

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

STZ- İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK FARE
OVARYUMUNDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ (ERS) İLİŞKİLİ PROTEİN
EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Aslı OKAN OFLAMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

STZ- İNDÜKLENMİŞ DİYABETİK FARE
OVARYUMUNDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM
STRESİ (ERS) İLİŞKİLİ PROTEİN
EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ash OKAN OFLAMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: TYL-2014-105)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25/12/2015

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Necdet DEMİR

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye

: Prof. Dr. Münire ERMAN AKAR

Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Üye

: Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

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

ÖZET

Hücre organellerinden biri olan endoplazmik retikulumun (ER) başlıca görevi; yeni oluşan sekretuar ve membran proteinlerin olgunlaşmasını ve tersiyer yapılarda doğru katlanmalarını sağlamaktır. N-bağımlı glikozilasyon inhibisyonu, kalsiyum dengesinin bozulması, hipoksi, oksidatif stres, glukoz yoksunluğu, viral enfeksiyonlar ve ortamın sıcaklığı gibi çevresel koşullar, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesine yol açarak ER stresi (ERS) adı verilen olayı meydana getirir. ERS'ye cevap olarak hücrede dengeyi yeniden sağlamak için katlanmamış protein cevabı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen sinyal yolağı aktif hale gelir. UPR veya ERS cevabının çeşitli fizyolojik durumlara karşı etkili bir adaptasyon mekanizması olduğu bilinmekle birlikte *diabetes mellitus* gibi hastalıkların fizyopatolojisi ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir.

Diyabetle indüklenmiş hiperglisemi ya da glukoz emilimindeki yetersizliğin fare granuloza hücrelerinin apoptozuna yol açtığı ve oositlerde; mayozun ilerlemesini azalttığı, düşük oosit kalitesine neden olduğu bilinmektedir. Hiperglisemik koşulların fare ovaryumlarında yarattığı olumsuz sonuçların nedenleri arasında, bozulan protein sentez mekanizması, ERS'nin ve buna cevap olarak ortaya çıkan hücre kaderini belirleyen UPR mekanizmasının rolleri olabilir.

Çalışmamızda, 24 günlük toplam 31 adet BalbC ırkı dişi fare kullanılarak üç grup oluşturuldu: 1) kontrol grubu (herhangi bir uygulama yapılmayan grup) (n=10), 2) çözgen grubu (intra peritoneal (i.p) 100 µl sodyum sitrat enjekte edilen grup) (n=6), 3) diyabet grubu (n=15) (tek doz 90 mg/kg streptozotosinin (STZ) i.p. olarak enjekte edilen grup). Diyabet modelinin takibi için, STZ enjeksiyonu takiben 2. , 7. ve 14. günlerde kan şekerleri ölçüldü. Kan şekeri değeri 300 mg/dl'nin üzerinde çıkan dişiler diyabetik kabul edildi. 14 günlük takip süresinin sonunda dişiler sakrifiye edilerek ovaryum örneklerinde ERS proteinlerinin (GRP78, DDIT3, KASPAZ 12 ve p-PERK) lokalizasyonları ve ekspresyon seviyelerini göstermek amacıyla immünohistokimya ve *western blot* yöntemleri uygulandı. qRT-PCR yöntemi ile ERS belirteçleri olan *Grp78* ve *Ddit3* genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi.

Diyabet grubuna ait ovaryum örneklerinde p-PERK ve DDIT3 proteinlerinin immün boyanmaları kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Her iki proteininde immün boyanmaları özellikle atretik foliküllerde, apoptotik granuloza hücrelerinde ve dejenere oositlerde görüldü. Ovaryumlarda p-PERK, GRP78 ve Kaspaz 12 protein miktarı açısından gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı belirlendi. *Grp78* mRNA düzeyi gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. *Ddit3*'ün mRNA miktarı diyabetik gruplarda anlamlı olarak artarken protein düzeyinde gruplar arası herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. XBP1s protein miktarının ise diyabetik ovaryumlarda arttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak; diyabetin fare ovaryumlarında ERS'yi başlatarak UPR'yi tetiklediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ERS, Diyabet, UPR, Fare, Ovaryum.

ABSTRACT

Main function of endoplasmic reticulum (ER) is to facilitate the proper folding of newly synthesized secretory and membrane proteins into native three-dimensional structures. Various triggers result in the onset of accumulation of unfolded or misfolded proteins in ER lumen including inhibition of N-linked glycosylation, perturbations in Ca^{2+} homeostasis, hypoxia, oxidative stress, glucose deprivation, viral infections and environmental conditions like ambient temperature, condition known as ER stress. In response to ER stress, unfolded protein response (UPR) signalling pathway is activated to retain cellular homeostasis. Although, UPR or ER stress response is an efficient adaptation mechanism for the cells, it was shown that it is also related to various pathophysiology of diseases, including diabetes.

Diabetes-induced hyperglycemia or glucose absorption inefficiency consistently causes granulosa cell apoptosis and reduced meiosis resumption rate in oocytes and low oocyte quality. Both ER stress and UPR may have a role in series of negative impacts on mice ovaries caused by hyperglycemic conditions by determining the cell fate.

In this study, 24-days-old BalbC female mice (N=31) were used and designed as three groups: Control (n=10, no treatment), Vehicle (n=6, i.p. 100 μl sodium citrate injected group), Diabetic (n=15, STZ-injected group (i.p. 90 mg/kg BW in 100 μl sodium citrate)). To control STZ-induced diabetic model, blood glucose level was measured following the injection days on 2nd, 7th and 14th. Mice whose blood sugar is over 300 mg/dl were accepted as the diabetic. The day of 14th, mice were sacrificed and ovary samples were examined with immunohistochemical staining and western blot analysis to show localisation and the expression levels of ER stress proteins (GRP78, Caspase 12, p-PERK and DDIT3). Additionally, with using qRT-PCR analysis mRNA level of *Grp78* and *Ddit3* genes which are the indicators for ER stress were examined.

It was observed that the immun reaction for p-PERK and DDIT3 was significantly increased in diabetic ovaries, especially in atretic follicles, apoptotic granulosa cells and degenerated oocytes. In ovaries, protein expression of Caspase 12, p-PERK and GRP78 was not showed any statistically differences among experimental groups. There was no significant differences among experimental groups for an amount of *Grp78* mRNA. Compar to control and vehicle group, *Ddit3* mRNA was significantly increased in diabetic group while amount of DDIT3 protein was not significantly differences among groups. XBP1s protein expression was increased in diabetic group which were statistically significant than control and vehicle.

In conclusion, it is detected that diabetes can initiate ERS and stimulate UPR in mice ovaries.

Keywords: ERS, Diabetes mellitus, UPR, Mice, Ovary

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan ve tezimin gerçekleşmesi için göstermiş olduğu hem maddi hem manevi desteği ile bana yardımcı olan çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Necdet DEMİR'e,

Tez konumun belirlenmesi sırasında görüş ve önerileri ile destek olan sevgili hocam sayın Prof. Dr. Çiler Çelik ÖZENCİ'ye;

Tez projemi gerçekleştirirken bilgi ve deneyimleriyle manevi desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Berna Sözen'e;

Tez yazım süresince gerek bilimsel gerek insani katkıları ile yanımda olan ekip arkadaşlarıma;

Çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her an yanımda oldukları için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına;

Bu süreçte göstermiş oldukları yardımlar için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm çalışanlarına;

Tüm eğitim yaşamım boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili ailemin tüm fertlerine;

Son olarak akademik eğitimim için gösterdiği fedakarlık, anlayış ve destek için sevgili eşim Can Uğur OFLAMAZ'a en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Dişi Üreme Sistemi.....	4
2.1.1. Ovaryumlar.....	4
2.1.2. Ovaryum Folikülleri.....	5
2.1.2.1. Primordiyal Folikül.....	6
2.1.2.2. Primer Folikül.....	7
2.1.2.3. Sekonder Folikül.....	8
2.1.2.4. Antral (Graaf) Folikül.....	9
2.1.2.5. Folikül Atrezisi.....	10
2.1.3. Ovulasyon (Yumurtlama).....	10
2.1.4. Korpus Luteum.....	11
2.2. Endoplazmik Retikulum.....	11
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	13
2.4. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR).....	14
2.4.1. PERK Sinyal Yolağı.....	15
2.4.2. IRE1 α Sinyal Yolağı.....	16
2.4.3. ATF6.....	16
2.4.4. ER Stresine Bağlı Apoptoz Mekanizmaları.....	17
2.5. Diyabetes Mellitus.....	20
2.5.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus.....	20
2.5.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus.....	21
2.5.3. Deneysel Diyabet Modelleri.....	23

2.5.3.1. Streptozotosin (STZ) ile İndüklenmiş Diyabet Modeli.....	23
2.5.4. Diyabetes Mellitusta UPR'nin Rolü.....	25
2.5.5. UPR Transmembran Proteinlerinin Memeli Ovaryan Foliküllerindeki Rollerini.....	27
GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Denekler	28
3.2. Diyabet Modelinin Oluşturulması.....	28
3.3. Doku Eldesi ve Hazırlanması.....	28
3.3.1. Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	29
3.4. İmmünohistokimya Yöntemi	29
3.5. Western Blot Analizi.....	31
3.5.1. Lizat Hazırlama	33
3.6. Kantitatif Real Time RT-PCR Analizi.....	34
3.6.1. Ovaryumlardan Total RNA İzolasyonu	34
3.6.2. Ovaryumlardan cDNA (Komplementer DNA) Eldesi.....	35
3.6.3. Kantitatif Real Time RT-PCR Uygulama basamakları.....	36
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	37
BULGULAR	38
4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	38
4.1.1. GRP78/ BİP İmmün Boyanmaları	38
4.1.2. Kaspaz 12 İmmün Boyanmaları.....	39
4.1.3. DDIT3/CHOP İmmün Boyanmaları	41
4.1.4. P-PERK İmmün Boyanmaları.....	42
4.2. Western Blot Analizi Bulguları.....	44
4.2.1. GRP78/BİP Ekspresyonu	44
4.2.3. XBP1s Ekspresyonu.....	44
4.2.3. Kaspaz 12 Ekspresyonu	45
4.2.5. DDIT3/CHOP Ekspresyonu.....	46
4.2.4. p-PERK Ekspresyonu	46
4.3. qRT-PCR Bulguları.....	47
4.3.1. GRP78/BİP Gen Ekspresyonu	47
4.3.2. DDIT3/CHOP Gen Ekspresyonu	47

TARTIŞMA	49
SONUÇLAR	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ATF4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
BCL2	: B hücresi lenfoma 2
bZIP	: Esas Lösün Fermuar Domain
CHOP	: C/EBP Homolog Proteini
CNX	: Kalneksin
CRT	: Kalretukilin
DER	: Düz Endoplazmik Retikulum
DM	: Diyabetes Mellitus
EDEM	: ER Degradasyon Artırıcı α Mannozydaz Benzeri Protein
eIF2α	: Ökaryotik Başlama Faktörü 2 α
ERAD	: ER İlişkili Bozunma
ERQC	: ER'nin kalite kontrol sistemini
ERS	: Endoplazmik Retikulum Stresi
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GADD34	: Büyümeyi Durduran ve DNA Hasarı ile Uyarılabilen
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GLS	: Golgi Lokalizasyon Sinyali
GLUT	: Glikoz taşıyıcı protein
GRP78	: Glukozla Düzenlenen Protein 78
GRP94	: Glukozla Düzenlenen Protein 94
HSP	: Isı Şoku Proteini
IRE1	: İnositol Gerektiren Kinaz 1
IRS	: İnsulin Reseptör Sinyali
JNK	: J-cun N Terminal Kinaz
Keap 1	: Kelch Benzeri ECH İlişkili Protein
LH	: Lüteinleştirici Hormon
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
Nrf2	: Nükleer Faktör Erythroid İlişkili Faktör 2
OMI	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
PERK	: Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz
PKC	: Protein Kinaz C
PP1	: Protein Fosfataz 1
SRP	: Sinyal Tanıma Partikülü
STZ	: Streptozotosin
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response)
XBP1s	: Kırpılmış X-box bağlayıcı protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	İnsan ve farede dişi üreme sistemi organlarının karşılaştırılması	4
2.2.	Normal rodent ovaryumun histolojik görüntüsü	5
2.3.	Primordial folikül	6
2.4.	Ovaryumdan geçen bir kesitin şematik çizimi	7
2.5.	Primer folikül	8
2.6.	Sekonder folikülün fotomikrografı	9
2.7.	Bir antral folikülün ışık mikroskop fotoğrafı	10
2.8.	Endoplazmik retikulumda protein sentezi ve salgılanması	13
2.9.	Katlanmamış protein cevabında rol oynayan ER transmembran sensörleri	15
2.10.	ERS koşulları altında sağkalım sinyalleri	17
2.11.	ERS koşulları altında apoptoz sinyali	18
2.12.	ERS ile başlatılan apoptoz mekanizmaları	19
2.13.	İnsülin sinyal yolağı	22
2.14.	Streptozotosinin (STZ) kimyasal yapısı	24
2.15.	Rodent pankreasına ait β hücrelerinde STZ ile indüklenmiş toksik olayların mekanizması	25
3.1.	Diyabet fare modelinin oluşturulması ve uygulanan metodlar	28
4.1.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde GRP78/BİP immün boyanmaları	38
4.2.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde GRP78/BİP proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	39
4.3.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde Kaspaz 12 immün boyanmaları	40
4.4.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde Kaspaz 12 proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	40
4.5.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde CHOP/DDIT3 immün boyanmaları	41
4.6.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde DDIT3/CHOP proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	42
4.7.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde p-PERK immün boyanmaları	43
4.8.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde p-PERK proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik	43
4.9.	Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda Grp78/BİP protein bandları	44
4.10.	Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda XBP1s protein bandları	45
4.11.	Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda Kaspaz 12 protein bandları	45
4.12.	Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda DDIT3/CHOP protein bandları	46
4.13.	Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda p-PERK protein bandları	46
4.14.	Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde <i>Grp78/Bip</i> mRNA ekspresyon düzeyini qRT-PCR ile karşılaştıran grafik	47

4.15.	Kontrol, özgen ve diyabet ovaryum örneklerinde <i>Ddit3/Chop</i> mRNA ekspresyon düzeyini qRT-PCR ile karşılaştıran grafik	48
--------------	---	-----------

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
3.1.	Çalışmada kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları	30
3.2.	<i>Western blot</i> deneyinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	34
3.3.	cDNA eldesinde kullanılan içerikler	36
3.4.	qRT-PCR uygulamasında kullanılan içerikler	36
3.5.	qRT-PCR tekniklerinde kullanılan primer dizileri	36

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Proteinlerin üç boyutlu yapılarını kazanmaları için katlanması, çok karmaşık ve hata olasılığı oldukça yüksek işlem döngülerinden oluşmaktadır. N-bağımlı glikozilasyonun inhibisyonu, kalsiyum homeostazının bozulması, hipoksi, oksidatif stres, enfeksiyonlar ve ortamın sıcaklığı gibi birçok etken proteinlerin fonksiyonel tersiyer yapılarını kazanmalarını etkilemektedir. Endoplazmik retikulum (ER), hücre dışına gönderilecek ve membran yapısında yer alacak proteinlerin sentezinin, katlanmasının ve kalite kontrolünün gerçekleştirildiği önemli bir organeldir [1].

ER'ye gelen proteinler N-bağımlı glikozilasyon, disülfid bağ oluşumu, hidroksilasyon, lipidizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğramadan katlanamazlar. Proteinlerin her katlanma aşamasının başarılı bir şekilde tamamlanması için protein katlanmasında rol oynayan kalsiyum bağımlı moleküller görev almaktadır. Bunlar; glukozla düzenlenen protein 78 (Glucose regulated protein 78, GRP-78), glukozla düzenlenen protein 94 (Glucose regulated protein 94, GRP-94), kalneksin (calnexin), kalretukilin (calreticulin) gibi moleküler şaperonlardır [2]. Bu şaperonlar proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olurken, diğer yandan da proteinlerin translokasyon ve yıkımının gerçekleşmesinde rol oynamaktadırlar [3].

ER'de katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi ve bunun sonucunda ER homeostazisinin bozulması durumunda ortaya çıkan hücresel cevap ER stresi (ERS) olarak tanımlanmaktadır. Bu durumda, ERS'yi engelleyebilmek ve ER dengesini tekrar eski haline döndürebilmek için katlanmamış protein cevabı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen bir takım hücre içi sinyal yollarından oluşan olaylar dizisi aktif hale gelmektedir [4].

UPR ile öncelikle, ER şaperonları ve katlanma enzimlerini kodlayan genlerin translasyonunun artırılması sağlanır ve genel protein translasyonu azaltılarak ER yükü hafifletilir. Ayrıca, yanlış katlanmış proteinler ER'den sitoplazmaya geçer ve ER ilişkili yıkım olarak bilinen proteazomlar tarafından parçalanırlar. Fakat ER dengesi uzun bir süre sağlanamazsa, çevre dokuya zarar vermemek için UPR sinyali hücreyi apoptoza yönlendirir. UPR sinyali ER'de bulunan 3 farklı transmembran proteini tarafından düzenlenmektedir. Bunlar: protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (Protein kinase RNA (PKR)- like ER kinase, PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (Activating transcription factor-6, ATF6) ve inositol gerektiren kinaz 1 (Inositol requiring enzyme-1, IRE1)'dir [4].

ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesi üzerine GRP-78 proteini, bu üç ERS reseptörlerinden ayrılır ve onların aktif hale geçmesine izin verir [5]. Aktive olan PERK ökaryotik başlama faktörü 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)'yı fosforilleyerek genel protein sentezini engeller. Böylelikle ER'de yeni oluşan protein yüklenmesi azaltılarak hücrenin hayatta kalması sağlanır [6]. Fosforillenen eIF2 α , genel translasyonu hücre içinde zayıflatsada, aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (activating transcription factor 4, ATF4) gibi spesifik mRNA'ların translasyonuna olanak sağlar. Transkripsiyon faktörü olan ATF4 çekirdeğe taşınır ve ER dengesini eski hale getirmek için gereken genlerin transkripsiyonunu indükler. Fakat ATF4 tarafından indüklenen genlerin hepsi anti-

apoptotik değildir. Özellikle ATF4 tarafından indüklenen transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteininin (C/EBP homolog protein, CHOP) hücrenin apoptoza gidişini arttırdığı bilinmektedir. Sonuç olarak, PERK'in aktivasyonu başlangıçta koruyucudur ve hücrenin hayatta kalması için önemlidir. Fakat PERK'in aktivasyonu CHOP indüksiyonunu da tetiklediğinden bu sinyal yolağı hücrenin ölümüne de yol açabilmektedir [5].

GRP78'den ayrılan ATF6, Golgi kompleksine taşınır ve orada site 1 ve site 2 proteazlar tarafından sırasıyla kesilerek aktif forma dönüştürülür. ATF6 aktif olduktan sonra çekirdeğe taşınır ve hedef genleri olan GRP-78, GRP-94 gibi ER şaperon proteinleri, protein disülfid izomeraz ve transkripsiyon faktörleri CHOP ve X-box bağlayıcı protein 1 (X-box binding protein 1, XBP1)'in aktivasyonunu sağlar [7].

IRE1, GRP-78'in ayrılmasıyla dimerize olur ve otofosforillenir. Fosforillenmesi ile birlikte RNaz aktif hale geçer ve mRNA X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1)'den 26 nükleotit uzaklaştırılır ve oluşan kırpılmış XBP1 mRNA translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne (spliced X box binding protein, sXBP1) dönüşür. Sonuç olarak, sXBP1 çekirdeğe geçer ve protein katlanmasında, ER biyogenezinde ve ER ilişkili yıkımda görev alan genlerin transkripsiyonunu artırır [8].

PERK, ATF6 ve IRE1 sinyal yolları ERS sırasında pro-apoptotik sinyalleri tetiklemektedir. Fakat direkt olarak hücre ölümüne yol açmazlar. ERS ile indüklenen apoptoz transkripsiyon faktörlerinin (özellikle CHOP'un), B hücreleri lenfoma 2 (BCL-2) ailesi üyelerinin, kinazların (JNK) ve kaspazların içinde bulunduğu hücre ölüm yollarıyla oluşmaktadır [5].

Apoptoz, normal gelişim ve doku homeostazı için önemlidir. Apoptozun çok fazla ya da çok az olması çeşitli hastalıklara yol açabilir. Kaspaz olarak adlandırılan sistein proteaz ailesi, programlı hücre ölümü için kritik düzenleyicilerdir. Bunlardan Prokaspaz 12 endoplazmik retikulumun sitoplazmik kısmında bulunur. Kalsiyum homeostazisinin bozulması ve ER'de aşırı protein birikimi sonucu oluşan ERS tarafından yarıklanır ve aktive edilir [9].

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada; obezite, ateroskleroz, kalp, karaciğer ve nörodejeneratif hastalıklarda görülen fizyopatolojik ve metabolik değişikliklerin ERS ve UPR sinyal yolu ile ilişkili olabileceğini öne süren birçok veri bulunmaktadır [1]. Yapılan çalışmalar; endoplazmik retikulum stresinin pankreatik β hücre hasarına ve insülin dirençliliğine katkıda bulunarak diyabet patogenezinde rol aldığı yönündedir [10].

Fare ovaryan foliküllerinde, granuloza hücreleri glukozu absorbe ederek ovositlere enerji metabolizmasında kullanılmak üzere besin sağlamaktadır. Diyabetle indüklenmiş hiperglisemi ya da glukoz emilimindeki yetersizlik granuloza hücrelerinin apoptozuna yol açmaktadır. Ayrıca, oositlerde; mayozun ilerlemesini azaltma, düşük oosit kalitesi ve preimplantasyon embriyo dejenerasyonu gibi bir takım negatif etkilere neden olmaktadır [11].

Diyabetin etkilerini incelemek amacıyla farelere streptozotosin (STZ) uygulanarak diyabet modeli oluşturulmaktadır. Streptozotosin *Streptomyces achromogenes*' den izole edilen bir antibiyotiktir. İntra peritoneal ya da intra venöz olarak uygulandıktan sonra glukoz taşıyıcı protein 2 (Glucose Transporter 2, Glut-2) yardımıyla pankreatik β hücrelerine girer ve DNA alkilasyonuna neden olur [12]. Çeşitli deney hayvanlarına uygulanan STZ seçici olarak pankreatik β hücrelerini tahribe uğratarak insülin yetersizliğine ve hiperglisemiye neden olmaktadır [13].

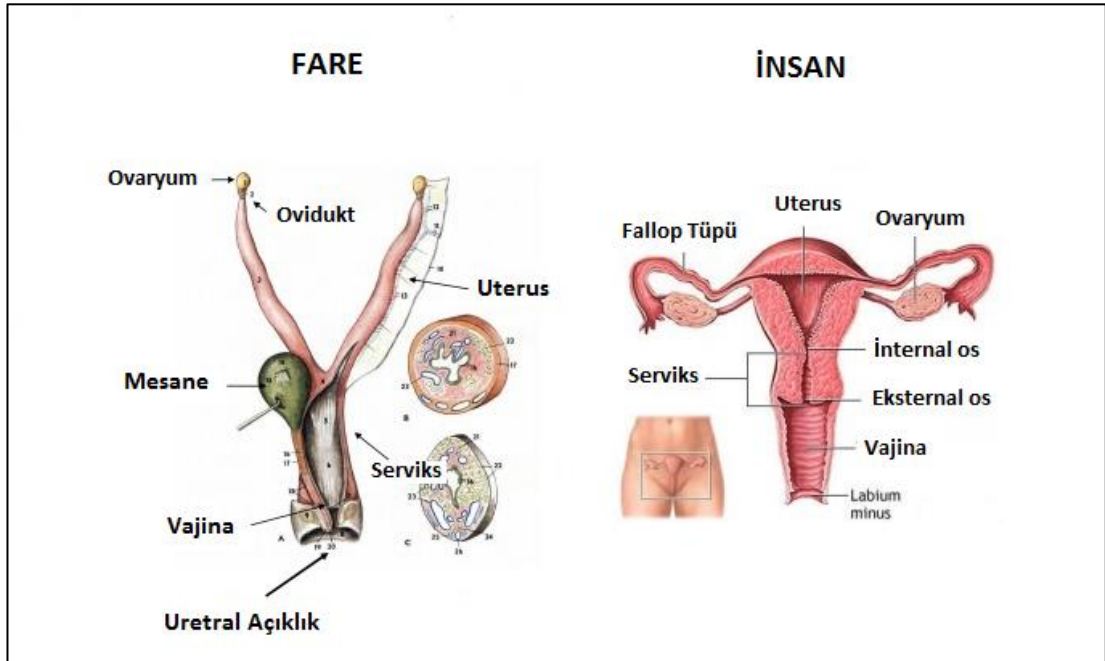
Literatürde *in vivo* hiperglisemik koşulların pubertal fare ovariumunda yarattığı ERS ile ilişkili UPR'de görev alan transmembran proteinlerinin ekspresyon düzeyleri bilinmemektedir. Çalışmanın hipotezi; 'STZ ile indüklenmiş diyabet modelindeki hiperglisemik mikroçevre fare ovariumundaki ERS'yi ve buna bağımlı UPR yolağını aktif hale getirir'. Bu çalışma kapsamında diyabetik koşullardaki potansiyel ERS'yi belirleyebilmek için, STZ ile oluşturulacak diyabetik farele modelinden toplanacak ovarium dokularındaki, ERS'ye cevap olarak aktive olan UPR'nin anahtar proteinlerinin lokalizasyonları ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Dışı Üreme Sistemi

Dışı üreme sistemi; iç genital organlar olan iki ovaryum, iki tuba uterina (fallop tüpleri) (farede ovidukt), uterus, serviks, vajina ve dış genital organlardan oluşur (Şekil 2.1). Bu sistem menarş (ilk adet) ile menapoz arasında histofizyolojik döngüsel değişikliklere uğrar ve bu değişiklikler hormonal mekanizmaların kontrolü altındadır [14].

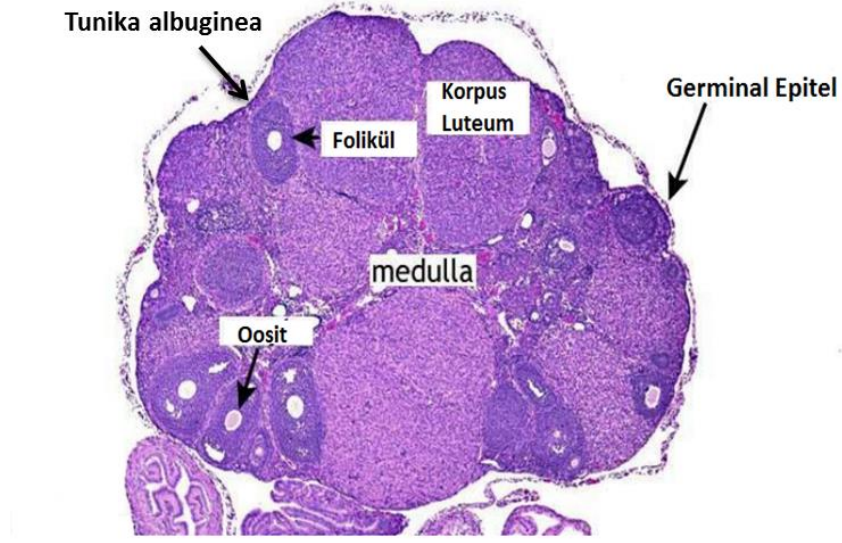
Dışı üreme sisteminin temel işlevleri, dışı cinsiyet karakteristiklerinin gelişimi için cinsiyet hormonlarının (östrojen ve progesteron) salgılanması, ovositin gelişimi ve fallop tüplerinde fertilizasyon için uygun ortamın sağlanması, uterusu embriyonun taşınması ve implantasyonu, gebelik boyunca fetüsün gelişimi ve yeni doğanın beslenmesidir [15].



Şekil 2.1. İnsan ve farede dışı üreme sistemi organlarının karşılaştırılması [16].

2.1.1. Ovaryumlar

Ovaryumlar insanda, boyu yaklaşık 3 cm, eni 1.5 cm ve kalınlığı 1 cm olan badem şeklinde organlardır. Yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı yassıdan kısa kübik epitele kadar değişkenlik gösteren bir epitel ile kaplıdır. Epitelin hemen altında ovaryumun beyaz rengini veren ve tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusu bulunur. Tunika albugineanın altında ovositleri içeren çok sayıda ovaryum foliküllerinin bulunduğu kortikal bölge yer alır. Foliküller tipik iğ biçiminde fibroblast içeren kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içine gömülü halde bulunur. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medüller bölgedir. Histolojik olarak korteks ve medullar arasında kesin bir sınır bulunmaz (Şekil 2.2) [14].



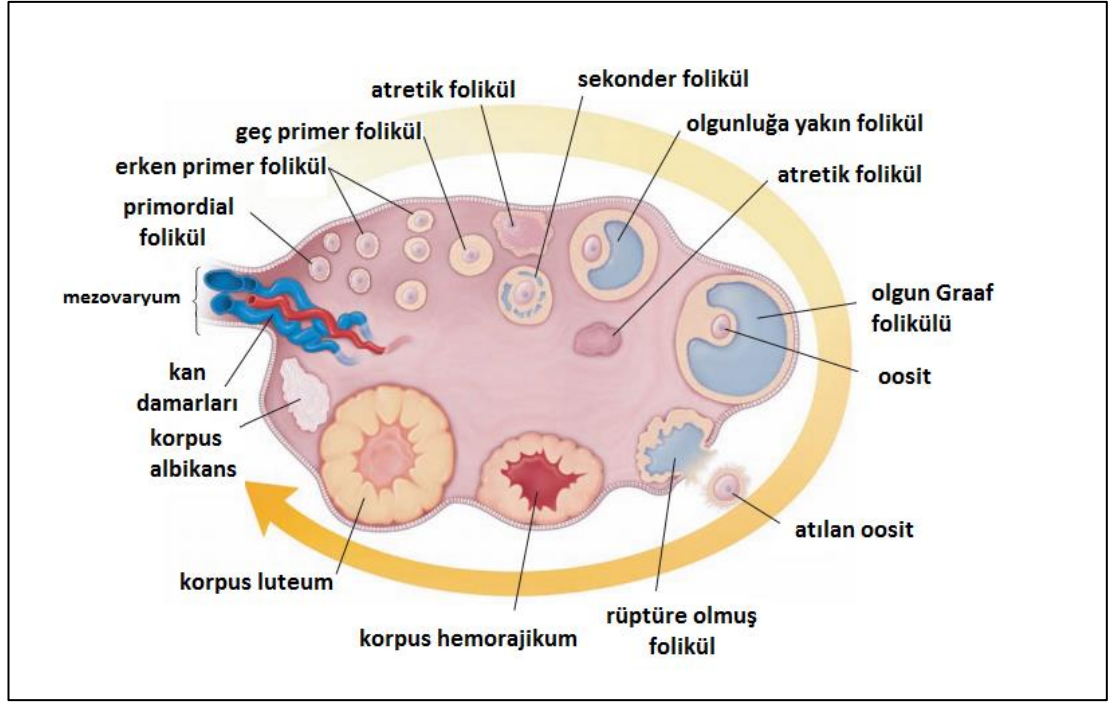
Şekil 2.2. Normal rodent ovaryumun histolojik görüntüsü [16].

Memeli türlerinden farede ovaryumlar, böbreklerin nispeten kaudalinde ve genellikle yağa gömülü halde bulunur. İnsan ve diğer primatlarda uterus tek bölmeli (basit uterus) iken, rodentlerde iki parçaya bölünmüştür (dupleks uterus) [17]. Tüp şeklindeki uterus boynuzları vajinal açıklığa doğru birleşerek kaynaşır. Vajina ve uterusun birleştiği yerde tek bir serviks yer alır. Uterus ve ovaryumlar vücudun dorsal duvarına yakındır. İnsan ve faredeki dişi üreme sistemi organlarının karşılaştırılması Şekil 2.1’ de verilmiştir.

2.1.2. Ovaryum Folikülleri

Ovaryum folikülleri gelişmekte olan ovositler için mikroçevreyi sağlamaktadır. Her biri tek bir ovosit içeren çeşitli boyutlardaki ovaryum folikülleri korteksin stromasına yayılmış durumdadır (Şekil 2.3). Folikülün boyutu, ovositin gelişim evresini belirtir. [18]. Ovaryumda histolojik olarak başlıca üç tip folikül tanımlanmıştır:

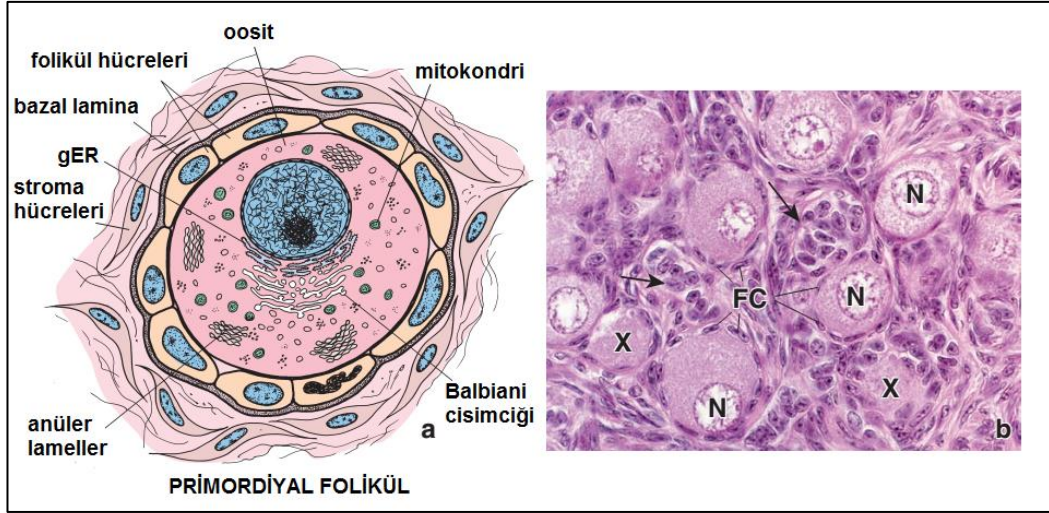
1. Primordial Folikül
2. Gelişen Folikül
 - a) Primer Folikül
 - b) Sekonder Folikül
3. Olgun (Graaf) Folikülü



Şekil 2.3. Ovaryumdan geçen bir kesitin şematik çizimi [18].

2.1.2.1. Primordiyal Folikül

Primordiyal folikül havuzu, kemiricilerde olduğu gibi doğumdan hemen sonra ya da primatlardaki gibi embriyonik gelişim boyunca meydana gelir [19]. Primordiyal folikül olgun ovaryumda tunika albugineanın hemen altında korteksin stromasında yer almaktadır. Bu foliküller tek sıra yassı folikül hücreleri ile çevrili bir primer oositten oluşur. Folikül hücrelerinin altında bir bazal lamina bulunur ve damardan yoksun folikülleri stromadan ayıran sınırı oluşturur (Şekil 2.4) [14].

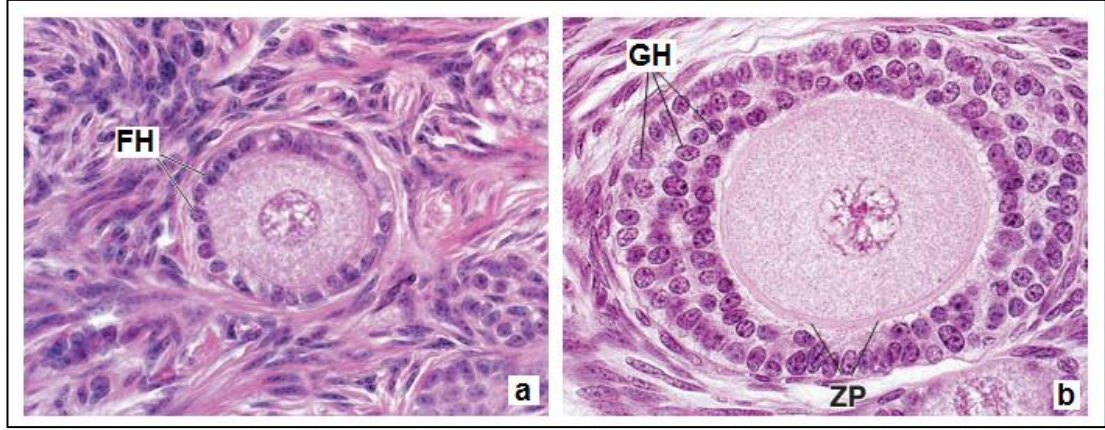


Şekil 2.4. Primordial Folikül. a. Primordial folikülün şematik çizimi. b. Primordial folikülün fotomikrografı. Nükleus (N), Nükleusları kesit düzleminde bulunmayan iki ovosit (X), Folikül hücreleri (FH) [18].

Birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında bekleyen primer ovosit, eksantrik yerleşmiş büyük bir çekirdeğe sahip, yaklaşık 25 µm çaplı yuvarlak bir hücredir. Ovosit sitoplazmasında çok sayıda mitokondri, birkaç Golgi kompleksi ve ER gibi organeller çekirdeğe yakın bir küme oluşturma eğilimi gösterirler. Başta bu yapı farklı bir organel olarak düşünüldüğünden Balbiani cisimciği olarak tanımlanmıştır. Balbiani cisimciği (Şekil 2.4) primordial foliküllerde bulunmakla birlikte, folikül gelişmeye başladığında mitokondrilerin ve endoplazmik retikulum yapılarının ovosit içerisine dağılması sonucu ortadan kalkmaktadır [19].

2.1.2.2. Primer Folikül

Puberteden başlayarak küçük bir primordial folikül grubu bekleme evresinden çıkar ve büyüme sürecine girer. Bu süreç içerisinde primer ovositlerde, foliküler hücrelerinde ve folikülü çevreleyen stromadaki fibroblast hücrelerinde değişiklikler meydana gelir [20]. Başlangıçta ovosit genişler ve bu esnada ovositin çapı maksimum 125-150 µm'ye ulaşır. Çekirdek büyür ve bu durumla germinal vezikül olarak adlandırılır. Mitokondri sayısında artış olur ve sitoplazmanın her tarafında eşit bir dağılım gösterir. GER hipertrofiye uğrarken Golgi kompleksleri de hücre yüzeyinin tam altına göç eder. Folikül hücreleri tek tabakalı kübik hücreler haline geldiğinde foliküle tek tabakalı (unilaminer) primer folikül ismi verilir (Şekil 2.5.a). Folikül hücreleri mitoz ile çoğalmayı sürdürerek çok katlı foliküler epiteli ya da granuloza tabakasını oluştururlar (Şekil 2.5.b). Buradaki hücreler oluklu bağlantılar (gap junction) aracılığı ile iletişim kurar ve folikülün bu haline çok tabakalı (multilaminer) primer folikül ismi verilir [14]. Ovosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek ovosit ve foliküler hücreler arasında ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluşturur [18].

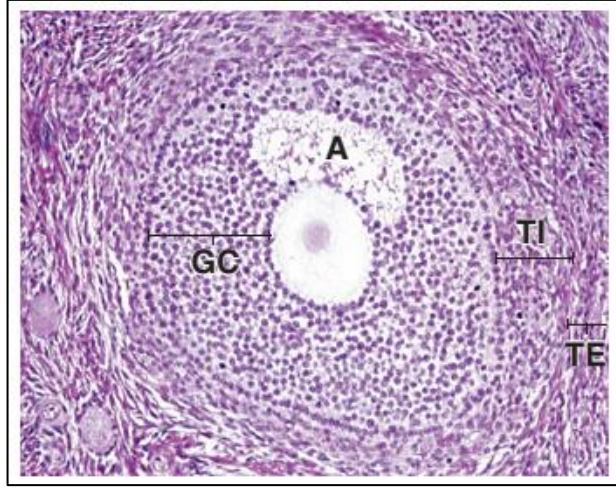


Şekil 2.5. Primer Folikül. a. Erken Primer Folikül, b. Geç Primer Folikül [18].

Granüloza hücreleri çoğalırken folikülün çevresindeki stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında teka folikülü olarak adlandırılan bir bağ dokusu hücre kılıfı oluşturur. Daha sonra bu tabaka teka interna ve teka eksterna tabakalarına farklılaşır. İç kısımda bulunan teka interna yüksek düzeyde vaskülarizedir ve kübik salgı hücrelerinden oluşur. Bu hücreler tamamen farklılaştığında steroid üreten hücrelerde olduğu gibi bol miktarda düz endoplazmik retikulum, tübüler kristaya sahip mitokondriler ve çok sayıda lipid damlacıkları içerir. Lüteinizan hormon (LH) reseptörlerine sahip bu hücreler, LH uyarımına yanıt olarak östrojen öncülü androjenleri salgılar. Buna ek olarak, teka interna tabakası fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağı içerir. Teka eksterna ise dış tarafta bulunan bağ dokusu hücreleri tabakasıdır. Düz kas hücreleri ve kollajen lif demetleri içerir ve çevresindeki stromayla arasındaki sınır belirgin değildir. Granüloza tabakası ile teka interna arasındaki bazal lamina bu iki tabaka arasında belirgin bir sınır oluşturmaktadır [14, 18].

2.1.2.3. Sekonder Folikül

Foliküller granüloza hücrelerinin büyüklüğünün ve sayısının artması ile büyürken hücreler arasında folikül sıvısı (likör folikülü) toplanmaya başlar. Hyaluronan bakımından zengin sıvı biriktikçe kaviteler birleşir ve en sonunda antrum denilen hilal biçimindeki kavite oluşur (Şekil 2.6). Bu aşamada folikül sekonder folikül ya da antral folikül olarak adlandırılır. Eksantrik konumlu yaklaşık 125 µm çapındaki ovosit daha fazla büyümeyebilir. Büyümenin inhibisyonu, granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgılanan küçük, 1-2 kilodaltonluk bir peptid olan ovosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından gerçekleştirilir. OMI yoğunluğu küçük foliküllerde en yüksek iken olgun foliküllerde en düşüktür.

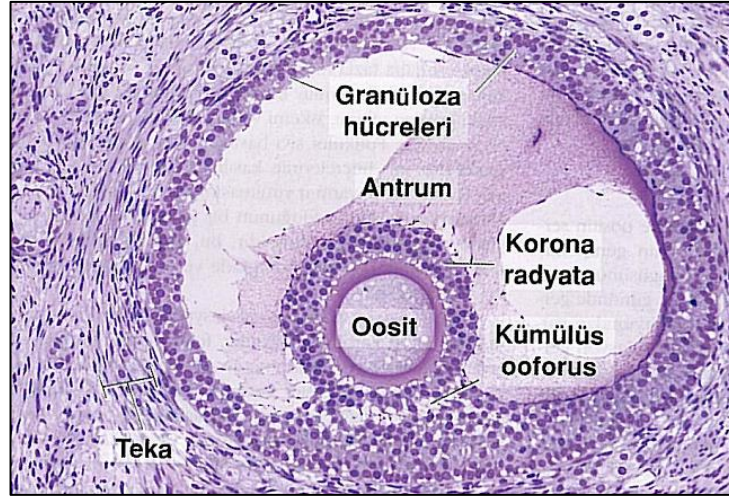


Şekil 2.6. Sekonder Folikülün Fotomikrografi. Stratum Granulozum (Granuloza hücreleri, Granulosa Cells,GC), Antrum (A), Teka İnterna (TI), Teka Eksterna (TE) [18].

Sekonder folikülün boyutu arttıkça, birkaç granuloza hücre tabakası ile çevrili olan antrumunda genişliği de artar. Granuloza hücre tabakası ovosit ile ilişkili olduğu bölgenin dışında her bölümde aynı kalınlıktadır. Ovositin çevresinde granuloza hücreleri kumulus ooforus adı verilen ve antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluştururlar. Ovositin etrafını çevreleyen ve ovulasyonda ovositle birlikte kalan granuloza hücrelerine korona radyata adı verilir. Bu hücreler zona pellusidayı penetre eden mikrovilluslar gönderir ve bu mikrovilluslar oluklu bağlantılar aracılığı ile ovositin mikrovillusları ile iletişim kurarlar [18].

2.1.2.4. Antral (Graaf) Folikül

En büyük folikül olgun (Graaf folikülü) foliküldür. 15-20 mm çapındadır. Folikül maksimum boyutuna yaklaşırken granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrumun boyutu arttıkça granuloza hücre tabakası incelik. Granuloza tabakasındaki antrum boşluğu genişlerken, kumulus ooforus ile folikül duvarı arasındaki bağlantı zayıflar ve ovosit etrafındaki korona radyata hücreleri ile birlikte antral boşluğa bırakılır (Şekil 2.7). Ovulasyon (yumurtlama) öncesi bu aşamada Graaf foliküllerinin granuloza hücreleri ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerden salınan folikül uyarıcı hormona (Follicle Stimulating Hormone, FSH) tam duyarlı hale gelir [18, 20].



Şekil 2.7. Bir antral folikülün ışık mikroskop fotoğrafı [14].

2.1.2.5. Folikül Atrezisi

Çok sayıda primer folikül olgunlaşma sürecine başlar ve yalnızca bir folikül gelişimini tamamlar, diğerleri atrezi denilen bir olayla dejenere olur. Foliküller gelişimin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilir. Özellikle maternal hormonların etkisinin ortadan kalktığı doğumdan hemen sonraki dönem ile, kalitatif ve kantitatif hormonal değişikliklerin görüldüğü puberta ve gebelik sırasında foliküler atrezi oldukça belirgindir. Atretik foliküller; camsı membran adı verilen kalın, kıvrılmış membranöz materyal, değişikliğe uğramış zona pellusida, dejenere olmuş ovosit ve folikül hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile ayırt edilebilir [14, 20].

2.1.3. Ovulasyon (Yumurtlama)

Ovulasyon, sekonder ovositin Graaf folikülünden atıldığı süreçtir. Ovulasyondan hemen önce olgun folikülde birinci mayotik bölünme tamamlandığında primer ovositin her kardeş hücresi eşit miktarda kromatin içerir, fakat kardeş hücrelerden biri daha fazla sitoplazma alarak sekonder ovosit olur. Diğer kardeş hücre ise çok az miktarda sitoplazma alarak birinci kutup cisimi haline gelir. Birinci kutup cisim atılmasından hemen sonra sekonder ovosit ikinci mayotik bölünmeye başlar. Bu bölünme metafaz evresinde durur ve sadece sekonder ovosit bir spermatozoon tarafından penetre edildiğinde tamamlanır [18].

Ovulasyon zamanında olgun folikül ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru, stigma denilen bir çıkıntı yapar. Lüteinize edici hormon (Lüteinizing Hormone, LH) düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik etkinlik sonucu Graaf folikülünün yırtılması kolaylaştırılır. Dışarıya atılan gamet, uterus tüplerine girer. Ovulasyondan birkaç saat önce, foliküler hücre tabakası ve teka interna korpus luteuma dönüşmeye başlar [20].

2.1.4. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra geriye kalan granüloza ve teka hücreleri korpus luteum (sarı cisim) adı verilen geçici bir endokrin bezi oluştururlar. Bu dönüşüm sırasında ilk olarak folikülün bazal membranı yıkılır. Ardından başlangıçta damarsız olan foliküler hücre kümesi içerisine kan damarları girer. Antrum boşluğuna kan dolar ve pıhtılaşır. Korpus hemarijikum adı verilen geçici bir yapı oluşur. Buraya yeni oluşmuş kan damarları (anjyogenez), fibroblastlar ve kollajen lifler fibrin pıhtı içine girer. Foliküler hücreler, foliküler lütein hücrelere dönüşerek, tipik steroid sentezleyen hücre özellikleri (lipit damlacıkları, gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum ve tübüler kristal mitokondriler) sergilerler. Hücreler bu özellikleri kazandıktan sonra FSH ve LH uyarısına cevaben progesteron ve östrojen salgırlarlar. Teka interma hücreleri de teka lütein hücrelerine dönüşür ve LH uyarısına yanıt olarak androstenediyon ve progesteron üretir [20].

Korpus luteum büyümeye devam eder. Fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmezse korpus luteum sadece 14 gün aktif kalır, daha sonra gerileme evresine girer. Hücreler lipid ile dolar, boyutları küçülür ve otolize uğrarlar. Önceki korpus luteumun dejenere hücrelerinde intraselüler hiyalin materyalin birikimi ile korpus albicans oluşur. Korteksin derinlerine doğru gömülür ve birkaç ay içinde kaybolur [18].

Gebelik meydana gelirse, plasenta tarafından üretilen koryonik gonadotropin korpus luteumu uyarır. Böylelikle altı ay kadar bir süre etkinliğini sürdürmeye devam eder. Ancak tam olarak kaybolmaz ve gebeliğin sonuna kadar progesteron salgılamaya devam eder. Buna gebelik korpus luteumu denir. Gebelik ve menstruasyon sonrasında korpus luteum hücreleri otolize uğrarlar [14].

2.2. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER), plazma membranının altında konumlanır ve nüklear zara doğru uzanan birbirine bağlı dallanmış tübüller, veziküller ve sisternadan oluşur. ER yapısında belli bölgeler barındırır. Bunlardan ilki granüllü endoplazmik retikulümdan (GER) sentezlenen bir düzine proteinin nüklear iç zarda kümelendiği nüklear zar domainidir. İkincisi, ER'ye bağlı ribozomların olmadığı düz endoplazmik retikulum (DER) domaini, üçüncüsü ribozomların bağlandığı GER domainidir. Son olarak, ER'de bulunan etkin kalsiyum sinyalinin sağlamak ve membrana gönderilecek lipidlerin transferini kolaylaştırmak için Golgi, vakuoller, mitokondri, peroksizomlar, geç endozomlar ve lizozomlar gibi diğer organeller ile iletişimi sağlayan bölgeler vardır [21].

ER'nin başlıca işlevleri:

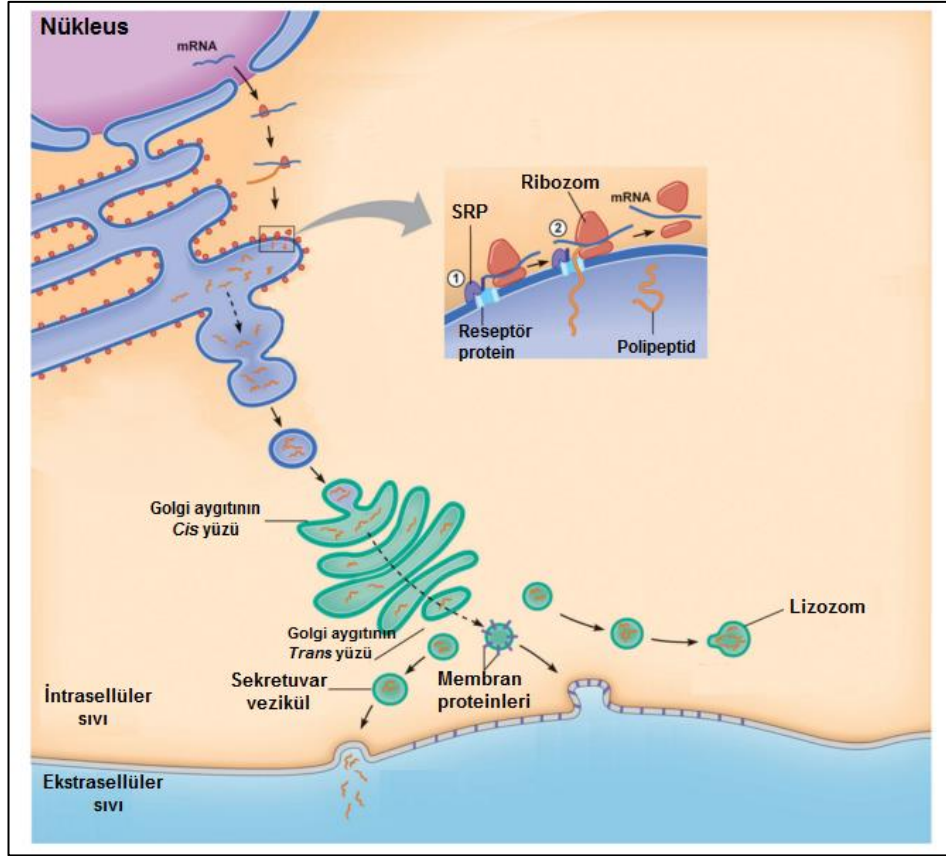
1. Sekretuar ve membran proteinlerin yer değişimlerini ve entegre olmalarını sağlamak.
2. Proteinlerin katlanmalarına yardımcı olmak ve hücre dışına ya da hücre membranına taşınmalarını sağlamak.
3. Lipid biyosentezini gerçekleştirmek.
4. Kalsiyum dengesini sürdürmek.

5. Proteinlerin N-bağlı glikozilasyon gibi post translasyonel modifikasyonlar geçirmesini sağlamak [22].

GER'de gömülü ribozomlarda protein sentezi ve salgılanması gerçekleşir. Buna karşın DER ribozomlardan yoksundur. Dolayısıyla, protein sentezinde etkin değildir. Fakat, fosfolipid ve lipid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum dengesinin düzenlenmesi için önemlidir. Hücre tipi, hücre işlevi ve hücrenin ihtiyacı hücrede ER'nin rolünü belirler. Örneğin karaciğer hücreleri ilaç detoksifikasyonunda rol oynayan çok miktarda DER'e sahipken, plazma hücreleri, beta hücreleri ve diğer sekretuar hücreler sekretuar protein talebini karşılamak için GER bakımından zengindir [22].

ER'de değişime uğrayacak sekretuar ya da membran proteinleri öncelikle N-terminal ER sinyal sekansı ile işaretlenirler. Ko-translasyonel modifikasyon boyunca, sinyal tanıma partikülü (signal reconation particle, SRP) yeni oluşan proteinin üzerindeki sinyal sekansını, ribozomu ve ER membranı üzerindeki SRP reseptörünü tanır ve bağlanır (Şekil 2.8). Sonra ribozom-yeni oluşan polipeptid zincir kompleksi, bir membran protein translokatorü olan SEC61 translokonuna transfer olur. Sinyal peptidi ER membranı üzerinde yer alan sinyal peptidaz tarafından yarıklanarak yeni oluşan zincir translokon aracılığı ile ER lümenine girer [22].

ER'de bulunan katlanma enzimleri ve moleküler şaperonlar; buraya gelen proteinlerin uygun konformasyonlarda katlanarak olgun hale geçmelerine yardımcı olurken bir yandan da yanlış katlanan proteinlerin yıkımının gerçekleşmesinde rol oynarlar [3]. Glukozla regüle edilen protein (GRP) sistemine dahil olan ısı şoku proteini 70 (Heat shock protein 70, Hsp70) ailesinin şaperonları ve ısı şoku proteini 40 (Heat shock protein 40, Hsp40) ailesinin ko-şaperonları, ER lektin benzeri şaperon sistemine dahil olan transferazlar ve glukozidazlar ile birlikte kalretikulin (CRT) ve kalneksin (CNX), protein disülfid izomeraz ailesi disülfid bağlı oksidaz, redüktaz ve izomeraz enzimleri ER'nin kalite kontrol sistemini (endoplasmic reticulum quality control, ERQC) oluşturan önemli yapı taşlarıdır. ERQC sistemi ile yeni oluşan bir proteinin doğal konformasyonuna dönüşümü gerçekleşir. Uygun bir şekilde katlanan proteinler veziküler taşıyıcılar vasıtasıyla Golgiye taşınırlar ve buradan ya plazma membranına veya lizozomal membrana ya da salgılanmak için granüllerin içine yüklenirler (Şekil 2.8). ERQC sisteminin seçici şaperonları ve ER degradasyon artırıcı α mannozidaz benzeri protein (ER degradation- enhancing α mannosidase-like protein, EDEM) gibi spesifik mannoz lektinler uygun olmayan, yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinleri etiketler. Bu durum proteinlerin tanınmalarını ve SEC61 translokonu vasıtasıyla sitozole retrotranslokasyonu kolaylaştırır [22].



Şekil 2.8. Endoplazmik Retikulumda protein sentezi ve salgılanması [23].

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi (ERS)

Oldukça aktif olan ER'nin kompleks işlevleri, hem hücre içindeki hem de mikroçevresindeki faktörlerden etkilenir. Örneğin, glukoz yoksunluğu, viral enfeksiyonlar, hipertermi, kalsiyum dengesindeki değişiklikler, hipoksi, artan protein sentezi gibi faktörler ER homeostazını bozar ve protein katlanmalarında hasarlara neden olur. Böyle bir durumda yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinler ER'de birikir. Sonuç olarak hücrede endoplazmik retikulum stresi (ERS) meydana gelir [24].

ER, hücre sel iyileşme ve hayatta kalma mekanizması olarak, strese UPR ile karşılık verir. Yanlış katlanan proteinler GRP78 ve GRP94 gibi polipeptid bağlayıcı proteinler tarafından doğru konformasyonda katlanmaları sağlanır. Tamir edilemeyen proteinler ise, hücre dışına iki ayrı mekanizma ile çıkarılır. Bu mekanizmalardan ilki 'Endoplazmik Retikulum İlişkili Bozunma (ER-Associated Degradation-ERAD)'dır. ERAD aracılığı ile fonksiyonel olarak uygun konformasyonlarını kazanamayan proteinler sitozole geri taşınır ve parçalanmaları için proteozomlara teslim edilir. İkinci mekanizma ise hasarlı proteinlerin hücre sel artıklar ile bir araya gelerek oluşturdukları agregomun otofaji yardımıyla geri dönüştürülmesidir [25]. Bu mekanizmalar UPR tarafından düzenlenir. Akut durumda meydana gelen fizyolojik bir yanıt olan UPR, çözümlenemeyen kronik ERS koşulları altında patolojilere yol

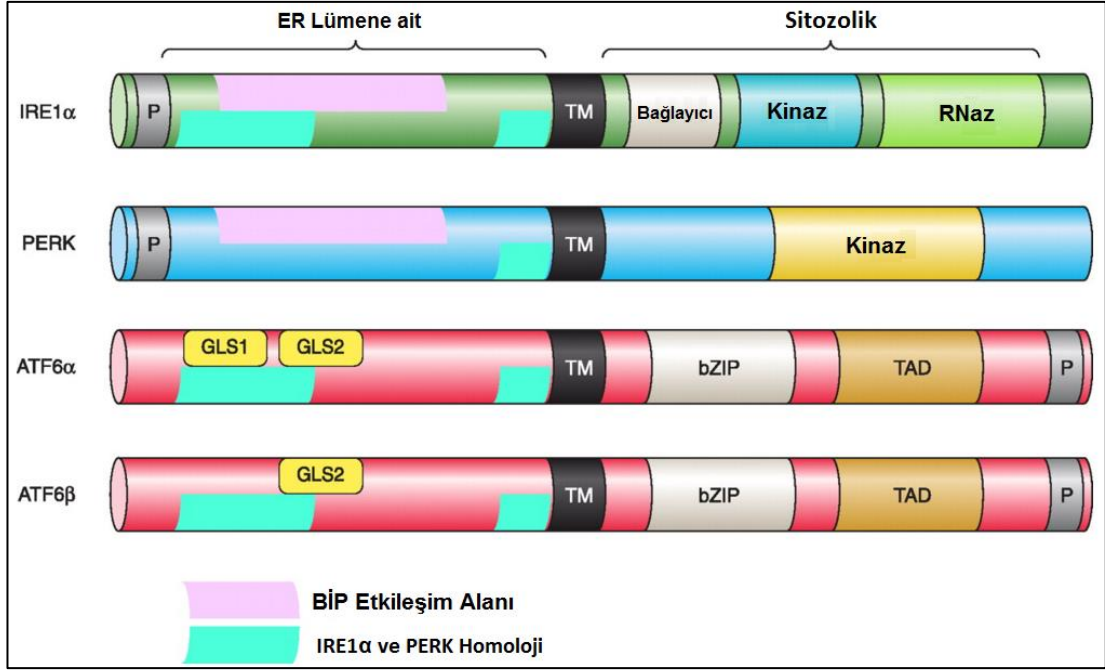
açtığı gibi hücrenin ölümüne de neden olabilir [26]. Hücre kaderini belirlemede etkili olduğu için tedaviye yönelik pek çok çalışmanın odak noktasıdır.

2.4. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)

Katlanmamış ya da yanlış katlanmış ve mutasyona uğramış proteinlerin birikmesi, hücrel redoks düzenlemesinde bozulmalar, endojen reaktif oksijen türlerinin oluşumu, hipoksi, hiperglisemi ve hiperlipidemi, kalsiyum regülasyonunda bozukluk ve viral enfeksiyonlar stres sinyali olarak davranır ve ER homeostazını etkileyerek ER'yi işlevsiz hale getirir. ER bu tür sinyallere, katlanmamış protein cevabı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen koruyucu ya da adaptif bir mekanizma ile karşılık verir. UPR, ER homeostazını normale döndürmeyi amaçlar. Buna karşın, stres çok şiddetli ise ya da sürekli devam ederse, ER hücreyi ölüme yönlendirebilir [5].

UPR hücrel homeostazın devamlılığını sağlasa da, devam eden sürekli ERS patolojik durumların oluşmasına neden olabilir. Stres sinyalleri ile ER'de aşırı miktarda protein birikimi Alzheimer [27] ve Parkinson hastalığı [28], aterosklerozis [29], diyabet [30], kardiyovasküler hastalıklar [31], kanser [32] ve oto immün hastalıklar [33] gibi hastalıkların gelişiminde etkin rol oynadığı yapılan çok sayıda çalışmada kanıtlanmıştır.

UPR sinyali ER'de bulunan üç farklı transmembran protein tarafından düzenlenir. Bunlar: (1) protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), (2) aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve (3) inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1)'dir (Şekil 2.9) [4]. UPR dönüştürücü proteinleri normal koşullarda ER lümeninin yanında bulunan ve bir şaperon olan immunglobulin ağır zincir bağlayan protein/glikoz ile düzenlenen protein 78 (BİP/GRP78)'e bağlı durumdayken inaktiftirler. ER stresi meydana geldiğinde BİP/GRP78, yanlış katlanmış lümene ait proteinlerle etkileşime girmek için PERK, IRE1 α ve ATF6'dan ayrılarak bu proteinlerin aktif hale gelmelerini sağlar [34].



Şekil 2.9. UPR’de rol oynayan ER transmembran sensörleri [35].

2.4.1. PERK Sinyal Yolağı

PERK, C-terminal sitozolik domaininde serin/threonin kinaz aktivitesine sahip tip 1 ER transmembran proteinidir. PERK’in lumenal domaininden GRP78/BİP’in ayrılması ile kinaz domaini otofosforillenir ve dimerizasyonu gerçekleşir (Şekil 2.9). Böylelikle PERK, aktif hale gelir. PERK’in aktivasyonu ile birlikte downstream efektörü olan ökaryotik başlatıcı faktör 2 alfa (eIf2 α) fosforillenir. ER’ye gelen yeni protein yükünü hafifletmek ve hücrenin hayatta kalımını sağlamak için genel protein translasyonu azaltılır (Şekil 2.10) [6]. Bununla birlikte; 5’ transle olmayan bölgelerinde iç ribozomal giriş bölgesi (IRES) gibi bazı düzenleyici sekansları taşıyan genler, eIf2 α bağımlı translasyonel engeli geçebilirler [7]. Bu genlerden biri aktive eden transkripsiyon faktörü 4 (ATF4)’tür. eIf2 α ’nın fosforillenmesi ile birlikte aktive olan ATF4, işlevsel UPR’ye dahil olan pek çok genin özellikle aminoasit metabolizmasında, redoks homeostazında ve ER stresi indüklü apoptozda yer alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder [36]. Örneğin, apoptotik hücre ölüm yolağının aktive olmasında rol oynayan transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteinin (CHOP) indüksiyonu ATF4’ e bağlıdır [5].

ATF4 tarafından indüklene diğer bir gende büyümenin durması ile ve DNA hasarı ile uyarılabilen protein (growth arrest and DNA damage-inducible protein, GADD34)’tür. GADD34, ökaryotik serin/treonin fosfatase protein fosfatase 1(PP1)’e bağlanarak eIf2 α ’nın defosforile olması için negatif feedback gibi görev yapar [37]. PERK’in aktive olması ile birlikte hücrenin hayatta kalması için fosforillenen diğer bir protein nükleer faktör erythroid ilişkili faktör 2 (Nrf2)’dir. Nrf2, Keap 1 ile birlikte sitoplazmik kompleks oluşturur. Nrf2/Keap 1 kompleksi stres olmayan koşullarda sitoplazmada bulunur ve ubiikitin-proteozom tarafından parçalanır. Stres

durumunda ise Nrf2 kompleksten ayrılır ve çekirdeğe taşınır. Antioksidan proteinleri ve detoksifiye eden enzimleri kodlayan genler için transkripsiyon faktörü gibi davranır [38].

2.4.2. IRE1 α Sinyal Yolağı

UPR'nin ikinci kolu inositol gerektiren enzim 1 (IRE1)'dir. IRE1, C-terminal sitozolik domaininde serin/threonin kinaz ve endoribonükleaz (RNaz) aktiviteli tip 1 ER transmembran proteindir (Şekil 2.9) [36]. IRE1'in iki homoloğu tanımlanmıştır: IRE1 α ve IRE1 β . IRE1 α vücudun tüm hücrelerinde eksprese olurken, IRE1 β intestinal epitelyum ve akciğerde ekspre olmaktadır [1].

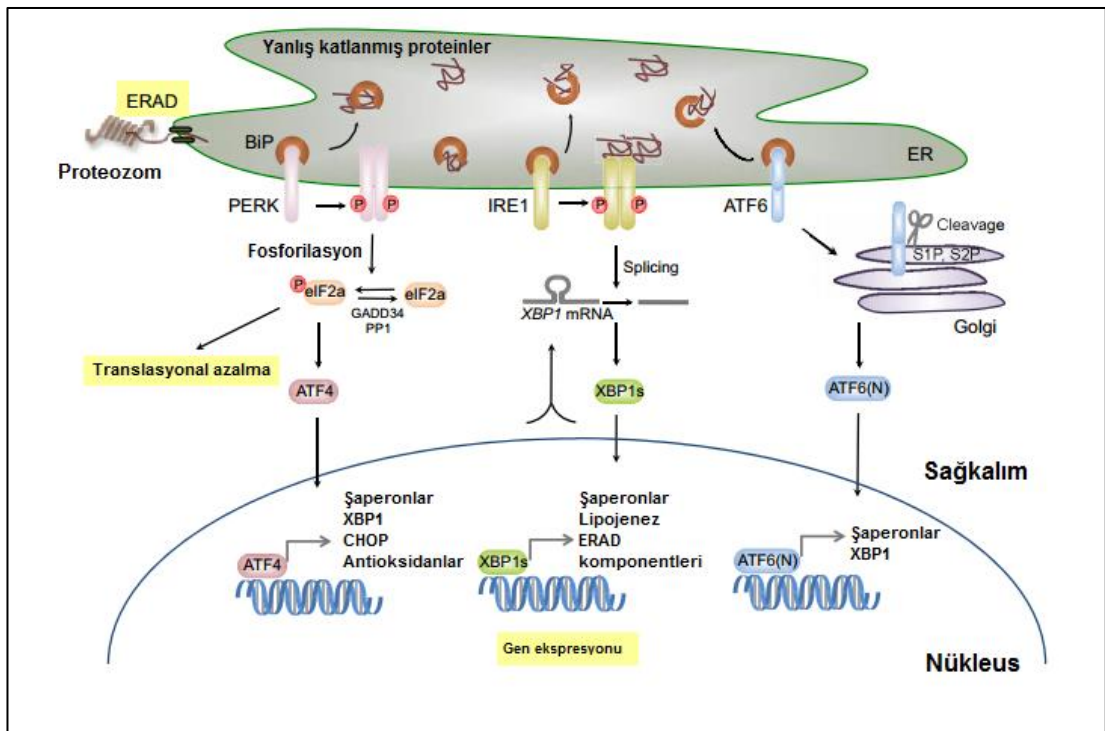
IRE1'in ER lümenal domaininden GRP78/BİP ayrıldıktan sonra, IRE1 oligomerize olur ve kinaz domaini otofosforillenir [39]. Aktive olan kinaz domaini c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive ederek kaspaz sinyal kaskadını başlatır. Ayrıca, konformasyonel değişikliğe cevap olarak IRE1 α 'nın RNaz domaini aktive olur ve X-box bağlayıcı protein-1 olarak adlandırılan transkripsiyon faktörünün mRNA' sından 26 nükleotit uzaklaştırarak Xbp-1'in spliced formu oluşturulur. Xbp-1'in spliced olmayan formu (Xbp-1u) sürekli sentezlenir. Ancak kararsızdır ve hızlı bir şekilde parçalanır. Yapılan çalışmalara göre; Xbp-1u, UPR' deki Xbp-1 yolağının potansiyel inhibitörüdür ve proteoliz ile ortamdan uzaklaştırılması uygun UPR aktivasyonu için gereklidir [40].

Nükleusa taşınan aktif Xbp-1s ise; ER şaperonlarının ve ERAD proteinlerinin ekspresyonlarını artırır. Ayrıca ER'nin genişlemesinde rol oynar [1]. Buna ek olarak; sXBP1'in hedefleri içinde HSP40 aile üyesi P58^{IPK} yer almaktadır [41]. P58^{IPK}, PERK'e bağlanarak PERK'i inhibe eder. Böylece, negatif geri bildirim döngüsü sağlanarak PERK aracılı translasyon engeli azaltılır [42]. P58^{IPK}'in artışı hemen gerçekleşmez, PERK ve eIF2 α fosforillendikten birkaç saat sonra indüklenir. P58^{IPK}'in induksiyonu UPR'nin sona erdiğini temsil eder. Bu durumda eğer UPR başarılı bir şekilde gerçekleşmişse ER normal işlevine geri döner ve hücre kurtulur. Fakat stres devam ederse P58^{IPK} tarafından azaltılan translasyon engeliyle pro-apoptotik proteinlerin sentezlenmesi söz konusu olabilir [43].

2.4.3. ATF6

UPR'nin üçüncü kolu aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6)'dır. Tip 2 ER transmembran proteindir ve yapısında bZIP transkripsiyon faktörü içerir (Şekil 2.9). Memelilerde, ATF6'nın ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki adet geni vardır [44]. Bu homolog proteinlerin, korunmuş DNA bağlayan domainleri ve farklı transkripsiyonel aktivasyon domainleri vardır. Bunlar çekirdeğe taşınır ve spesifik düzenleyici elemanlara bağlanarak GRP78 gibi ERS cevabında rol oynayan genlerin ekspresyonunu etkileyip ERS'nin çözülmesine katkıda bulunarak, hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olurlar. ATF6 α 'nın hızlı bir şekilde parçalandığı ve güçlü transkripsiyonel aktivatör olduğu, bunun yanında N-ATF6 β 'nın yavaş bir şekilde parçalandığı ve zayıf aktivatör olduğu Donna ve ark. [45] tarafından gösterilmiştir.

ATF6, N terminalinde iki adet GLS1 ve GLS2 olarak adlandırılan Golgi lokalizasyon sinyali içerir. Normal koşullarda GRP78, GLS1 ile etkileşim halinde bulunarak ATF6'nın inaktif formda kalmasını sağlar. ERS sırasında GRP78'in ayrılması ile birlikte ATF6 ER'den Golgi aygıtına taşınır. Bu süreç, GLS2 domainine ihtiyaç duyar [46]. Golgi'de ATF6 luminal domaini ve transmembran domaini sırasıyla Site 1 (S1P) ve Site 2 (SP2) proteazlar tarafından proteolize uğrar. Sonuç olarak, ATF6'nın bZIP domaini içeren N-terminal sitozolik domaini [ATF6(N)], nükleusa taşınır ve UPR hedef genlerinin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörü gibi davranır [1]. ERAD komponentlerini indükleyen ER şaperonlarının [örneğin; BİP, protein disülfid izomeraz (PDI)] ve Xbp1'in ekspresyonlarını artırır (Şekil 2.10) [36].



Şekil 2.10. ERS koşulları altında sağkalm sinyalleri [36].

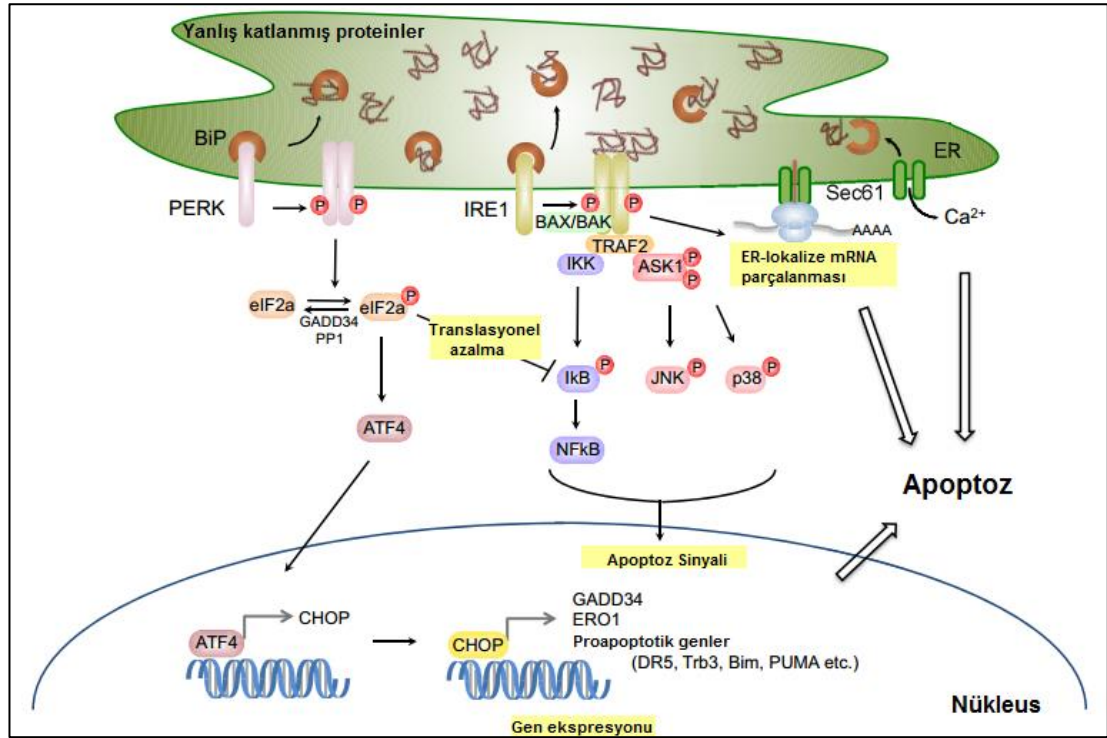
Özet olarak UPR, ER'nin protein katlama kapasitesini artırmak için ER şaperonlarını ve katalizörlerini kodlayan nükleer genlerin transkripsiyonel indüksiyonunu sağlar. ER'de biriken katlanmamış protein konsantrasyonunu azaltmak için genel translasyonu azaltarak ER'den hatalı katlanmış proteinleri kısa zamanda uzaklaştırmak için ERAD'ı düzenler. Böylece hücrenin hayatta kalımı sağlanmış olur (Şekil 2.10) [5].

2.4.4. ER Stresine Bağlı Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz, ER işlevlerinin ciddi bir şekilde zarar görmesi sonucunda hasar gören hücreleri elimine ederek organizmayı korumak amacıyla meydana gelir [47]. En az üç apoptoz yolağı bilinmektedir. Bunlardan ilki CCAAT/EBP homolog

proteinin (CHOP/DDIT3) transkripsiyonel aktivasyonudur. Şiddetli ER stresine cevap olarak, PERK-eIf2 α -ATF4 yolağı CHOP gibi proapoptotik faktörlerin transkripsiyonunu aktive eder. CHOP, bZIP transkripsiyon faktörlerinin C/EBP ailesinin bir üyesidir [36]. CHOP aynı zamanda gelişimi durdurucu ve DNA hasar indükleyici gen 153 (GADD153) ve DNA hasar indüklenebilir transkrip 3 (DDIT3) olarak bilinir. Bcl-2'nin ekspresyonu CHOP ekspresyonundan fazla olduğunda CHOP indüklü apoptozu indüklerken, CHOP ekspresyonunun fazla olması Bcl-2 proteininin azalmasına neden olur [48]. Uzun süren stres boyunca PERK ve IRE1 yolları CHOP'ta birleşerek muhtemelen birbirlerinin etkilerini artırır (Şekil 2.11). CHOP ile indüklenen apoptoz mekanizmasında ER oksidoreduktin (ER oksidoreduktin 1 α , ERO1 α), GADD34 ve TRB3 gibi hedef genler tanımlanmıştır [5].

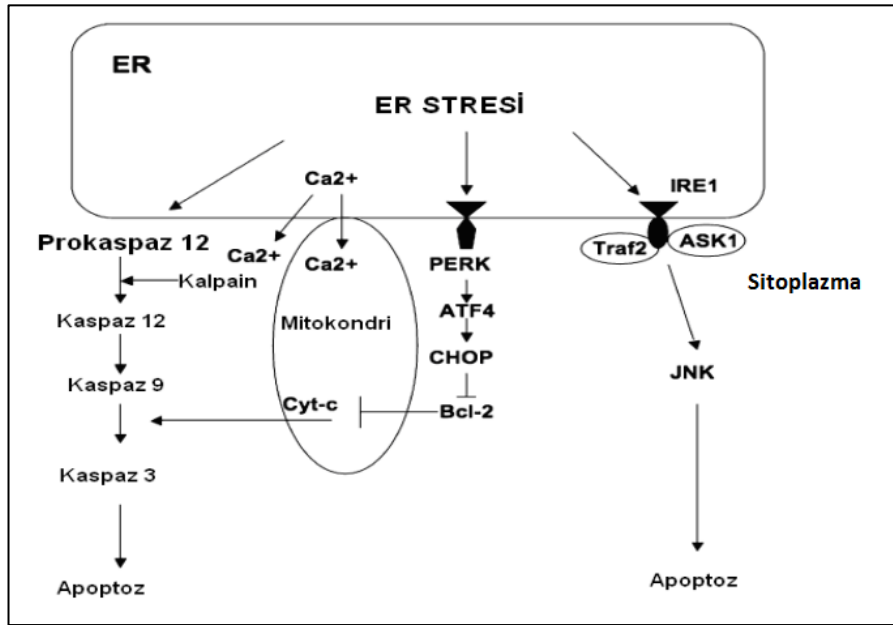
İkincisi; IRE1, tümör nekroz faktör reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1) kompleksi tarafından düzenlenen c-Jun NH2 terminal kinaz (JNK) yolağının aktivasyonudur [49].



Şekil 2.11. ER stresi koşulları altında apoptoz sinyali [36].

Üçüncüsü ise ER ilişkili Kaspaz 12'nin aktivasyonudur. Ölüm reseptörü aracılı ya da mitokondri hedefli apoptotik sinyaller tarafından aktive olmazken, ERS tarafından aktive edilmektedir. Prokaspaz 12 endoplazmik retikulumun sitoplazmik kısmında bulunur ve ER stresi ile yarıklanır ve aktive olur. Kaspaz 12 sadece rodentlerde ekspre olmaktadır. İnsandaki homoloğu evrim sırasında çeşitli mutasyonlar tarafından susturulmuştur [9]. Kalsiyum bağımlı sistein proteaz

ailesinden kalpainlerin Kaspaz 12 aktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Kalpain eksik fare embriyonik fibroblastlarında ERS ile indüklenen Kaspaz 12 aktivasyonunda azalma ve ERS ilişkili apoptoza direnç gösterdikleri gözlenmiştir [50]. Buna ek olarak IRE1'in TRAF2 aracılığıyla Kaspaz 12'nin oligomerizasyonunu ve yarıklanmasını indüklediği gösterilmiştir [51]. Kaspaz 12'den başka Kaspaz 3, 6, 7, 8 ve 9 çeşitli ERS çalışmalarında gösterilmiştir. Özellikle Kaspaz 12'nin ERS ile indüklenen apoptoza aracı olduğu ileri sürülmektedir [52]. Yarıklanmış Kaspaz 12, prokaspaz 9'un yarıklanmasına neden olur. Aktif Kaspaz 9'da Kaspaz 3'ün aktivasyonuna neden olarak apoptoz gerçekleşir [53] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Endoplazmik Retikulum Stresi ile Başlatılan Apoptoz Mekanizmaları [54].

Ayrıca, BAX/BAK gibi çeşitli proapoptotik Bcl-2 aile üyeleri IRE1 α ile etkileşime girerek, IRE1 α 'nın RNaz/kinaz aktivitesini artırır. Sonuç olarak, XBP1 spliced olur, XBP1'in hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşir, JNK fosforilasyonu ve apoptoz meydana gelir [36].

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada; Obezite, Ateroskleroz, Kalp, Karaciğer ve Nörodejeneratif hastalıklarda görülen fizyopatolojik ve metabolik değişikliklerin ERS ve UPR sinyal yolağı ile ilişkili olabileceğini gösteren birçok veri bulunmaktadır [1]. Yapılan çalışmalar; ERS'nin pankreatik β hücre hasarına ve insülin dirençliliğine katkıda bulunarak diyabet patogenezinde rol aldığı yönündedir. UPR komponentlerinin β hücrelerinde çift yönlü rolleri vardır. Fizyolojik koşullarda yararlı düzenleyiciler olarak hareket ederken, kronik stres koşullarında hücreyi apoptoza yönlendirebilmektedir. Ayrıca, ERS Tip 2 diyabette insülin dirençliliği ve obeziteyle bağlantılı olabilir. Yüksek oranda yağlı beslenme ve obezite karaciğerde ERS indükler ve insülin sinyalini JNK aktivasyonu ile baskılar. *In vitro* çalışmalar,

Tip 1 diyabette sitokinle indüklenmiş β hücre yıkımında ERS'nin rolü olabileceği yönündedir [10].

2.5. Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus (DM), insülin salgısı yokluğuna veya dokuların insülin duyarlılığında azalmaya bağlı karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozulmasını kapsayan bir sendromdur [55]. Diyabet hiperglisemi ile poliüri (çok idrar çıkarma), polidipsi (çok su içme), kilo kaybı bazen polifaji (çok yemek yeme) gibi bulgulara neden olur. Hastalığın ortak sonucu olan kan şekeri yüksekliği (hiperglisemi) kontrol altına alınmazsa zaman içinde diyabetin kronik komplikasyonları olarak kabul edilen retinopati, nefropati, periferik ve otonom nöropati gibi mikrovasküler düzeydeki problemlerden kaynaklanan sorunlar ortaya çıkar. Diyabetin varlığı, diyabete özgü olmayan koroner kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik damar hastalıkları gibi makrovasküler sorunların daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına ve daha agresif seyretmesine de neden olabilir. Böylece diyabet, hastaların yaşam kalitesini düşürdüğü gibi yaşam süresini de kısaltabilir [56].

Diyabetes mellitusun iki tipi vardır:

1. Tip 1 diyabet, insülin salgısı yokluğuna bağlıdır. İnsüline bağımlı diyabetes mellitus olarak da adlandırılır.
2. Tip 2 diyabet, hedef dokuların insülinin metabolik etkilerine duyarlılıklarının azalmasına bağlı olarak gelişir ve insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus adını alır [55].

2.5.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

Bu hastalıkta insülin yapımından sorumlu pankreasın Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin çoğunlukla otoimmün kaynaklı harabiyetine bağlı olarak mutlak insülin eksikliği gözlenir. Tip 1 diyabet, bu hastalığa genetik yatkınlığı olan kişilerde genellikle enfeksiyon, stres veya travma gibi bir olay sonrasında tetiklenmektedir. Diyabet hastalarının %5-10'u Tip 1 diyabetlidir [56].

Tip 1 diyabetin gelişiminde genetik ve çevresel faktörler etkilidir.

1. Genetik Faktörler:

HLA genlerinin Tip 1 DM gelişiminde önemli rolleri vardır. Tip 1 DM'de genetik yatkınlıktan ve koruyuculuktan sorumlu insan lökosit antijen genleri (human leukocyte antigen, HLA) genleri, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p21) yer alan majör histokompatibilite kompleksine (MHC) lokalize bölgelerdir. Bu bölgeler Tip 1 DM gelişimindeki yatkınlığın % 45-60'undan sorumlu tutulmaktadır [57, 58]. Bu genlerin Tip 1 DM gelişim patogenezindeki fonksiyonlarının tam olarak rolünün ne olduğu anlaşılmasına karşın immün cevabın gelişiminde (T hücrelerine antijen sunumu gibi) önemli fonksiyonlarının olduğu düşünülmektedir. HLA genlerinin Tip 1 DM gelişiminde önemli rolleri olduğu kadar koruyucu rolleri de mevcuttur. HLA-DR2 geninin koruyucu özelliği mevcut iken HLADR3/DR4 pozitifliğinin Tip 1 DM gelişimi için yatkınlaştırıcı genler olduğu öne sürülmüştür [57, 59].

MHC genleri, birçok HLA genlerini kapsayan class I, II ve III gen bölgeleri olarak sınıflandırılmaktadır. MHC genleri bilinen en polimorfik genlerdir. Tip 1 DM ile ilişkisi gösterilen ilk genler HLA class I genleri olup daha sonraki yapılan çalışmalarda HLA class II genlerinin de Tip 1 DM ile daha yakın ilişkisinin olduğu saptanmıştır. Şu an için Tip 1 DM gelişiminde en önemli genetik faktör HLA class II genleri olup en önemli bilinenleri HLA DR, HLA DQ, HLA DP dir. Beyazlarda HLA-DR4-DQ8 ve HLA-DR3-DQ2 haplotipleri maksimum yatkınlık sağlarken, DR2-DQ6 ve DR5'in koruyucu genler olduğu saptanmıştır. Şu an için Tip 1 DM gelişiminde en önemli genetik faktör HLA sınıf II genleri olup bilinen en önemlileri HLA-DR, HLA-DQ, HLADP'dir. HLA-DQ antijenindeki aminoasit değişikliklerinin diyabet gelişimini etkilediği saptanmıştır. Tip 1 DM hastalarının büyük çoğunluğu HLA DR3 ve DR4 sınıf II antijenlerini taşımaktadır. HLA-DR3 veya DR4 antijenlerinin varlığında Tip 1 DM gelişme riskinin 2-3 kat, her ikisinin varlığında ise riskin 7-10 kat arttığı saptanmıştır. Tip 1 DM'de yatkınlığı sağlayan HLA genleri ile ilişkili olmayan genler de tanımlanmıştır. Bunlar, diyabete yatkınlığın %10'undan sorumlu olan ve 11p5.5 kromozomda yer alan IDDM2 ile 2q33 kromozomunda yer alan ve T hücre aktivasyonundan sorumlu olan IDDM12 genleridir [57, 59].

Çevresel Faktörler:

Tip 1 diyabette otoimmün patogeneizde çevresel faktörlerin rolünü araştırmak üzere monozigot ikizlerde yapılan çalışmalar, bir kardeşinde Tip 1 diyabet olan çocuğun aynı genetik yapıya sahip diğer kardeşinde diyabet görülme oranının %30-50 olduğunu göstermiştir. Bu oran sadece genetik temelin yeterli olmadığını, otoimmün aktivasyonu tetikleyecek çevresel faktörlerin varlığının da çok önemli olduğunu göstermektedir. Sağlıklı insanlarda immün sistem efektör hücreleri kendi hücrelerini tanıırken hücresel bütünlüğü bozan birçok faktör bu immün toleransın bozulmasına neden olur. Beta hücrelerinde immün toleransın bozulmasına ve otoimmünitenin aktivasyonuna neden olan etkenlerin başında virüsler, toksinler ve bazı gıda maddeleri gelir. Virüsler (örneğin; *Retrovirus*, *Coxsackie B*) beta hücrelerini enfekte ederek ya da enfekte etmeden yıkıma uğrattırırken, bakteriyel bazı toksinler [örneğin; streptozotosin (STZ), alloksan, vakor] bir süper antijen olarak T hücre reseptörünün VB bölgesi ile antijen sunan hücre yüzeyindeki MHC Class II molekülü arasında bağlanmayı sağlayarak otoimmün yıkımı başlatabilir [60].

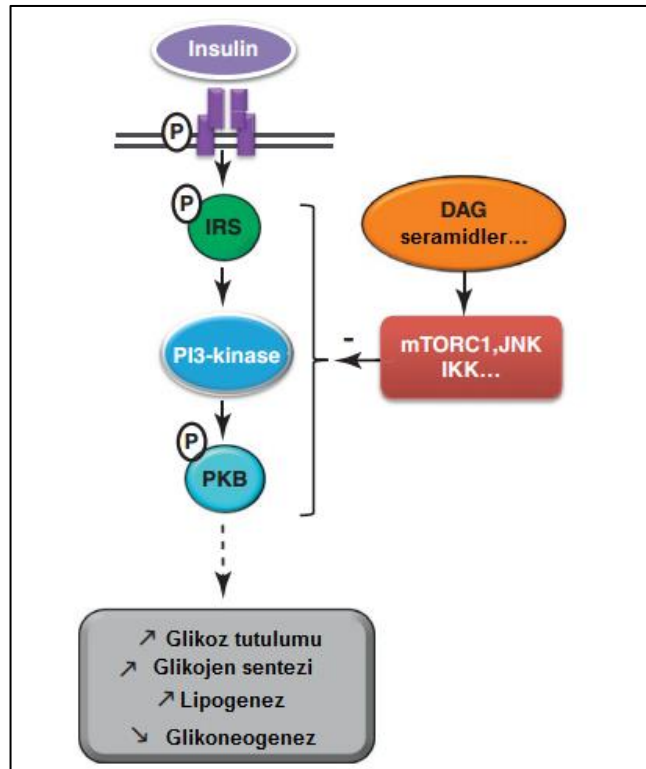
2.5.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus'un %80-90'ı Tip 2 diyabettir. Tip 2 DM insülin direnci ve beta hücresi insülin salgı kusuru birlikteliği ile ortaya çıkar [60]. İnsülin direnci, normal miktarda insülinin hedef dokulardaki duyarlılığının beklenenden az olmasıdır [55]. Direnç oluşmasında, genetik etkinin yanı sıra, genetik olmayan etkiler de yer alır. Genetik dışı etkilere örnek olarak düşük doğum kilosuna, obezite ve yaşam tarzı verilebilir [60].

İnsülinin hedef dokuları karaciğer, kas ve yağ dokusudur. İnsülin karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glikoz üretimini baskılar. Aynı zamanda glikozun kas ve yağ dokusuna alımını ve burada enerji kaynağı olarak depolanmasını sağlar. İnsülin direnci gelişen ortamda, insülinin karaciğer, kas ve yağ

dokusundaki bu etkilerine karşı direnç oluşur ve gerek hepatik glikoz çıkışında artış (hepatik insülin direnci) gerekse kas ve yağ dokusu içine alınamayan glikoz (periferik insülin direnci) ile kanda hiperglisemi gelişir. Hiperglisemiyi kompanse etmek için beta hücresinden daha fazla insülin salınımı gerçekleşir. Fakat beta hücresi de fonksiyonlarını kaybetmeye başladığında insülin salınım eksikliği ve sonucunda diyabet meydana gelir [60].

İnsüline hassas dokularda, insülin insülin reseptörüne bağlanır ve reseptör otofosforillenir. Aktive olan reseptör, adaptör moleküller olan insülin reseptör substrat 1 ve 2 (IRS1 ve 2)'yi fosforiller. Bu fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3-kinaz)'ın aktivasyonunu sağlar. Sonra insülinin anabolik faaliyetlerine dahil olan Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), protein kinaz C (PKCs) ve protein kinaz B (PKB) yollarının aktivasyonu gerçekleşir. İnsülin sinyalinin bozulması, insülin dirençliliğinde görülen bir durumdur ve insülin sinyal yolağının çeşitli düzeylerinde meydana gelebilir. Öncelikle, IRS proteinlerinin insülin ile indüklenen aktivasyonu IRS tyrosine rezidülerinin yerine serin rezidülerinin fosforillenmesi ile susturulur. Serin rezidülerinin fosforillenmesi bazı kinazların aracılığı ile olur. Bunların içinde mTORC1, c-jun N-terminal kinaz (JNK), çift sarmallı RNA aktive eden protein kinaz (PKR), K kinaz inhibitörü (IKK) ve PKCs'ler yer alır. Bunlarda (lipid ikinci taşıyıcıları) seramidler, DAG, proinflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri tarafından aktive edilir (Şekil 2.13) [61].



Şekil 2.13. İnsülin sinyal yolağı [61].

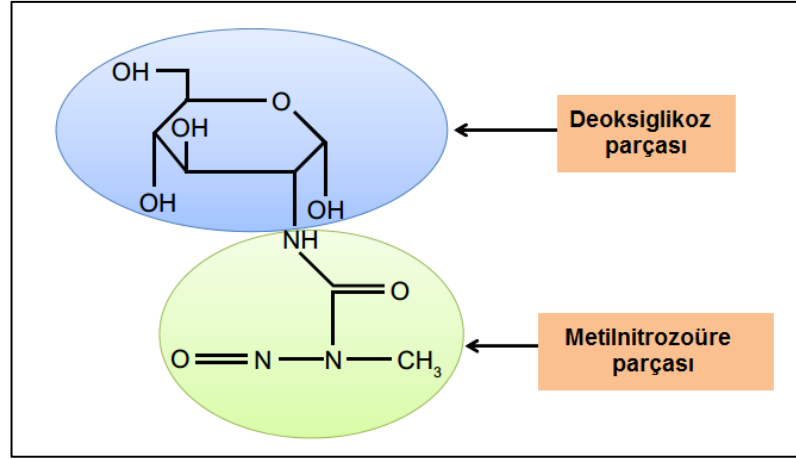
2.5.3. Deneysel Diyabet Modelleri

Diyabetin etiyopatogenezinin ve patolojisinin araştırılmasında, tedavisinde diyabetik hayvan modelleri kullanılmaktadır. Oluşturulan hayvan modelleri ile hem zaman probleminin üstesinden gelinir hem de diyabet sonucu meydana gelen komplikasyonların mekanizması kolaylıkla incelenir. İnsandaki diyabete benzer sendromlar birçok hayvan türünde farklı uygulamalar ile oluşturulmaktadır. Biyomedikal çalışmalarda sıklıkla kullanılan diyabet modelleri:

- Kimyasal yolla oluşturulan diyabet: Streptozotocin (STZ), Alloksan (ALL) ve ferrik nitrilotriasetat (Fe-NTA) deneysel diyabet oluşturmak için kullanılan kimyasallardır [62]. Bu kimyasal ajanlardan STZ diğerlerine göre daha uzun yarı ömre sahiptir (15 dakika), hiperglisemi daha uzun süre devam eder ve modelde görülen ölüm oranı da daha azdır [63].
- Spontan (genetik yolla) diyabet: Bu modelde puberteden hemen sonra diyabetik fenotip gösteren BB sıçanlar, *insülin 2* geninde mutasyon olan Akita fareler ve leptin reseptöründen tyksun Zucker diyabetik şişman sıçanlar kullanılmaktadır.
- Viral diyabet: Beta hücre yıkımını başlatan virüsler (coxsackie B virüs, encephalomyocarditis virüs ve Kilham sıçan virüs) kullanılır.
- Cerrahi diyabet: Pankreasın tamamen cerrahi olarak çıkartılması (pankreatektomi) ile diyabetin indüklendiği az tercih edilen diğer bir tekniktir [64].

2.5.3.1. Streptozotosin (STZ) ile İndüklenmiş Diyabet Modeli

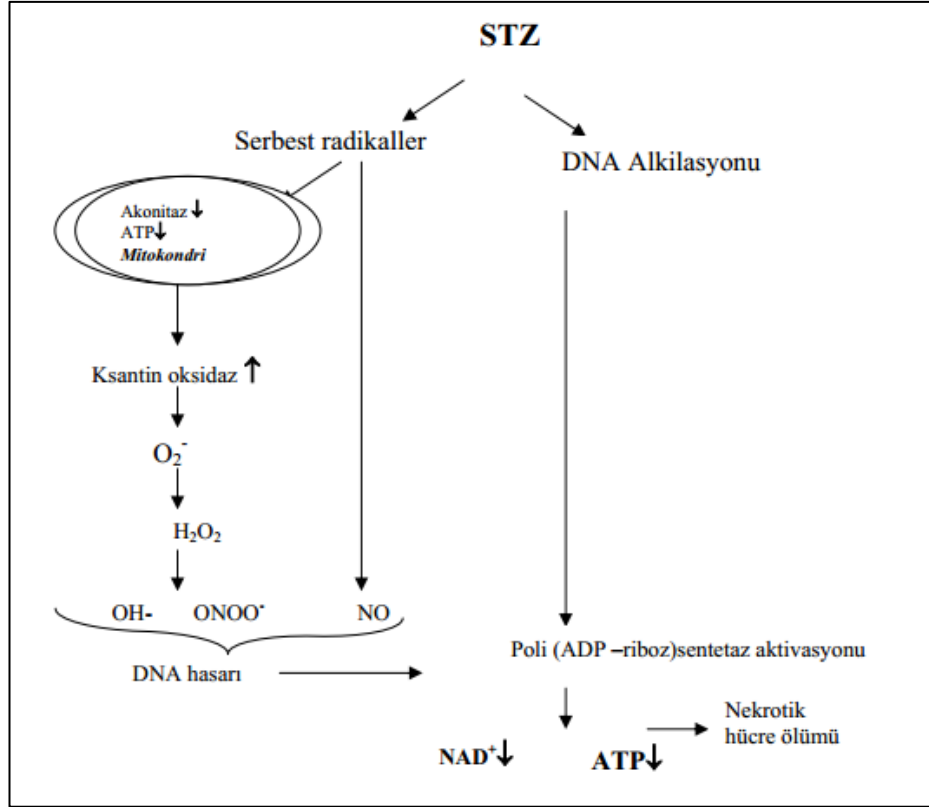
Streptozotosin (STZ), rodentlerde deneysel diyabetin indüklenmesinde yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. STZ tek başına veya diğer kimyasallar ya da diyetsel manipülasyonlar ile birlikte uygulanarak hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabet indüklenebilir. Rodentlerde Tip 1 diyabet tek STZ enjeksiyonu ile indüklenirken, Tip 2 diyabeti indüklemek için en az üç tane yöntem vardır. Bunlar: Nikotinamid uygulamasından sonra STZ enjeksiyonu, düşük doz STZ enjeksiyonunu takiben yüksek yağlı diyet ile besleme ve neonatal periyot sırasında STZ enjeksiyonudur. STZ'nin hazırlanması ve enjeksiyonları için standart bir protokol yoktur. Diyabetik durum hayvanların yaşına, cinsiyetine, vücut ağırlıklarına, türlere ve ırklara göre çeşitlilik göstermektedir [65]. Çoğunlukla farelerde oluşturulan diyabet modelinde kullanılan STZ ya tek yüksek doz olarak 100 ile 200 mg/kg⁻¹ aralıklarında [63] ya da çoklu düşük doz olarak 20 ile 40 mg/kg⁻¹ aralıklarında arka arkaya 5 gün boyunca i.p. olarak uygulanır [66].



Şekil 2.14. Streptozotocinin Kimyasal Yapısı [65].

STZ (2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozoüre)-D-glikopiranoz) *Streptomyces achromogenes* bakterisi tarafından üretilen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Kimyasal yapısında bir glikoz molekülü (deoksi formda) içerir ve bu kısım STZ'nin sitotoksik etkisini ortaya çıkardığını düşünülen metilnitrozoüre fonksiyonel parçasına bağlı durumdadır (Şekil 2.14). Glikoz fonksiyonel parçası kimyasal pankreatik beta hücrelerine yönlendirir [65].

STZ intraperitonel (i.p.) ya da intravenöz (i.v.) olarak uygulandıktan sonra, pankreatik β hücrelerine GLUT2 taşıyıcısı ile girer ve metilnitrozoüre fonksiyonel parçası ile DNA'yı alkiler. Metil grubunun STZ'den DNA molekülüne transferi DNA fragmentasyonu ile sonuçlanan hasara neden olur. DNA'yı tamir etmek için, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) uyarılır. Bu enzim, nikotinamid adenin dinükleotit moleküllerini kullandığı için hücresel NAD⁺ tükenir ve sonuç olarak ATP depolarında eksilir. Hücresel enerji depolarının tükenmesi β hücre ölümü ile sonuçlanır. STZ proteinleri metilleyerek β hücrelerindeki işlevsel hasarlara katkıda bulunsa da, DNA metilasyonu β hücre ölümünden sorumludur [67]. Mitokondrideki ATP'nin defosforilasyonunun artması ile süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olan substratlar açığa çıkar. Bu substratlardan ksantin oksidaz aracılığı ile hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri meydana gelir. STZ Krebs döngüsünü de inhibe ederek, mitokondrinin oksijen tüketimini azaltır. STZ maruziyeti sonucu fazla miktarda NO oluşur ve bu durum akonitaz aktivitesini inhibe eder. Sonuç olarak DNA hasar görür ve β hücreleri makrofajlar tarafından parçalanır (Şekil 2.15) [68].



Şekil 2.15. Rodent pankreasına ait β hücrelerinde STZ ile indüklenmiş toksik olayların mekanizması [68].

2.5.4. Diyabetes Mellitusta UPR'nin Rolü

Diyabetes mellitus, dünya çapında önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonunun yaptığı açıklamaya göre 2014 yılı sonu itibarı ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 387 milyon iken bu sayının 2035 yılında 592 milyona ulaşması beklenmektedir [69]. Hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin patojenik mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Son yapılan çalışmalar, ERS ve/veya UPR sinyalinin diyabet patogeneğinde önemli rol oynadıklarını göstermektedir [70, 71].

Önemli endokrin hormonlardan biri olan insülin vücuttaki glukoz, lipid ve protein homeostazını kontrol eder [72]. ER, insülin biyosentezinde önemli rol oynar. İnsülin geni preproinsülin polipeptidini kodlar. ER membran üzerinde bulunan sinyal tanıma partikülü ve preproinsüline bağlı sinyal peptid arasında gerçekleşen etkileşim ile sitoplazmada sentezlenen preproinsülin ER lümeninin içine taşınır. Preproinsülinin sinyal peptidi ER'de yarılr ve proinsülin üretilir. ER lümeninde proinsülin, üç disülfid bağ yardımıyla dayanıklılık ve biyoaktivite için gerekli olan protein katlanması geçirir. Doğru bir şekilde katlanan proinsülin daha sonra Golgi aygıtına taşınır ve sekretuar granüllerde paketlenir. Proinsülinde insüline dönüşümü burada gerçekleşir. Ekzositoz yolu ile olgun insülin serbest bırakılır. Dolayısı ile ER stresi, artan yanlış katlanmış proinsülin nedeniyle beta hücre işlev bozukluğunu ve diyabeti indükleyebilir [73].

UPR özellikle diyabet ve obezitede gözlenen aşırı besin yüklenmesiyle harekete geçtiği gibi, UPR'de rol alan elementler (örneğin, BİP ve IRE1) glukoz yetersizliği ile upregüle olan genlerle de ilişkilendirilmektedir [10].

Son yapılan çalışmalar PERK ve diyabet arasında bir ilişkinin olduğu yönündedir. *Perk*^{-/-} fenotipine sahip farelerde endokrin ve ekzokrin pankreas normal gelişme dahi doğumdan sonra Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinde yeterli insülin sentezinin yapılmadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla bu hayvanlarda hiperglisemi ve serumlarında insülin azlığına rastlanmıştır [70]. Yapılan başka bir çalışmada, *Perk* eksik farelerde fetal ya da yeni doğan pankreatik beta hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında çeşitli bozuklukların olduğu belirtilmiştir. Bu bozuklukların pankreatik beta hücre hacminde düşüşe, proinsülin katlanmasında hasara ve insülin sentezinde azalmaya bağlı sürekli neonatal diyabete yol açtığı tespit edilmiştir [74]. *Perk* insan Langerhans adacıklarının işlevselliğinde de öneme sahiptir. *Perk* mutasyonundan kaynaklanan nadir görülen Wolcot-Rallison sendromunda, fare modellerinde görülen benzer patolojiler olan büyüme geriliği, iskelet displazisi ve otoimmüniteye bağlı olmayan β hücre yıkımı ile başlayan erken diyabetin varlığı gösterilmiştir [75].

Lipson ve ark. kısa [76] süreli yüksek glukoz koşullarının pankreatik ada hücrelerinde UPR sinyal proteinlerinden IRE1 α aktivasyonunu indüklediği ve proinsülin sentezini artırdığını belirtmişlerdir. Buna karşın kronik yüksek glukoz maruziyetin IRE1 α 'nın aktivasyonunu artırdığını ve insülin mRNA ekspresyonunu baskıladığını gözlemlemişlerdir. IRE1 α 'nın aktivasyonunu sonucu kırılan X-box bağlayıcı protein 1 (XBP-1s)'in aşırı ekspresyonu glukoz ile uyarılan insülin sentezini bozduğu, beta hücre apoptozunu artırdığı ve insülin seviyesini azalttığı için hiperglisemik koşulların işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır. ERS duyarlı ATF6'nın karaciğer ve pankreasta glikoz metabolizmasında role sahip olduğu belirtilmiştir. Yüksek yağlı beslenmeye maruz bırakılan *ATF6 α* ^{-/-} farelerde erken gelişim ve pankreatik β hücrelerindeki azalan insülin içeriğinden kaynaklı şiddetli glukoz intoleransı gözlenmiştir [77].

UPR komponentlerinin β hücrelerinde çift yönlü rolleri vardır. Fizyolojik koşullarda yararlı düzenleyiciler olarak hareket ederken, kronik stres koşullarında hücreyi apoptoza yönlendirebilirler. Ayrıca, ERS Tip 2 diyabette insülin dirençliliği ve obeziteyle bağlantılı olabilir. Yüksek oranda yağlı beslenme ve obezite karaciğerde ERS'yi indükler ve insülin sinyalini JNK aktivasyonu ile baskılar. *In vitro* çalışmalar, tip 1 diyabette sitokinle indüklenmiş β hücre yıkımında ERS'nin rolü olabileceği yönündedir [10].

Diyabet hastalarında ERS kanıtı özellikle ERS belirteçlerinin protein ve mRNA düzeylerinin belirlenmesine dayanır. İnsanda Tip 2 diyabetin markerları fikse edilmiş pankreatik bölümlerde ve izole edilen adacıklarda gösterilmiştir. Donörlerden elde edilen adacıklar yüksek glukoz kültür ortamında ERS markerları olan GRP-78 ve XBP1'i, diyabet olmayan donörlerden alınan adacıklara göre daha fazla ekprese ettikleri gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada da Tip 1 diyabetli 13 donörden alınan pankreatik parçalarda GRP-78, XBP1 ve CHOP ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir [78]. Artan glikoz hücreye aşırı yüklenebilir, mitokondriyal ve ER işlevlerini bozabilir. Son yapılan çalışmalar ER homeostazının

bozulması durumunda β hücrelerinde proinsülin sentezinin, katlanmasının ve işleme tabi tutulmasının bozulduğu yönündedir [71].

Sonuç olarak, yapılan çalışmalar ile ERS ve UPR hem artan insülin dirençliliğine hem de azalan β hücre kitlesi gibi diyabet patofizyolojisine dahil olduğu sadece insülin bağımlı dokularda gösterilmiştir.

2.5.5. UPR Transmembran Proteinlerinin Memeli Ovaryan Foliküllerindeki Roller

Memeli ovaryan foliküllerin gelişimi boyunca, sadece limitli sayıda folikül ovulasyon için seçilmekte ve bu foliküllerin % 99'undan fazlası gelişimin çeşitli evrelerinde dejeneratif sürece girerek ve atreziye uğramaktadır [79]. Yapılan çalışmalar; memeli ovaryumlarında teka hücre dejenerasyonunu takiben foliküler atrezinin granuloza hücre apoptozu ile başlatıldığını göstermektedir. Antral foliküllerde, atrezinin erken dönemlerinde apoptotik hücreler granuloza tabakasının iç yüzeyinde gözlenir ve atrezi ilerledikçe granuloza tabakasına yayılır. Memeli ovaryumunun granuloza hücrelerinde aktif olarak tanımlanan iki bağımsız apoptotik sinyal yolağı tanımlanmıştır. Bunlardan biri ligand/ reseptör bağımlı ve diğeri ise mitokondri bağımlıdır [80]. Son çalışmalar, endoplazmik retikulumun apoptozu başlatmaya yönelik etkilerinin olabileceği üzerinedir [81].

Memelilerde, ovaryan foliküllerin anormal yüksek oranda atrezisi kronik infertiliteyle sonuçlanabilir [82]. Lin ve ark. 2012 [83] yılında *in vivo* ve *in vitro* keçi ovaryumlarında atreziye gidecek ovaryan folikül seçiminin düzenlenmesinde ER stresinin rol aldığını belirtmişlerdir. Bu çalışma, atretik foliküllerin granuloza hücrelerinde GRP-78 ve CHOP ekspresyonlarının arttığını ve bu hücrelerin Tunikamisin varlığı ya da besin yokluğunda apoptotik hücre ölümüne gittiği gösterilmiştir. Hem ATF6'nın hem de PERK/eIF2 α /ATF4 sinyali'nin granuloza hücre apoptozunda rol oynadığı belirtilmiştir.

ERS aracılı apoptotik yolağın granuloza hücre apoptozunda aktive olduğunu gösteren diğeri bir çalışmada, ER spesifik apoptoz yolağını düzenleyen UPR aktivasyonunun göstergesi GRP-78, CHOP ve Kaspaz 12 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Tunikamisin ve Thapsigargin ile apoptotik yıkım indüklenen fare granuloza hücrelerinde CHOP ve Kaspaz 12 apoptotik granuloza hücrelerinde gözlenirken, bu hücrelerde GRP-78 'e rastlanmamıştır [82].

Hyo- Jin ve ark. 2013 [84] yılında katlanmamış protein cevap (UPR) sinyal yolağının sığır östrus siklusu boyunca korpus luteum gelişiminde, devamlılığında ve gerilemesinde rol oynadığını göstermişlerdir. GRP-78, ATF6 ve XBP1 gibi UPR sinyalindeki bazı genlerin korpus luteumun gelişimi ve devamlılığında proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan moleküler şaperonlar gibi davrandığını belirtmişlerdir. Bunun yanında fosfo-IRE1 ve CHOP' un hem adaptif cevapta hem de ERS aracılı apoptozda rol oynadıkları gösterilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

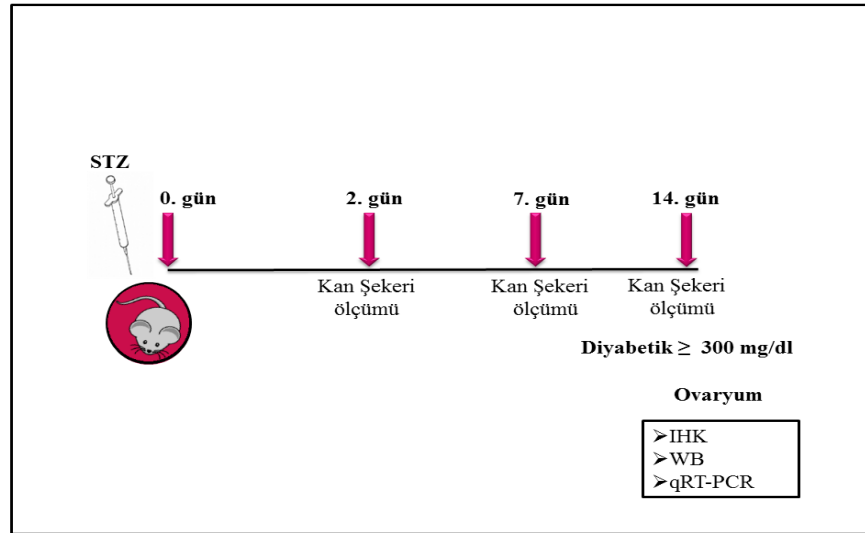
3.1. Denekler

Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen 31 adet pubertal 24 günlük Balb/C ırkı dişi fare kullanıldı. Deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu:

- 1) **Kontrol grubu;**
- 2) **Çözgen grubu;** sodyum sitrat tamponu (N5, Tri- Natrium citrate 5,5 hidrat, MERCK) (0.1M , pH 4.5) intraperitoneal olarak verilen grup (n=6).
- 3) **Diyabet grubu;** tek doz 90 mg/kg streptozotosin (STZ, S0130, Sigma Aldrich) intraperitoneal olarak verilen grup (n=15).

3.2. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabetik fare modeli oluşturmak için 24 günlük dişi farelere taze hazırlanan sodyum sitrat tamponunda çözülen STZ 90 mg/kg dozda 100µl sitrat tamponunda çözümlenerek intraperitoneal olarak enjekte edildi [85]. Diyabet modelinin takibi için enjeksiyondan sonraki 2., 7. ve 14. günlerde farelerin kuyruk veninden alınan kan örneklerinden glukometre (DIAVUE, BioCare Corporation) yardımı ile kan şekeri ölçümleri yapıldı. 14. günde kan şekeri değeri 300 mg/dl'nin üzerinde çıkan dişi fareler diyabetik kabul edilerek deneye dahil edildi. Kontrol grubuna ait dişi farelere hiçbir uygulama yapılmaz iken, çözgen grubuna aynı miktarda sitrat tamponu (100 µl) enjekte edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Diyabet fare modelinin oluşturulması ve uygulanan metodlar.

3.3. Doku Eldesi ve Hazırlanması

STZ enjeksiyonundan sonraki 14 günlük kan glukoz düzeyi takibinin ardından deneklere servikal dislokasyon ile ötanazi yapıldı. Ovaryumlar çıkarılarak, rastgele seçilen ovaryumlardan biri immünohistokimya analizi için rutin parafin doku

takibine alındı. Diğer ovaryumun üçte ikisi dondurma tüplerine alınarak western blot yöntemi uygulanmak üzere sıvı nitrojende (-196°C) saklandı. Bu ovaryumun kalan üçte birlik kısmı steril ependorflara alınarak üzerine 300 µl lizis solüsyonu konulup RNA izolasyon işlemine kadar -80°C’de derin dondurucuda saklandı.

3.3.1. Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi

Alınan ovaryum örnekleri Bouin fiksatifine içine alınarak +4 °C’de 6 saat tespit (fikse) edildi. Tespitten sonra, dokular %70’lik, %80, %90 alkol serilerinin her birinde 24 saat ve %100’lük alkolde 3 saat tutularak sudan kurtarma işlemi gerçekleştirildi. Ksilol içerisinde bir dakika bekletilerek şeffaflaştırılan dokular 58°C’lik etüvde, üç kez 1’er saat parafinize edildi. Üçüncü saatin sonunda dokular temiz parafine gömülerek parafinin oda ısısında katılaşması sağlandı.

3.4. İmmünohistokimya Yöntemi

Tüm deney gruplarındaki ERS yolağı proteinlerinin ovaryumdaki lokalizasyonlarını ve ekspresyon seviyelerini göstermek amacıyla immünohistokimyasal boyama yöntemi gerçekleştirildi.

Kullanılan Solüsyonlar

➤ **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz Solüsyonu):**

- 7.2 gr Na₂HPO₄.12H₂O (Merck)
- 0.8 gr KH₂PO₄ (Merck)
- 16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözüldü ve 2N NaOH ile pH’sı 7.4 olacak şekilde ayarlandı.

➤ **Sitrat Tamponu**

- 2.1 gr sitrik asit
- 900 ml distile su

900 ml distile suda sitrik asit çözüldükten sonra pH 6’ya ayarlandı.

➤ **%3’lük H₂O₂ Solüsyonu:**

63 ml Metanol (#1.06008.2500; Merck) ve 7 ml %35 H₂O₂ (18312, Sigma Aldrich) eklenerek alüminyum folyoya sarılı şale içerisinde hazırlandı.

➤ **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (#TA-125-UB; Thermo Scientific/LabVision)

➤ **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Antibody Diluent Reagent (003118, Invitrogen Corporation)

➤ **Streptavidin Peroksidaz Kompleksi:** Horseradish peroxidase Streptavidin (1325114A, Invitrogen Corporation)

- **Kromojen/Substrat:** DAB Kromojen (TA-012-HDC), DAB Substrat (TA-125-HDS)
- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer's Hematoxylin (#1.09249.1000; Merck)
- **Kapatma Solüsyonu:** Entellan (#1.07961.0100; Merck)

Pozitif yüklü lamlara alınan 5 mikrometre kalınlığındaki parafin kesitler 1 gece boyunca 56 °C'de etüvde bekletildi. Parafinden kurtarma (deparafinizasyon için parafin kesitler 2 kez 10'ar dakika ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 5'er dakika (%100, %90, %80, %70) bekletildi. Ardından distile su ile 5 dakika muamele edilerek yıkandı. Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler, 200 ml sitrat tamponu içine alındı ve mikrodalga fırında (665 watt) iki kez 5'er dakika tutuldu. Süre sonunda mikrodalga fırın dışına alınan kesitler 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizildikten sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisinden (PBS; pH: 7.2-7.4) geçirildi. Bir sonraki basamakta dokulardaki alkalin fosfataz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler metanolle hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika boyunca inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra spesifik olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama solüsyonu ile 7 dakika işleme tutuldu. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak kesitler primer antikoları ile +4 °C'de gece boyu inkübe edildi. Çalışmada kullanılan antikolar ve dilüsyon oranları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile üç kez beşer dakika yıkandı. Daha sonra sırasıyla, 1 saat biyotinlenmiş anti- tavşan sekonder antikoru (BA- 1000 Vector Laboratories) ile inkübe edildi ve 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkamanın ardından 20 dakika streptavidin peroksidaz kompleksi ile inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler DAB (Lab Vision TA-060-HDX) ile 2-5 dakika inkübe edildi. Daha sonra kesitler distile suya alındı ve ardından Mayer hematoksilen ile 10 saniye zıt boyama uygulanıp akar musluk suyunda yıkandı. Kesitler artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı ve ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra Entellan ile kapatılıp Axioplan ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) incelenerek fotoğraflandırdı.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antikolar ve dilüsyon oranları.

Primer Antikor	Katalog Numarası	Dilüsyon	Sekonder Antikor
BİP	#3177 Cell Signaling Technology	1:600	# BA- 1000 Vector Laboratories
PERK	bs- 3330R Bioss Antibodies	1:75	# BA- 1000 Vector Laboratories
KASPAZ 12	#2202 Cell Signalling Technology	1:100	# BA- 1000 Vector Laboratories
DDIT3	ab179823 Abcam	1:50	# BA- 1000 Vector Laboratories

3.5. Western Blot Analizi

Kullanılan Solüsyonlar

➤ **Lizis tampon solüsyonu:**

0,1M Tris: 0,6 gr Tris (#1.08387.0500; Merck) 40 ml bidistile suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim bidistile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Sodyum-ortoovanadate: 0.184 gr Na-orthovanadate (#L4390; Sigma Aldrich), 10 ml Tris (pH 10) (0.1M tris:0.6gr/50ml) ile ateş üzerinde çözüldü.

Lizis tamponunu hazırlamak için ise 10 ml 0.1M Tris (pH 7.4), 90 ml bidistile su, 1 ml Na-orthovanadate karıştırıldı. Hazırlanan solüsyona 1 gr SDS (Katalog No: #161-0302, BIO-RAD) eklendi ve lizis tamponu elde edildi.

➤ **Proteaz inhibitör kokteyli (#P8340; Sigma Aldrich)**

➤ **%30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu:** 15,4gr 37.5:1 oranındaki akrilamid- bisakrilamid ACRYL/BIS 37.5:1, #1052C146, Amresco) 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü.

➤ **4Xtris-HCL/SDS, pH 8.8:** 18.15 gr Tris, 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü pH 8.8'e ayarlandı. Ardından bidistile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0.4 gr SDS eklendi.

➤ **4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8:** 6.05 gr Tris, 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 6.8'e ayarlandı. Ardından bidistile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0.4 gr SDS eklendi.

➤ **%10'luk Amonyum-persülfat (APS):** 0,1 gr toz APS (#7727-54; Amresco) , 1 ml distile su içerisinde çözüldü.

➤ **N,N,N''',N'''-Tetramethylethylenediamine (TEMED)** (#BCBH1254V; Sigma Aldrich)

➤ **Ayrıştırıcı (Seperating) Jel:**

Ayrıştırıcı (Seperating) Jel	%7,5'lik Tris-HCl Jel	%15'lik Tris-HCl Jel
%30 Akrilamid-bisakrilamid	3,75 ml	7,5 ml
4X Tris-HCL/SDS, pH 8.8	3,75 ml	3,75 ml
Distile su	7,5 ml	3,75 ml

Yukarıda verilen solüsyonlar 15 ml'lik Falcon tüpünde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyon sağlayacak olan;

0,05 ml %10'luk Amonyum-persülfat (APS)

0,01 ml TEMED

solüsyonları eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldıktan sonra jel karışımı 2 cam plaka arasına döküldü. Yaklaşık 45 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

➤ **Toplayıcı (Stacking) Jel:**

650 µl %30 akrilamid-bisakrilamid

1250 µl 4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8

3050 µl bidistile su

Yukarıda verilen solüsyonlar 15 ml'lik Falcon tüpünde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyon sağlayacak olan;
25 µl %10'luk Amonyum-persülfat (APS)
5 µl TEMED
solüsyonları eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldı ve jel karışımı 2 cam plaka arasına döküldü. Ardından uygun genişlikteki tarak jel içerisine yerleştirildi.

➤ **5X Elektroforez yürütme solüsyonu:**

9 gr Tris

43.2 gr Glisin (#5.00190.1000; Merck)

3gr SDS (#161-0301; BioRad)

600 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 8.3-8.6'da olacak şekilde ayarlandı.

1X Elektroforez yürütme solüsyonu: 5X stok solüsyondan 140 ml alındı ve 560 ml distile su ile 700 ml'ye tamamlandı.

➤ **Transfer Tampon Solüsyonu (Blotting Buffer):**

➤ 3 gr Tris

➤ 14.3 gr Glisin

800 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7.8-8 arasında olacak şekilde ayarlandı. Solüsyona daha sonra 200 ml metanol (#1.06008.2500; Merck) eklendi. +4 °C'de soğutulmuş olarak kullanıldı.

➤ **10 X Tris Tamponlu Tuz (Tris Buffered Saline-TBS) Solüsyonu:**

60.55 gr Tris

87.66 gr NaCl (#1.06404.1000; Merck)

800 ml distile suda çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

1X Tris Tamponlu (Tris Buffered Saline)-Tween 20 (TBS-T) Solüsyonu:

100 ml 10X TBS solüsyonuna 900 ml distile su eklenerek 1X TBS hazırlandı. Daha sonra 1 litre 1X TBS'e 1 ml Tween 20 (#8.22184.0500; Merck) eklenerek TBS-T çalışma solüsyonu hazırlandı.

➤ **Bloklama Solüsyonu:**

%5'lik süt tozu: 5 gr. süt tozu (#170-6404; BioRad) 100 ml TBS-T içerisinde çözümlenerek hazırlandı.

➤ **Chemiluminescent solüsyonu:** (#34080 ; Thermo Scientific)

Luminol/geliştirici solüsyon ve sabitleme solüsyonu 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

➤ **Membran Soyma (Stripping) Solüsyonu** (#46430; Thermo Scientific)

➤ **Geliştirme (Developer) Solüsyonu:** 100 ml geliştirme solüsyonuna (#175 7314; Liford), 900 ml distile su eklenerek hazırlandı.

➤ **Sabitleme (Fiksatif) Solüsyonu:**

50 ml sabitleme solüsyonuna (#1984565; Liford) 450 ml distile su eklenerek hazırlandı.

3.5.1. Lizat Hazırlama

Doku temini esnasında dondurma tüpleri içine alınan ve sıvı nitrojende (-196°C) saklanan ovaryumlar seramik boncuklar içeren tüplere (MagNA Lyser Green Beads, Roche) alındı. Üzerine 300 µl lizis solüsyonu ve 5 µl proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Magna Lyser (03358968001, Roche) cihazında 6500 rpm'de 45 saniye santrifüj edilerek doku parçalama işlemi yapıldı. Daha sonra seramik boncuk içeren tüpler 15000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp çökelti kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20°C de saklandı.

3.5.2. SDS-PAGE Western Blot protokol

Protein miktarları distile su, örnek ve laemmli buffer (Sample Buffer 2X, Laemmli electrophoresis Reagent, Sigma, Katalog No: S-3401) oranları ile eşitlenen örnekler 5 dakika 95 °C'de kaynatıldı. Çalışılacak olan proteinlerin ve internal kontrol olarak kullanılan Beta aktin proteininin kilo dalton ağırlıkları dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. PERK, BİP ve XPB-1 için %7,5'lik, DDIT3 ve KASPAZ 12 için % 15'lik poliakrilamid jel hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µl örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklenerek Protean Tetra Cell, Mini Trans Blot Modül (# 165-8033; Biorad) tankının içine yerleştirildi. 1X elektroforez yürütme solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 80 Voltta 120-150 dakika elektroforez edildi.

Elektroforezin ardından jeldeki proteinleri PVDF membrana (polivinilidinden diflorür) membrana (#162-0177; Biorad) aktarmak için immunoblotlama yapıldı. Bu aşamada PVDF membran, üstte ve altta ikişer adet filtre kağıdı ve birer adet sünger olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. Jelde yürütülen proteinler, hazırlanan sandviçte PVDF membranın üzerine alınarak tekrar mini protean III sistemindeki tank içerisine alındı. Protean Tetra Cell, Mini Trans Blot Modül tankına transfer tampon solüsyonu eklenerek 32 Voltta +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması gerçekleştirildi.

Proteinlerin PVDF transferinden sonra, membran oda ısısında TBS-T ile yıkama yapıldı. Ardından membran 45 dakika oda ısısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile blokladı. Membranlar, BİP, PERK, KASPAZ 12, XBP-1s, DDIT3 antikoru (Çizelge 3.2) +4°C'de gece boyu, β-aktin primer antikoru oda sıcaklığında 2 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Membranlar, HRP-konjuge antitavşan IgG (Vector) sekonder antikoruyla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi (Çizelge 3.2) İnkübasyon sonrasında TBS-T ile tekrar 3 kez 10 dakika yıkama yapıldı. Membranlar SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde filme (Amersham Hyperfilm TM ECL 18X24 cm) aktarıldı. Görüntüleme amacıyla film, geliştirici ve tespit solüsyonlarından geçirildi ve distile su ile yıkanıp kurutuldu.

Çizelge 3.2. Western blot deneyinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Primer Antikor	Katalog Numarası	Dilüsyon	Sekonder Antikor
BİP	#3177 Cell Signaling Technology	1:500 (%5'lik süt tozu ile hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
PERK	bs- 3330R Bioss Antibodies	1:250 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
XBP-1s	#12782 Cell Signaling Technology	1:500 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
KASPAZ 12	#2202 Cell Signalling Technology	1:500 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
DDIT3	ab179823 Abcam	1:250 (TBS-T'de hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories
BETA AKTİN	#4970 Cell Signaling Technology	1:1000 (%5'lik süt tozu ile hazırlandı)	# PI-1000 Vector Laboratories

3.6. Kantitatif Real Time RT-PCR Analizi

3.6.1. Ovaryumlardan Total RNA İzolasyonu

Deneklerden alınan (deney gruplarındaki her bir fareden alınan bir ovaryumun üçte biri kadarlık kısmı) ovaryumlardan total RNA izolasyonu RNAqueous-Micro (Micro Scale RNA Isolation Kit) kiti kullanılarak aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirildi.

1. Ovaryumlar, steril 0.5 ml'lik tüplere alındı ve üzerine 300 µl lizis solüsyonu konulup, RNA izolasyon işlemine kadar -80 °C'de saklandı.
2. RNA izolasyonu için -80 °C'de saklanan örnekler çözüldükten sonra pipet ucuyla önce mekanik parçalanma gerçekleştirildi. Sonra vorteksle karışması sağlanarak homojen bir solüsyon elde edildi.
3. Ayrı bir ependorf tüpe bu solüsyondan 100 µl alındı ve üzerine 50 µl etanol (1.00986.2500, Merck) konuldu ve vorteksle iyice karıştırıldı.
4. Lizat ile etanol karışımı belirli bir por çapına sahip filtre içeren tüpe mikropipetle konuldu, 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Böylece karışımdaki RNA'ların filtreye tutunması sağlandı.
5. Mikropipetle yıkama solüsyonu-1'den 180 µl çekilip, filtrenin üzerine konuldu ve tüpler 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
6. Yıkama solüsyonu-2'den çekilen 180 µl ile filtre tekrar yıkandı ve tüpler 13000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

7. Filtre ilk tüpten alınıp, ayırma tüpüne yerleştirildi. +4 °C'de saklanan ve kullanım öncesi 75 °C'ye ısıtılan ayırma solüsyonundan 7µl alınıp, filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konuldu. Tüplerin kapağı kapatılıp, oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra; 13000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem tekrarlandı. Böylece RNA'ların mikro ayırma tüpünün dibine toplanması sağlandı.
8. Ayırma tüpünün dibinde toplanan ve RNA'yı içeren yaklaşık 13 µl'lik kısım steril 0.2 ml'lik tüplere alındı.
9. İzole edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması için bu karışımın hacminin %10'u kadar 10x DNaz I tamponu (1.3 µl) ve 1µl 10x DNaz I kondu ve 35 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
10. Total hacimin %10'u DNaz I inaktivasyon solüsyonu eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kısa bir süre vortekslendi. Tekrar 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 1300 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası RNA'yı içeren süpernatantlar, yeni steril 0.2 µl'lik tüplere alındı.

3.6.2. Ovaryumlardan cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

cDNA eldesinde Ambion RETROscript (Ambion, AM1710) kiti kullanıldı. Uygulanan basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

1. Ovaryumlardan elde edilen total RNA içeren tüplere 2 µl random dekamer eklendi.
2. RNA ve random dekamer karışımı, 85 °C'de 3 dakika inkübe edilerek, sekonder RNA kıvrımlarının açılması sağlandı.
3. Her bir tüpe, homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Elde edilen karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu (Çizelge 3.3).
4. Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklenerek, 44 °C'de, 60 dakika inkübe edildi. Ardından 92 °C'de 10 dakika bekletildi.
5. Bu aşamalardan sonra elde edilen cDNA'lar, qRT-PCR'de kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Çizelge 3.3. cDNA eldesinde kullanılan içerikler.

Reaktantlar	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10X RT Tamponu	2	1X
dNTP mix	4	0.5 mM/ her bir dNTP
RNaz inhibitörü	1	10 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
MMVL- geri transkriptaz	1	100 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
Toplam	8	

3.6.3. Kantitatif Real Time RT-PCR Uygulama basamakları

Çalışmada her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen beta aktin gen ekspresyonu temel alınarak, diyabetik, kontrol ve çözgen gruplarından elde edilen ovaryumlardaki *Bip/Grp78* ve *Ddit3/Chop* genlerinin görelî kantitatif ekspresyon düzeyleri belirlendi. Kantitatif real-time PCR uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. Aşağıdaki çizelge 4'te belirtilen reaktantlar konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Çizelge 3.4. qRT-PCR uygulamasında kullanılan içerikler.

Karışım İçeriği	Hacim (µl)
2x SybrGreen Süper Karışım	12,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Nükleaz İçermeyen Su	10,5
cDNA	1
Toplam	25

2. GRP78, CHOP ve beta aktin genleri için gerçek zamanlı PCR uygulaması üç kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR aşamasında kullanılan primerler, Çizelge 3.5'te verildi.

Çizelge 3.5. qRT-PCR tekniklerinde kullanılan primer dizileri.

Genin adı	İleri primer (F)	Geri primer (R)	PCR ürün büyüklüğü (bp)
<i>Grp78/Bip</i>	'GAGGTGGGCAAACCAAGACATT'	'TCGCTGGGCATCATTGAAGTAAG'	146
<i>Ddit3/Chop</i>	'TCTTGACCCTGCGTCCCTAG'	'TGGGCACTGACCACTCTGTTT'	172
<i>Aktin</i>	'TGCGTGACATCAAAGAGAAG'	'CGGATGTCAACGTCACACTT'	244

3. *Grp78*, *Chop* ve *Beta aktin* genleri için hazırlanmış örnekler kantitatif gerçek zamanlı PCR aletinde (Bio-Rad, iCycler Q Detection System, Hercules, CA, ABD) analiz edildi.

Amplifikasyon, 30 siklusta gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyonu: 95 °C'de 5 dakika; 30 siklus: 92 °C'de 30 saniye, 65 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 1 dakika olarak uygulandı. Örnekler analiz sonucunda, oluşturulan standart aralığında ve referans DNA ile kantitatif real-time PCR aletinde okundu ve software programı yardımıyla belirlendi. Ortaya çıkan eşik değeri siklusunda ve diğer sikluslarda *Grp78*, *Chop* ve *β -aktin* gen ekspresyon düzeyi miktarsal olarak belirlendi. Sonuçlar $2[-\Delta\Delta C(T)]$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu kullanılarak hesaplandı. Bu yöntemde; her bir örnek için ayrı ayrı olarak, test edilen genin Ct değeri ile endojen kontrol olarak kullanılan rRNA'nın verdiği Ct değerleri birbirinden çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri belirlendi.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

İmmünohistokimya ve western blot analizleri sonucunda elde edilen bulguların analizleri Image J programı kullanılarak ölçüldü. Bu sonuçlardan elde edilen veriler ve qRT-PCR analizleri sonucunda her bir örnek için ayrı ayrı test edilen genin ΔCt değerlerinin istatistiksel hesaplamaları Windows için Sigma Stat sürüm 3.5 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) kullanılarak One Way ANOVA testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

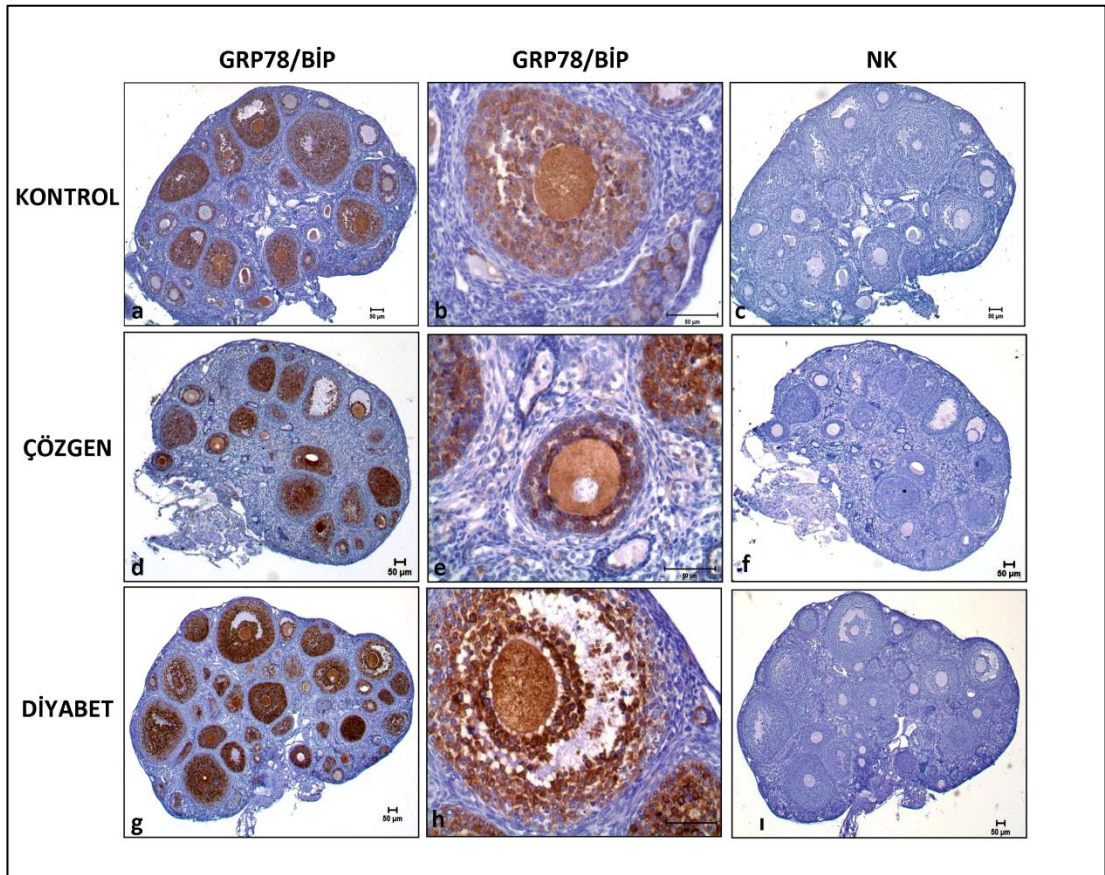
BULGULAR

Bu çalışmada, STZ ile indüklenmiş diyabet gruplarına ait fare ovaryum dokularındaki ER stres yolağı proteinlerinin varlığı ve ekspresyon düzeyleri, kontrol ve çözgen gruplarına ait ovaryum örnekleri ile karşılaştırılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, deneklerden alınan ovaryum dokuları immünohistokimya, western blot ve qRT-PCR teknikleri ile incelendi.

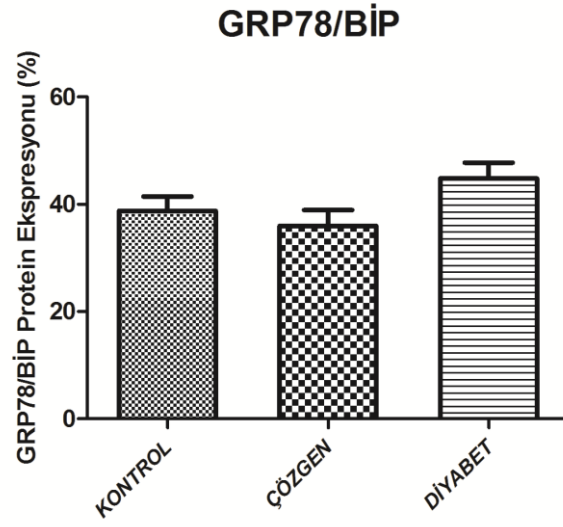
4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.1.1. GRP78/ BİP İmmün Boyanmaları

GRP78/BİP immün reaksiyonu tüm gruplarda ovaryumun gelişen foliküllerindeki granuloza hücrelerinde ve ovositte yoğun sitoplazmik boyanma olarak gözlenirken (Şekil 4.1), apoptotik granuloza hücrelerinde GRP78/BİP boyanmasına rastlanmamıştır. Boyanma yoğunluğu Image J programı ile değerlendirilmiştir. Diyabetik ovaryumlarda GRP78/BİP boyanma yoğunluğu kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla bir miktar artış gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($P= 0.0731$) (Şekil 4.2).



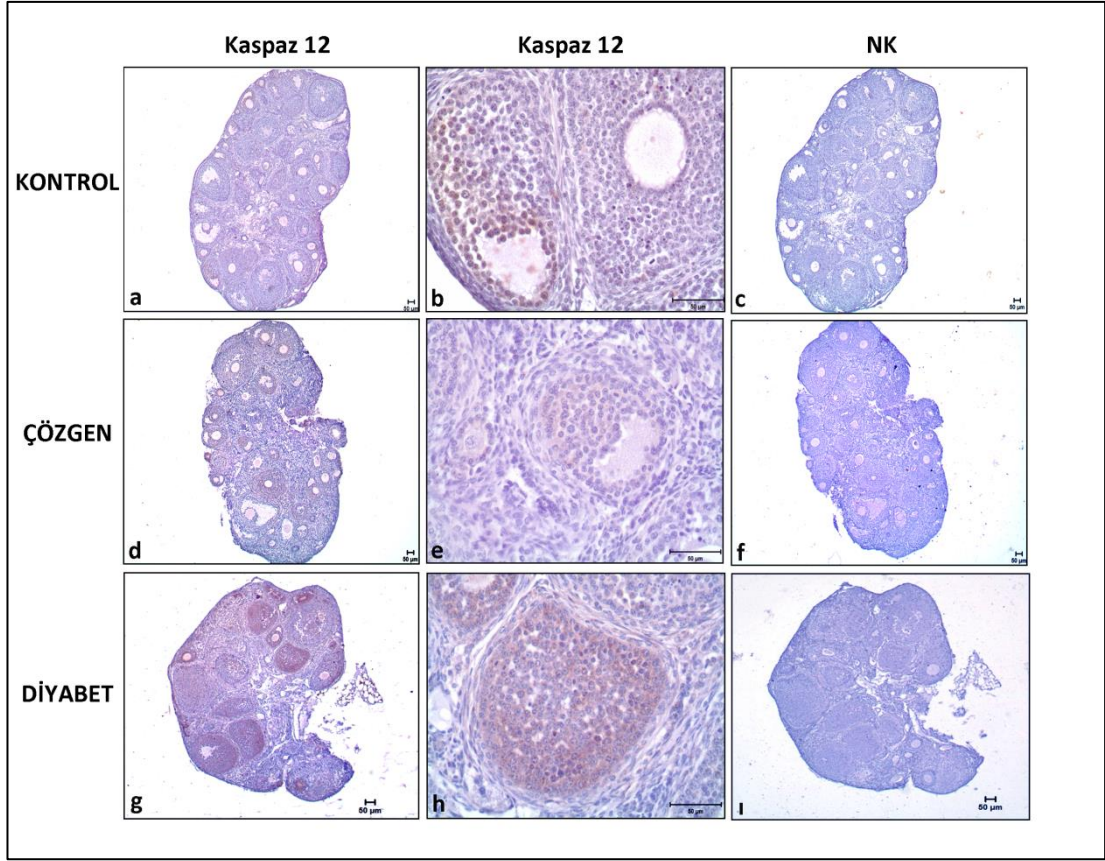
Şekil 4.1. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde GRP78/BİP immün boyanmaları. a-c-d-f-g-i: 50X; b-e-h: 400X.



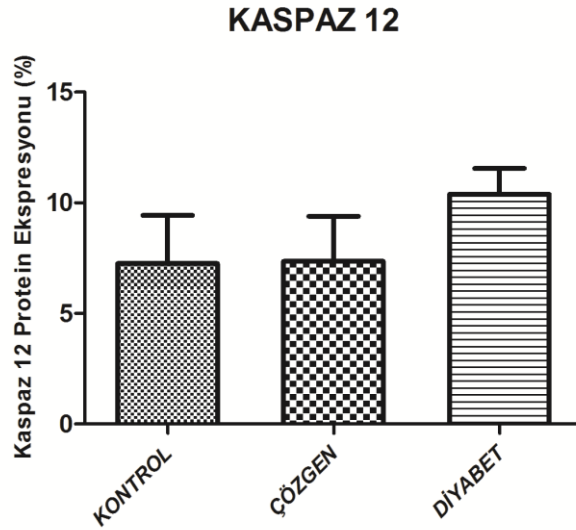
Şekil 4.2. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde GRP78/BİP proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik ($P>0.05$).

4.1.2. Kaspaz 12 İmmün Boyanmaları

Deneklerden alınan ovaryum örneklerinde, Kaspaz 12 proteininin immünreaktivitesi sekonder foliküllerde, antral foliküllerde ve korpus luteumda luteal hücrelerde sitoplazmik olarak boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.3). Kaspaz 12 proteininin boyanma yoğunluğu Image J programı ile değerlendirilmiştir. Diyabetik ovaryumlarda Kaspaz 12 boyanma yoğunluğu kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4, $P= 0.3561$).



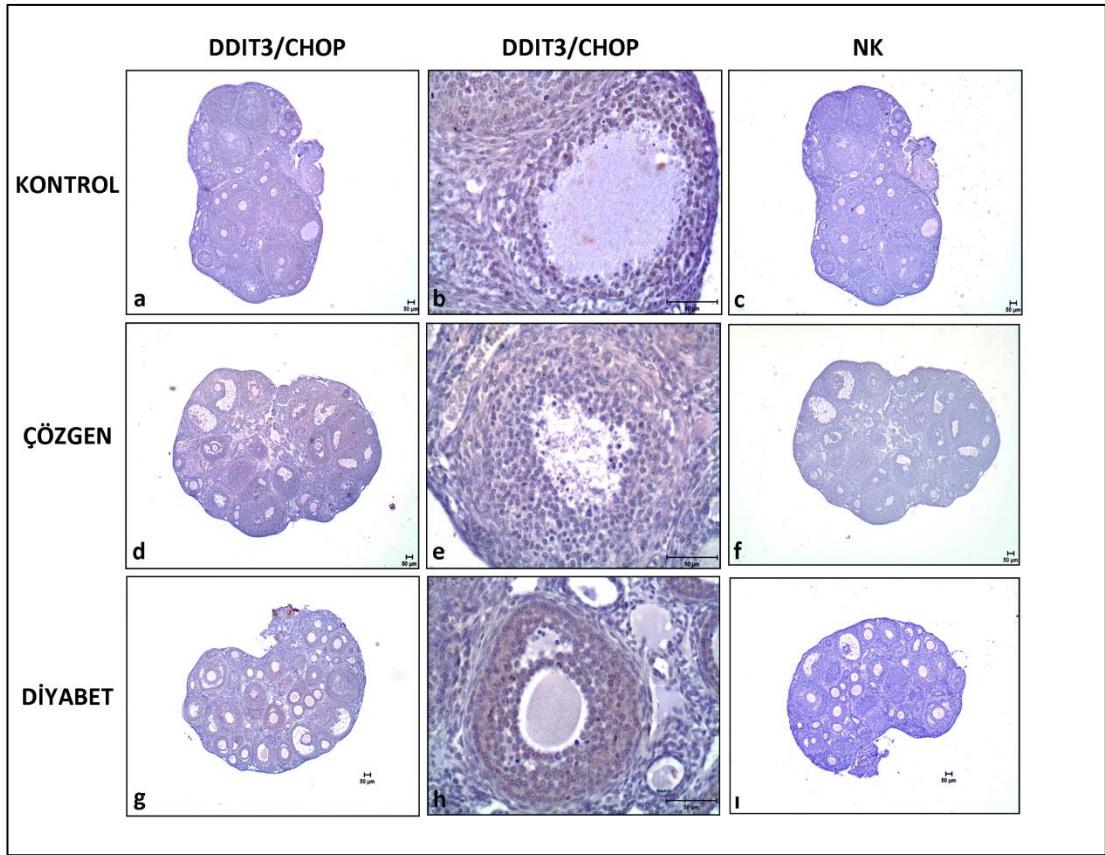
Şekil 4.3. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde Kaspaz 12 immün boyanmaları. a-c-d-f-g-i: 50X; b-e-h: 400X.



Şekil 4.4. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde Kaspaz 12 proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik ($P>0.05$).

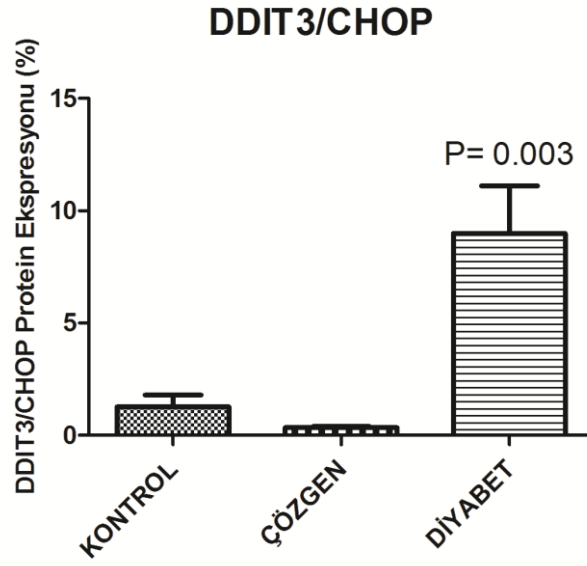
4.1.3. DDIT3/CHOP İmmün Boyanmaları

Deneklerden alınan ovaryum örneklerinde, DDIT3/CHOP proteininin boyanma şiddeti kontrol ve çözgen gruplarında zayıfken, diyabetik ovaryumlarda özellikle sekonder foliküllerdeki granuloza hücrelerinde, korpus luteumda luteal hücrelerde nüklear boyanmaların daha yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5). Diyabet gruplarına ait bazı ovaryum kesitlerindeki primordiyal foliküllere ait primer oositte ve tek katlı yassı hücrelerde nüklear boyanmaların olduğu gözlenmiştir. Kontrol ve çözgen gruplarına ait ovaryumlarda ise apoptotik granuloza hücrelerinde nüklear ve sitoplazmik boyanmalar görülmüştür.



Şekil 4.5. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde CHOP/DDIT3 immün boyanmaları. a-c-d-f-g-i: 50X; b-e-h: 400X.

DDIT3/CHOP proteininin boyanma yoğunluğu Image J programı ile değerlendirilmiştir. Diyabetik ovaryumlardaki boyanmanın kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6, $P < 0.05$).

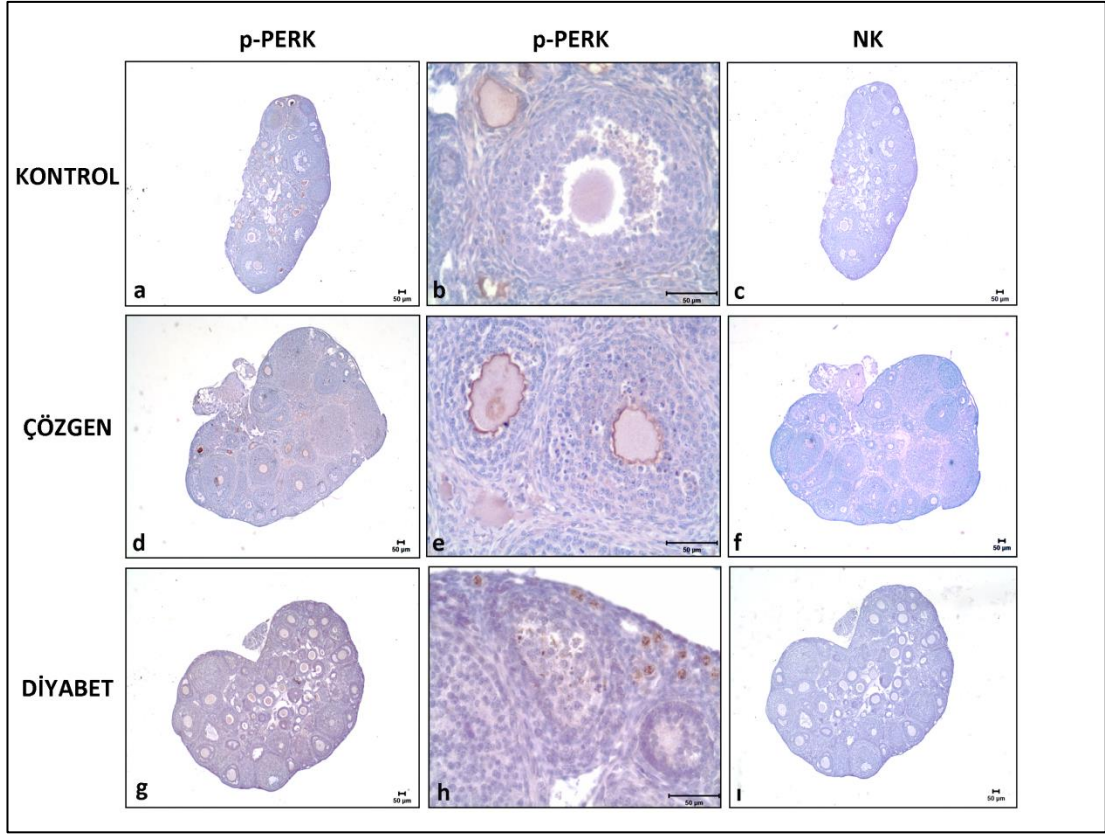


Şekil 4.6. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde DDIT3/CHOP proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik ($P<0.05$).

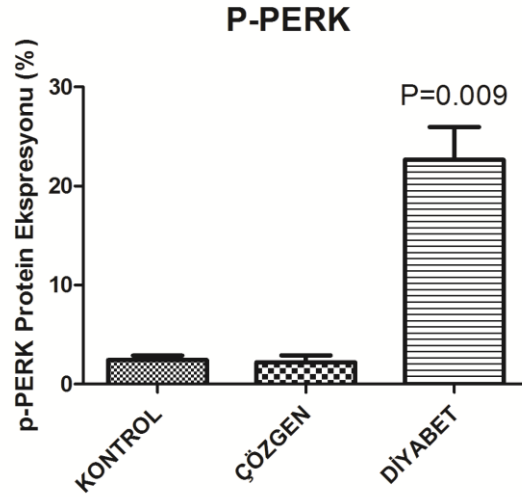
4.1.4. P-PERK İmmün Boyanmaları

p-PERK immün reaksiyonu, kontrol ve çözgen grubuna ait ovaryumlarda sadece atretik foliküllerde, dejenere oositlerde ve apoptotik granüloza hücrelerinde sitoplazmik boyanma olarak gözlenirken, diyabetik ovaryumlarda erken foliküler evrelerde özellikle primordiyal foliküllerde ekspresyon şiddetinin arttığı dikkat çekmiştir (Şekil 4.7).

p-PERK proteininin boyanma yoğunluğu image J programı ile analiz edildiğinde diyabetik ovaryumlardaki protein ekspresyon şiddetinin kontrol ve çözgen gruplarına göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8) ($P = 0.009$).



Şekil 4.7. Kontrol, çözen ve diyabet ovaryum örneklerinde p-PERK immün boyanmaları. a-c-d-f-g-i: 50X; b-e-h: 400X.

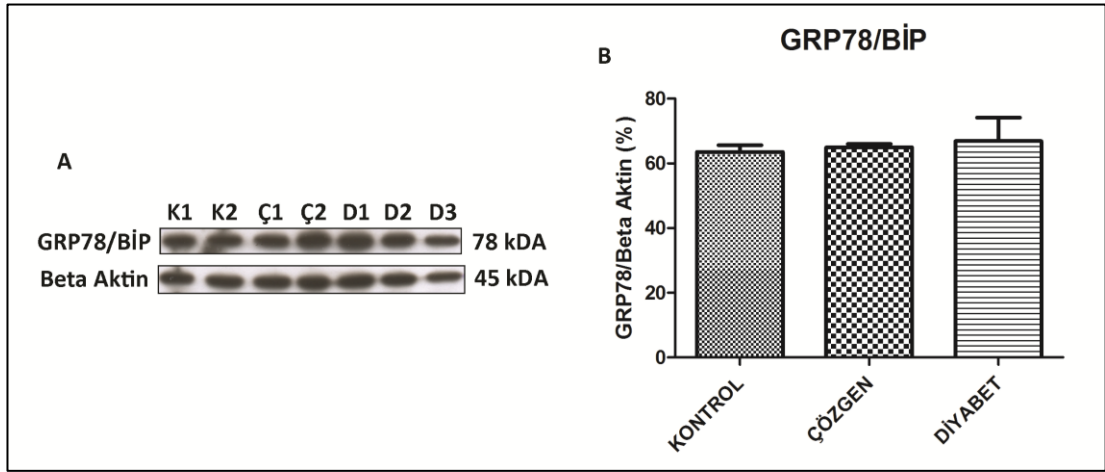


Şekil 4.8. Kontrol, çözen ve diyabet ovaryum örneklerinde p-PERK proteininin immün boyanma yoğunluklarını karşılaştıran grafik ($P < 0.05$).

4.2. Western Blot Analizi Bulguları

4.2.1. GRP78/BİP Ekspresyonu

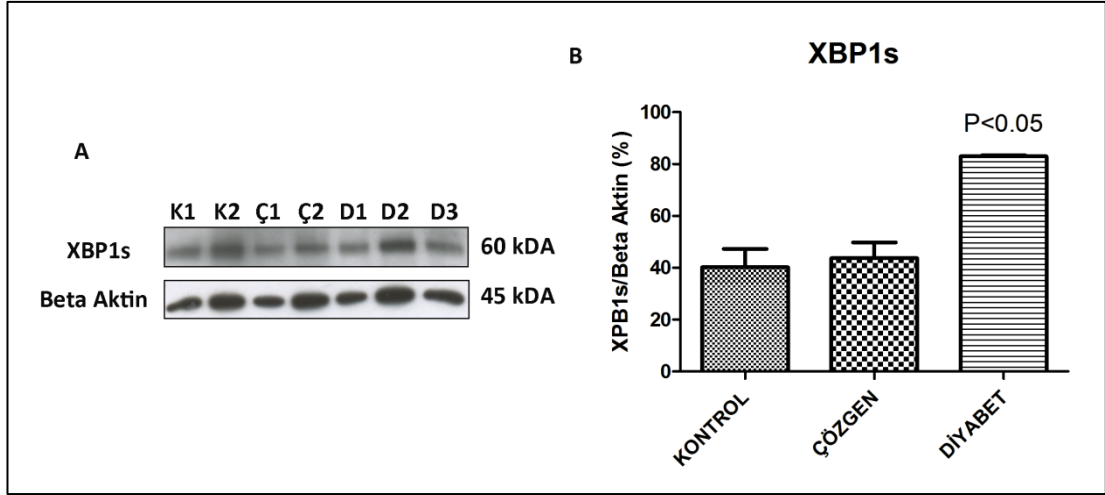
Diyabet, kontrol ve çözgen gruplarından elde edilen GRP78 protein bantları Image j programı kullanılarak analiz edildi. GRP78'in ekspresyon miktarları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.9) ($P=0.5266$).



Şekil 4.9. A. Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda GRP78/BİP protein bantları. B. Protein ekspresyonlarına ait bantların kantitatif değerlendirmesini gösteren grafik ($P>0.05$).

4.2.3. XBP1s Ekspresyonu

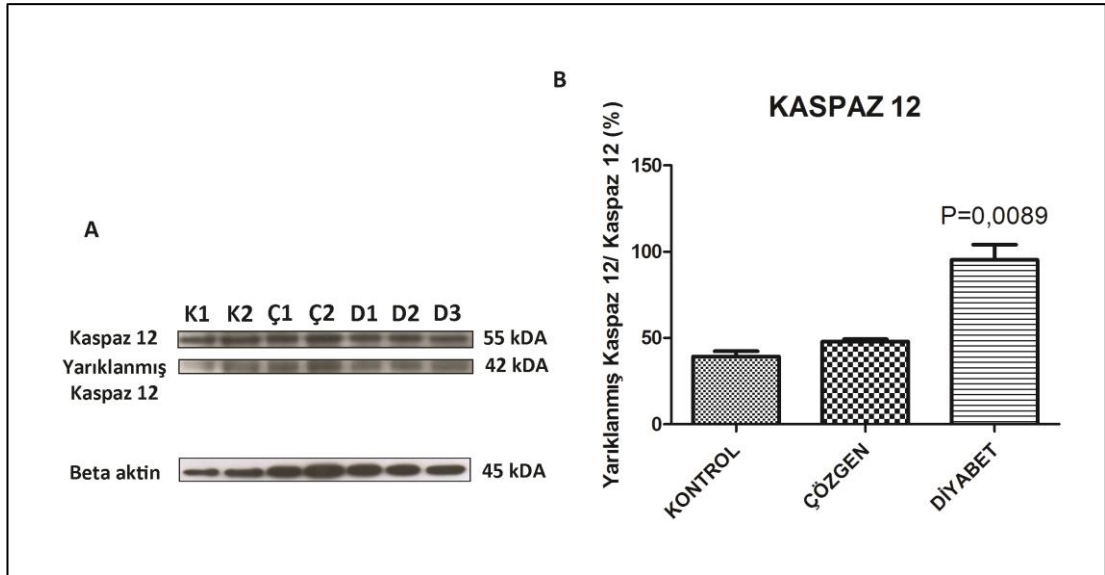
Diyabetik ovaryum örneklerinde XBP1s proteininin ekspresyon düzeyi kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.10) ($P< 0.05$).



Şekil 4.10. A. Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda XBP1s protein bantları. B. Protein ekspresyonlarına ait bantların kantitatif değerlendirmesini gösteren grafik ($P<0.05$).

4.2.3. Kaspaz 12 Ekspresyonu

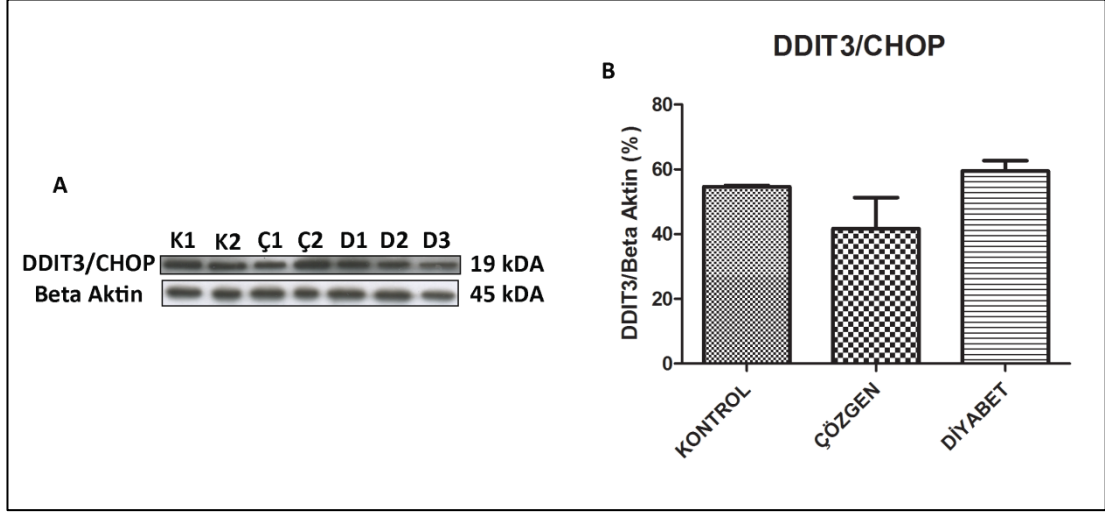
Diyabetik ovaryumlarda Kaspaz 12 ekspresyon miktarı kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.11) ($P<0.05$).



Şekil 4.11. A. Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda Kaspaz 12 protein bantları. B. Protein ekspresyonlarına ait bantların kantitatif değerlendirmesini gösteren grafik ($P>0.05$).

4.2.5. DDIT3/CHOP Ekspresyonu

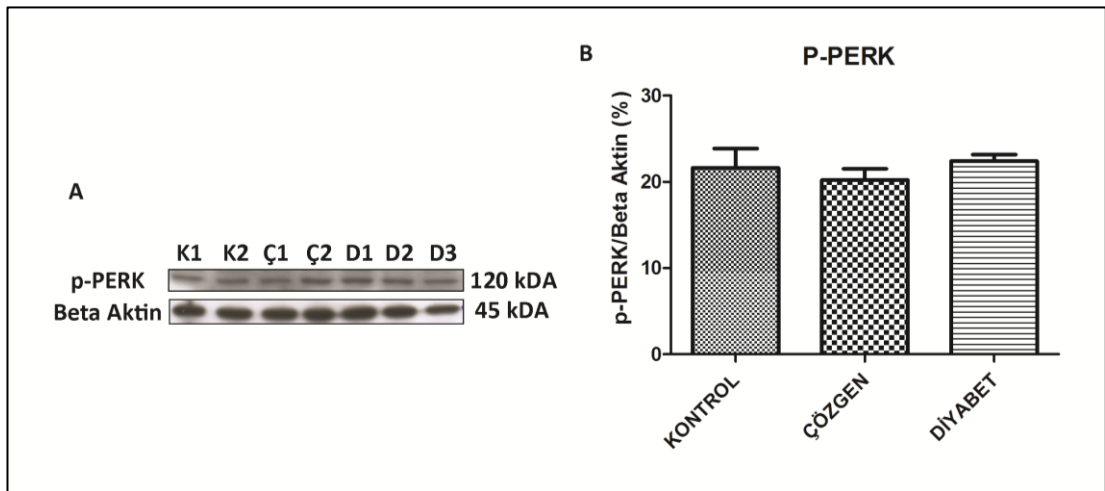
DDIT3 protein miktarları beta aktine oranlandığında diyabet grubunda az miktarda artış gözlenmiştir. Fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.12) ($P= 0.2309$).



Şekil 4.12. A. Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda DDIT3/CHOP protein bantları. B. Protein ekspresyonlarına ait bantların kantitatif değerlendirmesini gösteren grafik ($P>0.05$).

4.2.4. p-PERK Ekspresyonu

p-PERK protein miktarları beta aktine oranlandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.13) ($P=0.6450$).

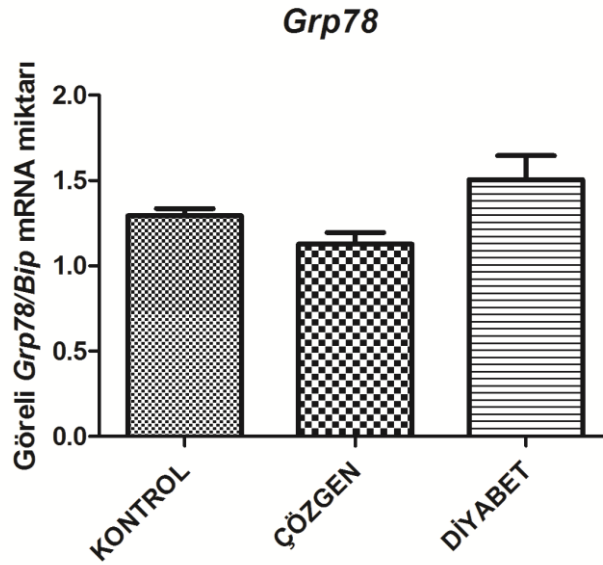


Şekil 4.13. A. Kontrol (K), çözgen (Ç) ve diyabet (D) gruplarından alınan ovaryumlarda p-PERK protein bantları. B. Protein ekspresyonlarına ait bantların kantitatif değerlendirmesini gösteren grafik ($P>0.05$).

4.3. qRT-PCR Bulguları

4.3.1. *Grp78/Bip* mRNA Ekspresyonu

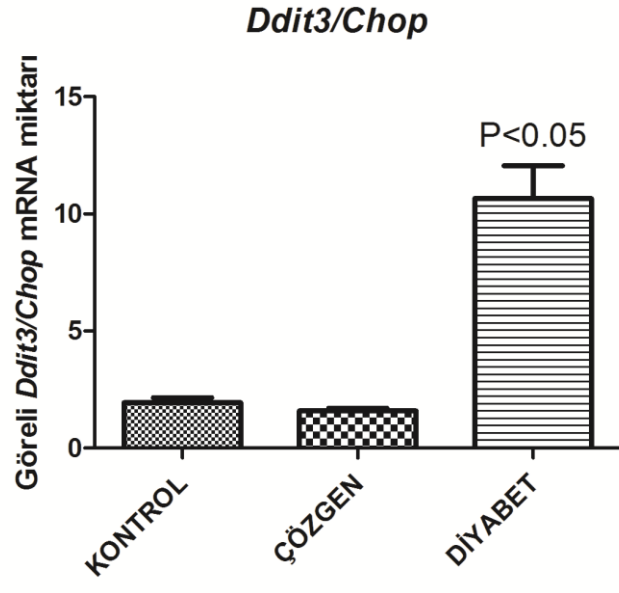
Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda, üç deney grubundaki ovaryumlarda *Grp78/Bip* mRNA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14, $P= 0.212$).



Şekil 4.14. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde *Grp78/Bip* mRNA ekspresyon düzeyini qRT-PCR ile karşılaştıran grafik ($P > 0.05$).

4.3.2. *Ddit3/Chop* Gen Ekspresyonu

Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda, diyabetik ovaryumlarda *Ddit3/Chop* mRNA ekspresyonu kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla artmış olduğu gözlenmiştir. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15, $P < 0.001$).



Şekil 4.15. Kontrol, çözgen ve diyabet ovaryum örneklerinde *Ddit3/Chop* mRNA ekspresyon düzeyini qRT-PCR ile karşılaştıran grafik ($P < 0.05$).

TARTIŞMA

ER, bütün organizmanın homeostazisini etkileyecek önemli bir organeldir. Başlıca görevi, membran ve sekretuar proteinlerin sentezini gerçekleştirmektir. Aşırı protein sentezi ve ER lümeninde biriken katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler sonucu bu süreç bozulur ve ERS meydana gelir. Hücre, savunma mekanizması olarak strese cevap olarak UPR başlatır. UPR'nin esas görevi protein katlama kapasitesini artırmak ve katlanmamış protein yükünü azaltmaktır. Eğer bu adaptasyon mekanizması ER dengesini normal haline döndüremez ise hücre apoptoza uğrar [61].

ERS ve UPR'nin preeklampsi ve intrauterin büyüme geriliği gibi gebeliğe ait rahatsızlıkların [86], nörodejeneratif hastalıkların [87], kardiyovasküler hastalıkların [88] ve diyabet gibi metabolik hastalıkların patofizyolojisi ile olan ilişkisi bilinmektedir.

Araştırmacılar çoğunlukla UPR'nin diyabet ile olan ilişkisini knock out fare modelleri ile tanımlamışlardır. UPR'de yer alan transmembran proteinlerinden PERK'in genel olarak her dokuda bulunduğu ancak pankreasta en yüksek değerlerde ekspre olduğu belirtilmiştir [89]. *Perk* koşullu knock out (KO) farede normal embriyonik gelişim gözlenmesine rağmen, hiperglisemi, hipoinsulinemi, pankreatik hücre ölümü, büyüme geriliği gibi bazı postnatal anomaliler meydana gelmiştir [90]. Pankreatik β hücrelerinde, *Irel1a*'nın KO edilmesi ile ya da *IRE1a*'nın inhibisyonu ile insülin biyosentezinin engellendiği belirtilmiştir [76]. *Atf6a* KO farede azalan glukoz toleransı, insülin sekresyonunda bozulma ve pankreasta insülin miktarının azaldığı gösterilmiştir [91].

Yang ve ark. [82] tarafından yapılan çalışmada olgun fare ovariumunda GRP78'in mural granuloza hücrelerinde zayıf boyandığı ve apoptotik granuloza hücrelerinde ise pozitif bir reaksiyon gözlenmediği belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar, keçi ovariumunda sağlıklı foliküllerin granuloza hücrelerinde GRP78'in immün reaksiyonunu gözlediklerini ve antral foliküllerde boyanmanın olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, düzensiz atretik cisimlerde ve atretik foliküllerin işlevini kaybetmiş granuloza hücre katmanlarında GRP78'in pozitif boyandığını göstermişlerdir [83].

Çalışmamızın immünohistokimyasal bulgularına göre, kontrol ve çözgen grupları ile benzer şekilde diyabetik ovariumlarda GRP78; apoptotik granuloza hücreleri dışında, gelişen ve gelişimini tamamlamış olgun bütün foliküllerdeki granuloza hücrelerinde sitoplazmik olarak boyanmıştır. Bu da GRP78'in granuloza hücre proliferasyonunda ve foliküler gelişimde düzenleyici rol oynayabileceğini göstermektedir. Kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla diyabet gruplarında görülen boyanmadaki artış istatistiksel olarak anlam ifade etmese de, GRP78'in diyabetle indüklenen ERS'ye karşı hayatta kalma mekanizması olarak yanlış katlanan proteinleri ya doğru katlamak için ya da ERAD'a yönlendirerek proteozomla parçalanmalarına yardım etmek için arttığı söylenebilir.

Ovulasyon, gebeliğin meydana gelmesi için gerekli bir süreçtir. Folikül stimüle edici hormon (FSH), pre-ovuluar foliküllerde lüteinize edici hormon

reseptör (LHR) ekspresyonunu indükler. LH dalgalanması ovulasyonu başlatır ardından korpus luteum meydana gelir. Ovulasyon korpus luteumun oluşması için ovule olan folikülün dramatik dönüşümüne neden olur. Fetal hayatta kalım için korpus luteumdan progesteron sentezlenir. ER’de progesteron sentezi için çok sayıda proteinin yeniden sentezlenmesi ve bu proteinlerin doğru bir şekilde katlanması gerekir. Bu durumda ER’de bulunan GRP78 moleküler şaperonu devreye girer. Buna ek olarak ER’de gonadotropin reseptörlerinin GRP78 gibi şaperonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durumda hem folikül stimüle eden hormon reseptörü (FSHR) hem de LHR’nin moleküler şaperona bağlanabileceği önerilmiştir. Kogure ve ark. 2012 yılında [92] sıçan ovaryumunda granuloza hücrelerinde GRP78 ekspresyonunun yüksek olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, LH ya da hCG gibi ovulatuvar uyaranlar ile müdahaleden sonra korpus luteumdaki granuloza hücrelerinde GRP78 ekspresyonunun daha da arttığı bildirilmiştir.

Literatür bilgisi ile uyumlu olarak; kontrol, çözen ve diyabet gruplarına ait ovaryum örneklerinde korpus luteumdaki granuloza lutein hücrelerinde GRP78’in immün reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da diyabetik ovaryumlarda görülen artan boyanma şiddetinin hiperglisemik koşul sonucu artan strese karşı bir yanıt olarak buradaki granuloza lutein hücrelerinin hayatta kalımlarını sağlamak ve aktivitelerini devam ettirmek için olabileceğini düşünmekteyiz.

Grp78 mRNA düzeyinde incelendiğinde diyabet gruplarında hafif artış olduğu görülse de kontrol ve çözen gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Benzer sonuçlar western yöntemi ile de desteklenmiştir. Hafif protein miktarındaki artışın hiperglisemik stres ile indüklenen UPR yanıt sonucu GRP78’in translasyonunu artıracak hedef genlerin indüklenmesi sonucu olduğunu düşünmekteyiz.

Memelilerde, ovaryan foliküllerin birçoğu gelişim boyunca atreziye uğrar, sadece bunlardan bir kaçı olgunlaşır ve gelişimini tamamlar. Foliküler atrezinin granuloza hücre ölümünden kaynaklandığı gösterilmiştir [93]. Foliküler atrezi verimli oositlerin ovulasyonu için normal fizyolojik bir süreçken, atrezinin anormal şekilde yüksek oranlarda olması kronik infertiliteye ve/veya zamanından önce fertilitenin son bulmasına (örneğin, menapoz) neden olur [94]. Granuloza hücre apoptozunun mekanizması belirsizliğini korurken, daha önce yapılan çalışmalar granuloza hücrelerinde meydana gelen apoptozun ERS yolağı ile indüklenebileceği yönündedir [83, 95].

Stres koşulları altında GRP78; UPR yanıtta rol alan önemli üç transmembran proteininden ayrılarak onların aktive olmalarını sağlar ve UPR yanıtı başlatır. Eğer stres uzun süre devam eder ve yatıştırılmazsa, hücre ölümü gerçekleşir. Bu durumda, DDIT3/CHOP, Kaspaz 12 ve c-Jun NH2 terminal kinaz bağlı yolak tarafından apoptotik cevap başlatılır [96]. Literatürde olgun fare ovaryumunda normal koşullarda ERS bağlı apoptoz ile ilişkili sinyal yolaklarından DDIT3/CHOP ve Kaspaz 12 proteinlerinin varlığı ovaryumda sadece apoptotik granuloza hücrelerinde gösterilmiştir [82, 83].

Çalışmamızda Kaspaz 12 immün reaksiyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında; özellikle diyabetik ovaryumlarda primordiyal ve primer folikülleri çevreleyen tek katlı yassı folikül hücrelerinde sitoplazmik olarak boyandığı gözlenmiştir. Korpus luteuma ait ölü granuloza hücrelerinde sitoplazmik immünreaktivite olduğu görülmüştür. Ancak gruplar arasında Kaspaz 12 ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Kaspaz 12 proteini western blot yöntemi ile incelendiğinde diyabetik ovaryumlardaki ekspresyonunun kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Kısa süreli (14 günlük) hiperglisemik koşulların apoptozu indükleyici ERS belirteci Kaspaz 12 yolağını aktive etmede etkili olduğu söylenebilir.

DDIT3 proteini stres koşullarında çekirdekte lokalize olurken, stres olmayan koşullarda sitoplazmada gözlenir [97]. Yapılan bir çalışmada, DDIT3'ün hedef genleri ve bu genlerin işlevlerini tanımlamak için genom mikro dizilim temelli ekspresyon analizi uygulanmıştır. DDIT3 ekspresyonunu indükleyen tamoksifen taşıyan hücrelerde yapılan analiz sonucunda sitoplazmik ve nüklear lokalize DDIT3'lü hücreler için farklı gen ekspresyonları gösterilmiştir. Araştırmacılar tarafından sitoplazmik DDIT3'ün daha çok migrasyon ile ilişkili genleri etkilediği, nüklear DDIT3'ün ise hücre döngüsünü kontrol eden genleri düzenlediği belirtilmiştir [98]. Yapılan bir başka çalışmada, nüklear DDIT3'ün hücre gelişimini kontrol ettiği belirtilmiştir. Yağ hücrelerine plazmid ile artırılan CHOP ekspresyonunun bu hücrelerde G1 hücre siklusunda duraklamayı indüklediği gösterilmiştir [99].

Bu literatür bilgisi ışığında, bulgularımızdaki diyabetik ovaryum foliküllerinde görülen apoptotik granuloza hücrelerindeki artışın ve gözlenen nüklear DDIT3 ekspresyonunun, buradaki hücrelerin hiperglisemik strese bağlı olarak hücre gelişimlerinin DDIT3 tarafından durdurularak apoptoza yönlendirilmesinden kaynaklı olabilir. *Ddit3* geni qRT-PCR yöntemi ile incelendiğinde immünohistokimyasal bulgularımızla paralel olarak diyabet gruplarında miktarının istatistiksel olarak arttığını gözlemledik. Ancak, western blot yöntemiyle incelendiğinde kontrol ve çözgen grupları ile karşılaştırıldığında diyabet gruplarda DDIT3 proteini az da olsa artmış olduğu görülsede istatistiksel olarak anlam ifade etmediği belirlenmiştir. Dolayısıyla, ER dengesi eski haline döndürülmüş ve artık CHOP proteinine gerek kalmamış olabilir. Bu yüzden post translasyonel olarak proteinler degrade olmuş olabilir.

Katlanmamış protein yanıtta önemli transmembran proteinlerinden biri de PERK'tir. Strese yanıt olarak fosforile olan PERK, eIF2 α 'yı fosforilleyerek genel translasyonu azaltır ve ER'de biriken protein yükünü azaltmayı hedefler. Uzun süren ER stresi koşullarında ise PERK hücre ölümünü başlatabilir [100]. eIF2 α 'nın defosforilasyonu iki enzim tarafından düzenlenir: GADD34 ve protein fosfataz 1 [101]. Yapılan bir çalışmada eIF2 α 'nın defosforilasyonunun inhibisyonu sonucu, stres cevabının uzun süre devam ettiği ve stres indüklü apoptozdan hücrelerin korunduğu gösterilmiştir [102].

Çalışmamızda, stres koşullarında ekspresyonu arttığı bilenen p-PERK protein ekspresyonunun kontrol ve çözgen gruplarına ait ovaryumlarda sadece atretik foliküllerde, dejenere oositlerde ve apoptotik granuloza hücrelerinde nüklear olarak gözlenmesi, bu hücreleri fizyolojik ovaryum gelişimine uyumlu olarak apoptoza yönlendirdiğini düşündürmektedir. Diyabetik ovaryum foliküllerinde bu bulgulara ek olarak özellikle primordiyal foliküllere ait primer oositlerde yoğun nüklear ekspresyon dikkati çekmiştir. P-PERK protein ekspresyonundaki istatistiksel olarak da anlamlı bulunan bu artış, diyabet ile ovaryumda artan ERS yanıtını doğrulamaktadır. Gelişen havuzdaki duraklayan foliküllerin oranının kontrolü üreme biyolojisi için önemlidir [103]. Bu durum p-PERK'in iyi kalite primordiyal folikül seçiminde ya da atreziye uğrayacak folikül seçiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Western blot yöntemi ile ovaryumdaki protein miktarına bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu durum, çalışmada kullanılan denek sayısı ile ilgili olabilir.

Yapılan bir çalışmada XBP1s'nin hiperaktivasyonu ob/ob farelerde insülin hassasiyetini artırdığı ve XBP1s'nin hafif aktivasyonunun bu farelerde insülin sinyal reseptörünü değiştirmeden glikoz dengesini iyileştirdiği belirtilmiştir. XBP1s'nin p38 mitojen aktive eden protein kinaz (p38 MAPK) aracılı fosforilasyon tarafından düzenlendiği belirtilmiştir [104]. Pankreatik β hücrelerinde, XBP1s'in p38 MAPK tarafından fosforillenmesi nüklear yer değişimini kolaylaştırır. Ciddi bir şekilde obez ve dişi farelerde p38'in genetik aktivasyonu XBP1s'in nüklear translokasyonunu artırır, ERS'yi azaltır ve öglisemi meydana gelir [105].

Çalışmamızdaki western blot bulgularımıza göre XBP1s protein miktarı kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. IRE1 α 'nın fosforile olmasıyla kırılan XBP1s nükleusa geçer ve ER şaperonlarının, ERAD proteinlerinin'in insülin bağımsız glukoz dengesini iyileştirmek ve ER stresini azaltmak için diyabetik ovaryumlarda ekspresyonunun arttığını söyleyebiliriz.

SONUÇLAR

Bu tez projesinde, STZ ile indüklenmiş diyabetik fare modeline ait ovaryumlarda ER stresi sonucu meydana gelen UPR'de görev alan GRP78, Kaspaz 12, DDIT3/CHOP, XBP1s ve p-PERK proteinlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol ve çözgen grupları ile karşılaştırılarak farklı yöntemlerle araştırılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. GRP78/BİP; kontrol, çözgen ve diyabet gruplarına ait ovaryumlarda erken foliküler evreden olgun evreye kadar foliküler gelişim boyunca sağlıklı granuloza hücrelerinde gözlenmiştir. Apoptotik granuloza hücrelerinde ise gözlenmemiştir. Literatür ile uyumlu olan bu bulgumuz GRP78'in granuloza hücre proliferasyonunda ve foliküler gelişimde homeostazı sağladığını doğrulamaktadır.
2. p-PERK; deney gruplarına ait ovaryumlarda sadece atretik foliküllerde, dejenere oositlerde ve apoptotik granuloza hücrelerinde gözlenmiştir. Diyabetik ovaryum primordiyal foliküllerdeki primer oositlerde yoğun boyanma gözlenmiştir. p-PERK'in iyi kalite primordiyal folikül seçiminde ya da atreziye uğrayacak folikül seçiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.
3. XBP1s protein miktarının diyabet grubunda anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu artışın ER stresi sonucu aktif olan ATF4 ve ATF6'nın çekirdeğe gelerek hücrenin hayatta kalımı için gerekli proteinlerin translasyonunu artıracak XBP1s'in translasyonunu indüklemesinden kaynaklanabileceğini önermektedir.
4. ERS ile ilişkili apoptoz sinyalinde görev alan CHOP'un diyabetik ovaryumlarda immün reaktivitesi kontrol ve çözgen gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Bu bulgu diyabetin UPR'nin apoptoz yolağını başlatıcı etkiye bulunabileceğini düşündürmektedir.
5. *Ddit3/Chop* mRNA miktarı diyabetik ovaryumlarda artmış olmasına rağmen, bu artış protein miktarına yansımamıştır. Bu sonuç post translasyonel olarak proteine dönüşümde protein sentezini etkilemediğini gösterebilir.
6. ER stresi sonucu aktive olduğu bilinen diğer bir protein Kaspaz 12'nin gruplar arasında protein ekspresyon düzeyi bakımından anlamlı bir farklılığın bulunması kısa süreli hiperglisemik koşulların bu yolağı aktive ettiğini gösterebilir.
7. Bu çalışma, ERS ile başlatılan hücre kaderini belirleyen UPR'de rol oynayan proteinlerin (GRP78, DDIT3, p-PERK, Kaspaz 12 ve XBP1s) ve genlerin (*Grp78/Bip* ve *Ddit3/Chop*) diyabetik ovaryumlarda değişen ekspresyon düzeylerini gösteren ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Park, S.W. and U. Ozcan, *Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(3): p. 351-73.
2. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *ER chaperone functions during normal and stress conditions*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(1-2): p. 51-65.
3. Buck, T.M., C.M. Wright, and J.L. Brodsky, *The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(6): p. 751-61.
4. Lee, J. and U. Ozcan, *Unfolded protein response signaling and metabolic diseases*. J Biol Chem, 2014. **289**(3): p. 1203-11.
5. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
6. Harding, H.P., et al., *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 897-904.
7. Schroder, M. and R.J. Kaufman, *The mammalian unfolded protein response*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 739-89.
8. Yoshida, H., et al., *XBPI mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell 2001. **107**: p. 881-891.
9. Nakagawa, T., et al., *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 98-103.
10. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. **29**(1): p. 42-61.
11. Ma, J.Y., et al., *Whole transcriptome analysis of the effects of type I diabetes on mouse oocytes*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41981.
12. Wang, Q., et al., *Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(10): p. 1603-12.
13. Jawerbaum, A. and V. White, *Animal models in diabetes and pregnancy*. Endocr Rev, 2010. **31**(5): p. 680-701.
14. Junqueira, L.C., J. Carneiro, and R.O. Kelley, *Temel Histoloji 8ed2010*, İstanbul: Barış Kitabevi.
15. Eroschenko, V.P., *Dişi Üreme Sistemi*, in *diFIORE'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle2013*, Palme Yayıncılık: Ankara. p. 505-531.
16. ; Available from: <http://www.hopkinsmedicine.org/mcp/education/femalerepro.pdf>
17. Spencer, T.E., K.A. Dunlap, and J. Filant, *Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **354**(1-2): p. 34-53.
18. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Dişi Üreme Sistemi*, in *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas B. Baykal*, Editor 2014, PALme Yayıncılık: Ankara. p. 830-845.
19. Pepling, M.E., et al., *Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 187-92.

20. Kierszenbaum, A.L., *Folikül Gelişimi ve Menstrual Döngü (Siklus)*, in *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, R. Demir, Editor 2006, Palme Yayıncılık Ankara.
21. Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport, *Structural organization of the endoplasmic reticulum*. EMBO Rep, 2002. **3**(10): p. 944-50.
22. Chaudhari, N., et al., *A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 213.
23. 2015; Available from: http://droualb.faculty.mjc.edu/Course%20Materials/Physiology%20101/Chapter%20Notes/Fall%202011/chapter_2%20Fall%202011.htm
24. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?* Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(12): p. 2277-93.
25. Schonthal, A.H., *Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy*. Scientifica (Cairo), 2012. **2012**: p. 857516.
26. Tabas, I. and D. Ron, *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(3): p. 184-90.
27. Salminen, A., et al., *ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology*. J Neuroinflammation, 2009. **6**: p. 41.
28. Hoozemans, J.J., et al., *Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(3): p. 707-11.
29. Chistiakov, D.A., et al., *Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and diabetic macrovascular complications*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 610140.
30. Harding, H.P. and D. Ron, *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S455-61.
31. Minamino, T., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1071-82.
32. Tsai, Y.C. and A.M. Weissman, *The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer*. Genes Cancer, 2010. **1**(7): p. 764-778.
33. Zhong, J., et al., *The role of endoplasmic reticulum stress in autoimmune-mediated beta-cell destruction in type 1 diabetes*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 238980.
34. Pfaffenbach, K.T. and A.S. Lee, *The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(2): p. 150-6.
35. Hetz, C., et al., *The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1219-43.
36. Kadowaki, H. and H. Nishitoh, *Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease*. Genes (Basel), 2013. **4**(3): p. 306-33.
37. Brush, M.H., D.C. Weiser, and S. Shenolikar, *Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1292-303.

38. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. *Genes Dev*, 1999. **13**(1): p. 76-86.
39. Liu, C.Y., et al., *The protein kinase/endoribonuclease IRE1alpha that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18346-56.
40. Tirosh, B., et al., *Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 5852-60.
41. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
42. Yan, W., et al., *Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 15920-5.
43. Ladiges, W.C., et al., *Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK*. *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 1074-81.
44. Haze, K., et al., *Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response*. *Biochem J*, 2001. **355**(Pt 1): p. 19-28.
45. Thuerauf, D.J., et al., *Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(31): p. 22865-78.
46. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals*. *Dev Cell*, 2002. **3**(1): p. 99-111.
47. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(4): p. 381-9.
48. McCullough, K.D., et al., *Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(4): p. 1249-59.
49. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats*. *Genes Dev*, 2002. **16**(11): p. 1345-55.
50. Rao, R.V., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33869-74.
51. Yoneda, T., et al., *Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(17): p. 13935-40.
52. Segezdi, E., U. Fitzgerald, and A. Samali, *Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **1010**: p. 186-94.

53. Morishima, N., et al., *An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34287-94.
54. Seydel, G.Ş. and K. Aksoy, *Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması*. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal), 2012. **21**(4): p. 221-235.
55. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Tıbbi Fizyoloji*, ed. H. Çavuşoğlu and B. Çağlayan Yeğen 2007: Nobel Tıp Kitabevleri.
56. T.C. Sağlık Bakanlığı, *Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü* Ankara.
57. Haller, M.J., M.A. Atkinson, and D. Schatz, *Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management*. Pediatr Clin North Am, 2005. **52**(6): p. 1553-78.
58. Buzzetti, R., C.C. Quattrocchi, and L. Nistico, *Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence*. Diabetes Metab Rev, 1998. **14**(2): p. 111-28.
59. Redondo, M.J., P.R. Fain, and G.S. Eisenbarth, *Genetics of type 1A diabetes*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 69-89.
60. İmamoğlu, Ş., *Diabetes Mellitus 2009 Multidisipliner Yaklaşımla Tanı, Tedavi ve İzlem* 2009: Deomed Medikal Yayıncılık.
61. Flamment, M., et al., *New insights into ER stress-induced insulin resistance*. Cell Press, 2012. **23**: p. 381-390.
62. Etuk, E.U., *Animal models for studying diabetes mellitus* Agriculture And Biology Journal Of North America, 2010. **1**(2): p. 130-134.
63. Srinivasan, K. and P. Ramarao, *Animal models in type 2 diabetes research: an overview*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 451-72.
64. King, A.J., *The use of animal models in diabetes research*. British Journal of Pharmacology, 2012. **166**: p. 877-894.
65. Wu, J. and L.J. Yan, *Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2015. **8**: p. 181-8.
66. Bonnevie-Nielsen, V., M.W. Steffes, and A. Lernmark, *A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin*. Diabetes, 1981. **30**(5): p. 424-9.
67. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
68. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
69. 2014; Available from: <https://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014>.
70. Harding, H.P., et al., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1153-63.
71. Back, S.H. and R.J. Kaufman, *Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 767-93.
72. Meshkani, R. and K. Adeli, *Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease*. Clin Biochem, 2009. **42**(13-14): p. 1331-46.
73. Kim, M.K., et al., *Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 509437.

74. Zhang, W., et al., *PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis*. Cell Metab, 2006. **4**(6): p. 491-7.
75. Delepine, M., et al., *EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome*. Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 406-9.
76. Lipson, K.L., et al., *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 245-54.
77. Usui, M., et al., *Atf6a -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance*. Metabolism Clinical And Experimental, 2012. **61**: p. 1118-1128.
78. Evans-Molina, C., M. Hatanaka, and R.G. Mirmira, *Lost in translation: endoplasmic reticulum stress and the decline of beta-cell health in diabetes mellitus*. Diabetes Obes Metab, 2013. **15 Suppl 3**: p. 159-69.
79. Kaipia, A. and A.J. Hsueh, *Regulation of ovarian follicle atresia*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 349-63.
80. Matsuda-Minehata, F., et al., *The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules*. J Reprod Dev, 2006. **52**(6): p. 695-705.
81. Rao, R.V., et al., *Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 177-87.
82. Yang, Y., et al., *Luman recruiting factor regulates endoplasmic reticulum stress in mouse ovarian granulosa cell apoptosis*. Theriogenology, 2013. **79**(4): p. 633-9 e1-3.
83. Lin, P., et al., *Endoplasmic reticulum stress is involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in goat ovaries*. Mol Reprod Dev, 2012. **79**(6): p. 423-32.
84. Park, H.J., et al., *Unfolding protein response signaling is involved in development, maintenance, and regression of the corpus luteum during the bovine estrous cycle*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(2): p. 344-50.
85. Tschen, S.I., et al., *Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1312-20.
86. Yung, H.W., et al., *Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction*. Am J Pathol, 2008. **173**(2): p. 451-62.
87. Althausen, S., et al., *Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice*. J Neurochem, 2001. **78**(4): p. 779-87.
88. Maron, B.J., V.J. Ferrans, and W.C. Roberts, *Ultrastructural features of degenerated cardiac muscle cells in patients with cardiac hypertrophy*. Am J Pathol, 1975. **79**(3): p. 387-434.
89. Shi, Y., et al., *Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7499-509.
90. Zhang, P., et al., *The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the*

- function and viability of the pancreas.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3864-74.
91. Usui, M., et al., *Atf6alpha-null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance.* Metabolism, 2012. **61**(8): p. 1118-28.
 92. Kogure, K., et al., *Glucose-Regulated Protein, 78-Kilodalton Is a Modulator of Luteinizing Hormone Receptor Expression in Luteinizing Granulosa Cells in Rats.* Biology of Reproduction, 2013. **88**(1):8: p. 1–11.
 93. Hughes, F.M., Jr. and W.C. Gorospe, *Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia.* Endocrinology, 1991. **129**(5): p. 2415-22.
 94. Johnson, A.L., *Granulosa cell apoptosis: conservation of cell signaling in an avian ovarian model system.* Biol Signals Recept, 2000. **9**(2): p. 96-101.
 95. Wu, L.L., et al., *High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates.* Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5438-45.
 96. Kim, R., et al., *Role of the unfolded protein response in cell death.* Apoptosis, 2006. **11**(1): p. 5-13.
 97. Wang, X.Z., et al., *Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153).* Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4273-80.
 98. Jauhainen, A., et al., *Distinct Cytoplasmic and Nuclear Functions of the Stress Induced Protein DDIT3/CHOP/GADD153.* PLoS One, 2012. **7**.
 99. Barone, M.V., et al., *CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G₂/M arrest.* Genes & Development, 2015. **8**: p. 453-464.
 100. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells.* Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
 101. Novoa, I., et al., *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha.* J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1011-22.
 102. Boyce, M., et al., *A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress.* Science, 2005. **307**(5711): p. 935-9.
 103. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles.* Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 200-14.
 104. Lee, J., et al., *p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis.* Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1251-60.
 105. Lee, A.H., et al., *Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(21): p. 8885-90.

ÖZGEÇMİŞ

Aslı OKAN OFLAMAZ 1986 yılında Bolu’da doğdu. 2004 yılında Eryaman Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Kısım’dan birincilikle mezun oldu. 2009 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2011 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programına başladı. Eğitimine devam ederken 2013 yılında ‘Öğretim Görevlisi Yetiştirme Programını’ kazanarak Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. Yüksek Lisans ve Doktora eğitimini almak üzere Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına geçici görevlendirilmesi yapıldı. 2013 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ‘Histoloji ve Embriyoloji’ yüksek lisans programına başladı. Eğitimine devam ederken, 2014 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programından bilim uzmanı ünvanı ile mezun oldu. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.