

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RETİNAL DEJENERASYON OLUŞTURULMUŞ FARE
MODELİNDE NEUREGULIN-1'İN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Şeyma Sultan GÖNÜLDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RETİNAL DEJENERASYON OLUŞTURULMUŞ FARE
MODELİNDE NEUREGULIN-1'İN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Şeyma Sultan GÖNÜLDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafında TYL-2017-2859 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

25 /01/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Kanat GÜLLE
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

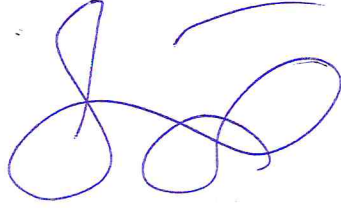
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

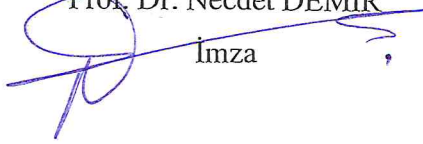
Şeyma Sultan GÖNÜLDAŞ

İmza



Prof. Dr. Necdet DEMİR

İmza



TEŐEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi tüm desteklerini sunan, her zaman sonsuz sevgi ve güvenleriyle yanımda olan annem Öznur GÖNÜLDAŞ, babam Sedat GÖNÜLDAŞ ve ablam Seda ÖZKOÇ'a sonsuz sevgimi ve teşekkürlerimi sunuyorum. Herz aman kendisini örnek aldığım ve hayatımda önemli bir yere sahip olan Av. Mualla BİLGE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, bilgilerini benimle paylaşan danışmanım Prof. Dr. Necdet DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışma konumu bulmamda yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen Dr. Esmâ KONUK'a teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Giriş: Neuregulin-1 (NRG-1), Endoplazmik Retikulum stresini (ERS) azaltan bir ajandır. Tedavi yaklaşımları oldukça kısıtlı olan retinal hastalıkların oluşumunun sebepleri arasında ERS gösterilmektedir. Projemizde retina dejenerasyonunun nedenlerinden biri olarak gösterilen ER stresini NRG-1 ile baskılamayı ve bunun retinal dejenerasyon patogenezi üzerindeki etkisini morfolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar ile değerlendirmeyi amaçladık. Böylece ERS kaynaklı retinal hastalıklarda Neuregulin-1'in hem proflakside hem de tedavideki etkisi hakkında fikir sahibi olmayı hedefledik.

Yöntem: Deney hayvanı olarak 6-8 haftalık BALB/c ırkı erkek fareler kullanıldı. Retinal dejenerasyon modeli için, farelere 60 mg/kg vücut ağırlığı dozunda N-methyl-N-nitröz (MNU) intraperitoneal (IP) tek doz enjeksiyon yapıldı. MNU kullanımdan hemen önce steril serum fizyolojik içerisinde seyreltilerek farelere enjekte edildi. Tedavi grubu için; farelere 0.6 mg/kg/gün dozunda Neuregulin-1 intraperitoneal (IP) enjeksiyon yapıldı. MNU enjeksiyonu yapıldığı gün 0. gün olarak kabul edildi ve tedavi, her gün tek doz Neuregulin verilerek 3. ve 7. günlerde retina diseksiyonu yapıldı. Hematoksil-eosin ile boyanan örnekler ışık mikroskopunda incelendi, İmmunoflorosan yöntemi kullanılarak gruplara ait retina örneklerinde GRP78, CHOP, Cleaved Caspase 3 protein ekspresyonları incelendi. Hücre ölümü belirteci olarak TUNEL yöntemi kullanıldı.

Bulgular: MNU ile indüklenmiş retina dejenerasyonu oluşturulmuş fare modellerinde, NRG-1 tedavisiyle ERS proteinlerinde (GRP78-CHOP-Cleaved Caspase 3) azalma gözlemlenmiştir. TUNEL sonuçlarına göre NRG-1 tedavisi uygulanan deneklerde TUNEL-pozitif hücre sayısında düşüş olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: MNU ile indüklenmiş retina dejenerasyonunda retina hücrelerinde ERS'nin hafiflediği ve hücre sağ kalımının arttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Retina dejenerasyonu, Endoplazmik Retikulum Stresi, Neuregulin-1, N -methyl- N –nitröz.

ABSTRACT

Introduction: Neuregulin-1 is an agent reduces ER stress. Researches have been shown that ER stress causes among the reasons for the development of retinal diseases with limited treatment approaches. In this study, we aimed to investigate the suppression of ER stress as one of the causes of retinal degeneration with Neuregulin-1 and its effect on the pathogenesis of retinal degeneration with morphological and immunohistochemical studies. In that point of view, we objected to have an opinion about the effect of Neuregulin-1 on both prophylaxis and treatment in retinal diseases originating from ER stress.

Materials and Methods: 6-8 weeks old male mouse of BALB/c were used. N-methyl-N (nitrosourea (MNU) intraperitoneal (IP) MNU was applied as single dose (60mg/kg with in body weight) by intraperitoneally. Just before the MNU application it was diluted in saline and injected to rats. For treatment group; mice was injected with Neuregulin-1 intraperitoneal (IP) at a dose of 0.6mg/kg/day for body weight. First day of MNU injection, it was accepted as day 0 and treatment was continued daily with one dose of Neuregulin and retinal dissection was performed on the 3rd and 7th days. Samples were stained with hematoxylin-eosin and investigated on light microscope. GRP78-CHOP Cleaved Caspase 3 protein expression was evaluated in group of immunofluorescence and retina samples. TUNEL method used as a marker of cell death.

Results: MNU-induced retinal degeneration-induced mouse models showed a reduction in ERS proteins (GRP78-CHOP-Cleaved Caspase 3) with NRG-1 treatment. According to the TUNEL results, the number of TUNEL-positive cells were decreased in NRG-1 injected groups.

Conclusion: MMNU-induced retinal degeneration showed retention of ERS and increased cell survival in retina cells.

Keywords: Retinal degeneration, Endoplasmic Reticulum Stress, Neuregulin-1, N-methyl-N-nitrosourea.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Göz Histolojisi	2
2.1.1. Retina Histolojisi	4
2.1.2. Görmenin Biyokimyasal Mekanizması	7
2.2. Retinitis Pigmentosa	9
2.3. Endoplazmik Retikulum	11
2.3.1. ER'nin Protein Katlanması, Yanlış Katlanmış Proteinleri	13
2.3.2. ER Stres ve Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)	13
2.4. ERS ve Apoptoz	19
2.5. Retina Dejenerasyonunda ERS	20
2.6. Neuregulin-1 (NRG-1)	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Retina Dejenerasyonu Oluşturulmuş Fare Modeli	23
3.2. Deney Gurupları	23
3.2.1. Parafin Takibi	25
3.2.2. Kriyo Takip	25
3.2.3. Hematoksilen-Eozin Boyama	25
3.2.4. TUNEL	26
3.2.5. İmmunfloresan Boyama (Chop-Grp78-CleavedCaspase3)	26

4. BULGULAR	28
4.1. HE Bulgular	28
4.2. İmmunofloresans Bulgular	28
4.2.1 GRP78/ BİP İmmün Boyanmaları	28
4.2.2. DDIT3/CHOP İmmün Boyanmaları	30
4.2.3. Cleaved Caspase 3 İmmün Boyanmaları	32
4.3. Tunel Bulguları	34
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Deney gruplarının enjeksiyon çizelgesi	24
Tablo 3.2.	İmmünofloresan boyanmada kullanılan antikorlar.	27



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Gözün Genel Yapısı	2
Şekil 2.2.	Kornea ve Lens Histolojik Görüntüsü	3
Şekil 2.3.	Gözün Ana Kısımlarının Şematik Yapısı	3
Şekil 2.4.	A-Gözün Anatomik Şeması B-Retina Hücreleri	4
Şekil 2.5.	A-Gözün Anatomisi B-Retina Hücrelerinin Şeması C- Retina Histolojik Görüntüsü	5
Şekil 2.6.	Retina Pigment Epiteli Şematik Görüntüsü	5
Şekil 2.7.	Çubuk-Koni Fotoreseptör Şematik Çizimi	7
Şekil 2.8.	11-cis-retinal ve All-trans Retinalin Moleküler Yapısı	8
Şekil 2.9.	Çubuk ve Konifotoreseptör Hücrelerinin Moleküler Mekanizması	8
Şekil 2.10.	Perk Sinyal Yolu	15
Şekil 2.11.	ATF6 Sinyal Yolu	16
Şekil 2.12.	IRE1 Sinyal Yolu	17
Şekil 3.1.	N-methyl-N-nitroz (MNU) kimyasal yapısı	23
Şekil 4.1.	a) Kontrol, b) MNU, c) Tedavi, d) Önleyici Tedavi , e) NRG-1, f) Çözgen Retina kesitlerinin HE boyaması (40X); ONL: Dış Nükleer tabaka, INL: İç Nükleer tabaka, GCL: Ganglion Hücre Tabakası	28
Şekil 4.2.	a) Kontrol, b) Çözgen, c) MNU, d) Çözgen, e) Tedavi, f) Önleyici Tedavi gruplarından alınan Retina immünfloresan görüntüsü (20X). Yeşil floresans GRP78 ekspresyonu, Mavi floresans DAPI	29
Şekil 4.3.	Kontrol, Tedavi, Önleyici Tedavi, Çözgen, NRG-1 ve MNU retina örneklerinde GRP78/BİP proteininin immünfloresans boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.	30

Şekil 4.4.	a) Kontrol, b) Çözgen, c) MNU, d) Çözgen, e) Tedavi, f) Önleyici Tedavi gruplarından alınan Retina immünfloresan görüntüsü (20X). Yeşil floresans Gadd ekspresyonu, Mavi floresans DAPİ.	31
Şekil 4.5.	Kontrol, Tedavi, Önleyici Tedavi, Sham, NRG-1 ve MNU retina örneklerinde DDIT3/CHOP proteininin immünfloresans boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik.	32
Şekil 4.6.	a) Kontrol, b) Çözgen, c) MNU, d) Çözgen, e) Tedavi, f) Önleyici Tedavi gruplarından alınan Retina immünfloresan görüntüsü (20X). Yeşil floresans C. Caspase 3 ekspresyonu, Mavi floresans DAPİ.	33
Şekil 4.7.	Kontrol, Tedavi, Önleyici Tedavi, Sham, NRG-1 ve MNU retina örneklerinde C. Caspase 3 proteininin immünfloresans boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	34
Şekil 4.8.	a) Kontrol, b) MNU c) Tedavi, d) Çözgen, e) Önleyici Tedavi, f) NRG-1 Gruplarının retina örneklerinde TUNEL boyamaları (40X).	35
Şekil 4.9.	Kontrol ve deney gruplarının TUNEL Pozitif Hücre Yüzdesi HSCORE değeri histogramı (p<0,001)	35

SİMGELER ve KISALTMALAR

A2E	: Lipofuskin
AMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
ATF4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
ATP	: Adenozin trifosfat
BCL2	: B Hücreli Lenfoma 2
CHOP	: C/EBP Homolog Proteini
DER	: Düz Endoplazmik Retikulum
DR	: Diabetik Retinopati
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
eIF2α	: Ökaryotik Başlama Faktörü 2 α
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: ER İlişkili Bozunma
ERS	: Endoplazmik Retikulum Stresi
GCL	: Fotreseptör Ganglion Hücre Tabakası
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GRP78	: Glukozla Düzenlenen Protein 78
INL	: Fotreseptör İç Nükleer Tabaka

IPL	: Fotreseptör İç Pleksiform Tabaka
JNK	: J-cun N Terminal Kinaz
MNU	: N-metil-N-nitrosourea
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NRG-1	: Neuregulin-1
ONL	: Fotreseptör Dış Nükleer Tabaka
OPL	: Fotreseptör Dış Pleksiform Tabaka
PERK	: Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz
POS	: Fotreseptör Dış Segment
RP	: Retinitis Pigmentosa
RPE	: Retina Pigment Epiteli
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response)
XBPI	: X-kutu bağlayıcı protein 1

1. GİRİŞ

Görme bozukluğu, dünya genelinde 2 milyondan fazla kişiyi etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Dünyadaki tüm görme bozukluğu vakalarının %50'sinden fazlasında fotoreseptörler bozulmakta ve işlevini kaybetmektedir. Retina dejenerasyonu (RD) insanlardaki görme kayıplarının önde gelen nedenidir.

Retina dejenerasyonu (RD), kalıtsal ve sonradan edinilmiş hastalıklar grubundandır. Sonradan edinilmiş hastalık gruplarında; yaş, oksidatif stres, inflamasyon, hipoksi, hiperglisemi orjinli ERS'nin etkili olduğu ifade edilmektedir. Transisyonel dejenerasyon nedeniyle retinadaki hücrelerden birinin kaybı diğer nöronları da etkilediğinden görme bozukluğu oluşmaktadır.

Endoplazmik retikulum stresi (ERS), yanlış katlanmış proteinlerin ER'de birikmesi ve hücrenin strese girmesidir. Hücre protein üretimini durdurarak ve yanlış katlanmış proteinleri parçalayarak homeostazi sağlamaya çalışır. Bu süreçte iki yol vardır; ya hücre homeostazi normale döner ya da hücre programlı hücre ölümü olan apoptoza gider. Hücrenin apoptoza gitmesi retina gibi aşırı sistematik hücre toplulukları için kalıcı zararlar verebilir. ER stresinin azalması ve hücrenin eski dengesine kavuşması retina dejenerasyonunda oldukça önemlidir.

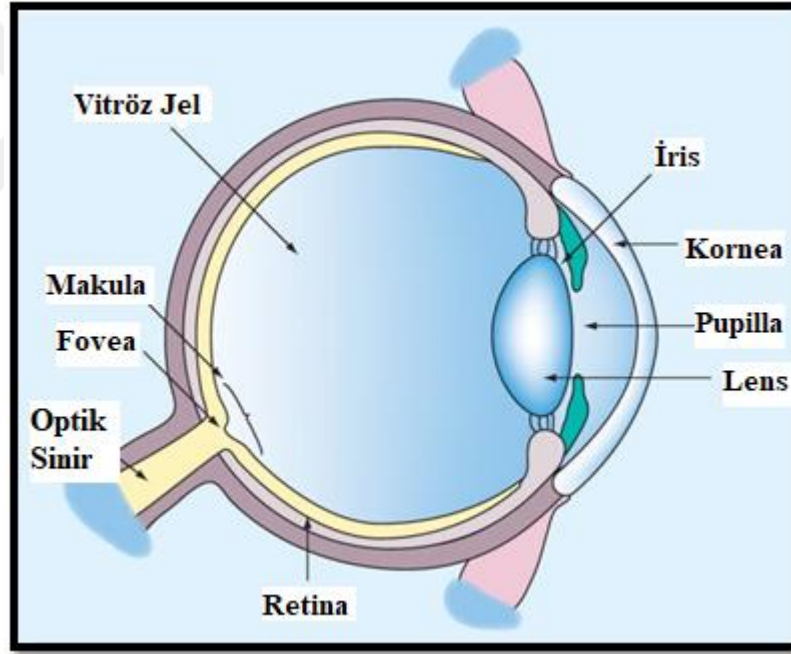
Neuregulin-1 (NRG-1), kardiyovasküler sistem, sinir sistemi, meme bezleri, bağırsak ve böbreklerde yaygın olarak eksprese edilir. NRG-1'in miyokardiyal hücrelerin apoptozunu inhibe ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. NRG-1, ER'in homeostazi sağladığı ve ER stresinin aktivasyonunu inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu inhibisyonun mekanizması halen net olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamızda Neuregulin-1 ile ER stresini baskılayarak retina dejenerasyonunu önlemeyi ve tedavi etmeyi amaçlamaktayız. Yapılan çalışmaları referans alarak; Neuregulin-1, retina dejenerasyonu oluşturulmuş fare modelinde ER stresini azaltarak nöronal kaybı engeller hipotezini kurduk.

2. GENEL BİLGİLER

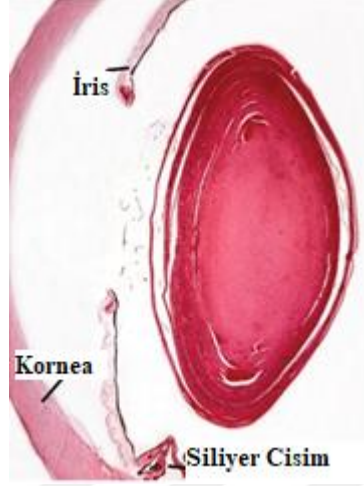
2.1 Göz Histolojisi

Omurgalı gözü farklı embriyonik tabakalardan köken almaktadır; lens ve kornea yüzey ektoderminden köken alırken, iris, siliyer cisim, retina ve epitel tabakası nöral plaktan köken almaktadır (Graw, 2010). Göz, nesnelere yansıyan ışığın şiddetinin, renklerin algılanmasını, nesnenin şeklinin ve boyutunun belirlenmesini sağlayan karmaşık bir organdır (Wert ve ark., 2014). Ön ve arka olmak üzere iki segmentten oluşmaktadır. Anterior segmentte kornea, lens, iris ve siliyer cisim bulunurken posterior segmentte retina ve koroid bulunmaktadır (Lee ve ark., 2010) (Şekil 2.1.) (Nieder Korn, 2009).



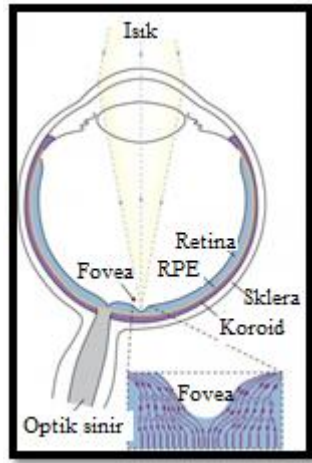
Şekil 2.1. Gözün genel yapısı (Nieder Korn, 2009)

Kornea, gözün en dış tabakasıdır ve limbusda sklera ile sınırlıdır ve gözde ışığın kırılmasında görev almaktadır (Ludwig ve Dulebohn, 2018). Gözün lens yapısı, retinaya ışık iletimini sağlayan bikonveks yapıda nispeten hücresel içerik bulunduran şeffaf göz içi yapısıdır. Lens korneadan gelen ışığın siliyer kasların yardımıyla odağını değiştirmek için şekil değiştirebilir. Böylece gelen ışık yansımalarının netliğini tam ve doğru olarak retinaya göndermektedir (Strauss, 1995) (Şekil 2.2) (Aliancy ve Mamalis, 1995).



Şekil 2.2. Kornea ve lensin görüntüsü (Aliancy ve Mamalis, 1995)

Gözün ön ve görünür kısmında kornea ve sklera yer alırken arkada ve görülmeyen kısmında sklera, koroid ve retina tabakası yer almaktadır. Sklera gözün en dışında bulunan sert ve koruyucu tabakasıdır. Beyaz renkte kollajen liflerden zengin, hücre dışı matriks (ESM), fibroblastlar ve fibröz bir yapıdan oluşmaktadır. Ayrıca sklera göz içi basıncı koruyarak gözün şeklini ve boyutunu belirlemektedir (Metlapally ve Wildsoet, 2015). Koroid, retinal pigment epiteli (RPE) ve skleranın arasında bulunur ve histolojik olarak 5 tabakaya ayrılır. Bu tabakalar retinaya bakan kısmından skleraya doğru; Bruch membranı, koryokapilaris, Haller tabakası, Sattler tabakası ve suprakoroidal tabakadır ve büyük ölçüde vasküler bir yapıya sahiptir (Ludwig ve Dulebohn, 2018).

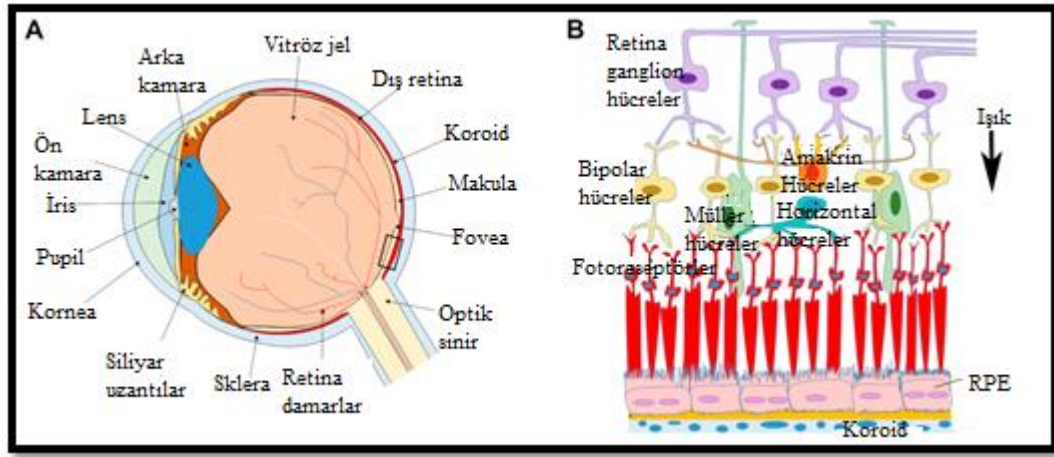


Şekil 2.3. Gözün ana kısımlarının şematik yapısı (Sung ve Chuang, 2010)

Sklera ve koroidin altında bulunan retina, gözün arka kısmının iç tabakasını oluşturur. RPE, retina ve koroidler arasında damarlı ve pigmentli bir bağ dokusu arasında bulunmaktadır (Sung ve Chuang, 2010) (Şekil 2.3) (Sung ve Chuang, 2010).

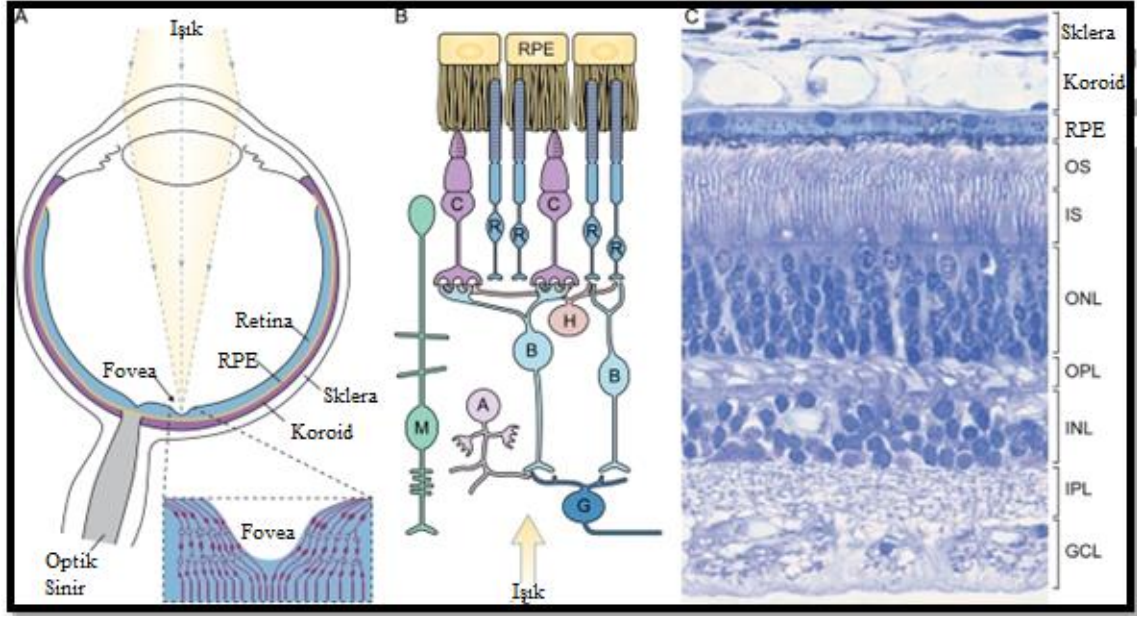
2.1.1. Retina Histolojisi

Retina; farklı nöron tiplerinden ve farklı görevler için farklılaşmış hücre topluluğundan oluşmaktadır. Retinada gangliyon hücreler; bipolar hücreler, amakrin hücreler, fotoreseptör hücreler ve yatay hücrelerden oluşmaktadır (Amini ve ark., 2017) (Şekil 2.4.) (Keeling ve ark., 2018).



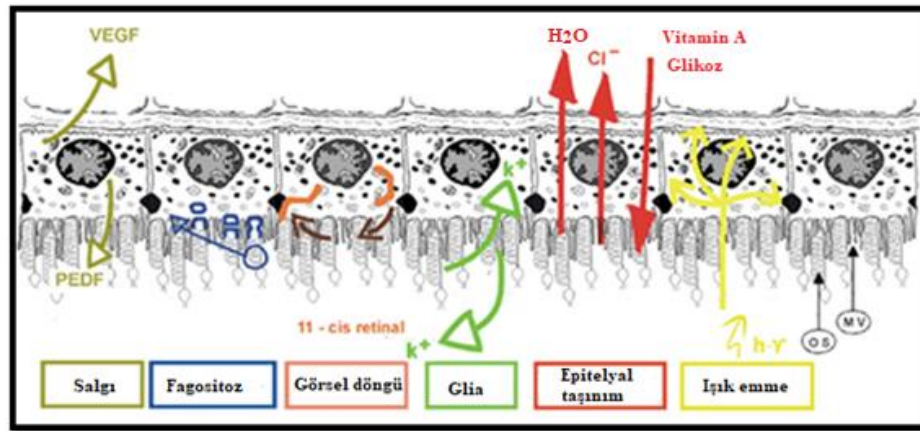
Şekil 2.4. A-Gözün anatomik şeması B-Retina hücreleri (Keeling ve ark., 2018)

Bu hücreler farklı katmanlar oluşturmaktadır, apikalden başlayarak hücreler; retinal pigment epitel (RPE) tabakası, fotoreseptör tabakası, dış sınırlayıcı membran, dış nüklear tabaka (ONL), dış pleksiform tabaka (OPL), iç nüklear tabaka (INL), iç pleksiform tabaka (IPL), gangliyon hücre tabakasından (GCL), sinir lif tabakası ve iç sınırlayıcı membrandan oluşmaktadır (Sung ve Chuang, 2010; Euler ve ark., 2014; Sanes ve Masland, 2015) (Şekil 2.5) (Sung ve Chuang, 2010).



Şekil 2.5. A-Gözün Anatomisi B-Retina Hücrelerinin Şeması C- Retina Histolojik Görüntüsü (Sung ve Chuang, 2010)

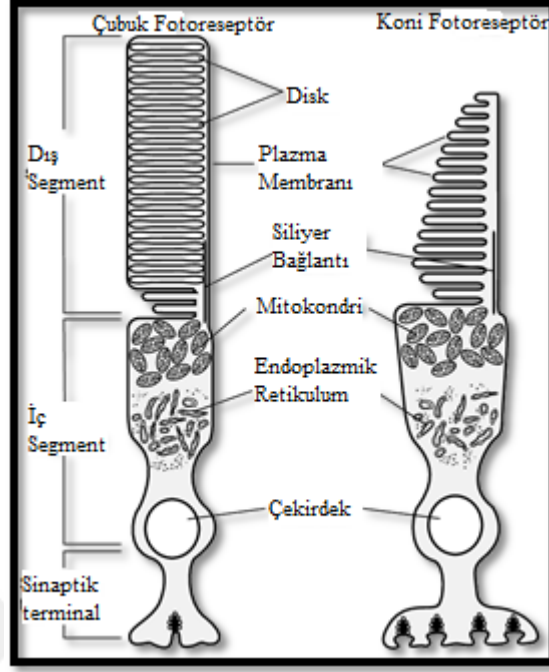
RPE, tek sıra halinde ve aralarında sıkı bağlantılar bulunan, fotoreseptörlerin görevlerini yerine getirmesi ve hayatta kalmalarını sağlayan özelleşmiş hücrelerdir. Her bir RPE belli bir grup fotoreseptör hücrelerinden sorumludur. RPE; fotoreseptör dış segment ile iç içe konumlanmaktadır. RPE'nin görevleri; epitelyal taşınma, görme döngüsüne katılma, iyon tamponlama, ışığı emme, gerekli büyüme faktörlerini salgılama ve vitamin A döngüsüne katılmaktır. RPE'i fotoreseptör tabakası ile organize çalışmaktadır (Strauss, 1995) (Şekil 2.6) (Strauss, 1995).



Şekil 2.6. Retina Pigment Epiteli Şematik Görüntüsü (Strauss, 1995)

Omurgalı retinasında iki tip fotosensitif nöron bulunmaktadır; bunlar koni ve çubuk fotoreseptörlerdir. Fotoreseptörler, ışığı algılamak için özelleşmiş retinanın dış nükleer tabakasında bulunan özel nöron tipleridir. Koni fotoreseptörleri ışık yoğunluğundaki değişikliklere hızlı yanıt verir, renkli görme ve görme keskinliğinden sorumludur. Çubuk fotoreseptörler ise ışığa oldukça duyarlı hücrelerdir ve düşük ışık yoğunluğunda, gece görüşünden sorumludur. Fotoreseptörler, fotonik uyarılara karşı elektrik sinyalleri ve protein üretimini sağlamaktadır. Fotoreseptörler protein üretimlerinin çoğunu hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri dış segmente doğru uzaklaştırmak yani 'dökülmesini' sağlamak için günlük olarak üretim sağlamaktadır. Günlük protein üretimi, dökülme işlemi, görme işlemi, temel biyosentez işlemleri için önemli miktarda enerji harcayan vücudun en aktif çalışan hücrelerindedir. Metabolik olayların bu kadar fazla olması, metabolik işlemlerde hata olasılığını da arttırmaktadır (De Robertis ve Lasansky, 1958; Sung ve Chuang, 2010; Wong-Riley, 2010).

İnsan retinasında yaklaşık olarak, 120 milyon çubuk hücresi, 6 milyon koni hücresi bulunmaktadır. Retinanın merkezi veya makula bölgesinde hücreler yoğunlaşmaktadır. Fotoreseptör hücreler yapısal ve işlevsel görevlerine göre bölümlere ayrılmaktadır. Fotoreseptörler 5 bölgeden oluşmaktadır; dış segment (OS), silyum (CC), iç segment (IS), nükleer bölge ve sinaptik bölge (Şekil-1.7) (Artemyev ve ark., 1998).



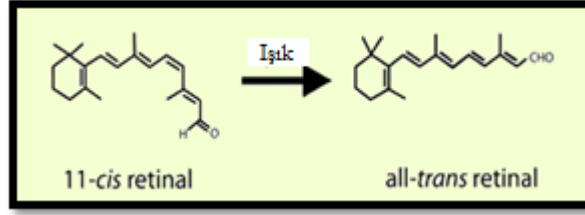
Şekil 2.7. Çubuk-Koni fotoreseptör şematik çizimi (Artemyev ve ark., 1998)

Çubuk dış segmenti (ROS) lameller sisteminden oluşmaktadır ve her bir hücrede yaklaşık olarak 1000 lamel bulunmaktadır. Koni dış segmenti lamel sistemi ise, plazma membranının iç içe geçmesi ile oluşmaktadır. OS, gelen ışığın yakalanması ve fototransdüksiyon işlemi denilen gelen ışık uyarılarını elektrik sinyallerine dönüştürmede görev alır. CC ise dış segmente (OS) bağlıdır ve belirli proteinlerin üretimi ve işlenmesinden sorumludur. IS, hücre organelleri (mitokondri, endoplazmik retikulum, Golgi kompleksi ve lizozomlar v.b.) içeren bölümdür ve hücrenin biyosentez ve metabolik mekanizmasının sürdürüldüğü bölümdür. Hücre çekirdeğini içeren nükleer bölge hücrenin son bölümü olan sinaptik bölge ile devam eder (Molday ve Moritz, 2015).

2.1.2. Görmenin Biyokimyasal Mekanizması

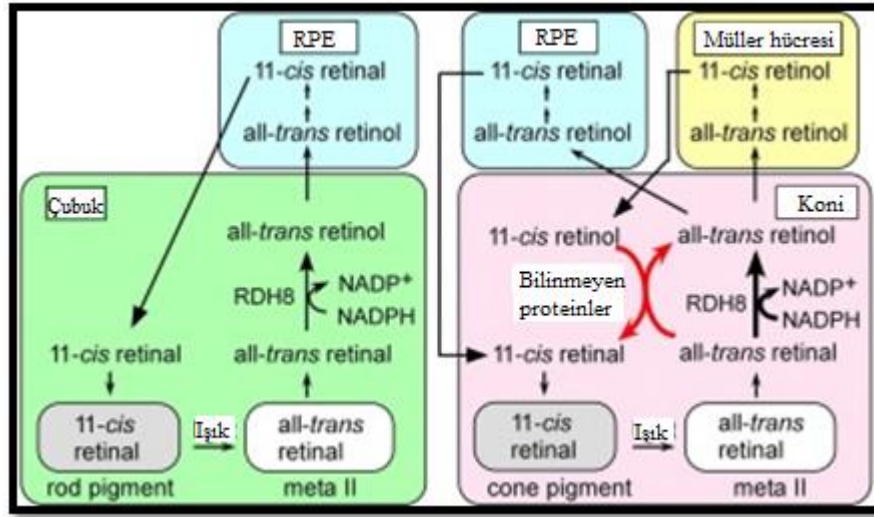
Çubuk ve koni fotoreseptörler, ışığı algılamak için A vitaminin ışığa duyarlı türevi olan 11-cis-retinal'i kullanmaktadırlar. Çubuk ve koni fotoreseptörler bir görsel pigment molekülünü oluşturmak için 11-cis-retinal bir opsin sinyal molekülüne bağlanmaktadır (Şekil 2.8) (Kono ve ark., 2008). Işığın emilmesinin ardından, görsel pigment kromoforu,

11-cis-retinal, all-trans-retinole izomerize edilmektedir (Kono ve ark., 2008; Saari, 2012).



Şekil 2.8. 11-cis-retinal ve all-trans retinalin moleküler yapısı (Kono ve ark., 2008)

All-trans-retinal, opsinden ayrılır ve RDH8 ile birlikte bir kofaktör olan NADPH ile trans-retinole indirgenir ve RPE'ine transfer edilir. Işık hassasiyeti yalnızca 11-cis-retinol'de bulunmaktadır ve fotoreseptörlerin çalışması için 11-cis-retinol sağlanmalıdır. Retinal pigment epitelinde retinol 11-cis formuna izomerleştirilir ve 11-cis-retinol'e okside edilerek görsel pigmentin yeniden döngüye girmesi için fotoreseptörlerin OS'ine geri transfer edilir (Kono ve ark., 2008; Miyazono ve ark., 2008) (Şekil 2.9) (Miyazono ve ark., 2008). Böylelikle görme biyokimyası tamamlanmış olmaktadır.



Şekil 2.9. Çubuk ve Koni fotoreseptör Hücrelerinin Moleküler Mekanizması (Miyazono ve ark., 2008)

Tüm bu süreçte çok fazla enerji harcanmaktadır. Genel olarak retina zengin kan akımından, çok sayıda mitokondriden ve yüzeyine çarpan ışık fotonlarından serbest radikallere maruz kalmaktadır. Çubuk fotoreseptörlerin dış segmenti, çift bağ segmenti

sayısından kaynaklanan peroksidasyona duyarlıdır ve yüksek oranda doymamış yağ asidi içermektedir. Çubuk fotoreseptörlerin iç kısımları ise hücre dışında hücreyi hasara uğratabilecek olan reaktif oksijen türlerini içeren mitokondri açısından zengindir. Tüm vücutta en zengin kan akımlarından birine koroid tabakası sahiptir. Bu bölgede diğer alanlara göre üretilen protein miktarı ve de oksijen tüketimi yedi kat daha fazladır. Ayrıca, retinaya vuran ışık, foto-oksidatif süreçleri artırabilmektedir. Mavi dalga boyuna sahip olan görünür ışık, sitokrom oksidazı hedefleyen ve RPE hücrelerini geri dönüşümsüz olarak DNA hasarına maruz bırakan toksik bir bileşen olan lipofuksin (A2E) oluşumunu indükler. Retina çalışma prensibi ve işleyiş açısından çok fazla strese maruz kalmaktadır (Shaban ve Richter, 2002; Sparrow ve ark., 2003; Wu ve ark., 2010).

2.2. Retinitis Pigmentosa

Klinik olarak retinitis pigmentosa 1853 yılında tanımlanmıştır, ancak 1857'ye kadar bu hastalığa bir ad verilmemiştir (Wolfrum ve Nagel-Wolfrum, 2018). Çoğu kez yanlış bir adlandırma olarak düşünülen retinitis terimi; inflamasyonun, hastalığın doğal seyrinde küçük bir rol oynamasına rağmen halen kullanılmaktadır. Retinitis pigmentosa (RP), kademeli görme kaybı oluşturan ilerleyici bir bozukluktur. Kalıtsal retina distrofisi olarak da bilinir. Genellikle bilateraldir. Çeşitli klinik bulgularla ortaya çıkabilir ve ilerleyebilir, RP'nin ilk semptomu genellikle gece görüşünün kaybıdır; bunu, görsel alanların kademeli olarak daralması izler. Hastalığın şiddeti ve ilerleme hızına bağlı olarak, tünel görme veya tam görme kaybı ile sonuçlanabilir. Hastalığın ilerlemesiyle, doğru renk seçiciliği kaybı ve görme keskinliği kaybı gibi başka semptomlar da gelişebilir. Makula çalışmaya devam ettiği için RP'de görme algısı kısıtlı olsa da devam etmektedir. RP'nin şiddetli etkilerinden biri olan, duyuusal yoksunluktan kaynaklandığı düşünülen fotopsinin (ışığın algılanan flaşları) gelişmesidir. Bu, görsel halüsinasyonlar noktasına bile gelebilmektedir. (O'Neal ve Luther, 2018).

Hastalık sadece görme kaybına neden olduğu durumda "non-sendromik" RP olarak adlandırılır. RP vakalarının çoğunluğu (~%70-80), non-sendromik kategoriye girmektedir. RP, sistemik hastalık ile birlikte ortaya çıktığında, "sendromik" RP olarak adlandırılır. En sık görülen sendrom tipi RP'de, görme kaybı ile ilişkili nöroensensiyel işitme kaybını içeren Usher sendromudur (Yang ve ark., 2018).

Retinitis pigmentosadan sorumlu genetik mutasyonlar, retinada özellikle çubuk fotoreseptörleri etkileyen biyokimyasal işlev bozukluğu oluşturur. Defektler, apoptoz, ışık hasarı, siliyer transport disfonksiyonu ve endoplazmik retikulum stresi de dahil olmak üzere birçok mekanizma ile ilişkili olabilir. Tüm olası yolların ortak sonucu çubuk fotoreseptörlerin ölümüdür (H. Xu ve ark., 2009). Çubuklar düşük ışık görüşünden sorumlu olduğu için, bu hücrelerin giderek artan kaybı, RP ile ilişkili karakteristik gece körlüğünü ve periferik görmenin kademeli olarak azalmasını sağlar. Sonunda, çok sayıda çubuğun tahribe uğraması, retinal pigment epitelyumu (RPE) üzerinde zararlı bir etki oluşturur ve koni fotoreseptörlerini de olumsuz yönde etkilemeye başlar. Koniler, retinadaki ilerleyici hücre ölümünün oluşturduğu toksik ortama maruz kaldıkça renk algısının bozulması gelişebilir.

Retinitis pigmentosa'nın ilerlemesine neden olan pek çok mekanizma vardır. Apoptoz esasen, bir genetik mutasyonla tetiklenebilen, programlı hücre ölümü olan fizyolojik bir olaydır. Apoptoz, fotoreseptörlerin kendi arasındaki hücre-hücre iletişimi yoluyla da indüklenebilir (Cideciyan ve ark., 2005). Bu nedenle, çubukların ölümü nihayetinde koni reseptörlerine de yayılabilir. Işık maruziyeti fototoksik mekanizmaları şiddetlendirebilir. Bunlar arasında, retinol metabolizmasındaki mutasyonlar ve ortamdaki oksijen tüketiminin hızlanması, hem çubuk hem de koni fotoreseptörlerin dejenerasyonunu artırabilir (Badano ve ark., 2006). Siliyer fonksiyon, retinadaki besin maddelerinin ve diğer maddelerin taşınmasında önemlidir. Usher sendromu da dahil olmak üzere bazı genetik mutasyonlar, bu işlevi bozabilir ve hücre kaybına neden olabilir (Andresen ve ark., 2006). Endoplazmik retikulumda ki stres, serbest radikallerin oluşumuna sebep olabilir, bunun ardından retina ve vasküler endotelial hücre hasarının hipoperfüzyonunun uyarılması gerçekleşebilir (Verbakel ve ark., 2018). Retinitis pigmentosa da tipik üç klinik bulgu bulunmaktadır; kemik spikül benzeri pigmentasyon, damarsal daralma ve optik sinir solukluğu. Karakteristik olarak yıldız şekilli kemik spikülü, melanin pigment birikintileri retinadaki perivasküler bölgelere ayrılan ve göç eden retinal pigment epitelyal hücrelerden kaynaklanır. Bu göçün kesin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır, fakat bunun bir nedeni de bunun çok sayıda fotoreseptörün ölümüne bağlı olarak azalmış bir metabolik talepten kaynaklanmasıdır. Optik diskin görünüşündeki değişiklik büyük olasılıkla diski kaplayan ve yansıtıcılığı artıran bir

"mumsu solukluk" üreten glial hücrelerin oluşmasından kaynaklanmaktadır (Wolfrum ve Nagel-Wolfrum, 2018).

RP'nin tipik gelişimi, yaşamın erken dönemlerinde başlayan görme bozuklukları şikayetlerini içermektedir. Erken RP'de düşük ışıkta net görememe ve karanlıktan aydınlığa geçişte adaptasyonun oldukça yavaşlamasıdır. Çoğu RP'li hastada erken belirtiler arasında, gece gördükleri bir far veya başka parlak bir cisimden sonra, karanlığa yeniden adaptasyon sürecinin çok yavaş olmasıdır. Görme alanının daralması başlangıçta belirgin değildir fakat zaman içinde ilerleyen hücre kayıpları ile birlikte görme alanı kayıpları görülmektedir.

Hastanın genetik geçmişi, kalıtım tipini belirlemek ve prognoza yardımcı olmak için kritik öneme sahiptir. RP'nin sendromik varyantlarını tanımlamak için görme bozukluğuna ek olarak etkilenen diğer sistemleri tanımlamak için eksiksiz bir geçmişe ve sistemlerin gözden geçirilmesine ihtiyaç vardır. Ek olarak, hastalığın taklitini oluşturabilecek olan bulaşıcı hastalıklara veya toksinlere maruz kalma gözden geçirilmelidir.

Fiziksel bulgular arasında, kemikli spikül pigmentasyonunun, damarsal daralmanın ve optik diskin anormal solukluğunun fundoskopik muayenesinde görülen "klasik triad" yer alır. Bunlar hastalığın erken döneminde belirgin olmayabilir ve anormalliklerin görülme derecesi hastalığın şiddeti ile değişkendir. Diğer ilişkili fiziksel bulgular subkapsüler katarakt ve makula ödemi içerebilir. Gözün dış muayenesi genellikle normal iken, RP hastaları keratokonus için genel popülasyona göre daha yüksek risk altındadır. Yine de, keratokonus gelişimi oldukça nadirdir (Shintani ve ark., 2009). Refraktif hatalar RP hastalarında genel popülasyona göre daha sık görülmektedir (Wolfrum ve Nagel-Wolfrum, 2018).

2.3. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER), çekirdek membranından hücre membranına uzanan en geniş hücre içi organelidir. Hücre çekirdeğinin hemen bitişiğindedir; membranı çekirdek zarının dış membranı ile sürekli ve ER lümen olarak adlandırılan iç boşluğa doğru uzanan çok genişletilmiş bir membran ile karakterize edilir. Bu organelin uzaması,

büyüklüğü, hücrenin aktivitesine ve tipine bağlıdır. Tübüller ve sisterna gibi farklı şekillerin alt alanlarında düzenlenir ve iki tipi bulunmaktadır: granülsüz endoplazmik retikulum (SER) ve granüllü endoplazmik retikulum (GER) (English ve ark., 2009).

ER, kalsiyum depolama, kimyasal bileşiklerin detoksifikasyonu ve lipit sentezi de dahil olmak üzere birçok farklı aktiviteyle hücre içinde görev almaktadır. Ayrıca diğer organellere, plazma membranına ve hücre dışı bölme salgılanıp gönderilen proteinlerin doğru katlanma ve translasyon sonrası modifikasyonundan da sorumludur. Bu aktivite GER'de bulunurken, diğer hücre içi organellere iletilecek lipitler SER'de sentezlenir. ER ayrıca hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) iyonları için önemli bir depo görevi görür. Kompartmanın fizyolojik aktiviteleri için doğru oksidoredüktaz potansiyelini sürdürmeye katkıda bulunmak için gereklidir. Sitosol ile karşılaştırıldığında ER, fazla oksitleyici bir redoks potansiyeli veren daha büyük bir kalsiyum konsantrasyonuna sahiptir. Disülfür köprüsü oluşumu ve karbonhidrat ilavesini içeren yeni sentezlenmiş polipeptidlerin enzimatik modifikasyonu, ER lümen içindeki yeterince oksitleyici koşulların sürdürülmesine bağlıdır. Aşırı derecede azalan bir ER aktivitesi, disülfür bağı oluşumu için elverişsizdir, fakat aşırı oksitleyici bir ER, yanlış katlanmış proteinlerin yakalanmasına neden olabilir (Braakman ve Bulleid, 2011). Kaslar gibi bazı özel hücrelerde ve dokularda, “kalsiyum depolaması”, ER'nin hücreyi kapsayan yapısı ile organelin ana faaliyetini temsil eder. (Altshuler ve ark., 2012).

Korunmuş kalsiyum, elektrik sinyalleri ile veya sırasıyla ryanodin ve IP3 reseptörleri gibi spesifik ER-transmembran iyon kanallarına bağlanan ikincil haberciler tarafından rahatlıkla serbest bırakılabilir. Sitosol içine salındıktan sonra, kalsiyum iyonları farklı enzimleri aktive edebilir, farklılaşma ve / veya hücre ölümü gibi spesifik hücre tepkilerine aracılık edebilir veya kas kasılması gibi spesifik aktiviteye neden olabilir. Doğru ER luminal kalsiyum konsantrasyonu, aynı zamanda bu organelin protein katlanması ve translasyon sonrası modifikasyon aktiviteleri için temel bir gerekliliktir. Çünkü şaperonlar, protein disülfid izomerazları (PDI'ler), N-glikolize etme ve diğer enzimlerin hepsi doğru oksidoredüktaz potansiyelini gerektirir (Seo ve ark., 2015).

2.3.1. ER'nin Protein Katlanması, Yanlış Katlanmış Proteinleri

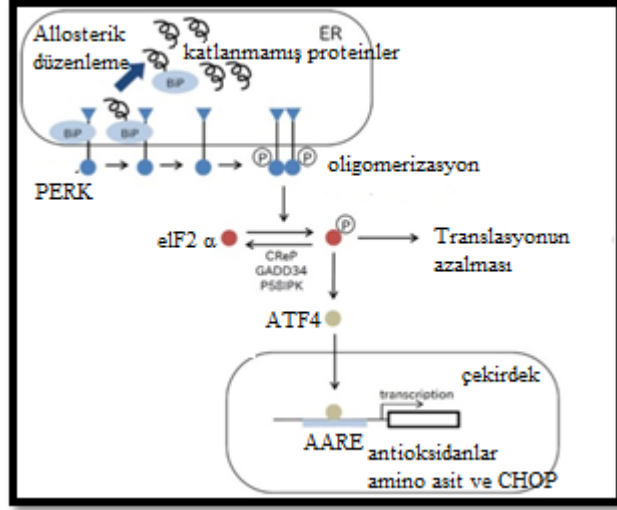
ER'de protein sentezinin ardından proteinler, glikolizasyon, disülfid bağlarının oluşturulması ve lipidasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğramaktadır. Bütün bu değişiklikler proteinin istenilen spesifik yapıya ulaşması için gereklidir (Chikuni ve ark., 1994; Cheung ve ark., 2002; Dobson, 2004). Her proteinin belirli bir amino asit dizisi ve kendine ait konformasyonel bir yapıya sahip olması gerekmektedir (Dobson, 2004). ER'de protein katlanması, çeşitli ER şaperonlarının ve enzimlerin yardımıyla gerçekleşmektedir. Moleküler şaperon BIP/GRP78 açılmamış veya tam olarak katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgesine bağlanır ve proteinlerin çevreleri ile etkileşime girmesini engeller (Haas ve Wabl, 1983). BIP/GRP78, katlanmamış proteinlerde konformasyonel değişiklikler yaratarak protein katlanmasını uyaran ATP hidroliz aktivitesine sahiptir (Hendershot ve ark., 1996). DNA-J-benzeri / HSP40 yardımcı-şaperonları, ATP hidroliz aktivitesini düzenleyerek BIP/GRP78 fonksiyonunu düzenlemektedir (Feldheim ve ark., 1992).

2.3.2 ER Stres ve Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)

Hücreler fizyolojik koşullara uyum sağlamak için ER'de fazla protein yüküne sahip olabilirler. ER'de oluşan protein yükü katlanma kapasitesini etkileyebilmektedir ve bunun sonucu olarak yanlış katlanmış proteinlerin oluşumu ve ER'de hatalı protein birikmesi görülebilmektedir, bu durum ER stresinin (ERS) oluşumuna sebep olmaktadır. ERS'nin düzeltilmesi hücre homeostazını tekrar sağlamak için katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bir sinyal yolunu aktive eder (Schroder ve Kaufman, 2005; Ron ve Walter, 2007). UPR'nin aktivasyonu için üç ayrı ERS proteini kullanılır. İnositol gerektiren protein-1 (IRE-1), aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), ER lümenine yerleşik olan bu integral membran proteinleri, katlanmamış veya yanlış katlanmış hatalı proteinlerin birikmesiyle stresin algılanmasını sağlamaktadırlar. UPR aktivasyonunun başlaması translasyonun zayıflaması, protein sentezinin yükünün azaltılması ve ER'de protein birikmesi, ER şaperonlarını ve enzimlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunun upregülasyonunu önlemek için hücrel sinyaller oluşturur. ER'deki proteinlerin katlanma kapasitesinin artırılması ve ER-İlişkili-Bozunma (ERAD) bileşenlerini

upregülasyonunu arttırmaktadır (Bonifacino ve Weissman, 1998; Tsai ve Rapoport, 2002)

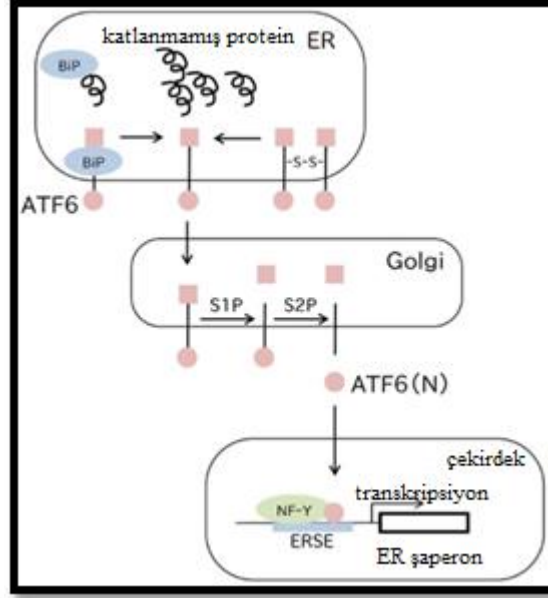
PERK, ER membranında yerleşiktir ve ER lümenindeki katlanmamış proteinlerin birikimini tespit eder. ER stresinin mevcudiyetinde, PERK, trans-otofosforilasyon ve oligomerizasyon ile aktive edilir. Aktive olmuş PERK, ökaryotik başlatma faktörü 2'nin fosforilasyonu ile alt birimi olan ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2'yi (eIF2 α) inaktive eder, bu da protein translasyonunun genel inhibisyonuna yol açar (Cui ve ark., 2011). PERK'nin luminal domaininin ER'de katlanmamış protein birikimini nasıl algıladığı anlaşılamamasına rağmen, ER şaperon, immünoglobulin ağır zincir bağlayıcı proteinin (BIP) ATPaz domain etkileşime girdiği, son zamanlarda UPR indüksiyonunun önemli bir allosterik modeli önerilmiştir. Katlanmamış bir proteinin BIP'nin kanonik substrat bağlama alanına bağlandığı zaman aktif hale gelen PERK ve IRE1'in luminal domainleri (Carrara ve ark., 2015) Salubrinal, guanabenz, ve sefin1 eIF2 α 'nın defosforilasyonunu inhibe eden hücreleri apoptosis'ten koruyan ve PERK tarafından protein translasyonunun inhibisyonu bir hücre koruyucu etkiye sahip olduğunu düşünülmektedir (Boyce ve ark., 2005; Tsaytler ve ark., 2011; Das ve ark., 2015). Bunun aksine, fosforile edilmiş eIF2 α , 5'-çevrilmemiş bölgesinde genlerin translasyonunu aktive eder, bu da transkripsiyon faktörü aktive eden transkripsiyon faktörü 4 (ATF4) gibi genlerin artan translasyonuna yol açar. ATF4, aynı zamanda, ER stresinin erken evresinde bir sitoprotektif etki sağlayan, amino asit üretimi, metabolizması ve oksidatif strese direnç gösteren genleri arttırmaktadır (Harding ve ark., 2000; Harding ve ark., 2003). Bununla birlikte, ATF4, ER stresinin daha sonraki aşamasında bir proapoptotik transkripsiyon faktörü olan C/EBP-homolog proteini (CHOP) aktive eder. CHOP, hücrelerin apoptozdan korunmasını sağlayan B hücreleri lösemi 2 (BCL2) aile üyelerinin işlevini inhibe eder ve bu nedenle hücre ölümüne yol açar.



Şekil 2.10. Perk sinyal yolu (Ariyasu ve ark., 2017)

Böylece, PERK yolunun hücresel koşullar üzerinde hem hücre koruyucu hem de apoptotik bir karşıt etkisi vardır. Günümüzde PERK'nin ER stresinde hücre kaderini belirlemede bir role sahip olduğuna inanılmaktadır (Liu ve ark., 2015). Son zamanlarda, eIF2 α -ATF4 yolunun otofajiye neden olduğu gösterilmiştir (B'Chir ve ark., 2013). PERK yolunun neden olduğu otofajinin PERK tarafından hücre kaderinin belirlenmesinde bir faktör olduğu öne sürülmüştür (Jiang ve ark., 2014) (Şekil 2.10) (Ariyasu ve ark., 2017).

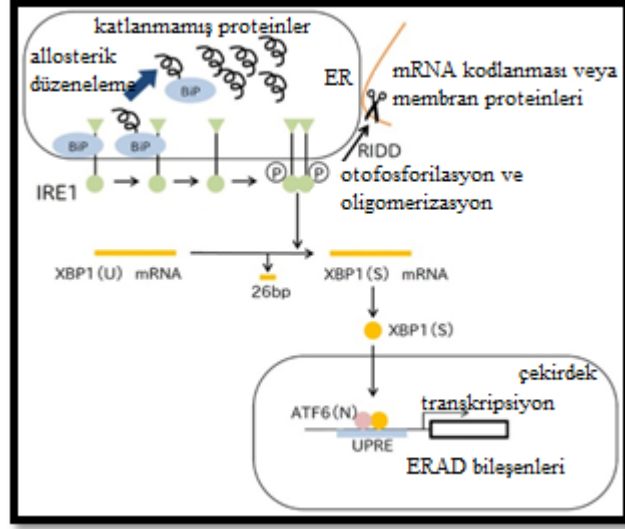
ATF6, ER membranında bulunan bir proteindir ve ER şaperonlarının ekspresyonlarını arttırmak ile görevlidir. ER'deki katlanmamış proteinleri algılar ve golgiye giderek burada Site-1 ve Site-2 proteazları ile parçalanır. Bu zamana kadar belirlenmiş, ATF6'nın stres algılama mekanizmaları için iki çalışma modeli vardır. İlk model, ER stresinden sonra ATF6'dan gelen BIP ayrışmasının, ATF6'nın Golgi yerleşim sinyalini açığa çıkarmasıdır ki bu, ATF6'nın Golgi'ye taşınmasını sağlamaktadır (Chen ve ark., 2002; Shen ve ark., 2005; Schindler ve Schekman, 2009). İkinci model, ATF6'nın lümen bölgelerinin ER'de normal koşullar altında moleküller arası disülfid bağları ile dimer veya oligomerleri oluşturmasıdır. ER stresine yanıt olarak, ATF6'nın disülfid bağları kopar ve sonuçta meydana gelen monomerik ATF6 Golgi'ye geçer (Nadanaka ve ark., 2007; Sato ve ark., 2011).



Şekil 2.11. ATF6 Sinyal Yolu (Ariyasu ve ark., 2017)

RIP tarafından Golgi membranından salınan ATF6'nın (N) N-terminal bZip domeyni, çekirdeğe girer ve genlerin ekspresyonunu, ERS cevap elementi (ERSE) aracılığıyla artırır (Yoshida ve ark., 1998). ATF6(N)'nin hedef genlerinin çoğu, ER şaperon genleri ve katlanan enzim genleri dahil olmak üzere ER kalite kontrolüne dahil edilir (Yamamoto ve ark., 2007; Y. Adachi ve ark., 2008; Bommasamy ve ark., 2009; Belmont ve ark., 2010) (Şekil 2.11) (Ariyasu ve ark., 2017).

IRE1, tüm ökaryotlarda ortologlara sahip ER membranındaki üçüncü proteindir (Mori, 2009). IRE1'in luminal bölgesi PERK'e benzerdir ve katlanmamış proteinlerin saptanmasında rol oynar. Oysa sitoplazmik domain bir kinaz alanı ve bir ribonükleaz (RNaz) alanı içerir (Yoshida, 2007). ER stresinin varlığında, IRE1 trans-otofosforilasyon ve oligomerizasyon ile aktive edilir (Kimata ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda, IRE1'in aktivasyonunun sadece BIP ayrışmasıyla değil, aynı zamanda açılmamış proteinlere bağlanarak da etkilendiğini göstermektedir (Gardner ve Walter, 2011).



Şekil 2.12. IRE1 Sinyal Yolu (Ariyasu ve ark., 2017)

Aktive edilmiş IRE1, XBP1 pre-mRNA'sını [XBP1 (U) mRNA], alışılmadık bir ekleme reaksiyonu ile olgun XBP1 mRNA'ya [XBP1 (S) mRNA] dönüştürür. XBP1 (U) mRNA, farklı okuma çerçevelerinde DNA bağlama alanına ve transkripsiyonel aktivasyon alanına sahiptir. XBP1 (U) mRNA'nın alışılmamış birleştirilmesi, aynı okuma çerçevesinde her iki alana sahip olan aktif XBP1 (S) 'nin translasyonu ile sonuçlanan bir 26-nükleotid intronu ortadan kaldırır. XBP1 (S) proteini, çekirdeğe geçiş yapar ve ATF6(N) ile bir heterodimer oluşturarak ERAD'de rol oynayan genlerin ekspresyonunu arttırmak için açılmamış protein tepki elementine (UPRE) bağlanır (Yoshida ve ark., 2001). IRE1, birleştirme için XBP1 (U) mRNA'nın özgül kök-halkalır RNA yapısını tanıır. XBP1 (U) mRNA, yeni XBP1 (U) polipeptit zinciri ve ER membranındaki XBP1 (U) mRNA'yı harekete geçiren ve stabilize eden bir ribozom ile bir kompleks oluşturur ve bu sayede IRE1 ile verimli bir şekilde birleşme sağlar (Yanagitani ve ark., 2009). XBP1 (U) mRNA'nın translasyonel olarak duraklatılması, ER membranına etkili hedefleme ve IRE1 tarafından XBP1 (U) mRNA'nın birleştirilmesi için gerekli olan karboksil uçtaki evrimsel olarak korunan peptid modülü tarafından sağlanır (Yanagitani ve ark., 2011). Ek olarak, XBP1 protein seviyesinde düzenlenir. Örneğin, XBP1 (U) proteini, XBP1 (S) proteini ile bir kompleks oluşturur ve stres olmayan koşullar altında hızlı proteazom bozulmasına uğrar ve bu da ER stresinin geri kazanım aşamasında XBP1 (S) 'nin hedef genlerinin transkripsiyonunu durdurur

(Yoshida ve ark., 2006). Küçük ubikitin benzeri modifiye edici (SUMO) konjugaz ubikuitin-konjuge enzim 9'un (UBC9) spesifik olarak XBP1 (S) 'ye bağlandığı ve stabilitesini arttırdığı da bildirilmiştir (Uemura ve ark., 2013).

IRE1 RNaz aktivitesi, ER'nin protein yükünü hafifletmek olan, sekresyon veya membran proteinlerini kodlayan ER ile ilişkili mRNA'ları seçici olarak indirgeyen RIDD (düzenlenmiş IRE1'e bağlı mRNA bozunumu) olarak adlandırılan bir mekanizmaya dahil edilir (Hollien ve Weissman, 2006; Hollien ve ark., 2009). ER işlevini koruyan ER şaperonlarını kodlayan mRNA'lar, bilinmeyen bir mekanizma tarafından RIDD'den kaçınır. IRE1'in RIDD hedeflerini nasıl tanımladığı açık değildir. IRE1 mRNA yarıma bölgelerinin ortak dizisi, RNA kök döngü yapısında CUGCAG'dır (Oikawa ve ark., 2010). Bununla birlikte, bazı memeli RIDD hedef genleri bu ortak dizisine sahip değildir. XBP1 mRNA ekleme, özellikle ER stresinin uyarlanabilir fazı sırasında geçici olarak aktive edilir. Aksine, RIDD'nin ER stres yoğunluğu ve / veya süresi ile gelişen ve sonuçta hücre ölümüne yol açan yapısal olarak aktif bir mekanizma olduğuna inanılmaktadır (Hetz, 2012; Upton ve ark., 2012; M. Maurel ve ark., 2014) (Şekil 2.12) (Ariyasu ve ark., 2017).

Son zamanlarda, ER membran permeabilizasyonu ve hücre ölümünü önleyen IRE1'in yeni bir özelliği bildirilmiştir. ER luminal proteinlerin sızıntısı ERAD nedeniyle değildir ve ER membran proteinleri bu mekanizmadan kaçır. Bu mekanizma IRE1 kinaz alanı ve jun N-terminal kinaz (JNK) yolu (aşağıda tarif edilmiştir) aracılığıyla uygulanır (Kanekura ve ark., 2015).

Açıklanan üç ana yol geçici olarak düzenlenmiştir. ER stresinden sonra, PERK ile protein translasyonunun inhibisyonu, üçü arasında tetiklenen ilk süreçtir çünkü eIF2 α 'nın fosforilasyonu gereklidir. Bununla birlikte, bu adım geçicidir ve hücreler sürekli ER stresine uyum sağlamalıdır. Bu nedenle, ATF6 tarafından ER şaperonlarının indüklenmesi daha sonra gerçekleşir çünkü ATF6'nın RIP ile bölünmesi, ayrılan ATF6'nın (N) çekirdeğe translokasyonu ve ER şaperonların üretilmesi için ATF6'nın Golgi'ye translokasyonu zaman alır. ER şaperonlar, eIF2 α 'nın defosforilasyonu ve PERK yolunun inaktivasyonundan sonra etkili bir şekilde çevrilir. IRE1-XBP1 yolağı en son aktive edilir çünkü hücrelerin XBP1 (U) mRNA'yı eklediğini, XBP1 (S) proteini

üretmesini ve XBP1 (S) 'nin ERAD'de yer alan genlerin ifadesini arttırmak için nükleusa translokasyonunu gerektirir. Ancak, açılmamış proteinler olduğu sürece işlevsel olarak sürdürülebilir olan *XBP1* geni ER'de mevcuttur (Yoshida ve ark., 2003). IRE1-XBP1 yolağı, IRE1-XBP1 yolağı tarafından uyarılan ERAD, ATF6 yolağı tarafından tetiklenen ER şaperonları tarafından yeniden katlanamayan katlanmamış proteinleri bozabildiğinden daha fazla sitoprotektif olarak etki eder.

Bu üç yol birbirine bağımlıdır; örneğin ATF6; CHOP geninin promotörüne yerleşen ERSE bağlanır ve IRE1'in alt yolağında yer alan XBP1 genine bağlanır. (Yoshida ve ark., 2001; Oyadomari ve Mori, 2004). Ayrıca PERK'in alt yolağını aktive eden ATF4, IRE1-XBP1 sinyalini aktive ettiği gösterilmiştir. (Tsuru ve ark., 2016).

2.4. ERS ve Apoptoz

ER stresinin açılmamış protein tepkisi ile hafifletilmediğinde, memeli hücreleri apoptotik yolları uyarır. Apoptoza neden olan üç iyi tanımlanmış yolak aşağıda açıklanmıştır. CHOP, ER stresi tarafından indüklenen bir transkripsiyon faktörüdür. ATF4 ve ATF6 (N) ifadesini geliştirmek için sırasıyla amino asit tepki elementine (AARE) ve memeli CHOP geninin promotöründeki ERSE'ye bağlanırlar (Yoshida ve ark., 2000; Oyadomari ve Mori, 2004; Hirsch ve ark., 2014). CHOP, ölüm reseptörü 5 (DR5), büyüme durması ve DNA hasarı 34 (GADD34) ve ER oksidoredüksiyon (ERO1) gibi proapoptotik faktörlerin ekspresyonunu indükler (Frandsen ve Kaiser, 1998; Yamaguchi ve Wang, 2004).

Aktive IRE1, JNK'yi fosforlayan ve apoptoza yol açan tümör nekroz faktörü reseptör-ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) ile bir kompleks oluşturur. IRE1 nakavt hücreleri veya ASK1 nakavt hücreleri JNK aktivasyonuna ve ER stresine göre apoptozise dirençli iken, TRAF2 nakavt hücreleri ER stresine daha yatkındır, bu da IRE1 – TRAF2 – ASK1 kompleksinin apoptozisi indüklediği fikri ile tutarlı değildir (Urano ve ark., 2000; Nishitoh ve ark., 2002; Mauro ve ark., 2006)

Kaspazlar, ER stresine özgü apoptotik yolak bileşenleri olarak iyi tanımlanırlar. Kaspaz-12 insanlarda kemirgenler ve kaspaz-4, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aracılı apoptotik yolları aktive eder. Casp12 KO fareleri, ER stresine bağlı apoptoza dirençlidir, fakat diğer

apoptotik sinyallere duyarlıdır (Nakagawa ve Yuan, 2000; Nakagawa ve ark., 2000; Hitomi ve ark., 2004; Binet ve ark., 2010; Martinez ve ark., 2010).

2.5. Retina Dejenerasyonu ERS

Retina, nöronların (fotoreseptörler, interneuronlar ve ganglion hücreleri), glia ve astrositlerin ve kan damarlarının oldukça organize bir yapıdan oluşan ve gözün arka kutbunu kaplayan çok ince tabakalı nöral bir dokudur. Retinal nöronların geri dönüşümsüz hasarı, retina disfonksiyonuna, dejenerasyona ve hücre ölümüne neden olarak, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon (AMD), retinitis pigmentosa (RP), retina dekolmanı ve glomkom gibi akut veya kronik görme fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Diyabetik retinopatide (DR) retina ödemi ve iskemi ile sonuçlanan retinal vasküler hücrelerin hasarlanması da retinada nöron ölümüne ve körlüğe neden olabilmektedir. Son birkaç yılda yapılan araştırmalarda, retinal dejenerasyona neden olan anahtar patofizyolojik olayların altında yatan mekanizmalar açıklanmaya çalışılmaktadır. ER stresinin retinada nöronal hücre hasarında rol oynadığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır ve ulaşılan sonuçlara göre, ER stresinin inhibisyonunun retinal hastalıkların tedavisinde yeni ve etkili bir tedavi yaklaşımı sağlayabileceğini göstermişlerdir (Inokuchi ve ark., 2009; Li ve ark., 2009; Gorbatyuk ve ark., 2010; T. Adachi ve ark., 2011; Li ve ark., 2011; Zhong, Li, ve ark., 2012; Zhong, Wang, ve ark., 2012).

Protein homeostazı, hücresel fonksiyon için kritiktir ve proteinlerin sentezi sıkı bir şekilde kontrol edilir (Sin ve Nollen, 2015). Protein sentezi (protein katlanması ve protein taşınımı dahil), bozulma oranına uygun olmalıdır (Alvarez-Castelao ve ark., 2012; Tanaka ve Matsuda, 2014). Sağlıklı bir proteom, her proteinin fonksiyonel olarak katlanmasını veya birleştirilmesini sağlayan bir dizi kompleks gözetim sistemi ile korunur (Jing ve ark., 2012). Hücreler, ubikuitin-proteazom sistemi (UPS) (Crippa ve ark., 2016) ER ile ilişkili protein yıkımı (ERAD) (Schuldt, 2014) ve katlanmamış protein tepkisi (UPR) (Appenzeller-Herzog ve Hall, 2012) gibi yanlış katlanmış proteinlerle baş etmek için birçok mekanizma geliştirmiştir.]. Bu proteostasis ağları, doğru şekilde katlanmış proteinlerin korunmasında ve yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar.

Endoplazmik retikulum (ER), protein katlama, post-translasyonel modifikasyon ve transport gibi yeni sentezlenen proteinlerin kalite kontrolünden sorumludur, bu nedenle hücrel proteostazın kilit bir bileşenidir. ER, ribozoma bağlı “granüllü” ER ve ribozomsuz “granülsüz” ER olarak sınıflandırılmıştır. Belirtildiği gibi, düz ER, füzyon ve kesecik tomurcuğunun gerçekleştiği ribozomsuz alanları içerirken, kaba ER uygun protein katlanması ve modifikasyonunun işlevlerini yerine getirmektedir. Yeni sentezlenmiş, katlanmamış proteinler başlangıçta ribozomlardan üretilir ve daha sonra bu polipeptit zincirlerinin uygun şekilde katlandığı ve oligomerize edildiği, disülfid bağlarının oluştuğu ER'nin sisternal alanının içine taşınır. N- bağlı oligosakkaritler, bir glikoprotein için eklenir. Katlama ve translasyon sonrası modifikasyondan sonra olgun proteinler ER şaperonlardan ayrılır ve Golgi aparatına taşınır (Shibata ve ark., 2006; Deldicque, 2013; Hiramatsu ve ark., 2015).

Hücrel protein katlama kapasitesi, intraselüler sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla ER'de sıkı bir şekilde düzenlenir (Muoio ve Newgard, 2004). Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi ER homeostazında bir dengesizliğe neden olduğunda, ER stresine yol açar ve bu da UPR'nin aktivasyonuna (katlanmamış protein tepkisi) neden olur (Kim ve ark., 2008; Perri ve ark., 2015). UPR, protein katlanmasını teşvik eder ve ER içindeki proteinlerin yükünü azaltmak için protein translasyonunu bastırır ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını desteklemek için otofaji ve ERAD'ı artırır (Kim ve ark., 2008).

Retinal hücrelerden görsel bilgi üretimi, rodopsin (Rh) gibi fonksiyonel proteinlere bağlıdır (Chabre ve le Maire, 2005). Yapılan araştırmalarda, T17M Rh'nin çubuk fotoreseptörlerdeki ekspresyonunun, ER stresine bağlı UPR sinyalleşmesinin aktivasyonunu indüklediğini ve bunun ciddi retinal dejenerasyona neden olduğunu bildirilmiştir. ATF4 nakavt, retina dejenerasyonunu bloke ettiği ve bir aylık T17M farelerinde fotoreseptör sağ kalımını desteklediği belirtilmiştir (Bhootada ve ark., 2016). Fotoreseptörler içindeki baskın protein olarak Rh'deki mutasyonlar, kalıtsal RP'nin en yaygın nedenidir (Daiger ve ark., 2007).

2.6. Neuregulin-1 (NRG-1)

Neuregulin-1 (NRG-1), kardiyovasküler endotel hücreleri tarafından salgılanan stres aracılı bir büyüme faktörüdür. Miyokardiyal hücrelerde koruma sağlar, ancak altta yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. NRG-1'in endoplazmik retikulum (ER) stresini düzenleyerek oksidatif hasara maruz kalmış miyokardiyal hücreleri koruduğu gösterilmiştir. NRG-1'in CHOP ve GRP78 protein seviyelerini düşürerek ER stresini hafiflettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, NRG-1'in ER stresi için umut verici bir ajan olduğunu öne sürülmüştür (M. Xu ve ark., 2014).

Neuregulinler (NRG), gelişim ve hastalık sırasında hücre-hücre iletişimde yer alan geniş bir EGF benzeri sinyal molekül ailesini içermektedir. Neuregulin ligand ailesinin dört üyesi vardır: NRG1, NRG2, NRG3 ve NRG4. NRG2, 3 ve 4 proteinlerinin biyolojik fonksiyonları hakkında az şey bilinmektedir. Buna karşılık, NRG1 proteinlerinin sinir sistemi, kalp ve meme bezlerinin gelişimi sırasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Britsch, 2007).

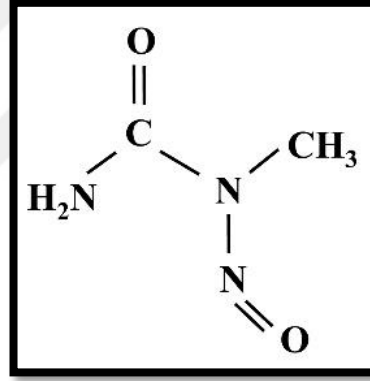
Yapılan çalışmalar sonucunda, kültürlenmiş Schwann hücrelerinin serum varlığında zayıf bir büyüme gösterdiği, ancak NRG1 varlığında aktif olarak çoğaldığı bildirilmiştir (Birchmeier ve Nave, 2008). NRG1, aynı zamanda ErbB reseptörlerini arttırarak, ras/MAPkinaz, PI3kinaz/Akt ve FAK aktivasyonlarını sağlamaktadır (P. Maurel ve Salzer, 2000).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen 54 adet 30 günlük Balb/C ırkı erkek fare kullanıldı.

3.1. Retina Dejenerasyonu Oluşturulmuş Fare Modeli

N-metil-N-nitrosourea (MNU), nitrozamin nitroz bileşiklerine ait güçlü bir alkilleyici ajandır ve yüksek seçicilik ve tekrarlanabilirlik ile fotoreseptör hücre apoptozunu indükleyebilir. MNU retinitis pigmentosa hayvan modellerini oluşturmak için kullanılmaktadır (Yoshizawa ve ark., 1999; Tsubura ve ark., 2010) (Şekil-3.1) (Tsubura ve ark., 2011).



Şekil-3.1. N-metil-N-nitroz (MNU) kimyasal yapısı (Tsubura ve ark., 2011)

3.2. Gruplar

Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu:

1. **Kontrol grubu;** herhangi bir uygulama yapılmayan grup (n=9).
2. **Çözgen grubu;** ilaçların çözüldüğü PBS enjeksiyonu yapılan grup (n=9).
3. **MNU grubu;** retina dejenerasyonu oluşturulmuş grup (n=9).
4. **Neurogulin-1 grubu;** sadece NRG-1 ile tedavi uygulanan grup (n=9).
5. **Tedavi grubu;** retina dejenerasyonu oluşturulduktan sonra NRG-1 tedavisi uygulanan grup (n=9).
6. **Önleyici tedavi grubu;** retina dejenerasyonu oluşturulduğu gün NRG-1 tedavisi uygulanan grup (n=9).

Tablo 3.1: Deney gruplarının enjeksiyon çizelgesi

Gruplar/ Günler	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün	7. Gün
Kontrol grubu	X	X	X	X	X	X	X
Çözgen grubu	PBS enjeksiyonu	PBS enjeksiyonu	PBS enjeksiyonu	PBS enjeksiyonu	PBS enjeksiyonu	PBS enjeksiyonu	PBS enjeksiyonu
MNU grubu	MNU enjeksiyonu	X	X	X	X	X	X
NRG-1 grubu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu
Tedavi grubu	MNU enjeksiyonu	X	X	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu
Önleyici tedavi grubu	MNU-NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu	NRG-1 enjeksiyonu

- Kontrol grubuna; herhangi bir enjeksiyon yapılmadı.
- Çözgen grubuna; ilaçların çözgen maddesi olan PBS 7 gün boyunca intraperitoneal olarak enjeksiyonu yapıldı.
- Neuregulin-1 grubuna, 7 gün boyunca 0.6 mg/kg/gün Neuregulin-1 intraperitoneal enjeksiyonu yapıldı.
- MNU grubuna, ilk gün tek doz 60 mg/kg intraperitoneal enjeksiyonu yapıldı.
- Tedavi grubuna; ilk gün MNU 60 mg/kg intraperitoneal enjeksiyon yapıldı. 4. günden itibaren 3 gün 0.6 mg/kg/gün dozda intraperitoneal olarak Neuregulin-1 enjeksiyonu yapıldı.
- Önleyici tedavi grubuna, ilk gün MNU 60 mg/kg dozda intraperitoneal olarak enjeksiyon yapıldı. Neuregulin-1 aynı gün başlanılarak 0.6 mg/kg/gün dozda 7 gün boyunca intraperitoneal olarak enjeksiyonu yapıldı.

Çalışmanın grupları yukarıda belirtildiği gibi oluşturuldu ve enjeksiyonlar tamamlandı. Yedi gün sonra hayvanlar ketamin (100 mg/kg; Alfasan) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg; Bayer) ile derin anestezi uygulandıktan sonra göğüs kafesi açıldı ve aortadan

distile su içinde hazırlanan fosfat tamponunda %4'lük paraformaldehit (Katalog no: 1.04005.1000- MERCK) solüsyonu verildi. Sakrifiye edilen hayvanların gözleri, aynı solüsyonda gece boyu bekletilerek postfiksasyon uygulandı. Her hayvana ait iki gözün biri (Sağ ve sol ayırmaksızın) parafin takip diğeri kriyo takip yapılmak için ayrıldı.

3.2.1. Parafin Takibi

Göz örnekleri gece boyu fiksatifte bekletildikten sonra 4 saat boyunca akan su ile yıkandı. birer gün olacak şekilde %70-80-90'lık Etanolde (Katalog no: 1.009.862.500- MERCK) muamele edildi ve 4 saat %100'lük alkolde bekletildi. Örnekler, 2 dakikalık periyotlarda 3 kez ksilol (16446-SIGMA) ile muamele edilerek şeffaflaştırma işlemi yapıldı ve ardından 3 saat 65 °C'de her saat başı parafinleri değiştirilerek parafin ile muamele edildi ve parafine gömme işlemi tamamlandı.

3.2.2. Kriyo Takip

Göz dokuları gece boyu paraformaldehit solüsyonu içinde bekletildi. Ertesi gün 4 saat akan su altında yıkandı. Yıkama işlemi ardından, %20'lik PBS (P4417-100TAB-SIGMA) sükröz (Katalog no: S011-1KG-CAISSON) içinde 2 gün bekletildi ve Kriomatrikse gömüldü.

Her iki takibin ardından parafin bloklar parafin mikrotomunda, kriyo bloklar kriyomikrotomda 5 µm kalınlıkta kesilerek lamlara alındı. Kriyo kesitler -20 °C'de saklandı.

3.2.3. Hematoksilen-Eozin Boyama

H&E boyama takibi;

- Parafin kesitler uygulama yapılacağı günden bir gece önce 45 °C'lik etüvde gece boyu bekletildi ve ardından 60 °C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Deparafinizasyon uygulaması yapıldı (ksilolde 2 kez 10'ar dakika).
- Dehidratasyon uygulaması yapıldı (%100,%90,%80,%70'lik etil alkolde 5'er dakika)
- Kesitler suda 5 dakika bekletildi.
- Hematoksilen ile 2 dakika boyama yapıldı.
- Kesitler boyamanın ardından 5 dakika akan suda yıkandı.
- Eozinde 45 saniye boyama yapıldı.

- Kesitler boyamanın ardından 5 dakika akan suda yıkandı.
 - Hızlı takip ile dokular %100 alkole alındı ve 10'ar dakika ksilolde bekletilip kapatma yapılarak dokular ışık mikroskobunda incelendi.

3.2.4. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)

Apoptoza uğrayan hücreleri tespit etmek için yapılan bir yöntemdir;

- Parafin kesitler uygulama yapılacağı günden bir gece önce 45 °C'lik etüvde gece boyu bekletildi ve ardından 60 °C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Deparafinizasyon uygulaması yapıldı (ksilolde, 2 kez 10'ar dakika).
- Dehidratasyon uygulaması yapıldı (%100,%90,%80,%70'lik etil alkolde 5'er dakika)
- Kesitler suda 5 dakika bekletildikten sonra TUNEL işlemine hazır hale getirildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika bekletildi.
- Permeabilizasyon solüsyonunda 8 dakika +4 °C'de inkübe edildi.
- TUNEL (Reagent) solüsyonunda 37 °C'de nemli ortamda 1 saat inkübe edildi.
- PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkama işlemi yapıldı.
- Dönüştürücü kesitler üzerine damlatıldı ve 30 dakika 37 °C'de nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi.
- PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkama işlemi yapıldı.
- Fast red solüsyonu ile kesitler boyandı.
- PBS solüsyonu ile 5'er dakika 2 kez yıkama yapıldı.
- Kesitler Kaisers jelatin ile kapatılarak ışık mikroskobunda görüntülendi.

3.2.5. İmmunofloresan Boyama (Chop-Grp78-CleavedCaspase3)

- Kriyo kesitler 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 5 dakika suda, 5 dakika da PBS'te (Fosfat tampon salin, ph:7,2-7,4) bekletildi.
- Ortaya çıkabilecek özgül olmayan reaksiyonların bloklanması için %5'lik BSA solüsyonu içerisinde %2'lik keçi Serum ile hazırlanan bloklama solüsyonu ile kesitler 45 dakika muamele edildi.

- Bu işlem sonrasında herhangi bir yıkama basamağı yapılmadan kesitler, pozitif gruplara önerilen oranda seyreltilmiş primer antikolar ve negatif gruplara ise aynı oranda PBS damlatılarak +4 °C'deki buzdolabında gece boyu inkübe edildi.
- Ertesi sabah 3 kez 5'er dakika PBS'de yıkanan kesitler 1/400 dilüsyonda sekonder antikorda oda ısısında 1 saat inkübe edildi (Sekonder antikor aşaması ve daha sonra yapılacak olan aşamalar karanlık ortamda yapıldı.).
- Kesitler 3x5 dakika PBS'de yıkandı.
- DAPI ile kapatıldı ve floresan mikroskop ile incelendi.

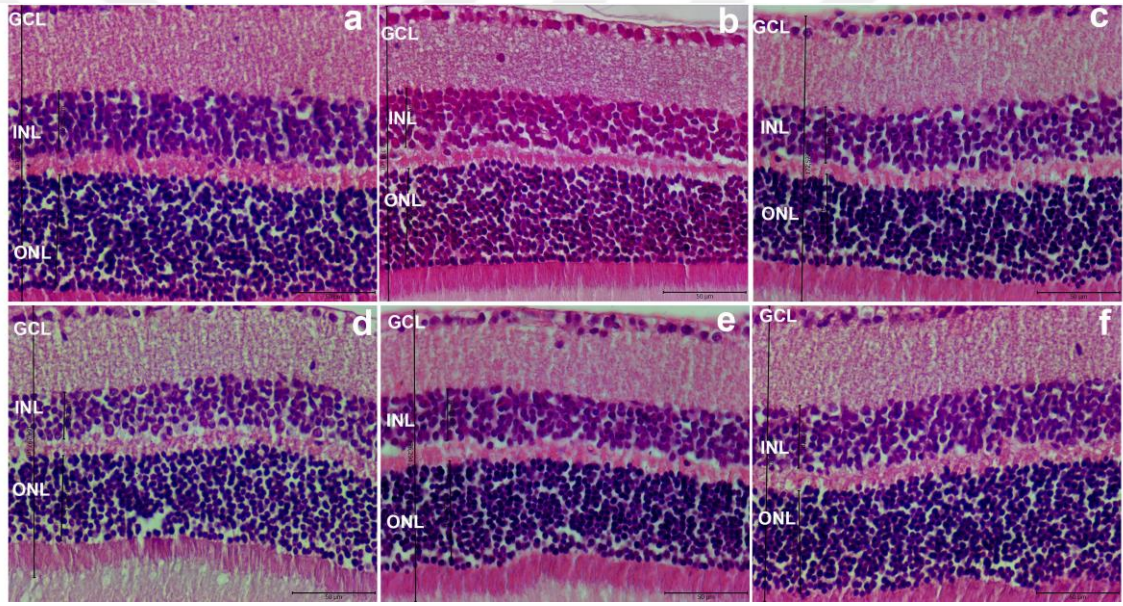
Tablo 3.2: İmmüno floresan boyanma protokolünde kullanılan antikolar.

Primer Antikor	Katalog No	Dilüsyon Oranı	Sekonder Antikor
GRP 78	3177S	1:100	CellSignaling-Alexa Flour 488- # 4412
Chop	SC-575	1:50	CellSignaling-Alexa Flour 488- # 4412
C. Caspase 3	9661L	1:400	CellSignaling-Alexa Flour 488- # 4412

4. BULGULAR.

4.1. HE Bulgular

Deneklerden alınan göz dokuları hematoksilin eozin boyamasının ardından ışık mikroskopunda incelendi. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi kontrol gruplarına oranla, çözgen gruplarda belirgin bir fark gözlenmedi. MNU grubunda ise dış nuklear tabakada hafif bir incelme olduğu gözlemlendi. Tedavi ve önleyici tedavi gruplarında ise retina katmanlarında bir incelme gözlemlenmedi.

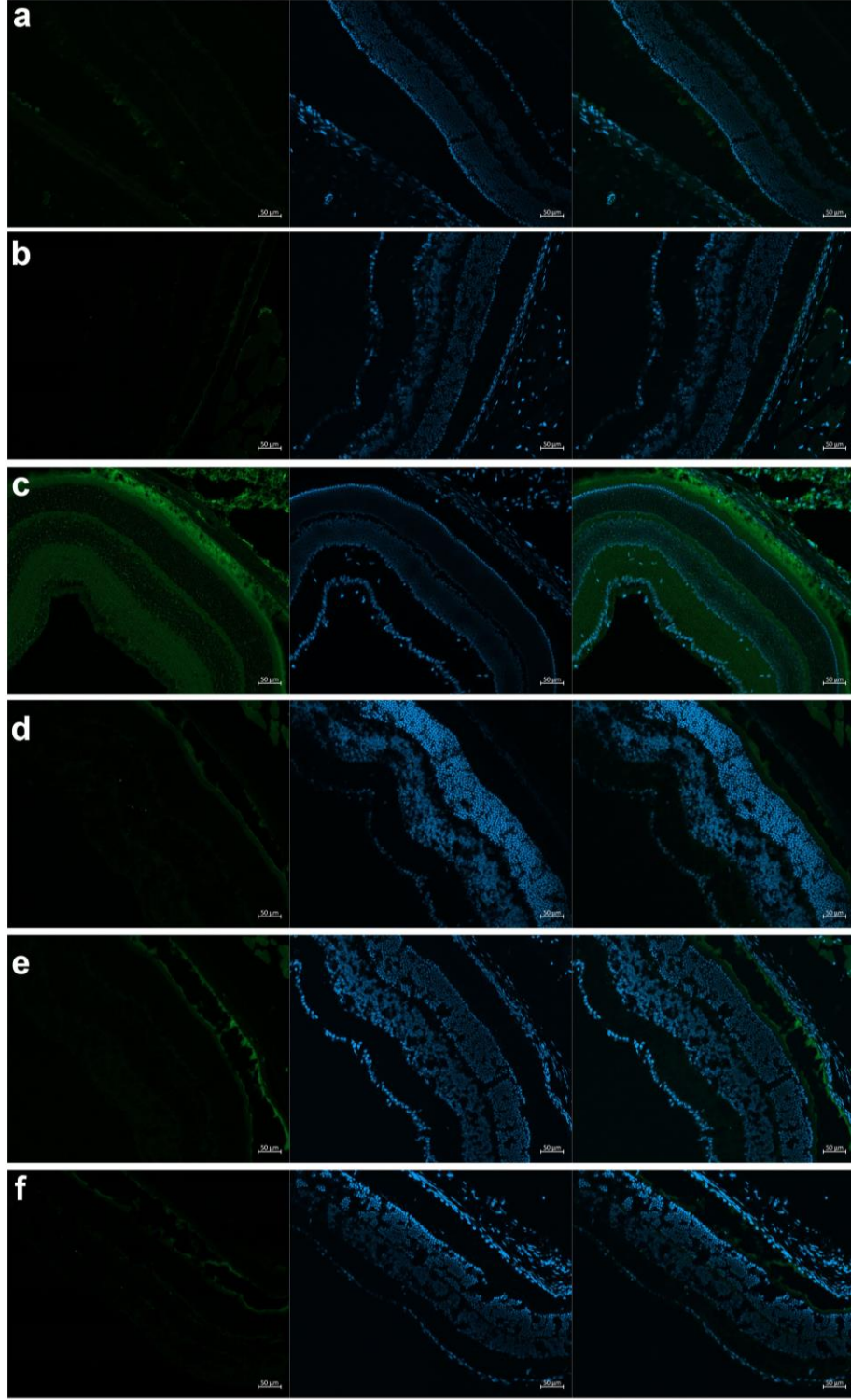


Şekil 4.1: a) Kontrol, b) MNU, c) Tedavi, d) Önleyici Tedavi, e) NRG-1, f) Çözgen Retina kesitlerinin HE boyaması (40X); ONL: Dış Nükleer tabaka, INL: İç Nükleer tabaka, GCL: Ganglion Hücre Tabakası

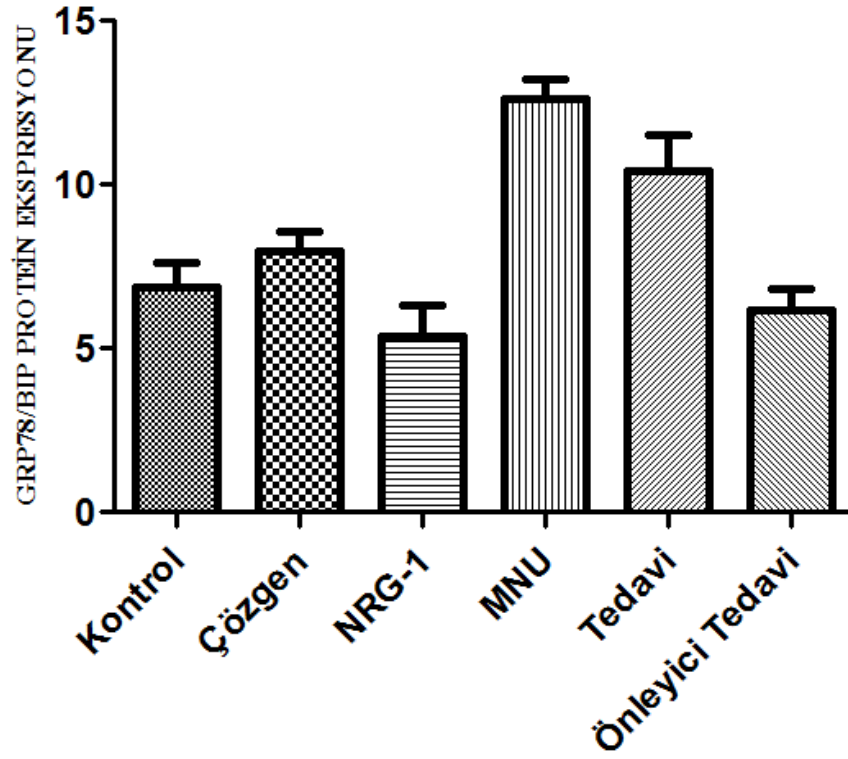
4.2. İmmunofloresans Bulgular

4.2.1 GRP78/ BIP İmmün Boyanmaları

GRP78/BIP immün reaksiyonları tüm gruplarda belli bir düzeyde boyanma göstermiştir. Kontrol gruplarına oranla, MNU gruplarında dış nuklear tabaka, iç nuklear tabaka ve retinal pigment epitelinde GRP78 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Tedavi ve önleyici tedavi gruplarında dış nuklear tabaka, iç nuklear tabakada ve retinal pigment epitelinde ekspresyonun azaldığı gözlemlenmiştir. Total retinada yapılan Image-j analizinde önleyici tedavi ekspresyonunda anlamlı bir düşüş olmuştur. (Şekil 4.2- Şekil 4.3).



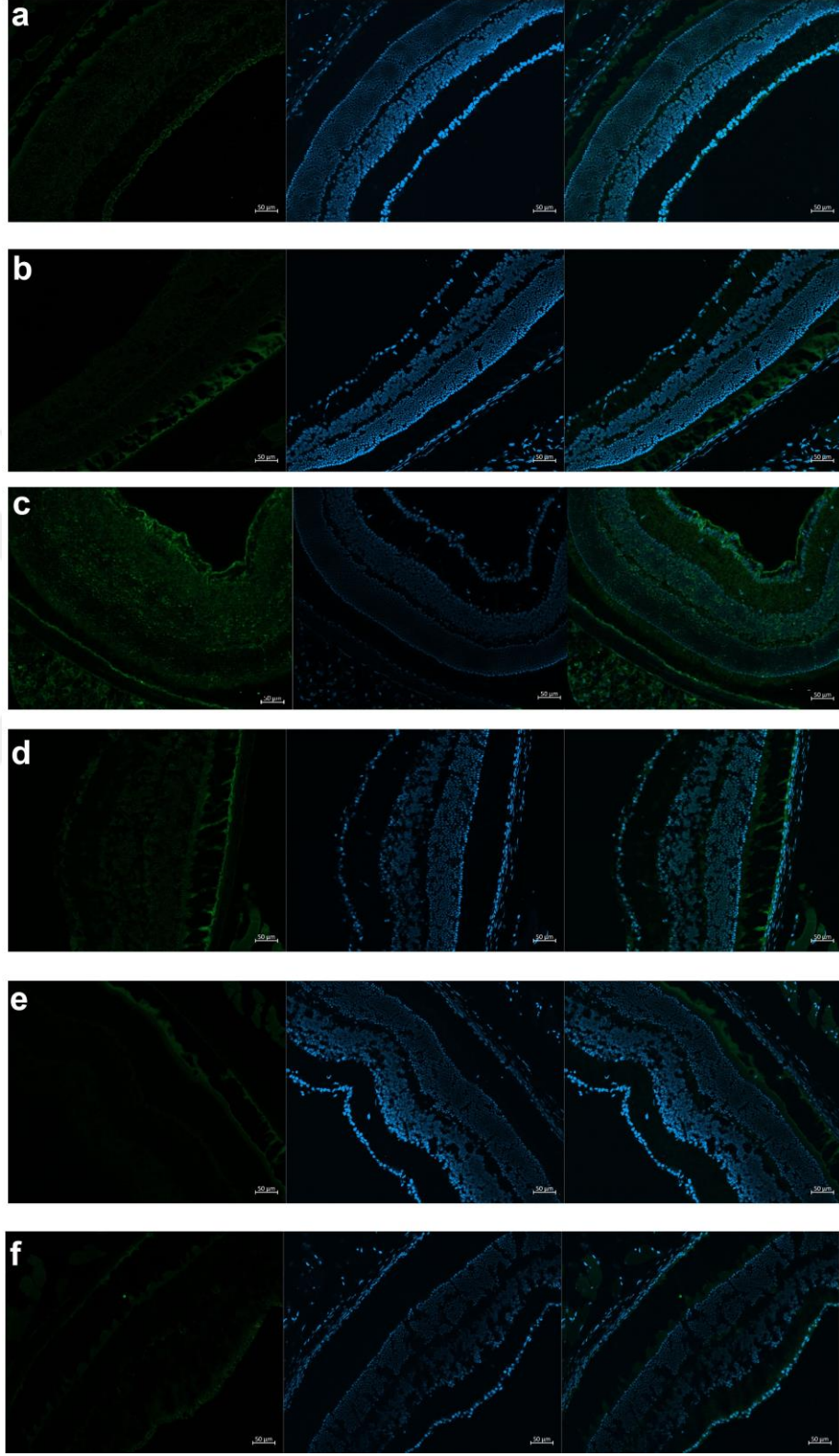
Şekil 4.2 a) Kontrol, b) Çözgen, c) MNU, d) NRG-1, e) Tedavi, f) Önleyici Tedavi gruplarından alınan retina immüno Floresan görüntüsü (20X). Yeşil floresans GRP78 ekspresyonu, Mavi floresans DAPI.



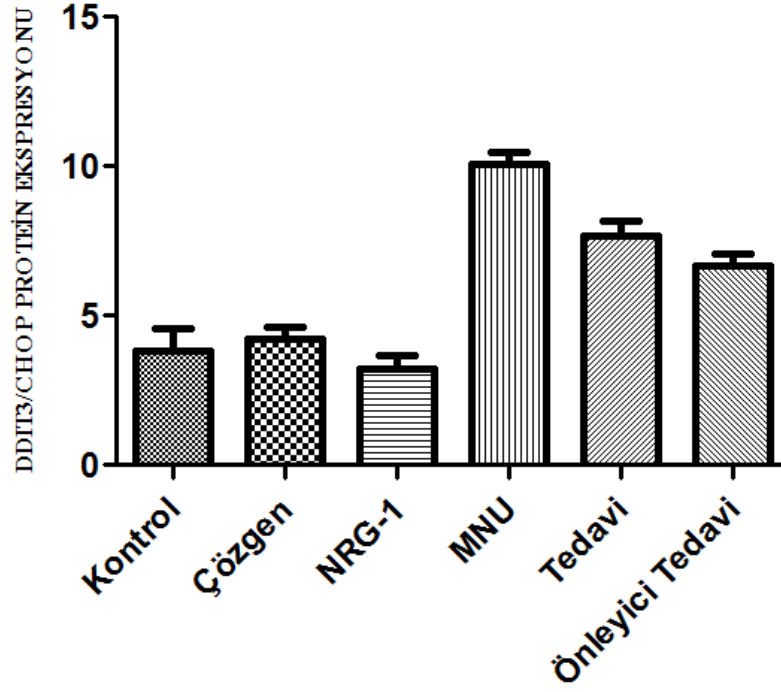
Şekil 4.3 Kontrol, Tedavi, Önleyici Tedavi, Çözgen, NRG-1 ve MNU retina örneklerinde GRP78/BİP proteininin immünofloresans boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik görülmektedir.

4.2.2. DDIT3/CHOP İmmün Boyanmaları

Deneklerden alınan göz dokularında, DDIT3/CHOP protein boyanmalarının şiddeti kontrol ve çözgen gruplarda belli bir düzeydedir. Kontrol gruplara kıyasla, MNU Gruplarının dış nükleer tabaka, iç nükleer tabakasında ve özellikle gangliyon hücre tabakası ve retinal pigment epitel tabakasında oldukça artmış ekspresyon gözlemledik. Tedavi ve önleyici tedavi gruplarında ise bu ekspresyonların azaldığını gözlemledik. Total retinada yapılan Image-J analizinde kontrol gruplara kıyasla MNU gruplarında anlamlı bir artış görüldü, önleyici tedavi grubunda ise MNU gurplarına kıyasla anlamlı bir düşüş görüldü. MNU gruplarına kıyasla tedavi grubunda bir düşüş olduğu fakat anlamlı olmadığı görüldü. ($P < 0,05$)(Şekil 4.4- Şekil 4.5).



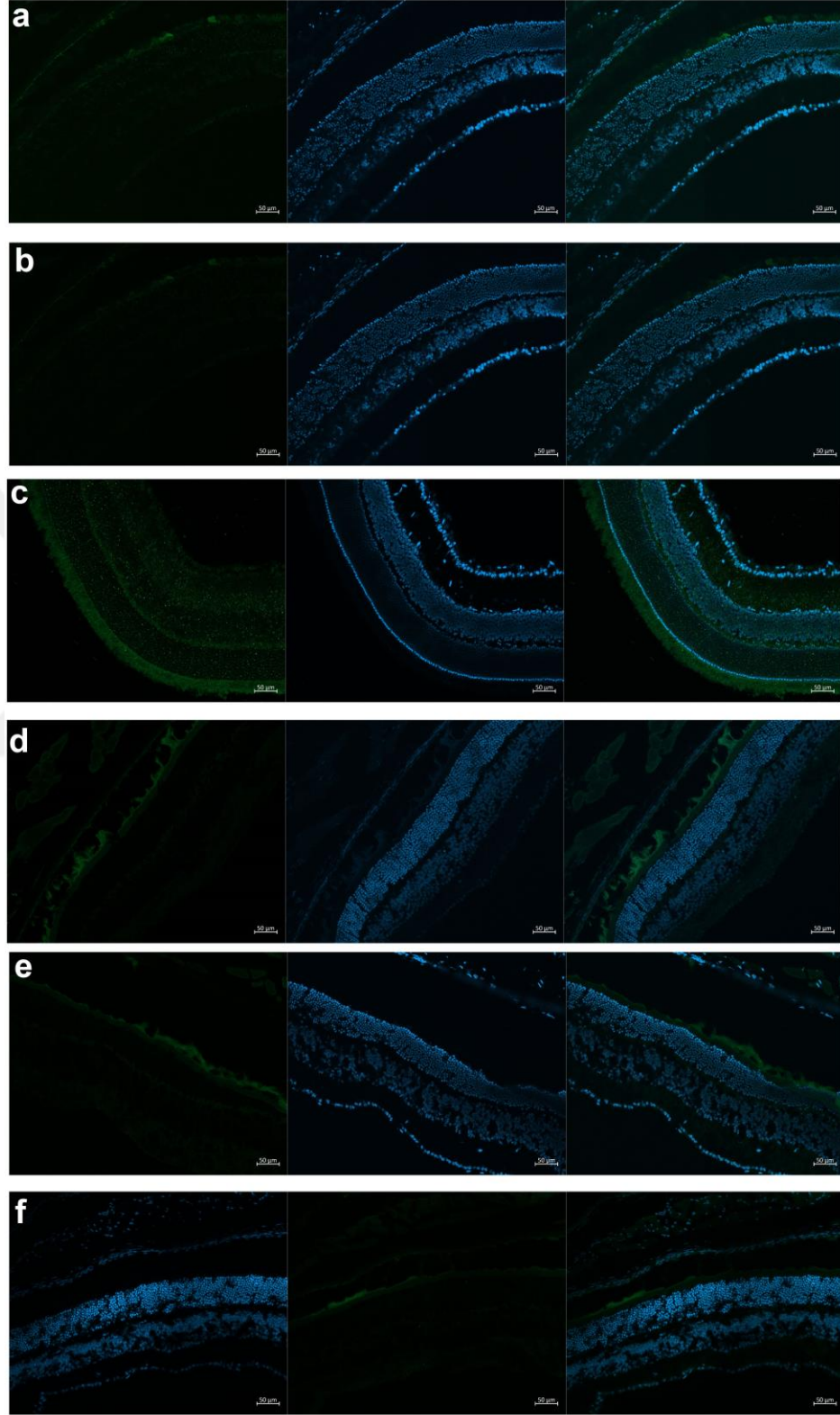
Şekil 4.4 a) Kontrol, b) Çözgen, c) MNU, d) NRG-1, e) Tedavi, f) Önleyici Tedavi gruplarından alınan retina immüno Floresan görüntüsü (20X). Yeşil Floresan GADD ekspresyonu, Mavi Floresan DAPI.



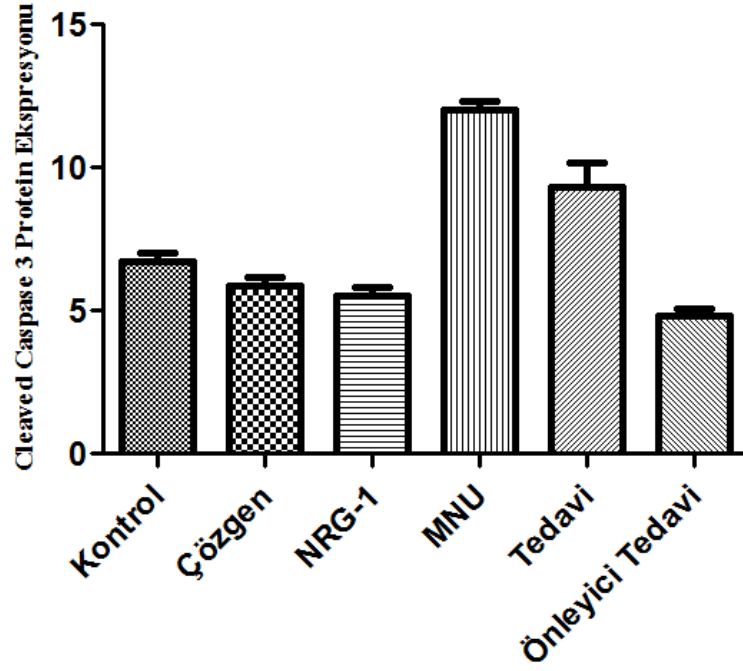
Şekil 4.5 Kontrol, Tedavi, Önleyici Tedavi, Sham, NRG-1 ve MNU retina örneklerinde DDIT3/CHOP proteininin immünfloresan boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik görülmektedir.

4.2.3. Cleaved Caspase 3 İmmün Boyanmaları

Gruplardan alınan göz örneklerinde Cleaved Caspase 3 reaksiyonları incelendiğinde MNU Gruplarında kontrol gruplarına göre iç nükleer tabaka ve dış nükleer tabakada artmış ekspresyon gözlemledik. Önleyici tedavi gruplarında bu ekspresyonların azaldığını Image-J ile yapılan analizlerde total retinada ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğunu gözlemledik. Tedavi gruplarında ise bir azalma olduğu fakat anlamlı olmadığını gösterdik. ($P < 0,05$) (Şekil 4.6-Şekil 4.6).



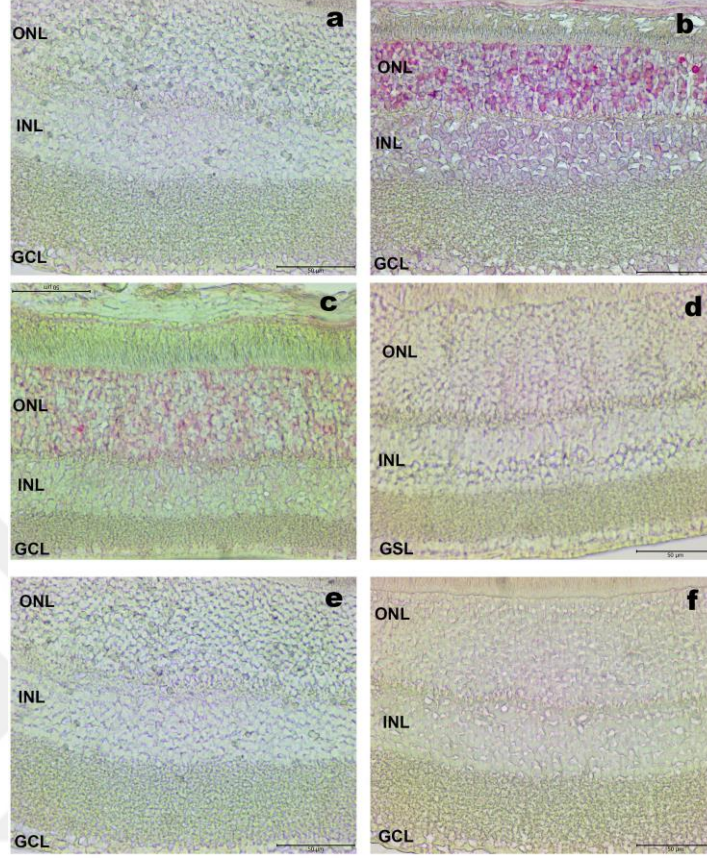
Şekil 4.6 a) Kontrol, b) Çözgen, c) MNU, d) NRG-1, e) Tedavi, f) Önleyici Tedavi gruplarından alınan Retina immünfloresan görüntüsü (20X). Yeşil floresan C. Caspase 3 ekspresyonu, Mavi floresan DAPI.



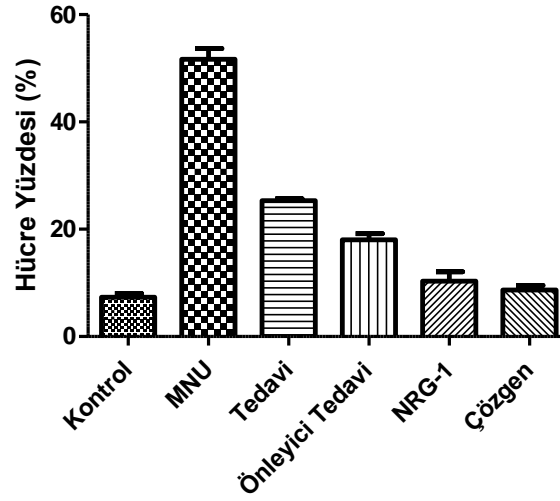
Şekil 4.7 Kontrol, Tedavi, Önleyici Tedavi, Çözgen, NRG-1 ve MNU retina örneklerinde C. Kaspas 3 proteininin immünofloresans boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik görülmektedir.

4.3. Tunel Bulguları

Kontrol ve deney gruplarının TUNEL boyanmış kesitleri, X40 büyütme kullanılarak bağımsız iki gözlemci tarafından apoptotik hücre sayımı yapıldı ve apoptotik hücre yüzdesi hesaplandı. Kontrol gruplara kıyasla MNU gruplarının iç nükleer tabakada, iç nükleer tabakada, retinal pigment epitel tabakasında TUNEL-Pozitif hücre ekspresyonlarının arttığını gözlemledik. Tedavi gruplarında hafif bir azalma olduğunu önleyici tedavi gruplarında ise belirgin bir azalma ölçünü gözlemledik. Total retinada yapılan Image-J analizlerinde önleyici tedavi gruplarında ekspresyonda anlamlı bir azalma ölçünü gösterdik. (Şekiller 4.8-4.9).



Şekil 4.8.a) Kontrol, b) MNU c) Tedavi, d) Çözgen, e) Önleyici Tedavi, f) NRG-1 Gruplarının retina örneklerinde TUNEL boyamaları (40X).



Şekil 4.9: Kontrol ve deney gruplarının TUNEL Pozitif Hücre Yüzdesi HSCORE değeri histogramı (p<0.001)

5. TARTIŞMA

N-metil-N-nitroz (MNU) retinal dejenerasyon hayvan modellerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Tsubura ve ark., 2010). Çalışmamızda RP hayvan modeli oluşturmak için, deneklere literatüre uygun bir şekilde MNU enjeksiyonu yapılmıştır. MNU'nun fare fotoreseptör hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Mordes ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda MNU uygulanan fare modellerinde retinanın dış nükleer tabakasında TUNEL-Pozitif hücrelerin arttığı gösterilmiştir (Mordes ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda bu çalışmaya uyumlu olarak MNU gruplarında iç nükleer tabakada, dış nükleer tabakada ve retinal pigment epitel tabakasında artmış TUNEL-Pozitif hücre ekspresyonu gözlemlendi.

ER, protein sentezinden, proteinlerin katlanmasından, translasyonu ve modifikasyonundan sorumlu olan, hücre içi homeostazın korunmasını sağlayan önemli bir organeldir (Walter ve Ron, 2011). Bu nedenle ERS'inin aşırı derecede artması ER lümeninde fonksiyon bozukluklarına neden olarak proteinlerin yanlış katlanmasına ve ER lümeninde birikmesine neden olabilmektedir (Cheng ve ark., 2017). ER stresinin ortaya çıkması, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına yol açabilir, bunun sonucunda Ca^{+2} gibi hücre içi iyon seviyelerinde anormal değişiklikler meydana gelmektedir (De-Qian ve ark., 2017). ERS'yi hafifletmek ve hücre içi dengeyi geri kazanmak için hücre bu strese yanıt olarak Katlanmamış Protein Cevabı (UPR) olan sinyal yolunu aktifleştirmektedir (Walter ve Ron, 2011). Bu faktörler, protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF-6) ve inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) gibi proteinlerin aktivasyonunu uyarmaktadır (Hetz ve Papa, 2018). ER'de biriken yanlış katlanmış protein miktarının artması hücre içi hasara hatta apoptoza neden olabilmektedir (Chakrabarti ve ark., 2011).

ERS ve UPR sinyal yolu, çeşitli göz hastalıklarında da bulunan patolojik bir mekanizmadır (Zode ve ark., 2011; Kroeger ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2015). Rodopsin, fotoreseptörler içindeki baskın proteindir, fotoreseptörlerin tüm proteomun ~%30'unu ve fotoreseptörlerin dış segment bölgesindeki tüm proteinlerin % 90'ından fazlasını içermektedir (Hargrave, 2001). Rodopsin sentezi ER'de meydana

gelmektedir, burada sentezlenen Rodopsin polipeptidi zar içine translasyonel olarak yerleştirilir ve asparajin kalıntılarında disülfid bağ oluşumu ve glikozilasyonu içeren çoklu post-translasyonel modifikasyonlara uğrar (Fukuda ve ark., 1979; Kaushal ve Khorana, 1994; Krebs ve ark., 2004). Düzgün bir şekilde katlandıktan sonra, rodopsin ER'den çıkar ve Golgi aparatına iletilir. Burada gerekli modifikasyonları uygular ve sonunda çubuk fotoreseptör dış segmentine iletilir (Liang ve ark., 1979). Rodopsin mutasyonu, RP'nin en sık nedenidir ve otozomal dominant RP (adRP)'nin % 25-30'unu oluşturmaktadır (Hargrave, 2001). Rodopsin yanlış katlanmasından kaynaklanan bir Drosophila retinal dejenerasyon modelinde, UPR'nin IRE1 sinyal yolunun aktivasyonu ve retina dejenerasyonun olduğu gösterilmiştir (Ryoo ve ark., 2007). ER'de yanlış katlanmış rodopsin eksprese eden deneklerde, ERS'nin arttığı ve proapoptotik UPR molekülü olan CHOP ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Lin ve ark., 2007). Çalışmamızın bulgularına göre yapılan çalışmalarla da uyumlu olarak, kontrol ve çözgen gruplara kıyasla RD oluşturulmuş fare modelinde ERS'nin arttığı ve BIP-GADD-CHOP gibi UPR sinyal moleküllerinin ekspresyonlarının retinanın iç nükleer tabakasında, dış nükleer tabakasında, ganglion hücre tabakasında ve retinal pigment epitel tabakasında arttığı immünofloresan yöntemi ile gösterilmiştir.

Neuregulin-1 (NRG-1), kardiyovasküler endotel hücreleri tarafından salgılanan stres aracılı bir büyüme faktörüdür ve miyokardiyal hücrelerde koruma sağlar, ancak altta yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. NRG-1'in endoplazmik retikulum (ER) stresini düzenleyerek oksidatif hasara maruz kalmış miyokardiyal hücreleri koruduğu gösterilmiştir. NRG-1'in CHOP ve GRP78 protein seviyelerini düşürerek ER stresini hafiflettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, NRG-1'in ER stresi için umut verici bir ajan olduğu öne sürülmüştür (M. Xu ve ark., 2014). Çalışmamızda bu bilgilere paralel olarak NRG-1 uygulanan deney modellerinde retinadaki ERS'nin azaldığı gözlemlenmiştir. NRG-1'in özellikler önleyici tedavi gruplarında ERS protein ekspresyonlarında düşüşe neden olduğunu ve hücre ölümünü belli oranda etkileyerek azalttığını gösterdik.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez projesinde, MNU ile indüklenmiş retinitis pigmentosa fare modeline ait göz dokularında ER stresi sonucu meydana gelen UPR yanıtlarında görev alan Grp78, Kaspaz 3 ve DDIT3/CHOP proteinlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol ve çözgen grupları ile karşılaştırılarak farklı yöntemlerle araştırılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- Tüm gruplarda yapılan HE boyanmasında; MNU gruplarında retina tabakasının kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla incelendiği görüldü.
- TUNEL boyanması sonucunda; MNU gruplarında gözlenen pozitif hücre sayısının kontrol ve çözgen deney gruplarına kıyasla daha fazla olduğu belirlendi.
- Tedavi ve Önleyici Tedavi gruplarında TUNEL pozitif hücrelerin azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı belirlendi.
- Immunofloresan yöntemi kullanılarak, Grp78, Kaspaz 3 ve DDIT3/CHOP protein ekspresyonları belirlenmiştir. MNU gruplarında kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla Grp78, Kaspaz 3 ve DDIT3/CHOP protein ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir. Tedavi ve önleyici tedavi gruplarında ise MNU gruplarına kıyasla bir düşüş olduğu gözlemlendi.
- NRG-1'in retina dejenerasyonu oluşturulmuş fare modellerinde ERS'yi ve hücre ölümünü azalttığı belirlenmiştir.
- Retina dejenerasyonu oluşturulmuş fare modelinde NRG-1'in ERS üzerindeki etkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bu sonuçların pek çok parametre ile desteklenmesi gerekmektedir.
- NRG-1'in hangi mekanizma ile ERS'yi etkilediği bilinmemektedir. Etki mekanizması pek çok yönüyle araştırılıp, ele alınması gereken bir konudur.

KAYNAKLAR

- Adachi, T., Yasuda, H., Nakamura, S., Kamiya, T., Hara, H., & Ikeda, T. Endoplasmic reticulum stress induces retinal endothelial permeability of extracellular-superoxide dismutase. *Free radical research*. 2011; 45 (9): 1083-1092.
- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., & Mori, K. Atf6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell structure and function*. 2008; 33 (1): 75-89.
- Aliancy, J. F., & Mamalis, N. (1995). Crystalline lens and cataract. In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *Webvision: The organization of the retina and visual system*. Salt Lake City (UT).
- Altshuler, I., Vaillant, J. J., Xu, S., & Cristescu, M. E. The evolutionary history of sarco(endo)plasmic calcium atpase (serca). *PloS one*. 2012; 7 (12): e52617.
- Alvarez-Castelao, B., Ruiz-Rivas, C., & Castano, J. G. A critical appraisal of quantitative studies of protein degradation in the framework of cellular proteostasis. *Biochemistry research international*. 2012; 2012: 823597.
- Amini, R., Rocha-Martins, M., & Norden, C. Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina. *Frontiers in neuroscience*. 2017; 11: 742.
- Andresen, H. M., Ragueira, H. T., & Leighton, F. [oxidative stress in critically ill patients]. *Revista medica de Chile*. 2006; 134 (5): 649-656.
- Appenzeller-Herzog, C., & Hall, M. N. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mtor signaling. *Trends in cell biology*. 2012; 22 (5): 274-282.
- Ariyasu, D., Yoshida, H., & Hasegawa, Y. Endoplasmic reticulum (er) stress and endocrine disorders. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18 (2).
- Artemyev, N. O., Arshavsky, V. Y., & Cote, R. H. Photoreceptor phosphodiesterase: Interaction of inhibitory gamma subunit and cyclic gmp with specific binding sites on catalytic subunits. *Methods*. 1998; 14 (1): 93-104.
- B'Chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., . . . Bruhat, A. The eif2alpha/atf4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*. 2013; 41 (16): 7683-7699.
- Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L., & Katsanis, N. The ciliopathies: An emerging class of human genetic disorders. *Annual review of genomics and human genetics*. 2006; 7: 125-148.
- Belmont, P. J., Chen, W. J., San Pedro, M. N., Thuerauf, D. J., Gellings Lowe, N., Gude, N., . . . Glembofski, C. C. Roles for endoplasmic reticulum-associated degradation and the novel endoplasmic reticulum stress response gene derlin-3 in the ischemic heart. *Circulation research*. 2010; 106 (2): 307-316.

Bhootada, Y., Kotla, P., Zolotukhin, S., Gorbatyuk, O., Bebok, Z., Athar, M., & Gorbatyuk, M. Limited atf4 expression in degenerating retinas with ongoing er stress promotes photoreceptor survival in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *PloS one*. 2016; 11 (5): e0154779.

Binet, F., Chiasson, S., & Girard, D. Evidence that endoplasmic reticulum (er) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 391 (1): 18-23.

Birchmeier, C., & Nave, K. A. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives schwann cell growth and differentiation. *Glia*. 2008; 56 (14): 1491-1497.

Bommiasamy, H., Back, S. H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., . . . Brewer, J. W. Atf6alpha induces xbp1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*. 2009; 122 (Pt 10): 1626-1636.

Bonifacino, J. S., & Weissman, A. M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998; 14: 19-57.

Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., . . . Yuan, J. A selective inhibitor of eif2alpha dephosphorylation protects cells from er stress. *Science*. 2005; 307 (5711): 935-939.

Braakman, I., & Bulleid, N. J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*. 2011; 80: 71-99.

Britsch, S. The neuregulin-i/erbb signaling system in development and disease. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 2007; 190: 1-65.

Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C., & Ali, M. M. Noncanonical binding of bip atpase domain to ire1 and perk is dissociated by unfolded protein ch1 to initiate er stress signaling. *eLife*. 2015; 4.

Chabre, M., & le Maire, M. Monomeric g-protein-coupled receptor as a functional unit. *Biochemistry*. 2005; 44 (27): 9395-9403.

Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and bioengineering*. 2011; 108 (12): 2777-2793.

Chen, X., Shen, J., & Prywes, R. The luminal domain of atf6 senses endoplasmic reticulum (er) stress and causes translocation of atf6 from the er to the golgi. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277 (15): 13045-13052.

Cheng, Y. C., Chen, C. A., & Chen, H. C. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death in podocytes. *Nephrology (Carlton)*. 2017; 22 Suppl 4: 43-49.

Cheung, M. S., Garcia, A. E., & Onuchic, J. N. Protein folding mediated by solvation: Water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99 (2): 685-690.

Chikuni, K., Tabata, T., Kosugiyama, M., Monma, M., & Saito, M. Polymerase chain reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat science*. 1994; 37 (3): 337-345.

- Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G., Aleman, T. S., Gu, D., Pearce-Kelling, S. E., Sumaroka, A., . . . Aguirre, G. D. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102 (14): 5233-5238.
- Crippa, V., D'Agostino, V. G., Cristofani, R., Rusmini, P., Cicardi, M. E., Messi, E., . . . Poletti, A. Transcriptional induction of the heat shock protein b8 mediates the clearance of misfolded proteins responsible for motor neuron diseases. *Scientific reports*. 2016; 6: 22827.
- Cui, W., Li, J., Ron, D., & Sha, B. The structure of the perk kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*. 2011; 67 (Pt 5): 423-428.
- Daiger, S. P., Bowne, S. J., & Sullivan, L. S. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125 (2): 151-158.
- Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., D'Antonio, M., Barry, N., . . . Bertolotti, A. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*. 2015; 348 (6231): 239-242.
- De-Qian, K., Yue, L., Li, L., & Guangying, Z. Downregulation of smac attenuates h2o2-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in human lens epithelial cells. *Medicine*. 2017; 96 (27): e7419.
- De Robertis, E., & Lasansky, A. Submicroscopic organization of retinal cones of the rabbit. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1958; 4 (6): 743-746.
- Deldicque, L. Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: Any contribution to sarcopenia? *Frontiers in physiology*. 2013; 4: 236.
- Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology*. 2004; 15 (1): 3-16.
- English, A. R., Zurek, N., & Voeltz, G. K. Peripheral er structure and function. *Current opinion in cell biology*. 2009; 21 (4): 596-602.
- Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T., & Baden, T. Retinal bipolar cells: Elementary building blocks of vision. *Nature reviews. Neuroscience*. 2014; 15 (8): 507-519.
- Feldheim, D., Rothblatt, J., & Schekman, R. Topology and functional domains of sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Molecular and cellular biology*. 1992; 12 (7): 3288-3296.
- Frand, A. R., & Kaiser, C. A. The ero1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell*. 1998; 1 (2): 161-170.
- Fukuda, M. N., Papermaster, D. S., & Hargrave, P. A. Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the nh2 terminus. *The Journal of biological chemistry*. 1979; 254 (17): 8201-8207.
- Gardner, B. M., & Walter, P. Unfolded proteins are ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*. 2011; 333 (6051): 1891-1894.

Gorbatyuk, M. S., Knox, T., LaVail, M. M., Gorbatyuk, O. S., Noorwez, S. M., Hauswirth, W. W., . . . Lewin, A. S. Restoration of visual function in p23h rhodopsin transgenic rats by gene delivery of bip/grp78. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107 (13): 5961-5966.

Graw, J. Eye development. *Current topics in developmental biology*. 2010; 90: 343-386.

Haas, I. G., & Wabl, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*. 1983; 306 (5941): 387-389.

Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular cell*. 2000; 5 (5): 897-904.

Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., . . . Ron, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*. 2003; 11 (3): 619-633.

Hargrave, P. A. Rhodopsin structure, function, and topography the friedewald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001; 42 (1): 3-9.

Hendershot, L., Wei, J., Gaut, J., Melnick, J., Aviel, S., & Argon, Y. Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative bip atpase mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93 (11): 5269-5274.

Hetz, C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under er stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2012; 13 (2): 89-102.

Hetz, C., & Papa, F. R. The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular cell*. 2018; 69 (2): 169-181.

Hiramatsu, N., Chiang, W. C., Kurt, T. D., Sigurdson, C. J., & Lin, J. H. Multiple mechanisms of unfolded protein response-induced cell death. *The American journal of pathology*. 2015; 185 (7): 1800-1808.

Hirsch, I., Weiwad, M., Prell, E., & Ferrari, D. M. Erp29 deficiency affects sensitivity to apoptosis via impairment of the atf6-chop pathway of stress response. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2014; 19 (5): 801-815.

Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., . . . Tohyama, M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and abeta-induced cell death. *The Journal of cell biology*. 2004; 165 (3): 347-356.

Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., & Weissman, J. S. Regulated ire1-dependent decay of messenger rnas in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 2009; 186 (3): 323-331.

Hollien, J., & Weissman, J. S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mrnas during the unfolded protein response. *Science*. 2006; 313 (5783): 104-107.

- Inokuchi, Y., Nakajima, Y., Shimazawa, M., Kurita, T., Kubo, M., Saito, A., . . . Hara, H. Effect of an inducer of bip, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (er) stress-induced retinal cell death. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009; 50 (1): 334-344.
- Jiang, Q., Li, F., Shi, K., Wu, P., An, J., Yang, Y., & Xu, C. Involvement of p38 in signal switching from autophagy to apoptosis via the perk/eif2alpha/atf4 axis in selenite-treated nb4 cells. *Cell death & disease*. 2014; 5: e1270.
- Jing, G., Wang, J. J., & Zhang, S. X. Er stress and apoptosis: A new mechanism for retinal cell death. *Experimental diabetes research*. 2012; 2012: 589589.
- Kanekura, K., Ma, X., Murphy, J. T., Zhu, L. J., Diwan, A., & Urano, F. Ire1 prevents endoplasmic reticulum membrane permeabilization and cell death under pathological conditions. *Science signaling*. 2015; 8 (382): ra62.
- Kaushal, S., & Khorana, H. G. Structure and function in rhodopsin. 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Biochemistry*. 1994; 33 (20): 6121-6128.
- Keeling, E., Lotery, A. J., Tumbarello, D. A., & Ratnayaka, J. A. Impaired cargo clearance in the retinal pigment epithelium (rpe) underlies irreversible blinding diseases. *Cells*. 2018; 7 (2).
- Kim, I., Xu, W., & Reed, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*. 2008; 7 (12): 1013-1030.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., . . . Kohno, K. Two regulatory steps of er-stress sensor ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of cell biology*. 2007; 179 (1): 75-86.
- Kono, M., Goletz, P. W., & Crouch, R. K. 11-cis- and all-trans-retinols can activate rod opsin: Rational design of the visual cycle. *Biochemistry*. 2008; 47 (28): 7567-7571.
- Krebs, M. P., Noorwez, S. M., Malhotra, R., & Kaushal, S. Quality control of integral membrane proteins. *Trends in biochemical sciences*. 2004; 29 (12): 648-655.
- Kroeger, H., LaVail, M. M., & Lin, J. H. Endoplasmic reticulum stress in vertebrate mutant rhodopsin models of retinal degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014; 801: 585-592.
- Lee, C. F., Griffiths, S., Rodriguez-Suarez, E., Pierce, A., Unwin, R. D., Jaworska, E., . . . Whetton, A. D. Assessment of downstream effectors of bcr/abl protein tyrosine kinase using combined proteomic approaches. *Proteomics*. 2010; 10 (18): 3321-3342.
- Li, J., Wang, J. J., Yu, Q., Wang, M., & Zhang, S. X. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS letters*. 2009; 583 (9): 1521-1527.
- Li, J., Wang, J. J., & Zhang, S. X. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress mitigates retinal endothelial inflammation via activation of x-box binding protein 1. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286 (6): 4912-4921.

- Liang, C. J., Yamashita, K., Muellenberg, C. G., Shichi, H., & Kobata, A. Structure of the carbohydrate moieties of bovine rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*. 1979; 254 (14): 6414-6418.
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., . . . Walter, P. Ire1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*. 2007; 318 (5852): 944-949.
- Liu, Z., Lv, Y., Zhao, N., Guan, G., & Wang, J. Protein kinase r-like er kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell death & disease*. 2015; 6: e1822.
- Ludwig, P. E., & Dulebohn, S. C. (2018). Anatomy, head, eye, cornea. In *Statpearls*. Treasure Island (FL).
- Martinez, J. A., Zhang, Z., Svetlov, S. I., Hayes, R. L., Wang, K. K., & Larner, S. F. Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the er stress-induced cell death pathway in differentiated pc12 cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2010; 15 (12): 1480-1493.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., & Gerlo, S. Getting ridd of rna: Ire1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences*. 2014; 39 (5): 245-254.
- Maurel, P., & Salzer, J. L. Axonal regulation of schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires pi 3-kinase activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000; 20 (12): 4635-4645.
- Mauro, C., Crescenzi, E., De Mattia, R., Pacifico, F., Mellone, S., Salzano, S., . . . Leonardi, A. Central role of the scaffold protein tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281 (5): 2631-2638.
- Metlapally, R., & Wildsoet, C. F. Scleral mechanisms underlying ocular growth and myopia. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015; 134: 241-248.
- Miyazono, S., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tachibanaki, S., & Kawamura, S. Highly efficient retinal metabolism in cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105 (41): 16051-16056.
- Molday, R. S., & Moritz, O. L. Photoreceptors at a glance. *Journal of cell science*. 2015; 128 (22): 4039-4045.
- Mordes, D., Luo, X., Kar, A., Kuo, D., Xu, L., Fushimi, K., . . . Wu, J. Y. Pre-mrna splicing and retinitis pigmentosa. *Molecular vision*. 2006; 12: 1259-1271.
- Mori, K. Signalling pathways in the unfolded protein response: Development from yeast to mammals. *Journal of biochemistry*. 2009; 146 (6): 743-750.
- Muoio, D. M., & Newgard, C. B. Biomedicine. Insulin resistance takes a trip through the er. *Science*. 2004; 306 (5695): 425-426.

- Nadanaka, S., Okada, T., Yoshida, H., & Mori, K. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of atf6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology*. 2007; 27 (3): 1027-1043.
- Nakagawa, T., & Yuan, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology*. 2000; 150 (4): 887-894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000; 403 (6765): 98-103.
- Niederhorn, J. Y. Role of nkt cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert review of clinical immunology*. 2009; 5 (2): 137-144.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., . . . Ichijo, H. Ask1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & development*. 2002; 16 (11): 1345-1355.
- O'Neal, T. B., & Luther, E. E. (2018). Retinitis pigmentosa. In *Statpearls*. Treasure Island (FL).
- Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., & Iwawaki, T. Identification of a consensus element recognized and cleaved by ire1 alpha. *Nucleic acids research*. 2010; 38 (18): 6265-6273.
- Oyadomari, S., & Mori, M. Roles of chop/gadd153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation*. 2004; 11 (4): 381-389.
- Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M., & Atkin, J. D. The unfolded protein response and the role of protein disulfide isomerase in neurodegeneration. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2015; 3: 80.
- Ron, D., & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007; 8 (7): 519-529.
- Ryoo, H. D., Domingos, P. M., Kang, M. J., & Steller, H. Unfolded protein response in a drosophila model for retinal degeneration. *The EMBO journal*. 2007; 26 (1): 242-252.
- Saari, J. C. Vitamin a metabolism in rod and cone visual cycles. *Annual review of nutrition*. 2012; 32: 125-145.
- Sanes, J. R., & Masland, R. H. The types of retinal ganglion cells: Current status and implications for neuronal classification. *Annual review of neuroscience*. 2015; 38: 221-246.
- Sato, Y., Nadanaka, S., Okada, T., Okawa, K., & Mori, K. Luminal domain of atf6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the golgi apparatus. *Cell structure and function*. 2011; 36 (1): 35-47.
- Schindler, A. J., & Schekman, R. In vitro reconstitution of er-stress induced atf6 transport in copii vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106 (42): 17775-17780.
- Schroder, M., & Kaufman, R. J. Er stress and the unfolded protein response. *Mutation research*. 2005; 569 (1-2): 29-63.

- Schuldt, A. Protein metabolism: A channel for erad. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2014; 15 (1): 2.
- Seo, M. D., Enomoto, M., Ishiyama, N., Stathopoulos, P. B., & Ikura, M. Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochimica et biophysica acta*. 2015; 1853 (9): 1980-1991.
- Shaban, H., & Richter, C. A2e and blue light in the retina: The paradigm of age-related macular degeneration. *Biological chemistry*. 2002; 383 (3-4): 537-545.
- Shen, J., Snapp, E. L., Lippincott-Schwartz, J., & Prywes, R. Stable binding of atf6 to bip in the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25 (3): 921-932.
- Shibata, Y., Voeltz, G. K., & Rapoport, T. A. Rough sheets and smooth tubules. *Cell*. 2006; 126 (3): 435-439.
- Shintani, K., Shechtman, D. L., & Gurwood, A. S. Review and update: Current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry*. 2009; 80 (7): 384-401.
- Sin, O., & Nollen, E. A. Regulation of protein homeostasis in neurodegenerative diseases: The role of coding and non-coding genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015; 72 (21): 4027-4047.
- Sparrow, J. R., Vollmer-Snarr, H. R., Zhou, J., Jang, Y. P., Jockusch, S., Itagaki, Y., & Nakanishi, K. A2e-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin e and other antioxidants inhibit a2e-epoxide formation. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278 (20): 18207-18213.
- Strauss, O. (1995). The retinal pigment epithelium. In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *Webvision: The organization of the retina and visual system*. Salt Lake City (UT).
- Sung, C. H., & Chuang, J. Z. The cell biology of vision. *The Journal of cell biology*. 2010; 190 (6): 953-963.
- Tanaka, K., & Matsuda, N. Proteostasis and neurodegeneration: The roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*. 2014; 1843 (1): 197-204.
- Tsai, B., & Rapoport, T. A. Unfolded cholera toxin is transferred to the er membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by ero1. *The Journal of cell biology*. 2002; 159 (2): 207-216.
- Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D., & Bertolotti, A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*. 2011; 332 (6025): 91-94.
- Tsubura, A., Lai, Y. C., Miki, H., Sasaki, T., Uehara, N., Yuri, T., & Yoshizawa, K. Review: Animal models of n-methyl-n-nitrosourea-induced mammary cancer and retinal degeneration with special emphasis on therapeutic trials. *In Vivo*. 2011; 25 (1): 11-22.
- Tsubura, A., Yoshizawa, K., Kuwata, M., & Uehara, N. Animal models for retinitis pigmentosa induced by mnu; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histology and histopathology*. 2010; 25 (7): 933-944.

- Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M., & Kohno, K. Novel mechanism of enhancing ire1alpha-xbp1 signalling via the perk-atf4 pathway. *Scientific reports*. 2016; 6: 24217.
- Uemura, A., Taniguchi, M., Matsuo, Y., Oku, M., Wakabayashi, S., & Yoshida, H. Ubc9 regulates the stability of xbp1, a key transcription factor controlling the er stress response. *Cell structure and function*. 2013; 38 (1): 67-79.
- Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., . . . Oakes, S. A. Ire1alpha cleaves select micrnas during er stress to derepress translation of proapoptotic caspase-2. *Science*. 2012; 338 (6108): 818-822.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. Coupling of stress in the er to activation of jnk protein kinases by transmembrane protein kinase ire1. *Science*. 2000; 287 (5453): 664-666.
- Verbakel, S. K., van Huet, R. A. C., Boon, C. J. F., den Hollander, A. I., Collin, R. W. J., Klaver, C. C. W., . . . Klevering, B. J. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in retinal and eye research*. 2018.
- Walter, P., & Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 334 (6059): 1081-1086.
- Wert, K. J., Lin, J. H., & Tsang, S. H. General pathophysiology in retinal degeneration. *Developments in ophthalmology*. 2014; 53: 33-43.
- Wolfrum, U., & Nagel-Wolfrum, K. [the usher syndrome, a human ciliopathy]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2018; 235 (3): 273-280.
- Wong-Riley, M. T. Energy metabolism of the visual system. *Eye and brain*. 2010; 2: 99-116.
- Wu, Y., Yanase, E., Feng, X., Siegel, M. M., & Sparrow, J. R. Structural characterization of bisretinoid a2e photocleavage products and implications for age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107 (16): 7275-7280.
- Xu, H., Chen, M., & Forrester, J. V. Para-inflammation in the aging retina. *Progress in retinal and eye research*. 2009; 28 (5): 348-368.
- Xu, M., Wu, X., Jie, B., Zhang, X., Zhang, J., Xin, Y., & Guo, Y. Neuregulin-1 protects myocardial cells against h2 o2 -induced apoptosis by regulating endoplasmic reticulum stress. *Cell biochemistry and function*. 2014; 32 (5): 464-469.
- Yamaguchi, H., & Wang, H. G. Chop is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing dr5 expression in human carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279 (44): 45495-45502.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., . . . Mori, K. Transcriptional induction of mammalian er quality control proteins is mediated by single or combined action of atf6alpha and xbp1. *Developmental cell*. 2007; 13 (3): 365-376.

Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., & Kohno, K. Cotranslational targeting of xbp1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mrna. *Molecular cell*. 2009; 34 (2): 191-200.

Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., & Kohno, K. Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of xbp1u mrna. *Science*. 2011; 331 (6017): 586-589.

Yang, Y. J., Peng, J., Ying, D., & Peng, Q. H. A brief review on the pathological role of decreased blood flow affected in retinitis pigmentosa. *Journal of ophthalmology*. 2018; 2018: 3249064.

Yoshida, H. Er stress and diseases. *The FEBS journal*. 2007; 274 (3): 630-658.

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273 (50): 33741-33749.

Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., & Mori, K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental cell*. 2003; 4 (2): 265-271.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. Xbp1 mrna is induced by atf6 and spliced by ire1 in response to er stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001; 107 (7): 881-891.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., & Mori, K. Atf6 activated by proteolysis binds in the presence of nf-y (cbf) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*. 2000; 20 (18): 6755-6767.

Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. Pxbp1(u) encoded in xbp1 pre-mrna negatively regulates unfolded protein response activator pxbp1(s) in mammalian er stress response. *The Journal of cell biology*. 2006; 172 (4): 565-575.

Yoshizawa, K., Nambu, H., Yang, J., Oishi, Y., Senzaki, H., Shikata, N., . . . Tsubura, A. Mechanisms of photoreceptor cell apoptosis induced by n-methyl-n-nitrosourea in sprague-dawley rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999; 79 (11): 1359-1367.

Zhang, S. X., Ma, J. H., Bhatta, M., Fliesler, S. J., & Wang, J. J. The unfolded protein response in retinal vascular diseases: Implications and therapeutic potential beyond protein folding. *Progress in retinal and eye research*. 2015; 45: 111-131.

Zhang, S. X., Sanders, E., Fliesler, S. J., & Wang, J. J. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. *Experimental eye research*. 2014; 125: 30-40.

Zhong, Y., Li, J., Chen, Y., Wang, J. J., Ratan, R., & Zhang, S. X. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes*. 2012; 61 (2): 492-504.

Zhong, Y., Wang, J. J., & Zhang, S. X. Intermittent but not constant high glucose induces er stress and inflammation in human retinal pericytes. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012; 723: 285-292.

Zode, G. S., Kuehn, M. H., Nishimura, D. Y., Searby, C. C., Mohan, K., Grozdanic, S. D., . . . Sheffield, V. C. Reduction of er stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121 (9): 3542-3553.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şeyma Sultan	Uyruğu	T.C
Soyadı	GÖNÜLDAŞ	Tel no	0505-132-29-85
Doğum tarihi	15.07.1991	e-posta	seymagonuldas@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Yavuz Selim Lisesi	2010
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2019
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
-		
-		
-		
-		

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
-		
-		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
-		
-		

Burslar-Ödüller:

Yayımlar ve Bildiriler: