

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**OKRATOKSİN A’NIN İNSAN PROKSİMAL TÜBÜL
HÜCRELERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜ MOLEKÜLER
MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dilek AŞCI ÇELİK
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4463-D2-15 proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez No: 164

ISPARTA – 2017

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/11/2017

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK



SDÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE:

Doç. Dr. Zühal HAMURCU



Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE:

Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN



Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE:

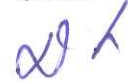
Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR



SDÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE:

Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM



SDÜ, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından, yapımına ve yazımına kadar geçen tüm aşamalarda herhangi bir etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar dahilinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı ve son olarak tezin yapılması ve yazımı sırasında patent ve telif hakları ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

“Okrotoksin A'nın İnsan Proksimal Tübül Hücrelerinde Hücre Döngüsü Moleküler Mekanizmaları Üzerine Etkisi” adlı doktora tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez önerisi ve yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan


Dilek AŞCI ÇELİK



İmza

Danışman

Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK



İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, beni yönlendirerek çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan, desteğini her zaman hissettiğim değerli tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e

Bu tez çalışmasının oluşturulmasından tamamlanmasına kadar her konuda yol gösteren, bana laboratuvarını açan, çalışmalarımnda birçok şeyi kısa sürede etkili bir şekilde öğreten, çalışmalarımna büyük bir özveri ile yön veren, her konuda daha iyi sonuçlar almam için beni destekleyen ikinci danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Nilgün GÜRBÜZ'e

Eğitimim boyunca yetişmemde büyük katkısı olan, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, bu uzun süreçte verdiği emek ve ayırdığı zaman için değerli hocam Prof. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na

Bu yolun başlangıcında verdiği büyük destekle bugünlere gelmemi sağlayan, hayata dair verdiğim en önemli kararlarda yanımda olan ve beni hep destekleyen değerli hocam Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a

Tez jürimde ve izleme komitemde yer alarak bana destek olan sayın hocalarım Doç. Dr. Zühal HAMURCU, Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN ve Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM'a

Tez çalışmamda kullandığım hücre hattını hediye ederek sağladığı büyük destek için Yrd. Doç. Dr. İbrahim YAMAN'a

Çalışma hayatının bana kazandırdığı, ihtiyacım olan her an koşulsuz yanımda bulduğum, zor zamanlarıma destek, sevincime ortak olan, hayatın en anlamlı mutluluğunu birlikte karşıladığım dostum Gülçin YAVUZ TÜREL'e

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her zaman her koşulda yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, zor zamanlarımda iş yükümü azaltmak için ellerinden gelen çabayı gösteren arkadaşlarım Arş. Gör. Vehbi Atahan TOGAY'a, Arş. Gör. Eda EVGEN TÜLÜCEOĞLU'na ve Arş. Gör. Yasemin ÇİÇEK'e

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yanımda olan ve enerjisiyle çalışma ortamına neşe katan Yüksek lisans öğrencisi Elif IŞILDAR SÖNMEZ'e

Birlikte başladığımız bu yolda geçen uzun zaman içerisinde hep yanımda olan, zorlukları da mutlulukları da birlikte karşıladığım dostum; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e

Her zaman sevgi ve desteklerini esirgemeyen, tüm öğrenim hayatım boyunca her türlü fedakarlıkta bulunan, beni bugünlere getiren, emeklerinden dolayı minnettar olduğum; babam, annem ve ağabeyime

Biz olduğumuz ilk günden beri sevgi ve desteğiyle bana güç veren, her zaman yanımda olan, sonsuz anlayışıyla bana en büyük kolaylığı sunan, katkılarıyla bugünlere geldiğim, hayatımdaki en büyük mutlulukların sebebi eşim Erdal ÇELİK'e

Varlığını öğrendiğim günden beri şansım olan, bu tezin oluşması sırasında ona ayıramadığım her an için affına sığındığım, mutluluk kaynağım canım kızım Tanem'e

Bu çalışmayı 4463-D2-15 BAP proje numarası ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. OTA'nın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2. OTA'nın Emilimi, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı	5
2.2.1. Emilim	5
2.2.2. Dağılım	6
2.2.3. Metabolizma	7
2.2.4. Atılım.....	8
2.3. OTA'nın Moleküler Mekanizmalar Üzerine Etkileri	9
2.3.1. Protein Sentezinin İnhibisyonu	10
2.3.2. Transkripsiyon Faktörü Aktivitelerinin Düzenlenmesi	11
2.3.3. Mitokondriyal Fonksiyon Bozuklukları ve Oksidatif Stres.....	12
2.3.4. Reaktif Oksijen Türleri	12
2.3.5. DNA Hasarı	13
2.3.6. Apoptoz, Nekroz, Otofaji	15
2.3.7. Sinyal İleti Yolakları.....	16
2.4. Hücre Döngüsü.....	18
2.4.1. OTA'nın Hücre Döngüsü ve Düzenleyici Faktörlerine Etkisi	23
2.5. p53 ve Hücre Döngüsü	25
2.6. Küçük Sessizleştirici RNA (small interfering RNA= siRNA).....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Hücre Kültürü.....	34

3.2. siRNA Transfeksiyonu	36
3.3. Hücre Canlılığı/Sitotoksosite Testi - MTS Deneyi	37
3.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Analizi	40
3.4.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu.....	42
3.4.2. cDNA Sentezi	43
3.4.3. RT-PCR Analizi.....	43
3.5. Western Blot.....	45
3.5.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....	45
3.5.2. Protein Miktar Tayini	46
3.5.3. Immunoblot Analizi.....	47
3.6. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Hücre Sitotoksosite Ölçümü.....	52
4.2. siRNA Transfeksiyonu ve OTA Muamelesinin HK-2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	53
4.3. p53 siRNA ile p53 Geninin Susturulmasının ve OTA'nın Hücre Döngüsüne Olan Etkisinin Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Değerlendirilmesi	55
4.3.1. p53 siRNA ile Transfekte Edilen HK-2 Hücrelerinde p53 Geninin Ekspresyonu.....	56
4.3.2. p53 siRNA ile Transfekte Edilen HK-2 Hücrelerinde OTA'nın Siklin D1 ve Siklin E1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi	58
4.4. p53 siRNA ile p53 Geninin İnhibisyonu ve OTA'nın Hücre Döngüsüne Etkisinin Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi.....	61
4.4.1. p53 siRNA ile Transfekte Edilen HK-2 Hücrelerinde OTA Muamelesi Sonucu Siklin D1, Cdk 4 ve Cdk2'nin Protein Ekspresyon Düzeyleri	62
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	79
ÖZET.....	81
ABSTRACT	82
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ.....	90

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta\psi_m$: Mitokondriyal membran potansiyeli
μ	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
10-OH-OTA	: 10-hidroksiokratoksin A
4-OH-OTA	: 4-hidroksiokratoksin A
8-OHdG	: 8-hidroksi-2- deoksiguanozin
Ago	: Argonaute proteini
ARE	: Antioksidan yanıt elemanı
ATM	: Ataksi telenjiiktazi mutanı
ATP	: Adenozin trifosfat
ATR	: Rad-3 ilişkili ataksi telenjiiktazi
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
BCIP/NBT	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium
Bcl-2	: B-hücreli lenfoma-2
BCP	: 1-bromo-3-kloropropan
CaCo-2	: İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
CAK	: Cdk-aktifleştiren kinaz
CDI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
DMEM/F-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksi nükleotid tri fosfat
dsRNA	: Çift iplikli RNA
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EF1A	: Uzatma Faktörü 1 Alfa
eIF4EBP1	: Translasyon başlama faktörü 4E bağlayıcı protein 1
ERK	: Ekstraselüler sinyal regülasyonlu kinaz

FBS	: Fetal sığır serumu
GADD45	: Büyüme durdurucu ve DNA hasar-arttırıcı protein 45
GAPDH	: Gliseralaldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GES-1	: İnsan mide epitelyum hücre hattı
gr	: Gram
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HDAC	: Histon deasetilaz
HEK293	: İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HepG2	: İnsan hepatoma kökenli hücre hattı
Het-1A	: İnsan özofagus epitelyum hücre hattı
HK-2	: İnsan böbrek proksimal tübül epitel hücre hattı (Human Kidney-2)
HNF4α	: Hepatosit nükleer faktör 4 α
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktör-1
IHKE-1	: Ölümsüzleştirilmiş insan böbrek epitel hücreleri-1
JNK	: c-Jun-N-terminal kinaz
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
LLC-PK1	: Domuz böbrek epitelyal hücre hattı
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
mg	: Miligram
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Haberci RNA
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazolyum
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol

Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OAT	: Organik anyon taşıyıcısı
OATP	: Organik anyon taşıyıcı polipeptid
OH[·]	: Hidroksil radikali
OP-OA	: Lakton-açık OTA
OTA	: Okratoksin A
OTα	: Okratoksin α
p14ARF	: CDKN2A, Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
p15	: CDKN2B, Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2B
p16	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A CDK4 inhibitörü
p21CIP	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A
p27	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B
p53	: Tümör protein 53
PAZ	: Piwi – Argonaute - Zwillie
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
PCNA	: Prolifere edici hücre çekirdek antijeni
PDK1	: Fosfoinositol bağımlı kinaz-1
PI3K	: Fosfatidil-inozitol-3 kinaz
pmol	: Pikomol
Rb	: Retinoblastoma
RISC	: RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi
RNAi	: RNA interferans
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
siRNA	: Küçük interferans RNA
TGF-beta	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
XPB	: Xeraoderma Pigmentosum Grup B DNA Helikaz
XPD	: Xeraoderma Pigmentosum Grup D DNA Helikaz

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Primer Dizilimleri	41
Tablo 2. Primer Konsantrasyonları	42



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı	4
Şekil 2.3. OTA'nın Moleküler Mekanizmalar Üzerine Etkileri	10
Şekil 2.4. Memelilerde Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi.....	23
Şekil 2.5.a. p53 Yolağı ve Etki Mekanizmaları.....	28
Şekil 2.5.b. p53'ün Hücre Döngüsündeki Önemi.....	31
Şekil 3.3.1. Hücrelerin sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı	39
Şekil 3.3.2. siRNA transfeksiyonu gerçekleşmiş ve OTA ile muamele edilmiş hücrelerin sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı	40
Şekil 3.5.2. Bradford yöntemine göre elde edilen protein standart grafiğı.....	47
Şekil 4.1. OTA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi	53
Şekil 4.2. p53 siRNA aracılı p53 geninin susturulmasının ve beraberinde OTA indüksiyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.3.1. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın p53 geni ekspresyonu üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.3.2.a. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Siklin D1 geni ekspresyonu üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.3.2.b. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Siklin E1 geni ekspresyonu üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.4.1.a. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Siklin D1 proteini ekspresyonu üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.4.1.b. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Cdk4 proteini ekspresyonu üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.4.1.c. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Cdk2 proteini ekspresyonu üzerine etkisi.....	66

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günlük hayatımızda sıklıkla tükettiğimiz birçok gıda maddesinde çeşitli küfler gelişebilmekte ve bunlar çeşitli toksik metabolitler oluşturmaktadır. Küfler, uygun koşullarda işlenmiş veya işlenmemiş gıdalarda çoğalarak bir yandan ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olarak ekonomik kayıplara sebebiyet verirken, diğer yandan da insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip toksik maddeleri oluşturarak halk sağlığını ciddi anlamda tehdit etmektedir. Bu toksik metabolitler insan ve hayvanlarda kanserojen, mutajenik, teratojenik, aterojenik ve östrojenik etkiler gibi akut ve kronik etkilere neden olabilmekte ve mikotoksin olarak adlandırılmaktadır (1, 2).

Mikotoksinler; başlıca *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* gibi mantar cinslerinin belirli nem ve ısı koşullarında oluşturdukları, düşük moleküler ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinler olup insan ve hayvanlarda, latent, subakut veya kronik toksikasyonlara neden olan sekonder metabolitlerdir (3-5). Yetiştirme süreci, hasat, işleme sırası, depolama evresi gibi üretimden tüketime kadar tüm evrelerde gıdalara bulaşabilir veya gıdalarda gelişebilirler. Toksin riskinin bulaşması bakımından hayvanlar doğrudan tehlike taşıyan faktörler olabildiği gibi, yaşamdaki büyüme sürecinde veya tüketim esnasında doğal biyodöngü ile bağlantılı olarak toksik maddelerin tüketiciye geçişinde etken faktör olabilmektedirler (3, 6). Mikotoksinlerle kontamine olmuş gıda ve yemlerin tüketilmesiyle ortaya çıkan hastalıklar mikotoksikozis olarak adlandırılmaktadır (5).

En sık karşılaşılan mikotoksinler; aflatoksinler, okratoksin, trikotesen, zearalenon, patulin ve fumonisin olarak sıralanabilir. Son yıllarda gıdalardan kaynaklanan bu toksik maddelerin organizma üzerindeki zararlı etkileri araştırmacılar tarafından sıklıkla ve büyük bir önemle çalışılmaktadır (5, 7, 8). Okratoksinler (A, B ve C), *Aspergillus* ve *Penicillium* mantarlarının sekonder metabolitleri olup özellikle A formu insan ve hayvanlarda en zararlı etkiyi göstermektedir (9). İnsan sağlığı üzerindeki tüm bu olumsuz etkilerinden dolayı Okratoksin A (OTA), Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC) tarafından muhtemel karsinojen olarak gruplandırılarak “Grup IIB” sınıfına dahil edilmiştir (10). Okratoksin A, bir taraftan dolaylı olarak karsinojenik etkileri nedeniyle

epigenetik karsinojen olarak adlandırılmasına karşılık (11) diğer taraftan da DNA'ya bağlanabilmesi nedeniyle doğrudan karsinojen olarak kabul edilmektedir (5). Son yıllarda OTA'nın toksik ve karsinojenik etkilerini açıklamayı amaçlayan birçok çalışma yapılmıştır. OTA'nın genotoksik etkisi, kanser gelişimindeki rolü ve bu yöndeki hücrel mekanizmaları günümüzde halen devam eden önemli bir tartışma konusudur. Birçok araştırmacı grup OTA'nın genotoksik olduğu sonucuna varmıştır. Ancak diğer bazı gruplar, karsinojenitenin direkt olarak genotoksik mekanizmalar aracılığıyla gelişmediğini, ancak oksidatif stres gibi indirek mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıktığını belirtmektedir (5, 12-14).

Tüketilen besinlerle vücuda alınan OTA'nın emilimi, özellikle ince bağırsaklar olmak üzere gastrointestinal sistemde gerçekleşir. Emilim sonrasında kan yoluyla vücuda dağılan OTA, düşük miktarlarda karaciğer, kas ve yağ doku gibi çeşitli hücrelerde birikmektedir (15). Ancak birçok klinik ve deneysel çalışma verileri OTA'nın başlıca hedef organının böbrek olduğunu vurgulamaktadır. Böbreklerde OTA'ya özgü özel taşıyıcılar bulunduğu ve bu nedenle birikimin en fazla bu dokuda gerçekleştiği düşünülmektedir (5, 15-17).

Böbrekteki olumsuz etkilerinin yanı sıra OTA aynı zamanda hepatonefrotoksik, genotoksik, teratojenik ve immünoşüpresif etkilere sahiptir (11, 18, 19). Veriler OTA'nın hücrede, sinyal ileti yollarında, DNA ve protein sentezinde, lipid peroksidasyonunda, glikoneogenezde, mitokondriyal fonksiyonlarda, apoptotik ve otofajik yollarda, DNA tamir mekanizmasında ve hücre döngüsünde değişikliklere neden olduğunu göstermektedir (5, 9, 17, 20-25).

Okratoksin A, hücrenin en önemli anahtar düzenleyicilerinden olan hücre döngüsünde G1/S, S ve G2/M kontrol noktalarında bulunan mediyatörler ile etkileşime girerek değişikliklere neden olmaktadır (18, 22, 24, 26, 27). Bilindiği üzere DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü, G1/S, S ve G2/M kontrol noktalarında durdurulur, tamir için hücreye zaman kazandırılır ve tamirde görevli genlerin transkripsiyonu hızlandırılır. Hücre döngüsünün kontrolünde, siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve siklinler birlikte aktivite göstermekte olup, hücre döngüsünün ilk kontrol noktası olan G1 evresinde siklin D-Cdk4/Cdk6, S evresinde siklinE-Cdk1/Cdk2 ve siklinA-Cdk1/Cdk2, daha sonraki G2 evresinde siklinA-Cdk1 ve M

evresinde ise siklinB-Cdk1 görev almaktadır (28-31). Hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan siklinler ve siklin bağımlı kinazları da kontrol eden daha üst mediyatörler bulunmaktadır. Bunlar, büyüme faktörleri, p53, Myc, TGF-beta, Ras, E2F gibi sinyal proteinleridir. Hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan tüm bu mekanizmalarda meydana gelen düzensizlik genomik kararsızlığa, anormal hücre proliferasyonuna ve hatta karsinogenezin başlamasına sebep olmaktadır.

p53, hedef genlerde transkripsiyonun aktive edilmesinde veya baskılanmasında görev alan, hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, hücre metabolizması ve yaşlanmasını içeren hücresel işleyişin düzenlenmesinde merkezi rol alan bir transkripsiyon faktörüdür. p53 geni normal hücrelerin malign hücreye dönüşmesinde kritik bir öneme sahiptir ve inaktivasyonu birçok kanser tipinin gelişmesine neden olmaktadır (32, 33). Bu yüzden p53 aktivitesinin düzenlenmesi hem normal hücrelerin büyümesinde hem de tümörün baskılanmasında kritik bir öneme sahiptir. p53 hücre büyümesi baskılanmasında etkili olup hücre döngüsünün duraklatılmasındaki mekanizmalarda kritik bir role sahiptir. p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyararak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır. p53 ayrıca, mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan c-myc ve c-fos gibi genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile fiziksel olarak etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında da rol almaktadır (34).

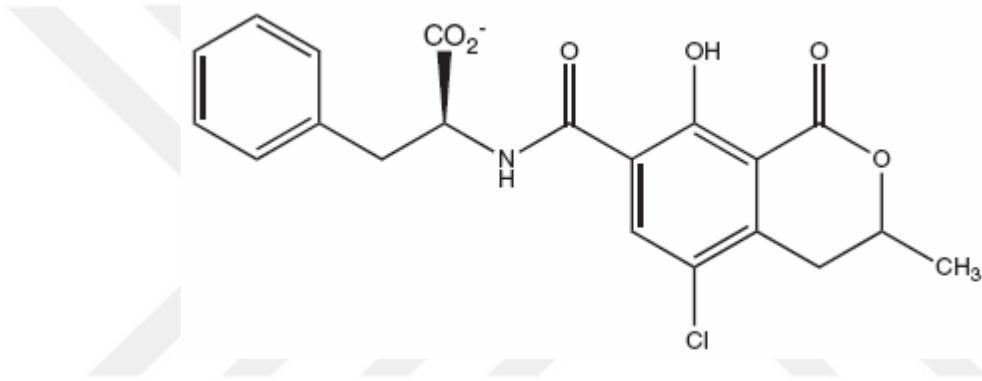
Yapılan çalışmalarda çeşitli hücre tiplerinde OTA'nın hücre döngüsünü G1, S ve G2 evrelerinde duraklatarak hücre döngüsünü önemli derecede etkilediği ifade edilmiştir (18, 22, 24, 26, 27). Ancak hücre döngüsünü kontrol eden birçok üst düzenleyici olduğu göz önüne alındığında OTA'nın bu etkisinin hangi üst mekanizma aracılığıyla olduğu, hücre döngüsünün üst seviyedeki kontrolünü sağlayan hangi anahtar mediyatörleri aracı olarak seçtiği yönünde net bir moleküler mekanizma hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu mekanizmayı aydınlatmak amacıyla hipotezimizi, OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu etkisini hücre döngüsünün kontrolünde kritik role sahip olan p53 aracılığı ile yapıp yapmadığını araştırmak üzerine kurduk.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OTA'nın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Okratoksin A, 1965 yılında van der Merwe tarafından *Aspergillus ochraceus* Wilh. mantar türünün toksik metaboliti olarak keşfedilmiştir (35). OTA bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından oluşturulan, yaygın bulunan, en önemli ve zararlı mikotoksinlerden biridir (7, 21).

OTA, dihidroizokumarinik halka ve bu halkaya peptid (amid) bağıyla bağlanmış bir molekül olan L-fenilalanininden oluşmaktadır (9, 17).



Şekil 2.1. Okratoksin A'nın Kimyasal Yapısı

Beyaz kristal toz şeklinde, kokusuz, ısıya dayanıklı, suda zayıf çözünen bir yapıya sahip olan OTA, orta sıcaklık derecelerinde stabildir ve kaynatma, fırınlama, kızartma ya da fermantasyon gibi pek çok gıda prosesi sırasında belli bir dereceye kadar bozulmadan kalabilmektedir. OTA, 121⁰C'de 3 saat otoklavlama işlemine karşı direnç göstermekte, 250⁰C'de bile ancak kısmi olarak parçalanmaktadır (2, 9). Sıcaklık, su aktivitesi, substrat kompozisyonu, uygun hava koşulları ve iklim, gıda içeriğine uygun olmayan paketleme yöntemleri besinlerde toksinin ortaya çıkmasına etken faktörlerdir. Mikroçevreye bağlı olarak OTA, non-iyonik, monoanyonik (OTA⁻) ve dianyonik (OTA⁻²) formlarda bulunabilmektedir (9).

Okratoksin A, tahıllar (mısır, buğday, arpa, yulaf, çavdar), baklagiller, kümes hayvanları ürünleri, süt ve süt ürünleri, kurutulmuş gıdalar, baharatlar, çay, kahve, kakao, şifalı bitkiler, bira, şarap gibi çok çeşitli gıda maddesinde yaygın olarak bulunmakta ve sürekli maruziyeti insanlarda ciddi sağlık sorunlarına neden

olmaktadır (9, 22, 23). Bu nedenle OTA'dan kaçınmak neredeyse imkansız hale gelmiştir ve günümüzde küresel bir endişe olarak karşımıza çıkmaktadır (22, 36). IARC (1993) birçok hayvan çalışmasından elde edilen karsinojenite verilerine göre OTA'nın Grup 2B insan karsinojeni olabileceğini bildirmiştir (10). Yüksek sıklıkla OTA maruziyetinin insanlarda kansere kadar varan birçok sağlık problemini beraberinde getirdiği belirtilmektedir (7).

2.2. OTA'nın Emilimi, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı

2.2.1. Emilim

Okratoksin A özellikle ince bağırsak olmak üzere gastrointestinal sistemin üst kısmından emilmektedir. Toksinin emilim miktarı türe bağlı olarak değişmektedir. İnsanlarda yaklaşık %93'lük kısmı ağızdan alınarak etkisini göstermeye başlarken, deney hayvanlarında ise non-iyonik ve mono anyonik formları özel taşıyıcı mekanizmalar olmaksızın mide ve jejunumda emilmektedir (9).

Farklı hayvan modelleri kullanılarak OTA'nın toksik etkileri ve toksinin organizmadaki ana hedefleri çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Karaciğer, immun sistem ve beyin hücrelerinde olan etkilerine rağmen OTA'nın hedef dokusunun böbrek olduğu tespit edilmiştir. Böbreklerdeki bu hassasiyetin OTA toksikokinetiğinin sonucu olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir. Böbrek dokularında kan akışının oldukça yüksek olması OTA'nın diğer organlara göre daha fazla böbrekte dağılmasına sebep olmaktadır. Serbest OTA proksimal tübüllerde salınıp daha sonra tekrar proksimal tübüllerden ve çıkan Henle kulpundan reabsorbe edilmektedir. Bu toksikokinetik özellikler sonucunda en yüksek toksik konsantrasyonun papilla ve iç medullada gözleendiği ve buna bağlı olarak böbrek dokusunda OTA'nın biriktiği belirtilmektedir (17).

OTA'nın toksikokinetiği daha ayrıntılı olarak incelendiğinde; gastrointestinal sistem tarafından absorbe edildikten sonra OTA birincil olarak dolaşım sisteminde albümine bağlanmakta ve yarılanma ömrü albümin tarafından belirlenmektedir. Albümin dolaşım sisteminde % 60 oranında en bol bulunan plazma proteini olup yüksek bir afiniteyle OTA'yı bağlamaktadır. Bu nedenle dolaşım sisteminde OTA

%99,8 albümine bağlı olarak bulunmaktadır (9). OTA'nın insanlarda kanda yarılanma ömrü 853.2 saatten fazla olarak tespit edilmiştir. Sağlıklı populasyonlarda OTA'nın plazma konsantrasyon aralığı yüzlerce pmol/L'den birkaç nmol/L'ye kadar değişebilirken, endemik bölgelerde ise 100 nmol/L'yi aşmaktadır. Albümine bağlanması nedeniyle OTA, düşük oranda glomerüler filtrasyon geçirse bile, bir kısmı yeniden absorbe edilir ve bu durum böbrek tübül hücrelerinde toksinin birikmesine neden olur (9, 17). Bu mekanizma; OTA'nın, nefronun post-proksimal kısmında kısmi olarak reabsorbe olması ve özellikle çıkan Henle kulpunda ve kanallarda birikmesi sonucu proksimal tübül lümeninde serbest OTA konsantrasyonunun seruma göre 10 kat daha fazla olması ile de açıklanmaktadır. OTA tarafından oluşturulan nefrotoksik değişikliklerin sıklıkla proksimal tübüllerden oluşan böbreğin kortikal bölümünde gerçekleştiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, reabsorbsiyon sonucu taşınmada kanal hücrelerinde birikme ve salgı taşınması gibi iki ana basamak, OTA'nın proksimal tübül hücrelerinde yoğun bir şekilde bulunmasına ve toksisiteside proksimal tübül hücrelerinin hedef olmasına neden olmaktadır. Henüz açıklanamayan birçok morfolojik değişikliğin de proksimal tübüllerle ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle OTA'nın böbreğe özgü toksik etkisini açıklamada toksikokinetik mekanizma öne çıkmaktadır (17).

OTA insan ve hayvanlarda tubular-interstitial nefropatiye sebep olmasının yanı sıra insanlarda endemik nefropati gelişimine de neden olan etiyolojik ajanlardan biri olarak değerlendirilmektedir. Toksin nefron fonksiyonlarını, renal kan akışını, glomerüler ve tübüler fonksiyonları etkileyerek değişikliğe neden olmaktadır. OTA'nın ana hedefi proksimal ve distal tübüllerdeki epitelyal hücreler ve interstitial hücrelerdir. Proksimal tübüllerdeki orta (S2) ve terminal (S3) bölgeler OTA'nın toksik etkilerine karşı en hassas bölgeler olarak belirtilmiştir. (21)

2.2.2. Dağılım

OTA'nın doku dağılımı toksin miktarı, beslenme şekli, diyet içeriği ve organizmanın sağlığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Hedef dokuları böbrek ve karaciğer, iskelet kası, yağ doku ve beyin olarak belirtilmektedir. Böbrek ve karaciğer dokusunun maruziyeti özel transport mekanizmalarına sahip olmaları ile de

açıklanmaktadır. Böbreklerde organik anyon taşıyıcıları (OAT) ve karaciğerde organik anyon taşıyıcı polipeptidler (OATP) OTA'nın hücrel alımından sorumlu başlıca moleküler yapılarıdır. Bazolateral OAT'ler OTA'nın kandan böbrek tübül hücrelerine alımından sorumlu tutulurken, apikal OAT4 ise üriner reabsorpsiyonu gerçekleştirerek OTA'nın tekrar böbrek tübül hücrelerinde birikmesine neden olmaktadır. Böbreğe özgü bazı OATP'ler de OTA'nın hücrel alımının bir kısmını gerçekleştirmektedir (9).

OTA'nın plasentaya geçiş mekanizması çok az bilinmesine karşılık aktif transport ile plasentaya geçtiği ve anneye oranla fetüs kanında iki kat daha fazla toksinle karşılaştığı bildirilmektedir (37). Fetal kan, maternal kan dolaşımından renal proksimal tübüller ve intestinal epitel hücreleri gibi taşınma yolağındaki aracı taşıyıcılar olan polarize hücreler tarafından ayrılmaktadır. Genetik, çevresel ve patolojik faktörlerin plasental OTA taşınmasında etkili olduğu çalışmalarda belirtilmektedir (15, 38).

2.2.3. Metabolizma

OTA'nın metabolize olduğu başlıca organlar karaciğer ve böbrektir. OTA, portal ven aracılığıyla karaciğere ulaşarak burada Faz I ve Faz II enzimleri tarafından metabolize edilebilmektedir. Faz I tip reaksiyonlar en çok sitokrom p450 ailesi ile ilişkilidir. Organik anyon taşıyıcı polipeptid 1 (OATP1) üzerinden hepatositlere gelen OTA, Faz I reaksiyonlar sonucunda sitokrom p450 enzimi sayesinde hidrosile edilerek daha az toksik etkiye sahip Okratoksin α 'ya (OTA α ; 5- kloro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-3,4-dihidroizokromen-7-karboksilikasit) dönüşmektedir (15). OTA'nın başlıca metabolitleri çok düşük toksisite göstermekle beraber bazı metabolitleri ise toksik değildir. Bağırsaklarda OTA'nın bir kısmı proteolitik enzimler ve bakteriyel mikroflora enzimleri tarafından Okratoksin α 'ya hidrolize edilmektedir. Alkali koşullarda ise OTA'nın lakton halkası açılır ve bunun sonucunda oldukça toksik bir bileşik olan lakton-açık OTA (OP-OA) oluşur. OTA'nın mikrozomal oksidasyon ürünü toksisitesi daha düşük olan 4-hidroksiokratoksin A (4-OH-OTA) iken, toksisitesi düşük olan diğer metabolit ise 10-hidroksiokratoksin A (10-OH-OTA)'dır. Buna ek olarak, OTA'nın hidrosil metabolitleri oluşumunda farklı türlerin etkili

olduğu gözlenmiştir. Bunun dışında OTA'nın deklorasyonu sonucu daha az genotoksik olan Okratoksin B'ye dönüştüğünü belirtilmektedir. Faz I sonucunda hidroksile olmuş OTA, Faz II reaksiyonları ile de sülfat, glukonat, glutatyon, metil, asetil gibi maddeler ile konjuge edilerek polar hale getirilir ve böylece idrarla atılımı sağlanır (9).

2.2.4. Atılım

OTA, kümülatif toksik etkiye sahip absorpsiyonu hızlı ancak atılımı yavaş olan bir bileşiktir. Tüm türlerde plazmadan toksinin uzaklaştırılmasında hem fekal hem de idrar yoluyla atılım önemli rol oynamaktadır (15). OTA'nın albümine güçlü bağlanması nedeniyle glomerüler filtrasyonla atılımının önemsenecek kadar az olduğu belirtilmektedir. Birincil olarak atılımın tübüler sekresyonla gerçekleştiği gözlenmektedir. Toksinin tübüler geri emilimi OTA'nın hücre içi birikmesinde kısmen de olsa sorumlu tutulmaktadır. In vivo ve in vitro çalışmalar organik anyon taşıyıcılarının hücre içi OTA birikimindeki önemini vurgulamaktadır. İnsanda böbreklerde OAT1, karaciğer ve beyinde OAT3 OTA'nın kandan dokuya geçişinde aktif olarak görev almaktadır. MRP2 taşıyıcıları OTA'nın böbrek tübül hücrelerinden idrara geçişinde aktif rol almaktadırlar (9).

İnsanda idrar, OTA ve OT α 'nın başlıca atılım aracıdır. OTA tüketiminden birkaç gün sonra idrarda gözlenmektedir. Tüketilmiş olan doza bağımlı olmaksızın OTA'nın idrar yoluyla atılımı düşük miktarlarda gerçekleşmektedir (ortalama 20 ve 80 ng/gün). OTA alınımı serbest OTA konsantrasyonuna bağılıdır ve serumda albümine bağlanan OTA tarafından sınırlandırılmaktadır. Bu yüzden, alınan OTA'nın kanda ve idrarda olması arasındaki ilişki kompleks bir sorundur (7).

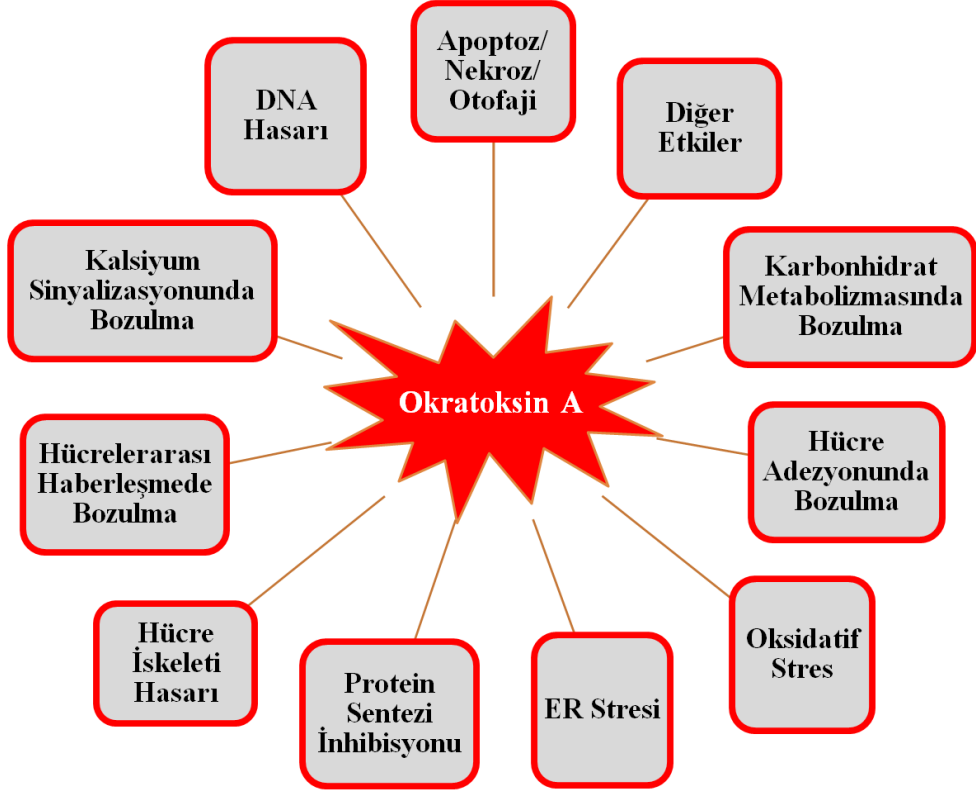
OTA ve metaboliti olan OT α fekal yolla da atılmaktadır. Fekal atılım safra atılımı nedeniyle oldukça etkilidir (15). OTA ve metabolitlerinin safra yoluyla atılımında fekal atılım başlıca yol olmakla birlikte ince bağırsaklara salınımında olduğu belirtilmektedir. Safraya atılan hidrolize olmuş OTA, bağırsaklardaki mikroflora tarafından yeniden emilir böylece enterohepatik sıklusa girdiği gözlenir. Güçlü bir şekilde albümine bağlanma özelliği OTA'nın enterohepatik dolaşımında artmasına neden olmakta ve vücuttan atılımını yavaşlatmaktadır (9).

OTA'nın anne sütü ile de atılımı olmakta ve bebekler bu yolla OTA'ya maruz kalabilmektedir. Bununla birlikte anne sütüne geçen OTA miktarı kanda bulunan OTA konsantrasyonuna göre oldukça düşük gözlenmiştir. (7, 15). Birçok çalışmada anne sütünde bulunan OTA seviyesi rapor edilmiş ve bireysel ve coğrafi değişikliklerin anne sütündeki OTA seviyesini etkilediği belirtilmiştir (15). Anne sütünde OTA kontaminasyonunun annenin beslenme alışkanlıkları ile de ilişkili olduğu saptanmıştır. Bitkisel kökenli gıdalarla beslenenlerde bu kontaminasyon riski en yüksek etkiye sahipken, hayvansal kökenli gıdalarla beslenenlerde daha düşük olduğu belirlenmiştir. Türkiye'nin de dahil olduğu bazı ülkelerde anne sütünde bulunan OTA konsantrasyonunun Avrupa ülkelerine göre 100 kat daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Anne sütünde bulunan OTA konsantrasyonunun kana göre çok düşük olmasına rağmen potansiyel bir sağlık tehdidi olabileceği sonucuna varılmıştır (7).

2.3. OTA'nın Moleküler Mekanizmalar Üzerine Etkileri

Okratoksin A'nın nefrotoksik, hepatotoksik, embriyotoksik, teratöjenik, nörotoksik, immunotoksik, genotoksik ve karsinojenik olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır (7, 11, 18, 19). Bununla birlikte OTA'nın etki yolları hala tartışma konusudur. OTA'nın direk genotoksikite, indirek oksidatif DNA hasarı, protein sentezinin inhibisyonu, epigenetik mekanizmalarda değişim, oksidatif stres, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, mitozun engellenmesi, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ve kalsiyum hemostazı gibi spesifik sinyal yollarını da içeren birçok mekanizma üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (39).

OTA'nın sitotoksik etkisi toksin konsantrasyonuna ve organizmanın/hücrenin maruziyet süresine bağlı olarak değişmektedir. Düşük toksin konsantrasyonları hücrede spesifik yollar aracılığıyla ikincil mesajcıları ve diğer hedef hücreleri etkilemekte, belirli taşıyıcıların inhibisyonuna ve normal hücre hemeostazının bozulmasına neden olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda maruziyet ise hücre metabolizmasında bozukluklara, makromolekül sentezinin inhibisyonuna, lipid peroksidasyonunun uyarılmasına, mitokondri bütünlüğünün bozulmasına ve epitelyal tübül hücrelerinin nekroza uğramasına sebep olmaktadır (17, 21).



Şekil 2.3. OTA'nın Moleküler Mekanizmalar Üzerine Etkileri

2.3.1. Protein Sentezinin İnhibisyonu

In vivo ve in vitro çalışmalar OTA'nın protein sentezi inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir (9). OTA, fenilalanin-tRNA sentetaz tarafından katalizlenen reaksiyonda fenil alanin ile yarışarak protein sentezini inhibe etmektedir (1). Fenilalanin sentetazın inhibisyonunda OTA'nın fenilalanin kısmının, fenilalanin ve toksin arasındaki rekabet nedeniyle önemli olduğu düşünülmüş ancak daha sonraki çalışmalar inhibisyonda fenilalanin kısmının daha az öneme sahip olduğunu, izokumarin yapısındaki modifikasyonların daha anlamlı etkiler oluşturduğunu göstermiştir. OTA ayrıca fenilalanin hidroksilazın da inhibitörü olup, OTA'nın in vivo deneylerde fenilalanin t-RNA sentetaz ve fenilalanin hidroksilaz üzerindeki etkilerinin, yüksek dozlarda OTA uygulanması sonucunda gözlemlendiği belirtilmektedir. Ayrıca protein sentez inhibisyonunun farklı yolları da olduğu, hücre içi etkiler sonucunda transkripsiyonu ve birçok proteini etkileyebildiği belirtilmektedir (9).

Protein sentez inhibisyonunda OTA'nın birincil olarak DNA ve RNA'nın sentezini inhibe ettiği düşünülmektedir. Son çalışmalarda devamlı karsinojenik dozda OTA ile beslenen ratların RNA ve protein ekspresyonunda azalmanın meydana geldiği ve bunun da protein sentez inhibisyonuna neden olduğu belirtilmektedir (11). Bununla birlikte prostaglandin F2 reseptörü negatif regülatör (Ptgfrn) ve ökaryotik translasyon başlama faktörü 4E bağlayıcı protein 1'in (eIF4EBP1) olumsuz etkilenecek iki genin düzenlenmesinde artış meydana geldiği belirtilmektedir. Buna karşın protein sentezinde görev alan uzama faktör-1 alfa-1 (eEF1A-1) geninin düzenlenmesinde azalışın olduğu belirtilmektedir.

RNA ekspresyonunun azalması ile ilgili çalışmalarda, OTA'nın gen susturma mekanizmalarını aktive ettiği belirtilmektedir. OTA'nın böbrek dokusunda histon deasetilaz (HDAC) aktivitesini arttırdığı, HDAC proteinlerinin transkripsiyonun inhibisyonuna öncülük eden nükleozomal histonların deasetilasyonundan sorumlu olduğu bildirilmektedir. HDAC proteinlerinin artışı da kanser gelişiminde rol almaktadır (40).

2.3.2. Transkripsiyon Faktörü Aktivitelerinin Düzenlenmesi

Diyetlerinde devamlı OTA bulunan ratların böbrek dokularında yapılan mikroarray çalışması sonucunda transkripsiyon faktörlerinden olan Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktöre (Nrf2) bağımlı genlerin ekspresyonlarında azalmanın olduğunu belirlenmiştir (11). OTA kaynaklı inhibisyonun elektroforetik hareketlilikte ve antioksidan yanıt elemanlarında (ARE) değişime neden olarak Nrf2 aktivitesini etkilediği belirtilmektedir (41). Hücre kültürü çalışmalarında OTA kaynaklı etkilerin önlenmesinde Nrf2'in tedavide başlatıcı olduğu belirlenmiştir. Nrf2 aktivasyonunun hayvan modellerinde ve insan çalışmalarında karsinogenezin başlamasını engellediği belirtilmektedir. Gen profil analizleri transkripsiyon faktörü hepatosit nükleer faktör 4 α (HNF4 α) tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonlarında da azalmalar olduğunu belirtmektedir (11). Hücre kültüründe Nrf2'de olduğu gibi HNF4 α 'nın da OTA kaynaklı aktivitesinde değişiklikler meydana gelmektedir. HNF4 α düzenleyici genler ksenobiyotik metabolizmasındaki enzimleri ve transport proteinleri içeren çeşitli fonksiyonlardaki proteinlerin kodlanmasında

görev almaktadır. HNF4 α tarafından düzenlenen transport proteinleri olan Oat1, Oat-k1 ve Oatp1, özellikle OTA'nın transportunda seçici olup OTA kaynaklı hem RNA hem de protein seviyelerinde önemli azalmalara neden olmaktadır. Hücre kültüründe OTA'nın Nrf2 ve HNF4 α 'nın aksine, Nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (40, 42, 43).

2.3.3. Mitokondriyal Fonksiyon Bozuklukları ve Oksidatif Stres

Okratoksin A'nın nefrotoksik etkisinin, enerji eksikliği ve reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olan mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir. İzole edilen renal proksimal tübül hücreleri geniş aralıkta OTA konsantrasyonları ile muamele edildiğinde, mitokondriyal solunumun inhibisyonuna neden olduğu gözlenmiştir. İnsan böbrek proksimal tübüler epitelyal hücrelerinde (HK-2), insan hepatoma kökenli hücrelerde (HepG2), insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde (CaCo-2), domuz böbrek epitelyal hücreleri (LLC-PK1) gibi böbrek hücreleri ve kanser hücre hatlarında OTA, solunum ve oksidatif fosforilasyonu etkileyerek mitokondriyal membranın bozulmasına ve solunum zincirinde elektron transfer aktivitelerinin süksinat destekli engellenmesine neden olmaktadır (12, 18, 44, 45). Renal korteksten izole edilen mitokondrilerde ATP sentezinin mikromolar konsantrasyonlarda OTA tarafından baskılandığı belirtilmektedir. Bu verilerden farklı olarak, OTA'nın nanomolar konsantrasyonlarının, hücre kültürlerinde mitokondriyal aktivitenin uyarılmasını sağladığı ifade edilmektedir. Buna göre, OTA toksisitesi ve karsinojenitesinde mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının önemli rolü olduğu, ancak kronik olarak düşük dozda OTA maruziyetlerinin etkisini açıklığa kavuşturmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (46).

2.3.4. Reaktif Oksijen Türleri

Süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksiti (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH[·]) gibi reaktif oksijen türleri (ROS), hücre büyümesi, transformasyonun başlatılması ve ilerlemesi, hücre ölümü gibi önemli biyolojik süreçleri etkilemektedir. ROS seviyesinin fazla artışı lipid, protein ve DNA'yı içeren biyomoleküllerin

oksidasyonuna ve biyolojik fonksiyonlarının değişimine neden olarak hücre hasarına ve hücre döngüsünün duraklatılmasına neden olmaktadır (47). ROS üretimi mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına eşlik etmektedir ($\Delta\psi_m$). Mitokondriyal fonksiyonel değişiklikler $\Delta\psi_m$ değişmesine neden olan faktörlerin başında gelmektedir. Hücre içi ROS birikmesi apoptozun başlamasına neden olmakta ve hücre sinyalizasyonunu da etkilemektedir. Özet olarak ROS, normal hücre büyümesi, hücre ölümü ve hücre yaşlanması gibi önemli birçok biyolojik süreci etkilemektedir. ROS'un çok fazla üretimi geçici veya kalıcı hücresel değişimlere neden olmakta, DNA üzerinde geri dönüşümsüz oksidatif hasara neden olarak genomik kararsızlığa ve sonucunda hücrelerin malign şekle dönüşmesine sebebiyet vermektedir. Bilindiği gibi DNA hasarını da içeren oksidatif hasar sonucunda hücre döngüsünün duraklatılması ve apoptoz gibi süreçler başlamaktadır. Hücre içi ROS seviyesinin artması direk DNA'yı etkilemekte ve genellikle çeşitli tipte DNA hasarına neden olmaktadır (22).

OTA muamelesi yapılan hücrelerde hücre içi ROS seviyesinin arttığı belirtilmektedir. OTA'nın ROS üretimini indüklediği ve oksidatif hasara neden olduğu çalışma verileri ile desteklenmektedir (18, 22). OTA'nın HK-2 hücrelerinde, insan hepatoma kökenli hücrelerde (HepG2), insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde (CaCo-2), domuz böbrek epitelyal hücreleri (LLC-PK1) gibi böbrek hücreleri ve kanser hücre hatlarında ROS seviyesini ve oksidatif hasarı arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca OTA'nın ROS seviyesini arttırarak oksidatif DNA hasarına neden olduğu insan bağışıklık sistemi hücreleri olan insan mononükleer periferel kan hücrelerinde de gösterilmiştir (12, 18, 44, 45).

2.3.5. DNA Hasarı

DNA hasarı tümör oluşumuna neden olan mutasyonların oluşmasına ve hücre ölümüne sebebiyet veren genomik yapıda değişikliklere neden olmaktadır. DNA hasarı sonucunda hücre döngüsünde G1'den S evresine geçişte, replikasyonda ve G2'den mitozaya geçişte duraklamalar meydana gelerek hasarlı DNA'nın tamiri veya hasarlı hücrenin apoptoz ile eliminasyonu sağlanmaktadır (26).

DNA hasarı, karsinomun başlaması ve gelişmesinde kritik rol oynayan mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir. ROS'un fazla oluşumu DNA hasarına bağlı karsinomun gelişmesinde önemli bir role sahiptir. Yukarıda belirtildiği gibi OTA da ROS oluşumuna sebebiyet verdiği için OTA maruziyeti ve DNA hasarı arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir. OTA maruziyeti sonucunda insan böbrek proksimal tübüler epitelyal hücrelerinde (HK-2), domuz böbrek epitelyal hücrelerinde (LLC-PK1), insan mide epitelyum hücrelerinde (GES-1), insan hepatoma kökenli hücrelerde (HepG2), insan özofagus epitelyum hücrelerinde (Het-1A), insan mononükleer periferel kan hücrelerinde ve insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde (CaCo-2) DNA hasarının meydana geldiği gösterilmiştir (12, 18, 26, 44, 45, 47, 48).

OTA'nın neden olduğu DNA hasarının etkisi insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293), DNA çift zincir kırıkları ve tek zincir kırıklarında etkili bir yöntem olan comet metodu ile değerlendirildiğinde, OTA'nın önemli derecede DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca DNA çift zincir kırıklarında etkili bir marker olan γ -H2AX'in OTA indüklü HEK293 hücrelerinde artan protein ekspresyonu da OTA'nın DNA hasarına neden olduğunu desteklemektedir (22). GES-1 hücrelerinde yapılan çalışmalarda OTA'nın tek ve çift zincir DNA kırıklarına neden olduğunu gösterilmiştir. Çift zincir kırıklarının tamiri birçok mekanizma aracılığıyla ile gerçekleşmektedir. Homolog rekombinasyon tamiri başlıca hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde gerçekleşmekte olup sitotoksik bir ajanın neden olduğu DNA hasarında Rad51'in sorumlu olduğu çalışmalarda gösterilmektedir. OTA'nın da doza ve zamana bağlı olarak GES-1 hücrelerinde DNA çift zincir kırıklarına neden olduğu ve Rad51'in ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (47, 49).

OTA'nın insan mononükleer periferel kan hücrelerinde, oksidatif DNA hasarının belirlenmesinde önemli bir biyomarker olan 8-OHdG seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca DNA tek ve çift zincir kırıklarının analizi comet metoduyla yapıldığında insan mononükleer periferel kan hücrelerinde OTA'nın DNA hasarına sebebiyet verdiği belirlenmiştir. Çift zincir kırıklarının belirlenmesinde önemli bir marker olan γ -H2AX protein ekspresyonundaki artışın belirlenmesi ile de bu veriler desteklenmiştir (18). OTA'nın Het-1A hücrelerinde tek zincir kırıklarına ve kromozomal aberasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (26). p53'den yoksun gpt

delta farelerin böbreklerinde ve p53 bulunan fare böbreklerinde OTA'nın etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada her iki grupta da OTA'nın DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte OTA uygulanmış p53 eksik farelerde γ -H2AX düzeyi p53 varlığına göre daha yüksek bulunmuş olup, p53'ün DNA hasarını ve çift zincir kırıklarının meydana gelmesini engellediği belirlenmiştir. p53 eksik farelerde çift zincir DNA tamir mekanizmasının başlıca yollarından olan homolog rekombinasyonla ilişkili genlerin (Rad51, Rad54, Brip1, Bard4) mRNA ekspresyonlarında artışın meydana geldiği belirlenmiştir (50).

2.3.6. Apoptoz, Nekroz, Otofaji

İnsan hücre hatları ve deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda OTA'nın programlı ve programsız hücre ölümünü arttırdığı belirtilmektedir. OTA indüklü hücre ölümü çoğunlukla programsız hücre ölümü nekroz veya programlı hücre ölümü apoptozis ile gerçekleşmektedir. Nekrozda hücre ölümü güçlü bir patolojik uyarı sonucunda gerçekleşirken, apoptozda hücre ölümü son derece denetimli patolojik ve fizyolojik bir süreçle düzenlenmektedir. Apoptoz; radyasyon, sıcaklık, sitokinler, serbest radikaller ve toksinler gibi birçok uyarıcı tarafından indüklenebilir. OTA indüklü hücre ölüm mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Genel olarak, OTA'nın neden olduğu sitotoksitede farklı mekanizmalar ileri sürülmektedir. Çoğunlukla OTA, düşük konsantrasyonlarda homeostazı koruyarak geri dönüşümlü değişikliklere, apoptotik süreç aktivasyonuna ve apoptotik ve nekrotik hücre ölümü uyarılmasına neden olurken, yüksek konsantrasyonlardaki süreçte nekrozla hücre ölümüne neden olduğu ifade edilmektedir. OTA'nın neden olduğu hücre ölümünün hücre tipine bağlı olarak da değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (21).

Apoptoz mitokondriyal yolak ve ölüm reseptör yolağı olmak üzere başlıca iki yolak tarafından gerçekleştirilmektedir. Mitokondriyal yolak cd-2 protein ailesi tarafından anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, BOO/DIVA, A1/Bfl-1, Mcl-1, NR-13) ve pro-apoptotik (Bax, Bak, Bcl-xs, Bok, Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Hrk, Nix, BNip3, Noxa, PUMA) proteinler tarafından düzenlenmektedir. OTA uygulaması sonucunda bazı hem anti-apoptotik genlerin (Bcl-2, Bcl-XL) hem de pro-apoptotik

genlerin (Bax, Bid) ekspresyonlarının baskılandığı gözlenmiştir. Kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekspresyonlarının da OTA muamelesi sonucunda baskılandığı belirlenmiştir (22, 23). OTA'nın Het-1A ve GES-1 hücrelerinde kaspaz-3'ü aktif hale getirerek apoptozu başlattığı gösterilmiştir (26, 51).

Mitokondriyal bozukluklar OTA toksisitesi sonucunda erken evrede gelişmektedir. Otofaji; oksidatif strese ve mitokondriyal bozukluklara karşı mitokondride gerçekleşmektedir (23). Otofaji; hücre içi makromoleküllerin ve organellerin, otofagozom olarak adlandırılan çift membran yapıda bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesini ve lizozomla birleşip otolizozom şeklini alarak lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanmasına yol açan mekanizmadır (52). Otofaji çeşitli patolojilere, enfeksiyonlara, inflamatuvar hastalıklara, kalp hastalıklarına, nörodejenarasyona ve kansere karşı organizmayı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda OTA'nın otofajik hücre ölümünü de arttırdığı rapor edilmiştir. OTA uygulamasının öncelikle sitotoksitenin gelişmesine ve otofajinin de başlatılmasına neden olduğu belirtilmektedir. OTA, mitokondriyal bozukluklara ve hasara sebebiyet vererek reaktif oksijen radikallerinin üretilmesine ve mitokondri membran potansiyelinin değişmesine neden olarak otofajik yolu indüklemektedir. OTA indüklü renal sitotoksitenin erken evresinde otofajinin, hücreyi OTA'nın etkilerine karşı korumada önemli bir rol aldığı belirtilmektedir (23, 53).

2.3.7. Sinyal İleti Yolakları

Mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) birçok fizyolojik ve patolojik sürece katılan önemli bir hücre içi sinyal ileti yolağı olarak bilinmektedir. MAPK ailesinin c-Jun-N-terminal kinaz (JNK), p38 kinaz ve ekstraselüler sinyal regülasyonlu kinaz (ERK) en önemli üyeleridir (54). ERK genellikle hücre proliferasyonun düzenlenmesinde görev alırken, JNK ve p38 stres cevabı ve apoptozda öne çıkmaktadır. İn vitro çalışmalarda OTA'nın ERK1/2, JNK ve p38 fosforilasyonunu başlattığı ifade edilmiştir (55). MAPK ekspresyonuna ve fosforilasyonuna OTA'nın etkisi, karsinojenik dozda OTA ile beslenen erkek sıçanların böbrek dokularında çalışılmış ve ERK proteinlerinin ve substratları olan ELK1/2 ve p90RSK değerlendirilmiştir. OTA'nın atipik PKC fosforilasyonunu

arttırdığı bulunmuş, bunun ERK1/2 ve onların substratı olan ELK1/2 ve p90RSK'nın aşağı yöndeki aktivasyonunu etkilediği saptanmıştır (40, 56). Madin-Darby köpek böbrek-C7 hücrelerinde (toplama kanalı MDCK-C7) ve renal proksimal tübül hücre hatlarında (OK hücreler, NRK-52E), OTA'nın ERK1 / 2'nin fosforilasyonunu ve aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. MDCK-C7 hücrelerinde bu etki hücre farklılaşması ile korelasyon göstermiştir. Aynı hücresel sistemlerde, diğer MAPK'lar olan JNK ve p38'inde OTA muamelesi sonucunda aktive olduğu ifade edilmiştir (17). Bu veriler OTA'nın böbrek hücrelerinde MAPK aktivitelerini uyararak apoptoz veya proliferasyon gibi zıt etkili mekanizmaları başlattığını göstermektedir (46).

Bununla birlikte OTA indüklü hücrelerde PKC'ye yukarı yönde etki eden efektörler değerlendirildiğinde, insülin benzeri büyüme faktör-1 (IGF-1) reseptörünün ve fosfatidil-inozitol-3 kinaz (PI3K) yolağının üzerinden OTA'nın etki ettiği gösterilmiştir. OTA'nın nefrokarsinogenik etkisinin anlaşılması bağlamında mevcut bulgularla, IGF-1 ve sonrasında MAPK'ın aşağı yöndeki cevabının insanlarda böbrek kanseri gelişimi ile bağlantılı olabileceği belirtilirken, IGF-1 reseptörünün renal tümörlerde artış gösterdiğini tespit etmişlerdir (56).

Benzer şekilde erkek sıçanlarda OTA aracılı renal toksisitenin IGF-PI3K-PKB yolağına etkisi araştırılmış, IGF-1 reseptör ekspresyonunun, fosfoinositol bağımlı kinaz-1'in (PDK1) ve atipik protein kinaz C'in (PKCz) fosforilasyonun arttığı belirlenmiştir. Renal kanserlerde sinyal kaskadının rolünün değerlendirildiği birçok çalışmada, hücre proliferasyonu, sağkalımı ve antiapoptotik aktivitede IGF-1'in uyarılması, PKC ve MAPK-ERK aktivitesinin artışının önemini vurgulamaktadır. Hayvan çalışmaları da MAPK kaskadının aktivasyonu ve renal kanserler arasındaki ilişkiyi desteklemekte, OTA'nın IGF-1-MAPK sistemini etkileyerek nefrokarsinogenitenin gelişmesinde etkili olabileceği belirtilmektedir (40).

MAPK sinyal yolağında JNK, ERK ve p38 aktivasyonu hücre döngüsünün durdurulmasını kapsamaktadır. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde MAPK önemli bir yolak olup OTA kaynaklı hücre döngüsünün durdurulmasında MAPK yolağının etkili olduğu düşünülmektedir. GES-1 hücreleri ile yapılan çalışmada hücre

döngüsün OTA kaynaklı G2 evresinde durdurulmasında MAPK sinyal yolağında p38 ve ERK içeren mekanizmanın etkili olduğu gösterilmiştir (54).

Kalsiyum bağımlı sinyal ileti yolağı da OTA'nın hücrel cevabının oluşmasında önemli olan diğeri bir mekanizmadır. Kalsiyum homeostazisinin kaybı toksik hasar gelişiminde oldukça önemli olup in vitro deneyler OTA'nın hücre içi Ca^{2+} homeostazisini etkilediğini göstermektedir (40). Ölümsüzleştirilmiş insan böbrek epitel hücreleri-1 (IHKE-1) ile yapılan çalışmada, nanomolar konsantrasyondaki OTA, kalsiyumun hücre içine hızlı ve geri dönüşümlü salınımına neden olmuştur. Bu etkinin hücre dışı kalsiyuma, fosfolipaz C'ye ve cAMP'ye bağımlı protein kinaza bağılı olarak geliştiğı belirtilmektedir. Buna karşın, aynı sistemde OTA'nın, epidermal büyüme faktörü ve anjiyotensin II ile indüklenen hücre proliferasyonunun kalsiyum bağımlı uyarımını güçlendirdiğı belirtilmektedir (57). OTA'nın neden olduğu toksik ve karsinojenik etkide kalsiyumun rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır (40, 46, 57).

Bu veriler ışığında OTA'nın hücrede DNA hasarı, apoptoz/nekroz/otofaji, protein sentez inhibisyonu, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin engellenmesi, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları, sinyal ileti yolları gibi birçok moleküler mekanizmada değişikliklere neden olduğu gözlenmektedir. Ayrıca OTA'nın hücre döngüsü üzerindeki önemli etkileri göze çarpmaktadır. OTA'nın hücre döngüsünü farklı evrelerde durdurucu yönde etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu etkinin ortaya çıkmasındaki moleküler detaylar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu moleküler mekanizmanın açıklanmasına katkı sağlamak amacıyla OTA'nın hücre döngüsündeki durdurucu etkisini çalışmamız kapsamında değerlendirmeyi hedeflemekteyiz.

2.4. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen morfolojik değişikliklerin ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin gerçekleştiğı bir süreç olup iki hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık olarak tanımlanmaktadır. Bir siklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlamaktadır. Hücre

proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusu proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku dönüşümüyle yakın ilişki içinde bulunmaktadır. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik ve patolojik durumlarda hücre siklusunun ne kadar kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (58, 59).

Hücre döngüsü interfaz (G1-S-G2) ve mitoz (M) olmak üzere iki aşamaya ayrılmaktadır. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, S, G2 ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler. G1-S-G2 fazları hücre siklusunun %90'ını kapsamakta olup 16-24 saat sürmektedir. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. Hücre büyümesi G1 fazında kısıtlayıcı nokta (Restriction point) tarafından koordine edilmektedir. Kısıtlayıcı noktada hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır (60).

Hücreler mitoz girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler ve makromoleküller sentezlenir. Hazırlık safhasına interfaz denir. G1 fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA replikasyonu için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi gerçekleştirilir. G1 aşamasındaki hücreler ya DNA çoğalması için S fazına girerler ya da hücre döngüsüne dönmeden önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalacağı bir dinlenme dönemi olan G0 fazına girerler. İnterfazın en belirgin olayı S fazında gerçekleşir, hücre DNA'sını hızla replike eder ve DNA iki katına çıkar. DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazılar, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık hale geldiği için DNA sentezi hızlı bir şekilde tamamlanmalıdır. G2 fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitoz hazırlanır. Mitozdan önce G2 fazı gelir ki, burada hücre, mitoz başlamadan önce DNA miktarının iki katına çıkarıldığından emin olmak ister ve tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu fazda kontrol edilir. Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır ve telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanarak aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir (58-61).

Hücre döngüsünde çevreden ve hücre içinden gelen uyarılar hücre döngüsü safhalarının düzenli bir şekilde birbirini izlemesinde etkili olur. Dolayısıyla bu aşamalarda birçok kontrol noktası vardır ve hücre döngüsü bu kontrol noktaları sayesinde ilerleme gösterir.

Hücrelerin, hücre döngüsünün değişik evrelerinden geçmeleri başta siklinler, siklin bağımlı serin/treonin protein kinazlar (Cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) olmak üzere, kontrol noktası kinazları (Chk1 ve Chk2), retinoblastoma (Rb), p53, DNA hasarını tanıyan proteinler gibi birçok farklı mekanizma ile oldukça sistemli ve düzenli bir şekilde denetlenmektedir.

Hücre döngüsünün çeşitli evrelerinde siklinler, Cdk ve CDI'lerin düzeyleri farklılık gösterir ve döngünün bir düzen içinde ilerlemesinde görev alırlar. Cdk'lar ancak sikline bağlandıklarında aktifleşerek aktif siklin-Cdk komplekslerini oluştururlar. Çünkü siklinler, Cdk'ların regülatör altbirimleridir ve bu nedenle Cdk'ya bağlandıklarında enzimde bir konformasyonel değişikliğe neden olarak katalitik alt birimin açığa çıkmasını sağlarlar. Siklinler döngünün çeşitli fazlarında sistemli bir şekilde belirli aralıklarla bir taraftan transkribe edilirken diğer taraftan da übikütin yolu ile yıkılırlar. Böylece siklinler kontrollü olarak yapılarak veya yıkılarak ilişkide buldukları Cdk'ların aktiviteleri düzenlenmektedir (58, 61, 62). Cdk'ların aktivitesinin düzenlenmesini sağlayan diğer bir mekanizma, Cdk üzerindeki, 160'inci pozisyon yakınında bulunan korunmuş treonin aminoasidinin fosforilasyonu ile gerçekleşmektedir. Cdk'ların bu aktive edici fosforilasyonu, Cdk-aktifleştiren kinaz (CAK) olarak adlandırılan ve Cdk (Cdk7)'nin siklin H ile kompleks oluşturmasıyla meydana gelen bir enzim tarafından katalizlenmektedir. CAK tarafından, aktive edici fosforillenmenin aksine, Cdk regülasyonundaki diğer mekanizma, Wee1 proteini tarafından katalizlenen Cdk amino ucuna yakın tirozinlerin, inhibe edici fosforillenmesi ile gerçekleşmektedir. Cdk1 ve Cdk2 tirozin-15 ve treonin-14'ün fosforillenmesi ile inhibe olmaktadır. Bu Cdk'lar, Cdc25 protein fosfataz ailesinin üyeleri tarafından bu aminoasitlerin defosforillenmesi ile aktifleşmektedirler (63). Aktive olmuş Cdk'lar serbestleşen katalitik alt birimleri sayesinde hücre döngüsünün bir sonraki evresine geçebilmesi için gerekli olan kritik hedef proteinleri fosforile ederek döngünün devamını sağlarlar. Hücre döngüsü esnasında devamlı ifade edilirler fakat inaktif formlarında siklin protein ailesine

bağlanarak fosforile olurlar ve aktif hale gelirler. Cdk'ların aktiviteleri siklinlerle düzenlenmesinin yanı sıra fosforilasyon ve defosforilasyona yol açan farklı yollar aracılığıyla da düzenlenmektedir. CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya Cdk'ların kendisi yada siklin-Cdk komplekslerine bağlanarak Cdk'ların aktivitelerini inhibe etmektedirler (58, 61, 62).

Memelilerde hücre döngüsünün tamamlanmasında birden fazla siklin proteini ve siklin bağımlı kinaz enzimi rol oynar. Bunlar A, B, D ve E siklinleri ile Cdk1, Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 enzimleridir. Siklin D/Cdk4 ile siklinD/Cdk6 kompleksleri G1 fazının ortasından sonuna kadar, siklin E/Cdk2 kompleksi G1 fazının sonunda, siklin A/Cdk2 kompleksi S fazında, siklin A/Cdk1 kompleksi G2'de ve siklin B/Cdk1 kompleksi de M fazında görev yapar. Özellikle G1 siklinleri, hücrenin G1 fazındaki restriksiyon noktasını geçebilmesinde büyük önem taşır.

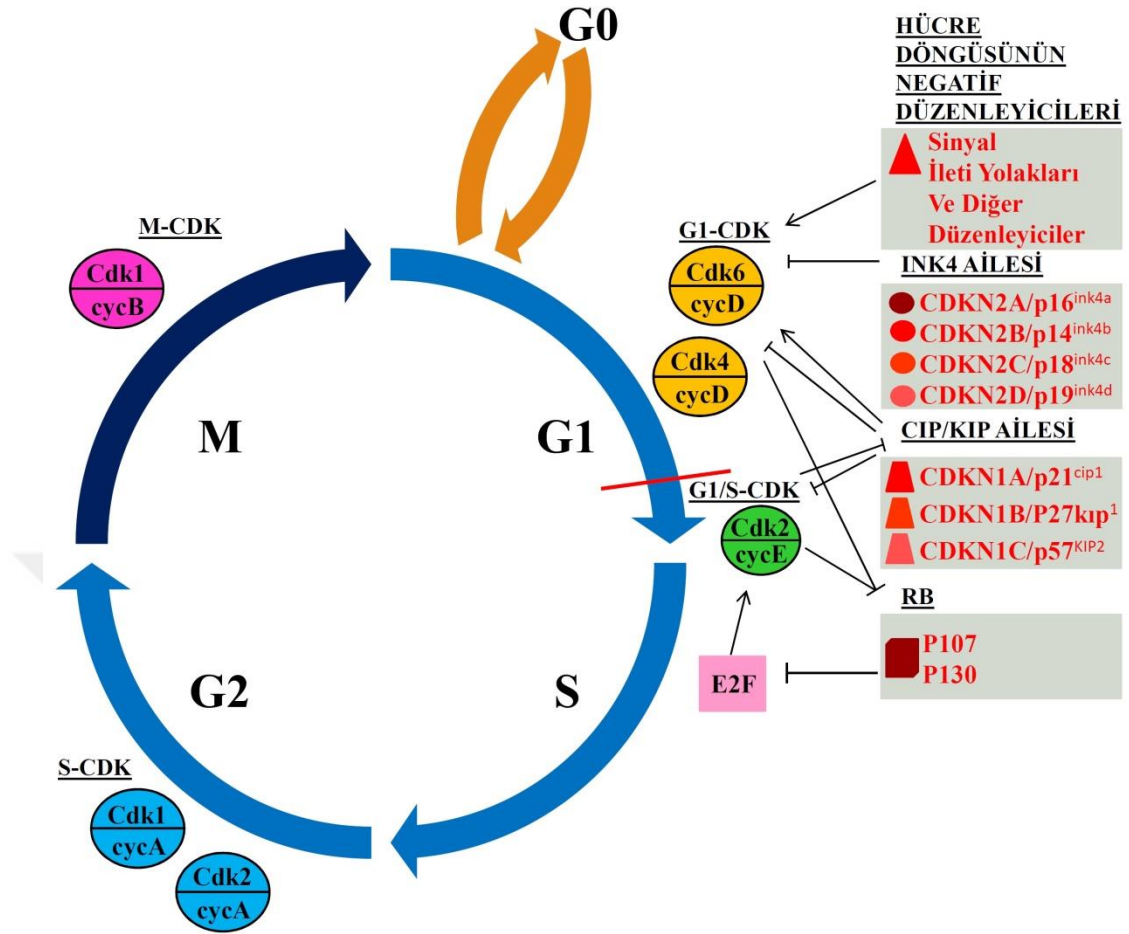
Hücre döngüsünde sırasıyla siklin D, E, A ve B görev almakta ve bir veya birden fazla Cdk'ya bağlanmaktadır. Siklin D döngüde düzeyi ilk artan siklin olup G1 evresinin ortasında ortaya çıkmakta olup D1, D2 ve D3 olmak üzere 3 formu bulunmaktadır. Siklin D, Cdk4'e bağlanarak hücre döngüsünün G1 evresinde SiklinD-Cdk4 kompleksini oluşturur ve RB proteinini fosforiller. RB'nin fosforilasyonu hücre döngüsünde anahtar bir role sahip olup RB hipofosforile formunda transkripsiyon faktörü E2F ile sıkı bir kompleks oluşturarak hücrenin replikasyonunu engellerken RB'nin fosforilasyonu ise kompleksin ayrılmasına ve E2F üzerindeki transkripsiyon aktivite engelini ortadan kalkmasına neden olmaktadır (61). E2F ailesinin siklus ilerletici etkisi sonucu hücre artık G1 fazında kalamaz ve bir sonraki faz olan S fazına girer. E2F ailesi ise etkilerini S fazına girişi sağlayan bir takım düzenleyici proteinlerin ilgili genlerini aktive ederek gösterirler (58). Siklin D, hücre döngüsünün kader noktası olan restriksiyon noktasının açılması için gerekli olan Siklin E'nin sentezini sağladığı için döngünün en önemli siklinlerinden birisidir.

Siklin E'nin E1 ve E2 olmak üzere iki izoformu bulunmakta olup, S evresinde Cdk2 ile aktif bir kompleks oluşturmaktadır. Bazı fonksiyonları siklin E-Cdk1 kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücre döngüsünün S evresinde ilerleyebilmesi ve DNA replikasyonunun başlayabilmesi için Siklin E ve Cdk2

arasında aktif bir kompleksin oluşmasına ve aktif bir E2F'ye ihtiyaç vardır. Aktif E2F, Siklin E'nin ve DNA replikasyonu için gerekli polimerazın transkripsiyonunu artırır ve DNA sentezi uyarılır.

Hücre döngüsünde bir sonraki kontrol noktası G2/M geçişidir ve bu geçiş E2F'nin transkribe ettiği siklin A ve onun oluşturduğu Siklin A-Cdk2 kompleksi tarafından sağlanmakta olup, bu kompleks mitotik profazdaki olayları düzenlemektedir. SiklinB-Cdk1 kompleksi bir protein fosfataz olan Cdc25 tarafından aktive edilir ve erken profaz evresinde çekirdek içinde birikmeye başlar. SiklinB-Cdk1 aktivasyonu çekirdek zarının çözülmesine neden olur ve mitozu başlatır.

Siklin A ve B'den oluşan Cdk kompleksleri G2/M geçişindeki mikrotübül stabilitesinin azalışı, sentrozomların ayrılışı, kromozomların yoğunlaşması gibi bazı kritik olayları kontrol ederler. Siklin B-Cdk1 kompleksinin inaktivasyonu ile mitozdan çıkış gerçekleşir, yeni bölünmüş olan hücreler G1 evresinde kalıp yeni bir replikatif döngüye girebilirler ya da dinlenmede kalabilirler (61).



Şekil 2.4. Memelilerde Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi (28)

Siklin/Cdk komplekslerinin aktiviteleri, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) aracılığı ile kontrol edilir. Memelilerde hücre döngüsünün düzenlenmesinde birden fazla inhibitör rol oynar. Bu inhibitörler iki ana gruba ayrılır; bunlardan biri G1 fazında görev yapan siklin D/Cdk4 ile siklin D/Cdk6 komplekslerini inhibe eden p14, p16, p18 ve p19 gibi inhibitörlerin bulunduğu INK4 ailesi, diğeri ise tüm Cdk enzimlerinin aktivitesini inhibe eden p21, p27 ve p57 gibi inhibitörlerin bulunduğu Cip/Kip ailesidir.

2.4.1. OTA'nın Hücre Döngüsü ve Düzenleyici Faktörlerine Etkisi

Farklı mikotoksinlerin hücre döngüsünü farklı evrelerde duraklattığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda çeşitli hücrelerde OTA'nın hücre döngüsünü farklı evrelerde etkilediği ortaya konulmuştur. Çeşitli hücre

hatlarında OTA'nın hücre döngüsünü G1, S ve G2'de duraklattığı belirtilirken, OTA'nın hücre döngüsü için farklı hücre hatlarında farklı etkiler gösterebildiği gözlemlenmiştir (18, 22, 26, 54).

OTA'nın hücre döngüsünü S evresinde duraklatmasında etkili olan mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır. Hücre döngüsü, siklin ve siklin bağımlı kinazlardan oluşan faza özgü protein kinaz kompleksleri tarafından oldukça düzenli ve koordineli olarak gerçekleşmektedir. Genotoksik hasar varlığında DNA replikasyonunun başlamadan geri dönüşümlü olarak inhibe edilmesi, S fazındaki kontrol noktaları sayesinde sağlanmaktadır. Siklin E ve Cdk2 G1/S geçişinde aktive olur ve S fazına geçişte görev almaktadır. S fazı daha sonra SiklinA/Cdk2 kompleksi tarafından düzenlenmektedir. HEK293 hücreleri ile yapılan çalışmalarda farklı OTA konsantrasyonları kullanılarak yapılan 24 saatlik uygulamalarda doza bağlı olarak Siklin A2, siklin E1 ve Cdk2 ekspresyonlarında azalma olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda Siklin A2, siklin E1 ve Cdk2'nin mRNA seviyelerinde olduğu gibi protein seviyelerinde de azalma olduğu belirlenmiştir. Tüm bu değişiklikler OTA'nın hücre döngüsünü S fazında duraklattığını desteklemektedir. Elde edilen bu veriler OTA'nın DNA hasarına ve S fazıyla ilişkili proteinlerde değişikliğe neden olarak hücre döngüsünü S fazında durdurduğunu göstermektedir (22, 27).

OTA'nın mide epitelyum hücrelerinde (GES-1) DNA çift zincir kırığına neden olduğu γ -H2AX artışıyla kanıtlanmıştır. OTA'nın DNA çift zincir kırıklarına neden olarak hücre döngüsünde anahtar faktörler olan Cdc2, Cdc25C ve siklinB1 ifadesinde azalmaya bağlı olarak hücre döngüsünü G2 fazında durdurduğu belirlenmiştir (51). Ayrıca OTA ile indüklenmiş GES-1 hücrelerinde ERK ve p38 yolaklarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulduğu gösterilmiştir (54). Yine GES-1 hücreleri yapılan bir diğer çalışmada, OTA kaynaklı artan hücre içi ROS üretimi ve DNA hasarının hücre döngüsünü G2 evresinde durdurması ile ilgili moleküler mekanizma değerlendirilmiş ve DNA hasarının ATM-Chk2 ve ATM-p53-p21 yolağını aktive ettiği, G2/M fazı düzenleyici proteinlerinin (Cdc25, Cdc2 ve Siklin B1) ekspresyonunun azalmasına neden olarak hücre döngüsünü G2 evresinde durdurduğu belirlenmiştir (47). GES-1 hücrelerinde OTA muamelesi sonucunda hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında Rad51'in

etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada ise, OTA'nın doza ve zamana bağlı olarak Rad51'in ekspresyonunu azalttığı bunun sonucunda da DNA hasarının tamir edilemediği ve hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulduğu gösterilmiştir (49). OTA'nın Het-1A hücrelerinde DNA hasarına bağlı olarak hücre döngüsünü G2 evresinde durdurduğu belirlenmiş olup bu yolakta Cdc2 ve Siklin B1 ekspresyonlarındaki azalmanın etkili olduğu gösterilmiştir (26).

p53'den yoksun gpt delta farelerin böbreklerinde (red/gam geni Spi⁻) ve p53 geni bulunan fare böbreklerinde OTA'nın etkisinin değerlendirildiği çalışmada OTA kaynaklı genotoksik stresin p53/p21 yolağını aktive ettiği ve hücre döngüsünü G1/S noktasından durdurduğu belirlenmiştir. p53'ü yoksun hücrelerde p53 bulunan hücrelere göre, hücre döngüsünün düzenlenmesiyle ilişkili genlerin (Ccne1, Ccnb1, Cdk1, Plk1 ve Aurka gibi) mRNA seviyelerinde önemli bir artışın olduğu belirlenmiştir (50).

2.5. p53 ve Hücre Döngüsü

p53 geni 17. kromozomun p kolunda yer alır (17p13.1) ve 53 Kd ağırlığında 393 aminoasitlik bir fosfoproteini kodlamaktadır. Bu genin ürünü olan p53 proteini diziye özgü DNA'ya tetramer olarak bağlanan bir transkripsiyon faktörü olup, hedef genlerde transkripsiyonun aktive edilmesinde veya baskılanmasında görev almaktadır (64).

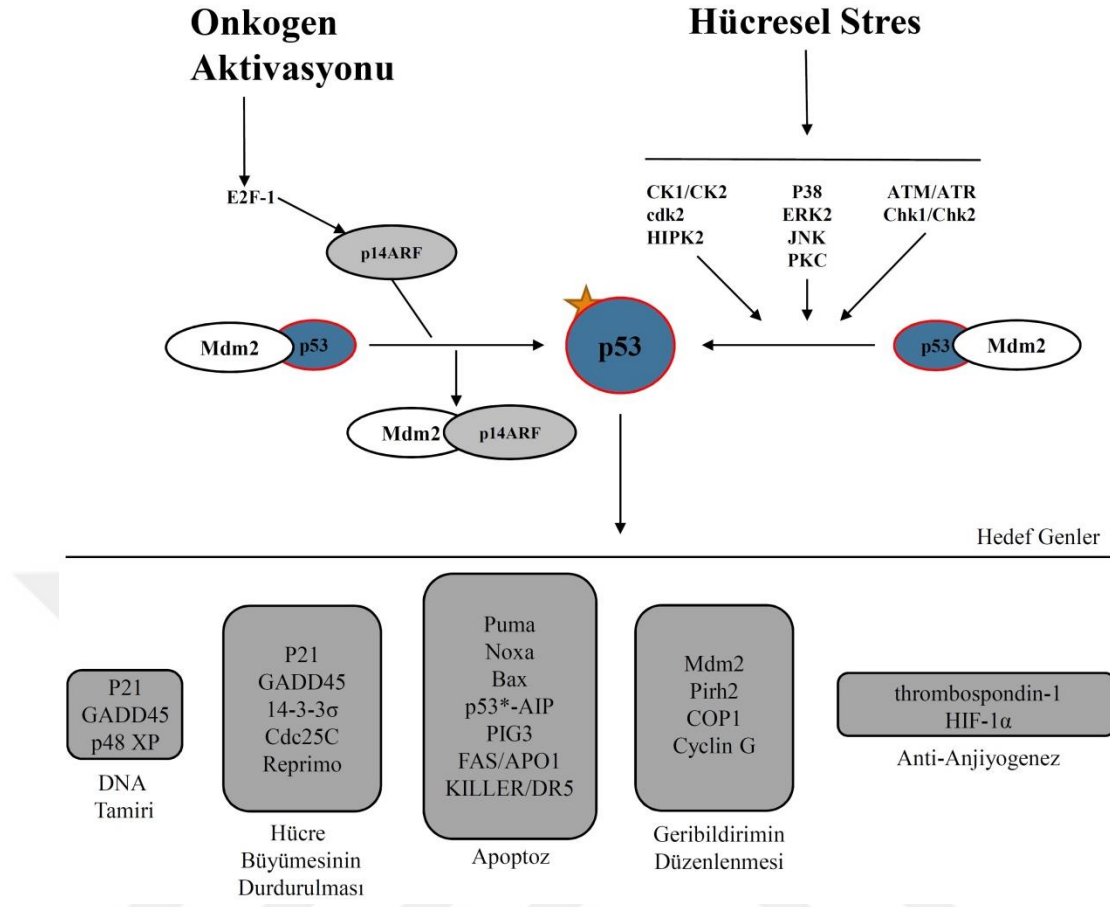
p53 proteini yapısal ve işlevsel özelliklerine bağlı olarak 4 bölgeye ayrılmakta olup, transkripsiyonel aktivasyon için gerekli asidik bir amino terminal bölgesi (aa 1-43), merkezi bir çekirdek dizisine özgü DNA bağlama bölgesi (aa 100-300), bir tetramerizasyon bölgesi (aa 324-355) ve bir C terminal düzenleyici bölgeden (aa 363-393) oluşmaktadır. Aktivatör bölge olarak adlandırılan N-ucu, temel transkripsiyonel mekanizmalarda TFIID (TBP, TAFs) ve TFIIF gibi proteinlerle etkileşimde olup, p53 proteinin DNA'ya bağlandıktan sonra transkripsiyonu başlatmasında rol almaktadır. MDM2 proteini, N-ucu aktivasyon alanına bağlanarak p53 transkripsiyonel aktivitesini negatif olarak düzenlemektedir. Ayrıca N-ucuna MDM2/HDM2 (MURINE/HUMAN DOUBLE MINUTE 2) proteini bağlanarak p53'ün proteosomlara yönlendirilmesine ve orada parçalanmasına neden

olmaktadır. ATM, ATR, Chk2 proteinleri hücrel stres veya DNA hasarı gibi bir nedenle aktifleşerek, p53 proteinin N ucundaki aminoasitlerin fosforillenmesine neden olur ve bunun sonucunda MDM2/HDM2 proteininin p53'e bağlanması engellenerek p53 proteininin kararlılığı sağlanmış olur. p53 kararlılığının sağlanması amacıyla MDM2'nin p53'den uzaklaştırılmasında INK geninin alternatif ürünü olan p14_{ARF} rol almakta olup; p14_{ARF}, MDM2/HDM2'ye bağlanarak bu proteinin p53'ten ayrılmasına neden olmaktadır. Hücrede meydana gelen hasara bağlı olarak kararlı hale gelen p53, hücre döngüsünü durdurarak hasarın tamiri için hücreye zaman kazandırabileceği gibi, hasarın giderilememesi durumunda ise hücreyi programlı hücre ölümüne yönlendirebilmektedir. p53'ün merkezi çekirdek bölgesi, diziye özgü DNA bağlama bölgesi içermektedir ve p53'ün hem transkripsiyon faktörü aktivitesinde hem de DNA ile ilişkili diğer işlevlerini yerine getirmesinde önemli bir role sahiptir. p53 proteini, çözelti içinde bir tetramer olarak bulunmakta ve p53 proteinin 324-355 aminoasit bölgesinin işleyişi için tetramerizasyonun gerekli olduğu belirtilmektedir. Oligomerizasyon p53'ün tümör baskılayıcı aktivitesi için gereklidir. p53 proteininin C-ucu oligomerizasyon bölgesi olarak adlandırılmakta olup, p53 proteini bu bölge ile diğer proteinlerle ilişki kurarak hetero-dimer yapılar oluşturmaktadır. DNA çift zincir kırılması, telomer hasarı gibi durumlarda ya da transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü zamanlarda p53 proteini DNA'ya homo-tetramer yapılar halinde direk bağlanabilmektedir. p53 proteini homo-tetramer yapılar oluşturamaması durumunda DNA ile doğrudan bağlantılı olan işlevlerini yerine getirememektedir. p53 proteininin C-ucunda, proteini nükleusa yönlendiren 3 tane NLS (nükleer yerleşim sinyali) bölgesi bulunmaktadır (34, 65-67).

p53 yolağı çeşitli intrinsik ve ekstrinsik sinyallere cevap vermeyi hedefleyen genleri ve onların ürünlerinden oluşan bir ağı içermekte olup, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının ve gen ifadesinin düzenlenmesi, hücre yaşlanması, apoptoz ve DNA tamiri gibi birçok hücrel olayda rol almaktadır (50, 68). p53, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir. p53, DNA tamiri ve DNA sentez mekanizmasında rol alan PCNA (prolifere edici hücre çekirdek antijeni), GADD45 (büyümeyi durdurucu ve DNA hasar-arttırıcı protein) proteinlerini ve

apoptozda rol alan PUMA, Noxa, Bax ve Fas gibi proteinlerin transkripsiyonlarını da düzenlemektedir. p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, *p21WAF2/Cip1* geninin transkripsiyonunu uyararak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurmaktadır. p53 ayrıca, mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan *c-myc* ve *c-fos* gibi genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile fiziksel olarak etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında da rol almaktadır (34). p53 replikasyon çatalının oluşumunu engelleyerek replikasyonun baskılanmasında da görev almaktadır. DNA tamirinde XPB (Xeraoderma Pigmentosum Grup B DNA Helikaz), XPD (Xeraoderma Pigmentosum Grup D DNA Helikaz), p62 ve topoizomeraz gibi proteinler p53 proteini ile birlikte görev almaktadır. Ayrıca DNA çift zincir kırıklarında ya da telomer hasarı gibi durumlarda direk DNA'ya bağlanarak, DNA sarmalının çözülmesine engel olmaktadır (34).

p53, normal koşullar altında çok düşük veya tespit edilemeyen seviyelerde muhafaza edilen kısa ömürlü bir proteindir. p53, DNA hasarı, hipoksi, ısı şoku, onkogenlerin aktivasyonu, ribonükleosid trifosfat eksikliği, iğ iplikçiklerinde meydana gelen hasarlar gibi birçok stres faktörü uyarana maruz kaldığında ve translasyon sonrası modifikasyonlarla aktive edilir. Aktive edilmiş p53, diziye özgü bir DNA bağlama transkripsiyon faktörüdür. p53'ün aşağı yöndeki hedefleri arasında *P21_{WAF/CIP1}*, *MDM2*, *GADD45*, *14-3-3 σ* , *bax* ve *KILLER/DR5* gibi çeşitli genler tanımlanmış olup bunların ifade ürünleri, hücre büyümesinin düzenleyicileri olarak işlev görmektedir (67).



Şekil 2.5.a. p53 Yolağı ve Etki Mekanizmaları (69)

Birçok hücre tipinde, hücre zararlı DNA ajanlarına maruz kaldığında hücre döngüsü progresyonunda geçici değişiklikler meydana geldiği gözlenmiştir. Bu değişiklikler DNA sentezi tekrar başlamadan (G1 evresinde durdurma) ve/veya mitoz başlamadan (G2 evresinde durdurma) hasarın onarımı için oldukça önemlidir. DNA hasarının replikasyondan veya mitozdan önce onarılması, mutajenik lezyonların yayılımına neden olabilmekte ve neoplastik dönüşümün oluşması için gerekli genomik değişikliklerin ilerleyici birikimine katkıda bulunabilmektedir (33).

p53 diziye özgü transkripsiyonel koaktivatör olarak işlev görmekte ve birçok hücre tipinde p53 ekspresyonu hücre döngüsü kontrol noktalarını etkileyerek döngünün durdurulmasına neden olmaktadır (67).

p53'ün hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol ettiğine ilişkin ilk kanıt, Kastan ve ark. tarafından bulunmuştur. Araştırmacılar DNA hasarını takiben hücre döngüsünün durdurulmasının kontrolünde sinyal iletim yolunda rol alan ATM, ATR, p53 ve GADD45'in rol aldığını belirlemişler ve bu yoldaki anormalliklerin tümör

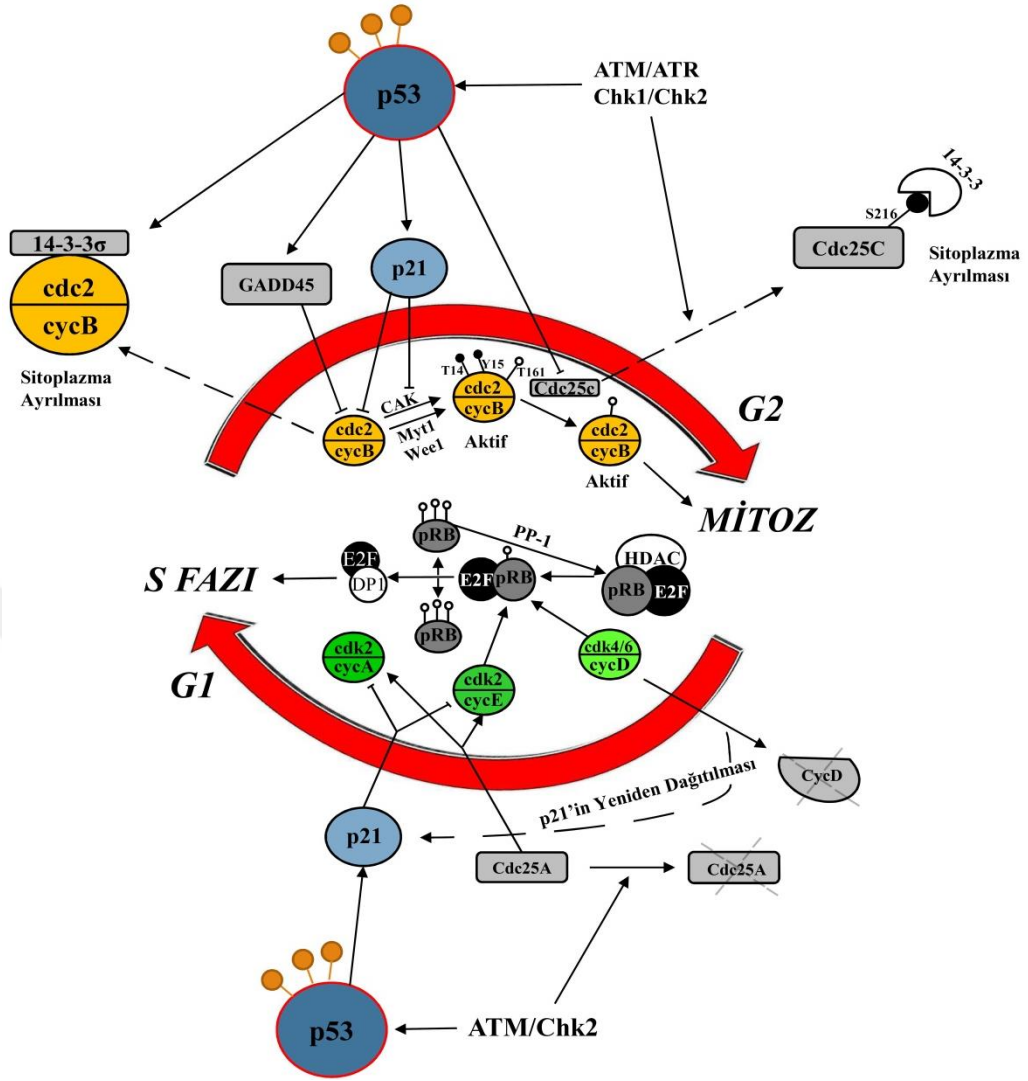
gelişimine neden olabileceğini tespit etmişlerdir (70). Daha sonra, DNA hasarına bağlı hücre döngüsünün G1 evresinde durdurulmasında p53'ün aşağı yöndeki hedefinin siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 olduğu belirlenmiştir. p53 proteini Cdk inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu uyarmaktadır. p21, siklin E/Cdk2, siklin D1/Cdk4, siklin A/cdc2 ve siklin B/cdc2'yi içeren bir dizi siklin ve Cdk komplekslerine bağlanır ve bunların kinaz aktivitesinin inhibisyonuna, pRB hipofosforilasyona ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmaktadır. Bu durum, hipofosforile Rb'nin birikimine ve transkripsiyon faktörü olan E2F ile kompleks oluşturmasına izin vererek, E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonu engelleyerek hücre döngüsünün G1 evresinde durdurulmasına sebebiyet vermektedir. Rb, S fazına özgü genlerin ekspresyonu için gerekli E2F transkripsiyon faktörünün negatif bir düzenleyicisidir. Rb, p53'ün aşağı yöndeki akışında rol alır, Rb fonksiyon kaybı sonucunda hücre döngüsünün p53 indüklü G1 evresinde durma noktasının atlanabileceği çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sonuçlar G1 kontrol noktasında p21'in rolünü açıkça ortaya koymaktadır (67, 71). Bununla birlikte, p21'in, p53 aracılı tümör baskılama için gerekli tek hedef gen olmadığı bilinmektedir (33, 67).

p53, G2/M kontrol noktasının düzenlenmesinde de rol alır. Siklin B1/cdc2 kompleksi mitozaya geçişte gerekli olan başlıca düzenleyici faktörlerden olup, siklin B1'in p53 tarafından aşağı yöndeki transkripsiyonel düzenlenmesi, hücre döngüsünün p53 aracılı G2/M evresinde durdurulmasında rol almaktadır. DNA hasarı indüklü döngüyü G2 evresinde durdurmayı içeren biyokimyasal yollar Cdc2'nin aktivitesinin baskılanmasını da içeren sinyal kaskadını başlatmaktadır. p53'ün transkripsiyonel hedefi olan GADD45, p21 ve 14-3-3σ tarafından Cdc2'nin baskılandığı belirtilmektedir. Gadd45, p53 ile indüklenir, Gadd45'in ekspresyonundaki artış siklin B1 ve cdc2'nin ekspresyonunun azaltılmasına neden olur. Gadd45, siklin B1/cdc2 kompleksinin aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsünün G2/M evresinde durdurulmasına neden olur. İyonize radyasyonla indüklenebilen diğer bir p53 hedef geni olan 14-3-3σ G2/M evresinde döngünün durdurulmasında görevli olup, fosforile Cdc25C'in sitoplazmada bağlanmasında ya da serbest bırakılmasında rol alır ve böylece Cdc25'in fosforilasyonunu ve Cdc2'nin aktivasyonunu önler. p21WAF1 / CIP1 ve BTG2 gibi

p53 indüklü bazı genlerinde döngünün G2/M evresinde durdurulmasıyla ilişkili olduğu belirtilmektedir (33, 65, 67, 68)

p21'in cdc2 aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsünü G2 evresinde durdurduğuna dair çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Buna mekanizmalara göre, p21 ya doğrudan Cdk/Siklin komplekslerine bağlanarak Cdk aktivitesini inhibe etmektedir ya da p21, cdk2'yi inhibe ederek cdc2 aktivitesi kaybına neden olmaktadır. Üçüncü olarak, p21'in cdk2'ye bağlanarak CAK ile kompleks oluşturmasını engelleyebileceği ve benzer etkinin cdc2'nin p21 tarafından inhibe edilmesinin altında da yatabileceği düşünülmektedir. Dördüncü mekanizma ise; DNA sentezi ve onarımı için gerekli olan p21 ile PCNA arasındaki ilişkiyle bağlantılı bulunmuştur. p21, DNA sentez sürecinde oldukça önemli olan PCNA etkisizleştirerek S fazı boyunca DNA hasarına neden olabilir ve bu durum cdc2'nin inhibisyonuna sebebiyet verebilir. Bunun sonucunda p53'ten bağımsız olarak hücreyi G2 evresinde durdurabilir (33).

DNA hasarı ayrıca cdc2 inhibisyonuna neden olan p53'ten bağımsız yolları da aktive etmektedir. Genotoksik strese cevap olarak, PI-3K ailesinin üyeleri aktive olmakta ve DNA onarımını ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyen sinyal iletim yollarını başlatmaktadır. PI-3K ailesinin birçok üyesi, DNA-PK, ATM, ATR'de dahil olmak üzere p53'ü doğrudan fosforile edebilir. DNA hasarıyla indüklenen ATM bağımlı sinyalizasyon ayrıca Chk1 ve Chk2 kinazlarının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Chk1 ve Chk2, 14-3-3 proteinleri için bir ortak bağlanma bölgesi oluşturan Cdc25C'yi fosforile edebilmektedir. 14-3-3 proteinlerinin Cdc25C'ye bağlanması; Cdc25C'nin nükleer dışarıya taşınması, fosfatazın sitoplazmada tutulması ve dolayısıyla Cdc2 aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. CAK; Cdk7, Siklin H ve Mat 1'den oluşur ve fosforilasyon ile Cdc2'yi aktive eder. CAK'in p53 tarafından baskılanmasıyla hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasına neden olabileceği belirtilmektedir (33, 68).



Şekil 2.5.b. p53'ün Hücre Döngüsündeki Önemi (69)

2.6. Küçük Sessizleştirici RNA (small interfering RNA= siRNA)

RNA interferans (RNAi), büyük oranda korunmuş, çift iplikli RNA (dsRNA)'nın hücreye girişiyle birlikte homolog mRNA'ların dizi-spesifik yıkımına yol açan post-transkripsiyonel gen susturma mekanizmasıdır (72-76). RNAi mekanizması, hücre gelişimini ve farklılaşmasını kontrol etmek için gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. dsRNA ile uyarılan bu mekanizma mikroRNA'lar (miRNA) ile hücre gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve küçük sessizleştirici RNA'lar (small interfering RNA=siRNA) ile hedef proteinlerin susturulması olmak üzere iki farklı mekanizma üzerinden görev yapmaktadır (72, 74, 77, 78)

RNAi mekanizmasında, çift zincirli RNA'yı RNase-III Ribonükleaz ailesinden sitoplazmik bir enzim olan Dicer II ~21 nükleotidlik siRNA olarak adlandırılan kısa parçalara ayırmaktadır. siRNA'ların 5'-uçlarında fosfat, 3'-uçlarında hidroksil grubu bulunur ve 3'-uçlarının, 5'-uçlarından iki nükleotid kadar daha uzun olduğu bilinmektedir (74, 79).

RNAi faktörleri biraraya gelerek RNA ile İndüklenen Susturucu Kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) meydana getirmektedir. Ancak oluşan RISC henüz aktif değildir. siRNA zincirleri ATP'ye bağımlı bir şekilde Dicer enziminde bulunan RNA Helikaz aktivitesiyle açılır sonra hedef mRNA'ya komplementer olan siRNA zinciri RISC'e bağlanır ve RISC kompleksi aktif hale gelir. Aktive olmuş RISC kompleksi, taşıdığı siRNA zincirinin komplementer dizisini içeren hedef mRNA'ya bağlanarak transkripti parçalara ayırmakta ve hedef mRNA'nın kodladığı protein sentezi engellenmektedir (72).

RNAi canlı organizmalarda doğal olarak bulunan bir mekanizma olmasının yanı sıra, in vitro olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak da hedeflenen bölgelerdeki gen ifadesinin baskılanması gerçekleştirilebilmektedir. In vitro olarak sentezlenen siRNA'lar hedeflenen gen bölgesini susturarak genlerin fonksiyonunun belirlenmesinde ya da bazı hastalıklar için terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (72, 73, 77, 80)

Uygulamada sentetik olarak sentezlenen siRNA'ların, Dicer ile işleme aşaması atlanarak doğrudan hücre içine verildiği ve RISC aracılı bir mekanizma kullanarak mRNA'ları yıktığı belirtilmektedir. Hücre içerisine siRNA'lar lipid temelli transfeksiyon ajanı ile verilmekte ve bu siRNA'lar, RISC ile bağlanmaktadır. RISC nükleaz aktiviteli bir RNA-multiprotein kompleksi olup yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini içermektedir (80). RISC yapısında bulunan Argonaute (Ago) proteini, antisense dalın 3' ucuna bağlanmada görevli olan Piwi- Argonaute-Zwille (PAZ) bölgesini ve hedef mRNA'nın kesiminde rolü olduğu düşünülen PIWI bölgesini içermekte olup, mRNA kesimi için katalitik bölge olarak görev yapmaktadır. Ago, anlamlı siRNA'ya bağlanır, anlamsız siRNA'yı dalından ayırır ve uzaklaştırır. Anlamsız siRNA zincirini bulunduran aktif RISC ise anlamsız zincire komplementer hedef mRNA'ya bağlanarak

degradasyonuna ve protein sentezinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesine neden olmaktadır. Aktif RISC kompleksi, mRNA hedeflerinin degradasyonuna devam ettikçe, gen susturması gerçekleşmiş olmaktadır (74, 75, 79-82).

İn vitro olarak oluşturulan siRNA'ların RISC tarafından tanınabilmesi ve etkin bir şekilde gen susturmasını başarabilmesi için bir takım özelliklere sahip olması gerekmektedir. siRNA'ların 21-23 nükleotidlik olanları RNAi mekanizmasında en etkin özelliğe sahip olup, 21 baz çiftinden küçük, 25 baz çiftinden büyük olan dsRNA'ların etkinliği çok azdır. 30 baz çiftinden büyük dsRNA'lar ise interferon cevabına neden olmaktadır. Ekzojen siRNA'larda çift iplik olan 19 nükleotidlik kısım ve 3' uçlarında bulunan 2 nükleotidlik overhang yapıları bulunur ve bu durum siRNA'ların tip III RNazlar tarafından tanınması için gereklidir (75, 77). Sonuç olarak teoride uygun olarak tasarlanmış bir siRNA kullanılarak, RNAi mekanizmasından yararlanılarak hücrede hedef alınan herhangi bir gen susturulabilir (77).

Çalışmamızda, RNAi yöntemi kullanılarak HK-2 hücre hattında p53 genini susturarak, OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu etkisinin altında yatan moleküler mekanizmada, hücre döngüsünün önemli kontrol noktalarından olan p53'ün etkisini araştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez projesi kapsamında aşağıda belirtilen yöntemler kullanıldı.

- Hücre Kültürü
- siRNA Transfeksiyonu
- Hücre Canlılığı/Sitotoksosite Testi
- RT-PCR (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
- Western Blot

Belirtilen in vitro deneyler çalışmada, insan böbrek proksimal tübül epitel hücre hattı (HK-2: Human-Kidney 2) kullanılarak aşağıdaki gruplarda gerçekleştirildi.

- a) Herhangi bir muameleye uğramamış hücreler
- b) Negatif siRNA ile transfekte edilmiş hücreler
- c) Negatif siRNA + 10 μ M OTA ile muamele edilmiş hücreler
- d) Negatif siRNA + 25 μ M OTA ile muamele edilmiş hücreler
- e) p53 siRNA ile transfekte edilmiş hücreler
- f) p53 siRNA +10 μ M OTA ile muamele edilmiş hücreler
- g) p53 siRNA + 25 μ M OTA ile muamele edilmiş hücreler
- h) 10 μ M OTA ile muamele edilmiş hücreler
- i) 25 μ M OTA ile muamele edilmiş hücreler

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre kültürü/PCR/Western Blot laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hücre Kültürü

Hücre Dizisi: Deneyler HK-2 hücre hattı kullanılarak yapıldı. Hücre hattı Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim Yaman tarafından hediye edilmiştir.

Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar:

- Hücre kültüründe kullanılan tüm sarf malzeme ve kimyasal maddeler steril olarak kullanıldı.
- Besiyeri: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) kullanıma hazır sıvı halde steril şişe içerisinde Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi ve kullanım süresince +4 °C'de saklandı.
- Serum: Fetal Sığır Serumu (FBS), kullanıma hazır sıvı halde steril şişe içerisinde Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi ve kullanım süresince -20 °C'de saklandı.
- Diğer solüsyonlar: Tripsin-Etilen diamin tetraasetik asit (Tripsin-EDTA) (%0.25), 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) ve penisilin/streptomisin antibiyotik solüsyonları, kullanıma hazır sıvı halde steril şişe içerisinde Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA); dimetil sülfoksit (DMSO) ve tripan mavi (%0.4) ise Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edildi.

Hücrelerin Kültüre Edilmesi: HK-2 hücreleri, % 10 oranında FBS ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM/F-12 besiyeri içerisinde kültüre edildi. Ayrıca bakteri kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla, 100 ünite/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisinden oluşan antibiyotik solüsyonundan % 1 oranında kültür medyumlarına eklendi. Hücreler, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C'de bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Steril 75 cm²'lik kültür kaplarında üretilen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaşana kadar beslendi, ancak bu yoğunluktan sonra Tripsin-EDTA yardımıyla yapıştıkları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve yine kendi besiyeri içerisinde steril yeni bir flaska aktarıldı. Böylece hücrelerin çoğalması sağlandı. Kültürleme işlemi sırasında hücreler, 1X PBS ile yıkandı. Hücre sayımı tripan mavi solüsyonu ile toma lamında gerçekleştirildi.

Hücrelerin Dondurulması: Hücreler, dondurma medyumunu içerisinde kademeli olarak dondurulduktan sonra kullanıma kadar sıvı nitrojende saklandı. Bu amaçla, Tripsin-EDTA ile flaskın yüzeyinden ayrılmasıyla elde edilen hücre

süspansiyonu 600 x g'de 8 dakika santrifüj edildi. İşlem sonunda elde edilen hücre peleti, dondurma medyumu ile resüspanse edilerek 2ml'lik steril dondurma tüplerine aktarıldı. Dondurma medyumu ise, %20 FBS ve %10 DMSO içeren DMEM/F12 ile hazırlandı.

3.2. siRNA Transfeksiyonu

Prensip: 20-21 nükleotidlik dizilimler olan siRNA'lar, spesifik olarak bağlandığı mRNA'yı degrade ederek ilgili proteinin translasyonunu engeller. Bu bilgi ışığında, p53 mRNA'sına spesifik siRNA aracılığıyla p53 protein sentezinin inhibisyonu amaçlandı. Bu amaçla HK-2 hücreleri p53 siRNA ile ve negatif siRNA ile ayrı ayrı transfekte edildi.

Kullanılan Kimyasallar:

- p53 ve negatif siRNA'lar; Ambion'dan (Austin, TX, USA) temin edildi.
- Hiperfect; siRNA'ların memeli hücrelerine aktarılmasında kullanılmakta olup, Qiagen'den (Hilden, Germany) temin edildi.

p53 siRNA ve Negatif siRNA'nın Hazırlanması: Liyofilize şekilde temin edilen 20 nmol stok p53 siRNA ve 5 nmol stok negatif siRNA'lar, DNaz/RNaz'dan yoksun suda resüspanse edilerek final konsantrasyonları 50µM olacak şekilde hazırlandı.

MTS Deneyi İçin siRNA Transfeksiyon Prosedürü:

- HK-2 hücreleri, p53 ve negatif siRNA'lar ile ayrı ayrı transfekte edilmesi amacıyla her bir kuyucukta %30 yoğunluğa sahip olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı.
- p53 ve negatif siRNA transfeksiyonu yapılacak her bir kuyucuk için ayrı bir tüp içerisinde final konsantrasyonu 50nM olan siRNA ve 0,9 µl hiperfect içeren karışım hazırlandı.
- Karışım oda ısısında laminar flow kabinde 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda bu karışım, daha önce hazırlanan 96 kuyucuklu kültür kabında bulunan hücrelerin üzerine eklenerek 8 saat inkübatörde bekletildi.

- Bu sürenin sonunda serumsuz besiyeri uzaklaştırılarak, 2X serum içeren besiyeri eklendi. Hücreler 72 saat kültür şartlarında inkübe edildi.

RT-PCR Deneyi İçin siRNA Transfeksiyon Prosedürü;

- HK-2 hücreleri, p53 ve negatif siRNA'lar ile ayrı ayrı transfekte edilmesi amacıyla her bir flaskta %30 yoğunluğa sahip olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına aktarıldı.
- p53 ve negatif siRNA transfeksiyonu yapılacak her bir kuyucuk için ayrı bir tüp içerisinde final konsantrasyonu 50nM olan siRNA ve 0,9 µl hiperfect içeren karışım hazırlandı.
- Karışım oda ısısında laminar flow kabinde 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda bu karışım, daha önce hazırlanan 6 kuyucuklu kültür kabında bulunan hücrelerin üzerine eklenerek 72 saat inkübasyonda bırakıldı.

Western Blot Deneyi İçin siRNA Transfeksiyon Prosedürü;

- HK-2 hücreleri, p53 ve negatif siRNA'lar ile ayrı ayrı transfekte edilmesi amacıyla her bir flaskta %30 yoğunluğa sahip olacak şekilde 25cm²'lik steril kültür flasklarına aktarıldı.
- p53 ve negatif siRNA transfeksiyonu yapılacak her bir kuyucuk için ayrı bir tüp içerisinde final konsantrasyonu 50nM olan siRNA ve 0,9 µl hiperfect içeren karışım hazırlandı.
- Karışım oda ısısında laminar flow kabinde 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda bu karışım, daha önce hazırlanan 25cm²'lik steril kültür flasklarında bulunan hücrelerin üzerine eklenerek 72 saat inkübasyonda bırakıldı.

3.3. Hücre Canlılığı/Sitotoksikite Testi - MTS Deneyi

Prensip: Hücrelerin, OTA ile muamelesinin takibinde gelişen sitotoksik cevabın saptanması amacıyla yapıldı. Bu amaçla, CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kiti (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) kullanıldı. Deneyin prensibinde, tetrazolyum tuzu 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-

(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- bir elektron taşıyıcısı olan fenazin metosülfat varlığında formazana indirgenmektir (83). Elektron taşıyıcılığı görevini ise, canlı hücrelerdeki dehidrogenazlar gerçekleştirir. Dolayısıyla formazan oluşumu, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan kahverengi rengin yoğunluğu 490 nm'de mikropłaka okuyucu ile spektrofotometre (Thermoscientific Multiskan Go Microplate Spectrophotometer) ile ölçüldü. MTS, proliferasyon, sitotoksisite veya kemoterapi testlerinde canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan kolorimetrik bir ölçüm yöntemidir.

OTA'nın Hazırlanması: Cayman firmasından (Ann Arbor, Michigan, USA) temin edilen OTA (MA: 403,8), 10mM final konsantrasyonu olacak şekilde DMSO içerisinde laminar flow kabinde çözüldü. 10 mM'lık bu ana stok solüsyondan ise 200 µM'lık ara stok solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyonlar -20°C'de saklandı. İleri aşamalarda kullanılacak OTA ara stok solüsyonları, her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü: HK-2 hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 600 x g'de 8 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Besiyeri ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu steril hücre kaplarına bölüştürüldü. Yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücrelerin, farklı dozlardaki OTA ile muamelesi gerçekleştirildi. 200 mM'lık ara stok solüsyonların kullanılmasıyla final konsantrasyonu 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM ve 40 µM olmak üzere 6 farklı OTA dozu ile 24 saat muamele edildi. MTS deneyi için HK-2 hücreleri, 96 kuyucuklu steril hücre kaplarına Şekil 3.3.1'de belirtildiği gibi bölündü.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	OTA yok	OTA yok	OTA yok		20 µM OTA	20 µM OTA	20 µM OTA		40 µM OTA	40 µM OTA	40 µM OTA	
B	5 µM OTA	5 µM OTA	5 µM OTA		25 µM OTA	25 µM OTA	25 µM OTA		Yalnız besiyeri	Yalnız besiyeri	Yalnız besiyeri	
C	10 µM OTA	10 µM OTA	10 µM OTA		30 µM OTA	30 µM OTA	30 µM OTA					

Şekil 3.3.1. Hücrelerin sitotoksisite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı

OTA ile muamele edilen hücreler 24 saat %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren inkübatörde 37 °C’de bekletildi. Süre sonunda MTS solüsyonundan 20 µl her bir kuyucuğa eklendi ve hücreler tekrar 1-4 saat arasında karanlıkta kontrol edilerek inkübe edildi. Canlı hücrelerde oluşan kahverengi renkli formazanın absorbans değerleri, mikropate okuyuculu spektrofotometrede 490 nm’de besiyerinin kullanıldığı köre karşı okundu. Ayrıca hücre sitotoksitesinin ölçümü, her bir deneyde üçlü olmak üzere birbirinden bağımsız deneylerle üç farklı zamanda tekrarlandı.

Elde edilen veriler doğrultusunda seçilen iki doz OTA konsantrasyonu ve etkin siRNA konsantrasyonu ile transfekte edilmiş hücrelerin kombinasyonunda hücre canlılığını tespit etmek için tekrar MTS deneyi kuruldu. HK-2 hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 600 x g’de 8 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Medyumu ile resüspanse edilen hücreler, her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu steril hücre kaplarına bölüştürüldü. Yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler daha önce belirtilen gruplara uygun olacak şekilde final konsantrasyonu 50 nM olan siRNA transfekte edildi ve 72 saat kültür şartlarında inkübe edildi. 72 saatlik sürecin son 24 saatinde de 10 µM ve 25 µM olmak üzere belirlenen iki farklı dozdaki OTA ile muamelesi gerçekleştirildi. Sonuç olarak, siRNA transfeksiyonu gerçekleşmiş hücreler 72 saat, OTA ile muamele edilen hücreler 24 saat boyunca inkübe edilmiş oldu. MTS deneyi için HK-2 hücreleri, 96 kuyucuklu steril hücre kaplarına Şekil 3.3.2’de belirtildiği gibi bölündü.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	OTAyok	OTA yok	OTA yok		p53 siRNA	p53 siRNA	p53 siRNA		10 µM OTA	10 µM OTA	10 µM OTA	
B	Negatif siRNA	Negatif siRNA	Negatif siRNA		p53 siRNA+ 10 µM OTA	p53 siRNA+ 10 µM OTA	p53 siRNA+ 10 µM OTA		25 µM OTA	25 µM OTA	25 µM OTA	
C	Negatif siRNA+ 10 µM OTA	Negatif siRNA+ 10 µM OTA	Negatif siRNA+ 10 µM OTA		p53 siRNA+ 25 µM OTA	p53 siRNA+ 25 µM OTA	p53 siRNA+ 25 µM OTA		Yalnız besiyeri	Yalnız besiyeri	Yalnız besiyeri	
	Negatif siRNA+ 25 µM OTA	Negatif siRNA+ 25 µM OTA	Negatif siRNA+ 25 µM OTA									

Şekil 3.3.2. siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve OTA ile muamele edilmiş hücrelerin sitotoksosite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarındaki dağılımı

3.4. Gen Ekspresyonunun RT-PCR ile Analizi

Prensip: Kalıp olarak kullanılan RNA'nın ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'ya çevrilmesi ve takibinde de bu DNA üzerinden hedef gene spesifik dizilimlerin çoğaltılması prensibine dayanır.

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar:

- Trizol Reaktifi, DNA ladder ve Platinyum Taq DNA polimeraz kiti, Invitrogen'den (Carlsbad, CA, USA) temin edildi.
- 1-bromo-3-kloropropan (BCP), izopropanol ve absolüt etanol Sigma'dan (St.Louis, MO, USA) temin edildi.
- cDNA sentezi kiti, Applied'den (Biosystem, Lithuania) temin edildi.
- Tris-Borat-Edta Tamponu: 10X stok olarak hazırlandı.
- 54 gr Tris base, 27,5 gr borik asit ve 20 ml EDTA 500 ml distile suda çözüldü. Kullanım aşamasında ise 10X'lik bu stok solüsyon, distile su ile 1X'e dilüe edildi.

Tablo 1. Primer Dizilimleri

p53 İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' CAT CTA CAA GCA GTC ACA GCA CA 3'
Antisense	5' GGT CTC TCC CAG GAC AGG C 3'
Siklin D1 İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' ATG CTG GAG GTC TGC GAG G 3'
Antisense	5' GGA AGC GTG TGA GGC GGT A 3'
Siklin E1 İçin Spesifik Primer Dizilimi:	
Sense	5' GAC GGC GAG GGA CCA GTG T 3'
Antisense	5' AGG GTG TTG CTC AAG AAA GTG CT 3'

p53, siklin D1 ve siklin E1 için spesifik primer diziliminin dizaynı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Doç. Dr. Nilgün Gürbüz tarafından yapılmıştır. p53, siklin D1 ve siklin E1 için spesifik primer diziliminin dizayn edilmesi için, önce <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> sitesinden p53, siklin D1 ve siklin E1 genlerine spesifik mRNA dizilimleri saptandı. Daha sonra genel primer dizayn kuralları göz önüne alınarak olası primerler seçildi. Seçilen primer dizilimlerinin, herhangi bir dimer oluşturup oluşturmadığı veya diğer genlere ait dizilimler ile çakışıp çakışmadığını kontrol etmek için ise <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> sitesinden yararlanıldı.

Primerlerin Çözülmesi: Dizaynını belirlediğimiz p53, siklin D1 ve siklin E1 primerlerinin dizilimleri Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) firmasına sentezletirildi. Liyofilize şekilde gelen stok primerler DNaz/RNaz'dan yoksun suda çözülerek 100 µM olacak şekilde ana stok çözeltisi hazırlandı.

Tablo 2. Primer Konsantrasyonları

Primer	Sense stok (nmol)	Antisense stok (nmol)
p53	17,7	33,1
Siklin D1	41,2	37,4
Siklin E1	29,7	20,5

100 μM 'lık ana stok primer çözeltilisinden de p53, siklin D1 ve siklin E1 primerleri için 10 μM 'lık ara stok çözeltilisi hazırlandı.

Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü: HK-2 hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 600 x g'de 8 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Besiyeri ile resüspanse edilen hücreler 6 kuyucuklu steril hücre kültür kaplarına %30 yoğunlukta olacak şekilde bölüştürüldü. Yüzeye yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, daha önce belirtilen gruplara uygun olacak şekilde final konsantrasyonu 50 nM olan negatif veya p53 siRNA'lar ile transfekste edildi ve 72 saat kültür şartlarında inkübe edildi. Ayrıca 72 saatlik periyodun son 24 saatinde de final konsantrasyonu 10 μM ve 25 μM olacak şekilde iki farklı dozda OTA ile muamele edildi.

3.4.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu

Prosedür:

- 6 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücrelere 1ml/kuyu trizol reaktifi eklendi ve oda ısısında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonu takiben 200 μl BCP eklendi ve 12000 x g'de, 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de, 15 dakika santrifüj edildi.
- En altta DNA, ortada protein ve en üstte RNA olmak üzere 3 faza ayrılan süspansiyonun, en üst renksiz fazı temiz bir tüpe aktarılarak üzerine 500 μl izopropanol eklendi. 12000 x g'de, 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de, 8 dakika santrifüj işlemini takiben elde edilen pelete %75'lik etanol eklenerek karışım, 7500 x g'de, 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de, 5 dakika santrifüj edildi.

- Elde edilen RNA peleti, RNaz içermeyen su ile resüspanse edildi ve çözünmesi için 58 °C'de, 10 dakika inkübe edildi.
- Mikroplate okuyuculu spektrofotometrede önce 260 nm'de RNA miktarı, daha sonra da 260nm/280nm'de RNA'nın saflığı tayin edildi. 260nm/280nm oranı, 1,7- 2 olan RNA numuneleri RT-PCR analizinde kullanıldı.

3.4.2. cDNA Sentezi

Prosedür:

- RNA'nın izolasyonundan hemen sonra komplementer DNA (cDNA) sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, Lithuania) sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi.
- Kit protokolüne göre, 1µg RNA örnekleri, 10X RT buffer, 25X dNTP karışımı, 10X RT random primer, RNaz inhibitörü, DNaz/RNAz'dan yoksun su ve RT enzimden oluşan toplam hacmi 20 µl olan karışım içerisinde reaksiyona tabi tutuldu.
- cDNA sentezi için termal döngü cihazında aşağıdaki program kullanıldı.
25°C'de 10 dakika
37°C'de 120 dakika
85°C'de 5 dakika
- Elde edilen cDNA sentez ürünleri, hedeflenen genler olan p53, siklin E1 ve siklin D1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

3.4.3. RT-PCR Analizi

Prosedür:

- RT-PCR deneyi, Platinyum Taq DNA Polimeraz kiti (Carlsbad, CA, USA) ile gerçekleştirildi. GAPDH geni ise referans gen olarak kullanıldı.

- Kit protokolüne göre, her bir örnek için elde edilen cDNA; final konsantrasyonu 1X olan PCR tamponu, 0,2mM olan dNTP karışımı, 1,5mM olan MgCl₂, 0,2 µM olan sense ve antisense primer karışımı içerisinde DNaz/RNAz'dan yoksun suyun kullanılmasıyla toplam hacim 25 µl olacak şekilde reaksiyona hazırlandı.
- p53, siklin D1 ve siklin E1 gen amplifikasyonu için aşağıdaki PCR programı kullanıldı.

94⁰C'de 2 dakika

94⁰C'de 30 saniye

55⁰C'de 45 saniye

72⁰C'de 1 dakika

} 35 döngü

72⁰C'de 5 dakika

- Elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri, yükleme tamponu ile dilüe edilerek %2'lik agaroz jel üzerinde ve 1X Tris-Borat-EDTA tamponu (pH:8.3) varlığında 30-35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Marker olarak Invitrogen'den TrackIt DNA ladder 100bp (Carlsbad, CA, USA) kullanıldı.

Görüntüleme:

- %2'lik agaroz solüsyonunun hazırlanması aşamasında eklenen 1X Sybr Green floresan boyanın kullanılmasıyla, Blook LED Transilluminatörde (Genedirex, Miaoli County, Taiwan) bantların görüntülenmesi yapıldı. Bilgisayar ortamına aktarılan görüntülerdeki bantların yoğunluğu, Image J – Versiyon 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı ile kuantifiye edildi.

3.5. Western Blot

3.5.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar:

- Hücre lizis tamponu: Promega (Madison, WI, USA) firmasından temin edilen 5X lizis tamponu, kullanım sırasında distile su ile 1X'e dilüe edildi.
- Proteaz ve Fosfatataz inhibitör kokteyli: Thermofisher Scientific (Rockford, IL, USA) firmasından temin edilen 100X inhibitör kokteyli, çalışma sırasında hücre lizis tamponu ile 1X'e dilüe edildi.

OTA'nın Hazırlanması: Western Blot analizi için hücrelerin OTA ile muamele edilmesinde 10mM OTA stok solüsyonu kullanıldı.

Prosedür:

- HK-2 hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu 600 x g'de 8 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi. Medyumu ile resüspanse edilen hücreler, hücre sayımı yapıldıktan sonra 25 cm² çapındaki steril kültür kaplarına %30 yoğunlukta olacak şekilde aktarıldı.
- Yüze yapışmaları için gece boyunca inkübatörde bekletilen hücreler, yukarıda belirtilen gruplara uygun olacak şekilde final konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde siRNA ile transfekte edildi ve 72 saat kültür şartlarında inkübe edildi. Ayrıca siRNA ile birlikte OTA muamelesi uygulanacak gruplardaki hücrelere ise, 72 saatlik periyodun son 24 saatinde 10 µM ve 25 µM olmak üzere iki farklı dozda OTA verildi. Böylece siRNA transfeksiyonu gerçekleşmiş hücreler 72 saat, beraberinde OTA ile muamele edilen hücreler ise 24 saat inkübe edilmiş oldu.
- Süre sonunda hücreler tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve oluşan hücre süspansiyonu her bir gruba ait

15ml'lik falkonlara aktarılarak 600 x g'de 8 dakika santrifüj edilerek hücre peleti elde edildi.

- Hücre peleti 1 kez soğuk 1X PBS ile yıkandı ve 600 x g'de 4 °C'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda elde edilen hücre pelleti, pelletin miktarına göre 60-120 µl lizis tamponu ile resüspanse edildi.
- 10000 x g'de ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Immunoblotlama aşamasında her numuneden eşit miktarda proteinin yüklenebilmesi için, supernatandaki protein miktarı kuantifiye edildi ve bu numuneler immunoblot analizi için kullanıldı.

3.5.2. Protein Miktar Tayini

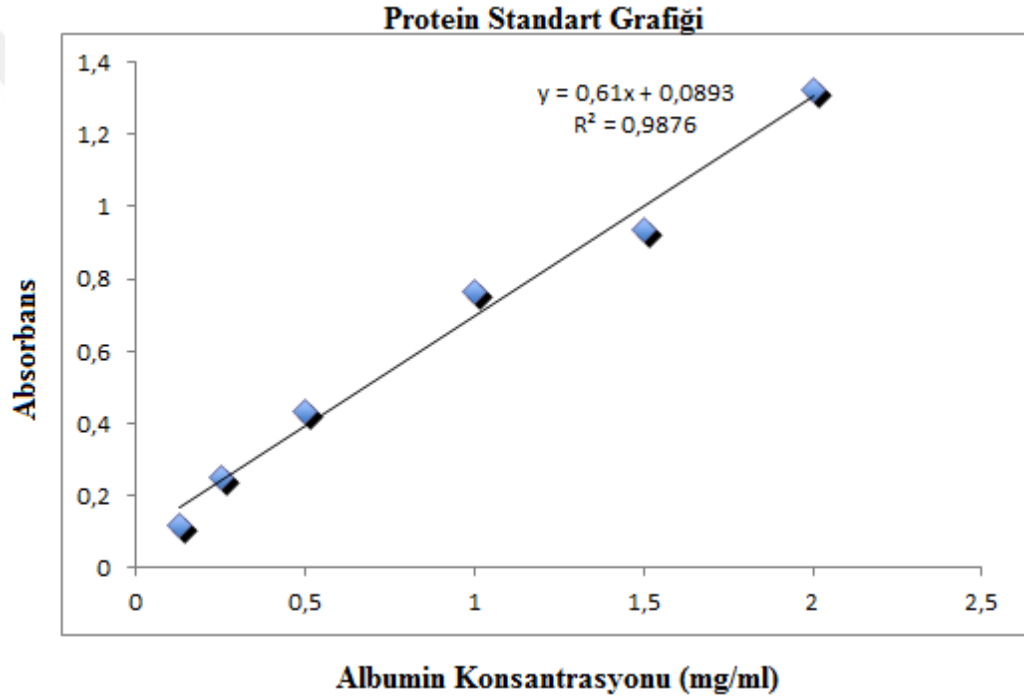
Prensip: Bradford yöntemi ile yapılan protein miktar tayininde organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek renk oluşturması esas alınmaktadır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorbans verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesidir.

Bradford yöntemi Coomasie brillant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak, değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Mavi rengin oluşmasında proteinin aminoasit bileşimi önemlidir. Boyanın özellikle arjinin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Yöntemde boyaya bağlanmış protein 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermekte ve standartlar varlığında köre karşı protein miktar tayini yapılmaktadır (84)

Kullanılan Kit: BioRad'dan (Hercules, CA, USA) temin edilen Bradford protein tayin kiti kullanıldı. Standart olarak, kit içerisinde verilen farklı konsantrasyonlardaki kullanıma hazır albümin solüsyonları kullanıldı.

Prosedür:

- Deney prosedürü olarak, kit üretici firma tarafından önerilen protokol uygulandı.
- Numunelerdeki protein miktarı, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 1,5 ve 2 mg/ml olmak üzere 6 farklı albümin standardının kullanıldığı standart grafiğe göre hesaplanarak tayin edildi. Standart grafiği olarak, her bir ölçüm ile eş zamanlı olarak elde edilen anlık grafikler kullanıldı ve R^2 değeri 0.95'in üzerinde olan grafikler kabul edildi. Buna bir örnek olarak aşağıdaki grafik verildi (Şekil 3.4.2).



Şekil 3.5.2. Bradford yöntemine göre elde edilen protein standart grafiği.

3.5.3. Immunoblot Analizi

Prensip: HK-2 hücrelerinde siRNA transfeksiyonu ve OTA muamelesi sonrasında oluşan Cdk2, Cdk4 ve siklin D1 protein ekspresyonundaki değişiklikler immunoblotlama yöntemi ile gösterildi. Bu yöntem, elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre jelde ayrılan proteinlerin, membrana aktarılarak önce spesifik antikoları ile sonra da bunu tanıyan ve belirli bir substrat ile reaksiyon verebilen ikincil bir antikora ile bağlanması sonucu oluşan bantların gösterilmesi prensibine

dayanmaktadır. Bu amaçla proteinler önce Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrışmalı, sonra ilgili primer antikorla ile blotlanmalıdır.

Kullanılan Kit ve Solüsyonlar:

- Yükleme Tamponu (Loading Dye): 3X SDS-PAGE yükleme tamponu olarak Biovision'dan (Milpitas, CA, USA) kullanıma hazır olarak temin edildi. Tamponun içeriğinde; 150mM Tris-HCl (pH:6.8), 300mM DTT, %6 SDS, %30 gliserol, %0.3 bromfenol mavisi bulunur. Final konsantrasyonu 1X olacak şekilde örnekle birlikte kuyucuklara yüklendi.
- Elektroforez Tamponu (Running Buffer): 5X stok olarak hazırlandı.
- 15 gr Tris, 72 gr Glisin ve 5 gr SDS tartılıp 1L distile suda çözüldü. Kullanım aşamasında ise 5X'lik bu stok solüsyon, distile su ile 1X'e dilüe edildi.
- Blotlama Tamponu (Blotting Buffer): 10X stok olarak hazırlandı.
- 30.3 gr Tris, 144 gr Glisin ve 10 gr EDTA tartılıp 1L distile suda çözüldü. Kullanım aşamasında ise 10X'lik bu stok solüsyon, %20 metanol varlığında distile su ile 1X'e dilüe edildi. Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edilen metanol, transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi amacıyla blotlama tamponuna eklendi.
- Tris Buffered Saline (TBS-T) (%0.1 Tween 20): 10X stok TBS solüsyonu hazırlandı. 31,5 g Tris-HCl ve 80 gr NaCl tartılıp 1L distile suda çözüldü. Hazırlanan bu 10X'lik stok solüsyon, kullanılmadan önce distile su ile 1X'e dilüe edildi ve 1L için 1 ml Tween-20 eklenerek TBS-T solüsyonu hazırlandı.
- %5 Bloklama Solüsyonu: 1 g yağsız süt tozu, 20 ml TBS-T içerisinde taze olarak hazırlanır.
- Primer ve sekonder antikorlar için Cell Cycle Regulation Sampler Kit kullanıldı (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

- Cdk2, Cdk4 ve siklin D1 primer antikoru: 1:1000 oranında 1X TBS-T ile dilüe edilerek taze olarak hazırlandı. Üç antikorda anti-rabbit ve monoklonal karaktere sahiptir.
- Sekonder Antikor Solüsyonu: Alkalen fosfat (AP) ile konjuge edilmiş anti-rabbit sekonder antikoru, 1:2000 oranında TBS-T ile dilüe edilerek taze olarak hazırlandı.

Prosedür:

SDS-PAGE Elektrofrez

- Her kuyucukta 40 µg protein olacak şekilde örnekler, BioRad'dan (Hercules, CA, USA) temin edilen 4-15% Tris-HCl Precast Polyacrylamide hazır jelin kullanıldığı SDS-PAGE elektrofrezine tabi tutuldu.
- Jelin bulunduğu plakalar elektrofrez tankına yerleştirildikten sonra 1X elektrofrez tamponu (running buffer) hazırlandı. İç havuz elektrofrez tamponu ile kuyucukları tamamen kapatacak şekilde dolduruldu ve daha sonra dış havuz elektrofrez tamponu ile dolduruldu. Kuyucukların temiz ve sağlam olduğundan emin olmak için yıkama yapıldı.
- Protein miktarları Bradford yöntemiyle önceden tayin edilen numuneler, her bir kuyucukta 40 µg olacak şekilde 3X yükleme tamponu ile dilüe edildi. Hazırlanan numuneler 95 °C'lik termoblok içerisinde 5 dakika inkübe edildi. Markır olarak BioRad'dan (Hercules, CA, USA) temin edilen Kaleidoscope Prestained SDS-PAGE Standarts kullanıldı. İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan markır, diğerlerine de numuneler jele yüklenerek elektrofrez başlatıldı. 1X elektrofrez tamponu varlığında, numunelerin ayrıştırma jeline kadar aynı anda toplanabilmesi için akım önce 80 V'a, daha sonra asıl ayrışmanın olması için 120 V'a ayarlanarak elektrofrez işlemi gerçekleştirildi.

Immunoblotlama:

- Elektroforez sonunda plaka kalıpların arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde PVDF (Poli-viniliden florür) membranı ile sandviçlendi. Bu amaçla kullanılacak olan PVDF membranı önce 2-3 dk metanol içinde rehidrate oldu ve sonrasında 2-3 dk distile suda yıkandı. Bu sırada membran, süngerler ve filtre kağıtları soğuk 1X transfer tamponu ile doyuruldu.
- Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, whatmann kağıdı, jel, PVDF membran, whatmann kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üst üste yerleştirildi ve aparat sıkıca kapatıldı. Hazırlanan sandviçin anot kutbunun anotta, katot kutbunun da katotta olmasına dikkat edilerek transfer tankına yerleştirildi. Transfer işlemi 1X transfer tamponu içerisinde +4 °C ve 80 V'da, 4 saatte süresince gerçekleşti.
- Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla %5'lik bloklama solüsyonu ile oda ısısında 1 saat, daha sonra çalışılması hedeflenen Cdk2, Cdk4 veya siklin D'ye spesifik primer antikor ile +4 °C'de gece boyunca, son olarak ise sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat süresince inkübe edildi.

Görüntüleme:

- Primer ve sekonder antikorlar ile işaretlenmiş olan örneklerdeki Cdk2, Cdk4 ve Siklin D1 protein ekspresyonlarına ait bantlar, sekonder antikorun işaretli olduğu alkalin fosfatazın BCIP/NBT reaktifi (Sigma, St.Louis, USA) ile verdiği reaksiyon sonucu kolorimetrik olarak Kodak Image Station 2000MM (USA) cihazında görünür hale getirildi. Bantların yoğunluğu Image J – Versiyon 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı ile kuantifiye edilmiştir (85).

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizleri SPSS 20.0 (86) paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerlerinin karşılaştırılmaları non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kriter alınmış ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar *, **, # ile gösterilmiştir.

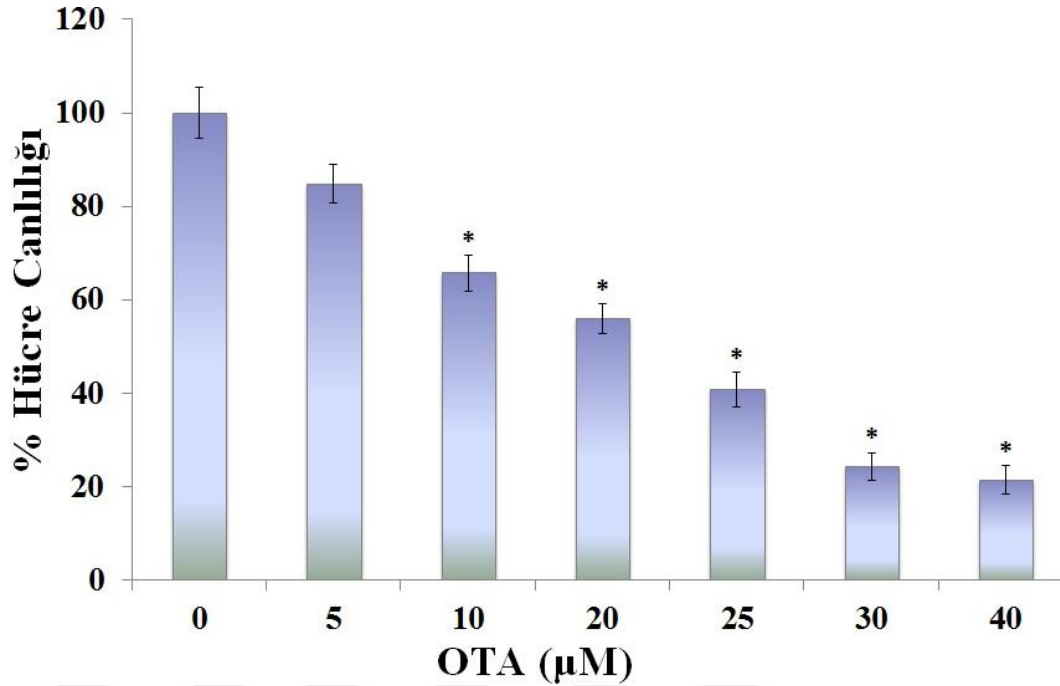


4. BULGULAR

4.1. Hücre Sitotoksosite Ölçümü

Çalışmanın ileri aşamalarında kullanılacak en uygun OTA dozunun saptanması amacıyla yapılan hücre sitotoksosite ölçümü için hücreler; 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M ve 40 μ M olmak üzere 6 farklı OTA dozu ile 24 saat muamele edildi.

Metabolik olarak aktif, diğer bir ifadeyle canlı olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesinin ölçümüne dayalı olarak elde edilen absorbans değerleri ile hücre sitotoksosite ölçümü ilişkilendirildi. OTA'nın hücrelerde oluşturduğu toksisite, OTA ile muamele edilen hücrelerin absorbans değerlerinin, muamele edilmemiş hücrelerin absorbans değerlerine oranı ile değerlendirildi. Sonuçlar OTA muamelesinin olmadığı durumda elde edilen verilere oranlanarak % kontrol olarak verildi. OTA'nın, konsantrasyona bağlı olarak HK-2 hücrelerinin canlılığını azalttığı tespit edildi. Buna göre; 5 μ M OTA'nın %16 oranında hücre canlılığını baskıladığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). Buna karşılık 10 μ M, 20 μ M, 25 μ M OTA'nın hücre canlılığı üzerinde sırasıyla % 35, % 45 ve % 60 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). 30 μ M ve 40 μ M OTA'nın ise kontrole göre istatistiksel anlamlılık göstermekle birlikte % 76 ve % 79 gibi büyük oranda canlılığı baskılayarak toksik bir etkiye sahip olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Şekil4.1). OTA'nın tüm dozlarında gözlenen hücresel yanıtlar kıyaslandığında, HK-2 hücrelerinde hücre inhibisyonuna neden olan ancak toksik etkinin gözlenmediği en düşük doz olan 10 μ M ve en yüksek doz olan 25 μ M OTA, çalışmanın ileri deneylerinde kullanılmak üzere belirlendi. Böylece, OTA'nın etkileri iki farklı doz olarak ayrı ayrı değerlendirildi.



Şekil 4.1. OTA'nın hücre canlılığı üzerine etkisi. HK-2 hücreleri, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM ve 40 µM OTA ile 24 saat muamele edildi. OTA ile muamele edilmemiş hücrelerdeki değerler baz alınarak % kontrol olarak verilen sonuçlar, birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama ± standart hata değerine karşılık gelmektedir (*, p < 0,05).

4.2. siRNA Transfeksiyonu ve OTA Muamelesinin HK-2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

Çalışmada kullanılacak uygun OTA dozlarının belirlenmesini takiben, p53 siRNA'nın yalnız ve OTA ile birlikte muamele edildiği durumda, HK-2 hücrelerinin canlılığının belirlenmesi amacıyla tekrar MTS analizi yapıldı. Bu amaçla hücreler; yalnız negatif siRNA ile veya p53 siRNA ile 72 saat süresince transfekte edildi, siRNA'lar ile birlikte ayrıca 10 µM ve 25 µM OTA dozu ile 24 saat süreyle muamele edildi. Sonuçlar OTA muamelesinin olmadığı durumda elde edilen verilere oranlanarak % kontrol olarak değerlendirildi.

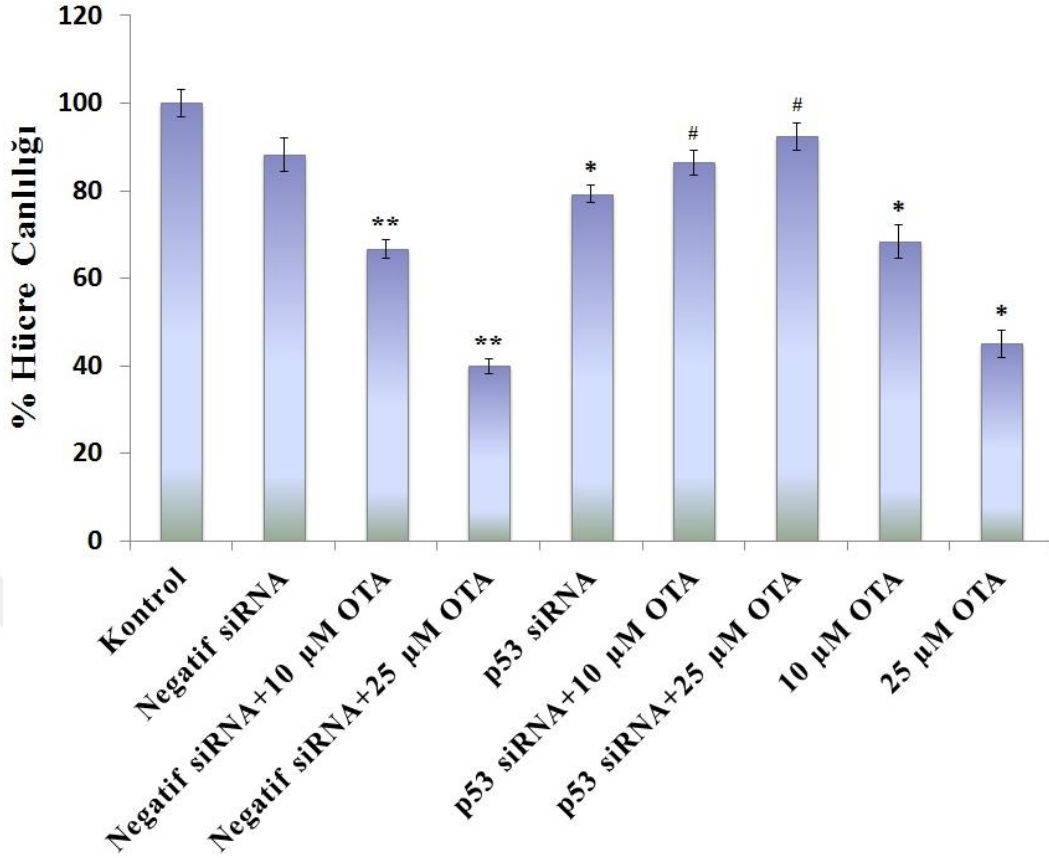
Negatif siRNA ile transfekte edilen hücreler, herhangi bir uygulama yapılmamış HK-2 hücrelerinden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında transfeksiyona bağlı olarak % 12 oranında hücre canlılığını baskıladığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı belirlendi (p > 0,05). Negatif siRNA transfeksiyonu gerçekleşmiş ve bununla birlikte 10 µM ve 25 µM OTA'ya

maruz kalan hücrelerde hücre canlılığının % 34 ve % 61 oranında baskılandığı gözlemlendi. Yalnız negatif siRNA ile transfekte edilen hücreler ile negatif siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra 10 µM ve 25 µM OTA ile muamele edilen hücrelerin sonuçları karşılaştırıldığında, OTA'nın hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

p53 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde ise, transfeksiyona bağlı olarak hücre canlılığında % 21 oranında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi. HK-2 hücreleri p53 siRNA ile birlikte 10 µM ve 25 µM OTA maruziyetine bırakıldığında ise, p53 siRNA'nın hücre canlılığı üzerinde tek başına yaptığı % 21'lik inhibisyonun, OTA dozlarında azalarak sırasıyla % 14 ve % 8 olduğu gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Bu sonuç, p53 ortamda olmayınca OTA'nın hücreleri öldürmediğini gösterdi. Bununla birlikte 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA muamelesi yapılan hücreler, OTA ile muamele edilmemiş hücreler ile kıyaslandığında canlılığın anlamlı bir şekilde sırasıyla %32 ve %56 oranında inhibe olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 4.2).

Hücre canlılığı ölçümünün sonuçları, hem yalnız negatif siRNA ile transfekte edilen hem de negatif siRNA ile iki farklı OTA dozunun birlikte muamele edildiği HK-2 hücrelerinin canlılığında azalmalar olduğunu göstermiştir. Buna paralel olarak, yalnız 10 µM ve 25 µM OTA ile muamele edilen hücrelerde de hücre canlılığının inhibe olduğu saptandı. Buna karşın p53 siRNA transfeksiyonu ve p53 siRNA transfeksiyonu ile birlikte iki farklı dozdaki OTA muamelesine sonucunda ise hücre canlılığında anlamlı bir azalmanın olmadığı tespit edildi.

p53 geninin susturulması sonucunda hücre döngüsünde önemli bir kontrol noktası ortadan kalkmaktadır. OTA ise 10 µM ve 25 µM dozlarda HK-2 hücrelerinde hücre canlılığını azaltmakta ve hücre döngüsünde duraklamalara neden olmaktadır. Bu verilere dayanarak, p53 siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA muamelesi yapılmış hücrelerde, hücre canlılığında anlamlı bir azalmanın gözlenmemesi ve tersine hücre canlılığında artışın gözlenmesi, OTA'nın p53 aracılı bir mekanizma üzerinden hücre canlılığını etkilediğini gösterdi.



Şekil 4.2. p53 siRNA aracılı p53 geninin susturulmasının ve beraberinde OTA indüksiyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücreler, önce ilgili siRNA ile (50nM; 72 saat) ve beraberinde OTA dozları ile (10 µM ve 25 µM; 24 saat) muamele edildi. OTA ile muamele edilmemiş hücrelerdeki değerler baz alınarak % kontrol olarak verilen sonuçlar, birbirinden bağımsız üç deneyin ortalama ± standart hata değerine karşılık gelmektedir.

4.3. p53 siRNA ile p53 Geninin Susturulmasının ve OTA'nın Hücre Döngüsüne Olan Etkisinin Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Değerlendirilmesi

p53 diziyeye özgü transkripsiyonel koaktivatör olarak işlev görmektedir ve birçok hücre tipinde p53 ekspresyonu hücre döngüsü kontrol noktalarını etkileyerek döngünün durdurulmasına neden olmaktadır (67). OTA, hücre döngüsünü etkilemekte olup çeşitli hücre hatlarında OTA'nın hücre döngüsünü G1, S ve G2'de duraklattığı gösterilmiştir (18, 22, 26, 54).

Bu bilgiler ışığında, OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu etkisinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak amacıyla HK-2 hücrelerinde p53 geni susturularak,

hücre döngüsünün ilerlemesinde görevli siklinlerden olan, Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonlarında meydana gelen olası değişiklikler RT-PCR deneyi ile tespit edildi. Ayrıca p53 siRNA transfeksiyonu sonucunda p53 geninin mRNA ekspresyonunda beklenen inhibisyon RT-PCR deneyi ile kanıtlandı.

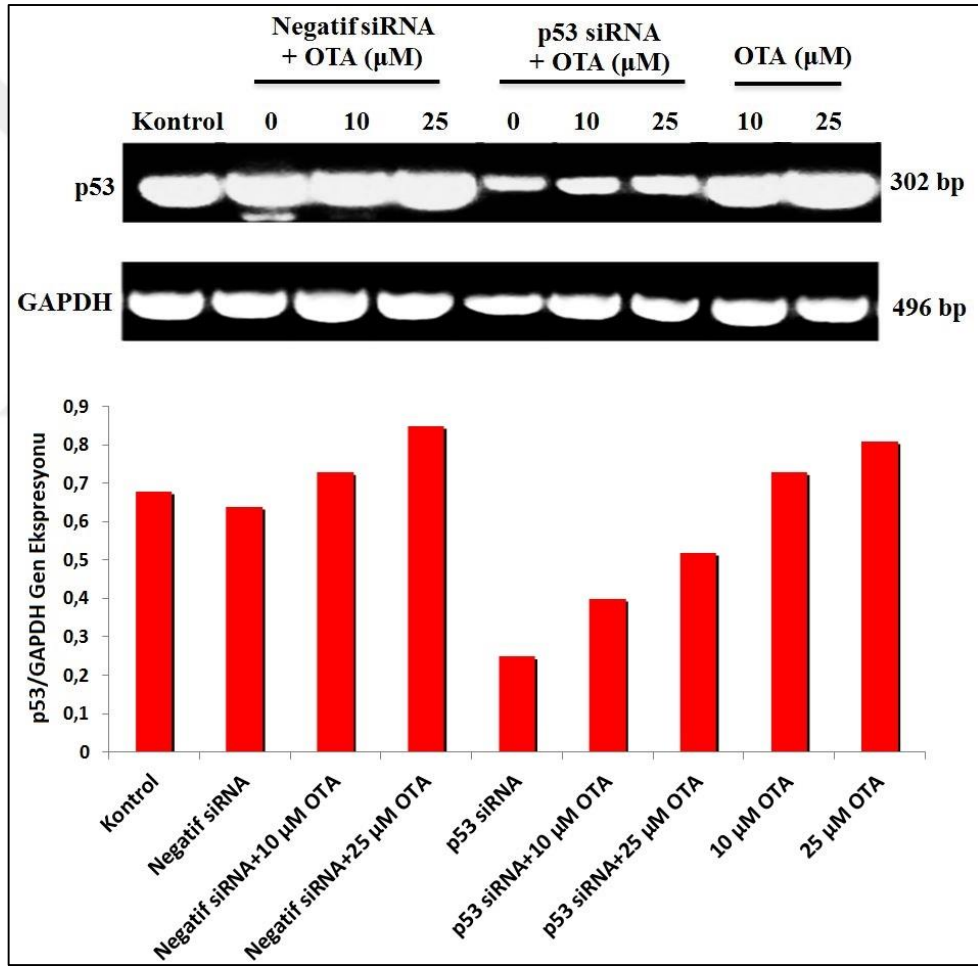
4.3.1. p53 siRNA ile Transfekte Edilen HK-2 Hücrelerinde p53 Geninin Ekspresyonu

HK-2 hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktarı ve saflıkları ölçülerek, saflığı 1,7-2 olan RNA'lar RT-PCR analizlerinde kullanıldı. Yüksek saflığa sahip RNA'lardan 1 µg olacak şekilde ters transkriptaz enzim yardımıyla cDNA sentezlendi. cDNA'lar kullanılarak RT-PCR ile p53 geninin ifadesi araştırıldı. RT-PCR sonucunda elde edilen p53 mRNA'larına ait amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde ayrıştırılarak görünür hale getirildi.

p53'ün RT-PCR sonuçları analiz edildiğinde, HK-2 hücreleri p53 siRNA ile transfekte edildiğinde p53 mRNA ekspresyonunun, herhangi bir muamele görmemiş hücreye ve negatif siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelere göre azaldığı tespit edildi. Buna karşılık negatif siRNA ile hücrelerin transfekte edilmesi sonucunda p53 geninde anlamlı bir inhibisyon gözlenmedi. HK-2 hücrelerinin kendi kontrol şartları baz alındığında, yalnız p53 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde p53 ekspresyon seviyesi %25 olarak tespit edilirken, p53 siRNA transfeksiyonu ile birlikte 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA muamelesi yapılan hücrelerde mRNA ekspresyon seviyesi artarak sırasıyla %40 ve % 52 olarak tespit edildi. Negatif siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde p53 ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, yalnız negatif siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde bu değer % 64 oranında iken, 10 µM ve 25 µM dozlardaki OTA ile kombine olarak muamele edilen hücrelerde ise p53 ekspresyon seviyesinin sırasıyla %73 ve %85 olduğu belirlendi. Yalnız 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde ise bu değer, sırasıyla %73 ve %77 olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.1). Ayrıca, internal kontrol amacıyla gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılmış olup, GAPDH'e spesifik primerlerin kullanılmasıyla p53 gen ekspresyonunun normalizasyonu sağlandı.

Bu sonuç, hücrelerin p53 siRNA ile transfekte edildiğinde p53 gen ekspresyonunun inhibe olduğunun açıkça kanıtıdır. Bu nedenle ileriki analizlerimizde p53 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde elde ettiğimiz bulguları, p53 mRNA gen ekspresyonunun inhibisyonu ile direkt olarak ilişkilendirebildik.

Ayrıca bu bulgular; p53 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, p53 geninin ekspresyonunun baskılandığını ancak OTA'nın hücrede meydana getirdiği hasara cevaben, hem p53 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde hem de negatif siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde ekspresyon seviyelerinde artışın meydana geldiğini gösterdi.



Şekil 4.3.1. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın p53 geni ekspresyonu üzerine etkisi. Sonuçlar RT-PCR ile elde edilen p53 ve GAPDH gen ekspresyon bantlarının Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile taranması sonucunda p53/GAPDH şeklinde oranlanmış olup kontrol hücrelerin bu oranı 1 olarak kabul edildi. Diğer grupların sonuçları ise, bunun katları şeklinde ifade edildi.

4.3.2. p53 siRNA ile Transfekte Edilen HK-2 Hücrelerinde OTA'nın Siklin D1 ve Siklin E1 Geni Ekspresyonu Üzerine Etkisi

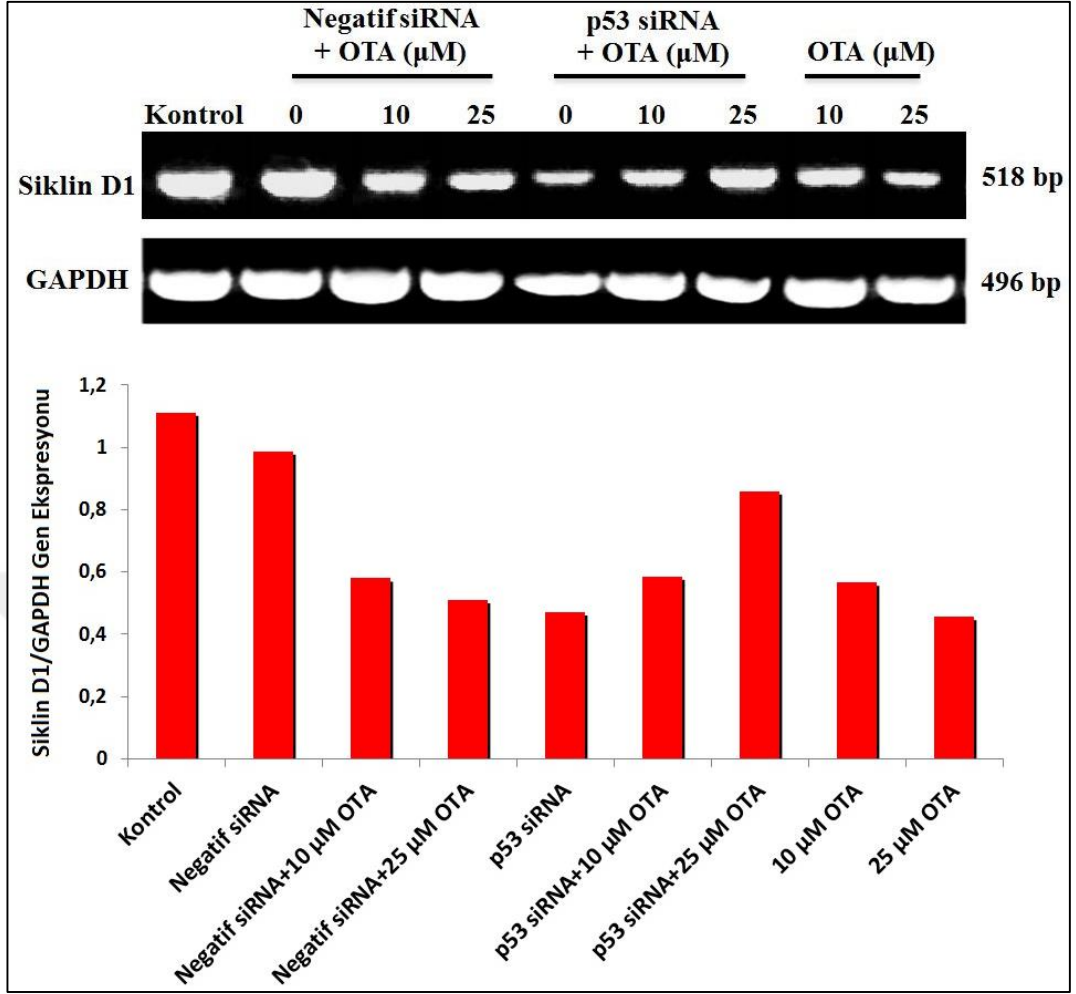
İnsan böbrek proksimal tübül epitel hücrelerinde, p53 geni susturulduktan sonra OTA muamelesine cevaben siklin D1 ve siklin E1'in mRNA ekspresyonlarındaki olası değişiklikler RT-PCR yöntemi ile tespit edildi.

HK-2 hücrelerinin kendi kontrol şartları baz alındığında, negatif siRNA transfeksiyonu sonucunda siklin D1 geninin ekspresyonunda önemli bir değişim gözlenmedi. Bununla birlikte, negatif siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra sırasıyla 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA muamelesi yapılan hücrelerde, siklin D1 geninin ekspresyonunda sırasıyla %40 ve % 47 oranında azalışın olduğu gözlemlendi. OTA'nın bu baskılayıcı etkisine paralel olarak, yalnız 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerdeki siklin D1 geninin ekspresyonunun, herhangi bir muamele görmemiş hücrelerdeki ekspresyonu ile kıyaslandığında OTA'nın sırasıyla %54 ve % 65 oranında azalmaya neden olduğu saptandı. p53 siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; yalnız p53 siRNA ile transfekte edilen hücreye göre, p53 siRNA ve beraberinde sırasıyla 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde, diğer gruplardaki verilerin aksine siklin D1 geninin ekspresyonunda sırasıyla %11 ve % 38 oranında artışın olduğu saptandı (Şekil 4.3.2.a).

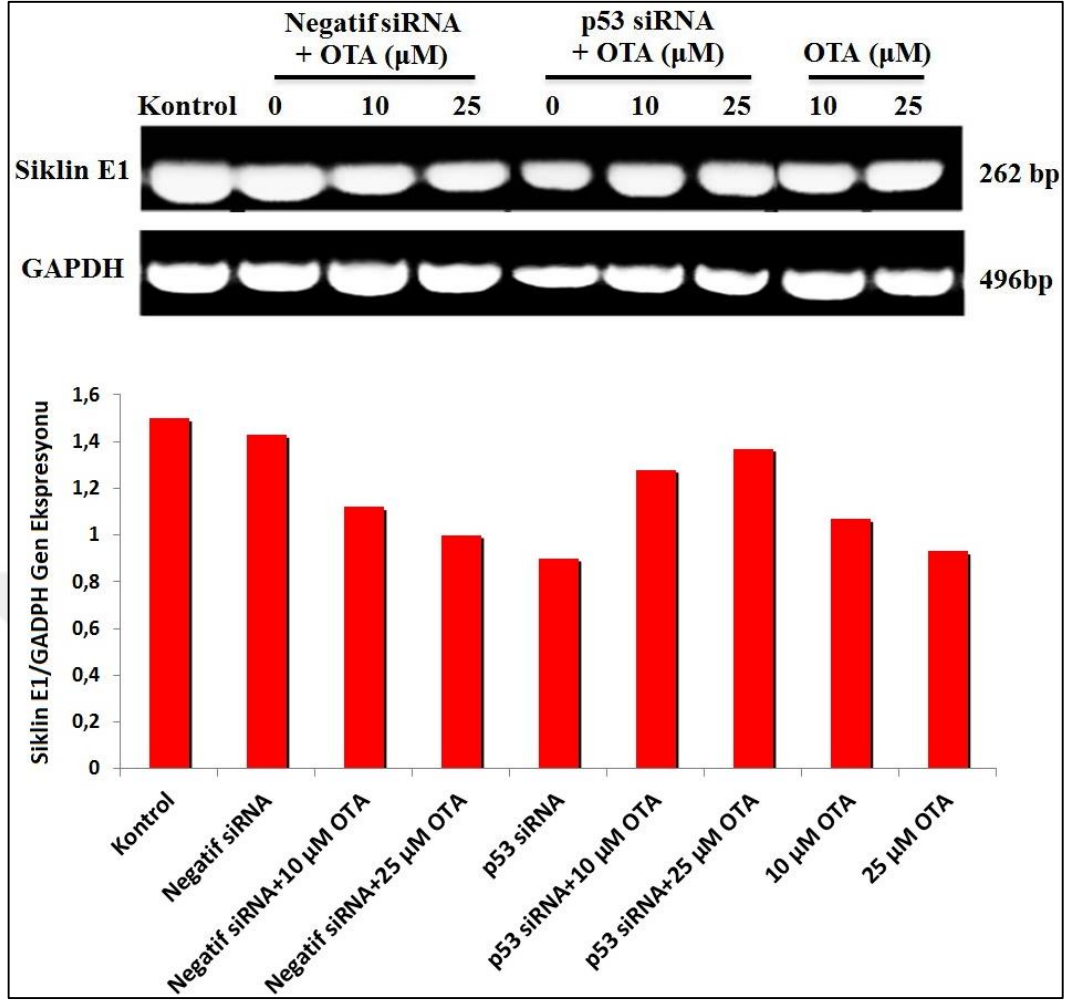
Siklin D1 mRNA ekspresyonunda tespit edilen bu bulgulara ek olarak, Siklin E1 geninin ekspresyon seviyesi değerlendirildiğinde HK-2 hücrelerinin kendi kontrol şartları baz alındığında, negatif siRNA transfeksiyonu sonucunda siklin E1 geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmedi. Negatif siRNA transfeksiyonundan sonra sırasıyla 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde, siklin E1 geninin ekspresyonunda sırasıyla %31 ve %43 oranında azalma olduğu saptandı. OTA'nın bu baskılayıcı etkisine paralel olarak, yalnız 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerdeki siklin E1 geninin ekspresyonunun, herhangi bir muamele görmemiş hücrelerdeki ekspresyonu ile kıyaslandığında OTA'nın sırasıyla %43 ve % 57 oranında azalmaya sebep olduğu saptandı. p53 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; yalnız p53 siRNA ile transfekte edilen hücreye göre, p53 siRNA ve beraberinde sırasıyla 10

μM ve $25 \mu\text{M}$ dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde, diğer gruplarda saptanan ekspresyon seviyelerindeki azalışın tersine siklin E1 geninin ekspresyonunda sırasıyla % 38 ve % 47 oranında artışın olduğu belirlendi (Şekil 4.3.2.b).

Bu bulgular ışığında; OTA'nın bu iki genin ekspresyonları üzerinde benzer etkiye sahip olduğu saptandı. Hücre döngüsünün ilerlemesinde kritik öneme sahip G1 ve G1/S kontrol noktalarının anahtar düzenleyicilerinden olan Siklin D1 ve Siklin E1 mRNA ekspresyonlarını inhibe etmesi, OTA'nın hücre döngüsü üzerindeki durdurucu etkisini bu iki siklin üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bununla birlikte OTA'nın bu etkiyi p53 aracılı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmediğini kanıtlamak için p53 geninin susturulduğu durumlarda OTA'nın verdiği yanıtlar değerlendirildiğinde, siklin D1 ve Siklin E1 genlerine ait ekspresyon seviyelerinin arttığı saptandı. Oysa ki negatif siRNA ile transfekte edilen hücrelerde OTA indüksiyonu böyle bir etkiye neden olmadı. Bu sonuç, hipotezimizi destekleyecek nitelikte olup, OTA'nın hücre döngüsünü p53 üzerinden durdurduğunu açıkça göstermektedir.



Şekil 4.3.2.a. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Siklin D1 geni ekspresyonu üzerine etkisi. Sonuçlar, RT-PCR ile elde edilen Siklin D1 ve GAPDH gen ekspresyon bantlarının Image J dansitometre programı ile taranması sonucunda Siklin D1/GAPDH şeklinde oranlanmış olup, kontrol hücrelerin bu oranı 1 olarak kabul edildi. Diğer grupların sonuçları ise, bunun katları şeklinde ifade edildi.



Şekil 4.3.2.b. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Siklin E1 geni ekspresyonu üzerine etkisi. Sonuçlar, RT-PCR ile elde edilen Siklin E1 ve GAPDH gen ekspresyon bantlarının Image J dansitometre programı ile taranması sonucunda Siklin E1/GAPDH şeklinde oranlanmış olup, kontrol hücrelerin bu oranı 1 olarak kabul edildi. Diğer grupların sonuçları ise, bunun katları şeklinde ifade edildi.

4.4. p53 siRNA ile p53 Geninin İnhibisyonu ve OTA'nın Hücre Döngüsüne Etkisinin Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi

Hücre döngüsünün kontrolü ve doğru bir şekilde ilerlemesi Cdk enzimleri ve bunların düzenleyicileri olarak görev yapan siklinlerin seviye ve aktiviteleri ile sağlanmaktadır. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktası Cdk4 veya Cdk6 ile ilişkili D tipi siklinler, G1/S geçişindeki kontrol noktası ise Cdk2 ile ilişkili Siklin E

tarafından düzenlenmektedir (87). Bu nedenle Siklin D1, Cdk2 ve Cdk4 proteinleri, hücre döngüsünün kontrolünde kritik bir role sahiptir.

OTA'nın hücre döngüsünü G1, S ve G2 evrelerinde duraklattığı çeşitli çalışmalarda belirtilmekte olup (18, 22, 26, 54), altında yatan moleküler mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Bu bilgiler dahilinde, OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu etkisinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak amacıyla, HK-2 hücrelerinde p53 geni susturularak, hücre döngüsünün ilerlemesinde görevli siklinlerden olan Siklin D1 ve siklin bağımlı kinazlardan Cdk2 ve Cdk4'ün protein ekspresyon düzeylerinde meydana gelen olası değişiklikler Western Blot analizi ile tespit edildi.

4.4.1. p53 siRNA ile Transfekte Edilen HK-2 Hücrelerinde OTA Muamelesi Sonucu Siklin D1, Cdk 4 ve Cdk2'nin Protein Ekspresyon Düzeyleri

İnsan böbrek proksimal tübül epitel hücrelerinden protein eldesi sağlandıktan sonra lizatlar hazırlandı ve protein miktar tayini yapıldı. Western Blot analizi ile Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonu araştırıldı. β -aktin ise, her bir kuyucukta protein miktarının eşit olduğunu göstermek için kontrol amacıyla kullanıldı. Western Blot analizi sonucu elde edilen bantların Image J programıyla dansitometri analizlerinin yapılmasıyla semikantitatif bir değerlendirme yapıldı. Yapılan dansitometre analizi sonucu elde edilen bant yoğunlukları ilgili β -aktin bantının yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi. Sonuçlar herhangi bir muameleye uğramamış hücredeki protein ekspresyonu ile β -aktin ekspresyonunun oranlandığı şartlar 1 kabul edilerek, diğer bantlar bunun katları şeklinde hesaplanarak grafiğe aktarıldı.

Elde edilen sonuçlar, OTA'nın Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyon düzeylerinde benzer etkilere neden olduğunu gösterdi. Hücre döngüsünün kontrollü ilerlemesinde kritik öneme sahip olan Siklin D1 ve Cdk4 ile Cdk2'nin protein ekspresyonlarının OTA uygulaması ile baskılandığı, bununla birlikte p53 siRNA transfeksiyonu ile p53 geni susturulmuş gruplarda ise ekspresyonlarında artış meydana geldiği gözlemlendi.

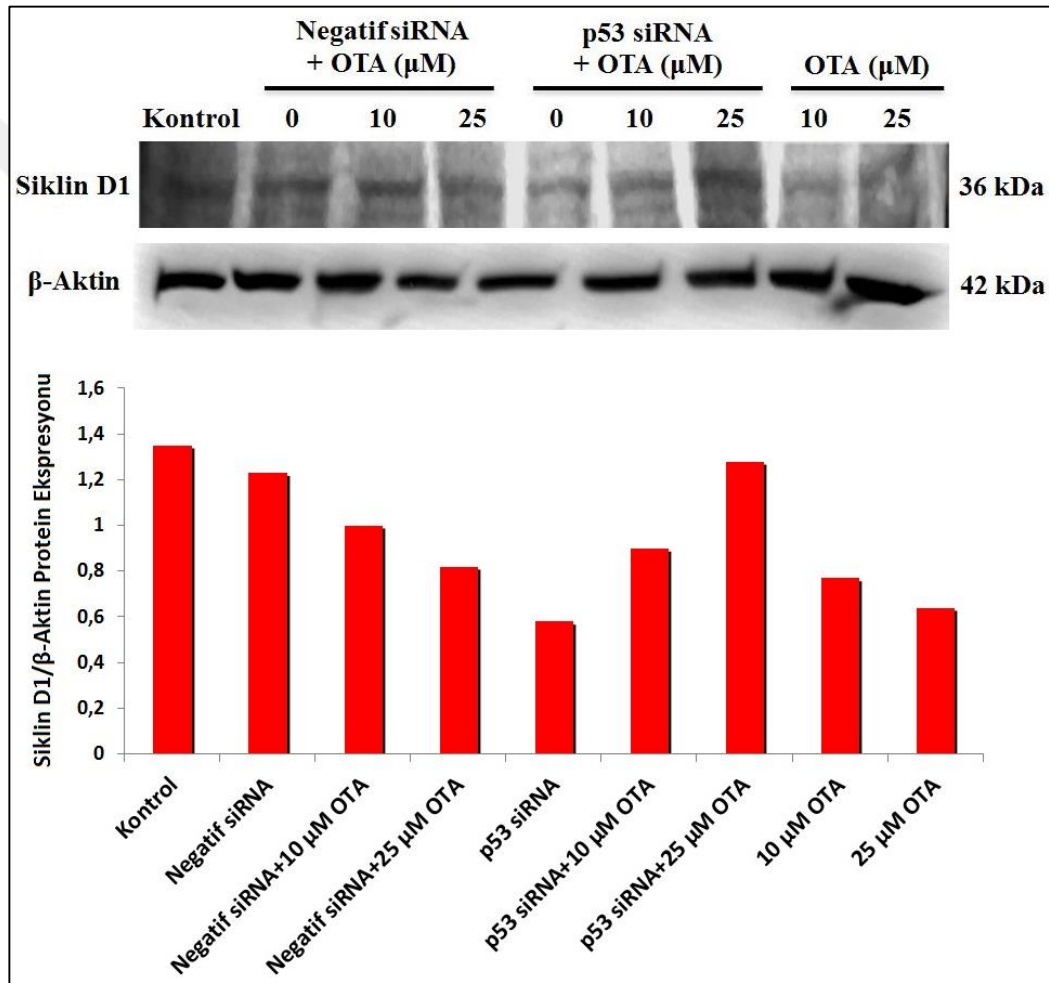
İnsan böbrek proksimal tübül epitel hücrelerinin kendi kontrol şartları baz alındığında, negatif siRNA transfeksiyonu sonucunda siklin D1 proteinin ekspresyonunda önemli bir değişim gözlenmezken; negatif siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra sırasıyla 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA muamelesi yapılan hücrelerde, Siklin D1 proteinin ekspresyonunda sırasıyla %23 ve %41 oranında azalışın olduğu gözlemlendi.

Benzer şekilde yalnız 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde Siklin D1 proteinin ekspresyonunun herhangi bir muameleye uğramamış hücrelere kıyasla, sırasıyla %58 ve %74 oranında azaldığı gözlemlendi. p53 siRNA ile transfeksiyonu yapılan hücrelerdeki ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; yalnız p53 siRNA ile transfekte edilen hücreye göre, p53 siRNA ile transfeksiyonu sonrasında 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile indüklenen hücrelerde diğer gruplardaki verilerin tersine Siklin D1 proteinin ekspresyonunda sırasıyla %32 ve %70 oranında artışın olduğu saptandı (Şekil 4.4.1.a).

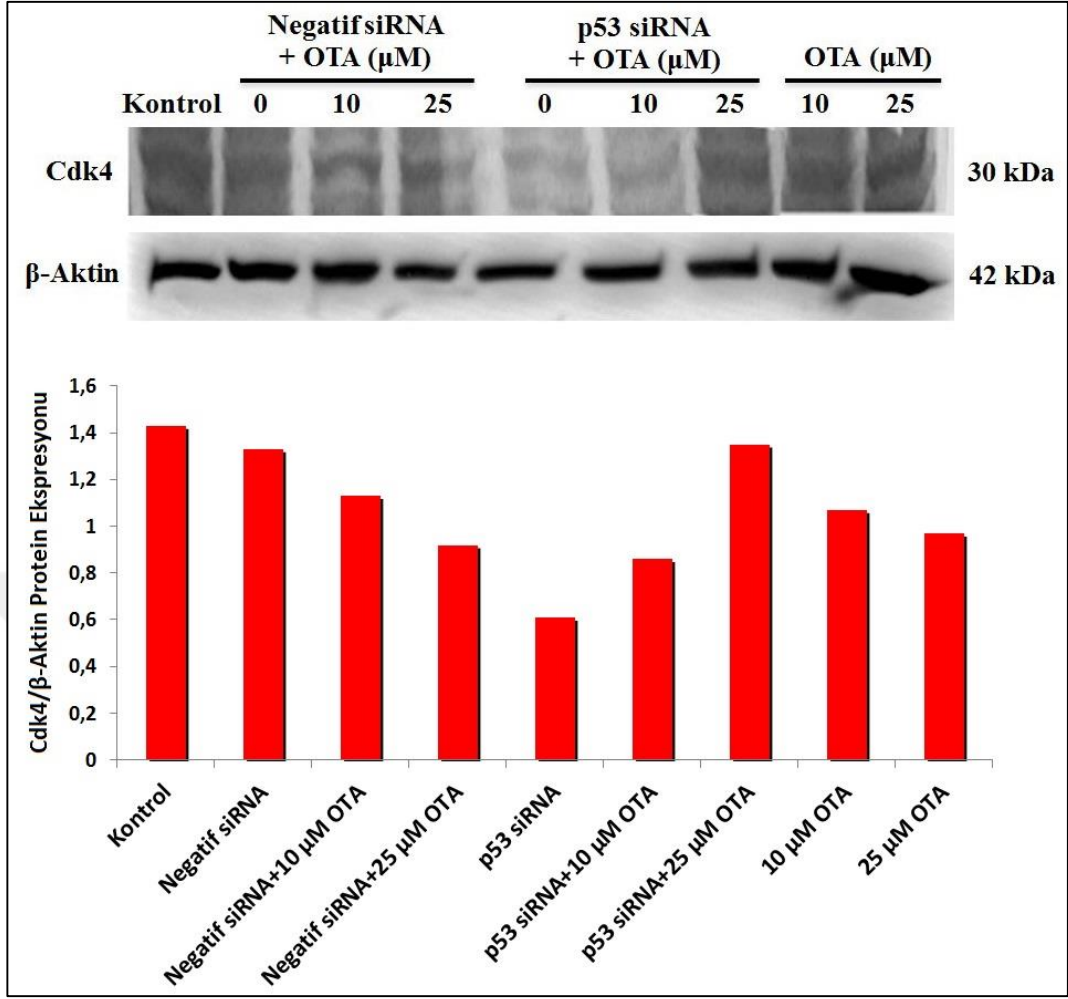
HK-2 hücrelerinin kendi kontrol şartlarına göre, negatif siRNA transfeksiyonu sonucunda Cdk4 ve Cdk2 protein ekspresyonlarında sırasıyla %10 ve %11 gibi çok düşük bir değişim meydana geldiği ve bunun anlamlı olmadığı gözlemlendi. Negatif siRNA ile transfeksiyonundan sonra sırasıyla 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde, Cdk4 protein ekspresyonunda %20 ve %41 oranında, Cdk2 protein ekspresyonunda ise sırasıyla %28 ve %54 oranında azalma olduğu saptandı. Herhangi bir muameleye uğramamış hücrelerle kıyaslandığında, yalnız 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde de Cdk4 protein ekspresyonunda sırasıyla %36 ve %46 oranında, Cdk2 protein ekspresyonunda ise %49 ve %67 oranında azalma gözlemlendi.

p53 ile siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde; yalnız p53 siRNA ile transfekte edilen hücreye göre, p53 siRNA ile transfeksiyon sonrasında 10 µM ve 25 µM dozlarda OTA ile muamele edilen hücrelerde, Cdk4 protein ekspresyonunun sırasıyla %25 ve %74 oranında, Cdk2 protein ekspresyonunda ise %25 ve %65 oranında arttığı gözlemlendi (Şekil 4.4.1.b, Şekil 4.4.1.c).

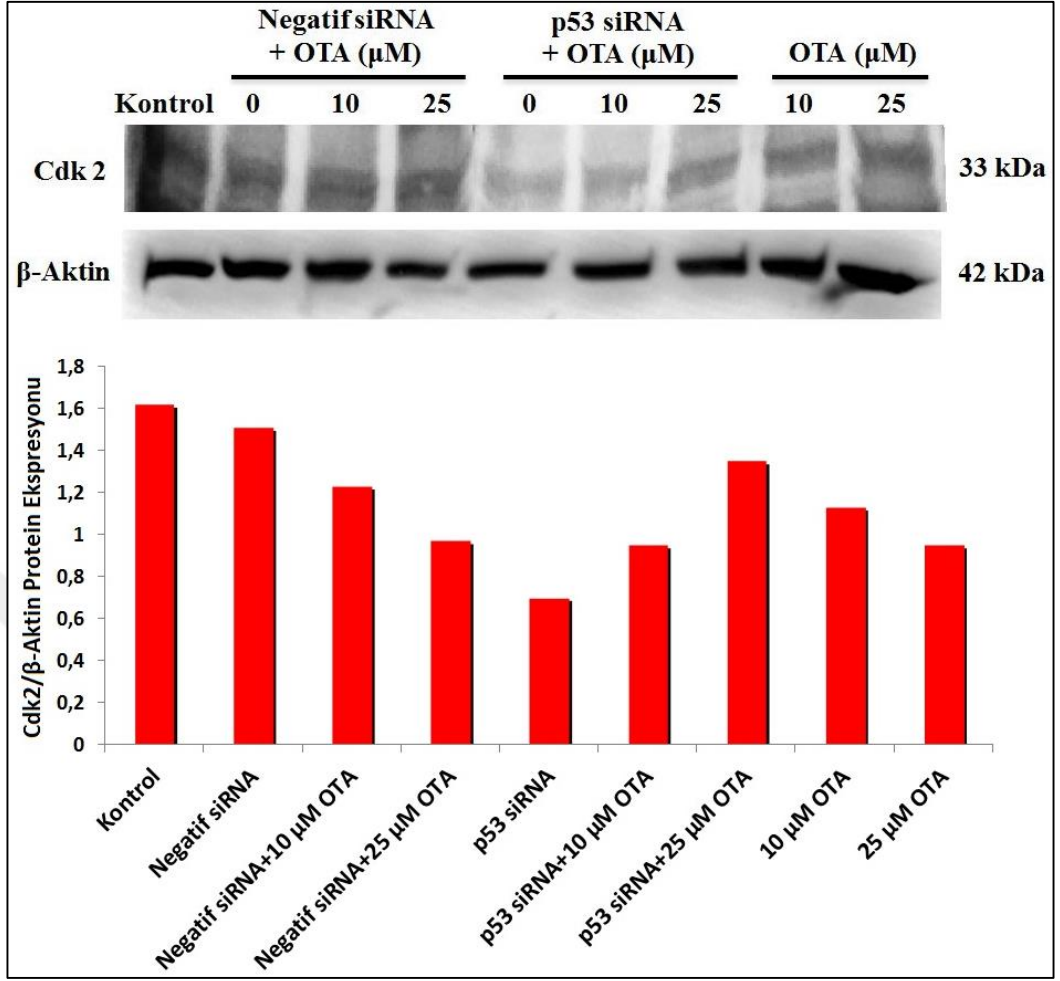
Bu bulgular ışığında; hücre döngüsünün kontrollü ve doğru bir şekilde ilerlemesinde görev alan siklinlerden; Siklin D1 ve siklin bağımlı kinazlardan; Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonunun, OTA indüksiyonunu takiben inhibe olduğu kanıtlandı. Bununla beraber OTA'nın hücre döngüsü üzerindeki durdurucu etkisinin altında yatan mekanizmayı açıklamak adına p53 geninin susturulduğu hücrelerde, Siklin D1 ile Cdk4 ve Cdk2 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin, maruz kalınan OTA dozuna bağlı olarak arttığı saptanarak, OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu yöndeki etkisini p53 aracılı bir mekanizma ile gerçekleştirdiği sonucuna varıldı.



Şekil 4.4.1.a. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Siklin D1 proteini ekspresyonu üzerine etkisi. Sonuçlar, western blot ile elde edilen Siklin D1 ve β-aktin protein ekspresyon bantlarının Image J dansitometre programı ile taranması sonucunda Siklin D1/β-aktin şeklinde oranlanmış olup, kontrol hücrelerin bu oranı 1 olarak kabul edildi. Diğer grupların sonuçları ise, bunun katları şeklinde ifade edildi.



Şekil 4.4.1.b. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Cdk4 proteini ekspresyonu üzerine etkisi. Sonuçlar, western blot ile elde edilen Cdk4 ve β -aktin protein ekspresyon bantlarının Image J dansitometre programı ile taranması sonucunda Cdk4/ β -aktin şeklinde oranlanmış olup, kontrol hücrelerin bu oranı 1 olarak kabul edildi. Diğer grupların sonuçları ise, bunun katları şeklinde ifade edildi.



Şekil 4.4.1.c. p53 siRNA ile p53 geni susturulan HK-2 hücrelerinde, OTA'nın Cdk2 proteini ekspresyonu üzerine etkisi. Sonuçlar, western blot ile elde edilen Cdk2 ve β -aktin protein ekspresyon bantlarının Image J dansitometre programı ile taranması sonucunda Cdk2/ β -aktin şeklinde oranlanmış olup, kontrol hücrelerin bu oranı 1 olarak kabul edildi. Diğer grupların sonuçları ise, bunun katları şeklinde ifade edildi.

5. TARTIŞMA

OTA, *Aspergillus ve Penicillium* türü mantarlar tarafından üretilen yaygın bulunan bir mikotoksindir. Tahıl ve tahıl ürünlerinde, baklagiller, süt ve süt ürünlerinde, kurutulmuş gıdalarda, baharatlar, çay, kahve, şifalı bitkiler, kakao gibi birçok gıda maddesinde bulunması nedeniyle, insanlar günlük hayatta sıklıkla OTA'ya maruz kalmaktadır (23). OTA, yaygın bulunması ve maruziyetinin artması nedeniyle son yıllarda önemli bir halk sağlığı sorunu olarak dikkati üzerine çekmektedir. Gıdalarda bulunması ve tüketimi nedeniyle önemli bir sağlık sorunu haline gelen OTA'nın risk değerlendirmesi üzerine kapsamlı incelemeler yapılmaktadır (48).

Tüketilen besinlerle vücuda alınan OTA düşük miktarlarda karaciğer, kas, yağ ve beyin dokusunda birikmekte olup (15, 17), birçok klinik ve deneysel çalışma verileri OTA'nın başlıca hedef organının böbrek olduğunu vurgulamaktadır (5, 15-17). Böbreklerde OTA'ya özgü özel taşıyıcılar bulunduğu ve bu nedenle birikimin en fazla bu dokuda gerçekleştiği düşünülmektedir. OTA'nın, insanlarda endemik nefropati ve tübüler interstisyel nefropati gelişiminde rol oynayan etyolojik ajanlardan biri olduğu belirtilmiştir (15, 19). Toksin, böbrek kan akımı, glomerüller ve tübüler fonksiyonda dahil olmak üzere farklı nefron fonksiyonlarını etkilemektedir. Proksimal ve distal tübüllerin epitelyal hücreleri ve interstisyel hücreler OTA'nın başlıca hedefleridir (19, 21, 23, 40). Bununla birlikte yapılan literatür çalışmalarında OTA'nın etkilerinin, insan hepatoma kökenli hücrelerde (HepG2), insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde (CaCo-2), domuz böbrek epitelyal hücrelerinde (LLC-PK1), insan mide epitelyum hücrelerinde (GES-1), insan mononükleer periferik kan hücrelerinde, insan özofagus epitelyum hücrelerinde (Het-1A), sıçan ve farelerin başlıca böbrek dokusu olmak üzere çeşitli dokularında araştırıldığı gözlenmiştir (12, 18, 26, 44, 45, 47, 48, 88). Ancak OTA'nın başlıca hedef organının böbrek olması ve kronik OTA maruziyetinin öncelikle proksimal tübül epitelyal hücreleri etkilemesi nedeniyle çalışmamızı, insan proksimal tübül epitel hücre hattı (HK-2) kullanarak gerçekleştirdik.

OTA ile kontamine gıdaların tüketilmesi, nefrotoksisite, genotoksisite, karsinojenite, teratojenite, mutajenite, immunotoksisite, nörotoksisite ve

hepatotoksisite gibi çeşitli toksikolojik etkilerle ilişkilendirilmiştir (19, 21, 23, 40). Bu nedenle, 1993'te OTA, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC, 1993) tarafından Grup 2B muhtemel insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır (10). Bununla birlikte OTA'nın DNA hasarı ve oksidatif stresin artması, protein sentez inhibisyonu, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, epigenetik mekanizmalar ve sinyal ileti yollarındaki değişimler, hücre iskelet yapısının ve mitokondriyal solunumun bozulması, apoptozdan kaçış, hücre döngüsünün durması gibi birçok mekanizmada etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak OTA indüklü hücresel olaylarda meydana gelen bu değişimler henüz tam olarak açıklanamamıştır (39). Bu nedenle, OTA indüksiyonu sonucu gelişen bu hücresel etkilerden biri olan hücre döngüsünün durdurulması ve bunun altında yatan mekanizmanın araştırılması bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadır.

Hücre döngüsünün ilerlemesinde katalitik alt birim olarak Cdk'lar ve aktive edici alt birim olarak siklinlerden oluşan siklin-Cdk kompleksleri regülatör olarak görev yapmaktadır. G1 evresinde Siklin D-Cdk4/6, G1'den S fazına geçişte SiklinE/Cdk2, S evresinde SiklinA/Cdk2, G2 evresinde SiklinA-Cdk1 ve M evresinde ise SiklinB-Cdk1 kompleksi görev alarak hücre döngüsünün kontrollü ve doğru bir şekilde ilerlemesi sağlanır (28-31, 89). Hücre döngüsünün kontrolü ile sadece hücre çoğalmasının kontrolü sağlanmakla kalmayıp bunun yanında DNA replikasyonu, hücre farklılaşması, apoptozis, mitoz bölünme gibi diğer hücresel yolların kontrolü de sağlanmış olur. Bu nedenle hücre döngüsünün kontrolü, hücre için kritik bir önem arz etmektedir. Ancak çalışmalar, OTA'nın hücre döngüsünü G1, S ve G2/M evrelerinde durdurucu yönde bir etkisinin olduğunu göstermektedir (18, 22, 24, 26, 27). Bu noktadan yola çıkarak bizde çalışmamızda OTA'nın hücre döngüsün G1 evresinde oluşturabileceği etkileri ortaya koymak istedik.

OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğuna ilişkin çalışma Liu ve ark. tarafından insan periferel mononükleer kan hücrelerinde (hPBMC) yapılmıştır. OTA'nın, reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasına, DNA hasarının artmasına, apoptoza ve hücre döngüsünün durdurulmasına yol açtığını belirttikleri çalışmalarında, hücre döngüsünün G1 evresine olan etkileri akış-sitometresi analizleri ve Siklin D1 ve Cdk4'ün protein ekspresyonlarındaki değişimlerle tespit edilmiştir. Hücreler 5 µM, 10 µM, 20 µM OTA ile 24 saat muamele edildiğinde,

Siklin D1 ve Cdk4'ün inhibe olduğu ve hücre döngüsünün G1 evresinde durduğu saptanmıştır. OTA'nın meydana getirdiği oksidatif DNA hasarı sonucunda hücre döngüsünü durdurucu yönde bir etki gösterdiği belirtilmiştir (18). Çalışmamızda ise 10 µM ve 25 µM OTA dozu ile 24 saat muamele edilen HK-2 hücrelerinde, G1 ve G1/S geçişinin anahtar düzenleyicilerinden olan Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonları ile Siklin D1, Cdk4, Cdk2'nin protein ekspresyonları değerlendirildi. Biz de Liu ve ark.'nın bulgularına benzer şekilde OTA'nın, Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonunu ve Siklin D1, Cdk4, Cdk2 protein ekspresyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğunu tespit ettik. Ancak bu yöndeki bulgularımızı bir adım daha ileri götürerek OTA'nın hücre döngüsü üzerindeki bu durdurucu yöndeki etkisinin altında yatan moleküler mekanizmayı açıklamayı hedefledik.

Yang ve ark.'nın insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK-293 hücrelerinde OTA'nın hücre döngüsü ve DNA'ya olan etkisini araştırdıkları çalışmada, OTA'nın DNA hasarını arttırdığı, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olarak mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı ve hücre döngüsünü S fazında durdurduğu gösterilmiştir. OTA ile muamele edilen HEK-293 hücrelerinde G1'den S fazına geçişte ve S fazının ilerlemesinde anahtar düzenleyici faktörlerden olan Siklin A2, Siklin E1 ve Cdk2'nin mRNA ve protein ekspresyonlarında değişimler belirlenmiştir. HEK-293 hücreleri 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM OTA ile 24 saat muamele edildiğinde Siklin A2, Siklin E1 ve Cdk2'nin mRNA ekspresyonlarında doza bağlı olarak azalmanın olduğu belirtilirken, protein ekspresyon seviyelerinde ise 25 µM ve 50 µM OTA dozlarında azalmanın gerçekleştiği gösterilmiştir (22). Bu bulgular, OTA'nın hücre döngüsünü S fazında durdurucu yöndeki etkisini desteklemektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde HK-2 hücrelerinde OTA'nın, doza bağlı olarak G1/S geçişinin düzenleyicilerinden olan Siklin E1'in mRNA ekspresyonunda ve Cdk2'nin protein ekspresyonunda inhibisyona neden olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Yang ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada HEK-293 hücreleri 25 µM OTA ile 24 saat muamele edilmiş ve OTA'nın oksidatif hasara neden olduğu, bunun sonucunda DNA hasarı ve hücre döngüsünde S fazında durma meydana geldiği belirtilmiştir. OTA'nın hücre döngüsünü Siklin A2, Siklin E1 ve Cdk2 ekspresyonundaki inhibisyona bağlı olarak S fazında durdurduğu

saptanmıştır. Bununla birlikte OTA uygulanmış HEK-293 hücreleri antioksidan bir madde olan N-asetil sistein (NAC) ile 5mM dozda muamele edildiğinde oksidatif hasarın azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç, OTA indüklü meydana gelen DNA hasarında ve hücre döngüsünün durdurulmasında oksidatif hasarın sorumlu olduğunu; ayrıca NAC'in ise DNA hasarını ve OTA tarafından uyarılan döngünün S-fazında durmasını tersine çevirebildiğini göstermiştir (27).

İnsan özofagus epitelyum hücresi olan Het-1A hücrelerinde OTA'nın sitotoksitesininin araştırıldığı çalışmada, OTA'nın DNA kırıklarını ve kromozomal aberasyonları indüklediği; bunun sonucunda da artan DNA hasarına cevaben hücre döngüsünü G2 evresinde durdurduğu belirtilmiştir. Het-1A hücreleri 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM OTA ile 24 saat muamele edildiğinde, G2'den M fazına geçişte rol oynayan Cdk1 ve Siklin B1 protein ekspresyonlarının artan OTA dozuna bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar yaptıkları akış sitometresi analizleri ile 10 µM ve 20 µM OTA'nın G2 evresinde bulunan hücre sayısını arttırdığını belirlemiştir (26).

İnsan mide epitelyum hücresi olan GES-1 hücrelerinde OTA'nın hücre döngüsü ve apoptoza olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada OTA'nın hücre döngüsünü G2/M evresinde durdurucu yönde etkisinin olduğu rapor edilmiştir. G2/M faz geçişinde kritik düzenleyici faktörlerden olan Cdc25, Cdk1 ve Siklin B1'in ekspresyonlarındaki değişimler değerlendirilmiştir. GES-1 hücreleri 5 µM, 10 µM ve 20 µM OTA ile 24 saat muamele edildiğinde, kontrol şartlarına kıyasla Cdc25c, Cdk1 ve SiklinB1'in mRNA ve protein ekspresyonlarında azalma olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, GES-1 hücrelerinde Cdc25c (Ser-216) ve Cdc2 (Tyr-15) fosforilasyonlarında azalma olduğu ve bunun da Cdc25c ve Cdk1 total protein ekspresyonundaki azalmaya bağlı olabileceği bildirilmiştir. GES-1 hücrelerinin G2'den M fazına geçişinde bozulmalar olduğu ve hücrelerin G2 fazında kaldığı sonucuna varılmıştır (51).

Kuroda ve ark.'ı, red/gam geni eksik (Spi⁻) gpt delta sıçanlara 4 hafta boyunca gavajla 70, 210 veya 630 µg/kg/gün OTA vererek böbrek dokusunda OTA'nın DNA hasarına neden olduğunu göstermiş ve OTA maruziyeti sonucunda mutageneze neden olan yolları açığa kavuşturmak için DNA hasar/tamiri ile ilişkili

gen ve proteinlerin ekspresyon seviyelerini değerlendirmiştir. OTA dozuna bağlı olarak hücre döngüsünün G2/M fazında durdurulmasıyla ilişkili genler Chek1 ve Wee1'in, S/G2 evresinde durdurulmasıyla ilişkili genler Ccna2 ve Cdk1'in ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır. Homolog rekombinasyon tamiri ile ilişkili genler Rad51, Rad18 ve Brip1'in ekspresyonları artarken, NHEJ onarımı (Xrcc5, Xrcc6 ve Lig4), baz eksizyon tamiri (Fen1 ve Xrcc1) ve nükleotid ekzizyon tamiri (Erc1 ve Xpa) ile ilgili mRNA'ların ekspresyonu OTA muamelesi ile değişmemiştir. OTA muamelesine bağlı oluşan DNA hasarının homolog rekombinasyon tamiriyle ilişkili genler tarafından düzenlendiği ve bu mekanizma aracılığıyla hücre döngüsünü durdurduğu belirtilmiştir (90).

Çalışmalar OTA'nın hücre döngüsünü G1, S ve G2/M evrelerinde durdurucu yönde etkisinin olduğunu ve bu etkiyi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulmasına, DNA hasarına neden olarak gerçekleştirdiğini göstermektedir. Ancak hücre döngüsünü kontrol eden birçok üst düzenleyici olduğu göz önüne alındığında OTA'nın bu etkisinin hangi üst mekanizma aracılığıyla olduğu, hücre döngüsünün üst seviyedeki kontrolünü sağlayan hangi anahtar mediyatörleri aracı olarak seçtiği yönündeki net bir moleküler mekanizma hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu açık noktayı aydınlatmak amacıyla sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte henüz bu etkide rol alan düzenleyicilerin rolleri yeterince ortaya konulamamıştır.

Bu amaçla OTA'nın etkilediği mekanizmalarda rol alan düzenleyicilerin fonksiyonlarını belirlemek adına RNAi mekanizmasından yararlanılmış ve hedeflenen genlerin fonksiyonu belirlenmeye çalışılmıştır. RNAi, hedef genin transkriptinin diziye özgü bir ilişki temelinde dsRNA ile durdurulmasına neden olan bir mekanizmadır. Bu mekanizma dsRNA uyarılmakta miRNA'lar ile hücre gen ekspresyonunun düzenlenmesi sağlanırken, siRNA'lar ile hedef proteinlerin susturulması gerçekleştirilmektedir (72, 74, 77, 78). RNAi dsRNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamakta ve siRNA'lar RISC aktivasyonuna neden olarak komplementer mRNA'nın bulunmasını sağlamakta ve RISC siRNA zincirinin rehberliğinde komplementer hedef mRNA'yı parçalamaktadır. RNAi canlı organizmada doğal olarak bulunmasının yanı sıra in

vitro olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak da endojenik genlerin ekspresyonunu baskılamak için kullanılmaktadır (73).

Ciu ve ark.'nın GES-1 hücrelerinde, Cdc25c, Cdk1 ve SiklinB1'in mRNA ve protein ekspresyonlarında OTA indüklü inhibisyonu gösterdikleri ve OTA'nın hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğunu belirttikleri çalışmalarından (51) sonra aynı araştırmacılar, bu durdurucu yöndeki etkiyi hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiğini araştırmışlardır. Bu çalışmalarında, MAPK'nın hücre döngüsü ilerlemesindeki kritik rolü göz önüne alınarak, OTA ile indüklenen GES-1 hücrelerinde, döngünün G2 evresinde durdurulmasının MAPK yollarının modülasyonu yoluyla olabileceği belirtilmiştir. 5 µM, 10 µM ve 20 µM OTA ile 24 saat muamele edilmiş GES-1 hücrelerinde, western blot analizi ile p38 ve ERK aktivasyonunda belirgin bir artış olduğu saptanmış ancak JNK aktivasyonu ise tespit edilmemiştir. Buna karşılık her bir MAPK'nın total protein ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemesi, OTA indüklü bu aktivasyonu açıkça göstermiştir. OTA aracılı hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında ERK ve p38 yollarının rolleri, ERK-siRNA ve p38-siRNA'ların kullanılması sonucu ERK ve p38 genlerinin susturulmasıyla incelenmiştir. Bunun sonucunda OTA ile muamele edilmiş GES-1 hücrelerinde ERK-siRNA ve p38-siRNA ile transfeksiyon sonrasında hücre döngüsünün G2 evresinde durmasının inhibe olduğu saptanmış, ayrıca Cdk1/p-Cdk1, Cdc25c/p-Cdc25c, Siklin B1 ve Siklin B1-Cdk1 komplekslerinin baskılanmasını tersine çevirerek, G2 fazındaki durdurucu yöndeki etkinin ortadan kalktığı belirtilmiştir. Böylece OTA indüksiyonu sonucunda hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında bu düzenleyici faktörlerin ara moleküller olarak hareket ettiği ve MAPK'lar tarafından düzenlendiği kanıtlanmıştır (54).

Ciu ve ark. bir diğer çalışmalarında OTA indüklü GES-1 hücrelerinde ROS oluşumu, DNA hasarı ve ATM bağımlı yolağın aktivasyonunda DNA hasarının ve ATM yolağının olası rollerini değerlendirmiştir. Araştırmacıların bulguları, 5 µM, 10 µM, 20 µM OTA ile 24 saat muamele edilen GES-1 hücrelerinde ROS oluşumunun arttığını, ROS aracılı DNA hasarının meydana geldiğini ve ATM-Chk2 ve ATM-p53-p21 yollarının OTA aracılı olarak aktive olduğunu göstermiştir. GES-1 hücreleri 10 µM ve 20 µM OTA ile muamele edildiğinde ATM'nin (Ser-1981) fosforilasyon seviyesinin kontrole göre arttığı saptanmış ve OTA'nın ATM kinazı

aktive ettiği gösterilmiştir. OTA'nın Chk2 ve p53-p21'i hedefleyen ATM yollarını aktive ettiğini kanıtlamak için GES-1 hücreleri ATM siRNA ile transfekte edilerek OTA'nın Chk2 ve p53 aktivasyonundaki etkileri belirlenmiştir. ATM siRNA ile susturulmuş ve takibinde OTA ile muamele edilmiş GES-1 hücrelerinde Chk2 ve p53'ün aktivasyonu ile p21'in protein ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Bu veriler OTA ile indüklenen DNA hasarının, ATM-Chk2 ve ATM-p53-p21 yolaklarını aktive ettiğini göstermiştir. Aynı araştırmacılar, ATM aracılığıyla gerçekleşen OTA'nın etkilerini G2/M fazının düzenleyici proteinleri üzerindeki değişiklikler ačíndan incelediklerinde, Cdc25c, Cdk1 ve Siklin B1 protein ekspresyonunun ve Cdc25c ile Cdk1'in aktivasyonunun ATM geni susturulmuş olan hücrelerde yukarı yönde düzenlendiğini saptamışlardır. Sonuęlar, GES-1 hücrelerinde OTA'nın hücre döngüsünü ATM üzerinden G2 fazında durdurduğunu göstermektedir (47).

Aynı çalışma grubu tarafından yapılan bir başka çalışmada, OTA ile indüklenen GES-1 hücrelerinde hücre döngüsünün G2 evresinde durmasındaki mekanizmalardan bir diğerinin DNA çift zincir kırıklarına bağlı geliştiği ileri sürülmüş ve bunun hangi moleküler mekanizma aracılığıyla gerçekleştiği incelenmiştir. Araştırmacılar OTA'nın homolog rekombinasyonda DNA çift zincir kırıklarının tamirinde anahtar bir protein olan Rad51 üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını; eğer varsa da Rad51'in OTA aracılı DNA çift zincir kırıklarında ve hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasındaki olası etkilerini araştırmışlardır. 5 µM, 10 µM, 20 µM OTA ile 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş GES-1 hücrelerinde, Rad51'in gen ve protein ekspresyonunun artan OTA dozuna ve zamana bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Rad51'in DNA hasarı üzerindeki ve hücre döngüsünü durdurucu yönündeki rolünü belirlemek için siRNA aracılığı ile Rad51 geni susturulduğunda Cdk1/p-Cdk1, Cdc25c/p-Cdc25c ve Siklin B1 protein ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak GES-1 hücrelerinde OTA, Rad51'i inhibe etmekte ve Rad51 siRNA aracılı inhibe olduğunda da OTA'nın etkisine benzer şekilde hücrede DNA çift zincir kırığı meydana gelmekte ve hücre döngüsünde G2 evresinde durma gözlenmektedir. Rad51 ekspresyonu, Rad51 geni içeren plazmid transfeksiyonu ile arttırıldığında OTA'nın hücrede oluşturduğu hasarın ve hücre döngüsünü durdurucu yönde etkisinin zayıfladığı belirtilmiştir.

Böylece, Rad51'in OTA indüklü hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasında oynadığı rol ortaya konulmuştur. Rad51'in transkripsiyonel baskılayıcısı olarak bilinen p53'ün OTA ile muamele edilmiş hücrelerdeki rolü araştırıldığında ise, p53 siRNA aracılığıyla p53 geni susturulduğu durumda Rad51'in düzenlenmesi incelenmiştir. p53 geni susturulduğunda OTA indüklü GES-1 hücrelerinde Rad51'in aşağı yöndeki düzenlenmesinin azaldığı ve OTA'nın p53 yolunu aktive ederek Rad51'i inhibe ettiği gösterilmiştir (49).

Çalışmalar OTA'nın, farklı hücre tiplerinde ve hücre döngüsünün farklı evrelerinde duraklamalara neden olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda OTA'nın hücre döngüsünü durduru yöndeki etkisinin altında yatan mekanizmada, sinyal ileti yollarının, oksidatif strese bağlı oluşan DNA hasarının ve tamir mekanizmasındaki düzenleyicilerin önemli ölçüde rol oynadığı açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak literatür incelemelerimiz sonucunda, OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisinin altında yatan moleküler mekanizmasının henüz açığa kavuşmadığını ve bu etkinin OTA'nın hedef dokusunu oluşturan proksimal tübül hücrelerindeki cevabının hala yanıt bulamadığını tespit ettik. Bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda HK-2 hücrelerinde OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisini ve bu etkide hücre döngüsünün kontrollü ve doğru bir şekilde ilerlemesinde önemli düzenleyicilerden olan p53'ün rolünü belirlemeyi hedefledik.

p53, hücre döngüsü kontrol noktasının harekete geçirilmesi ve DNA tamirinde görevli faktörlerin transkripsiyonunun başlatılması yoluyla hücre döngüsünün durdurulması sağlar ve DNA hasarının onarımına katkıda bulunur (91). Hücrede fizyolojik koşullar altında düşük seviyelerde eksprese edilmekte olup, ubiquitasyon ve proteoliz yolunun aracılık ettiği bir dönüşüm nedeniyle yarılanma ömrü kısadır. Hücresel strese bağlı olarak aktifleşen p53'ün birçok geni indüklediği, hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamir mekanizmasının ve apoptozun uyarılması gibi birçok mekanizma ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu genlerin ifadesi hücresel strese, çevreye ve uyarana bağlı olarak yanıt oluşturabilir ve hücrenin progresyonunu değiştirebilir. p53 hücresel tepkilerin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olup, hücre döngüsünün durdurulmasında da anahtar bir bileşen olarak görev yapmaktadır. Bunu, hasar görmüş DNA'nın tamirine zaman

kazandırmak için hücre döngüsünü G1 ve G2 evrelerinde durdurarak sağlamaktadır. (33, 71, 92). Literatür incelemelerimiz sonucunda OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu yönde etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte bu etkinin oluşmasında hücre döngüsünün durdurulmasında kritik öneme sahip olan p53'ün rolünü insan proksimal epitel tübül hücrelerinde açıklayan çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda OTA'nın HK-2 hücrelerinde hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisinde p53'ün rolünü, RNAi mekanizmasından faydalanarak siRNA aracılığıyla p53 genini susturarak açıklamayı amaçladık.

Çalışmamızda HK-2 hücreleri 10 μ M ve 25 μ M OTA ile muamele edilerek Siklin D1 ve Siklin E1 mRNA ekspresyonlarında inhibisyonun meydana geldiği gösterildi. Bunu destekleyici olarak negatif siRNA veya negatif siRNA ile birlikte 10 μ M ve 25 μ M OTA ile muamele edilmiş hücrelerde de Siklin D1 ve Siklin E1 mRNA ekspresyonlarının inhibe olduğu saptandı. p53 siRNA ile transfekte ettiğimiz hücrelerde de Siklin D1 ve Siklin E1 mRNA ekspresyonlarında inhibisyon olduğu tespit edildi. Ancak p53 siRNA ile p53 geni susturulan ve 10 μ M ve 25 μ M OTA ile muamele ettiğimiz HK-2 hücrelerinde, Siklin D1 ve Siklin E1 mRNA ekspresyon seviyelerinde artışın olduğu belirlendi. OTA muamelesi sonrasında Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyon seviyelerindeki azalma, OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yönde etkisini bu iki siklin üzerinden gerçekleştirdiğini kanıtlamakla birlikte p53 geninin susturulduğu hücrelerde Siklin D1 ve Siklin E1 genlerine ait ekspresyon seviyelerinin artması, OTA'nın G1 fazındaki durdurucu yöndeki etkisini p53 aracılı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirdiğini açıkça gösterdi.

Western blot analizleri sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre OTA'nın, Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyon düzeylerinde de benzer etkilere neden olduğunu saptamamız gen ekspresyonu ile elde ettiğimiz bulguları da desteklemiştir. 10 μ M ve 25 μ M OTA ile 24 saat muamele ettiğimiz HK-2 hücrelerinde Siklin D1 ve Cdk4 ile Cdk2 protein ekspresyonlarının OTA muamelesi sonucunda inhibe olduğunu, ancak p53 siRNA aracılığıyla p53 geni susturulduğunda ise protein ekspresyonlarının arttığını saptadık.

Bizde OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu yöndeki etkisini G1 ve G1/S kontrol noktalarının düzenleyicilerinden olan Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonlarında, Siklin D1, Cdk2 ve Cdk4'ün protein ekspresyonlarındaki azalmayı göstererek kanıtlamış olduk. Bununla birlikte p53 geninin susturulduğu durumlarda OTA induksiyonu sonucunda, Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonlarında, Siklin D1, Cdk2 ve Cdk4'ün protein ekspresyonlarında artışın meydana geldiğini saptadık. Oysa ki negatif siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde ise bu düzenleyicilerin gen ve protein ekspresyonlarında OTA'nın meydana getirdiği etkiye benzer şekilde azalma gözlemlememize karşılık, takibinde OTA induksiyonunun G1 evresinin bu önemli mediyatörleri üzerinde artırıcı etkisini saptamadık. Tam tersine negatif siRNA transfeksiyonu takibindeki OTA induksiyonunun bu ekspresyonları daha da azalttığını tespit ettik. Bu sonuçlar bize OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisini p53 aracılı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirdiğini gösterdi.

Kuroda ve ark. çalışmalarında p53'den yoksun ve p53 geni bulunan gpt delta farelerin (red/gam geni Spi⁻) böbreklerinde OTA'nın etkisini değerlendirmiş, DNA hasar/tamir, hücre proliferasyonu/hücre döngüsü, apoptoz ve p53 sinyalizasyonu ile ilgili genlerin ekspresyon değişimlerini mikroarray yöntemi ile belirlemiştir. Daha önceki çalışmalarında sıçanlarda elde edilen sonuçlara benzer şekilde (24) farelerde de OTA'nın DNA çift zincir kırıklarını indüklediği belirlemiş ve p53'ün de p53/p21 aracılı hücre döngüsü kontrolü nedeniyle DNA çift zincir kırıklarının ve gen mutasyonlarının oluşmasını engellediğini saptamışlardır. OTA kaynaklı genotoksik stresin p53/p21 yolağını aktive ettiğini ve hücre döngüsünü G1/S noktasında durdurduğunu belirlemişlerdir. p53 geninin yokluğunda p53 geni bulunan hücrelere göre, hücre döngüsünün düzenlenmesiyle ilişkili genlerin (Siklin E1, Siklin B1, Cdk1, Plk1 ve Aurka gibi) mRNA seviyelerinde önemli bir artışın olduğunu saptamışlardır (50). Çalışmamız Kuroda ve ark. bulgularını destekler nitelikte olup, insan proksimal epitel tübül hücreleri olan HK-2 hücrelerinde yapılması ve ekspresyonu değerlendirilen mRNA ve proteinlerin bazılarının G1 ve G1/S geçişinde rol alan diğer düzenleyiciler olması nedeniyle farklılık göstermektedir.

Li ve ark. OTA'nın neden olduğu hücresel değişimlerin moleküler mekanizmasında p53'ün rolünü ortaya koymaya çalışmışlar ve Vero maymun böbrek

hücreleri, MARC-145 ve HEK-293 hücrelerinde OTA'nın p53 aktivasyonunu ve apoptozu indüklediğini saptamışlardır. OTA aracılı bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmanın açıklanması için p53 geni susturulduğunda OTA indüklü apoptozun arttığı tespit edilmiştir. p53'ün sağkalım öncesi işlevinin, OTA ile indüklenen apoptozda kritik bir rol oynadığı tespit edilmiş ve JNK aktivasyonunun bastırılması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada OTA ile indüklenen apoptozda p53'ün hücre sağkalımındaki rolü belirlenmiştir (92).

OTA indüklü karsinogenez mekanizmasının araştırıldığı çalışmada, gpt delta sıçanlar karsinojenik doz olan 5ppm OTA'ya 4 hafta maruz bırakılmış, böbrek dokusunda DNA hasar ve tamiri, oksidatif stres, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonları değerlendirilmiştir. Böbrek dış medullasında hücre döngüsünün ilerlemesi ve durdurulmasıyla ilişkili genlerin moleküler fonksiyonları değerlendirildiğinde, G1/S fazının ilerlemesiyle (Siklin E1 ve Siklin A2), G2/M veya M fazının ilerlemesiyle (Siklin A2 ve Siklin B1), G2/M fazında durdurulmasında (Siklin G1, Chk1 ve Wee1) ve M fazının mitotik süreciyle (Ska1, Ska2, Plk1) ilişkili genlerin yukarı yönde düzenlendiği belirtilmiştir. Böbrek dış medullasında da p53 ile ilişkili faktörlerinde (Phlda3 ve Siklin G1) yukarı yönde düzenlendiğini mikroarray yöntemi ile saptamışlardır (24).

Hibi ve ark., p53'den yoksun ve p53 geni bulunan (red/gam geni Spi⁻) gpt delta fareler kullanarak böbrek tübül hücrelerinde OTA indüklü meydana gelen karyomegali, apoptoz ve mutajenitede p53'ün rolünü belirlemiştir. Farelere OTA 4 hafta boyunca 1 mg/kg ve 5 mg/kg olacak şekilde verilmiş, 5 mg/kg OTA verilen p53 geni bulunan farelerde p53 protein seviyesinin anlamlı şekilde arttığı belirtilmiştir. OTA'nın DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon tamirinde delesyonlara neden olarak mutajenik etki gösterdiği ve p53'ün bu süreçte OTA indüklü genotoksisitede baskılayıcı bir rol aldığı saptanmıştır. OTA'nın hücrelerde DNA hasarına bağlı olarak karyomegali ve apoptozu neden olduğu ve bu mekanizmalarda oluşturduğu etkilerin de p53 aracılı inhibe edildiği belirtilmiştir (91).

OTA'nın hücrede farklı mekanizmalar aracılığıyla hücre döngüsünde, DNA hasar ve tamirinde, apoptozda görev alan aracı moleküllerin ekspresyonlarında

değişimlere neden olduğu belirlenmiş olup, bu değişimlerin hangi üst mediyatörler aracılığıyla gerçekleştiği önemli bir araştırma konusudur. Çalışmamızda hücre döngüsünün G1 evresinde OTA indüklü durdulmasında üst mediyötör olarak p53'ün rolünü belirleyerek bu mekanizmalardan birine açıklık getirmeye çalıştık. Literatür araştırmalarımızda insan kökenli bir hücrede OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisi ve bu etkinin oluşmasında önemli bir mediyatör olan p53'ün rolünün ortaya konulduğu başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız ile bu alandaki boşluğu doldurarak, OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisinin altında yatan moleküler mekanizmanın açıklanmasına katkı sağladığımızı düşünmekteyiz. Ancak hücre döngüsünde dahil olmak üzere birçok hücreyel olay, aracı moleküllerin yanı sıra birçok üst mediyatör tarafından düzenlenmekte ve bu üst mediyatörlerin aşağı yönde düzenlediği birçok gen ve protein bulunmaktadır. Çalışmamız insan kökenli bir hücrede OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisini ve bu etkinin oluşmasında önemli bir mediyatör olan p53'ün rolünü ortaya koymakla birlikte bu mekanizmayı aydınlatmak adına hücre döngüsünün ilerlemesi ve kontrolünde görev alan ve p53 tarafından düzenlenen moleküllerin daha ileri araştırmalarla ortaya konularak moleküler mekanizmanın zenginleştirilmesine katkı sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları özetleyecek olursak;

- 1- HK-2 hücreleri 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M ve 40 μ M olmak üzere 6 farklı OTA dozu ile 24 saat muamele edildi ve hücre sitotoksosite testi sonucunda HK-2 hücrelerinde hücre inhibisyonuna neden olan ancak toksik etkinin gözlenmediği en düşük doz olan 10 μ M ve en yüksek doz olan 25 μ M OTA konsantrasyonu belirlendi.
- 2- HK-2 hücrelerinin negatif siRNA ile veya p53 siRNA ile 72 saat transfekte edilmesi ve siRNA'lar ile birlikte 10 μ M ve 25 μ M OTA ile 24 saat muamelesinin takibinde yapılan sitotoksosite testinin sonuçlarına göre, negatif siRNA ve negatif siRNA birlikte iki farklı doz OTA ile muamele edilen hücrelerin canlılığında azalma tespit edildi. Aynı şekilde 10 μ M ve 25 μ M OTA ile muamele edilen hücrelerde de hücre canlılığının inhibe olduğu belirlendi. Ancak p53 siRNA ve p53 siRNA ile birlikte iki farklı doz OTA muamelesi sonucunda hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmedi ve tersine hücre canlılığında artış saptandı. Bu sonuç OTA'nın p53 aracılı bir mekanizma üzerinden hücre canlılığını etkilediğini gösterdi.
- 3- p53 siRNA transfeksiyonu sonucunda p53 geninin mRNA ekspresyonunda beklenen inhibisyon RT-PCR deneyi ile kanıtlandı.
- 4- p53 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, p53 geninin ekspresyonunun baskılandığını ancak OTA'nın hücrede meydana getirdiği hasara cevaben, hem p53 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde hem de negatif siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde OTA muamelesi sonucunda p53 gen ekspresyon seviyelerinde artışın meydana geldiği belirlendi. Bu sonuç OTA'nın hücrede meydana getirdiği hasara cevaben p53 aktivasyonunu indüklediğini düşündürdü.
- 5- HK-2 hücrelerinin OTA ile muamelesi sonucunda hücre döngüsünün ilerlemesinde görevli siklinlerden olan, Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA

ekspresyonlarının ve Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonlarının inhibe olduğu kanıtlandı.

- 6- OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu yöndeki etkisinin altında yatan mekanizmayı açıklamak adına p53 geninin susturulduğu hücrelerde ise Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonlarında, Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonlarında maruz kalınan OTA dozuna bağlı olarak artışın meydana geldiği tespit edildi. OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu yöndeki etkisini p53 aracılı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği sonucuna varıldı.

Çalışmamızdan elde edilebilecek çıkarımları özetlediğimizde ise;

Son yıllarda OTA'nın toksik ve karsinojenik etkilerini açıklamayı amaçlayan ve bu etkilerin altında yatan hücrenin moleküler mekanizmasındaki değişimlerini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bizde OTA indüklü hücre döngüsünün G1 evresinde durdurulması ve bu durdurucu yöndeki etkinin p53 aracılı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirdiğine yönelik elde ettiğimiz sonuçlarımızla önemli bir mekanizmanın açıklanmasına katkı sağladığımızı düşünmekteyiz. Ayrıca hücrede OTA'nın oluşturduğu durdurucu yöndeki etkinin, kanserin başlamasını engelleyen önemli bir tümör baskılayıcı olan p53 gibi bir mediyatör üzerinden gerçekleşmesi, OTA indüklü renal karsinogenezin moleküler temelini açıklanmasına da katkı sağlamaktadır.

Bununla birlikte ileriki çalışmalarda OTA'nın hücre döngüsü üzerinde olan etkisini daha ayrıntılı açıklamak için, p53'ün düzenlenmesinde rolü olan birçok üst mediyatörün ve p53 tarafından düzenlenen aşağı yöndeki mediyatörlerin ekspresyonlarındaki değişimlerin belirlenmesinin bu mekanizmanın daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmasına katkı sağlayacağı kanısındayız.

OTA'nın hücrede oluşturduğu etkilerin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak açıklanamadığı için OTA kaynaklı toksisitenin hafifletilmesi için etkili stratejiler geliştirmekte oldukça zordur. Ancak diğer taraftan OTA günlük hayatta sıklıkla tükettiğimiz birçok gıda maddesinde bulunmakta ve maruziyetinden kaçınmak neredeyse imkansız hale gelmektedir. Bu nedenle ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelen OTA maruziyetinden kaçınarak hücresel alınıminin engellenmesinin en etkili koruyucu önlem olacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Okratoksin A'nın İnsan Proksimal Tübül Hücrelerinde Hücre Döngüsü Moleküler Mekanizmaları Üzerine Etkisi

Okratoksin A (OTA), *Aspergillus* ve *Penicillium* türü mantarlar tarafından üretilen toksik bir metabolittir. Günlük hayatımızda sıklıkla tükettiğimiz birçok gıda maddesinin kontaminantı olup, insan ve hayvanların dokularında tespit edilmektedir. Karaciğer, beyin, kas ve yağ dokuda birikim göstermekle birlikte OTA'nın hedef organı böbrektir. Nefrotoksik, hepatoksik, genotoksik, nörotoksik, immunotoksik etkilerinin yanı sıra karsinojenik etkileri de bilinmektedir. OTA hücrede DNA ve protein sentezi, lipid peroksidasyonu, glikoneogenez, mitokondriyal fonksiyonlar, hücre ölüm yolları, DNA tamir mekanizması ve hücre döngüsü gibi birçok hücrel olayı etkilemekte olup, bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamızda insan böbrek proksimal tübül epitel hücresi olan HK-2 hücrelerinde OTA'nın hücre döngüsünü G1 evresinde durdurucu yöndeki etkisi ve bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmada p53'ün rolü ortaya konuldu. p53 siRNA ile transfekte edilerek p53 geni susturulan ve OTA ile indüklenen HK-2 hücrelerinde, hücre döngüsünün G1 ve G1/S geçiş evresinin önemli düzenleyicilerinden olan Siklin E1 ve Siklin D1'in mRNA ekspresyonu ile Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonundaki değişimler gösterildi. 10 µM ve 25 µM OTA dozu ile 24 saat ile muamele edilen HK-2 hücrelerinde Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonlarının ve Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonlarının inhibe olduğu saptandı. p53 siRNA ile transfekte edilen OTA indüklü HK-2 hücrelerinde ise Siklin D1 ve Siklin E1'in mRNA ekspresyonunun, Siklin D1, Cdk4 ve Cdk2'nin protein ekspresyonunun maruz kalınan OTA dozuna bağlı olarak arttığı gösterildi. Bu sonuçlar ışığında HK-2 hücrelerinde OTA'nın hücre döngüsünü durdurucu yöndeki etkisini p53 aracılı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Okratoksin A, HK-2, hücre döngüsü, p53, siRNA, böbrek

ABSTRACT

The Effect of Ochratoxin A on Molecular Mechanisms of Cell Cycle in Human Proximal Tubule Cells

Ochratoxin A (OTA) is a toxic metabolite produced by *Aspergillus* and *Penicillium* fungus. OTA found in the human and animal tissues can contaminate many foods that we daily consume in our lives. It accumulates in liver, brain, muscle and fat, but especially in kidney. Carcinogenic effects of OTA are known as well as nephrotoxic, hepatotoxic, genotoxic, neurotoxic and immunotoxic effects. These effects arrive from the alteration of many cellular mechanisms such as DNA and protein synthesis, lipid peroxidation, gluconeogenesis, mitochondrial functions, cell death pathways, DNA repair mechanisms and cell cycle. The OTA-mediated underlying molecular mechanisms are not fully understood yet. In our study, it was demonstrated that the inhibitory effect of OTA on G1 phase of cell cycle and additionally the role of p53 in OTA induced cell cycle arrest in human proximal tubule epithelial cells, HK-2. It was evaluated that the changes in mRNA expressions of Cyclin E1 and Cyclin D1, which are key regulators of the G1 and G1 / S phases of the cell cycle, and the changes in protein expressions of Cyclin D1, Cdk4 and Cdk2 in HK-2 cells treated with control siRNA or p53 siRNA in the absence or presence of OTA. It was found that mRNA expressions of Cyclin D1 and Cyclin E1 and protein expressions of Cyclin D1, Cdk4 and Cdk2 were inhibited in HK-2 cells treated with 10 μ M and 25 μ M doses of OTA for 24 hours. However the knockdown of p53 led to increase OTA-mediated in mRNA expressions of Cyclin D1 and Cyclin E1 and protein expressions of Cyclin D1, Cdk4 and Cdk2 compared to control siRNA in HK-2 cells. Our finding strongly provided that the cell cycle arresting effect of OTA performs through p53 mediated mechanism.

Keywords: Ochratoxin A, HK-2, cell cycle, p53, siRNA, kidney

KAYNAKLAR

1. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluŐumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 2008;28(1):63-92.
2. Gürhayta OF, Çağındı Ö. Kurutulmuş Meyvelerde Aflatoksin ve Okratoksin A Varlığının ve Sağlık Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. Celal Bayar University Journal of Science. 2016;12(2):327-38.
3. Bakırcı GT. Tahıl ve Tahıl Ürünlerinin Aflatoksin, Okratoksin A, Zearalenon, Fumonisin ve Deoksinivalenol Mikotoksinleri Yönünden İncelenmesi. Academic Food Journal/Akademik Gıda. 2014;12(2):46-56.
4. Soyöz M, Özçelik N. Okratoksin A'nın toksik etkileri ve eliminasyonu. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2002;22(4):421-7.
5. Sorrenti V, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. Toxins. 2013;5(10):1742-66.
6. Oruç HH. Mikotoksinler ve tanı yöntemleri. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2005;24(1-4).
7. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leskowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. Toxins. 2016;8(7):191-240.
8. Giray B. Geriatrik popölasyonda serum okratoksin A düzeyleri. Marmara Pharmaceutical Journal. 2011;15(2):69-74.
9. Köszeđi T, Poór M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. Toxins. 2016;8(4):111-36.
10. Anonymus, editor Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; 1993; Geneva. Switzerland: World Health Organization; 1993.
11. Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezencon C, Piguet D, Mansourian R, et al. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. Toxicological Sciences. 2006;89(1):120-34.
12. Arbillaga L, Azqueta A, Ezpeleta O, de Cerain AL. Oxidative DNA damage induced by ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. Mutagenesis. 2006;22(1):35-42.
13. Anonymus, editor Evaluation of certain contaminants in food: 72nd report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 2011; Rome, Italy. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

14. Anonymus, editor Safety evaluation of certain mycotoxins in food. . Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA); 2001: WHO.
15. Ringot D, Chango A, Schneider Y-J, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*. 2006;159(1):18-46.
16. Özçelik N, Soysal D. Okratoksin A: Endemik nefropati ile ilişkisi. *Genel Tıp Derg*. 1998;8(4):173-6.
17. Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G. Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Molecular nutrition & food research*. 2005;49(2):118-30.
18. Liu J, Wang Y, Cui J, Xing L, Shen H, Wu S, et al. Ochratoxin A induces oxidative DNA damage and G1 phase arrest in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Toxicology letters*. 2012;211(2):164-71.
19. O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical reviews in toxicology*. 2005;35(1):33-60.
20. Özcan Z, Gül G, Yaman I. Ochratoxin A activates opposing c-MET/PI3K/Akt and MAPK/ERK 1-2 pathways in human proximal tubule HK-2 cells. *Archives of toxicology*. 2015;89(8):1313-27.
21. Petrik J, Malic A, Barisic K, Rumora L, Kőszegi T, Pepeljnjak S, et al. Ochratoxin A induces apoptotic and necrotic renal cell death. *Croatica chemica acta*. 2005;78(3):447-53.
22. Yang Q, He X, Li X, Xu W, Luo Y, Yang X, et al. DNA damage and S phase arrest induced by Ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK 293). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;765:22-31.
23. Shen XL, Zhang B, Liang R, Cheng W-H, Xu W, Luo Y, et al. Central role of Nix in the autophagic response to ochratoxin A. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;69:202-9.
24. Hibi D, Kijima A, Kuroda K, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, et al. Molecular mechanisms underlying ochratoxin A-induced genotoxicity: global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression. *The Journal of toxicological sciences*. 2013;38(1):57-69.
25. Mally A. Ochratoxin A and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicological Sciences*. 2012;127(2):315-30.
26. Liu J, Wu S, Shen H, Cui J, Wang Y, Xing L, et al. Ochratoxin A induces DNA damage and G2 phase arrest in human esophageal epithelium Het-1A cells in vitro. *The Journal of toxicological sciences*. 2015;40(5):657-65.
27. Yang Q, Shi L, Huang K, Xu W. Protective effect of N-acetylcysteine against DNA damage and S-phase arrest induced by ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK-293). *Food and Chemical Toxicology*. 2014;70:40-7.

28. Devès M, Bourrat F, editors. Transcriptional mechanisms of developmental cell cycle arrest: problems and models. *Seminars in cell & developmental biology*; 2012: Elsevier.
29. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(7):2776-8.
30. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):316-23.
31. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306.
32. Kitagishi Y, Matsuda S, Minami A, Ono Y, Nakanishi A, Ogura Y. Regulation in Cell cycle via p53 and PTEN Tumor Suppressors. *Cancer Stud Mol Med Open J*. 2014;1(1):1-7.
33. Wang S, El-Deiry WS. p53, cell cycle arrest and apoptosis. *25 Years of p53 Research*: Springer; 2007. p. 141-63.
34. Koçak N, Yıldırım İH, Yıldırım SC. p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücrel işlevleri. *Dicle Medical Journal*. 2011;38(4):530-5.
35. Van der Merwe K, Steyn P, Fourie L, Scott DB, Theron J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. 1965;205:1112-3.
36. Duarte S, Pena A, Lino C. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*. 2010;27(2):187-98.
37. Zimmerli B, Dick R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995;666(1):85-99.
38. Cha SH, Sekine T, Kusahara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, et al. Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(6):4507-12.
39. Rumora L, Domijan A-M, Grubišić TŽ, Klarić MŠ. Differential activation of MAPKs by individual and combined ochratoxin A and citrinin treatments in porcine kidney PK15 cells. *Toxicon*. 2014;90:174-83.
40. Marin-Kuan M, Cavin C, Delatour T, Schilter B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. *Toxicon*. 2008;52(2):195-202.
41. Cavin C, Delatour T, Marin-Kuan M, Holzhäuser D, Higgins L, Bezencon C, et al. Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. *Toxicological Sciences*. 2007;96(1):30-9.
42. Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2006;29(2):79-90.

43. Hong JT, Lee MK, Park KS, Jung KM, Lee RD, Jung HK, et al. Inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on ochratoxin A-induced cytotoxicity and activation of transcription factors in cultured rat embryonic midbrain cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. 2002;65(5-6):407-18.
44. Guerra M, Galvano F, Bonsi L, Speroni E, Costa S, Renzulli C, et al. Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1 and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). *British journal of nutrition*. 2005;94(02):211-20.
45. Kamp HG, Eisenbrand G, Schlatter J, Würth K, Janzowski C. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*. 2005;206(3):413-25.
46. Schilter B, Marin-Kuan M, Delatour T, Nestler S, Mantle P, Cavin C. Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food additives and contaminants*. 2005;22(s1):88-93.
47. Cui J, Liu J, Wu S, Wang Y, Shen H, Xing L, et al. Oxidative DNA damage is involved in ochratoxin A-induced G2 arrest through ataxia telangiectasia-mutated (ATM) pathways in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro. *Archives of toxicology*. 2013;87(10):1829-40.
48. Marin-Kuan M, Ehrlich V, Delatour T, Cavin C, Schilter B. Evidence for a role of oxidative stress in the carcinogenicity of ochratoxin A. *Journal of toxicology*. 2011;2011:1-15.
49. Lian H, Cui J, Wang Y, Liu J, Wang J, Shen H, et al. Downregulation of Rad51 participates in OTA-induced DNA double-strand breaks in GES-1 cells in vitro. *Toxicology letters*. 2014;226(2):214-21.
50. Kuroda K, Hibi D, Ishii Y, Yokoo Y, Takasu S, Kijima A, et al. Role of p53 in the progression from ochratoxin A-induced DNA damage to gene mutations in the kidneys of mice. *Toxicological Sciences*. 2015;144(1):65-76.
51. Cui J, Xing L, Li Z, Wu S, Wang J, Liu J, et al. Ochratoxin A induces G 2 phase arrest in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro. *Toxicology letters*. 2010;193(2):152-8.
52. Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2011;2(4):184-94.
53. Shen XL, Zhang Y, Xu W, Liang R, Zheng J, Luo Y, et al. An iTRAQ-based mitoproteomics approach for profiling the nephrotoxicity mechanisms of ochratoxin A in HEK 293 cells. *Journal of proteomics*. 2013;78:398-415.
54. Wang Y, Liu J, Cui J, Xing L, Wang J, Yan X, et al. ERK and p38 MAPK signaling pathways are involved in ochratoxin A-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells. *Toxicology letters*. 2012;209(2):186-92.

55. Sauvant C, Holzinger H, Gekle M. The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. *Cellular physiology and biochemistry*. 2005;15(1-4):125-34.
56. Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezencon C, Piguet D, Delatour T, et al. MAPK-ERK activation in kidney of male rats chronically fed ochratoxin A at a dose causing a significant incidence of renal carcinoma. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;224(2):174-81.
57. Benesic A, Mildenerger S, Gekle M. Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflügers Archiv*. 2000;439(3):278-87.
58. Engin K, Özyardımcı N. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık; 2001.
59. Çoğulu Ö, Alpman A, Durmaz B, Özkınay F. Mitoz ve Mayozun Moleküler Temelleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2007;27(5):725-37.
60. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008;9(3):51-61.
61. Aktuğ H. Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi*. 2014;53(1):60-4.
62. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin moleküler biyolojisi. *Türkiye Bilimler Akademisi*. 2008:769-93.
63. Cooper GM, Hausman RE, Sakızlı M, Atabey N. Hücre: moleküler yaklaşım: İzmir Tıp Kitabevi; 2006.
64. Karaman A. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2003;23(1):67-73.
65. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(20):1442-55.
66. Schulz W. *Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook*: Springer Science & Business Media; 2005.
67. Somasundaram K, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci*. 2000;5:D424-D37.
68. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899-908.
69. Giono LE, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of cellular physiology*. 2006;209(1):13-20.
70. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research*. 1991;51(23 Part 1):6304-11.
71. El-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in cancer biology*. 1998;8(5):345-57.
72. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(1):23-36.

73. Gündoğdu R, ÇELİK V. RNA İnterferans (RNAi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2009;25(1-2):34-47.
74. Lee S, Sinko P. siRNA—getting the message out. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2006;27(5):401-10.
75. Agrawal N, Dasaradhi P, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2003;67(4):657-85.
76. Wall NR, Yang S. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *The Lancet*. 2003;362(9393):1401-3.
77. Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 2005;107(2):222-39.
78. Großhans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature*. 2008;451(7177):414-6.
79. Hammond SM. Dicing and slicing. *FEBS letters*. 2005;579(26):5822-9.
80. Karagüzel A, Kalay E, Celep F. RNA interferans (RNAi): gen sessizleştirilmesi ve tedavi edici uygulamaları. *RNA*. 2007;33(1):041-4.
81. Gündoğdu R, Çelik V. RNA İnterferans (RNAİ). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2016;25(1-2).
82. Miyoshi T, Ito K, Murakami R, Uchiumi T. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nature communications*. 2016;7:1-12.
83. Soman G, Yang X, Jiang H, Giardina S, Vyas V, Mitra G, et al. MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of interleukin-15: assay qualification, standardization and statistical analysis. *Journal of immunological methods*. 2009;348(1):83-94.
84. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2010 (38):e1918-e.
85. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):671-5.
86. IBM. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 Released 2012. Armonk, NY: IBM Corp. ; 2012.
87. Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15(7):3463-9.
88. Hibi D, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, et al. Site-specific in vivo mutagenicity in the kidney of gpt delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A. *Toxicological Sciences*. 2011:kfr139.
89. Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience reports*. 2010;30(4):243-55.

90. Kuroda K, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Kijima A, Matsushita K, et al. Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of gpt delta rats. *Mutagenesis*. 2013;29(1):27-36.
91. Hibi D, Kijima A, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Sugita-Konishi Y, et al. Effects of p53 knockout on ochratoxin A-induced genotoxicity in p53-deficient gpt delta mice. *Toxicology*. 2013;304:92-9.
92. Li J, Yin S, Dong Y, Fan L, Hu H. p53 activation inhibits ochratoxin A-induced apoptosis in monkey and human kidney epithelial cells via suppression of JNK activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;411(2):458-63.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Dilek	Soyadı	AŞCI ÇELİK
Doğum Yeri	Isparta	Doğum Tarihi	01.04.1985
Uyruğu	T.C	Tel	05058409112
e- mail	diileek@gmail.com dilekasci@sdu.edu.tr	Adres	SDÜ Doğu Kampüsü Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ISPARTA

Eğitim düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	SDÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.	2017
Yüksek lisans	SDÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD.	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen- Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl)
Araştırma Görevlisi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2010-2017

Yabancı Dilleri	KPDS / ÜDS Puanı	Diğer Puanı
İngilizce	66,25	Yok

YAYINLAR

- ✓ **SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale**

Aşçı-Çelik D, Aslan-Koşar P, Özçelik N, Eroğlu E. Cytogenetic Finding of Breast Cancer Cases and in Their First - Degree Relatives. Journal of Breast Cancer. 2013 September; 16(3): 285 – 29

Aslan-Koşar P, Koçer M, Aşçı Çelik D, Özçelik N. Cytogenetic findings in patients diagnosed with breast cancer having undergone adjuvant chemotherapy regimens. Genetics and Molecular Research. March 2016;15(1)

- ✓ **Hakemli dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale**

Aşçı-Çelik D, Aslan-Koşar P, Özçelik N. MikroRNA'lar ve Kanser İlişkisi. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2013;20(3)/121-127

- ✓ **SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayın**

Aşçı Çelik D, Yavuz Türel G, Aslan Koşar P, Özçelik N. Role of microRNAs in cancer development, diagnosis and treatment. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:5

Aslan Koşar P, Koçer M, Aşçı Çelik D, Özçelik N. Cytogenetic findings in breast cancer patients who underwent chemotherapy. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:101

Yavuz Türel G, Şahin Calapoğlu N, Aşçı Çelik D. Cellular effects of Aflatoxins. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:173

Yavuz Türel G, Şahin Calapoğlu N, Aslan Koşar P, Aşçı Çelik D. Investigation of association with bladder cancer and Ku70/80 polymorphism. 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:174

Aşçı Çelik D, Toğay VA, Özçelik N. Effects of some food additives on DNA damage in human lymphocytes. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channel. 24-27 May 2016 Isparta/TURKEY. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress. 2016 June;8(1)586

Semerci Sevimli T, Sevimli M, Toğay VA, Aşçı Çelik D, Özçelik N. Protective effects of silibinin on DNA in diabetes induced rats. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channel. 24-27 May 2016

Isparta/TURKEY. Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress. 2016 June;8(1)587

✓ **Uluslararası toplantıda sunularak özet metin olarak yayımlanan bildiri**

Aslan Koşar P, Aşçı D, Ertok S, Çelik E, Sakallı Çetin E. Demonstrating the proliferation index (PI) and sister chromatid Exchange (SCE) pre-treatment and post-treatment in helicobacter pylori infections (3 rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels) (Cell Membranes and Free Radical Research Volume: 2, Number: 1, June 2010), Poster No: 97, Özet Metin

✓ **Ulusal toplantıda poster, sözlü sunum ve gösterim**

Aşçı D, Aslan-Koşar P, Özçelik N. Isparta Yöresindeki Meme Kanseri Vakalarında Sitogenetik Bulgular. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Suppl. 31,6:94 XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya

Aşçı-Çelik D, Yavuz-Türel G, Aslan-Koşar P, Özçelik N, Şahin Calapoğlu N. Meme kanseri ve Ku80 -1401G/T polimorfizmi ilişkisinin araştırılması. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Kuşadası 27-30 Ekim 2013. PS-06 30, 284

Aşçı-Çelik D, Yavuz-Türel G, Aslan-Koşar P, Özçelik N. TGF-β C-509T gen polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisinin araştırılması. 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Kuşadası 27-30 Ekim 2013. PS-06 28, 283.

Yavuz Türel G, Aşçı Çelik D, Aslan Koşar P, Şahin Calapoğlu N. Mesane kanseri ve TGF-β C-509T gen polimorfizminin ilişkisinin araştırılması. 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Kuşadası 27-30 Ekim 2013. PS-06 26, 282.

Yavuz Türel G, Aşçı Çelik D, Aslan Koşar P, Polat GP, Şahin Calapoğlu N. Prostat kanseri ve Ku80 -1401G/T polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırılması. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Kuşadası 27-30 Ekim 2013. PS-06 27, 282

Toğay VA, Özçelik N, Yıldırım Baş F, Calapoğlu M, Aşçı Çelik D. İyonize radyasyona maruz kalan radyoloji çalışanlarında oluşan DNA hasarının alkali comet metodu ile belirlenmesi. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 27-30 Ekim 2015

Ulusal sempozyum, kongre, kurs (workshop) düzenlenmesi gibi etkinliklerde görev almak

XI. Deney Hayvanları Kullanımı Eğitimi Programı (10-17 Aralık 2014/ ISPARTA)

Ulusal kuruluşlarca desteklenen projede görev alma

Isparta Yöresindeki Meme Kanseri Vakalarında Sitogenetik Bulgular

(BAP 2170-YL-10)

Okratoksin A'nın İnsan Proksimal Tübül Hücrelerinde Hücre Döngüsü Moleküler Mekanizmaları Üzerine Etkisi (BAP 4463-D2-15)

