



T.C.

**BARTIN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİTOKONDRIYAL TÜREVLİ PEPTİD (MOTS-C)'İN İNSAN  
KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SEVİLAY GÜNAY**

**DANIŞMAN**

**DOÇ. DR. YAVUZ ERDEN**

**BARTIN-2022**





**T.C.**  
**BARTIN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MİTOKONDRIYAL TÜREVLİ PEPTİD (MOTS-C)'İN İNSAN KOLON KANSERİ**  
**HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Sevilay GÜNAY**

**BARTIN-2022**

## BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Yavuz ERDEN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Mitokondriyal Türevli Peptid (MOTS-c)’in İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

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

Sevilay GÜNAY

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmama maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK Proje No:318S235), teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, maddi, manevi desteğini esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok değerli danışmanım Doç. Dr. Yavuz ERDEN'e, tecrübelerini her zaman benimle paylaşan Doç. Dr. Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU'na, Doç. Dr. Suat TEKİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem TEKİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Fahriye ZEMHERİ NEVRUZ'a, diğer tüm hocalarıma ve akademik süreçteki yol göstericiliğinden dolayı Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgi, hoşgörü ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemedi bugünlere gelmemi sağlayarak tüm eğitim öğretim hayatım boyunca yanımda olan başta babam Mehmet GÜNAY'a, annem Güllü GÜNAY'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevilay GÜNAY

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS

### MİTOKONDRIYAL TÜREVLİ PEPTİD (MOTS-C)'İN İNSAN KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevilay GÜNAY

Bartın Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yavuz Erden

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın-2022, 83

Mitokondriyal-türevli peptid (MOTS-c), mitokondriyal DNA tarafından kodlanan bir hormondur. MOTS-c'nin *de novo* purin biyosentezini ve hücrede folat siklusunu inhibe ettiği bildirilmektedir. MOTS-c'nin çekirdeğe yerleştiği ve metabolik stresin ardından 5'-adenosin monofosfatla aktifleştirilmiş protein kinaza (AMPK) bağımlı bir şekilde nükleer gen ekspresyonunu düzenlediğini gösterilmiştir. AMPK'nın, başta kanser dahil olmak üzere metabolik hastalıklar için potansiyel bir terapötik hedef olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada MOTS-c'nin kolorektal kanser hücre serisi üzerine sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada MOTS-c ve 5-Fluorourasil (5-FU)'in farklı konsantrasyonları insan kolon kanseri hücre serisi (Caco-2) ve sağlıklı kolon epitel hücre serisine (FHC) değişik zaman periyotlarında uygulandı. Uygulamalar sonrası hücrelerde canlılık düzeyindeki değişimler MTT analizi ile belirlendi. Bileşiklerin genotoksik etkisi tek hücre jel elektroforez (Comet) analizleriyle ortaya kondu. Apoptotik hücre ölümü düzeyi TUNEL boyama sonucu

belirlendi. Ayrıca çalışmada bileşiklerin apoptoz ve otofaji süreçlerinde görev alan proteinler üzerine etkileri Western blot analizleriyle belirlendi.

MOTS-c uygulaması Caco-2 hücrelerinde canlılığı 24. saatte önemli düzeyde azalttı ( $p<0.05$ ). MOTS-c uygulamasından sonra hücrelerde DNA hasar seviyesi ve TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubu ile benzer seviyedeydi. Buna karşın uygulanan 5-FU DNA hasarını indükledi ve TUNEL pozitif hücre sayısını kontrol grubuna kıyasla artırdı ( $p<0.05$ ).

MOTS-c uygulaması Caco-2 hücrelerinde TSC2 ve ULK1 protein düzeylerinde artışa neden olurken ( $p<0.05$ ), Bcl-2, Bax, kaspase-3 ve p53 protein düzeylerinde anlamlı değişime neden olmadı. Bunun aksine 5-FU uygulaması p53 ve Bax protein seviyesini arttırdı, anti-apoptotik Bcl-2 ifadesini azalttı.

Bu sonuçlar MOTS-c'nin ULK1 ve TSC2 protein ifadelerini artırarak Caco-2 hücrelerinde hücre ölümüne aracılık ettiğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Genotoksisite, Kanser, MOTS-c, Otofaji, Sitotoksisite

**Bilim Alanı Kodu:** 401.01.05

# **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

## **INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF MITOCHONDRIAL DERIVED PEPTIDE (MOTS-C) ON HUMAN COLON CANCER CELL LINE**

**Sevilay GUNAY**

**Bartın University**

**Graduate School**

**Department of Biology**

**Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yavuz ERDEN**

**Co-Advisor: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL**

**Bartın-2022, pp: 83**

Mitochondrial-derived peptide (MOTS-c) is a hormone encoded by mitochondrial DNA. It is reported that MOTS-c inhibits de novo purine biosynthesis and folate cycle in the cell. It has been shown that MOTS-c localizes to the nucleus and regulates nuclear gene expression in a 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent manner following metabolic stress. AMPK has been shown to be a potential therapeutic target for metabolic diseases, particularly cancer.

In this study, we aimed to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of MOTS-c on colorectal cancer cell line. In the study, different concentrations of MOTS-c and 5-Fluorouracil (5-FU) were applied to human colon cancer cell line (Caco-2) and non-tumorigenic colon epithelial cell line (FHC) at different time periods. The changes in the viability level of the cells after the treatments were determined by MTT analysis. The



genotoxic effect of the compounds was demonstrated by single cell gel electrophoresis (Comet) analyzes. Apoptotic cell death level was determined by TUNEL staining. In addition, the effects of compounds on proteins acted role in apoptosis and autophagy processes were determined by Western blot analysis.

MOTS-c application significantly decreased the viability of Caco-2 cells at 24 hours ( $p < 0.05$ ). After MOTS-c application, the DNA damage level and TUNEL positive cell count in the cells were similar to the control group. In contrast, administered 5-FU induced DNA damage and increased TUNEL positive cell count compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

While MOTS-c administration caused an increase in TSC2 and ULK1 protein levels in Caco-2 cells ( $p < 0.05$ ), it did not cause a significant change in Bax, Bcl-2, caspase-3, and p53 protein levels. In contrast, 5-FU administration increased p53 and Bax protein levels and decreased anti-apoptotic Bcl-2 expression.

These results show that MOTS-c mediates cell death in Caco-2 cells by increasing ULK1 and TSC2 protein expressions.

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

**Scientific Field Code:** 401.01.05

# İÇİNDEKİLER

BEYANNAME .....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLOLAR DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Mitokondriyal-Türevli Peptid (MOTS-c).....	4
2.1.1 Keşfi.....	4
2.1.2 Biyokimyasal Yapısı.....	5
2.1.3 MOTS-c'nin Doku Dağılımı.....	6
2.1.4 MOTS-c'nin Etki Mekanizması.....	6
2.2 Kolorektal Kanseri .....	8
2.2.1 Epidemiyoloji.....	10
2.2.2 Tedavi Yaklaşımları.....	10
2.2.3 Caco-2 Hücre Hattı .....	11
2.3 Hücre Ölümü.....	12
2.3.1 Apoptoz .....	13
2.3.2 Otofaji .....	18
3. MATERYAL VE METOT .....	21
3.1 Araştırmanın Yapıldığı Merkez .....	21
3.2 Çalışmada Kullanılan Hücre Serileri ve Kültür Ortamları.....	21
3.2.1 Caco-2 Hücre Serisi (ATCC HTB-37).....	21
3.2.2 FHC Hücre Serisi (ATCC CRL-1831) .....	21
3.4 Hücrelerin Çoğaltılması ve Ekimi .....	22
3.5 Test Bileşiklerinin Hazırlanması .....	23
3.6 Test Bileşikleri ile Hücrelerin Muamelesi .....	23
3.7 Canlılık Düzeyinin Belirlenmesi (MTT Testi).....	23
3.7.1 MTT'nin Hazırlanması ve Uygulanması .....	23

3.8 Genotoksisite Analizi .....	24
3.9 Hücre Ölümünde Apoptozun Belirlenmesi (TUNEL Analizi).....	25
3.10 Western Blot Analizi.....	27
3.10.1 Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.10.2 Jellerin Hazırlanması.....	30
3.10.3 Hücre İzolasyonu.....	30
3.11 Analizin Yapılması.....	31
3.12 Verilerin İstatistiksel Analizi .....	32
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
4.1 MTT Analizlerin Sonuçları.....	33
4.1.1 MOTS-C'nin Caco-2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	33
4.1.2 5-FU'nun Caco-2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	34
4.1.3 MOTS-C'nin FHC Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri.....	36
4.1.4 5FU'nun FHC Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri .....	38
4.2 Comet Analizlerinde Uygulama Sürelerinin ve Kullanılan Dozların Belirlenmesi .....	41
4.2.1 Caco-2 Comet Analiz Sonuçları.....	42
4.2.2 FHC Comet Analiz Sonuçları .....	44
4.3 TUNEL Analiz Sonuçları .....	46
4.3.1 Caco-2 Hücreleri TUNEL Analiz Sonuçları.....	46
4.3.2 FHC Hücreleri TUNEL Analiz Sonuçları .....	46
4.4 Western Analiz Sonuçları .....	49
4.4.1 Caco-2 Hücrelerinde Protein Seviyelerindeki Değişimler .....	49
4.4.2 FHC Hücrelerinde Protein Seviyelerindeki Değişimler .....	51
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>53</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>58</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
2.1: MDP'lerin sınıflandırılması ve işlevi.....	5
2.2: MOTS-c'nin açık okuma çerçevesi.....	6
2.3: Metiyonin folat döngüsü ve buna bağlı pürin biyosentezinin şematik gösterimi .....	7
2.4: MOTS-c'in metabolik homeostaza etkisi.....	8
2.5: Kolorektal kanser için değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörlerinin listesi.....	9
2.6: İçsel apoptoz.....	15
2.7: Dışsal apoptoz .....	17
2.8: Otofaji ve otofajik hücre ölümü .....	19
2.9: Hücrelerdeki üç tip otofaji.....	20
3.1: Hücrelerin büyütülmesi (A) ve 96 kuyucuklu plakalara ekimi (B).....	22
3.2: Comet analizi basamakları .....	25
3.3: TUNEL reaksiyonunda dNTP etiketleme seçenekleri. ....	26
3.4: Western blot analizinin basamakları. ....	31
4.1: MOTS-c uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). ....	33
4.2: 10 µM MOTS-c uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra Caco-2 hücre canlılık düzeyi (%). ....	34
4.3: 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). ....	35
4.4: 100 µM 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. ....	36
4.5: MOTS-c uygulamasından sonra FHC hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). ....	37
4.6: 10 µM MOTS-c uygulamasından sonra FHC hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. ....	38
4.7: 5-FU uygulamasından sonra FHC hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). ....	39
4.8: 100 µM 5-FU uygulamasından sonra FHC hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. ....	40

<b>4.9:</b> Caco-2 hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 24 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. ....	43
<b>4.10:</b> FHC hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 24 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. ....	45
<b>4.11:</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. ....	47
<b>4.12:</b> MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra FHC hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. ....	48
<b>4.13:</b> Caco-2 hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri. ....	50
<b>4.14:</b> FHC hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri. ....	52

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>No</b>	<b>No</b>
<b>3.1:</b> TUNEL boyama solüsyonunun hazırlanması. ....	27
<b>3.2:</b> SDS jellerin hazırlanması.....	30
<b>3.3:</b> Çalışmada kullanılan antikor bilgileri. ....	32
<b>4.1:</b> Hücre serilerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU için IC <sub>50</sub> değerlikleri (µM). ....	41
<b>4.2:</b> Comet analizlerinde kullanılan MOTS-c ve 5-FU bileşiklerinin doz bilgileri.....	41
<b>4.3:</b> Caco-2 hücresi comet analiz sonuçları.....	42
<b>4.4:</b> FHC hücresi comet analiz sonuçları.....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{L}$	Mikro Litre
$\mu\text{m}$	Mikro Metre
$\mu\text{M}$	Mikro Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
ng	Nano Gram

### KISALTMALAR

AICAR	5-Aminomidazol-4-Karboksamid Ribonukleotid
AMPK	5'-Adenosin Monofosfatla Aktifleştirilmiş Protein Kinaza
APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive Edeci Faktör 1
Caco-2	Kanser Coli-2
CARD	Kaspaz Toplama Alanı
CMA	Şaperon Aracılı Otofaji
DR	Apoptozun Ölüm Reseptörü
FADD	Fas ile İlişkili Ölüm Alanı
FBS	Fetal Sığır Serumumu
IAP	Apoptoz Proteinlerinin İnhibitörleri
MDP	Mitokondriyal Türevli Peptitleri
MOMP	Mitokondriyal Dış Zar
MOTS-c	12S rRNA Tip-c'nin Mitokondriyal Açık Okuma Çerçevesi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NOXA	Forbol-12-Miristat-13-Asetat Kaynaklı Protein
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PCD	Programlanmış Hücre Ölümü
RCD	Düzenlenmiş Hücre Ölümü
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

SMAC	İkinci Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
sORF	Mitokondriyal DNA Kısa Açık Okuma Çerçevesi
TNF	Tümör Nekroz Faktör



# 1.GİRİŞ

Kanser bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve sonrasında genellikle diğer doku veya organlara metastazı ile karakterize olan büyük bir sağlık problemidir. Bu hastalık süreci mutasyonlar, hormonlar, DNA hasarı ve bağışıklık sistemine bağlı koşullar ile iç faktörlerden kaynaklanabileceği gibi ultraviyole ve iyonize radyasyon gibi dış faktörler ile de tetiklenebilir (Jackson ve Loeb 2001). Oldukça karmaşık bir süreç içeren bu hastalığın kesin olarak bir tedavi yöntemi günümüzde maalesef mevcut değildir. Kanser tedavisinde başta kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmakla beraber bunlara ek olarak son zamanlarda hastalara daha az zarar veren tedaviler uygulamayı hedef almışlardır. (Huang vd. 2009; Harris vd. 2013; i Ferrer vd. 2018).

Kolorektal kanser eskiye kıyasla daha kolay teşhis edilen olgulara sahip olmasının yanı sıra, günümüzde dünyanın dördüncü en ölümcül kanseridir (Haraldsdottir vd. 2014). Hem kalıtsal hem de çevresel risk faktörleri kolorektal kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Bu faktörlerden bazıları, genetik unsurlar, sigara kullanımı, alkol tüketimi, obezite ve statin kullanımı gibi etkenler kolorektal kanser riskini artırmaktadır (Dekker vd. 2019).

Kanser tedavisinde kullanılan terapötikler, doğal ürünler, DNA-alkilleyici maddeler, hormon agonistleri/antagonistleri ve antimetabolitleri de içerisine alan geniş bir alanı kapsar. Ancak bunların birçoğu, normal hücreler üzerine de istenmeyen etkiler oluşturmaktadır (Kalyanaraman vd. 2002; Al-Benna vd. 2011). Kanser tedavisi için modellenen ilaçlar, normalde kontrolsüz bölünen kanser hücrelerini hedef alırken aynı zamanda normal memeli hücreleri üzerine de benzer etkiler sergiler. Sonuç olarak tedavi gören bu kişilerde kan hücrelerinin üretiminde azalma, sindirim sistemi üzerindeki enflamasyon süreçlerin meydana gelmesi ve saç dökülmesi gibi istenmeyen yan etkiler görülür (Riedl vd. 2011). Ayrıca, bu bileşiklerin birçoğu hücre zarından geçip sitozole girdikten sonra kanserli hücrelerden bir direnç mekanizmasının bir parçası olarak hücrenin dışına geri taşınırlar (Perez-Tomas 2006). Antikanser ajanı hücre dışına taşıyan ilaç taşıyıcılarının artmasının yanı sıra, çoklu ilaç direncinin (MDR) başka mekanizmaları da tarif edilebilir. Bunlar, hücrenin zarar görmüş DNA hasarını onarma yeteneğini, stres koşullarına toleransı ve ilaç detoksifiye edici enzimlerin anormal ifadesini içerir (Gaspar vd. 2013). Bütün bu istenmeyen durumların meydana gelmesi ve hücrelerin tedaviye karşı göstermiş olduğu direnç

neticesinde, bilim insanları kanserin tedavisi için yeni yöntemlere ve ilaç tasarımına/geliştirilmesine yönelmişlerdir.

MOTS-c, mtDNA tarafından kodlanan bir peptittir. İlk kez Lee vd. tarafından 2015 yılın da tespit edilen MOTS-c, mtDNA transkripsiyonu sonucu sitoplazmada translasyona uğrar ve hücrel metabolizmada rol aldığı bildirilmiştir. MOTS-c, kemirgenlerde ve insanlarda çeşitli dokularda ve dolaşımında (plazma) eksprese edilir. MOTS-c'nin de novo purin biyosentezini ve hücrede folat siklusunu inhibe ettiğini bildirmektedir (Lee vd. 2015). Yapılan bazı çalışmalarda, MOTS-c'nin çekirdeğe yerleştiğini ve metabolik stresin ardından 5'-adenosin monofosfatla aktifleştirilmiş protein kinaza (AMPK) bağımlı bir şekilde nükleer gen ekspresyonunu düzenlediğini gösterilmiştir (Kim vd. 2018).

AMPK, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunur. AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), hücrel enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. AMPK, hücre içi adenin nükleotid seviyelerindeki değişikliklere yanıt verir ve ATP'ye göre AMP/ADP'deki bir artışla aktive olur (Carling 2017). AMPK, hücre içi enerji dengesinin korunmasındaki rolüne ek olarak, tüm vücut enerji metabolizmasını düzenler. Enerji homeostazını kontrol etmedeki kilit rolü göz önüne alındığında, AMPK, başta kanser dahil olmak üzere metabolik hastalıklar için potansiyel bir terapötik hedef olduğunu göstermiştir. Kanser hücrelerinde diğer hücrelerden farklı olarak metabolik değişiklikler mevcuttur ve AMPK kanserdeki bu düzensiz süreçleri önleyebilir (Cool vd. 2006; Giordanetto ve Karis 2012). AMPK, hücre büyümesini, lipid, glikoz metabolizması ve otofaji dahil olmak üzere diğer birçok hücrel süreci kontrol eder (Herzig ve Shaw 2018). AMPK'nın iyi bilinen yollarından biri, PI3K-AKT ve Ras-Raf-MEK-ERK sinyal yollarının aşağı akışında da etkinleştirilebilen mTOR'un aşağı regülasyonuna yol açan TSC1/TSC2 kompleksinden geçer (Hosokawa vd. 2009; Jung vd. 2009). AMPK aktivasyonu, mTOR'un tümörjenik etkilerini TSC1/TSC2 kompleksi yoluyla aşağı regüle eder, böylece artan apoptoz ve otofaji aracılı hücre ölümüne yol açar (Anwar vd. 2014). mTOR yolu, tümör baskılayıcılar p53 ve p27 üzerindeki etkisiyle apoptozu baskılar. Ayrıca, UNC-51 benzeri kinaz 1 (ULK1) ve ULK2'yi baskılayarak da otofajiyi inhibe eder (Ansari vd. 2018). Bu etkilerinden dolayı AMPK'nın sergilediği metabolik etkiler, kanser tedavisinde önemli bir rol almaktadır.

MOTS-c'nin AMPK ifadesini arttırdığı ve kanser hücrelerinde AMPK'nın otofaji ve apoptoz yollarına etki ettiği düşünüldüğünde, MOTS-c'nin kanser tedavisinde yeni bir

aktör olabileceği akıllara gelmektedir. Bu alışmada, MOTS-c'nin kolorektal kanser hücre serisi üzerine muhtemel sitotoksik ve genotoksik etkilerini moleküler düzeyde ortaya koymayı amaçladık.

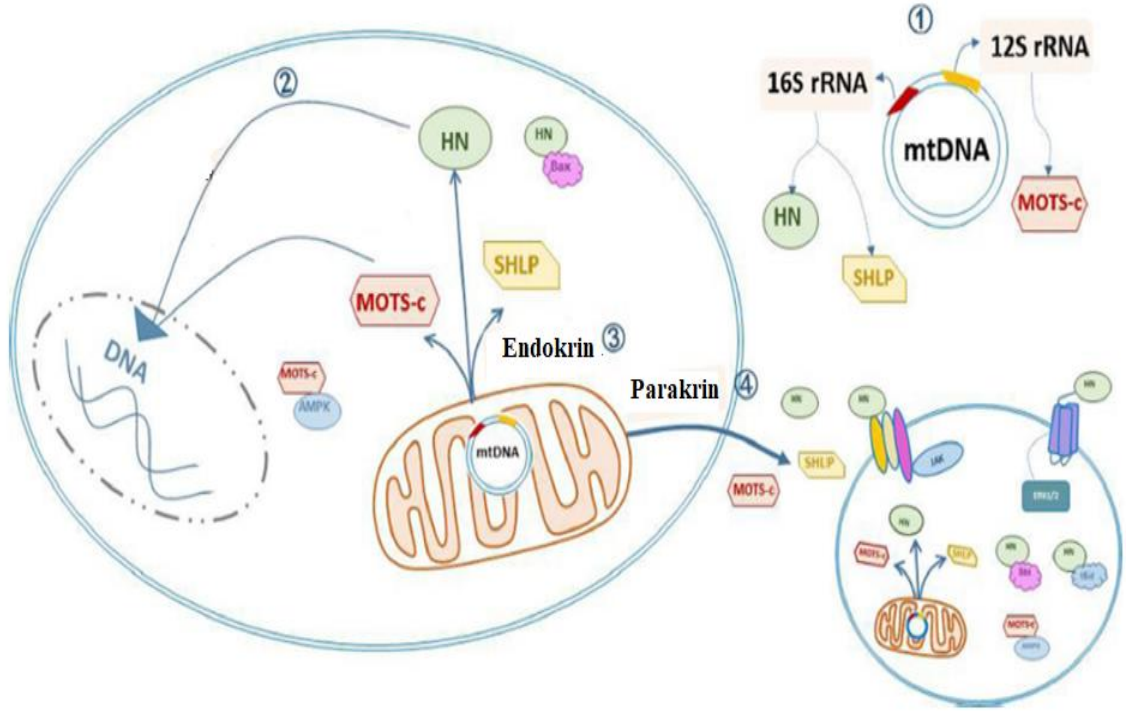
## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Mitokondriyal-Türevli Peptid (MOTS-c)

#### 2.1.1 Keşfi

Mitokondrilerin genlerini kodlayabilmesi için nükleer genomlarından ayrı kendilerine ait DNA'ları mevcuttur ve mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak adlandırılmaktadır (Lee vd. 2016). İnsan mitokondriyal genomu 16.5 kilobaz, dairesel, çift sarmallıdır. Solunum zinciri kompleksini oluşturan 13 protein bu gen tarafından kodlanır. Aynı zamanda mtDNA, 22 tRNA'yı ve 2 ribozomal RNA'yı (yani 12S rRNA ve 16S rRNA'yı) kodlamaktadır. mtDNA'nın sadece kendi organeliyle alakalı proteinleri kodladığı görüşü gün geçtikçe geçerliliğini yitirmektedir. mtDNA'da mitokondriyal türevli peptitleri (MDP'ler) kodlayan birkaç küçük açık okuma çerçevesi bulunmuştur. Bunlar, hücresel fonksiyonun düzenlenmesine katılan yeni bir peptit sınıfı olarak değerlendirilmektedir (Ahn vd. 2020).

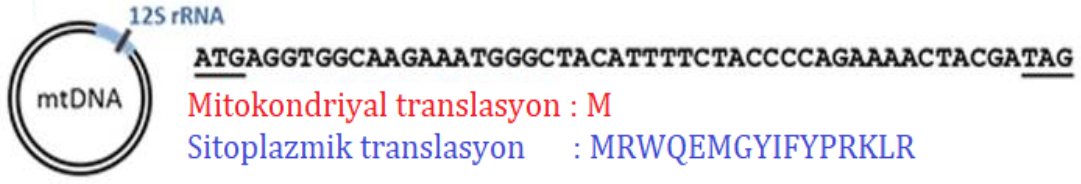
Lee vd. tarafından mitokondride yeni kısa açık okuma çerçevelerinin (sORF) araştırılmasıyla 2015 yılının da tespit edilen MOTS-c (12S rRNA tip-c'nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi), mtDNA tarafından kodlanan bir peptittir (Lee vd. 2015). Bu peptid mtDNA transkripsiyonu sonucu sitoplazmada traslasyona uğrar ve hücresel metabolizmada rol alır. MOTS-c, kemirgenlerde ve insanlarda çeşitli dokularda ve dolaşımında (plazma) eksprese edilir, bu da hem hücre-otonom hem de hormonal rolü öne sürer ve hücrede mitokondri ile birlikte lokalize olur (Lee vd. 2015).



**Şekil 2.1:** MDP'lerin sınıflandırılması ve işlevi. (1) HN, SHLP'ler ve MOTs-c, sırasıyla mitokondriyal 16S rRNA geni ve 12S rRNA geni tarafından kodlanır. (2) Metabolik stres altında, HN ve MOTs-c, nükleer genlerin ekspresyonunu “geriye dönük sinyalleşme” yollarıyla etkileyebilir. (3) MDP'ler, endokrin yollarla hücre içi reseptörlere bağlanarak işlevlerini yerine getirir. (4) MDP'ler, parakrin yollarla hücre dışı reseptörlere bağlanarak işlevlerini yerine getirir. (Yang vd. 2019)

### 2.1.2 Biyokimyasal Yapısı

MOTS-c 12S rRNA bölgesinde bulunup 16 aminoasitlik bir peptidi kodlar. MOTs-c yüksek miktarda eksprese olan 51 baz çifti büyüklüğünde bir peptittir (Xinqiang vd. 2020). Molekül ağırlığı 2174.61 Da'dır. MOTs-c peptidinin translasyonu nükleer genetik kodun kullanılmasıyla sitoplazmada gerçekleşir. (Lee vd. 2015). MOTs-c'nin mitokondriyal translasyonunun şematik gösterimi aşağıdaki gibidir (Şekil 2.2).



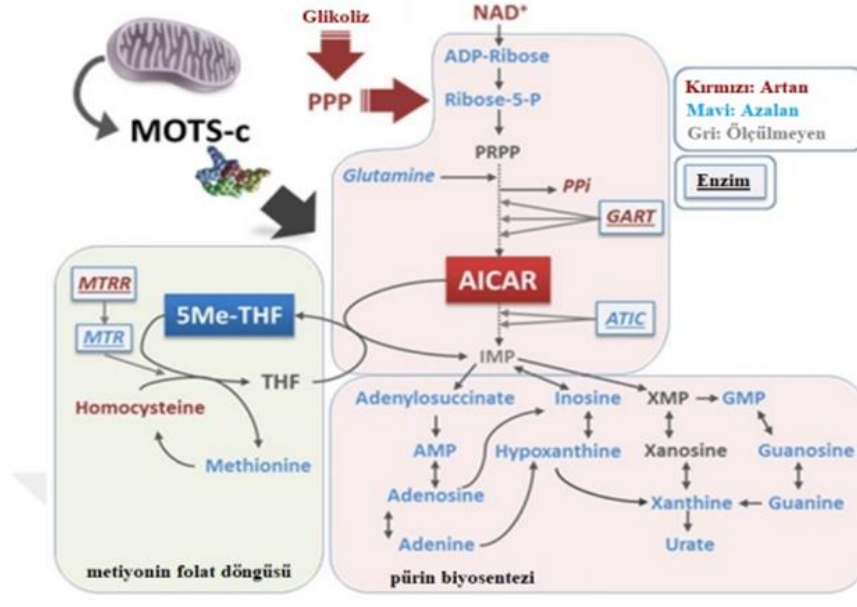
**Şekil 2.2:** MOTS-c'nin açık okuma çerçevesi (Lee vd. 2016)

### 2.1.3 MOTS-c'nin Doku Dağılımı

İnsanlarda ve kemirgenlerde, çeşitli dokularda ve dolaşımında (plazma) MOTS-c'nin varlığı tespit edilmiştir. Böylece MOTS-c hem hormonal sistemde hem de hücrede bir rolünün olduğunu göstermektedir. (Zarse ve Ristow 2015). İlk olarak iskelet kasında varlığının gösterilmesiyle birlikte enerji duyarlılığı yüksek dokularda (kalp, beyin vs.) tespit edilmiştir. Yüksek enerji kaynağı koşulları altında ise metabolik homeostazın potansiyel bir düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir (Lee vd. 2015).

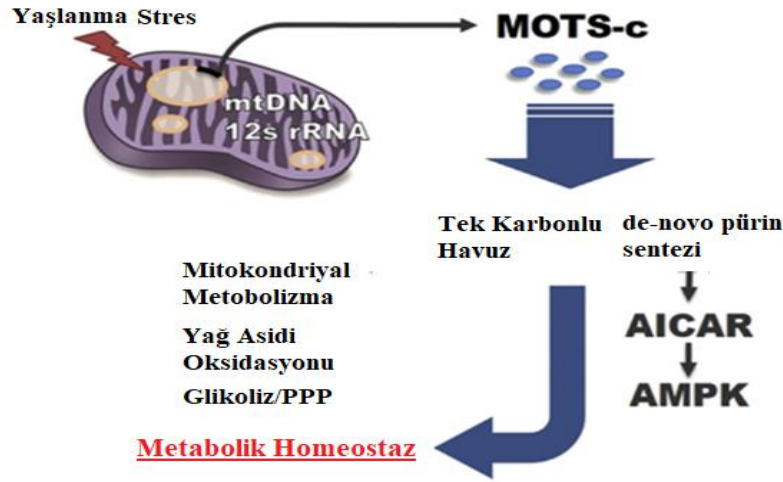
### 2.1.4 MOTS-c'nin Etki Mekanizması

MOTS-c de-novo pürin sentezi ve metiyoninfolat döngüsünden sorumlu genlerin ekspresyonlarını değiştirdiği bildirilmiştir (Lee vd. 2015). MOTS-c öncelikle metiyoninfolat döngüsünü hedef alarak metiyonin ve 5ME-THF seviyelerinde düşmeye sebep olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.3). Buradaki azalma de-novo pürin sentezini inhibe eder ve 5-aminomidazol-4-karboxamid ribonukleotid (AICAR)'ın birikimine sebep olur. Böylelikle, AICAR'ın artışı 5'-adenosin monofosfatla aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) yoluyla aktive edilir (Zarse ve Ristow 2015; Kim vd. 2017).



**Şekil 2.3:** Metiyonin folat döngüsü ve buna bağlı pürin biyosentezinin şematik gösterimi (Lee vd. 2015)

AMPK yolağının aktifleşmesi yağ metabolizmasının düzenlenmesini etkiler ve böylelikle kasların glikoz alım ihtiyacını ve oksidatif fosforilasyonu artırır (Qin vd. 2018). Fakat MOTS-c'nin bu etkisi kısa süreli etki gösterebilir çünkü de-novo pürin sentezindeki öncül metabolitlerin birikmesiyle meydana gelen feedback mekanizması sonucunda de-novo pürin sentezinin tekrar uyarılır (Şekil 2.4). Böylelikle AICAR miktarında azalma meydana gelir (Qin vd. 2018). Bu bilgiler doğrultusunda MOTS-c'nin AMPK yolağı aracılığı ile mekanizma üzerinde dengeleyici bir etkisi olabileceği söylenebilir.



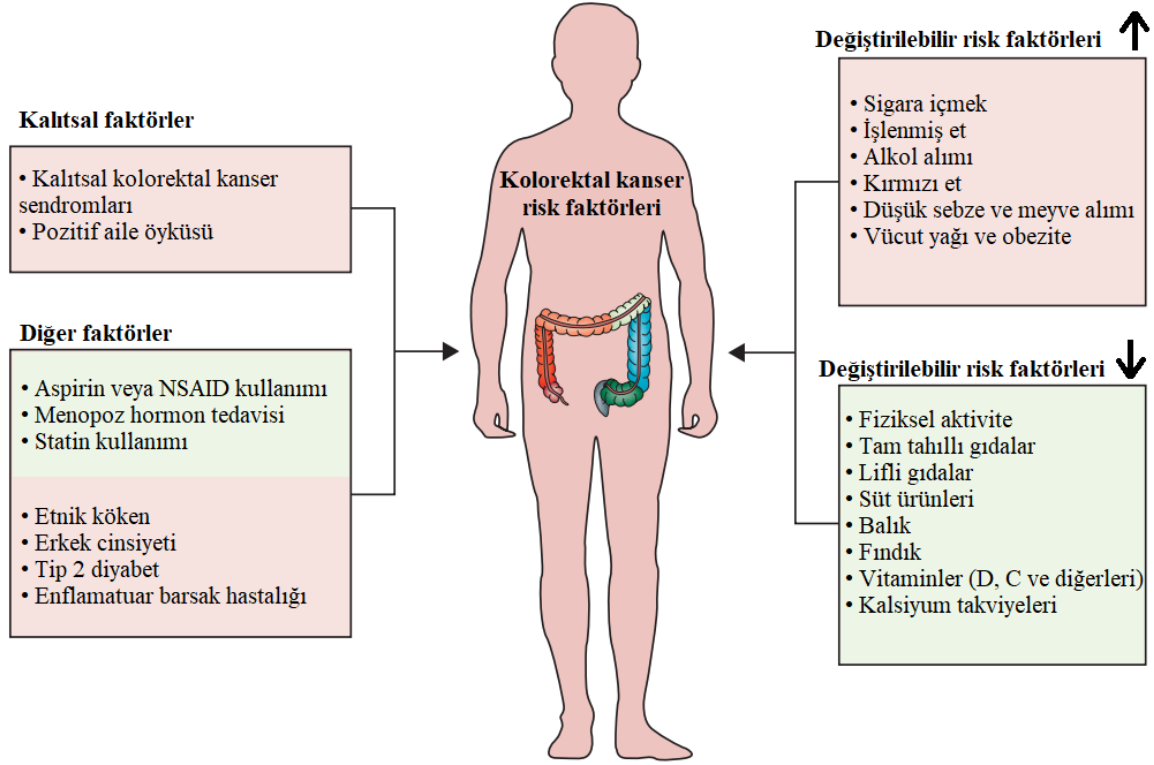
Şekil 2.4: MOTS-c'in metabolik homeostaza etkisi (Lee vd. 2015)

## 2.2 Kolorektal Kanseri

Eskiye kıyasla daha kolay teşhis edilen kolorektal kanser olguları, günümüzde yılda yaklaşık 900.000 ölümle dünyanın dördüncü en ölümcül kanseridir. İnsidans erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir. Güçlü kalıtsal bileşenlere rağmen, çoğu kolorektal kanser vakası sporadiktir ve adenom-karsinom dizisi yoluyla birkaç yıl içinde yavaş yavaş gelişir (Haraltdottir vd. 2014).

Hem kalıtsal hem de çevresel risk faktörleri kolorektal kanser gelişiminde rol oynar (Şekil 2.5). Kolorektal kansere ilişkin birkaç genom çapında ilişkilendirme çalışması, kolorektal kanser riski ile ilişkili kansere yatkınlık genlerini (yaygın tek nükleotid polimorfizmleri) başarıyla tanımlamış olsa da, kalıtsallığa neden olan faktörlerin çoğu hala belirsizliğini korumaktadır (Jiao vd. 2014). Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %5-7'lik bir alt grubu, iyi tanımlanmış kalıtsal kolorektal kanser sendromundan etkilenir (Syngal vd. 2015). Uzun süredir devam eden inflamatuvar bağırsak hastalığı olan ve daha önce kolorektal kanser veya adenom öyküsü olan hastalar, kolorektal kanser için yüksek risk altındadır ve düzenli gözetim gerektirir (Brenner vd. 2011; Cottet vd. 2012; Jess vd. 2012). Bunun yanı sıra çevresel yaşam tarzı faktörleri bu kanserin gelişim sürecine katkı sağlayabilir. Yüksek gelirli ülkelerde yaşlanan nüfus ve beslenme alışkanlıklarının yanı sıra obezite, fiziksel egzersiz yapmama ve sigara gibi olumsuz risk faktörleri de kolorektal kanser riskini artırmaktadır (Dekker vd. 2019).





**Şekil 2.5:** Kolorektal kanser için değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörlerinin listesi (Dekker vd. 2019)

Araştırmacılar, kolorektal kanserin daha etkili bir şekilde tanımlanması ve tedavisinin yapılması amacıyla, 2015 yılında gen ekspresyonu temelinde kolorektal kanseri dört moleküler alt tipte sınıflandırdı (konsensus moleküler alt tipler [CMS] 1–4) (Guinney vd. 2015). Bu alt tiplerin tanımlanmasında kanserleşme sürecinde rol oynayan ilgili genler veya yollar, alt tiplerin özgünlüğüne göre sınıflandırıldı. CMS1 (Mikrosatelit kararsızlığı ve bağışıklık) yüksek mutasyon düzeyi, mikrosatelit kararsızlığı ve güçlü bağışıklık aktivasyonu ile karakterizedir ve örneklerin %14'ünü oluşturmaktadır. CMS2 (kanonik) örneklerin %37'sini oluşturur ve epitelyal, belirgin WNT ve MYC sinyal aktivasyonu ile tanımlanır. CMS3 (metabolik), epitelyal ve belirgin metabolik düzensizlik sergiler ve örneklerin %13'ünü kapsar. Son olarak CMS4 (mezenkimal), belirgin dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  aktivasyonu, stromal invazyon ve anjiyogenez ile karakterizedir ve örneklerin %23'ünü oluşturur. Geri kalan %13'lük kısım ise karışık özelliklere sahip numuneleri oluşturur ve bunlar muhtemelen bir geçiş fenotipini veya tümör içi heterojenliği temsil eder (Guinney vd. 2015).

### **2.2.1 Epidemiyoloji**

Dünya çapında, kolorektal kanser, 2018'de tahmini 1.85 milyon yeni vaka ve 881 000 ölümle sonuçlanan önemli bir sağlık problemidir (Wild vd. 2020). Kolorektal kanser, dünya çapında yıllık olarak teşhis edilen tüm kanserlerin ve kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Bray vd. 2018). Dünya genelinde kadınlarda ikinci, erkeklerde ise üçüncü en sık görülen kanserdir. Ülkemizde 2017 yılı verilerine göre ise kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları sıralamasında kolorektal kanser erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 25.1 ve 14.7 oranlarıyla (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) 3. sırada yer almaktadır (Kara ve Keskinlik 2021). Bu oranlar, ülkelerin gelişmişlik düzeyi ve coğrafi alanlara göre değişiklik gösterebilir. Gelişmekte olan ülkelerde devam eden ilerlemeyle birlikte, dünya çapında kolorektal kanser insidansının 2035'te 2.5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (Arnold vd. 2017; Bray vd. 2018). Diğer pek çok kanser tipinde olduğu gibi kolorektal kansere yakalanma oranı gelişmiş ülkelerde kısmen azalma eğilimindedir. Bu duruma bilinçli bir yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları etki etse de genel olarak ilgili ülkelerin tarama programlarına ve kolonoskopiye erişim bu durumu belirler (Ait Ouakrim vd. 2015; Wild vd. 2020). Buna karşılık, özellikle rektum kanseri ve sol kolon kanseri olmak üzere 50 yaşından küçük kolorektal kanserle başvuran hastalarda endişe verici bir artış görülmektedir (Bailey vd. 2015; Siegel vd. 2017; Kasi vd. 2019). Genetik, yaşam tarzı, obezite ve çevresel faktörlerin bazı ilişkileri olsa da bu artışın kesin nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır.

### **2.2.2 Tedavi Yaklaşımları**

Birincil ve adjuvan tedavilerdeki gelişmeler göz önüne alındığında, kolorektal kanserde hayatta kalma süresi gün geçtikçe artış sergilemektedir. Tipik olarak ideal kolorektal kanser tedavisinde, çoğunlukla cerrahi müdahale ön plandadır ve böylelikle tümörün ve metastazların tamamen çıkarılması sağlanmaktadır (Brenner vd. 2014). Diğer taraftan rezeke edilemeyen (çıkartılamayan) lezyonları olan veya cerrahiye tolere edemeyen hastalar için amaç, tümörün maksimum şekilde küçültülmesi ve daha fazla tümör yayılımının ve büyümesinin baskılanmasıdır. Bu tür hastalarda hastalığı kontrol etmek için radyoterapi ve kemoterapi önde gelen stratejilerdir. Bazı durumlarda, tümörü maksimum düzeyde azaltmak ve stabilize etmek için neoadjuvan veya adjuvan tedavi olarak cerrahiden önce veya sonra

kemoterapi veya radyoterapi uygulanabilir (Lbianca vd. 2013; Van Cutsem vd. 2014; Messersmith 2019).

Mevcut kemoterapi hem floropirimidin bazlı olan tek ajanlı tedaviyi, hem de oksaliptatin, irinotekan ve kapesitabin dahil olmak üzere bir veya birkaç ilaç içeren çoklu ajan rejimlerini içerir (Xie vd. 2020). Kemoterapide, mevcut sistemik toksisite, tatmin edici olmayan yanıt oranı, öngörülemez doğuştan gelen ve kazanılmış direnç ve düşük tümöre özgü seçicilik gibi belirli sınırlamalar göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, mevcut kolorektal kanser kemoterapisini iyileştirmek ve hatta değiştirmek için yeni yaklaşımlar geliştirmek önemlidir. Günümüzde bu durumu iyileştirmek adına hedefe yönelik tedavi yaklaşımları önem kazanmıştır. Hedefe yönelik tedaviler, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve göçünü doğrudan engelleyerek kanserli hücreler üzerinde çalışabilir. Yerel kan damarları ve bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere tümör mikro ortamı, hedeflenen ilaçlar tarafından tümör büyümesini engellemek ve daha güçlü bağışıklık gözetimi ve saldırısını yürürlüğe koymak için değiştirilebilir. Monoklonal antikorlar gibi küçük moleküller, hedefe yönelik tedavilerde önemli oyuncular (Tariman 2017; Ferguson ve Gray 2018; Oh ve Bang 2020).

Wnt/ $\beta$ -katenin, Notch, Hedgehog ve TGF- $\beta$ /SMAD gibi kolorektal kanserin başlatılmasına, ilerlemesine ve göçüne aracılık eden çeşitli yolları ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT veya RAS/hızlı hızlandırılmış fibrosarkom (RAF) gibi sinyalleşme basamaklarını etkileyebilen molekülleri hedefleyen tedavi yaklaşımları oldukça etkili sonuçlar açığa çıkartabilir (Krishnamurthy ve Kurzrock 2018; Tiwari vd. 2018). Bunun yanı sıra Anti VEGF/VEGFR ve anti-EGFR ajanları ile immün yanıt kontrol birim inhibitörleri kolorektal kanser tedavisinde önemli ajanlardır (Xie vd. 2020).

### **2.2.3 Caco-2 Hücre Hattı**

1970'lerde mide-bağırsak tümörlerinden birkaç epitel hücre hattı kuruldu. Amaç, kanser gelişimindeki mekanizmaları ve sitoterapinin etkilerini incelemektir. Kısmen hem morfoloji hem de fonksiyon açısından birincil bağırsak epitel hücrelerinin, yani ince bağırsak enterositleri, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreleri, Paneth hücreleri ve M-hücrelerinin heterojenliğinden dolayı, tümör hücrelerinin daha özel hücre tiplerine farklılaştırılmasına ihtiyaç vardı. Hücre hatlarının birkaçı, ortama sentetik veya biyolojik faktörlerin eklenmesiyle kısmen farklılaştırılabilir. Ancak bunlardan biri olan Cancer coli-2 (Caco-2),

birleşme noktasına ulaştığında kendiliğinden farklılaşabildiği için oldukça benzersizdir. Caco-2, Sloan-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsünde Jorgen Fogh tarafından bir insan kolorektal adeno karsinomundan oluşturulmuştur (Fogh vd. 1977).

Caco-2 hücreleri, olgun ince bağırsak enterositlerinin morfolojik (polarize kolumnar epitel) ve fonksiyonel özelliklerini ifade etmek için kendiliğinden farklılaşır. Polarize Caco-2 hücre katmanı, HT29 tek katmanlarına kıyasla 4 kat daha yüksek TEER değerleri gösterir, yani in vivo duruma daha benzer şekildedir. Caco-2 hücreleri, normal epitelde bulunan aminopeptidaz, esteraz ve sülfataz gibi çoğu reseptörü, taşıyıcıyı ve ilaç metabolize edici enzimleri eksprese eder. Bununla birlikte, hiçbir P-450 metabolize edici enzim aktivitesi bildirilmemiştir (Lea 2015).

Normal bağırsak epiteliyle karşılaştırıldığında, Caco-2 hücre modelinin çeşitli sınırlamaları vardır. Her şeyden önce, normal epitel sadece enterositleri değil, birden fazla hücre tipini içerir. İkinci olarak, Caco-2 hücre modeli kullanıldığında, mukus ve karıştırılmamış su tabakası bulunmaz. Ayrıca, bir dizi hücresel olmayan parametre, hücrelerde belirli bir bileşiğin emilimini etkileyecektir (Lea 2015).

Bu nedenle, lipofilik moleküllerin taşınması, safra asitleri ve fosfolipidlerin varlığından güçlü bir şekilde etkilenir ve ayrıca mukus tabakasındaki ve ayrıca epitele yakın karıştırılmamış su tabakasındaki bileşik çözünürlüğü, in vivo alımı güçlü bir şekilde etkiler. Genel olarak Caco-2 hücreleri, bağırsak epitelinin özelliklerini incelemek için güçlü bir araç sağlasa da, bu tür in vitro modellerden in vivo duruma veri tahmininde dikkatli olunmalıdır (Lea 2015).

### **2.3 Hücre Ölümü**

Hücre ölümü, çok hücreli organizmalar için önemli bir süreçtir ve hücreler, bir doku homeostazın da canlı ve ölüm arasında dengededir. Bu dengenin içsel veya dışsal faktörler nedeni ile bozulması hücre ölümünün başlatılması veya normal hücrenin hemostazının koruma arzusu haline gelir. Hücrelerin bütünlüklerini koruyamadıkları kritik yapısal hasar tarafından tetiklenen pasif hücre ölümünün yanı sıra, aktif hücre ölümü bir veya daha fazla sinyal iletim modülü tarafından modüle edilir. Aktif hücre ölümü, hücre sayısının gelişmede, morfogeneze, dengelenmesinde, zararlı hücrelerin yok edilmesinde ve doku döngüsünde

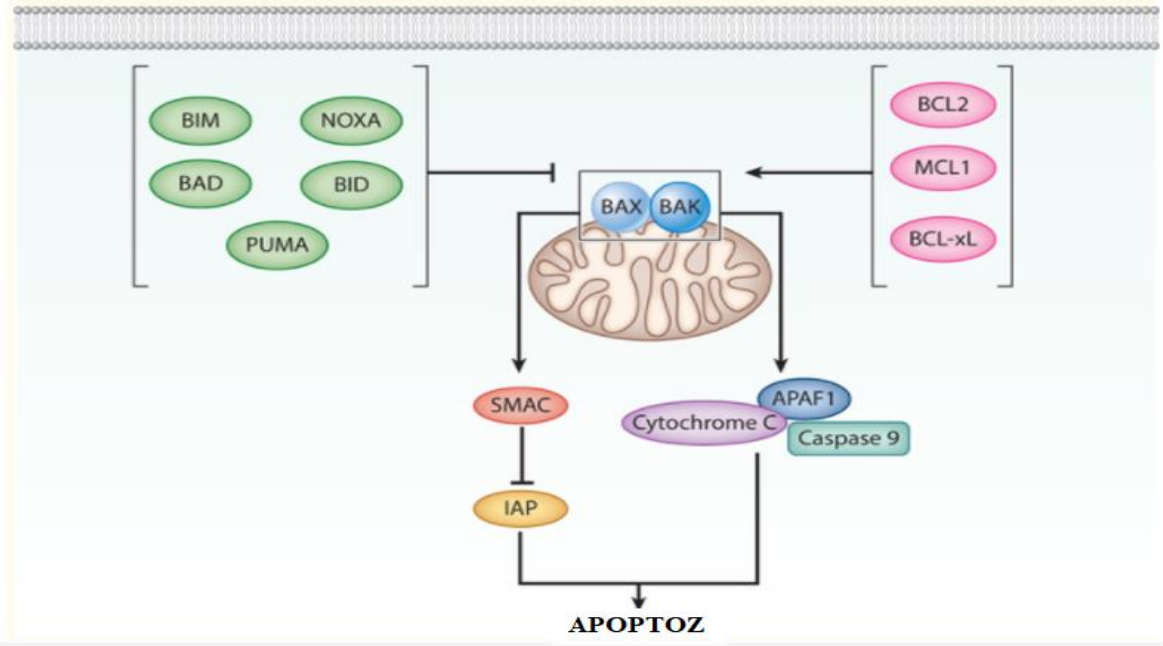
kritik bir role sahiptir. Çoğu kaynaklar programlanmış hücre ölümü (PCD) kullanırken, aktif hücre ölümü Nomenclature Committee on Cell Death 2018 tarafından düzenlenmiş hücre ölümü (RCD) olarak adlandırılmış ve PCD'yi belirli bir RCD tipi olarak tanımlamıştır (Galluzzi ve ark. 2018, Ashkenazi ve Salvesen 2014, Chen, Kang ve Fu 2018). PCD, fizyolojik süreçle doğrudan ilişkilidir ve dışsal çevresel stres sinyalleri olmadan meydana gelir. Ayrıca, RCD, PCD'ye ek olarak, hücrenin üstesinden gelemediği hücre içi veya hücre dışı sinyallerin neden olduğu stres kaynaklı hücre ölümünü de içerir (Galluzzi ve ark. 2018). Çok sayıda çalışma ile birkaç spesifik RCD formu tanımlanmıştır. Farklı sınıflandırmalarına rağmen RCD, morfolojik özelliklerine bağlı olarak apoptoz, otofajik hücre ölümü ve regüle nekroz olarak sınıflandırmak mümkündür. Birbiriyle alakasız mekanizmalar değildirler ve benzer moleküler yolları paylaşabilirler (Chen, Kang ve Fu 2018).

### **2.3.1 Apoptoz**

Apoptoz kelimesi ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972'de yayınlanan bir makalede morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tipini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr vd. 1972). Apoptoz, bir hücrenin kendisinin öleceğine karar verdiği süreci ifade eder. Bu süreç çok hücreli organizmalarda gerçekleşir ve çoğunlukla organizmanın bir bütün olarak iyileştirilmesini hedefler. (Lowe ve Lin 2000). Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Kaspazların iki kategorisi vardır, başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar (Elmore 2007). Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9) inaktif prokaspazlardan aktive edilir ve efektör kaspazlarını (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive etmeye devam eder. Efektör kaspazlarının aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan DNA fragmantasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile sonuçlanan bir olaylar dizisi başlatır (Martin vd. 1995; Poon vd. 2014). Apoptoz, içsel ve dışsal yollar olmak üzere iki farklı mekanizmaya sahiptir.

## a) Apoptozun İçsel Yolu

Apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinen içsel yol (Igney ve Krammer 2002), endoplazmik retikulum stresi, aktive onkogenler, oksidatif stres, DNA hasarı veya mikrotübül yıkımı nedeniyle iç sinyaller tarafından başlatılır (Czabotar vd. 2014). Bu apoptoz formu, mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır ve pozitif veya negatif yoldan başlatılır. Negatif sinyaller, hücrenin yakın çevresinde sitokinlerin, hormonların ve büyüme faktörlerinin yokluğundan kaynaklanır. Bu pro-hayatta kalma sinyalleri olmadan, normalde inhibe olan PUMA, NOXA ve Bax gibi hücre içindeki pro-apoptotik moleküller aktif hale gelir ve apoptozu başlatır. Apoptozu başlatan diğer faktörler doğada pozitifdir ve hipoksiye, toksinlere, radyasyona, reaktif oksijen türlerine, virüslere ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmayı içerir (Brenner ve Mak 2009), ancak nötrofiller gibi bazı hücreler söz konusu olduğunda hipoksi hücrenin hayatta kalmasını teşvik edebilir (Walmsley vd. 2005). Apoptozun içsel yolunu kontrol eden başlatıcı kaspaz, kaspaz işe alım alanının (CARD alanı) maruz kalmasının ardından adaptör protein apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (APAF1) bağlanabilen kaspaz 9'dur. Apoptotik olmayan bir hücredeki APAF1 genellikle, CARD alanı bloke edilir ve ayrıca bir CARD alanı içeren pro-kaspaz 9 ona bağlanamayacak şekilde katlanır. Apoptoz, pozitif veya negatif uyarılarla indüklendiğinde, mitokondriyal membranda değişiklikler tetiklenir ve bunun sonucu olarak mitokondriyal geçirgenlik geçişi (MPT) gözenekler açılır. MPT gözenek açıldıktan sonra, proapoptotik proteinler (sitokrom c, Smac/Diablo ve HtrA2/Omi dahil) mitokondriden sitoplazmaya sızabilir ve apoptozu aktive edebilir (Cain vd. 2002). Sitokrom c, APAF1 monomerlerinin WD alanına bağlanarak apoptozu indükler, bu da APAF1'de, ATP'yi (dATP) bağlayabilen bir nükleotid bağlama ve oligomerizasyon alanını açığa çıkaran konformasyonel bir değişiklikle sonuçlanır. Bu bağlanma, APAF1'de hem CARD'ı hem de oligomerizasyon alanlarını açığa çıkaran ek bir yapısal değişikliği indükler ve böylece birkaç APAF1'in anapoptozom olarak bilinen bir kompleks halinde toplanmasına izin verir (Acehan vd. 2002). Apoptozom, açık merkezinde, birkaç prokaspaz 9 proteinini toplayan ve aktive eden birkaç CARD alanını içerir. Bu aktive edilmiş kaspaz 9 enzimleri, aktif kaspaz 3 formunda tamamen apoptozu indükleyebilen uygulayıcı prokaspaz 3'ü aktive edebilir (Cain vd. 2002). Smac/Diablo ve HtrA2/Omi, apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörlerini inhibe ederek apoptozu başlatmaya yardımcı olur, ancak sitokrom c salınımı olmadan, IAP'lerin tek başına inhibe edilmesi apoptozu başlatmak için yetersizdir (Ekert ve Vaux 2005) (Şekil 2.6).

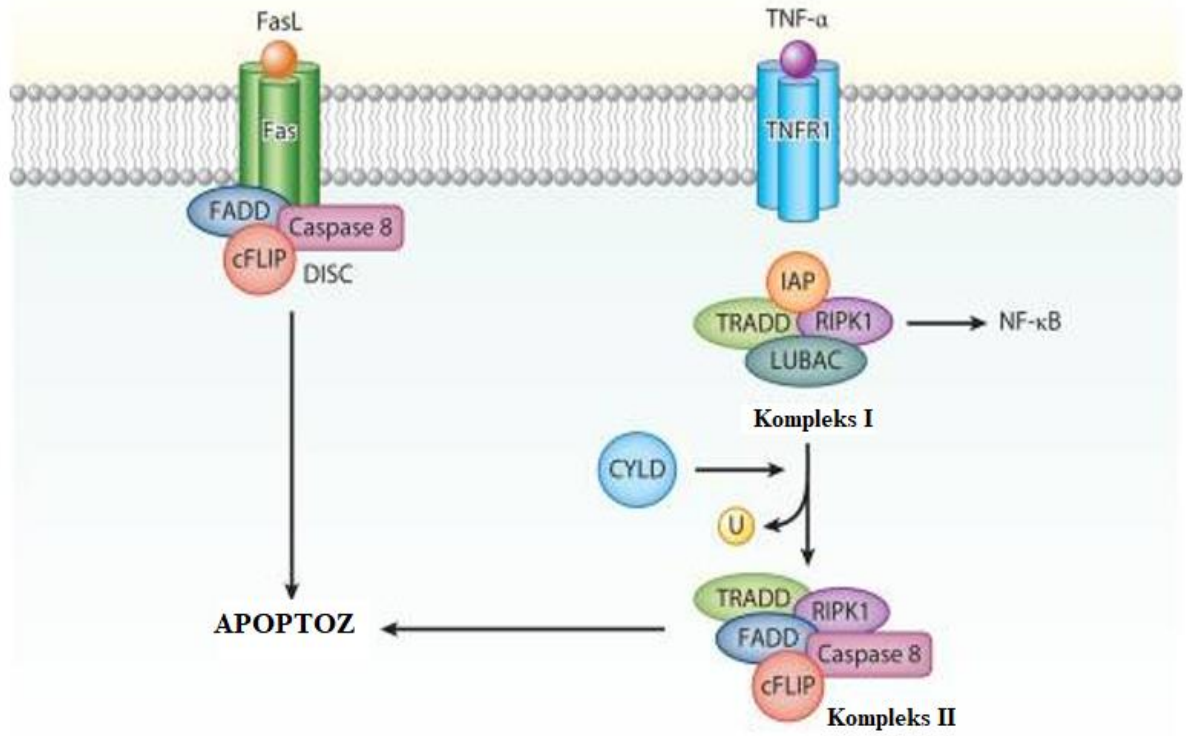


**Şekil 2.6:** İçsel apoptoz. (Hücreleri apoptoza yönlendiren adım, mitokondriyal dış zarın (MOMP) geçirgenleştirilmesidir. MOMP, B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ile ilişkili X apoptoz düzenleyicisi (Bax) ve Bcl-2 antagonisti/katil 1 (BAK) dış mitokondriyal membran gözenekleri oluşturduğunda oluşur. Bu süreç, Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü (BAD), p53-yukarı regüle edilmiş bağlanma bileşeni (PUMA), Bcl-2 benzeri 11 (BIM), forbol-12-miristat-13-asetat kaynaklı protein (NOXA) ve BH3-etkileşimli alan ölüm agonisti (BID) dahil olmak üzere yalnızca BH3 proteinleri tarafından desteklenir ve Bcl-2, B hücreli lenfoma ekstra büyük (Bcl-xL) ve miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini (MCL1) dahil olmak üzere anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri tarafından antagonize edilir. MOMP, sitokrom c'nin ve ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörünün (SMAC) salınmasına neden olur. Sitokrom c, kaspaz 9'un aktive olduğu apoptozomu oluşturmak için apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve başlatıcı kaspaz 9'u bağlar. SMAC, kaspaz aktivasyonunu sınırlamak için hücreler tarafından muhafaza edilen sitoplazmik proteinleri nötralize eder (Sauler vd. 2019))

## **b) Apoptozun Dışsal Yolu**

Apoptozun ölüm reseptörü (DR) yolu olarak da bilinen dışsal yol (Igney ve Krammer 2002), olarak bilinen doğal öldürücü hücreler veya makrofajlar, hedef hücre zarındaki DR'lerle bağlandıktan sonra procaspaz 8 ile kaspaz 8'in aktivasyonu yoluyla dış yolu indükleyen ölüm ligandları ürettiklerinde başlatılır. (Kim vd. 2004). DR'ler, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin üyeleridir ve her DR'nin karşılık gelen bir ölüm ligandına sahip olduğu birkaç üye içerir (Bossen vd. 2006). Kaspaz 8'i aktive etmek için, bir ölüm ligandının bir DR'ye bağlanması gerekir, bu da monomerik procaspaz 8'in ölüm-indükleyici (DED) alanı aracılığıyla ligand-bağlı DR'nin sitoplazmik alanında bulunan bir ölüm-indükleyici sinyal kompleksine alınması ile sonuçlanır. DISC ayrıca, procaspaz 8'in DISC ile etkileşimini kolaylaştıran, ya FAS ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ya da TNF reseptörü (TNFR) ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) olarak bilinen bir adaptör proteini içerir (Kim vd. 2004). Birkaç procaspaz 8 monomerinin DISC'e alınması, bunların dimerizasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır, böylece ortaya çıkan kaspaz 8, iki farklı alt yoldan biri veya diğeri yoluyla apoptozu indükleyebilir. İndüklenen belirli alt yol, hücrelerin tip I veya tip II hücreler olarak sınıflandırılıp sınıflandırılmadığına bağlıdır (Samraj ve diğerleri, 2006). Tip I hücrelerde kaspaz 8, cellat kaspazlarını doğrudan böler ve bu nedenle doğrudan apoptozu başlatır. (Samraj vd. 2006).. Tip II hücrelerde, IAP'ler, mitokondriden salınan proteinler tarafından inhibe edilmediği sürece, cellat kaspazlarının doğrudan kaspaz 8 aktivasyonunu inhibe eder (Spencer vd. 2009). Apoptozun dışsal yolunu kontrol etmede kaspaz 8'in önemli rolü Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Varfolomeev vd. 1998) (Şekil 2.7).





**Şekil 2.7:** Dışsal apoptoz. (Fas'a ligand bağlanması, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD), hüresel FLICE inhibitör proteini (cFLIP) ve kaspaz 8'den oluşan ölüme neden olan sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuyla sonuçlanır. Aktivasyon üzerine, kaspaz 8'in bölünmesi, cellat kaspazlarının bölünmesine ve apoptoza yol açar. TNF reseptörü 1 (TNFR1) aktivasyonunun sonuçları, Kompleks 1, reseptör-etkileşimli protein kinaz 1'e (RIPK1) alınan başka bir proteinin translayon sonrası modifikasyonlarına bağlıdır. TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) bağımlı işe alım üzerine, RIPK1, apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) ve lineer ubiquitination zincir montaj kompleksi (LUBAC) inhibitörü tarafından her yerde bulunabilir. Ubiquitinated RIPK1 (U), protein kinaz sinyalini ve IκB kinaza (IKK) bağımlı NF-κB aktivasyonunu aktive ederek inflamasyonu ve hücre sağkalımını destekler. Sonuç olarak, RIPK1, sitozolde FADD ve kaspaz 8 ile bir kompleks oluşturur (Kompleks II). Fas tarafından sinyallemeye benzer şekilde, bu kompleks ayrıca cFLIP proteinleri tarafından düzenlenir ve kaspaz 8 aktivasyonuna ve apoptoza yol açabilir (Sauler vd. 2019))

Apoptoz, altta yatan biyokimyasal süreçleri izleyerek tespit edilebilir. Bu tekniklerin bazıları; mitokondriyal membran potansiyeli, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, ATP düzeyi gibi floresan ölçümüne dayanmaktadır ancak bu analizler doğrudan apoptotik hücre ölümünü ortaya çıkarmazlar (Martin vd. 1995; Galluzzi vd. 2007). Bu sebeple, analizin diğer apoptoz ayırt edici faktörlerle birleştirilmesi gerekir. Yaygın olarak kullanılan ayırt etme yöntem ise, Annexin V proteinine konjuge edilmiş bir floresan veya enzimatik etiketin apoptotik hücrelerin dış zarında bulunan fosfatidilserine (PS) bağlandığı Annexin V boyamadır (Martin vd. 1995). DNA parçalanması, apoptik cisimler gibi morfolojik değişikliklerin izlenmesi, apoptotik hücre ölümünü diğer ölüm mekanizmalarından ayırt edilmesinde yardımcı olabilir.

### **2.3.2 Otofaji**

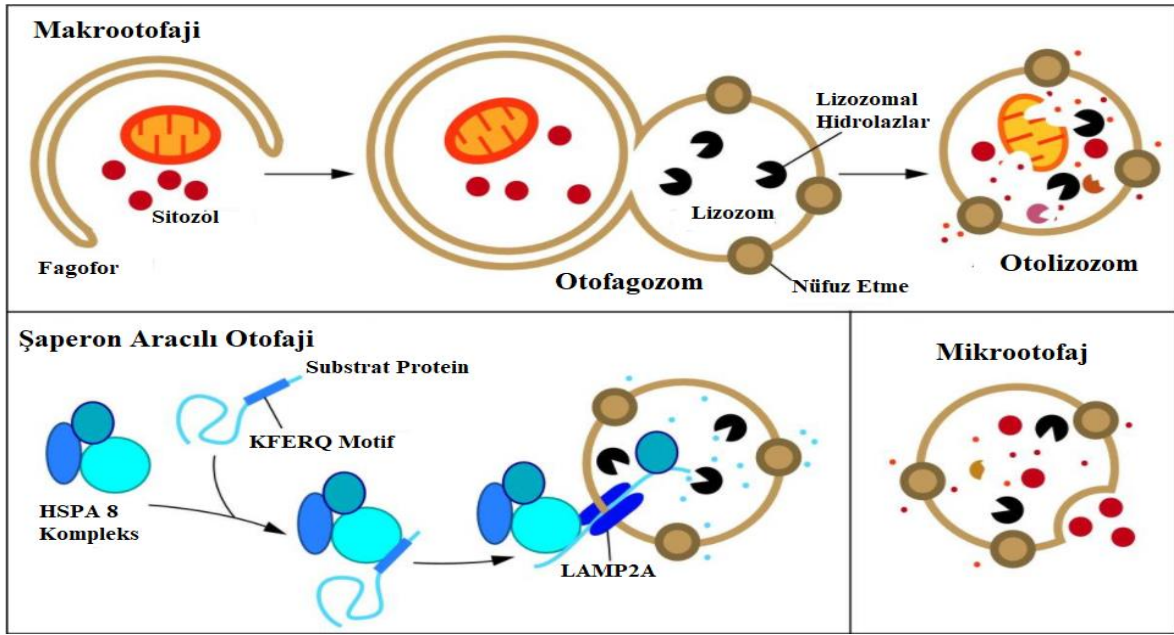
Otofaji, ökaryotik hücrelerde temel molekülleri geri kazanmak ve gıda eksikliği sırasında protein sentezi için yeterli miktarda amino asidi sürdürmek için ana katabolik mekanizma olduğu kanıtlanmıştır (Maiuri vd. 2010). Otofaji terimi, “kendi kendini yeme” anlamına gelen Yunanca bir kelimedenden türetilmiştir (Deter ve De Duve 1967). Başlıca, otofaji, lizozomal bölme içindeki sitoplazmik yapıların parçalanması anlamına gelir (Klionsky 2005).

Otofajik süreç, otofagozomlar olarak bilinen çift zarlı veziküllerin oluşumu ile başlatılır. Çeşitli kargolar otofagozom içine alınır ve otofagozom sonunda otolizozomları oluşturan lizozomlarla birleşir (Lamb vd. 2013). Yutulan materyaller, lizozomal hidrolazların etkisiyle bozunur ve yeni oluşturulan yapı taşları (örneğin, protein bozunmasından kaynaklanan amino asitler) yeniden kullanım için sitozole geri aktarılır.

Otofagozom oluşumu, otofajiyle ilişkili (ATG) genleri ve maya ATG repertuarının (Ohsumi 2014) homologları olmayan ancak çok hücreli organizmalarda bulunan ek proteinleri içeren üç farklı çoklu protein kompleksini hedef alan bir sinyaller dizisi yoluyla başlatılır. Vakuolar protein sınıflandırıcı PI3-kinaz VPS34'ü içeren kompleksin aktivasyonu üzerine, endoplazmik retikulumda PI3P sıcak noktaları (Levine vd. 2015; Ktistakis ve Tooze 2016) üretilir ve diğer komplekslerin düzenli bir şekilde toplanması, omegazom olarak bilinen yeni oluşan bir çift membran yapısının tomurcuklanmasını başlatır (Ktistakis ve Tooze 2016).



Başlıca hücrelerde üç ana otofaji türü vardır; mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA) (Şekil 2.9). Her biri morfolojik olarak farklı olsada, üçü de kargonun bozunma ve geri dönüşüm için lizozoma iletilmesiyle sonuçlanır (Yang ve Klionsky 2010). Mikrootofaji sırasında, kargoyu yakalamak için lizozomal membranın invaginasyonları veya çıkıntıları kullanılır (Mijaljica vd. 2011). Alım, doğrudan lizozomun sınırlayıcı zarında gerçekleşir ve sağlam organelleri içerebilir. CMA, kargoyu ayırmak için membranöz yapılar kullanmaması, bunun yerine belirli bir pentapeptit motifi içeren kargo proteinlerini tanımlamak için şaperonlar kullanması bakımından mikrootofajiden farklıdır; bu substratlar daha sonra açılır ve ayrı ayrı doğrudan lizozomal membran boyunca yer değiştirir (Massey vd. 2004). Mikrootofaji ve CMA'nın aksine, makrootofaji, yükün lizozomdan ayrılmasını içerir. Bu durumda, çift membranlı veziküllerin (otofagozomlar) de novo sentezi, kargoyu ayırmak ve ardından onu lizozoma taşımak için kullanılır (Yorimitsu ve Klionsky 2005).



**Şekil 2.9:** Hücrelerdeki üç tip otofaji. (Makrootofaji, yükü lizozoma ayırmak ve taşımak için sitozolik çift membranlı veziküllerin, ofofagozomların de novo oluşumuna dayanır. Şaperon aracılı otofaji, katlanmamış proteinleri doğrudan lizozomal membran boyunca taşır. Mikrootofaji, lizozomal membranın invajinasyonu yoluyla doğrudan kargo alımını içerir. Her üç otofaji türü de kargonun bozulmasına ve parçalanma ürünlerinin hücre tarafından yeniden kullanılmak üzere sitozole geri salınmasına yol açar (Parzych ve Klionsky 2014))

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Araştırmanın Yapıldığı Merkez**

Bu çalışma Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

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

Hücre serileri laboratuvar çalışmalarında birçok alanda kullanılmasının yanı sıra kanser çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser araştırmaları için farklı hücre serileri mevcut olmakla birlikte çalışmaya uygun hücre serisi seçimi önem arz etmektedir. Çalışma da kolon kanseri hücresi (Caco-2) ve kolon epitel hücresi (FHC) kullanıldı.

##### **3.2.1 Caco-2 Hücre Serisi (ATCC HTB-37)**

Çalışmada kolon kanseri olarak Caco-2 hücreleri kullanıldı. Caco-2 hücreleri için besleme medyumu yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Katalog No: DMEM-HA; Capricorn Scientific GmbH, Almanya) kullanıldı. Ham medyum içerisine %10 FBS (Katalog No: S181G-500; Serox GmbH, Almanya), %1 penisilin-streptomisin solüsyonu (Katalog No: 03-031-1B; Biological Industries, İsrail) ve %1 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (Katalog No: P08-32100; Pan Biotech GmbH, Almanya) ilave edildi. Hazırlanan besleme medyumu 0.22 µm por çapına sahip vakum filtrasyon sisteminden (Katalog No: 343001; NEST Biotechnology, Çin) süzüldü ve Caco-2 hücreleri için bütün deneysel basamaklarda kullanıldı.

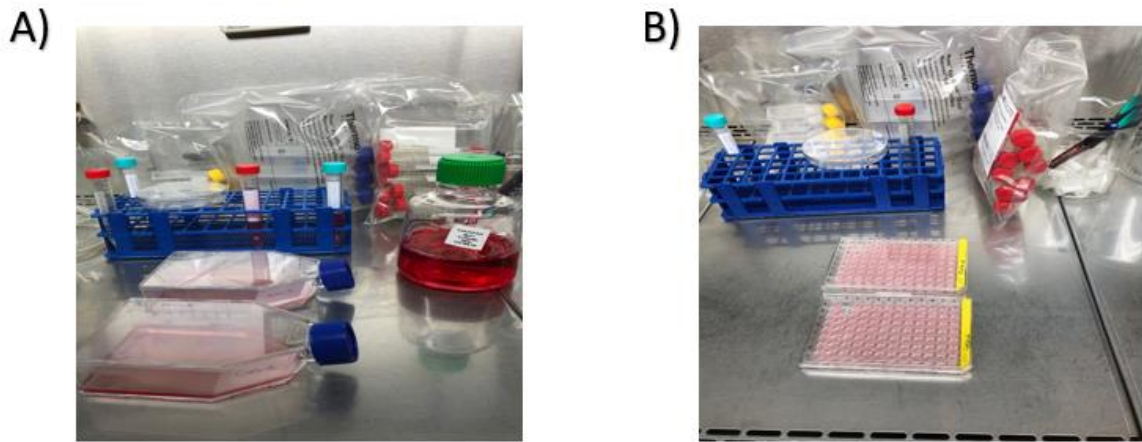
##### **3.2.2 FHC Hücre Serisi (ATCC CRL-1831)**

Çalışmada kolon epitel hücresi olarak FHC hücresi kullanıldı. Bu hücreler için besleme medyumu olarak DMEM:F12 (Katalog No: 30-2006; ATCC, ABD) kullanıldı. Ham medyum içerisine %10 FBS (Katalog No: 30-2020; ATCC, ABD), 10 ng/ml kolera toksini (Katalog No: BML-G117-0001, ENZO Life Sciences, ABD), 0.005 mg/ml insan rekombinant insülini (Humulin-R, Lilly, ABD), 0.005 mg/ml transferrin (Katalog No: T3309, Sigma-Aldrich, Almanya), 100 ng/ml hidrokortizon (Katalog No: H0888-1G;

Sigma-Aldrich, Almanya), 20 ng/ml insan epidermal büyüme faktörü (Katalog No: PHG0311L; Thermo Fisher, ABD) ve 10 mM HEPES (medyumda final konsantrasyon 25 mM olacak şekilde) ilave edildi. Hazırlanan besleme medyumunu 0.22 µm por çapına sahip vakum filtrasyon sisteminden (Katalog No: 343001; NEST Biotechnology, Çin) süzüldü ve FHC hücreleri için bütün deneysel basamaklarda kullanıldı.

### 3.4 Hücrelerin Çoğaltılması ve Ekimi

Hücreler öncelikli olarak sıvı azot tankından çıkartılıp 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına ekimi gerçekleştirildi. Belirli periyotlarda takibi yapıldı. Ekimi gerçekleştirilen Caco-2 ve FHC hücreleri DMEM medyum (içerisine %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin solüsyonu, %1 esansiyel olmayan amino asit çözeltisi ilave edilerek hazırlanan) ve DMEM/F12 (içerisine %10 FBS, 10 ng/ml kolera toksini, 0.005 mg/ml insan rekombinant insülini, 0.005 mg/ml transferrin, 100 ng/ml hidrokortizon, 20 ng/ml insan epidermal büyüme faktörü, 10 mM HEPES ilave edilerek hazırlanan) ile beslendi. Hücrelerin medyumunu haftada iki kere değiştirildi ve deneysel süreçler boyunca hücre %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 37°C sıcaklıkta (Thermo Forma II CO<sub>2</sub> İnkübatör, ABD) inkübasyona bırakıldı. Flask tabanında konfülent olan hücreler, tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flaskların tabanından kaldırıldı ve %0.4 tripan mavisi ile boyandıktan sonra inverted mikroskop altında sayım gerçekleştirildi. Hücre canlılık oranı %90 ve üstü olduğu durumda deneysel basamaklara geçildi ve 96 kuyucuklu plakalarda yer alan her bir kuyucuğa 15x10<sup>3</sup> hücre gelecek şekilde ekim işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Hücrelerin büyütülmesi (A) ve 96 kuyucuklu plakalara ekimi (B)

### **3.5 Test Bileşiklerinin Hazırlanması**

MOTS-c (Katalog No: 9697-1; BioVision, ABD)'nin 0.001, 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM ve standart kanser ilacının 5-Fluorourasil (5-FU; Katalog No: F6627-1G; Sigma-Aldrich, Almanya)'in 1, 5, 25, 50, 100 µM'lık konsantrasyonları besleme medyumları içerisinde hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyonlar deneysel süreç boyunca -20°C ve +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.6 Test Bileşikleriyle Hücrelerin Muamelesi**

Çalışma kapsamında MOTS-c (0.001, 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM) ve 5-FU (1, 5, 25, 50, 100 µM) konsantrasyonları, hücrelerin ekimi yapılan kuyucuklara eklendikten sonra plakalar 1, 8, 16, 24, 48 ve 72 saat %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör de 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda uygulanan bileşiklerin hücre canlılığına olan muhtemel etkileri MTT yöntemi ile belirlendi.

### **3.7 Canlılık Düzeyinin Belirlenmesi (MTT Testi)**

MOTS-c ve 5-FU'nun sitotoksik etkisi, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın kullanılan ve bir enzimatik yöntem olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntem MTT bileşiğinin tetrazolium halkasını parçalayabilmesi özelliğine dayanır. Bileşik (MTT) canlı hücrelere absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir (Horáková vd. 2001) (Denizot ve Lang 1986; Horáková vd. 2001). Bu reaksiyon yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu hücrelerde gerçekleşir. Buda hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülerek yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir.

#### **3.7.1 MTT'nin Hazırlanması ve Uygulanması**

İlk olarak 0.5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi steril fosfat tamponu içerisinde hazırlandı. Sonra test bileşikleriyle muamele edilen hücrelerin inkübasyon süreleri tamamlandığında, plakalar da yer alan her bir kuyucukda ki medyum uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 50 µL ilave edilerek 3 saat süresince CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kuyucuklardaki MTT solüsyonu

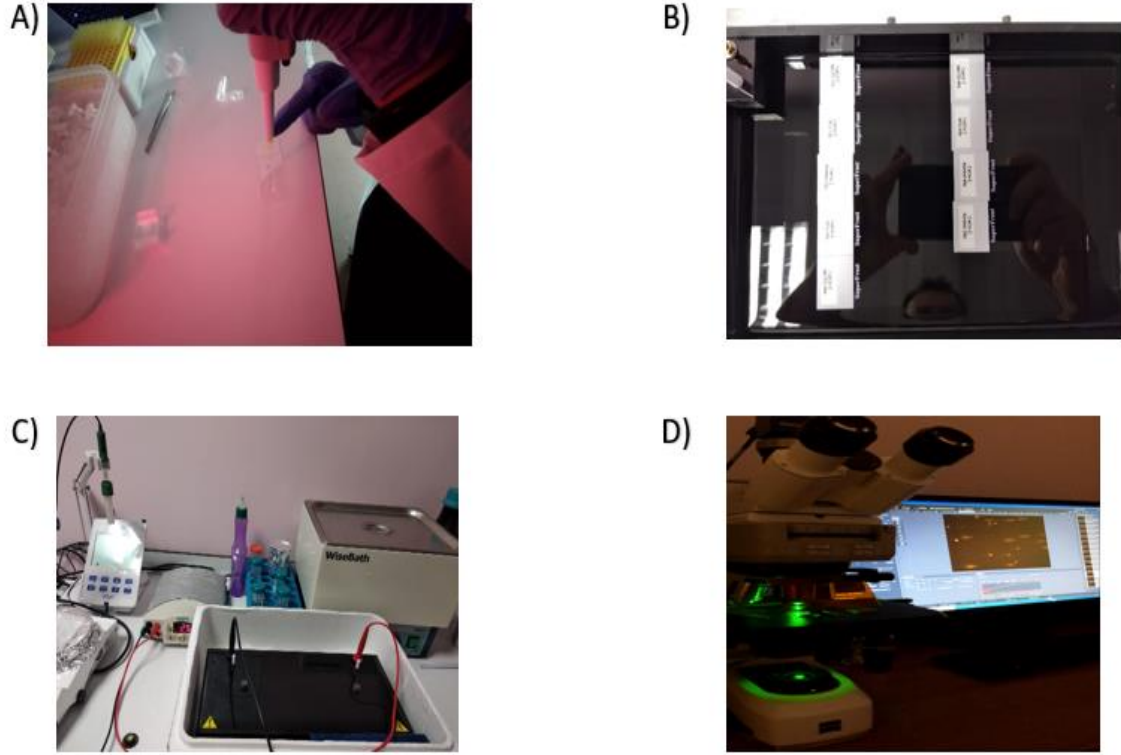
kuyucuklardan uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi. Kuyucuktaki hücrelerin optik densisiteyi ELISA plaka okuyucuda (Thermo MultiskanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda okundu (Mosmann 1983). Kontrol kuyucukları (sadece medyum bulunan kuyucuklar) okutularak, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Referans ilaç ve MOTS-c uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık değerleri hesaplandı.

### **3.8 Genotoksisite Analizi**

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen “Comet Assay”, ökaryotik canlılarda DNA hasarını (Genotoksisite) belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Olive ve Banáth 2006; Nandhakumar vd. 2011). Bu yöntemde iç veya dış faktörler sonucu DNA üzerinde meydana gelen kırılmalar agaroz bir destek ortamı yardımıyla analiz edilir.

Çalışmada öncelikle hücreler 6 kuyucuklu plakalarda büyütüldü. Sonrasında MTT analizleri sonucu hücre canlılığının yaklaşık %70 olan konsantrasyonları hücrelere uygulandı. Toplanan hücre örnekleri fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı ve tekrardan süspansiyon edildi. Alınan 10 µL hücre süspansiyonu (yaklaşık 10.000 hücre) 80 µL %1’lik low melting agarose ile karıştırıldı. Bu karışım %1’lik high melting agarose ile kaplanmış olan slaytlar üzerine pipetlendi ve üzerine lamel kapatıldı. Hazırlanan preparatta agarın katılmasını için lamellar 10-15 dakika süreyle +4 °C’de ve karanlıkta bırakıldı. Lamellar atıldıktan sonra, lamellar stok lizis solüsyonundan (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH: 10) taze olarak hazırlanan çalışma solüsyonu (stok lizis solüsyonuna, %1 Triton X-100 ve %10 DMSO ilave edilerek hazırlanan) içerisine yerleştirildi ve karanlıkta +4 °C’de 1 saat bekletildi. Lizis işleminden sonra, lamellar yatay elektroforez tankına (Cleaver Scientific, UK) aynı yönlü olarak yerleştirildi ve güç kaynağının voltajı 25 V, amperi de 300 mA’ye sabitlenerek 30 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında lamellar nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris, pH 7.5) ile 3 kez 5 dakika süreyle +4 °C’de yıkandı. Son olarak ethidium bromide (20 µg/mL) ile boyanan lamellar, lamel kapatılarak floresans mikroskop (Carl Zeiss / Scope A1, Almanya) altında fotoğraflandı. Skoring işlemi TriTek Comet Score Software kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.2).

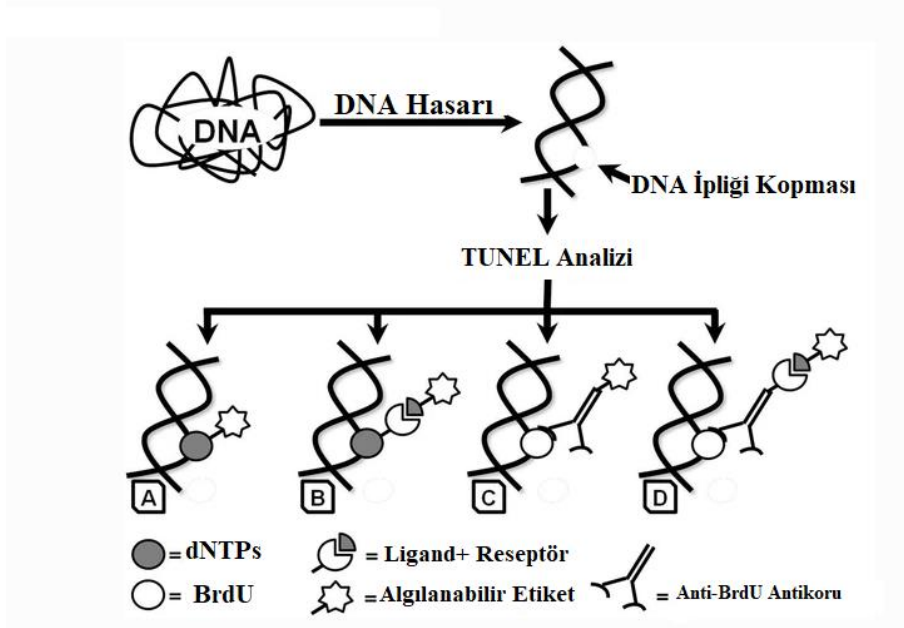




**Şekil 3.2:** Comet analizi basamakları. A) Hücre LMA süspansiyonun lamlara aktarılması, B) Lamların elektroforez tankına yerleştirilmesi, C) Elektroforezin başlatılması, D) Görüntüleme

### 3.9 Hücre Ölümünde Apoptozun Belirlenmesi (TUNEL Analizi)

Terminal deoksinükleotidil transferaz deoksinükleotitlerin (dUTP) çentik-uç etiketleme (TUNEL) yöntemi, DNA parçalanmasının saptanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) yöntemin temelini oluşturur. Modifiye edilmiş bir deoksinükleotit analogunun (dUTP'ler) DNA zincir kırıklarının serbest -OH terminaline bağlanmasını katalize eder. Bu dUTP'ler, ya doğrudan DNA zincir kırıklarının saptanmasına izin veren ya da bir veya daha fazla saptanabilir belirteç ile etkileşime girebilen çeşitli belirteçler kullanılarak etiketlenir (Majtnerová ve Roušar 2018) (Şekil 3.4). TUNEL analizi, apoptotik hücrelerin saptanması ve miktarının belirlenmesi için standart histokimyasal yöntemlerden biri olarak kabul edilebilir (Kyrylkova vd. 2012).



**Şekil 3.3:** TUNEL reaksiyonunda dNTP etiketleme seçenekleri. (A ve B’de gösterilenler, doğrudan etiketleme seçenekleridir, bunlar: bir etiketin dNTP’lere (A) doğrudan bağlanması ve reseptörün dNTP’lere (B) bağlanması. Bu reseptör, floresan veya enzimatik olarak etiketlenen ve DNA zincir kırıklarının saptanmasına izin veren ligand ile etkileşime girebilir. C ve D’de tasvir edilenler, BrdU kullanan etiketleme olasılıklarıdır: algılanabilir bir etiketle (C) etiketlenmiş anti-BrdU antikoru ile etkileşime giren BrdU’nun doğrudan bağlanması ve kendileri ligand ile etkileşime girebilen bir reseptör ile etiketlenen anti-BrdU antikoru ile etkileşime giren BrdU’nun (D) bağlanması. Bu ligand, floresan veya enzimatik olarak etiketlenmiştir ve DNA zincir kırıklarının tespit edilmesini sağlar (Majtnerová ve Roušar 2018))

### a) Hücre İzolasyonu

Hücreler 8 kuyucuklu kültür slaytlarına (Katalog No: 230108; NEST Biotechnology, Çin) ekildi. Hücreler etkin dozu belirlenen test bileşikleri ile muamele edildikten sonra medyumları çekildi. Sonra 37° C de su banyosunda ısıtılmış PBS ile X2 defa yıkandı. %4’lük paraformaldehit ile fiksasyon gerçekleştirildi. 20 dakika oda ısısında ve karanlıkta bekletildi. Hücreler tekrar PBS ile X2 defa yıkandı. %0.1 Triton X-100 ile muamele edildi ve karanlıkta 20 dakika bekletildi. Son olarak PBS ile X2 defa yıkandı.

## b) Tunel Analizi Aşaması

Tunel analizi için Tunel Assay Kit-FITC (Katalog No: ab66108; Abcam, İngiltere) kullanıldı. Kit protokolüne göre hazırlanan TUNEL reaktifi (Tablo 3.1) ile 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı ve ardından yıkama işlemleri yapıldı. Hücre çekirdekleri için ise analiz kiti ile gelen propidyum iyodür (PI) ile 30 dakika süre ile boyandı. Kuyucuklar slayttan ayrıldı ve lamel kapatıldı. Sonra floresans mikroskop altında görüntülendi

**Tablo 3.1:** TUNEL boyama solüsyonunun hazırlanması.

<b>DNA Etiketleme Solüsyonu</b>	<b>1 Örnek</b>
Reaksiyon Tamponu	10 µl
Tdt Enzimi	0.75 µl
FITC-dUTP	8 µl
dH <sub>2</sub> O	32.25 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>51 µl</b>

## 3.10 Western Blot Analizi

Çalışmada, MOTS-c ve 5-FU uygulaması sonrasında hücrel apoptoz ve otofaji süreçlerinde görevli proteinlerin düzeyi Western blot analizleri ile belirlendi.

### 3.10.1 Çözeltilerin Hazırlanması

#### a) 1.5 M Tris-HCL (pH: 8.8)

27.23 g Tris-base tartıldı ve 80 ml dH<sub>2</sub>O da çözüldü. Sonrasında pH: 8.8’e ayarlandı ve total hacim 150 mL tamamlandı. Kullanılacağı zamana kadar +4°C’de saklandı.

#### b) 0.5 M Tris-HCL (pH: 6.8)

6.06 g Tris-base tartıldı ve 60 ml dH<sub>2</sub>O da çözüldü. Sonrasına pH: 6.8’e ayarlandı ve total hacim 100 mL tamamlandı. Kullanılacağı zamana kadar +4°C’de saklandı.

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

Akrilamid	29.2 g
Bis-akrilamid	0.8 g
dH <sub>2</sub> O	100 mL

Bileşikler 100 ml içerisinde çözüldü ve sonrasında Whatman™ No:1 filtre kâğıdı kullanılarak süzüldü. Kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklandı.

**d) Running Buffer (10X, pH: 8.8)**

250 mM	Tris-Base	30.3 g
1.92 M	Glycine	144.1 g
%1	SDS	10 g
	dH <sub>2</sub> O	1000 mL

Tüm kimyasallar tartıldı, üzerine 700 mL dH<sub>2</sub>O eklendi. Çözünmenin kolay olması için 50-60 °C ısı verildi. pH ayarlandı ve total hacim 1 L'ye tamamlandı. Elektroforez de kullanılan buffer için hazırlanan stok buffer dan 100 mL alındı ve 900 mL dH<sub>2</sub>O eklendi.

**e) TBS (10X, pH: 7.4 –7.6)**

200 mM	Tris-Base	24.2 g
1500 mM	NaCl	87.6 g
	dH <sub>2</sub> O	1000 mL

Tüm kimyasallar tartıldı, üzerine 700 mL dH<sub>2</sub>O eklendi ve bileşikler çözüldü. pH ayarlandı ve total hacim 1 L'ye tamamlandı.

**f) Transfer Solüsyonu (Towbin Buffer) (1X, pH: 8.1 – 8.5)**

25 mM	Tris-Base	3.02 g
190 mM	Glisin	14.4 g
%1	SDS	1 g
%20	Metanol	200 mL
	dH <sub>2</sub> O	800 mL
<b>Toplam</b>		<b>1 L</b>

Tris-base, SDS ve glisin tartıldı, 500 mL dH<sub>2</sub>O da çözdürüldü. pH ayarlandı sonra metanol eklendi ve total hacim 1 L'ye tamamlandı.

**g) Lizis solüsyonu (RIPA buffer)**

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

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

### 3.10.2 Jellerin Hazırlanması

Çalışmada %12'lik SDS jel kullanıldı. Kullanılan jeller aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2:** SDS jellerin hazırlanması

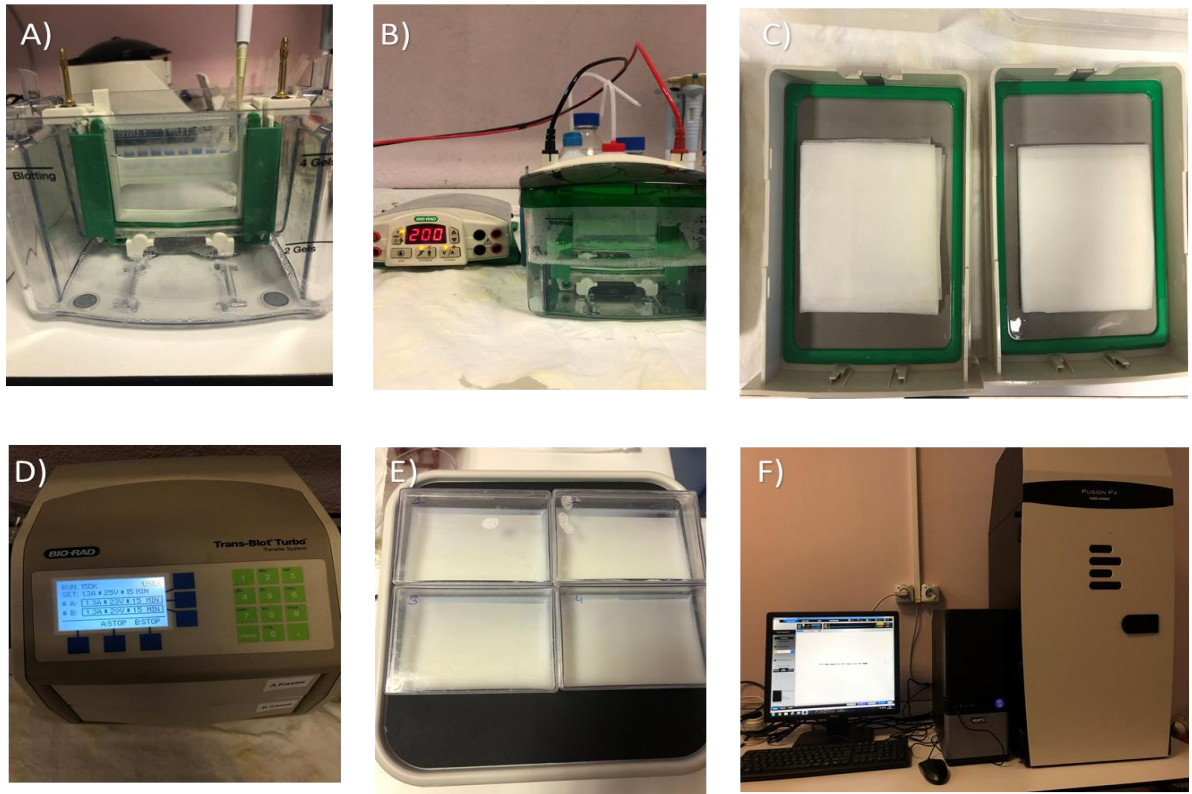
	<b>Yükleme Jeli (%4; 1 jel)</b>	<b>Ayırma Jeli (%12; 1 jel)</b>
<b>1.5 M Tris-base (pH:8.8)</b>	-	1.25 mL
<b>0.5 M Tris-base (pH:6.8)</b>	625 µL	-
<b>%10 SDS</b>	25 µL	50 µL
<b>%30 Akrilamid/Bis solüsyonu</b>	325 µL	2 mL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1.52 mL	1.67 mL
<b>%10 Amenyum persülfat</b>	15 µL	37.5 µL
<b>TEMED</b>	3 µL	7.5 µL
<b>TOPLAM</b>	<b>2.5 mL</b>	<b>5 mL</b>

### 3.10.3 Hücre İzolasyonu

Hücre öncelikle 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına ekildi ve sonrasında ise MOTS-c ve referans ilacın belirlenen etkin dozu (IC<sub>50</sub>) ile belirlenen etkin zaman süresince muamele edildi. Muamele sonrasında hücreler flasktan hücre sıyrıcı (cell scraper) kullanılarak toplandı ve hücre peletleri 2 defa PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine RIPA buffer eklendi. Ependorf tüplerine toplanan örnekler buz içerisinde bekletildi ve her 5 dakikada bir tüpler vortekslendi. 30 dakika lizis sonrası her bir örnek 5 saniye süreyle 3 defa sonike (QSonika 500, ABD) edildi. Ependorf tüplerde yer alan örnekler önceden soğutulmuş ultrasantrifüje yerleştirildi (SL8R, Thermo Scientific, ABD). Ardından santrifüj yapıldı (14.500 rpm, 30 dakika) ve sonrasında süpernatant yeni tüplere toplandı. Örneklerin toplam protein konsantrasyonu BCA kiti (Model no: orb90411, Biorbyt, İngiltere) kullanılarak belirlendi. Yüklemelemlerde kullanılacak örnekler 4X Laemmli örnek tamponu kullanılarak 30µg/20µl olacak şekilde hazırlandı. Çalışma süresince örnekler -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.11 Analizin Yapılması

%12 SDS jellere hazırlanan örnekler (30µg/20µL) yüklendi ve elektroforez sonrası 0.22 µm PVDF membranlara proteinler transfer edildi (TransBlot Turbo, BioRad, USA). Membran oda sıcaklığında 1 saat %5'lik süt tozuyla bloklandı ve sonra gece boyu 4 °C'de primer antikorla inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, membranlar 3x5 dakika TBS-T ile yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat oda sıcaklığında HRP ile konjüge edilmiş ikincil antikor uygulandı. Son olarak, ECL solüsyonu (Clarity ECL Western Blotting Substrate, BioRad, USA) ile muamele edilen membranlar, Fusion FX-7 (Vilber, Almanya) sisteminde görüntülendi. Blotların analizi Image J programında analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak insan anti-β-aktin antikorunu kullanıldı. Çalışmada basamakları Şekil 3.4'te özetlendi ve kullanılan antikorlar Tablo 3.3'te verildi.



**Şekil 3.4:** Western blot analizinin basamakları. Proteinlerin jele yüklenmesi (A), elektroferizin yapılması (B), transfer yığınının hazırlanması (C), proteinlerin transferinin gerçekleştirilmesi (D), proteinlerin bloklanması (E), membrandaki proteinlerin görüntülenmesi (F)

**Tablo 3.3:** Çalışmada kullanılan antikor bilgileri.

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

### 3.12 Verilerin İstatistiksel Analizi

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

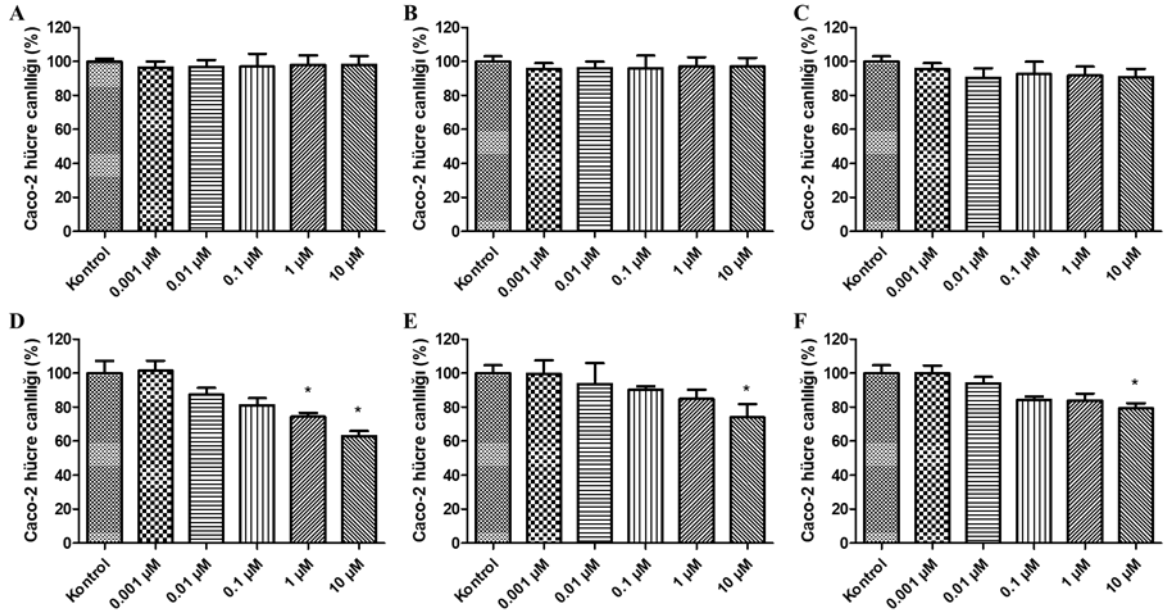


## 4. BULGULAR

### 4.1 MTT Analizlerin Sonuçları

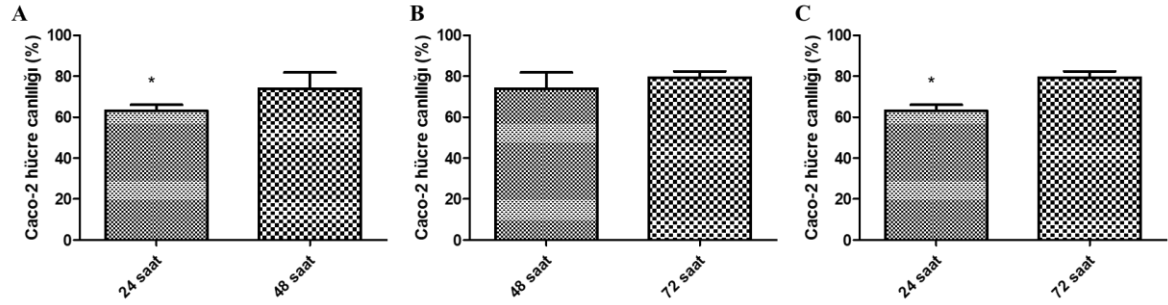
#### 4.1.1 MOTS-C'nin Caco-2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MOTS-c uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.1'de gösterildi. MOTS-c uygulamasından 1, 8 ve 16 saat sonra Caco-2 hücre canlılığında anlamı bir değişim görülmedi. Bu doğrultuda 24, 48 ve 72. saat süresince uygulanan yüksek doz MOTS-c hücre canlılığını önemli düzeyde azalttı. 24. saatte yüksek doza (10 µM) ek olarak uygulanan 1 µM'lık dozda da hücre canlılığı önemli düzeyde düşüktü ( $p<0.05$ ). Fakat 1 ve 10 µM'lık dozların 24 saatte gösterdiği etki arasında anlamlı bir farklılık yoktu.



**Şekil 4.1:** MOTS-c uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). (A: 1 saat sonra; B: 8 saat sonra; C: 16 saat sonra; D: 24 saat sonra; E: 48 saat sonra ve F: 72 saat sonra hücre canlılık düzeyleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi. İkili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±SD olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar)

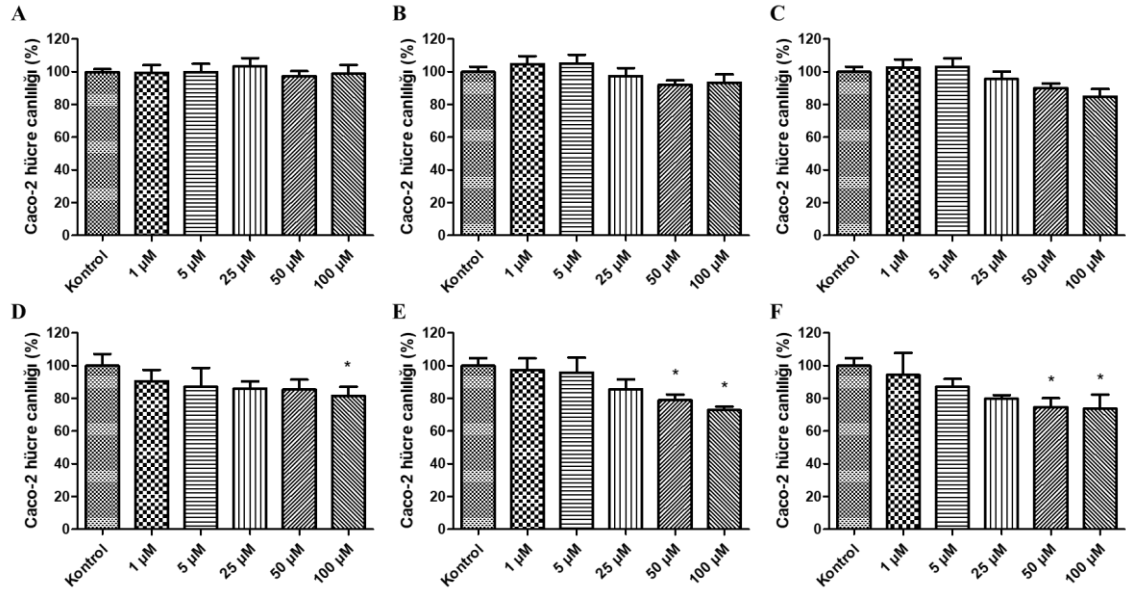
Bu sonuçlar doğrultusunda 24, 48 ve 72. saatlerde ortak olarak 10  $\mu$ M'lık MOTS-c dozu canlılığı düşürdü (Şekil 4.1). Zaman periyotlarının ikili karşılaştırmaları sonucu 48 ve 72. saatler arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 4.2). Buna karşın 24. saatte meydana gelen hücre canlılık değişimi hem 48. saate hem de 72. saate kıyasla daha düşük düzeydeydi. Bu değişim istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.2:** 10  $\mu$ M MOTS-c uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra Caco-2 hücre canlılık düzeyi (%). (A: 24 ve 48. saatler, B: 48 ve 72. saatler, C: 24 ve 72. saatlerde Caco-2 hücre canlılık düzeyleri. İkili karşılaştırmalar t testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  diğer gruba kıyasla).

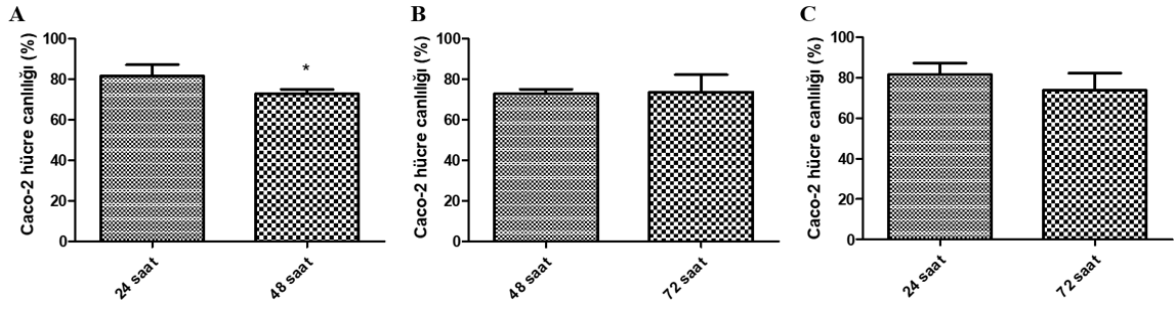
#### 4.1.2 5-FU'nun Caco-2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.3'te gösterildi. Buna göre uygulamadan 1, 8 ve 16. saat sonra hücre canlılık düzeylerinde anlamlı bir değişim tespit edilmedi. 24. saatte 5-FU'nun uygulanan yüksek dozu canlılık düzeyini kontrole kıyasla düşürdü ( $p < 0.05$ ). En belirgin azalma ise 48 ve 72 saat uygulama sonrasında belirlendi ve bu sürelerde 5-FU'nun uygulanan 50 ve 100  $\mu$ M dozlarının her ikisi de canlılığı kontrole kıyasla önemli düzeyde azalttı ( $p < 0.05$ ). 48. ve 72. saatlerde etkili olan 5-FU'nun 50 ve 100  $\mu$ M dozları Caco-2 hücre canlılığını benzer düzeyde etkiledi ve bu iki doz arasında anlamlı bir farklılık görülmedi.



**Şekil 4.3:** 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde meydana gelen canlılık değişim düzeyi (%). (A: 1 saat sonra; B: 8 saat sonra; C: 16 saat sonra; D: 24 saat sonra; E: 48 saat sonra ve F: 72 saat sonra hücre canlılık düzeyleri. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi. İkili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±SD olarak ifade edildi. \*p<0.05 kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar)

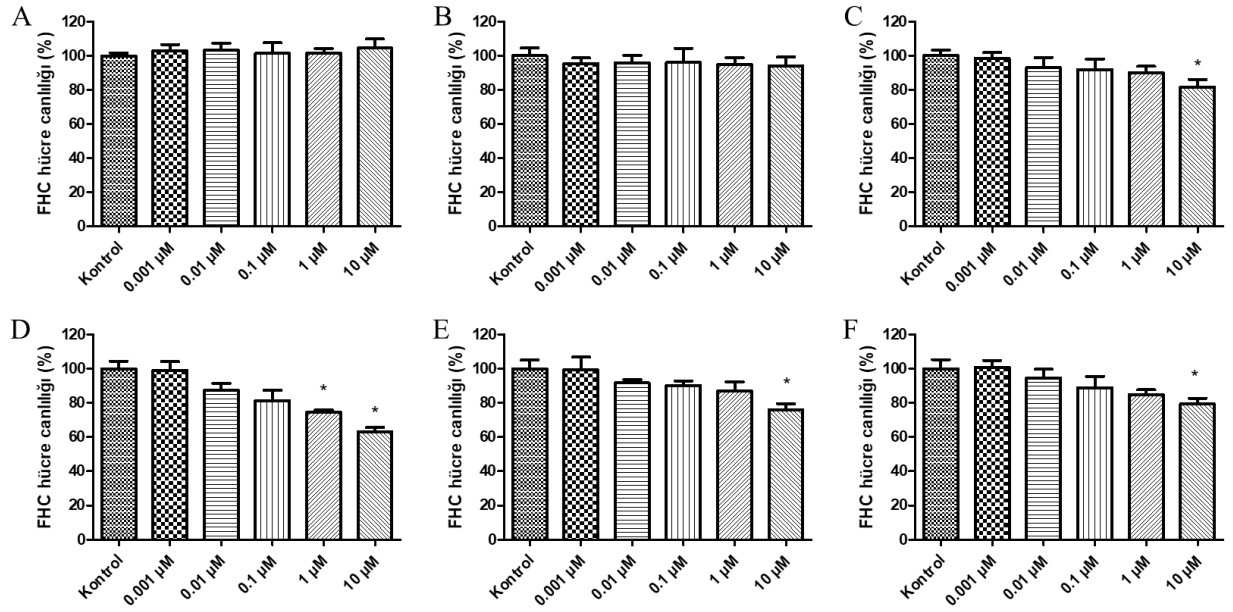
5-FU'nun uygulanan 100 µM dozu sonrasında 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılık karşılaştırmaları Şekil 4.4'te verildi. Buna göre, 5-FU 48. saatte 24. saate kıyasla daha fazla hücre canlılığını azalttığı belirlendi (p<0.05). Buna karşın 48 ve 72 saat, 24 ve 72 saat 5-FU uygulaması sonrasında Caco-2 hücre canlılığında meydana gelen değişim düzeyleri benzer düzeydeydi ve bu iki zaman dönemi arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi.



**Şekil 4.4:** 100  $\mu$ M 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücre canlılık düzeylerinin (%) ardışık zaman dönemleri arasındaki kıyaslama sonuçları. Caco-2 hücreleri ile muamele edilen 100  $\mu$ M 5-FU sonrasında en düşük hücre canlılığı 48 saat sonra tespit edildi. (A: 24 ve 48. saatler, B: 48 ve 72. saatler, C: 24 ve 72. Saatlerde Caco-2 hücre canlılık düzeyleri. İkili karşılaştırmalar t testi kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi. \* $p$ <0.05 diğer gruba kıyasla)

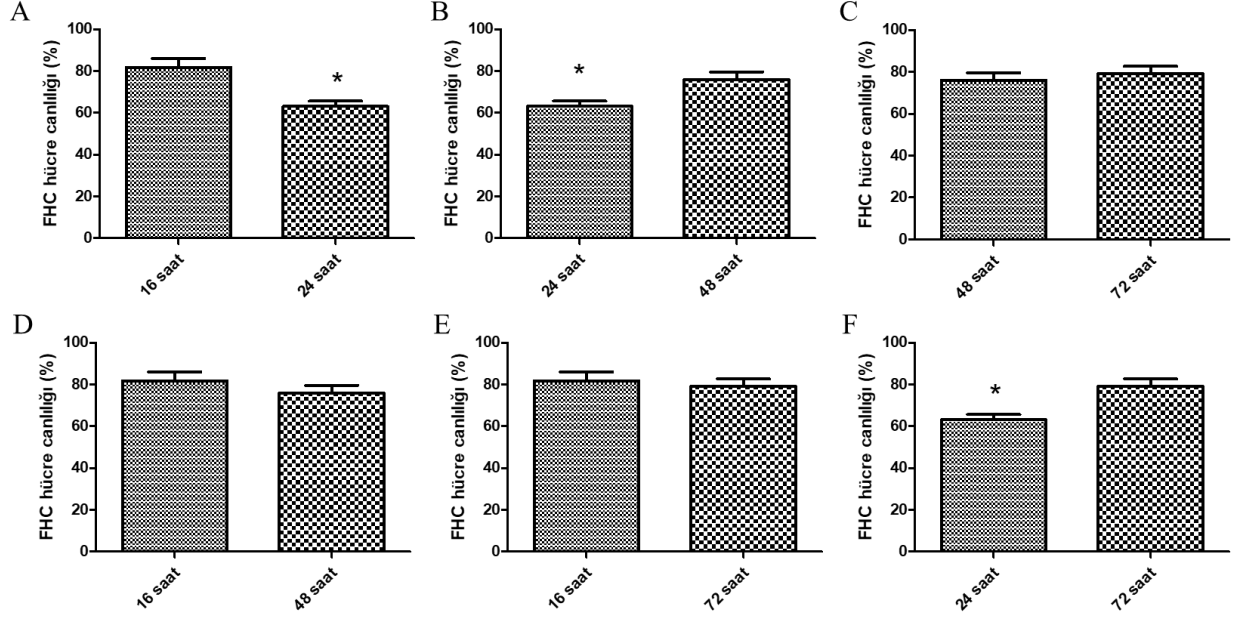
#### 4.1.3 MOTS-C'nin FHC Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

MOTS-c uygulamasından sonra FHC hücrelerinde belirlenen canlılık değişimi Şekil 4.5'te gösterildi. Uygulamadan 16-72. saat sonra gerçekleştirilen MTT analizleri sonrasında, ilgili peptidin hücre canlılığında anlamlı bir değişime neden olduğu belirlendi ( $p$ <0.05). Değişim görülen zaman dilimlerinde (8-72 saatler) MOTS-c'nin uygulanan 10  $\mu$ M dozu etkiliydi. Fakat yalnızca 24. saatte bu yüksek doza ek olarak MOTS-c'nin uygulanan 1  $\mu$ M MOTS-c'nin de canlılığı anlamlı düzeyde azalttığını gösterdi ( $p$ <0.05). 24. saatte meydana gelen 1 ve 10  $\mu$ M dozlardaki bu etkiler kıyaslandığında ise iki doz arasında anlamlı bir farklılığın meydana gelmediği belirlendi.



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

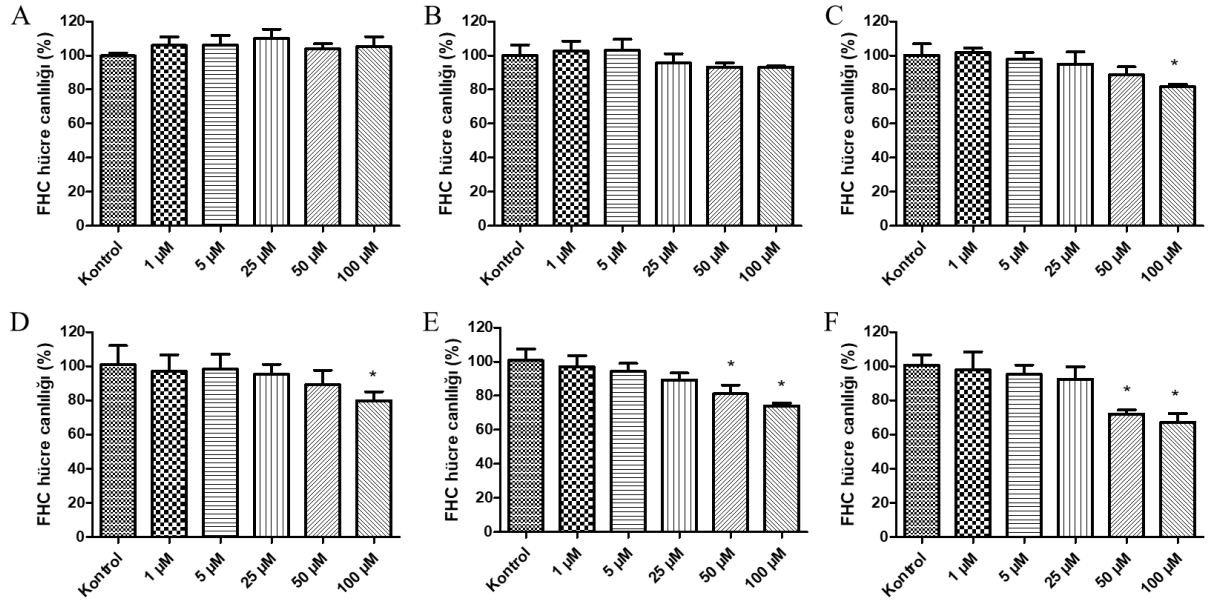
Tespit edilen sonuçlardan sonra etkin uygulama süresini belirleyebilmek için en yüksek dozun (10 µM) anlamlı olduğu zaman dilimleri karşılaştırıldı (Şekil 4.6). Buna göre 16 - 24 ve 24 - 48 saatlerde görülen etkilerin karşılaştırılması gerçekleştirildi. Her iki karşılaştırmada da 24 saat uygulamanın anlamlı düzeyde daha düşük hücre canlılığına neden olduğu belirlendi. Ayrıca 24-72 saatlerde görülen canlılık değişiminde de 24 saat MOTS-c uygulamasının daha etkili olduğu sonucuna varıldı ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar FHC hücre canlılığı üzerine MOTS-c'nin 24 saatte maksimum etki sergilediğini, sonraki zamanlarda (48 ve 72. saatlerde) bu etkinin ortadan kalktığını ve hücre canlılığında anlamlı artışların gerçekleştiğini ifade edebiliriz.



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

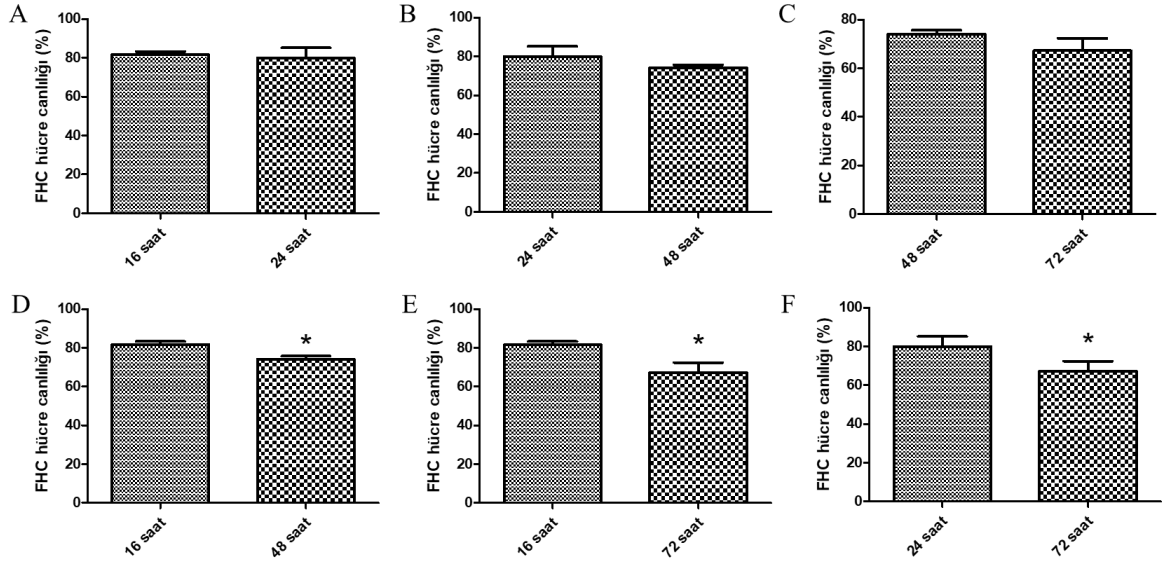
#### 4.1.4 5FU'nun FHC Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

5-FU uygulamasından 1-72 saat sonra hücre canlılığında meydana gelen değişimler Şekil 4.7'de gösterildi. 5-FU'nun uygulanan yüksek iki dozu (50 ve 100 μM) FHC hücre canlılığını 16. saatten itibaren anlamlı düzeyde etkiledi. 100 μM 5-FU uygulaması 16, 24, 48 ve 72 saatlerde, 50 μM 5-FU uygulaması ise 48 ve 72. saatlerde FHC hücre canlılığında anlamlı düzeyde azalmaya sebep oldu (p<0.05). 48 ve 72 saat uygulamalarda canlılığı etkileyen 50 ve 100 μM dozların etki düzeyleri arasında bir farklılık tespit edilemedi.



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

FHC hücrelerine uygulanan 100 µM 5-FU'nun etkin zaman noktasını belirlemek için zaman dilimleri ikili karşılaştırmalar ile değerlendirildi (Şekil 4.8). Buna göre 16 - 24, 24 - 48 ve 48 -72 saat uygulamalar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi. 100 µM 5-FU uygulaması FHC hücre canlılığını en çok 72 saat sonra etkiledi ve bu zaman dilimi ile 16 ve 24 saat uygulamalarının sonuçları karşılaştırıldı. 16 - 72 ve 24 - 72 saatler arasındaki karşılaştırmada FHC hücre canlılığının en çok 72 saatlik uygulama sonrası azaldığı ve bu azalmanın bu iki uygulama dönemine göre (16 ve 24 saatlik uygulamalar) anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlendi (p<0.05). Bu sonuçlar 5-FU uygulamasının artan zamana bağlı olarak FHC hücre canlılığında etkilerini sürdürdüğünü ve uzun sürelerde canlılık üzerine daha etkili olduğunu gösterdi.



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

MTT analizlerinden elde edilen sonuçlar neticesinde, MOTS-c uygulaması zamana bağlı olarak etkisinin değişkenlik gösterdiğini söyleyebiliriz. Yapılan MTT analizinde Caco-2 (insan kolon kanseri hücre serisi) hücrelerine ve FHC (insan kolon hücre serisi) hücrelerine uygulanan MOTS-c'nin farklı zaman dönemlerinde etkinlik sergilediği belirlendi. MOTS-c uygulamasından 24 saat sonra Caco-2 ve FHC hücrelerinde canlılık seviyesi önemli düzeyde düştü. Elde edilen veriler doğrultusunda MOTS-c'nin ve referans kanser ilacı 5-FU'nun IC<sub>50</sub> değerlikleri etkin zaman dönemi dikkate alınarak (Caco-2 ve FHC için belirlenen 24. Saat) hesaplandı ve Tablo 4.1'de gösterildi. Hücrelerin TUNEL boyama ve Western blot analizlerinde bileşiklerin elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri kullanıldı.



**Tablo 4.1:** Hücre serilerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU için IC<sub>50</sub> değerlikleri (µM).

	MOTS-c	5-FU
FHC (24 saat)	10.86	220.77
Caco-2 (24 saat)	10.74	192.2

#### 4.2 Comet Analizlerinde Uygulama Sürelerinin ve Kullanılan Dozların Belirlenmesi

MTT analiz sonuçları dikkate alınarak MOTS-c'nin insan kanser hücre serisi ve insan kolon hücresi üzerine anlamlı etki sergilediği muamele süreleri yukarıda belirtildiği üzere hesaplandı. MTT analizleri sonucunda Caco-2 ve FHC hücrelerine uygulanan MOTS-c'nin kolon kanseri hücre serisinde (Caco-2) ve kolon epitel hücresinde (FHC) 24 saatlik uygulama sonrasında canlılık seviyeleri diğer zaman dönemlerine kıyasla en düşüktü. Comet analizlerinde uygulama süresi olarak belirlenen bu zamanlar kullanıldı. Ayrıca Comet analizleri için uygulanacak dozlar da MTT analizleri dikkate alınarak seçildi. MTT analizleri sonrası canlılığın en az %70 olduğu dozlar Comet analizlerinde kullanıldı (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2:** Comet analizlerinde kullanılan MOTS-c ve 5-FU bileşiklerinin doz bilgileri.

	MOTS-c		5-FU	
	Seçilen Doz	Hücre Canlılığı (%)	Seçilen Doz	Hücre Canlılığı (%)
FHC (24 saat)	0.1 µM	81.39±6.10	100 µM	79.97±5.22
Caco-2 (24 saat)	0.1 µM	81.18±4.11	100 µM	81.50±5.59

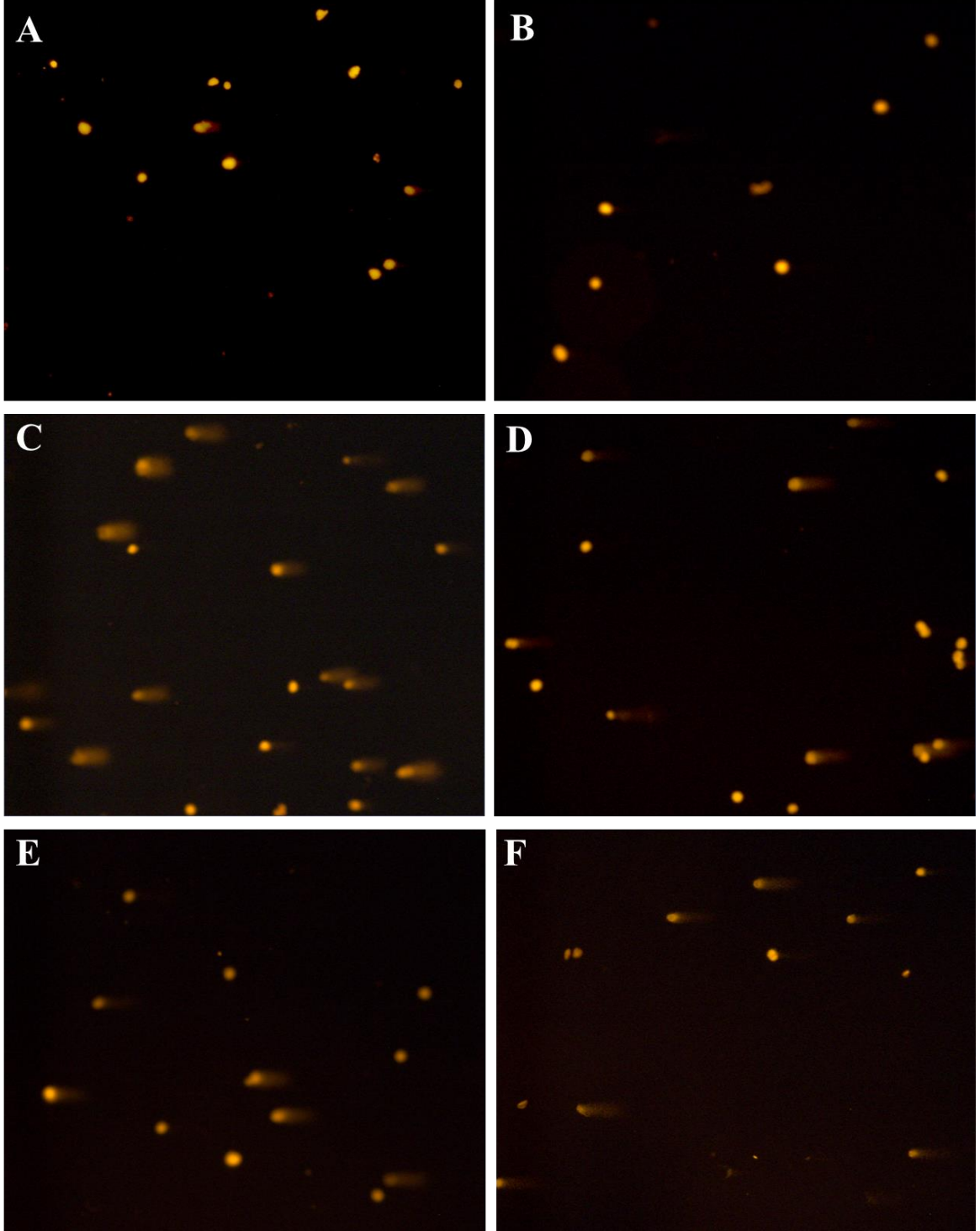
#### 4.2.1 Caco-2 Comet Analiz Sonuçları

Caco-2 hücrelerine 24 saat uygulanan MOTS-c ve 5-FU'nun DNA hasarına etkileri Tablo 4.3'te, analize ait örnek görseller de Şekil 4.9'da gösterildi. Uygulama sonrasında, MOTS-c'nin kontrole kıyasla DNA hasar parametreleri olan TL, TI ve TM seviyelerini arttırdığı bulundu ( $p < 0.05$ ). Buna karşın 24 saatlik 5-FU uygulaması Caco-2 hücrelerinde DNA hasar parametrelerini kısmen arttırsa da bu değişim kontrole kıyasla anlamlı değildi.

**Tablo 4.3:** Caco-2 hücresi comet analiz sonuçları.

Caco-2 (24 saat)	Kontrol	MOTS-c	5-FU
TL (px)	7 (4 - 43)	43 (11.5 – 99)*	22.5 (5 – 53)
TI (px)	35001 (21539-62624)	65701 (27486 - 165275.5)*	39257.5 (19079.75 – 94665)
TM (px)	0.41 (0.21 - 8.7)	4.58 (0.64 - 26.84)*	1.71 (0.28 - 8.98)

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



**Şekil 4.9:** Caco-2 hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 24 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. (A ve B: Kontrol hücreler, C ve D: 24 saat MOTS-c uygulaması sonrası, E ve F: 24 saat 5-FU uygulaması sonrası. X100)

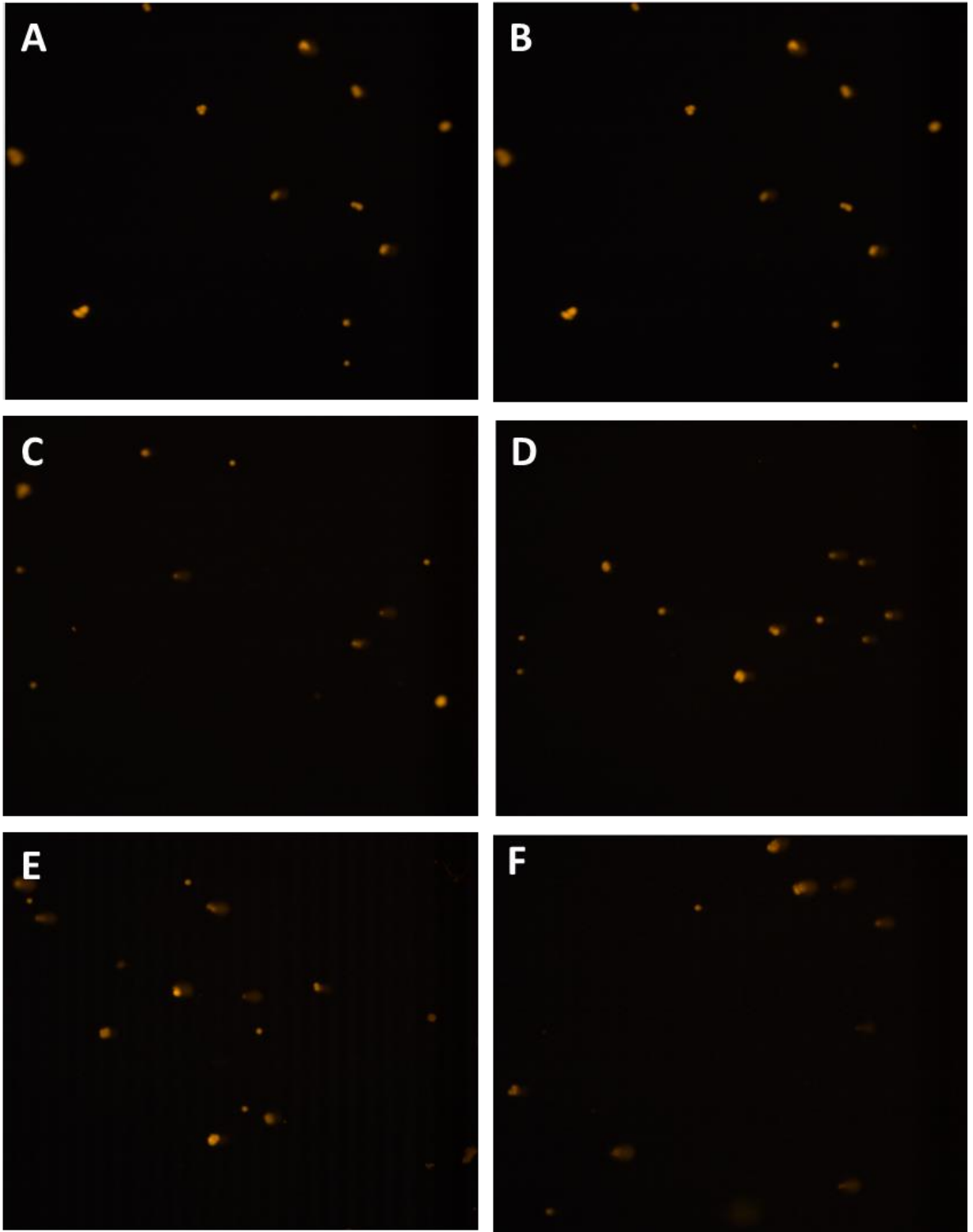
#### 4.2.2 FHC Comet Analiz Sonuçları

MOTS-c ve 5-FU ile 24 saat muamele edilen FHC hücrelerinin Comet analiz sonuçları Tablo 4.4'te, analize ait örnek görseller de Şekil 4.10'da gösterildi. MOTS-c uygulamasından sonra FHC hücrelerinin Comet analizlerinde TL, TI ve TM ölçümlerinin kontrole kıyasla önemli seviyede değişmediği görüldü. Buna karşın 5-FU uygulaması sonrasında da DNA hasar parametrelerinin üçü de kontrol grubuna kıyasla arttığı ve bu artışların TM ve TL parametrelerinde anlamlı düzeyde gerçekleştiği belirlendi ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 4.4:** FHC hücresi comet analiz sonuçları.

FHC (24 saat)	Kontrol	MOTS-c	5-FU
TL (px)	18 (5 - 44)	16 (6 - 44)	35 (8 - 53)*
TI (px)	36493 (19857 - 84228)	31171.5 (14665.75 - 69023.5)	56650.5 (19342.75 - 121347.5)
TM (px)	1.96 (0.30 - 10.89)	2.22 (0.38 - 11.11)	7.93 (0.65 - 21.34)*

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



**Şekil 4.10:** FHC hücrelerinin MOTS-c ve 5-FU ile uygulamasından 24 saat sonraki DNA hasar düzeyleri. (A ve B: Kontrol hücreler, C ve D: MOTS-c uygulaması sonrası, E ve F: 5-FU uygulaması sonrası. X100)

### **4.3 TUNEL Analiz Sonuçları**

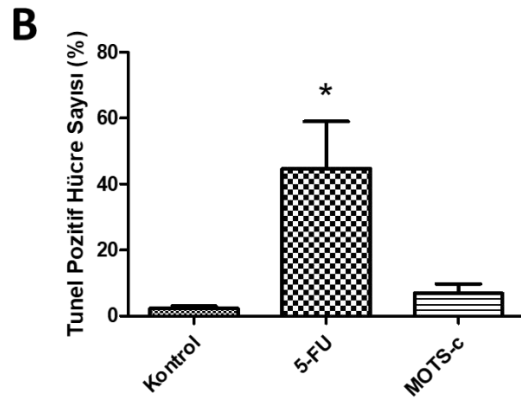
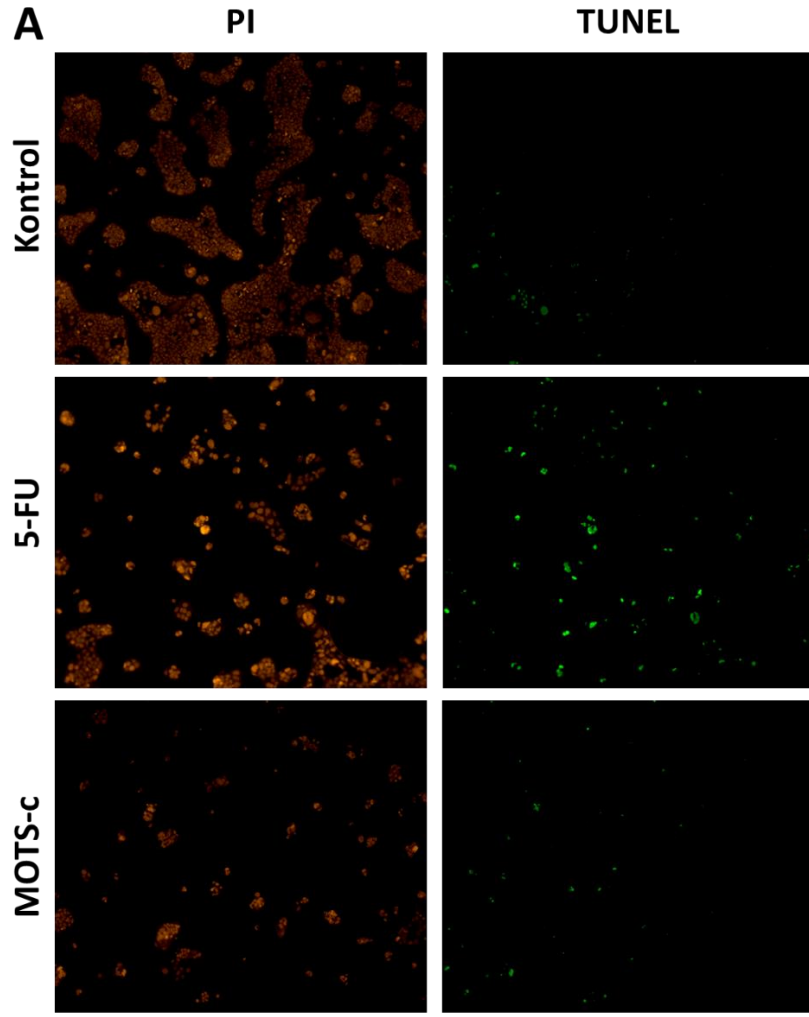
Çalışma kapsamında MOTS-c ve 5-FU'nun IC<sub>50</sub> dozları, etkin zamana dikkate alındı. Etkin doza uygun şekilde hücre serilerine uygulandı. Sonuçlar hücre serileri için değerlendirildi ve aşağıda özetlendi.

#### **4.3.1 Caco-2 Hücreleri TUNEL Analiz Sonuçları**

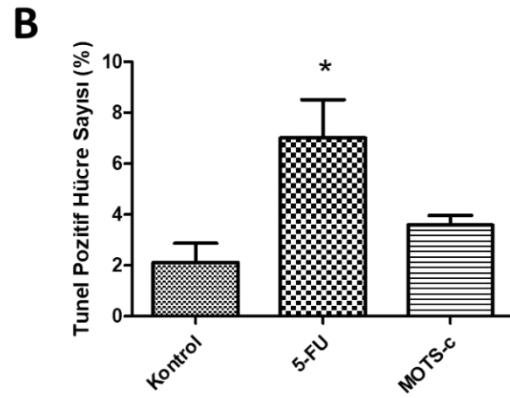
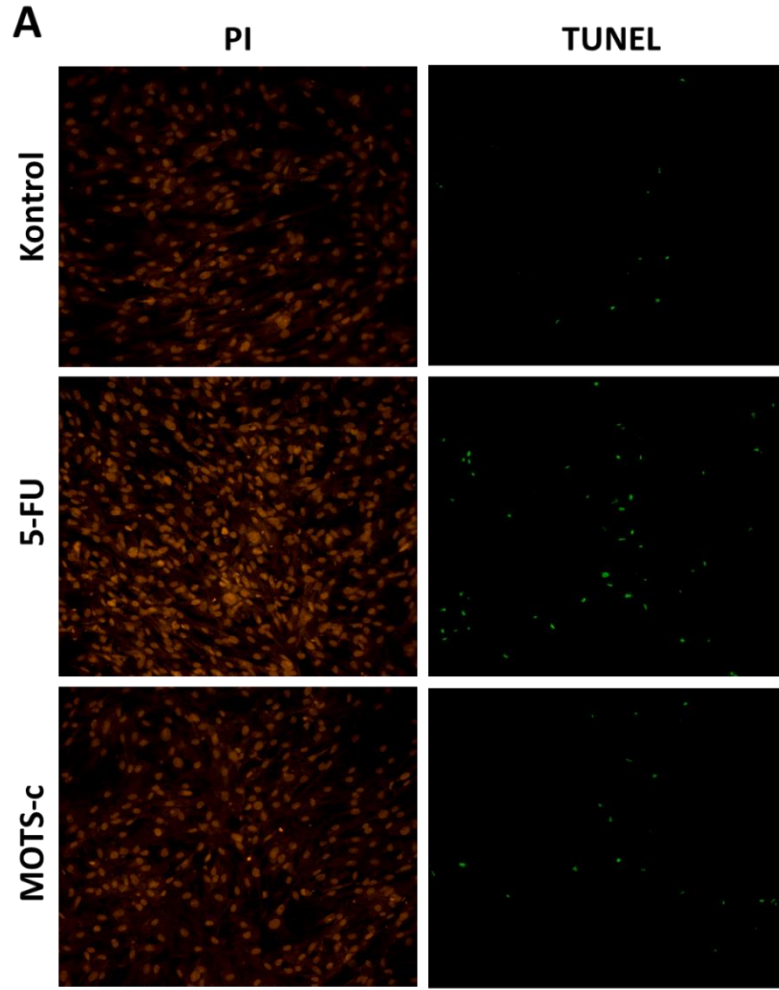
MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerdeki TUNEL boyama sonuçları Şekil 4.11'de gösterildi. Uygulamadan 24 saat sonra kontrol ve MOTS-c gruplarına kıyasla 5-FU uygulanan grupta TUNEL pozitif hücre sayısı yüksekti. Bu artış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). MOTS-c uygulanan grupta ise kontrol grubu ile benzer düzeyde TUNEL pozitif hücre sayısı belirlendi ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi.

#### **4.3.2 FHC Hücreleri TUNEL Analiz Sonuçları**

MOTS-c ve 5-FU uygulamasından 24 saat sonra grupların TUNEL analiz sonuçları Şekil 4.12'de verildi. Buna göre MOTS-c uygulamasından sonra TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla bir miktar artış gösterse de bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildi. 5-FU uygulamasından 24 saat sonra yapılan analizler bu bileşiğin FHC hücrelerinde TUNEL pozitif hücre sayısında kontrole kıyasla artışa neden olduğunu gösterdi ( $p<0.05$ ). 5-FU uygulaması MOTS-c' uygulamasına kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısında bir artışa neden olsa da bu değişim anlamlı düzeyde gerçekleşmedi.



**Şekil 4.11:** MOTS-c ve 5-FU uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinde TUNEL boyama sonuçları. A) Uygulama sonrası grupların floresans mikroskop görüntüleri, 100X. B) Uygulama sonrasında belirlenen grupların TUNEL pozitif hücre sayıları (%). Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±SD olarak ifade edildi. PI: propidyum iyodür.



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



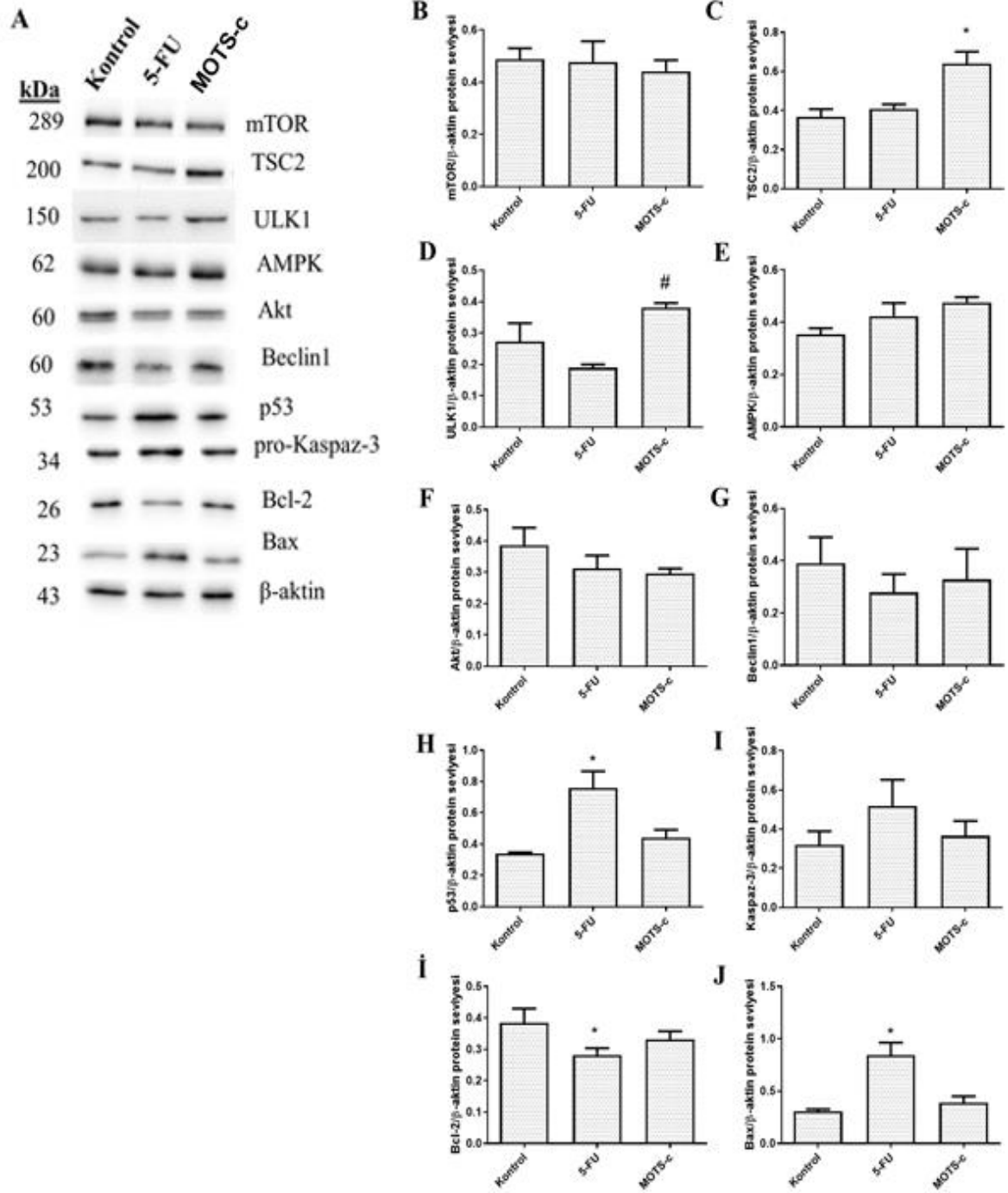
## 4.4 Western Analiz Sonuçları

### 4.4.1 Caco-2 Hücrelerinde Protein Seviyelerindeki Değişimler

Caco-2 hücrelerine uygulanan 5-FU sonrasında p53 ve Bax protein düzeyleri kontrole kıyasla yaklaşık yüksek bir oranda artışa neden oldu (Şekil 4.13 H ve J;  $p < 0.05$ ). 5-FU, kaspaz-3 ifadesinde bir artışa neden olsada, bu değişim kontrole kıyasla anlamlı değildi. Bunlara ek olarak Bcl-2 ifadesi 5-FU uygulanan grupta önemli düzeyde düşük bulundu (Şekil 4.13 İ;  $p < 0.05$ ). mTOR, TSC2, ULK1, AMPK, Akt ve Beclin1 protein düzeylerinde gözlenen değişimler ise kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Caco-2 hücrelerine MOTS-c uygulamasından 24 saat sonra, TSC-2 ve ULK1 protein seviyeleri diğer gruplara kıyasla yüksek düzeydeydi. TSC2 protein ifadesinde meydana gelen bu değişim kontrol grubuna kıyasla, ULK1 seviyesindeki artış ise 5-FU grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.13 C ve D). Apoptoz yolağında yer alan p53, kaspaz-3, Bcl-2 ve Bax proteinlerinin düzeyleri MOTS-c uygulamasına bağlı olarak kısmen değişim gösterse de bu meydana gelen farklılıklar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.13 H-J).

Bu sonuçlar 5-FU'nun Caco-2 hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. MOTS-c'nin ise TSC2/ULK1 aracılı otofajiyi indükleyerek hücresel sitotoksositeye neden olduğunu söyleyebiliriz.

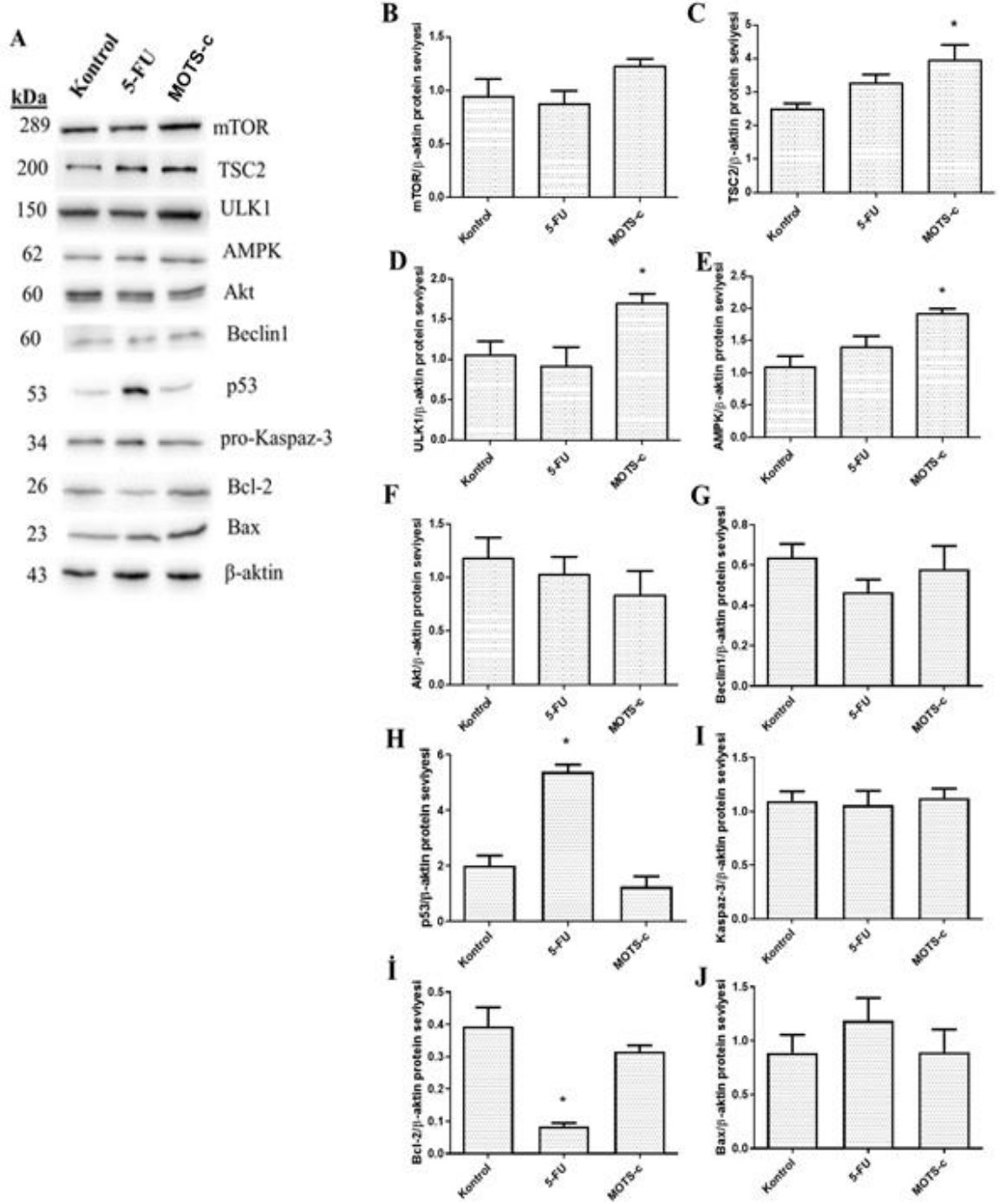


**Şekil 4.13:** Caco-2 hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri. A: Western blot membran görüntüleri, B-J: Protein miktarlarının grafiksel gösterimi. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama±SD olarak ifade edildi. \* $p < 0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, #  $p < 0.05$  5-FU grubuna kıyasla diğer gruplar.

#### 4.4.2 FHC Hücresinde Protein Seviyelerindeki Değişimler

MOTS-c ve 5-FU uygulamasından 24 saat sonra FHC hücrelerindeki apoptoz ve otofajide rol alan protein ifadelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.14'te gösterildi. 5-FU uygulaması sonrasında p53 ifadesi kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3 kat arttı ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.14 H). Ayrıca 5-FU, Bcl-2 ifadesini önemli ölçüde azalttı (Şekil 4.14 İ;  $p < 0.05$ ) ve Bax ifadesinde ise kısmen bir artışa sebep oldu (Şekil 4.14 J). Yapılan analizler 5-FU uygulamasının FHC hücrelerinde mTOR, TSC2, ULK1, AMPK, Akt, Beclin1 ve kaspaz-3 protein ifadelerinde anlamlı bir değişime neden olmadığını gösterdi.

FHC hücrelerine MOTS-c uygulamasından 24 saat sonra TSC2, ULK1 ve AMPK protein seviyeleri kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek bulundu (Şekil 4.14 C, D ve E). MOTS-c uygulaması sonrasında mTOR ifadesi bir miktar artış gösterdi ve bu değişim kontrol grubuna kıyasla anlamlı değildi (Şekil 4.14 A). MOTS-c uygulaması sonrasında pro-apoptotik (Bax ve kaspaz-3) ve anti-apoptotik (Bcl-2) protein seviyeleri kontrol grubuna benzer düzeydeydi. Bu sonuçlar MOTS-c'nin FHC hücrelerinde de TSC2/ULK1 aracılı otofajiyi indükleyerek hücre ölümüne sebep olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.14:** FHC hücrelerine uygulanan MOTS-c ve 5-FU sonrası belirlenen protein seviyeleri. A: Western blot membran görüntüleri, B-J: Protein miktarlarının grafiksel gösterimi. Grup ortalamaları Kruskal-Wallis H testi ile analiz edildi ve ikili karşılaştırmalarda Dunn testi kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edildi. \* $p<0.05$  kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, #  $p<0.05$  5-FU grubuna kıyasla diğer gruplar.

## 5. TARTIŞMA

MDP'ler hücre metabolizmasında önemli roller üstlenebilen bir biyoaktif protein ailesidir. Tanımlanan sekiz MDP diyabet (Ramanjaneya vd. 2019), obezite (Merry vd. 2020), prostat kanseri (Xiao vd. 2017) gibi hastalıkların patofizyolojisinde önemli roller oynar. Bir MDP olarak MOTS-c'nin konu alındığı çalışmalar genellikle T2D ve obezite üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Oysaki MOTS-c'nin hücresel enerji regülasyonunda önemli bir rol üstlenen AMPK ile mevcut ilişkisi düşünüldüğünde (Lee vd. 2015), bu proteinin farklı süreçlerde önemli roller üstlenebileceği düşünülmektedir. AMPK'nın hücresel enerji düzenlenmesindeki rolü göz önüne alındığında, başta kanser olmak üzere metabolik hastalıklar için bu molekülün potansiyel bir terapötik olabileceği varsayılabilir (Cool vd. 2006; Giordanetto ve Karis 2012). MOTS-c'nin AMPK seviyesini yükseltmesi bu peptidin kanser tedavisinde bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada MOTS-c'nin kolon kanseri hücreleri üzerine etkilerini gösteren ilk bulguları sunuyoruz.

Çalışmada MOTS-c uygulamasının Caco-2 ve FHC hücrelerinde, hücre canlılık düzeyi üzerine etkilerini MTT analizleri sonucu belirlendi. MOTS-c'nin uygulanan 10 µM dozu 24 saat sonra Caco-2 hücre canlılığını yaklaşık olarak %40 azalttı. 5-FU'nun ise yüksek doz uygulaması aynı zaman döneminde Caco-2 hücre canlılığını yaklaşık olarak %20 inhibe etti. Her iki bileşiğin uzun dönem uygulamaları (72 saat sonra) Caco-2 hücre canlılığı üzerine benzer seviyede etki sergiledi ve canlılık kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık olarak %20 daha düşüktü. FHC hücrelerinde ise MOTS-c'nin uygulanan yüksek dozu 24 saat sonra canlılığı yaklaşık %35 azalttı. 5-FU'nun uygulanan yüksek dozu ise bu hücre serisinde canlılığı 24 saat sonra yaklaşık %15 seviyesinde inhibe etti. Bileşiklerin 72 saat inkübasyonları sonucunda MOTS-c'nin 5-FU'ya kıyasla FHC hücreleri üzerine daha az sitotoksik etki sergilediği belirlendi. MOTS-c 72 saat sonra FHC hücre canlılığını yaklaşık %20 oranında azaltırken, 5-FU uygulaması hücre canlılığında yaklaşık olarak %40'lık bir azalma meydana getirdi. Bu sonuçlar MOTS-c'nin Caco-2 hücrelerinde 5-FU'ya kıyasla daha erken ve etkili bir sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermektedir.

Cheah vd. 24 saat ve 48 saat boyunca Caco-2 hücrelerinde 5-FU'nu sitotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, bu bileşiğin Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı zamana ve doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar 100 µM 5-FU uygulamasının 24 saatte Caco-2 hücrelerinde canlılığı kontrol değerlerinin %88'ine ve 48

saatte ise hücre canlılığında kontrol değerlerinin %70'ine kadar azaldığını bildirmektedir (Cheah vd. 2014). Zheng vd. Caco-2 hücrelerine uygulanan 5-FU'nun hücre canlılığını 36 saate kıyasla 48 saatte daha fazla etkilediğini ve sitotoksitenin zamana bağlı olarak güçlendiğini göstermiştir (Zheng vd. 2019). Elde ettiğimiz sonuçlar 5-FU'nun uygulama süresine ile sitotoksik etkisi arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu gösterdi ve bu sonuçlar mevcut literatürler ile uyumluydu.

Çalışmada MOTS-c ve 5-FU uygulamasının muhtemel genotoksik etkileri Comet analizleri yapılarak değerlendirildi. MTT analizleri sonrası canlılığın en az %70 olduğu dozlar hücre serilerine uygulandı. Sonuçlarımız MOTS-c uygulamasının Caco-2 hücrelerinde TL, TI ve TM parametrelerini kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde arttırdığını ve genotoksisiteye neden olduğunu gösterdi. FHC hücrelerine uygulanan MOTS-c'nin ise DNA hasar düzeyi kontrol grubu ile oldukça benzer seviyedeydi ve iki grup arasında anlam yoktu. 5-FU uygulaması Caco-2 hücrelerinde DNA hasarında artışa neden olsa da analiz edilen parametrelerdeki değişimler kontrol grubuna kıyasla anlamlı değildi. Buna karşın 5-FU uygulaması önemli düzeyde FHC hücrelerinde genotoksisiteye neden oldu ve bu değişim kontrol grubuna kıyasla anlamlı seviyedeydi.

Farklı hücre grupları üzerine uygulanan 5-FU, artan DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir (Mohapatra vd. 2011; Gomaa vd. 2015). Mohapatra vd. HCT-116 insan kolon kanseri hücre serisine uygulanan 5-FU'nun artan Comet uzunluğu ile sonuçlandığını bildirmektedir (Mohapatra vd. 2011). Diğer bir çalışmada araştırmacılar SW480 ve HCT-8 kolon kanseri hücre serilerine 5-FU'nun 12.5 ve 25 µg/ml dozlarını 24 saat uygulamış ve sonuç olarak 5-FU'nun doza bağlı olarak bu hücrelerde TL, TM, TI ve tail DNA% seviyelerinde artışa neden olduğunu göstermiştir (Sun vd. 2016). Sonuçlarımızla mevcut literatürlerle uyumlu olarak 5-FU'nun hücrelerde genotoksisiteye neden olduğunu ortaya koydu. MOTS-c'nin sadece Caco-2 hücrelerinde genotoksik etki sergilemesi, muhtemel bir tedavi durumunda sağlıklı hücreler üzerine olumlu bir özelliği olarak yansiyabilir.

MOTS-c ve 5-FU'nun belirlenen IC<sub>50</sub> dozları TUNEL analizlerinde kullanıldı ve böylelikle bu bileşiklerin apoptotik hücre ölümü üzerine etkileri belirlendi. MOTS-c uygulaması sonrasında yapılan TUNEL analizleri, MOTS-c'nin TUNEL pozitif hücre sayısını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde değiştirmedini gösterdi. Buna karşın 5-FU'nun TUNEL pozitif hücre sayısını arttırdığını, bu artışın Caco-2 ve FHC hücre hatlarında anlamlı düzeyde

meydana geldiğini belirledik. 5-FU tek başına veya diğer terapötik ilaçlarla kombinasyon halinde, çeşitli kanserlerin klinik tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 5-FU çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne sebep olur (Li vd. 2020). Kao vd. HT-29, Colo 320DM, SW480 ve LoVo kolorektal karsinom hücre serilerinde 5-FU uygulamasının apoptozu indüklediğini bildirmiştir (Kao vd. 2012). Mevcut literatürler çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Sonuçlarımız MOTS-c'nin sitotoksik etkisinin apoptotik süreçlerden başka ölüm mekanizmaları ile gerçekleşebileceğini, 5-FU'nun ise belirgin şekilde hücrelerde apoptoza sebep olduğunu göstermektedir.

Apoptozun içsel yolunun belirlenmesinde p53, Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 protein seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi sürecin moleküler düzeyde aydınlatılması için önemlidir. Tümör baskılayıcı p53, yaşlanmanın düzenlenmesinde, hücre döngüsünün kontrolünde ve strese yanıt olarak apoptozun indüklenmesinde önemli roller üstlenir (Wawryk-Gawda vd. 2014; Wang vd. 2015). p53, Bcl-2 aile üyelerinin ifadelerini düzenleyerek intrinsik yol aracılığıyla apoptozu kontrol eder (Zhang vd. 2021). Yaptığımız Western blot analizleri sonrasında 5-FU uygulamasının hücre serilerinde p53 ve Bax protein ifadelerinin artışıyla, buna karşın anti-apoptotik Bcl-2 protein ifadesinde ise azalmayla sonuçlandığını gösterdik. MOTS-c uygulamasının ise hücrelerdeki Bax, Bcl-2, kaspaz-3 ve p53 protein ifadelerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde değiştirmedeğini belirledik. Bax/Bcl-2 protein oranı mitokondriyal apoptozun önemli bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar 5-FU uygulanan kolon (Kao vd. 2012; Zou vd. 2012), mide (Seo vd. 2011) ve meme (Ponce-Cusi ve Calaf 2016) kanseri hücrelerinde pro-apoptotik Bax ifadesinin arttığını ve anti-apoptotik protein seviyelerinin ise baskılanarak mitokondriyal apoptotik yolağın aktivasyonu ile apoptozun indüklendiğini bildirilmektedir. Elde ettiğimiz bulgular ve mevcut bilgiler doğrultusunda kolon hücre serilerinde 5-FU'nun apoptotik süreci aktive ederek hücre ölümünü gerçekleştirdiğini göstermektedir. Buna karşın MOTS-c'nin ise farklı hücre ölüm süreçleri aracılığıyla bir etki sergileyerek sitotoksik ortama koyduğunu söyleyebiliriz.

Otofaji aracılığıyla hücre ölümü besin yoksunluğu, reaktif oksijen türleri, DNA hasarı, protein kümeleri, hasarlı organeller veya hücre içi patojenler gibi çok çeşitli streslere yanıt olarak ortaya çıkabilir (Levine ve Kroemer 2008; Kroemer vd. 2010). Otofaji indüksiyonu, enerji algılayan proteinler tarafından yukarı akışta kontrol edilir. mTOR, bol miktarda besin varlığında otofajiyi kapatan ana inhibitör sinyalin önemli bir düzenleyicisidir. Artan

AMP/ATP oranı hücrel enerji eksikliğinin önemli bir belirteçidir ve bu durum AMPK'yı aktive eden önemli bir uyarıcıdır (Carling 2017). AMPK aktivasyonu hücrel enerji homeostazını korumak için ATP tüketen (anabolik) yolları aşağı regüle eder ve otofaji gibi ATP üreten (katabolik) yolları yukarı regüle eder. Ayrıca AMPK aktivasyonu, mTOR'un tümörjenik etkilerini TSC1/TSC2 kompleksi yoluyla aşağı regüle eder, böylece artan apoptoz ve otofaji aracılı hücre ölümüne yol açar (Anwar vd. 2014). Buna ek olarak AMPK, yukarı akış otofaji faktörlerini (ULK1 ve Beclin1 gibi) fosforile ederek doğrudan otofajiyi uyarır (Kroemer vd. 2010; Abada ve Elazar 2014; Mathiassen vd. 2017).

MOTS-c ve 5-FU'nun hücre serilerine uygulamasının ardından AMPK aracılı otofaji sürecine etkilerini belirlemek için ULK1, TSC2, mTOR ve Beclin1 protein ifadelerinin seviyelerini inceledik. Sonuçlarımız MOTS-c uygulamasının Caco-2 ve FHC hücrelerinde AMPK protein seviyesini kısmen arttırdığını, FHC hücrelerinde gözlenen artışın anlamlı seviyede olduğunu gösterdi. Ayrıca MOTS-c TSC-2 ve ULK1 protein ifadelerinde diğer gruplara kıyasla önemli düzeyde artışa neden oldu. Buna karşın MOTS-c uygulaması mTOR ve Beclin1 ifadesinde bir farklılığa neden olmadı. 5-FU uygulaması sonrasında ise AMPK, mTOR, ULK1, TSC2 ve Beclin1 protein düzeyleri kontrol ile benzer seviyedeydi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar MOTS-c'nin AMPK ifadesini arttırarak ULK1 ve TSC2 aracılı otofajiyi indüklediğini ve böylelikle sitotoksik etki ortaya koyduğunu göstermektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar MOTS-c'nin enerji metabolizması, T2D, obezite, kardiyovasküler sistem üzerinde rollerinin olduğunu ortaya koymuştur. MOTS-c'nin AMPK aracılı gen regülasyonunu düzenlediği ve böylelikle hücresel süreçlerde önemli roller üstlendiği bildirilmektedir (Lee vd. 2015; Kim vd. 2018; Yin vd. 2020). AMPK'nın başta kanser olmak üzere birçok patolojik durumda inhibe edildiğini ve AMPK'nın aktivasyonunun hastalıkları tedavi etmek için faydalı olabileceği bildirilmektedir (Jeon 2016). Bu çalışmada MOTS-c'nin kolon kanseri hücre serisinde otofaji aracılı hücre ölümünü uyardığını bildiriyoruz. Yapılacak *in vivo* çalışmalar MOTS-c'nin göstermiş olduğu bu etkinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır. Yapılacak kapsamlı çalışmalar sonrasında MOTS-c'nin kolon kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik aday olabileceğini düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

- Abada, A., Elazar, Z. (2014). Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep*, 15(8): 839-852.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2): 423-432.
- Ahn, C. H., Choi, E. H., Kong, B. S., Cho, Y. M. (2020). Effects of MOTS-c on the mitochondrial function of cells harboring 3243 A to G mutant mitochondrial DNA. *Molecular biology reports*, 47(5): 4029-4035.
- Ait Ouakrim, D., Pizot, C., Boniol, M., Malvezzi, M., Boniol, M., Negri, E., Bota, M., Jenkins, M. A., Bleiberg, H., Autier, P. (2015). Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ*, 351: h4970.
- Al-Benna, S., Shai, Y., Jacobsen, F., Steinstraesser, L. (2011). Oncolytic activities of host defense peptides. *International journal of molecular sciences*, 12(11): 8027-8051.
- Ansari, M. Y., Ahmad, N., Haqqi, T. M. (2018). Butein activates autophagy through AMPK/TSC2/ULK1/mTOR pathway to inhibit IL-6 expression in IL-1 $\beta$  stimulated human chondrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(3): 932-946.
- Anwar, M. A., Abou Kheir, W., Eid, S., Fares, J., Liu, X., Eid, A. H., Eid, A. A. (2014). Colorectal and prostate cancer risk in diabetes: metformin, an actor behind the scene. *Journal of Cancer*, 5(9): 736.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4): 683-691.
- Bailey, C. E., Hu, C.-Y., You, Y. N., Bednarski, B. K., Rodriguez-Bigas, M. A., Skibber, J. M., Cantor, S. B., Chang, G. J. (2015). Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA surgery*, 150(1): 17-22.
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J.-L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J. r., Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20): 13964-13971.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6): 394-424.
- Brenner, D., Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current opinion in cell biology*, 21(6): 871-877.
- Brenner, H., Chang-Claude, J., Seiler, C. M., Rickert, A., Hoffmeister, M. (2011). Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Annals of internal medicine*, 154(1): 22-30.
- Brenner, H., Kloor, M., Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927): 1490-1502.
- Cain, K., Bratton, S. B., Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84(2-3): 203-214.
- Carling, D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Current opinion in cell biology*, 45: 31-37.
- Cheah, K. Y., Howarth, G. S., Bastian, S. E. (2014). Grape seed extract dose-responsively decreases disease severity in a rat model of mucositis; concomitantly enhancing chemotherapeutic effectiveness in colon cancer cells. *PLoS One*, 9(1): e85184.
- Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism*, 3(6): 403-416.
- Cottet, V., Jooste, V., Fournel, I., Bouvier, A.-M., Faivre, J., Bonithon-Kopp, C. (2012). Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: a population-based cohort study. *Gut*, 61(8): 1180-1186.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(1): 49-63.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207): 1467-1480.
- Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89(2): 271-277.

- Deter, R. L., De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology*, 33(2): 437-449.
- Ekert, P. G., Vaux, D. L. (2005). The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current opinion in cell biology*, 17(6): 626-630.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4): 495-516.
- Ferguson, F. M., Gray, N. S. (2018). Kinase inhibitors: the road ahead. *Nature reviews Drug discovery*, 17(5): 353-377.
- Fogh, J., Wright, W. C., Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 58(2): 209-214.
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiological reviews*, 98(2): 813-880.
- Galluzzi, L., Zamzami, N., Rouge, T. d. L. M., Lemaire, C., Brenner, C., Kroemer, G. (2007). Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis*, 12(5): 803-813.
- Gaspar, D., Veiga, A. S., Castanho, M. A. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in microbiology*, 4: 294.
- Giordanetto, F., Karis, D. (2012). Direct AMP-activated protein kinase activators: a review of evidence from the patent literature. *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(12): 1467-1477.
- Gomaa, I. E., Abdel Gaber, S. A., Bhatt, S., Liehr, T., Gleib, M., El-Tayeb, T. A., Abdel-Kader, M. H. (2015). In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of gold nanoparticles-mediated photo-thermal therapy versus 5-fluorouracil. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(2): 102.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reynies, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*, 21(11): 1350-1356.
- Haraldsdottir, S., Einarsdottir, H. M., Smaradottir, A., Gunnlaugsson, A., Halfdanarson, T. R. (2014). Colorectal cancer-review. *Laeknabladid*, 100(2): 75-82.
- Harris, F., Dennison, S. R., Singh, J., Phoenix, D. A. (2013). On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Medicinal research reviews*, 33(1): 190-234.

- Hasegawa, J., Iwamoto, R., Otomo, T., Nezu, A., Hamasaki, M., Yoshimori, T. (2016). Autophagosome–lysosome fusion in neurons requires INPP 5E, a protein associated with Joubert syndrome. *The EMBO journal*, 35(17): 1853-1867.
- Herzig, S., Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(2): 121-135.
- Horáková, K. n., Šovčíková, A., Seemannová, Z., Syrová, D., Bušányová, K. n., Drobná, Z., Ferenčík, M. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(6): 650-664.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S.-i., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 20(7): 1981-1991.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1): 1-20.
- i Ferrer, B.-C. S., van Roekel, E., Lynch, B. M. (2018). The role of physical activity in managing fatigue in cancer survivors. *Current nutrition reports*, 7(3): 59-69.
- Igney, F. H., Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4): 277-288.
- Jackson, A. L., Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1-2): 7-21.
- Jeon, S.-M. (2016). Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & molecular medicine*, 48(7): e245-e245.
- Jess, T., Rungoe, C., Peyrin–Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 10(6): 639-645.
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular biology of the cell*, 25(8): 1327-1337.
- Jiao, S., Peters, U., Berndt, S., Brenner, H., Butterbach, K., Caan, B. J., Carlson, C. S., Chan, A. T., Chang-Claude, J., Chanock, S. (2014). Estimating the heritability of colorectal cancer. *Human molecular genetics*, 23(14): 3898-3905.

- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*, 20(7): 1992-2003.
- Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S., Wang, S., Konorev, E., Kotamraju, S. (2002). Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Molecular and cellular biochemistry*, 234(1): 119-124.
- Kao, T. Y., Chung, Y. C., Hou, Y. C., Tsai, Y. W., Chen, C. H., Chang, H. P., Chou, J. L., Hsu, C. P. (2012). Effects of ellagic acid on chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal carcinoma cells. *Anticancer Res*, 32(10): 4413-4418.
- Kara, F., Keskinlik, B. "Türkiye kanser istatistikleri 2017". from [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2017.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf). Son erişim tarihi:17.11.2021)
- Kasi, P. M., Shahjehan, F., Cochuyt, J. J., Li, Z., Colibaseanu, D. T., Merchea, A. (2019). Rising proportion of young individuals with rectal and colon cancer. *Clinical colorectal cancer*, 18(1): e87-e95.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4): 239-257.
- Kim, J. H., Lee, S. Y., Oh, S. Y., Han, S. I., Park, H. G., Yoo, M., Kang, H. S. (2004). Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncology reports*, 12(6): 1233-1238.
- Kim, K. H., Son, J. M., Benayoun, B. A., Lee, C. (2018). The mitochondrial-encoded peptide MOTS-c translocates to the nucleus to regulate nuclear gene expression in response to metabolic stress. *Cell metabolism*, 28(3): 516-524. e517.
- Kim, K. H., Son, J. M., Benayoun, B. A., Lee, C. (2018). The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress. *Cell Metab*, 28(3): 516-524 e517.
- Kim, S. J., Xiao, J., Wan, J., Cohen, P., Yen, K. (2017). Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *The Journal of physiology*, 595(21): 6613-6621.
- Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science*, 118(1): 7-18.
- Krishnamurthy, N., Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer treatment reviews*, 62: 50-60.

- Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2): 280-293.
- Ktistakis, N. T., Tooze, S. A. (2016). Digesting the expanding mechanisms of autophagy. *Trends in cell biology*, 26(8): 624-635.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis*, Springer: 41-47.
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24: vi64-vi72.
- Lamb, C. A., Yoshimori, T., Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(12): 759-774.
- Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. *The impact of food bioactives on health*: 103-111.
- Lee, C., Kim, K. H., Cohen, P. (2016). MOTSC-c: a novel mitochondrial-derived peptide regulating muscle and fat metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 100: 182-187.
- Lee, C., Zeng, J., Drew, B. G., Sallam, T., Martin-Montalvo, A., Wan, J., Kim, S.-J., Mehta, H., Hevener, A. L., de Cabo, R. (2015). The mitochondrial-derived peptide MOTSC-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*, 21(3): 443-454.
- Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1): 27-42.
- Levine, B., Liu, R., Dong, X., Zhong, Q. (2015). Beclin orthologs: integrative hubs of cell signaling, membrane trafficking, and physiology. *Trends in cell biology*, 25(9): 533-544.
- Li, T., Si, W., Zhu, J., Yin, L., Zhong, C. (2020). Emodin reverses 5-Fu resistance in human colorectal cancer via downregulation of PI3K/Akt signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, 12(5): 1851.
- Lowe, S. W., Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3): 485-495.
- Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Current opinion in cell biology*, 22(2): 181-185.
- Majtnerová, P., Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular biology reports*, 45(5): 1469-1478.
- Martin, S., Reutelingsperger, C., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R., Laface, D. M., Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane

- phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*, 182(5): 1545-1556.
- Massey, A., Kiffin, R., Cuervo, A. M. (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12): 2420-2434.
- Mathiassen, S. G., De Zio, D., Cecconi, F. (2017). Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front Oncol*, 7: 51.
- Merry, T. L., Chan, A., Woodhead, J. S., Reynolds, J. C., Kumagai, H., Kim, S.-J., Lee, C. (2020). Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 319(4): E659-E666.
- Messersmith, W. A. (2019). NCCN guidelines updates: management of metastatic colorectal cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(5.5): 599-601.
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7): 673-682.
- Mohapatra, P., Preet, R., Choudhuri, M., Choudhuri, T., Kundu, C. N. (2011). 5-fluorouracil increases the chemopreventive potentials of resveratrol through DNA damage and MAPK signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Oncol Res*, 19(7): 311-321.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130(1): 165-178.
- Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M. M., Rao, K. R., Chand, P., Bhat, B. V. (2011). Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J Pharmacol Pharmacother*, 2(2): 107-111.
- Oh, D.-Y., Bang, Y.-J. (2020). HER2-targeted therapies—a role beyond breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(1): 33-48.
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell research*, 24(1): 9-23.
- Olive, P. L., Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1: 23.
- Parzych, K. R., Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3): 460-473.



- Perez-Tomas, R. (2006). Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current medicinal chemistry*, 13(16): 1859-1876.
- Ponce-Cusi, R., Calaf, G. M. (2016). Apoptotic activity of 5-fluorouracil in breast cancer cells transformed by low doses of ionizing alpha-particle radiation. *Int J Oncol*, 48(2): 774-782.
- Poon, I. K., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3): 166-180.
- Qin, Q., Delrio, S., Wan, J., Widmer, R. J., Cohen, P., Lerman, L. O., Lerman, A. (2018). Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *International journal of cardiology*, 254: 23-27.
- Ramanjaneya, M., Bettahi, I., Jerobin, J., Chandra, P., Abi Khalil, C., Skarulis, M., Atkin, S. L., Abou-Samra, A. B. (2019). Mitochondrial-Derived Peptides Are Down Regulated in Diabetes Subjects. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 331.
- Riedl, S., Zwegtlick, D., Lohner, K. (2011). Membrane-active host defense peptides—challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and physics of lipids*, 164(8): 766-781.
- Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40): 29652-29659.
- Sauler, M., Bazan, I. S., Lee, P. J. (2019). Cell death in the lung: the apoptosis–necroptosis axis. *Annual review of physiology*, 81: 375-402.
- Seo, J. S., Kim, T. G., Hong, Y. S., Chen, J. Y., Lee, S. K. (2011). Contribution of Epstein-Barr virus infection to chemoresistance of gastric carcinoma cells to 5-fluorouracil. *Arch Pharm Res*, 34(4): 635-643.
- Shen, H.-M., Mizushima, N. (2014). At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in biochemical sciences*, 39(2): 61-71.
- Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Anderson, W. F., Miller, K. D., Ma, J., Rosenberg, P. S., Jemal, A. (2017). Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974–2013. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(8).
- Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M., Sorger, P. K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, 459(7245): 428-432.

- Sun, Z. Z., Zhang, T., Ning, K., Zhu, R., Liu, F., Tang, S. C., Jiang, B., Hua, D. (2016). B7-H3 upregulates BRCC3 expression, antagonizing DNA damage caused by 5-Fu. *Oncol Rep*, 36(1): 231-238.
- Syngal, S., Brand, R. E., Church, J. M., Giardiello, F. M., Hampel, H. L., Burt, R. W. (2015). ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *The American journal of gastroenterology*, 110(2): 223.
- Tariman, J. D. (2017). Changes in cancer treatment: Mabs, mibs, mids, nabs, and nibs. *Nursing Clinics*, 52(1): 65-81.
- Tiwari, A., Saraf, S., Verma, A., Panda, P. K., Jain, S. K. (2018). Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. *World journal of gastroenterology*, 24(39): 4428.
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25: iii1-iii9.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9(2): 267-276.
- Walmsley, S. R., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A. M., Cowburn, A. S., Johnson, N., Chilvers, E. R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF- $\kappa$ B activity. *Journal of Experimental Medicine*, 201(1): 105-115.
- Wang, X., Simpson, E. R., Brown, K. A. (2015). p53: protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer research*, 75(23): 5001-5007.
- Wawryk-Gawda, E., Chylińska-Wrzos, P., Lis-Sochocka, M., Chłapek, K., Bulak, K., Jędrych, M., Jodłowska-Jędrych, B. (2014). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*, 251(3): 525-533.
- Wild, C., Weiderpass, E., Stewart, B. (2020). World Cancer Report. International Agency for Research on Cancer, WHO.
- Wild, C. P., Weiderpass, E., Stewart, B. W. (2020). World cancer report: cancer research for cancer prevention, Lyon, France: IARC Press.

- Xiao, J., Howard, L., Wan, J., Wiggins, E., Vidal, A., Cohen, P., Freedland, S. J. (2017). Low circulating levels of the mitochondrial-peptide hormone SHLP2: novel biomarker for prostate cancer risk. *Oncotarget*, 8(55): 94900.
- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1): 1-30.
- Xinqiang, Y., Quan, C., Yuanyuan, J., Hanmei, X. (2020). Protective effect of MOTS-c on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *International immunopharmacology*, 80: 106174.
- Yang, Y., Gao, H., Zhou, H., Liu, Q., Qi, Z., Zhang, Y., Zhang, J. (2019). The role of mitochondria-derived peptides in cardiovascular disease: recent updates. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117: 109075.
- Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*, 22(2): 124-131.
- Yin, X., Jing, Y., Chen, Q., Abbas, A. B., Hu, J., Xu, H. (2020). The intraperitoneal administration of MOTS-c produces antinociceptive and anti-inflammatory effects through the activation of AMPK pathway in the mouse formalin test. *Eur J Pharmacol*, 870: 172909.
- Yorimitsu, T., Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation*, 12(2): 1542-1552.
- Zarse, K., Ristow, M. (2015). A mitochondrially encoded hormone ameliorates obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*, 21(3): 355-356.
- Zhang, J., Xie, Y., Fan, Q., Wang, C. (2021). Effects of karanjin on dimethylhydrazine induced colon carcinoma and aberrant crypt foci are facilitated by alteration of the p53/Bcl2/BAX pathway for apoptosis. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(3): 202-212.
- Zheng, J. H., Lin, S. R., Tseng, F. J., Tsai, M. J., Lue, S. I., Chia, Y. C., Woon, M., Fu, Y. S., Weng, C. F. (2019). Clerodane Diterpene Ameliorates Inflammatory Bowel Disease and Potentiates Cell Apoptosis of Colorectal Cancer. *Biomolecules*, 9(12).
- Zou, H., Volonte, D., Galbiati, F. (2012). Interaction of caveolin-1 with Ku70 inhibits Bax-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7(6): e39379.