin düzensiz çalışması veya aşırı aktivasyonu hücre ölümüne yol açabilmektedir. Son yıllarda otofajinin düzenlenmesi ve moleküler mekanizmaları üzerine önemli ilerlemeler kaydedilmiş olup, otofajiyi tetikleyen sinyal yolları ve hücresel süreçler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ancak, otofajinin hücre tipi, çevresel faktörler ve fizyolojik koşullara bağlı olarak nasıl düzenlendiği, hücreyi ne zaman koruyucu ne zaman öldürücü bir mekanizma olarak işlediği gibi konular tam olarak aydınlatılamamıştır (S. Liu, Yao, Yang, Liu, & Wang, 2023). Otofajinin düzensiz işleyişi, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyomiyopati, enfeksiyon hastalıkları, tip II diyabet, yağlı karaciğer hastalığı ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Amaravadi, Kimmelman, & Debnath, 2019; Klionsky et al., 2021). Bu nedenle, otofajinin işleyişi ve hastalıklarla ilişkisi üzerine daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



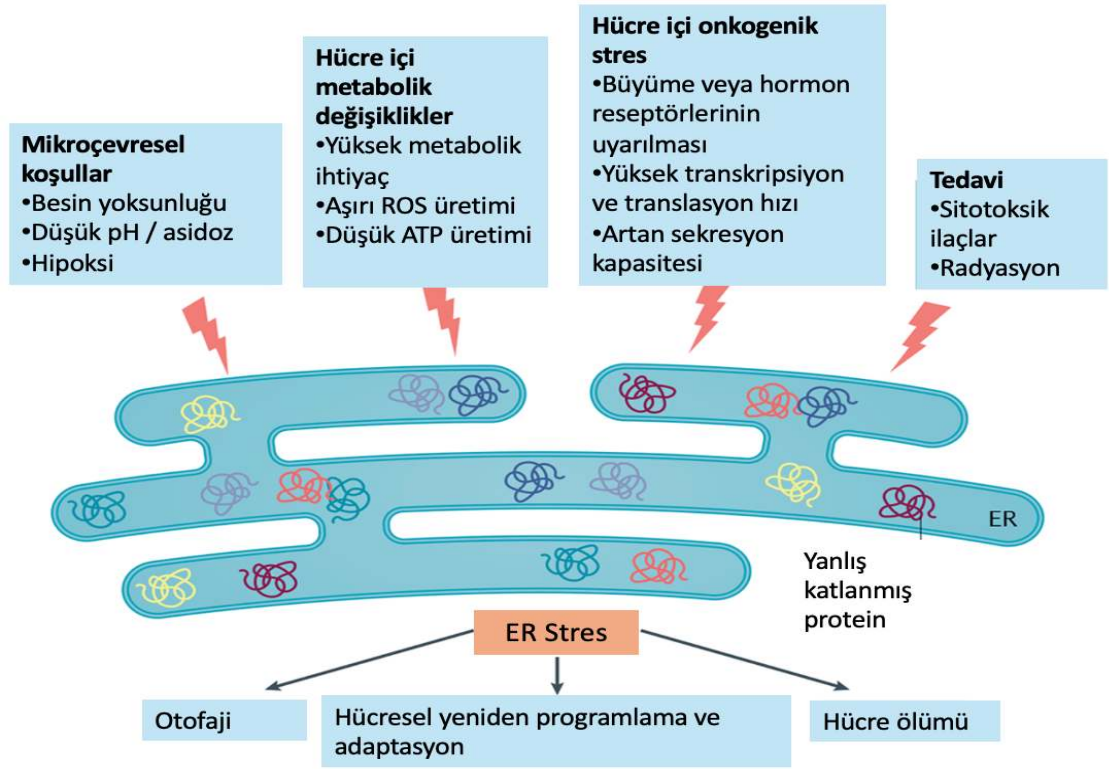
Şekil 2.3 Otofajik sürecin özeti.1)Başlatma: AMPK, mTORC1'i baskılar ve ULK1 kompleksi aracılığıyla otofaji başlatılması.2)Vezikül Genişlemesi: Beclin-1/VPS34 kompleksi otofajik vezikül oluşumunun desteklenmesi.3)ATG Kompleksi: ATG12-ATG5-ATG16L kompleksi otofajik yapıya dahil olması.4)LC3 İşlenmesi: LC3-II formuna dönüştürülerek otofagozoma entegre edilmesi.5)Füzyon: SNARE kompleksi aracılığıyla otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozom oluşturmaları (S. Liu et al., 2023)

Otofaji, kanser gelişiminde kritik roller üstlenerek hücre apoptozisi, metastazı ve hücre döngüsü gibi süreçleri düzenler (J. Zhang et al., 2023). Ancak, kanser üzerindeki etkisi çift yönlüdür; bir yandan tümör oluşumunu baskılayarak koruyucu bir rol oynarken, diğer yandan hücrel metabolik stresi azaltarak tümör büyümesi ve ilerlemesine katkıda bulunabilir (J. Zhang et al., 2023). Bu durum, otofajik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasının, kanser tedavilerine yönelik yeni ve etkili stratejilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşıdığını göstermektedir.

Fonksiyonel olarak otofaji, hücre hayatta kalımını destekler, enerji üretimini artırır ve bağışıklık yanıtlarına aracılık eder. Otofaji genlerinin kaybı, hücrel stresin bir göstergesi olan katlanmamış protein yanıtı (UPR) indükler (Senft & Ronai, 2015). UPR'nin temel işlevi, ERAD sistemi ve şaperon proteinlerinin düzenlenmesi yoluyla protein sentezini kontrol altına almak ve hücrenin toparlanmasını sağlamaktır. Bu süreç, transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen ekspresyonunu yönlendirir. Hücrel dengeyi koruyarak, otofaji ve sağkalım mekanizmalarının etkinliğini sürdürmeye yardımcı olur (Lin, Jiang, Chen, Zhao, & Wei, 2019).

2.4 Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), salgı yolunun merkezi organeli olup, protein translokasyonu, katlanması ve post-translasyonel modifikasyonlarından sorumludur. Bu süreçler, proteinlerin Golgi aygıtına iletilmesini ve veziküller aracılığıyla salgılanmasını veya plazma membranında sergilenmesini sağlar. ER fonksiyonundaki bozulmalar, "ER stresi" olarak (Şekil 2.4) bilinen duruma yol açarak, protein homeostazını yeniden sağlamak için hücre içi sinyal iletim mekanizmalarının hassas bir şekilde düzenlendiği katlanmamış protein yanıtını (UPR) tetikler.



Şekil 2.4 ER stresinin oluşumunda etkili olan mekanizmalar (X. Chen & Cubillos-Ruiz, 2021)

UPR, inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), çift sarmallı RNA ile aktive olan protein kinaz R (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktifleştirici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olmak üzere üç ER sensörü tarafından başlatılır ve düzenlenir (X. Chen, Shi, He, Xiong, & Xia, 2023). UPR'nin hedef genleri, protein katlanması, ERAD, oksidatif stres, otofaji, mitokondriyal işlev bozukluğu ve dokuya göre değişen metabolik yollarla bağlantılıdır (Sano & Reed, 2013).

XBP-1 mRNA, IRE1 endoribonükleaz tarafından belirli bölgelerden kesilir ve daha sonra yeniden birleştirilerek aktif formu olan XBP-1s'i oluşturur. Bu süreç, XBP-1'in yapısını değiştirerek onun ER şaperonlarını, ER translokon kanallarını, ER ile ilişkili bozunuma (ERAD) bileşenlerini ve lipid metabolizması enzimlerini düzenlemesini sağlar (Volkman et al., 2011).

PERK, ATF4 aracılığıyla otofaji genlerinin ekspresyonunu artırarak otofajiyi destekler. Bulgular, ATG5 ve ATG7'nin koruyucu etkisinin ER-faji yoluyla PERK sinyaline bağlı olduğunu ve PERK'in ER homeostazı ve hücre sağlığında kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Zheng et al., 2019).

Yapılan bir çalışmada, kanser hücrelerinin in vivo ortamda sıklıkla maruz kaldığı bir stres faktörü olan serum yoksunluğına yanıt olarak PERK ekspresyonunun IRE1 aracılığıyla düzenlendiği gözlemlenmiş ve bu bulgu, IRE1-PERK etkileşiminin fizyolojik ER stres koşulları altında işlevsel olduğunu ortaya koymuştur (Ong et al., 2024). ATF6 sinyalizasyonunun, hücre kaderini doğrudan belirlemekten ziyade, hücrelerin uzun süreli kronik stres koşullarına uyum sağlamasına yardımcı olan bir mekanizma olarak işlev gördüğü ne sürülmüştür (Walter, O'Brien, Concannon, Dussmann, & Prehn, 2018). Bu süreç, endoplazmik retikulumda meydana gelen yanlış katlanmış proteinlerin dengelenmesine katkıda bulunarak, hücrelerin stres koşulları altında hayatta kalmasını destekleyebilir. Ayrıca, ATF6'nın düzenlediği genler aracılığıyla ER homeostazının korunmasına yardımcı olduğu ve hücresel fonksiyonların sürdürülebilirliğine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan materyaller, cihazlar ve sarf malzemeleri aşağıdaki tablolarda listelenmiştir (Tablo 3.1 ve 3.2).

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan materyaller.

Materyaller	Katalog Numarası	Üretici Firma
RPMI 1640 Medyum	MCL-037	Serena
%25 Trypsin - EDTA	B103-052-1B	Biond
Penicillin Streptomycin	B103-031-1C	Biond
T75 Filter cap cell culture flask	788.003	Nest
TC-Treated multiple 6 well plate	703.001	Nest
Fetal Bovine Serum	AU-035	Serena
Tunikamisin	T7765	Sigma
MTT	M5655	Sigma
DMSO	276855	Sigma
PrP ^c siRNA (Mouse) 10 µm	sc-36319	Santa Cruz
siRNA Transfection Reagent	sc-29528	Santa Cruz
siRNA Dilüsyon Tamponu	sc-29527	Santa Cruz
Control siRNA (FITC conjugate-A) 10 µM	sc-36869	Santa Cruz
siRNA Transfeksiyon Medyumu	sc-36868	Santa Cruz
RNA Purification Kit	I01-01-05	A.B.T.
cDNA Synthesis Kit	Q03-01-05	A.B.T.
2X qPCR EVA-Green MasterMix	Q02-01-01	A.B.T.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	Üretici Firma
Pipetörler (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, ABD
Santrifüj	Eppendorf, ABD
Laminar Hava Akımlı Sınıf II Kabin	Laborİdam, Türkiye
CO2 İnkübatör	PHCbi, Japan
Hücre Kültür Flaskları (25, 75 cm ²)	Nest, Çin
Hücre Kültür Plakaları (6, 24, 96 kuyucuklu)	Nest, Çin
Steril Serolojik Pipet (1, 5, 10, 25 ml)	Nest, Çin
PCR Tüpleri	SSIbio, ABD
Mikroplaka Okuyucu	Bio-Rad, Japan
Real Time PCR	Bio-Rad, Japan
Spektrofotometre	Thermo Scientific
Inverted Mikroskop	Medkal, Çin
Konfokal Mikroskop	NIH, ABD

3.2 Hücre Hatlarının Temini ve İdamesi

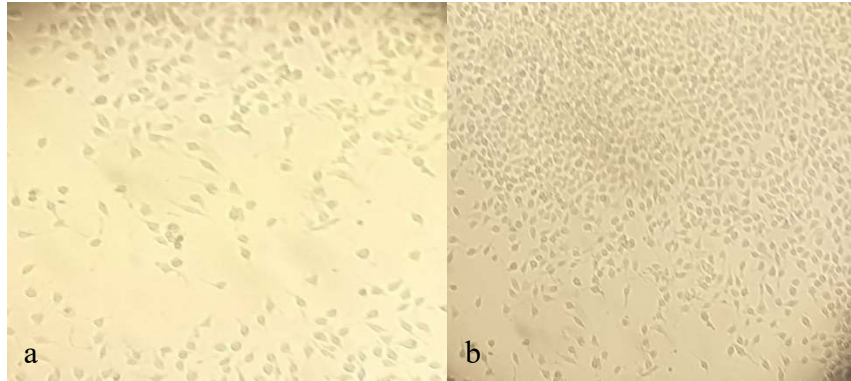
Tez çalışmasında, Immune Innovation Laboratory Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne, Avustralya'dan Prof. Michael H. Kershaw'dan temin edilen 4T1 üçlü negatif fare meme kanseri ve 4T1 HER2(+) hücre hatları kullanılmıştır. 4T1 hücre hattı, triple negatif meme kanseri (TNBC) modellemesi için yaygın olarak kullanılan, yüksek invaziv ve metastatik kapasiteye sahip bir meme adenokarsinom hücre hattıdır. 4T1-HER2+ hücre hattı ise, insan HER2+ meme kanseri alt tipini modellemek amacıyla HER2 geni ile modifiye edilmiş bir varyanttır. Hücrelerin kökeni, BALB/c fare meme tümörlerinden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler, temin edildikten sonra kurum laboratuvarında kültüre alınarak 4-6. pasajlar arasında deneysel işlemlerde kullanılmıştır. 4T1 ve 4T1-HER2+ hücre hatlarının temel fenotipik ve biyolojik özellikleri Tablo 3.3'de detaylı olarak sunulmuştur.

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan fare meme kanser hücre hatlarının özellikleri.

Hücre Hattı	Tümör Tipi	ÖR	PR	HER2
4T1	Triple negatif	-	-	-
4T1-HER2 (+)	HER2 enriched	-	-	+

ÖR: östrojen reseptörü, PR: progesteron reseptörü, HER2: insan epidermal büyüme faktörü 2 (human epidermal growth factor receptor 2)

4T1 ve 4T1-HER2+ hücre hatları, RPMI-1640 besiyerinde %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), 100 µg/mL streptomisin ve 100 U/mL penisilin ilavesiyle kültüre edilmiştir. Hücreler, %5 CO₂ ve nem içeren, 37°C sıcaklıktaki inkübatörde (Laborİldam, Türkiye) çoğaltılmıştır. Kültür süresince hücrelerin canlılık durumu, proliferasyon kapasitesi ve olası kontaminasyonlar ters (inverted) mikroskop (Medkal, Çin) ile düzenli olarak kontrol edilmiştir. Hücre yoğunluğu %80'in üzerine ulaştığında, uygun koşullarda pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Uzun süreli saklama amacıyla, hücreler %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren FBS ile freezing-mix çözeltisi hazırlanarak dondurulmuş ve kriyoviyaller içinde sıvı azot tankında -196°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. 4T1 ve 4T1-HER2+ hücre hatlarının 4X'lik büyütmedeki mikroskop görüntüsü (a: 4T1-HER2, b: 4T1)

3.3 Hücrelerde ER Stresi Oluşturma

Hücrelerde endoplazmik retikulum (ER) stresi oluşturmak amacıyla, ER stressörü olarak bilinen Tunikamisin (7765, SIGMA) kullanılmıştır. Tunikamisin, N-bağlı glikozilasyonun inhibisyonu yoluyla ER stresini indükleyen bir antibiyotiktir (Dawood & Altobje, 2020) ve deneysel olarak birçok çalışmada ER stres mekanizmalarının araştırılmasında kullanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında, ticari olarak temin edilen Tunikamisin, %100 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonunda çözülerek ana stok solüsyonu hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır. Çalışmalarda, hücrelere uygulanacak Tunikamisin konsantrasyonu ve süresinin belirlenmesi için literatürdeki önceki çalışmalar temel alınarak, doz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir (M. Liu, Honjo, Yamagishi, & Aihara, 2025; You, Li, & Guan, 2018).

Tunikamisin uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, hücreler belirlenen dozlarla (0,075 / 0,10 / 0,15 / 0,20 / 0,25 / 0,30 / 0,35 / 0,40 / 0,50 ve 0,60 µM/mL) muamele edilmiş ve sitotoksik etkinlik, 24, 48 ve 72 saatlik MTT (metil tiyazolil tetrazolyum) testi ile ölçülmüştür. Hücrelerin metabolik aktivitesi üzerindeki değişimler takip edilerek etkin konsantrasyon belirlenmiş ve en az üç tekrarlı MTT testleri sonucunda kullanılacak optimal dozlar ve saat seçilmiştir. ER stresinin hücresel düzeyde doğrulanması için stres yanıtı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR analiz sistemleri ile değerlendirilmiş ve elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

3.4 MTT ile Hücre Canlılığı Takibi

ER stresi oluşturmak için kullanılan Tunikamisin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek ve hücrelerin %50'sini öldüren dozunu (IC₅₀) tespit etmek amacıyla, mitokondriyal dehidrogenazların tetrazolium tuzlarını renkli formazan bileşiklerine indirgemesi prensibine dayanan MTT testi uygulanmıştır (Ghasemi, Turnbull, Sebastian, & Kempson, 2021).

MTT ölçümleri için öncelikle geniş bir doz aralığı belirlenmiş ve Tunikamisin'in 4T1 ve 4T1-HER2⁺ fare meme kanseri hücre hatlarında oluşturduğu ER stresinin optimal doz aralığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, 0,050/ 0,075 / 0,10 / 0,15 / 0,20 / 0,25 / 0,30 / 0,35 / 0,40 ve 0,50 µM/mL konsantrasyonlarında doz hesaplamaları yapılmıştır. Deneyde pozitif kontrol grubu (ilaç uygulanmamış hücreler) dahil olmak üzere toplam 11 grup oluşturulmuştur.

Deneyin ilk gününde, her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde 1×10^4 hücre/mL yoğunluğunda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol grubu için belirlenen ilk üç kuyucuğa 100'er µL besiyeri eklenerek toplam hacim 200 µL'ye tamamlanmış ve hücreler 37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde bir gece bekletilmiştir. İkinci gün, her doz grubunda üçer tekrarlı olacak şekilde belirlenen konsantrasyonlarda Tunikamisin uygulaması yapılmış ve hücreler inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Belirtilen inkübasyon süresinin sonunda, her kuyucuğa 20 µL MTT (M5655, Sigma) çözeltisi eklenmiş ve hücreler inkübatörde 4 saat boyunca bekletilmiştir. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki süpernatant uzaklaştırılmış ve oluşan Formazan kristallerini çözündürmek amacıyla her kuyucuğa 200 µL DMSO eklenmiştir. Arka plan (background) absorbans değerlerini belirlemek için ise, ilave olarak sadece 200 µL DMSO içeren 3 boş kuyucuk hazırlanmıştır. Ardından, renk oluşumunun homojen hale gelmesi için plakalar çalkalayıcıda 5 dakika çalkalanmış ve mikropilaka okuyucuda (Bio-Rad, Japan) 570 nm absorbans değerinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Tunikamisin'in hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi, üç kez tekrarlanan ölçümlerle değerlendirilmiş ve elde edilen veriler GraphPad Prism yazılımı ile analiz edilerek IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

3.5 RNA interference Yöntemi ile PrP^c Kodlayan Genin Susturulması

Prion proteinin anlatımı baskılamak için uygulanan siRNA transfeksiyon yöntemi, Santa Cruz Biotechnology tarafından sağlanan PrP^c siRNA (sc-36318) (Sense: GCCCAGCAAACCAAAAACCCUtt, Antisense: AGGGUUUUUGGUUUGCUGGGCtt) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sırasında üretici firmanın önerdiği standart protokol adımları izlenmiş ve aşağıda ayrıntılı olarak belirtilen çözeltiler kullanılmıştır.

Deneyin ilk aşamasında, 8 kuyulu kültür plakasının her bir kuyusuna, 1000 µL antibiyotiksiz tam büyüme ortamı (RPMI-1640 + %10 FBS) içerisinde 2×10^5 hücre ekilmiştir.

Hücrelerin yüzeye tutunmasını ve sağlıklı bir şekilde büyümelerini sağlamak amacıyla hücreler, %95 nem, %5 CO₂ içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde, % 80 yoğunluğa ulaşıncaya kadar inkübasyon yapılmış ardından transfeksiyon aşamasına geçilmiştir.

Transfeksiyon solüsyonlarının hazırlanması işlemi için 8 kuyulu bir grup baz alınarak, aşağıdaki iki ayrı solüsyon hazırlanmıştır:

- Solüsyon A:
 - PrP^c siRNA (sc-36318) stok çözeltisinden 6 µL alınmış,
 - siRNA Transfeksiyon Ortamı (sc-36868) ile 100 µL'ye tamamlanarak karıştırılmıştır.

Bu ortam, siRNA'nın hücre içine kolayca girebilmesi için özel olarak hazırlanmıştır. Serum içermediği için siRNA'nın bozulmasını önler ve etkisini kaybetmeden hücreye ulaşmasını sağlar. Aynı zamanda, hücrelerin canlı kalmasına uygun koşulları sağlayarak transfeksiyon sürecinin daha başarılı olmasına yardımcı olur.

- Solüsyon B:
 - siRNA Transfeksiyon Reaktifi (sc-29528)'den 6 µL alınmış,
 - siRNA Transfeksiyon Ortamı (sc-36868) ile 100 µL'ye tamamlanmıştır.

Bu reaktif, siRNA ile birleşerek hücre zarından geçmesini kolaylaştıran özel yapılar oluşturur. Bu yapılar hücre tarafından içeri alınır ve siRNA'nın hücre içinde hedef mRNA'yı susturmasını sağlar.

- Solüsyon A ve B, eşit hacimde birleştirilerek 1:1 oranında karıştırılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürede, siRNA ile reaktifin karışarak hücreye girebilecek kararlı yapılar oluşturması sağlanmıştır.

Transfeksiyon aşaması için; karışımı hazırlandıktan sonra, her bir kuyucuğa aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

1. 200 µL siRNA: Transfeksiyon reaktifi karışımı (A+B) eklenmiştir.
2. Ardından her kuyucuğa ilave olarak 800 µL siRNA Transfeksiyon Ortamı (sc-36868) eklenerek hacim 1 mL'ye tamamlanmıştır.
3. Hücreler bu ortamda 37°C, %5 CO₂ inkübatörde 6 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında; her bir kuyucuğa 250 µL taze besiyeri (RPMI-1640 + %10 FBS + %1 antibiyotik) eklenmiştir. Böylece toplam hacim artırılmış ve olası toksik etkilerin azaltılması sağlanmıştır.

Hücreler, bu ortamda 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 18–24 saat daha inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından transfeksiyon karışımı ortamdaki uzaklaştırılmış, her kuyucuğa 1 mL taze besiyeri (RPMI-1640 + %10 FBS + %1 antibiyotik) eklenmiş ve hücreler deneysel uygulamaya uygun olacak şekilde 24–72 saat boyunca kültüre edilmiştir.

Hücreler tripsinizasyon yapılmadan doğrudan toplanmış ve Real-Time PCR analizleri için hazırlanmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Böylece RNA izolasyonu için uygun şekilde muhafaza edilmiştir.

3.6 siRNA Transfeksiyonunun Konfokal Mikroskop ile Doğrulanması

Transfeksiyon uygulamasının başarı düzeyini değerlendirmek ve hücre içi alımı doğrulamak amacıyla, kontrol grubu olarak fluorescein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş kontrol siRNA (sc-36869, Santa Cruz, ABD) kullanılmıştır. Bu gruptaki hücrelere PrP^c siRNA yerine FITC-konjugatlı, bilinen hiçbir mRNA'yı hedeflemeyen ve spesifik yıkıma neden olmayan scramble dizili kontrol siRNA eklenmiştir. Üretici firmanın önerdiği protokol adım adım takip edilerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Transfeksiyondan 6 saat sonra, hücreler floresan sinyalin hücre içine alınıp alınmadığını ve sitoplazmik lokalizasyonunu değerlendirmek amacıyla konfokal mikroskopi analizine alınmıştır. Görüntüleme işlemleri, yüksek çözünürlüklü Leica SP8 lazer taramalı konfokal mikroskop (Leica Microsystems, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, FITC-siRNA'nın sitoplazma içerisinde yaygın bir şekilde lokalize olduğu gözlemlenmiş ve bu durum, siRNA'nın hücre zarını başarıyla geçerek hücre içerisine alındığını göstermiştir. İmmünofloresan görüntülere ait sayısal

ve yoğunluk analizleri Image J yazılımı (v1.54c, NIH, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.7 İmmunofloresan Yoğunluk Analizi

siRNA protokolü uygulaması sırasında, hücre içi alımı doğrulamak amacıyla FITC ile konjuge edilmiş kontrol siRNA (sc-36869, Santa Cruz) kullanılmıştır. Kontrol siRNA, hiçbir bilinen mRNA'yı hedeflemeyen ve spesifik yıkıma neden olmayan baz dizisine sahiptir (Sense: CUUACGCUGAGUACUUCGAtt, Antisense: UCGAAGUACUCAGCGUAAGtt)

Transfeksiyonu takiben elde edilen immünofloresan görüntüler, Image J yazılımı (v1.54c; National Institutes of Health, ABD) kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. Görüntüler yazılıma aktarıldıktan sonra, her deney grubundan rastgele seçilen 10 hücre bölgesinde floresan yoğunluğu değerlendirilmiştir.

Analiz sürecinde, Image J yazılım arayüzünde Analyze > Set Measurements sekmesi açılmış ve “Area”, “Standard Deviation”, “Min & Max Gray Value”, “Integrated Density” ve “Mean Gray Value” seçenekleri işaretlenmiştir. FITC sinyali içeren hücre alanları, “Polygon” aracı ile manuel olarak seçilmiş ve Analyze > Measure komutu kullanılarak sayısal verilere dönüştürülmüştür.

Integrated Density, seçilen hücre alanındaki tüm piksel değerlerinin toplamını ifade eder ve teknik olarak, bu değer seçilen alan ile “Mean” (Ortalama Gri Değer) çarpımıyla elde edilir.

Arka plan etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, floresans içermeyen hücre dışı bölgelerden, analiz yapılan hücrelerle aynı piksel boyutlarında alanlar belirlenmiş ve bu bölgelerin ortalama yoğunluk değerleri arka plan düzeltmesinde kullanılmıştır. Her bir hücre için DTHF (Düzeltilmiş Total Hücre Floresan Yoğunluğu) değeri şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$DTHF = Integrated\ Density - (Hücre\ Alanı \times Ortalama\ Arka\ Plan\ Yoğunluğu)$$

3.8 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir reaksiyonu (RT Q-PCR)

RNA İzolasyonu: Toplam RNA izolasyonu, ticari olarak temin edilen RNA izolasyon kitleri (20105, A.B.T.) kullanılarak, üretici firmanın belirlediği protokoller doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu için 1×10^5 hücre santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre peleti, fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanarak hücre kalıntıları ve potansiyel kontaminantlardan arındırılmıştır. Temizlenen hücreler, uygun lizis tamponlarıyla parçalanarak homojenize edilmiş ve ardından organik çözücü eklenerek faz ayrımı sağlanmıştır. Elde edilen sulu faz, RNA'nın saflaştırılması amacıyla spin kolona yüklenmiş ve üretici firmanın protokolüne uygun olarak yıkama adımları gerçekleştirilmiştir. Son olarak, saflaştırılmış RNA, nükleaz içermeyen su ile dilüe edilmiştir. İzolasyon işlemi tamamlandıktan sonra, RNA'nın miktarını ve kalitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrik analizler gerçekleştirilmiştir. NanoDrop (Nanodrop™ 2000C, Thermo Scientific™, ABD) spektrofotometresi kullanılarak RNA'nın A260/A280 oranları ölçülmüş ve saflığı değerlendirilmiştir. A260/A280 oranının 2,0-2,1 arasında olması, protein ve fenol gibi kontaminantların bulunmadığını göstermiştir. RNA örnekleri buz üzerinde tutulmuş ve cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir.

cDNA Sentezi: Toplam RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, ticari bir cDNA sentez kiti (C03-01-05, A.B.T.) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında, her RNA örneğine oligo(dT) primer ve kit içeriğinde yer alan random hekzamer primerler eklenmiştir. Oligo(dT) primerler mRNA'nın poli(A) kuyruğuna bağlanarak özgül cDNA sentezi sağlarken, random hekzamer primerler RNA popülasyonunun tamamını hedef alarak daha kapsamlı bir sentez sağlamıştır. Devamında reaksiyon tamponu, RNaz inhibitörü, dNTP karışımı ve reverse transkriptaz enzimi eklenmiş, tüm bileşenler kısa süreli santrifüjle homojen hâle getirilmiştir. Reverse transkriptaz reaksiyonu başlamadan önce tüpler buz üzerinde tutulmuş ve sonrasında üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre koşullarına göre termal döngü cihazında inkübe edilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 cDNA sentezi döngüsel sıcaklık ve süreleri

RT Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Adım	25	10 dakika	1
2. Adım	37	120 dakika	1
3. Adım	85	5 dakika	1
4. Adım	4	Süresiz (∞)	1

Sentezin ardından elde edilen cDNA ürünleri, üretici protokolünde belirtildiği şekilde -20°C’de saklanmış ve ileri analizlerde şablon olarak kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri Tablo 3.5’te sunulmuştur. Primerler, hedef gen bölgelerine özgüllüğün sağlanabilmesi amacıyla National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanındaki referans diziler temel alınarak tasarlanmıştır. Tasarım sürecinde Primer3 programı kullanılmış ve primerlerin uzunluk, erime sıcaklığı (T_m), GC içeriği, ikincil yapı ve dimerleşme potansiyeli gibi parametreleri dikkate alınmıştır. Böylece deneysel doğruluğu yüksek, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmeyi sağlayacak primerler seçilmiştir.

Tablo 3.5 Primer dizileri tabloda verilmiştir.

Primer Adı	Primer Dizisi	
PrP^c	Left Primer	TTCACCTGTCCAAGTCAGCA
	Right Primer	TTGTAGACTCGCACCACCA
P62	Left Primer	GGAGTACCTGAACCCTCTCG
	Right Primer	CTCTGGTGATGGAGCCTCTC
LC3II	Left Primer	TGTTGTCAGCAGGTCCTCAT
	Right Primer	CGAACTCAGAAATCCGCCTG
Bax	Left Primer	GCAGGCGGTTCTCTATGTTG
	Right Primer	TTTGAGCAGGGGAAGGGTAG
Bcl-2	Left Primer	TTGTAATTCATCTGCCGCCG
	Right Primer	AATGAATCGGGAGTTGGGGT
GADPH	Left Primer	GAAGATATGGGCACAGGGGA
	Right Primer	CAAGAAGATGCGGCTGTCTC

Real-Time Kantitatif PCR (qRT-PCR) Analizi: Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizi, BIO-RAD (CFX Connect) real-time PCR cihazı kullanılarak EVA Green Master Mix (Q02-01-01, A.B.T.) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için EVA Green Master Mix, ileri (forward) ve geri (reverse) primerler, şablon cDNA ve nükleaz içermeyen su (RNAz-free water) içeren toplam 20 µL'lik reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan tüpler real-time PCR cihazına yerleştirilmiş ve üretici firmanın önerdiği termal döngü protokolü uygulanmıştır. PCR programı başlangıç denatürasyonu (95°C), döngüler boyunca denatürasyon (95°C), primer bağlanması (55-65°C) ve uzama (72°C) aşamalarından oluşmuştur. Her döngü sonunda, EVA Green boyası aracılığıyla floresan sinyali ölçülerek DNA amplifikasyonu takip edilmiştir. Amplifikasyon sonrası, melt curve (erime eğrisi) analizi yapılarak spesifik olmayan bağlanmalar ve primer dimerleri kontrol edilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri, Ct (eşik döngüsü) değerleri üzerinden hesaplanmış ve $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile normalizasyon yapılarak referans genlere göre karşılaştırılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.9 İstatistiksel Analiz

Gen ifadesi analizinde kullanılan Cq (veya Ct) değeri, DNA çoğalmasının belirli bir seviyeye ulaştığı döngü sayısını gösterir. Bu değer, floresan sinyalinin arka plan seviyesini aşır algılanabilir hale geldiği noktada ölçülür. Bu noktadan sonra DNA miktarı hızlı bir şekilde artmaya başlar. Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde ise $2^{-\Delta\Delta C_q}$ metodundan faydalanılmıştır. Her bir deney örneğine ait çift tekrarlı ΔC_q değerleri, $2^{-\Delta C_q}$ formülü (Rao, Huang, Zhou, & Lin, 2013) kullanılarak üstel dönüşüme tabi tutulmuş ve bu şekilde gen ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. Ardından, deney gruplarındaki her bir örnek için elde edilen $2^{-\Delta C_q}$ değerlerinin ortalaması alınarak, bu değerler kontrol grubunun ortalamasına bölünmüş ve $2^{-\Delta\Delta C_q}$ değeri elde edilmiştir. Bu yöntemle, gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla ne ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Kullanılan denklemler aşağıda verilmiştir:

$$\Delta C_q = C_q (\text{hedef gen}) - C_q (\text{referans gen})$$

$$2^{-\Delta\Delta C_q} = (2^{-\Delta C_q_{\text{ortalama_deney}}}) / (2^{-\Delta C_q_{\text{ortalama_kontrol}}})$$

Sonuçların istatistiksel analizi, $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değerleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi kullanılmış ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar, Post-Hoc Tukey testi ile belirlenmiştir. Tüm analizler, IBM SPSS® Statistics (Sürüm 30) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen p değeri 0,05 ve altı olarak belirlenmiştir.

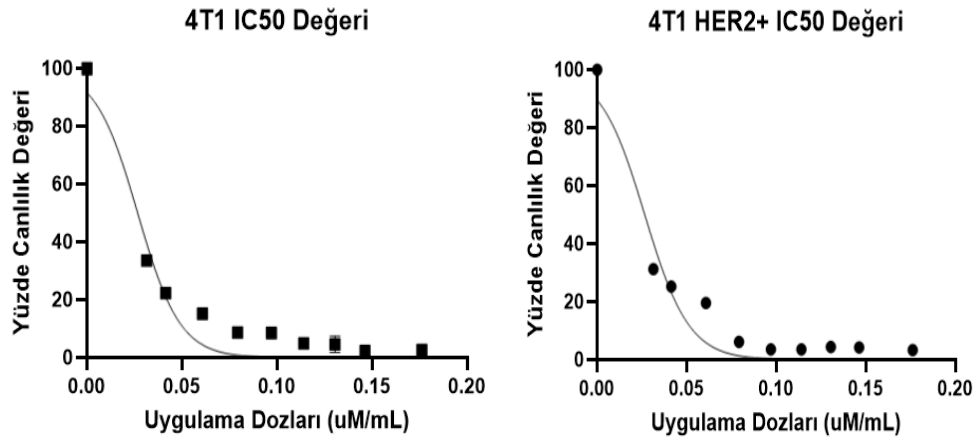


4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 MTT ile Hücre Canlılığı Takibi

4T1 ve 4T1 HER2+ hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT testinde, Tunikamisin uygulamasına karşı hücre canlılık düzeyleri değerlendirildi; elde edilen absorbans verileri GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda, doz-yanıt eğrisi doğrultusunda IC_{50} (yarı maksimal inhibitör konsantrasyon) değeri 0.063 $\mu\text{Mol/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1). Elde edilen değer, Tunikamisin' in hücre canlılığını %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyonu temsil etmektedir. Tunikamisin uygulanan doz grupları değerlendirildiğinde (0,050 / 0,075 / 0,10 / 0,15 / 0,20 / 0,25 / 0,30 / 0,35 / 0,40 ve 0.50 $\mu\text{M/mL}$), 0.05 $\mu\text{Mol/mL}$ dozunda hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmiş, bu dozun belirgin sitotoksik etki oluşturmaya başladığı belirlenmiştir. 0.10 $\mu\text{Mol/mL}$ dozundan itibaren ise hücre canlılık oranında yüksek bir düşüş tespit edilmiştir. Tüm uygulamalar, 3 tekrarlı ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1 4T1 ve 4T1 HER2+ hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT testi sonucunda IC_{50} değeri 0,063 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi (GraphPad Prism, Ver. 9.0)

Stres etkilerinin daha ayrıntılı incelenebilmesi amacıyla, IC_{50} değerinin ± 0.010 $\mu\text{Mol/mL}$ aralığında yer alan 0.073 $\mu\text{Mol/mL}$ konsantrasyonu da çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Bu doğrultuda, 0.063 $\mu\text{Mol/mL}$ (IC_{50} değeri) ve 0.073 $\mu\text{Mol/mL}$ ($IC_{50} + 0.010$) dozlarında uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Belirlenen bu iki doz seviyesi

kullanılarak, siRNA transfeksiyonu ve Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR) analizlerine yönelik deney grupları oluşturulmuştur. İlgili uygulama planı ve oluşturulan grupların kısaltmaları Tablo 4.1'de belirtilmektedir.

Tablo 4.1 Tasarlanan deney grupları ve çalışmada kullanılan kısaltmaları.

HÜCRE HATLARI	UYGULAMALAR	KISALTMALAR
4T1	Kontrol	T-K/H-K
	Tunikamisin 0.063µM/mL	T-63/ H-63
	Tunikamisin 0.073µM/mL	T-73/ H-73
4T1/HER2+	PrP ^c siRNA	T-S/ H-S
	PrP ^c siRNA+ Tunikamisin 0.063µM/mL	T-S63/ H-S63
	PrP ^c siRNA+ Tunikamisin 0.073µM/mL	T-S73/ H-S73

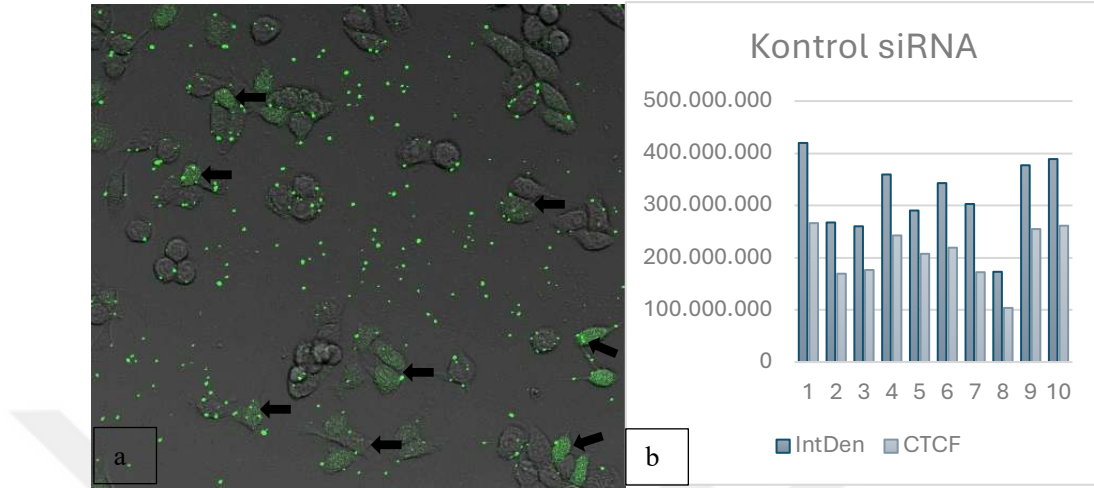
4.1.2 RNA interference Yöntemi ile PrP^c Kodlayan Genin Susturulması

Kontrol siRNA (FITC konjugatlı) ile işaretlenmiş hücrelerden elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri, Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir örnekten rastgele seçilen 10 hücre grubuna ait CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence – Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresan Yoğunluğu) değerleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.2.b). Görüntü analizine göre, hücrelerin büyük çoğunluğunda yeşil floresan sinyali tespit edilmiştir.

Elde edilen Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresan Yoğunluğu (CTCF) değerleri doğrultusunda, yaklaşık sekiz farklı hücre grubunda floresan sinyal düzeyinin pozitif kabul edilebilecek bir eşik değeri olan 160 milyon birimin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum, ilgili hücre gruplarında FITC ile işaretlenmiş siRNA'nın etkili bir şekilde hücre içerisine alındığını göstermektedir. Buna ek olarak, floresan mikroskopi ile elde edilen görüntülerden rastgele seçilen bir alanda 100 hücre sayılmış ve bu hücrelerin yaklaşık %80'inde FITC'ye özgü yeşil floresan sinyalinin gözlemlendiği tespit edilmiştir. Görsel gözlemlerle desteklenen bu oran, transfeksiyon verimliliğinin %70-80 aralığında olduğunu göstermekte ve kullanılan protokolün başarılı bir şekilde uygulandığını belirten niteliktedir.

Bu sonuçlar, FITC-siRNA'nın hücre membranını geçerek sitoplazmaya etkili bir şekilde iletilebildiğini ve bu protokolün, ileri aşamada gerçekleştirilecek gen susturma (gene silencing) deneyleri için yeterli düzeyde transfeksiyon verimliliği sağladığını desteklemektedir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan negatif kontrol

siRNA grubuna ait hem görsel hem de kantitatif veriler Şekil 4.2'de sunulmaktadır. Kontrollere ait düşük floresan sinyalleri, gözlemlenen etkinliğin özgün transfeksiyon işlemi kaynaklı olduğunu destekler niteliktedir.



Şekil 4.2 a) siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde konfokal mikroskop görüntüsü (Oklar)(20X) **b)** Görüntülerden rastgele seçilen 10 farklı hücredeki PrP^c immunofloresan yoğunluklarının Image J yazılımı ile elde edilmiş sayısal verileri (IntDen: integrated density; CTCF: Corrected Total Cell Fluorescence. (Düzeltilmiş Total Hücre Floresan Yoğunluğu)

4.1.3 Real-Time Kantitatif PCR (qRT-PCR) Analizi

Prion proteininin hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla *P62*, *LC3II*, *Bax*, *Bcl-2* ve *PrP^c* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Seçilen genlerden PrP^c'nin hücre hayatta kalımı ve stres yanıtlarında rol oynadığı bilinmektedir (Hirsch et al., 2017). *P62* ve *LC3II* genleri otofaji sürecinin başlıca belirteçleri olarak tanımlanırken (Pankiv et al., 2007), *Bax* ve *Bcl-2* ise hücresel apoptozis mekanizmasında sırasıyla pro-apoptotik ve anti-apoptotik düzenleyiciler olarak görev almaktadır.

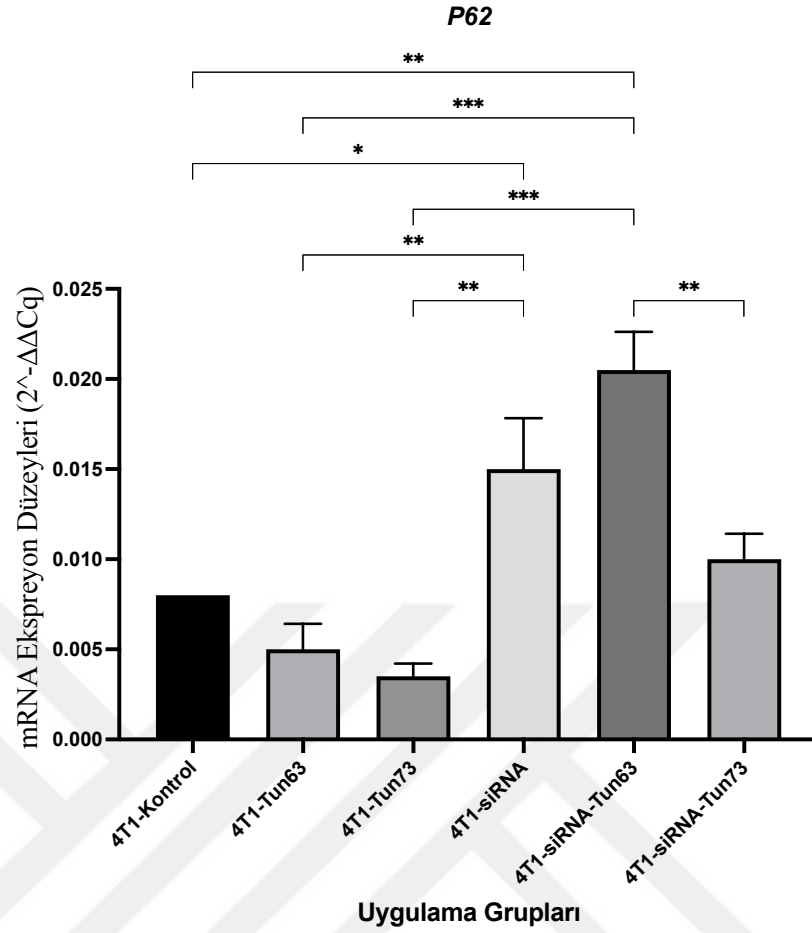
Çalışmada, gen ekspresyonuna ilişkin veriler $2^{-\Delta Cq}$ yöntemi ile değerlendirilmiş ve gruplar arası farklar bağımsız örneklem One-Way ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS® Statistics (Versiyon 30) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş; anlamlılık düzeyi $p \leq 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4.1.3.1 4T1 Hücre Hattında Genlerin İfadelenme Düzeyleri

4T1 hücre hattında gerçekleştirilen Real-Time PCR analizi ile *P62* genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Uygulama grupları; kontrol grubu (T-K), IC_{50} düzeyinde Tunikamisin uygulanan grup (T-63), yüksek doz Tunikamisin uygulanan grup (T-73), PrP^c siRNA ile hücrel prion proteininin susturulduğu grup (T-S), PrP^c baskılanması ile birlikte IC_{50} Tunikamisin uygulanan grup (T-S63) ve yüksek doz Tunikamisin ile birlikte PrP^c baskılanması yapılan grup (T-S73) olarak oluşturuldu.

İstatistiksel analizler sonucunda, gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi. Özellikle; T-K grubu ile T-S ($p=0.041$), T-S63 ($p=0.002$) grupları arasında anlamlı farklar gözlenmiştir. Bu bulgular, PrP^c ekspresyonunun baskılanmasının *P62* düzeylerinde anlamlı bir artışa yol açtığını göstermektedir. T-K ile T-63 ve T-73 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p=0.534$ ve $p=0.211$), *P62* düzeyinde bir azalma eğilimi gözlemlendi. T-73 grubu, T-S ($p=0.002$) ve T-S63 ($p=0.004$) gruplarına göre anlamlı düzeyde daha düşük ekspresyon göstermiştir; bu da Tunikamisin'in yüksek dozda uygulanmasının PrP^c baskılamasıyla birlikte sinerjik bir şekilde *P62* ekspresyonunu artırabileceğini düşündürmektedir. T-S63 grubunun hem kontrol grubuna hem de diğer gruplara göre belirgin şekilde daha yüksek *P62* ekspresyonuna sahip olması ve istatistiksel olarak anlamlı farklar göstermesi, bu kombinasyonun otofaji yanıtı güçlü şekilde uyurabileceğini göstermektedir. T-S73 grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0.828$), bu durum yüksek doz Tunikamisin 'in PrP^c baskılaması ile birlikte uygulanmasının beklenen sinerjiyi göstermemiş olabileceğini ya da biyolojik varyasyonun etkili olduğunu düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, hem Tunikamisin uygulamasının doz bağımlı etkisini hem de PrP^c baskılanmasının *P62* üzerinden otofaji mekanizmaları düzenleyici rolünün olduğunu belirtir niteliktedir. Özellikle T-S63 grubundaki belirgin *P62* artışı, bu grubun potansiyel terapötik etki mekanizmalarının daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. *P62* genine ilişkin tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler) Tablo 4.2'de; gruplar arası anlamlılık düzeyleri ise Tablo 4.3'te ve şekil 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.3 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *P62* geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

Tablo 4.2 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *P62* ifadenin istatistiksel verileri.

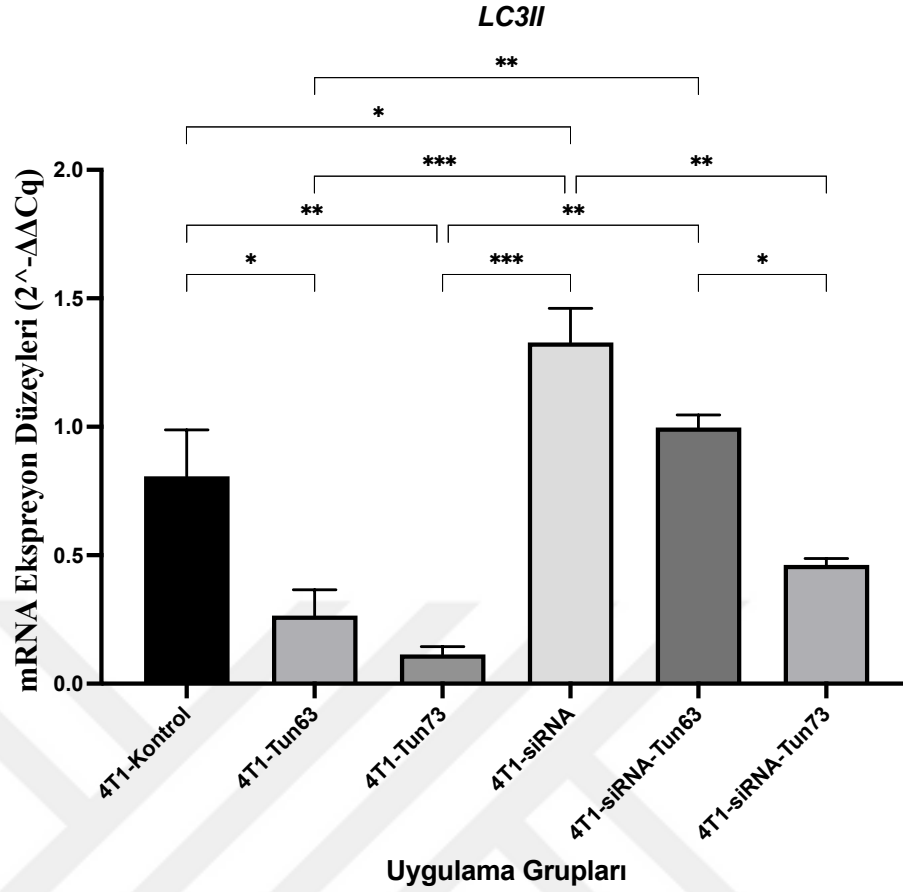
	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
T-K	2	0.008	0.000	0.008	0.008
T63	2	0.005	0.001	0.004	0.006
T73	2	0.003	0.007	0.003	0.004
T-S	2	0.015	0.003	0.013	0.017
T-S63	2	0.020	0.002	0.019	0.022
T-S73	2	0.010	0.001	0.009	0.011
TOPLAM	12	0.093	0.013	0.056	0.068

Tablo 4.3 4T1 Hücre hattında *P62* genine ait p değeri değişimleri.

	T-K	T63	T73	T-S	T-S63	T-S73
T-K	-	0.534	0.211	0.041	0.002	0.828
T63	0.534	-	0.935	0.007	0.0007	0.151
T73	0.211	0.935	-	0.002	0.004	0.056
T-S	0.041	0.007	0.002	-	0.108	0.151
T-S63	0.002	0.0007	0.004	0.108	-	0.006
T-S73	0.828	0.151	0.056	0.151	0.006	-

4T1 hücre hattında gerçekleştirilen Real Time PCR analizi sonucunda *LC3II* genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, Kontrol grubu (T-K) ile T-63 ($p = 0.014$), T-73 ($p = 0.004$) ve siRNA (T-S) grubu ($p = 0.017$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldü. Bu sonuçlar, Tunikamisin uygulamasının doz artışıyla *LC3II* ekspresyonunu baskıladığını ve PrP^c ekspresyonunun susturulmasının da bu gen üzerinde etkili olabileceğini belirtmektedir.

Tunikamisin uygulanan T-63 ve T-73 grupları, hem siRNA (T-S) grubuyla ($p = 0.0004$ ve $p = 0.0002$) hem de siRNA + Tunikamisin kombinasyon grubu olan T-S63 ($p = 0.003$ ve $p = 0.001$) ile anlamlı farklılık gösterdi. Bu bulgular, Tunikamisin ve PrP baskılanmasının *LC3II* ekspresyonu üzerinde ayrı ayrı etkili olduğunu, ancak birlikte uygulandığında bu etkinin daha belirgin hâle gelebileceğini göstermektedir. Ayrıca T-S ve T-S73 grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p = 0.001$). T-S63 grubunun, T-S73 grubuna göre daha yüksek *LC3II* ekspresyonuna sahip olması, PrP^c baskılanmasının yüksek doz Tunikamisin ile birlikte uygulandığında *LC3II* geninin ifadesini artırabildiğini düşündürmektedir. *LC3II* genine ait kantitatif ekspresyon verileri Şekil 4.4'te, istatistiksel veriler Tablo 4.4 ve grup karşılaştırmalarına ait p-değerleri ise Tablo 4.5'te sunulmaktadır.



Şekil 4.4 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *LC3II* geninin ekspresyon düzeyleri. (*:0.01 ≤ p < 0.05, **: 0.001 ≤ p < 0.01, ***: p < 0.001)

Tablo 4.4 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *LC3II* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

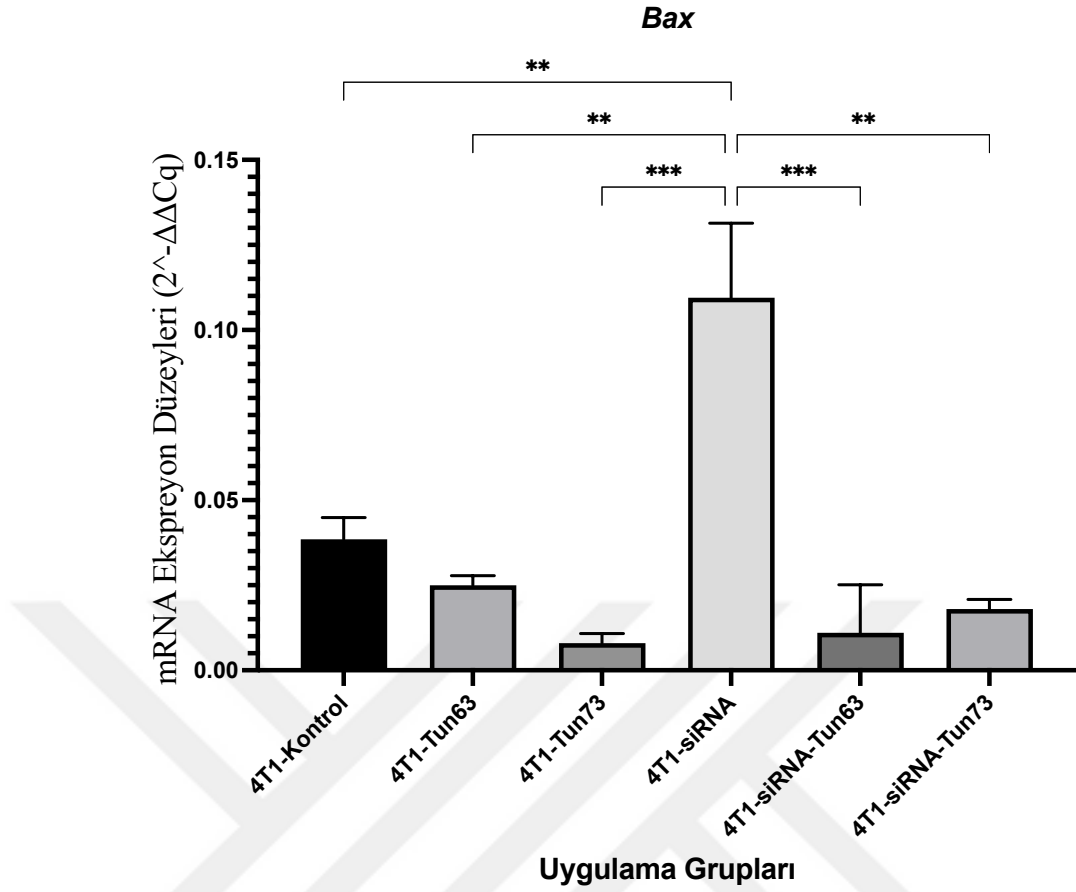
	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
T-K	2	0.807	0.180	0.680	0.935
T63	2	0.336	0.200	0.194	0.478
T73	2	0.135	0.060	0.092	0.179
T-S	2	1.422	0.265	1.235	1.610
T-S63	2	0.997	0.048	0.963	1.032
T-S73	2	0.462	0.024	0.445	0.480
TOPLAM	12	4.159	0.777	3.678	4.645

Tablo 4.5 4T1 Hücre hattında *LC3II* genine ait p değeri değişimleri.

	T-K	T63	T73	T-S	T-S63	T-S73
T-K	-	0.014	0.004	0.017	0.507	0.100
T63	0.014	-	0.694	0.0004	0.003	0.473
T73	0.004	0.694	-	0.0002	0.001	0.095
T-S	0.017	0.0004	0.0002	-	0.116	0.001
T-S63	0.507	0.003	0.001	0.116	-	0.015
T-S73	0.100	0.473	0.095	0.001	0.015	-

Bax gen ekspresyonuna ilişkin analizlerde, T-K grubunun T-S grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük ekspresyon düzeyi gösterdiği değerlendirildi ($p = 0.005$). Benzer şekilde, T-63 grubunun da T-S grubuna göre anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi ($p = 0.002$). Ayrıca, T-73 grubunun T-S grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük ekspresyon düzeyi gösterdiği değerlendirildi ($p = 0.0008$). Bu bulgular, PrP baskılanmasının *Bax* ekspresyonunu artırdığı yönünde değerlendirilmektedir.

Bununla birlikte, T-S grubunun T-S63 ($p = 0.0009$) ve T-S73 ($p = 0.0014$) gruplarıyla karşılaştırılmasında anlamlı farklar belirlenmiş olup; bu durum, PrP^c baskılanmasına ek olarak Tunikamisin uygulamasının *Bax* ekspresyonunu azaltıcı yönde etkileyebileceği şeklinde değerlendirildi. Elde edilen bu bulgular, yüksek *Bax* ekspresyonunun PrP^c baskılanmasına bağlı olduğunu, ancak Tunikamisin'in bu artışı baskılayıcı bir rol oynayabileceğini göstermektedir. *Bax* genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri ve istatistiksel karşılaştırmalara ait p değerleri sırasıyla Tablo 4.6, Şekil 4.5 ve Tablo 4.7'te sunuldu.



Şekil 4.5 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *Bax* geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

Tablo 4.6 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *Bax* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

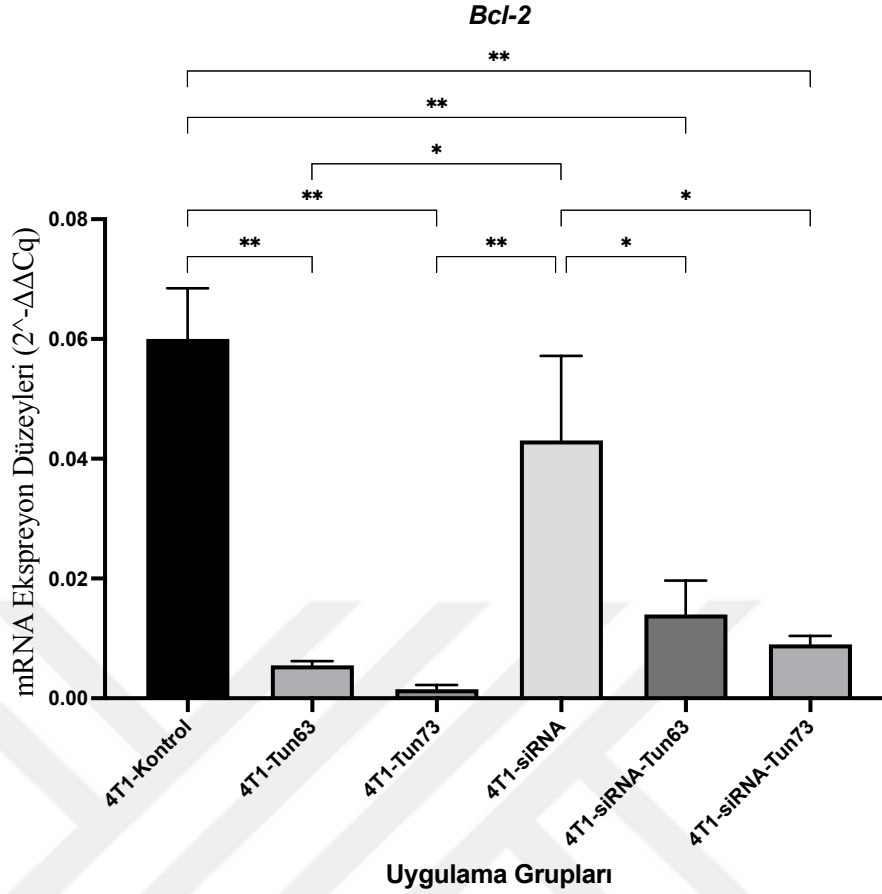
	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
T-K	2	0.038	0.006	0,034	0,043
T63	2	0.025	0.002	0,023	0,027
T73	2	0.008	0.003	0,006	0,010
T-S	2	0.125	0.043	0,094	0,156
T-S63	2	0.021	0.030	0,043	0,001
T-S73	2	0.018	0.002	0,016	0,020
TOPLAM	12	0.235	0.086	0.216	0.256

Tablo 4.7 4T1 Hücre hattında *Bax* genine ait p değeri değişimleri

	T-K	T63	T73	T-S	T-S63	T-S73
T-K	-	0.818	0.196	0.005	0.265	0.507
T63	0.818	-	0.662	0.002	0.797	0.984
T73	0.196	0.662	-	0.0008	0.999	0.933
T-S	0.005	0.002	0.0008	-	0.0009	0.0014
T-S63	0.265	0.797	0.999	0.009	-	0.984
T-S73	0.507	0.984	0.933	0.0014	0.984	-

Bcl-2 genine yönelik analizlerde, T-K grubunun T-63 ($p = 0.002$) ve T-S ($p = 0.293$) gruplarıyla karşılaştırılmasında, sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı ve anlamlılık sınırına yakın değerler elde edildi. T-63 grubunun, anti-apoptotik bir gen olan *Bcl-2* ekspresyonunu artırdığı bilinen PrP baskılanmasının olmadığı T-S grubuna göre anlamlı fark göstermesi ($p = 0.014$), düşük doz Tunikamisin'in bu genin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğunu düşündürdü. Aynı şekilde, T-S grubunun T-S63 ($p = 0.046$) ve T-S73 ($p = 0.022$) gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde farklılık göstermesi, PrP^c baskılanmasının Tunikamisin uygulamasıyla birlikte *Bcl-2* ekspresyonunu daha da azalttığını ortaya koydu.

Bununla birlikte, T-S63 ile T-S73 grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemesi ($p = 0.975$), düşük ve yüksek doz Tunikamisin'in PrP^c baskılanmış hücreler üzerindeki etkilerinin benzer düzeyde seyrettiğini işaret etti. Bu bulgular, PrP^c'nin anti-apoptotik mekanizmalar üzerindeki düzenleyici etkisinin Tunikamisin ile etkileşimli biçimde çalışabileceğini düşündürmektedir. *Bcl-2* genine ait mRNA ekspresyon seviyeleri ile uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalara ilişkin veriler Şekil 4.6, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da sunulmaktadır.



Şekil 4.6 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *Bcl-2* geninin ekspresyon düzeyleri. (*:0.01 ≤ p < 0.05, **: 0.001 ≤ p < 0.01, ***: p < 0.001)

Tablo 4.8 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *Bcl-2* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

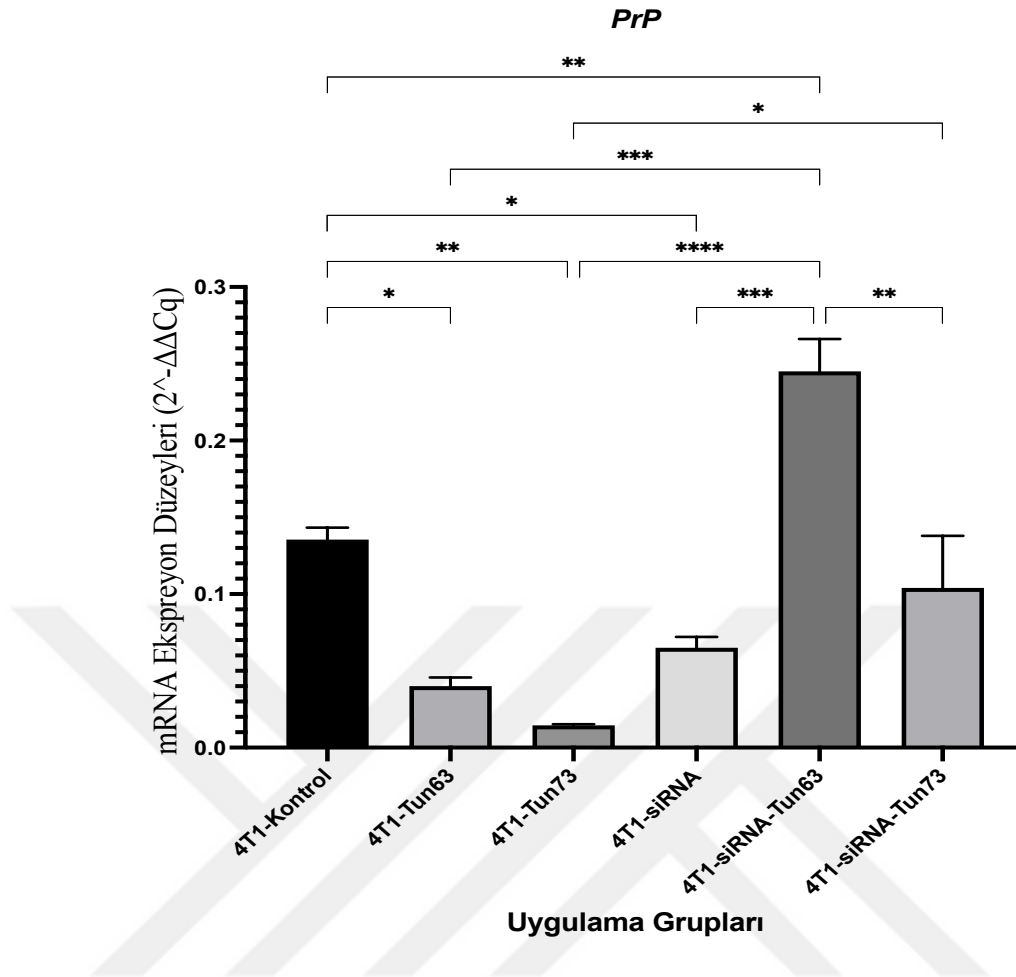
	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
T-K	2	0.060	0.008	0,054	0,066
T63	2	0.005	0.007	0,005	0,006
T73	2	0.001	0.007	0,001	0,002
T-S	2	0.053	0.028	0,033	0,073
T-S63	2	0.013	0.016	0,002	0,025
T-S73	2	0.007	0.006	0,003	0,012
TOPLAM	12	0.139	0.072	0,054	0,066

Tablo 4.9 4T1 Hücre hattında *Bcl-2* genine ait p değeri değişimleri

	T-K	T63	T73	T-S	T-S63	T-S73
T-K	-	0.002	0.001	0.293	0.005	0.003
T63	0.002	-	0.990	0.014	0.828	0.994
T73	0.001	0.990	-	0.008	0.551	0.885
T-S	0.293	0.014	0.008	-	0.046	0.022
T-S63	0.005	0.828	0.551	0.046	-	0.975
T-S73	0.003	0.994	0.885	0.022	0.975	-

PrP^c genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, T-K grubuna kıyasla *PrP^c* ekspresyonunun siRNA ile baskılandığı T-S (p = 0.004) ve T-S63 (p = 0.005) gruplarında anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. Bu durum, siRNA aracılığıyla gerçekleştirilen *PrP^c* baskılamasının başarılı şekilde uygulandığını ve ilgili genin ekspresyon seviyesinin etkili biçimde düşürüldüğünü göstermektedir. Ayrıca, yalnızca Tunikamisin uygulaması yapılan T-63 ve T-73 grupları ile siRNA uygulamasının da dahil olduğu T-S ve T-S63 grupları karşılaştırıldığında, T-63 grubunun T-S63 grubuna göre (p = 0.002), T73 grubunun ise hem T-S63 (p = 0.003) hem de T-S73 (p = 0.014) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği değerlendirildi. Bu sonuçlar, *PrP^c* baskılanmasının, Tunikamisin uygulamasının etkisinden bağımsız olarak *PrP^c* ekspresyonunu anlamlı düzeyde azalttığını ortaya koymaktadır.

Öte yandan, T-K grubu ile T-S73 grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemesi (p = 0.503), yüksek doz Tunikamisin'in siRNA'nın baskılayıcı etkisini sınırlayabileceği ihtimalini gündeme getirdi. *PrP^c* genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri ile uygulama grupları arasındaki karşılaştırmalara ilişkin veriler Şekil 4.7, Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de sunuldu.



Şekil 4.7 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *PrP^c* geninin ekspresyon düzeyleri. (*:0.01 ≤ p < 0.05, **: 0.001 ≤ p < 0.01, ***: p < 0.001)

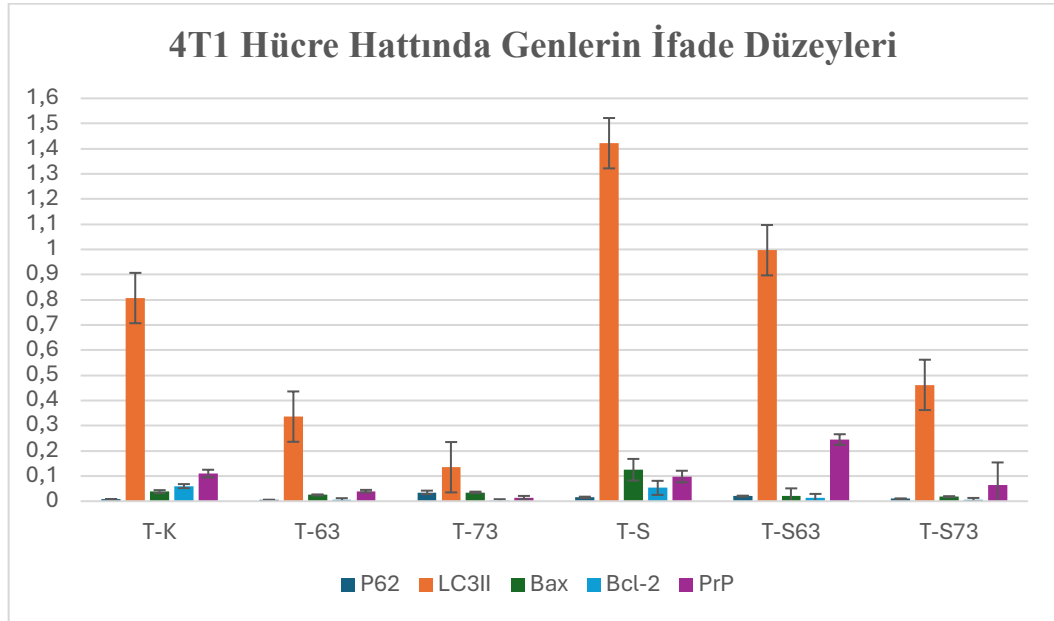
Tablo 4.10 4T1 Hücre hattına ait gruplarda *PrP^c* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
T-K	2	0.135	0.015	0,130	0,141
T63	2	0.040	0.005	0,036	0,044
T73	2	0.014	0.007	0,014	0,015
T-S	2	0.075	0.023	0,070	0,080
T-S63	2	0.245	0.021	0,230	0,260
T-S73	2	0.065	0.089	0,128	0,002
TOPLAM	12	0.558	0.160	0.627	0.525

Tablo 4.11 4T1 Hücre hattında *PrP^c* genine ait p değeri değişimleri

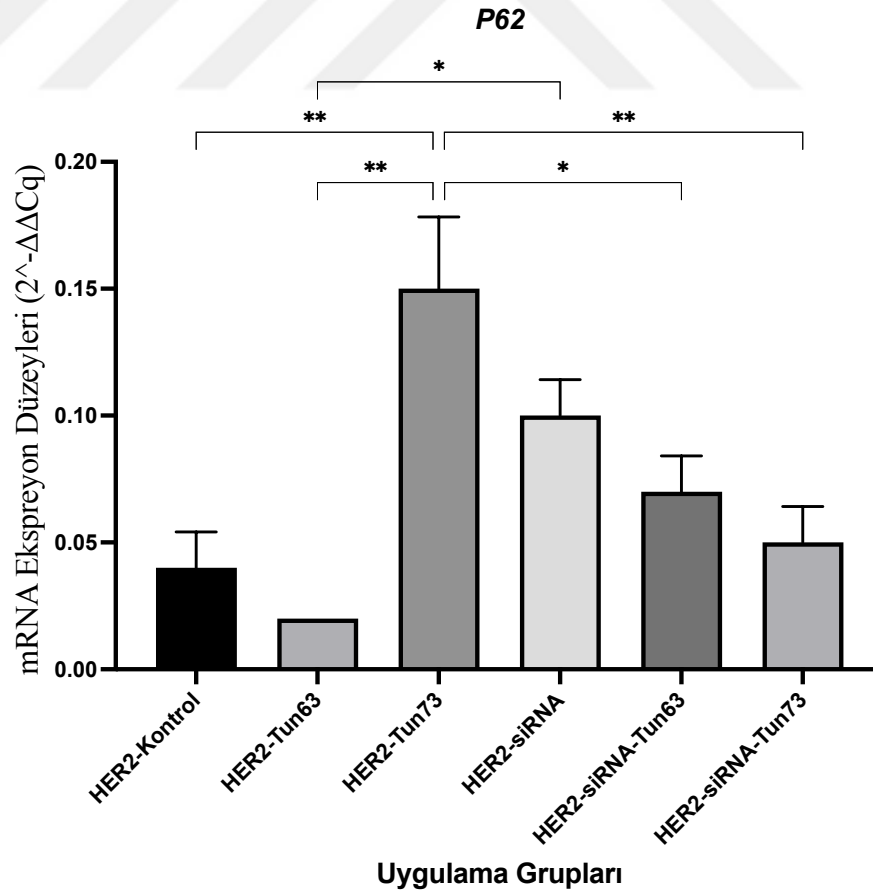
	T-K	T63	T73	T-S	T-S63	T-S73
T-K		0.010	0.031	0.004	0.005	0.503
T63	0.010	-	0.679	0.694	0.002	0.063
T73	0.031	0.679	-	0.153	0.003	0.014
T-S	0.004	0.694	0.153	-	0.003	0.322
T-S63	0.005	0.002	0.003	0.003	-	0.013
T-S73	0.503	0.063	0.014	0.322	0.013	-

4T1 hücre hattında yürütülen Real-Time PCR analizleri sonucunda, *PrP^c* geninin siRNA ile etkili bir şekilde baskılandığı değerlendirildi. Bu baskılamanın otofajiyle ilişkili *LC3II* ve *p62* gen ekspresyon düzeylerinde artışa ve apoptozis ile ilişkili anti-apoptotik *Bcl-2* geninde ise belirgin bir artışa neden olduğu gözlemlendi. Tersine, *Bax* geninde düşüşler tespit edildi. Ayrıca, Tunikamisin uygulamalarının doz bağımlı etkiler gösterdiği ve gen ekspresyon profillerini anlamlı düzeyde değiştirdiği belirlendi. Elde edilen veriler, 4T1 hücre hattında *PrP^c*'nin hücrel stres yanıtlarını düzenleyen mekanizmalarda etkili olabileceğini göstermektedir. İlgili genlere ait ifadenlenme düzeyleri şekil 4.8' de verilmiştir.

**Şekil 4.8** 4T1 hücre hattına dair gen ifade düzeyleri.

4.1.3.2 4T1-HER2+ Hücre Hattında Genlerin İfadeleme Düzeyleri

4T1-HER2⁺ hücre hattında gerçekleştirilen Real-Time PCR analizleriyle *P62* genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Kontrol grubunun (H-K), H-73 ($p = 0.004$) ve H-S ($p = 0.069$) gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı veya anlamlılık sınırına yakın farklılıklar gösterdiği belirlendi. H-63 grubunun H-73 ($p = 0.001$) ve H-S ($p = 0.019$) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği değerlendirildi. Ayrıca, H-73 grubunun H-S63 ($p = 0.019$) ve H-S-73 ($p = 0.006$) gruplarıyla karşılaştırmalarında da anlamlı fark gözlemlendi. Bu bulgular, yüksek doz Tunikamisin uygulamasının *P62* gen ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığını düşündürmektedir. Öte yandan, H-K ile H-63 ($p = 0.812$) veya H-S73 ($p = 0.985$), H-S ile H-S63 ($p = 0.508$) grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu durum, bazı kombinasyon uygulamalarının HER2⁺ hücrelerde farklı düzeylerde etki oluşturabileceğini göstermektedir. *P62* gen ekspresyon düzeylerine ait karşılaştırmalı analizler ile anlamlılık değerleri sırasıyla Şekil 4.9, Tablo 4.12 ve Tablo 4.13’de sunulmuştur.



Şekil 4.9 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *P62* geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

Tablo 4.12 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *P62* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

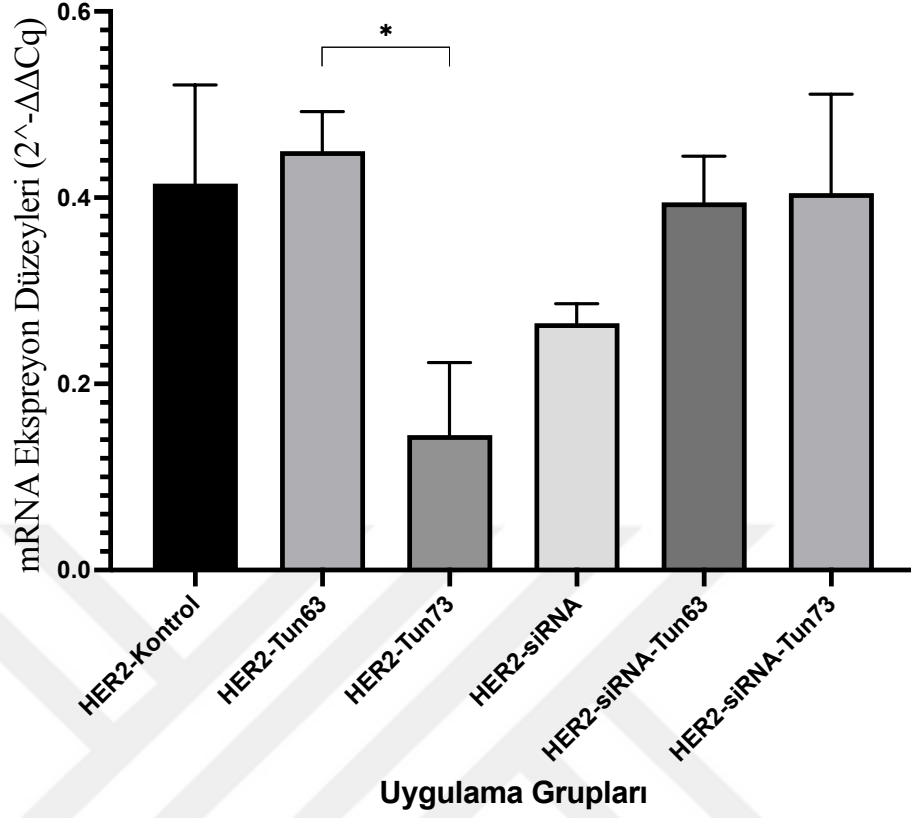
	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
H-K	2	0.040	0.014	0,030	0,050
H63	2	0.020	0.000	0,020	0,020
H73	2	0.150	0.028	0,130	0,170
H-S	2	0.100	0.014	0,090	0,110
H-S63	2	0.070	0.014	0,060	0,080
H-S73	2	0.050	0.014	0,040	0,060
TOPLAM	12	0.430	0.084	0.370	0.490

Tablo 4.13 4T1-HER2+ Hücre hattında *P62* genine ait p değeri değişimleri

	H-K	H63	H73	H-S	H-S63	H-S73
H-K	-	0.812	0.004	0.069	0.508	0.985
H63	0.812	-	0.001	0.019	0.136	0.508
H73	0.004	0.001	-	0.136	0.019	0.006
H-S	0.069	0.019	0.136	-	0.508	0.136
H-S63	0.508	0.136	0.019	0.508	-	0.812
H-S73	0.985	0.508	0.006	0.136	0.812	-

4T1-HER2⁺ hücre hattında gerçekleştirilen *LC3II* genine yönelik mRNA ekspresyon analizleri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre, yalnızca H-63 ve H-73 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p = 0.044$). Diğer grup karşılaştırmalarında anlamlı fark saptanmadı. Özellikle H-K grubunun tüm gruplarla yapılan karşılaştırmalarında anlamlılık düzeyine ulaşılmadı. Bu durum, HER2⁺ hücrelerde Tunikamisin uygulamalarının *LC3II* gen ekspresyonu üzerinde sınırlı etkiler oluşturabileceğini düşündürür niteliktedir. *LC3II* genine ilişkin istatistiksel karşılaştırma bulguları Şekil 4.10, Tablo 4.14 ve Tablo 4.15’de sunulmuştur.

LC3II



Şekil 4.10 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *LC3II* geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

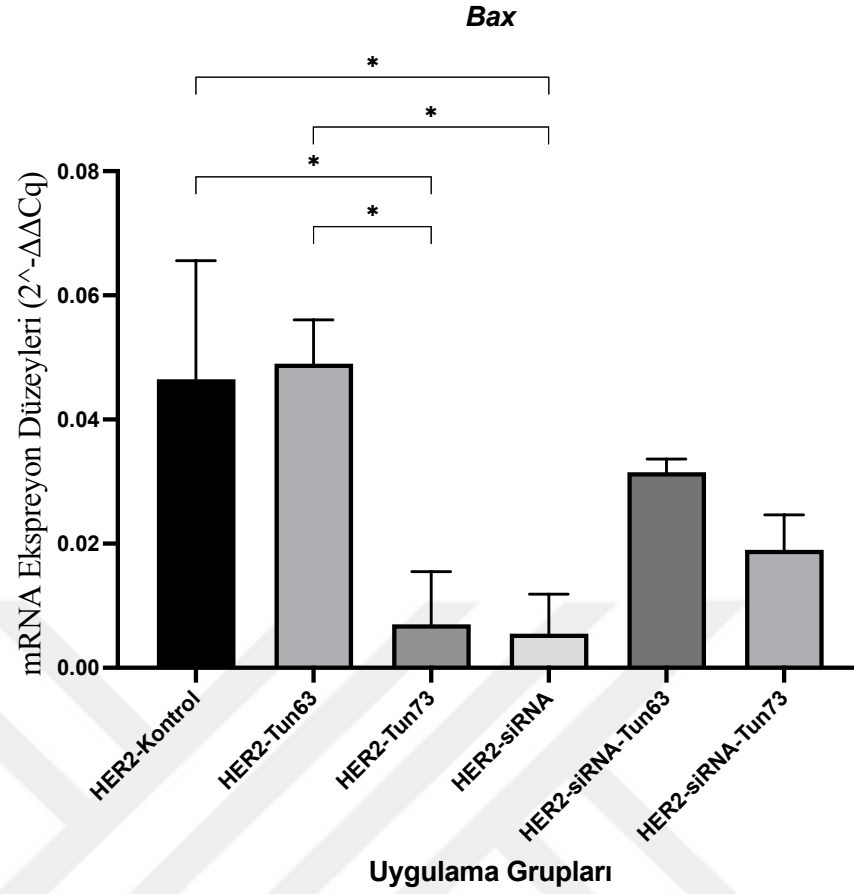
Tablo 4.14 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *LC3II* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
H-K	2	0.415	0.106	0,34	0,49
H63	2	0.450	0.042	0,42	0,48
H73	2	0.22	0.084	0,16	0,28
H-S	2	0.265	0.021	0,25	0,28
H-S63	2	0.395	0.049	0,36	0,43
H-S73	2	0.405	0.106	0,33	0,48
TOPLAM	12	2.150	0.408	1.860	2.440

Tablo 4.15 4T1-HER2+ Hücre hattında *LC3II* genine ait p değeri değişimleri

	H-K	H63	H73	H-S	H-S63	H-S73
H-K	-	0.995	0.073	0.427	0.999	0.999
H63	0.995	-	0.044	0.260	0.968	0.986
H73	0.073	0.044	-	0.619	0.098	0.084
H-S	0.427	0.260	0.619	-	0.552	0.487
H-S63	0.999	0.968	0.098	0.552	-	0.999
H-S73	0.999	0.986	0.084	0.487	0.999	-

4T1-HER2⁺ hücre hattında *Bax* genine yönelik gerçekleştirilen mRNA ekspresyon analizleri sonucunda, H-63 grubunun, hem H-73 ($p = 0.034$) hem de H-S ($p = 0.029$) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek *Bax* gen ekspresyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, H-73 grubunun kontrol grubu (H-K) ile karşılaştırıldığında *Bax* ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır ($p = 0.045$), bu da yüksek doz Tunikamisin'in pro-apoptotik *Bax* genini baskılayıcı etkisini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, H-K grubunun H-S grubuna göre de anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p = 0.038$), bu durum siRNA uygulamasının tek başına *Bax* ekspresyonunu düşürebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, H-S63 ve H-S73 gruplarıyla yapılan karşılaştırmalarda H-63 grubunun anlamlı farklılık göstermediği ($p > 0.05$) görülmüştür. Aynı şekilde H-73 grubunun H-S ve siRNA ile kombinasyon gruplarına (H-S63, H-S73) karşı da anlamlı fark oluşturmadağı belirlenmiştir. Detaylı bulgular Şekil 4.11, Tablo 4.16 ve 4.17'de yer almaktadır.



Şekil 4.11 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *Bax* geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

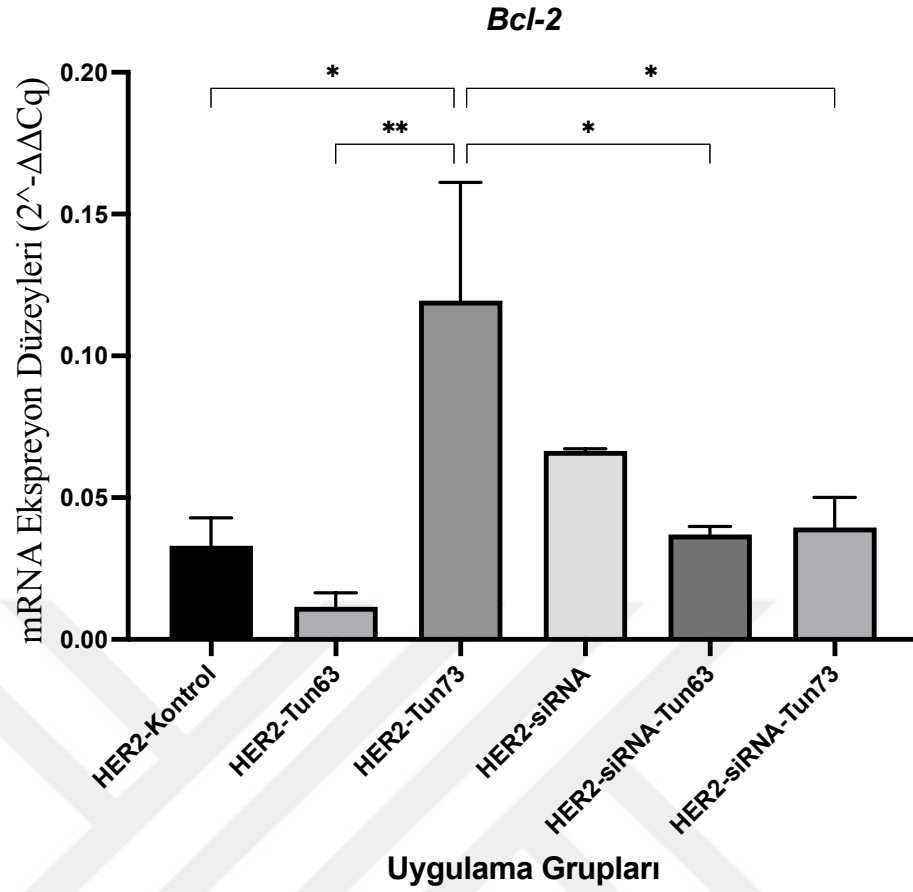
Tablo 4.16 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *BAX* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
H-K	2	0.046	0.019	0.033	0.060
H63	2	0.049	0.007	0.044	0.054
H73	2	0.008	0.010	0.001	0.013
H-S	2	0.007	0.008	0.001	0.016
H-S63	2	0.031	0.002	0.030	0.033
H-S73	2	0.019	0.005	0.015	0.023
TOPLAM	12	0.160	0.051	0.144	0.176

Tablo 4.17 4T1-HER2+ Hücre hattında *BAX* genine ait p değeri değişimleri

	H-K	H63	H73	H-S	H-S63	H-S73
H-K		0.999	0.045	0.038	0.652	0.175
H63	0.999	-	0.034	0.029	0.523	0.131
H73	0.045	0.034	-	0.999	0.248	0.171
H-S	0.038	0.029	0.999	-	0.209	0.731
H-S63	0.652	0.523	0.248	0.209	-	0.782
H-S73	0.175	0.131	0.806	0.731	0.782	-

4T1-HER2⁺ hücre hattında gerçekleştirilen *Bcl-2* genine yönelik mRNA ekspresyon analizleri değerlendirildi. H-73 grubunun, H-K ($p = 0.022$), H-S63 ($p = 0.028$) ve H-S73 ($p = 0.032$) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek ekspresyon gösterdiği belirlendi. Ayrıca H-63 grubunun H-73 grubuna karşı anlamlı düzeyde daha düşük ekspresyon gösterdiği saptandı ($p = 0.007$). Öte yandan, H-K grubunun diğer gruplarla yapılan karşılaştırmalarında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bu bulgular, yüksek doz Tunikamisin uygulamasının *Bcl-2* ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığını, ancak siRNA kombinasyonlarının bu etkiyi sınırlayabildiğini düşündürmektedir. İlgili istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.12, Tablo 4.18 ve Tablo 4.19’da sunulmuştur.



Şekil 4.12 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *Bcl-2* geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

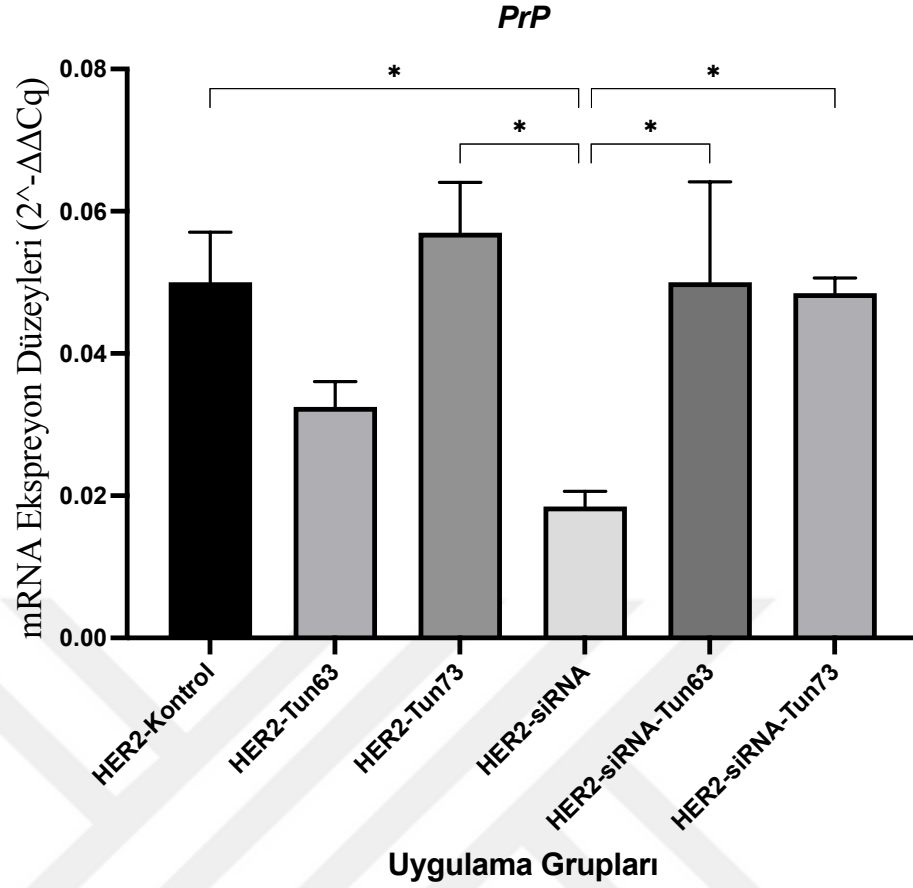
Tablo 4.18 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda *Bcl-2* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
H-K	2	0.033	0.009	0.026	0.040
H63	2	0.011	0.004	0.008	0.015
H73	2	0.119	0.041	0.090	0.149
H-S	2	0.066	0.001	0.066	0.067
H-S63	2	0.037	0.002	0.035	0.039
H-S73	2	0.039	0.010	0.032	0.047
TOPLAM	12	0.305	0.067	0.257	0.357

Tablo 4.19 4T1-HER2+ Hücre hattında *Bcl-2* genine ait p değeri değişimleri

	H-K	H63	H73	H-S	H-S63	H-S73
H-K		0.831	0.022	0.505	0.999	0.998
H63	0.831	-	0.007	0.146	0.726	0.656
H73	0.022	0.007	-	0.161	0.028	0.032
H-S	0.505	0.146	0.161	-	0.614	0.685
H-S63	0.999	0.726	0.028	0.614	-	0.999
H-S73	0.998	0.656	0.032	0.685	0.999	-

4T1-HER2⁺ hücre hattında *PrP^c* genine yönelik yapılan mRNA ekspresyon analizleri değerlendirildiğinde, H-S grubunun, H-K (p = 0.035), H-73 (p = 0.014), H-S-63 (p = 0.035) ve H-S73 (p = 0.044) gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği belirlendi. Ayrıca H-73 grubunun H-63 grubuna karşı anlamlılık sınırında daha yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu saptandı (p = 0.099). H-K grubunun diğer gruplarla yapılan karşılaştırmalarında anlamlı bir fark gözlenmedi. Elde edilen sonuçlar, *PrP^c* gen ekspresyonunun özellikle bazı uygulamalarda değişiklik gösterdiğini ve bu değişimin hücre hattına bağlı olarak seçici bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. İstatistiksel değerlendirmeler Şekil 4.13, Tablo 4.20 ve Tablo 4.21’de sunulmuştur.



Şekil 4.13 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda PrP^c geninin ekspresyon düzeyleri. (*: $0.01 \leq p < 0.05$, **: $0.001 \leq p < 0.01$, ***: $p < 0.001$)

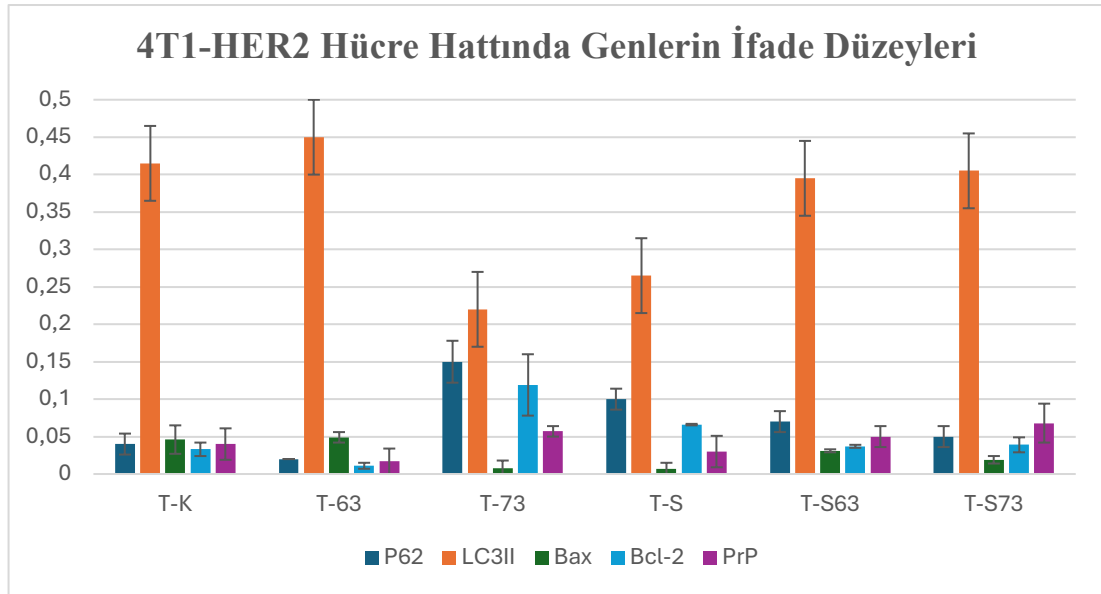
Tablo 4.20 4T1-HER2+ Hücre hattına ait gruplarda PrP^c ifadenlenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	St. Sapma	Min.	Max.
H-K	2	0.050	0.011	0,045	0,055
H63	2	0.017	0.017	0.005	0.030
H73	2	0.057	0.007	0.052	0.062
H-S	2	0.030	0.021	0.017	0.043
H-S63	2	0.050	0.014	0.040	0.060
H-S73	2	0.068	0.026	0.050	0.087
TOPLAM	12	0.262	0.106	0.189	0.337

Tablo 4.21 4T1-HER2+ Hücre hattında *PrP^c* genine ait p değeri değişimleri

	H-K	H63	H73	H-S	H-S63	H-S73
H-K	-	0.288	0.916	0.035	0.999	0.999
H63	0.184	-	0.099	0.473	0.288	0.359
H73	0.197	0.099	-	0.014	0.916	0.840
H-S	0.088	0.473	0.014	-	0.035	0.044
H-S63	0.317	0.288	0.916	0.035	-	0.999
H-S73	0.177	0.359	0.840	0.044	0.999	-

4T1-HER2⁺ hücre hattında gerçekleştirilen gen ekspresyon analizleri sonucunda; otofaji (*P62*, *LC3II*), apoptozis (*Bax*, *Bcl-2*) ile ilişkili genlerin uygulamalara verdikleri yanıtların farklılık gösterdiği değerlendirildi. Tunikamisin uygulamasının gen ekspresyonları üzerinde doz bağımlı etkiler oluşturduğu, özellikle yüksek doz uygulamasının bazı genlerde belirgin artışlara veya azalışlara yol açtığı gözlemlendi. siRNA ile kombinasyonların ise genellikle ekspresyon düzeylerini düşürdüğü ya da etkisini sınırladığı değerlendirildi. Genel olarak, 4T1-HER2⁺ hücre hattının uygulamalara karşı daha seçici ve sınırlı yanıt verdiği, bu durumun genetik düzenlemeler ve hücresel direnç mekanizmalarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İlgili genlere ait ifadenlenme düzeyleri şekil 4.14’ de verilmiştir.

**Şekil 4.14** 4T1-HER2+ hücre hattına dair gen ifade düzeyleri.

4.2. Tartışma

Kanser, dünya genelinde en önemli ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Farklı doku ve organlarda gelişebilen malign tümörler, yüksek metastatik potansiyelleri ve tedaviye karşı direnç geliştirebilme yetenekleri nedeniyle tıbbın en karmaşık mücadele alanlarından birini oluşturmaktadır. Hastalığın seyri, kullanılan tedavi yöntemleri kadar tümörün biyolojik özellikleri ve hücresel yanıt mekanizmaları ile de doğrudan ilişkilidir.

Son yıllarda, hücresel stres yanıtları, otofaji ve apoptozis gibi programlı hücre ölüm yolları (Kopeina & Zhivotovsky, 2022), kanser tedavilerinde yeni hedeflerin belirlenmesinde önemli bir odak haline gelmiştir. Bu süreçlerde görev alan gen ve proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler, tümör hücrelerinin tedaviye yanıtını şekillendirebilmekte ve bu nedenle detaylı olarak incelenmektedir. Özellikle hücre içi dengeyi sağlayan ve stres altındaki hücre yanıtlarını (Ho et al., 2021) modüle eden moleküler mekanizmalar, tedavi yanıtını etkileyen belirleyici faktörler arasında yer almaktadır.

Yapılan tez çalışmasında, fare meme kanseri modelleri olan 4T1 ve 4T1-HER2(+) hücre hatları kullanılarak, hücresel prion proteini (PrP^c) ve hücre ölüm mekanizmaları süreçlerinde görev alan temel genlerin (*Bcl-2*, *P62*, *LC3-II* ve *Bax*) ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmanın odak noktası hem hücre hattı farklılığının hem uygulanan stres koşullarının hem de anlatımı baskılanan grupların bu genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Bu kapsamda, hücrelerde endoplazmik retikulum (ER) stresi oluşturmak amacıyla stresör ajan olarak Tunikamisin kullanılmış, ardından PrP^c ekspresyonunun baskılanması ile oluşturulan farklı deneysel gruplarda gen düzeyindeki değişimler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Böylece, ER stresi altındaki tümör hücrelerinin moleküler yanıtlarında PrP^c'nin düzenleyici rolü ortaya konmaya çalışılmıştır.

Elde edilen bulgular, PrP^c'nin hem normal hem de ER stresine maruz kalan hücrelerdeki ekspresyonunun, otofaji yanıtıyla ilişkili moleküllerin düzenlenmesinde potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir. PrP^c düzeyinin baskılanması ve Tunikamisin uygulamasının birlikte ya da ayrı ayrı uygulanmasının, *P62*, *LC3-II*, *Bax*

ve *Bcl-2* genlerinin ifadesi üzerinde anlamlı etkiler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, hücrelerin hayatta kalma ve ölüm mekanizmalarının, uygulanan deneysel koşullara bağlı olarak genetik düzeyde farklılaştığını göstermektedir.

P62, hücrel stres yanıtlarının düzenlenmesinde görev alan, otofaji sürecinde ve proteazomal olmayan protein yıkım yollarında önemli rol oynayan çok işlevli bir adaptör proteindir. Gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, otofaji yanıtının seyri açısından önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (Jeong et al., 2019), (X. Huang et al., 2023). Bu çalışmada, *p62* gen ekspresyonunun, 4T1 ve 4T1-HER2⁺ fare meme kanseri hücre hatlarında hücrel Prion protein (PrP^c) baskılanması ve endoplazmik retikulum (ER) stresörü olan Tunikamisin uygulaması sonrasında nasıl değişiklik gösterdiği değerlendirilmiştir.

4T1 hücre hattında Kontrol grubuna (T-K) kıyasla yalnızca Tunikamisin uygulanan gruplarda (T-63 ve T-73), *P62* ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmemiştir (T-63 $p = 0.534$; T-73 $p = 0.211$). Bu bulgular, düşük ve yüksek doz Tunikamisin uygulamasının tek başına 4T1 hücrelerinde *P62* düzeylerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Ancak PrP^c anlatımının susturulduğu grupta (T-S), *P62* ekspresyonunda anlamlı bir artış kaydedilmiştir (T-S vs T-K, $p = 0.041$). Bu durum, PrP^c'nin baskılanmasının *P62* transkripsiyonunu uyarabileceğini düşündürmektedir. Literatürde PrP^c'nin otofajiyile ilişkili genlerin düzenlenmesinde rol aldığı ve seçici otofajiyi *BiP* gibi ER stres belirteci üzerinden etkileyebileceği bildirilmiştir (Dery et al., 2013). Bir başka çalışmadan elde edilen veriler, özellikle PrP^c ekspresyonunun baskılandığı ve eşzamanlı olarak endoplazmik retikulum stresinin uyarıldığı gruplarda *p62* gen ekspresyon düzeyinin anlamlı şekilde yükseldiğini ortaya koymuştur (M. Huang et al., 2024). Literatürde, otofajinin özellikle meme kanseri gibi malignitelerde ikili bir rol oynayabileceği; erken evrelerde tümör baskılayıcı etki gösterirken, ileri evrelerde hücrelerin stres koşullarında hayatta kalmasını kolaylaştırarak metastatik potansiyeli artırabileceği belirtilmiştir (Kim & Koo, 2023).

En dikkat çekici sonuçlardan biri hem PrP^c'nin susturulduğu hem de IC₅₀ dozunda (0.063µM/mL) Tunikamisin uygulanan T-S63 grubunda gözlenen belirgin artıştır. Bu grup, hem kontrol grubuna ($p = 0.002$) hem de diğer deney gruplarına göre anlamlı şekilde daha yüksek *P62* ekspresyonu sergilemiştir (T-63 vs T-S63, $p = 0.0007$; T73

vs T-S63, $p = 0.004$). Bu bulgular, PrP^c baskılanmasının ER stresi koşullarında *P62* transkripsiyonunu sinerjik olarak artırabileceğini göstermektedir. ER stresinin *P62*'yi aktive eden *IRE1-JNK-CHOP* gibi yolları uyardığı bilinmektedir (Choi et al., 2020) ve bu durum siRNA transfeksiyonu ile Prion proteininin anlatımının baskılanması etkisiyle daha da belirgin hale gelmiş olabilir.

IC₅₀ dozunda uygulama ve siRNA transfeksiyonu yapılan (T-S63) grupta gözlenen *P62* artışı, otofaji akışının aktive edilmesine veya bozulmasına bağlı birikimle açıklanabilir. Literatürde, ER stresörlerinin ileri faz otofajik akışı inhibe ederek *P62* protein birikimine neden olduğu ve bu birikimin transkripsiyonel artışla desteklendiği bildirilmiştir (Qi et al., 2022). Ayrıca *mTOR* sinyali gibi otofajiyi baskılayan yolların, *P62* transkripsiyonel aktivitesiyle etkileşime girebileceği de belirtilmiştir (Hare & Harvey, 2017).

Sonuç olarak, 4T1 hücre hattında PrP^c'nin susturulması ile Tunikamisin aracılığıyla oluşturulan endoplazmik retikulum stresi, *p62* gen ekspresyonunu sinerjik olarak artırmıştır. *P62* geni, meme kanserinde aşırı eksprese edilen ve metastazla ilişkili olduğu bilinen bir otofaji adaptörüdür. *p62*'nin baskılanmasının hücre proliferasyonunu azaltarak ve Tümör mikro çevresini (TME) yeniden şekillendirerek tümör gelişimini engelleyebileceğini çalışmalarda gösterilmiştir (Qi et al., 2022). *P62* ekspresyonundaki artış hem seçici otofajinin hem de hücresel stres yanıtlarının moleküler düzeyde yeniden düzenlendiğini ortaya koymaktadır. *P62*'nin bu süreçte bir adaptör proteini olarak merkezi rol üstlendiği ve PrP^c aracılığıyla regüle edildiği sonucunu düşündürmektedir.

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) pozitif meme kanseri hücre hattı olan 4T1-HER2⁺ hücrelerinde *P62* gen ekspresyon düzeyleri analizleri sonucunda, HER2-Kontrol (H-K) grubuna kıyasla yüksek doz (0.073µM/mL) Tunikamisin uygulanan H-73 grubunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p = 0.004$). Bu bulgu, yüksek dozda ilaç uygulamasında meydana gelen ER stresinin HER2⁺ hücrelerde *P62* ekspresyonunu belirgin şekilde artırabildiğini göstermektedir. Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu durumun Tunikamisin'in ER'de protein katlanmasını bozarak *PERK* ve *ATF6* gibi sensörlerin aktive edilmesi (Choi et al., 2020) yoluyla *P62* transkripsiyonunu artırabileceğini bağlantısıyla açıklanabilir.

IC₅₀ (0.063µM/mL) doz Tunikamisin uygulanan H-63 grubunda ise, kontrol grubuna (H-K) göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p = 0.812). Bu bulgu, HER2 pozitif hücrelerin IC₅₀ dozunda ilaç uygulamasıyla ER stresine karşı daha dirençli olabileceğini ve *P62* ekspresyonunun bu stres düzeyinde değişmediğini göstermektedir. Bununla birlikte IC₅₀ (0.063µM/mL) doz uygulama grubunun (H-63) 0.073µM/mL Tunikamisin uygulanan gruba (H-73) göre anlamlı düşük ekspresyon göstermesi (p = 0.001), bu etkinin doz bağımlı olduğunu destekler niteliktedir.

PrP^c baskılanması ile elde edilen PrP-siRNA grubunda (H-S) ise *P62* ekspresyonu Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da anlamlıya yakın bir artış saptanmıştır (p = 0.069). Bu durum, HER2 pozitif hücrelerde PrP^c'nin tek başına *P62* ekspresyonu üzerinde 4T1 hücre hattında olduğu kadar güçlü bir regülatör etki oluşturmadığını düşündürmektedir. Ancak IC₅₀ (0.063µM/mL) doz Tunikamisin uygulanan (H-63) gruba kıyasla anlamlı bir fark olması (p = 0.019), PrP^c baskılanmasının düşük ER stres koşullarında *P62* üzerindeki etkisini artırabileceğini düşündürmektedir. IC₅₀ (0.063µM/mL) doz uygulama grubu (H-63), 0.073µM/mL Tunikamisin uygulanan (H-73) gruplarında *P62* ekspresyonu artmış olmasına karşın kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.508 ve p = 0.985). Bununla birlikte siRNA ve 0.073µM/mL Tunikamisin uygulanan grubunun, sadece 0.073µM/mL Tunikamisin uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha düşük ekspresyon sergilemesi (p = 0.006), PrP^c baskılanmasının yüksek doz Tunikamisin ile birlikte uygulandığında *P62* artışını sınırlandırabileceğini göstermektedir. HER2 sinyal yollarının (örneğin, *PI3K/Akt/mTOR*) üzerinde dengeleyici bir etki oluşturduğunu bilinmektedir (Hare & Harvey, 2017). *P62* gen ekspresyonunun HER2⁺ hücre hattında daha yüksek düzeyde seyretmesi, HER2 sinyal yolunun otofajiyle olan etkileşimini yansıtmaktadır. Literatürde, HER2'nin *mTOR* sinyal yolunu aktive ederek otofajiyi baskıladığı ve bunun sonucunda *P62* birikimine neden olabileceği belirtilmiştir (Cai-McRae & Karantza, 2015).

p62'nin çoklu sinyal yolları yoluyla HER2 kaynaklı meme tümör oluşumunu kolaylaştırdığı ve hücrel dönüşüm ve tümör oluşumu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Cai-McRae & Karantza, 2015). Ayrıca, *p62*'nin çekirdek içinde transkripsiyonel düzenleyici aktivite göstermesi ve tümör hücre proliferasyonunu

desteklemesi, HER2⁺ hücrelerde gözlenen stabil ekspresyon artışını açıklayabilecek mekanizmalardan biri olarak değerlendirilmektedir (Mondal et al., 2025).

Sonuç olarak, HER2⁺ hücre hattında yüksek doz (0.073µM/mL) Tunikamisin uygulaması *P62* ekspresyonunu artırırken, PrP^c baskılanmasının etkisi sınırlı kalmıştır. Daha çok Tunikamisin uygulamasına bağlı anlamlı değişimlere rastlanmıştır. Bu bulgular, HER2 sinyalizasyonunun otofajik süreçlerle etkileşimini ve ER stresine karşı hücresel yanıtların HER2⁺ fenotipe özgü olarak farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmamızda *p62* gen ekspresyonundaki artışların hem uygulanan stres etkenine hem de hücre tipine bağlı olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır. Özellikle 4T1 hücrelerinde *p62* ekspresyonunda daha belirgin değişiklikler gözlenirken, HER2 pozitif hücre hattında bu yanıtların daha sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Literatürde, *p62*'nin multipl miyelom hücrelerinde bortezomib (birinci nesil bir proteazom inhibitörü (Yamamoto & Egashira, 2021)) direncini artırarak hücre sağkalımını destekleyebileceği ve farklı hücre hatlarında sağkalımı ya da hücre ölümünü düzenleyebileceği bildirilmiştir (Milan et al., 2015). Bu bulgular, *p62* geninin uygulamalara verdiği yanıtın hücre tipi kaynaklı farklılıklardan etkilendiğini ve stres yanıtlarındaki düzenleyici rolünü desteklemektedir (Yu, Wang, Zhou, & Xu, 2021). Aynı zamanda, hücre hattına özgü yanıt profillerinin incelenmesinin önemini de ortaya koymaktadır.

LC3-II (LC3B) gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, 4T1 hücre hattında farklı uygulama grupları arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Kontrol grubuna (T-K) kıyasla, düşük (T-63; $p = 0.014$) ve yüksek (T-73; $p = 0.004$) doz Tunikamisin uygulanan gruplarda *LC3-II* düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu durum, Tunikamisin'in beklenen otofaji indükleyici etkisinin, bu dozlarda 4T1 hücre hattında zayıflayabileceğini veya hücre tipine/doza bağlı olarak otofajik akışta tıkanıklık yaratabileceğini düşündürmektedir. PrP^c baskılaması uygulanan grup olan (T-S; $p = 0.017$) ile kontrol grubu arasında *LC3-II* düzeyleri açısından anlamlı bir fark izlenmiştir. Aynı şekilde siRNA transfekte grup, sadece Tunikamisin uygulanmış T-63 (0.063µM/mL; $p = 0.0004$) ve T-73 (0.073µM/mL; $p = 0.0002$) grupları arasında anlamlı düzeyde yüksek *LC3-II* ekspresyonu göstermiştir. Bu bulgu, PrP^c

baskılanmasının, Tunikamisin uygulamasıyla azalan otofaji seviyelerini yeniden artırabileceğini ve otofaji sürecini destekleyebileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, siRNA+Tunikamisin ($0.073\mu\text{M/mL}$) uygulama grubu da, sadece $0.063\mu\text{M/mL}$ Tunikamisin uygulanmış ($p = 0.003$) ve sadece $0.073\mu\text{M/mL}$ Tunikamisin uygulanmış ($p = 0.001$) gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek *LC3-II* ekspresyonu göstermektedir. Öte yandan, siRNA+Tunikamisin ($0.073\mu\text{M/mL}$) (T-S73) grubu hem sadece siRNA uygulanmış grup ($p = 0.001$) hem de siRNA'ya ek olarak $0.063\mu\text{M/mL}$ Tunikamisin uygulanmış (T-S63) ($p = 0.015$) gruplara göre anlamlı düzeyde daha düşük *LC3-II* düzeyleri sergilemiştir. Bu durum yüksek doz Tunikamisin'in, PrP baskılamasına rağmen, otofaji süreci üzerinde bir etki gösterebileceğini ve bu etkinin doz bağımlı olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan önceki çalışmalarda, Tunikamisin'in ER stresine bağlı olarak otofajiyi indükleyebildiği ve *LC3-II* ekspresyonunu artırabildiği bildirilmiş olsa da (Tang, Kay, Jiang, & Arkin, 2022), bu etkinin hücre hattı ve doz gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceği vurgulanmaktadır. *LC3-II*'nin stres koşullarında hücre hayatta kalımını düzenlemedeki rolü literatürde açıkça ifade edilmiştir (Koh et al., 2024). Ayrıca, *LC3-II* işaretlemesinin meme kanserinde otofajinin bir ölçüsü olarak kötü prognostik değer taşıyabileceği gösterilmiştir (S. Chen et al., 2013).

4T1-HER2⁺ hücre hattında *LC3-II* gen ekspresyonuna yönelik analizler, 4T1 hücre hattına kıyasla daha sınırlı bir yanıt profili ortaya koymuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda yalnızca $0.063\mu\text{M/mL}$ Tunikamisin uygulanmış grup (H-63) ve $0.073\mu\text{M/mL}$ Tunikamisin uygulanmış gruplarda (H-73) istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermesi ($p = 0.044$), IC_{50} dozunda ($0.063\mu\text{M/mL}$) Tunikamisin uygulamasının bu hücre hattında otofaji süreci üzerinde farklı bir düzenleyici etki yaratabileceğini düşündürmektedir. Ancak kontrol grubu ile herhangi bir deney grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemesi, HER2'ye özgü sinyal yollarının otofaji üzerindeki baskılayıcı etkisini desteklemektedir. Nitekim literatürde, *LC3-II*'nin HER2 sinyali aracılığıyla farklı şekillerde düzenlenebileceği ve HER2⁺ hücrelerde otofaji yanıtının daha karmaşık mekanizmalarla kontrol edildiği raporlanmıştır (M. Li et al., 2024). Ayrıca, HER2⁺ hücrelerde otofajinin baskılanmasıyla *LC3-II* birikiminin inhibe edildiği de gösterilmiştir (Hwang & Kim, 2023). Bu farklılıklar, HER2 gibi onkogenlerin (Vranic, Beslija, & Gatalica, 2021) hücre tipine özgü olarak otofaji süreçlerini düzenleyebileceğini ortaya koymaktadır.

LC3-II seviyelerindeki değişikliklerin 4T1 hücre hattında hem ER stresi hem de PrP^c baskılanmasına bağlı olarak şekillenmesi, bu genin stres yanıtlarındaki düzenleyici rolünü desteklemektedir. Ancak bu yanıtın, hücre hattına bağlı olarak farklılık gösterdiği analiz sonuçlarında belirgin bir şekilde görülmektedir. 4T1 hücre hattında, özellikle PrP^c baskılanmasına (T-S) ve düşük doz Tunikamisin ile birlikte uygulanan kombinasyonlara (T-S63) ait gruplarda *LC3-II* düzeylerinde anlamlı artış gözlenmiş, bu da PrP^c baskılanmasının otofaji aktivitesini destekleyici etkiler ortaya koyabileceğini düşündürmüştür. Buna karşın, 4T1-HER2⁺ hücre hattında PrP^c baskılanması (H-S) ve kombinasyon uygulamaları (H-S63, H-S73) kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik oluşturmamış, *LC3-II* düzeyleri sabit kalmıştır. Bu durum, HER2⁺ hücrelerde PrP^c baskılanmasının otofaji üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğini ve HER2 sinyal yolunun otofaji üzerinde baskılayıcı bir rol üstlenebileceğini göstermektedir. Nitekim, HER2⁺ hücrelerde otofajinin baskılanmasıyla birlikte LC3-II birikiminin inhibe edildiği ve HER2 sinyaliyle *LC3-II*'nin negatif regülasyona uğrayabileceği daha önceki çalışmalarda raporlanmıştır (M. Li et al., 2024). Bu farklılıklar, stres yanıtlarının hücre tipine özgü olarak şekillendiğini ve HER2 gibi onkogenlerin (M. Li et al., 2024) otofaji düzenlemesinde belirleyici olabileceğini göstermektedir. Öte yandan, *LC3-II*'nin yalnızca otofaji süreçlerinde değil, aynı zamanda inflamasyon, hücre proliferasyonu ve metastaz gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarda da görev aldığı bildirilmektedir (Geng et al., 2023). Dolayısıyla, *LC3-II*'nin terapötik hedef olarak potansiyeli artmakta; ancak bu hedefin etkililiğinin, kullanılan tedavi stratejisinin yanı sıra tümör hücresinin moleküler alt tipine göre değişebileceği anlaşılmaktadır (Y. Chen et al., 2025). Özellikle HER2 ve HER3 pozitifliği ile birlikte yüksek *LC3-II* ekspresyonunun, agresif tümör biyolojisiyle anlamlı şekilde bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Bortnik et al., 2020).

Triple Negatif Meme Kanseri (TNBC) hücre hatlarında yapılan çalışmalarda *LC3-II* ve otofaji düzeylerinin yüksek olduğu, bunun da kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu hasta grubunun kemoterapiye daha az yanıt verdiği ve tedaviye otofaji inhibitörlerinin eklenmesinin potansiyel bir strateji olabileceği öne sürülmüştür (Lefort et al., 2014). Tümör dokularında *LC3-II* ve *p62*'nin birlikte yüksek düzeyde ekspresyonu iyi prognozla ilişkilendirilmişken, sadece *LC3-II* yüksekliği kötü sağkalım ile bağlantılı bulunmuştur (Niklaus et al., 2017). Ancak bazı çalışmalarda belirtildiği üzere bu proteinlerin sağkalım üzerindeki etkisi kanser türüne göre

değişiklik göstermiştir (Cao et al., 2016). Hücrel prion proteinini nörodejeneratif hastalıklara sebep olan formu PrP^{sc} ile yapılan çalışmalarda ise, *LC3II* ve *p62*'nin anormal form olan PrP^{sc}'nin birikimini azaltması ve apoptozisi baskılaması, bu proteinin hem otofaji hem de protein homeostazında kritik bir düzenleyici olduğunu göstermektedir (Moon et al., 2016; Xu et al., 2014) Bu nedenle hem *LC3-II*'nin hem de *p62*'nin otofaji süreçlerindeki etkilerini ve yardımcı moleküllerini araştırmak kanser türüne özgü tedavi geliştirme süreçlerinde önemli bir parametredir.

Apoptozisin mitokondriyal yolunun temel düzenleyicilerinden olan *Bax* ve *Bcl-2* proteinleri, hücre içi sinyal ağlarında karşıt işlevleri aracılığıyla hücre kaderini belirlemektedir. Bu çalışmada, endoplazmik retikulum (ER) stresörü Tunikamisin ve PrP^c baskılanmasının bu genler üzerindeki etkileri, 4T1 ve 4T1-HER2⁺ meme kanseri hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4T1 hücre hattı açısından değerlendirildiğinde, *Bax* gen ekspresyonu 0.063 µM/mL Tunikamisin uygulanmış grup (H-63) ve 0.073 µM/mL Tunikamisin uygulanmış (H-73) gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Ancak anlamlı olmasa da ekspresyon düzeyinin düşük olması, yüksek doz Tunikamisin uygulamasının *Bax* ekspresyonunu baskılayarak apoptozisten kaçışa katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. *Bax* ekspresyonunun kanser ilerledikçe azaldığı ve uzak metastazlı hastalarda en düşük seviyeye geldiği raporlanmıştır (Gil et al., 2017).

En dikkat çekici bulgu, yalnızca PrP^c baskılanmasının uygulandığı T-S grubunda *Bax* düzeyinde anlamlı bir artışın gözlenmesidir ($p = 0.005$). Bu durum, PrP^c'nin anti-apoptotik bir protein olarak *Bax* üzerinden hücre hayatta kalımını düzenlediği yönünde bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Ancak, kombine (Tun+siRNA) uygulama yapılan T-S63 ve T-S73 gruplarında *Bax* ekspresyonunun yeniden düşmesi, Tunikamisin kaynaklı stresin, PrP^c baskılanmasının oluşturduğu pro-apoptotik etkiyi sınırladığını gösterir niteliktedir.

Bcl-2 gen ekspresyonu ise tüm deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalmıştır. Tunikamisin uygulanan 0.063µM/mL (H-63) ve 0.073µM/mL (H-73) gruplarındaki bu düşüş oldukça belirgindir (sırasıyla; $p < 0.02$, $p < 0.01$), bu da Tunikamisin'in ER stresini artırarak anti-apoptotik *Bcl-2* düzeyini baskıladığını

göstermektedir. Literatürde, uzun süreli ER stresinin *Bcl-2* transkripsiyonunu baskıladığı ve bu durumun mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozise neden olduğu bildirilmektedir (Z. Li, Liu, Li, Yan, & Xu, 2025). Ayrıca JNK, (JNK'ler, çeşitli streslere karşı hücrel yanıtı düzenleyerek gen ekspresyonu, hücre iskeleti dinamikleri ve hayatta kalma yolları üzerinden birçok fizyolojik süreci kontrol eder (Zeke et al., 2016)) aracılığıyla fosforile edilen *Bcl-2*'nin anti-apoptotik özelliğini kaybederek ER'den Ca^{2+} salınımını artırabileceği de ifade edilmiştir (Lebeaupin et al., 2020).

Sadece hücrel prion proteininin baskılandığı T-S grubunda, *Bcl-2* düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p = 0.293$), ancak siRNA transfeksiyonuna ek olarak Tunikamisin uygulaması yapılan T-S63 ve T-S73 gruplarında bu düzeyler yeniden düşmüştür ($p < 0.005$, $p < 0.003$). Bu durum, tek başına PrP baskılamasının *Bcl-2* düzeyini koruyabileceğini, ancak ek olarak uygulanan Tunikamisin'in bu etkiyi ortadan kaldırarak stres yollarını baskın hale getirdiğini göstermektedir. Ancak uzamış stres durumunda, *Bcl-2*'nin UPR (yanlış katlanmış protein yanıtları) sensörleriyle olan etkileşimleri apoptotik süreçlerin tetiklenmesine katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Palabiyik, 2025). Genel olarak bu bulgular, ER stresinin hem pro-apoptotik (*Bax*) hem de anti-apoptotik (*Bcl-2*) genlerde anlamlı düzeyde değişikliklere yol açtığını ve PrP'nin bu süreçte önemli bir düzenleyici rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

4T1-HER2⁺ hücre hattında *Bax* gen ekspresyonu, kontrol grubuna benzer şekilde H-63 grubunda (0.063 μ M/mL Tunikamisin) yüksek düzeyde seyretmiştir ($p = 0.999$). Ancak H-73 (0.073 μ M/mL Tunikamisin; $p = 0.045$), H-S (siRNA; $p = 0.038$) ve H-S63 (0.063 μ M/mL Tun+ siRNA; $p = 0.131$) gruplarında anlamlı ya da anlamlıya yakın düzeyde düşüşler gözlenmiştir. Özellikle 0.073 μ M/mL Tunikamisin ve sadece siRNA transfeksiyonu uygulama gruplarındaki düşüş, yüksek doz Tunikamisin ve/veya PrP^c baskılanması uygulanan koşullarda pro-apoptotik *Bax* ifadesinin baskılandığını ve apoptozisin geri planda kaldığını göstermektedir. Bu bulgular, HER2⁺ hücrelerde apoptotik yanıtın sınırlı olduğunu ve HER2 sinyal yollarının *PI3K/Akt* ve *MAPK/ERK* üzerinden *Bax* translokasyonunu inhibe ederek apoptozisten kaçışı destekleyebileceğini gösteren literatürle uyumludur (Devis-Jauregui et al., 2021).

4T1-HER2⁺ hücre hattında *Bcl-2* gen ekspresyonu, IC₅₀ dozunda Tunikamisin uygulama grubunda (H-63) kontrol grubuna kıyasla azalmalar görülmesine rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p = 0.831). Buna karşılık, 0.073µM/mL Tunikamisin grubunda (H-73) anlamlı düzeyde bir artış gözlenmiştir (p = 0.022), ayrıca bu artış H-63 grubuna göre de oldukça anlamlıdır (p = 0.007). Yalnızca PrP^c baskılamasının uygulandığı siRNA transfekte olan grubunda orta düzeyde bir artış gözlenirken (p > 0.505), kombine gruplarda (H-S63; p = 0.028) ve (H-S73; p = 0.032) gruplarında H-73'e göre anlamlı düşüşler tespit edilmiştir. Özellikle 0.073µM/mL Tunikamisin grubundaki (H-73) *Bcl-2* artışı, yüksek doz Tunikamisin'in *Bcl-2* üzerinden hücreyi koruyucu bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir. Literatürde, *Bcl-2*'nin endoplazmik retikulum membranında lokalize olarak *IP3R* aracılığıyla ER Ca²⁺ seviyelerini düzenlediği, böylece stresi dengeleyerek apoptozisi baskıladığı bildirilmiş ve HER2 sinyal yollarının *Bcl-2* stabilitesini artırarak hem otofaji hem de apoptozis süreçlerini modüle ettiği de rapor edilmiştir (Devis-Jauregui et al., 2021).

Bu sonuçlar, HER2⁺ hücre hattında apoptotik mekanizmaların daha karmaşık ve duruma bağlı olarak değişken şekilde işlediğini, bazı koşullarda anti-apoptotik yanıtların daha baskın olabileceğini göstermektedir. *Bax* ve *Bcl-2* birlikte incelendiğinde, HER2⁺ hücrelerde apoptotik tepkinin sınırlı ve daha çok sinyal ağına bağımlı olabileceği değerlendirilmektedir. Triple Negatif Meme Kanseri (MDA-MB-231, TNBC) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, lösemi ve lenfoma tedavisinde onaylanmış, *Bcl* ailesinin anti-apoptotik üyesi *Bcl-2*'yi seçici olarak inhibe eden Venetoclax (VCX) tedavisinin, anti-apoptotik *Bcl-2* ekspresyonunu azaltıp pro-apoptotik *Bax* ekspresyonunu artırarak *Bax/Bcl-2* oranında belirgin bir yükselişe neden olmuş ve böylece apoptozisi indüklediği raporlanmıştır (Alhoshani et al., 2020). Bu bağlamda, HER2⁺ hücrelerde apoptozis yanıtının, *Bcl-2* inhibisyonuna TNBC hücrelerindeki kadar güçlü bir şekilde yanıt vermeyebileceği ve bu hücrelerde apoptozisin daha karmaşık düzenleyici mekanizmalar tarafından kontrol edilebileceği ayrı bir araştırma konusu olarak düşünülebilir.

Otofaji, tümör oluşumunun erken evrelerinde tümör baskılayıcı bir rol üstlenirken, ilerleyen evrelerde kanserin gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunabildiği gösterilmiştir (Rakesh, PriyaDharshini, Sakthivel, & Rasmi, 2022). Ayrıca hem otofaji

hem de apoptozis süreçlerinin kolorektal kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli roller üstlendiği, apoptozis düzenleyicilerinin aynı zamanda otofaji aktivasyonun düzenleyicileri olarak da işlev görebildiği belirtilmiştir (Xie, Liu, & Li, 2020).

Bu iki süreç arasındaki yakın ilişki, otofaji ve apoptozisin bazı ortak düzenleyici proteinleri paylaşmasından kaynaklanmaktadır. Özellikle *Bcl-2* ailesine ait alt grupların (*Bak*, *Bax* ve *BH3*-only proteinleri) endoplazmik retikulumda lokalize olarak hem kaspaz-bağımlı apoptozisi hem de otofajiyi düzenledikleri gösterilmiştir (Xie et al., 2020). Ayrıca otofaji ve apoptozis, *Akt* ve *MAPK* yolları gibi çeşitli sinyal iletim yolları tarafından da ortaklaşa düzenlenmektedir. Bu kapsamda, *ErK*, *p38*, *MAPK* ve *JNK* gibi moleküllerin otofaji sürecine doğrudan müdahale ettiği raporlanmıştır (J. Yang & Yao, 2015). Kanser hücrelerinde bu iki sürecin karşılıklı etkileşimi, hücre hayatta kalımı üzerinde etkili bir düzenleyici rol oynamaktadır.

Otofaji ile apoptoz arasındaki moleküler kesişim noktaları, *p62/SQSTM1*, *Bcl-2* ailesi proteinleri, *Beclin-1* ve *LC3-II* gibi ortak düzenleyici proteinler aracılığıyla şekillenmekte olup, bu etkileşim tümör hücrelerinin hayatta kalma ya da ölüm yönündeki kaderini belirleyebilmektedir. Klinik anlamda, bu iki yolak arasındaki dengenin hedeflenmesi sayesinde, kanser tedavisinde terapötik etkinliğin artırılacağı ve ilaç direncinin aşılabileceği öne sürülmektedir (Choi et al., 2020). Sonuç olarak, otofaji ve apoptozis tümör oluşumunda hem sinerjik hem de antagonistik etkiler sergileyebilir. Koruyucu otofaji, bazı durumlarda antikanser ajanlara karşı direnç oluşturabilirken; ölümcül otofaji, bu ajanlarla iş birliği içinde apoptozisi destekleyerek tümör hücrelerinin eliminasyonunu sağlayabilir (Linder & Kogel, 2019; Xie et al., 2020).

Hücrel Prion Proteini (PrP^c); kanser hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazının yanı sıra ilaç direnci gelişimi ve kanser kök hücrelerinin oluşumunu destekleyerek tümör progresyonunda kritik ve çok yönlü bir düzenleyici rol üstlenebileceği son yıllarda artan çalışmalarla beraber gösterilmiştir (Ding, Chen, Lang, & Cui, 2021; Limone et al., 2023; X. Yang et al., 2014). PrP^c'nin, hücre çoğalması, metastaz, ilaç direnci ve kanser kök hücre özelliklerini; *PI3K-Akt* ve *Notch* gibi hücre sağkalımına yönelik sinyal yolları ile ekstraselüler matriks, hücre yüzeyi molekülleri ve kanser kök hücre belirteçleriyle etkileşerek düzenlediği gösterilmiştir (Go & Lee, 2020; Ryskalın et al., 2019). Yüksek PrP^c düzeylerinin antikanser ilaçlara

direnç kazandırabileceği, MCF7 meme kanseri hücre hattında PrP^c artışı ile tümör nekroz faktörü- α 'ya (*TNF α*) direnci arasındaki nedensel ilişkiyle gösterilmiştir (Mouillet-Richard et al., 2021). Östrojen reseptörü (ÖR) negatif meme kanseri hastalarında PrP^c'nin yüksek ekspresyonunun, kemoterapiye düşük yanıtla ilişkili olduğu (Abi Nahed et al., 2023) ve adjuvan tedavi yanıtını öngörmede potansiyel bir biyobelirteç olabileceği raporlanmıştır (Ryskalin et al., 2021). Ayrıca düşük PrP^c ekspresyonuna sahip hücrelerde, yüksek PrP^c düzeyine sahip hücrelere kıyasla daha belirgin bir UPR (katlanmamış protein yanıtı) aktivasyonu gözlemlendiği belirlenmiştir (Z. Gao et al., 2019). PrP^c'nin otofagozom oluşumunu düzenleyici bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Dias et al., 2016). Bu nedenler ile birlikte otofaji yollarındaki etkilerinin daha iyi anlaşılması gerektiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır. Nitekim PrP^c'nin tümör karsinogenezinde yer alan 570'den fazla proteinle etkileşime girmesi (Armocida, Busceti, Biagioni, Fornai, & Frati, 2023), otofaji süreçlerindeki rolünün bu etkileşimlerin ortak ve önemli bir paydası olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, hücrel prion proteinin (PrP^c) baskılanması ve ER stresinin indüklenmesiyle hem otofaji hem de apoptozis yanıtlarının hücre tipine özgü olarak şekillendiğini ortaya koymuştur. Özellikle *p62* ve *LC3II* gibi otofaji belirteçleriyle birlikte, *Bax* ve *Bcl-2* gen ekspresyonlarındaki değişimler bu yanıtların aktivasyon düzeyini işaret etmektedir. Literatürde de vurgulandığı üzere, stres altındaki hücrelerde otofaji ilk etapta bir koruma mekanizması olarak aktive edilmekte, ancak bu süreç yeterli olmadığında apoptozis devreye girmektedir (Miller & Thorburn, 2021). Bu çerçevede değerlendirildiğinde, prion proteininin baskılandığı gruplarda olduğu kadar ekspresyonunun devam ettiği gruplarda da, söz konusu proteinin yalnızca hücre sağkalımını artırmakla sınırlı kalmayıp, aynı zamanda otofaji-apoptoz dengesinin sürdürülmesinde de etkili bir modülatör olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, PrP^c'nin hedeflenmesiyle birlikte bu iki hücrel yanıtın koordineli biçimde modüle edilebileceği yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilir.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hücrel Prion proteininin (PrP^c) baskılanmasının ve endoplazmik retikulum stresörü Tunikamisin'in farklı dozlarda uygulanmasının, otofaji ve apoptozis ile ilişkili gen ekspresyonları üzerindeki etkileri, triple negatif meme kanseri hücre hatları olan 4T1 ve HER2 pozitif alt tipi 4T1-HER2+'de karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, stres koşullarında PrP^c baskılanmasının hücrelerin yanıt mekanizmalarını farklı şekillerde etkileyebileceğini ve bu etkinin hücre tipine özgü yanıt profilleri sergileyebileceğini göstermiştir.

Özellikle *p62*, *LC3-II*, *Bax* ve *Bcl-2* genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler hem uygulanan stres etkenine hem de PrP^c'nin baskılanma durumuna bağlı olarak önemli farklılıklar göstermiştir. Bu durum, PrP^c'nin yalnızca hücre sağkalımı ve ilaç direnci üzerinde değil, aynı zamanda otofaji-apoptozis dengesini düzenleyen çok yönlü bir moleküler düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. Literatürde de belirtildiği üzere, PrP^c'nin seçici otofaji süreçlerinde *p62* üzerinden etkili olduğu, hücrel stres yanıtlarını şekillendirdiği ve tümör mikro çevresinin yeniden düzenlenmesinde aktif rol üstlendiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, elde edilen verilerle örtüşmektedir.

Çalışmanın sonuçları, özellikle hücrel Prion proteini baskılandığında *p62* ekspresyonunun artması, otofaji akışındaki artışa neden olabileceğini ortaya koymuştur. 4T1 hücrelerinde gözlemlenen bu etki, 4T1-HER2 pozitif hücrelerde daha sınırlı kalmış ve bu durum HER2 sinyal yolunun Prion proteininin düzenleyici etkisini baskılayabileceğini düşündürmüştür. Buna ek olarak, HER2+ hücre hattında yüksek doz Tunikamisin uygulaması *p62* ekspresyonunu artırsa da PrP^c baskılanmasının bu etkiyle sinerji oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu farklılık, PrP^c'nin regülasyonunun hücre tipine ve mikro çevre faktörlerine bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmanın literatüre katkısı, yalnızca PrP^c'nin gen ekspresyon düzeyine etkisiyle sınırlı kalmayıp, kanser hücrelerinin stres koşullarına karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarının Prion proteini aracılığıyla nasıl şekillendiğine dair yeni veriler sunmasıdır. Bu kapsamda, PrP^c'nin yalnızca fizyolojik değil, patolojik koşullarda da önemli bir düzenleyici olduğunu ve özellikle sağkalım, otofaji, apoptozis gibi süreçlerde merkezi bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Ancak elde edilen bulgular, gen ekspresyon düzeyinde yapılan analizlerle sınırlı olduğundan, proteomik düzeyde gerçekleştirilecek destekleyici çalışmalarla daha kapsamlı yorumlar yapılması gerekmektedir. Özellikle hücrel Prion proteininin otofaji akışı üzerindeki etkisi, post-translasyonel modifikasyonlarla ilişkisi ve çekirdek içi sinyal yollarıyla etkileşimi gelecekte yapılacak ayrıntılı moleküler araştırmalarla aydınlatılmalıdır. Apoptotik belirteçlerin yalnızca gen düzeyinde değil, Annexin V boyaması gibi yöntemlerle de doğrulanması önemlidir. Bu doğrultuda protein düzeyinde doğrulama ve hücre içi sinyal yollarına yönelik fonksiyonel analizlerin; Western blot, otofagozom oluşumunun immüno Floresan veya immüno sitokimyasal boyama yöntemleriyle desteklenmesi önerilmektedir. Ayrıca PrP^c'nin otofaji ile olan ilişkisini daha iyi anlamak amacıyla, otofaji yollarının bu çalışmada analiz edilmeyen otofagozomal tamamlama üyelerinin de (ATG genleri, ESCRT kompleksi) değerlendirilmesi gelecekteki araştırmalar için önem taşımaktadır. Ayrıca, çalışmalarda kullanılacak hücre hatlarının seçiminde yalnızca HER2 değil, aynı zamanda östrojen reseptörlerinin (ÖR) ekspresyon profillerinin de dikkate alınması önemlidir. Östrojen reseptörleri, meme kanserinde tümörün biyolojik davranışını, tedaviye yanıtını ve prognozu belirleyen başlıca moleküler belirteçlerden biridir. Bu bağlamda, HER2 ve ÖR durumlarının birlikte değerlendirilmesi, otofaji ve apoptoz mekanizmalarının farklı alt tiplerdeki işleyişinin daha kapsamlı şekilde aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma, PrP^c'nin özellikle endoplazmik retikulum stresi koşullarında tümör hücrelerinin adaptasyon süreçlerinde kritik bir düzenleyici rol üstlendiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, PrP^c'nin hücrel stres yanıtlarını yönlendirme kapasitesi aracılığıyla tümör hücrelerinin otofaji ve apoptoz arasındaki dengeyi şekillendirebildiğini ve bu yolla kanser hücrelerinin hayatta kalma stratejilerine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, PrP^c'nin moleküler hedef olarak değerlendirilmesi, yalnızca kanserin ilerleyişini yavaşlatmaya yönelik değil, aynı zamanda otofajiyi de doğrudan hedef alan yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından da umut verici görünmektedir. Gelecekte PrP^c'nin farklı kanser tiplerinde, heterojen tümör modellerinde ve translasyonel düzeyde yapılacak geniş ölçekli prelinik çalışmalarla ayrıntılı olarak incelenmesi, prion proteini merkezli anti-kanser stratejilerin potansiyelini ortaya koyarak, kanser biyolojisi ve tedavi yaklaşımlarına önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abi Nahed, R., Safwan-Zaiter, H., Gemy, K., Lyko, C., Boudaud, M., Desseux, M., Benharouga, M. (2023). The Multifaceted Functions of Prion Protein (PrP(C)) in Cancer. *Cancers (Basel)*, 15(20). doi:10.3390/cancers15204982
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*, 50(1), 33. doi:10.1186/s40659-017-0140-9
- Alhoshani, A., Alatawi, F. O., Al-Anazi, F. E., Attafi, I. M., Zeidan, A., Agouni, A., Korashy, H. M. (2020). BCL-2 Inhibitor Venetoclax Induces Autophagy-Associated Cell Death, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Onco Targets Ther*, 13, 13357-13370. doi:10.2147/OTT.S281519
- Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., & Debnath, J. (2019). Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Cancer Discov*, 9(9), 1167-1181. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0292
- Armocida, D., Busceti, C. L., Biagioni, F., Fornai, F., & Frati, A. (2023). The Role of Cellular Prion Protein in Glioma Tumorigenesis Could Be through the Autophagic Mechanisms: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*, 24(2). doi:10.3390/ijms24021405
- Babar, Q., Saeed, A., Tabish, T. A., Pricl, S., Townley, H., & Thorat, N. (2022). Novel epigenetic therapeutic strategies and targets in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1868(12), 166552. doi:10.1016/j.bbadis.2022.166552
- Bortnik, S., Tessier-Cloutier, B., Leung, S., Xu, J., Asleh, K., Burugu, S., . . . Gorski, S. M. (2020). Differential expression and prognostic relevance of autophagy-related markers ATG4B, GABARAP, and LC3B in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 183(3), 525-547. doi:10.1007/s10549-020-05795-z
- Cai-McRae, X., & Karantza, V. (2015). p62: a hub of multiple signaling pathways in HER2-induced mammary tumorigenesis. *Mol Cell Oncol*, 2(3), e975035. doi:10.4161/23723556.2014.975035
- Cao, Q. H., Liu, F., Yang, Z. L., Fu, X. H., Yang, Z. H., Liu, Q., . . . Fan, X. J. (2016). Prognostic value of autophagy related proteins ULK1, Beclin 1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B and p62/SQSTM1 in gastric cancer. *Am J Transl Res*, 8(9), 3831-3847.

- Cha, S., & Kim, M. Y. (2023). The role of cellular prion protein in immune system. *BMB Rep*, 56(12), 645-650. doi:10.5483/BMBRep.2023-0151
- Chen, S., Jiang, Y. Z., Huang, L., Zhou, R. J., Yu, K. D., Liu, Y., & Shao, Z. M. (2013). The residual tumor autophagy marker LC3B serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 19(24), 6853-6862. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1617
- Chen, X., & Cubillos-Ruiz, J. R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 21(2), 71-88. doi:10.1038/s41568-020-00312-2
- Chen, X., Shi, C., He, M., Xiong, S., & Xia, X. (2023). Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 352. doi:10.1038/s41392-023-01570-w
- Chen, Y., Yi, H., Liao, S., He, J., Zhou, Y., & Lei, Y. (2025). LC3B: A microtubule-associated protein influences disease progression and prognosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 81, 16-26. doi:10.1016/j.cytogfr.2024.11.006
- Choi, Y. K., Kang, J. I., Han, S., Kim, Y. R., Jo, J., Kang, Y. W., . . . Kang, H. K. (2020). L-Ascorbic Acid Inhibits Breast Cancer Growth by Inducing IRE/JNK/CHOP-Related Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated p62/SQSTM1 Accumulation in the Nucleus. *Nutrients*, 12(5). doi:10.3390/nu12051351
- Cordani, M., Dando, I., Ambrosini, G., & Gonzalez-Menendez, P. (2024). Signaling, cancer cell plasticity, and intratumor heterogeneity. *Cell Commun Signal*, 22(1), 255. doi:10.1186/s12964-024-01643-5
- Dawood, A. A., & Altobje, M. A. (2020). Inhibition of N-linked Glycosylation by Tunicamycin May Contribute to The Treatment of SARS-CoV-2. *Microb Pathog*, 149, 104586. doi:10.1016/j.micpath.2020.104586
- Debnath, J., Gammoh, N., & Ryan, K. M. (2023). Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24(8), 560-575. doi:10.1038/s41580-023-00585-z
- Dery, M. A., Jodoin, J., Ursini-Siegel, J., Aleynikova, O., Ferrario, C., Hassan, S., . . . LeBlanc, A. C. (2013). Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 15(2), R22. doi:10.1186/bcr3398

- Devis-Jauregui, L., Eritja, N., Davis, M. L., Matias-Guiu, X., & Llobet-Navas, D. (2021). Autophagy in the physiological endometrium and cancer. *Autophagy*, 17(5), 1077-1095. doi:10.1080/15548627.2020.1752548
- Dias, M. V., Teixeira, B. L., Rodrigues, B. R., Sinigaglia-Coimbra, R., Porto-Carreiro, I., Roffe, M., . . . Martins, V. R. (2016). PRNP/prion protein regulates the secretion of exosomes modulating CAV1/caveolin-1-suppressed autophagy. *Autophagy*, 12(11), 2113-2128. doi:10.1080/15548627.2016.1226735
- Ding, M., Chen, Y., Lang, Y., & Cui, L. (2021). The Role of Cellular Prion Protein in Cancer Biology: A Potential Therapeutic Target. *Front Oncol*, 11, 742949. doi:10.3389/fonc.2021.742949
- Gao, J. J., & Swain, S. M. (2018). Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist*, 23(5), 556-565. doi:10.1634/theoncologist.2017-0535
- Gao, Z., Peng, M., Chen, L., Yang, X., Li, H., Shi, R., . . . Li, C. (2019). Prion Protein Protects Cancer Cells against Endoplasmic Reticulum Stress Induced Apoptosis. *Virol Sin*, 34(2), 222-234. doi:10.1007/s12250-019-00107-2
- Geng, F., Zhong, Y., Su, H., Lefai, E., Magaki, S., Cloughesy, T. F., . . . Guo, D. (2023). SREBP-1 upregulates lipophagy to maintain cholesterol homeostasis in brain tumor cells. *Cell Rep*, 42(7), 112790. doi:10.1016/j.celrep.2023.112790
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 22(23). doi:10.3390/ijms222312827
- Gil, J., Ramsey, D., Szmida, E., Leszczynski, P., Pawlowski, P., Bebenek, M., & Sasiadek, M. M. (2017). The BAX gene as a candidate for negative autophagy-related genes regulator on mRNA levels in colorectal cancer. *Med Oncol*, 34(2), 16. doi:10.1007/s12032-016-0869-y
- Go, G., & Lee, S. H. (2020). The Cellular Prion Protein: A Promising Therapeutic Target for Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(23). doi:10.3390/ijms21239208
- Hara, H., & Sakaguchi, S. (2020). N-Terminal Regions of Prion Protein: Functions and Roles in Prion Diseases. *Int J Mol Sci*, 21(17). doi:10.3390/ijms21176233
- Hare, S. H., & Harvey, A. J. (2017). mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am J Cancer Res*, 7(3), 383-404.

- Hirsch, T. Z., Martin-Lannere, S., & Mouillet-Richard, S. (2017). Functions of the Prion Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 150, 1-34. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.06.001
- Ho, C. J., Samarasekera, G., Rothe, K., Xu, J., Yang, K. C., Leung, E., . . . Gorski, S. M. (2021). Puncta intended: connecting the dots between autophagy and cell stress networks. *Autophagy*, 17(4), 1028-1033. doi:10.1080/15548627.2020.1775394
- Huang, M., Liu, W., Cheng, Z., Li, F., Kong, Y., Yang, C., . . . Chen, C. (2024). Targeting the HECTD3-p62 axis increases the radiosensitivity of triple negative breast cancer cells. *Cell Death Discov*, 10(1), 462. doi:10.1038/s41420-024-02154-5
- Huang, X., Yao, J., Liu, L., Chen, J., Mei, L., Huangfu, J., . . . Yang, A. (2023). S-acylation of p62 promotes p62 droplet recruitment into autophagosomes in mammalian autophagy. *Mol Cell*, 83(19), 3485-3501 e3411. doi:10.1016/j.molcel.2023.09.004
- Hwang, H. J., & Kim, Y. K. (2023). The role of LC3B in autophagy as an RNA-binding protein. *Autophagy*, 19(3), 1028-1030. doi:10.1080/15548627.2022.2111083
- Jeong, S. J., Zhang, X., Rodriguez-Velez, A., Evans, T. D., & Razani, B. (2019). p62/SQSTM1 and Selective Autophagy in Cardiometabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal*, 31(6), 458-471. doi:10.1089/ars.2018.7649
- Judasz, E., Lisiak, N., Kopczynski, P., Taube, M., & Rubis, B. (2022). The Role of Telomerase in Breast Cancer's Response to Therapy. *Int J Mol Sci*, 23(21). doi:10.3390/ijms232112844
- Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., . . . Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int*, 2022, 9605439. doi:10.1155/2022/9605439
- Kim, H. M., & Koo, J. S. (2023). The Role of Autophagy in Breast Cancer Metastasis. *Biomedicines*, 11(2). doi:10.3390/biomedicines11020618
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., . . . Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *EMBO J*, 40(19), e108863. doi:10.15252/emboj.2021108863

- Koh, M., Lim, H., Jin, H., Kim, M., Hong, Y., Hwang, Y. K., . . . Moon, A. (2024). ANXA2 (annexin A2) is crucial to ATG7-mediated autophagy, leading to tumor aggressiveness in triple-negative breast cancer cells. *Autophagy*, 20(3), 659-674. doi:10.1080/15548627.2024.2305063
- Kopeina, G. S., & Zhivotovsky, B. (2022). Programmed cell death: Past, present and future. *Biochem Biophys Res Commun*, 633, 55-58. doi:10.1016/j.bbrc.2022.09.022
- Kovac, V., & Curin Serbec, V. (2022). Prion Protein: The Molecule of Many Forms and Faces. *Int J Mol Sci*, 23(3). doi:10.3390/ijms23031232
- Lebeaupin, C., Blanc, M., Vallee, D., Keller, H., & Bailly-Maitre, B. (2020). BAX inhibitor-1: between stress and survival. *FEBS J*, 287(9), 1722-1736. doi:10.1111/febs.15179
- Lefort, S., Joffre, C., Kieffer, Y., Givel, A. M., Bourachot, B., Zago, G., . . . Mechta-Grigoriou, F. (2014). Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy*, 10(12), 2122-2142. doi:10.4161/15548627.2014.981788
- Legname, G. (2017). Elucidating the function of the prion protein. *PLoS Pathog*, 13(8), e1006458. doi:10.1371/journal.ppat.1006458
- Li, M., Feng, J., Zhao, K., Huang, T., Zhang, B., Yang, Y., Shao, G. (2024). LSD1 Demethylates and Destabilizes Autophagy Protein LC3B in Ovarian Cancer. *Biomolecules*, 14(11). doi:10.3390/biom14111377
- Li, Z., Liu, M., Li, J., Yan, G., & Xu, X. (2025). Diosmetin alleviates AFB1-induced endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis via PI3K/AKT pathway in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 292, 117997. doi:10.1016/j.ecoenv.2025.117997
- Limone, A., Maggisano, V., Sarnataro, D., & Bulotta, S. (2023). Emerging roles of the cellular prion protein (PrP(C)) and 37/67 kDa laminin receptor (RPSA) interaction in cancer biology. *Cell Mol Life Sci*, 80(8), 207. doi:10.1007/s00018-023-04844-2
- Lin, Y., Jiang, M., Chen, W., Zhao, T., & Wei, Y. (2019). Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother*, 118, 109249. doi:10.1016/j.biopha.2019.109249

- Linder, B., & Kogel, D. (2019). Autophagy in Cancer Cell Death. *Biology (Basel)*, 8(4). doi:10.3390/biology8040082
- Liu, M., Honjo, M., Yamagishi, R., & Aihara, M. (2025). Effects of Brimonidine, Latanoprost, and Omidenepag on Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Fibrosis in Human Trabecular Meshwork Cells. *Biomolecules*, 15(3). doi:10.3390/biom15030389
- Liu, S., Yao, S., Yang, H., Liu, S., & Wang, Y. (2023). Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*, 14(10), 648. doi:10.1038/s41419-023-06154-8
- Meslin, F., Hamai, A., Gao, P., Jalil, A., Cahuzac, N., Chouaib, S., & Mehrpour, M. (2007). Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Res*, 67(22), 10910-10919. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0512
- Milan, G., Romanello, V., Pescatore, F., Armani, A., Paik, J. H., Frasson, L., . . . Sandri, M. (2015). Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun*, 6, 6670. doi:10.1038/ncomms7670
- Miller, D. R., & Thorburn, A. (2021). Autophagy and organelle homeostasis in cancer. *Dev Cell*, 56(7), 906-918. doi:10.1016/j.devcel.2021.02.010
- Mondal, G., Gonzalez, H., Marsh, T., Leidal, A. M., Vlahakis, A., Phadatare, P. R., . . . Debnath, J. (2025). Autophagy-targeted NBR1-p62/SQSTM1 complexes promote breast cancer metastasis by sequestering ITCH. *Nat Cell Biol*. doi:10.1038/s41556-025-01689-8
- Moon, J. H., Lee, J. H., Nazim, U. M., Lee, Y. J., Seol, J. W., Eo, S. K., . . . Park, S. Y. (2016). Human prion protein-induced autophagy flux governs neuron cell damage in primary neuron cells. *Oncotarget*, 7(21), 29989-30002. doi:10.18632/oncotarget.8802
- Mouillet-Richard, S., Ghazi, A., & Laurent-Puig, P. (2021). The Cellular Prion Protein and the Hallmarks of Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(19). doi:10.3390/cancers13195032
- Niklaus, M., Adams, O., Berezowska, S., Zlobec, I., Graber, F., Slotta-Huspenina, J., . . . Langer, R. (2017). Expression analysis of LC3B and p62 indicates intact activated autophagy is associated with an unfavorable prognosis in colon cancer. *Oncotarget*, 8(33), 54604-54615. doi:10.18632/oncotarget.17554

- Ong, G., Ragetli, R., Mnich, K., Doble, B. W., Kammouni, W., & Logue, S. E. (2024). IRE1 signaling increases PERK expression during chronic ER stress. *Cell Death Dis*, 15(4), 276. doi:10.1038/s41419-024-06663-0
- Palabiyik, A. A. (2025). The role of Bcl-2 in controlling the transition between autophagy and apoptosis (Review). *Mol Med Rep*, 32(1). doi:10.3892/mmr.2025.13537
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282(33), 24131-24145. doi:10.1074/jbc.M702824200
- Qi, J. L., He, J. R., Liu, C. B., Jin, S. M., Yang, X., Bai, H. M., & Ma, Y. B. (2022). SQSTM1/p62 regulate breast cancer progression and metastasis by inducing cell cycle arrest and regulating immune cell infiltration. *Genes Dis*, 9(5), 1332-1344. doi:10.1016/j.gendis.2021.03.008
- Rakesh, R., PriyaDharshini, L. C., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2022). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1868(7), 166400. doi:10.1016/j.bbadis.2022.166400
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71-85.
- Remsik, J., Fedr, R., Navratil, J., Bino, L., Slabakova, E., Fabian, P., . . . Soucek, K. (2018). Plasticity and intratumoural heterogeneity of cell surface antigen expression in breast cancer. *Br J Cancer*, 118(6), 813-819. doi:10.1038/bjc.2017.497
- Requena, J. R. (2020). The protean prion protein. *PLoS Biol*, 18(6), e3000754. doi:10.1371/journal.pbio.3000754
- Ryskalin, L., Biagioni, F., Busceti, C. L., Giambelluca, M. A., Morelli, L., Frati, A., & Fornai, F. (2021). The Role of Cellular Prion Protein in Promoting Stemness and Differentiation in Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(2). doi:10.3390/cancers13020170
- Ryskalin, L., Busceti, C. L., Biagioni, F., Limanaqi, F., Familiari, P., Frati, A., & Fornai, F. (2019). Prion Protein in Glioblastoma Multiforme. *Int J Mol Sci*, 20(20). doi:10.3390/ijms20205107

- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3460-3470. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028
- Senft, D., & Ronai, Z. A. (2015). UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40(3), 141-148. doi:10.1016/j.tibs.2015.01.002
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., . . . Committee, E. G. (2015). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 26 Suppl 5, v8-30. doi:10.1093/annonc/mdv298
- Sigurdson, C. J., Bartz, J. C., & Glatzel, M. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms of Prion Disease. *Annu Rev Pathol*, 14, 497-516. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013109
- Tang, Y., Kay, A., Jiang, Z., & Arkin, M. R. (2022). LC3B Binds to the Autophagy Protease ATG4b with High Affinity Using a Bipartite Interface. *Biochemistry*, 61(21), 2295-2302. doi:10.1021/acs.biochem.2c00482
- Volkman, K., Lucas, J. L., Vuga, D., Wang, X., Brumm, D., Stiles, C., . . . Patterson, J. B. (2011). Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease. *J Biol Chem*, 286(14), 12743-12755. doi:10.1074/jbc.M110.199737
- Vranic, S., Beslija, S., & Gatalica, Z. (2021). Targeting HER2 expression in cancer: New drugs and new indications. *Bosn J Basic Med Sci*, 21(1), 1-4. doi:10.17305/bjbms.2020.4908
- Walter, F., O'Brien, A., Concannon, C. G., Dussmann, H., & Prehn, J. H. M. (2018). ER stress signaling has an activating transcription factor 6alpha (ATF6)-dependent "off-switch". *J Biol Chem*, 293(47), 18270-18284. doi:10.1074/jbc.RA118.002121
- Xie, Q., Liu, Y., & Li, X. (2020). The interaction mechanism between autophagy and apoptosis in colon cancer. *Transl Oncol*, 13(12), 100871. doi:10.1016/j.tranon.2020.100871
- Xu, Y., Zhang, J., Tian, C., Ren, K., Yan, Y. E., Wang, K., . . . Dong, X. P. (2014). Overexpression of p62/SQSTM1 promotes the degradations of abnormally accumulated PrP mutants in cytoplasm and relieves the associated cytotoxicities via autophagy-lysosome-dependent way. *Med Microbiol Immunol*, 203(2), 73-84. doi:10.1007/s00430-013-0316-z

- Yamamoto, S., & Egashira, N. (2021). Pathological Mechanisms of Bortezomib-Induced Peripheral Neuropathy. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 888. <https://doi.org/10.3390/ijms22020888>
- Yang, C. C., Chuang, F. C., Chang, C. L., Huang, C. R., Chen, H. H., Yip, H. K., & Chen, Y. T. (2023). Melatonin-Assisted Cisplatin Suppresses Urinary Bladder Cancer Cell Proliferation and Growth through Inhibiting PrP(C)-Regulated Cell Stress and Cell Proliferation Signaling. *Int J Mol Sci*, 24(4). doi:10.3390/ijms24043353
- Yang, J., & Yao, S. (2015). JNK-Bcl-2/Bcl-xL-Bax/Bak Pathway Mediates the Crosstalk between Matrine-Induced Autophagy and Apoptosis via Interplay with Beclin 1. *Int J Mol Sci*, 16(10), 25744-25758. doi:10.3390/ijms161025744
- Yang, X., Zhang, Y., Zhang, L., He, T., Zhang, J., & Li, C. (2014). Prion protein and cancers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46(6), 431-440. doi:10.1093/abbs/gmu019
- Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5(3), 412-424. doi:10.5306/wjco.v5.i3.412
- You, S., Li, W., & Guan, Y. (2018). Tunicamycin inhibits colon carcinoma growth and aggressiveness via modulation of the ERK-JNK-mediated AKT/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*, 17(3), 4203-4212. doi:10.3892/mmr.2018.8444
- Yousaf, S., Ahmad, M., Wu, S., Zia, M. A., Ahmed, I., Iqbal, H. M. N., . . . Rehman, S. U. (2022). Cellular Prion Protein Role in Cancer Biology: Is It A Potential Therapeutic Target? *Biomedicines*, 10(11). doi:10.3390/biomedicines10112833
- Yu, W., Wang, B., Zhou, L., & Xu, G. (2021). Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated p62 Downregulation Inhibits Apoptosis via c-Jun Upregulation. *Biomol Ther (Seoul)*, 29(2), 195-204. doi:10.4062/biomolther.2020.089
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., & Bogoyevitch, M. A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(3), 793–835. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-14>

- Zhang, J., Xiang, Q., Wu, M., Lao, Y. Z., Xian, Y. F., Xu, H. X., & Lin, Z. X. (2023). Autophagy Regulators in Cancer. *Int J Mol Sci*, 24(13). doi:10.3390/ijms241310944
- Zhang, Y., Yang, X., Ge, X., & Zhang, F. (2019). Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice. *Biomed Pharmacother*, 109, 726-733. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.161
- Zheng, W., Xie, W., Yin, D., Luo, R., Liu, M., & Guo, F. (2019). ATG5 and ATG7 induced autophagy interplays with UPR via PERK signaling. *Cell Commun Signal*, 17(1), 42. doi:10.1186/s12964-019-0353-3



ÖZGEÇMİŞ



-Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Deneysel Fen Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEFAM) (Kısmi zamanlı) (2016-2017)
-Serox İlaç Makina Kimyasal San. ve Tic.Ltd.Şti. Teknokent-Manisa CBÜ ofisi
KOSGEB Projesi Ar-Ge Elemanı (Ocak 2019- Aralık 2020)

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2011-2015
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2015-2018
Doktora	Moleküler Biyoloji	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2019-2025

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı: Prion Protein Anlatımı Baskılanmış İlaça Dirençli H69 Hücre Hattında Hücre Ölüm Tiplerinin Araştırılması (18.12.2018)
Danışman: Prof. Dr. Erdal BALCAN

Doktora Tezi/S.Yeterlik Çalışması/Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı ve Danışmanı: Meme Kanseri Prion Proteinlerinin Otofajik Etkilerinin Araştırılması. Danışman: Prof. Dr. Erdal BALCAN

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğr.Gör.	Avrasya Üniversitesi (SHMYO-TLT Programı)	2023-

Projelerde Yaptığı Görevler:

-Meme Kanseri Prion Proteinlerinin Otofajik Etkilerinin Araştırılması Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (Proje No: 8382), Proje Yöneticisi: Dr.Öğr.Üyesi Hanife Ayşegül MENDİ; Araştırmacı (2023-2025).

-Meme Kanseri Hücre Hattında Kediotu Kökünün Programlanmış Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Araştırılması Yükseköğretim Kurumları tarafından

destekli bilimsel araştırma projesi (Proje No: 2021-121), Proje Yöneticisi: Prof. Dr. E. Balcan; Araştırmacı (Tamamlandı, 2022).

-II 6, Actn 3, Ace, Ckmm, Mlck, Bdnf, Cntfr ve Gnb 3 Polimorfizmlerin Kuvvet Duyusu

Keskinliği İle İlişkileri Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (Proje No: 2020-009), Proje Yöneticisi: Dr. Öğr. Ü. M. Altun, Araştırmacı (Tamamlandı, 2022)

-Prion Protein Anlatımı Baskılanmış İlaça Dirençli H69 Hücre Hattında Hücre Ölüm Tiplerinin Araştırılması Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi (Proje No: 2016160), Proje Yöneticisi: Prof. Dr. E. Balcan; Araştırmacı (Tamamlandı, 2018).

Son iki yılda verdiği lisans ve lisansüstü düzeydeki dersler:

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	Haftalık Saati		Öğrenci Sayısı
			Teorik	Uygulama	
2023-2024	Güz	Hastalık Bilgisi	2		30
		Laboratuvar Güvenliği	2		90
		Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2		50
	Bahar	Beslenme ve Genetik	2		40
		Genel Biyokimya	2		160
		Fizyoloji	3		80
		Klinik Biyokimya	2		40
		Sistem Hastalıkları	2		150
		Biyokimya	2		120
2024-2025	Güz	Genel Biyoloji	2		90
		Tıbbi Mikrobiyoloji II	2	2	60
		Laboratuvar Güvenliği	2		70
		Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2		40
	Bahar	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2		60
		Klinik Biyokimya	2		60
		Beslenme ve Genetik	2		20
		Sterilizasyon Esasları	2		100

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. -Tuğrul B, Balcan E, **Öztel Z**, Çöllü F, Gürcü B. Prion protein-dependent regulation of p53-MDM2 crosstalk during endoplasmic reticulum stress and doxorubicin treatments might be essential for cell fate in human breast cancer cell line, MCF-7. Exp Cell Res. 2023 May 26;429(1):113656. doi: 10.1016/j.yexcr.2023.113656. Epub ahead of print. PMID: 37245583 (2023) (SCI, SCI-Expanded).

A2-Başımoğlu Koca, Y., Koca, S., **Öztel, Z.**, & Balcan, E. Determination of histopathological effects and myoglobin, periostin gene-protein expression levels in Danio rerio muscle tissue after acaricide yoksoorun-5EC (hexythiazox) application. Drug and Chemical Toxicology, 1-9. (doi: <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.2007945> (2021) (SCI, SCI-Expanded).

A3-Balcan E., **Öztel Z.**, Polevshchikov A. Endoplasmic Reticulum Affect the Localization of Prion Protein in the Small Intestine and Mesenteric Lymph Nodes. Arch. Biol. Sci. 2020;72(4):503-513 (doi:<https://doi.org/10.2298/ABS200727044B>.) (2020) (SCI, SCIEExpanded).

A4-Öztel Z., Gazan S., Balcan E. Tunicamycin-induced Endoplasmic Reticulum-stress in the Small Intestine. Biotech & Histochem 96:7,507-519, (doi:<https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1823481>) (SCI, SCI-Expanded).

A5 -Birkan T., Şahin M., **Öztel Z.**, Balcan E. Do prion protein gene polymorphisms induce apoptosis in non-mammals? J. Biosciences. 41, 97-107; 2016 (doi: 10.1007/s12038-01595847) (2016) (SCI, SCIEExpanded).

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

D1. -ALTUN M., GÖLMEN M.H., ÖZGÜNEŞ Ş., **ÖZTEL Z.**, BATIR S. Acute responses of strength-related gene expressions to maximum strength and force sense acuity Turk J Med Sci (2024) 54: doi:/sag-2308-101 (2023)

D2 -ALPSOY, D., TUĞRUL, B., **ÖZTEL, Z.**, BALCAN, E. (2023). The Root Extracts of Valeriana Officinalis L. may Control Programmed Cell Death Pathways in Breast Cancer Cell Line, MCF-7. Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(4), 289-295. <https://doi.org/10.34087/cbusbed.125711>

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. - Balcan, E., Birkan, T., **Öztel, Z.** Prion Proteini Kodlayan Gendeki Tek Nukleotid Polimorfizmleri İle Apoptozis Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Hücre Ölüm ve Araştırma Derneği Uluslararası Katılımlı Nörodejenerasyon/Nörorejenerasyon Çalıştayı Özet Kitabı S:42. 4-5 Mayıs 2018, İstanbul (Poster sunumu).

- CRISPR/Cas9 Sistemi ile Memeli Hücre Hatlarında Gen Düzenlemesi Çalıştayı (2019-Manisa Celal Bayar Üniversitesi) (Görevli öğrenci).

F. Sertifikalar

F1. – Eğiticilerin Eğitimi Sertifikası (ÇOMÜ,2024)