

**EPSTEIN BARR VİRÜS REKOMBİNANT PROTEİNLERİ EBNA1 VE LMP1'İN INS1-E (832/13) BETA HÜCRE  
KÜLTÜRÜNDE ENDOPLASMİK RETİKULUM (ER) STRES MARKIRLARI, APOPTOZ VE HÜCRE  
PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

**Biyolog Merve ŞEN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ**

**Tez No: 2015-005**

**2015 – Afyonkarahisar**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EPSTEIN BARR VİRÜS REKOMBİNANT PROTEİNLERİ  
EBNA1 VE LMP1'İN INS1-E (832/13) BETA HÜCRE  
KÜLTÜRÜNDE ENDOPLASMIK RETİKULUM (ER) STRES  
MARKIRLARI, APOPTOZ VE HÜCRE PROLİFERASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Biyolog Merve ŞEN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ**

**Bu Tez TUBİTAK tarafından 113S153 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez No: 2015-005**

**2015-Afyonkarahisar**

## KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:06/02/2015

Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ  
Sakarya Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Recep KEŞLİ  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Merih ŞİMŞEK  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Merve ŞEN'in "Epstein Barr Virüs rekombinant proteinleri EBNA1 ve LMP1'in INS1-E (832/13) beta hücre kültüründe Endoplasmik Reticulum (ER) stres markarları, apoptoz ve hücre proliferasyonu üzerine etkisi" başlıklı tezi 06.02.2015 günü saat 14:00'de Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınay Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, akademik olarak örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum , yapmak istediğim çalışmalarım ve fikirlerimi her zaman destekleyerek beni motive eden, tecrübelerinden faydalanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca fedakarlıklarını ve katkılarını benden bir an olsun esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli hocalarım; Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e, Veterinerlik Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a, Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye

Ders dönemi aşamasında bilimsel birikimlerini benimle paylaşan hocalarım Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D öğretim üyeleri Doç. Dr. Recep KEŞLİ ve Yrd. Doç. Dr. Gülşah AŞIK'a

Hayatın içindeki zorlukları fedakarlıkları ve sabrıyla benim için kolaylaştıran, her zaman yanımda olan eşim Serkan ŞEN'e

Beni her konuda destekleyip bu günlere gelmemde büyük payları olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, anne ve babama teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	ii
Önsöz.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
Şekiller.....	x
Tablolar.....	xii

<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Epstein Barr Virüs.....	1
1.1.1.Tarihçe.....	1
1.1.2.Herpesvirüsler.....	2
1.1.3.EBV'nin Yapısal Özellikleri.....	4
1.1.4.EBV Antijenleri.....	5
1.1.5.EBV'nin Enfeksiyon Mekanizması.....	8
1.1.6.EBV Prevelansı.....	8
1.1.7.EBV Epidemiyolojisi.....	9
1.1.8.EBV Enfeksiyonunda Kullanılan Tanı Yöntemleri.....	10
1.1.8.1.Heterofil Antikor Testi.....	10
1.1.8.2.Avidite.....	11
1.1.8.3.ELISA (Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay).....	12
1.1.8.4.IFA (İndirekt Floresan Antikor).....	13
1.1.9.Moleküler Tanı Yöntemleri.....	13
1.1.9.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	14
1.1.9.2.In Situ Teknikler.....	16
1.1.10.EBV Enfeksiyonu Semptomları.....	16
1.1.11.EBV ile İlişkili Hastalıklar.....	17
1.1.11.1.Enfeksiyöz Mononükleoz (EM).....	17
1.1.11.2.Kronik Aktif (Persistan) EBV Enfeksiyonu.....	18
1.1.12.Epstein Barr Virüs, Proliferasyon ve Onkogenez.....	19
1.1.12.1.Hemofagositik Lenfositosis.....	19
1.1.12.2.Lenfoid Granülomatozis.....	19
1.1.12.3.Burkitt Lenfoma.....	19
1.1.12.4.Hodgkin Hastalığı.....	20
1.1.13. Proliferatif Ajan Olarak Epstein Barr Nuclear Antigen1 (EBNA1) Proteinini.....	21
1.1.14. Proliferatif Ajan Olarak Latent Membrane Protein1 (LMP1).....	22
1.1.15. LMP1'in Proliferatif Etkinliği.....	23
1.1.16. LMP1 İlişkili Biyokimyasal Yolaklar.....	24
1.2.Diabetes Mellitus.....	26
1.3. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü).....	28

1.3.1. Diyabet Patogenezinde Beta Hücre Apoptozisinin Rolü.....	29
1.4. Endoplasmik Retikulum (ER) Stresi.....	33
1.4.1 ER Stresine Cevap Yolları.....	34
1.4.1.1.ER Stresinde Şaperon Proteinlerin Transkripsiyonel Düzeyde Uyarılması....	34
1.4.1.2.ER Stresinin Translasyonel Düzeyde Zayıflatılması.....	35
1.4.1.3.ER Stresinde Hatalı Katlanan Proteinlerin Yıkımlanması (ERAD).....	36
1.4.1.4.ER Stresinde Apoptozisin Uyarılması.....	38
1.4.2. Endoplasmik Retikulum (ER) Şaperon Proteinleri.....	41
1.4.3. Tip 2 Diyabet ve ER Stres Aracılı $\beta$ -hücre Apoptozisi.....	42
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>46</b>
2.1. Hücre Kültürü.....	46
2.1.1. Hücre Pasajı.....	46
2.1.2. Hücre Kültüründe ER Stres Modelinin Oluşturulması.....	47
2.2. İnsülin Sekresyon Ölçümü.....	48
2.3. Protein Ölçümleri.....	48
2.4. RNA İzolasyonu ve Real Time QRT-PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri.....	49
2.5. Apoptozis Belirleme Çalışmaları.....	52
2.5.1. TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Assay.....	53
2.6. COMET Assay Analizi.....	53
2.7. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi.....	56
2.8. İstatiksel Analizler.....	57
<b>3.BULGULAR.....</b>	<b>58</b>
3.1. İnsülin Değerleri.....	58
3.2. Real Time QRT-PCR mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	60
3.2.1. Beta Hücre Proliferasyonundan Sorumlu Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	60
3.2.2. ER Stresi Belirteçleri Olan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	66
3.2.3.Apoptozla İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	71
3.3. TUNEL Assay Sonuçları.....	80
3.4. COMET Assay Sonuçları.....	80
<b>4.TARTIŞMA.....</b>	<b>83</b>
<b>5.SONUÇ.....</b>	<b>88</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>90</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>92</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>94</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AP-1: Activator Protein 1

ATF4: Activating Transcription Factor 4

ATF6: Activating Transcription Factor 6

ATP: Adenozin 3'-trifosfat

Bip: Binding Protein

BL: Burkitt Lenfoma

BRIN-BD11: RAT

BSA: Bovine Serum Albumin

CAD: Caspase activated DNase

Cas 3: Kaspaz 3

Cas 8: Kaspaz 8

Cas 12: Kaspaz 12

CNX: Kalneksin

CO<sub>2</sub>: Karbondioksit

CRT: Kalretikulin

CTAR1: C-terminal aktivasyon bölgeleri 1

CTAR2: C-terminal aktivasyon bölgeleri 2

CTL: Sitotoksik T Lenfositler

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNaz: Deoksiribonükleaz

EBER-1: EBV-encoded RNA 1

EBER-2: EBV-encoded RNA 2

EBNA: Epstein Barr Virüs Nüclear Antigen  
EBNA1: Epstein Barr Virüs Nüclear Antigen 1  
EBNA2: Epstein Barr Virüs Nüclear Antigen 2  
EBNA3A: Epstein Barr Virüs Nüclear Antigen 3A  
EBNA-LP: Epstein Barr Virüs Nüclear Antigen  
EBV: Epstein Barr Virüs  
EBV<sup>+</sup>: Epstein Barr Virüs ile Enfekte  
EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit  
EGF: Epidermal Growth Factor  
EIF2 $\alpha$ : Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$   
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
ER: Endoplasmik Retikulum  
ERSE: ER Stres Cevap Elementi  
FCS: Fotal Bovine Cerum  
FGF: Fibroblast Growth Factor  
Fox01: Forkhead Box Protein  
GADD34: Growth arrest and DNA damage-inducible protein  
GLP-1: Glukagon- like peptide-1  
Gly-Gly-Ala: Glisin-Glisin-Alanin  
GRP: Glucose Regulated Protein  
GRP94: Glucose Regulated Protein 94  
HEDJ: Human ER asociated dnaj  
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic asit  
HIT-T/S: Hamster Pankreas Hücre Hattı  
HL: Hodking Lenfoma  
HRS: Hodking ve Reed-Sternberg Hücreleri



HSP40:Heat Shock Protein  
HSP70: Heat Shock Protein  
ICAM1:Intercellular Adhesion Molecule 1  
IFN- $\gamma$ : İnterferon Gama  
IGF:Insulin-like Growth Factor  
IKK: Inhibitor of Kappa kinase  
INS1E (832/13):Pankreas  $\beta$  Hücre Hattı  
JAK:Janus kinase  
JAK3:Janus kinase 3  
JNK: c-Jun N-terminal kinase  
KRBH: Krebs-Ringer Bikarbonat HEPES  
LFA1:Lymphocyte function-associated antigen 1  
LFA3: Lymphocyte function-associated antigen  
LMA: Low Melting Point Agarose  
LMP-1:EBV Latent Membran Protein 1  
LMP-2: Latent Membran Protein 2  
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase  
MHC class1:Major Histocompatibility Complex  
MIN6: Fare Pankreas Hücre Hattı  
NF-KB: Nükleer Faktör Kappa B  
NIK: NF-KB İndükleyen Kinaz  
NMA: Normal Kaynama Dereceli Agaroz  
ORP:Oksijen Regüle Edici Protein  
OriP:Origin of Plasmid Replication  
PBS:Phosphate-Buffered Saline  
PDI: Protein Disülfid İzomeraz

PERK:Protein kinase RNA-like endoplasmic retikulum kinase

PH:Power of Hydrogen

PKA:Protein Kinaz A

P38 MAP Kinaz:Mitogen-Activated Protein Kinase

RPMI:Roswell Park Memorial Institute Medium

rRNA:Ribozomal RNA

RT: Revers Transkriptaz

RT-PCR: Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

S1P:Sphingosine-1-phosphate

TCF7L2: Transcription factor 7-like 2

THAPS: Thapsigargin

TNFR: Tumor Nekrozis Faktör Reseptörü

TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktör  $\alpha$

TRADD:Ölüm domain proteini

TRAF: TNF reseptör ilişkili faktör

TRAIL: TNFRelated Apoptosis- Inducing Ligand

TRAILR1: TNFRelated Apoptosis- Inducing Ligand R1

TRAILR2: TNFRelated Apoptosis- Inducing Ligand R2

Tris HCl:Tris Hydrochloride

TUNEL: Tdt-mediated Dntp nick end labelling

UDP:Üridin Difosfat

UPR: Katlanmamış Protein Cevabı

UPRE: Katlanmamış Protein Cevap Elementi

XBP-1:X-box binding protein 1

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. EBV Yapısı.....	5
Şekil 1.2. EBV LMP1 İlişkili Yolaklar.....	25
Şekil 1.3. Beta Hücre Kütle Kontrol Mekanizması.....	26
Şekil 1.4. ER Stres Cevapları.....	37
Şekil 1.5. ER Stres Sinyal Yolakları.....	40
Şekil 1.6. Glikoprotein Katlanması ve Katlanmayan Glikoproteinlerin Degradasyonu .....	42
Şekil 2.1. Comet Assay'de Görsel Skorlama.....	56
Şekil 3.1. Hücre İçi/Dışı İnsülin Konsantrasyonları.....	59
Şekil 3.2. FoxO1 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	64
Şekil 3.3. PDX 1 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	64
Şekil 3.4. B-katenin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	65
Şekil 3.5. Wnt-4 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	65
Şekil 3.6. TCF7L2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	66
Şekil 3.7. GRP78 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	67
Şekil 3.8. CHOP mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	68
Şekil 3.9. ATF-4 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	69
Şekil 3.10. ATF-6 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	70
Şekil 3.11. PERK geni mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	71
Şekil 3.12. p53 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	73

Şekil 3.13. NF $\kappa$ B mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	74
Şekil 3.14. TNF $\alpha$ mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	74
Şekil 3.15. IFN- $\gamma$ mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	75
Şekil 3.16. Kaspaz-3 (CAS-3) mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	75
Şekil 3.17. Kaspaz-8 (CAS-8) mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	76
Şekil 3.18. Kaspaz-12 (CAS-12) mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	76
Şekil 3.19. JNK mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	77
Şekil 3.20. Bcl-2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	77
Şekil 3.21. Bcl-xL mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	78
Şekil 3.22. IL-6 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	78
Şekil 3.23. p35 mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	79
Şekil 3.24. Bax mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	79
Şekil 3.25. Comet Skorları.....	82

## TABLolar

Tablo 1.1. İnsan Herpesvirüsleri ve Ayırıcı Özellikleri.....	3-4
Tablo 1.2. EBV Latent Faz Antijenlerinin Fonksiyonları.....	6
Tablo 1.3. Beta Hücre Apoptozunda Potansiyel Uyarıcılar.....	30-31
Tablo 2.1. Oligonükleotid Primer Dizileri ve PCR Programları.....	51-52
Tablo 3.1. Hücre İçi (Lizat) ve Sekrete (Medyum) İnsülin Konsantrasyonları.....	58-59
Tablo 3.2. Beta Hücre Proliferasyonu, Apoptozu ve ER Stresi ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri (misli değişiklik <sup>#</sup> ).....	62
Tablo 3.3. Comet Skorları.....	81

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Epstein Barr Virüs

Epstein Barr Virüs Gamma-1 herpesvirüs veya lenfokriptovirüs ailesine aittir. Lenfokriptovirüs ailesinde yer alan virüsler yalnız primatlarda enfeksiyon yaparlar. Bu virusların içinde sadece EBV insanlarda da enfeksiyon yapar (Kutok ve Wang, 2006). Epstein Barr Virüs ait olduğu Lenfokriptovirüs genusunun diğer üyeleri gibi litik, persistan, latent ve transformasyona neden olabilen enfeksiyonlara yol açar (Arman, 2002). Bütün insan popülasyonlarında hayatın ilk dekadında EBV ile enfekte olma oranı %95'den fazladır (Kutok ve Wang, 2006).

### 1.1.1.Tarihçe

Enfeksiyöz Mononükleoz (EM), bir klinik sendrom olarak ilk kez 1920 yılında tanımlanmıştır (Us ve Ergunay,2007). 1932 yılında, hastaların serumunda heterofil antikorların olduğu Paul ve Bunnell tarafından gösterilmiştir (Geçgel, 2011). 1958 yılında, Dr. Denis Burkitt tarafından Afrika`da sık görülen bir çocukluk çağı kanseri olan, Burkitt lenfomannın (BL) tanımlanmasından sonra, 1961 yılında BL`li hastalara ait baş ve boyun biyopsi örneklerinin incelenmesi sırasında, Dr. Anthony Epstein ile arkadaşları

Yvonne Barr ve Bert Achong elektron mikroskopunda herpes benzeri partiküllerin varlığını göstermiştir (Us ve Ergunay, 2007). Daha sonra bu bilgi Lancet'te yayınlanmış ve virüse Epstein Barr Virüs (EBV) ismi verilmiştir (Kutok ve Wang, 2006). EBV ile enfeksiyöz mononükleoz arasındaki etiyolojik ilişki, dört yıl sonra EM tanısı konulan bir laboratuvar teknisyeninde EBV serokonversiyonunun ortaya çıkması sonucu anlaşılmıştır. EBV'nin, in vitro olarak B lenfositlerini transforme ettiğinin gösterilmesi ve BL'den başka nazofarengeal karsinoma ile ilişkisinin saptanmasıyla, 1970 yılında EBV ilk insan tümör virüsü olarak kabul edilmiştir. (Us ve Ergunay, 2007).

### 1.1.2. Herpesvirüsler

EBV Herpesviridae ailesinin Gammaherpesvirinae alt ailesinde bulunan Lenfokriptovirüs genusunun bir üyesidir (Hislop et al., 2007). Toplumda yaygın olarak görülen değişik hastalıkların etiyolojisinde yer alan herpesvirüsler, nükleusta replike olan zarflı DNA virüsleridir. Tüm omurgalıları enfekte edebilme yeteneğine sahiptir (Geçgel, 2011). Herpesvirüsler doku tropizmi, patojenite ve kültür koşullarındaki davranışlarına göre üç alt aileye ayrılırlar:

**Alfaherpesvirüsler (sitolitik):** Nörotropik, replikasyon döngüsü hızlı, yaygın konak ve hücre yelpazesi olan virüslerdir. Oral herpes enfeksiyonu etkeni Herpes simplex virus tip-1 (HSV-1), genital herpes enfeksiyonu etkeni HSV-2, suçiçeği ve zona etkeni Varicella-Zoster Virus (VZV) bu grupta yer almaktadır (Tablo 1.1.) (Tamer, 2006).

**Betaherpesvirüsler (sitomegalik):** Genom büyüklüğü ve yapısı farklı, replikasyon döngüsü daha yavaş, hücre yelpazesi daha dar (glandüler hücreler ve/veya lenfoid doku hücreleri) olan virüslerdir. Egzantem subitum etkeni Roseola virüs ve Cytomegalovirus (CMV) bu grubun üyeleridir (Tablo 1.1).

**Gammaherpesvirüsler (lenfoproliferatif):** Alfaherpesvirüslere göre nispeten daha yavaş replike olurlar; lenfoid doku hücrelerini tutarlar. Kaposi Sarkomu etkeni Human Herpesvirus tip-8 (HHV-8), Enfeksiyöz Mononükleoz ve lenfoma etkeni EBV bu gruba ait örnekler arasında gösterilebilir (Tablo 1.1) (Tamer, 2006)

Alt aile	Virüs adı	Primer hedef hücre/hastalık	Latent kaldığı yer/nükseden enfeksiyon	Bulaşma yolu
<b>Alphaherpesvirinae</b>				
İnsan herpes virüsü 1	<b>HSV-1</b>	Mukoza ve epitelyal hücreler/Jinjivostomatit	Nöron/Herpes labialis, ensefalit, keratit	Yakın temas
İnsan herpes virüsü 2	<b>HSV-2</b>	Mukoza ve epitelyal hücreler/Herpes genitalis, neonatal herpes	Nöron/Herpes genitalis	Yakın temas, cinsel temas
İnsan herpes virüsü 3	<b>VZV</b>	Mukoza ve epitelyal hücreler/suçiçeği	Nöron/Zona zoster	Solunum, yakın temas
<b>Betaherpesvirinae</b>				
İnsan herpes virüsü 5	<b>CMV</b>	Monosit, lenfosit ve epitelyal hücreler/konjenital enfeksiyon, mononükleoz	Monosit, lenfosit/Semptomsuz döküntü	Yakın temas,transfüzyon,organ nakli,konjenital

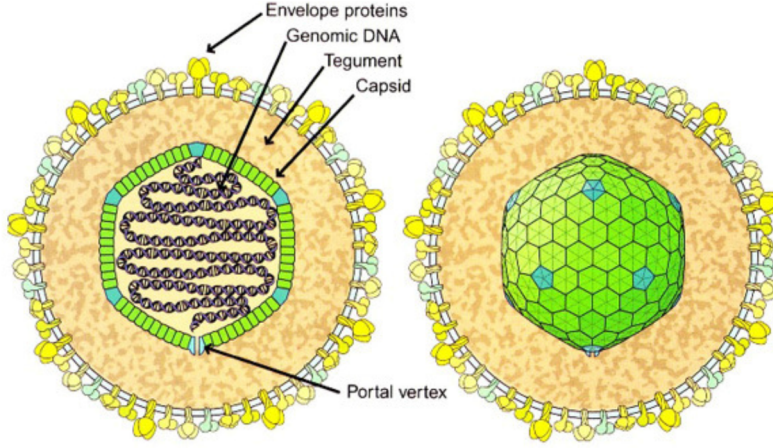


İnsan herpes virüsü 6	<b>HHV -6</b>	T hücreleri/Roseola (Exanthem subitum)	T hücreleri/Reaktivasyon	Solunum, yakın temas
İnsan herpes virüsü 7	<b>HHV -7</b>	T hücreleri/HHV-6 benzeri döküntülü hastalık	T hücreleri /Reaktivasyon	Kesin bilinmiyor
<b>Gammaherpesvirinae</b>				
İnsan herpes virüsü 4	<b>EBV</b>	B hücreleri, epitelyal hücreler/Enfeksiyöz mononükleoz	B hücresi/Kronik yorgunluk sendromu	Tükürük (öpücük hastalığı)
İnsan herpes virüsü 8	<b>HHV -8</b>	Lenfosit ve diğer hücreler/Mononükleoz benzeri	B hücresi/Kaposi sarkomu	Yakın temas (cinsel), tükürük

**Tablo1.1.** İnsan herpesvirüsleri ve ayırıcı özellikleri (Altındış, 2013)

### 1.1.3. EBV'nin Yapısal Özellikleri

EBV 180-200 nm çaplı DNA virüsüdür. Virüs *Herpesviridae* ailesinden *Gammaherpesvirinae* alt familyasının bir üyesidir. Virüs; ikosahedral simetri düzeninde, 126 kapsomerli, 120 nm çapında ve kılıflıdır. Nükleokapsidi 100 nm çapındadır. Çift sarmalı 172 kb olan DNA'sı olgun virionda lineer, latent olarak enfekte hücrelerde sirküler yapıdadır. EBV genomu 80 protein kodlamaktadır (Şekil 1.1.) (Kimura et al., 2008).



Şekil 1.1. EBV Yapısı (<http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv>)

Virüsün zarf glikoproteinlerini içeren membran antijeni (MA), B hücre reseptörlerine tutunmadan sorumludur. Konakta oluşan nötralizan etkili antikorlar MA'ya yöneliktir. EBV'nin diğer önemli proteini viral kapsid antijenidir (viral capsid antigen; VCA) ve VCA'ya karşı oluşan antikorlar tanı testlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, viral DNA sentezinden önce beliren erken antijen (Early antigen; EA) ve nükleusta kromozoma bağlı olarak bulunan nükleer antijen ( Epstein-Barr nuclear antigen; EBNA)'e özgü antikor tespiti de tanı testlerinde kullanılan diğer belirteçlerdir. EBV genomu ayrıca latent membran proteinleri (Latent membrane protein) ve küçük –untranslated- RNA molekülleri (Epstein-Barr encoded RNAs; EBERs) de kodlamaktadır (Us, 2007).

#### 1.1.4. EBV Antijenleri

Eksprese oldukları viral siklus fazına göre EBV antijenleri iki gruba ayrılır.

**Latent faz antijenleri:** Virüsün latent enfeksiyon oluşturduğu B hücrelerinde sentezlenen proteinlerdir. Epstein-Barr nükleer antijen-1 (EBNA-1), EBNA-2, EBNA-3A, 3B, 3C, EBNA-lider protein (EBNA-LP), latent membran proteinleri (LMP-1, LMP-2), translasyona uğramamış ve poliadenile olmamış küçük RNA molekülleri (EB encoded RNA; EBER-1, EBER-2) ve BamH1-A bölgesi transkriptleri (BARTs) bu grupta bulunur. Bu antijenlerin ekspresyonu, EBV genomunun varlığını gösterir. Değişmeksizin eksprese olan antijen sadece EBNA-1'dir; EBNA-1 viral epizomların devamlılığı için gereklidir. LMP-2 ekspresyonu, reaktivasyonu engeller (Tablo 1.2) (Kutok ve Wang, 2006)

Antijen Fonksiyonları	
<b>EBNA-1</b>	Epizomal DNA'nın devamlılığı
<b>EBNA-2</b>	B lenfosit transformasyonu, transkripsiyon aktivatörü, viral ve hücrel proteinlerin ekspresyonu
<b>EBNA-3</b>	B lenfosit transformasyonu (3A ve 3C)
<b>EBNA-LP</b>	Transformasyona uğramış hücrelerin uzun süreli devamlılığı
<b>LMP-1</b>	Transformasyon, sinyal yollarının uyarılması
<b>LMP-2</b>	B lenfositlerin EBV aracılı litik enfeksiyonlarının önlenmesi, latensinin devamı
<b>EBER'ler</b>	Apoptozdan kaçış

**Tablo 1.2.** EBV latent faz antijenlerinin fonksiyonları (Muderris, 2009).

**Litik faz antijenleri:** Litik enfeksiyon fazında eksprese edilen erken ve geç proteinlerdir.

**a. Erken başlangıç antijenleri (immediate early; IEA):** Litik fazda gen ekspresyonunun indüklenmesinde anahtar rol oynayan, transkripsiyon aktivatörleridir [BZLF-1 geni tarafından kodlanan BamHi Z Epstein-Barr

virus replication activator (ZEBRA) ve BRLF-1 geni tarafından kodlanan R transaktivatör (Rta)] (Geçgel, 2011).

**b. Erken antijenler (EA):** Yaklaşık 30 erken gen tarafından kodlanan yapısal olmayan proteinlerdir. Çoğunluğunun viral DNA replikasyonunda enzim fonksiyonu vardır. (Erensoy ve ark., 2008). Sentezleri viral DNA replikasyonuna bağımlı değildir. Bu antijenlerin ekspresyonu, prodüktif viral replikasyonun başladığını gösterir. EA'nın iki komponenti vardır. Yaygın komponent (diffuse; EA-D) enfekte hücrelerin nükleus ve sitoplazmasında; kısıtlı komponent (restricted;EA-R) ise sadece nükleusda bulunur (Geçgel, 2011).

**c. Geç antijenler:** Kapsid ve zarfın yapısal komponentleridir. Özellikle prodüktif viral enfeksiyon sırasında sentezlenirler (Geçgel, 2011).

**c.1. Viral kapsid antijen (VCA):**

Litik enfeksiyonun geç döneminde sentezlenen, glikolize olmayan yapısal proteinlerdir (Erensoy ve ark., 2008). Çekirdekte virionların toplanmasında ve konak hücreden salınmasında rol alırlar (Geçgel, 2011).

**c.2. Membran antijenleri:** Enfekte hücre membranında bulunan glikoprotein yapısındaki bu antijenlerin virüsün enfektivitesi ve yayılmasında rolleri vardır. Olgun virüsün zarf yapısında eksprese edilirler, nötralizan antikorları indüklerler (Ackermann, 2006). BLLF-1 geni tarafından kodlanan majör zarf glikoproteini (gp 350/220), BXLf- 2 gen ürünü gp85, BZLF-2 gen ürünü gp42 ve BKRF-2 gen ürünü gp25 bu antijenlerden bazılarıdır (Yaung 2003; Doğan, 2005).

### **1.1.5. EBV`nin Enfeksiyon Mekanizması**

Epstein Barr virüs, sağlıklı kislere genellikle tükürük, boğaz salgısı, yakın temas; nadiren kan veya kontamine esyalar ile bulasır. Virüs EM olgularının, immün sistemi baskılanmış hastaların ve sağlıklı EBV seropozitif bireylerin oral sekresyonlarında bulunabilir (Geçgel, 2011).

EBV önce orofarinksin epitel hücrelerini enfekte eder, virüsün replikasyonu, hücrenin lizisi ve viryon salımı burada gerçekleşir. Daha sonra nazofarenks ve tükürük bezleri ile hedef hücre olan larenksin lenfoid dokularında bulunan duyarlı B lenfositleri enfekte eder. Virüs ürediğı hücreye sitopatik etki yapmaz ancak, virüs genomu içeren hücre, devamlı üreme özelliğı kazanır. Konakçı hücrelerden sentezlenen antijenik yapılar B lenfositler için otokrin büyüme faktörünü stimüle eder ve apoptozisi engeller. Enfeksiyonla birlikte B lenfositler proliferasyon, stimülasyon ve sonrasında immünglobülin üretimi için aktive olur ve IgM başta olmak üzere IgG ve IgA sınıfı antikorlar sentezler. Humoral ve hücrenel immün yanıt gelişmesine rağmen virüs konaktan elimine edilemez ve enfekte B lenfositlerin içinde latent olarak kalır (Brady et al., 2007).

### **1.1.6. EBV Prevelansı**

Enfekte kislilerin tükürük ve boğaz salgısında bulunan EBV yakın temas, kan ve kontamine esyalarla kisten kişiye bulasmaktadır. Çocukluk döneminde ortak kullanılan su bardakları, ergenlik döneminde öpüşme yakın

temasla bulaktan sorumludur. Sağlıklı kişilerde tükürkle virüs atılımı %15 iken bu oran immünsüpresif kişilerde, transplantasyon sonrasında ve HIV pozitiflerde %100'e yaklaşıyor (Erensoy, 2008; Muderris 2009). Lenfoproliferatif hastalıklarda, transplant alıcılarında ve AIDS hastalarında tükürkte EBV-DNA'nın arttığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Idesawa et al., 2004).

### 1.1.7. EBV Epidemiyolojisi

EBV ile karşılaşma yaşı coğrafi bölgelere göre değişkenlik gösterir. Enfeksiyon sosyoekonomik düzeyi yüksek olan topluluklarda, düşük olanlara göre daha geç yaşlarda görülür. Eriskin yaş grubunda seropozitiflik %80-100'dür. Serokonversiyon 1-6 yaş ve 14-20 yaş dönemlerinde pik yapar. Ülkemizde eriskin yaş grubunda seropozitifliğin %70-99.4 olduğu bildirilmiştir (Erensoy, 2008).

Ege bölgesinde yapılan bir seroprevalans çalışmasında, eriskin yaş grubunda seropozitiflik %84.4 iken 0-4 yaş grubunda %67.9 bulunmuş ve seropozitifliğin yaşla anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (Erensoy, 2008).

EBV ile ilişkili malignitelerde bazı kofaktörlerden söz edilmektedir. Örneğin sıtmanın neden olduğu bağışıklık yetmezliğinin Afrika'da çocuklarda görülen Afrika Burkitt lenfomasında, Çin'de görülen nazofarengeal karsinomada ise genetik faktörler, besinler ve çevresel faktörlerin kofaktör olduğuna dair çalışmalar vardır (Erensoy S., 2008). Ülkemizde çeşitli malignitelerin etiolojisinde EBV'nin rolünü araştıran çalışmalarda; Hodgkin lenfoma-EBV ilişkisi %55-62.5 (mikst sellüler tipte %75-100), non Hodgkin lenfoma-EBV ilişkisi %57, nazofarengeal karsinoma-EBV ilişkisi %29

bulunmus; Kuzeydoğu Anadolu’da Hodgkin lenfoma-EBV ilişkisi %75 iken, İç Anadolu bölgesinde %42.8 saptanmıştır (Zeytinoğlu ve ark., 2005).

EBV susları EBNA genlerindeki polimorfizmlere göre tip A ve B olarak (tip 1 ve 2) sınıflandırılırlar. Seroloji ve PCR çalışmaları her iki tipin de dünyada yaygın olduğunu ancak tip A’nın tip B’den daha sık saptandığını ve EM’da baskın tip olduğunu göstermiştir. Afrika’da iki tip benzer oranda görülürken, Amerika ve Avrupa’da tip A tip B’den 10 kat daha fazla bulunur. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, çoklu EBV susları ile koenfeksiyonlar gösterilmiştir (Linde ve ark. 2009).

#### **1.1.8.EBV Enfeksiyonunda Kullanılan Tanı Yöntemleri**

EBV enfeksiyonun teşhis etmek için çeşitli laboratuvar testleri kullanılır buna ek olarak tanısız içi yararlı olan diğer testler parametreleri (lökositoz, lenfositoz ile atipik lenfositler, anormal karaciğer fonksiyon testleri, vb) vardır. Non-spesifik heterofil antikorların ve spesifik anti-EBV antikorların tespiti için testler, EBV DNA tespit etmek için moleküler biyolojik yöntemler kullanılır (Paschale et al.,2012).

##### **1.1.8.1 Heterofil Antikor Testi**

30 yıl önce, Paul ve Bunnell IgM modelinin heterofilik antikorların EM ile birleşik olduğunu ilk keşfedenlerdi. Bu antikorlar çapraz türlerdir ve EBV özellikli değildir. Bu antikorla tipik olarak poliklonal uyarmanın sonucudur fakat özellikle mononükleozlu hastalarda bulunmazlar (Hess et al., 2004).

Heterofil antikorlar EM'den başka diğer hastalıkları olan hastalarda da tespit edilebilir, ve test sonuçları 6 ile 12 boyunca pozitif kalabilir. Ticari olarak bulunabilir olan heterofil antikorların tespiti için aglütinasyon test araçları keçi, at ya da sığır eritrosilerini kobay ciğeri ekstrasyonunu ile reabsorpsiyon olduktan sonra kullanılır ve gençlerin ya da yetişkinlerin %85-90 için akut faz serumları ile etkilidir fakat 2-5 yaşları arasındaki çocuklar için sadece %50 etkilidir. Böylece yanlış-pozitif sonuçlar otoimmün hastalarda %2-3'ünde bulunmuşken, yanlış-negatif sonuçların yüksek oranı beklenebilir (Hess et al.,2004).

#### **1.1.8.2. Avidite**

Avidite testi ek bir metot olarak, VCA IgG'nin avidite testi anti-EBNA-1-negatif vakalarında ilk enfeksiyon ve geçmiş enfeksiyon arasında değişiklik gösterebilen ve VCA IgM'nin uzun dönem sürdüğü vakaları da çözebilir. Enfeksiyon süreci esnasında sadece en yüksek aviditesi olan antikorlar seçilir; böylece *in vivo* IgG'nin olgunlaşması *in vitro* ortamda aviditenin kararlılığıyla ölçülebilir (Gandhi et al., 2004). B hücreleri canlıda IgM'yi IgG izotipine çevirir. IgG olgunlaşma işlemin kinetikleri, ilk EBV enfeksiyonundan sonra birkaç hafta içinde olgunlaşma süreci tamamlanmış olabilmesine rağmen kişiden kişiye değişiklik gösterir. Ölçümler VCA özellikli substratlı EIA, IFA ya da Western blot tekniğiyle elde edilir (Gandhi et al.,2004) Benzer örneğin iki temsil parçası IgG antikorların varlığı için paralel olarak test edilir biri işlenmez ve diğeri antijenleri antikorlardan ayıran maddelerle işlenir. Bu ayrılma antikorun aviditesine bağlı olduğu için, işlenmiş ve işlenmemiş örnekler arasındaki oran aviditenin derecesine karar verir. Avidite bu nedenle bir ilk enfeksiyonun sürecini tahmin etmekte, akut ve geçmiş enfeksiyonu ayırt etmek için kullanılabilir (Hess et al.,2004).



### **1.1.8.3. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay )**

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere ve tahlil yöntemlerine genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA, ELISA) denmektedir. Enzimle işaretli immuno reaktiflere dayalı bu testler, antijen antikor reaksiyonu tespiti ile özellikle Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında sıkça çeşitli enfeksiyonlar, antijen ve antikorların tanısında kullanılmaktadır. Bu tekniklerde çeşitli enzimler kullanılabilir, fakat en genelleri alkalın fosfotaz ve peroksidazdır. Tipik tahlil süreleri 2-3 saattir fakat kendinden membran içeren EIA'lar ve competitive EIA'lar önemli derecede hızlı olabilirler. EIA'lar böylece üreticilere tarafından farklı klinik uygulamalarına uyması için geniş çapta bir format çeşitliliğini ortaya koyarlar. Floresan particle immunoassay immunotesti (FPIA) ve kemilüminesans immunotest gibi daha otomatikleşmiş EIA metotları, ilaç ve hormon testleri gibi daha yüksek yoğunluk testleri için kullanılmaya meyillidirler (Tang ve Stratton, 2006). EIA genellikle çeşitli antijenleri, solid faza bağlamak için kullanılırlar. Ya saf ya da tekrar birleştirilmiş proteinler, füzyon proteinleri, ya tam boyutunda VCA kodlanmış gen ya da sadece VCA kodlanmış genin kısımlarını temsil eden sentetik peptidler kullanılır. Aynısı EBNA-1 içinde doğrudur. Fakat, çoğu üretici bugün tekrar birleştirilmiş tam boyutlu EBNA-1 proteinleri kullanır. EIA ile ilk enfeksiyondan 7 gün sonra erken bir sürede antikorları gösterebilirken geleneksel IFA klinik belirtilerinden sonra EBNA-1 IgG antikorların 4 ile 6 haftada arasında tespit eder (Gartner, 2003).

#### **1.1.8.4. IFA (İndirekt Floresan Antikor)**

İndirekt Floresan Antikor (IFA) günümüzde altın standart olarak kabul edilen yöntemdir. IFA testinde genellikle burkit lenfomalı hastalardan alınan insan EBV transform B hücre dizileri kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak P3HR-1 hücre dizisi veya IFA'nın ilk substratı olan raji hücre dizisidir (Paschale ve Clerici, 2012). P3HR-1 hücreleri EBNA-1'i üretirken, hücrelerin yaklaşık %5-20'si çekirdek içinde ayrıca VCA üretir. Raji hücre dizisinin EBV spesifik protein modeli özellikle çekirdekteki EBNA-1 ve EBNA-2 üretimi olmak üzere EBNA'larla sınırlıdır. Raji hücre dizisi VCA üretmez. Bir antijen-antikor reaksiyonu olan bu testte, spesifik antikorlar fluorokrom bir boya (FITC, Auramine, Rhodamin, vs) ile boyanmıştır. Bir preparatta homolog antijenin bulunduğu durumlarda üzerine boyalı antikor konursa, boyalı antikorlar antijenle birleşir ve UV-ışınları ile donatılmış mikroskop altında sarı-yeşil parlak bir floresans vererek kolayca fark edilirler. IFA tekniği halen primer EBV enfeksiyonunun tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem EBV-VCA, EBV-EA ve EBNA antijenlerine karşı oluşan antikorların paralel olarak belirlenmesi ile akut ve geçirilmiş enfeksiyonları birbirinden ayırt ederken aynı zamanda reaktivasyon ve kronik enfeksiyonların belirlenmesini sağlamaktadır (Paschale ve Clerici, 2012).

#### **1.1.9. Moleküler Tanı Yöntemleri**

Pek çok farklı metot, teknik ve protokoller EBV DNA ve virüs varlığını tespit etmek için kullanıldılar. Dot blot, PZR ve in situ hibridizasyon hepsi çeşitli materyallere uygulanmıştır, fakat onların yoğunluktaki ve özgüllük farklılıkları laboratuardan laboratuara değişiklik gösterdiği için dikkatle gözlenmesi gereken sonuçlara yol açmıştır. Son çalışmalar, gerçek zamanlı PZR'nin hassas olduğunu ve özellikle immün sistemi baskılanmış olan

hastalardaki ve EBV alakalı bozukluklar geliştirenlerdeki enfeksiyon durumunu tanımlamak için çok kullanışlı olduğunu bildirmiştir. Fakat, hala en iyi materyallerin, ölçme birimleri ya da müdahale gerektiren yada prognozu önceden haber veren sayısal seviyelerin kullanımına ilişkin bir fikir bilgisi yoktur (Hayden et al.,2008; Preiksaitis et al.,2009).

### **1.1.9.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu sadece birkaç saat içinde milyarlarca katmanlı DNA'nın belirli bir bölgesini kopya etmek ya da amplifikasyon için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu amplifikasyon ilk katmanı küçük nükleotidlerden oluşan yapılardır ve DNA bölgesinin yanında olur. PZR, teşhis ve araştırma laboratuvarlarında yeterince test etmek, analiz etmek ya da işlenmiş olmak için yeterli miktarda DNA üretmek için kullanılmaktadır. Sunduğu aşırı hassasiyet sebebiyle, PZR teşhis mikrobiyolojisinde hızla standart bir metot olmuştur. Son zamanlarda kullanılan kitler ve çeşitli cihaz platformu reaksiyona hız, esneklik ve sadelik eklemiştir (Qaddo, 2013).

PZR'yi pratik bir araştırma ve tanı aracı yapmaktan sorumlu iki eski termal vardır termostabil DNA polimerazı ve termal dolaşımlıdır. PZR ilk defa ısıya dayanıksız DNA polimeraz kullanılırken uygulandı. Her devir sonrasında yok edilen enzimin bu manuel yenilenmesi gerekmektedir. Sabit ısılı DNA polimeraz *Thermus aquaticus* adlı ısının 90C aştığı kaynaklarda yaşayan bakteriden yalıtılmıştır. Taq DNA polimeraz olarak adlandırılan bu enzim amplifikasyonun pek çok devri esnasında tekrar ısıtılmaya rağmen aktif kalmıştır (Paschale ve Clerici, 2012).

DNA polimerazına ek olarak PZR reaksiyonunun gerekli komponentleri, oligonükleotid primerleri, deoksinükleotid trifosfatlar

(dNTPs), kalıp ve hedef DNA ve baffle (genellikle Tris) ve magnezyum klorid gibi iki değerli bir katyon içermektedir. Primerler genellikle 20-25 taban uzunluğunda oligonükleotitlerdir. Onlar hedefin özel sırasını tanımak ve amplifikasyon bölgeyi tanımlamak için dizayn edilmişlerdir (Tang ve Stratton, 2006).

Primerlerin uzunluğu ve sekansı onun erime ve sertleşme derecesine karar verir. Hedef DNA'ya bir kez tav verildiğinde, primerler bir çift zincirli DNA kalıbı gerek duyan DNA polimeraz için bağlayıcı bir alan yaratmaktadır. Bu kısa çift zincirli primer bölümü DNA replikasyonun ya da amplifikasyonun temelidir. Taq DNA polimerazı yeni DNA zinciri sentezi ya da genişletmesinden sorumlu enzimdir (Tang ve Stratton, 2006).

DNA amplifikasyon teknolojileri direk virüs ölçümünde ve klinik laboratuarlarda virüs ilişkili hastalıkların teşhisinde ve gözlemlenmesinde daha geniş kullanımlar kazanıyor (Macky et al.,2002). PZR'nin EBV enfeksiyonun tespit ve izlenmesinde kullanımı pek çok araştırmada rapor edilmiştir. En iyi denetimler primer ve prop farklı sekanslar ile yüksek kurunmuş open reading frames (ORFs) hedefi kullanarak çok az ya da hiç yanlış olmayan sonuçlar vermiştir. Yaklaşımlar nükleik asit için çok hafif farklı kaynaklar ve işleme teknikleri kullanmaktadır ve farklı miktar ölçme standartlarını görevlendirmektedir. En yüksek hassasiyet için, en iyisi kan örneklerini ya da DNA virüslerinin kaynağı olan periferal kan mononükleer hücreleri kullanmak, çünkü virüs hemen hemen her zaman hücreyle ilişkilidir ve (plasma ya da omurilik sıvısı gibi) hücrenin olmadığı yerlerde nadiren kıyaslanabilir seviyelerde bulunmaktadır (Hayden et al.,2009).

### **1.1.9.2. İn Situ Teknikler**

İn situ teknikleri öncelikle lezyon için hücrelerde EBV bulunup bulunmadığına karar vermek için doku biyopsisi kullanılmaktadır. İki in situ tekniği kullanılmaktadır, birincisi EBV özellikli DNA'yı kullanarak DNA'nın genomik varlığını tespit etmek ve EBER RNA'yı tespit etmek için oligonükleotid proplarını kullanmaktadır ( Hayden et al., 2009).

İkincisi daha çok genel olarak kullanılan bir tekniktir ve prob araçları bazı kaynaklardan temin edilebilir. Onlar EBV genomunun en aktif şekilde uyarlanmış bölgesinden RNA polimeraz III tarafından yapılmış iki küçük RNA moleküllerinin birinin ya da her ikisinde tespitine güvenir. EBERs için in situ tekniğinin büyük avantajı hücre başına 107 kopyanın aşacağı tahmin edilmiş olan RNA birikimidir. Böylece kolaylıkla doku bölümleriyle EBV'nin yeri iki saatten az zamanda tespit edilebilir. Viral varlığı (EBER prop) in situ özellikleri ile enfekte hücrelerde viral gen ekspresyonu virüsün tanısında yardımını çoğaltmak için çalışmalar vardır. Ayrıca ZEBRA (EBV replikasyon aktivatör), EA\_D (EA diffüz), EA\_R (EA sınırlı) ve M antigen diye adlandırılan litik faz antigenleri için kitler vardır. Bunların herhangi biri litik virüs üretimini tespit etmek için kullanılabilir ( Hayden et al.,2009).

### **1.1.10. EBV Enfeksiyonu Semptomları**

Hastalık genellikle boğaz ağrısı, bulantı, farenjit, ateş, baş ağrısı, gribeyaz eksüdalar ve nekrotik alanlar içeren tonsilit, ön ve arka servikal lenf nodu tutulumu, karaciğer enzim artışı ile karakterizedir. Hepatomegali (%6-13), splenomegali (%50-63) görülür. Hastaların periferik kanlarında atipik lenfositler saptanır. Hastalar 2-3 haftada iyilesir. Boğaz ağrısı aylarca

sürebilirken diğer semptomlar kısa sürede kaybolur. Nadiren kronik mononükleoz sendromu gelişebilir (Geçgel, 2011).

Ayrıca otoimmün hemolitik anemi, trombositopeni ve hafif nötropeni görülebilir. Olguların %1'inden azında ensefalit, aseptik menenjit, transvers miyelit, Guillain-Barre sendromu, optik nörit gibi nörolojik komplikasyonlar gelişebilir. Bunun dışında siroz, perikardit ve fatal miyokardit olguları da bildirilmiştir (Engels et al.,2001).

EM tablosu EBV dışında CMV ile de oluşabilir ancak klinik ve laboratuvar bulguları farklıdır. Akut toksoplazmozda ve adenovirüslerle de EM benzeri tablo oluşabilir. Tanı serolojik testlerle konur. Ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken diğer hastalıklar viral hepatit, kızamıkçık, streptokokkal tonsillit ve primer HIV enfeksiyonudur (Arman, 2008).

#### **1.1.11. EBV ile İlişkili Hastalıklar**

##### **1.1.11.1. Enfeksiyöz Mononükleoz (EM)**

En sık rastlanan EBV enfeksiyonudur. Etken tükürük ile bulaşır, enfeksiyon orofarenkste başlar. Viral replikasyon farenksin epitel hücreleri ve tükürük bezlerinde gerçekleşir. Replikasyonu takiben virüs, B lenfositlerini enfekte eder ve bu hücrelerde varlığını sürdürür (latent enfeksiyon). Normal bireylerde virüsle enfekte olan hücrelerin çoğu elimine edilir, ancak az sayıda enfekte lenfosit ömür boyu konakta kalır (Geçgel, 2011). Hastalık çocukluk çağında genellikle asemptomatik seyreder. Semptomatik hastalıkta otitis media, diyare, üst solunum yolu enfeksiyonu gibi tipik olmayan belirtiler veya EM tablosu ortaya çıkar (Geçgel, 2011).

Küçük çocuklarda klinik bulgular saptansa da yarısında heterofil antikorlar oluşmaz. Yaş ile hem klinik belirtiler hem de heterofil antikor pozitifliği artar; 4 yaş grubunda enfeksiyon geçirenlerin %80'inde heterofil antikor saptandığı bildirilmiştir (Geçgel, 2011).

#### **1.1.11.2. Kronik Aktif (Persistan) EBV Enfeksiyonu**

EM kliniğini takiben kalıcı yorgunluk, baş ağrısı, miyalji, subfebril ateş, lenfadenopati, hepatosplenomegali, pnömoni, nörolojik ve oftalmik patolojiler ile seyreden uzamış bir hastalık tablosudur. Hastaların çoğunda kronik EBV enfeksiyonu ile uyumlu antikor profilleri saptanır. 'Kronik mononükleoz' tablosunun aylar ve yıllar boyu devam eden bir sendrom olduğu düşünülmektedir. Ayrıca nadir görülen, ciddi malignitelere veya ölümcül seyreden diğer hastalıklara dönüşen EBV ile ilişkili tablolara 'kronik aktif EBV enfeksiyonu' adı verilmektedir (Erensoy, 2008).

Kronik mononükleoz sendromlu hastalarda yüksek düzeyde anti-VCA ve anti-EA antikorları (IgG ve IgA) oluşur, bunun yanı sıra normal, düşük veya saptanamayacak düzeyde anti-EBNA antikorları bulunabilir. Ayrıca anti-VCA IgM titreleri çok düşük veya saptanamayacak düzeylerde olabilir. Pansitopeni ve poliklonal hipergamaglobülinemi gelişebilir. Bu hastalarda yüksek düzeyde EBV genomu saptanmıştır. Etiyopatogenezinden hücresel immün yanıt, interferon sistemi ve NK hücre aktivitesinde yetersizlik; EBNA'ya anormal hümorale yanıt ya da EBV varyantı bir süsun etken olabileceği sorumlu tutulmaktadır (Erensoy S., 2008).

### **1.1.12. Epstein Barr Virüs, Proliferasyon ve Onkogenez**

Epstein-Barr Virüs çeşitli lenfoproliferatif hastalıklara neden olabilir (Doğan, 2005). Bunlar:

#### **1.1.12.1. Hemofagositik Lenfohistiositoz**

Benign bir hastalıktır, histiositik proliferasyon ve hemofagositoz ile karakterizedir. Epstein-Barr virüs ile enfekte lenfositler TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  salınımını artırır. Bu yapılar makrofaj aktivasyonuna neden olur. Hastalık ateş, lenfadenopati, hepatosplenonegali, hepatit, pansitopeni ve koagülopati ile kendini gösterir (Doğan, 2005).

#### **1.1.12.2. Lenfoid Granülopatosis**

Lenfoid sistemin EBV ile ilişkili damar hasarı ile karakterize bozukluğudur. Ateş, bulantı, kilo kaybı ve öksürük görülür. Bir immün yetmezlik durumu vardır (Doğan, 2005).

#### **1.1.12.3. Burkitt Lenfoma**

Epstein Barr Virüs ile ilişkili ve biyolojik, yerleşim yönlerinden birbirlerinden farklı 3 klinik şekli vardır. Bunlar endemik, sporadik ve immün yetmezlikli kişilerle ilişkili varyantlardır. Burkitt lenfomanın endemik formu, Afrikanın ekvatoryal bölgelerinde ve Papua Yeni Gine’de sıkça (50-100/106) görülür.



Tümör hücrelerinde EBV'nin varlığı ile endemik BL arasında hemen hemen %100 ilişki vardır (Straathof, 2003; Sarac ve ark., 2005).

Epstein Barr Virüs primer olarak B lenfositleri enfekte eder ve proliferere olabileceği blastlara ulaşır. Epstein Barr Virüs nüklear antijen-2 ve LMP-1 lenfositlerin ölümsüzlüğü açısından önemlidir (Straathof, 2003; Sarac ve ark., 2005).

#### **1.1.12.4. Hodgkin Hastalığı**

Hodgkin lenfoma (HL) klinik olarak agresif ama tedavi ile sağ kalım oranları yüksek; malign lenfoma grubunda kabul edilen heterojen bir hastalıktır. Hodgkin ve Reed-Sternberg Hücrelerinin (HRS) orijininin lenfoid kökenli olduğunun saptanması nedeniyle Hodgkin Hastalığı olan adlandırma yerini HL'ya bırakmıştır. Genellikle lenf düğümlerinde ve en sık servikal bölgede ve çoğunlukla genç erişkinlerde gözlenmektedir. Etiyopatogenezinin açıklanmasında önemli gelişmeler olmasına karşın belirsizlikler hala sürmektedir. Enfeksiyon ile ilişkisine yönelik epidemiyolojik, klinik, ve histopatolojik kesin bulgular vardır (Sarac ve ark., 2005, Straathof ve ark., 2003). Epstein-Barr virüsünün (EBV) rolü serolojik çalışmalarda ve biyopsi materyallerinde sıklıkla bulunan EBV genomuyla desteklenir. EBV-HL ilişkisi bilinen bir konu olmasına karşın EBV'nün hastalığın gelişimindeki rolü ve prognostik önemi tartışmalıdır.

### **1.1.13. Proliferatif Ajan Olarak Epstein Barr Nuclear Antigen1 (EBNA1) Proteini**

EBNA1, epizomal EBV genomunun korunumu ve replikasyonu için gerekli olan ve DNA bağlayan bir proteindir. Bu fonksiyon, EBNA1'in viral replikasyonun plazmid orijini olan "oriP"ye bağlanmasıyla kazanılmıştır (Sample ve Kieff, 1996). EBNA1 aynı zamanda Qp'nin kendi ekspresyonunu ters yönde ayarlamak için aşağı doğru olan iki bölgesi ile etkileşir (Nonkwelo et al., 1996). EBNA 1 transkripsiyonal bir transaktivatör olarak hareket ederek Cp ve LMP 1 promotorunu regüle eder (Sample ve Kieff, 1996). EBNA1 proteini, farklı EBV izolatlarında farklı büyüklüğe sahip glisin-glisin-alanin (Gly-Gly-Ala) tekrar dizileri içerir (Sample ve Kieff, 1996). Bu tekrar alanı sınırlandırılmış MHC class 1'in cis etkili inhibitörüdür ve antijen sürecini ubiquitin-proteozom kaskadı yolu ile inhibe ederek fonksiyonu açığa çıkarır (Levitskaya ve ark., 1995). EBNA 1 oluşturan peptidlerdeki hata hedef hücrelerde eksprese olduğunda inefektif CD8+ T-hücrelerinin EBNA1 cevabı ile sonuçlanır (Wilson et al., 1996).

Yapılan bir çalışmada, transgenik farelerdeki B hücrelerinde EBNA1 ekspresyonu B-hücre proliferasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu da onkogeneziste EBNA1'in direkt rolü olabileceğini öne sürmektedir (Wilson, 1996).

EBNA1 epizomal replikasyon ve viral genomun devamlılığı için gereklidir (Beaulieu et al., 1999). Epstein-Barr Virüs ile enfekte olan tüm hücreler mutlaka EBNA-1 sentezler. Virüsün hücrede persistansı için EBNA-1 gereklidir ve EBNA-1 sentezlemeyen rekombinant virüsler, B lenfositleri ölümsüzleştiremezler (Yaung et al. 2003). Latent EBV enfeksiyonunda enfekte hücrenin çekirdeğindeki tüm kromozom ile EBNA-1 ilişkilidir ve

latent replikasyon orjini (Ori P) ve kromozomal proteinlerin her ikisinde birbirleri ile etkileşmeleri EBV epizomlarının yeni nesil hücrelere geçişini sağlar (Beaulieu et al. 1999). Epstein-Barr Virüs nükleer antijen-1'in santral kısmı gly-ala tekrarlarından oluşur (Yaung et al. 2003). Bu bölgeler immün sistemden kaçışta önemlidir. Bu tekrar bölgeleri, ubiquitin/proteasome antijen işleme yolunu inhibe ederek viral proteinlerin işlenmesini ve MHC Sınıf-1 aracılı sunumunu önler. Böylece EBV sitotoksik T lenfositlere (CTL) sunulamaz ve CTL'lerin cevabı engellenir (Doğan, 2005).

EBNA1 EBV latent gen ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynar ve EBV replikon plazmid replikasyonu için gerekli olan tek viral bir proteindir (Elizabeth et al., 2000). Ancak EBNA1'in proliferasyondan sorumlu transkripsiyon faktörlerini hangi mekanizmalarla artırdığı gizemini korumaktadır.

#### **1.1.14. Proliferatif Ajan Olarak Latent Membrane Protein 1 (LMP1)**

LMP1'in fonksiyonunda en az dört adet kaskad bulunmaktadır. Bunlar NF-kB, JNK/AP-1, p38/MAPK ve JAK/STAT' dir. LMP1'in C terminalinde en az iki aktive eden bölge bulunur. Bunlar CTAR1 ve CTAR2'dir (C-terminal 'i aktive eden bölgeler 1 ve 2). CTAR1 membrana proksimal olarak lokalizedir (aminoasit 351-386) ve EBV<sup>+</sup> B-hücrelerinin uzun dönem gelişimi için gereklidir (Izumi ve Kieff, 1997). LMP1'in lenfositlerdeki ekspresyonu, transkripsiyon faktörü NF-kB' nin aktivasyonu ve anti-apoptotik bir gen olan bcl-2 ve A20 geninin ekspresyonunun denetlenmesi gibi çeşitli hücrel değişiklikleri indüklemektedir (Laherty et al., 1992; Rowe et al., 1994).

Transkripsiyon faktörü NF-kB'nin aktivasyonu doğrusal olmayan hücre sinyalindeki LMP1'in önemindeki ilk belirtidir. Hem CTAR1, hem de CTAR2, NF-kB'yi bağımsız olarak aktive edebilir (Huen et al., 1995). CTAR2, NF-kB aktivasyonuna arabuluculuk yapan LMP1'in büyük çoğunluğunun (%70-80) tümör nekrosiz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkili ölüm domain proteini (TRADD) ile etkileşimini açıklar. Geri kalan NF-kB aktivasyonuna arabuluculuk yapan LMP1'in %20-30'u CTAR1 P<sup>204</sup>XQ<sup>206</sup>XT<sup>208</sup> motifinden elde edilir. Bu motif TNF ile ilişkili birçok faktörle etkileşmektedir (Devergne et al., 1996).

LMP1, JNK (c-Jun N-terminal kinaz) kaskatını yalnızca CTAR2 yolu ile aktive eder (Eliopoulos et al.,1999). Oysa p38/MAPK kaskatının aktivasyonunda hem CTAR1 hem de CTAR2 arabuluculuk etmektedir. LMP1'in C-terminalindeki 33 baz çiftlik tekrara sahip proline zengin bir dizi Janus kinaz 3 (JAK3)'ün aktivasyonuna arabuluculuk eder (Gires et al., 1999). LMP1'in plazma membranı içindeki agregasyonu için kritik bir önkoşuldur ve transmembran domeynlerin instrinsik bir özelliği olarak ortaya çıkar (Gires et al., 1997). LMP1, lipid yığınlarında zenginleştirilmiştir ve hücre iskeletiyle ilişkidir. Transmembran domeynleri, LMP1'i lipid yığınlarına yönlendirmekten sorumludur, oysa LMP1'in TRAF molekülleriyle etkileşimi LMP1'in hücre iskeletiyle ilişkisi için önemlidir (Higuchi, 2001).

#### **1.1.15. LMP1'in Proliferatif Etkinliği**

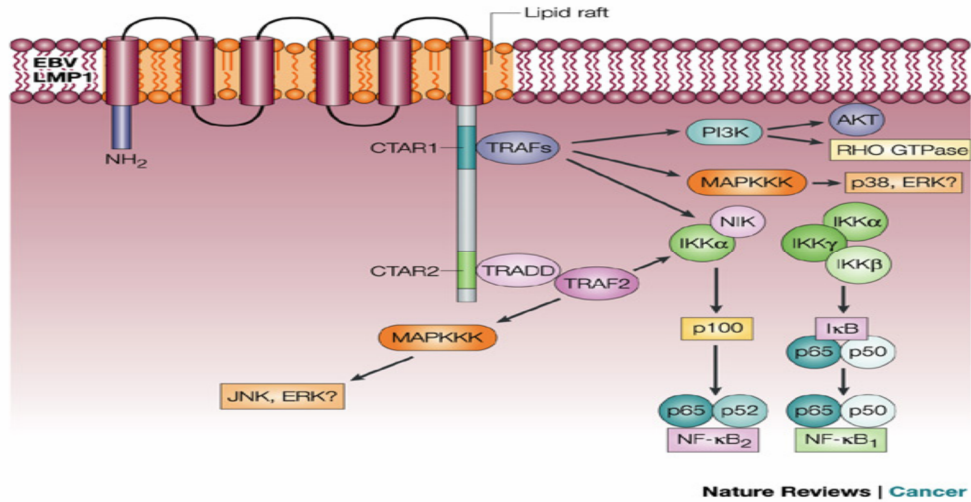
LMP1, promotörü EBNA-2'ye yanıt elementi taşır (Beaulieu et al.,1999) aynı zamanda hücre yüzey adezyon moleküllerinin artışına yol açar (Yaung et al., 2003) ve hücrel onkogen bcl-2'nin yapımını artırarak EBV ile

enfekte lenfositleri apoptozisten korur (Beaulieu et al.,1999). Bunların yanında latent membran protein geninin fibroblastlara transferinde, normalde tümör oluşturmeyen fibroblast dizilerinden bazılarının tümör hücresi haline geçtiği de tespit edilmiştir (Beaulieu et al., 1999). Yine LMP1'in in vitro olarak; proliferasyonun devamı ve B lenfositlerdeki ölümsüzlüğün devamı açısından gerekli olduğu gösterilmiştir (Niedobitek et al., 2001). Diğer taraftan LMP1'in hücrel adezyon moleküllerinden lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (LFA1), LFA3 ve ICAM1 ifadelenmesine de neden olduğu ve bu nedenle LMP-1 ifade eden hücrelerin çok sık kümeleştikleri bildirilmiştir. Bu moleküller B lenfositlerle T lenfositler arasında LFA3/CD2 ve LFA1/ICAM1 adezyon yolları ile bağlantı kurar ve EBV ile transforme olmuş B lenfositlerin CTL (sitotoksik T lenfosit) 'ler aracılığı ile eliminasyonunda önemlidir. Sitotoksik T lenfosit aracılı lizis özellikle immünsüpresif hastalarda tedavide kullanılmaktadır (Beaulieu et al., 1999). Başka bir çalışmada ise LMP1'in B lenfosit aktivasyon moleküllerinin (CD23, CD39, CD40 ve CD44 gibi) ifadelenmesini uyardığı bildirilmiştir (Niedobitek et al., 2001).

#### **1.1.16. LMP1 İlişkili Biyokimyasal Yolaklar**

Epstein-Barr Virüs LMP-1, 63 kilodalton ağırlığında integral membran proteindir ve üç ana parçaya bölünebilir. İlk parça; LMP-1'i plazma membranına bağlayan ve proteini yönlendiren bir amino terminal sitoplazmik kuyruk (1-23.aminoasitler), ikinci parça; LMP-1 agregasyon ve oligomerizasyondan sorumlu altı hidrofobik transmembran düğüm (24-186. aminoasitler) ve üçüncü parça; molekülün sinyal aktivitesininin büyük bölümünü oluşturan uzun karboksiterminal sitoplazmik bölgedir (187-386. aminoasitler). Nüklear faktör-kB (NFkB) transkripsiyon faktör yolunu aktive

edebilme yeteneklerine göre iki farklı fonksiyonel bölge; C-terminal aktivasyon bölgeleri 1 ve 2 (CTAR1 ve CTAR2) olarak tanımlanmışlardır (Zheng H. ve ark 2007). Latent membran protein-1'in sinyal etkisi tümör nekroz faktör (TNF) reseptör, TNF reseptör ilişkili faktör (TRAF)'ün CTAR1 ile 13 direk olarak veya CTAR2'ye bağlanan ölüm bölgesi içeren protein TNF aracılıklı ölüm domaini (TRADD) ile indirek olarak etkileşmeleri sonucu ortaya çıkar (Eliopoulos AG ve Young LS, 2001). Bu adaptör proteinler NF- $\kappa$ B-indükleyen kinaz (NIK) ve I $\kappa$ B kinazları (IKK) içeren bir multiprotein katalitik kompleks oluştururlar. Bu hem klasik I $\kappa$ B alfa bağımlı NF- $\kappa$ B yolunun (p50-p65 heterodimerlerini içerir) aktivasyonu, hem de p52-p65 heterodimerlerinin oluşumu için p100 NF- $\kappa$ B işlenmesi ile sonuçlanır (Eliopoulos et al., 2003). (Şekil 1.2. )

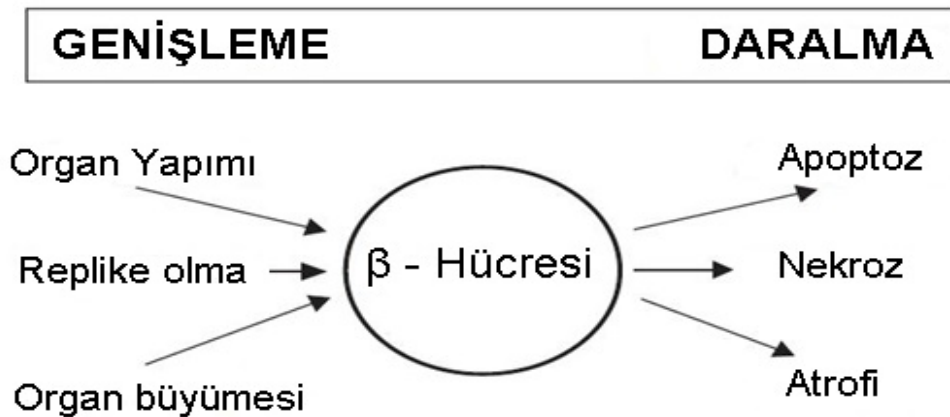


Şekil 1.2. EBV LMP1 ilişkili Yolaklar (Eliopoulos AG ve ark. 2003).

## 1.2. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus; insülin üretim veya aktivitesindeki yetersizlikten doğan kan glukoz seviyesinin yüksek olmasıyla karakterize, metabolik bir hastalıktır. Diyabetin tip1 ve tip2 olmak üzere iki ana formu bulunmaktadır. Her iki tipte progresif pankreatik beta hücre kayıplarıyla karakterizedir (Gurzov et al.,2008).

Organizmada bulunan dokularda proliferasyon ve neogenez ile apoptosıs genelde denge halindedir (Şekil 1.3.). Bu dengenin apoptosıs yönünde bozulması veya nekroza kayması, diyabet hastalarındaki beta hücre kayıplarında olduğu gibi doku hasarlarına neden olabilmektedir. Özellikle Tip2 Diabetes Mellitus (T2DM) hastalarındaki beta hücre kayıplarının temel nedeninin apoptosıs olduğuna inanılmaktadır. Bunun en güzel göstergesinin T2DM hastalarındaki beta hücrelerinde, apoptotik mediatörler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivitelerinin yükselmesi olduğu ifade edilmektedir. Fakat T2DM'la karakterize insülin sekresyonundaki değişikliklerde, beta hücre kayıplarının tahmin edilen sonuçları yeterince açıklanamamaktadır (Girard, 2008; Lupı ve Del Prato, 2008).



Şekil 1.3. Beta Hücre Kütlesi Kontrol Mekanizması (Lupı ve Del Prato, 2008)

Tahminlere göre, 2010 yılı itibari ile tüm dünyada erişkin (20-79 yaş) nüfusta diyabet prevalansı %6,6'dır ve 2030 yılında %18 artışla bu değer %7,8 olacağı öngörülmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin Diyabet Atlası'nda farklı ülkeler ve bölgelerdeki diyabet prevalansını karşılaştırmak için dünya nüfusunun standart yaş grubu dağılımına göre hesaplamalar yapılmıştır. Buna göre 2010 yılı standardize diyabet prevalansı %6,4 iken 2030 yılında yaklaşık %20 artış ile %7,7'ye ulaşacaktır. Sayısal olarak söylemek gerekirse şimdilerde 285 milyon olan diyabetli nüfusun yirmi yıl sonra 438 milyona ulaşması beklenmektedir (International Diabetes Federation;2009, T.C. Sağlık Bakanlığı;2011).

Türkiye'de 1993'de yapılan çok merkezli DiabCost çalışmasına göre komplikasyonsuz bir diyabetlinin yıllık doğrudan maliyeti kişi başı yaklaşık 400 ABD doları olmuştur. Komplikasyonlu diyabetlide ise maliyet yaklaşık 4 kat daha yüksek olarak hesaplanmıştır (EUROBIAB-ACE Study Group;2000). 2010 yılında ise Türkiye için diyabet nedeniyle kişi başı sağlık harcaması 572 ABD doları olduğu hesaplanmıştır (International Diabetes Federation;2009). Bu rakam Türkiye'de diyabet maliyetinin geçen 15 yılda %40 artış gösterdiğini ortaya koymaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı;2011). Bu bağlamda diyabet tedavisinin ve komplikasyonlarının giderilmesinin önemi ortadadır ve yukarıda verilen tahminlere göre de her geçen gün bu önem artmaktadır.



### 1.3. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)

Programlı hücre ölümü (apoptoz) hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (Hampton ve Orrenius, 1998). Apoptoz mekanizmasında üç temel grup molekül rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar).

Ölüm reseptörleri; TNF (Tumour Necrosis Factor) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (Death Domain) adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar (Büyükgebiz ve Caferler , 2001). Bilinen altı tane ölüm reseptörü, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNFRelated Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6 dır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (caspaseactivated DNase; CAD) aracılığı ile DNA yıkımına neden olunur (Büyükgebiz ve Caferler, 2001).

Apoptoz birçok fizyolojik ve patolojik olayda etkin rol oynamaktadır. Fizyolojik olayların başında hücre yapım-yıkımı gelir. Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılarak yeni hücrelere yer açılır. Patolojik olarak sayabileceğimiz olaylarda ise; tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında rol oynar. Yine hormona bağımlı olarak dokularda patolojik atrofi

sırasında; örneğin kastrasyondan sonra prostat atrofisi ya da glukokortikoid kullanımından sonra timusta lenfosit kaybı apoptoz yoluyla olur. Pankreas, tükürük bezi, böbrek tubulusları gibi parankimatöz organlarda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofide gözlenir. Yine kanserde apoptoz mekanizmasının yeri ve önemi büyüktür ve kanser tedavi planlarında bir numaralı araştırma alanını apoptotik süreç mekanizması oluşturmaktadır. Bu nedenle apoptoz mekanizması tam olarak anlaşıldığında bu sayılan hastalıkların tedavisi de mümkün olabilecektir (Fadeel et al.,1999;Renehan et al., 2001).

Apoptozun önemi; çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır (Tomatır, 2003). Son yıllardaki çalışmalar  $\beta$  hücrelerinde Endoplazmik Retikulum (ER)'un apoptotik ölüm sinyallerinin iletilmesinde önemli bir organel olduğunu göstermiştir.

### **1.3.1. Diyabet Patogenezinde Beta Hücre Apoptozisinin Rolü**

Pankreatik beta hücreleri insulin sekresyonu ile ilişkili glukoz homeostazisinde çok önemli bir role sahiptirler. Beta hücrelerinin hem sayısal hem de hacimsel olarak değişimleri dinamik olarak değişik fizyolojik ve patolojik koşulların etkisi altındadır (Bonner, 2000). Fizyolojik şartlarda yaşam boyunca düşük düzeyde beta hücre ölümleri ile proliferasyonu arasında

bir denge mevcuttur. Ancak, beta hücrelerinin aşırı kaybının diyabete ve hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin ortak özelliği olan beta hücre disfonksiyonuna neden olduğu kabul edilir (Mathis, 2001; Eizirik ve Poulsen, 2001). Tip 1 diyabette, beta hücreleri otoimmün ve yangısal proseslerle seçici olarak yok edilirler ve bu durum insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile sonuçlanır. Tip 2 diyabette hastalığın ilerlemesinde esas etkili olan faktör, sıklıkla şişmanlık ve fiziksel aktivite azlığı ile ilişkili olan insülin direncidir. Fakat bu durum, sadece beta hücrelerinin artan insülin ihtiyacını karşılayamamaları sonucu oluşur. Her iki durumda da, beta hücre ölümlerinin esas yolu apoptozis olarak telakki edilir. Beta hücrelerinde gelişen apoptozis, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, membran geçiş özelliği olan değişik maddeler, büyüme faktörlerinin yetersizliği, metabolik ve sinyal yollarındaki aksaklıklar gibi değişik uyaranlara bağlı olarak ortaya çıkar (Tablo 1.3.). Ölüm reseptörlerinin bağlanması ve DNA hasarı apoptozisin başlatıcıları olarak kabul edilirler ve mitokondrial membran permabilitesini ve kaspazların aktivasyonunu indüklerler. Son çalışmalar, endoplazmik retikulumun (ER) stres aracılı apoptozise duyarlı bir organel olduğunu ve apoptotik sinyalleri iletebildiğini göstermektedir.

**Tablo 1.3.** Beta Hücre Apoptozunda Potansiyel Uyarıcılar.

---

Ölüm reseptörleri

- Fas ligand/Fas reseptör (Mathis D., ve ark. 2001, 16)
- Perforin (Mathis D., ve ark. 2001, 16)
- Sitokinler (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) (Mathis D., ve ark. 2001; Eizirik DL. ve Poulsen TM., 2001)

Membranı geçebilen aracı moleküller

- Reaktif oksijen türleri (hidrojen peroksit, hidroksil radikali) (Kaneto H., ve ark., 1999)
- Reaktif azot türleri (nitrik oksit, peroksinitrit) (Oyadomari S., ve ark., 2001)
- Alkilleştirici ajanlar (streptozotosin, MMS) (Saini KS., ve ark. 1996, Delaney CA, ve ark. 1995)
- Seramid (Unger RH., 2002)

Yetersiz büyüme faktörleri

---

- 
- IGF-1 (Withers DJ., ve ark. 1999; Withers DJ., ve ark. 1998)
  - EGF (Miettinen PJ, ve ark. 2000)
  - FGF (Hart AW., ve ark. 2000)

Metabolik ve sinyal yollarında yetersizlik

- Artış
    - Glukoz (Biarnés M., ve ark. 2002; Liu K., ve ark. 2000)
    - Serbest yağ asitleri (Unger RH., 2002)
    - Amilin (Zhang S., ve ark. 1999)
    - Kalsiyum (Oyadomari S., ve ark., 2001; Zhou YP., ve ark. 1998)
  - Azalış
    - Hücre döngüsü düzenleyicisi (siklin bağımlı kinaz 4) (Rane SG., ve ark. 1999)
    - Transkripsiyon faktörü (BETA/NeuroD, HNF-1 $\alpha$ ) (Wobser H., ve ark. 2002; Naya FJ., ve ark. 1997)
    - Mitokondri fonksiyonu (mitokondriyal transkripsiyon faktörü A) (Silva JP., ve ark. 2000)
    - ER stres değiştirici (PERK) (Harding HP 2001)
- 

Apoptozun önemi; çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır (Tomatır, 2003). Son yıllardaki çalışmalar  $\beta$  hücrelerinde Endoplazmik Retikulum (ER)'un apoptotik ölüm sinyallerinin iletilmesinde önemli bir organel olduğunu göstermiştir.

Diyabet hastaları için risk faktörü olarak ifade edilen ve insan genomundaki yeri araştırılan transkripsiyon faktörü TCF7L2 (transcription faktor 7-like 2) 2006 yılında keşfedilmiştir. Bu transkripsiyon faktörünün proliferasyon, hücre korunması ve insülin sekresyonunu içeren  $\beta$  hücre fonksiyonlarını düzenleyen ve endokrin pankreasın etkilerini geliştiren Wnt

sinyal ağının en önemli üyesi olabileceği ifade edilmektedir. TCF7L2, “canonncal pathway” şeklinde bilinen Wnt/ $\beta$ -katenin yolunu kullanarak, cyclin D ve c-myc genleri gibi Wnt sinyallerine cevap verecek genleri uyararak hücre poliferasyonunu artırmakta, insülin sekresyonunun kontrolünü sağlamaktadır (Cauchi ve Eroguel, 2008; Welters ve Kulkarnı, 2008).

TCF7L2'nin iskelet kasları dışında beta hücreleri de dahil olmak üzere birçok dokuda üretilmekte olduğu ve obez diyabet hastalarında sekresyonunun azaldığı ifade edilmektedir. Yine aynı çalışmada beta hücrelerinde aktif TCF7L2 düzeylerinin değişiminin diyabetin ilerlemesine ve defektif insülin sekresyonuna neden olabileceğine değinilmektedir (Shu et al.,2008).

TCF7L2 faktörü, glukoz homeostasisine pro-glukagonun gen ekspresyonu üzerinden, ince barsağın L hücrelerinde ilgili genleri kodlayarak ve GLP-1 sentezini sağlayarak etki etmektedir (Shu et al., 2008).

TCF7L2, beta hücrelerini glukozun ve stokinlerin neden olduğu toksisiteye karşı korumakta, bununla birlikte kaspaz 3 aktivitesini düşürerek apoptosis derecesini azaltmaktadır.

Bu etkilerinin bir kısmını, GLP-1 aracılığıyla aktifleşen PKA'nın  $\beta$ -katenini uyarmasına bağlı olarak transkripsiyon faktörü FoxO1 aracılığı ile gerçekleştirdiği ve böylelikle beta hücrelerini koruyarak poliferasyonu sağladığı bildirilmektedir (Welters ve Kulkarnı, 2008).

#### 1.4. Endoplasmik Retikulum (ER) Stresi

ER ökaryotik hücrelerde salgı proteinlerinin sentez ve salgılanma yolağında ana organeldir.  $\beta$  hücrelerinde ER'da insülin başta olmak üzere, plazma membran proteinleri ve lizozomal proteinlerin sentezleri, glikozilasyonları ve üç boyutlu yapıyı kazanmaları için “katlanmaları” gerekir. ER'daki katlanmalardan sorumlu proteinler, foldazlar (katlanmayı katalizleyen enzimler ve moleküller) ve şaperonlar (agregasyonu önleyerek protein katlanmasına yardımcı olan proteinler) olmak üzere iki sınıfta toplanırlar. Bazı koşullarda bu işlem mekanizması bozulabilir (Ozturk, 2008).

Örneğin oksijen, glukoz, pH, ATP ve kalsiyum iyon konsantrasyonlarındaki değişiklikler yanlış katlanmış veya hiç katlanamamış proteinlerin üretilmesine neden olur. Bu proteinler de hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını bozar; bu işlem “proteotoksisite” ya da “ER stresi” olarak adlandırılır. ER stresi çeşitli koşullarda protein glikolizasyonunun bozulması, disülfid bağların oluşumunda azalma, ER lümeninde  $Ca^{+2}$  azalması, ER'dan Golgi'ye protein transportunun bozulması gibi nedenlerle ortaya çıkar. Hücreler, ER stresine karşı hücreSEL bir korunma mekanizmasına sahiptir ve dört farklı cevap yolağı ile hücre ER stresinden korunmaya (ER stresine cevap) çalışır (Ozturk, 2008).

## 1.4.1. ER Stresine Cevap Yolları

### 1.4.1.1. ER Stresinde Şaperon Proteinlerin Transkripsiyonel Düzeyde Uyarılması

ER'da protein katlanmaları, Bip/GRP78 ve GRP94 gibi ER şaperon proteinleri ve protein disülfid izomeraz (PDI) ile peptidil-prolil izomeraz gibi enzimler tarafından kolaylaştırılır. Bu proteinler ER stresi ile uyarılırlar ve bu uyarılma transkripsiyonel düzeyde kontrol edilir. ER stresi koşullarında, hücreler ER'dan çekirdeğe doğru, katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen hücre içi sinyal yolunu aktive ederler. UPR'nin hedef genleri promoter bölgelerinde ortak bir bölgeyi paylaşırlar ki bu bölge ER stres cevap elementi (ERSE) veya katlanmamış protein cevap elementi (UPRE) olarak bilinir. Son zamanlarda, ATF6 (Yoshida et al.,1999) ve XBP-1'in (Yoshida et al., 2001) memeli hücre UPR'si için transkripsiyon faktörleri oldukları rapor edilmektedir. ATF6, ER'da lokalize olmuş tip II transmembran protein (p90ATF6) olarak sentez edilir ve ER stres aracılı proteolizis ile aktive olur (Yoshida et al., 2000). ER stresi, ATF6'nın ER'dan golgiye taşınmasını uyarır (Chen et al., 2002) ki; golgide ATF6 iki aşamalı bir işleme maruz kalır. İlk önce ATF-6'nın ER lümeni kısmı bölge-1 proteazla (S1P) ve sonra da transmembran kısmı bölge-2 proteazla etkileşime girer. Bağlanan N-terminal sitoplazmik uç (p50ATF6) çekirdeğe tranport edilir ve orada NF-Y ile birlikte ERSE'ye bağlanır; sonuçta UPR hedef genleri uyarılır. XBP-1 ERSE'ye bağlanır. XBP-1 mRNA'sı ER stresine cevap olarak uç uca bağlanır ve bu UPR hedef genlerinin uyarılmasında yüksek transkripsiyonel aktiviteye sahiptir. XBP-1 mRNA'sının bağlanması IRE1 aktivasyonuna ihtiyaç duyar. IRE1 ER'da lokalize olan tip1 transmembran endonükleazdır (Bertolotti et

al.,2000). Stressiz koşullarda, ER şaperon Bip IREa'nın ER lümeni bölgesine (domain) bağlanır ve bu proteini inaktif formda tutar. ER stresi varlığında ise, Bip katlanmamış proteinlere bağlanır ve böylece yarışmalı olarak IREa'dan ayrılır, bu da oligomerizasyon ve trans-otofosforilasyonla IREa'nın aktive olmasına neden olur (Bertolotti et al., 2000). XBP-1 mRNA'sı ER stresi sonucu ATF-6 aktivasyonu ile uyarılır. Ters olarak, ATF6 mRNA'sı ER stresi ile uyarılmaz. Bu nedenle, ER stresinin düşük düzeyde ve erken döneminde ATF6'nın; oysaki şiddetli ve geç fazında hem ATF6'nın hem de XBP-1'in aktive olduğu söylenebilir (Yoshida et al., 2001).

#### **1.4.1.2. ER Stresinin Tranlasyonel Düzeyde Zayıflatılması**

ER'da, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması bozulunca mRNA translasyonu zayıflatılır ve katlanmamış proteinlerin daha ileri düzeyde üretimi baskılanır. Bu olay, eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonu ile henüz translasyon aşamasının başlangıcında meydana gelir. EIF2 $\alpha$  faktörü başlatıcı Met-tRNA'nın ribozoma bağlanmasına aracılık eder. EIF2 $\alpha$ 'nın alfa alt ünitesinin Ser51 pozisyonunda fosforilasyonu bu aşamayı boke eder ve protein sentezi inhibe olur. Pankreatik endoplazmik retikulum eIF2 $\alpha$  kinaz (PERK), ER stresi sırasında bu fosforilasyondan sorumlu olan kinazdır (Shi et al., 1998). PERK ER'de lokalize olmuş, tip 1 transmembran serin/threonin kinazdır. IRE1 $\alpha$  gibi, PERK'in aktivasyonu da Bip'in ER lümeni domaininden ayrılması ile tetiklenir ve bu oligomerizasyona ve trans-otofosforilasyona öncülük eder (Bertolotti et al., 2000). IRE1 ve PERK'in lümen domainleri zayıf bir homoloji (yaklaşık %20 benzerlik) gösterirler; buna rağmen ER stresine duyarlılıkta fonksiyonel olarak değişkenlik gösterebildikleri rapor edilmiştir (Bertolotti et al., 2000). PERK, translasyonel zayıflatmada esas etkili olan



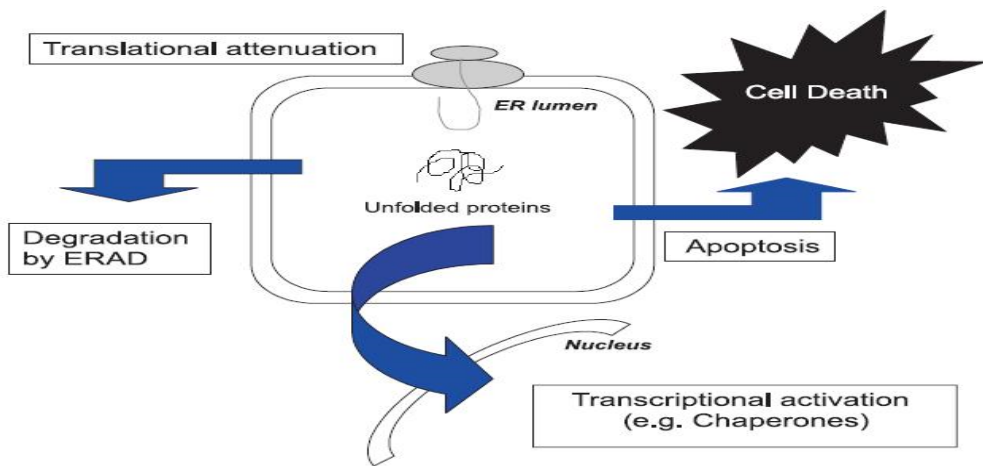
düzenleyicidir ki bu olay ER stresi sırasında hücrenin hayati devamlılığı için esansiyeldir. PERK sinyal mekanizmasının sonlandırılması PERK-Bip kompleksinin oluşumu ve eIF2 $\alpha$ 'nın GADD34 ile defosforilasyonu sonucu gerçekleşir (Novoa et al., 2001). GADD34, ER stresi sonrası gelişen translasyonel baskılanmadan geri dönüşü teşvik eden negatif feed back döngüsü olarak rol oynayabilmektedir. Memeli hücrelerinde bilinen 2 önemli IRE1 proteini IRE1 $\alpha$  ve IRE1 $\beta$ 'dir ve her ikisi de ER stres-sinyal iletim yollarında rol alırlar. Bundan başka IRE1 $\beta$ 'nin 28s rRNA'yı bağlayarak protein sentezini baskıladığı da rapor edilmektedir (Iwawaki et al., 2001). IRE1 $\alpha$  pankreasta en baskın olanıdır ve sürekli olarak eksprese edilirken, IRE1 $\beta$  ise barsak epitel hücrelerinde özel olarak sentezlenirler.

#### **1.4.1.3. ER Stresinde Hatalı Katlanan Proteinlerin Yıkımlanması (ERAD)**

ER stresinde hatalı katlanan proteinler ER-kalite kontrol sistemi tarafından tespit edilirler ve ER'dan sitosole taşınarak yıkımlanırlar. Bu işlem ER-aracılı yıkımlama (ERAD) olarak adlandırılır. Bu işlemin ilk basamağı hatalı katlanmış proteinlerin tanınmasıdır. Hatalı katlanan glikoproteinlerin yıkımlanması işleminde Man8-bağlı lektin sinyal tanıyıcı faktör olarak görev alır (Jakob et al., 1998). İşlemin 2. basamağı hatalı katlanmış olan proteinlerin yakalanması ve katlanmalarıdır. Kalneksin (CNX) ve kalretikulin (CRT), ER dirençli lektin-benzeri şaperonlar hatalı katlanmış ptoteinlere bağlanırlar. Üçüncü aşamada sitosole taşınma işlemi gerçekleştirilir. Sitosolde ubikutin-konjuge enzimler hatalı katlanmış proteinleri 26S proteozom vasıtasıyla yıkımlamak üzere hedef alırlar. Hatalı proteinlerin yıkımlanması işlemi protein ubikutinle reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Bu aşamada görev alan enzimler maya da identifiye edilmişlerdir ancak insandaki homologları henüz

bilinmemektedir. Maya hücrelerinde yapılan son çalışmalar, hatalı katlanmış proteinlerin ER’da etkili bir şekilde yıkımlanmasının UPR’yi gerektirdiğini ve ERAD sisteminde görev alan birçok genin UPR ile uyarıldığını göstermektedir (Casagrande et al., 2000). Bu bulgular, ERAD sistemi kapasitesinin ER stresi koşullarında sınırlı olduğunu, yeterli olmadığını ima etmektedir.

ER’nin protein katlama kapasitesi ile protein sentezine talep arasındaki uyumsuzluk ER stresini uyarır. Şişmanlık ve uzun süre sülfonilüreler ile tedavi gibi koşullar altında insülin sekresyonuna ihtiyaç artar. Bu da, bozulmuş insülin sekresyonuna doğru giden aşırı yüklenmiş  $\beta$  hücrelerine neden olabilir. Bu koşullar altındaki  $\beta$  hücre fonksiyonunun bozulması “pankreatik  $\beta$  hücresinin tükenmesi” olarak tanımlanmaktadır.  $\beta$  hücrelerine aşırı yüklenilerek kronik ER stresi uyarılır, böylece hücre fonksiyon bozukluğu ve apoptoz yolu ile beta hücre kitlesinde önemli bir azalma ortaya çıkar.



Şekil 1.4 ER Stres Cevapları ( Rajan et al., 2007)

#### 1.4.1.4. ER Stresinde Apoptozisin Uyarılması

Son yıllardaki çalışmalar beta hücrelerindeki ER stresinin hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin gelişiminde etkili olduğunu göstermektedir.  $\beta$  hücreleri yoğun olarak insülin sentezlemesi ve salgılaması nedeniyle sıklıkla ER stresine maruz kalan hücrelerdir. ER stresi ile ilişkili apoptozun gelişiminde 3 ayrı yolak tespit edilmiştir.

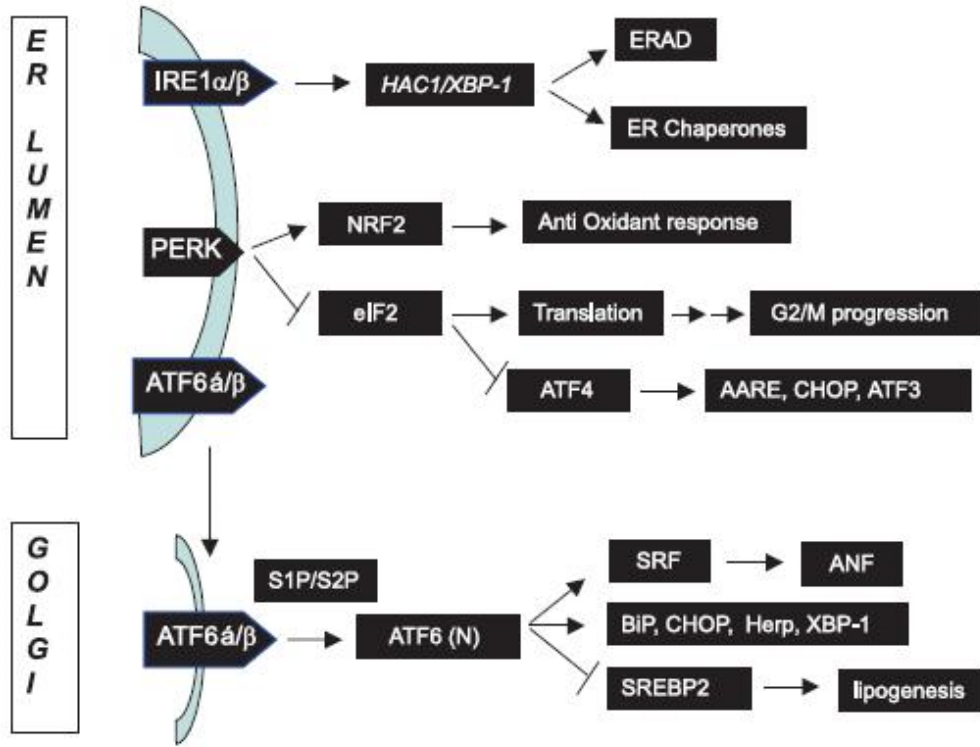
**Transkripsiyonel uyarı yolağı:** Birincisi, transkripsiyon faktör ailesinin üyesi olan CHOP/GADD153 geninin transkripsiyonel düzeyde uyarılmasıdır. CHOP, fizyolojik koşullarda ya sentezlenmez ya da düşük düzeyde sentez edilir. Fakat ER stresine cevap olarak, transkripsiyon düzeyinde güçlü bir şekilde uyarılır (Wang et al., 1996). CHOP'un aşırı uyarılması büyümede duraklamaya ve apoptozise neden olur (Barone et al., 1994). CHOP geninden yoksun fareler normal bir gelişim ve fertilitate gösterirlerken; ER stresine cevapta apoptozis oluşumunda azalma sergilerler (Zinszner et al., 1998). Bu nedenle, CHOP ER stres aracılı apoptozisin uyarılmasında önemli bir rol üstlenir. UPR cevabında ER şaperonları gibi CHOP geninin transkripsiyonu hem IRE1 yolu (Wang et al., 1998) hem de ATF6 yolu (Yoshida et al., 2000) ile uyarılır. İlave olarak, CHOP ayrıca PERK yolağında transkripsiyon faktörü ATF4'ün translasyonel indüksiyonu ile de uyarılır (Harding et al., 2000). ATF4 birçok hücre tipinde yüksek düzeyde eksprese edilir fakat ER stresi ya da amino asit azalması sırasında eIF2 $\alpha$  fosforile olmadan etkili bir şekilde translasyonu gerçekleşemez. CHOP ayrıca posttranslasyonel düzeyde de regüle edilir. CHOP'un Ser78 ve Ser81. pozisyonlarda p38 MAP kinaz tarafından fosforilasyonu, transkripsiyonel aktivitesini artırır (Wang et al.,

1996). CHOP, ER stresi ile genlerin uyarılmasına aracılık edebilir. Stresle uyarılan karbonik anhidraz VI'nın hücre proton konsantrasyonunu artırarak ve hücre içi pH'ı düşürerek apoptozisi desteklediği ifade edilmektedir (Sok et al., 1996). Bunun nedeni proapoptotik regülatör Bax'ın düşük pH'da yüksek aktivite göstermesidir (Antonsson et al., 1997). CHOP'un Bcl-2 proteini baskıladığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırdığı bildirilmiştir (Nakagawa et al., 2000).

**c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaz (JNK) yolağı:** ER stresinde ikinci apoptotik yol cJUN NH<sub>2</sub>-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu yoludur. JNK'lar gen ekspresyonunu düzenleyen ve stres durumunda apoptozis ile hayatta kalma arasında verilecek karara katılan sinyal ileti proteinlerinin bir ailesidir. ER stresi JNK'ları IRE1 $\alpha$  ve IRE1 $\beta$  üzerinden aktive eder. JNK aktivasyonunun ve p38 yolunun devamlılığı apoptozis sinyal düzenleyici kinaz (ASK1)'in aktivasyonunu gerektirir ki; bu, hücreyi apoptoza götürür (Tobiume et al., 2001).

**Kaspaz-12 aktifleşmesiyle:** Üçüncü yol ise kaspaz 12'nin aktivasyonudur. Kaspaz 12, ER membranının sitosolik tarafında lokalize olmuştur ve ER stresi ile aktive edilir. Ölüm reseptörleri ya da mitokondri aracılı apoptotik sinyallerle aktive olduğu belirgin değildir. Kaspaz 12 noksan fareler ER stres aracılı apoptozise direnç göstermektedirler. Kaspaz 12'nin m-kalpain (Nakagawa et al., 2000), IRE1 $\alpha$ /TRAF2 (Yoneda et al., 2001) ve kaspaz 7 (Rao et al., 2001) tarafından aktive edildiği rapor edilmiştir. m-kalpain sitosolik Ca tarafından aktive edilen nötral sistein endopeptidazdır. Aktive m-kalpain sırasıyla prokaspaz 12 ve Bcl-xL'nin yakalanmasından, kaspaz 12'nin aktivasyonu ve Bcl-xL'nin inaktivasyonundan sorumludur (Rao et al., 2001). Sitosolik Ca artışı kaspaz 12'yi m-kalpain vasıtasıyla aktive edebilmesine

rağmen, kaspaz 12'nin neden sadece ER stresi ile aktive olduğu bilinmemektedir. ER stresi sırasında, sitosolik kaspaz 7'nin ER'ye transfer edildiği rapor edilmiştir (Mauricio et al., 1998). Kaspaz-7 kaspaz12 ile etkileşime girer ve onun öncül domainine bağlanarak onu aktif hale getirir. Bununla birlikte, kaspaz-7'nin ER'ye transferi sadece ER stresi ile değil aynı zamanda Fas tarafından da uyarılır (Chandler et al., 1998). Buradan hareketle, kaspaz-7'nin, ER stresine cevapta sinyalleri iletecek diğer adaptör moleküllere ihtiyacı olduğu söylenebilir.



Şekil 1.5 ER Stres Sinyal Yolakları (RAJAN et al., 2007).

ER stres ileti proteinlerinden IRE1 $\alpha$  ve PERK'in adacık  $\beta$  hücrelerinde yüksek oranda sentezlendiği gösterilmiştir. Bu da  $\beta$  hücrelerinde proteinlerin doğru katlanmalarının sıkı bir kontrol altında olduğunun göstergesidir. Hatalı protein katlanmaları sonucunda beta hücrelerinin ER stresine cevap yollarını kullandığı ve bazı koşullarda da hücrenin apoptoza gittiği ve bunun sonucu

beta hücre kayıpları ile diyabetin ortaya çıktığını gösteren çok sayıda çalışma vardır.

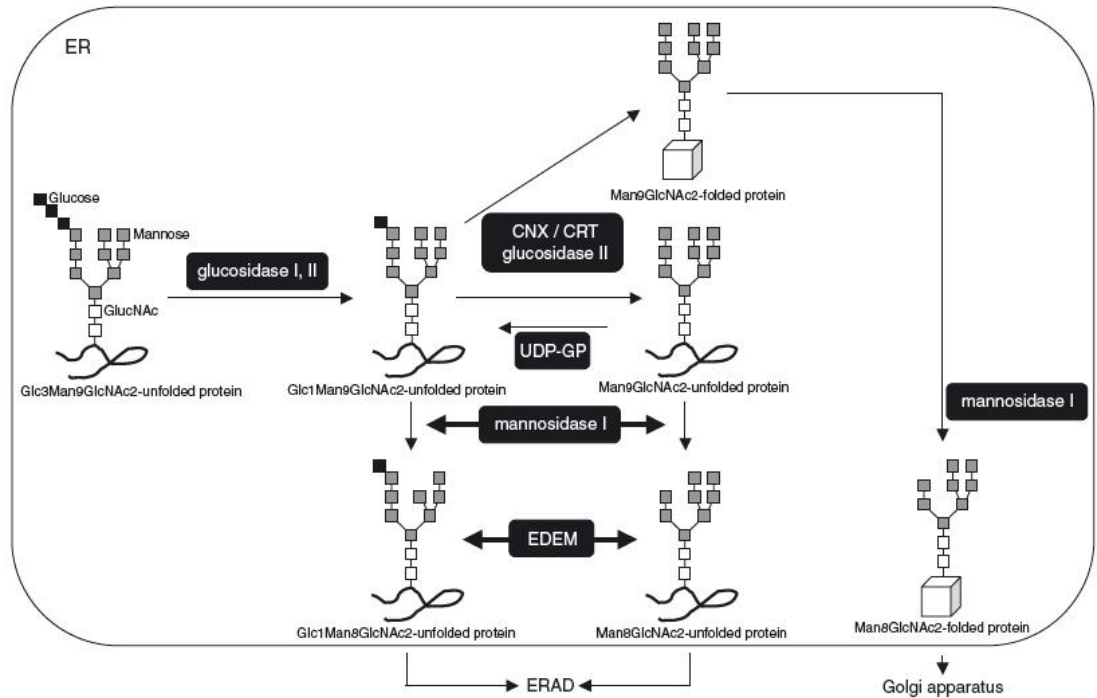
#### **1.4.2. Endoplasmik Retikulum (ER) Şaperon Proteinleri**

BiP (Binding Protein)/Glucose Regulated Protein (GRP) 78 in ER şaperonu olduğu bilinmektedir ve Isı-Şok Protein (Heat Shock Protein) HSP 70 ailesine mensuptur. BiP katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgelerindeki bağları, kendi substrat bağlanma bölgesi yolunu kullanarak ATP'nin hidrolizi ile konformasyonel değişiklikleri uyarır (Yoshida, 2007).

Oksijen regüle edici protein (ORP)150/GPR 170 bir ER şaperonudur ve HSP 110 ailesi (HSP70 in bir alt ailesi) mensubudur. Proteinlerin katlanmasını BiP'e benzer bir mekanizma yolu ile kolaylaştırır. Hipoksiye cevapta görev almaktadır. ER dnaJ (ERdj), ERdj3/human ER asociated dnaJ (HEDJ), ERdj4, ERdj5, SEC63, ve p58IPK HSP40 ailesine mensup ER şaperonlarıdır. BiP'in ATPaz aktivitesinin regulasyonundan sorumlu şaperonlardır. BiP ilişkili Protein (BAP) nükleotid değişimini artırarak BiP'in görevlerini ayarlar. GRP94; HSP90 ailesine ait bir ER şaperonudur ve ATP'nin hidrolizi ile protein katlanmalarına yardımcı olmaktadır. FKB13; FKB ailesine ait bir peptidil-prolil izomerazdır. Sekretuar proteinlerin genel katlanma prosesinde görevlidir (Yoshida, 2007).

Kalneksin ve kalretikülin glikoprotein katlanmalarına yol açan spesifik ER şaperon proteinleridir. İki glikoz artığı ne zaman glikozidaz I ve II tarafından koparılır ve sadece bir glukoz rezidüsü kalırsa kalneksin ve kalretikülin alıcı proteini katlar. Son glukoz artığı glikozidaz II tarafından

kırıldığı zaman, kalneksin ve kalretikülin alıcı proteini bırakır ve UDP glukoz-glikoprotein-glikoziltransferaz'a bağlanır. Eğer protein sorunsuz bir şekilde katlanırsa protein enzimden bırakılır ve golgi aparatına taşınır. Eğer protein katlanmazsa UDP glukoz-glikoprotein glikoziltransferaz bir glukoz artığını bağlar ve kalneksin ve kalretiküline geri döner. Bu katlanma sürecinin adı kalneksin siklusudur. Kalneksin ve kalretikülin sırasıyla transmembran ve luminal proteinler olmalarına karşın benzer moleküler yapı ve formları paylaşırlar (Deprez et al., 2005).



Şekil 1. 6 Glikoprotein Katlanması ve Katlanmayan Glikoproteinlerin Degradasyonu (YOSHIDA, 2007).

### 1.4.3. Tip 2 Diyabet ve ER Stres Aracılı $\beta$ -hücre Apoptozisi

Diyabet hastalığının en yaygın formu tip 2 diyabettir ve genelde erişkinlerde obezite ile ilişkili olarak ortaya çıkar. Hastalık insülin sekresyonunda ( $\beta$ -hücre fonksiyon yetersizliği) ve insüline duyarlılıkta azalma

(insülin direnci) durumlarının kombinasyonu ile karakterizedir. Normal beta hücre fonksiyonuna sahip bireyler, obezite gibi koşullarda insülin sentezini artırarak insülin direncine adapte olabilirler. İnsülin direncini kırmak amacıyla artan ihtiyaca cevap vermek üzere sürekli insülin sentezi beta hücrelerinde ilerleyen bir yetmezliğe ve sonunda hiperglisemiye neden olur. Obez insanların yaklaşık %10-15'inde diyabet gelişmektedir (DeFronzo ve Ferrannini, 1991). Bu yüzden, tip 2 diyabetin patogenezinde beta hücre fonksiyon bozukluğu kilit faktördür. İnsülin sekresyonundaki yetersizliğe ilave olarak, beta hücre kütleindeki azalma da fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. Aslında çok sayıda çalışma, tip 2 diyabetik hastalarda muhtemelen  $\beta$ -hücrelerinin apoptotik ölümünden kaynaklı  $\beta$ -hücre kütleinde azalma olduğunu göstermektedir (Stefan et al., 1982).

İnsülinin aşırı sekresyonu, diyabet öncesi evrede ya da tip 2 diyabetin erken diyabetik fazında sıklıkla görülür. İnsülin direnci ve uzun süreli sülfonilüre tedavisi sonucu insülin sekresyonuna duyulan ihtiyacın artması  $\beta$ -hücrelerinde aşırı yüklenmeye ve sonuçta insülin sekresyonunda azalmaya neden olabilir. Sülfonilüre grubu ilaçlar oral hipoglisemik ajanlardır ve  $\beta$ -hücrelerini insülin sekresyonu yapmak üzere uyarırlar. Bu koşullar altında gelişen  $\beta$ -hücre fonksiyon bozukluğu “pankreatik  $\beta$ -hücre yoğunluğu” olarak ifade edilir. İlişkili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. ER stresine duyarlılık hücreden hücreye farklılık gösterir.  $\beta$ -hücreleri belkide ER stresine en duyarlı hücrelerdir. ER stresini ileten (düzenleyen) proteinler olan Ire1 $\alpha$  ve PERK pankreatik  $\beta$ -hücrelerinde yüksek oranda sentezlenirler. Bu muhtemelen  $\beta$ -hücrelerinin yüksek düzeyde protein sentezi ile donatılmış olması ile ilişkilidir. ER stres iletici bu proteinlerin yüksek düzeyde sentez edilmeleri,  $\beta$ -hücrelerinde sentezlenen proteinlerin sıkı bir şekilde kalite kontrollerinin yapılabilmesi için gerekli olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, ER'daki protein trafiğindeki aksaklık hücrenin ölümüne neden olabilir.  $\beta$ -



hücreleri ER stres aracılı apoptozise yüksek derecede duyarlıdırlar. Spontan olarak hiperglisemi tablosu gösteren mutant Akita farelerinde insülitis ya da obezite olmadan  $\beta$ -hücre kütlelerinde azalma gelişir (Yoshioka et al., 1997). Devamlı olarak gerçekleşen hiperglisemi tablosuna CHOP'un uyarılması ve  $\beta$ -hücre apoptozisinin eşlik ettiği rapor edilmiştir (Oyadomari et al., 2002). Sürekli hiperglisemi gösteren Akita farelerinde diyabet gelişmesi durumunda, ER şaperon Bip ve ER stres ilişkili apoptozis faktörü CHOP'un mRNA sentezleri pankreasda uyarılır. Mutant insülinin aşırı eksprese edildiği fare MIN6  $\beta$ -hücrelerinde CHOP ekspresyonu uyarılır ve apoptozis gelişir. Bununla birlikte CHOP geni susturulmuş olan homozigot Akita farelerinde, diyabetin oluşumu engellenememektedir. Bu nedenle, CHOP'un dışında JNK ve kaspaz-12 gibi diğer yolların da apoptoziste etkili olabileceği söylenebilir.

Son yapılan çalışmalar, PERK'den yoksun fareler ve eIF2- $\alpha$  fosforilasyon bölgesinde mutasyon oluşturulan farelerde,  $\beta$ -hücrelerinin ER stresine daha duyarlı olduklarını göstermiştir (Harding et al., 2001). PERK noksan fareler yaşamlarının 4. haftasında belirgin bir hiperglisemi gösterirler ve doğum sonrası dönemde  $\beta$ -hücrelerinde artan bir apoptozis oranına sahiptirler. Bu farelerin pankreas langerhans adacıklarının elektron mikroskop görüntülerine bakıldığında beta hücrelerinin endoplazmik retikulumlarının genişlediği, sekretör granüllerin büyüklüğünde ve sayısında azalma olduğu görülmüştür. Benzer değişiklikler Akita farelerin adacıklarında da görülmüştür (Wang et al., 1999). PERK yolağı, fizyolojik koşullarda yeni protein sentezinin ER katlama kapasitesini aşmaması yönünde bir sigorta ya da garantör görevi görür.  $\beta$ -hücreleri translasyonel zayıflatmanın yokluğuna oldukça duyarlı hücrelerdir ki bunun devamında apoptozisle sonuçlanan bir ER stresine maruz kalırlar. Oysaki diğer hücreler bu koşullara kolaylıkla adapte olabilme yeteneğine sahiptirler. Bu nedendir ki; PERK yolağı  $\beta$ -hücrelerinde protein sentezinin fizyolojik yükünde esansiyel bir yoldur.

Tüm bu bilgilerden hareketle,  $\beta$ -hücrelerinde ER diyabetin gelişimini modifiye edebilme potansiyeli taşımaktadır. Protein sentezine duyulan ihtiyaç ile ER'un protein katlama kapasitesi arasındaki dengesizlik ER stresini tetikleyebilir. Tip2 diyabette, ER'da düşük düzeyde ve uzun süreli olarak devam eden protein yanlış katlanmalarının  $\beta$ -hücre kayıplarına neden olabileceği söylenebilir.  $\beta$ -hücrelerine aşırı yüklenilmesi kronik ER stresine neden olabilir.  $\beta$ -hücrelerinde ER stresi aracılı apoptozis üzerine yapılacak çalışmalar diyabetin patogenezinde yeni mekanizmaların aydınlatılmasına ve tedavi hedeflerinin iyi belirlenmesine ışık tutacaktır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1.Hücre Kültürü

Hücrelerin homojen populasyonlarından oluşması nedeniyle hücre kültürleri günümüz fen ve sağlık bilimleri araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Pankreas beta hücreleri ile ilgili in vitro çalışmalarda değişik mutant hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında MIN6 (fare), INS-1 (rat), HIT-T15 (hamster), BRIN-BD11 (rat) gibi beta hücre hatları sayılabilir. Bu çalışmada rat INS-1 beta hücre kültürü kullanılmıştır. Bu hücreler klonal insülin üreten insülinoma hücreleridir ve yüksek glukoza hassastırlar. Hücre kültürü flasklarında süspansiyon ortamında hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması basamakları aşağıda verilmiştir.

#### 2.1.1.Hücre Pasajı

Hücreler %10 (v/v) oranında ısı ile inaktif edilmiş fötal buzağı serumu (FCS) ve 5 mM glutamin, 100 µ/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 1 mM sodyum piruvat, 50 mikroM 2-merkaptoetanol ve 10 mM HEPES içeren RPMI 1640 besi yerinde 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edildi. Hücreleri çoğaltmak amacıyla yaklaşık cm karede 4x10<sup>4</sup> hücre yoğunluğu olacak şekilde 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 3x10<sup>6</sup> hücre 20 ml besiyeri içeren kültür kabına (150-mm flask) konarak 4-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Süspansiyon steril kapaklı tüplere aktarılarak 400xg ve 25°C'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre tortusu elde edildi. Pelet üzerine tüp hacminin

yaklaşık 1/3'ü kadar taze besiyeri sıvısı konarak pipet ile karıştırıldı ve buradan alındı 20µl hücre süspansiyonu ile 90 µl tampon (1xPBS + %1 FCS) ve 100 µl tripan mavisi ependorf içinde karıştırıldı. Mikroskopik incelemede karışımda beyaz renkte canlı hücreler ile mavi renkte ölü hücrelerin mililitredeki sayısı hemositometre üzerinde belirlendi.

### **2.1.2. Hücre Kültüründe ER Stres Modelinin Oluşturulması**

Flasklar içerisinde çoğaltılan hücreler 1-2 dakika süreyle tripsin (1ml %0.25) ile muamele edilerek hücrelerin flask tabanından serbest kalması sağlandı. Serbest bırakılan hücre toplulukları pipet ile toplanarak kapaklı tüp içinde yukarıda belirtildiği gibi santrifüj sonrası RPMI ile yıkandıktan sonra hücre sayımı yapılarak ER stresi oluşturmak için  $8 \times 10^5$ /ml hücre olacak şekilde flasklara dağıtıldı. Komple medyumda ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamda bir gece inkübasyonun ardından PBS ile bir kez yıkanmasının ardından çalışma için kullanıldı.

Hücreler ER stresi oluşturmak için  $10^{-8}$  mol/l thapsigargin (DMSO içinde) ile 18 saat süreyle muamele edildi.

## 2.2. İnsülin Sekresyon Ölçümü

Hücreler glukoz içermeyen Krebs-Ringer bikarbonat HEPES (KRBH) tamponu (135 mM NaCl, 3,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> ve 10 mMHEPES, ph7,4 BSA (0,1%) 2 kez yıkandıktan sonra 37 °C de 30 dk süreyle aynı mediumda inkübe edilir. Bu işlem bir kere daha tekrarlanır. İnkübasyon pleytin buz üzerine konması ile durdurulur. Süpernatant sekrete edilen insülin düzeyinin ölçümü için toplanır. Hücreler asit-etanol ile hücrel insülin ölçümü öncesinde ekstrakte edilir. Sekrete edilen insülin ve hücrel insülin ölçümleri spesifik ELISA kiti (Millipore, Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat. EZRMI-13K) kullanılarak fotometrik yöntemle yapıldı.

## 2.3. Protein Ölçümleri

İnkübasyonlar sonrası hücreleri yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1ml %0.25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif çırpma hareketleri ile hücreler serbest bıraktı. Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C, 400 xg devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet elde edilecektir. Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifiüj) üzerine hücre lizis tamponu konacaktır. Lizis tampon şu karışımdan oluşturuldu: %1 Triton X-100 (v/v), 50mM HEPES buffer pH 7.2, 10mM EDTA, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, %8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (aprotinin, PMSF, leupeptin, NaF). Deterjanda çözünmeyen proteinler 12 000 xg, 4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj ile uzaklaştırılarak supernatant elde edildi. Supernatanların içerdiği protein

düzeyleri standart olarak sığır serum albumini kullanarak Bradford metodu ile yapıldı.

Çalışmalarda gruplarda aynı pasajdan elde edilen hücreler kullanıldı, araştırmanın her aşamasında sterilizasyona azami özen gösterilmiştir. Her deney 3 tekrardan oluşacak ve elde edilecek ortalama değerler SPSS istatistik programında One-Way ANOVA kullanılarak değerlendirildi.

#### **2.4. RNA İzolasyonu ve Real Time QRT-PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri**

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi yapılacak transkripsiyon analizlerinde kullanılacak total RNA hazır ticari kit kullanarak hazırlandı. Kontroller ve her bir gruptan inkübasyon sonu alınacak  $1 \times 10^7$  sayıda hücre üzerine 1ml RNA izolasyon kiti konulacak ve kılavuzunda belirtildiği gibi yaklaşık 2 saatlik süre sonunda total RNA hazırlanarak miktarı ve saflığı spektrofotometrede (OD 260nm ve 280nm'de) belirlendi. RNA/DNA oranı 1.7 ve üzeri olanlar çalışmada kullanıldı. Ayrıca her bir izolattan 2.5µg alınarak %1'lik agarozda yürütülerek total RNA'nın varlığı UV lamba altında gözlemlendi.

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA'dan 1µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Daha sonra her bir örneğe ait cDNA'den 1µl alınarak üzerine SYBR green master mix ve bir çift primer (oligonükleotid) eklendi.

Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup literatürde daha önce belirtilen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak elde edilecek ve reaksiyonda yaklaşık 100ng düzeyinde kullanıldı. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{beta\ actin})_{denek\ grubu} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{beta\ actin})_{kontrol\ grubu}$$

formülü uygulanarak; hesaplanan değer her bir gen için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanılacak ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. PCR çalışmalarında her gruptan 5 örnek rastgele seçilecek ve bunların 3 tekrarı yapılarak ortalamaları alındı.

Real Time PCR sisteminde sybr green boyası çift iplikçikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışığa yapar ve bu ışığa sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak, bilgisayar ortamında grafik formatına çevrildi. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır.

PCR çalışmaları ile ekspresyon düzeyi belirlenmiş olan genler:

- Beta hücre proliferasyonundan sorumlu olan FoxO1, PDX-1,  $\beta$ -katenin, Wnt ve TCF7L2;
- Ölüm habercileri olan NF $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ; apoptosisle ilgili

olan kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 12, JNK, Bcl-2 ve Bcl-xL;

- ER stresi markerları GRP-78, CHOP, ATF-4, ATF-6 ve PERK

Gen	Primer Dizisi	PCR Programı	Döngü
p53	F-5'CGGAGGTCGTGAGACGCTG'3 R-5'CACATGTA CT TGTAGTGGATGGTGG'3	94°-1 dk/59°-1dk/72°-1dk	40
Kaspaz-3	F-5'GAGCACTGGAATGTCATCTCGCTCTG'3 R-5'TACAGGAAGTCAGCCTCCACCGGTATC'3	94°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	40
Kaspaz-12	F-5'TCCGACAGCACATTCCTGGTC'3 R-5'CCCTTTGCTTGTGGATAACCA'3	94°-1 dk/57°-1 dk/72°-1 dk	35
Kaspaz-8	F-5'TGAAGGAGCTGCTTTTCCAT'3 R-5'ATCAAGCAGGCTCGAGTTGT'3	95°-1 dk/60°-1 dk/72°-30s	45
TNF-α	F-5'AGCCAGGCAGGTTCCGTCCTC'3 R-5'TTACTGTGCCACCAGCCGAC'3	94-1 dk/65-1 dk/72-1 dk	35
Bcl-2	F-5'CAGCTGCACCTGACGCCCTT'3 R-5'CCCAGCCTCCGTTATTCTGGA'3	94°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	40
IL-1 β	F-5'GCTATGGCAACTGTCCCTGAA'3 R-5'ATCCCACGAGTCACAGAGGACG'3	94°-1 dk/57°-1 dk/72°-1 dk	35
IL-6	F-5'ATGAAGTTTCTCTCTGCAAGAGAC'3 R-5'CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC'3	95°-30s/55°-1 dk/72°-1 dk	50
Fox01	F-5'GTGAACACCATGCCTCACAC'3 R-5'CACAGTCCAAGCGCTCAATA'3	95°-15 s/60°-1 dk/72°-1 dk	40
CHOP	F-5'CACTACTCTTGACCCTGCATCC'3 R-5'CTTCATGCGCTGTTTCCAGC'3	94°-1 dk/57°-1 dk/72°-1 dk	35
GRP78	F-5'CTGGGTACATTTGATCTGACTGG'3 R-5'GCATCCTGGTGGCTTTCAGCCATTC'3	95°-30 s/58°-30 s/72°-45 s	30
ATF4	F-5'TCTGTATGAGCCCTGAGTCCCTACCT'3 R5'GGTCATAAAGTTTGGGTCGAGAACCAC'3	94°-1 dk/59°-1 dk/72°-1 dk	40
ATF6	F-5'GGATTTGATGCCTTGGGAGTCAGAC'3 R-5'ATTTTTTCTTTGGAGTCAGTCCAT'3	94°-1 dk/59°-1 dk/72°-1 dk	40
NFκB	F-5'TCCCCAAGCCAGCACCCCAGC'3 R-5'GGCCCCAAGTCTTCATCAGC'3	94°-20 s/70°-40 s/72°-3 dk	35
PERK	F-5'AGGAGTCTGAAACTCAGTGCCA'3 R-5'GCTCCCTGTTTGGGAGACGGA'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	35
PDX-1	F-5'GGCTTAACCTAAACGCCACA'3 R-5'GGGACCGCTCAAGTTTGTAA'3	94°-1dk/59°-1 dk/72°-1 dk	30
Bcl-xL	F-5'GAACTCTTTCGGGATGGGGTA'3 R-5'CAGAACTACACCAGCCACAGTC'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	35



Wnt-4	F-5'GCCACGCACTAAAGGAGAAG'3 R-5'GGCCTTAGACGTCTTGTTC'3	94°-1 dk/61°-1 dk/72°-1 dk	40
TCF7L2	F-5'GCCTCTCATCACGTACAGCA'3 R-5'GGATGGGGGATTTGTCCTAC'3	95°-30 sn/58°-1 dk/72°-1 dk	35
IFN- $\gamma$	F-5'ATCTGGAGGAACTGGCAAAAGGACG'3 R-5'CCTTAGGCTAGATTCTGGTGACAGC'3	93°-1 dk/55°-1 dk/72°-1 dk	40
JNK-1	F-5'TCAGACCCATGCTAAGCGAGC'3 R-5'AGGTGCTTGATTCCACACAGCA'3	95°-30 s/59°-1 dk/72°-1 dk	40
$\beta$ -Katenin	F-5'GCTAAAATGGCAGTGCCTA'3 R-5'GTGGTCCACAGGAGCTTCTCG'3	95°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	35
$\beta$ -Aktin	F-5'CATCGTCACCAACTGGGACGAC'3 R-5'CGTGGCCATCTCTTGCTCGAAG'3	93°-15 s/55°-30 s/68°-1 dk	30
Bax	F-5'AGAAGCTGAGCGAGTGTCTCC'3 R-5'GCCTTGAGCACCAGTTTGCTA'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	40
P35	F-5'AAAGGCCACACTGTTTGAGGA'3 R-5'CCTCTTCCAAGGCAGTACCGA'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	40

**Tablo 2.1** Oligonükleotid Primer Dizileri ve PCR Programları.

## 2.5. Apoptozis Belirleme Çalışmaları

Apoptoz, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlenir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri (bcl-2, bcl-xL, bax, bak, bad) apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir (Rossen et al., 1998; Delehedde et al., 1999; Tilli, 2002). Gelişim ve diferansiyasyon boyunca canlılığın düzenlenmesinde fonksiyon görürler. Normalde fütal ve adult dokuda eksprese edilen bcl-2, hücre proliferasyonuna neden olmadan hücrenin canlılığını sağlayan apoptoz inhibitörüdür (Ramdial, 2000). Overekspresyonu radyasyon, UV, p53, kemoterapötik ilaçlar gibi değişik stimuluslar tarafından başlatılan hücre ölümünü engeller ya da belirgin biçimde azaltır (Cho et al., 2001; Tilli et al., 2002). Bunu genel apoptoz yolunu kapatarak yapar. Bax protein (bcl-2-associated x protein) ise bcl-2 ile

yüksek derecede yapısal benzerlik göstermesine rağmen proapoptotik aktivite gösterir(Tilli et al., 2002). Bax overekspresyonu homodimerizasyon ile sonuçlanır ve bcl-2 protein ile heterodimer formu oluşturarak onu inaktive eder. Böylece bcl-2 fonksiyonu engellendiğinden apoptoz indüksiyonu başlar (Cho et al., 2001; Tilli et al., 2002). Normal epidermiste bcl-2 bazal hücre tabakasında ve matür kıl follikülünde eksprese edilirken, bax protein çoğunlukla suprabazal hücrelerde eksprese edilmektedir (Delehedde et al., 1999; Tilli et al., 2002).

Bu bağlamda apoptosis belirleme çalışmalarında ; hücre kültürü lizatlarından; proapoptotik olarak bax ve p53 gen ekspresyonu, antiapoptotik olarak ise Bcl-2 ve p35 gen ekspresyonu analizi yapılmıştır.

### **2.5.1. TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Assay**

Hücreler immunohistokimyasal boyamada olduğu gibi fibronektin kaplı lameller üzerine ekilecek ve %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dk tespit edildi. Tespitten sonra PBS ile yıkanacak ve permeabilizasyon için %0.1 triton X-100 ile hücreler 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Bundan sonraki aşama in situ cell Death detection kit POD (Roche)'in önerdiği protokole göre yapıldı. Boyama sonrası % olarak apoptotik indeks belirlendi.

### **2.6. COMET Assay Analizi**

Yukarıda belirtilen apoptozis belirleme yöntemlerini desteklemek adına DNA hasar tespitinde kullanılan Comet Assay'den faydalanılmıştır (Choucroun et al., 2001). Fas antijeni eksprese eden Jurkat hücreleri ile

yaptıkları çalışmada; Fas antikorları ile uyarılmış apoptozisin olabildiğince erken dönemde comet görüntüleri kullanılarak tespit edilebileceğini ve comet görüntülerinin apoptotik risk mevcut olduğu durumlarda genotoksisite indikatörü olarak kullanılmayacağını göstermişlerdir.

INS-1E (832/13) hücre kültürü izolatlarından medium hızla uzaklaştırıldıktan sonra soğuk PBS tamponu ile süspense edildi. Yine aynı tamponda hücreler 2100 rpm' de 10 dakika ve 0°C de santrüfuj edilerek iki kez yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra PBS tamponu ile PBS ile mm<sup>3</sup>'te 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde süspense edildi.

**a. Slaytların hazırlanması:** PBS içerisinde hazırlanan %1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) jel solüsyonundan 80-100 µl alınarak lam üzerine damlatıldıktan sonra lamın yüzeyine agarozun yayılması sağlandı. Agarozlu lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. PBS ile mm<sup>3</sup>'te 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde süspense edilmiş hücrelerden 10 ul alındı ve 80 ul %0.5'lik düşük kaynama dereceli agaroz (LMA) ile karıştırılarak (37 °C), hızlı bir şekilde, daha önce hazırlanmış lamın (birinci agaroz tabakalı) üzerine damlatılıp bir lamel kapatılarak yayıldı. Lamlar buz kasetleri veya buzlu yüzey üzerine konarak 5 dk süre ile bekletilip slaytın donması sağlandı ve lamel uzaklaştırılıp son olarak da 75 µl LMA (%0.5) agaroz solüsyonu 3. tabakayı oluşturacak şekilde 2. tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slaytın hazırlanması tamamlanmış oldu.

**b. Lizis:** Hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içerisinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla, slaytlar buz soğukluğunda tutulan lizis solüsyonu (2.5M NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10mM Trizma, , 10%

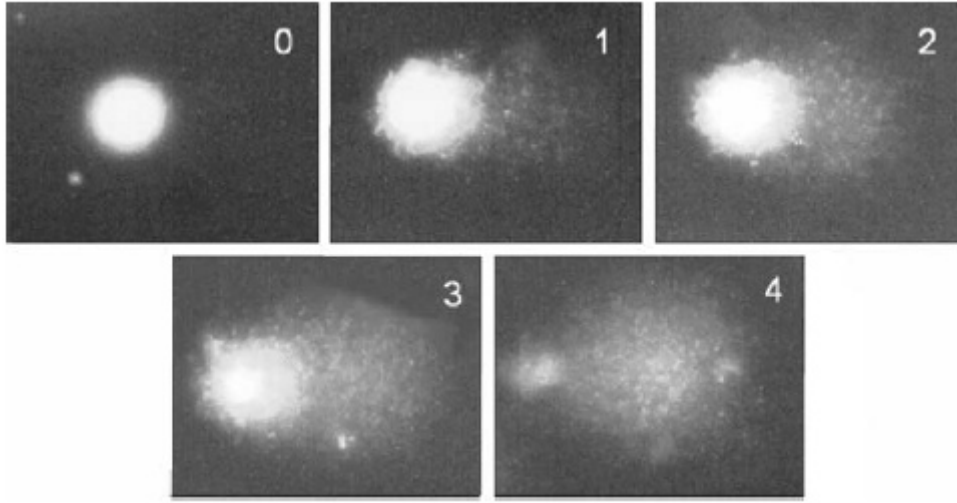
DMSO, and 1% Triton X-100, pH 10) içerisine konuldu ve 1 gece, karanlıkta, 4°C'de (buzdolabında) bekletildi.

**c. DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez:** Elektroforez işlemi öncesinde DNA zincirinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (300mM NaOH ve 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH.13) 20 dakika boyunca ve 2-5°C'de, karanlıkta bekletildi. Elektroforez işlemi aynı tampon içerisinde, 4°C'de buzdolabında 25 dakika boyunca, 25V (0.96 V/cm) ve yaklaşık olarak 300 mA akım koşullarında yapıldı.

**d. Nötralizasyon ve boyama işlemleri:** Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, alkali tampon çözeltisinin slaytlardan uzaklaştırılması için slaytların her biri 5 ml 0.4 M Tris HCl (pH 7.5) ile 3 dk yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Nötralizasyon tamamlandıktan sonra slaytlar 20 µg/ml'lik 50 µl ethidium bromide ile boyandı ve 4 saat içinde değerlendirme yapıldı.

**e. Değerlendirme:** Ethidium bromide ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile elde edilen DNA görüntüleri değerlendirildi. Değerlendirme işlemi görsel skorlama şeklinde yarı kantitatif olarak yapıldı. Kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görüntüsünün tespiti hasarsız hücrelerin varlığı anlamına gelmektedir. Bu görünüm non-migration (göç yok) olarak değerlendirildi. Eğer DNA hasarı oluşmuş ise fragmentlerin ya da zincir kırılmalarının miktarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak düzensiz kenarlı bir görünüm elde edilmektedir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olmaktadır. Bu görünüme stretch ya da low migration denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (Comet, high

migration) şeklini alır. Son aşama ise apoptozistir. Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri puanlandırıldı. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1'den 4'e kadar puanlandırıldı (Şekil 2.1.) ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirildi.



Şekil 2.1. Comet Assay'de Görsel Skorlama (COLLINS et al., 1995).

## 2.7. MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi

MTT hücre viabilite testi ile INS-1E hücrelerindeki ölüm oranını tespit ederek, apoptozun yukarıdaki yöntemlerle belirlenmesinin desteklenmesi amaçlanmıştır. Akalın ve Incesu (2005), CO25 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, MTT ve akridin oranje yöntemleri kullanılarak apoptotik oranı belirlemişlerdir.

$2 \times 10^4$  hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan, 100 µl 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarıldı ve aynı zamanda hücrelere 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02-0,1 mg/ml konsantrasyonlarında bileşenler eklenerek 37 °C'de inkübe edildi. 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edildi ve hücreler 37 °C' de 2 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmış ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dakika inkübe edilmişlerdir. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi (DENIZOT ve LANG, 1986).

## **2.8. İstatiksel Analizler**

Araştırmadan elde edilen sonuçlar SPSS 9.05 (1999) istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapıldı; istatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulanıp, veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. İnsülin Değerleri

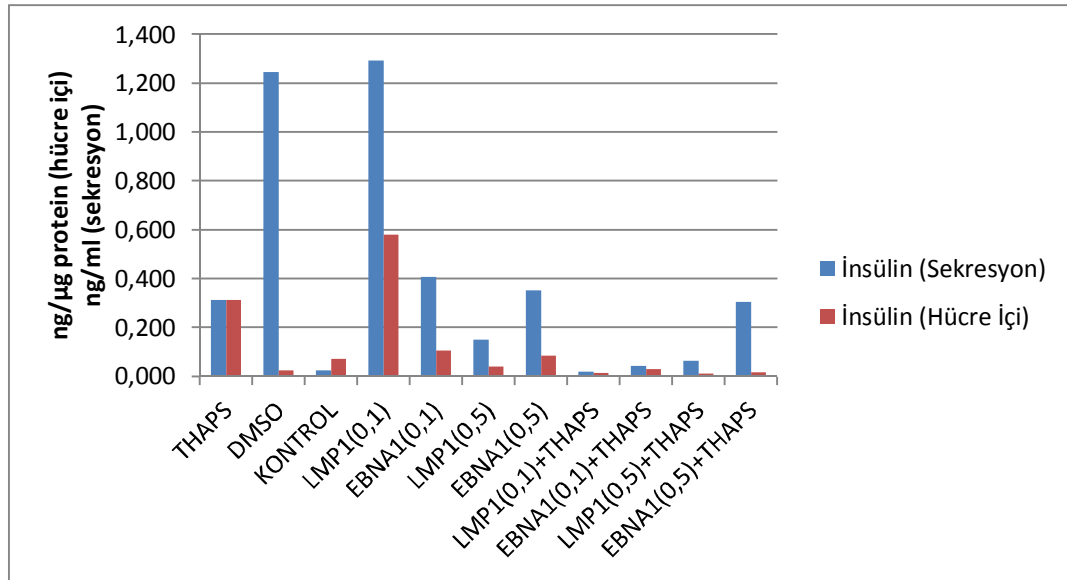
Thapsigargin grubunda (ER stres grubu) kontrol grubuna nazaran hem hücre içi insülin hem de sekrete insülin konsantrasyonlarında istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde artış tesbit edilmiştir. Thapsigargin ile ER stres modeli oluşturulmuş ve EBV rekombinant protein uygulanmış olan gruplarda ise thapsigargin grubuna göre hücre içi ve dışı insülin konsantrasyonlarında (insülin sentez ve salınımında) istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde LMP1(0,1) grubu hariç düşüşler tesbit edilmiştir.

GRUP	İNSÜLİN KONSANTRASYONU	
	Hücre içi İnsülin (ng/ $\mu$ g protein)	Sekrete İnsülin (ng/ml)
THAPS	0,314 $\pm$ 0,0787 <sup>c</sup>	0,313 $\pm$ 0,106 <sup>b</sup>
DMSO	0,027 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	1,245 $\pm$ 0,215 <sup>c</sup>
KONTROL	0,073 $\pm$ 0,017 <sup>a,b</sup>	0,026 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>
LMP1(0,1)	0,58 $\pm$ 0,164 <sup>d</sup>	1,293 $\pm$ 0,176 <sup>c</sup>
EBNA1(0,1)	0,108 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>	0,407 $\pm$ 0,072 <sup>b</sup>
LMP1(0,5)	0,042 $\pm$ 0,009 <sup>a,b</sup>	0,152 $\pm$ 0,046 <sup>a</sup>
EBNA1(0,5)	0,085 $\pm$ 0,016 <sup>a,b</sup>	0,353 $\pm$ 0,079 <sup>b</sup>

LMP1(0,1)+THAPS	0,016±0,003 <sup>a</sup>	0,021±0,004 <sup>a</sup>
EBNA1(0,1)+THAPS	0,031±0,007 <sup>a,b</sup>	0,043±0,008 <sup>a</sup>
LMP1(0,5)+THAPS	0,0138±0,003 <sup>a</sup>	0,064±0,014 <sup>a</sup>
EBNA1(0,5)+THAPS	0,0184±0,005 <sup>a</sup>	0,307±0,088 <sup>b</sup>

**Tablo 3.1.** Hücre İçi (Lizat) ve Sekrete (Medyum) İnsülin Konsantrasyonları.

EBV rekombinant proteinlerinden LMP1'in 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta; insülin sentez ve salınımında kontrol grubuna nazaran istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde artışlar tesbit edilmiştir. Yine EBNA1 rekombinant proteininin 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta ise sadece insülin salınımında (sekrete insülin) kontrol grubuna nazaran istatistiksel bir artış söz konusu olmuştur (Şekil 3.1.). Bu değişikliklerle alakalı tartışma bölümünde ayrıntılı yorumlar tutulmuştur.



**Şekil 3.1.** Hücre İçi/Dışı İnsülin Konsantrasyonları.

KONT: Kontrol grubu, DMSO: Dimetil sülfoksit grubu, THAPS: Thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu,



LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu.

## **3.2. Real Time QRT-PCR mRNA Ekspresyon Düzeyleri**

### **3.2.1. Beta Hücre Proliferasyonundan Sorumlu Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri**

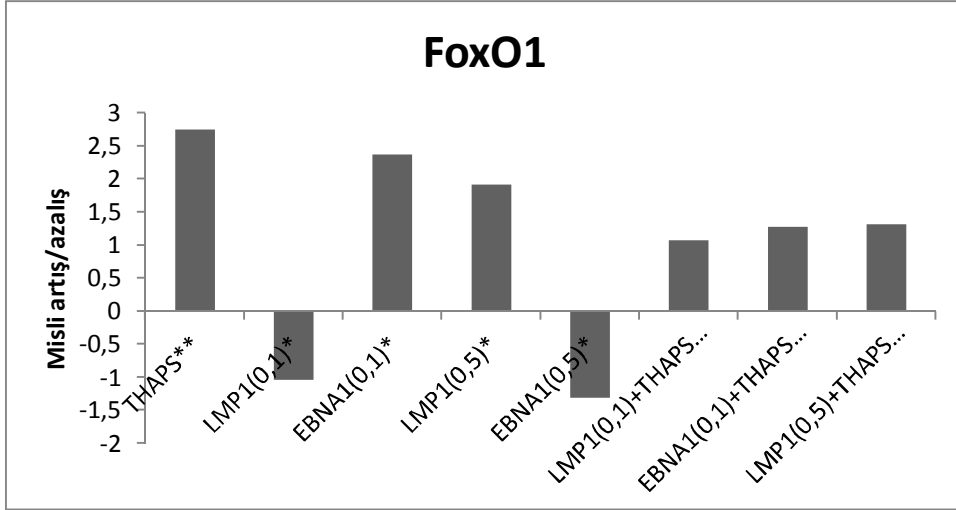
Beta hücre proliferasyonundan sorumlu oldukları literatür verilerince belirtilen (FoxO1, PDX-1, Wnt-4, TCF7L2 ve  $\beta$ -Katenin) genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri; thapsigargin grubunda kontrol grubuna göre FoxO1'i 2,75 misli, PDX-1'i 2,05 misli, Wnt-4'ü 2,23 misli, TCF7L2'yi 7,16 ve  $\beta$ -Katenin'i 15,24 kat artırmıştır. Epstein Barr Virus rekombinant proteinleri EBNA1 ve LMP1 proteinlerinden proliferasyonu en iyi uyaran dozun EBNA1'in 0,1 ppm lik dozu olduğu sonucu ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinden anlaşılmıştır (Tablo 3.2). Bu bakımdan EBNA1 0,1 ppm'lik dozda uygulanan deney grubunda kontrol grubuna göre; FoxO1, PDX1, Wnt4, TCF7L2 ve  $\beta$ -Katenin genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini sırasıyla 2,37 misli, 6,48 misli, 4,25 misli, 3,8 misli ve 1,4 misli artırmıştır. (Tablo 3.2, Şekil 3.2, 3.3, 3.5, 3.6, 3.4). Aynı şekilde EBNA1 proteininin 0,5 ppm'lik uygulandığı ve deneysel ER stres modeli geliştirilmiş olan grupta (EBNA1(0,5)+Thaps grubu) thapsigargin grubuna nazaran aynı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde  $\beta$ -Katenin hariç sırasıyla 1,31 misli, 2,26 misli, 1,4 misli ve 2,1 misli artışlar gösterilirken, aydınlatılmaya muhtaç olduğunu düşündürecek bir biçimde  $\beta$ -Katenin'i ise 4,59 misli baskılamıştır (Şekil 3.4, Tablo 3.2). Diğer taraftan LMP1 rekombinant proteininin

0,1ppm'lik ve 0,5 ppm'lik uygulamalarında hücre proliferasyonunu artırıcı kayda değer sonuçlara ulaşamamıştır.

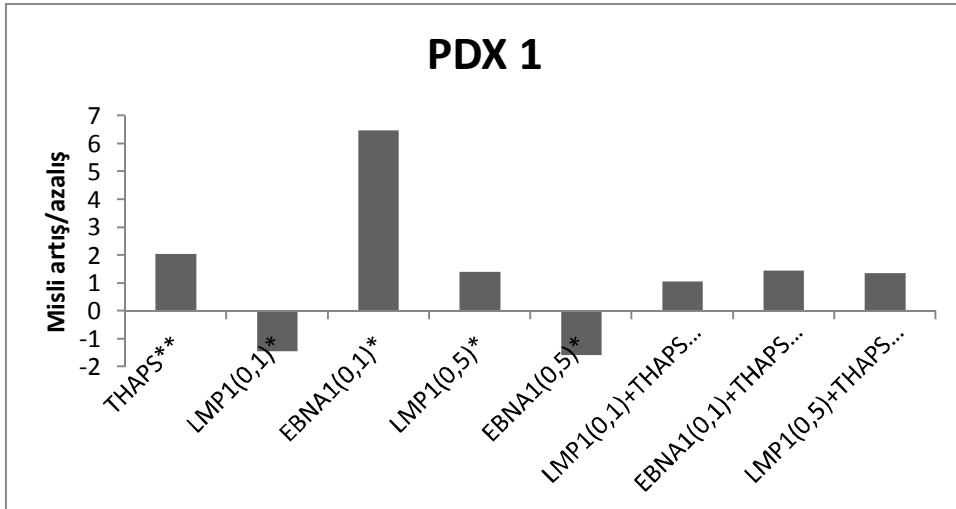
**Tablo 3.2.** Beta Hücre Proliferasyonu, Apoptozu ve ER Stresi ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri (misli değişiklik<sup>#</sup>).

	THAPS**	LMP1(0,1)*	EBNA1(0,1)*	LMP1(0,5)*	EBNA1(0,5)*	LMP1(0,1)+THAPS***	EBNA1(0,1)+THAPS***	LMP1(0,5)+THAPS***	EBNA1(0,5)+THAPS***
<b>GRP 78</b>	6,63	-7,75	-1,33	-5,75	-3,89	1,87	-4,33	-5,46	-3,59
<b>PDX 1</b>	2,05	-1,44	6,48	1,41	-1,58	1,05	1,45	1,35	2,26
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-1,14	-1,13	2,47	-1,01	1,12	-2,02	-3,44	-2,14	-1,19
<b>Wnt 4</b>	2,23	-1,54	4,25	1,43	-1,61	1,18	-1,06	1,1	1,4
<b>p 53</b>	5,61	1,13	9,41	1,51	-1,13	1,31	1	1,2	1,95
<b>ATF 6</b>	19	1,42	1,85	2,7	-1,13	1,64	1,92	1,52	1,66
<b>ATF 4</b>	10,62	-1,92	4,62	1,72	-1,21	1,91	2,17	1,38	2,57
<b>CAS 3</b>	3,91	1,00	12,78	2,18	-1,09	-1,05	-1,12	-1,09	-1,07
<b>Bcl-2</b>	1,28	-1,12	2,05	1,35	-1,38	-1,24	-1,56	-1,2	-1,2
<b>CAS 8</b>	-1,31	2,69	5,66	2,28	1,28	-16,67	-44,32	-63,26	-18
<b>FoxO1</b>	2,75	-1,04	2,37	1,92	-1,31	1,07	1,28	1,32	1,31
<b>CAS 12</b>	-1,01	1,12	1,31	-1,36	1,16	-1,14	1,05	-1,17	1,4
<b>CHOP</b>	8,05	-1,65	4,47	2,02	-1,03	1,61	2,28	2,02	2,79
<b>JNK</b>	4,02	1,37	4,5	1,58	-2	1,05	1,38	1,35	1,38
<b>NFkB</b>	3	10,8	154,34	1,13	-1,91	-97	-34,85	-83,67	-39,85
<b>TCF7L2</b>	7,16	1,06	3,8	1,66	-1,3	1,78	1,35	1,42	2,1
<b>PERK</b>	15,03	1,06	1,23	2,22	1,15	2,03	3,5	2,66	2,71
<b>BCL-xL</b>	1,25	10,5	24,02	2,45	-7,17	-23,2	-43,11	-54,56	-20,29
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	-2,01	-1,55	2,25	1,16	-1,21	1,55	2,32	1,72	4,19
<b>IL - 6</b>	2,63	-2,09	4,82	1,7	-1,1	2,4	2,28	-1,43	9,15
<b><math>\beta</math> Katenin</b>	15,24	-1,1	1,4	2,32	-1,23	-5,87	-4,19	-6,75	-4,59
<b>p35</b>	3,78	-1,13	7,39	1,52	-1,42	1,11	1,12	1,24	2,32
<b>Bax</b>	2,63	1,34	10,48	1,7	-1,12	-1,17	-1,42	-1,33	-1,09

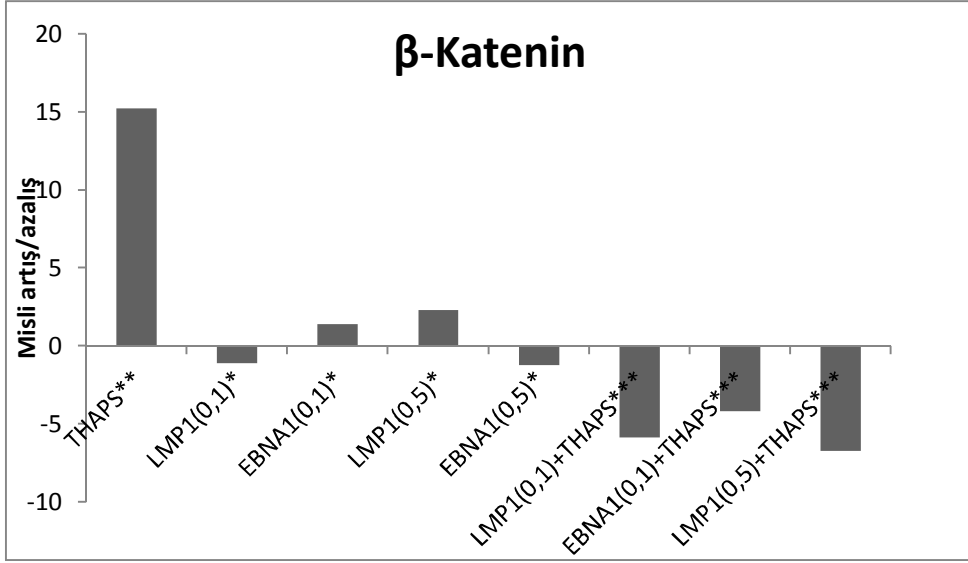
\*: Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre. KONT: Kontrol grubu, DMSO: Dimetil sülfoksit grubu, THAPS: Thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm'lik Latent Membrane Protein1 grubu, EBNA1(0,1): 0,1ppm'lik Epstein Barr Virus Nuclear Antigen1 grubu, LMP1(0,5): 0,5 ppm'lik Latent Membrane Protein1 grubu, EBNA1(0,5): 0,5 ppm'lik Epstein Barr Virus Nuclear Antigen1 grubu #: Misli değişiklikler uyarılma (+) ve baskılanma (-) olarak ifade edilmiştir.



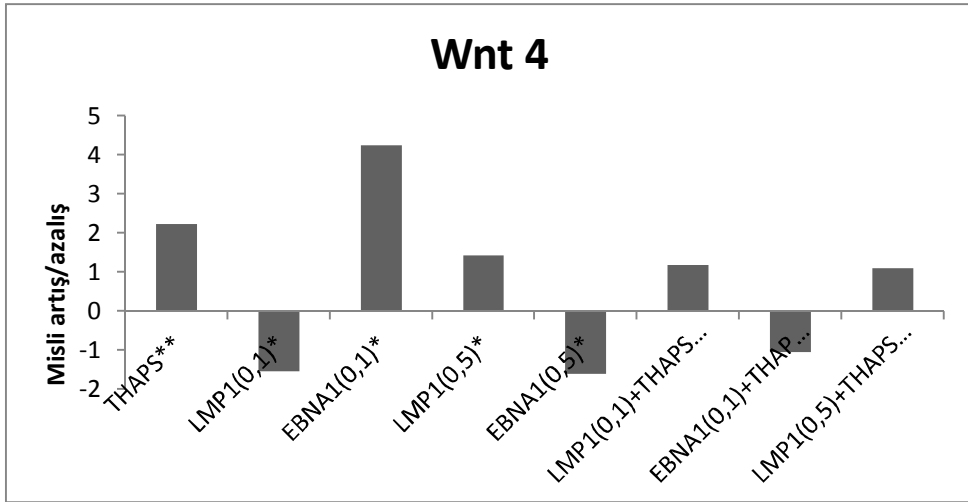
**Şekil 3.2.** FoxO1 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



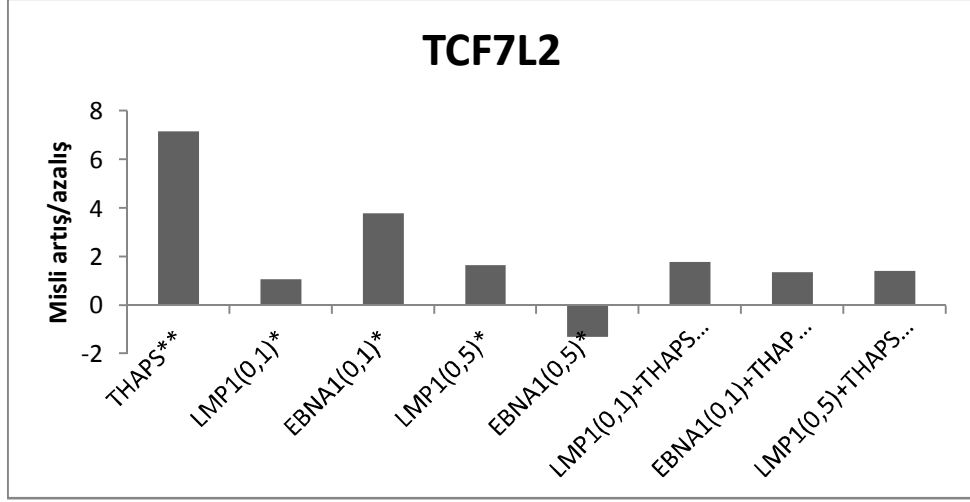
**Şekil 3.3.** PDX 1 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 3.4. B-kenin mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



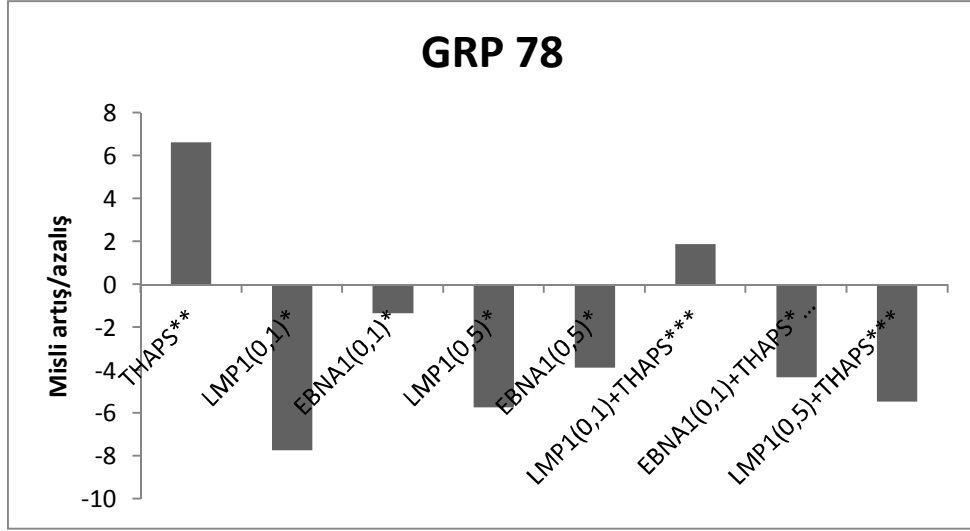
Şekil 3.5. Wnt-4 mRNA ekspresyon düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



**Şekil 3.6.** TCF7L2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

### 3.2.2. ER Stresi Belirteçleri Olan Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri

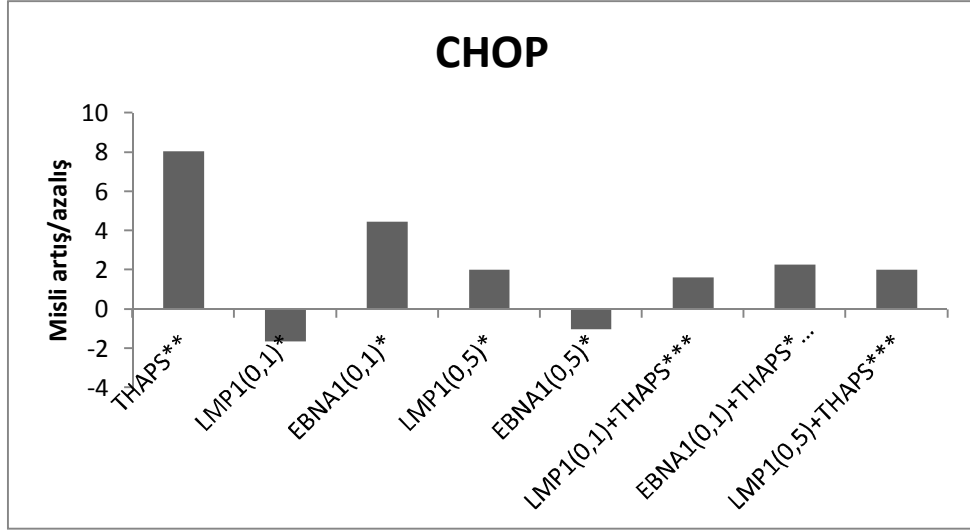
GRP78 geni ER stres göstergesi olarak kabul görmüş ER stres markerlarından biridir. Bu bakımdan thapsigargin grubunda GRP78 mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 6,63 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak GRP78 geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,87 misli, -4,33 misli, -5,46 misli ve -3,59 misli azalış olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2 Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** GRP78 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

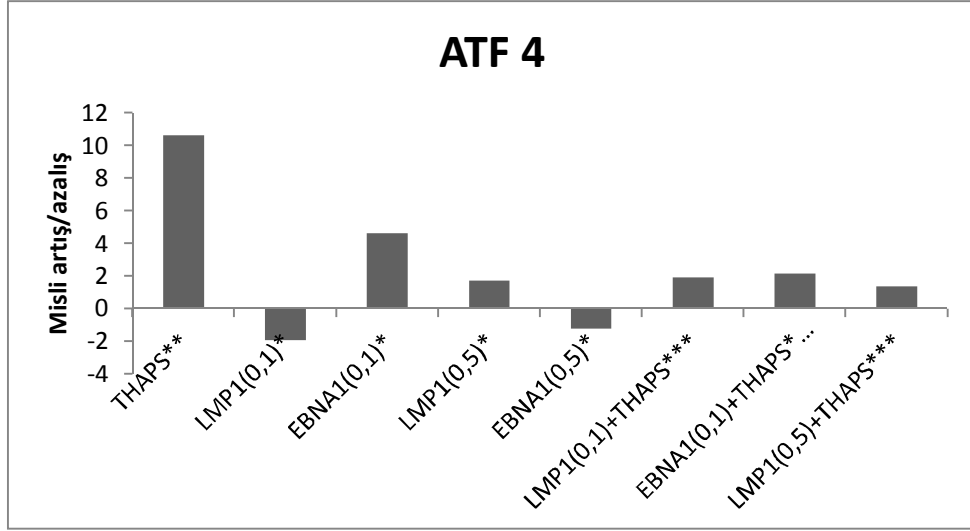
CHOP geni ER stres göstergesi olarak kabul gören bir diğer ER stres markerlarıdır. Bu bakımdan thapsigargin grubunda CHOP mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 8,05 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak CHOP geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,61 misli, 2,28 misli, 2,02 misli ve 2,79 misli azalış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 3.2 ve Şekil 3.8).





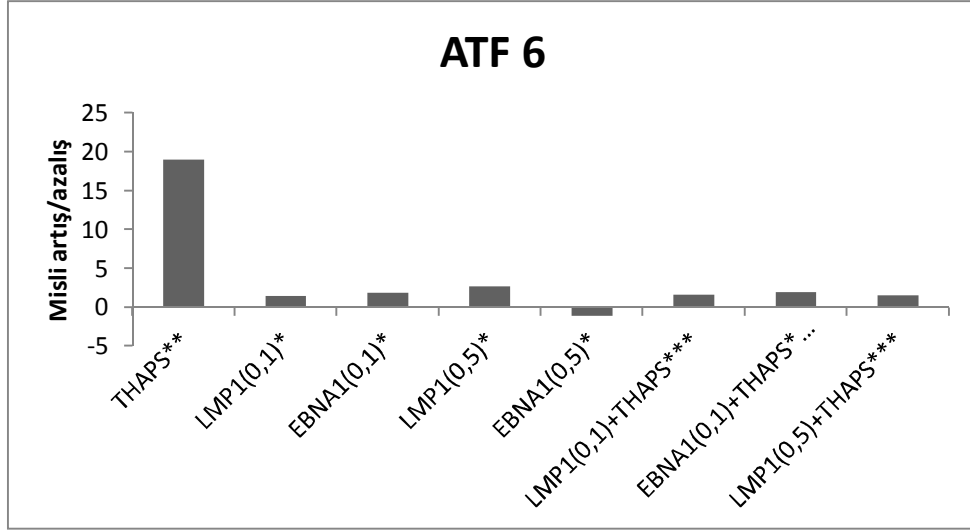
**Şekil 3.8.** CHOP mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

Bir başka ER stres belirteci ATF4 genidir. Bu bakımdan thapsigargin grubunda ATF4 mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 10,62 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak ATF4 geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,91 misli, 2,17 misli, 1,38 misli ve 2,57 misli artış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 3.2 ve Şekil 3.9).



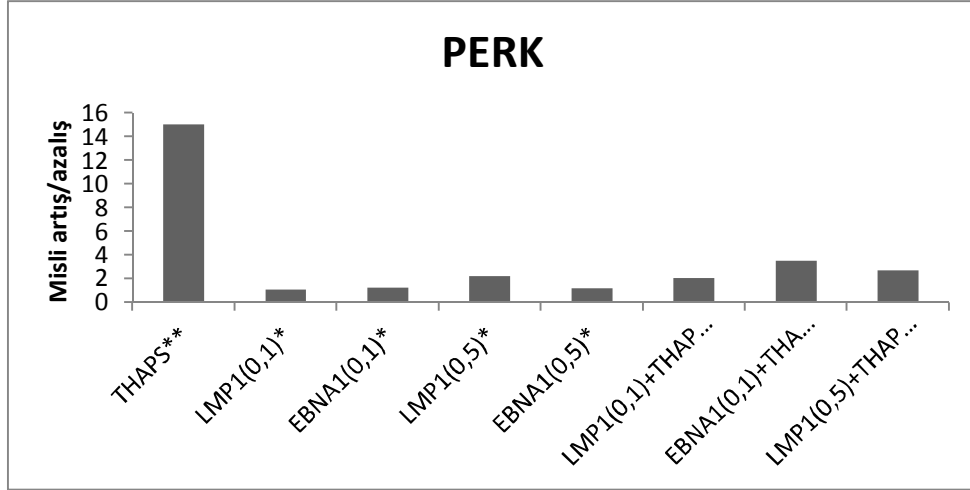
**Şekil 3.9.** ATF4 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

Bir diğer ER stres belirteci olarak ATF6 geni mRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde thapsigargin grubunda ATF4 mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 19 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak ATF6 geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,64 misli, 1,92 misli, 1,52 misli ve 1,66 misli artış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 3.2 ve Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** ATF-6 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

ER stres belirteci olarak son ele alınan gen PERK olmuştur. Thapsigargin grubunda PERK mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 15,03 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak PERK geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 2,03 misli, 3,5 misli, 2,66 misli ve 2,71 misli artış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 3.2 ve Şekil 3.11).



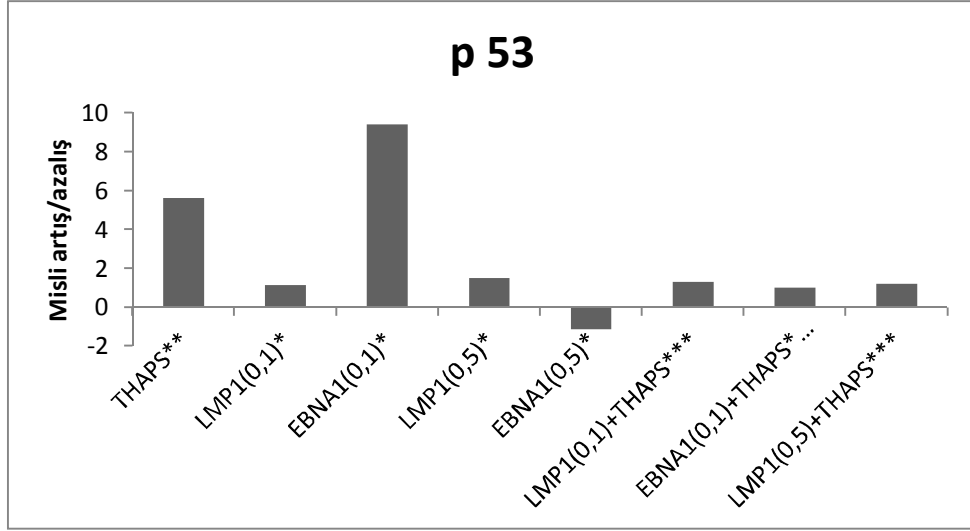
Şekil 3.11. PERK mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

### 3.2.3. Apoptozla İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Proapoptotik oldukları literatür özetinde ilgili literatürlerce belirtilen cas3, cas8, cas12, TNF- $\alpha$ , p53, JNK, IFN- $\gamma$  ve bax genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildiğinde ilgili genler LMP1(0,1) grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla; 1,00 misli (değişim yok), 2,69 misli, 1,12 misli, -1,13 misli, 1,13 misli, 1,37 misli, -1,55 misli ve 1,34 misli artış/azalış tesbit edilmiştir (Tablo 3.2 Şekil 3.16, 3.17, 3.18, 3.14, 3.12, 3.19, 3.15, 3.24). Aynı şekilde EBNA1 (0,1) grubunda ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna nazaran; 12,78 misli, 5,66 misli, 1,31 misli, 2,47 misli, 9,41 misli, 4,5 misli, 2,25 misli ve 10,48 misli artış olduğu tesbit edilmiştir. LMP1 ve EBNA1'in 0,5 ppm dozda uygulandığı gruplarda ise ilgili proapoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde ılımlı artış ve azalışlar gözlemlenmiştir. (Tablo 3.2 ve Şekil 3.12). Aynı genler için thapsigargin grubunda DMSO kontrol grubuna nazaran 3,91 misli, -1,31 misli, -1,01 misli,

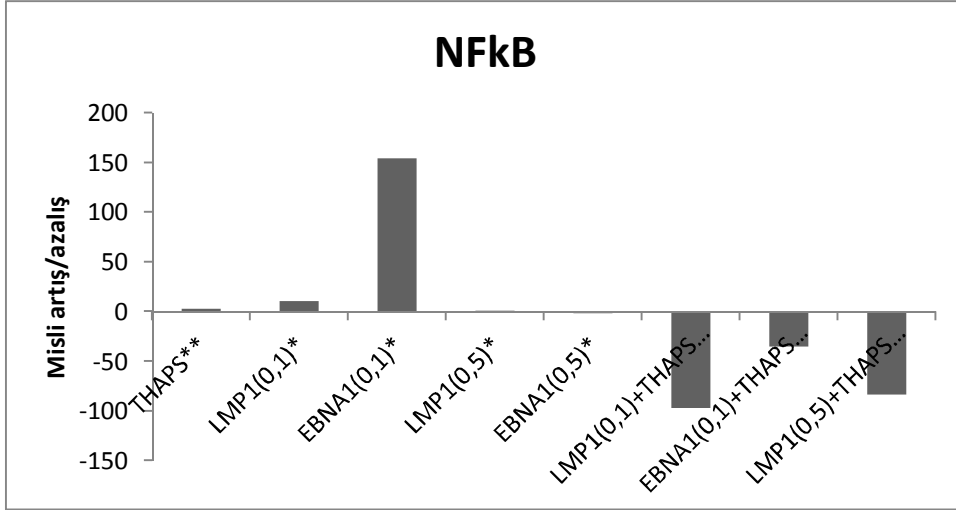
-1,14 misli, 5,61 misli, 4,02 misli, -2,01 misli ve 2,63 misli artış/azalışlar tesbit edilmiştir. LMP1 (0,5)+Thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna göre ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla; -1,09 misli, -63,26 misli, -1,17 misli -2,14 misli, 1,2 misli, 1,35 misli, 1,72 misli, -1,33 misli artış/azalışlar tesbit edilmiştir. EBNA1 (0,1)+thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna göre ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla-1,12 misli, -44,32 misli, 1,05 misli, -3,44 misli, 1,00 misli (değişim yok), 1,38 misli, 2,32 misli ve -1,42 misli artış/azalışlar tesbit edilmiştir. Diğer taraftan proinflamatuvar belirteçler olarak IL-6 ve IFN- $\gamma$  mRNA ekspresyon düzeylerinde; çalışmada kullanılan ilgili rekombinant proteinler açısından anlamlı olabilecek sonuçlara ulaşılammıştır (Tablo 3.2, Şekil 3.22, 3.15).

Antiapoptotik genler olarak çalışmaya dahil edilen Bcl2, Bcl-xL ve p35 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildiğinde Thapsigargin grubunda DMSO Kontrol grubuna göre ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; 1,28 misli, 1,25 misli ve 3,78 misli artış tesbit edilmiştir (Şekil 3.20, 3.21, 3.23). LMP1 (0,5) +thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna göre ilgili antiapoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; -1,2 misli, -54,56 misli ve 1,24 misli azalış/artış tesbit edilmiştir (Şekil 3.20, 3.21, 3.23). EBNA1 (0,1)+thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna nazaran aynı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; -1,56 misli, -43,11 misli ve 1,12 misli azalış/artış tesbit edilmiştir (Şekil 3.20, 3.21, 3.23). LMP1 (0,1) grubunda kontrol grubuna göre ilgili anti-apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; -1,12 misli, 10,5 misli,-1,13 misli artış/azalışlar tesbit edilirken aynı genlerde EBNA1 (0,1) grubunda kontrol grubuna nazaran ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; 2,05 misli, 24,02 misli ve 7,39 misli artışlar tesbit edilmiştir.

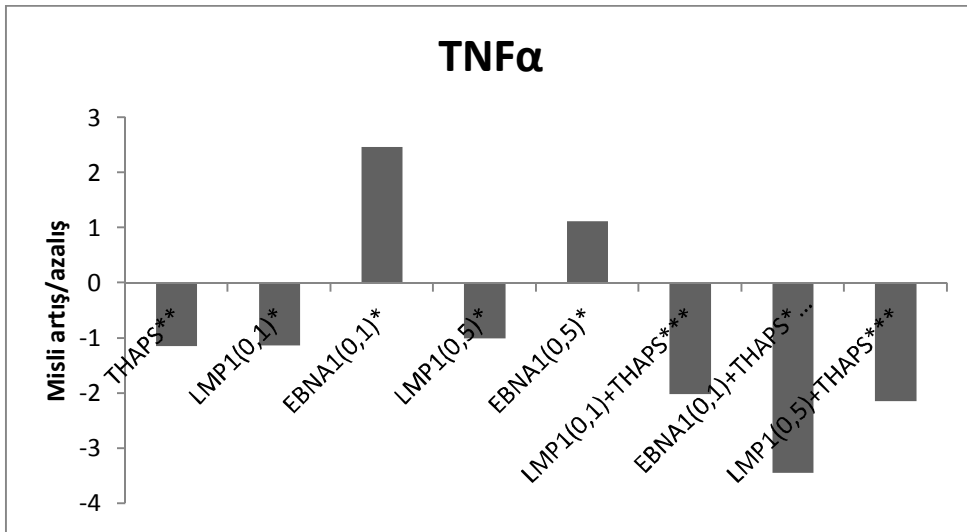


**Şekil 3.12.** p53 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

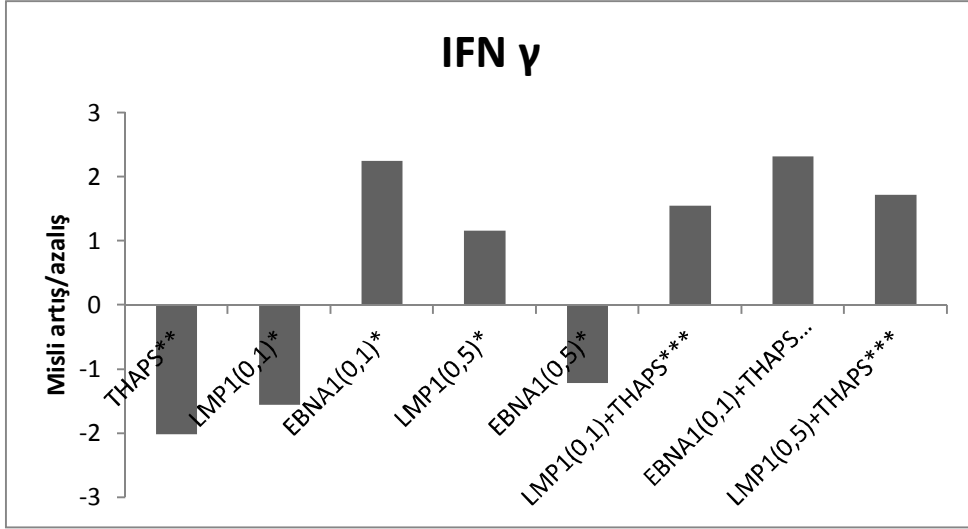
THAPS grubunda NF $\kappa$ B mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 3 misli düzeyde uyarılmıştır. Buna karşın Thapsigargin ile kombine edilen LMP1 ve EBNA1 proteinlerinin 0,1 ve 0,5 pmm lik dozlarınınin uygulandığı gruplarda ise NF $\kappa$ B mRNA ekspresyon düzeylerinde oldukça yüksek miktarlarda baskılanmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu açıdan LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5)+thapsigargin, EBNA1 (0,1)+thapsigargin ve EBNA1 (0,5)+thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre NF $\kappa$ B mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla; -97 misli, -83,67 misli, -34,,85 misli ve 39,85 misli baskılandığı tesbit edilmiştir. LMP1 ve EBNA1 rekombinant proteinlerinin tek başına uygulandıkları gruplar olan LMP1 (0,1), LMP1 (0,5), EBNA1 (0,1) ve EBNA1 (0,5) gruplarında NF $\kappa$ B mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; 10,8 misli, 154,34 misli, 1,13 misli ve -1,91 misli artış/azalışlar gözlemlenmiştir. (Tablo 3.2 , Şekil 3.13).



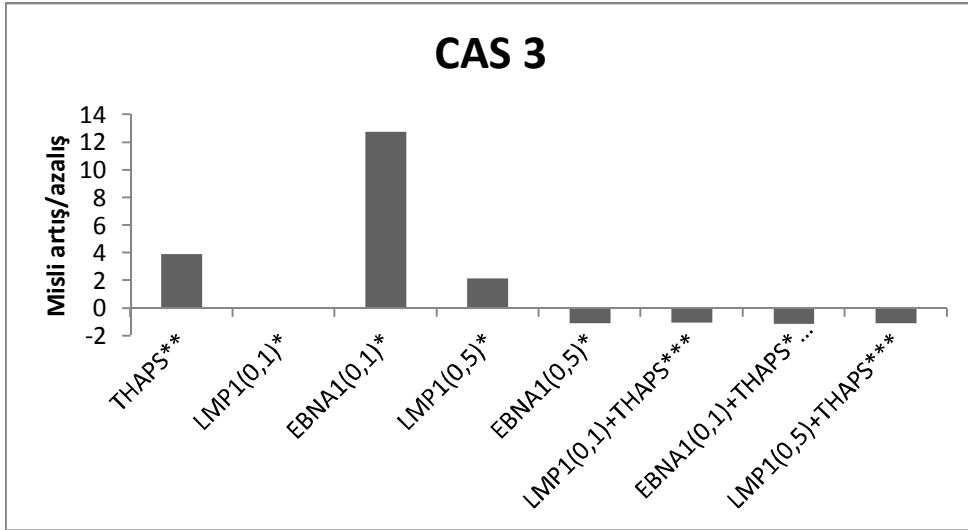
Şekil 3.13. NF $\kappa$ B mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 3.14. TNF $\alpha$  mRNA ekspresyon düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

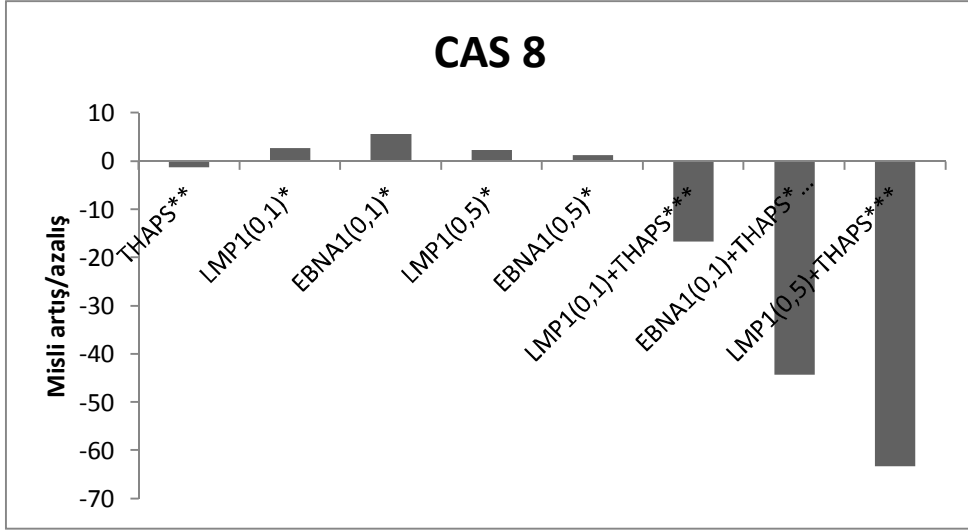


Şekil 3.15. IFN- $\gamma$  mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

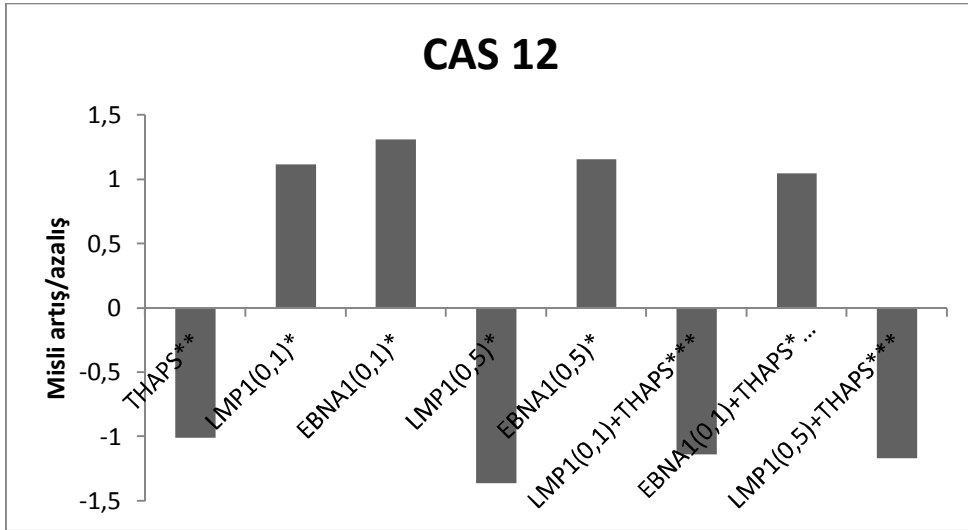


Şekil 3.16. Kaspaz-3 (CAS-3) mRNA ekspresyon düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

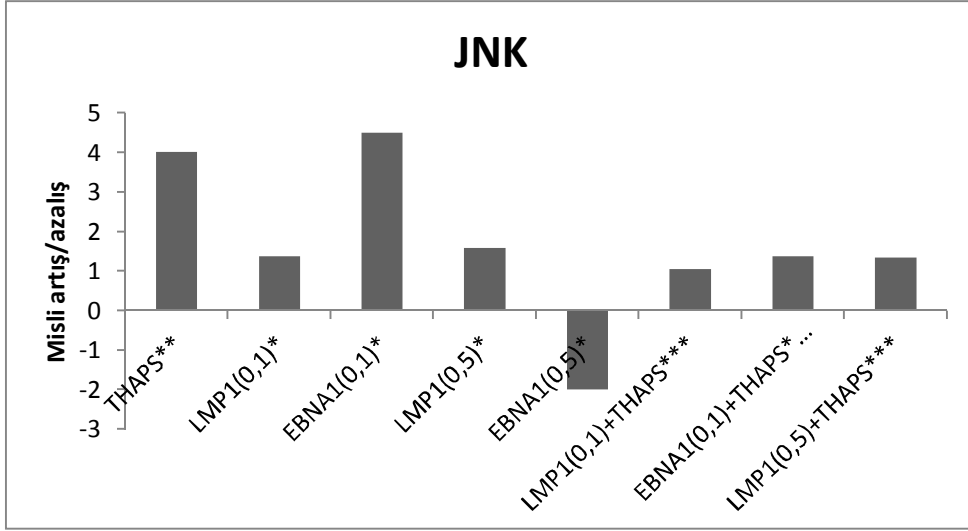




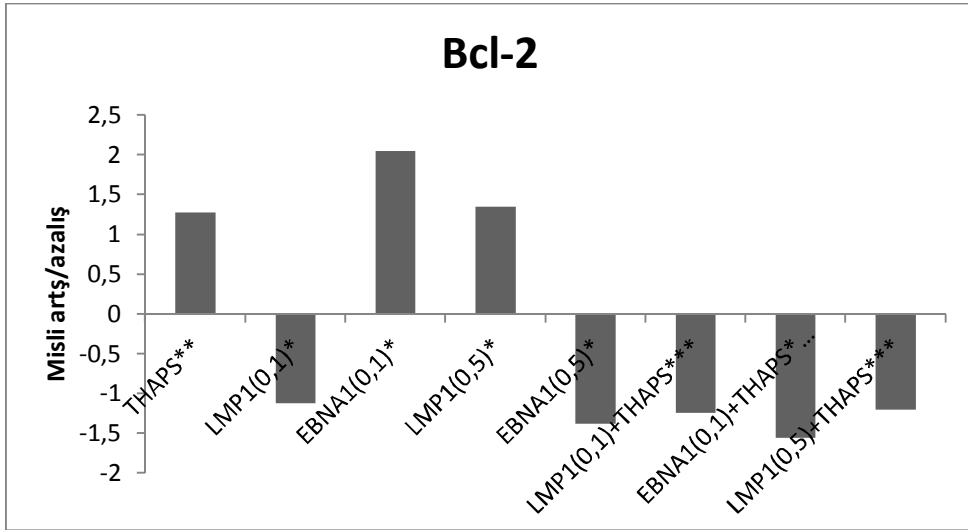
Şekil 3.17. Kaspaz-8 (CAS-8) mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



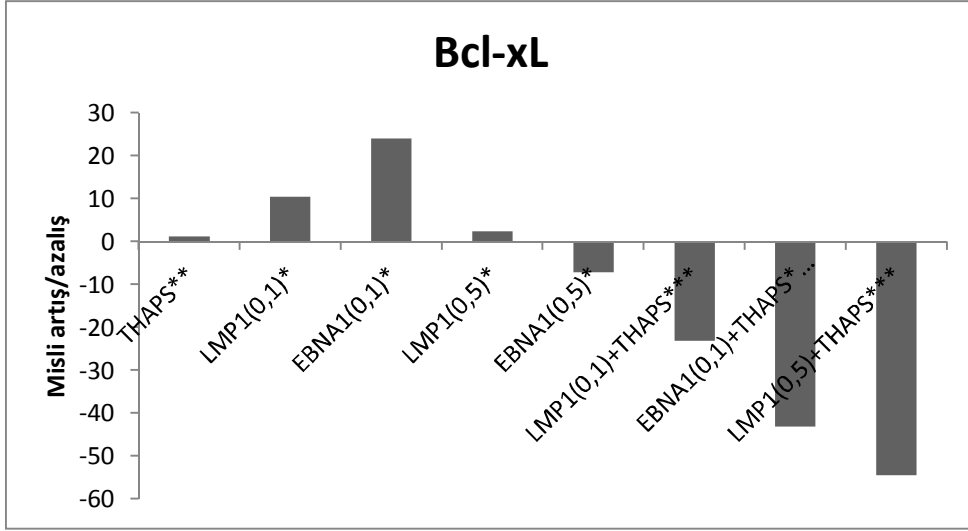
Şekil 3.18. Kaspaz-12 (CAS-12) mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



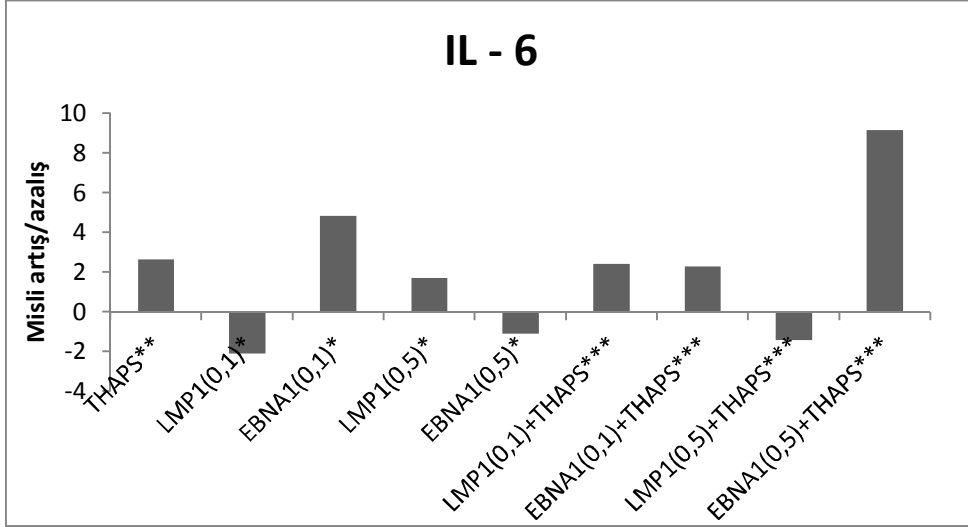
Şekil 3.19. JNK mRNA ekspresyon düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



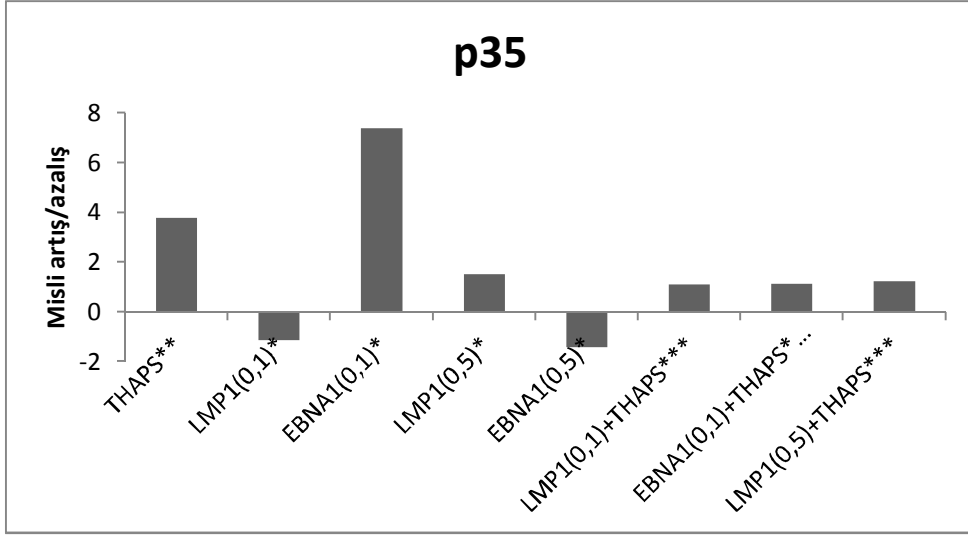
Şekil 3.20. Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



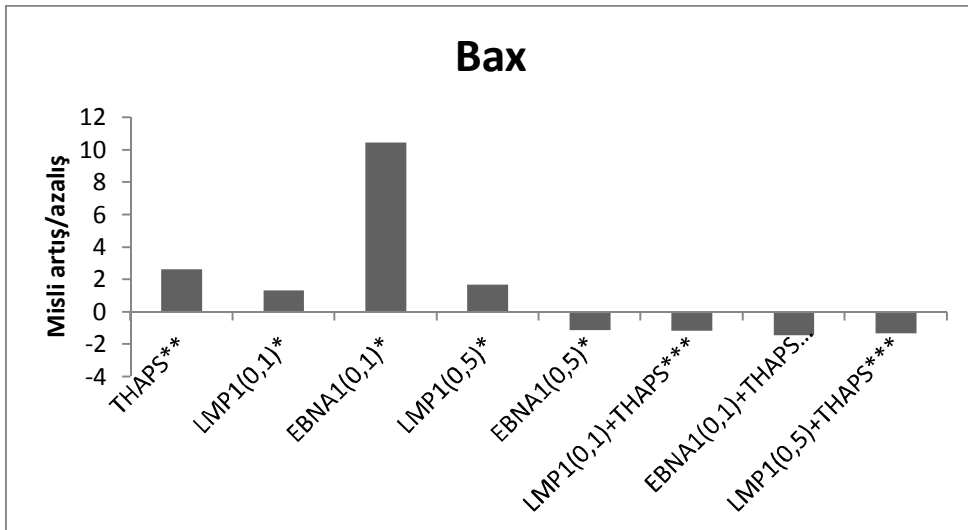
Şekil 3.21. Bcl-xL mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 3.22. IL-6 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



**Şekil 3.23.** p35 mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



**Şekil 3.24.** Bax mRNA Ekspresyon Düzeyleri. \*:Kontrol grubuna göre, \*\*: DMSO Kontrol grubuna göre, \*\*\*Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

### 3.3. TUNEL Assay Sonuçları

TUNEL Assay çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı kullanılarak yapılmıştır. TUNEL Assay çalışması için; iki farklı kit (Roche; In Situ Cell Death Detection Kit, POD ve Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; Lot:2243505) ile toplamda 7 deneme yapılmıştır. Her bir deneme sonucunda yapılan mikroskopik analizlerde apoptotik hücelere rastlanamamıştır.

### 3.4. COMET Assay Sonuçları

DNA hasarı comet yöntemi ile floresan mikroskopunda analiz edilirken her lamda rastgele seçilmiş 100 hücre görsel skorlama (arbitrary unit) ile değerlendirildi. Hücrelerdeki DNA hasar derecesini belirlemek için her bir hücreye (hücrelerde görülebilecek kuyruk göçü, kuyruk momenti, kuyruk yoğunluğu ve baş çapı gibi değişiklikler göz önünde bulundurularak) verilen skorlar (0, 1, 2, 3) aracılığı ile 0-400 AU arasında değişebilecek bir değerlendirme yapıldı.

Hücelere %40 DMSO'da çözülen  $10^{-8}$  mol/L thapsigargin uygulaması sonucunda (THAPS grubu) meydana gelen DNA hasar skoru  $69,4 \pm 3,6$  AU olarak tespit edildi. Thapsigargin uygulaması sonucu oluşan DNA hasarının, kontrol ve thapsigarginin çözücüsü DMSO uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu görüldü (Tablo 3.3 ve Şekil 3.25).

ER stres tetikleyicisi olarak Thapsigarginin uygulandığı grupta karşımıza çıkan DNA hasarı araştırmamız kapsamında oluşturulan EBNA1(0,1)+Thaps. Grubu hariç diğer tüm gruplardan istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Thapsigarginin bu etkisini kullandığımız rekombinant proteinlerin ne derece etki ettiklerini anlamamız için ilgili proteinlerin thapsigargin ile beraber uygulandıklara gruplar ele alındığında EBNA1(0,1)+Thaps. Grubu hariç diğer tüm uygulamalar thapsigarginin neden olduğu DNA hasarını istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde azaltmayı başarmıştır. Bu açıdan thapsigarginin neden olduğu DNA hasarını baskılamada en iyi etkiyi sergileyen iki grup LMP(0,5)+Thaps.ve EBNA1(0,5)+thapsigargin grupları olmuştur. İlgili gruplarda sırasıyla görsel comet skorları  $13,2\pm3$  ve  $9,2\pm1,9$  olarak tesbit edilmiştir. (Tablo 3.3 ve Şekil 3.25).

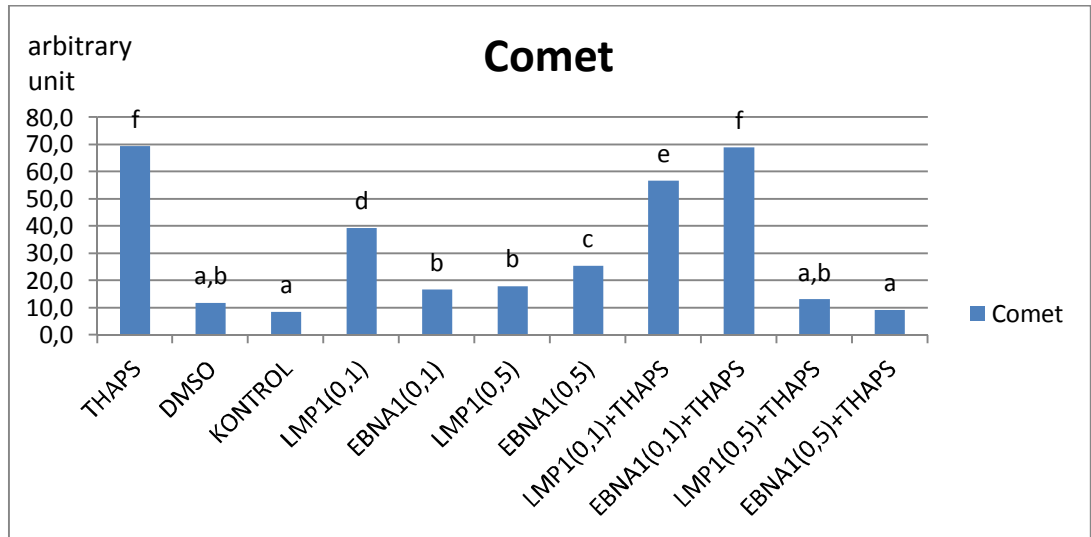
Başka bir açıdan ise LMP1 ve EBNA1 rekombinant preoteinlerinin uygulandığı tüm gruplarda da kontrol grubuna nazaran istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde yine DNA hasarlarının oluştuğu tesbi edilmiştir.

Gruplar	DNA Hasarı (AU)
THAPS	$69,4\pm3,6^f$
DMSO	$11,8\pm1,7^{a,b}$
KONTROL	$8,6\pm1,1^a$
LMP1(0,1)	$39,4\pm11,3^d$
EBNA1(0,1)	$16,8\pm0,8^b$
LMP1(0,5)	$18\pm3,5^b$
EBNA1(0,5)	$25,4\pm2,7^c$
LMP1(0,1)+THAPS	$56,8\pm0,8^e$
EBNA1(0,1)+THAPS	$69\pm11^f$
LMP1(0,5)+THAPS	$13,2\pm3^{a,b}$
EBNA1(0,5)+THAPS	$9,2\pm1,9^a$

**Tablo 3.3.** Comet Skorları.

a, b, c, d,e,f. Farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ). AU: Arbitrary Unit, KONT: Kontrol grubu, DMSO: Dimetil sülfoksit grubu, THAPS: Thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu.

Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde LMP1 ve EBNA1 rekombinant proteinlerinin thapsigarginle oluşturulan DNA hasarını azaltmada istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde etkili olduğu tesbit edilmiş olmasına rağmen tek başlarında kullanıldıkların ise kontrol grubuna nazaran DNA hasarı oluşturmada da istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde etkili olduğu belirlendi (Tablo 3.3 ve Şekil 3.25).



**Şekil 3.25.** Comet Skorları. Farklı harfler ile sembolize edilen gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar mevcuttur.

#### 4. TARTIŞMA

ER stres markerları olan GRP78, ATF4, ATF6, CHOP ve PERK genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde THAPS grubunda DMSO KONT grubuna nazaran sırasıyla; 6,63 misli, 10,62 misli, 19 misli, 8,05 misli ve 15,03 misli artış olduğu gözlenlenmiştir. Bu bize; projede deneysel ER stres modeli oluşumunun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Thapsigargin uygulaması ile ilgili ER stres markerı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki bu artış projede kullanılan EBV rekombinant protein uygulamaları ile önemli ölçüde değişiklikler göstermiştir. Proje sonuç raporunun bulgular kısmında da değinilen miktarlarda; rekombinant proteinlerin (LMP1 ve EBNA1) uygulanmaları ile ER stres markerı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerin de önemli miktarlarda baskılanmalar olduğu tesbit edilmiştir. Bu bakımdan proje sonuç raporunda LMP1 ve EBNA1 için ER stresini baskılamada ya da etkilerini azaltma da yeni umutlar verme potansiyeline sahip olduğu yorumu tutulmuştur.

Literatür özetinde de belirtildiği gibi ER stresi pankreatik beta hücre kayıplarına neden olarak beta hücre kitlesinde azalmalara neden olmakta bu da kişileri eksojen insüline bağımlı hala getirmektedir. Bu açıdan ilgili sonuçlar ele alındığında LMP1 ve EBNA1 protein uygulamaları anti ER stressörü olarak antidiyabetik tedavide kullanılıp kullanılamayacağı konusunun



araştırılması gerektiği önümüze çıkan ve sorulması gereken sorular arasında dikkat çekmektedir.

Bir başka açıdan ER stresi ele alındığında; THAPS grubunda mRNA ekspresyon düzeylerinde artış tesbit edilen proapoptotik genlerden p53 ve JNK genlerinin (sırasıyla; 5,61 misli ve 4,02 misli artış) LMP1 ve EBNA1 protein uygulamaları ile p53 geninde yaklaşık 4 kat ve JNK geninde ise yaklaşık 3 katlık bir azalmaya neden olduğu tesbit edilmiştir. Bu sonuç bu bakımdan bize LMP1 ve EBNA1 için ER stresinin neden olduğu apoptotik belirteçlerin yüksekliğini baskılaması bakımından ileriki çalışmalarla bu baskılanmanın nedenlerinin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Pankreatik beta hücre proliferasyonu açısından en dikkat edici bulgulara EBNA1 proteininin 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta rastlanmıştır. Bu bakımdan ilgili proteinin ilgili dozu proliferasyondan sorumlu oldukları bilinen genler olan; PDX1, Wnt4, FoxO1, TCF7L' ve  $\beta$ -Katenin genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini sırasıyla; 6,48 misli, 4,25 misli, 2,37 misli, 3,8 misli ve 1,4 misli artırmıştır. LMP1 proteininin 0,1 ppm ve 0,5 ppm lik dozları için böyle bir tablo söz konusu olmamıştır. Bu sonuçlar da bize göstermektedir ki LMP1 proteini ER stresinin bertarafı açısından EBNA1 ile ön plana çıkmıştır ve fakat aynı derece proliferasyon üzerin etkisinden söz edilememiştir.

İnsülin sentez ve salınımı açısından LMP1 ve EBNA1 proteinleri değerlendirildiğinde karşımıza proliferasyon sürecini hızlandıran genlere ait mRNA ekspresyon sonuçlarıyla paralellik teşkil edecek bulgulara ulaşılmıştır. Bu bağlamda LMP1'in 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta insülin sentez ve

salınımı kontrol grubuna nazaran istatistiki anlamlılık teşkil edecek şekilde uyarıldığı tesbit edilmiştir. Aynı şekilde LMP1 proteininin 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta ise insülin salınımı kontrol grubuna nazaran istatistiki anlamlılık verecek şekilde yükseltildiği tesbit edilmiştir. Öte yandan LMP1 (0,5) grubunda kontrol grubuna nazaran insülin sentezinin arttığı ve fakat bu artışın istatistiki bir önem arz etmediği tesbit edilmiştir. LMP1 ve EBNA1 proteinlerinin insülin sentez ve salınımını bu yönde değiştirmelerinin nedeni araştırıldığında karşımıza çıkan ilgi durumsalar LMP1 ve EBNA1 rekombinant proteinlerinin hem ER stresini baskılandıkları hem de hücre proliferasyonunu uyardıklarıdır. Ne var ki LMP1 ve EBNA1 proteinlerinin 0,1 ve 0,5 ppm dozda uygulanmaları bu yönde olumlu sonuçlar doğurmuş olsa da COMET analizlerinde karşımıza çıkan sonuçlar her iki proteininin de ilgili dozlarının DNA hasar oluşumuna neden olduğudur. İlgili proteinler bu açıdan ele alındığında DNA hasar oluşumuna neden olmalarının sebepleri açıklığa kavuşturulacak olursa ve bu durum kontrol altına alınabilirse gelecek çalışmalarda antidiyabetik viroterapik ajanlar olarak kullanılabilmesinin yolu açılabilir. Yine bu konuyla alakalı bir başka literatür verisinde; Gou Y., ve ark. (2014) yaptıkları araştırmada EBV ile enfekte edilmiş nasofaringial karsinoma hücrelerinde DNA hasarı ile EBV enfeksiyonları arasında bir korelasyonun olduğunu göstermişlerdir. Bu bakımdan projede ortaya çıkan sonuçların literatür verileriyle de uyumluluk gösterdiği söylenebilir.

Ju Y. ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, JNK aktivasyonunun baskılandığı durumlarda FoxO1 geninin de baskılanacağını göstermişlerdir. Bu projenin bulgular kısmında da değinildiği gibi EBNA1 proteininin 0,1 ppm dozu FoxO1 geninin mRNA ekspresyon düzeyini kontrol grubuna nazaran 2,37 misli artırırken 0,5 ppm'lik dozu -1,31 KAT baskılamıştır. Bu farklılığın nedeni olarak aynı gruptaki JNK gen aktivasyonlarına baktığımızda EBNA1 (0,1) grubunda JNK geni kontrole

nazaran 2,37 misli artarken EBNA1 (0,5) grubunda -2,0 misli baskılamıştır. Bu bağlamda bu sonuçlar Ju Y. ve ark.'nın verileri ile örtüşmektedir ve iki doz arasındaki proliferatif farklılığın da buradan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hayakawa J. ve arkadaşları (2003)'nin yaptıkları çalışmada DNA hasarının JNK aktivasyonuna neden olduğunu comet assay ile göstermişlerdir. Çalışmamızda gösterilmiştir ki; EBNA1 (0,1) grubunda proje hedeflerine uygun doğrultuda proliferasyondan sorumlu genlerin aktivasyonu sağlanmıştır ancak ilgili protein DNA hasarına da neden olmuştur. Bu sonuç üzerinde durduğumuzda yukarıda verilen literatür verisinden yararlanarak ilgili sonuçla alakalı; EBNA 0,1 ppm dozda DNA hasarını kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak artırmıştır ve bu EBNA1 (0,1) grubunda JNK aktivitesinin kontrole göre 4,5 kat artışıyla sonuçlanmıştır. Yine literatür verilerinden edindiğimiz bilgilere göre; JNK'lar gen ekspresyonunu düzenleyen ve stres durumunda apoptozis ile hayatta kalma arasında verilecek karara katılan sinyal ileti proteinlerinin bir ailesidir. ER stresi JNK'ları IRE1 $\alpha$  ve IRE1 $\beta$  üzerinden aktive eder. JNK aktivasyonunun ve p38 yolunun devamlılığı apoptozis sinyal düzenleyici kinaz (ASK1)'in aktivasyonunu gerektirir ki; bu, hücreyi apoptoza götürür (TOBIUME et al., 2001). EBNA1 (0,1) grubundaki kontrol grubuna nazaran 4,5 katlık JNK aktivasyonu aynı grupta proapoptotik genlerden olan p53, cas3 ve cas 8'in mRNA gen ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna nazaran dramatik şekilde sırasıyla; 9,41 misli, 12,78 misli ve 5,66 misli artırmıştır. Bu sonuçlar ilgili literatür verileri ile uyum göstermesi bakımından dikkate değer bulunmuştur. Eğer ileriye yönelik çalışmalarda, EBNA1 ve LMP1 için neden DNA hasarına ve proapoptotik genlerin ekspresyonuna neden oluyor sorusunun cevabı aranacak olursa bu bahsedilen noktanın bir başlangıç noktası olabileceği düşünülmektedir.

Laherty ve arkadaşları (1992) ve Rowe ve ark. (1994) yaptıkları çalışmalara göre; LMP1'in lenfositlerdeki ekspresyonu, transkripsiyon faktörü NF-kB' nin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda da beta hücre kültüründe gösterilmiştir ki; LMP1 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta NfκB'nin mRNA ekspresyon düzeyini kontrol grubuna nazaran 10,8 kat artırmıştır. Ancak ilginç ve açıklayamadığımız ve üzerinde durulması gerektiğini düşündüğümüz bir biçimde LMP1(0,1) +THAPS grubunda NFκB geninin ekspresyonunu -97 kat baskılanmıştır.

Tran T.M., ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada TNF-α'nın NFκB ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde EBNA1 (0,1) grubunda kontrol grubuna nazaran TNF-α ekspresyon düzeyi 2,47 misli artış gösterirken buna karşın NFκB mRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubuna nazaran 154,34 misli dramatik bir artış göstermiştir.

De Leo A., ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada LMP1 proteinine ait geni LMP1 siRNA kullanarak gen susturması yaptıklarında antiproliferatif etkinliğin artırıldığını göstermişlerdir. Bu demek oluyor ki LMP1'in varlığı hücre proliferasyonu için önem arz etmektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde LMP1 (0,5) grubunda hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilen genlerin ekspresyon düzeylerinde artışların olduğu tespit edilmiştir. Ancak LMP1 (0,1) grubunda beta-katenin geni hariç bu artışlardan söz etmek mümkün olmamıştır.

## 5.SONUÇ

Çalışmada elde edilen bulgular ve literatür verilerinden elde edilen bilgiler ışığında; sonuç olarak EBV rekombinant proteinleri LMP1 ve EBNA1'in proliferasyondan sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerini artırdığı aynı zamanda ER stres markerı genlerin ekspresyon düzeylerini baskılayarak da ER stresinin neden olduğu beta hücre kayıplarının tersine döndürülmesinde avantaj sağlayabileceği ve bu bakımdan daha üst düzey çalışmalar ile desteklendiği takdirde antidiyabetik tedavilerde viroterapik ajanlar olarak kullanılabilmesinin yolunun açılması potansiyeli bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmanın handikapı olabileceğini düşündüğümüz bir sonucu ise ilgili proteinlerin DNA hasarına neden olmasıdır. Ancak literatür verileri incelendiğinde bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan bir çok ilacın da belirli dozlarda DNA hasarına uğrattıkları gözlemlenmiştir. Örneğin aspartam (Meier et al., 1990), atrofin (Yamada et al., 1997) ketamine (Rudin et al., 2005) vb. Bu bağlamda LMP1 ve EBNA1 için kontrol grubuna nazaran DNA hasarı oluşturuyor olmaları, ileri de verecekleri muhtemel yararlıardan daha fazla önem arz etmeyebilir.

Bu haliyle çalışmadan şu sonuçlar çıkarılabilir;

1. EBNA1 ve LMP1 proteinlerinin diyabet tedavisinde viroterapik ajanlar olarak denenebilmesi açısından yol gösterici olabilecek ilk araştırmadır.

2. Hücre kültürü çalışmalarında bilindiği üzere hiçbir hücre hattının sonsuz çoğalma yeteneği yoktur. Hücre kültürü araştırmacılarının en büyük korkularından biri de hücre üreme hızlarının düşmesi ya da hücreleri çoğaltmada sıkıntılar yaşanmasıdır. Bu çalışmanın bir diğeri çıktısı da; hücre hatlarını üretme konusunda sıkıntıya düşen araştırmacılar için yeni bir metodolojik çalışmaya yol gösterici olabilme potansiyeline sahip olmasıdır.
3. Çalışmanın bir diğeri yan çıktısı ise EBNA1 ve LMP1'in tedavi maksatlı preparat olarak ya da pankreatomi / laparoskopi ile pankreasa lokal uygulamalarının; gerekli klinik, cerrahi, dozaj, faz ve farmakokinetik çalışmaların planlanması ile hayata geçirilebilme potansiyeline sahip olmasıdır.

## ÖZET

Diyabet prevalansı ve insidansı günümüz dünyasında her geçen gün artmakta olan bir sağlık sorunudur. Diyabetin humoral ve dokusal bulguları zengin olmasına rağmen komplikasyonlarının oldukça fazla olması diyabet tanı ve tedavisini önemli kılmaktadır.

Bugün içerisinde diyabetinde sayıldığı bir çok hastalığın Endoplasmik Reticulum (ER) stresi ile indüklenen apoptozisle alakalı olduğu kanısı hakimdir. Nitekim yapılan çalışmalarda pankreatik beta hücrelerinde ER organelinin protein alım ve katlama kapasitesi arasındaki dengesizlikten doğan ER stresi ile indüklenen apoptozisin diyabete neden olduğu vurgulanmaktadır.

Epstein-Barr Virüs(EBV); Lenfokriptovirüs bir virus olup, bu tür viruslerin genel olarak B lenfositlerde latent enfeksiyon yaptıkları dönemlerde hücre proliferasyonuna ve transformasyon sürecine katkıda buldukları bilinmektedir. EBV'nin proliferatif etkinliği iki mediatör protein aracılığıyla(Epstein Bar Nuclear Antigen1-EBNA1 ve Latent Membrane Protein1-LMP1) gerçekleşmektedir. Tip 2 diyabet hastalarında uzun süren anti diyabetik tedaviler esnasında, pankreatik hücre kayıpları ve pankreatik kütlenin azalması sonucu eksojen insülin kullanımına geçilmektedir. Bu çalışmada pankreatik hücre kayıplarının rekombinant viral EBV protenleri uygulanarak tersine çevirmenin araştırılması amaçlanmıştır. Yanı sıra ilgili proteinlerin DNA hasarı, ER Stresi üzerine etkileri ve insülin sentez-salınımına nasıl katkıda bulunabilecekleri de araştırılmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda ticari olarak elde edilen rekombinant EBNA1 ve LMP1 proteinlerinin Lethal Doz 50 çalışması sonrası her iki proteinin 0,1 ppm ve 0,5 ppm'lik dozlarının çalışma için kullanılmasına karar verilmiştir. Bu proteinlerin belirtilen dozları uygulandıktan sonra proliferasyonun bu durumdan ne derece etkilendiğinin tespit edilebilmesi için proliferasyondan sorumlu oldukları bilinen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Diğer taraftan DNA hasarı için Comet Assay ve ER stres için ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri de test edilmiştir.

RT-PCR çalışmaları neticesinde ER stres markerları olan AFT4, ATF6, PERK, GRP78 ve CHOP genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde thapsigargin grubunda DMSO Kontrol grubuna göre sırasıyla; 10,62 kat, 19 kat, 15,03 kat, 6,63 kat ve 8,05 kat artışlar saptanmıştır. ER stres markerı olan genlerdeki bu yükselişin çalışmada kullanılan ilgili proteinler vasıtasıyla baskılandığı da belirlenmiştir.

Çalışmada sonuç olarak; EBV rekombinant proteinleri LMP1 ve EBNA1'in proliferasyondan sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerini artırdığı aynı zamanda ER stres markerı genlerin ekspresyon düzeylerini baskılayarak da ER stresinin neden olduğu beta hücre kayıplarının tersine döndürülmesinde avantaj sağlayabileceği ve bu bakımdan daha üst düzey çalışmalar ile desteklendiği takdirde antidiyabetik tedavilerde viroterapik ajanlar olarak kullanılabilmesinin yolunun açılması potansiyeli bulunduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** LMP1, EBNA1, ER stresi, INS-1E (832/13) beta hücresi, İnsülin



## SUMMARY

The prevalence and incidence of diabetes is a health problem that increases almost every day today's world. Although humoral and histologic findings of diabetes complications are diverse; the high numbers of complications cause the diagnosis and treatment of diabetes to be extremely important.

Today, it is believed that a large number of diseases, including diabetes, are related to the Endoplasmic Reticulum (ER) stress-induced apoptosis. Indeed, it is emphasized that studies in pancreatic beta cells and folding capacity of the ER organelle protein intake resulting from the imbalance between the apoptosis induced by ER stress caused by diabetes.

Epstein-Barr Virus (EBV); Lenfocriptovirüs is a virus, such viruses in general the latent infection in B lymphocytes during periods of cell proliferation and are known to contribute to the transformation process. Proliferative activity of EBV proteins occurs via two mediators (Epstein Barr Nuclear Antigen1-EBNA1 and latent membrane Protein1-LMP1). Type 2 diabetic patients treated for a long time during the anti-diabetic pancreatic cell loss and resulting decrease in pancreatic mass lead to the use of exogenous insulin. In this study, it is aimed to investigate that recombinant viral EBV protein of pancreatic cell loss those applying to reverse. In addition to that related proteins as well as DNA damage and stress effects on insulin synthesis and release and their contributions were also investigated.

For that purpose, commercially obtained recombinant proteins LMP1 Lethal Dose 50 EBNA1 and after operation 0.1 ppm and 0.5 ppm doses of either protein, were decided to be studied. Upon application of these proteins indicated dose proliferation is affected by this order to determine to what extent they are known to be responsible for the proliferation of mRNA expression levels of genes was investigated. Comet assay for DNA damage and on the other hand to ER stress, levels of mRNA expression of the gene of interest were tested.

As a result of RT-PCR applications, mRNA expression levels of genes of AFT4, ATF6, PERK, GRP78 and CHOP, which are ER stress markers, orderly increased 10-fold, 19-fold, 15,03-fold, 6,63-fold, and 8,05-fold according to DMSO control group in thapsigargin group. It is observed this increase on the expression of the genes which are ER stress marker is repressed by interest proteins.

As a result; the conclusion was that EBV recombinant proteins LMP1 and EBNA1 proliferation genes which are responsible for expression levels increased but also ER stress marker gene expression level by suppressing the ER stress-induced beta cell loss in reversing would be advantageous and therefore higher levels work and if supported antidiabetic treatments virotherapy as agents the ability to use the potential opening of the way.

**Keywords:** LMP1, EBNA1, ER stress, INS-1E (832/13) beta cell, Insulin

## KAYNAKLAR

- Ackermann M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol* 2006;113:211-22.
- Akalın G, Incesu Z, The effect of 1,3 BIS (Heteroary1 substituted) benzene derivatives on apoptosis of N-Ras transformed Mouse skeletal muscle cell, *J. Fac. Pharm, Ankara* (1) 1 -15, (2005).
- Altındış M., *Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı, Nobel Tıp Kitabevi, 2013*
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 18, 277(5324), 370-2, (1997).
- Arman D. Epstein-Barr Virus. In: Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 2nd ed. Nobel Pres, 2002; 1197-1201.
- Arman D. Enfeksiyöz mononükleoz. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2008. 1677-8.
- Barone MV, Crozat A, Tabae A, Philipson L, Ron D. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev*. 8(4), 453-64, (1994).
- Beaulieu BL, Sullivan JL. Epstein-Barr virus. *Clinical Virology* 2nd ed 1999; 479-495.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2(6), 326-32, (2000).
- Biarnés M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*. 51(1), 66-72, (2002).
- Bonner-weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*. 141(6), 1926-9, (2000).
- Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91 (16): 1376-81.
- Brady G, MacArthur G , Farrell P. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 2007;60: 1397-1402.
- Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom*, 13, 102-7, (2001).
- Casagrande R, Stern P, Diehn M, Shamu C, Osario M, Zúñiga M, Brown PO, Ploegh H. Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. *Mol Cell*. 5(4), 729-35, (2000).
- Cauchı S, Eroguel P, TCF7L2 genetic defect and type 2 diabetes. *Curr. Diab Rep.*, 8(2), 149-155, (2008).
- Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem*. 273(18), 10815-8, (1998).
- Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem*. 277(15), 13045-52, (2002).

- Cho S, Hahm J-H, Hong Y-S. Analysis of p53 and bax mutations, loss of heterozygosity, p53 and bcl2 expression and apoptosis in basal cell carcinoma in Korean patients. *Br J Dermatol*, 144, 841-848, (2001).
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD, Comet assay and early apoptosis., *Mutat Res*. 478(1-2), 89-96, (2001).
- Chu JS, Chen CC, Chang KJ. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett* 1998; 124: 53-7.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. *Mutat Res*, 336, 69-77, (1995).
- De Leo A., Arena G., Stecca C., Raciti M., Mattia E. Resveratrol inhibits proliferation and survival of Epstein Barr virus-infected Burkitt's lymphoma cells depending on viral latency program. *Mol Cancer Res*.2011 Oct;9(10):1346-55. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0145. Epub 2011 Aug 19.
- Defronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991 Mar;14(3):173-94.
- Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. *Biochem Pharmacol*. 22, 50(12), 2015-20, (1995).
- Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M, Brisbay S, Davies M, El-Naggar AK, McDonnell TJ. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*, 85, 1514-22, (1999).
- Delibaş N., Kılınç İ., (2003) İnsulin ve Gliklazid Tedavisinin Streptozotosin Diabetik Rat Hipokampuslarında Lipid Peroksidasyonuna Etkisi. *Türk Biyokimya Klinik Dergisi*, 1(1):33-39.
- Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C and Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, 27, 285-299, (2008).
- Denizot F, Lang R, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immun Meth*. 89, 271-277, (1986).
- Deprez P, Gautschi M & Helenius A, More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle. *Mol Cell* 19, 183-195, (2005).
- Devergne O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol*. 16: 7098-7108.
- Doğan B. Tekrarlayan tonsillit hastalarının tonsil dokularında EBV'nin gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu ile kantitatif tespiti ve serum VCA-IgG titreleri ile korelasyonu. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi 2005
- Eızırlık DL, Poulsen TM, A choice of death-the signal-transduction of immune-mediated beta cell apoptosis, *Diabetologia*, 44, 2115-2133, (2001).
- Eliopoulos AG, Caamano JH, Flavell J, Reynolds GM, Murray PG, Poyet JL, et al. Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway *Oncogene* 2003; 22 (48): 7557-69.

- Eliopoulos AG, Young LS. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol.* 2001; 11: 435-44.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., Young, L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274: 16085-16096.
- Elizabeth R. Leight and Bill Sugden. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 2000; 10: 83±100.
- Engels N, Merchant M, Pappu R, Chan AC, Longnecker R, Wienands J. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med* 2001;194:255-64.
- Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein-Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 3. baskı. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2008. 1677-8.
- EUROBIAB-ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood Diabetes in Europe. *Lancet* 2000;355:873-6
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 699-717, (1999).
- Gandhi M, Tellam J, and Khanna R., Epstein-Barr Virus-Associated Hodgkin's Lymphoma. *Br J Haematol*, 2004; 125(3): 267-81.
- Gartner, B. C., R. D. Hess, D. Bandt, A. Kruse, A. Rethwilm, K. Roemer, Evaluation Of Four Commercially Available Epstein-Barr Virus Enzyme Immunoassays With An Immunofluorescence Assay As The Reference method. *Clin. Microbiol. and N. Mueller-Lantsch.* 2003. 10:78-82.
- Geçgel S.K., Epstein-Barr Virüs Enfeksiyonları Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Yeri, Uzmanlık Tezi, 2011
- Gires, O., Zimmerstrobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M. Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo. J.* 18: 3064-3073.
- Gou Y., Sun C., Hu L., He J., Zhang C., Feng Y., Zhang P., Kong X., Xiao L., Li Y. Correlation between DNA damage and EB virus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2014 Feb;30(2):184-7.
- Gurzov EN, Ortis F, Bakiri L, Wagner EF, Eizirik DL, JunB Inhibits ER Stress and Apoptosis in Pancreatic Beta Cells. *PLoS ONE*, 3(8), 3030, (2008).
- Halefioglu İ., Karataş F., Çolak R., Canatan H., Telo S., (2005) Tip 2 Diyabetik Hastalarda tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3):117-12
- Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8:1-5.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 6(5), 1099-108, (2000).
- Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell.* 7(6), 1153-63, (2001).

- Hart AW, Baeza N, Apelqvist A, Edlund H. Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature*. 408(6814), 864-8, (2000).
- Hayakawa J., Depatia C., Ohmichi M., Mercola D., The Activation of c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) by DNA-damaging Agents Serves to Promote Drug Resistance via Activating Transcription Factor 2 (ATF2)-dependent Enhanced DNA Repair. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:20582-20592. (2003).
- Hayden R, Hokanson K, Pounds S, Bankowski M, et al. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 157-163
- Hess R. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(8): 3381–3387.
- Higuchi, M., Izumi, K.M., Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4675-7680.
- Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: Lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 2007;25:587–617.
- <http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv>, 2014
- Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, et al. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:230-2.
- International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, 4th Edition, Brussels, 2009
- Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura-Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol.* 3(2), 158-64, (2001).
- Izumi K.M., Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12592-12597.
- Jakob CA, Burda P, Roth J, Aebi M. Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol.* 142(5), 1223-33, (1998).
- Ju Y., Xu T, Zhang H, Yu A. FOXO1-dependent DNA damage repair is regulated by JNK in lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2014 Apr;44(4):1284-92. doi: 10.3892/ijo.2014.2269. Epub 2014 Jan 21.
- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 1999 Dec;48(12):2398-406.
- Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 2004; 44(3):257-67.
- Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV associated disease. *Rev Med Virol* 2008; 18(5): 305-19
- Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 375-404.

- Laherty, C., Hu, H., Opiari, A., Wang, F., Dixit, V. (1992). The Epstein- Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor, KB. *J. Biol. Chem.* 267: 24157-24160.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwaldmullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375: 685-688.
- Linde A, Falk K. Epstein-Barr virüs. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J (eds). Klinik mikrobiyoloji. 9.baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd;2009. 1567-70.
- Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6), 2820-5, (2000).
- Lupi R, Del Prato S,  $\beta$ -cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes&Metabolism*, 34, 56-64, (2008).
- Macky I, Arden k, Netsche A, Real time PCR in virology. *Nucliec Acid Res* 2002; 30: 1292\_1305
- Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414(6865), 792-8, (2001).
- Mauricio D, Mandrup-Poulsen T, Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes.* 47(10), 1537-43, (1998).
- Meier I., Shephard S. E., Lutz WK. Nitrosation of aspartic acid, aspartame, and glycine ethylester. Alkylation of 4-(p-nitrobenzyl)pyridine (NBP) in vitro and binding to DNA in the rat. *Mutat Res.* 1990 May;238(3):193-201.
- Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development*, 127(12), 2617-27, (2000).
- Müderris T. Larenks kanserli hastaların tümör dokularında Epstein-Barr virüsün gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu ile saptanması (Uzmanlık Tezi). Ankara: Gazi Üniversitesi; 2009.
- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 150(4), 887-94, (2000).
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 403(6765), 98-103, (2000).
- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.*, 11(18), 2323-34, (1997).
- Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 149-70.
- Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A., Sample, J. (1996). Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J. Virol.* 70: 623-627.
- Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol.* 153(5), 1011-22, (2001).

- Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest.* 109(4), 525-32, (2002).
- Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19), 10845-50, (2001).
- Ozturk M. Programlı hücre ölümü sempozyumu kitabı, 2008.
- Paschale M, Clerici P, Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol* 2012; 1(1): 31-43.
- Pfaffl MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45, (2001).
- Preiksaitis JK, Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Caliendo AM, Miller GG. Interlaboratory comparison of epstein-barr virus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9: 269-279.
- Qaddo F.M.Q. Epstein Barr Virüs Enfeksiyonunun Tanısında Moleküler ve Serolojik Göstergelerin Yeri, Yüksek Lisans Tezi, 2013
- Rajan SS, Srinivasan V, Balasubramanyam M, Tatu U, Endoplasmic reticulum (ER) stres and diabetes. *Indian J Med Res*, 125, 411-424, (2007).
- Ramdial PK, Madaree A, Reddy R, Chetty R. Bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 27, 283-291, (2000).
- Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet*, 22(1), 44-52, (1999).
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, 276(36), 33869-74, (2001).
- Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/(Clinical Research Ed.) (BMJ)*, 322, 1536-8, (2001).
- Rossen K, Karabulut Thorup A, Hou-Jensen K, Krag Jacobsen G. Bax protein is not expressed by basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 139, 472-474, (1998).
- Rowe, M., Peng Pillon, M., Huen, D., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E., Rickinson, A.B. (1994). Upregulation of bcl-2 by the Epstein- Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell specific response that is delayed relative to NF-KB Activation and to induction to cell surface markers. *J. Virol.* 68: 5602-5612.
- Rudin M., Ben-Abraham R., Gazit V., Tendler Y., Tashlykov V., Katz Y. Single-dose ketamine administration induces apoptosis in neonatal mouse brain. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2005;16(4):231-43.
- Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int.* 39(6), 1229-36, (1996).
- Sample J., Kieff E. (1990). Transcription of the Epstein-Barr Virus Genome during Latency in Growth-Transformed Lymphocytes. *J. Virol.* 64(4): 1667-1674.
- Sarac S, Akyol MU, Kanbur B, Poyraz A ve ark. Bcl-2 and LMP1 expression in nasopharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* 2001; 22(6):377-82.



- Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18(12), 7499-509, (1998).
- Silva JP, Köhler M, Graff C, Oldfors A, Magnuson MA, Berggren PO, Larsson NG. Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet*, 26(3), 336-40, (2000).
- Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol*, 19(1), 495-504, (1999).
- Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*, 31(8 Pt 1), 694-700, (1982).
- Straathof KCM, Bollard CM, Rooney CM, Heshlop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr- Virus Associated Cancers in Children. *The Oncologist* 2003; 8:83-98.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı Kitapçığı, Ankara, yayın no: 816 (2011)
- Tamer D. Epstein- Barr virus (EBV) genomunun periferik kandan PCR ve real-time PCR ile gösterilmesi ve tiplendirilmesi (Yüksek lisans tezi).
- Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2006.
- Tang Y, Stratton C, editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. New York: Springer Science and Business Media; 2006
- Tıllı CMLJ, Stavast-Kooy AJW, Ramaekers FCS, Neumann HAM. Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 29, 79-87, (2002).
- Tobume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2(3), 222-8, (2001).
- Tomatır AG, Apoptosis progamed cell death, *T Klin J Med Sci*, 23, 499-508, (2003).
- Tran TM, Temkin V, Shi B, Pagliari L, Daniel S, Ferran C, Pope RM. TNF $\alpha$ -induced macrophage death via caspase-dependent and independent pathways. *Apoptosis*. 2009 Mar;14(3):320-32. doi: 10.1007/s10495-009-0311-4. (2009).
- Unger RH, Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53, 319-36, (2002).
- Us A.D., Ergunay K., *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Bilimsel Tıp Kitabevi S540-547, Ankara, (2007)*
- Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*, 103(1), 27-37, (1999).
- Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*, 17(19), 5708-17, (1998).
- Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol*, 16(8), 4273-80, (1996).
- Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 272(5266), 1347-9, (1996).

- Welters HJ, Kulkarni RN, Wnt signaling: relevance to  $\beta$ -cell biology and diabetes. *Trends in Endocrinology and metabolism*, 19, 349-355, (2008).
- Wilson, J.B., Bell, J.L., Levine, A.J. (1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo. J.* 15: 3117-3126.
- Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, 23(1), 32-40, (1999).
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900-4, (1998).
- Wobser H, Düssmann H, Kögel D, Wang H, Reimertz C, Wollheim CB, Byrne MM, Prehn JH. Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. *J Biol Chem*, 277(8), 6413-21, (2002).
- Yaung LS, Murray PG. EBV and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22: 5108-21.
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*, 276(17), 13935-40, (2001).
- Yoshida H, ER stress and diseases, *FEBS Journal*, 274, 630-658, (2007).
- Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33741-9. Erratum in: *J Biol Chem*, 274(4), 2592, (1999).
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881-91, (2001).
- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 20(18), 6755-67, (2000).
- Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, 46(5), 887-94, (1997).
- Zeytinoğlu A, Hekimgil M, Erensoy S ve ark. Lenfomalı hastaların dokularında Epstein-Barr virüs DNA ve RNA'sının araştırılması. *Mikrobiyol Bül*t 2005;39:473-81.
- Zheng H, Li L, Hu D, Deng X, Cao Y. Role of Epstein-Barr Virus encoded Latent Membrane Protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cellular & Molecular Immunology* 2007;4(3): 185-96.
- Zhou YP, Teng D, Dralyuk F, Ostrega D, Roe MW, Philipson L, Polonsky KS. Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and arachidonic acid metabolism. *J Clin Invest*, 101(8), 1623-32, (1998).
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12(7), 982-95, (1998).

