

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İskemik Akut Renal Yetmezlikte Oksidatif/Nitrozatif Stres ve
Endoplazmik Retikulum (ER) Stresinin Etkileşimleri ve ER Stres
Yanıt Proteini MANF/ARMET'in Fonksiyonunun Araştırılması**

Biyokimya (Eczacılık) Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı

Fadime AYDIN KÖSE

Danışman

Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU

2. Danışman

Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK

İZMİR

2014

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İskemik Akut Renal Yetmezlikte Oksidatif/Nitrozatif Stres ve
Endoplazmik Retikulum (ER) Stresinin Etkileşimleri ve ER Stres
Yanıt Proteini MANF/ARMET'in Fonksiyonunun Araştırılması**

Biyokimya (Eczacılık) Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı

Fadime AYDIN KÖSE

Danışman

Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU

2. Danışman

Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK

İZMİR

2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan : Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU

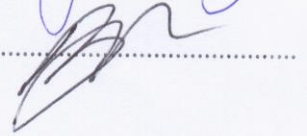
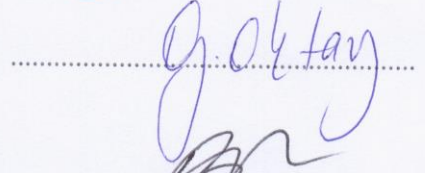
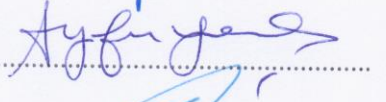
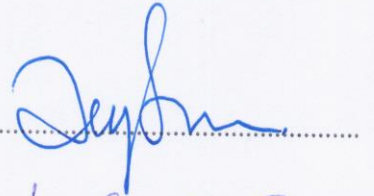
(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Ayfer YALÇIN

Üye : Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS

Üye : Prof. Dr. Gülgün OKTAY

Üye : Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK



Doktora tezinin kabul edildiği tarih:14.1.2014.....

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince, bana her konuda destek veren, bilgi birikimini hiçbir karşılık beklemezsiniz paylaşan, kendisi ile çalışmaktan onur duyduğum değerli danışman hocam, E.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD Başkanı Sayın Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU'na,

Çalışmalarında destek ve katkı sağlayan ikinci danışmanım, Sayın Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK'a, tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayfer YALÇIN'a, Sayın Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a,

Her zaman desteğini hissettiğim, bana çok emeği geçen değerli hocam E.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Varol PABUÇÇUOĞLU'na ,

Biyokimya ABD Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sibel KONYALIOĞLU'na, Biyokimya ABD'daki tüm çalışma arkadaşlarıma ve Uzm. Biyolog Yalçın ERZURUMLU'ya,

Çalışmalarım kapsamında kullanılan plazmit ve siRNA dizisini hediye eden Sayın Dr. Shengyun FANG'a,

Tez çalışmalarım sırasında cihaz desteği sağlayan E.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD ve Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarına (FABAL),

Bu uzun süreç içerisinde en büyük fedakarlığı gösteren kişiler olan, sevgili kızım Melisa KÖSE'ye, eşim Gürkan KÖSE'ye ve beni yetiştiren sevgili aileme teşekkür ederim.

Doktora tezim kapsamında yapılan deneysel çalışmalar; PIRG-GA-2008-239409 nolu AB Projesi ve 12-ECZ-007 nolu Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Fadime AYDIN KÖSE

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR	xiii

BÖLÜM I

1 GENEL BİLGİLER.....	2
1.1 Akut Böbrek Yetmezliği	2
1.1.1 İskemik akut böbrek yetmezliği	4
1.1.2 İskemik akut böbrek yetmezliğinin hücresele patofizyolojisinde yer alan mekanizmalar.....	8
1.1.3 Hipoksik strese karşı gelişen adaptif yanıt: Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF).....	28

BÖLÜM II

2 GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
2.1 Kullanılan Gereçler	35
2.2 Kullanılan Sarf Malzemeleri	36
2.3 Kullanılan Çözeltiler	38
2.4 Yöntemler.....	41
2.4.1 Hücre kültürü	41
2.4.2 İskemik ABY modeli oluşturulması	42
2.4.3 Stres indüksiyonları.....	43
2.4.4 Geçici transfeksiyon yöntemi ile HK-2 hücrelerinde MANF ekspresyonunun düzenlenmesi	45

2.4.5	Hücrelerin lizatlanması	51
2.4.6	Protein miktar tayini.....	51
2.4.7	SDS-PAGE elektroforezi ve immünoiblotlama (Western Blotlama) ...	53
2.4.8	İmmünopresipitasyon yöntemi ile hücre besiyerinden MANF protein düzeyi tayini.....	56
2.4.9	WST-1 ile hücre proliferasyon analizi	57
2.5	İmmünoiblotlama Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin Dansitometrik Analizi.....	58
2.6	İstatistiksel Analiz	58

BÖLÜM III

3	BULGULAR.....	59
3.1	Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi.....	59
3.2	Optimizasyon Çalışmaları	60
3.2.1	HK-2 hücrelerinde iskemik ABY modeli oluşturulması.....	60
3.2.2	HK-2 hücrelerinde stres indüksiyonu optimizasyon çalışmaları	62
3.2.3	HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon işleminin optimizasyonu	66
3.2.4	HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon işlemi ile MANF kodlayan plazmid transfeksiyonu optimizasyonu	67
3.2.5	HK-2 hücrelerinde siRNA tekniği ile MANF gen ifadesinin susturulmasının optimizasyonu.....	68
3.3	HK-2 Hücrelerinde Stres İlişkilerinin İncelenmesi.....	69
3.3.1	Normoksi koşullarında OS, NS ve ER streslerinin incelenmesi.....	69
3.3.2	Hipoksi-reperfüzyonun OS, NS ve ER stresi üzerindeki etkisinin incelenmesi	85

3.4	HK-2 Hücrelerinde MANF Proteininin OS, NS, ER Stresi ve İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Etkisinin İncelenmesi.....	95
3.4.1	HK-2 hücrelerinde stres artışlarının hücre içi MANF düzeyi üzerindeki etkisi	95
3.4.2	MANF proteininin HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi	101
3.4.3	MANF proteininin HK-2 hücrelerindeki potansiyel sitoprotektif etkisinin hücre canlılık deneyleri ile incelenmesi.....	103
3.4.4	HK-2 hücrelerinde MANF protein ekspresyonu artışının stres yanıtları üzerindeki etkisinin stres belirteçleri ile incelenmesi	110
3.4.5	HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının stres yanıtları üzerindeki etkisinin stres belirteçleri ile incelenmesi.....	122
3.4.6	HK-2 hücrelerinde MANF proteininin olası parakrin etkilerinin incelenmesi	134

BÖLÜM IV

4	TARTIŞMA	137
4.1	HK-2 Hücre Hattının Seçimi	138
4.2	İskemik ABY’de Oksidatif Stres, Nitrozatif Stres ve ER Stresinin Karşılıklı Etkileşimleri.....	138
4.2.1	Normoksi koşullarında Oksidatif stres, Nitrozatif stres ve ER stresi	138
4.2.2	Hipoksi ve reperfüzyonda OS, NS ve ER stresi.....	141
4.3	HK-2 Hücrelerinde MANF Proteininin OS, NS, ER Stresi ve İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Fonksiyonu.....	151
ÖZET	160

ABSTRACT.....	162
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	164
ÖZGEÇMİŞ	185

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. pCIneo-MANF plazmid konsantrasyonu ve A260/280 oranı.....	49
Tablo 2. MANF siRNA'ya ait nükleotid dizisi.....	50
Tablo 3. SDS-PAGE ayırma jeli.....	54
Tablo 4. SDS-PAGE yığınlama jeli.....	54
Tablo 5. BSA standart eğrisine ait ortalama absorbans değerleri.....	59
Tablo 6. Stres düzeylerini belirlemek için kullanılan özgül stres belirteçleri ve antikorlar.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nefron yapısı ve oksijenasyonu.....	5
Şekil 2. Oksijen konsantrasyonunun ETZ’de sitokrom c oksidaz (Cco) fonksiyonu üzerindeki etkisi	13
Şekil 3. ETZ’de serbest radikal üretiminin oksijen konsantrasyonuna bağlı değişimi	14
Şekil 4. İskemi ve reperfüzyon koşullarında ROT ve RNT sentezi	15
Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında renal endotel ve epitel hücreler arasındaki ilişki.....	18
Şekil 6. ER stresi ve katlanmamış protein yanıtı.	22
Şekil 7. HIF-1 α ’nın normoksik ve hipoksik koşullardaki regülasyonu	30
Şekil 8. BSA standart eğrisine ait grafik.....	60
Şekil 9. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrasında süreye bağlı HIF-1 α miktarı değişimi.	60
Şekil 10. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında HIF-1 α miktarının süreye bağlı değişimi.....	61
Şekil 11. HK-2 hücrelerinde OS indüksiyonu için H ₂ O ₂ konsantrasyonunun optimizasyonu.	62
Şekil 12. HK-2 hücrelerinde H ₂ O ₂ ile OS indüksiyon süresinin optimizasyonu.	63
Şekil 13. HK-2 hücrelerinde ONOO ⁻ ile NS indüksiyonunun optimizasyonu.	64
Şekil 14. HK-2 hücrelerinde tunikamisin ile ER stresi indüksiyon süresinin optimizasyonu.	65
Şekil 15. HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile pEGFP kodlayan plazmid transfeksiyonunun optimizasyonuna ait floresans mikroskopu görüntüleri.....	66

Şekil 16. HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon işlemi ile MANF kodlayan plazmid transfeksiyonunun optimizasyonu.....	67
Şekil 17. HK-2 hücrelerinde siRNA uygulaması ile MANF gen ifadesinin susturulmasının optimizasyonu.....	68
Şekil 18. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz protein düzeylerine ait bulgular	71
Şekil 19. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS protein düzeylerine ait bulgular.....	72
Şekil 20. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular	73
Şekil 21. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular.	74
Şekil 22. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular.....	76
Şekil 23. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular.....	77
Şekil 24. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular	78
Şekil 25. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeyine ait bulgular.	79
Şekil 26. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası CHOP, GRP-78, eIF-2 α ve P-eIF-2 α protein düzeylerine ait bulgular	81
Şekil 27. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular.	82

Şekil 28. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular	83
Şekil 29. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular.	84
Şekil 30. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrasında HIF-1 α düzeylerine ait IB görüntüsü.....	85
Şekil 31. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular..	86
Şekil 32. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular..	87
Şekil 33. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular.	88
Şekil 34. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular	89
Şekil 35. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında HIF-1 α düzeyine ait IB görüntüsü.....	90
Şekil 36. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular.....	91
Şekil 37. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular.....	92
Şekil 38. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular	93
Şekil 39. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular.	94

Şekil 40. HK-2 hücrelerinde OS indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerine etkisi.	96
Şekil 41. HK-2 hücrelerinde NS indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerine etkisi.	97
Şekil 42. HK-2 hücrelerinde ER stresi indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi.....	98
Şekil 43. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi.....	99
Şekil 44. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi.....	100
Şekil 45. MANF proteini over-ekspresyonunun HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi.	102
Şekil 46. MANF gen ifadesinin susturulmasının HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi.	103
Şekil 47. Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin OS'e duyarlılıklarını gösteren grafik.....	104
Şekil 48. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin OS'e duyarlılıklarını gösteren grafik.....	105
Şekil 49. Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin ER stresine duyarlılıklarını gösteren grafik.	106
Şekil 50. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin ER stresine duyarlılıklarını gösteren grafik.....	106
Şekil 51 Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin hipoksiye duyarlılıklarını gösteren grafik.....	107

Şekil 52. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin hipoksiye duyarlılıklarını gösteren grafik.....	108
Şekil 53. Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin hipoksi-reperfüzyon hasarına karşı duyarlılıklarını gösteren grafik....	109
Şekil 54. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin hipoksi-reperfüzyon hasarına karşı duyarlılıklarını gösteren grafik.....	110
Şekil 55. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun OS üzerindeki etkisine ait bulgular.	112
Şekil 56. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun NS üzerindeki etkisine ait bulgular.	114
Şekil 57. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun ER stresi üzerindeki etkisine ait bulgular.....	116
Şekil 58. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun hipoksi üzerindeki etkisine ait bulgular.....	118
Şekil 59. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun hipoksi-reperfüzyon üzerindeki etkisine ait bulgular.....	121
Şekil 60. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının OS üzerindeki etkisine ait bulgular.....	124
Şekil 61. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının NS üzerindeki etkisine ait bulgular.....	126
Şekil 62. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının ER stresi üzerindeki etkisine ait bulgular.....	128
Şekil 63. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi üzerindeki etkisine ait bulgular.....	130

Şekil 64. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisine ait bulgular	133
Şekil 65. HK-2 hücrelerinden besiyerine salgılanan MANF düzeyinin IP ile belirlenmesine ait bulgular.....	136

KISALTMALAR

ABY: Akut böbrek yetmezliği,

AP-1: Aktivatör protein-1,

ARE: Antioksidan yanıt elementi,

ARMET: Arginine-rich mutated in early stage tumors,

ATF-4: Siklik AMP bağımlı transkripsiyon faktörü-4,

ATF-6: Aktive edici transkripsiyon faktörü-6,

CHOP: CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein,

eIF-2 α : İnisiyasyon faktörü-2 α ,

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz,

ER: Endoplazmik retikulum,

ERAD: Endoplazmik retikulum ilişkili yıkım,

ERK: Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz,

ERSE: Endoplazmik retikulum stres elementi,

ESM: Ekstraselüler matriks,

ETZ: Elektron transport zinciri,

FIH: HIF inhibe edici faktör,

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı,

GRP-78/ Bip: Glukoz ile regüle edilen protein-78/immünglobulin bağlayıcı protein,

GRP-94: Glukoz ile regüle edilen protein-94,

H₂O₂: Hidrojen peroksit,

HIF: Hipoksi ile indüklenen faktör,

HO[•]: Hidroksil radikali,

HOCl: Hipokloröz asit,

HRE: Hipoksi yanıt elementi,

IRE-1: İnozitol gerektiren kinaz-1,

IB: İmmünoblotlama,

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz,

JNK: c- JUN-NH₂- terminal kinaz,

KBY: Kronik böbrek yetmezliği,

KDH: Ksantin dehidrogenaz,

KIM-1: Böbrek hasar molekülü-1,

KO: Ksantin oksidaz,

MANF: Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor,

MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinaz,

NF-κB: Nükleer faktör- kappa B

NGAL: Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin,

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz,

NO[•]: Nitrik oksit,

NO₂⁻: Nitrit,

NOS: Nitrik oksit sentaz,

Nrf2: Nükleer faktör-eritroil-ilişkili faktör 2,

NS: Nitrozatif stres,

O₂^{•-}: Süperoksit radikali,

ONOO⁻: Peroksinitrit,

OS: Oksidatif stres,

P- eIF-2 α : Fosforillenmiş inisiasyon faktörü-2 α ,

PARP: Poli-ADP-riboz polimeraz,

PCC: Protein karbonil grupları,

PERK: Protein kinaz RNA benzeri kinaz,

PHDs: Oksijen bağımlı prolil hidroksilazlar,

PMNL: Polimorf nükleer lökosit,

pVHL: von Hippel-Lindeu proteini,

RNT: Reaktif nitrojen türleri,

ROT: Reaktif oksijen türleri,

SOD: Süperoksit dismutaz,

UPR: Katlanmamış protein yanıtı,

UPRE: Katlanmamış protein yanıtı elementi,

XBP-1: X-box bağlayıcı protein-1,

3-NT: 3-nitrotirozin

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Akut böbrek yetmezliği (ABY), böbrek fonksiyonlarının ani olarak gerilemesi sonucunda ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Yapılan araştırmalar sonucunda ABY'ne yönelik yeni birçok tedavi stratejileri geliştirilmiş olmasına rağmen, halen yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili bir sendrom olarak değerlendirilmektedir.

ABY gelişiminin en yaygın nedeni, böbrek dokusuna ulaşan kan akımının geçici olarak azalması ile meydana gelen iskemik hasardır. Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar sonucunda, oksidatif stres (OS), nitrozatif stres (NS) ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin iskemik hasarın patofizyolojisinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bu sendromun patofizyolojisinde rol oynayan hücresel mekanizmaların daha iyi anlaşılması, hedefe yönelik etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda, iskemik ABY patogeneğinde hipoksi ve ER stresinin rolü üzerindeki çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Bu konuyla ilgili ilişkilendirilen proteinlerden biri de MANF/ARMET'dir. İlk kez 2008 yılında bir ER stresi yanıt proteini olarak rapor edilen bu proteinin fonksiyonları ile ilgili henüz az sayıda çalışma bulunduğu tespit edilmiştir. MANF/ARMET'in iskemik hasardaki rolünün incelendiği çalışmalarda, iskemik kalp ve beyin dokularında sitoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir. Literatürde MANF/ARMET'in iskemik böbrek dokusundaki ekspresyonu veya fonksiyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada iskemik ABY patofizyolojisinde OS, NS ve ER stresi etkileşimlerinin ve MANF/ARMET proteininin olası hücre içi ve parakrin koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1 GENEL BİLGİLER

1.1 Akut Böbrek Yetmezliği

Son yıllarda daha çok *akut böbrek hasarı* olarak isimlendirilen ABY; böbrek fonksiyonlarının ani olarak bozulması sonucunda, glomerüler filtrasyon hızının (GFR) azalması ve kanda üre azotu, kreatinin, üremik toksinlerin artması ile karakterize bir sendromdur (15, 34). Uluslararası bir komite olan “Acute Kidney Injury Network” tarafından belirlenen ve klinikte de kabul gören tanımlama kriterinde, ABY böbrek fonksiyonlarının 48 saat veya daha kısa bir süre içinde azalması, artmış serum kreatinin düzeyi (> 0.3 mg/dL) ve oligüri (< 0.5 ml/kg/saat) üzerinden değerlendirilmektedir (4,40).

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) olarak adlandırılan sendromda ise, böbrek fonksiyonlarının kaybı ve GFR'deki azalma daha uzun bir süreçte (aylar, yıllar gibi) gelişmektedir. ABY gelişen olguların % 30- 70 oranında KBY'ne dönüştüğü ve son dönem böbrek yetmezliğine kadar ilerleyebildiği de bilinmektedir (8, 15, 74).

ABY gelişiminde, sepsis, iskemi, yanlış ilaç kullanımı, nefrotoksik ajanlar, çoklu organ bozuklukları, cerrahi operasyonlar ve şok önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır. ABY'nin en yaygın nedeni ise böbrek dokusunda oluşan iskemik hasardır (14, 15, 36). Böbreklere gelen kan akımında ani ve geçici bir azalma nedeniyle ortaya çıkan bu sendromda, dokunun lokal olarak oksijenlenmesinin bozulması ve metabolik atıkların dokuda birikimi sonucunda tübüler epitel hücrelerde hasar meydana gelir, eğer hasar ileri düzeyde ise apoptoz/nekroz yoluyla hücre ölümü gerçekleşir (8, 24).

Yukarıda da belirtildiği gibi, klinikte ABY tanısı için kullanılan genel parametre; serum kreatinin düzeyi artışıdır. Ancak, serum kreatinin düzeyi artışının

gözlenmediği bazı durumlarda da böbrek yetmezliğinin geliştiği bildirilmiştir (15). Bu nedenle, son yıllarda ABY erken tanısı için, renal hasarın gelişmesi ile ultrafiltrata salıverilen interlökin-18 (IL-18), böbrek hasar molekülü-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1) ve nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) düzeyleri de incelenmektedir (4, 8, 34).

ABD’de 2006 yılında yapılan bir çalışmada, ABY insidansının % 1.9, bu hastalardaki mortalite oranınının % 21.3 olduğu, ancak yoğun bakım hastalarında gelişen ABY durumlarında mortalite oranınının % 80’e kadar çıkabildiği bildirilmiştir (76). Ülkemizde ise, Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre, 2007 yılında 5498 hastaya ABY tanısı konulmuş olup, bu hastalarda mortalite oranı % 15.1 olarak belirlenmiştir (38).

Akut böbrek yetmezliği sendromu etiyopatogenezine göre; prerenal, intrinsik ve postrenal olmak üzere üç grupta incelenir (8, 24, 34) :

I. Prerenal ABY: Böbreklere ulaşan kan akımının azalmasına (hipoperfüzyona) bağlı olarak gelişir. Kısa süreli hipoperfüzyon parankim doku hasarına neden olmaz. Ancak, hipoperfüzyonun şiddeti ve süresi uzadıkça, koruyucu mekanizmalar yetersiz olmaya başlar ve akut tübüler nekroz ve ABY gelişir. Prerenal ABY olgularında, dokuda perfüzyonun normale dönmesi ile birlikte renal fonksiyonlar 24-48 saat içerisinde geri kazanılır.

II. İntrensik ABY: Prerenal ABY’nden en önemli farkı, gelişen hipoperfüzyonun böbrek parankim dokusunda hasar oluşturmasıdır. Oluşan parankim doku hasarına bağlı olarak, intrinsik ABY başlıca; tübüler, vasküler ve interstisyel hastalıklar olmak üzere 3 ayrı kategoride incelenir. Tübüler hastalıkların en yaygın nedeni ise iskemi ve toksinlere bağlı gelişen akut tübüler nekrozdur (ATN).

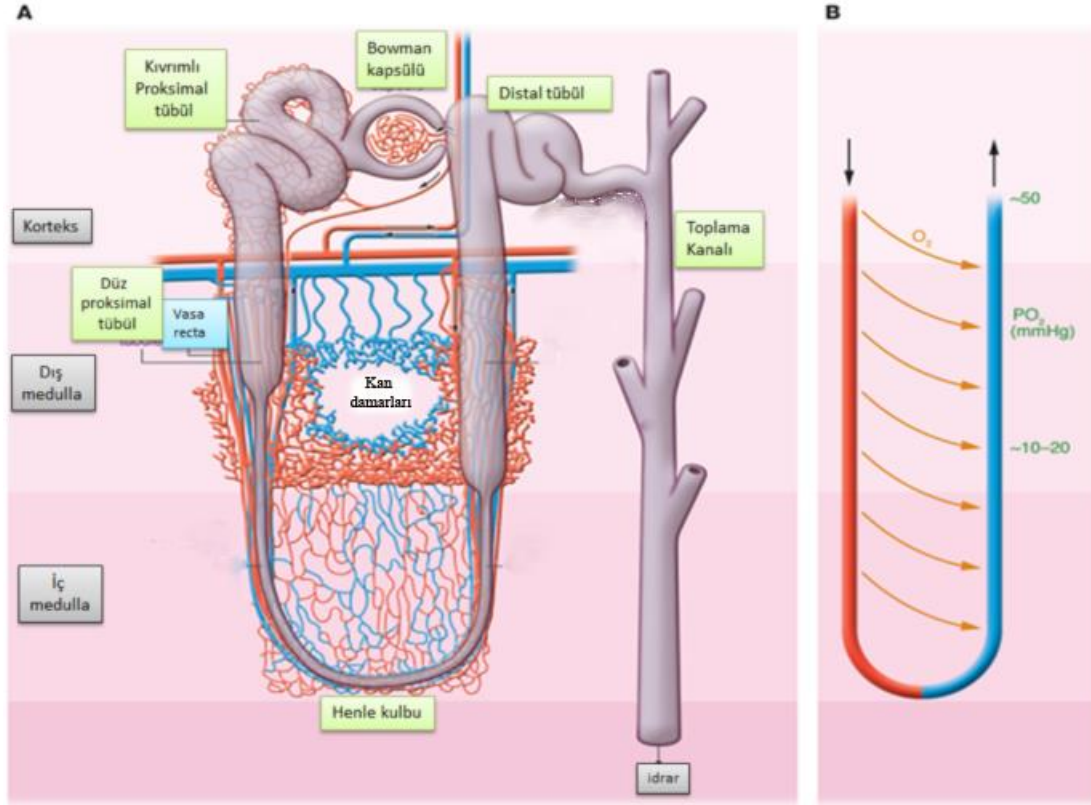
Genellikle geri dönüşümlü bir olay olmasına karşılık, hasarın şiddetine göre kalıcı böbrek yetmezliğine neden olabilir.

III. Postrenal ABY: İdrar yollarının ani obstrüksiyonu sonucunda her iki böbreğin de idrar akımının bozulması ile oluşur. Alt üriner sistemde gelişen taş, pıhtı, papiller nekroz, kanser, eksternal kompresyon, prostatik hiperplazi gibi tıkanıklık oluşturan etkenler nedeniyle meydana gelir.

Genel olarak, ABY vakalarının yaklaşık % 50'sinin prerenal, % 45'inin intrinsik ve % 5'lik kısmının ise postrenal ABY'nden kaynaklandığı, prerenal ve intrinsik ABY'nin en yaygın nedeninin ise iskemi olduğu belirtilmiştir (15, 105).

1.1.1 İskemik akut böbrek yetmezliği

Böbrekler kan akımının en yoğun olduğu organlardan olmalarına rağmen, böbrek dokusunda arteriyel ve venöz damarların paralel olarak bulunması, böbrek hücrelerinin O₂ konsantrasyonunun diğer dokulara göre daha düşük olmasına yol açar (105). Böbreklere ulaşan kan akımının büyük bölümü kortekse yönlendirilmekte olup, buradaki O₂ basıncı yaklaşık olarak 30- 50 mmHg kadardır. Ancak medulla bölgesinde O₂ basıncı hem daha düşük (yaklaşık 10 ila 25 mmHg), hem de üriner filtrat ve kan akımı arasındaki ters akım nedeniyle dışarıdan içeriye doğru giderek daha da azalmaktadır (15, 55, 105), (Şekil 1). Bu nedenle böbrek dokusu, O₂ konsantrasyonu değişikliklerine karşı son derece duyarlıdır.



Şekil 1. Nefron yapısı ve oksijenasyonu. (A) nefron anatomisi, (B) oksijen gradiyenti (15).

Böbrek dokusunun oksijenasyonu, O_2 kaynağı ve tüketimi arasındaki denge ile sağlanır. Hücrede mitokondriyal bozukluklar veya O_2 tüketen alternatif yolların aktive olması bu dengenin bozulmasına neden olmaktadır (55, 120).

İskemi, doku veya organı besleyen kan akımının bozulmasıdır. İskemi sonucunda, kan dolaşımı ile dokuya ulaşması gereken O_2 ve glukoz miktarı azalır ve hücrelerin enerji metabolizması bozulur. Dokunun iskemik hücre ölümünden korunması için, kan akımının bir an önce normale dönmesi, yani reperfüze olması gereklidir. Ancak dokuya yeniden kan akımının, dolayısıyla O_2 'in ulaşması paradoksal olarak, tek başına iskeminin neden olduğu hasardan daha ciddi bir hasara, hatta hücre ölümüne neden olabilmektedir. İskemi; O_2 ve glukoz yokluğundan kaynaklanan hücre hasarına ve ölümüne yol açarken, reperfüzyon ise O_2 dönüşü ile

hasara neden olmaktadır. Bu nedenle iskemi ve reperfüzyon hem ayrı, hem de birlikte değerlendirilmesi gereken patolojik durumlardır (24, 34).

İskemik ABY, akut veya kronik dolaşım bozuklukları, sistemik kan basıncının azalması, ateroskleroz, emboli, renal arteriyal tromboz gibi çok farklı pre-renal veya renal nedenlerle gelişebilmektedir. Bunlara renal transplantasyon, kardiyak anestezi veya aortik klempleme yapılan çeşitli operasyonlar da dahil edilebilir (74).

Böbreklerde iskemi-reperfüzyon hasarının moleküler mekanizmaları henüz yeteri kadar açıklanamamış olup, konuyla ilgili çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir (14, 15).

1.1.1.1 İskemi- reperfüzyonun neden olduğu böbrek doku hasarının özellikleri

Böbrek dokusunda, bölgesel olarak değişen O₂ gradiyentinden ve hücrel metabolizma farklılıklarından dolayı, iskemi-reperfüzyon hasarının şiddeti de doku içerisinde farklılık göstermektedir. İskemik ABY'nde glomerüler hasar genellikle önemsenmeyecek derecede az olmasına rağmen, proksimal ve distal tübüler hücrelerde oluşan hasar son derece ciddidir. Proksimal tübüler hücreler, Na⁺/K⁺ ATPaz pompaları ile gerçekleştirdikleri yüksek metabolik aktivitelerinden dolayı, böbrek dokusunun hipoperfüzyona en duyarlı bölümleridir (24, 152).

Hasara uğrayan hücreler, hasarın şiddetine ve dokuda buldukları bölgeye göre, hasar sonrasında rejenere olarak yaşamlarını devam ettirebilir, ya da ağır hasarlı olanlar apoptoz/nekroz yolu ile ölürler (14, 15, 34).

Proksimal tübüler hasarın özellikleri

Normal koşullarda, epitel hücreleri birbirleri ile F-aktin hücre iskeleti tarafından düzenlenen sıkı bağlantılar ve adezyon bağlantıları sayesinde iletişim içerisindedirler. Hipoksi sonrasında ATP'nin azalmasıyla, proksimal tübüler hücrelerde aktinin lokalizasyonu apikal membrandan lateral membrana doğru kayar. Böylece, aktin-hücre iskeletinin bütünlüğü bozulur. Bunun sonucunda, hücre matriksi adezyonu da hasara uğrar, hücreler arası adherent ve sıkı bağlantılar kaybedilir ve hücre-hücre etkileşimi bozulur (15, 34, 134).

Şiddetli hasarlarda sağlıklı epitel hücre sayısı azalır, ultrafiltrat ve interstisyum arasında, tek filtre olarak bazal membran kalır. İncelen yapı permeabiliteyi artırır ve glomerüler filtratın geri kaçışına yol açar. Hasar gören ve ortadan kaldırılan hücrelere ait hücre debrisleri ve proteinleri filtrata geçerek tübülün obstrüksiyonuna yol açabilir (8, 15).

ABY gelişimi ile, özellikle proksimal tübüler hücreleri hasardan korumak üzere, KIM-1 ve NGAL gibi çok sayıda protein aktive olur. NGAL, normalde nefron ve diğer organlarda sentezlenen ve proksimal tübülden reabsorbe edilen bir demir taşıyıcı proteindir. KIM-1 ise, fosfatidil serin reseptörü olup, proksimal tübüler hücrelerde apoptotik hücreleri tanır ve lizozomlara yönlendirir. KIM-1 ve NGAL ABY'nin erken tanı belirteçleri olarak klinikte kullanılmaktadır (4, 8).

Distal tübüler hasarın özellikleri

Distal tübüler hücreler, azalan O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak oksidatif enerji üretimini hızla glikolitik enerji üretimi şekline dönüştürebildiği için hasardan daha az etkilenirler (152). Ayrıca iskemi, distal tübüler hücrelerde proksimal tübüler hücrelerden farklı olarak, *mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK)/*

ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) sinyal yolağını da aktive eder (134). Hücre membranından nükleusa bilgi akışı sağlayan bu sinyal yolağı, anti-apoptotik Bcl-2 proteini ve onarıcı büyüme faktörleri gibi sitoprotektif moleküllerin transkripsiyonunu artırır. Bu mekanizmanın, distal tübüler hücrelerin iskemik hasara karşı korunmasında katkı sağladığı belirlenmiştir (15, 134).

1.1.1.2 İskemik ABY sonrasında KBY gelişimi

ABY'nde ekstraselüler matriks'in (ESM) ileri derecede bozulması ve dirençli tübülointerstisyel inflamasyon gelişimi tübüler hasarın yeteri kadar onarılamamasına neden olur. Onarılamayan böbrek hasarı, fibrozis ile kronik KBY gelişimine yol açar (55, 103). İskemik ABY'nden sonra fibrozis gelişimi önemli bir klinik sonuç olmasına rağmen, bu durumun moleküler mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Uzun süreli hipoksi, böbreklerde peritübüler mikrodamarların kaybı ve immün yanıtın şiddetlenmesi gibi olaylarla post-iskemik fibrozise neden olmaktadır. Ayrıca mezenşimal-epitelyal hücre dönüşümünün ve epitelyal hücreler tarafından sentezlenen pro-fibrotik mediyatörlerin de fibrozis gelişimine katkı sağladığı bildirilmiştir (54, 105).

1.1.2 İskemik akut böbrek yetmezliğinin hücresel patofizyolojisinde yer alan mekanizmalar

Daha önce de değinildiği gibi, halen önleyici ve iyileştirmeye yönelik tedavilerin yetersiz olduğu iskemik böbrek yetmezliğinin moleküler mekanizmasının iyi anlaşılması, hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (4, 15).

Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalarda, oksidatif stres/nitrozatif stresin, endotel hücrelerinin, inflamasyonun ve endoplazmik retikulum stresinin iskemik

hasarın gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (4, 60, 70, 98). Ancak bir seri hücrel ve humoral yolağı tetikleyen bu olayların moleküler mekanizmaları ve etkileşimleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

1.1.2.1 Reaktif oksijen ve nitrojen türleri

Yapılarında bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili ve stabil olmayan atom veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (47, 136). Aerobik organizmalarda, yaşamın devamı için gerekli olan O_2 , aynı zamanda en önemli serbest radikal kaynağıdır (48, 139). O_2 , dış orbitalinde iki adet çiftlenmemiş elektron taşımasından dolayı, yüksek bir redoks potansiyeline sahiptir. Organizmada enerji üretiminden sorumlu başlıca yol olan oksidatif fosforilasyonda ETZ'e aktarılan elektronlar, son basamakta $1/2 O_2$ 'ne aktarılır. Bu reaksiyon sonucunda, O_2 suya indirgenerek kararlı hale geçer ve kimyasal enerji salıverilir. Ancak, geçiş metalleri gibi uygun katalizörlerin varlığında, O_2 kısmi olarak indirgenerek reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturabilir (48). ROT'nin en önemlileri; süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikalidir (HO^{\bullet}). Hidrojen peroksit (H_2O_2) ise çok kuvvetli bir reaktif molekül olan HO^{\bullet} oluşturmasından dolayı ROT arasında yer almaktadır. $O_2^{\bullet-}$, oksijenin tek elektron alarak indirgenmesiyle oluşur ve süperoksit dismutaz ile H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 ise katalaz ve glutatyon peroksidaz ile suya dönüştürülür. Ancak, Fe^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının varlığında çok reaktif bir molekül olan HO^{\bullet} oluşturur (46, 47, 151).

ETZ dışında, endojen ROT oluşumuna yol açan diğer mekanizmalar arasında miyeloperoksidaz enzimi, oksidatif protein katlanması, peroksizom aktivitesi ve ksantin oksidaz sistemi sayılabilir (102, 151).

Oksijen kaynaklı radikallerden başka, hücrede endojen olarak sentezlenen ve hasara neden olan azot kaynaklı radikaller de vardır. Bu radikaller reaktif azot türleri (RNT) olarak adlandırılır. Bunlardan en önemli olanı nitrik oksit radikalidir (NO^{\bullet}). Nitrik oksit, hücrede L-arginin'in sitriline dönüşümü sırasında, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından, yan ürün olarak sentezlenmektedir. NO^{\bullet} , ortamda bulunan $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikali ile doğrudan reaksiyona girerek, fizyolojik özelliklerini kaybeder ve çok daha reaktif bir molekül olan peroksinitrit (ONOO^-) oluşturur (43, 124, 137).

ROT ve RNT, hücredeki proteinler, polisakkaritler, lipitler ve nükleik asitler gibi makromoleküller ile reaksiyona girerek yapısal modifikasyonlara ve fonksiyon bozukluklarına yol açarlar (10, 62).

Oksidatif Stres ve Nitrozatif Stres

Fizyolojik koşullarda, hücrel ROT ve RNT üretimi ile antioksidan moleküller arasında bir denge bulunmaktadır. ROT ve RNT'nin zararlı etkileri antioksidan moleküller tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Hücrede ROT üretimi ile bu moleküllerin antioksidan sistem tarafından nötralizasyonu arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres (OS) olarak tanımlanır (48). Hücrede RNT'lerin artışı ile meydana gelen hasar ise nitrozatif stres (NS) olarak tanımlanmaktadır (10). OS/NS artışı, hücrenin redoks dengesinin bozulmasına yol açar. Redoks dengesindeki değişiklik sinyal iletim yolları, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, endoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınımı, makro moleküllerin fosforilasyonu ve enzim aktivasyonu gibi çeşitli hücrel olayların indüklenmesine veya baskılanmasına neden olur (6, 60, 71, 158).

Yaşlanma ve aralarında hipertansiyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, diyabet, Alzheimer hastalığı gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde OS ve NS yer almaktadır (6, 46).

Hipoksi ve Oksidatif Stres/Nitrozatif Stres İlişkisi:

İskemi sürecinde, hücrelerdeki düşük O₂ konsantrasyonu nedeniyle, OS/NS oluşumu paradoksal bir durum olarak düşünülse de, literatürde yer alan ilk çalışmalarda hem hipoksi, hem de reperfüzyon sürecinde OS ve NS düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (29, 98, 117). Ardından yapılan çalışmalarda iskemik ABY'de, ROT ve RNT'nin renal hasar gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (28, 69, 109, 156, 158). Ayrıca, ABY'nin kronik böbrek yetmezliğine dönüşmesinde, ROT'nin majör rol oynadığı ileri sürülmüştür (36).

İskemi-reperfüzyon sırasında, ROT ve RNT'nin, renal tübüler hücrelerde, doğrudan toksik etki ile hücre hasarına/ölümüne neden olmasının yanı sıra, nükleer faktör-kappa B (NF-κB), aktivatör protein-1 (AP-1) gibi çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenleyen bir sinyal molekülü olarak görev yaptığı da belirlenmiştir (1, 6). İskemik hasarda ROT ve RNT artışının birden çok mekanizma ile ilişkili olması konuya duyulan ilgiyi arttırmıştır.

Hipoksi ve reperfüzyon şartlarında, O₂ radikali konsantrasyonu değişikliğine bağlı olarak, farklı hücresel mekanizmalar ile ROT/RNT üretildiğine yönelik çeşitli bulgular vardır (107, 109, 125). Her iki koşulda da, ROT ve RNT üretimine neden olan kaynakların belirlenmesi ile ilgili tartışmalar devam etmekte olup, henüz tam olarak açıklanamamıştır (20, 25, 120).

Hipoksik koşullarda hücrede ROT artışı, mitokondriyal ETZ ile ilişkilendirilmektedir (18, 138). Normal koşullarda, mitokondriler oksidatif

fosforilasyon ile hücrenin en fazla O₂ kullanan organelidir. Ancak, solunum sırasında kullanılan oksijenin yaklaşık % 1-2 kadarının suya kadar indirgenemediği, ETZ'nin Kompleks I ve Kompleks III bölümlerinden sızan elektronlar ile kısmi olarak indirgenerek, O₂^{•-} radikaline dönüştüğü bilinmektedir (120, 138).

Hipoksik koşullarda ise, hücreler ATP sentezi için anaerobik glikoliz yolağını kullanmaya başlarlar. Bununla birlikte, ortamda bulunan az miktardaki O₂ ile oksidatif ATP üretimine devam edildiği ileri sürülmektedir (117). Ancak hipoksik şartlarda hücrede homeostazın bozulmasıyla, ETZ bileşenlerinin fonksiyonlarında değişiklik meydana geldiği ve elektron aktarımının doğru bir şekilde gerçekleşmediği belirtilmektedir (117, 125). Diğer taraftan, hipoksida hücredeki O₂ konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle, ETZ'ne ulaşan elektronların tamamının O₂'e aktarılamadığı da bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı, hipoksik koşullarda ETZ aktivitesi sırasında elektron sızıntılarının artmasıyla ROT sentezinin de arttığı düşünülmektedir (9).

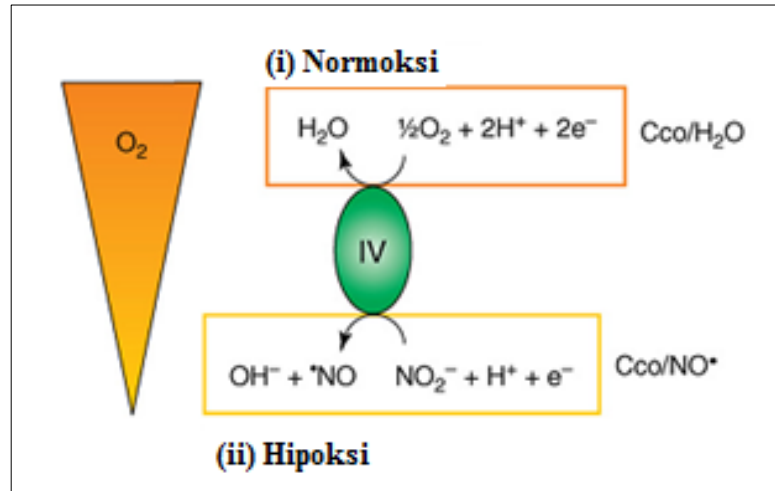
Memeli hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucunda, normoksiden farklı olarak, hipoksi sürecinde üretilen O₂^{•-} radikali oluşumunda, ETZ'deki Kompleks III ve sitokrom c oksidaz'ın sorumlu olduğu bildirilmiştir (88, 120, 121).

Ayrıca hipoksik koşullarda, mitokondriyal ETZ' nin sadece ROT artışından değil, aynı zamanda RNT'nin artışından da sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (20, 101, 138).

İskemik ABY'nde, hipoksi ile renal dokuda NO[•] düzeyinin ve nitrozatif stresin arttığı; *hipoksi ile indüklenen faktör* (HIF) tarafından iNOS ekspresyonunun arttırıldığı, eNOS ekspresyonunun ise baskılandığı gösterilmiştir (42, 66, 78).

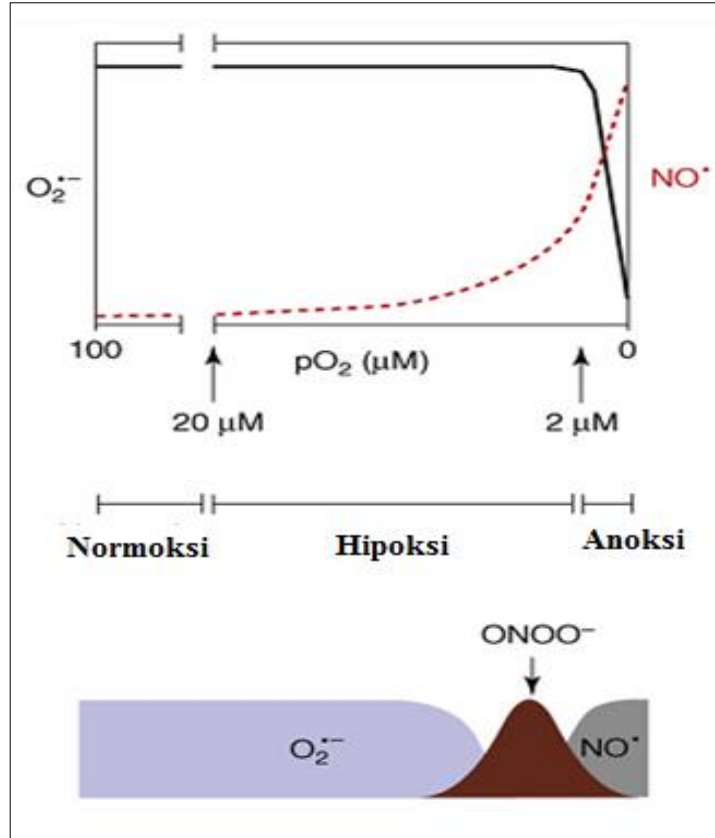
Diğer taraftan, NOS aktivitesi için O_2 ve NADPH gerekli oluşu için, hipoksik koşullarda NO^* düzeyinin önemli derecede artışında, NOS'dan bağımsız bir mekanizmanın daha rol oynayabileceği düşünülmektedir (120).

Bu konuda yapılan araştırmalar sonucunda, hipoksik hücrelerde NO^* üretiminden sitokrom c oksidaz'ın sorumlu olduğu belirlenmiştir. Sitokrom c oksidaz, normokside O_2 'in suya redüksiyonunu katalizlerken, hipokside ise nitrit redüktaz fonksiyonu gösterdiği ve nitritin (NO_2^-) redüksiyonu ile NO^* sentezlediği bildirilmiştir. Hipokside O_2 konsantrasyonunun ve hücre pH'sının azalması sonucunda nitrit konsantrasyonunun arttığı ve sitokrom c oksidaz enziminin oksidaz/nitrit redüktaz fonksiyonları arasında değişiklik olduğu öne sürülmüştür (Şekil 2) (20).



Şekil 2. Oksijen konsantrasyonunun ETZ'de sitokrom c oksidaz (Cco) fonksiyonu üzerindeki etkisi (120).

İskemi sırasında ETZ tarafından üretilen radikal türünün O_2 konsantrasyonu ile ilişkili olarak değiştiği ve hem $ONOO^-$, hem de O_2^* radikali sentezlendiği ileri sürülmüştür (Şekil 3) (20, 121).

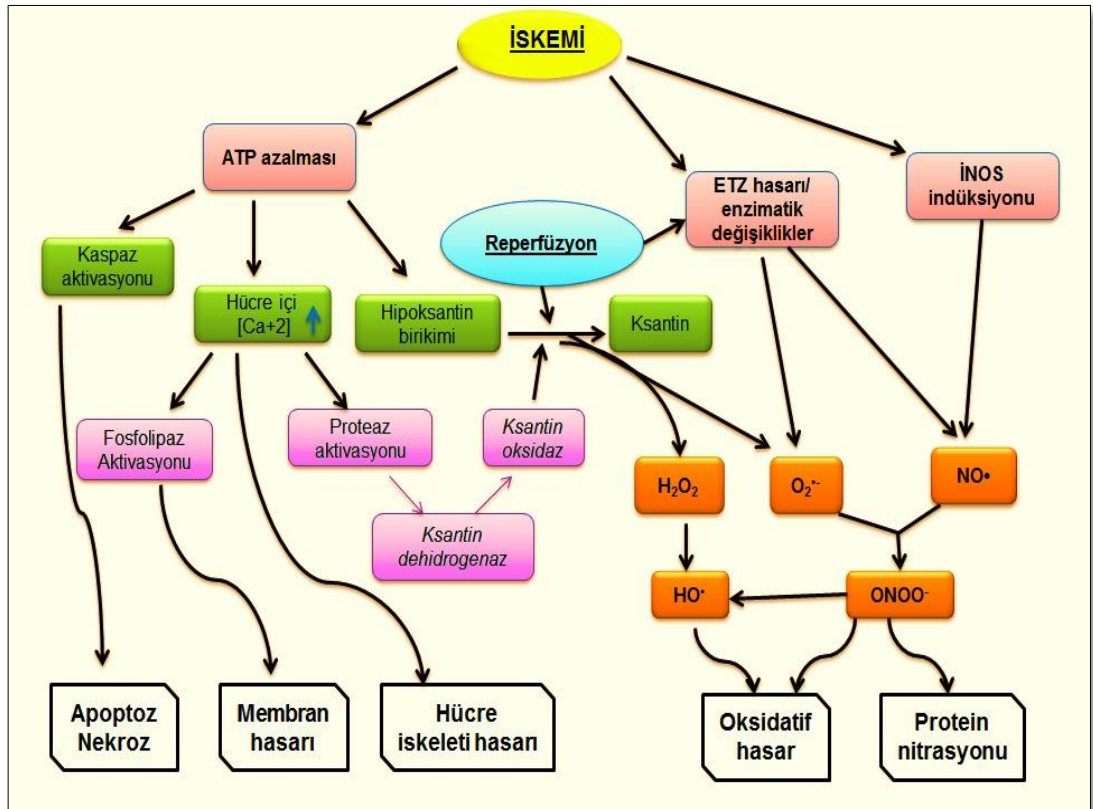


Şekil 3. ETZ'de serbest radikal üretiminin oksijen konsantrasyonuna bağlı değişimi (120).

İskeminin ardından dokuya yeniden O₂'in ulaştığı reperfüzyon fazında ise; OS ve NS' in daha da arttığı belirlenmiştir (6, 25, 34). Bu fazda, ROT ve RNT sentezi, birkaç özel durum dışında, normoksik hücrelerdekine benzer mekanizmalar ile gerçekleşmektedir.

Hipoksi sürecinde ROT ve RNT artışıyla hücredeki antioksidan savunma mekanizmaları zayıflamakta ve reperfüzyon fazında üretilen radikaller hücrede daha fazla hasar oluşumuna neden olmaktadır (18, 125). Ayrıca reperfüze olan dokuya, kan akımı ile birlikte ulaşan polimorf nükleer lökositler (PMNL)'in de, *miyeloperoksidaz* aracılığıyla, ROT/RNT üretimine katkıda bulunduğu, hatta hasarın ilerlemesine yol açtığı belirtilmiştir (24, 78).

Reperfüzyon fazında, OS/NS artışına neden olan bir başka endojen kaynağın *ksantin oksidaz enzim sistemi* olduğu ileri sürülmektedir (94). Önerilen bu mekanizma, hipoksik koşullarda hücre içi Ca^{+2} düzeyi artışı ile aktive olan *kalpain* enziminin proteolitik bir reaksiyon ile ksantin dehidrogenaz (KDH) enzimini ksantin oksidaz'a (KO) dönüştürmesiyle ilişkilendirilmektedir. KO enzimi oksijene bağımlı çalışan bir enzim olduğundan, hipoksik süreçte inaktif olup, reperfüzyon aşamasında ise aktif hale gelir. Bu enzim aktivitesi sonucunda ara ürün olarak H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ radikali üretilir (94, 151). Böylece oluşan radikaller, reperfüzyon sürecinde ROT/RNT üretimine katkı yapmaktadır.



Şekil 4. İskemi ve reperfüzyon koşullarında ROT ve RNT sentezi.

1.1.2.2 Hipoksi ve endotel hücrelerinin ilişkisi

İskemik ABY patofizyolojisinde endotel hücrelerinin mikrosirkülasyonu ve meydana getirdikleri inflamatuvar yanıt büyük önem taşımaktadır. Endotel hücreleri, vasküler tonusun düzenlenmesinde, lökosit fonksiyonunda görev yapmaktadırlar. İskemi sonrasında endotelyumda gelişen hasarı kısaca özetlemek gerekirse; iskemi endotel hücrelerin şişmesine, integrasyonun azalmasına, endotelyumu kaplayan glikokaliks tabakasının hasara uğramasına neden olmaktadır. Sonuçta endotel ve epitel doku arasında bulunan tek tabakalı yapı bozularak vasküler permeabilite artmaktadır (8, 14, 15).

Ancak endotel hücrelerin sahip oldukları özellikler nedeniyle bu hasar mekanizmasına katılan çok sayıda etken vardır. Her bir etken tek başına hasar oluşturabilirken, biri diğerinin etkisini kuvvetlendirerek hasarın daha da şiddetlenmesine yol açabilmektedir (18, 34, 36) .

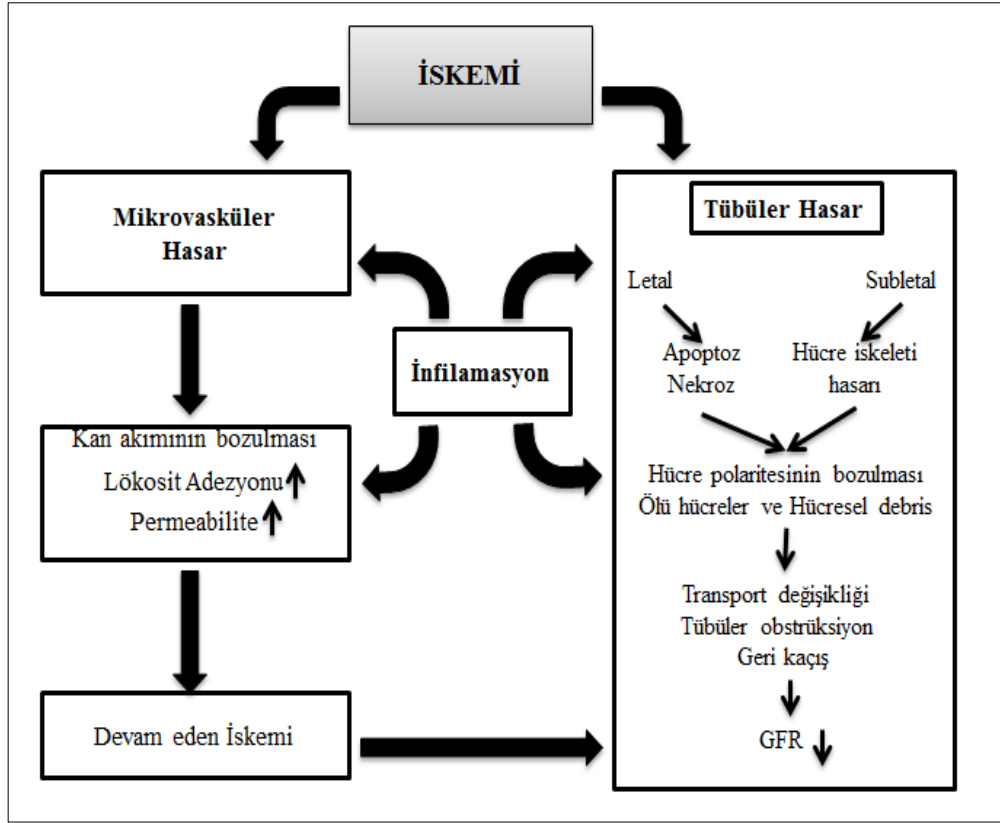
Endotel hücre hasarı sonrasında vazokonstriktör mediyatörlerin (endotelin-1, angiotensin II, tromboksan A2, prostaglandin H2, lökotrien C4 ve D4) sentezi artar, sempatik sinir sistemi stimülasyonu devreye girer. Eş zamanlı olarak hasarlı endotel hücrelerinde hem eNOS tarafından üretilen NO[•] sentezi, hem de vazodilatör mediyatörlere (asetilkolin, bradikinin ve NO[•]) verilen yanıt baskılanır. Sonuç olarak; küçük arteriyollerin normalden çok daha fazla daralması, renal kan akımının ve GFR hızının daha da azalmasına yol açar (15, 18).

Diğer taraftan hasara uğramış endotel hücrelerin lökositleri aktive etmesiyle, hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu artar, kemoatraktan moleküller ve sitokinler salgılanmaya başlar. Pro-inflamatuvar yolağın aktivasyonu ise hem

vazokonstriktör sitokinlerin salınımını arttırarak, hem de ROT üretimine neden olarak hücre/doku hasarının daha da ilerlemesine neden olmaktadır (4, 14, 141).

PMNL'ler intrinsik yol ile ROT üretebilme yeteneğine sahiptirler. Nötrofil aktivasyonunun ardından, PMNL'de 'solunum patlaması' meydana gelir. Bu olayda rol oynayan NADPH oksidaz, süperoksit dismutaz, nitrik oksit sentaz ve miyeloperoksidaz gibi enzimler tarafından $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , hipokloröz asit (HOCl) ve NO^{\cdot} gibi oksidatif hasara yol açan moleküller üretilir (8, 14, 141). Aktive PMNL'lerden salınan intrinsik enzimlerin de renal doku harabiyetine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (4). Ayrıca mikrosirkülasyonun azalması ve iskemik etkinin uzaması sonucunda kapiller damarlar PMNL'ler ile fiziksel olarak bloke olabilmekte ve bu durum PMNL'lerin etkisini daha da kuvvetlendirmektedir (34, 134).

İskemi-reperfüzyon hasarı ile endotel hücrelerinden salınan pro-inflamatuvar ve kemotaktik sitokinler, tübüler epitelyal hücrelerde de inflamatuvar yanıt gelişimine neden olurlar. Ayrıca, tübüler hücrelerin Toll-benzeri reseptörleri (Toll-like receptor, TLR), kompleman sistem reseptörlerini ve T lenfosit aktive edici molekülleri de eksprese etmeleri, bu hasara T lenfosit aktivasyonunun ve kompleman sisteminin de katılmasına yol açar. Bunun sonucunda, endotel hücre hasarı epitel hücre hasarını da beraberinde getirebilmektedir (4, 8, 15).



Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında renal endotel ve epitel hücreler arasındaki ilişki (8).

1.1.2.3 Hipoksi ve endoplazmik retikulum stresi

Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER); ökaryotik hücrelerde protein katlanmasının düzenlendiği en önemli organeldir. Hücrede salgılanan veya membran yapısına katılan proteinler gibi kompleks yapıli proteinler ER’de katlanırken, daha basit yapıli proteinler sitoplazmada katlanmaktadır. ER, protein katlanmasının yanı sıra, hücrede Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenlenmesi, glukoneogenez, lipit metabolizması, otofagozom ve peroksizom sentezi gibi birçok süreçte görev alan hücresel bir organeldir (89, 127, 154).

Yeni sentezlenmiş proteinler, oksidatif özellikteki ER lümeninde, N-glikozilasyon, disülfid bağı oluşumu, hidrosilasyon ve oligomerizasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar ile katlanır ve olgunlaşır (133).

ER homeostaz değişikliklerine karşı oldukça duyarlı bir organeldir. Hücre içi Ca^{+2} miktarının değişmesi, glukozun azalması, hipoksi, oksidatif stres, enerji yoksunluğu, inflamasyon, ısı şoku gibi çeşitli faktörler ER homeostazını değiştirerek, proteinlerin yanlış katlanmasına neden olabilmektedir. Yanlış katlanan ya da çözünürlüğü bozularak agregate olan proteinler, hücre için potansiyel toksik moleküller haline gelirler. Bu nedenle katlanan proteinler, ER'da bulunan kalite kontrol mekanizmaları ile sürekli, sıkı bir şekilde kontrol edilmektedirler (89).

ER kalite kontrol sisteminde görevli olan glukoz ile regüle edilen protein-78/immünoglobülin bağlayıcı protein (GRP-78/Bip), GRP-94, kalneksin, kalretikülin gibi şaperon moleküller, yanlış katlanmış proteinleri tanır ve tekrar katlanmak üzere yönlendirirler. Tekrar katlanması mümkün olmayan yanlış katlanmış proteinler ise, seçici olarak, ER'dan sitozole gönderilerek ER-aracılı yıkım (Endoplasmic Reticulum Associated-Degradation, ERAD) olarak tanımlanan proteozomal yıkım yolu ile ortadan kaldırılırlar (60, 70, 154).

ER'da gerçekleşen bu kompleks sürecin herhangi bir basamağında meydana gelen aksaklık, proteinlerin katlanma etkinliğinin ve protein sentezi ile protein katlanması arasındaki dengenin bozulmasına neden olur. Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin ER'da birikmesi *ER stresi* olarak tanımlanır (90, 127, 154).

ER stresinin, Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi katlanmamış proteinlerin birikimiyle ilişkili hastalıkların patogenezinde rol oynadığı, ayrıca

iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet ve ateroskleroz gibi daha geniş patolojik durumlarla da ilişkili olduğu bilinmektedir (81).

Hücrenin ER Stresine Yanıtı (Katlanmamış Protein Cevabı)

ER stresi ile değişen çevre koşullarına adaptasyonu sağlamak ve ER homeostazının yeniden kurulması için, *katlanmamış protein cevabı* (UPR, unfolded protein response) olarak isimlendirilen bir sinyal yolağı devreye girer (89, 154).

Bu mekanizmanın gelişen stresi algılaması, ER membranında yer alan ve UPR sensörleri olarak tanımlanan üç adet transmembran proteini ile sağlanır. Bunlar; *protein kinaz RNA benzeri kinaz* (PERK), *inozitol gerektiren kinaz-1* (IRE-1) ve *aktive edici transkripsiyon faktörü-6*'dır (ATF-6). Bu transmembran proteinlerinin, N-terminalleri ER lümeninde, C-terminalleri ise sitozolde bulunur. Bu sayede UPR sensörleri hücrenin iki kompartmanı arasında köprü görevi görerek, kompartmanlar arası bilgi akışını sağlar. UPR aktivasyonu hem hücre sağ kalımı, hem de apoptotik hücre ölümü ile ilişkili sinyal kaskatlarını aktive edebilen çift yönlü etkiye sahiptir (64, 122, 127).

Normal koşullarda, bu proteinlerin N-terminallerine GRP-78 şaperonu bağlı olup, inaktif durumdadırlar. ER stresi ile birlikte GRP-78, katlanmamış/yanlış katlanmış proteinlere bağlanmak üzere UPR sensörlerinden ayrılır ve sessiz haldeki PERK, IRE-1 ve ATF-6 yolları aktive olur (70, 89, 127)

PERK aktivasyonu, ökaryotik translasyon başlama faktörü 2'nin (eIF2) alfa alt birimini fosforilleyerek (P-eIF2- α) hücre içerisinde genel protein translasyonunu durdurur. Böylece, yeni sentezlenen ve katlanmamış proteinlerin ER içerisinde akümüleyonunu engeller. P-eIF2- α , global olarak protein sentezini inhibe etmesine karşılık, *siklik AMP bağımlı transkripsiyon faktörü 4* (ATF-4, cyclic AMP-

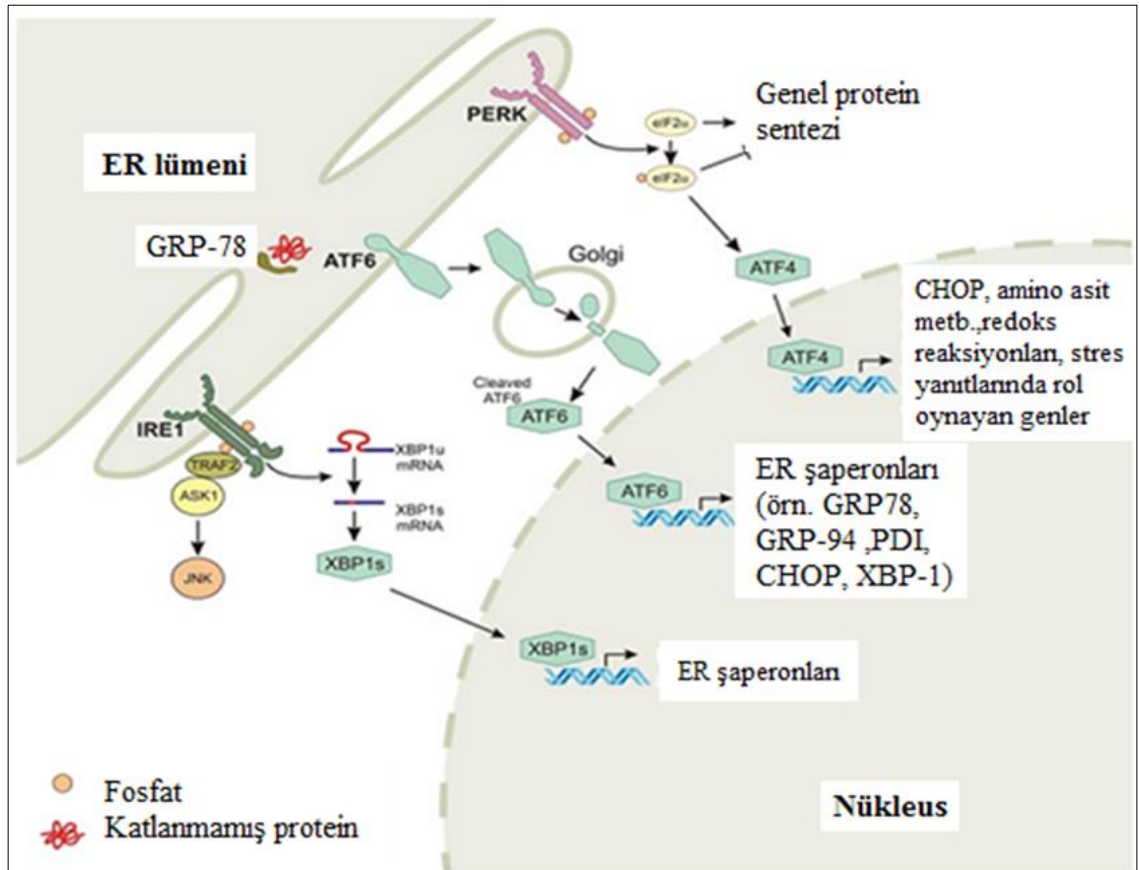
dependent transcription factor 4) gibi, bazı özgül proteinlerin sentezini ise seçici olarak artırır. ATF-4, UPR'de görevli *GRP-97*, *GRP-94*, *X-box bağlayıcı protein-1* (XBP1, X-box-binding protein-1) gibi genlerin transkripsiyonunu artırır (70, 89, 127).

Aktif PERK, eIF2 α 'ya ek olarak, *nükleer faktör-eritroil-ilişkili faktör 2*'yi (Nrf2) de fosforilleyerek aktive etmektedir. Aktif Nrf-2, hücre çekirdeğinde antioksidan yanıt elementi (ARE, antioksidant response element) ile etkileşerek antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını artırır (60, 89, 90).

ER stresi ile birlikte aktif hale gelen IRE-1 sinyal yolağı ise RNAaz aktivitesi ile, XBP-1 mRNA'sından bir intron uzaklaştırılması reaksiyonunu katalize eder. Kırpılmış XBP-1 mRNA'sının translasyonu ile bir transkripsiyon faktörü olan XBP-1 sentezlenir. XBP-1, nükleusta ER stresi elementine (endoplasmic reticulum stress element, ERSE) ve katlanmamış protein yanıtı elementine (unfolded protein response element, UPRE) bağlanır. Bu bağlanma sonucunda, protein katlanmasında görev alan enzimlerin (protein disülfid izomeraz gibi), şaperonların (*GRP-78*, *GRP-94* gibi), yanlış katlanmış proteinlerin ER'dan sitozole geri transportunda görevli proteinlerin ve bu mekanizmada görevli çeşitli moleküllerin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (64, 73, 91).

Üçüncü UPR sinyal yolağı olan ATF-6 ise, *GRP-78*'in ayrılması ile önce Golgi cisimciğine, ardından nükleusa yönlendirilir. Nükleusa ulaşan aktif ATF-6, ERSE'ne bağlanır ve ER şaperonlarının transkripsiyonunu indükleyerek ER'un katlama kapasitesini arttıracak yönde etki gösterir. ATF-6'nın transkripsiyonunu arttırdığı genlerden birisi de *XBP-1* olup, stres durumunda XBP-1 proteini üretimi iki UPR yolağının karşılıklı etkileşimi sonucunda daha da artar (64, 73, 91).

Sonuç olarak her üç sinyal yoluğı da öncelikle hücrenin sağ kalımını sağlamak üzere düzenlemeler yapar. Ancak uzun süreli ve şiddetli ER stresi sonucunda, UPR'nin adaptif düzenlemeleri yetersiz kalır. Bu durumda UPR sinyal yolları apoptoz mekanizmalarını indükleyerek hücre ölümüne neden olur. ER ilişkili apoptotik hücre ölümü, CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP) yoluğı, ER-ilişikli Kaspaz-12 yoluğı ve c- JUN-NH₂- terminal kinaz (JNK) yoluğı olmak üzere 3 farklı yolak ile gerçekleşebilmektedir (64, 91, 127).



Şekil 6. ER stresi ve katlanmamış protein yanıtı (64).

Yukarıda da bahsedildiği üzere; UPR, fizyolojik ve patolojik koşullarda farklı fonksiyonlar gösterebilmektedir. UPR komponentleri lipid ve kolesterol

metabolizmasından enerji homeostazına, inflamasyona ve hücre farklılaşmasına kadar geniş bir yelpazede görev yapmaktadır (91, 127) .

Moleküler düzeyde, UPR'ın bu kadar farklı görevleri bir arada yürütüyor olması, farklı stres ve metabolik yollar arasında meydana gelen etkileşimlerden sorumlu tutulmasına neden olmuştur. Bu senaryoda, UPR'nin çevresel sinyallerdeki dalgalanmalara ve değişikliklere karşı ER homeostazını sağlamak üzere, dinamik bir sinyal kaskadı çerçevesi içerisinde çalıştığı düşünülmektedir (70).

ER stresi yanıt proteini MANF/ARMET:

UPR adaptif ve apoptotik genleri aktive ederek çeşitli patolojik durumların gelişmesine farklı şekillerde katkı yapmaktadır (60). ER stresi gelişimi ile birlikte, insan embriyonik böbrek hücre hattında (HEK-293) ve insan osteosarkoma hücre hattında (U2OS), UPR mekanizması içinde 12 adet genin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bunlardan biri de *MANF* genidir (5).

MANF 158 amino asit içeren ve 21 kDa ağırlığında bir proteindir. ER ve golgi organellerinde lokalize olan bu protein aynı zamanda bir salgı proteindir. İlk kez çeşitli tümörlerde erken dönemlerde, yüksek mutasyon potansiyelinde ve arginin amino asidince zengin bir protein olarak teşhis edilmiş ve ARMET (Arginine-rich mutated in early stage tumors) adı verilmiştir (135). Daha sonra orta-beyin dopaminerjik nöronlarında hücrenin sağ kalımını arttıran bir nörotrofik faktör olarak fonksiyon gösterdiği belirlenmiş ve bu proteine ikinci bir isim olarak MANF (Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor) adı verilmiştir (119).

UPR aktivasyonu ile ekspresyonu artan ve hücrede koruyucu etkisi olduğu ileri sürülen bu proteinin fonksiyonları ve etki mekanizmaları henüz tam olarak belirlenmemiştir (110, 160).

Normal koşullarda, memeli dokularında karaciğerde daha fazla olmak üzere, böbrekler, akciğerler, testisler ve salgı bezlerinde düşük miktarda ekspresyonu gerçekleşen MANF'ın, ER stresi sonrası UPR aktivasyonunu (ATF-6 ve XBP-1 ile) takiben, mRNA ve protein düzeylerinde artış gerçekleşmektedir (5, 82, 99). Ancak, *MANF geninin* susturulmasının hücreyi ER-stresle indüklenen ölüme daha duyarlı bir duruma getirdiğı ve hücre boyutlarının küçüldüğü belirtilmiştir. Bu proteinin over-ekspresyonunda ise stres koşullarında hücrelerin canlılığının arttığı ileri sürülmüştür (5).

İskemi veya hipoksi sonrasında hücrede gelişen ER stresi nedeniyle, salgı proteinlerinin miktarı azalmaktadır. Ancak ER stresinin ardından, hücreden salgılanan MANF düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Hücre içerisinde GRP-78 ile kompleks oluşturan MANF, stres durumunda GRP-78'in bu kompleksten ayrılması ile serbest kalarak hücre dışına salgılanmaktadır (40). Ancak hücre dışına salgılanan MANF'ın diğer hücreler üzerinde nasıl bir etki gösterdiğine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Hipoksi ve ER Stresi İlişkisi

Hipoksik koşullarda hücrelerde; ATP'nin azalması, besin yoksunluğu ve Ca^{+2} homeostazındaki değişiklikler birer ER stresi sebebidir. Bunun yanı sıra, hücrelerde OS, NS ve ER stresi oluşturan mekanizmalar birbirleri ile etkileşerek, kısır bir döngü oluşturmaktadır (60, 61, 70).

İskemi-reperfüzyon ile hücrede artan ROT ve RNT'nin çeşitli mekanizmalarla ER stresine neden olabileceğı ileri sürülmektedir. Örneğın; ROT ve RNT artışının hücrenin redoks dengesini bozarak ER stresi oluşturabileceğı düşünülmektedir (71).

Bundan başka, ROT ve RNT'nin ER membranındaki iyon pompalarının aktivitelerini bozarak ER stresine neden olabilecekleri de bildirilmiştir (72, 100, 122).

Hücredeki OS ve NS artışı redoks homeostazındaki değişiklik ile karakterize bir durumdur. Hücrede redoks bağımlı çalışan organellerden birisi de ER olup, bozulan redoks dengesi ER disfonksiyonuna neden olmaktadır. Bununla birlikte ROT'nin ER'de protein katlanmasında rol oynayan birçok enzimin ve şaperonun oksidatif modifikasyonuna yol açtığı da belirlenmiştir (35, 131, 145, 157). Ayrıca yine protein katlanmasında görev yapan protein disülfid izomeraz enziminin RNT tarafından tiyol grubundan nitrolandığı ve inaktive edildiği bildirilmiştir (56, 111, 112, 144) .

ROT ve RNT düzeylerindeki artışın bir diğer etkisi ise, ER lümeninden sitozole Ca^{+2} geçişinin artmasına yol açmalarıdır. Bu etkilerinin başlıca nedeninin, RNT'nin ER membranında yer alan Ca^{+2} -ATPaz kanallarında spesifik tirozin rezidülerini nitrolayarak inaktive etmesi olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte sitozolik Ca^{+2} kontrasyonundaki artışın, TCA döngüsünü stimüle ettiği ve ETZ'de ROT ve RNT üretimini daha da arttırdığı öne sürülmüştür (11, 154).

Diğer taraftan ER, fizyolojik koşullarda hücredeki ROT üreten kaynaklardan birisidir. ER' de gerçekleşen oksidatif protein katlanması sürecinde oluşturulan her disülfid bağından bir molekül ROT üretildiği belirlenmiş olup, ER'un hücrelerdeki ROT üretiminde yaklaşık % 25'lik bir paya sahip olduğu düşünülmektedir. ER stresi gelişimiyle yanlış katlanmış proteinlerin tekrar katlanması, üretilen ROT miktarının da artmasına neden olarak OS'e yol açtığı belirlenmiştir (53, 143).

Ayrıca, hücrede yanlış katlanmış/katlanmamış protein miktarının artması, bu proteinlerin yeniden katlanmaları için gereken ATP miktarını da artırır. Artmış ATP

ihtiyacı ise mitokondrilerde oksidatif fosforilasyonu stimüle ederken ETZ’de üretilen ROT miktarında artışa yol açar. Dolayısıyla ER stresi gelişiminin hücredeki OS düzeyinin daha fazla şiddetlenmesine ve hasarın artmasına yol açtığı bildirilmiştir (89, 90, 143).

1.1.2.4 İskemik ABY’de apoptoz ve nekroz

İskemik ABY’de onarılamaz derecede hasar gören tübüler hücreler apoptoz/nekroz yoluyla ölürler (8, 13). Nekroz; hücrenin sıvı olarak şişmesi, membran bütünlüğünün bozulması ve fragmantasyonu ile karakterize edilen patofizyolojik bir süreçtir. Apoptoz ise, hücresel ve nükleer büzülme, DNA fragmantasyonu ve hücrenin apoptotik cisimciklere parçalanması ile karakterizedir. Apoptoz ile oluşan apoptotik cisimcikler fagositoz ile hızla ortadan kaldırılamaz ise, bu yolağı ikincil nekroz yolağı takip eder (68, 77).

İskemik ABY’de, hücre ölümünün hangi yolak ile gerçekleşeceği hücre tipine ve hasarın şiddetine göre değişmektedir (13, 78-80). Önceki yıllarda, nekroz yolağının proksimal tübüler hücrelerde, apoptoz yolağının ise distal tübüler hücrelerde gerçekleştiği düşünülmekteydi. Ancak yapılan deneysel ve klinik çalışmalardan sonra, proksimal tübüler hücrelerde hem nekroz, hem de apoptoz yolağı ile hücre ölümü gerçekleştiği belirlenmiştir (8).

İskemi-reperfüzyon ile gelişen apoptoz/nekroz yolakları arasındaki farkı açıklamak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Schumner ve ark. (130), sıçanlarda gerçekleştirdikleri iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında 15 dakika ve altındaki iskemi sürelerinde sadece apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini, bu sürenin üzerine çıkıldığında ise hem apoptotik, hem de nekrotik hücre ölümünün bir arada gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, proksimal tübüler hücrelerde

oluşturulan anoksik koşullarda, hücrelerdeki ATP düzeyinin % 25-50 düzeylerine inmesi halinde hücre ölümünde başlıca apoptotik yolağın rol oynadığı, % 15 ve altına düştüğünde ise nekrotik hücre ölümünün gerçekleştiği tespit edilmiştir (79). Elde edilen bu bulgular sonucunda, apoptotik hücre ölümünün ATP kullanan bir yolak olduğu ve hipoksik koşullarda hücrelerdeki ATP düzeyinin daha da azalmasının nekrozu beraberinde getirdiği öne sürülmüştür. Bu durum, iskemik hasarda apoptoz/nekroz yolaklarının, iskemik hasarın şiddetine bağlı olarak, hücre ölümünde bir arada çalıştıklarını düşündürmüştür (8).

Poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölüm yolakları ile ilişkili, bir DNA onarım enzimidir. DNA hasarı gelişimi ile birlikte PARP enzimi DNA zincir kırıklarına bağlanır ve nükleer proteinlerde poli-ADP-riboz modifikasyonunu katalizler. Ancak şiddetli hasar durumunda PARP aktivitesinin artması, hücre içi NAD^+ konsantrasyonunun azalmasına neden olarak, hücreyi nekrotik hücre ölümüne götürmektedir (26, 44, 87).

Diğer taraftan apoptotik hücre ölümü yolağında rol oynayan sistein-aspartat spesifik proteaz (kaspaz) enzimlerinin en önemli substratlarından biri; PARP enzimidir. Kaspaz aktivasyonu PARP enziminin proteolitik olarak kırılmasına ve inaktive olmasına neden olmaktadır (148). PARP ve kaspaz enzimleri arasındaki bu etkileşimden dolayı kırılmış PARP düzeyi hücredeki kaspaz aktivasyonu ve dolaylı olarak apoptotik hücre ölümü için en sık kullanılan belirteçlerden birisidir (7, 21).

1.1.3 *Hipoksik strese karşı gelişen adaptif yanıt: Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF)*

Aerobik organizmalarda, başlıca enerji üretiminin oksidatif fosforilasyon ile gerçekleşmesi nedeniyle, hem sistemik, hem de intrasellüler O₂ homeostazının korunması hayati önem taşır. Hücrede, sistemik veya lokal O₂ konsantrasyonu azalınca (hipoksi), metabolik reaksiyonların, dolayısıyla canlılığın devam edebilmesi, organizmanın yeni koşullara adaptasyon sağlaması ile mümkün olur (161).

Organizmada gelişen sistemik hipoksiye adaptasyon sağlamak için, eritropoez, anjiyogenez ve hiperventilasyon gibi mekanizmalar indüklenir ve dokulara ulaşan O₂ miktarı arttırılmaya çalışılır (19, 45). Hipoksiye hücresel düzeyde adaptasyon sürecinde ise, hücrede oksijensiz enerji üretebilecek glikoliz yolağı aktive edilir ve hücre bölünmesi, protein sentezi gibi fazla enerji gerektiren prosesler inhibe edilerek enerji kullanımı azaltılır (106, 161).

Hipoksiye karşı gelişen bu sistemik ve hücresel yanıtların neredeyse tamamı, bir transkripsiyon faktörü olan *HIF* (*hipoksi ile indüklenen faktör*) üzerinden gerçekleştirilir (19, 45, 93).

HIF ailesi, α ve β alt birimlerinden oluşan, heterodimer yapılı, transkripsiyon faktörleridir. HIF α/β heterodimeri, hedef genin *hipoksi yanıt elementi*'ne (HRE, hypoxia response element) bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonel up-regülasyonlarını gerçekleştirir ve bu şekilde hipoksik çevreye adaptasyonu sağlar (19, 161).

HIF kompleksinin α alt birimi, O_2 konsantrasyonu ile regüle edilirken, β alt birimi O_2 'e duyarlı değildir. Ancak hipokside, HIF heterodimerinin oluşması ve HRE'ne bağlanabilmesi için iki alt birimin de bulunması gereklidir (45, 104).

Memelilerde α -alt biriminin; α -1, α -2 ve α -3 olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır. HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın DNA bağlanma bölgesinin ve transkripsiyon aktivasyon bölgelerinin yaklaşık % 70 homolojik benzerlik gösterdiği, ayrıca HIF-2 α ve -3 α 'nın da oksijen konsantrasyonu ile düzenlendiği belirlenmiştir (104). Diğer taraftan, HIF-1 α hemen hemen tüm hücrelerde sentezlenirken, HIF-2 α 'nın sentezinin sadece endotel hücreleri, renal fibroblastlar, kardiyak miyositler ve akciğer tip II pnömonositleri gibi O_2 düzeyi değişikliklerine çok hassas hücreler ile sınırlı olduğu tespit edilmiştir (19, 98, 126).

HIF ailesinin ilk keşfedilen ve üzerinde en fazla çalışılan üyesi olan HIF-1 α , normal koşullarda hücre içerisinde sentezlendikten kısa bir süre sonra yıkılır. Ancak O_2 düzeyinin azalması ile HIF-1 α kararlı hale gelir, nükleusa geçer ve burada HIF-1 β ile dimerize olarak HRE'ne bağlanır (150). HRE olarak adlandırılan, 5'-(A/G)CGTG-3' konsensüs dizisi, düşük O_2 düzeyi ile up-regüle olan genlerin çoğunda bulunmaktadır (45, 85).

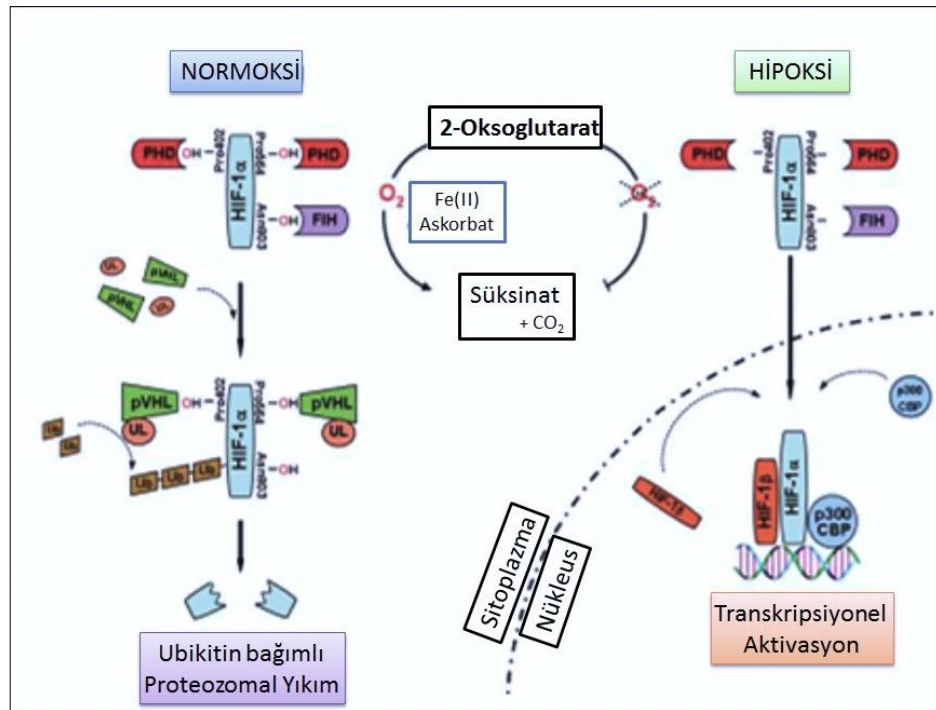
HIF-1 α ile aktive edilen genlerin sayısı 100'den fazla olup, sayıları gün geçtikçe artmaktadır. Bu genlerin ürünü olan proteinler hem O_2 homeostazında, hem de hipoksiye adaptasyon sürecinde görev alırlar (86, 104).

HIF-1 α 'nın O_2 konsantrasyonuna bağlı düzenlenmesi ile ilgili çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. Bu hipotezler arasında öne çıkanlar enzimatik düzenlemeler ile ilgili olanlardır (97, 104).

Normoksida, HIF-1 α 'nın karboksil terminalinde bulunan *oksijen-bağımlı yıkım domeninde* yer alan 402 ve 564 no'lu prolin rezidüleri *oksijen bağımlı prolin hidrosilazlar* (PHDs) tarafından hidrosillenir (116). Ardından *von Hippel-Lindeu proteinine* (pVHL) bağlanarak proteozomal yıkıma uğrar (58, 63).

Ayrıca normoksik koşullarda HIF inhibe edici faktör (factor inhibiting HIF, FIH) tarafından HIF-1 α 'nın karboksil terminalindeki 803. asparagin rezidüsü de hidrosillenir. Bu konumun hidrosilasyonu sonucunda ko-aktivatörleri ile etkileşimi engellenir ve transkripsiyonel fonksiyonu baskılanır (104).

PHD, ko-substrat olarak O₂ ve 2-oksoglutarata, kofaktör olarak ise demir (Fe⁺²) ve askorbik asite ihtiyaç duyar. PHD'ın yanı sıra FIH da 2-oksoglutarat bağımlı bir dioksijenaz olup, aktivitesi O₂ konsantrasyonu ile düzenlenmektedir (129). Hipoksida O₂ konsantrasyonunun azalmasıyla, hem PDH hem de FIH'in inhibe olduğu ve HIF-1 α yıkımının engellendiği belirlenmiştir (108).



Şekil 7. HIF-1 α 'nın normoksik ve hipoksik koşullardaki regülasyonu (104).

Sonraki yıllarda, HIF-1 α 'nın O₂ konsantrasyonundan bağımsız olarak; geçiş metalleri, ROT, NO[•], çeşitli büyüme faktörleri veya prolil/asparajil hidroksilazın doğrudan inhibitörleri gibi farklı etkenler ile de düzenlendiği tespit edilmiştir (30, 116, 153, 161). Bu nedenle HIF-1 α , oksijenasyon bozukluğu, inflamasyon, enerji yoksunluğu ve/veya aşırı proliferasyon hızı gibi çok çeşitli stres koşulları sonucu aktive olan hayati bir transkripsiyon faktörüdür.

HIF-1 α ve ROT/ RNT İlişkisi

Hem normoksi, hem de hipoksi koşullarında, ROT/RNT'nin HIF-1 α regülasyonunda önemli rol oynayan moleküller olduğu belirlenmiştir (23, 123, 161). Ancak aralarındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik yapılan çalışmalar ile çeşitli hipotezler öne sürülmüş olup, henüz etkileşim mekanizmaları kesin olarak açıklanamamıştır.

ROT ve HIF-1 α ilişkisi ile ilgili öne sürülen hipotezlerden birisi, hücrelerde bu iki yapı arasındaki etkileşimin O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak geliştiği yönündedir. Normoksik koşullarda NADPH oksidazlar gibi kaynaklardan üretilen ROT'nin HIF-1 α yıkımını indüklediği, hipoksik koşullarda ise mitokondri tarafından sentezlenen ROT'nin HIF-1 α 'yı stabilize ettiği düşünülmektedir (108, 161). Bu görüş, mitokondrileri tüketilmiş hücrelerde, hipoksi indüksiyonu sonrasında, ROT düzeyinde herhangi bir değişikliğin olmadığı, aynı zamanda HIF-1 α aktivitesinin de gözlenmediğini gösteren çalışmalar ile desteklenmiştir (22).

RNT ile HIF-1 α arasında ise daha karmaşık bir ilişki bulunmaktadır. Hipoksik koşullarda, HIF-1 α 'nın transkripsiyonunu arttırdığı genlerden birisi de *iNOS* genidir. (96, 115). Ancak hücrede artan NO[•] ve RNT düzeyinin HIF-1 α 'nın hem stabilizasyonunu engellediği hem de transkripsiyonel aktivitesini baskılayabildiği

ileri sürülmüştür (57). Bununla birlikte, literatürde normoksik koşullarda, NO^{*}'in, Fe⁺² ile şelasyon yaparak PHD'nin aktivitesini inhibe ettiği ve HIF-1 α akümülyasyonuna neden olduğunu ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (55).

NO^{*}'in HIF-1 α 'nın üzerindeki iki yönlü etkisi ile ilgili bilgiler henüz netlik kazanmamıştır. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, bu iki yönlü etkinin hücredeki NO^{*} ve RNT konsantrasyonuna bağlı olarak geliştiği vurgulanmıştır (30).

HIF-1 α ve ER stresi/UPR İlişkisi

Hipoksi ve ER stresi ile ilgili son çalışmalar, UPR yolağı ile HIF aktivasyonu arasında bir bağlantı olduğunu önermektedir.

HIF-1 α -UPR ilişkisini açıklamaya yönelik çalışmalar sonucunda, insan hepatosit hücre hattı HepG2'de hipoksik koşullarda ER stresi indüksiyonunun, HIF-1 α mRNA transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (153).

Ayrıca, hipoksik koşullarda stabil hale gelen HIF-1 α 'nın PERK aktivasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (113). Ardından iskemide kısıtlı üretilen enerjinin ekonomik kullanılması için gerçekleştirilen protein sentezi inhibisyonunun HIF-1 α -PERK sinyal yolağı etkileşimi ile sağlandığı ileri sürülmüştür. Ayrıca böbreklerde proksimal tübüler epitel hücrelerinde, HIF-1 α 'nın ATF-6 translasyonunu arttırdığı ve IRE-1 sinyal yolağı üzerinden GRP-78 ekspresyonunu indüklediği de bildirilmiştir (60, 122).

Böbrekler daha önce belirtildiği üzere, hipoksiye son derece duyarlı organlar olup, hipoksik koşullarda hücrede yüksek miktarda HIF eksprese edilmesi beklenen bir durumdur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda hipoksi ile birlikte böbrek hücrelerinde HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın akümüle olduğu gösterilmiştir (93, 126).

İskemik ABY'de, HIF over-ekspresyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, böbrek hasarının engellendiği tespit edilmiştir (92). Bununla birlikte bazı çalışmalarda, iskemik ABY modelinde, PHD inhibitörlerinin kullanımı ile doku hasarının ve apoptozun azaldığı ve serum kreatinin düzeylerinin normale döndüğü bildirilmiştir (24).

BÖLÜM II

2 GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız iki temel bölüm altında gerçekleştirildi:

I- İskemik ABY’de OS/NS ve ER stresinin etkileşimlerini incelemek amacıyla, normoksik hücrelerde OS/NS ve ER stresi indüksiyonu gerçekleştirilerek immünoiblotlama (IB) yöntemi ile hücre içi stres düzeyleri incelendi. Ardından iskemik ABY modeli oluşturularak hipoksi-reperfüzyon koşullarında yukarıda belirtilen stres düzeyleri yine IB yöntemi ile belirlendi.

II- ER stresi yanıt proteini MANF’in iskemik ABY, OS, NS ve ER stresindeki fonksiyonunun incelenmesi amacıyla, HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon yöntemi ile MANF ekspresyonunun arttırıldığı veya post-transkripsiyonel gen susturma yöntemi ile *MANF* geninin susturulduğu koşullarda stres indüksiyonları tekrar edildi. Hücrelerdeki stres düzeyleri, IB ve hücre proliferasyon analizi yöntemleri kullanılarak incelendi. HK-2 hücrelerinde MANF’in olası parakrin etkisini araştırmak üzere MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilen hücrelerden elde edilen besiyerleri normal hücrelere eklendi ve stres indüksiyonları tekrar edildi. Ardından hücrelerin stres yanıtları hücre proliferasyon analizi ile belirlendi.

Bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmaların tamamı E.Ü Eczacılık Fakütesi, Biyokimya ABD ve Farmasotik Bilimler Araştırma Laboratuvarı’nda (FABAL) gerçekleştirildi.

2.1 Kullanılan Gereçler

- CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific Model 370),
- Laminer hava akımlı kabin (Thermo Scientific Class II MSC-Advantage),
- İverted floresan mikroskop (Leica DM IL),
- Faz kontrast mikroskop,
- Neubauer hemositometre (Hausser Scientific),
- Modüler hipoksi odacığı (Billups Rothenberg),
- Oksijen analizörü (Vasküler Technology),
- Akış ölçer (Billups Rothenberg),
- Fuxion FX7 görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat),
- Dikey elektroforez (BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell),
- Membran transfer sistemi (Thermo Scientific VEP-2 OWL),
- Mikroplaka okuyucu (Molecular Devices VERSAmax Tunable),
- Spektrofotometre (VersaMax),
- Nanovette UV/VIS spektrofotometre (Beckman-Coulter DU730),
- Çalkalamalı inkübatör (IKA 4000 i),
- Soğutmalı yer tipi santrifüj (KUBOTA 7780),
- pH metre (Hanna Instruments HI221),
- Çalkalamalı blok ısıtıcı (Grant-bio PHMT),
- Orbital çalkalayıcı (LABNET Orbit 1000),
- Manyetik karıştırıcı (Yellowline MAG HS 7),
- Hassas ve kaba analitik teraziler (Denver Instrument),
- - 80°C derin dondurucu (Sanyo),
- Buzdolabı ve -20°C derin dondurucu (White Westinghouse).

2.2 Kullanılan Sarf Malzemeleri

Kullanılan Kitler:

- BCA protein miktar tayini kiti (*Pierce*),
- PureLink Hipure Plasmid Filter Maxiprep kiti (*Invitrogen*),
- OxyBLOT protein oksidasyonu deteksiyon kiti (*Millipore*).

Kullanılan Malzemeler:

- PVDF membran (*Pierce*),
- Kullanılan tüm plastik malzemeler (*Corning ve Sartstedt*).

Kullanılan kimyasal maddeler:

- Memeli proteaz inhibitör kokteyli (PIC), N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED), polietilen glikol 8000 (PEG), glisin, sodyum klorür (NaCl), sodyum fosfat monobazik anhidrus (NaH₂PO₄), sodyum fosfat dibazik anhidrus (Na₂HPO₄), sodyum azid, bakteriyolojik maya ekstraktı, bakteriyolojik tripton, etilendiamin tetraasetik asid (EDTA), etilenglikol tetraasetik asit (EGTA), amonyum persülfat, Tween-20, Triton X-100, Nonidet P-40, Ponceau S, gliserol, magnezyum sülfat heptahidrat, tris(hidroksimetil)aminometan (TRİS), 2-merkaptoetanol (2-ME), ampisilin sodyum tuzu, deoksikolik asit sodyum tuzu (DOC), dimetilsülfoksit (DMSO) (*Amresco*),
- Akrilamit-bisakrilamit solüsyonu ve sodyum dodesilsülfat (SDS) (*Serva*),
- Serum içermeyen keratinosit besiyeri (keratinocyte serum free medium, KSFM), rekombinant epidermal büyüme faktörü (rekombinant epidermal growth factor, rEGF) ve sığır hipofiz ekstresi (bovine

pituitary extract, BPE), Lipofektamin 2000, opti-MEM besiyeri ve protein A sefaroze boncukları Invitrogen firmasından; % 0.05 Tripsin-EDTA, DMEM, L-glutamin ve tripan mavisi (*Biological Industries*),

- Xtreme GENE transfeksiyon ajanı ve WST-1 hücre proliferasyon ajanı (*Roche*)
- Kemilüminesans substrat görüntüleme ajanı (*Pierce*),
- Hidrojen peroksit (*J.T. Baker*),
- Peroksinitrit (*Calbiochem*)
- Tunikamisin (*Sigma*).

Kullanılan antikorlar:

Primer antikorlar,

- Monoklonal anti-katalaz, monoklonal anti- β -aktin, monoklonal anti-FLAG M2, poliklonal CHOP/GADD153, poliklonal anti-P-eIF-2 α , poliklonal anti-iNOS antikorları (*Sigma*),
- Poliklonal PARP, poliklonal eIF-2 α , poliklonal HIF-1 α antikorları (*Cell Signalling*),
- Poliklonal anti-MANF antikoruna (*Abcam*),
- Poliklonal anti-3-NT antikoruna (*Upstate*).

Sekonder antikorlar

- Anti-Rabbit ve anti-Mouse IgG, (H+L) antikorları (*Pierce*).

2.3 Kullanılan Çözeltiler

a) Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS):

500 ml FBS stok çözeltisine 50 ml 100X L-glutamin ve 17.5 µl 2-ME eklendi, 0.22 µm çapındaki filtreden geçirilerek sterilize edildi.

% 10 FBS içeren DMEM Besiyeri:

500 ml DMEM besiyeri içerisine hazırlanan FBS stok çözeltisinden 50 ml eklendi. Buzdolabında + 4 °C’de saklandı.

Serum içermeyen Keratinosit Besiyeri (KSFM):

Besiyeri içerisine 0.05 mg/ml BPE ve 5 ng/ml rEGF eklenerek deney günü taze hazırlandı. Buzdolabında + 4 °C’de saklandı.

b) SDS-PAGE İşlemi Sırasında Kullanılan Çözeltiler

10X Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (Phosphate Buffer Saline, PBS) :

87.5 g NaCl, 11.5 g NaH₂PO₄, 2.3 g Na₂HPO₄ tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Çözeltinin pH’sı 7.4’e ayarlandı ve distile su ile 1 L’ye tamamlandı. Çözelti 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı zaman 1:10 oranında distile su ile 1X PBS’e seyreltildi.

2X Radyoimmünopresipitasyon Assay (RIPA) Lizatlama Tamponu:

40 mg SDS, 200 mg 7-DOC tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Ardından 0.4 ml NP-40 ve 4 ml 10X PBS ilave edilip distile su ile 20 ml’ye tamamlandı.

İmmünopresipitasyon (IP) için Hücre Lizatlama Tamponu:

25 ml 1.5 M NaCl çözeltisi üzerine 2.5 ml 1 M Tris-HCl (pH=7.5), 0.5 ml 0.5 M EDTA, 0.5 ml 0.5 M EGTA, ve 1.25 ml NP-40 (% 0.5) eklendi ve distile su ile 250 ml’ye tamamlandı.

IP için Yıkama Tamponu:

25 ml 1.5 M NaCl çözeltisi üzerine 2.5 ml Tris-HCl (pH=7.4), 0.5 ml 0.5 M EDTA, 0.5 ml 0.5 M EGTA, 0.5 ml NP-40 (% 0.2) eklendi ve distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE 4X Ayırma Tamponu:

90.855 g Tris HCl ve 2 g SDS tartılarak bir miktar suda çözüldü. Çözeltiye 2 ml TEMED eklendi ve pH' sı 8.9 ayarlandıktan sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE 4X Yığınlama Tamponu (Stacking Buffer) :

30.285 g Tris HCl ve 2 g SDS tartılarak bir miktar suda çözüldü. 2 ml TEMED eklendi ve pH'sı 6.9 ayarlandıktan sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

4X Protein Yükleme Tamponu:

4 g SDS bir miktar distile su içinde çözüldü. 10 ml 1 M Tris HCl (pH=6.8), 2 ml gliserol, 2 ml 14.7 M 2-ME, 5 ml 0.5 M EDTA ve 40 mg bromofenol mavisi eklendikten sonra distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu:

30.2 g TRIS baz, 144 g glisin, 10 g SDS tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1X SDS-PAGE Yürütme Tamponu:

100 ml 10X SDS-PAGE yürütme tamponu distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

% 10 Amonyum persülfat (AP) Çözeltisi:

1 g amonyum persülfat tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

c) Western Blotlama Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler

10X Transfer Tamponu:

30.33 g TRIS-baz, 144 g glisin tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 1 L' ye tamamlandı .

1X Transfer Tamponu:

50 ml 10X transfer tamponu 350 ml distile su ile seyreltildi ve 100 ml metanol ilave edildi.

1X Yıkama Tamponu:

100 ml 10X PBS üzerine 1 ml Tween-20 eklendi. pH'sı 7.4'e ayarlandı ve distile suyla 1 L'ye tamamlandı.

%5'lik Yağsız Süt Bloklama Ajanı:

5 g yağsız süt tozu bir miktar 1X yıkama tamponu içerisinde çözüldü. pH'sı 7.4'e ayarlandı ve 1X yıkama tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.

d) Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Bakteri Besi Ortamı (LB Medya):

10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g maya ekstresi tartıldı. Bir miktar distile su ile çözüldükten sonra, distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dakika süreyle sterilize edildi.

1000X Ampisilin Antibiyotik Stoğu:

Liyofilize halde bulunan ampisilin, 100 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile çözüldü. Laminer akışlı hava kabininde filtre sterilizasyonundan geçirildi.

Transformasyon ve Saklama çözeltisi (TSS, Transformation and Store Solution):

10 g PEG ve 1.23 g magnezyum sülfat heptahidrat tartıldı. Bir miktar LB besiyeri çözündürülüp, 5 ml DMSO ilave edildi. pH'sı 6.5'e ayarlandıktan sonra LB medya ile 100 ml'ye tamamlandı, 121°C'de 20 dakika tutularak sterilize edildi.

2.4 Yöntemler

2.4.1 Hücre kültürü

Çalışmamızda American Type Culture Collection' dan (ATCC) satın alınan insan proksimal tübüler epitelyal (HK-2) hücre hattı kullanıldı. HK-2 hücreleri, 1997 yılında insan böbrek korteksinden izole edilen proksimal tübüler epitelyal hücrelerinin insan pappilloma virüsü kullanılarak ölümsüzleştirilmesi ile oluşturulmuşlardır (128).

Hücreler rEGF ve BPE eklenen KSFM ile beslendi ve konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37°C'de, % 5'lik CO₂ inkübatöründe çoğaltıldılar. Aralıklarla faz kontrast mikroskobu ile kontrol edildiler.

Hücrelerin yoğunluğu % 80 oranına ulaştığında, besi ortamı vakumla uzaklaştırılıp, 1 ml % 0.05'lik tripsin-EDTA ile yıkandı ve vakumla tripsin-EDTA uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için 37 °C'deki CO₂ inkübatöründe 5 dk bekletildi. Kullanılan tripsin-EDTA çözeltisini nötralize etmek için hücreler % 10 FBS içeren DMEM besiyeri ile toplanarak 125xg'de 5 dakika santrifüj edildiler. Ardından DMEM besiyeri vakumla uzaklaştırıldıktan sonra hücreler KSF besiyeri ile resüspande edilerek 1:4 oranında yeni kültür kabına ekildi ve çoğaltılmaya devam edildi.

Hücre hattına ait ana stoğu korumak için, ilk pasajdaki hücrelerin bir kısmı, 1.5×10^6 hücre/ml sayıda hücre olacak şekilde, % 7.5 DMSO içeren KSF besiyeri ile karyovial tüplere alınarak sıvı azot içerisinde saklandı.

Hücre hattının tüm kültür işlemleri laminar hava akımlı sınıf II steril hücre kültürü kabininde, steril sarf malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

2.4.2 İskemik ABY modeli oluşturulması

HK-2 hücrelerinde iskemik ABY modeli, ‘modüler hipoksi’ odacığı kullanılarak gerçekleştirildi. Modüler hipoksi odacığı, içeriğindeki O_2 konsantrasyonunun ayarlanabilmesine olanak sağlayan kapalı bir sistemdir.

Modüler hipoksi odacığında hipoksik ortam oluşturmak için, deney için hazırlanan hücreler hipoksi odacığına yerleştirildi. Ardından odacık içerisindeki hava, oksimetre kontrolünde, % 95 N_2 + % 5 CO_2 gaz karışımı ile değiştirilerek oksijen konsantrasyonu % 2’ye indirildi. Hipoksi odacığı daha sonra inkübasyon süresince $37^\circ C$ ’ de inkübe edildi.

Hücrelerde gerçekleştirilen hipoksi indüksiyonu, IB tekniği ile anti-HIF-1 α antikoru kullanılarak belirlendi.

Hipoksi sonrasında reperfüzyonun etkilerinin değerlendirileceği çalışmalarda ise, hipoksik inkübasyonun ardından hücreler hipoksi odacığından çıkartılarak konvansiyonel CO_2 inkübatöründe inkübe edildiler.

2.4.3 *Stres indüksiyonları*

2.4.3.1 **Oksidatif stres indüksiyonu**

HK-2 hücrelerinde OS indüksiyonu hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. H_2O_2 , organizmada oksijen metabolizması sırasında üretilen bir reaktif oksijen türevidir. Bir serbest radikal değildir ancak ortamda Fe^{+2} ile reaksiyona girerek son derece reaktif bir molekül olan OH^* oluşturur ve hücrede OS'e neden olur. Çalışmamızda kullandığımız H_2O_2 konsantrasyonları % 30'luk H_2O_2 stok çözeltisinden, besiyeri ile seyreltilerek, deney günü taze olarak hazırlandı.

Hücrelerdeki OS düzeyi, OxyBlot kiti kullanılarak, anti-dinitrofenil hidrazon (DNP) antikoru ile stabil bir oksidatif stres belirteci olan protein karbonil içeriği (PCC) düzeyleri üzerinden belirlendi (32).

OxyBlot Kiti:

Kitin çalışma prensibi, proteinlerdeki karbonil gruplarının (protein carbonyl content, PCC) 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-dinitrophenylhydrazine, DNPH) ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon (dinitrophenyl hidrazon, DNP) yapılarının IB yöntemi ile tayinine dayanmaktadır.

Örneklerin Hazırlanması: İndüksiyon süreleri sonunda toplanan hücreler Bölüm 2.4.5'de belirtilen şekilde lizatlandı ve Bölüm 2.4.6'da belirtilen şekilde protein içeriği tayin edildi. Deney süresince protein içeriğinin oksidasyona karşı korunması için tüplere son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde DTT eklendi.

Örneklerin Türevlendirilmesi: Yeni bir tüpte 20 μ g protein içeren örnek üzerine 5 μ l %12'lik SDS çözeltisi eklendi. Ardından tüp içeriğine 10 μ l 1x DNPH solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüpe 7.5 μ l nötralizasyon solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

Standart DNP-protein belirtecinin hazırlanması (marker, M): Kit içerisinde hazır halde gelen, 2.5 µl standart DNP-protein çözeltisi üzerine 20 µl 1X yükleme tamponu eklenerek hazırlandı.

Hazırlanan örnekler ve DNP-protein belirteci, Bölüm 2.4.7’de anlatıldığı şekilde, % 12’lik SDS-PAGE jeli kullanılarak ayrıldı. Proteinler PVDF membrana transfer edildikten sonra, anti-DNP primer antikoru ile IB işlemi yapılarak örneklerdeki PCC düzeyleri belirlendi.

2.4.3.2 Nitrozatif stres indüksiyonu

HK-2 hücrelerinde NS indüksiyonu peroksinitrit (ONOO⁻) radikali kullanılarak gerçekleştirildi. ONOO⁻, bir reaktif nitrojen türevi olup, fizyolojik koşullarda O₂^{-•} ve NO[•] radikallerinin tepkimesi sonucu ortaya çıkan ve hücrelerde NS’e neden olan bir radikaldir. NS indüksiyonu deneylerinde, deney günü ONOO⁻ çözeltisinin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 302 nm dalga boyunda 1 M’lık sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisine karşı absorbansı okunarak hesaplandı. Deneyde kullanılacak ONOO⁻, istenilen konsantrasyonlara 1 M’lık NaOH çözeltisi ile seyreltilerek hazırlandı.

Hücrelerdeki NS düzeyi, IB tekniği ile 3-nitrotirozin (3-NT) üzerinden anti-3NT antikoru kullanılarak belirlendi. 3-NT; hücre içerisinde artan RNT’nin proteinlerin spesifik tirozil rezidülerini nitrolaması sonucu oluşan stabil bir NS belirtecidir (10).

2.4.3.3 Endoplazmik retikulum stresi indüksiyonu

HK-2 hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER) stresi indüksiyonu tunikamisin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tunikamisin, bakteri ve ökaryotik hücrelerde asetil glukozamin transferaz enzimini inhibe ederek ER stresi oluşumuna neden

olmaktadır. Liyofilize halde temin edilen tunikamisin, konsantrasyonu 2.5 mg/ml olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

Hücrelerdeki ER stresi artışı ve UPR yolağı aktivasyonu glukoz ile regüle edilen protein-78 (GRP-78), fosforillenmiş ökaryotik inisiasyon faktörü (P-eIF2 α) ve CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP) üzerinden belirlendi.

2.4.4 Geçici transfeksiyon yöntemi ile HK-2 hücrelerinde MANF ekspresyonunun düzenlenmesi

Transfeksiyon; DNA veya çift zincirli RNA gibi nükleik asitlerin hücreye eklenmesi işlemidir. Hücreye eklenen DNA, hücrenin metabolik aktivitesini kullanarak protein sentezi gerçekleştirebilmektedir. Diğer taraftan hücre içerisine eklenen çift zincirli RNA ise spesifik olarak ilgili olduğu proteine ait mRNA'nın translasyonunu inhibe ederek, protein sentezini baskılayabilmektedir.

Uygulanan transfeksiyon yöntemine göre, nükleik asitlerin hücre genomuna yerleştirilmesi ile kalıcı olarak gerçekleştirilebileceği gibi, hücre genomuna her hangi bir işlem yapılmaksızın nükleik asitlerin hücre içerisine girmesi sağlanarak geçici olarak da yapılabilmektedir.

Transfeksiyon işlemi için en sık kullanılan yöntemlerden birisi, Lipofektamine 2000 ve Xtreme GENE HP gibi katyonik lipidlerin kullanıldığı kimyasal transfeksiyondur. Bu yöntemin temeli; katyonik lipidlerin nükleik asitler ile pozitif yüklü lipozom kompleksleri oluşturarak negatif yüklü hücre mebranından geçebilmesi temeline dayanmaktadır.

Çalışmamızda HK-2 hücrelerinde katyonik lipid aracılı gerçekleştirilen DNA ve siRNA transfeksiyon protokolleri ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılmıştır.

2.4.4.1 HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon yöntemi ile MANF over-ekspresyonu

HK-2 hücrelerinde MANF proteini over-ekspresyonu, FLAG ile işaretli *MANF* geni taşıyan pCIneo vektörü (pCIneo-MANF-FLAG) kullanılarak lipozom aracılı geçici transfeksiyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan MANF kodlayan pCIneo-MANF-FLAG plazmidini Dr. Shengyun FANG (Maryland Üniversitesi, Baltimore) tarafından hediye edilmiştir. Plazmidin çoğaltılmasından hücreye transfekte edilmesine kadar uygulanan işlemler sırasıyla aşağıda listelenmiştir:

- pCIneo-MANF-FLAG plazmidinin DH5 α bakterilerine transformasyonu,
- DH5 α bakterilerinden DNA izolasyonu,
- Elde edilen çözeltilerdeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesi,
- HK-2 hücrelerine pCIneo-MANF-FLAG plazmidinin transfeksiyonu.

Transformasyonda kullanılan DH5 α bakterilerinin hazırlanması:

Stok DH5 α bakterisinden 10 μ l alınarak, 5 ml antibiyotik içermeyen LB besiyeri içerisine ekildi. Besiyeri çalkalamalı inkübatör içerisinde, 37 °C sıcaklıkta bir gece üremeye bırakıldı. Ertesi gün bakteri üremesi gerçekleşen çözeltiler, taze LB besiyeri ile 1:100 oranında dilüe edilerek yeniden inkübasyona başlandı. Aralıklarla bakteri kültürünün 600 nm'deki absorbansı okunarak kontrol edildi. Absorbans değeri 0.300-0.400 oluncaya kadar büyütülmeye devam edildi. Okunan absorbans değeri 0.300-0.400'e ulaştığında, bakteri içeren erlen inkübatörden çıkarıldı ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Ardından 4 °C'de 1000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek bakterilerin çökmesi sağlandı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve bakteri

hücreleri, 5 ml soğuk TSS tamponu ile süspande edilip, steril tüplere 100 µl'lik hacimler halinde -80 °C'de saklandı.

pCIneo-MANF-FLAG plazmidinin DH5α bakterilerine transformasyonu:

Tüp içerisindeki DH5α bakterileri 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Tris-EDTA (TE) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanan pCIneo-MANF-FLAG plazmidinden 3 µl alınarak, bakteri üzerine eklendi ve 20 dakika süre ile buz üzerinde bekletildi. Ardından 42 °C'lik su banyosunda 45 saniye bekletilip, yeniden buz üzerine alındı ve 2 dakika bekletildi. Isı şoku uygulaması sonrasında, tüpe 500 µl LB eklenip, 1 saat 37 °C'de 900 rpm'de ön inkübasyon gerçekleştirildi. Bu esnada yeni bir erlen içerisinde 200 ml LB ve 200 µl 1000X ampisilin hazırlandı. Ön inkübasyonu tamamlanan bakteri tüplerinden 100 µl alınarak yeni besiyeri içerisine eklendi ve bir gece boyunca 37°C'de 250 rpm'de çoğaltıldı.

Plazmid DNA'sının bakteriden izolasyonu:

Bakterilerde çoğaltılan pCIneo-MANF-FLAG plazmidlerinin izolasyonu, PureLink Hipure Plasmid Filter Maxiprep kiti ile gerçekleştirildi.

PureLink Hipure Plasmid Filter Maxiprep protokolü:

Bakteri Hücrelerinin Toplanması: Bir gece önceden inkübe edilen bakteriler steril bakteri tüplerine aktarıldı. 4000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, hücre pelletleri ile çalışılmaya devam edildi.

Hücre Lizatının Hazırlanması: Hücre pelletinin üzerine 10 ml RNaz eklenen resüspanسیون tamponu eklendi ve pipetleme işlemi ile süspanسیون haline getirildi. Süspanسیون 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 10 ml lizatlama tamponu eklendi. 5 defa nazikçe alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında

inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, 10 ml presipitasyon tamponu eklendi ve nazikçe karıştırıldı.

DNA'nın Kolona Bağlanması: Hazırlanan bakteri lizatı filtreli kartuş-kolon sistemine aktarılarak süzüldü. Kartuş 10 ml yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra çıkartıldı ve kolon ile çalışmaya devam edildi. Kolona tekrar 50 ml yıkama tamponu eklendi ve damlama bitinceye kadar beklendi.

DNA'nın Kolondan Ayrılması ve Çöktürülmesi: Bir önceki aşamada DNA'nın bağlandığı kolon steril santrifüj tüpü üzerine yerleştirildi. 15 ml elüsyon tamponu eklendi, damlama bitince kolon uzaklaştırıldı. Tüpün içerisindeki elüsyon tamponuna 10.5 ml 2-propanol (izopropanol) eklendi ve homojen hale getirmek için nazikçe karıştırıldı. Tüp içeriği 4 °C'de 15200 x g'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Pellet (DNA) üzerine 5 ml soğuk %70'lik etanol eklenerek süspansiyon haline getirildi ve steril tüplere alındı. Tüpler 4 °C'de 15200 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletin havanın etkisiyle kuruması beklendi. DNA pelleti 200 µl TE tamponu (TE) ile süspansiyon haline getirilerek -20 °C' de saklandı.

Elde edilen süspansiyonun DNA konsantrasyonunun belirlenmesi:

Maxiprep kiti ile izole edilen plazmid DNA çözeltisinin konsantrasyonu ve saflığı Nanovette spektrofotometre cihazı kullanılarak belirlendi. Örneğin absorbansı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında TE tamponuna karşı okundu ve oranlanarak DNA konsantrasyonları bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. pCIneo-MANF plazmid konsantrasyonu ve A260/280 oranı.

Plazmid	Konsantrasyon (µg/µl)	A260/280
pCIneo-MANF-FLAG	1.052	1.680

pCIneo-MANF-FLAG plazmidinin HK-2 hücrelerine transfeksiyonu:

Çalışmamızda standart protokol olarak 100 mm'lik hücre kültürü kabında gerçekleştirilen transfeksiyon protokolü dikkate alınarak, kullanım amacına göre farklı büyüklükteki hücre kültürü kaplarına ekilen, farklı sayılardaki HK-2 hücrelerine transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi.

Deney gününden bir gün önce HK-2 hücreleri sayıldı ve 1.6×10^6 olacak şekilde 100 mm'lik hücre kültürü kabına ekildi. Ertesi gün hücrelere FLAG işaretli MANF kodlayan pCIneo-MANF-FLAG plazmidi, 1 µg DNA başına 1 µl Lipofektamin 2000 kullanılarak, transfekte edildi. Bu işlem için steril tüpte 750 µl Opti-MEM I içerisine DNA ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Aynı bir tüpte 750 µl Opti-MEM I içerisine Lipofektamin 2000 eklendi, hafifçe çalkalanıp 5 dakika inkübe edilerek lipozomların oluşması sağlandı. Ardından Lipofektamin 2000-Opti-MEM I çözeltisi, DNA içeren Opti-MEM I tüpüne ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra hücrelere damla damla uygulandı. Transfeksiyondan 6 saat sonra besiyeri uzaklaştırılarak yeni besiyeri eklendi ve 16 saat süreyle konvansiyonel şartlarda inkübe edildi.

Transfeksiyon ajanı olarak Xtreme GENE HP kullanılan çalışmalarda ise, steril bir tüpe 750 µl Opti-MEM I içerisinde DNA ilave edildi ve hafifçe vortekslendi. Ardından Xtreme GENE HP eklendi, hafifçe el darbesi ile çalkalanarak 30 dakika inkübe edildi ve hücrelere damla damla uygulandı. Lipofektamin 2000 kullanılan

çalışmalardan farklı olarak, hücreler besiyeri değiştirilmeksizin 24 saat süre ile inkübe edildi.

2.4.4.2 HK-2 hücrelerinde siRNA transfeksiyonu aracılı *MANF* gen ifadesinin susturulması

Hücrelerde MANF ekspresyonunun baskılanması küçük müdahale edici RNA (small interfering RNA, siRNA) oligomerlerinin (MANF siRNA) geçici transfeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. siRNA'lar 21-31 nükleotid uzunluğunda çift zincirli yapıdadırlar. siRNA yöntemi ile gen ifadesinin susturulması hedef gene ait mRNA'ların kesilmesi temeline dayanır. Hücre içerisine giren siRNA, RNA-ile indüklenen susturma kompleksi (RNA-Induced Silencing Complex, RISC) ile etkileşir ve siRNA'nın çift sarmallı yapısı açılarak, hedef mRNA ile aynı baz dizisini taşıyan "yolcu" dizisi (passenger, sense strand) yapıdan ayrılır. RISC üzerinde kalan "rehber" dizi (guide, antisense strand) ise hedef mRNA üzerinde komplementer olduğu dizi ile birleşir ve mRNA'nın kesilmesine yani susturulmasına neden olur.

Tez çalışmamızda gerçekleştirilen MANF siRNA deneylerinde, Ambion firmasından satın alınan, daha önce Dr. Shengyun FANG (Maryland Üniversitesi, Baltimore) tarafından tasarlanmış, MANF siRNA oligonükleotid dizisi kullanıldı (Tablo 2).

Tablo 2. MANF siRNA'ya ait nükleotid dizisi.

Gene Acc.No.	siRNA	Nükleotid içeriği (sense 5'-3')	Firma
<i>hMANF</i> NM_006010.4	MANF	GAUUUUACCAGGACCUCAATT	Ambion

siRNA deneylerinde, deney gününden bir gün önce HK-2 hücreleri sayıldı ve 6 kuyucuklu hücre kültürü kabına 2×10^5 'er hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelere Bölüm 2.3.4.1'de anlatıldığı şekilde Lipofektamin 2000 transfeksiyon ajanı kullanılarak 40 nM konsantrasyonda MANF-siRNA transfekte edildi. Transfeksiyon işleminden 6 saat sonra besiyeri taze besiyeri ile yenilendi ve 72 saat süre ile konvansiyonel şartlarda inkübe edildi. Kontrol olarak genom üzerinde herhangi bir bölge ile eşlenmeyen negatif kontrol siRNA kullanıldı.

2.4.5 Hücrelerin lizatlanması

Yapılan çalışmalardan sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler soğuk 1X PBS ile yıkanarak toplandı. Tüp içeriği 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Örnek tüpü başına 30 µl 1X PBS, 30 µl 2X RIPA ve 0.6 µl 100X PIC eklendi. Tüpler 5 dakikada bir vortekslenerek 20 dakika süreyle lizatlandı. Hücre pelletini uzaklaştırmak için 14.000 rpm'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar temiz tüplere transfer edildi.

2.4.6 Protein miktar tayini

Elde edilen hücre lizatlarının total protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (bicinchoninic acid, BCA) deney kiti kullanılarak tayin edildi. Bu yöntemin temeli, alkali çözeltideki proteinlerin Biüret reaktifindeki Cu^{+2} 'yi, Cu^{+1} 'e indirgemesi ve daha sonra Cu^{+1} 'in BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır.

Örneklerin protein miktarı, çeşitli konsantrasyonlardaki sığır serum albumini (BSA) proteini kullanılarak hazırlanan standart eğri grafiği ve denklemi üzerinden hesaplandı.

BCA çalışma reaktiflerinin hazırlanması: Çalışma reaktifi kit içeriğinde hazır halde gelen reaktif A ve reaktif B ile deney günü taze olarak hazırlandı. Çalışma reaktifi hazırlanırken 50 kısım Reaktif A üzerine, 1 kısım Reaktif B (50:1, Reaktif A:B) ilave edildi ve karıştırıldı. Mikroplaka ile çalışırken örnek başına 200 µl çalışma reaktifi kullanıldı.

BSA standartlarının hazırlanması: İçerisindeki protein miktarı tayin edilecek örnek; konsantrasyonları bilinen standart albümin çözeltileri ile hazırlanan, BSA standart eğrisine ait doğru denklemi üzerinden hesaplandı.

Standart albümin çözeltilerinin hazırlanması ve standart eğri grafiğinin çizilmesi: Kitle birlikte verilen 1 ml'lik ampüllerin her biri 2 mg/ml sığır serum albümini (BSA) içermektedir. Bu stok çözeltiden alınan belirli hacimler, distile su ile seyreltilerek ml'de 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 2000 µg BSA taşıyan çalışma çözeltileri hazırlandı.

Standart eğri grafiği çizmek için, mikroplakanın her bir kuyucuğuna 25 µl standart çözelti ve 200 µl BCA çalışma reaktifi eklendikten sonra, 1 dakika orbital çalkalayıcıda karıştırıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Distile su ve BCA reaktifi ile hazırlanan köre karşı mikroplaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Okunan absorbans değerleri ve protein konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren standart bir grafik çizildi.

Örneklerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi: Mikroplakanın her bir kuyucuğuna 8 µl distile su eklendikten sonra, 2 µl protein miktarı belirlenecek hücre lizatları eklendi. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl BCA çalışma reaktifi ilave edildi ve bir dakika süre ile çalkalandı. Hazırlanan plaka 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroplaka içeriği köre karşı (1X PBS: 2X

RIPA, 1:1) mikropilaka okuyucuda 562 nm dalga boyunda okundu. Absorbans değerlerinin ortalaması alındıktan sonra, doğru denklemde yerine konularak protein miktarı bulundu.

Hücrelerin lizatlanması sonucu elde edilen her örnek için yukarıdaki protokole göre total proteini miktar tayini yapıldı.

2.4.7 SDS-PAGE elektroforezi ve immünoblotlama (Western Blotlama)

Uygulanan deney koşulları ile hücre içi hedef proteinlerdeki değişimleri belirlemek amacıyla IB (Western Blotlama) yöntemi kullanıldı. Yöntemin esası; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin, membrana transfer edilmesi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla tayin edilmesidir.

SDS-PAGE elektroforezi: Örneklerde fraksiyonlarına ayrılmak istenen proteinlerin molekül ağırlıkları göz önünde tutularak % 10 ve 12'lik ayırma jelleri hazırlandı. Yığınlama jeli olarak % 3.5 jel hazırlandı. Örnekler 40 µg protein içerecek şekilde 4X yükleme tamponu ile birlikte 100 °C'de 5 dakika kaynatılarak denatüre edildi. İnkübasyon sonunda örnekler jel kuyucuklarına yüklendi ve 200 V'ta yürütüldü.

Tablo 3. SDS-PAGE ayırma jeli.

Ayırma Jeli		
Jel (%)	% 10	% 12
Bir jel için (10 ml)		
% 30'luk Akrilamit	3,33 ml	4 ml
4X Ayırma Tamponu	2,5 ml	2,5 ml
Distile su	4,1 ml	3,5 ml
% 10'luk AP	75 µl	75 µl

Tablo 4. SDS-PAGE yığınlama jeli.

Yığınlama Jeli (%3,5'luk) 3 ml	
%30'luk Akrilamit	0,35 ml
4X Yığınlama Tamponu	0,75 ml
Distile su	1,9 ml
% 10'luk AP	25 µl

Proteinlerin Jelden Membrana Transferi: Protein taşıyan poliakrilamid jel ile membran doğrudan temas ettirilip iletici bir çözelti içerisinde birleşen iki elektrot arasına yerleştirildi. 200 mA'lık elektrik akımı soğukta 90 dakika uygulandı, negatif yüklü proteinler pozitif kutba doğru hareket etti, membran ile karşılaştıklarında hareketsiz kaldılar ve membrana bağlandılar, bu şekilde membran sürüklenmelerini durdurdu. Membran olarak polivinilidin diflorit (PVDF) membran kullanıldı. PVDF membranlar, kullanılmadan önce metanol ile ıslatılarak etkinleştirildi.

Membrandaki Proteinlerin Blotlanması: Transfer işleminden sonra blotlama işlemi sırasında oluşabilecek spesifik olmayan protein bağlanmalarını engellemek için, membranın transfer sırasında protein bağlanmayan bölgeleri 1X yıkama tamponu içerisinde hazırlanan %5'lik süt tozu ile membran, yarım saat boyunca inkübe edildi. Bloklama işleminden sonra membran yıkama solüsyonu ile bir kez 5 dakika boyunca yıkandı ve primer antikor eklendi, gece boyunca 4 °C'de muamele edildi.

Çalışmalarda kullanılan primer antikorlar; monoklonal anti-katalaz 1:4000 oranında, poliklonal anti-DNP 1:300 oranında, poliklonal anti-3-NT 1:1000, poliklonal anti- iNOS 1:1000, poliklonal anti-HIF-1 α 1:1000, poliklonal anti-GRP-78 1:10000, poliklonal anti-CHOP 1:1000, poliklonal anti-eIF2 α 1:1000, poliklonal anti-PeIF2 α 1:1000, poliklonal anti-PARP 1:1000, poliklonal anti-MANF 1:1000, monoklonal anti-FLAG 1:20000, monoklonal anti- β -actin 1:20000 oranında % 5'lik yağsız sütte hazırlandı, koruyucu olarak 1:1000 oranında sodyum azit çözeltisi eklendi ve +4 °C'de saklandı.

Primer antikor ile inkübasyonun ardından membran 3 defa 5 dakikalık sürelerle yıkama tamponu ile muamele edildi. Ardından kullanılan primer antikorun türüne göre, 1:7500 oranında %5'lik yağsız sütte hazırlanan horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile işaretlenmiş goat anti-rabbit ve goat anti-mouse sekonder antikor ile 1 saat çalkalandı.

Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi: HRP enzimi ile işaretlenmiş sekonder antikorlar ile inkübe edilen membranların görüntülenmesi için SuperSignal WestPico kemilüminesans substratı kullanılmıştır. Substrat olarak kullanılan luminol, HRP ve H₂O₂ varlığında okside olur ve uyarılmış ürün olan 3-aminoflatat oluşur. Bu

ürün, 425 nm'de ışımaya verir. Çalışma esnasında membranlar, SuperSignal WestPico Chemiluminescence Substrate çalışma solüsyonları membran başına 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak taze hazırlandı ve membranla 1 dakika inkübe edildi. Fazla solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra membran protein kısmı yukarı bakacak şekilde Vilber Lourmat Fuxion-FX7 görüntüleme cihazı ile kemilüminesans görüntülemesi yapıldı.

2.4.8 İmmünopresipitasyon yöntemi ile hücre besiyerinden MANF protein düzeyi tayini

HK-2 hücrelerinden besiyerine salgılanan MANF immünopresipitasyon (IP) yöntemi ile tayin edildi. IP yöntemi, antijen-antikor etkileşimi ile protein izolasyonu temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde uygun boncukların yüzeyine ilgilenilen proteine özgül antikorlar bağlanarak boncuk-antikor kompleksi oluşturulur. Ardından örnek çözeltisi ile muamele edilerek, ilgili proteinlerin (antijenlerin) bu komplekste yer alan antikorlara bağlanması sağlanır. Daha sonra protein-antikor-boncuk kompleksi çöktürülerek protein izolasyonu gerçekleştirilir.

IP yöntemi ile besiyerinden MANF tayini için, hücrelere Xtreme GENE transfeksiyon ajanı kullanılarak 1, 2 ve 4 µg FLAG işaretli pCIneo-MANF plazmidi transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılacak hücrelere ise boş pCIneo vektörü transfekte edildi. Transfeksiyon süresinin tamamlanmasının ardından hücrelerin besiyeri tazelandı ve 8 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri toplandı. 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant'ın 900 µl'si yeni besiyerine yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.5 µl FLAG antikorunu eklenerek 4 °C'de, 30 dk çalkalanarak inkübe edildi. Ön inkübasyonun ardından, tüpe 15 µl Protein A Agaroz boncuğu eklendi ve 4 saat süre ile rotator ile karşılaştırıldı. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 5000xg hızda santrifüj edilerek protein-antikor-boncuk kompleksi

çökütürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüp içeriği 5 defa IP yıkama tamponu ile yıkanarak non-spesifik bağlanmalara uzaklaştırıldı. Yıkama işleminin ardından tüpteki tüm sıvı uzaklaştırıldı, 25 µl 2X yükleme tamponu eklendi ve 95 °C’de 5 dk kaynatıldı. Bu sayede antijen antikor kompleksinin boncuklardan ayrılması ve yükleme tamponu içerisine geçmesi sağlandı.

Besiyeri toplanan hücreler ise input olarak kullanılmak üzere lizatlandı. 20 µl hücre lizatının üzerine 6.7 µl 4X yükleme tamponu eklenerek 95 °C’de 5 dk kaynatıldı. Ardından hazırlanan IP ve input örnekleri, %12’lik jele yüklenerek ardından IB gerçekleştirildi. IP ile besiyerinden izole edilen MANF proteinleri, membranın MANF antikoruna ile blotlanmasının ardından kemilüminesans yöntemi ile tayin edildi.

2.4.9 WST-1 ile hücre proliferasyon analizi

Hücre proliferasyonu ve canlılığı WST-1 hücre proliferasyon ajanı ile gerçekleştirildi. WST-1 ajanı içerisindeki tetrazolium tuzu (4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum)-1,3-benzen disülfonat), hücre proliferasyonu veya hücre canlılığının ölçülmesinde kullanılır. Yöntemin temeli; açık kırmızı renkte olan WST-1 reaktifinin, mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenmesi ile koyu kırmızı bir renk alması ve renk değişiminin 440 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Renk şiddetindeki artış canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Tez çalışmamızda yapılan hücre proliferasyon veya canlılık deneyleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında gerçekleştirildi. HK-2 hücrelerinin bulunduğu 96 kuyucuklu hücre kabından tüm besiyeri dikkatlice uzaklaştırıldı ve 90 µl yeni besiyeri eklendi. Ardından her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 proliferasyon ajanı

eklendi. Hücreler 37 °C'de, %5'lik CO₂ inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun 1., 2. ve 4. saatlerinin sonunda örneklerin absorbansı, hücre içermeyen besiyeri ve WST-1 karışımına karşı mikropłaka okuyucuda 440 nm'de ölçüldü.

2.5 İmmünoblotlama Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin Dansitometrik Analizi

İmmünoblotlama yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen protein bantlarının yoğunlukları (optik yoğunlukları) Adobe Photoshop CS5 paket programı kullanılarak hesaplandı. Ardından, ilgili proteinlerin düzeyleri β -aktin proteininin optik yoğunluğuna göre normalize edildi (ilgili protein düzeyi/ β -aktin düzeyi).

2.6 İstatistiksel Analiz

Üç farklı deneyden (n=3) elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi için ortalama \pm ortalama standart hataları (Ort. \pm O.S.H.) hesaplandı. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını tespit etmek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi ve ikili grupların kendi arasında karşılaştırılması için *Student t testi* ile istatistiksel analizi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak p <0.05 kabul edildi. Bu işlemlerin tamamı Prism-GraphPad 5 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bölüm III

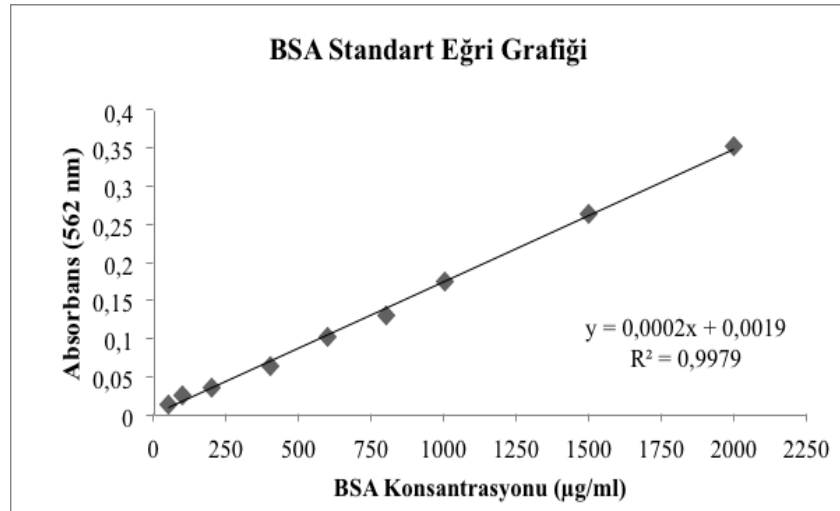
3 BULGULAR

3.1 Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi

Farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$) BSA içeren çözeltilerin spektrofotometrede 562 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin ortalaması \pm ortalama standart hatalar (Ort. \pm O.S.H.) Tablo 5'te sunulmuş olup, Şekil 8'de bu değerlere göre çizilen standart eğri grafiği gösterilmiştir.

Tablo 5. BSA standart eğrisine ait ortalama absorbans değerleri.

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbans (Ort \pm O.S.H)
50	0.014 \pm 0.007
100	0.027 \pm 0.001
200	0.036 \pm 0.003
400	0.066 \pm 0.007
600	0.105 \pm 0.032
800	0.131 \pm 0.017
1000	0.177 \pm 0.009
1500	0.265 \pm 0.013
2000	0.354 \pm 0.009

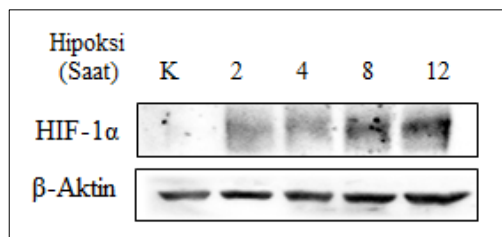


Şekil 8. BSA standart eğrisine ait grafik.

3.2 Optimizasyon Çalışmaları

3.2.1 *HK-2 hücrelerinde iskemik ABY modeli oluşturulması*

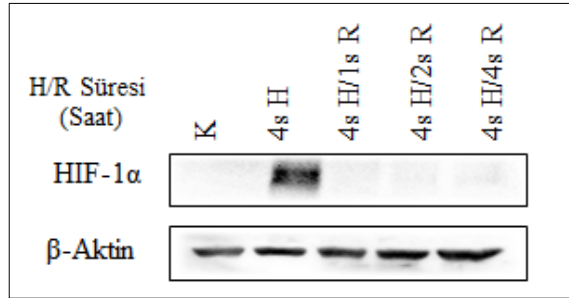
Hücrelerde iskemik ABY modeli oluşturmak için HK-2 hücreleri deneyden bir gün önce 1×10^6 şar hücre olarak 60 mm'lik hücre kültürü kaplarına ekildi. Ertesi gün hücreler hipoksi odacığına alınarak farklı sürelerde (2, 4, 8 ve 12 saat) hipoksik koşullarda inkübe edildi. İndüksiyon süreleri sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve hipoksi indüksiyonu, IB yöntemiyle, HIF-1 α artışı üzerinden değerlendirildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikorunu kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrasında süreye bağlı HIF-1 α miktarı değişimi.

HK-2 hücrelerine uygulanan hipoksi indüksiyonunun 2. saatten itibaren HIF-1 α düzeyinde artışa neden olduğu belirlendi.

HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu süresinin belirlenmesinin ardından, reperfüzyon süresini belirlemek amacıyla, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan hücreler 4 saatlik hipoksi indüksiyonu sonunda hipoksi odacığından çıkartılarak konvansiyonel CO₂ inkübatörüne alındı. Hücreler 1, 2 ve 4 saat süreyle reperfüze edildi. Bu işlemlerden sonra hücrelerden protein izolasyonu yapıldı. Gerçekleşen reperfüzyon, IB yöntemi kullanılarak, HIF-1 α düzeyinin azalması üzerinden değerlendirildi (Şekil 10). Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi.



Şekil 10. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında HIF-1 α miktarının süreye bağlı değişimi (H:hipoksi, H/R: hipoksi /reperfüzyon).

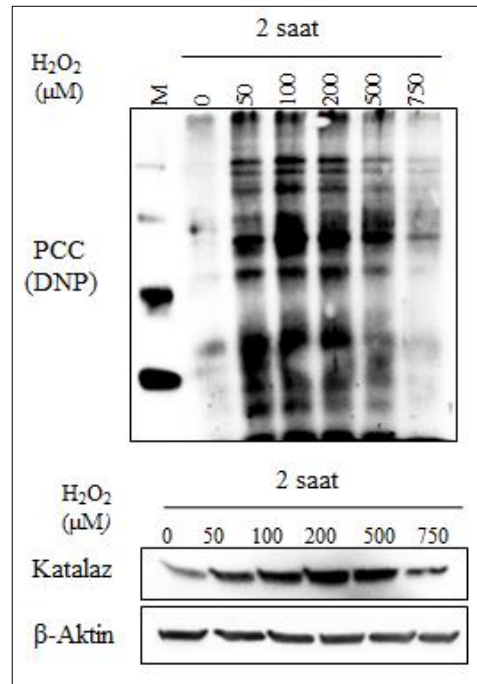
HK-2 hücrelerinde 4 saatlik hipoksi indüksiyonu ile artan HIF-1 α protein miktarının, reperfüzyonun 1. saatinden itibaren azaldığı belirlendi.

3.2.2 HK-2 hücrelerinde stres indüksiyonu optimizasyon çalışmaları

3.2.2.1 Hidrojen peroksit ile indüklenen oksidatif stres optimizasyonu

HK-2 hücrelerinde, hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılarak oksidatif stres (OS) indüksiyonu gerçekleştirmek için, en uygun H_2O_2 konsantrasyonu ve indüksiyon süresini belirlemek üzere optimizasyon çalışmaları yapıldı.

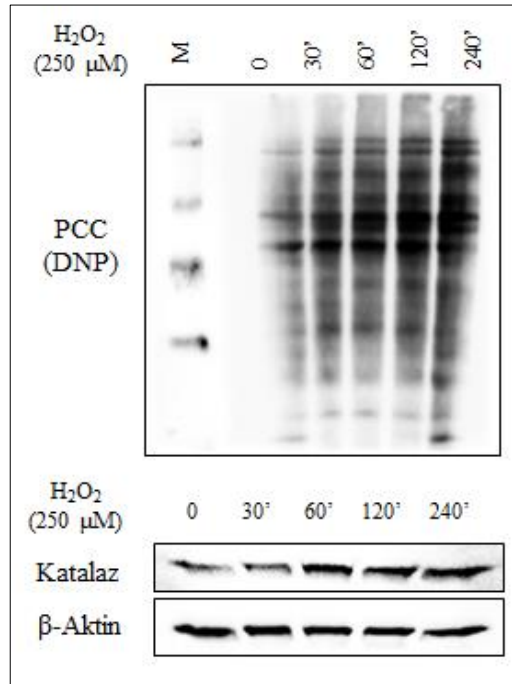
En uygun H_2O_2 konsantrasyonunu belirlemek üzere, HK-2 hücreleri deneyden bir gün önce 3×10^5 'er hücre olarak 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelere farklı konsantrasyonlarda (50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM , 750 μM) H_2O_2 eklendi ve 2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve OS düzeyi, IB yöntemi ile, PCC (anti-DNP antikoru ile) ve katalaz (anti-katalaz antikoru ile) düzeyleri üzerinden belirlendi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. HK-2 hücrelerinde OS indüksiyonu için H_2O_2 konsantrasyonunun optimizasyonu.

HK-2 hücrelerinde H_2O_2 'in $50 \mu M$ ve üzeri konsantrasyonlarda PCC ve katalaz düzeylerinde artışa neden olduğu tespit edildi. Ayrıca, $750 \mu M$ ve üzeri konsantrasyonlarda H_2O_2 'in toksik etki gösterdiği belirlendi.

HK-2 hücrelerinde H_2O_2 ile OS indüksiyonu için en uygun süreyi belirlemek üzere, hücreler deneyden bir gün önce 3×10^5 'er hücre olarak 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. Ertesi gün hücreler, $250 \mu M H_2O_2$ ile, 30, 60, 120, 240 dakika olmak üzere inkübe edildi. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve hücrelerdeki OS düzeyi, IB yöntemi ile PCC ve katalaz düzeyleri üzerinden tespit edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikorunu kullanarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 12).

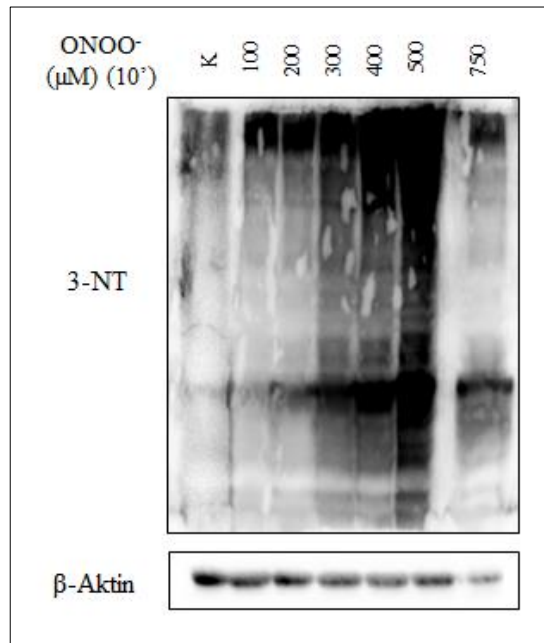


Şekil 12. HK-2 hücrelerinde H_2O_2 ile OS indüksiyon süresinin optimizasyonu.

HK-2 hücreleri 250 μM H_2O_2 ile 30 dakika inkübe edildikten sonra PCC düzeyinde, 60 dakikalık inkübasyon sonunda ise katalaz düzeyinde artış gerçekleştiği tespit edildi.

3.2.2.2 Peroksinitrit ile indüklenen NS optimizasyonu

HK-2 hücrelerinde ONOO^- kullanılarak NS indüksiyonu gerçekleştirmek için, hücreler deneyden bir gün önce 3×10^5 'er hücre olarak 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelere farklı konsantrasyonlarda (100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM ve 500 μM) ONOO^- uygulanarak 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve hücrelerdeki NS düzeyi, IB yöntemi ile, 3-NT düzeyleri üzerinden tespit edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoruna kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 13).

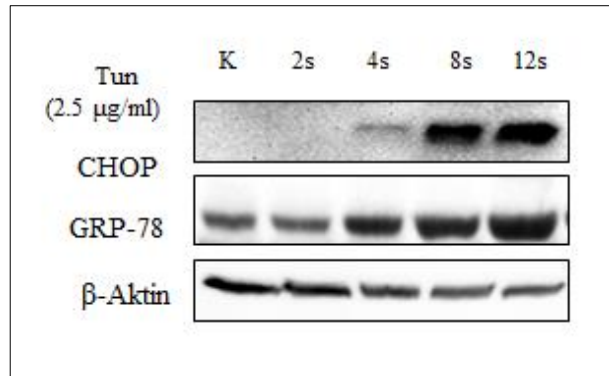


Şekil 13. HK-2 hücrelerinde ONOO^- ile NS indüksiyonunun optimizasyonu.

HK-2 hücrelerinde, 300 μM 'lık ONOO^- konsantrasyonundan itibaren 3-NT düzeyinin arttığı belirlendi.

3.2.2.3 Tunikamisin ile indüklenen ER stresi optimizasyonu

HK-2 hücrelerinde tunikamisin (Tun) kullanılarak ER stresi indüksiyonu gerçekleştirmek için, hücreler deneyden bir gün önce 3×10^5 'er hücre olarak 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelere 2.5 $\mu\text{g/ml}$ tunikamisin uygulandı ve farklı sürelerde (2, 4, 8 ve 12 saat) inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve hücrelerdeki ER stresi düzeyi, IB yöntemi ile, CHOP ve GRP78 düzeyleri üzerinden tespit edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 14).



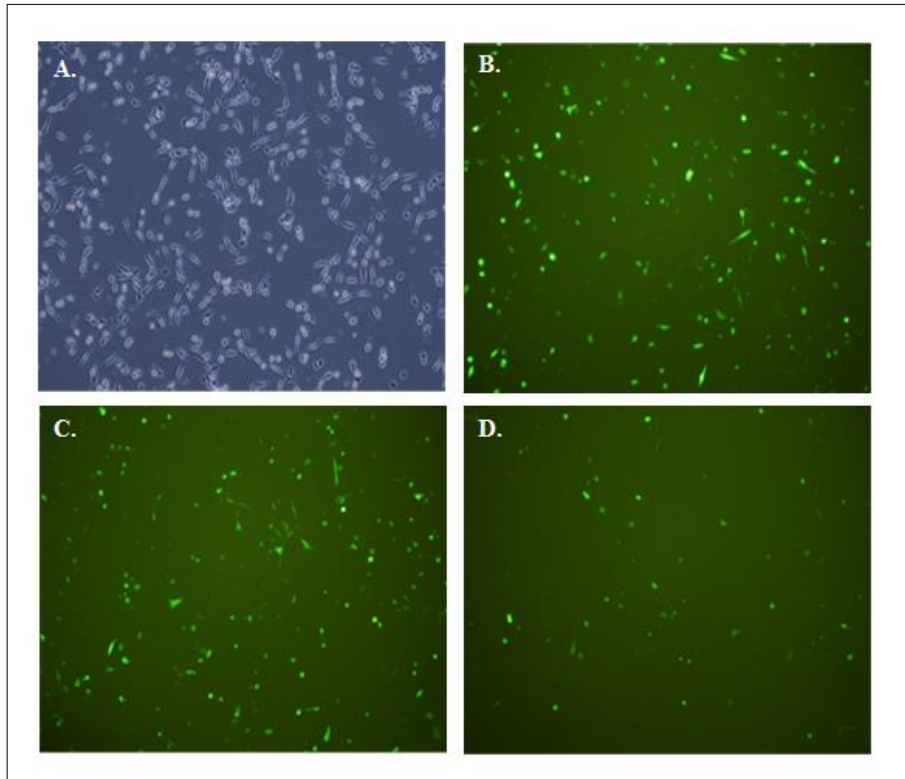
Şekil 14. HK-2 hücrelerinde tunikamisin ile ER stresi indüksiyon süresinin optimizasyonu.

HK-2 hücrelerinde tunikamisin uygulamasının, 4. saatten itibaren GRP-78 ve CHOP protein miktarlarında kontrole göre artışa neden olduğu belirlendi.

3.2.3 HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon işleminin optimizasyonu

HK-2 hücrelerinde, geçici transfeksiyon işlemi ile plazmid transfeksiyonu etkinliği belirlenmesi için, deney gününden bir gün önce hücreler 3×10^5 'er hücre olarak 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. Ertesi gün, hücelere farklı oranlarda pEGFP plazmidli:transfeksiyon ajanı (1:1, 1:1.5 ve 1:2) kullanılarak transfeksiyon işlemi uygulandı. 24 saat sonra hücreler floresans mikroskobu altında incelendi.

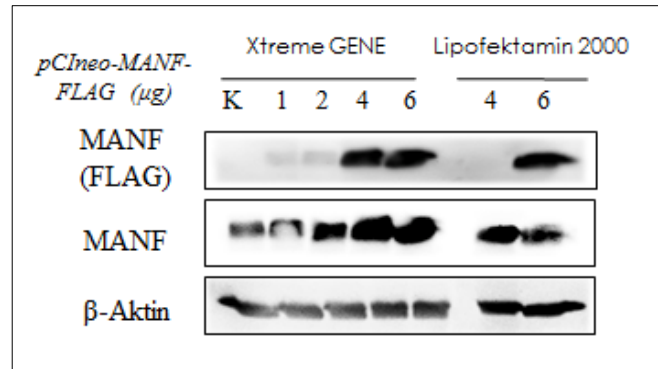
HK-2 hücrelerinde en etkin transfeksiyonun 1:1.5 DNA/Lipofektamin konsantrasyonunda gerçekleştiği, 1:2 DNA/Lipofektamin konsantrasyonunda etkin transfeksiyon gerçekleşmesine karşılık, hücre ölümüne yol açtığı belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile pEGFP kodlayan plazmid transfeksiyonunun optimizasyonuna ait floresans mikroskobu görüntüleri. **A:** kontrol hücreleri, **B:** (1:1) oranında pEGFP:lipofektamin transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler, **C:** (1:1.5) oranında pEGFP:lipofektamin transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler, **D:** (1:2) oranında pEGFP:lipofektamin transfeksiyonu gerçekleştirilen hücreler.

3.2.4 HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon işlemi ile MANF kodlayan plazmid transfeksiyonunun optimizasyonu

HK-2 hücrelerinde pCIneo-MANF-FLAG plazmid transfeksiyonunun etkinliğini belirlemek için, hücreler deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 3×10^5 'er hücre olarak ekildi. Ertesi gün Lipofektamin 2000 ve Xtreme GENE transfeksiyon ajanları kullanılarak, dört farklı konsantrasyonda (1, 2, 4 ve 6 μg) pCIneo-MANF kodlayan plazmid transfeksiyonu yapıldı. Kontrol olarak kullanılan hücrelere boş pCIneo vektörü transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler toplanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi ve transfeksiyon etkinliği, IB yöntemi ile, anti-MANF ve anti-FLAG antikoru ile tespit edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 16).

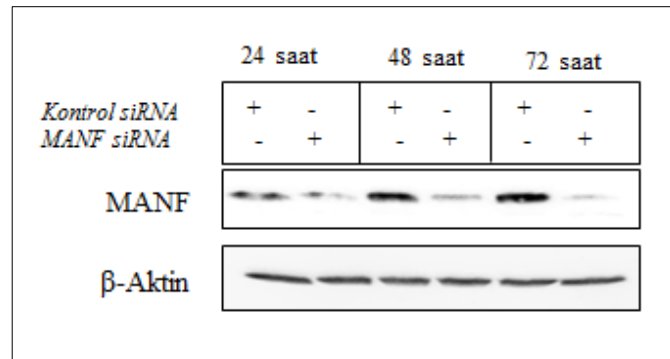


Şekil 16. HK-2 hücrelerinde geçici transfeksiyon işlemi ile MANF kodlayan plazmid transfeksiyonunun optimizasyonu.

HK-2 hücrelerinde Xtreme GENE transfeksiyon ajanının, Lipofektamin 2000'e göre daha başarılı transfeksiyon gerçekleştirdiği belirlendi.

3.2.5 HK-2 hücrelerinde siRNA tekniği ile MANF gen ifadesinin susturulmasının optimizasyonu

HK-2 hücrelerinde MANF siRNA kullanılarak *MANF* geni ifadesini susturmak için uygun transfeksiyon süresi optimize edildi. Hücreler deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 4×10^5 'er hücre olarak ekildi. Ertesi gün hücrelere, Lipofektamin 2000 transfeksiyon ajanı kullanılarak 40 nM konsantrasyonda 'negatif kontrol siRNA' ve 'MANF siRNA' oligonükleotidleri transfekte edilerek 24, 48 ve 72 saat süre inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Hücre içi MANF protein düzeyleri, IB yöntemi ile, anti-MANF antikoruna kullanılarak tespit edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoruna kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 17).



Şekil 17. HK-2 hücrelerinde siRNA uygulaması ile MANF gen ifadesinin susturulmasının optimizasyonu.

HK-2 hücrelerinde, kullanılan MANF siRNA oligonükleotidi ile transfeksiyonun 48. saatinden itibaren, MANF gen ifadesinin etkin bir şekilde susturulduğu tespit edildi.

3.3 HK-2 Hücrelerinde Stres İlişkilerinin İncelenmesi

3.3.1 Normoksi koşullarında OS, NS ve ER streslerinin incelenmesi

HK-2 hücrelerinde her bir stresin diğer stresler ile etkileşimini incelemek amacıyla, hücreler deneyden bir gün önce 1×10^6 'şar hücre olarak 60 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün, her bir stres türü için özgül stres ajanları kullanılarak OS, NS ve ER stresi indüksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile hücrelerdeki stres düzeyleri Tablo 6'da belirtilen ilişkili stres belirteçleri üzerinden değerlendirildi. Üç ayrı deney sonrasında elde edilen sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edildi. Elde edilen sonuçlar kontrol hücrelerine oranlandı ve kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak grafikleri elde edildi.

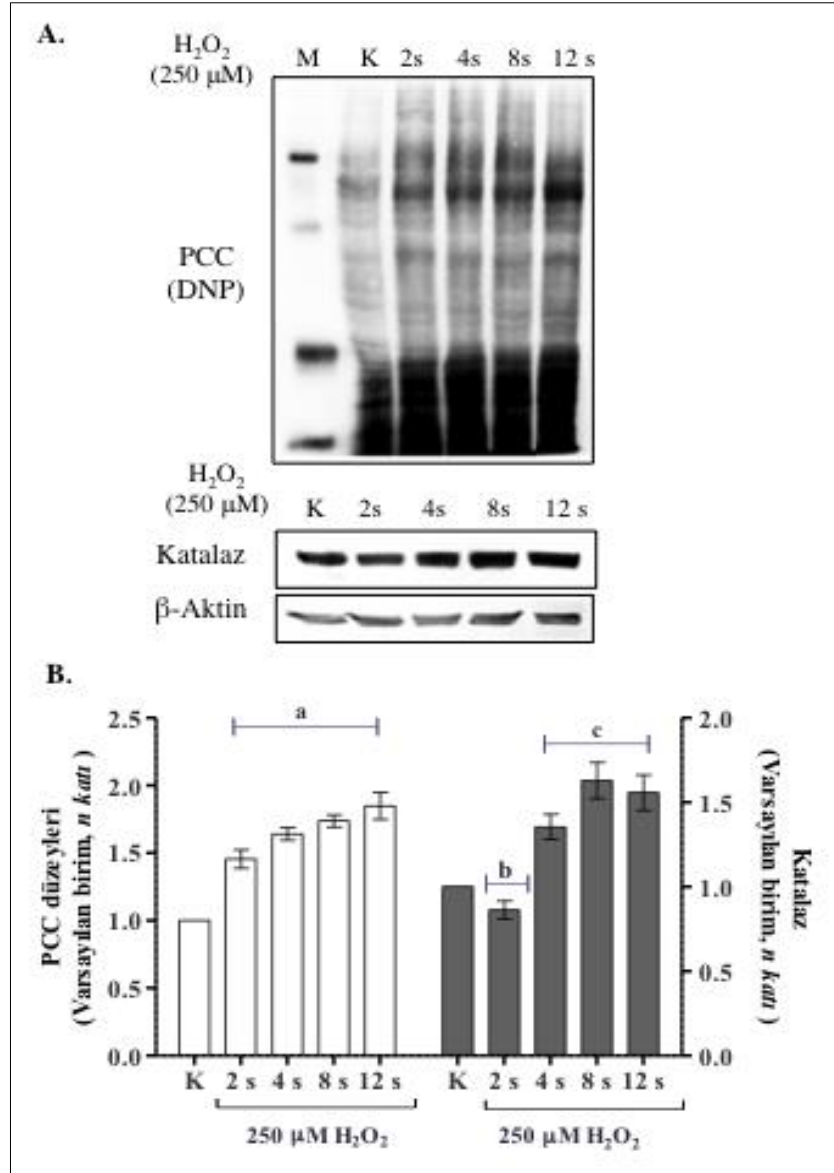
Tablo 6. Stres düzeylerini belirlemek için kullanılan özgül stres belirteçleri ve antikolar.

İncelenen parametre	Kullanılan ilişkili belirteçler
Oksidatif stres	<ul style="list-style-type: none"> • PCC (anti-DNP antikoru ile) • Katalaz (anti-katalaz antikoru ile)
Nitrozatif stres	<ul style="list-style-type: none"> • 3-NT (3-NT antikoru ile) • iNOS (anti-iNOS antikoru ile)
ER stresi	<ul style="list-style-type: none"> • CHOP (anti-CHOP antikoru ile) • GRP-78 (anti-GRP-78 antikoru ile) • P-eIF2α (anti- P-eIF2α antikoru ile)
Hücre ölümü	<ul style="list-style-type: none"> • Total PARP (anti-PARP antikoru ile) • Kırpılmış PARP (anti-PARP antikoru ile)
Hipoksi-reperfüzyon	<ul style="list-style-type: none"> • HIF-1α (anti-HIF-1α antikoru ile)

3.3.1.1 Normoksik koşullarda oluşturulan OS'in NS ve ER stresi üzerineki etkisinin incelenmesi

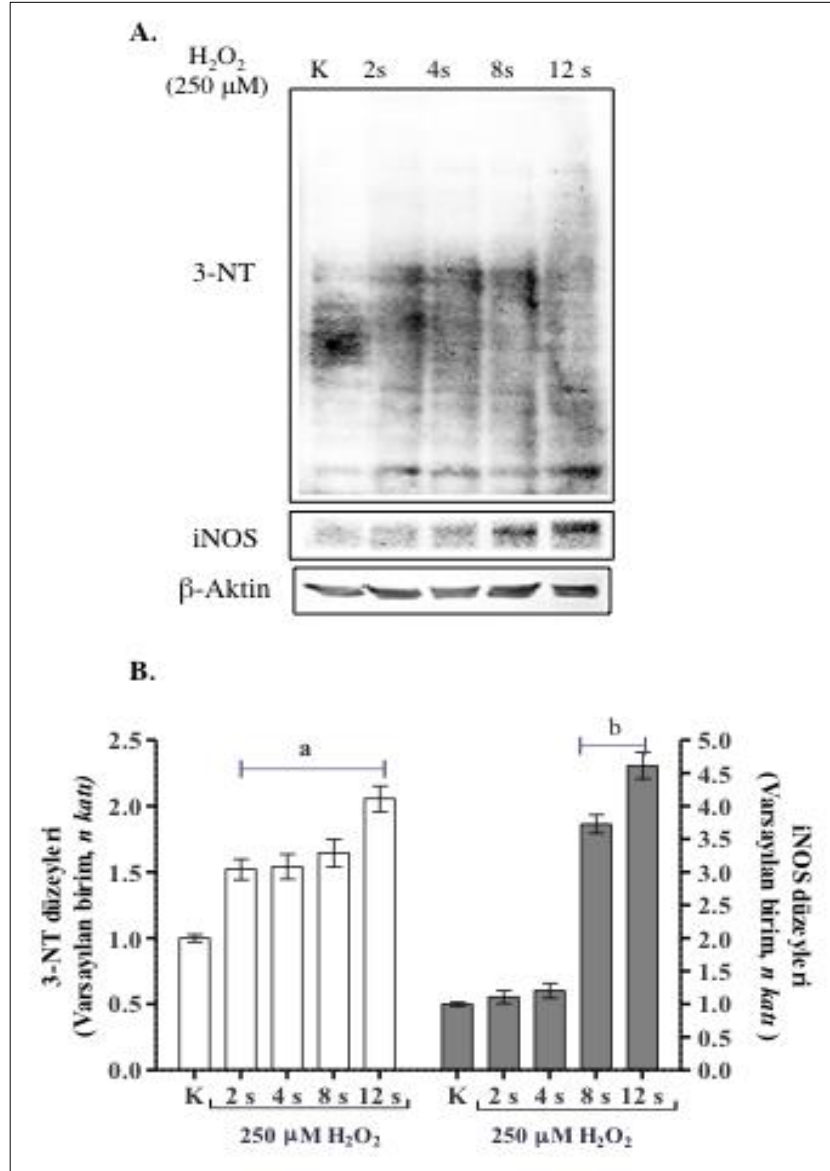
Bölüm 3.3.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan hücelere 250 μM H_2O_2 uygulandı ve 2, 4, 8 ve 12 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile stres belirteç düzeyleri tayin edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi

Hücelerde H_2O_2 uygulaması ile gerçekleştirilen OS indüksiyonu, PCC ve katalaz düzeyleri üzerinden değerlendirildi (şekil 18).



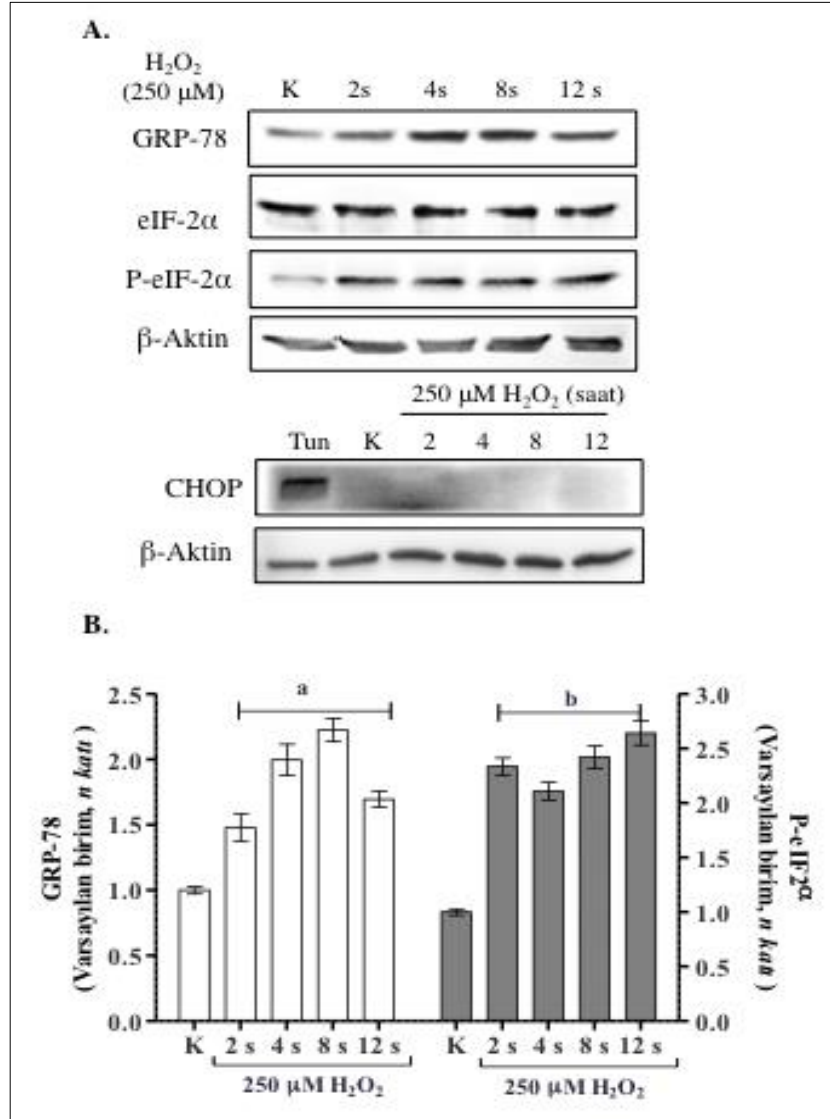
Şekil 18. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz protein düzeylerine ait bulgular. (A) PCC ve katalaz proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) PCC ve katalaz protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre *n* katı değişim (ortalama ± O.S.H..) olarak ifade edilmiştir. (*a*, *c*: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$. *b*: kontrole göre anlamlı düzeyde düşük, $p < 0.05$).

Normoksi koşullarında HK-2 hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen OS'in, inkübasyonun 2. saatinden itibaren 3-NT miktarında, 8. saatinden itibaren ise iNOS miktarında kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 19).



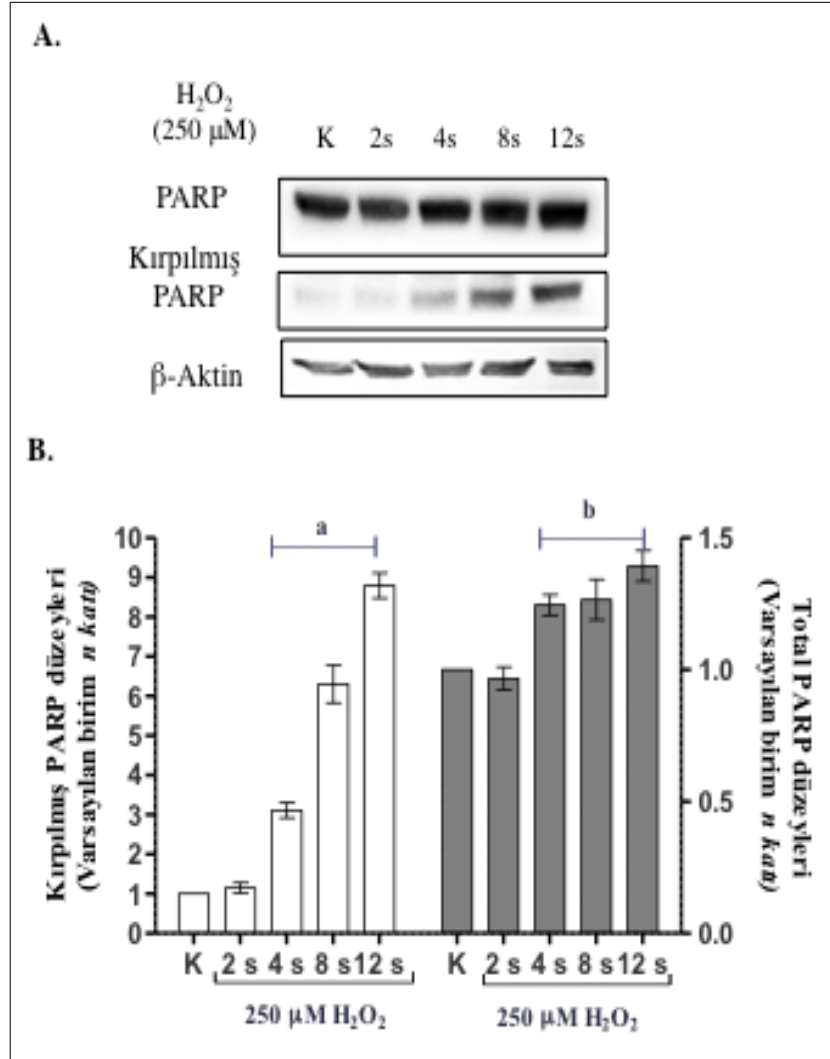
Şekil 19. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS protein düzeylerine ait bulgular. (A) 3-NT ve iNOS proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) PCC ve katalaz protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

Normoksi koşullarında HK-2 hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen OS'in, inkübasyonun 2. saatinden itibaren GRP-78 ve P-eIF2 α düzeylerinde, kontrol hücrelerine göre, anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Aynı koşullarda CHOP düzeyinde bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 20).



Şekil 20. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular. (A) GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) GRP-78 ve P-eIF-2 α protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

Normoksi koşullarında HK-2 hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen OS'in, inkübasyonun 4. saatten itibaren total ve kırılmış PARP düzeyinde, kontrol hücrelerine göre, anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$), (Şekil 21).

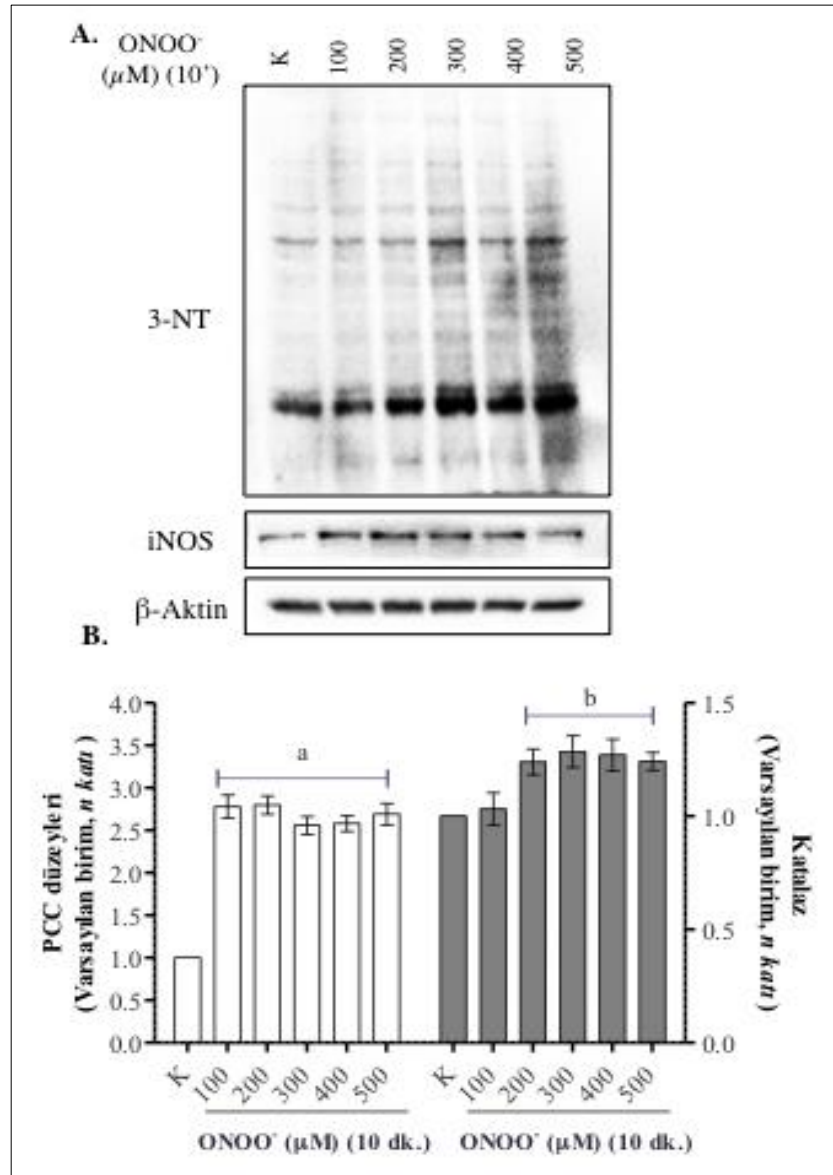


Şekil 21. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular. Kırılmış PARP düzeyine ait grafik, total ve kırılmış PARP düzeylerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan değerlere göre elde edilmiştir. (A) Total PARP ve kırılmış PARP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) Total PARP ve kırılmış PARP protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

3.3.1.2 Normoksi koşullarında oluşturulan NS'in OS ve ER stresi üzerindeki etkisinin incelenmesi

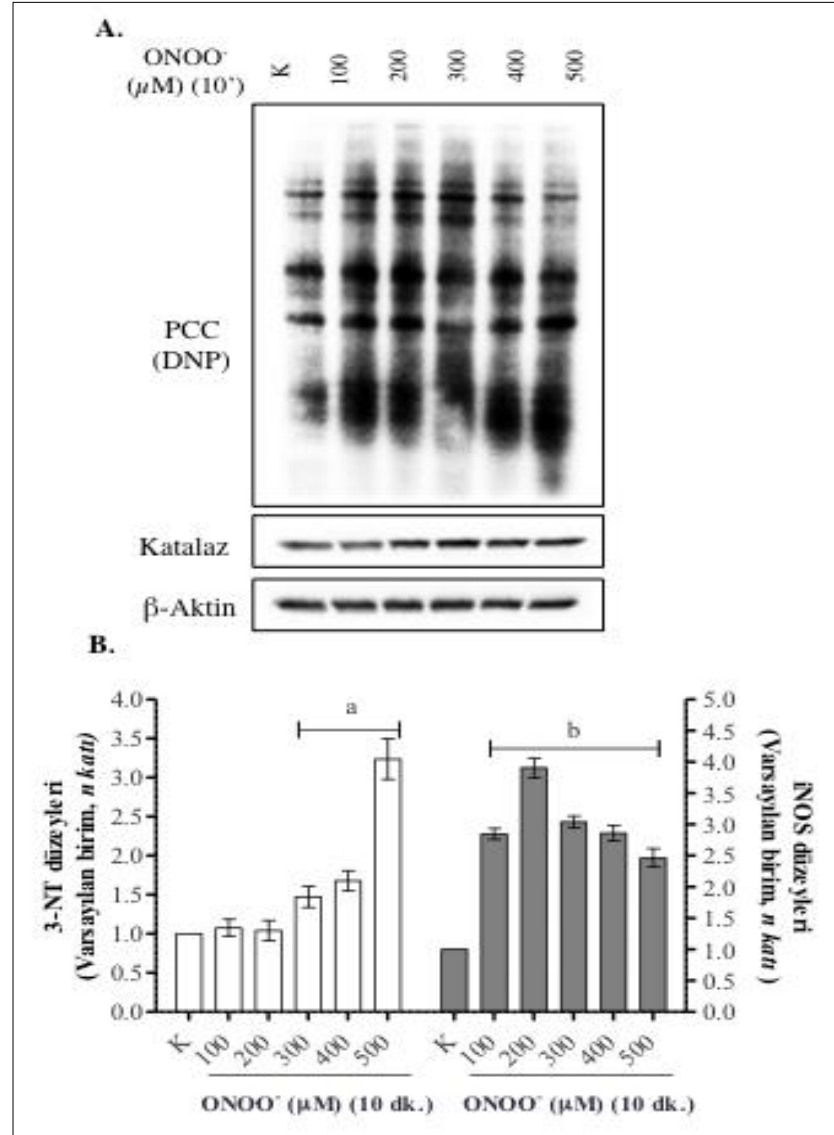
HK-2 hücrelerinde normoksik koşullarda NS oluşturmak üzere hücelere, 100, 200, 300, 400, 500 μM ONOO⁻ uygulanarak, 10 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile stres belirteç düzeyleri tayin edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak, aktin protein düzeyleri belirlendi.

Hücrelerde ONOO⁻ ile gerçekleştirilen NS indüksiyonu, 3-NT ve iNOS düzeyleri üzerinden belirlendi (Şekil 22).



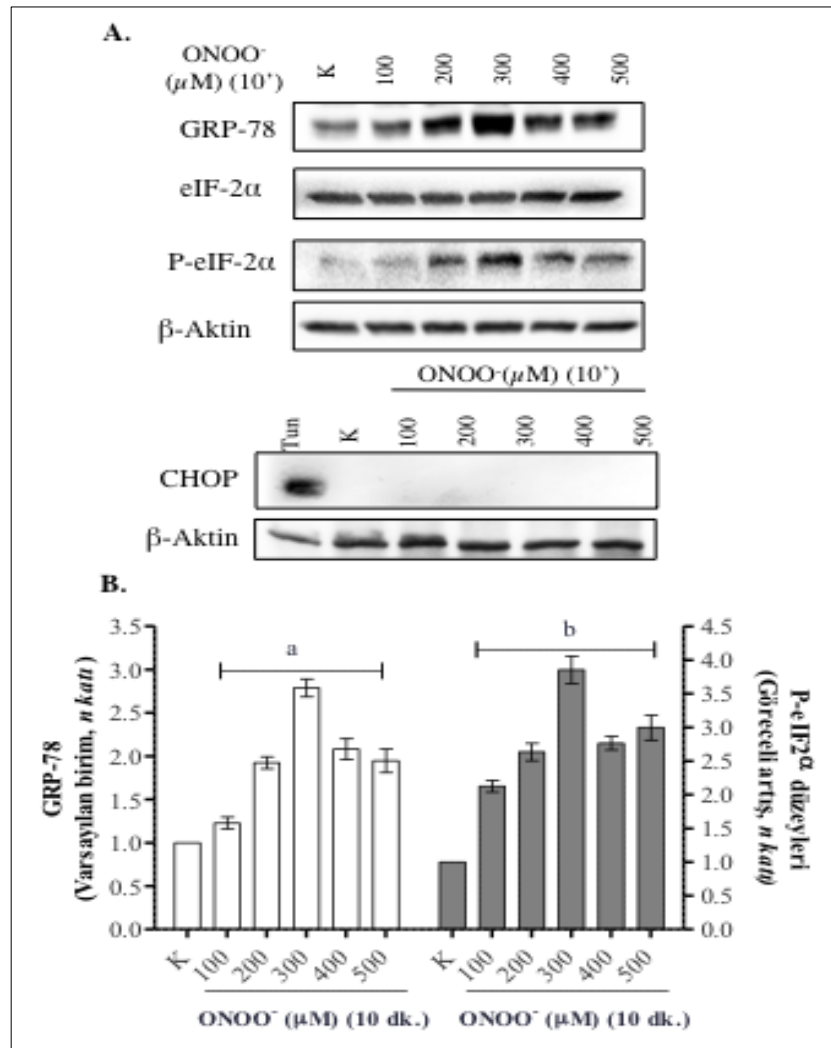
Şekil 22. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular. **(A)** 3-NT ve iNOS proteinlerine ait IB görüntüleri, **(B)** 3-NT ve iNOS protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama ± O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (*a, b*: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

Normoksi koşullarında hücrelerde oluşturulan NS'in, 100 μM ve üzeri ONOO^- konsantrasyonlarında PCC düzeyinde, 200 μM ve üzeri ONOO^- konsantrasyonlarında da katalaz düzeyinde, kontrol hücrelerine göre, anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 23).



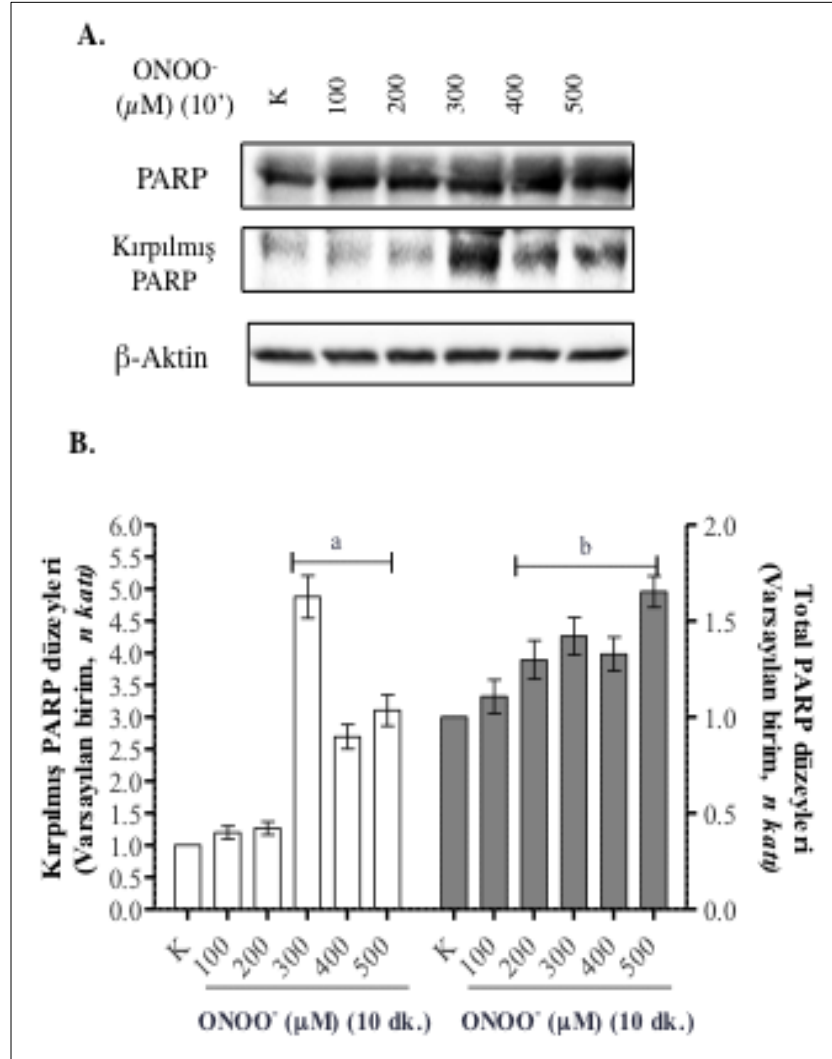
Şekil 23. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular. (A) PCC ve katalaz proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) PCC ve katalaz protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

Normoksi koşullarında hücrelerde ONOO^- 'in $200 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonda, konsantrasyondan bağımsız olarak, GRP-78 ve P-eIF2 α protein miktarlarında, kontrol hücrelerine göre, anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$). ONOO^- uygulaması ile CHOP düzeyinde herhangi bir artış tespit edilmedi (Şekil 24).



Şekil 24. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular. (A) GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) GRP-78 ve P-eIF-2 α protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

Normoksi koşullarında HK-2 hücrelerinde ONOO⁻'in 200 µM ve üzeri konsantrasyonlarda total PARP miktarlarında, 300 µM ve üzeri konsantrasyonlarda kırılmış PARP miktarlarında, kontrol hücrelerine göre, anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 25).

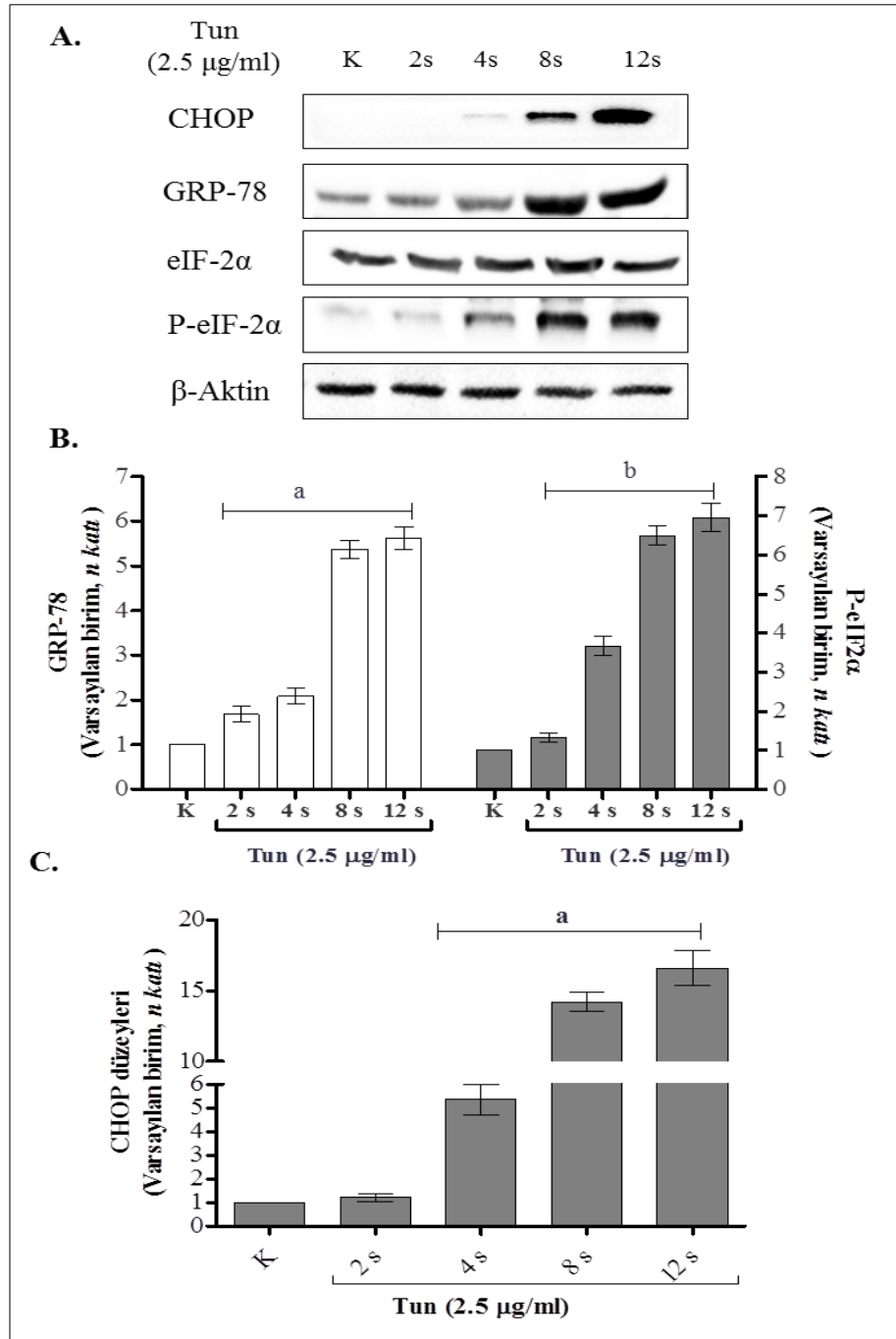


Şekil 25. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen NS indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeyine ait bulgular. Kırılmış PARP düzeyine ait grafik, total ve kırılmış PARP düzeylerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan değerlere göre elde edilmiştir. (A) Total PARP ve kırılmış PARP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) Total PARP ve kırılmış PARP protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

3.3.1.3 Normoksi koşullarında oluşturulan ER stresi'nin OS ve NS üzerindeki etkisinin incelenmesi

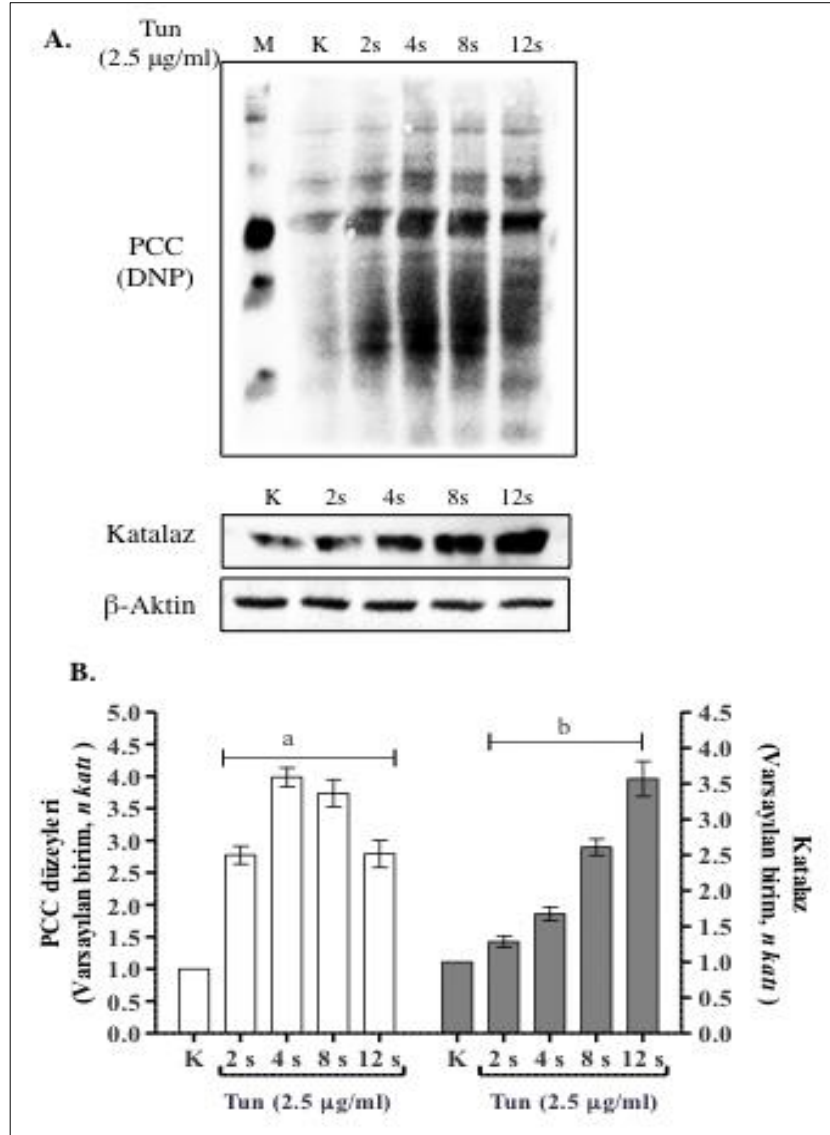
HK-2 hücreleri 2.5 µg/ml tunikamisin ile 2, 4, 8 ve 12 saat süre ile inkübe edilerek ER stresi indüksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süreleri sonunda toplanan hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile stres belirteç düzeyleri tayin edildi. Yükleme kontrolü olarak anti-β-aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

HK-2 hücrelerinde, tunikamisin uygulaması ile gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu CHOP, GRP-78 ve P-eIF2α protein düzeyleri üzerinden değerlendirildi (Şekil 26).



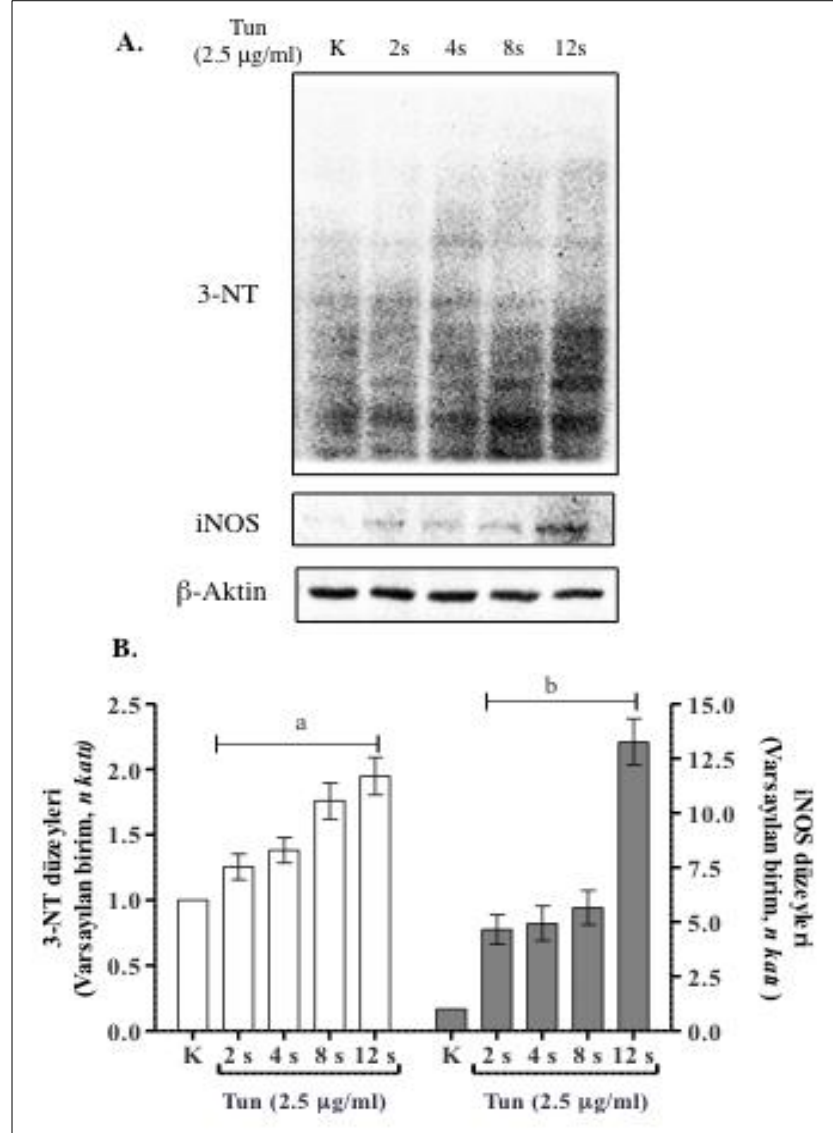
Şekil 26. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası CHOP, GRP-78, eIF-2α ve P-eIF-2α protein düzeylerine ait bulgular. (A) CHOP, GRP-78, eIF-2α ve P-eIF-2α proteinlerine ait IB görüntüleri, (B), (C) CHOP, GRP-78 ve P-eIF-2α protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre *n* katı değişim (ortalama ± O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (*a*, *b*, *c*: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında tunikamisin ile indüklenen ER stresinin 2. saatten itibaren PCC ve katalaz düzeylerinde, kontrol grubuna göre, anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 27).



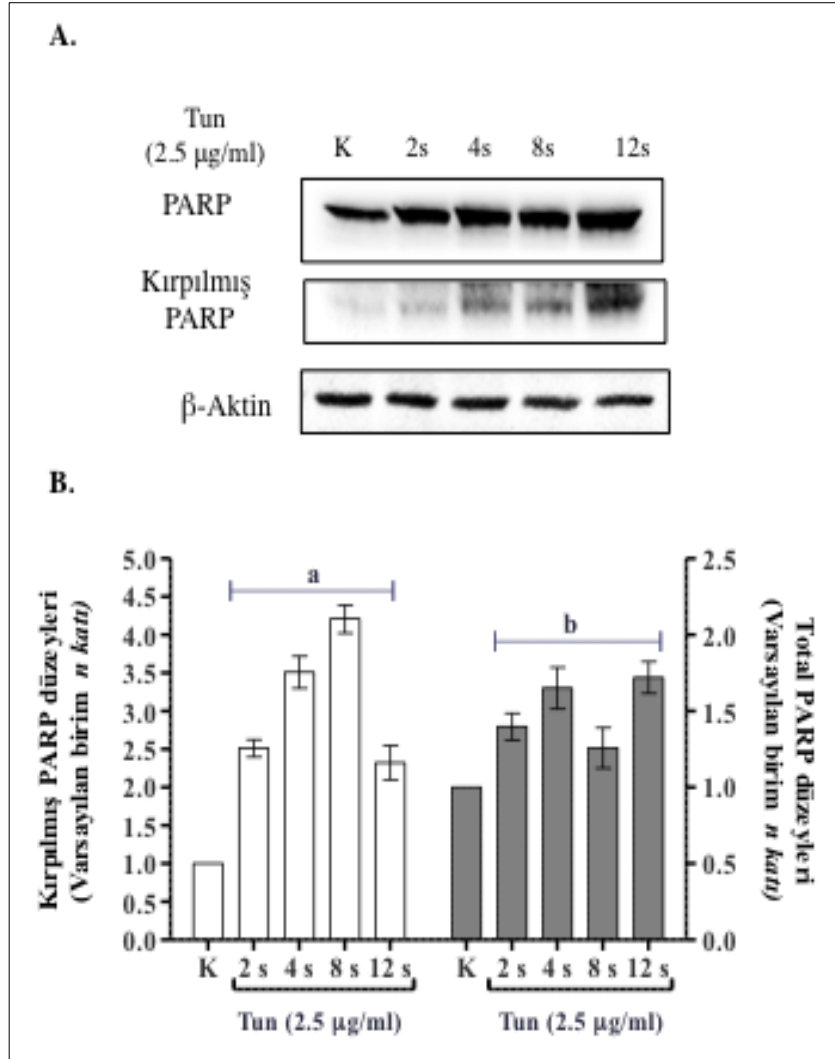
Şekil 27. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular. (A) PCC ve katalaz proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) PCC ve katalaz protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında tunikamisin ile indüklenen ER stresinin, 2. saatten itibaren 3-NT ve iNOS düzeylerinde, kontrol grubuna göre, anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 28).



Şekil 28. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular. (A) 3-NT ve iNOS proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) 3-NT ve iNOS protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a , b : kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında tunikamisin uygulamasının, 2. saatten itibaren kırılmış PARP ve total PARP düzeylerinde, kontrole göre, anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 29).



Şekil 29. HK-2 hücrelerinde normoksi koşullarında gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular. Kırılmış PARP düzeyine ait grafik, total ve kırılmış PARP düzeylerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan değerlere göre elde edilmiştir. (A) Total PARP ve kırılmış PARP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) Total PARP ve kırılmış PARP protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

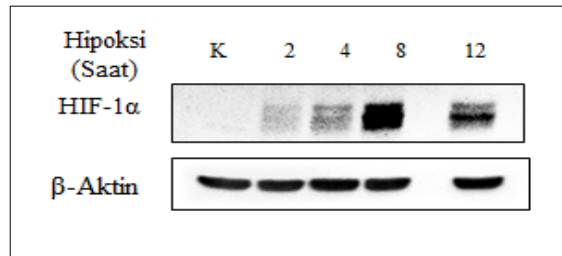
3.3.2 *Hipoksi-reperfüzyonun OS, NS ve ER stresi üzerindeki etkisinin incelenmesi*

HK-2 hücrelerinde hipoksi ve hipoksi-reperfüzyonun OS, NS ve ER stresi üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla, HK-2 hücreleri deneyden bir gün önce 1×10^6 'şar hücre olarak, 60 mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün hücrelere hipoksi veya hipoksi-reperfüzyon uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda toplanan hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile stres belirteç düzeyleri tayin edildi.

3.3.2.1 **HK-2 hücrelerinde hipoksinin OS, NS ve ER stresi üzerindeki etkisinin incelenmesi**

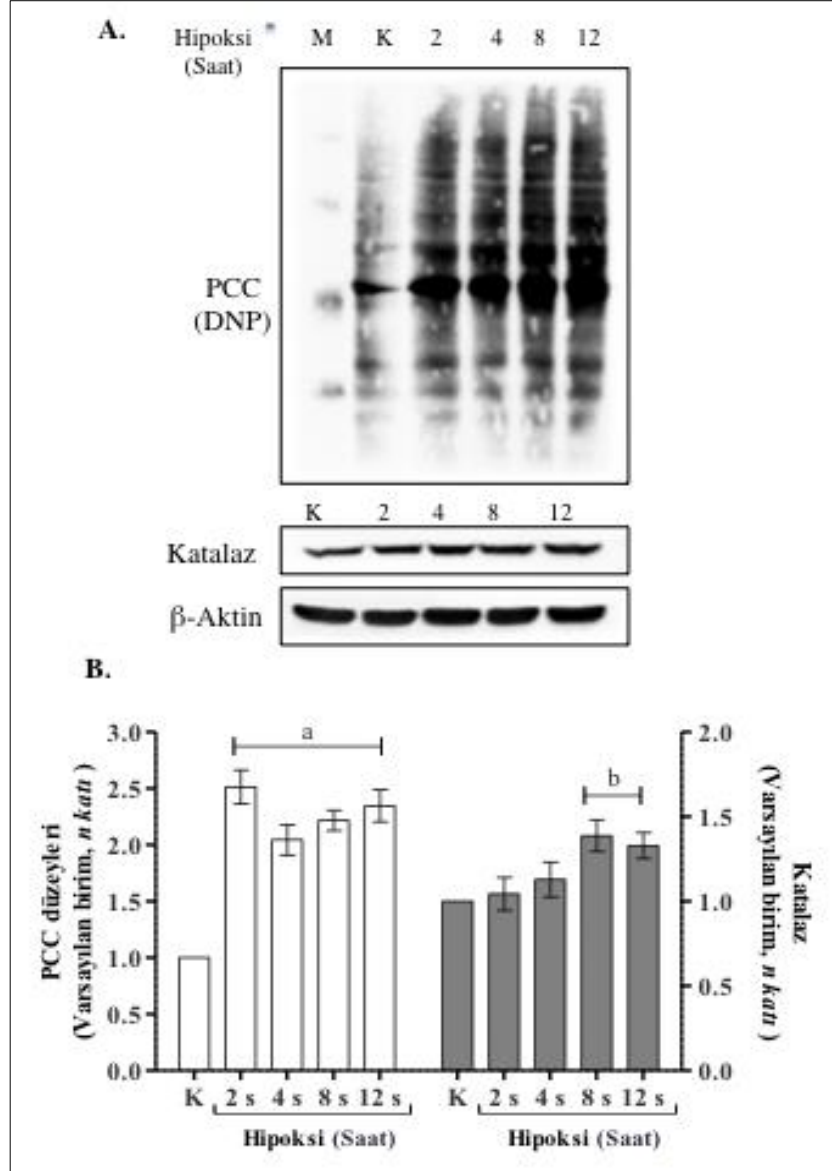
Deney günü HK-2 hücreleri hipoksi odacığına alındı ve 2, 4, 8 ve 12 saat süre ile hipoksi indüksiyonu yapıldı. İndüksiyon süreleri sonunda toplanan hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile stres belirteç düzeyleri tayin edildi.

HK-2 hücrelerinde hipoksik koşulların sağlandığı, HIF-1 α protein artışı ile kontrol edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 30).



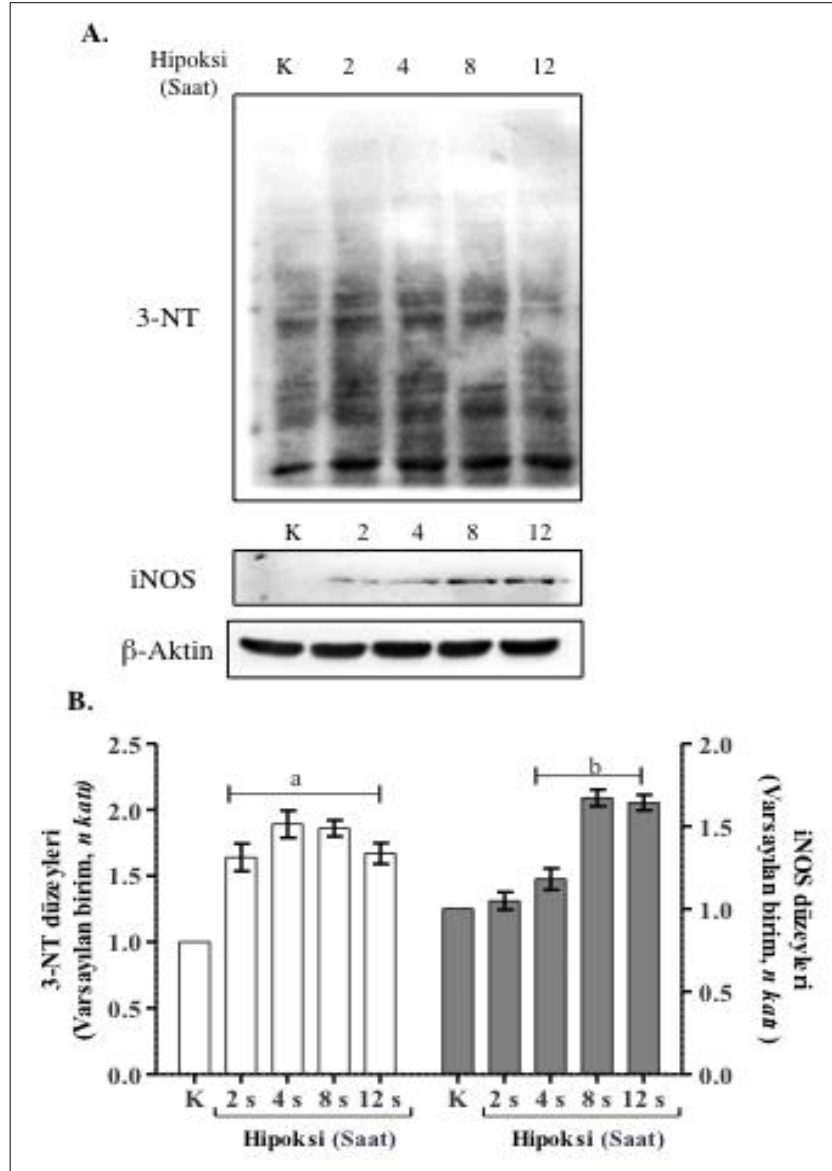
Şekil 30. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrasında HIF-1 α düzeylerine ait IB görüntüsü.

HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun, 2. saatten itibaren PCC, 8. saatten itibaren ise katalaz düzeylerinde, normoksik (kontrol) hücrelere göre, anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 31).



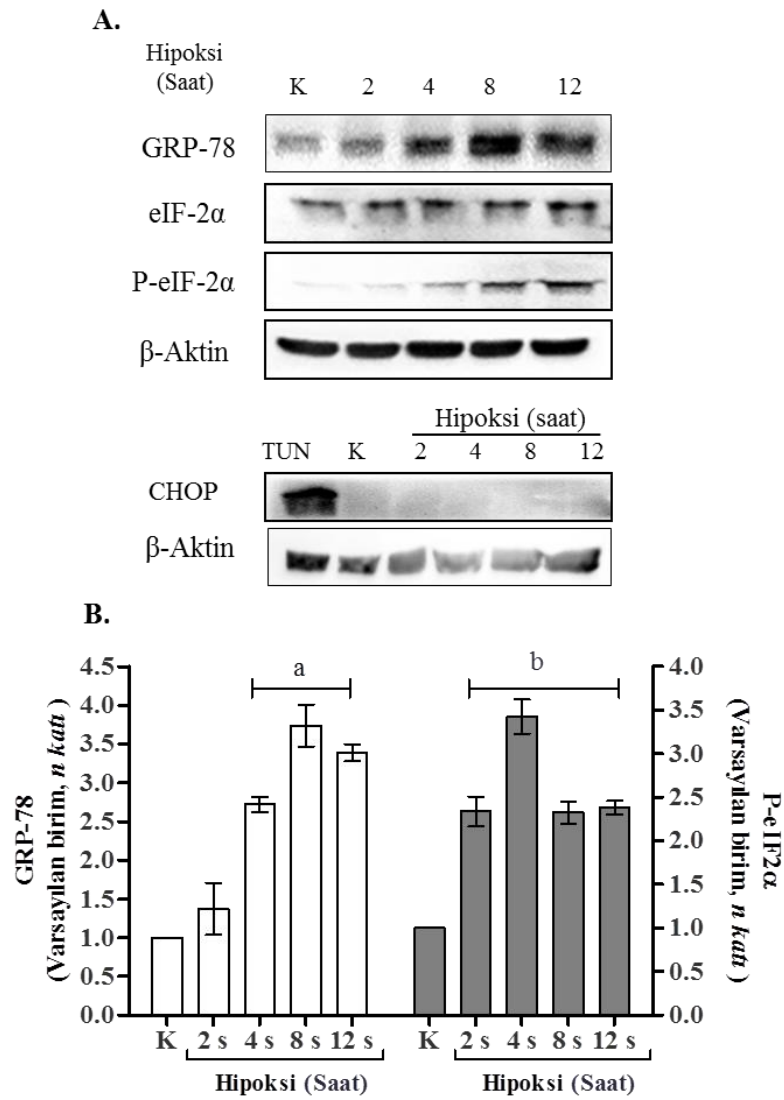
Şekil 31. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular. (A) PCC ve katalaz proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) PCC ve katalaz protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun, 2. saatten itibaren 3-NT, 4. saatten itibaren ise iNOS düzeyinde, normoksik (kontrol) hücelere göre, anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 32).



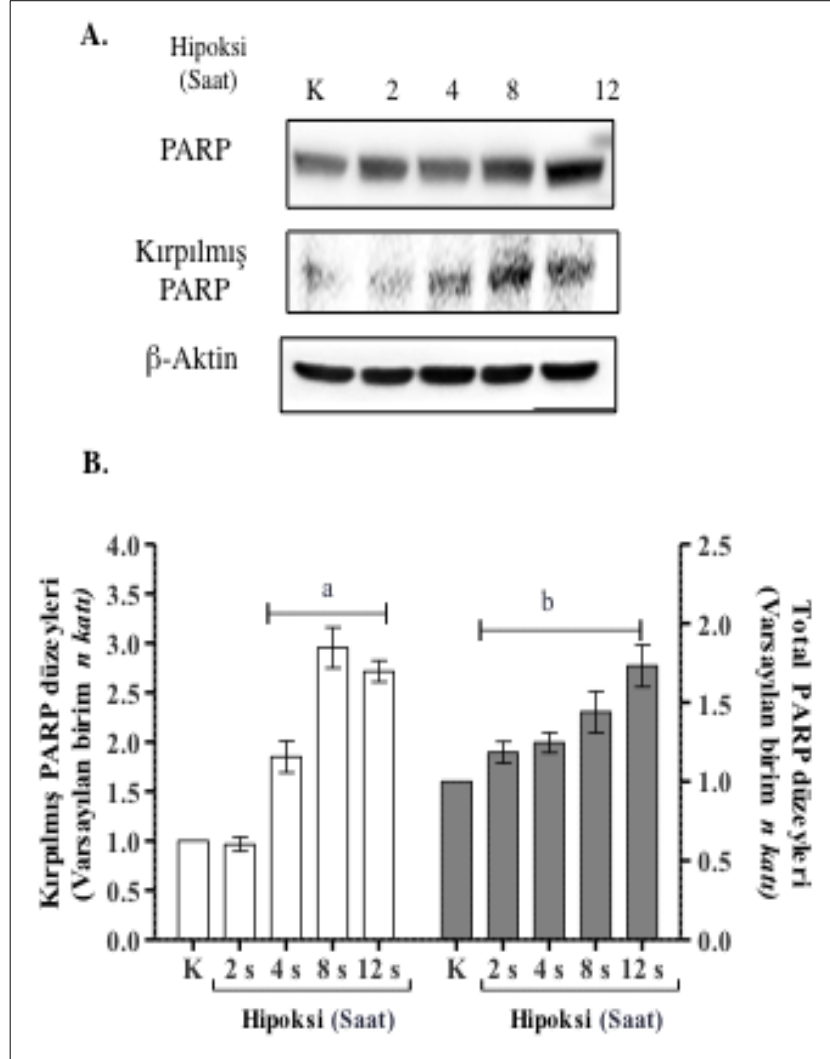
Şekil 32. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular. (A) 3-NT ve iNOS proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) 3-NT ve iNOS protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a , b : kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun, 2. saatten itibaren P-eIF2 α miktarında, 4. saatten itibaren de GRP-78 miktarında, normoksik (kontrol) hücrelere göre, anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 33).



Şekil 33. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular. (A) CHOP, GRP-78, eIF-2 α ve P-eIF-2 α proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) GRP-78 ve P-eIF-2 α protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun, 2. saatten itibaren total PARP düzeyinde, 4. saatinden itibaren kırılmış PARP düzeyinde, normoksik (kontrol) hücrelere göre, anlamlı düzeyde artışa yol açtığı belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 34).

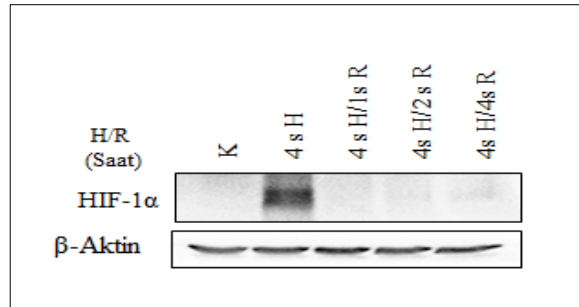


Şekil 34. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonu sonrası total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular. Kırılmış PARP düzeyine ait grafik, total ve kırılmış PARP düzeylerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan değerlere göre elde edilmiştir. (A) Total PARP ve kırılmış PARP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) Total PARP ve kırılmış PARP protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre *n* katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, b: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

3.3.2.2 HK-2 hücrelerinde reperfüzyonun OS, NS ve ER stresi üzerindeki etkisinin incelenmesi

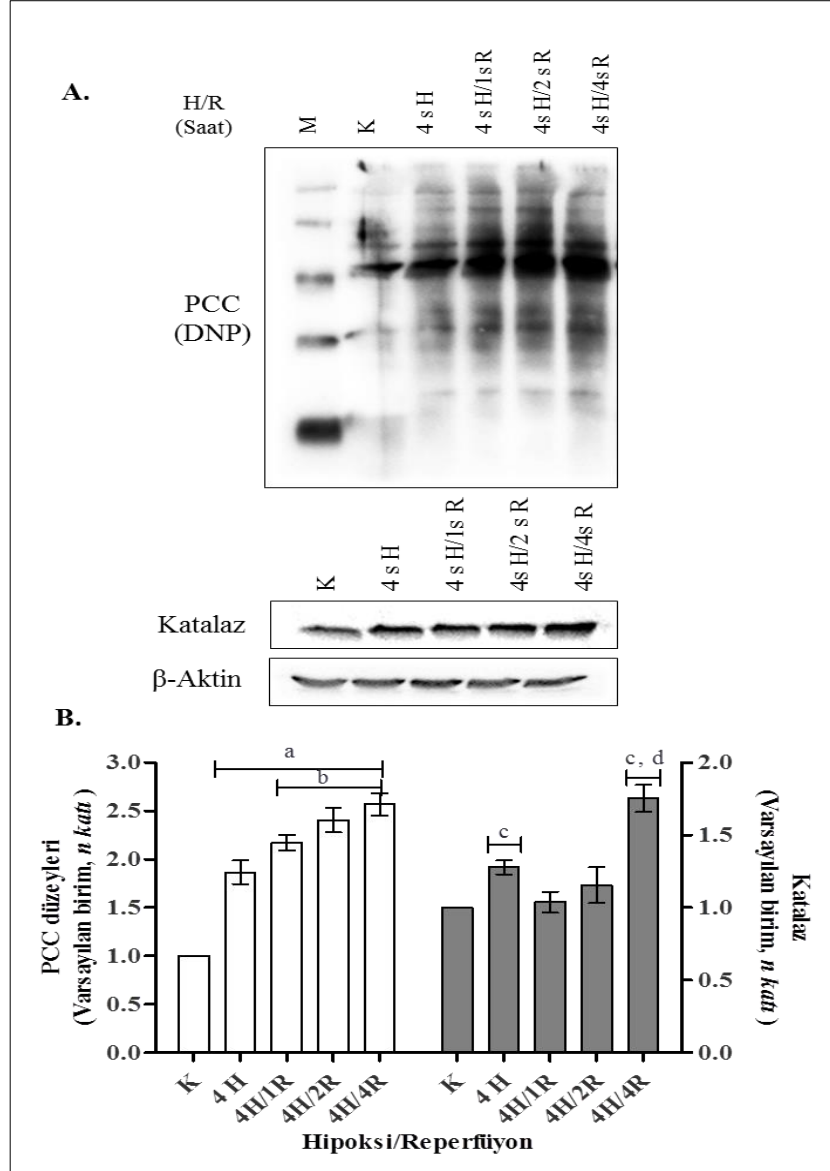
Bölüm 3.3.2’de belirtilen şekilde hazırlanan HK-2 hücreleri, deney günü hipoksi odacığına alınarak, 4 saat süre ile hipoksi indüksiyonu gerçekleştirildi. Hipoksik inkübasyonun ardından hücreler konvansiyonel CO₂ inkübatörüne alındı ve 1, 2, 4 saat süre ile reperfüze edildiler. İnkübasyon süresi sonunda toplanan hücrelerden protein izolasyonu yapıldı ve IB yöntemi ile stres belirteç düzeyleri tayin edildi.

Gerçekleştirilen hipoksi ve reperfüzyon, HIF-1 α protein düzeyi ile kontrol edildi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin protein düzeyleri belirlendi (Şekil 35).



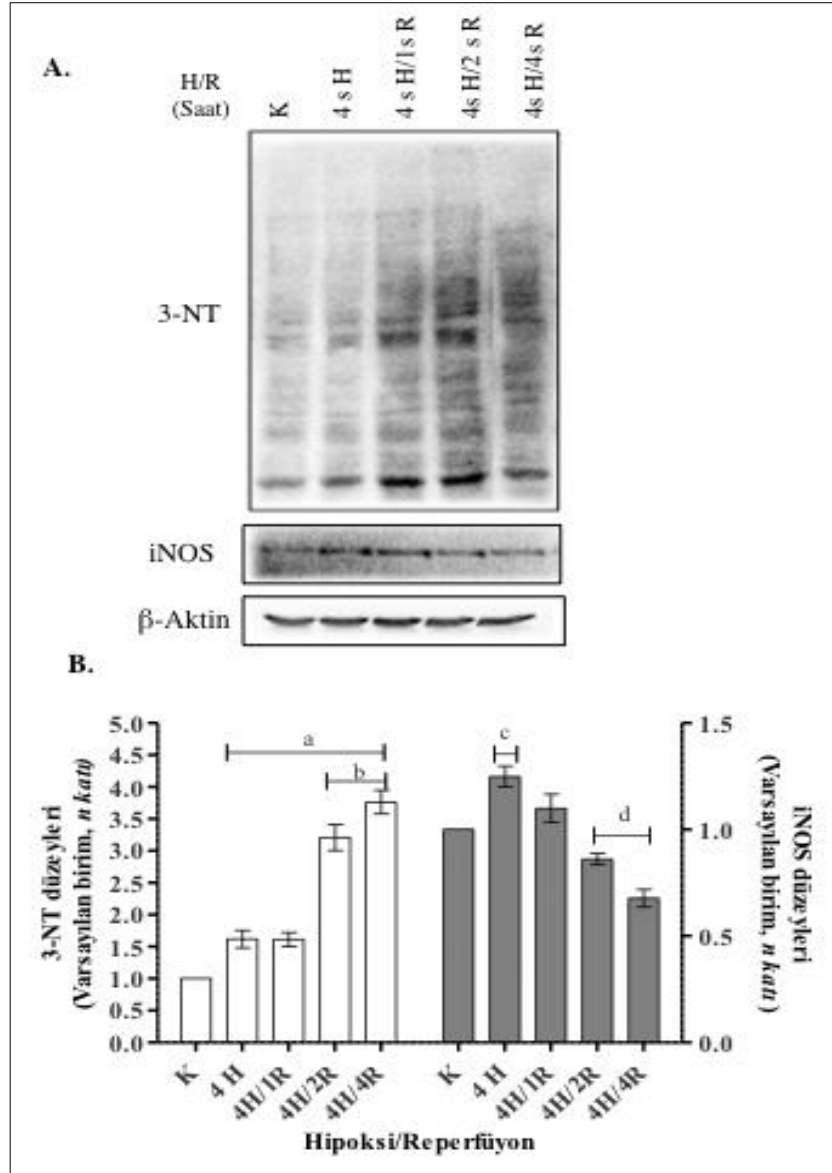
Şekil 35. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında HIF-1 α düzeyine ait IB görüntüsü.

Hipoksi indüksiyonu sonrasında reperfüze edilen hücrelerde, PCC ve katalaz düzeylerinin, normoksik (kontrol) ve hipoksik hücelere göre, anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 36).



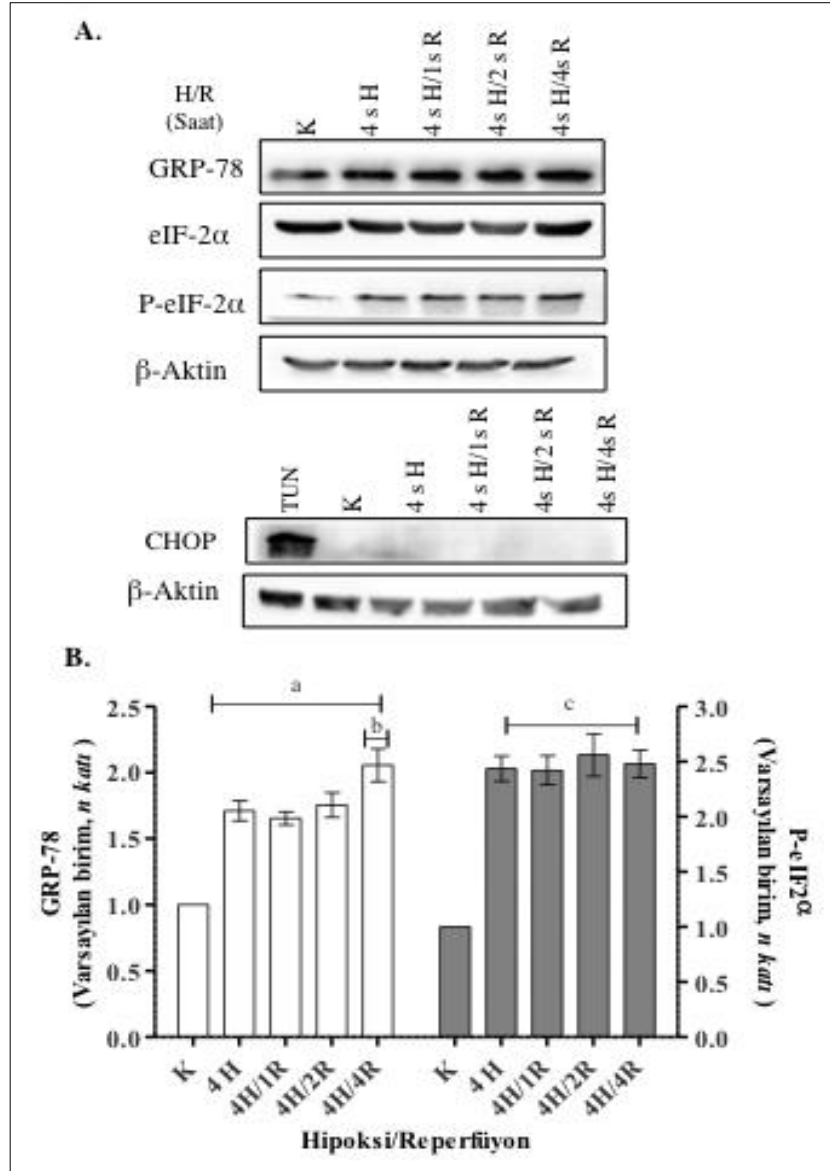
Şekil 36. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında PCC ve katalaz düzeylerine ait bulgular. (A) PCC ve katalaz proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) PCC ve katalaz protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, c: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$). b, d: hipoksik hücelere göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$).

Hipoksi indüksiyonu sonrasında reperfüze edilen hücrelerde, 3-NT düzeyinin normoksik (kontrol) ve hipoksik hücelere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu; iNOS düzeyinin ise daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 37).



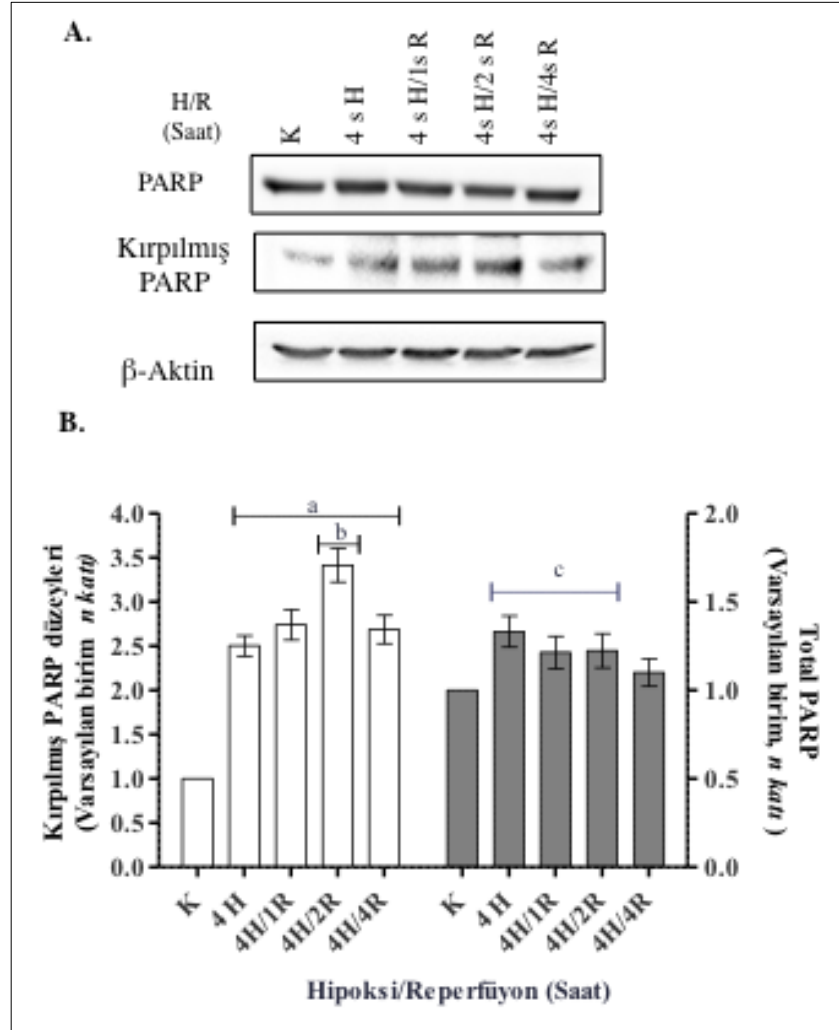
Şekil 37. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında 3-NT ve iNOS düzeylerine ait bulgular. (A) 3-NT ve iNOS proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) 3-NT ve iNOS protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, c: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek, $p < 0.05$. b: hipoksik hücelere göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$). d: kontrol ve hipoksik hücelere göre anlamlı düzeyde düşük ($p < 0.05$)).

Hipoksi indüksiyonu sonrasında reperfüze edilen HK-2 hücrelerinde, GRP-78 düzeyi normoksik ve hipoksik hücelere göre anlamlı olarak daha yüksek ($p < 0.05$), P-eIF2 α düzeyi ise hipoksik hücelere benzer olarak tespit edildi ($p > 0.05$) (Şekil 38).



Şekil 38. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP protein düzeylerine ait bulgular. (A) CHOP, GRP-78, eIF-2 α , P-eIF-2 α ve CHOP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) GRP-78 ve P-eIF-2 α protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, c: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$). b: hipoksik hücelere göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

Hipoksi indüksiyonu sonrasında reperfüze edilen HK-2 hücrelerinde, kırılmış PARP düzeyinin reperfüzyonun 2. saatinde hipoksik hücelere göre anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Total PARP düzeyi ise hipoksik hücelere benzer olarak belirlendi ($p > 0.05$) (Şekil 39).



Şekil 39. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında total PARP ve kırılmış PARP düzeylerine ait bulgular. Kırılmış PARP düzeyine ait grafik, total ve kırılmış PARP düzeylerinin birbirlerine oranlanması ile bulunan değerlere göre elde edilmiştir. (A) Total PARP ve kırılmış PARP proteinlerine ait IB görüntüleri, (B) Total PARP ve kırılmış PARP protein düzeylerine ait grafik. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (a, c: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$), b: hipoksik hücelere göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4 HK-2 Hücrelerinde MANF Proteininin OS, NS, ER Stresi ve İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Etkisinin İncelenmesi

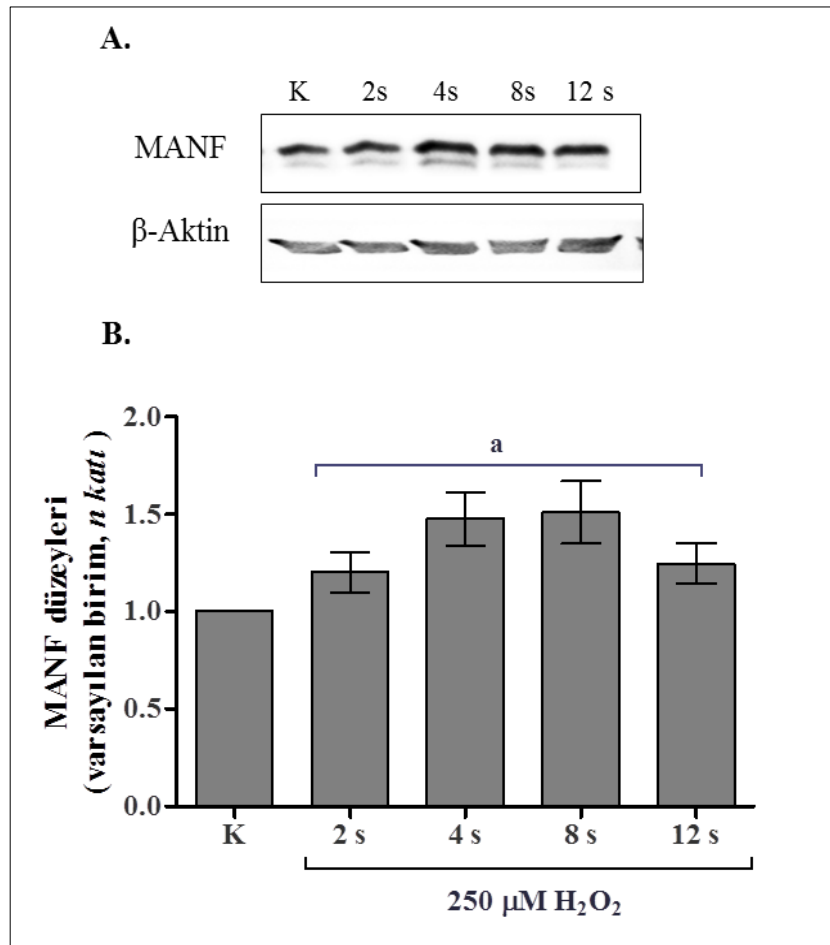
3.4.1 *HK-2 hücrelerinde stres artışlarının hücre içi MANF düzeyi üzerindeki etkisi*

HK-2 hücrelerinde hücre içi streslerin, endojen MANF proteini üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda HK-2 hücrelerinde, Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde, OS, NS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon gerçekleştirildi. Her bir stres türünün indüksiyonundan sonra, hücre içi MANF proteini düzeyleri anti-MANF antikoruna kullanılarak IB tekniği ile incelendi. Her deneyde yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoruna kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

3.4.1.1 OS artışının hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi

HK-2 hücrelerinde, bölüm 3.3.1.1’de anlatıldığı şekilde, OS indüksiyonu gerçekleştirildikten sonra endojen MANF düzeyleri belirlendi.

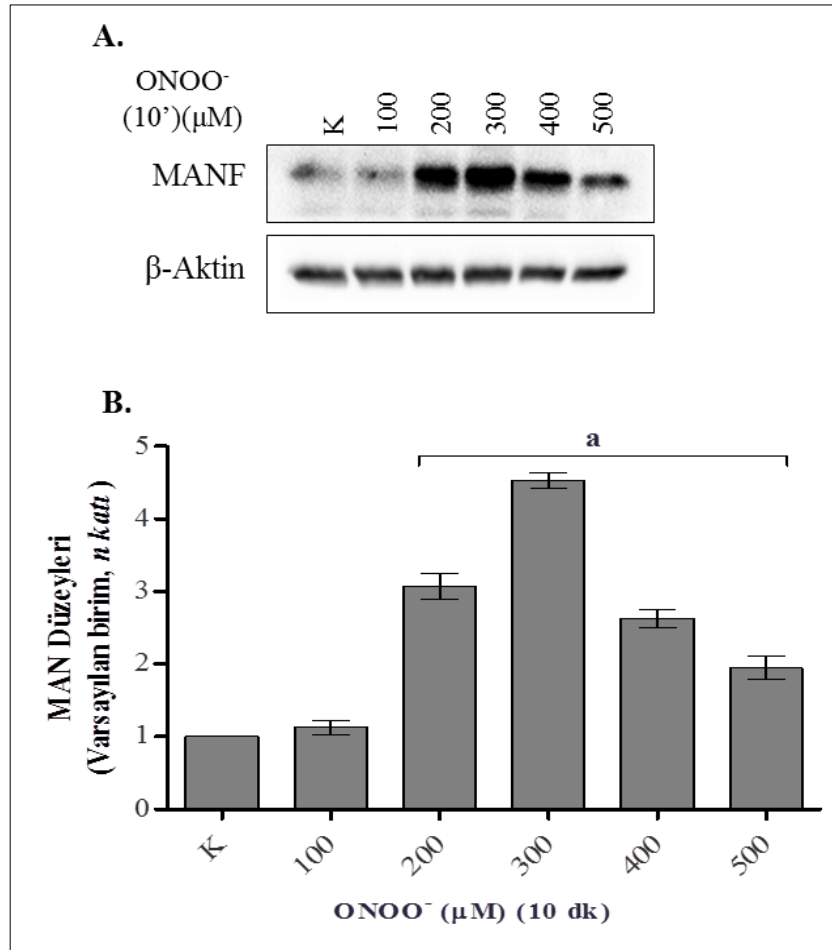
OS indüksiyonunun, 2. saatten itibaren, hücre içi MANF protein miktarında kontrole göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 40) .



Şekil 40. HK-2 hücrelerinde OS indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi. (A) H₂O₂ indüksiyonu sonrasında MANF düzeyine ait IB görüntüsü. (B) MANF düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (a: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.1.2 NS artışının hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi

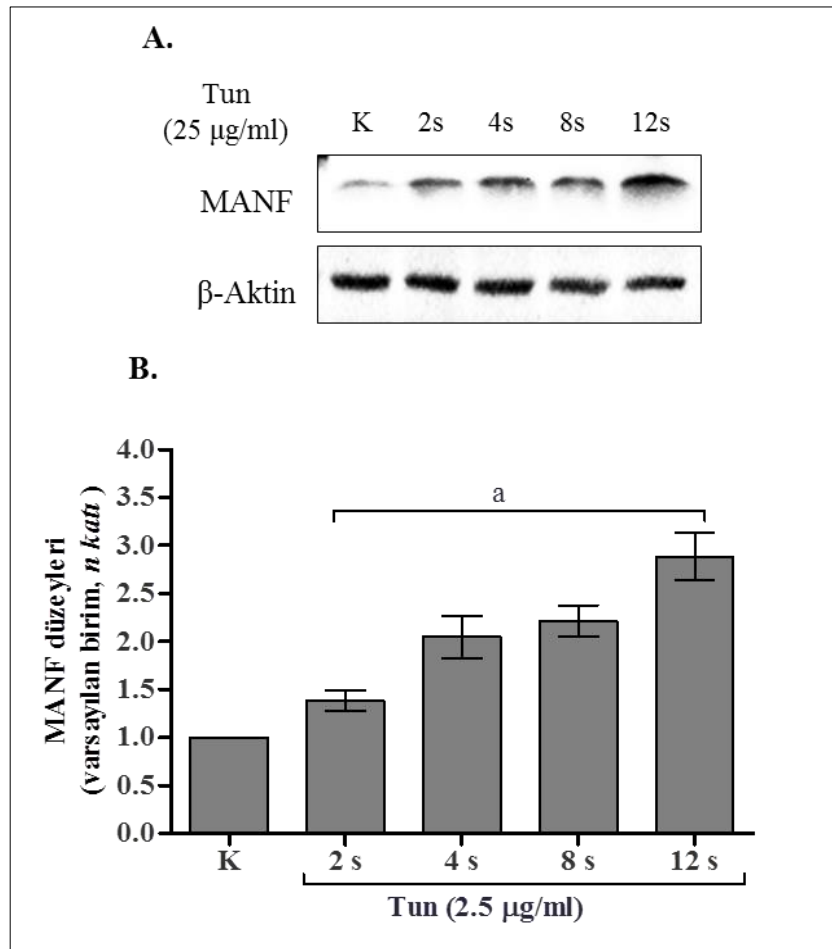
HK-2 hücrelerinde bölüm 3.3.1.2’de anlatıldığı şekilde NS indüksiyonu tekrar edildi ve ardından endojen MANF düzeyleri belirlendi. HK-2 hücrelerinde, 200 μM ve üzeri ONOO^- konsantrasyonunun hücre içi MANF protein miktarında kontrole göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 41).



Şekil 41. HK-2 hücrelerinde NS indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi. (A) ONOO^- indüksiyonu sonrasında MANF düzeyine ait IB görüntüsü, (B) MANF düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (a: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.1.3 ER stresi artışının hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi

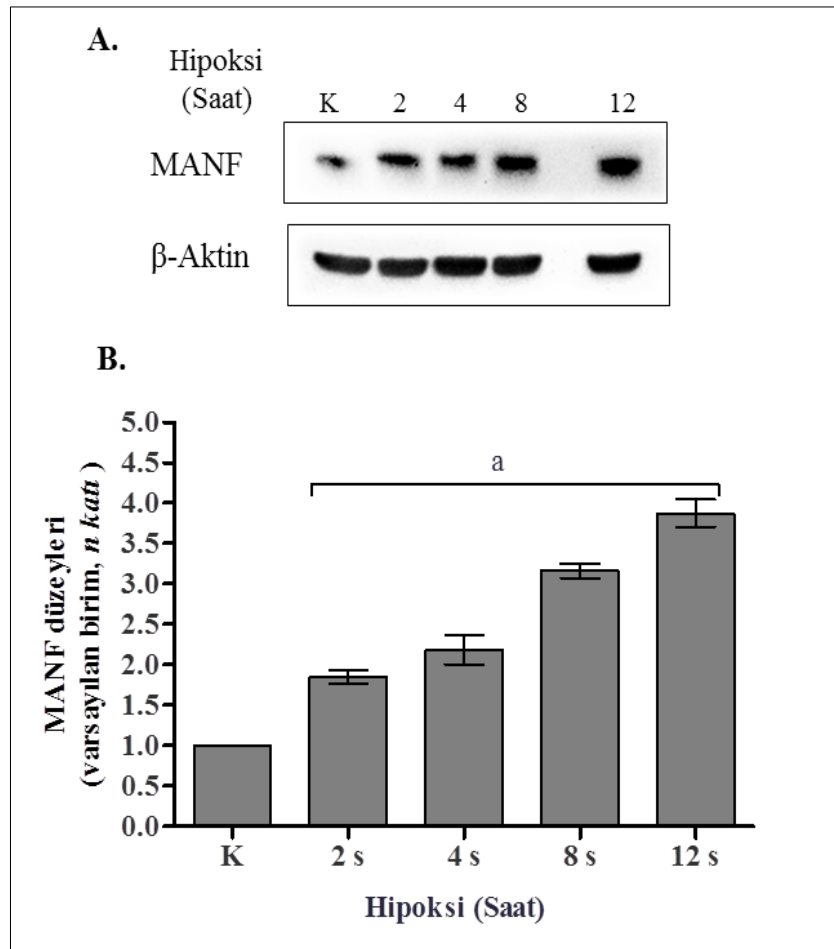
HK-2 hücrelerinde bölüm 3.3.1.3'te anlatıldığı şekilde, ER stresi indüksiyonu gerçekleştirildi ve ardından endojen MANF düzeyleri belirlendi. HK-2 hücrelerinde ER stresi indüksiyonunun, 2. saatten itibaren hücre içi MANF protein miktarında kontrole göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 42).



Şekil 42. HK-2 hücrelerinde ER stresi indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi. (A) tunikamisın indüksiyonu sonrasında MANF düzeyine ait IB görüntüsü. (B) MANF düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (a : kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.1.4 Hipoksinin hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi

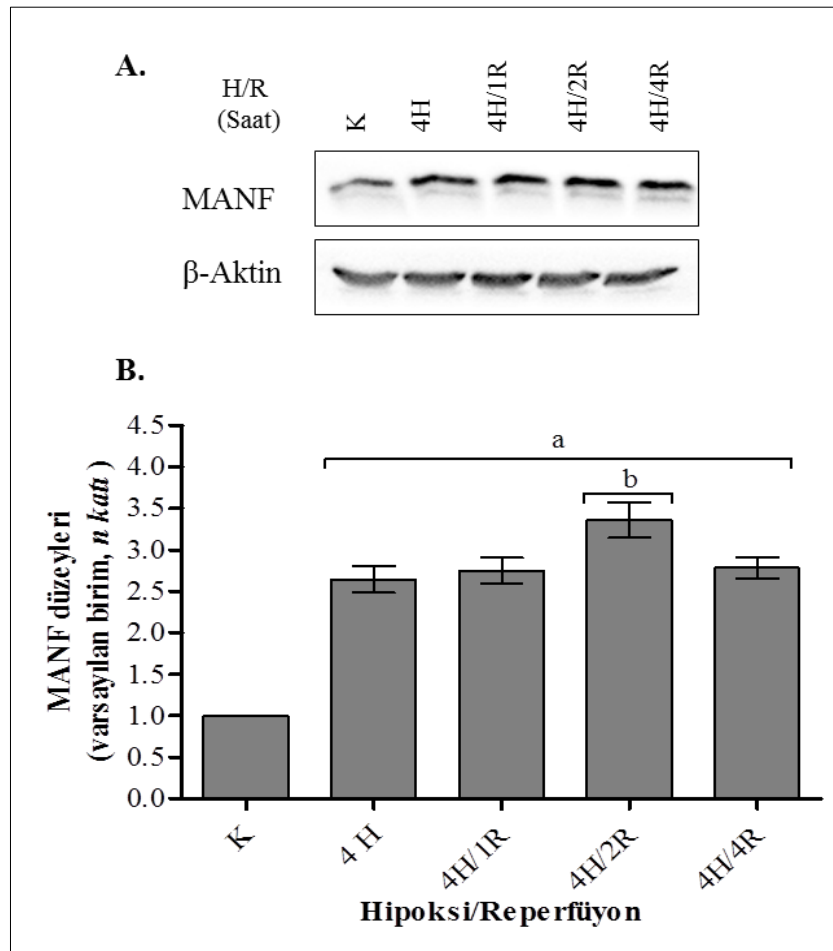
HK-2 hücrelerinde bölüm 3.3.2.1’de anlatıldığı şekilde hipoksi indüksiyonu gerçekleştirildi ve endojen MANF düzeyleri belirlendi. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun, 2. saatten itibaren, hücre içi MANF protein miktarında kontrole göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 43).



Şekil 43. HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerine etkisi. (A) hipoksi indüksiyonu sonrasında MANF düzeyine ait IB görüntüsü. (B) MANF düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (a : kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.1.5 Hipoksi-reperfüzyon'un hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi

HK-2 hücrelerinde bölüm 3.3.2.2'de anlatıldığı şekilde hipoksi-reperfüzyon gerçekleştirildikten sonra, endojen MANF düzeyleri belirlendi. Hipoksi-reperfüzyon (H/R) gerçekleştirilen HK-2 hücrelerinde, hücre içi MANF protein miktarının kontrol ve sadece hipoksi indüksiyonu gerçekleştirilmiş hücelere göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 44).



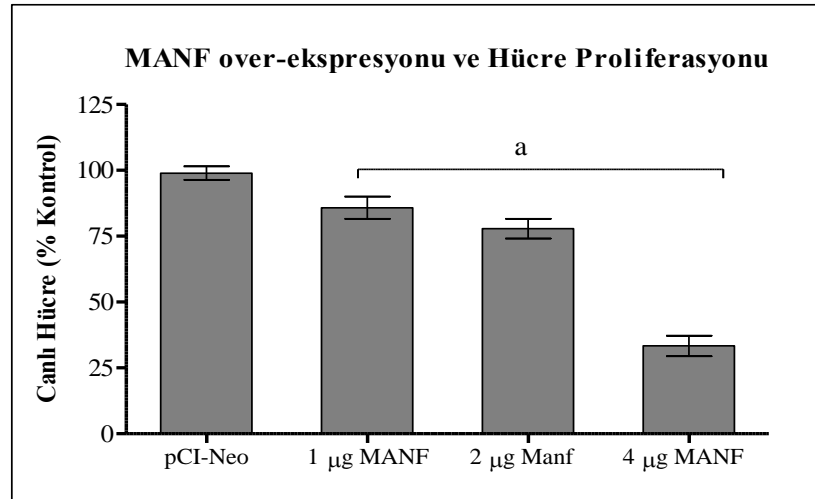
Şekil 44. HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyonun hücre içi endojen MANF düzeyi üzerindeki etkisi. (A) Hipoksi-reperfüzyon koşullarında MANF düzeyine ait IB görüntüsü. (B) MANF düzeylerine ait grafik. Sonuçlar, aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (a: kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.2 *MANF* proteininin *HK-2* hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi

3.4.2.1 *MANF* proteini over-ekspresyonunun *HK-2* hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi

HK-2 hücreleri deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün 1, 2 ve 4 μg pCIneo *MANF* transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılacak hücelere ise boş pCIneo plazmidi transfekte edildi. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra, hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına 7500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 48 saat süreyle inkübe edildiler. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin proliferasyon hızı spektrofotometrik olarak, WST-1 ajanı ile değerlendirildi. Kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerine göre düzeltme yapıldıktan sonra, canlı hücre sayısı değişimi kontrolün yüzdesi (% kontrol) olarak ifade edildi.

HK-2 hücrelerinde *MANF* ekspresyon düzeyindeki artışın, hücre proliferasyon hızında, kontrole göre anlamlı düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi ($p < 0.01$) (Şekil 45).

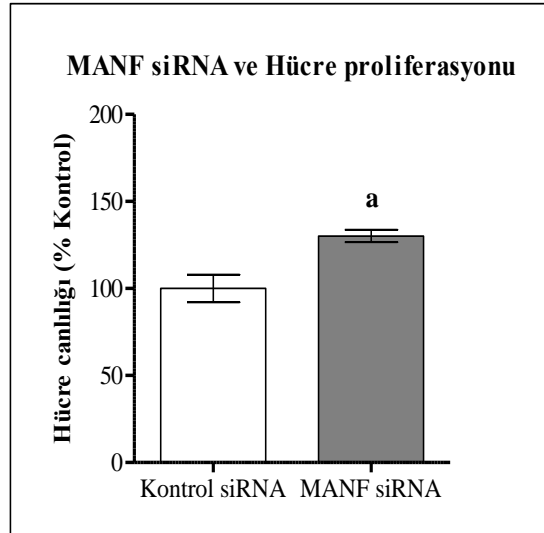


Şekil 45. MANF proteini over-ekspresyonunun HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi. Sonuçlar, kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (n=5) (a: Kontrole göre anlamlı derecede düşük ($p < 0.01$))

3.4.2.2 MANF gen ifadesinin susturulmasının HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi

HK-2 hücreleri deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu petri kaplarına 2×10^5 sayıda ekildi. Ertesi gün hücrelere, 40 nM konsantrasyonda kontrol siRNA veya MANF siRNA oligonükleotidi transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler toplandı ve 7500 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 48 saat sonunda hücrelerin proliferasyon hızı spektrofotometrik olarak, WST-1 ajanı ile değerlendirildi. Kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerine göre düzeltme yapıldıktan sonra, canlı hücre sayısı değişimi kontrolün yüzdesi (% kontrol) olarak ifade edildi.

HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının, hücre proliferasyon hızında, kontrole göre anlamlı düzeyde artışa neden olduğu belirlendi ($p < 0.01$) (Şekil 46).



Şekil 46. MANF gen ifadesinin susturulmasının HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerindeki etkisi. (n=5). Sonuçlar, kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (n=5)(a: Kontrole göre anlamlı derece yüksek ($p < 0.01$)).

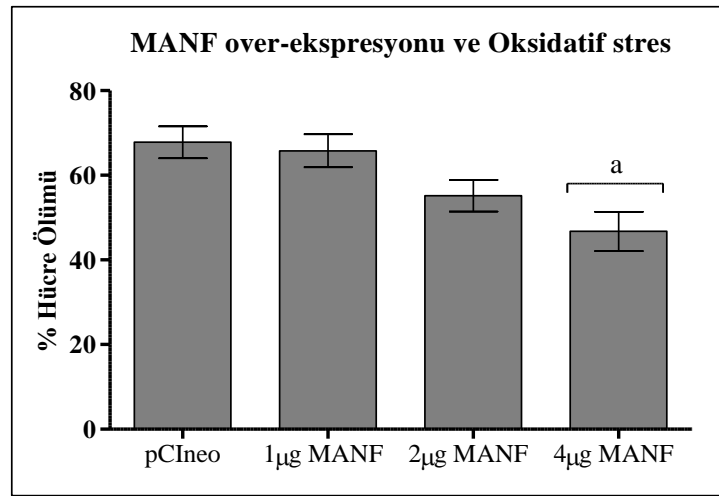
3.4.3 *MANF proteininin HK-2 hücrelerindeki potansiyel sitoprotektif etkisinin hücre canlılık deneyleri ile incelenmesi*

MANF ekspresyonunun, OS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşulları altında, HK-2 hücrelerindeki olası koruyucu etkisini araştırmak üzere, HK-2 hücrelerine bölüm 3.4.2.1 ve 3.4.2.2’de anlatıldığı şekilde, MANF over-ekspresyonu ve MANF siRNA uygulaması yapıldı. Daha sonra hücreler iki set halinde, 7500 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekildi ve bir gece konvansiyonel hücre kültürü şartlarında inkübe edildiler. Ertesi gün, hazırlanan hücre setlerinden birinde stres indüksiyonu gerçekleştirildi, diğer hücre seti ise kontrol olarak kullanıldı. İndüksiyon süresi sonunda her iki settteki hücrelerin canlılığı, spektrofotometrik olarak WST-1 ajanı ile belirlendi. Kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerine göre düzeltme yapıldıktan sonra, elde edilen değerler *% hücre ölümü* olarak ifade edildi.

3.4.3.1 HK-2 hücrelerinde MANF proteininin OS hasarına karşı olası sitoprotektif etkisinin incelenmesi

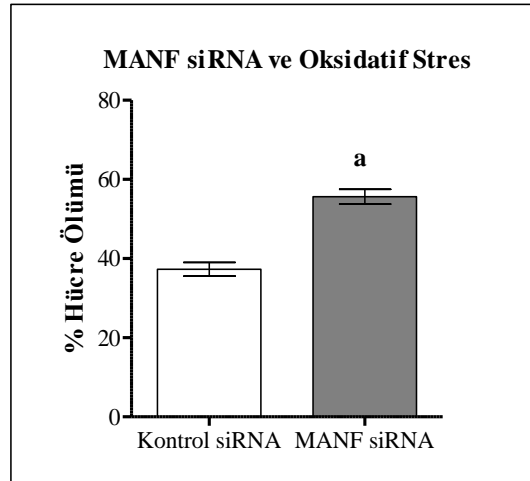
Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan hücelere 250 μM H_2O_2 uygulandı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları spektrofotometrik olarak WST-1 ajanı ile belirlendi.

MANF over-ekspresyonu deneyi: OS indüksiyonu sonrasında, 1 ve 2 μg pCIneo MANF transfekte edilen hücrelerdeki % hücre ölümleri boş pCIneo plazmidini (kontrol) transfekte edilmiş hücelere benzer olarak tespit edilirken, 4 μg 'lık pCIneo MANF transfeksiyonu gerçekleştirilen hücelerde, % hücre ölümü değerinin kontrol hücelere göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0.005$) (Şekil 47).



Şekil 47. Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücelerinin OS'e duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar, kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir ($n = 5$) (a: Kontrole göre anlamlı derece düşük ($p < 0.005$)).

MANF siRNA deneyi: OS indüksiyonunun, MANF gen ifadesi susturulmuş hücelerde, kontrole göre, anlamlı derecede daha fazla hücre ölümüne neden olduğu belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 48).

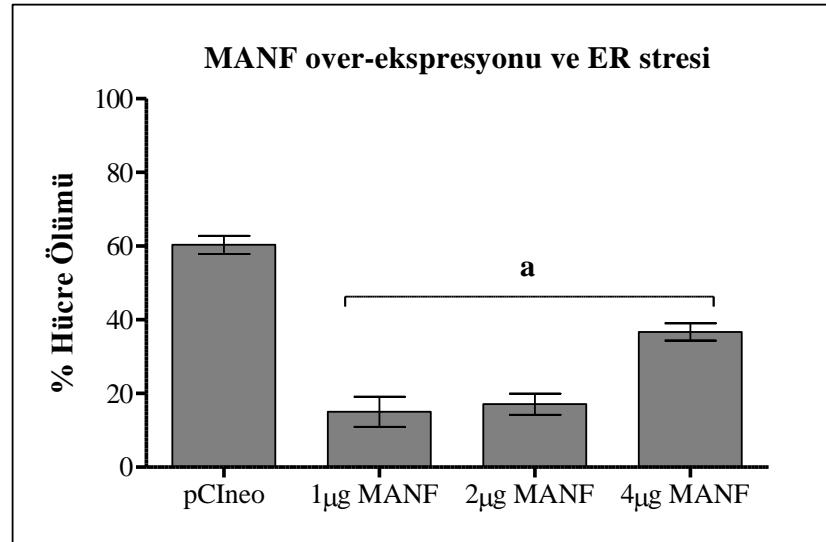


Şekil 48. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin OS'e duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (n=5) (a: kontrol siRNA uygulanan hücelere göre anlamlı derecede yüksek (p< 0.001)).

3.4.3.2 HK-2 hücrelerinde MANF proteininin ER stresi hasarına karşı olası sitoprotektif etkisinin incelenmesi

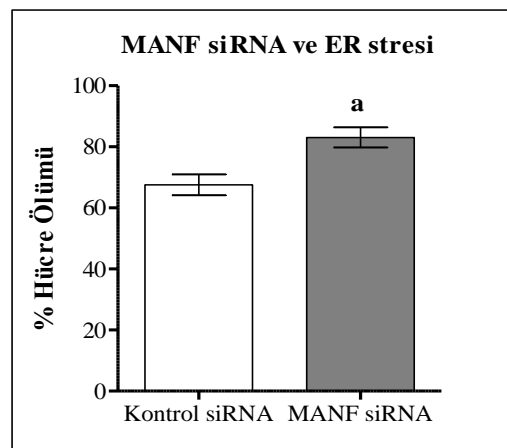
Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan hücelere, 2.5 μ g/ml tunikamisin uygulandı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları spektrofotometrik olarak WST-1 ajanı ile belirlendi.

MANF over-ekspresyonu deneyi: ER stresi indüksiyonu sonrasında, MANF ekspresyonu arttırılmış hücelerdeki % hücre ölümü değerinin, boş pCIneo plazmidini (kontrol) transfekte edilmiş hücelere göre, anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (p< 0,001) (Şekil 49).



Şekil 49. Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin ER stresine duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir. (n= 5)(a: Kontrole göre anlamlı derece düşük (p< 0.001)).

MANF siRNA deneyi: ER stresi indüksiyonunun, MANF gen ifadesi susturulmuş hücrelerde kontrole göre anlamlı derecede daha fazla hücre ölümüne neden olduğu tespit edildi (p< 0.005) (Şekil 50).

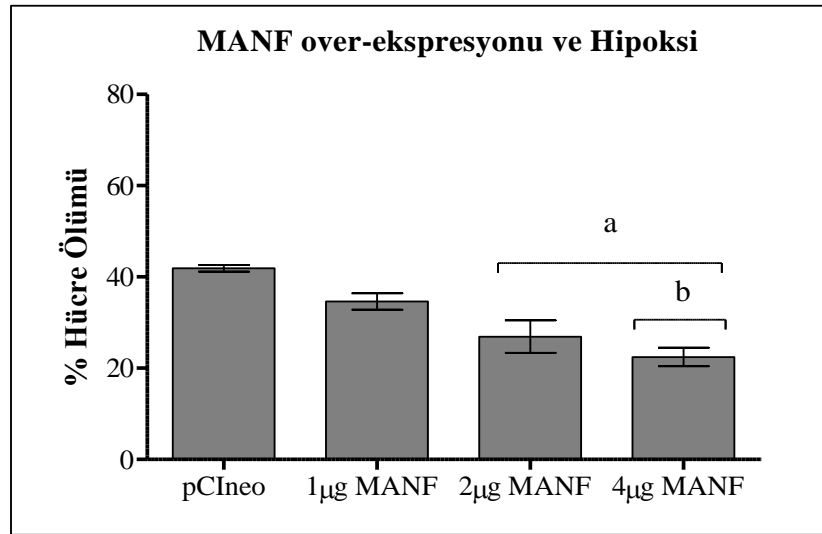


Şekil 50. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin ER stresine duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir, (n= 5)(a: Kontrole göre anlamlı derece anlamlı derecede yüksek (p< 0.005)).

3.4.3.3 HK-2 hücrelerinde MANF proteininin hipoksi ile oluşan hasara karşı olası sitoprotektif etkisinin incelenmesi

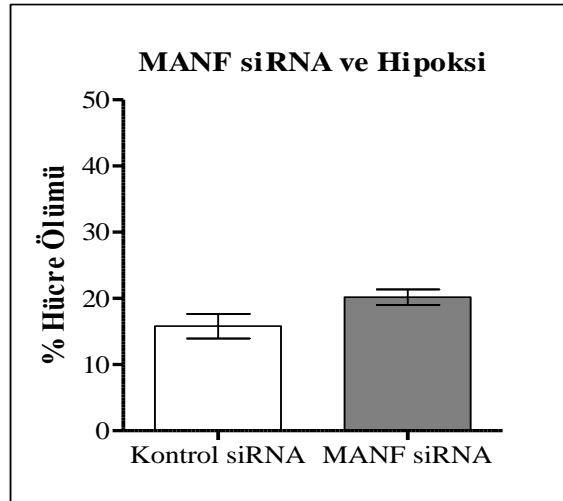
Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan hücreler, 24 saat süre ile hipoksik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları spektrofotometrik olarak WST-1 ajanı kullanılarak belirlendi.

MANF over-ekspresyonu deneyi: Hipoksi indüksiyonu sonrasında 1 µg pCIneo-MANF transfekte edilen hücrelerdeki % hücre ölümü değerleri, boş pCIneo plazmidi (kontrol) transfekte edilmiş hücelere benzer olarak tespit edilirken, 2 µg MANF ve 4 µg'lık pCIneo MANF transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde % hücre ölümü değerlerinin kontrol hücrelerine göre anlamlı derecede azalmış olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (Şekil 51).



Şekil 51 Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin hipoksiye duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama ± O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (n= 5)(a: Kontrole göre anlamlı derece düşük ($p < 0.001$)).

MANF siRNA deneyi: Hipoksi indüksiyonunun, MANF gen ifadesi susturulmuş hücrelerde, kontrol hücrelerine benzer düzeyde hücre ölümüne neden olduğu tespit edildi ($p > 0.05$) (Şekil 52).



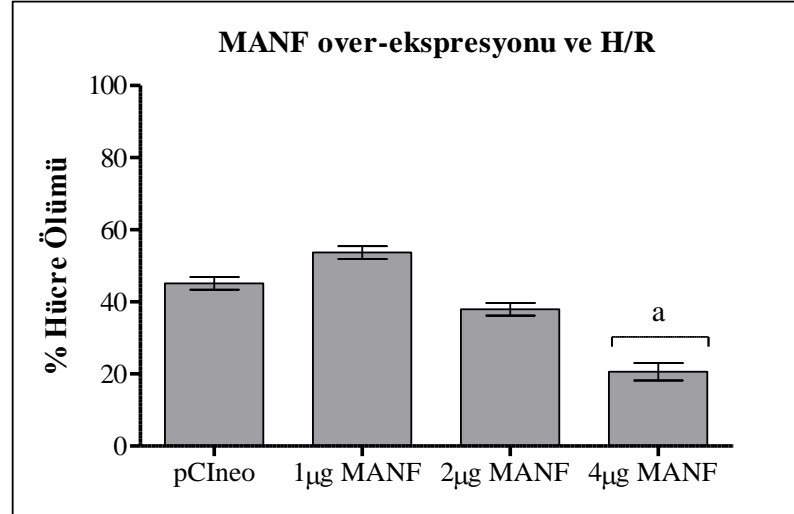
Şekil 52. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin hipoksiye duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir ($n= 5$) ($p > 0.05$).

3.4.3.4 HK-2 hücrelerinde MANF proteininin hipoksi-reperfüzyon ile oluşan hasara karşı olası sitoprotektif etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan hücreler, 8 saat süre ile hipoksik koşullarda inkübe edildikten sonra 16 saat süreyle reperfüze edildiler. İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları spektrofotometrik olarak WST-1 ajanı ile belirlendi.

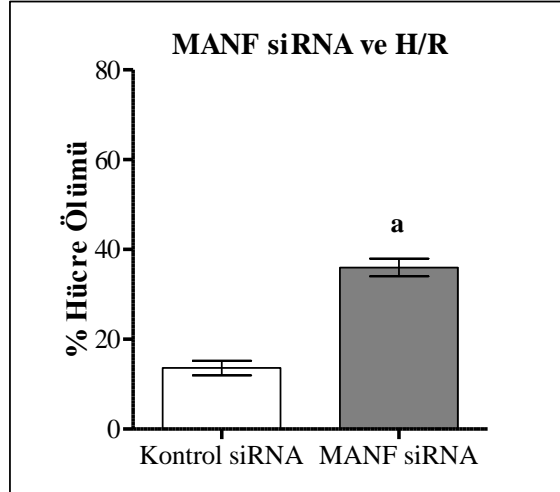
MANF over-ekspresyonu deneyi: Hipoksi-reperfüzyon koşullarında 1 ve 2 μ g pCIneo-MANF transfekte edilen hücrelerdeki % hücre ölümü değerleri boş pCIneo plazmidi (kontrol) transfekte edilmiş hücrelere benzer olarak tespit edilirken, 4 μ g pCIneo-MANF transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde % hücre ölümü değerinin

kontrol hücrelerine göre anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.005$) (Şekil 53).



Şekil 53. Farklı konsantrasyonlarda pCIneo-MANF transfekte edilen HK-2 hücrelerinin hipoksi-reperfüzyon hasarına karşı duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir ($n = 5$)(*a*: Kontrole göre anlamlı derecede düşük ($p < 0.005$)).

MANF siRNA deneyi: Hipoksi-reperfüzyon koşullarında, MANF gen ifadesi susturulmasının, kontrole göre, anlamlı derecede daha fazla hücre ölümüne neden olduğu tespit edildi ($p < 0.001$) (Şekil 54).



Şekil 54. MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinin hipoksi-reperfüzyon hasarına karşı duyarlılıklarını gösteren grafik. Sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama \pm O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (n= 5)(a: Kontrole göre anlamlı derece yüksek (p< 0.001)).

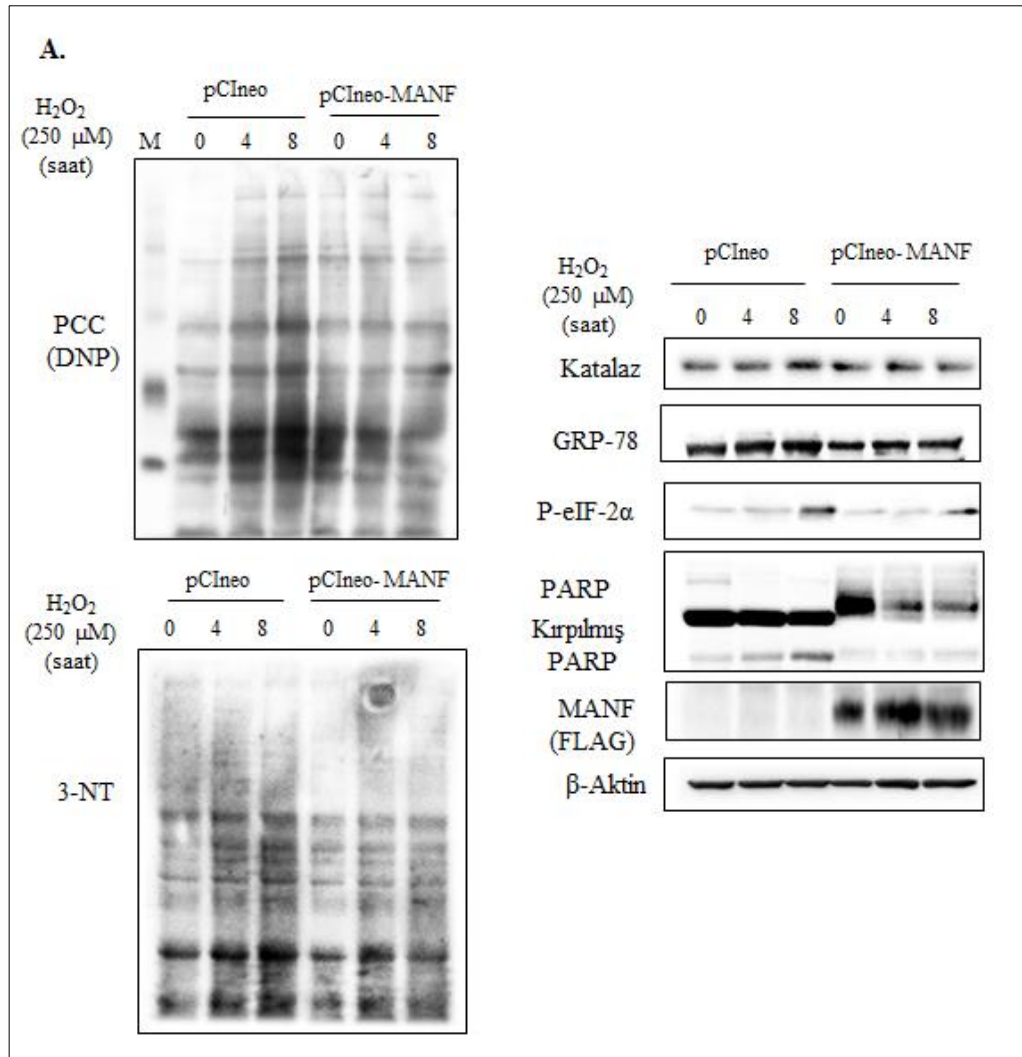
3.4.4 *HK-2 hücrelerinde MANF protein ekspresyonu artışının stres yanıtları üzerindeki etkisinin stres belirteçleri ile incelenmesi*

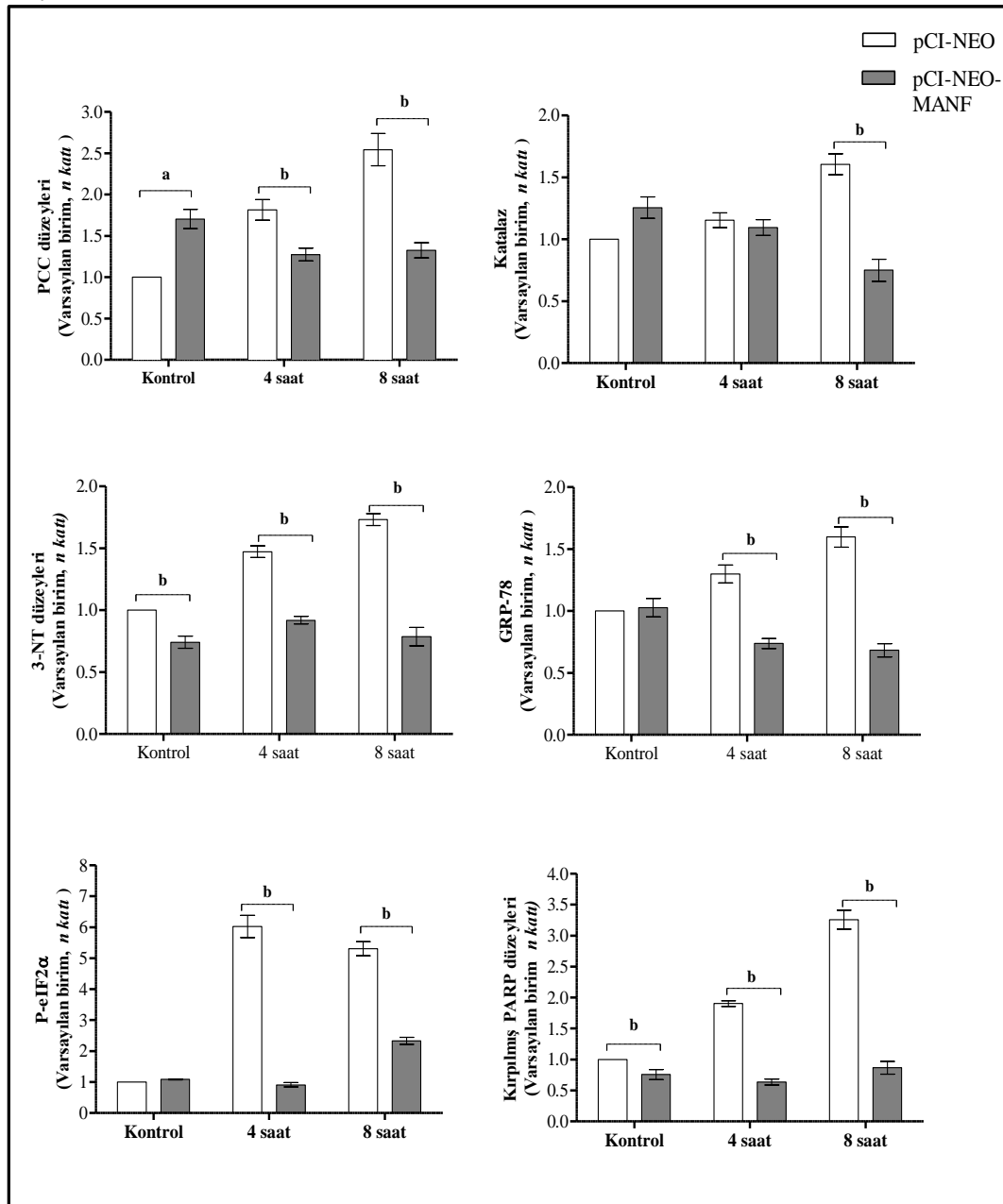
HK-2 hücrelerinde MANF proteinin stres yanıtları üzerine etkisini detaylı olarak incelemek amacıyla, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Deneyden bir gün önce iki adet 100 mm'lik petri kabına 1.6×10^6 'şar sayıda hücre ekildi. Ertesi gün, hücrelere 2.5 μ g boş pCIneo (kontrol) veya pCIneo-MANF-FLAG plazmidleri transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler eşit olarak 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına aktarıldı. Ertesi sabah hücrelerde stres indüksiyonu gerçekleştirildi. Toplam inkübasyon süresi sonunda hücreler lizatlandı ve IB yapıldı. Her deneyde, gerçekleştirilen MANF transfeksiyon etkinliği anti-FLAG antikoru ile belirlendi. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi. Üç ayrı deney sonrasında elde edilen veriler dansitometrik olarak değerlendirildikten sonra, kontrole göre oranlanıp % grafikleri elde edildi

3.4.4.1 MANF ekspresyonu artışının OS üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen HK-2 hücrelerine 250 μ M H₂O₂ uygulanarak, 0, 4 ve 8 saat süre ile OS indüksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottama yöntemi kullanılarak, MANF proteini over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş hücrelerdeki stres düzeyleri, kontrol ile karşılaştırıldı.

OS indüksiyonu sonrası, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş HK-2 hücrelerinde, incelenen hücresel stres parametrelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 55).



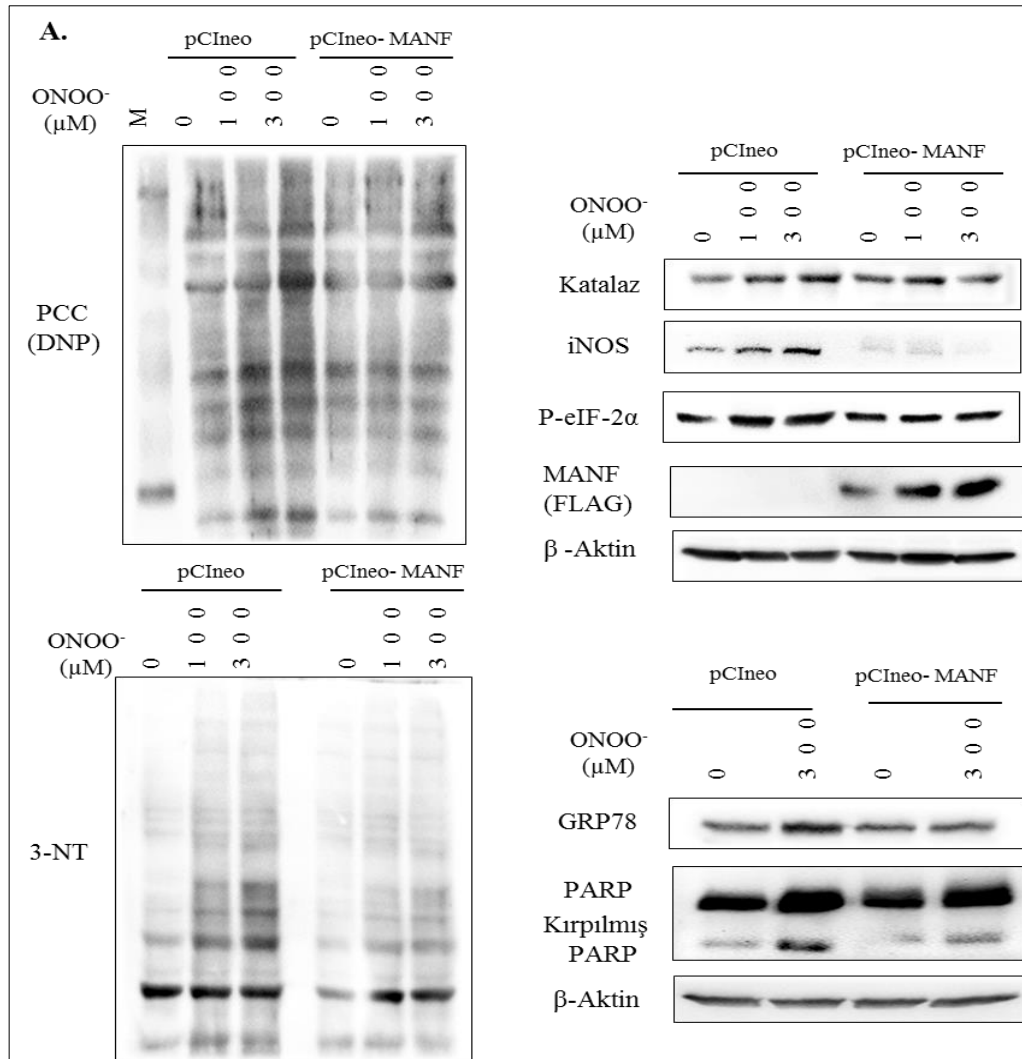
B.

Şekil 55. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun OS üzerindeki etkisine ait bulgular. pCIneo ve pCIneo-MANF-FLAG transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde H₂O₂ uygulamasının ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek, b: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde düşük ($p < 0.05$)).

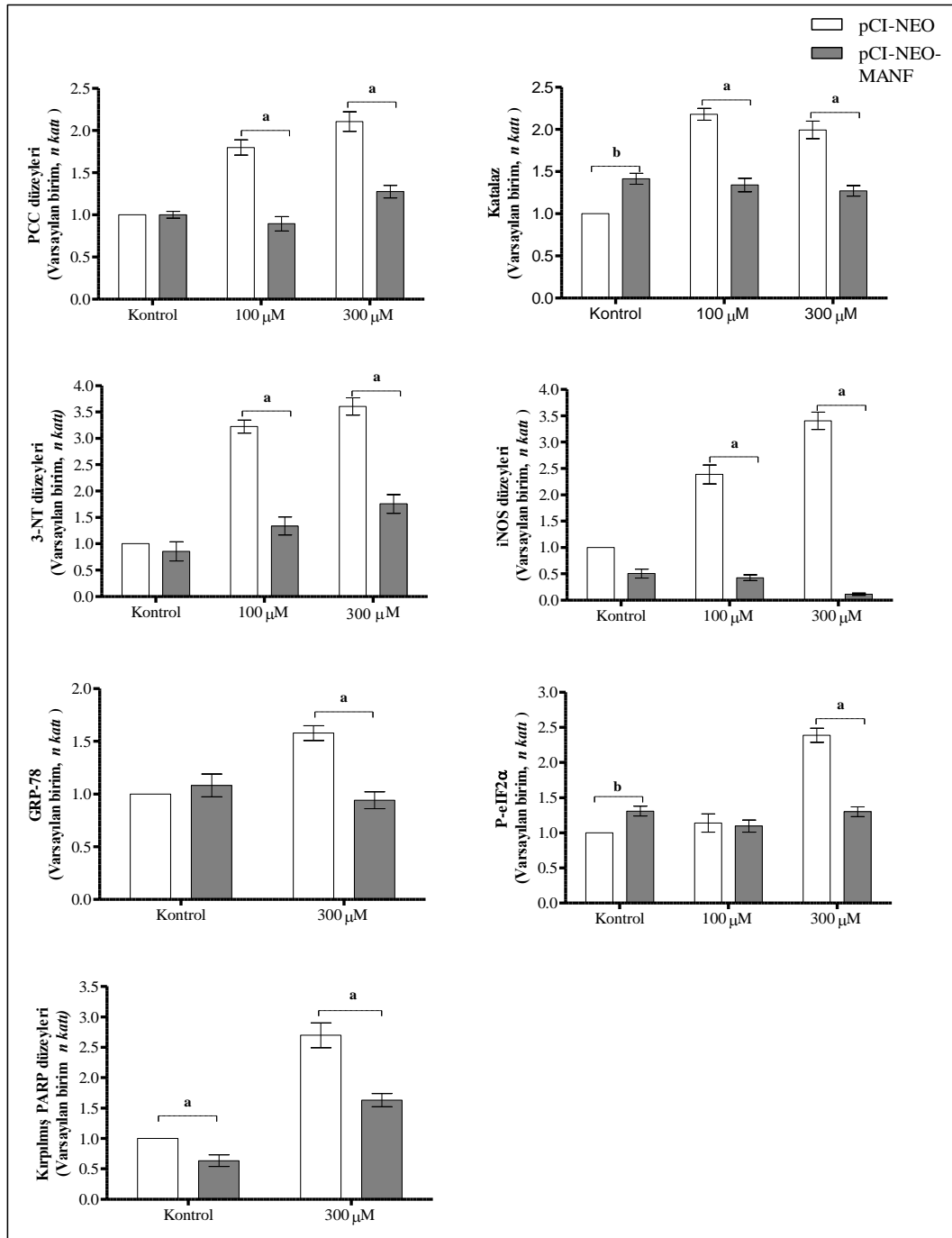
3.4.4.2 MANF ekspresyonu artışının NS üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen HK-2 hücrelerine 0, 100 ve 300 μM ONOO^- uygulandı ve 10 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoiblamlama yöntemi ile MANF proteini over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş hücrelerdeki stres düzeyleri, kontrol hücrelerindeki stres düzeyleri ile karşılaştırıldı.

NS indüksiyonu sonrası, MANF over-ekspresyonunun gerçekleştiği HK-2 hücrelerinde, incelenen hücrel stres parametrelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 56).



B.

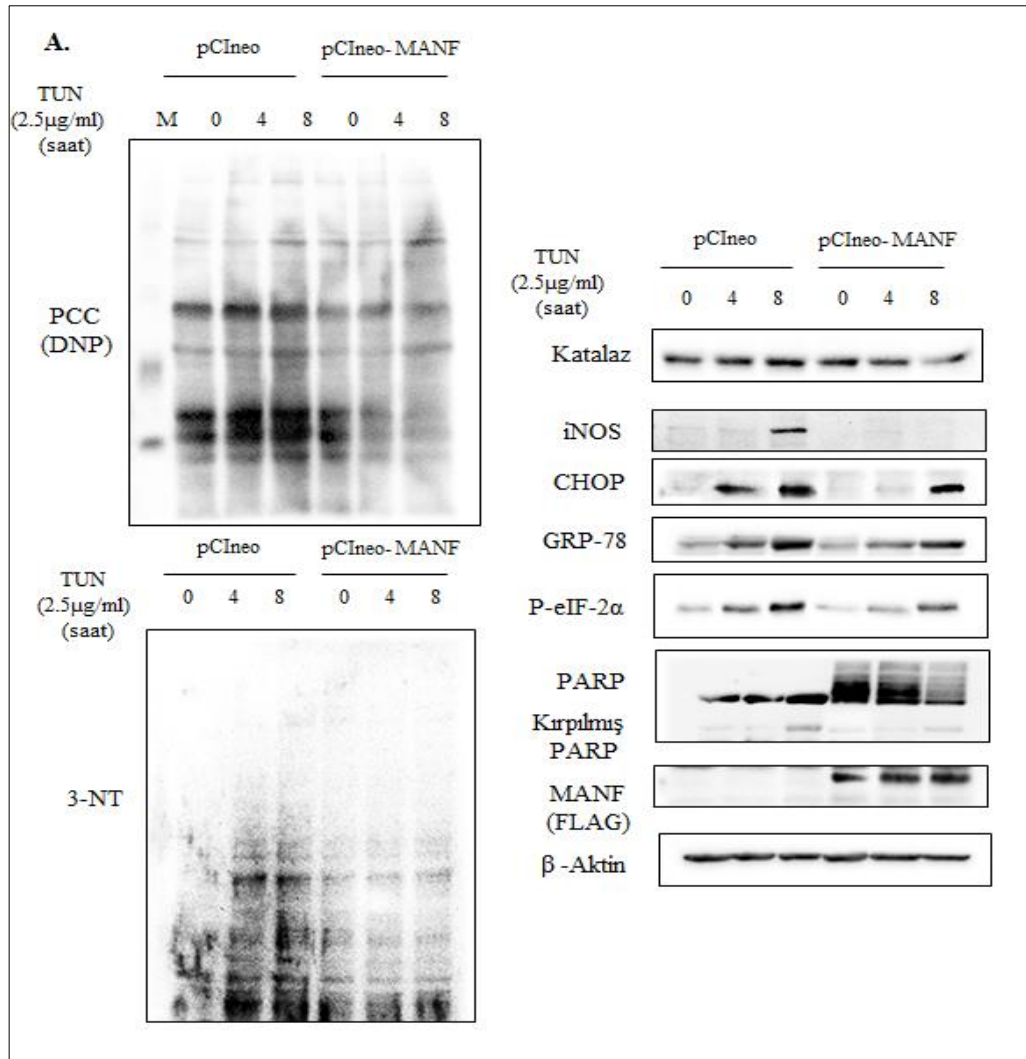


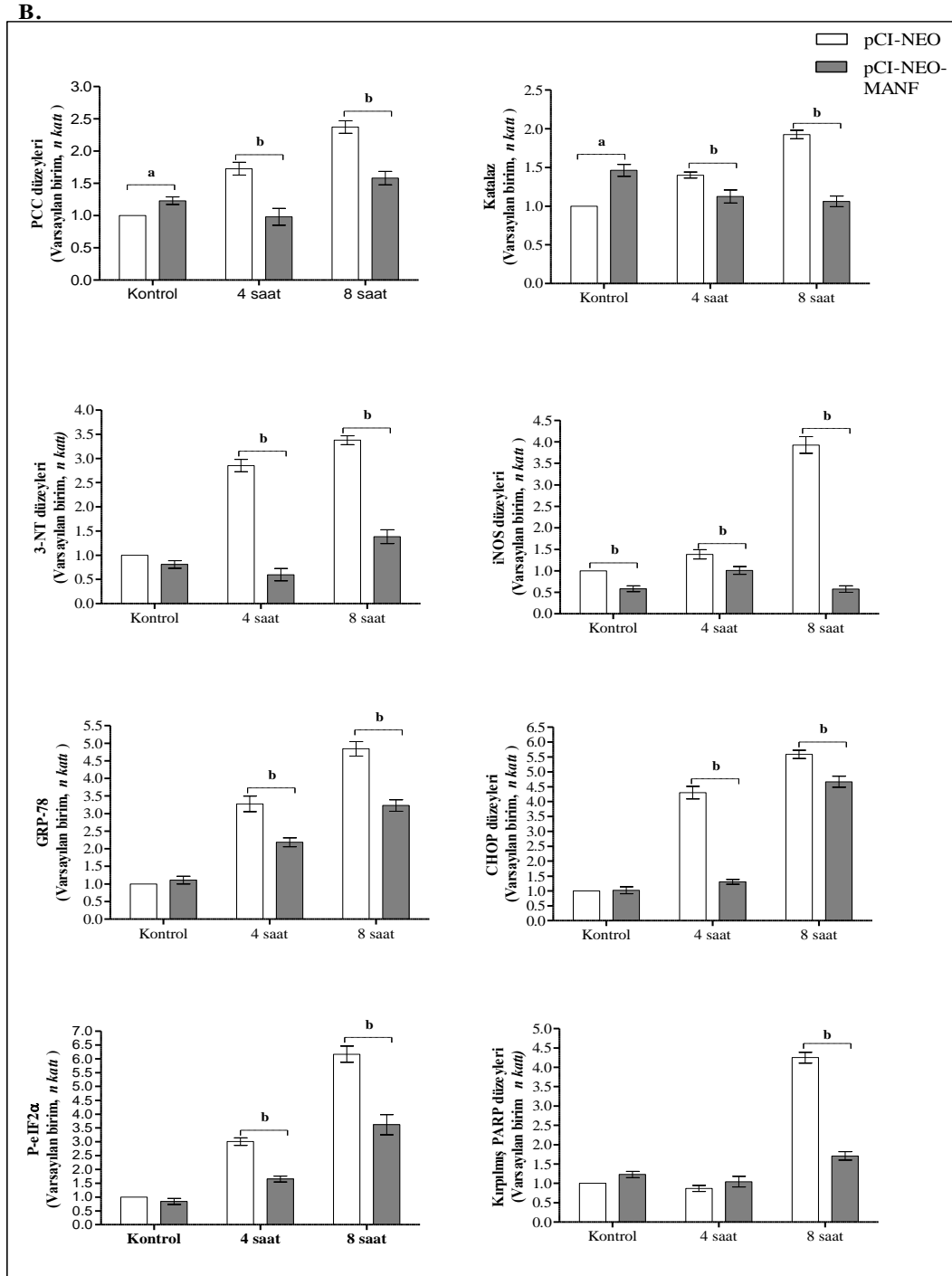
Şekil 56. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun NS üzerindeki etkisine ait bulgular. pCIneo ve pCIneo-MANF-FLAG transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde ONOO⁻ uygulamasının ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama ± O.S.H.) (a: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde düşük ($p < 0.05$), b: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$))

3.4.4.3 MANF ekspresyonu artışının ER stresi üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen HK-2 hücrelerine 2.5 µg/ml tunikamisin uygulanarak 0, 4 ve 8 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottlama yöntemi ile MANF proteini over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş hücrelerdeki stres düzeyleri, kontrol hücrelerindeki stres düzeyleri ile karşılaştırıldı.

ER stresi indüksiyonu sonrası, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş HK-2 hücrelerinde, incelenen hücresel stres parametrelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 57).



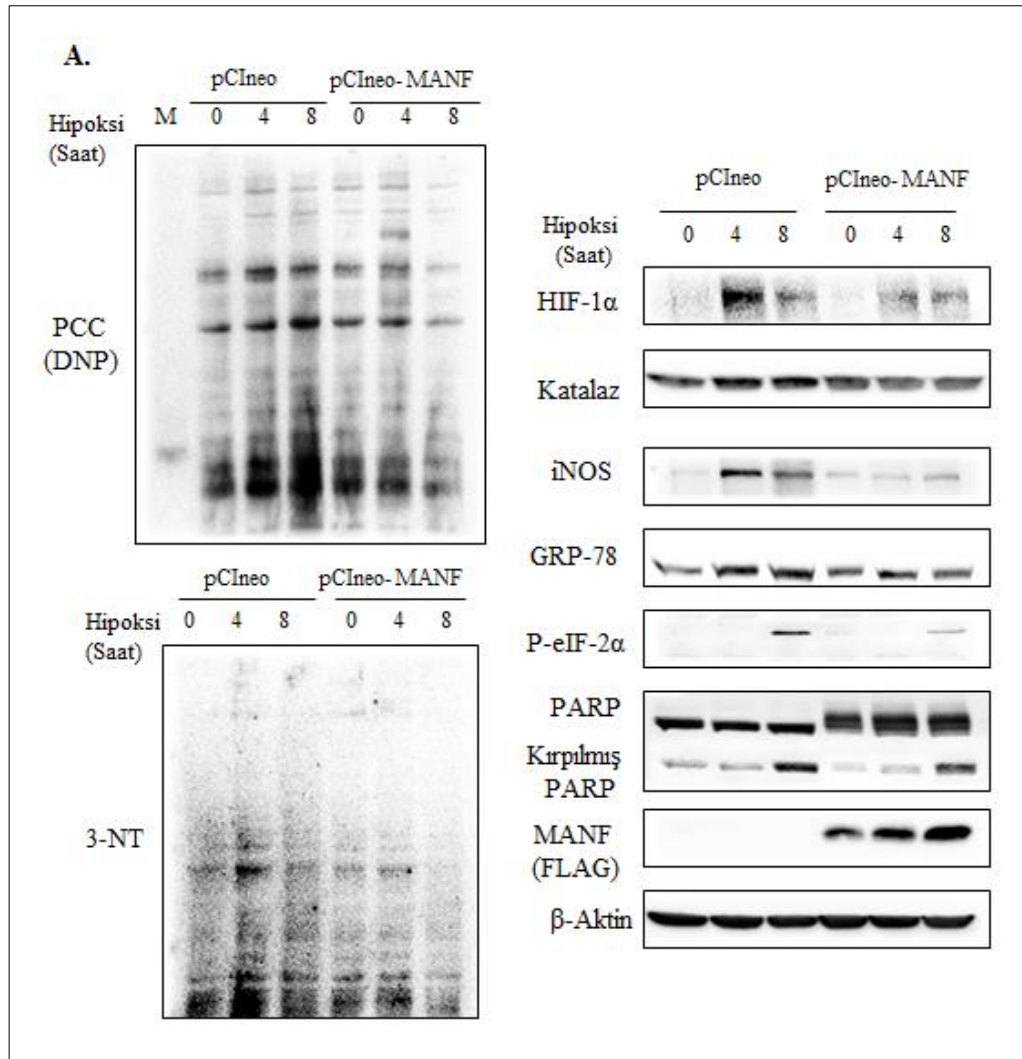


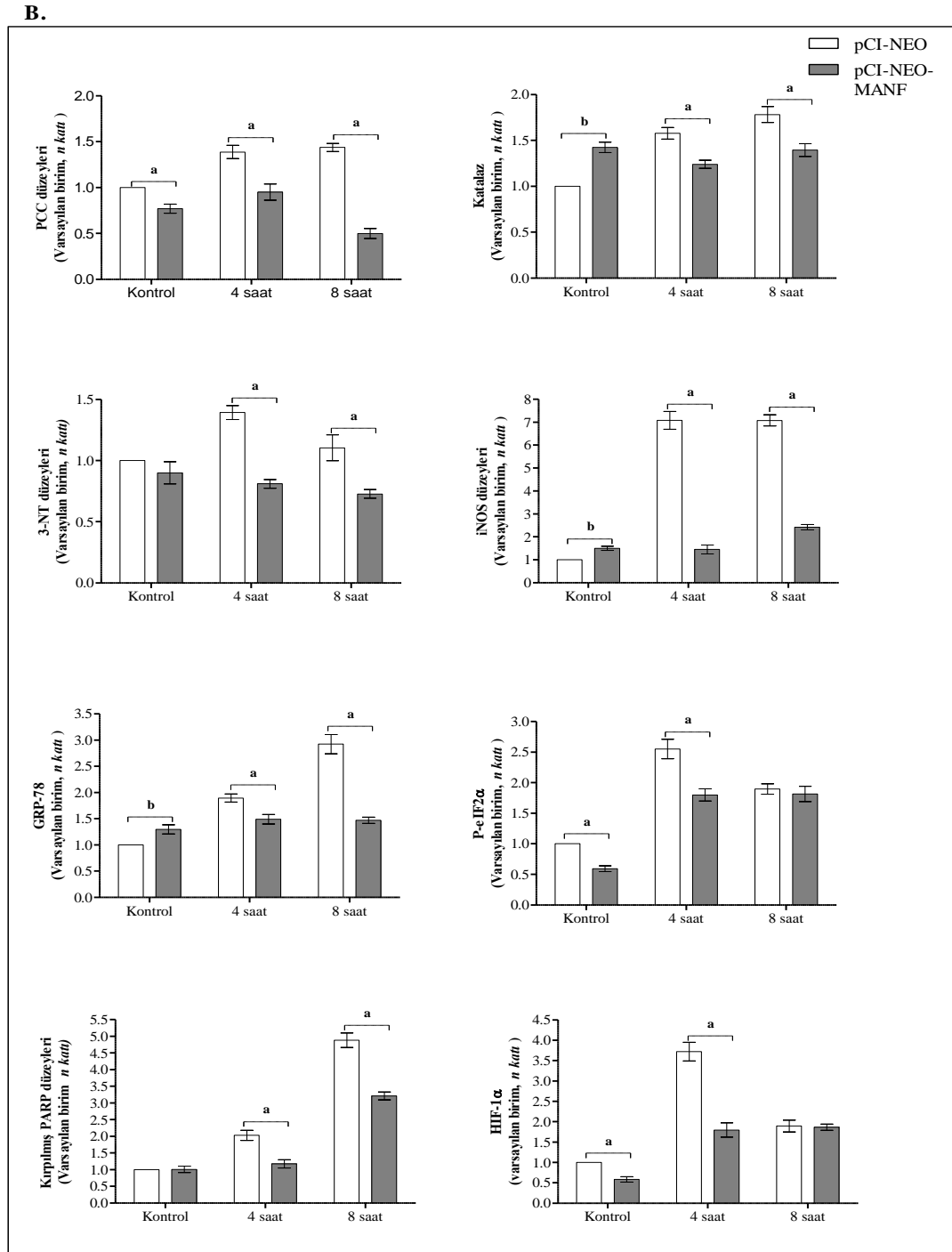
Şekil 57. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun ER stresi üzerindeki etkisine ait bulgular. pCIneo ve pCIneo-MANF-FLAG transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde tunikamisin uygulamasının ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$), b: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde düşük, $p < 0.05$).

3.4.4.4 MANF ekspresyonu artışının hipoksi üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen HK-2 hücrelerine 0, 4 ve 8 saat süre ile hipoksi indüksiyonu uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoiblamlama yöntemi ile MANF proteini over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş hücrelerdeki stres düzeyleri, kontrol hücrelerindeki stres düzeyleri ile karşılaştırıldı.

Hipoksi indüksiyonu sonrası, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş HK-2 hücrelerinde, incelenen hücresel stres parametrelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 58).



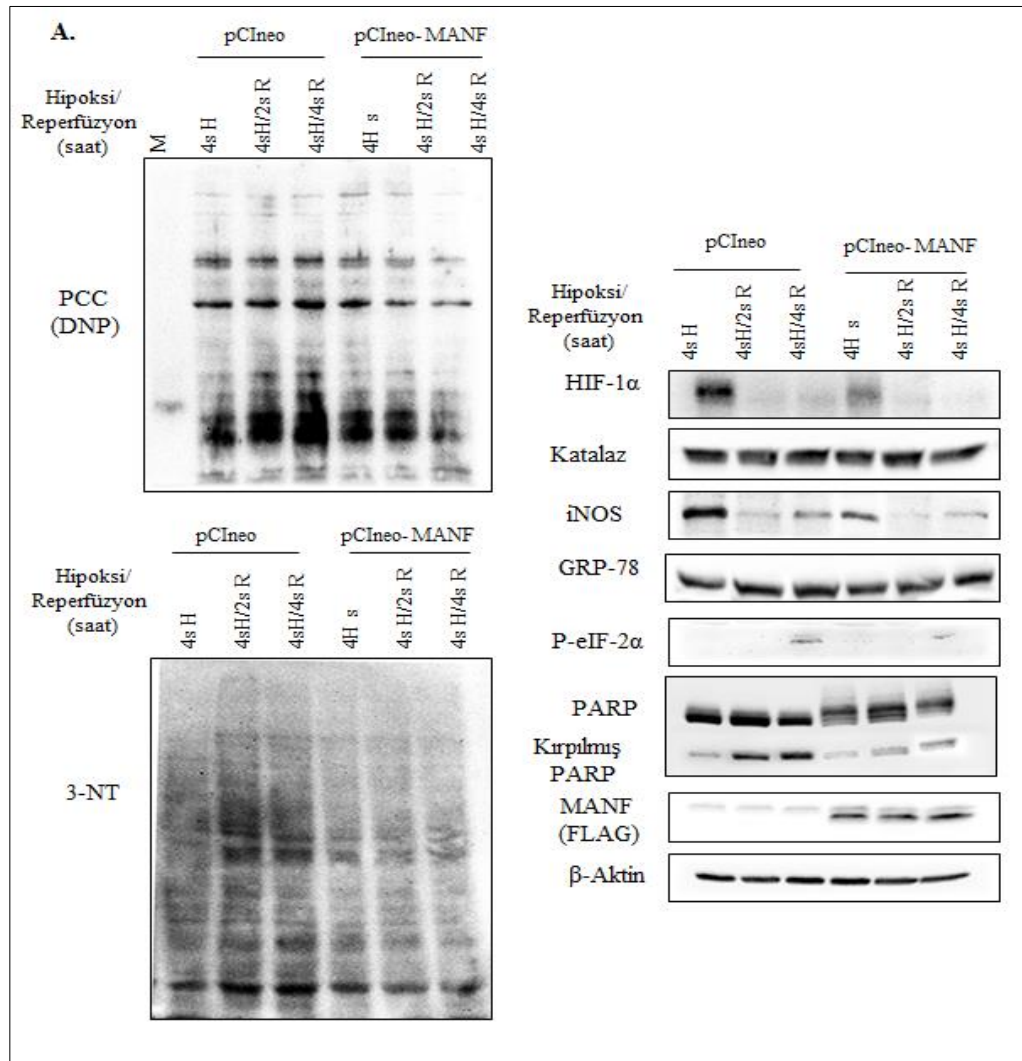


Şekil 58. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun hipoksi üzerindeki etkisine ait bulgular. pCIneo ve pCIneo-MANF-FLAG transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hipoksi indüksiyonunun ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde düşük ($p < 0.05$), b: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

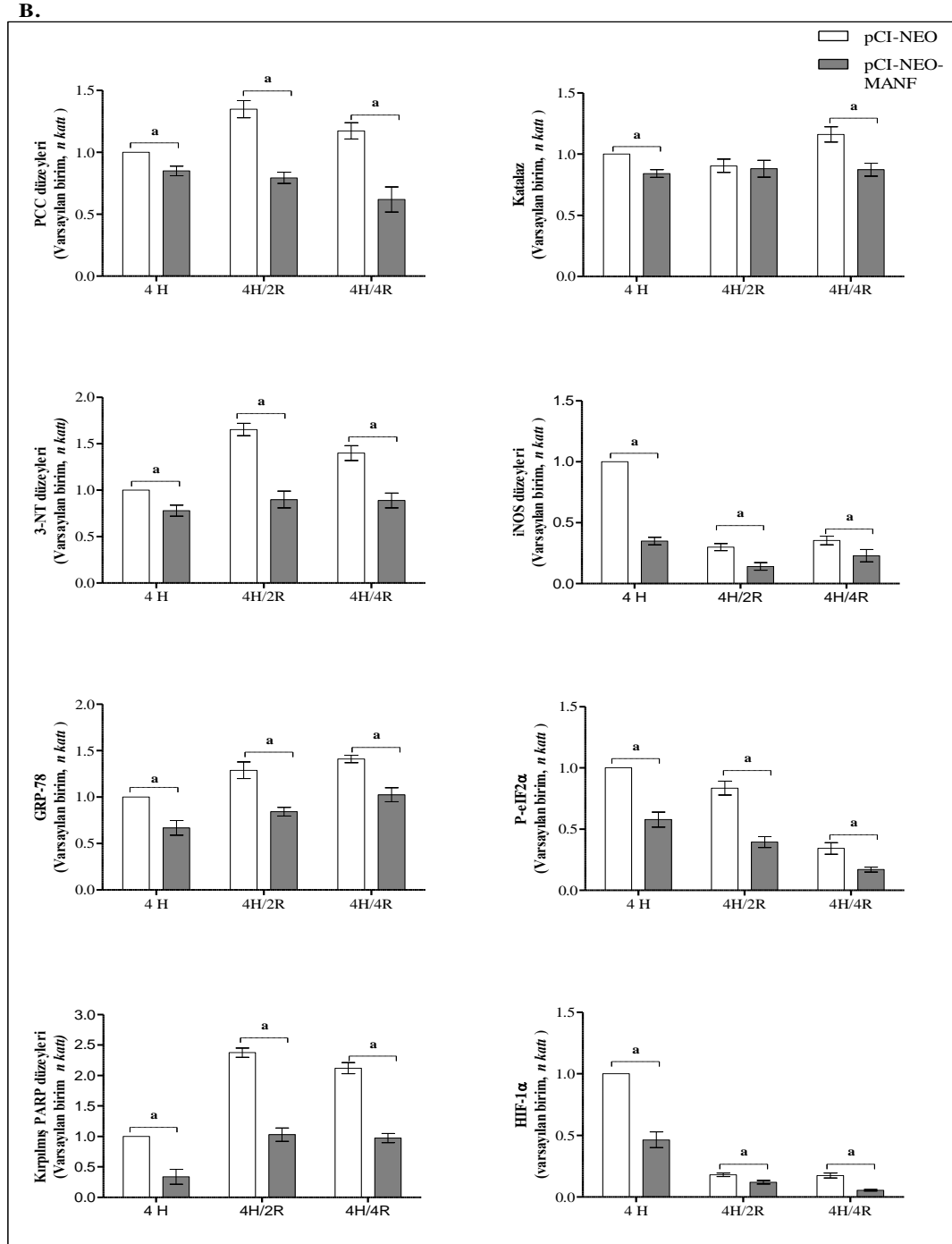
3.4.4.5 MANF over-ekspresyonun hipoksi-reperfüzyon üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen HK-2 hücreleri 4 saatlik hipoksi sonrasında 0, 2 ve 4 saat süre ile reperfüze edildiler. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottlama yöntemi ile MANF proteini over ekspresyonu gerçekleştirilmiş hücrelerdeki stres düzeyleri, kontrol hücrelerindeki stres düzeyleri ile karşılaştırıldı.

Hipoksi-reperfüzyon koşullarında, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilmiş HK-2 hücrelerinde, incelenen hücresel stres parametrelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 59).



Şekil 59-A. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun hipoksi-reperfüzyon üzerindeki etkisine ait bulgular.



Şekil 59. HK-2 hücrelerinde MANF over-ekspresyonunun hipoksi-reperfüzyon üzerindeki etkisine ait bulgular. pCIneo ve pCIneo-MANF-FLAG transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hipoksi-reperfüzyon koşullarında elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: pCIneo transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde düşük, ($p < 0.05$)).

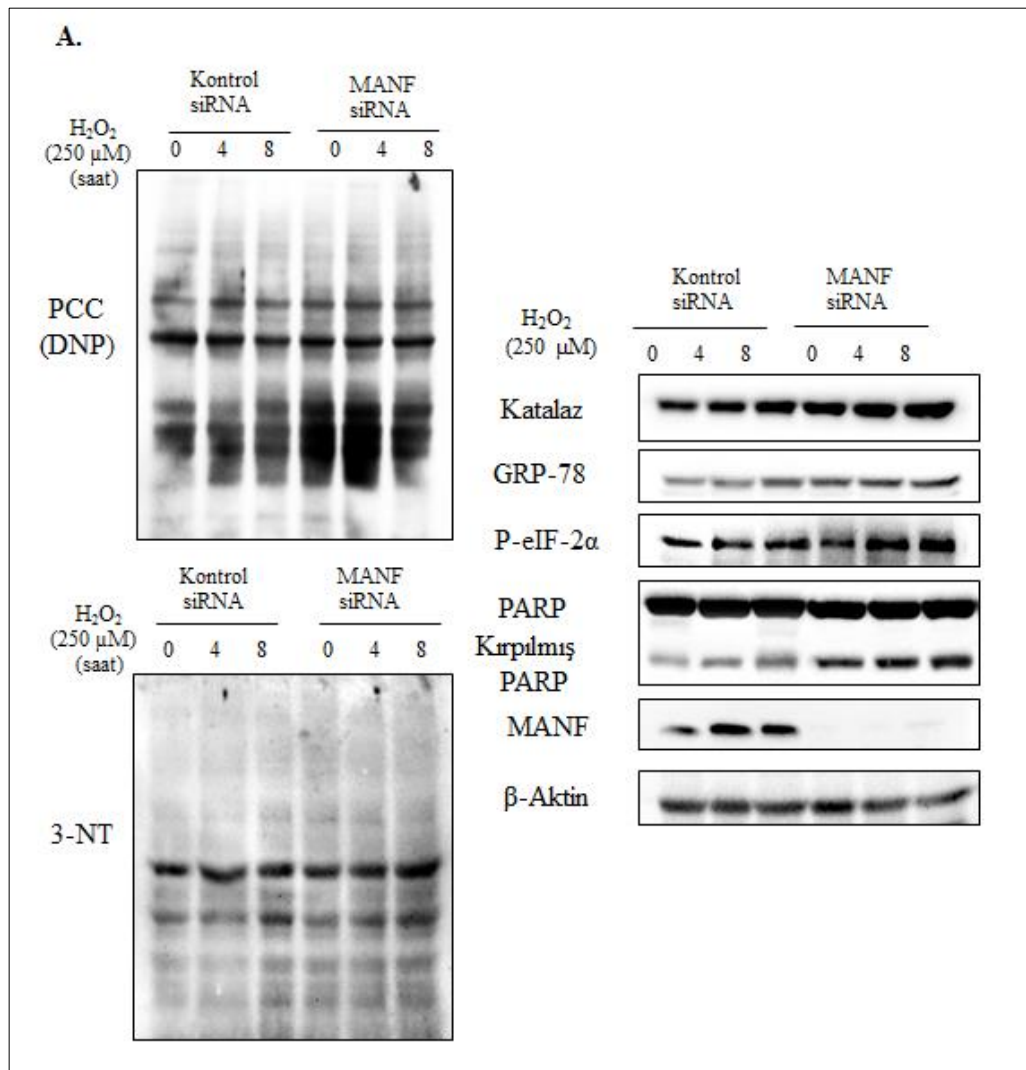
3.4.5 *HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının stres yanıtları üzerindeki etkisinin stres belirteçleri ile incelenmesi*

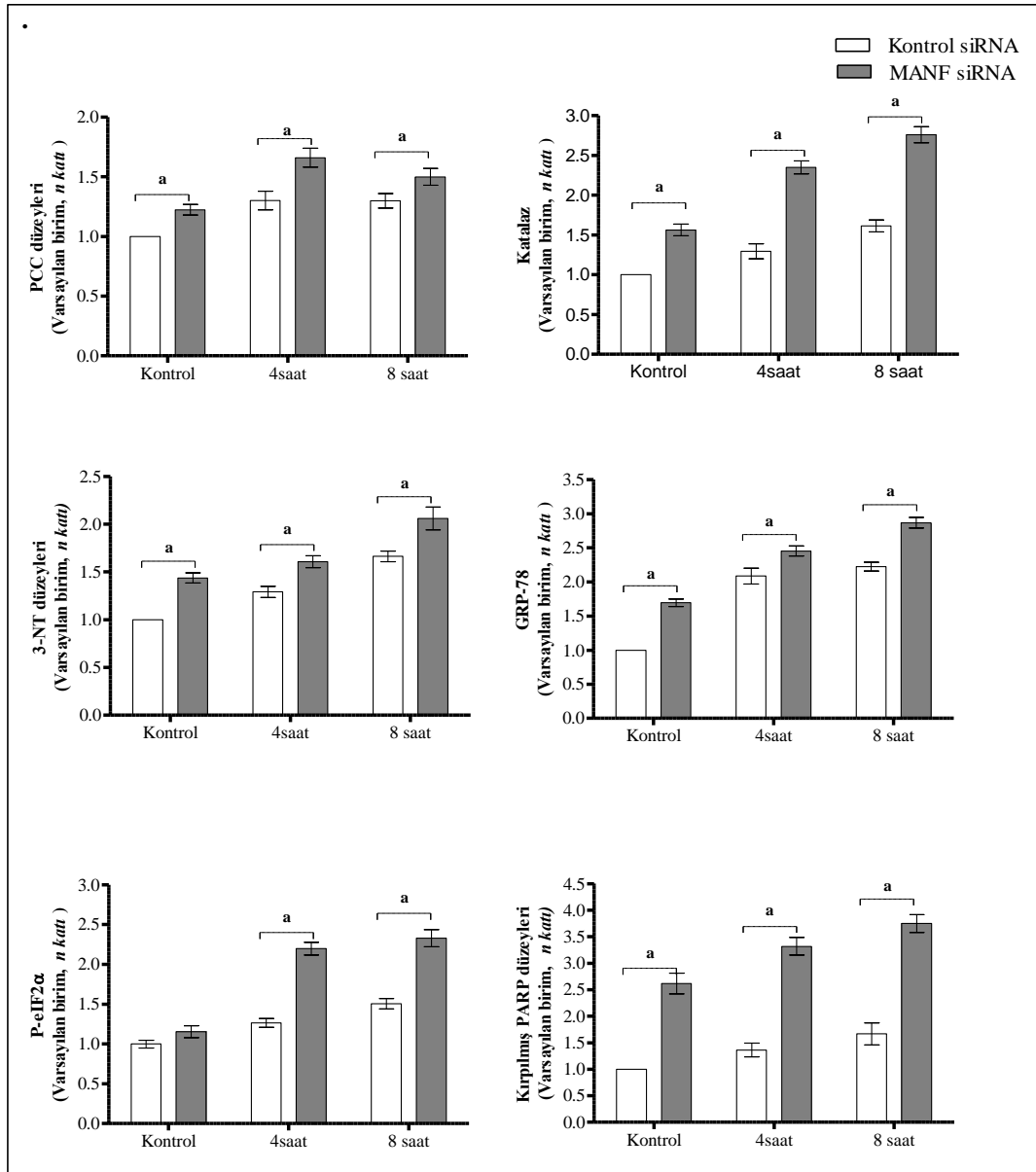
HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının stres yanıtları üzerine etkisini incelenmek amacıyla, hücreler deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu petri kaplarına 2×10^5 'er hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelere, Lipofektamin 2000 transfeksiyon ajanı kullanılarak, 40 nM konsantrasyonda 'negatif kontrol siRNA' veya 'MANF siRNA' oligonükleotidleri transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra, stres indüksiyonları gerçekleştirildi. Toplam inkübasyon süresi sonunda hücreler lizatlandı ve IB yapıldı. Her deneyde uygulanan MANF siRNA yönteminin etkinliği, anti-MANF antikoru kullanılarak belirlendi. Her deneyde yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

3.4.5.1 MANF gen ifadesinin susturulmasının OS üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.5’de belirtilen şekilde, kontrol siRNA ve MANF siRNA transfekte edilen HK-2 hücrelerine 250 μ M H₂O₂ uygulanarak 0, 4 ve 8 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoyotlama yöntemi ile hücrelerdeki stres düzeyleri karşılaştırıldı.

OS indüksiyonu sonrasında, MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinde incelenen hücresel stres parametrelerinin, kontrol siRNA uygulanmış hücrelere göre, anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 60).



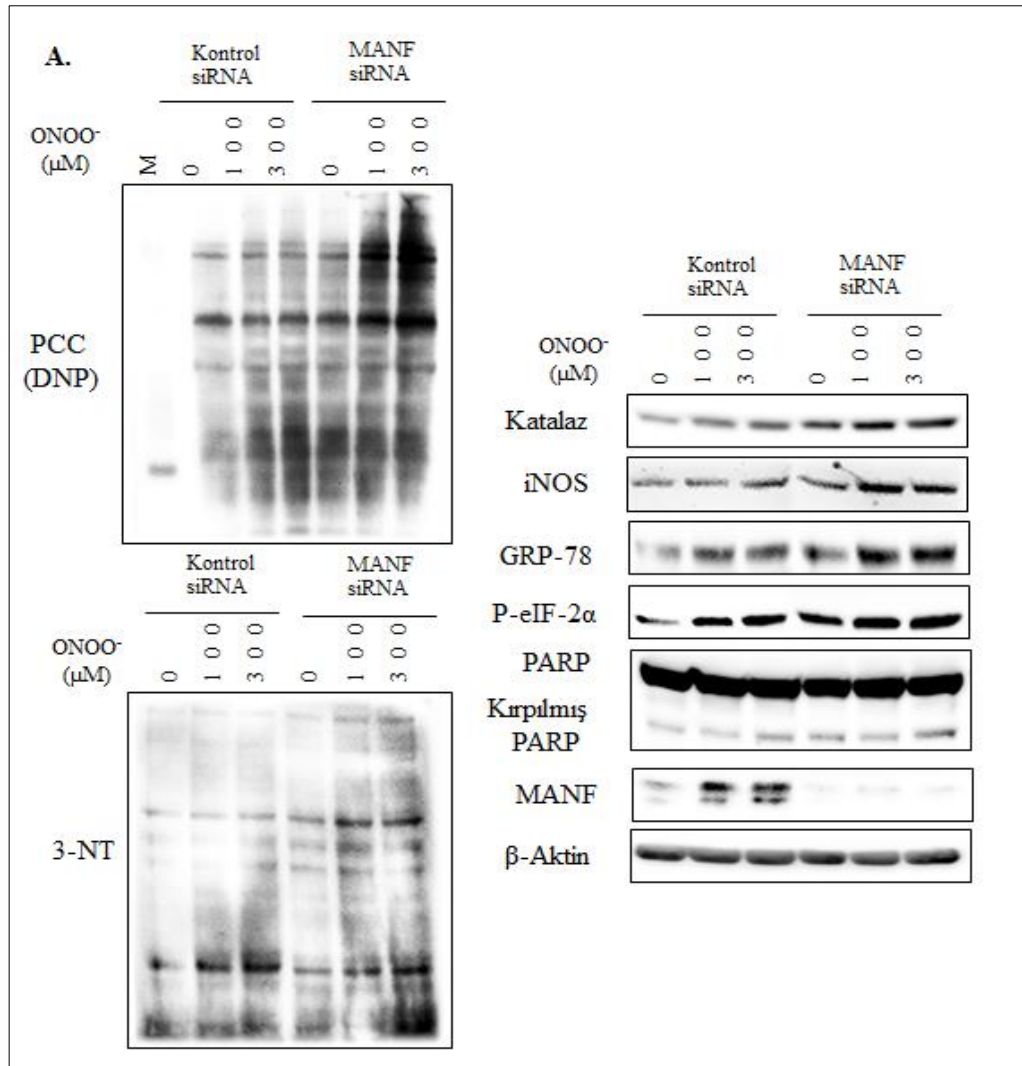
B

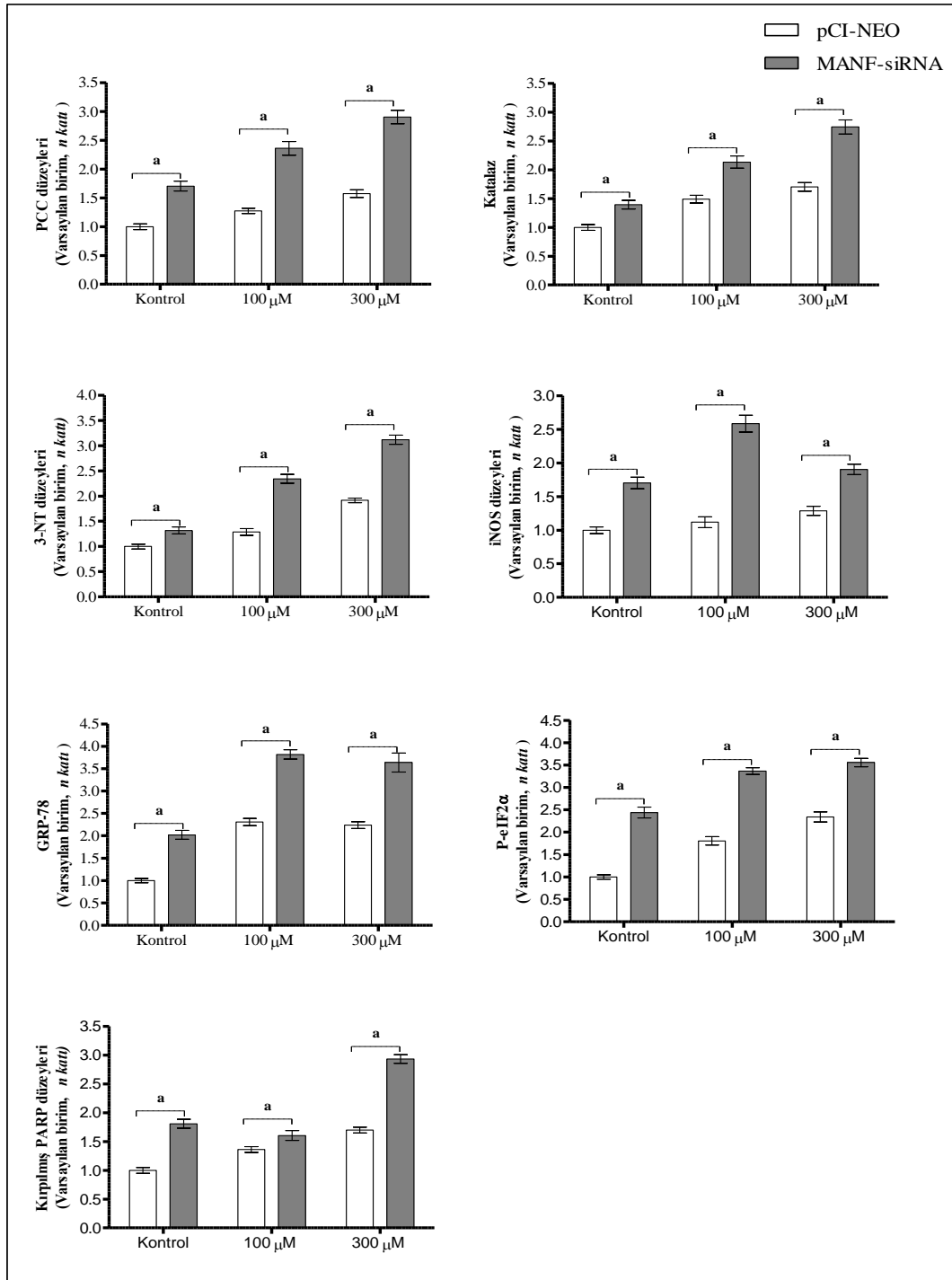
Şekil 60. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının OS üzerindeki etkisine ait bulgular. Negatif kontrol siRNA ve MANF siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde H_2O_2 uygulamasının ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: negatif kontrol siRNA transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.5.2 MANF gen ifadesinin susturulmasının NS üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.5’de belirtilen şekilde, kontrol siRNA ve MANF siRNA transfekte edilen HK-2 hücrelerine 0, 100 ve 300 μM ONOO⁻ uygulandı ve 10 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottama yöntemi ile hücrelerdeki stres düzeyleri karşılaştırıldı. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

NS indüksiyonu sonrasında, MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinde incelenen hücresel stres parametrelerinin, kontrol siRNA uygulanmış hücrelere göre, anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 61).



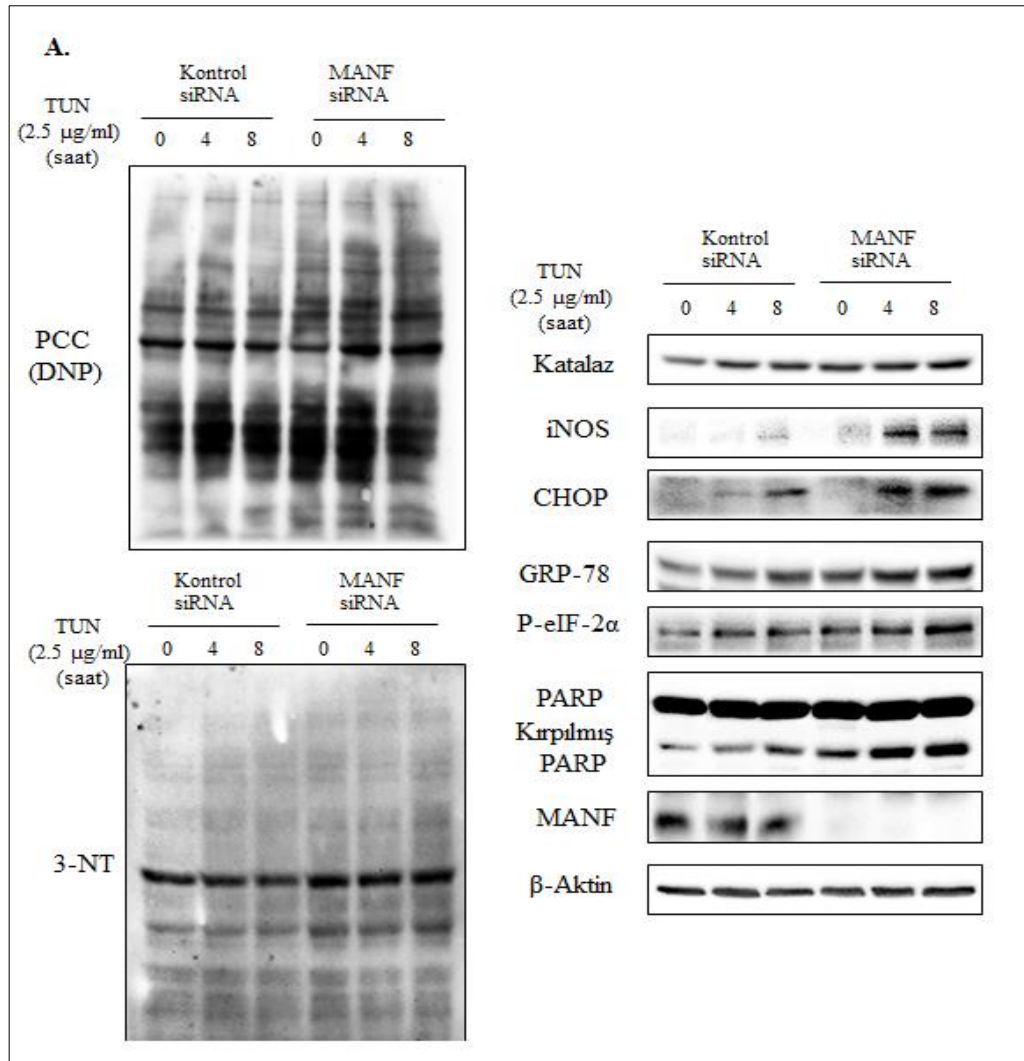
B.

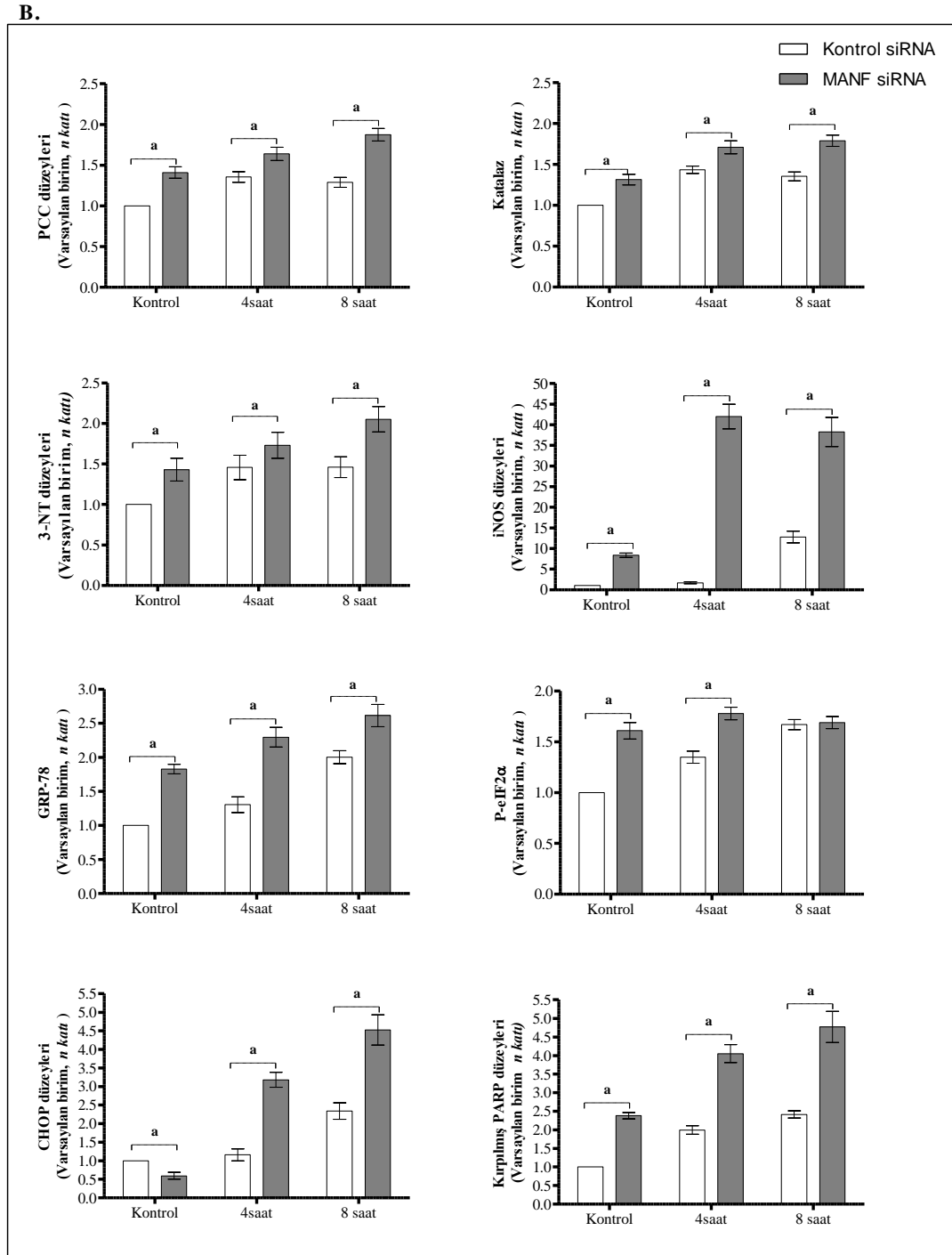
Şekil 61. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının NS üzerindeki etkisine ait bulgular. Negatif kontrol siRNA ve MANF siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde ONOO⁻ uygulamasının ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: negatif kontrol siRNA transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.5.3 MANF gen ifadesinin susturulmasının ER stresi üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.5’de belirtilen şekilde, kontrol siRNA ve MANF siRNA transfekte edilen HK-2 hücrelerine 2.5 µg/ml tunikamisin uygulanarak 0, 4 ve 8 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottama yöntemi ile hücrelerdeki stres düzeyleri karşılaştırıldı. Yükleme kontrolü olarak anti-β-aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

ER stresi indüksiyonu sonrasında MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinde incelenen hücresel stres parametrelerinin, kontrol siRNA uygulanmış hücrelere göre, anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 62).



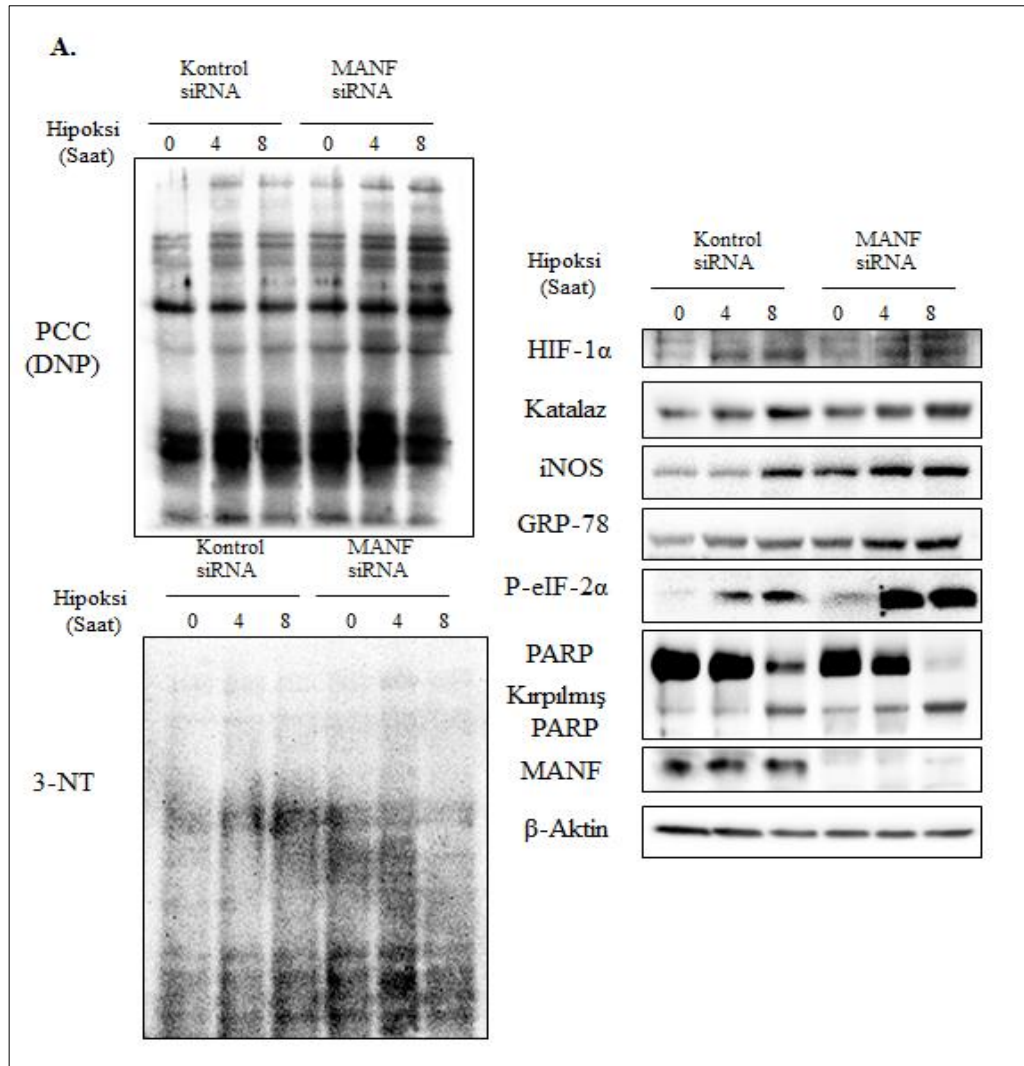


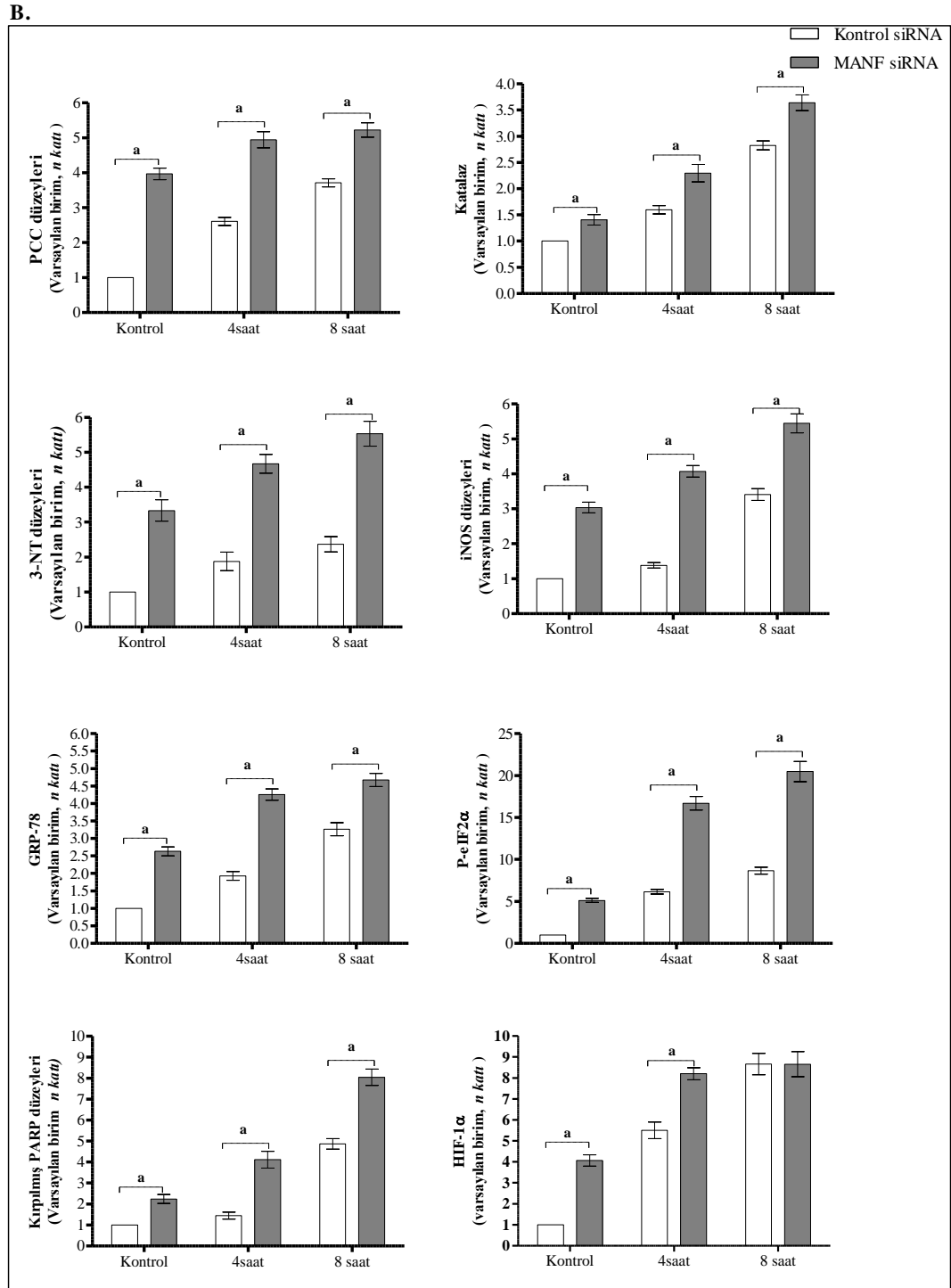
Şekil 62. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının ER stresi üzerindeki etkisine ait bulgular. Negatif kontrol siRNA ve MANF siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde tunikamisin uygulamasının ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: negatif kontrol siRNA transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.01$)).

3.4.5.4 MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi üzerindeki etkisi

Bölüm 3.4.5’de belirtilen şekilde, kontrol siRNA ve MANF siRNA transfekte edilen HK-2 hücrelerinde 0, 4 ve 8 saat süre ile hipoksi indüksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottlama yöntemi ile stres düzeyleri karşılaştırıldı. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

Hipoksi indüksiyonu sonrasında, MANF gen ifadesinin susturulduğu HK-2 hücrelerinde incelenen hücresel stres parametrelerinin, kontrol siRNA uygulanmış hücrelere göre, anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 63).



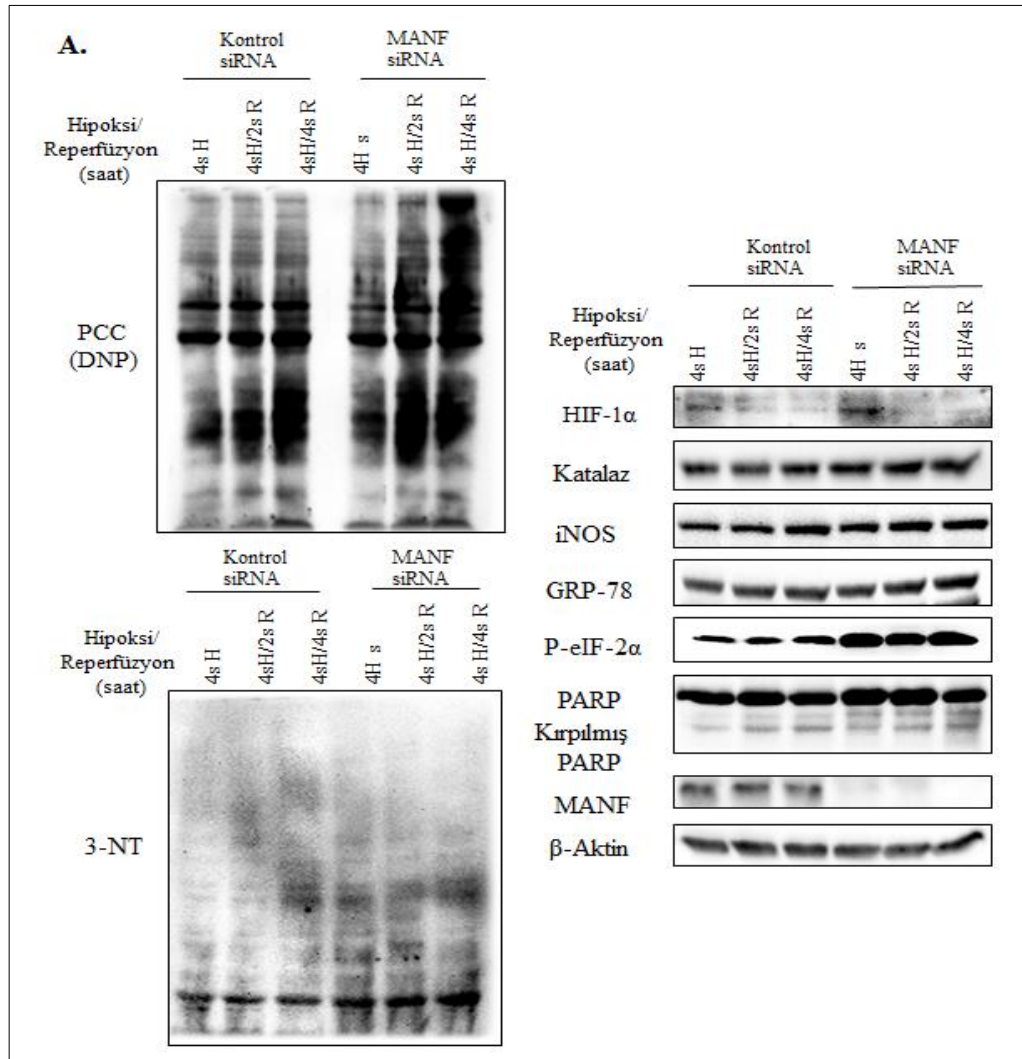


Şekil 63. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi üzerindeki etkisine ait bulgular. Negatif kontrol siRNA ve MANF siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hipoksi indüksiyonunun ardından elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: negatif kontrol siRNA transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.5.5 MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi-reperfüzyon üzerindeki etkisi

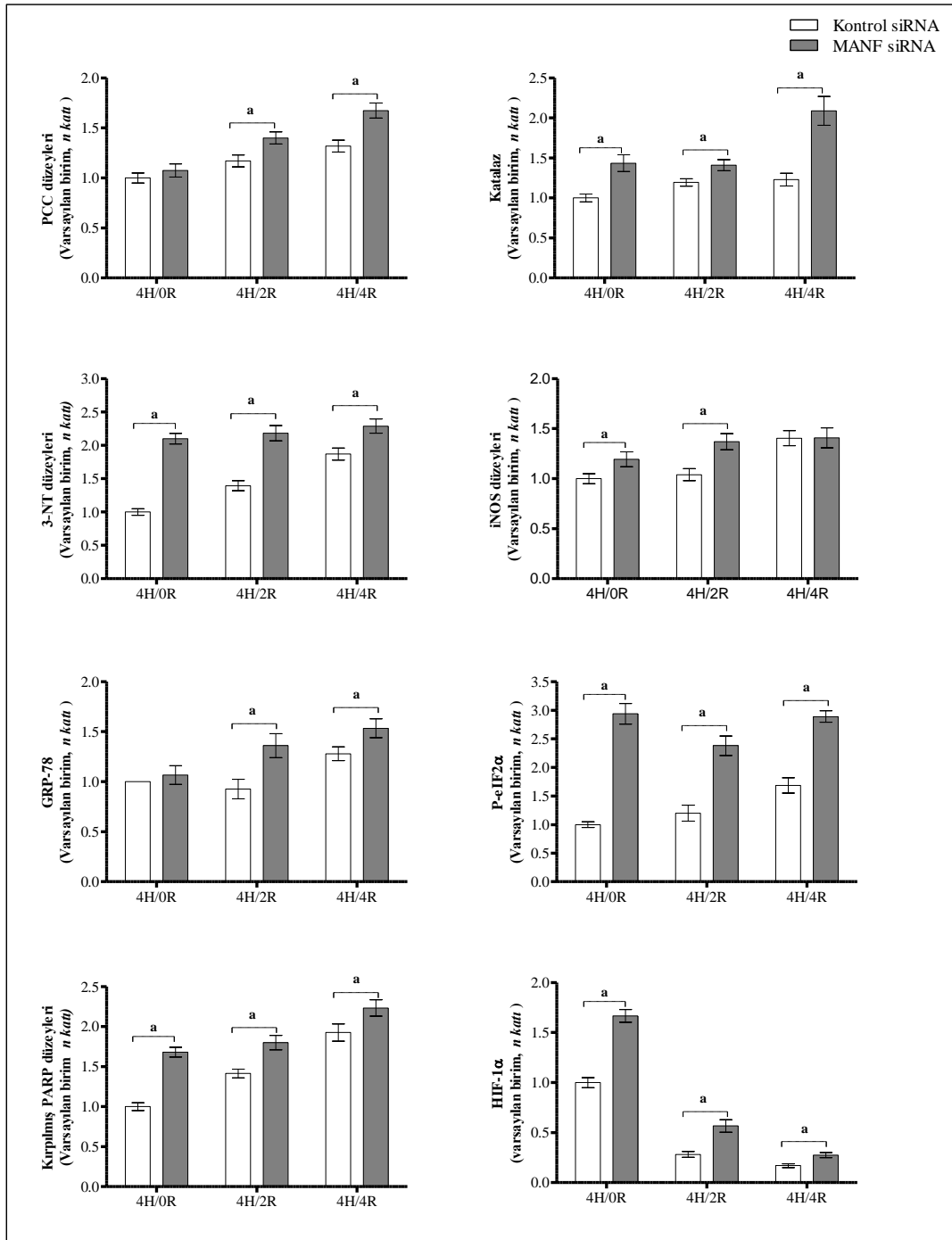
Kontrol siRNA ve MANF siRNA transfekte edilen HK-2 hücreleri 4 saat'lik hipoksi sonrasında 0, 2 ve 4 saat süre ile reperfüze edildiler. İnkübasyon süreleri sonunda hücreler toplanarak lizatlandı. İmmünoablottama yöntemi ile stres düzeyleri karşılaştırıldı. Yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi.

Hipoksi-reperfüzyon koşullarında, MANF gen ifadesinin susturulmuş HK-2 hücrelerinde incelenen hücresel stres parametrelerinin, kontrol siRNA uygulanmış hücrelere göre, anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 64).



Şekil 64-A. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisine ait bulgular.

B.

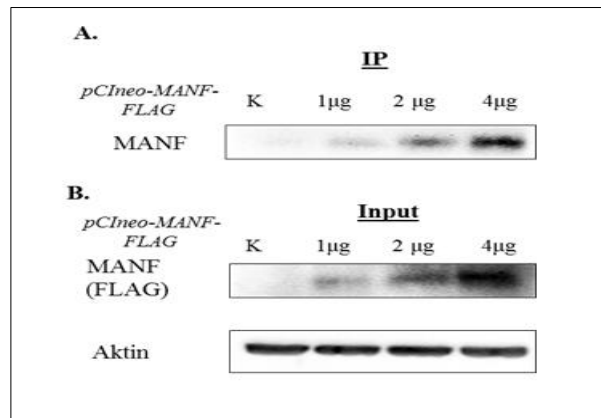


Şekil 64. HK-2 hücrelerinde MANF gen ifadesinin susturulmasının hipoksi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisine ait bulgular. Negatif kontrol siRNA ve MANF siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde hipoksi-reperfüzyon koşullarında elde edilen; (A) IB görüntüleri, (B) IB görüntülerine ait grafikler. Sonuçlar aktin protein düzeylerine göre normalize edilmiş olup, kontrole göre n katı değişim olarak ifade edilmiştir (ortalama \pm O.S.H.) (a: negatif kontrol siRNA transfekte edilen kontrol hücrelerine göre anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$)).

3.4.6 HK-2 hücrelerinde MANF proteininin olası parakrin etkilerinin incelenmesi

3.4.6.1 HK-2 hücrelerinden besiyerine salgılanan MANF düzeyinin IP ile belirlenmesi

Hücreden salgılanan bir protein olan MANF'in parakrin olarak sitoprotektif işlevi olup olmadığını incelemek amacıyla, HK-2 hücreleri deneyden bir gün önce 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün 1, 2 ve 4 μg FLAG işaretli pCIneo MANF transfekte edildi. Kontrol olarak kullanılan hücrelere ise boş pCIneo vektörü transfekte edildi. Transfeksiyon süresi sonunda besiyerleri ve hücreler ayrı tüplerde toplandı. Besiyerinde, IP yöntemi kullanılarak salgılanan MANF düzeyi tayin edildi. Hücre lizatlarında ise, transfeksiyon işlemi kontrolü olarak anti-FLAG antikoru ile hücre içi MANF düzeyleri ve yükleme kontrolü olarak anti- β -aktin antikoru kullanılarak aktin düzeyleri belirlendi. IP deneyi sonrasında, en yüksek miktarda MANF salgılanmasının 4 μg MANF transfeksiyonu ile gerçekleştiği belirlendi (Şekil 65).

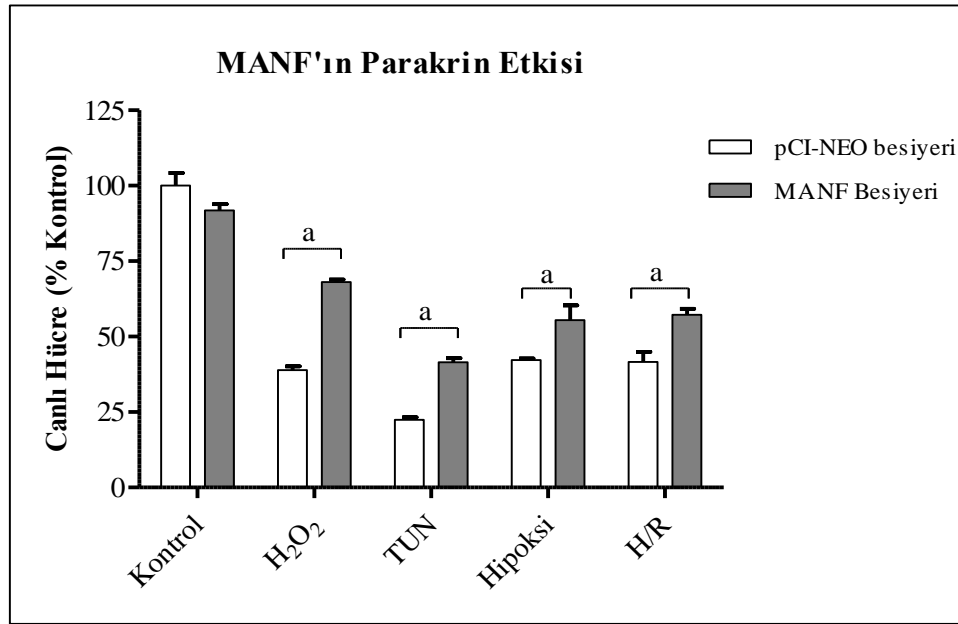


Şekil 65. HK-2 hücrelerinden besiyerine salgılanan MANF düzeyinin IP ile belirlenmesine ait bulgular. (A) IP: Besiyerlerindeki MANF düzeylerine ait IB görüntüsü, (B) İnut: hücre içi MANF ve aktin düzeylerine ait IB görüntüleri.

3.4.6.2 MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilen besiyerinin olası sitoprotektif etkisinin incelenmesi

Besiyerine salgılan MANF proteininin olası parakrin etkisinin incelenmesi amacıyla, deneyden bir gün önce iki adet 100 mm'lik petri kabına 1.6×10^6 şar sayıda hücre ekildi. Ertesi gün hücelere 4 µg boş pCIneo (kontrol) veya pCIneo-MANF-FLAG plazmidi transfekte edildi. 24 saat sonra hücrelerden pCIneo ve MANF içeren besiyerleri (conditioned media) toplandı. Bir gün öncesinden 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilmiş olan HK-2 hücrelerinin besiyeri, elde edilen pCIneo veya MANF içeren besiyerleri ile değiştirildi. Ardından, hücrelerde Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekilde, OS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarındaki proliferasyonları eğrileri, WST-1 proliferasyon ajanı kullanılarak karşılaştırıldı.

OS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarında, MANF içeren besiyeri eklenmiş hücrelerde pCIneo eklenmiş hücelere göre hücre canlılığının anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (Şekil 66).



Şekil 66. MANF içeren besiyerinin olası sitoprotektif etkilerinin incelenmesine ait bulgular. Elde edilen sonuçlar kontrole göre % değişim (ortalama ± O.S.H.) olarak ifade edilmiştir (n=5) (a: pCIneo içeren besiyeri uygulanan hücrelere göre anlamlı derecede yüksek (p< 0.001)).

BÖLÜM IV

4 TARTIŞMA

Böbrekler oksijen konsantrasyonu değişimlerine karşı en duyarlı organlardan biridir. Bu nedenle iskemi ve ardından gelişen reperfüzyon, böbrek dokusunda geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasara yol açarak, ABY'ne neden olmaktadır.

İskemik ABY'nin hücrel patofizyolojisi karmaşık bir mekanizmaya sahip olup, henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır (15, 103). Hücre içi O₂ ve ATP konsantrasyonunun azalmasının yanı sıra, oksidatif stres, nitrozatif stres, ER stresi gibi hücrel streslerin, endotel hücre-lökosit etkileşimleri (inflamasyon) gibi mekanizmaların ve çeşitli mediyatörlerin bu prosede birlikte rol oynadığı ileri sürülmektedir (4, 34, 60, 70). Ancak bu faktörlerin hasar oluşumundaki rolleri ve etkileşimleri henüz net olarak açıklanamamıştır.

Halen yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili bir sendrom olarak değerlendirilmekte olan iskemik ABY'nde, gelişen doku hasarına karşı koruyucu ve tedaviye yönelik stratejilerin oluşturulmasında hücrel streslerin etkileşimlerinin açıklığa kavuşturulması büyük önem taşımaktadır (4, 15).

Tez çalışmamızın ilk bölümünde iskemik ABY modeli oluşturulan HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında OS, NS ve ER stresi gelişimleri incelenmiştir. İkinci bölümde ise yine aynı hücrelerde oluşturulan iskemik ABY modelinde, bir ER stresi yanıt proteini olan MANF'ın fonksiyonu araştırılmıştır.

4.1 HK-2 Hücre Hattının Seçimi

Böbrek dokusu kendi içinde korteksten medullaya doğru azalan bir O₂ gradiyentine sahiptir. Bu nedenle iskemi-hipoksi ile oluşan hasarın şiddeti doku içerisinde farklılık göstermektedir. O₂ konsantrasyonunun en düşük olduğu bölgeler; proksimal tübüler hücreler ve distal tübüler hücrelerdir (8, 14, 15). *In vivo* iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulan çalışmalarda en fazla hasarın proksimal tübüler hücrelerde görüldüğü, distal tübüler hücrelerin göreceli olarak iskemik hasara daha dirençli olduğu bildirilmiştir (8, 152). Bu durumun, tübül hücrelerinin, oksijensiz koşullarda glikoliz yolağı ile ATP üretebilme kapasitelerindeki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir.

Tez çalışmamızda kullandığımız, ölümsüzleştirilmiş insan proksimal tübüler epitelyal hücre hattı (HK-2), proksimal tübüler hücrelere ait fonksiyonları gerçekleştirilebilir yetisine sahip bir hücre hattıdır. Bu nedenle iskemik ABY modeli için böbrek dokusuna ait gerekli özellikleri taşımaktadır (128).

4.2 İskemik ABY’de Oksidatif Stres, Nitrozatif Stres ve ER Stresinin Karşılıklı Etkileşimleri

4.2.1 Normoksi koşullarında Oksidatif stres, Nitrozatif stres ve ER stresi

Hipoksi koşullarında OS, NS ve ER stresi artışının iç içe geçmiş mekanizmalar ile hasara neden olduğu ileri sürülmektedir (60, 70, 109, 154). Bu nedenle iskemik ABY’ndeki ilişkilerini daha iyi anlayabilmek için, öncelikle HK-2 hücrelerinde her bir stres türü indüklenerek, time course deneyleri ile, diğer stresler üzerine etkileri karakterize edilmiştir. Ardından hipoksi-reperfüzyon koşullarındaki streslerin durumları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, hücrelerdeki OS düzeyi protein karbonil grupları (PCC) ve katalaz; NS düzeyi 3-nitrotirozin (3-NT) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS);

ER stresi glukoz ile regüle edilen protein-78 (GRP-78), ER stresi yanıtı olan UPR aktivasyonu fosforile-ökaryotik inisiyasyon faktörü-2 α (P-eIF-2 α) üzerinden, ER stres indüksiyonu ve UPR'nin pro-apoptotik yanıtı CHOP düzeyleri üzerinden, hücrelerde indüklenen stresler sonucunda gelişen hücre ölümü ise kırılmış PARP ve total PARP düzeyleri üzerinden değerlendirilmiştir.

Hücrelerde OS indüksiyonu için H₂O₂ kullanılmıştır. H₂O₂'in hücreler üzerindeki öldürücü (sitotoksik) konsantrasyonu hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan HK-2 hücrelerinde, ölümcül hasar oluşturmadan, OS indüksiyonu gerçekleştirmek için en uygun konsantrasyon ve indüksiyon süresi optimizasyon çalışmaları ile belirlenmiştir (Şekil 11, 12). Normoksi koşullarında gerçekleştirilen OS indüksiyonu sonrasında elde edilen bulgular ile, PCC, 3-NT, GRP-78 ve P-eIF2 α düzeylerinin 2. saatten itibaren; katalaz, total PARP ve kırılmış PARP düzeylerinin 4. saatten itibaren; iNOS düzeyinin ise 8. saatten itibaren arttığı belirlenmiştir. CHOP düzeyinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 18-21).

HK-2 hücrelerinde NS indüksiyonu ise, bu tip çalışmalarda sıklıkla kullanılan ONOO⁻ ile gerçekleştirilmiştir. ONOO⁻, pH'ya bağımlı etki gösteren kısa yarı ömürlü bir molekül olduğu için, NS indüksiyonlarının 5-10 dakika arasında gerçekleştirilmesi gerektiği, uzatılmış sürelerde hücre besiyerinin pH'sını değiştirmesi nedeniyle, nitrozatif stresten bağımsız etkiler oluşturabileceği bildirilmiştir (1). Bu nedenle ONOO⁻ ile gerçekleştirilen NS indüksiyonu 10 dk'lık indüksiyon süresinin farklı konsantrasyonlardaki etkileri incelenerek değerlendirilmiştir.

HK-2 hücrelerinde ONOO⁻ ile NS indüksiyonu gerçekleştirildikten sonra, iNOS, PCC, GRP-78 ve P-eIF-2 α düzeylerinin 100 μ M'lık ONOO⁻ indüksiyonundan itibaren, katalaz ve total PARP düzeylerinin 200 μ M'lık ONOO⁻ indüksiyonundan itibaren; 3-NT ve kırılmış PARP düzeylerinin ise 300 μ M'lık ONOO⁻ indüksiyonundan itibaren, kontrole göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. CHOP düzeyinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 22-25).

Çalışmamızda ER stresi indüksiyonu tunikamisin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür araştırması ve ön çalışmalar sonucunda ER stresi indüksiyonu için 2.5 μ g/ml konsantrasyonda tunikamisin kullanılmasına karar verilmiştir. HK-2 hücrelerinde 2, 4, 8, 12 saat süre ile gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu sonrasında, GRP-78, P-eIF-2 α , PCC, katalaz, 3-NT, iNOS, total PARP ve kırılmış PARP düzeylerinin indüksiyonun 2. saatinden itibaren, CHOP düzeyinin ise indüksiyonun 4. saatinden itibaren, kontrole göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 26-29).

Elde edilen bu bulgular ile normoksi şartlarında HK-2 hücrelerinde OS, NS ve ER stresinin birbirlerini ekiledikleri tespit edilmiş, ancak her bir stres indüksiyonuna özgü bazı farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

HK-2 hücrelerinde OS indüksiyonu sonrasında 3-NT düzeyinin iNOS düzeyinden daha erken arttığı, ONOO⁻ ile gerçekleştirilen NS indüksiyonundan farklı olarak, iNOS düzeyinin 3-NT düzeyinden daha önce arttığı belirlenmiştir (Şekil 19, 22). Bu farklılık, HK-2 hücrelerinde OS artışının iNOS yolağından bağımsız olarak, NS indüksiyonunu başlatabildiğini düşündürmektedir. Ayrıca HK-2 hücrelerinde gerek H₂O₂, gerekse ONOO⁻ indüksiyonu ile artan ER stresinin CHOP düzeylerinde bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 20, 24). Hücrelerde tunikamisin ile

gerçekleştirilen ER stresi indüksiyonu ise, CHOP düzeylerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, hücrelerde ER stresinin şiddetine bağlı olarak pro-apoptotik UPR yanıtının aktive olduğunu göstermektedir (Şekil 26).

4.2.2 Hipoksi ve reperfüzyonda OS, NS ve ER stresi

Çalışmamızda HK-2 hücrelerinde hipoksi geliştirmek amacıyla, modüler hipoksi odacığı kullanılarak iskemik ABY modeli oluşturulmuştur. Modüler hipoksi odacığı, hızlı ve ekonomik bir şekilde hipoksik ortam oluşturabilmesi nedeniyle hipoksi çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir sistemdir (16).

Bu sistem, kimyasal ajanlar ile hipoksi indüksiyonuna göre çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılan kimyasal yöntemlerden farklı olarak, odacığın O₂ konsantrasyonunun istenilen şekilde ayarlanabilmesi, farklı hipoksik ortamlarda çalışabilmeye olanak sağlamakta ve hücrelere uygulanan kimyasal ajan ve çözücülerden gelen etkileşimleri de ortadan kaldırmaktadır.

Hücrelerde gelişen hipoksi, hipoksik koşullarda stabil hale gelen HIF-1 α düzeyi üzerinden belirlenmiştir.

HK-2 hücrelerinde 2, 4, 8 ve 12 saatlik “time course” deneyleri ile hipoksi indüksiyonu gerçekleştirildikten sonra, HIF-1 α , PCC, 3-NT, P-eIF-2 α ve total PARP düzeylerinin hipoksi indüksiyonunun 2. saatinden itibaren, iNOS, GRP-78 ve kırılmış PARP düzeylerinin indüksiyonun 4. saatinden itibaren, katalaz düzeyinin indüksiyonun 8. saatinden itibaren, kontrole göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Hipoksi indüksiyonu süresince CHOP düzeyinde ise herhangi bir artış belirlenmemiştir (Şekil 30-34).

Reperfüzyon koşullarında ise; PCC düzeyinin 1. saatten itibaren, 3-NT ve kırılmış PARP düzeylerinin 2. saatten itibaren, katalaz ve GRP-78 düzeylerinin 4.

saatte normoksik ve hipoksik hücelere göre anlamlı olarak arttığı, iNOS düzeyinin ise reperfüzyon ile birlikte hipoksik hücelere göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Reperfüzyon süresince P-eIF-2 α , total PARP ve CHOP düzeyleri ise hipoksik hücelere benzer olarak bulunmuştur (Şekil 35-39).

Elde ettiğimiz bu sonuçlar aşağıda detaylı olarak değerlendirilmiştir:

Hipoksi indüksiyonunun ardından HK-2 hücelerinde PCC düzeyinin normoksik hücelere göre anlamlı olarak artmış olması, hipoksinin OS düzeyinde artışa neden olduğunu göstermektedir (Şekil 31).

Bu bulgumuz literatürde yer alan, hipokside ROT artışı ve oksidatif stresin indüklendiğini ileri süren yayınları desteklemektedir. Hipoksi nedeniyle hücrede azalan ATP düzeyini arttırmak için mitokondriyal ETZ'nin indüklendiği ve bunun sonucunda da ROT artışının meydana geldiği ileri sürülmektedir (18, 120). Bu çalışmalarda, hücrede artan ROT'nin böbrek tübüler hüceleri için doğrudan toksik etki gösterdiği ve iskemik ABY'nde hipoksik hasarın başlamasında ve ilerlemede rol oynadığı vurgulanmıştır (14, 107, 146). Daha da önemlisi iskemi ile gelişen ABY'nin KBY'ne dönüşmesinde rol oynayan en önemli faktörlerin ROT olduğu ileri sürülmüştür (17, 36).

Reperfüze edilen hücelerde ise; OS belirteci olan PCC düzeyinin hipoksik hücelere göre daha yüksek olarak tespit edilmiş olması, reperfüzyondaki hasarda ROT'nin daha büyük bir rol oynadığını göstermektedir (Şekil 36). Bu durum, hipoksi sürecinde hasar gören ETZ bileşenlerinin daha fazla elektron kaçışına, dolayısıyla ROT artışına neden olduğunu ileri süren yayınları desteklemektedir (8, 18, 120).

Ayrıca, hipoksik koşullarda aktivitesi değişen bazı enzimlerin reperfüzyon döneminde aktive olarak daha fazla ROT üretimine yol açabileceği önerilmektedir.

OS ile ilişkili olarak incelenen bir diğer parametre ise katalaz düzeyleridir. Çalışmamızda HK-2 hücrelerinde gerçekleştirilen hipoksi ve reperfüzyon koşullarında katalaz düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 31, 36).

Katalaz hücrenin başlıca antioksidan enzimlerinden biri olup, hücrede oluşan H_2O_2 'in parçalanmasında görev alır. Çeşitli çalışmalarda, gerek normoksi koşullarında H_2O_2 indüksiyonu ile gerçekleştirilen OS indüksiyonunun, gerekse hipoksi-reperfüzyon koşullarının, katalaz ekspresyonunda artışa neden olduğu bildirilmiş olup, bu durumun artan oksidatif strese karşı verilen koruyucu bir yanıt olarak geliştiği ileri sürülmüştür (50, 95, 132). Bizim çalışmamızda da OS artışının gözlemlendiği hipoksi-reperfüzyon koşullarında ve normoksi koşullarda gerçekleştirilen NS ve ER stresi indüksiyonlarından sonra hücrelerdeki katalaz düzeyinin artmış olması bu görüşü desteklemektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda iskemik ABY patogeneğinde NS'in de önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (42, 109). Çalışmamızda HK-2 hücrelerinde hipoksi indüksiyonunun 2. saatinde 3-NT düzeyinin, HIF-1 α ve PCC düzeyleri ile birlikte arttığı, ancak iNOS düzeyinin ise indüksiyonun 4. saattinden itibaren kontrole göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 30-32).

Elde ettiğimiz bu bulguya benzer olarak, normoksik koşullarda H_2O_2 ile indüklediğimiz OS sonrasında da, ONOO $^-$ uygulamasından farklı olarak, 3-NT düzeyinin iNOS artışından daha erken geliştiği belirlenmiştir (Şekil 19). Bu bulgular hipoksinin erken fazında gelişen NS'in iNOS'dan bağımsız olarak, ROT'den kaynaklandığını, hipoksinin ilerleyen fazında ise iNOS artışının NS hasarına katkıda bulunduğunu düşündürmüştür.

Hipoksi ile hücrelerde gelişen NS iki mekanizma üzerinden açıklanmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki yukarıda da açıkladığımız gibi, hipoksi sonucunda hücre içi artmış $O_2^{\cdot-}$ radikallerinin ONOO⁻ sentezine, dolayısıyla NS'e neden olmasıdır. Diğeri ise, hipoksinin hücre içinde NO düzeyini arttırmasıyla RNT sentezine yol açmasıdır (24, 42, 109).

Bu konuyla ilgili olarak yapılan ilk çalışmalarda, hipoksi ile artan NO düzeyi, hücrelerde hipoksiye adaptasyon sağlamak için aktive olan HIF-1 α 'nın iNOS transkripsiyonunu arttırması ile açıklanmıştır (65). Bu görüş ratlarda *iNOS geninin* çıkartılması sonucunda proksimal tübüler hücrelerin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı daha dayanıklı olduğunun gözlemlendiği çalışmayla desteklenmiştir (84, 118).

Ayrıca proksimal tübüler hücrelerde iNOS mRNA'sının oligonükleotidler ile baskılandığı *in vivo* çalışmalarda da iskemi-reperfüzyon hasarının azaldığı gösterilmiştir (75, 84). Hipokside NO artışı ile birlikte, ETZ aktivitesinin de artmasıyla, $O_2^{\cdot-}$ radikali artışının peroksinitrit artışına ve nitrozatif strese yol açtığı ileri sürülmüştür (24, 121).

Son çalışmalarda, hipokside NS artışına neden olan bir diğer mekanizmanın hipoksik koşullardaki mitokondriyal sitokrom c oksidaz aktivitesi olabileceği bildirilmiştir. Hipoksik koşullarda sitokrom c oksidaz'ın nitrit redüktaz fonksiyonu gösterdiği ve yüksek miktarda NO[•] ürettiği belirlenmiştir (20). Bu bulgunun ardından, hipoksik koşullarda NO üretiminden iNOS enzimi aktivitesi ve sitokrom c oksidaz aktivitesi olmak üzere iki farklı mekanizmanın sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Ancak iNOS enziminin O₂-bağımlı çalışan bir enzim olması nedeniyle, hipoksik koşullarda aktivitesinin kısıtlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hipoksideki NS artışından, daha çok sitokrom c oksidaz enziminin nitrit redüktaz

aktivitesinin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Bu durumla ilişkili olarak, hücrede sentezlenen reaktif molekül türlerinin O_2 konsantrasyonuna göre değiştiği, hipoksik şartlar altında en fazla üretilen reaktif molekülün $ONOO^-$ olduğu, reperfüzyonda sentezlenen majör reaktif molekülün $O_2^{\cdot-}$ radikali olduğu belirtilmiştir (120, 121). Bizim bulgularımızda da hipokside NS gelişiminin OS artışı ile başlaması bu öneriyi destekler niteliktedir.

Reperfüzyon fazında ise 3-NT düzeyi hipoksik hücrelere göre daha da artmış, bunun aksine iNOS düzeyinin olası HIF-1 α yıkımı ile birlikte azaldığı belirlenmiştir (Şekil 37). Bu bulgumuz, hipokside iNOS'ın HIF-1 α ile up-regüle edildiğini bildiren çalışmaları destekler niteliktedir (66). Diğer taraftan, reperfüzyon süresince iNOS düzeyi azalırken, 3-NT ve PCC düzeylerinin paralel olarak artması, reperfüzyon dönemindeki nitrozatif stresin de ROT artışından, yani oksidatif stresten kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu varsayım, reperfüzyon fazında artan ROT'nin $ONOO^-$ sentezine yol açtığı ve hücrede nitrozatif strese neden olduğunu bildiren çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (6). Ayrıca yukarıda da bahsettiğimiz gibi, normoksik koşullarda da OS indüksiyonunda 3-NT düzeyinin iNOS'dan bağımsız olarak artması bu görüşü desteklemektedir (Şekil 19).

İskemik ABY patogenezinde rol oynayan mekanizmalardan birisi de katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikimi sonucunda gelişen ER stresi ve ER stresiyle aktive olan katlanmamış protein yanıtıdır (UPR) (60, 70). Hipoksi doğrudan katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış protein miktarını arttırarak ER stresine neden olabildiği gibi, OS ve NS artışı üzerinden de dolaylı olarak ER stresine yol açabilmektedir. Bu nedenle, iskemi-reperfüzyon hasarında ER stresi, OS ve NS ile iç içe girmiş mekanizmalar olarak değerlendirilmektedir. Ancak ER stresinin iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü henüz net olarak tanımlanamamıştır. Literatürde

hipoksi ile birlikte gelişen ER stresi ve UPR yanıtının hücreleri hipoksik hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini bildiren çalışmaların yanı sıra, ER stresin apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve iskemik hasarın ilerlemesine yol açtığını bildiren çalışmalar da yer almaktadır (72, 122).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, HK-2 hücrelerinde, normoksik koşullarda ER stresi indüksiyonu sonrasında GRP-78, P-eIF-2 α ve CHOP düzeylerinin eşzamanlı olarak arttığı tespit edilirken (Şekil 26), hipoksi indüksiyonu sonrasında bu parametrelerde gözlenen farklılıklar proksimal tübüler hücrelerde hipoksi ve ER stresi ilişkisinin normoksik koşullardan daha farklı gerçekleştiğine işaret etmektedir (Şekil 33).

ER stresle ilişkili olarak hipoksik koşullarda normoksiye göre farklılık gösteren bulgular aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirilmiştir:

- GRP-78 düzeyinin hipoksi indüksiyonunun 4. saatinde, PCC ve 3-NT düzeylerinden daha sonra artmış olması, hipoksidede ER stresinin artan OS ve NS sonucunda oluştuğunu düşündürmüştür. İskemi-reperfüzyon hasarında O₂ ve glukoz yoksunluğunun ve bozulan Ca⁺² dengesinin ER stresine neden olduğu ileri süren makaleler bulunmaktadır (39, 72). Bunların yanısıra, hipoksi ve reperfüzyon ile artan OS ve NS'in ER'da protein katlanmasının aksamasına ve yanlış protein katlanmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (60, 70, 71, 155). Hatta hipoksi-reperfüzyon hasarında ER stresine ROT/RNT'nin yol açtığı ileri sürülmüş olup, bu görüş hipoksi indüksiyonu öncesinde OS veya NS'in çeşitli ajanlar ile inhibisyonunun ER stresi engellediği ve iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığını bildiren çalışmalar ile desteklenmiştir (49, 159). Bizim çalışmamızda da HK-2

hücrelerinde uygulanan hipoksi indüksiyonunun ardından PCC ve 3-NT düzeylerinin GRP-78'den daha erken artış göstermesi bu yayınları destekler niteliktedir.

- Hipoksizde, UPR aktivasyonu belirteçlerinden biri olan P-eIF-2 α 'nın GRP-78'e göre daha erken evrede ve HIF-1 α akümüasyonu ile birlikte artış göstermesi, PERK-eIF2 α yolağının ER stresinden farklı olarak HIF-1 α ile uyarılan adaptif bir yanıt olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda hipoksi indüksiyonu ile arttığı tespit edilen P-eIF-2 α ; protein sentezinde anahtar rol oynayan bir moleküldür. Bir translasyon başlama faktörü olan eIF-2 α ; UPR sinyal yollarından PERK'in aktifleşmesi ile fosforillenmekte ve hücrede global protein sentezi inhibisyonuna neden olmaktadır. Gerek *in vivo* deneysel çalışmalarda, gerekse hücre hatlarında oluşturulan hipoksi-reperfüzyon modellerinde böbrek hücrelerinde, en fazla proksimal tübül hücrelerde olmak üzere, PERK ve eIF-2 α 'nın fosforile olduğu gösterilmiştir (100).

Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda ise hipoksik koşullarda PERK yolağı aktivasyonunun ER stresden bağımsız olarak, enerji kullanımını azaltmak için, protein sentezini inhibe etmek suretiyle, HIF-1 α tarafından gerçekleştirilen adaptif bir yanıt olarak geliştiği öne sürülmektedir (12, 31, 51). 'Time-course' çalışmalarda GRP-78 düzeyi artışının, P-eIF-2 α fosforilasyon artışından daha sonra tespit edilmesi, P-eIF-2 α fosforilasyonunun HIF-1 α tarafından indüklenen, adaptif bir yanıt olduğunu düşündürmektedir.

PERK yolağı aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bir başka sonucumuz ise hem hipoksi, hem de reperfüzyon süresince artan katalaz düzeyidir. ER stresi ile aktive olan PERK- P-eIF2 α -ATF4 sinyal yolağının, Nrf2 aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Aktive olan Nrf2'nin, antioksidan yanıt elementine bağlanarak (ARE, antioxidant response element) antioksidan enzimlerin

ekspresyonunu arttırdığı ve hücreyi oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği öne sürülmüştür (60, 90, 91, 154). Söz konusu antioksidan enzimlerden biri olan katalaz ekspresyonu ARE ile düzenlenmektedir. Bu nedenle elde ettiğimiz bulgu, PERK yolağı aktivasyonunun katalaz artışında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

- Çalışmamızda HK-2 hücrelerinde normoksik koşullarda tunikamisin ile gerçekleştirdiğimiz ER stresi indüksiyonu sonrasında, pro-apoptotik bir belirteç olan CHOP düzeyi, diğer ER stresi parametreleri ile birlikte artış göstermiştir. Hipoksi-reperfüzyon koşulları altında ise CHOP ile ilgili bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuç, hücrelerde hipoksi-reperfüzyon süreçleri ile birlikte gelişen streslere karşı hücreyi korumak üzere, UPR mekanizmasının adaptif yollarının daha hakim olduğuna işaret etmektedir. CHOP; ER stresi ile indüklenen UPR aktivasyonunun pro-apoptotik etkileri ile ilişkili bir parametredir. Hücrede gerçekleşen strese karşı UPR mekanizmasının adaptif yanıtları yetersiz kaldığında, UPR ile ER stres ilişkili apoptoz yolu indüklenmekte ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Hipoksik koşullarda hücrede CHOP düzeyi ile ilgili farklı bulgular öne sürülmüştür. Zinsner ve ark.'ı (162), farelerde gerçekleştirilen CHOP inhibisyonunun, iskemi reperfüzyon hasarından sonra gözlenen apoptotik hücre ölümünü azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaya benzer olarak, HK-2 hücrelerinde 24 saatlik hipoksi indüksiyonu sonrasında diğer ER stresi belirteçleri ile birlikte CHOP düzeyinin arttığı ve ER stresin apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (159). Ancak bu yayınlarda sözü edilen hipoksik koşullar 'şiddetli hipoksi' olarak tanımlanmaktadır. Şiddetli hipoksi koşullanmasında, O₂ konsantrasyonu % 0.02'nin altına düşürülmekte olup, bu koşullar akut iskemi/hipoksi indüksiyonundan farklılık gösterir (8, 12).

Bi ve ark. (12) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, CHOP düzeyinin en az 16 saatlik şiddetli hipoksi sonrasında arttığını, bunun öncesinde CHOP indüksiyonunun gerçekleşmediğini belirledikten sonra, hipoksi ile aktive olan UPR'nin hücrenin hipoksik koşullara adaptasyonuna yardımcı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Tez çalışmamızda hipoksi ve reperfüzyon koşullarında ER stresi ve UPR aktivasyonu ile ilgili olarak elde ettiğimiz bulgular da bu görüşü destekler niteliktedir.

Diğer taraftan, reperfüzyon döneminde, hücrelerin O₂ konsantrasyonu normale döndüğü halde, ER stresinin ve UPR aktivasyonunun devam etmesi, bu süreçte daha da artış gösteren OS ve NS nedeniyle olabilir.

İskemik ABY'de gerçekleşen tüm bu hücrel değişiklikler, gelişen hipoksi-reperfüzyonun süresine ve şiddetine bağlı olarak hücre ölümüne yol açabilmektedir. HK-2 hücrelerinde gerçekleştirdiğimiz hipoksi ve reperfüzyon koşullarında, hücre ölümünü belirlemek için PARP ve kırılmış PARP düzeyleri incelenmiş olup, elde edilen bulgularda hipoksi indüksiyonunun 2. saatinden itibaren total PARP düzeyinin, 4. saatinden itibaren kırılmış PARP düzeyinin kontrole göre, anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 34). Reperfüzyon gerçekleştirilen hücrelerde ise, hücrelerde reperfüzyon sürecinin başlaması ile birlikte, kırılmış PARP düzeyinin, hipoksiye göre anlamlı olarak arttığı tespit edilirken, total PARP düzeyi hipoksik hücrelere benzer olarak bulunmuştur (Şekil 39).

PARP enzimi hem nekrotik, hem de apoptotik hücre ölüm yolları ile ilişkili bir DNA tamir enzimidir (21, 33, 147). Çalışmamızda hipokside, HK-2 hücrelerinde total PARP düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durumun hipoksi indüksiyonu ile azalan O₂ miktarı ve artan stres düzeyleri ile gelişen nekrotik hücre ölümü nedeniyle oluştuğu düşünülebilir. Aynı zamanda kırılmış PARP düzeyinin de artmış olması,

hipoksinin 4. saatinden itibaren kaspaz aktivasyonunun da gerçekleştiğine işaret etmektedir. PARP enzimine ait bu bulgular, HK-2 hücrelerinde hipoksik hasarda apoptotik ve nekrotik yolağın birlikte çalıştığını düşündürmüştür. Bununla birlikte, reperfüzyon döneminde PARP düzeyinin hipoksik koşullardakine benzer olarak bulunması, ancak kırılmış PARP düzeyinin daha da artmış olması ise, bu evrede apoptotik sürecin baskın olabileceğini düşündürmüştür.

Literatürde, böbreklerde iskemi-reperfüzyon hasarının apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü bir arada indükleyebildiğini ileri süren çalışmalar yer almaktadır (13, 142). Ayrıca hipoksi-reperfüzyon ile gerçekleşen nekrotik veya apoptotik hücre ölümünün sadece hücrelerde ATP konsantrasyonunun azalmasından kaynaklanmadığı, ayrıca hipoksi ile hücrelerde artan OS, NS ve ER stresinin de hücre ölümüne yol açan birer uyarıcı olduğu açıkça belirtilmiştir (26, 33, 37, 148). Bizim çalışmamızda da HK-2 hücrelerinde normoksik şartlar altında gerçekleştirdiğimiz OS, NS ve ER stresi indüksiyonlarının her birinin, doza/süreye bağımlı olarak, hem total PARP, hem de kırılmış PARP düzeyinde artışa yol açtığı görülmüştür (Şekil 21, 25, 29). Bu bulgular hipoksi ve reperfüzyon koşullarında gözlenen total PARP ve kırılmış PARP düzeylerindeki değişikliklerde bu streslerin rol oynadığı görüşünü kuvvetlendirmektedir.

Bizim bulgularımıza benzer olarak, çeşitli araştırmacılar tarafından ROT ve RNT radikallerinin hem apoptotik, hem de nekrotik hücre ölümüne neden olabileceği ileri sürülmüştür (44, 59). Farklı hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalarda ROT ve RNT artışının hücrede DNA hasarına yol açarak, PARP ekspresyonunda ve aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (37, 148).

Hipoksi-reperfüzyonun neden olduğu hücre hasarını inceleyen diğer bazı çalışmalarda da hipoksi indüksiyonu öncesinde, OS ve NS'in baskılanmasının apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü önemli derecede azalttığı bildirilmiş ve hipoksik hücrelerde hasardan asıl sorumlu olan mekanizmanın ROT olduğu vurgulanmıştır (24, 52).

HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon koşullarında elde edilen bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde, iskemik ABY hasarında OS ve NS artışının başlıca etmenler olduğu ve bu hasarda gelişen ER stresi ile aktive olan UPR yolağının OS ve NS'e karşı adaptif bir yanıt olarak ortaya çıktığı önerilebilir.

4.3 HK-2 Hücrelerinde MANF Proteininin OS, NS, ER Stresi ve İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Fonksiyonu

Kısaca MANF veya ARMET olarak adlandırılan bu protein daha önce de belirtildiği gibi, ER stresine yanıt olarak UPR tarafından up-regüle edildiği bildirilen, yeni bir salgı proteindir. ER stresine neden olan iskemide, MANF'ın ekspresyonunun indüklendiği bildirilmiştir (99). MANF'ın iskemik beyin ve kalp dokularında gelişen hasar ile ilişkili olduğu ve ER stresini baskılayarak nöroprotektif ve kardiyo-protektif etki gösterdiği de ileri sürülmüştür (140, 160).

Çalışmamızın ilk bölümünde, HK-2 hücrelerinde oluşturduğumuz iskemi-reperfüzyon'da ER stresinin arttığı tespit edilmiş ve literatür bulguları ile de desteklenmiştir. Günümüze kadar yapılan literatür araştırmasında, MANF'ın çalışma konumuz olan iskemik ABY patofizyolojisindeki rolü ile ilişkili bir çalışmanın rapor edilmediği belirlenmiştir. Bu nedenle, MANF'ın iskemik ABY patofizyolojisindeki olası rolü belirlenmeye çalışılmıştır.

Ayrıca, ilk bölümde bahsettiğimiz gibi, iskemik ABY patogeneğinde OS, NS ve ER stresi çok sıkı bir etkileşim içerisinde olup, hasarın başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. MANF'ın iskemik hasardaki fonksiyonunun daha iyi anlaşılabilmesi için hücre içi streslerle ilişkisinin de araştırılması ve birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, iskemik ABY'de MANF'ın fonksiyonu incelenirken, hipoksi ve reperfüzyon koşullarındaki etkilerinin yanı sıra, normoksik koşullarda OS, NS ve ER stresi üzerine etkilerinin de araştırılmasına karar verilmiştir.

Bu doğrultuda öncelikle HK-2 hücrelerinde OS, NS, ER stresi ve hipoksi-reperfüzyon gerçekleştirilerek indüksiyon süresine/indüksiyon ajanı konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerdeki endojen MANF düzeyi değişimleri belirlenmiştir. Hipoksi-reperfüzyon koşulları altında hücrelerdeki endojen MANF düzeyinin hipoksi süresine paralel olarak arttığı, hipoksi indüksiyonundan sonra reperfüze edilen hücrelerde ise MANF düzeyinin hipoksi indüksiyonunun hücrelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 43, 44).

Bununla birlikte, normoksik koşullarda yapılan OS, NS ve ER stresi indüksiyonlarından sonra da hücre içi MANF düzeyinin indüksiyon süresine/indüksiyon ajanı konsantrasyonuna paralel olarak arttığı tespit edilmiştir (Şekil 40-42).

Yaptığımız literatür araştırmasında, henüz MANF ile ilgili az sayıda çalışma olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında kardiyak miyosit hücre hattında, HeLa hücre hattında, nöronal hücre hattında, kalp ve beyin dokusunda MANF ekspresyonunun iskemi ile up-regüle olduğu bildirilmiştir (5, 83, 140, 160). Bununla birlikte, Mizobuchi ve ark. (99) sağlıklı farelerde dokularda MANF ekspresyonunu

inceledikleri çalışmalarında, birçok dokunun yanı sıra böbrek dokusunda da MANF ekspresyonunun gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Ancak, literatürde MANF ve iskemik böbrek hasarı ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, ilk kez böbrek proksimal tübüler hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon hasarında MANF protein düzeyinin arttığı gösterilmiştir.

MANF'ın ER stresi yanıt proteini olması nedeniyle, normoksik koşullarda yaptığımız 'time-course' ER stresi indüksiyonunun ardından, hücre içindeki miktarının artması beklenen bir durumdur. Ancak burada dikkat çekici olan nokta, ER stresi indüksiyonundan sonra hücre içi MANF protein düzeyinin pro-apoptotik CHOP düzeyinden daha önce artış göstermesidir (Şekil 26, 42). Elde ettiğimiz bu verilerin daha doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için, ilerleyen çalışmalarda aynı koşullarda her iki proteine ait mRNA düzeylerinin de karşılaştırılması gerekmektedir. Yu ve ark. (160), yaptıkları *in vivo* ve *in vitro* deneylerde, ER stresi ve iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında beyin dokusunda MANF'ın CHOP'den daha önce arttığını tespit etmişler ve iskemik doku hasarında MANF proteininin erken tanı belirteci olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Ayrıca, çalışmamızda OS ve NS indüksiyonu ile hücre içi MANF düzeylerinde artış tespit edilmesi, MANF'ın sadece ER stresi ve bununla ilişkili hipoksi-reperfüzyon hasarına karşı değil, aynı zamanda OS ve NS'e karşı da koruyucu etki gösterebileceğini düşündürmüştür. Yapılan literatür araştırmasında, MANF proteininin OS veya NS ile ilişkili olduğunu ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Voutilainen ve ark. (149) tarafından, sıçanlarda 6-

hidroksidopamin (6-OHDA) kullanarak oluşturulan Parkinson hastalığı modelinde MANF' in nöroprotektif etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 6-OHDA'nın mitokondriyal Kompleks I' i inhibe ederek ROT üretimini arttırdığı ve artan ROT düzeylerinin ER stresine neden olarak nörotoksik etki oluşturduğu ileri sürülmüştür (27). MANF'ın 6-OHDA'e karşı koruyucu etki göstermesi OS ve MANF arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

MANF'ın sitoprotektif olduğunu bildiren çalışmalarda, bu etkisini hücrelerde ER stresinin yanı sıra, hücre proliferasyonunu da inhibe ederek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. Bu bilgi göz önüne alınarak, stres indüksiyonlarını takiben arttığını tespit ettiğimiz MANF'ın, HK-2 hücrelerindeki düzeylerinin incelenmesinden önce, hücre proliferasyon hızı üzerine olan etkisi belirlenmiştir. Bu doğrultuda, hücrelerde geçici transfeksiyon yöntemi kullanılarak, MANF over-ekspresyonu ve MANF siRNA uygulaması gerçekleştirilerek, MANF ile hücre proliferasyon hızı arasındaki ilişki incelenmiştir. Elde edilen bulgularda, HK-2 hücrelerinde hücre içi MANF düzeyi ile proliferasyon hızı arasında ters bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Şekil 44, 45).

Bu bulgu, MANF'ın anti-proliferatif etkisi ile böbrek hücrelerinde koruyucu fonksiyonu olabileceği yönündeki düşüncemizi kuvvetlendirmiştir. Apostolou ve ark.'ı (5), HeLa hücrelerinde gerçekleştirdiği MANF over-ekspresyonu ve MANF siRNA deneylerinin sonucunda MANF'ın hücre proliferasyonunu baskılayarak sitoprotektif etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da HK-2 hücrelerinde MANF'ın anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiş olup, yukarıda belirtilen bulgulara benzerlik göstermektedir.

MANF'ın hücrede koruyucu etkisinin olabileceğine dair elde edilen bu ön bulguların ardından, hücre içi MANF ekspresyonunun arttırıldığı/susturulduğu koşullarda OS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon gerçekleştirildikten sonra, hücre canlılık testleri yapılmıştır. Streslere bağlı gelişen hücre ölümüne karşı koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Yaptığımız ön çalışmalarda, incelenen stresin etkisinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için hücrelerin en az 24 saat süre ile stres koşullarında inkübe edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Bu nedenle, ONOO⁻ ile gerçekleştirilen NS indüksiyonunun maksimum 10 dakika ile sınırlı olmasından dolayı, bu stres türünde hücre canlılık deneyi gerçekleştirilememiştir. MANF ve NS hasarı ile ilgili çalışmalar IB yöntemi ile incelenmiş olup, sonuçları ile ilgili bilgi aşağıda detaylı şekilde tartışılmıştır.

Hücre canlılık deneyleri sonucunda, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilen hücrelerde OS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon hasarına bağlı gelişen hücre ölümünün, kontrol hücrelerine göre, anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 47, 49, 52, 53). Bununla birlikte, MANF ekspresyonunun baskılandığı hücrelerde ise OS, ER stresi ve hipoksi-reperfüzyon hasarına bağlı hücre ölümünün kontrol hücrelerine göre daha yüksek olduğu tespit edilirken, hipoksi indüksiyonu sonrasında, kontrole göre, anlamlı bir artış olmadığı belirlenmiştir (Şekil 48, 50, 52, 54).

Elde edilen bu bulgular ile MANF'ın HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyon, OS ve ER stresi ile gelişen hücre ölümüne karşı koruyucu etkili olabileceği ilk kez gösterilmiştir.

Bu konu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalarda, iskemik kalp dokusunda MANF ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve kardiyomiyositlerde koruyucu etkisine

dikkat çekilmiştir (40, 41). Benzer şekilde, iskemik beyin dokusunda, indüksiyon süresine bağlı olarak, MANF ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve nöronlarda koruyucu etkili olabileceği ileri sürülmüştür (2, 3, 160).

MANF'in, anti-proliferatif ve ER stresi inhibisyonuna dayalı anti-apoptotik etkileri bildirilmiş olmakla birlikte, hücrelerdeki koruyucu etkisinin hangi mekanizmalar ile gerçekleştirdiğini açıklayabilen çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MANF'in OS ve NS'e karşı koruyucu etki gösterdiğine dair elde ettiğimiz yeni bulgular, iskemik hasardaki koruyucu etkisinde, hücre içi streslerin ve etkiledikleri sinyal yollarının da rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bu doğrultuda, çalışmamızda MANF ekspresyonunun arttırıldığı/baskılandığı hücrelerde OS, NS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilen hücrelerde normoksi ve hipoksi-reperfüzyon şartlarında OS, NS ve ER stresi düzeylerinin kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Şekil 55-59). Hücrelerde MANF ekspresyonunun baskılanması ise tam tersi etki göstererek, stres indüksiyonları sonrasında hasarın daha da şiddetlenmesine neden olmuştur (Şekil 60-64).

Elde ettiğimiz bulgular, MANF'in iskemik hasardaki sitoprotektif etki mekanizmasında, OS ve NS koşullarındaki etkilerinin de önemli rol oynadığını göstermiştir. MANF'in, OS ve NS'e yanıt olarak ekspresyonunun artması ve bu streslere karşı koruyucu etki göstermesi, OS ve NS artışı ile seyreden diğer patofizyolojik durumlarda da değerlendirilmesi gereken bir protein olduğunu ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, hücrelerde hipoksiye adaptif yanıt olarak aktive olan HIF-1 α düzeyi ile MANF düzeyi arasında zıt bir ilişki olduğu tespit edilmiş olup, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilen hücrelerde HIF-1 α düzeyi azalırken, MANF siRNA uygulanan hücrelerde HIF-1 α düzeyinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 58, 59, 63, 64). HIF-1 α , hücrelerde 100'den fazla genin transkripsiyonunun düzenlenmesinde etkin rol oynayan bir hücresel bileşendir. Bu nedenle, MANF ve HIF-1 α arasındaki ilişkinin ilerleyen çalışmalar ile detaylı şekilde incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca, hücrelerde MANF ekspresyonu artışının, total PARP düzeyi üzerinde farklı bir etkiye neden olabileceği gözlenmiştir (Şekil 55-59). MANF siRNA gerçekleştirilen hücrelerde ise bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 60-64). PARP'ın asetilasyon, fosforilasyon, sumoilizasyon ve ribozilasyon olmak üzere, 4 farklı şekilde modifiye olduğu ve bu modifikasyonların her birinin PARP aktivitesi üzerinde farklı bir etkisi olduğu bildirilmiştir (67, 87). İleride yapılacak çalışmalar ile, MANF over-ekspresyonu ile gerçekleşen bu farklılığın PARP aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesinin, MANF'in hücredeki etkilerinin açıklanmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bir diğer önemli bulgu ise, MANF over-ekspresyonunun, hücrelerdeki NS, ER stresi ve hipoksi ile indüklenmiş iNOS artışını baskılamasıdır (Şekil 55-59). Hücrelerdeki iNOS ekspresyonu NF- κ B yolağı ile düzenlenmektedir. NF- κ B sinyal yolağı, hücrelerde inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (114). İlerleyen çalışmalarda, MANF ve iNOS arasındaki ilişki detaylı olarak incelenerek, bu karşı etkileşimin nasıl gerçekleştiğinin belirlenmesi gereklidir. Eğer MANF, iNOS ekspresyonunu NF- κ B yolağını inhibe ederek gerçekleştiriyorsa, bu fonksiyon MANF'in olası anti-inflamatuvar özelliğinin de ortaya çıkartılması açısından önem taşımaktadır.

Tez çalışmamızda son olarak, bir salgı proteini olan MANF'ın parakrin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, öncelikle HK-2 hücrelerine MANF transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra, besiyerindeki MANF protein düzeyi, IP yöntemi ile tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgularda besiyerine salgılanan MANF düzeyinin, hücre içi MANF ekspresyonuna paralel olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 65).

Bu tespitin ardından, besiyerine salgılanan MANF'ın hücreler üzerindeki parakrin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, MANF over-ekspresyonu gerçekleştirilerek, MANF içeriği arttırılan besiyerleri toplanıp, normal hücrelerin üzerine eklenmiş, ardından OS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarındaki hücre canlılıkları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, MANF içeren besiyeri eklenen hücrelerde stres indüksiyonları ile gelişen hücre ölümlerinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 66). Bu bulgu, HK-2 hücrelerinden salgılanan MANF'ın parakrin etki ile çevredeki hücreler üzerinde de koruyucu etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Literatürde yer alan çalışmalarda, MANF'ın hem hücre içinde bulunduğu, hem de hücreden salgılandığı bildirilmiş olup, hücreden salgılanan MANF düzeyinin ER stresi ile arttığı tespit edilmiştir (5, 99). Tadimalla ve ark.'ları (140) ventriküler miyosit hücre hattında yaptıkları çalışmada, besiyerine ekledikleri rekombinant MANF proteininin hücrelerde sitoprotektif etki gösterdiğini tespit ettikten sonra, MANF'ın parakrin etkisinin olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ancak parakrin etkisi ile ilgili olarak, hücrede endojen olarak sentezlenip besiyerine salgılanan MANF ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır (140). İlk kez bu çalışma sonucunda, HK-2 hücrelerinden salgılanan MANF proteininin parakrin ve koruyucu etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızın bu bölümünde, HK-2 hücrelerinde MANF'ın hem hipoksi-reperfüzyon, hem de OS, NS ve ER stresi ile gelişen hücre hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceği ilk kez belirlenmiştir. Bu bulgularımız, iskemik ABY'de MANF'ın renoprotektif bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, ER stresi yanıt proteini olarak tanımlanan MANF'ın OS ve NS'e karşı da hücrede koruyucu etkisi olduğu bu çalışma ile tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızın, henüz fonksiyonları yeteri kadar aydınlatılmamış olan MANF'ın renoprotektif etkisini ve hücrel stresler üzerindeki etkilerini ortaya çıkarması açısından literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

İskemik Akut Renal Yetmezlikte Oksidatif/Nitrozatif Stres ve Endoplazmik Retikulum (ER) Stresinin Etkileşimleri ve ER Stres Yanıt Proteini MANF/ARMET'in Fonksiyonunun Araştırılması

Bu çalışmanın ilk bölümünde insan proksimal tübüler epitelyal (HK-2) hücre hattında iskemik akut böbrek yetmezliği (ABY) modeli oluşturulduktan sonra, hipoksi-reperfüzyon koşullarında oksidatif stres (OS), nitrozatif stres (NS) ve endoplazmik retikulum (ER) stresleri 'time course' deneyleri yapılarak IB tekniği ile incelenmiştir.

HK-2 hücrelerinde hipoksi-reperfüzyonun OS, NS ve ER stresine neden olduğu tespit edilmiştir. Normoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarında elde edilen sonuçlar; OS ve NS artışının iskemik böbrek doku hasarı gelişiminde başlıca etmenler olduğuna ve UPR aktivasyonunun OS ve NS'e karşı adaptif bir yanıt olarak geliştiğine işaret etmektedir.

İkinci bölümde ise bir ER stresi yanıt proteini olan MANF/ARMET'in normoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarındaki protein düzeyleri incelenmiş ve olası parakrin etkisi ve hücrel stresler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

HK-2 hücrelerinde OS, NS, ER stresi, hipoksi ve hipoksi-reperfüzyon koşullarının MANF/ARMET protein düzeyinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. MANF/ARMET over-ekspresyonu ve MANF/ARMET siRNA uygulaması gerçekleştirilen hücrelerde:

a) MANF/ARMET düzeyi ile hücre proliferasyon hızı arasında ters bir ilişki olduğu,

b) OS, ER stresi ve hipoksi-reperfüzyon hasarına bağlı gelişen hücre ölümünün ve hücre içi stres düzeylerinin MANF/ARMET over-ekspresyonu ile azaldığı, MANF siRNA uygulaması ile arttığı,

c) Besiyerine salgılanan MANF/ARMET proteinin OS, NS, ER stresi ve hipoksi-reperfüzyon hasarına bağlı gelişen hücre ölümünü azalttığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular ile HK-2 hücrelerinde MANF/ARMET'in hem hipoksi-reperfüzyon, hem de OS, NS ve ER stresi ile gelişen hücre hasarına karşı koruyucu etkisinin olabileceği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

ABSTRACT

Investigation of The Relationship Between Oxidative/Nitrosative Stress and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and The Function of MANF/ARMET as an ER Stress Response Protein In Ischemic Acute Renal Failure

In the first part of the study, ischemic acute renal failure model has been established by using proximal tubular epithelial cells (HK-2 cell line). Then, oxidative stress (OS), nitrosative stress (NS) and endoplasmic reticulum (ER) stress under hypoxia-reperfusion conditions were examined with time-course experiments by immunoblotting technique.

It was detected that hypoxia- reperfusion triggers OS, NS and ER stress in HK-2 cells. The results obtained under normoxia and hypoxia-reperfusion conditions pointed out that the increase in OS and NS are the main causes of ischemic renal injury and UPR activation is developed as an adaptive response to OS and NS.

In the second part of the study, the protein levels of MANF/ARMET, which is an ER stress response protein, under normoxia and hypoxia-reperfusion conditions have been evaluated and its possible paracrine effect and effects on cellular stress were investigated.

It was found that the inductions of OS, NS, ER stress, hypoxia and hypoxia reperfusion cause an increase in the level of MANF/ARMET protein in HK-2 cells. In the cells after the procedures of MANF/ARMET over-expression and MANF/ARMET siRNA treatment;

a) There was an inverse correlation between MANF/ARMET protein level and cell proliferation rate,

b) The cell death induced by OS, ER stress and hypoxia-reperfusion injury, and the intracellular stress levels were decreased with overexpression of MANF/ARMET and were increased by MANF siRNA treatment,

c) The cell death induced by OS, NS, ER stress and hypoxia-reperfusion injury were reduced by secreted MANF/ARMET.

The protective intracellular and paracrine effects of MANF/ARMET against cell damage developed either by hypoxia-reperfusion or OS, NS and ER stress were realized and reported for the first time in this study.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Agbani, E.O., Coats, P., Mills, A., and Wadsworth, R.M. (2011) Peroxynitrite stimulates pulmonary artery endothelial and smooth muscle cell proliferation: involvement of ERK and PKC. *Pulm Pharmacol Ther.* 24(1): p. 100-9.
2. Airavaara, M., Chiocco, M.J., Howard, D.B., Zuchowski, K.L., Peranen, J., Liu, C., *et al.* (2010) Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury. *Exp Neurol.* 225(1): p. 104-13.
3. Airavaara, M., Shen, H., Kuo, C.C., Peranen, J., Saarma, M., Hoffer, B., *et al.* (2009) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. *J Comp Neurol.* 515(1): p. 116-24.
4. Akcay, A., Nguyen, Q., and Edelstein, C. L. (2009) Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* 2009: p. 137072.
5. Apostolou, A., Shen, Y., Liang, Y., Luo, J., and Fang, S. (2008) Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp Cell Res.* 314(13): p. 2454-67.
6. Araujo, M., and Welch, W. J. (2006) Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 15(72-77).
7. Ariumi, Y., Uedab, K., Masutani, M., Copelandd, T. D., Nodae, M., Hatanakaa, M., Shimotohnoa, K. (1998) In vivo phosphorylation of

poly(ADP-ribose) polymerase is independent of its activation. *FEBS Letters*. 436 p. 288-292.

8. Basile, D.P., Anderson, M. D., and Sutton, T. A. (2012) Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol*. 2(2): p. 1303-53.
9. Becker, L.B., vanden Hoek, T.L., Shao, Z.H., Li, C.Q., and Schumacker, P.T. (1999) Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol*. 277(6 Pt 2): p. H2240-6.
10. Beckman, J.S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* . 9: p. 836-844.
11. Benhar, M., Forrester, M. T., and Stamler, J. S. (2006) Nitrosative stress in the ER: a new role for S-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *ACS Chem Biol*. 1(6): p. 355-8.
12. Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., *et al.* (2005) ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*. 24(19): p. 3470-81.
13. Bonegio, R., and Lieberthal, W. (2002) Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 11: p. 301-308.
14. Bonventre, J.V. (2003) Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 14(8): p. 2199-2210.
15. Bonventre, J.V., and Yang, L. (2011) Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 121(11): p. 4210-21.

16. Breggia, A.C., and Himmelfarb, J. (2008) Primary mouse renal tubular epithelial cells have variable injury tolerance to ischemic and chemical mediators of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1(1): p. 33-38.
17. Cachofeiro, V., Goicochea, M., de Vinuesa, S.G., Oubina, P., Lahera, V., and Luno, J. (2008) Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl*, (111): p. S4-9.
18. Carden, D.L., and Granger, D.N. (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190(255-266).
19. Cassavaugh, J., and Lounsbury, K. M. (2011) Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem.* 112(3): p. 735-44.
20. Castello, P.R., David, P.S., McClure, T., Crook, Z., and Poyton, R.O. (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 3(4): p. 277-87.
21. Chaitanya, G.V., Steven, A. J., and Babu, P. P. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 8: p. 31.
22. Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: p. 11715-11720.

23. Chang, S., Jiang, X., Zhao, C., Lee, C., and Ferriero, D.M. (2008) Exogenous low dose hydrogen peroxide increases hypoxia-inducible factor-1 α protein expression and induces preconditioning protection against ischemia in primary cortical neurons. *Neurosci Lett.* 441(1): p. 134-8.
24. Chatterjee, P.K. (2007) Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 376(1-2): p. 1-43.
25. Chatterjee, P.K., Cuzzocrea, S., Brown, P.A.J., Zacharowski, K., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., *et al.* (2000) Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 58: p. 658-673.
26. Chatterjee, P.K., Cuzzocrea, S., and Thiemermann, C. (1999) Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int.* 56(3): p. 973-84.
27. Chen, G., Bower, K.A., Ma, C., Fang, S., Thiele, C.J., and , and Luo, J. (2004) Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *The FASEB Journal* 18(10): p. 1162-64.
28. Chen, Y.T., Sun, C.K., Lin, Y.C., Chang, L.T., Chen, Y.L., Tsai, T.H., *et al.* (2011) Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med.* 9: p. 51.
29. Choi, D.E., Jeong, J.Y., Lim, B.J., Chung, S., Chang, Y.K., Lee, S.J., *et al.* (2009) Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297(2): p. F362-70.

30. Chun, Y.-S., Kim, M-S. and Park J-W. (2002) Oxygen-Dependent and - Independent Regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci* 17(581-588).
31. Cybulsky, A.V., Takano, T., Papillon, J., and Bijian, K. (2005) Role of the endoplasmic reticulum unfolded protein response in glomerular epithelial cell injury. *J Biol Chem.* 280(26): p. 24396-403.
32. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta.* 329(1-2): p. 23-38.
33. Devalaraja-Narashimha, K., Singaravelu, K. and Padanilam, B. J. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure. *Pharmacol Res.* 52(1): p. 44-59.
34. Devarajan, P. (2006) Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 17(6): p. 1503-20.
35. Ding, W., Yang, L., Zhang, M., and Gu, Y. (2012) Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress contributes to aldosterone-induced apoptosis in tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 418(3): p. 451-6.
36. El Sabbahy, M.a.V., V. S. (2011) Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 3(5): p. 606-18.
37. Erdelyi, K., Bakondi, E., Gergely, P., Szabo, C., and Virag, L. (2005) Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.* 62(7-8): p. 751-9.

38. Erek, E., Süleymanlar, G., Serdengeçti, K. (2007) Türkiyede nefroloji-diyaliz ve transplantasyon. *Türk nefroloji derneği yayınları*. Ankara.
39. Fougeray, S., Bouvier, N., Beaune, P., Legendre, C., Anglicheau, D., Thervet, E., *et al.* (2011) Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis.* 2: p. e143.
40. Glembotski, C.C. (2011) Functions for the cardiomyokine, MANF, in cardioprotection, hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 51(4): p. 512-7.
41. Glembotski, C.C., Thuerauf, D.J., Huang, C., Vekich, J.A., Gottlieb, R.A., and Doroudgar, S. (2012) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor protects the heart from ischemic damage and is selectively secreted upon sarco/endoplasmic reticulum calcium depletion. *J Biol Chem.* 287(31): p. 25893-904.
42. Goligorsky, M.S., Brodsky, S.V. and Noiri, E. (2002) Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney International.* 61: p. 855–861.
43. Groves, J.T. (1999) Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: p. 226-235.
44. Ha, H.C. and Snyder, S.H. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(24): p. 13978-82.
45. Haase, V.H. (2006) Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: p. 271-281.

46. Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1(5): p. 358-64.
47. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 219(1): p. 1-14.
48. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* . 219: p. 1-14.
49. Hammond, E.M., Dorie, M. J. and Giaccia, A. J. (2003) ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation. *J Biol Chem.* 278(14): p. 12207-13.
50. Haque, R., Chun, E., Howell, J.C., Sengupta, T., Chen, D., and Kim, H. (2012) MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One.* 7(8): p. e42542.
51. Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., *et al.* (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11(3): p. 619-33.
52. Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., *et al.* (2010) Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function. *J Biol Chem.* 285(17): p. 13045-56.
53. Haynes, C.M., Titus, E. A. and Cooper, A. A. (2004) Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell.* 15(5): p. 767-76.

54. Heyman, S.N., Evans, R.G., Rosen, S., and Rosenberger, C. (2012) Cellular adaptive changes in AKI: mitigating renal hypoxic injury. *Nephrol Dial Transplant.* 27(5): p. 1721-8.
55. Heyman, S.N., Khamaisi, M., Rosen, S., and Rosenberger, C. (2008) Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 28(6): p. 998-1006.
56. Hsieh, Y.H., Su, I.J., Lei, H.Y., Lai, M.D., Chang, W.W., and Huang, W. (2007) Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by iNOS. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(3): p. 643-8.
57. Huang, L.E. (1999) Inhibition of Hypoxia-inducible Factor 1 Activation by Carbon Monoxide and Nitric Oxide. Implications For Oxygen Sensing And Signaling. *Journal of Biological Chemistry.* 274(13): p. 9038-9044.
58. Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: p. 7987-7992.
59. Huang, Q. and Shen, H.M. (2009) To die or to live: the dual role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage. *Autophagy.* 5(2): p. 273-6.
60. Inagi, R. (2009) Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* 112(1): p. e1-9.
61. Inagi, R. (2011) Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol.* 491: p. 361-80.

62. Ischiropoulos, H. and Gow, A. (2005) Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. *Toxicology*. 208(2): p. 299-303.
63. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., *et al.* (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 292(5516): p. 468-72.
64. Jager, R., Bertrand, M.J., Gorman, A.M., Vandenabeele, P., and Samali, A. (2012) The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell*. 104(5): p. 259-70.
65. Jung, F. (2002) Hypoxic Induction of the Hypoxia-Inducible Factor Is Mediated via the Adaptor Protein Shc in Endothelial Cells. *Circulation Research*. 91(1): p. 38-45.
66. Jung, F., Palmer, L.A., Zhou, N., and Johns, R.A. (2000) Hypoxic Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase via Hypoxia Inducible Factor-1 in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*. 86(3): p. 319-325.
67. Kauppinen, T.M., Chan, W.Y., Suh, S.W., Wiggins, A.K., Huang, E.J., and Swanson, R.A. (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(18): p. 7136-41.
68. Kaushal, G.P., Basnakian, A. G. and Shah, S. V. (2004) Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 66(2): p. 500-6.
69. Kim, J., Jang H. and Park, K. M. (2010) Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal

- ischemia and reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298: p. F158-F166.
70. Kitamura, M. (2008) Endoplasmic reticulum stress in the kidney. *Clin Exp Nephrol.* 12(5): p. 317-25.
71. Kitamura, M.a.H., N. (2010) The oxidative stress: endoplasmic reticulum stress axis in cadmium toxicity. *Biometals.* 23(5): p. 941-50.
72. Kuznetsov, G., Bush, K.T., Zhang, P.L., and Nigam, S.K. (1996) Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16): p. 8584-9.
73. Lai, E., Teodoro, T. and Volchuk, A. (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda).* 22: p. 193-201.
74. Lameire, N.H., Bagga, A., Cruz, D., De Maeseneer, J., Endre, Z., Kellum, J.A., *et al.* (2013) Acute kidney injury: an increasing global concern. *The Lancet.* 382: p. 170-179.
75. Liang, M. and Knox, F.G. (2000) Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 278: p. R1117-R1124.
76. Liano, F. and Pascual, J. (1996) Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int.* 50(3): p. 811-8.

77. Lieberthal, R.B.a.W. (2002) Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: p. 301-308.
78. Lieberthal, W. (1998) Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury, role of nitric oxide and inflammatory response. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 7: p. 289-295.
79. Lieberthal, W., Koh, J. S. and Levine, J. S. (1998) Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol*. 18(5): p. 505-18.
80. Lieberthal, W., Menza, S. A. and Levine, J. S. (1998) Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol*. 274(2 Pt 2): p. F315-27.
81. Lin, J.H., Walter, P. and Yen, T. S. (2008) Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 3: p. 399-425.
82. Lindholm, P., Peranen, J., Andressoo, J.O., Kalkkinen, N., Kokaia, Z., Lindvall, O., *et al.* (2008) MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. *Mol Cell Neurosci*. 39(3): p. 356-71.
83. Lindholm, P. and Saarma, M. (2010) Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol*. 70(5): p. 360-71.
84. Ling, H., Gengaro, P.E., Edelstein, C.L., Martin, P.-Y., Wangsiripaisan, A., Nemenoff, R., *et al.* (1998) Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from NO syntetase knockout mice. *Kidney Int*. 53: p. 1642-1646.

85. Liu, W., Shen, S.-M., Zhao, X.-Y., and Chen, G.-Q. (2012) Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol.* 3(2): p. 165-178.
86. Liu, W., Shen, S.M., Zhao, X.Y., and Chen, G.Q. (2012) Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol.* 3(2): p. 165-78.
87. Luo, X. and Kraus, W.L. (2012) On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 26(5): p. 417-32.
88. Madesh, M. and Hajnoczky, G. (2001) VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol.* 155(6): p. 1003-15.
89. Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol.* 18(6): p. 716-31.
90. Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 9(12): p. 2277-93.
91. Malhotra, J.D. and Kaufman, R.J. (2011) ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(9): p. a004424.
92. Malhotra, R., Tyson, D.W., Rosevear, H.M., and Brosius, F.C., 3rd (2008) Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced

- apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. *BMC Cardiovasc Disord.* 8: p. 9.
93. Maxwell, P. (2003) HIF-1: An Oxygen Response System with Special Relevance to the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology.* 14(11): p. 2712-2722.
94. McKelvey, T.G., Hollwarth, M.E., Granger, D.N., Engerson, T.D., Landler, U., and Jones, H.P. (1988) Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol.* 254(5 Pt 1): p. G753-60.
95. Meilhac, O.Z., M.; Santanam, N.; Parthasarathy, S. and (2000) Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *J. Lipid Res.* 41: p. 1205–1213.
96. Melillo, G. (1997) Functional Requirement of the Hypoxia-responsive Element in the Activation of the Inducible Nitric Oxide Synthase Promoter by the Iron Chelator Desferrioxamine. *Journal of Biological Chemistry.* 272(18): p. 12236-12243.
97. Millonig, G., Hegedusch, S., Becker, L., Seitz, H.K., Schuppan, D., and Mueller, S. (2009) Hypoxia-inducible factor 1 alpha under rapid enzymatic hypoxia: cells sense decrements of oxygen but not hypoxia per se. *Free Radic Biol Med.* 46(2): p. 182-91.
98. Miyata, T., Takizawa, S., and van Ypersele de Strihou, C. (2011) Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(2): p. C226-31.

99. Mizobuchi, N., Hoseki, J., Kubota, H., Toyokuni, S., Nozaki, J., Naitoh, M., *et al.* (2007) ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. *Cell Struct Funct.* 32(1): p. 41-50.
100. Montie, H.L., Kayali, F., Haezebrouck, A.J., Rossi, N.F., and Degracia, D.J. (2005) Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK. *Biochim Biophys Acta.* 1741(3): p. 314-24.
101. Mount, P.F. and Power, D.A. (2006) Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf).* 187(4): p. 433-46.
102. Mueller, S., Millonig, G., and Waite, G.N. (2009) The GOX/CAT system: a novel enzymatic method to independently control hydrogen peroxide and hypoxia in cell culture. *Adv Med Sci.* 54(2): p. 121-35.
103. Munshi, R., Hsu, C., and Himmelfarb, J. (2011) Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Med.* 9: p. 11.
104. Nagel, S., Talbot, N.P., Mecinovic, J., Smith, T.G., Buchan, A.M., and Schofield, C.J. (2010) Therapeutic manipulation of the HIF hydroxylases. *Antioxidants & Redox Signaling.* 12(4): p. 481-501.
105. Nangaku, M. and Eckardt, K.U. (2007) Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med (Berl).* 85(12): p. 1325-30.
106. Nangaku, M., Inagi, R., Miyata, T., and Fujita, T. (2008) Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease. *Nephron Exp Nephrol.* 110(1): p. 1-7.
107. Nath, K.A. and Norby, S.M. (2000) Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med.* 109(8): p. 665-78.

108. Niecknig, H., Tug, S., Reyes, B.D., Kirsch, M., Fandrey, J., and Berchner-Pfannschmidt, U. (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Radic Res.* 46(6): p. 705-17.
109. Noiri, E., Nakao, A., Uchida, K., Tsukahara, H., Ohno, M., Fujita, T., *et al.* (2001) Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281(5): p. F948-57.
110. Oh-Hashi, K., Hirata, Y., and Kiuchi, K. (2013) Transcriptional regulation of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in Neuro2a cells. *Cell Mol Biol Lett.* 18(3): p. 398-415.
111. Ohta, S., Hattori, Y., Nakanishi, N., Sugimoto, H., and Kasai, K. (2011) Differential modulation of immunostimulant-triggered NO production by endoplasmic reticulum stress inducers in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 57(4): p. 434-8.
112. Oliver, B.L., Cronin, C.G., Zhang-Benoit, Y., Goldring, M.B., and Tanzer, M.L. (2005) Divergent stress responses to IL-1beta, nitric oxide, and tunicamycin by chondrocytes. *J Cell Physiol.* 204(1): p. 45-50.
113. Ostergaard, L., Simonsen, U., Eskildsen-Helmond, Y., Vorum, H., Uldbjerg, N., Honore, B., *et al.* (2009) Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmatic stress proteins in human endothelial cells. *Proteomics.* 9(19): p. 4457-67.
114. Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18(49): p. 6853-66.

115. Palmer, L.A., Semenza, G.L., Stoler, M.H., and Johns, R.A. (1998) Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am. J. Physiol.* . 274(18): p. 212-219.
116. Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., *et al.* (2007) Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.* 27(3): p. 912-25.
117. Park, J.-W.C., Y-S.; Kim, Y.-H.; Kim, C-H.; Kim, M-S. (1997) Ischemic preconditioning reduces O₂ generation and prevents respiratory impairment in the mitochondria of post-ischemic reperfused heart of rat. *Life Sciences.* 60(24): p. 2207-2219.
118. Peresleni, T., Noiri, E., Bahou, W.F., and Goligorsky, M.S. (1996) Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *Am J Physiol.* 270(6 Pt 2): p. F971-7.
119. Petrova, P., Raibekas, A., Pevsner, J., Vigo, N., Anafi, M., Moore, M.K., *et al.* (2003) MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci.* 20(2): p. 173-88.
120. Poyton, R.O., Ball, K.A., and Castello, P.R. (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 20(7): p. 332-40.
121. Poyton, R.O., Castello, P.R., Ball, K.A., Woo, D.K., and Pan, N. (2009) Mitochondria and hypoxic signaling: a new view. *Ann N Y Acad Sci.* 1177: p. 48-56.

122. Prachasilchai, W., Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Aikawa, C., Uchida, K., *et al.* (2008) A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury. *Eur J Pharmacol.* 592(1-3): p. 138-45.
123. Qutub, A.A. and Popel, A.S. (2008) Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1alpha differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol.* 28(16): p. 5106-19.
124. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001) Unraveling Peroxynitrite Formation In Biological Systems. *Free Radical Biology & Medicine.* 30(5): p. 463-488.
125. Raedschelders, K., Ansley, D.M., and Chen, D.D. (2012) The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 133(2): p. 230-55.
126. Rosenberger, C., Mandriota, S., Jurgensen, J.S., Wiesener, M.S., Horstrup, J.H., Frei, U., *et al.* (2002) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 13(7): p. 1721-32.
127. Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14(1): p. 20-8.
128. Ryan, M.J., Johnson, G., Kiuu, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A., and Torok-Storb, B. (1994) HK-2 An immortalized proximal tubule epithelial cell line. *Kidney International* 45: p. 48-57.

129. Schley, G., Klanke, B., Schodel, J., Kroning, S., Turkoglu, G., Beyer, A., *et al.* (2012) Selective stabilization of HIF-1alpha in renal tubular cells by 2-oxoglutarate analogues. *Am J Pathol.* 181(5): p. 1595-606.
130. Schumer, N., Colombel, M.C., Sawczuk, I.S., Gobe, G., Connor, J., O'Toole, K.M., *et al.* (1992) Morphologic, Biochemical, and Molecular Evidence of Apoptosis During the Reperfusion Phase After Brief Periods of Renal Ischemia. *American Journal of Pathology.* 140(4): p. 831-838.
131. Shang, F. and Taylor, A. (2011) Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 51(1): p. 5-16.
132. Shen, C.Y., Lee, J.F., Su, C.L., Wang, D., and Chen, C.F. (2008) Hypoxia and reoxygenation of the lung tissues induced mRNA expressions of superoxide dismutase and catalase and interventions from different antioxidants. *Transplant Proc.* 40(7): p. 2182-4.
133. Shen, X., Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 28(1-2): p. 79-92.
134. Sheridan, A.M. and Bonventre, J.V. (2000) Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 9(4): p. 427-34.
135. Shridhar, R., Shridhar, V., Rivard, S., Siegfried, J.M., Pietraszkiewicz, H., Ensley, J., *et al.* (1996) Mutations in the arginine-rich protein gene, in lung, breast, and prostate cancers, and in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 56(24): p. 5576-8.

136. Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82(2): p. 291-5.
137. Souza, J.M.D., E.; Yudkoff, M.; Raman, C. S.; Ischiropoulos, H. (1999) Factors Determining the Selectivity of Protein Tyrosine Nitration. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 371(2): p. 169-178.
138. Stowe, D.F. and Camara, A.K. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* 11(6): p. 1373-414.
139. Sun, J. and Trumpower, B.L. (2003) Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 419(2): p. 198-206.
140. Tadimalla, A., Belmont, P.J., Thuerauf, D.J., Glassy, M.S., Martindale, J.J., Gude, N., *et al.* (2008) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart. *Circ Res.* 103(11): p. 1249-58.
141. Thurman, J.M. (2007) Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol.* 123(1): p. 7-13.
142. Toronyi, E., Lord, R., Bowen, I.D., Perner, F., and Szende, B. (2001) Renal tubular cell necrosis and apoptosis in transplanted kidneys. *Cell Biol Int.* 25(3): p. 267-70.
143. Tu, B.P. and Weissman, J.S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol.* 164(3): p. 341-6.

144. Uehara, T. (2007) Accumulation of misfolded protein through nitrosative stress linked to neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal*. 9(5): p. 597-601.
145. van der Vlies, D., Makkinje, M., Jansens, A., Braakman, I., Verkleij, A.J., Wirtz, K.W., *et al.* (2003) Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid Redox Signal*. 5(4): p. 381-7.
146. Venkatachalam, M.A., Bernard, D.B., Donohoe, J.F., and Levinsky, N.G. (1978) Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int*. 14(1): p. 31-49.
147. Virag, L. and Szabo, C. (2002) The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacological Reviews*. 54(3): p. 375-429.
148. Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., and Szabo, C. (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 140-141: p. 113-24.
149. Voutilainen, M.H., Back, S., Porsti, E., Toppinen, L., Lindgren, L., Lindholm, P., *et al.* (2009) Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 29(30): p. 9651-9.
150. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(5510-5514).

151. Weight, S.C., Bell, P.R., and Nicholson, M.L. (1996) Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg.* 83(2): p. 162-70.
152. Weinberg, J.M. (1991) The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney International.* 39: p. 476-500.
153. Werno, C., Zhou, J., and Brune, B. (2008) A23187, ionomycin and thapsigargin upregulate mRNA of HIF-1alpha via endoplasmic reticulum stress rather than a rise in intracellular calcium. *J Cell Physiol.* 215(3): p. 708-14.
154. Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 115(10): p. 2656-64.
155. Xu, K.Y., Huso, D.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., and Becker, L.C. (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(2): p. 657-62.
156. Ye, J., Li, J., Yu, Y., Wei, Q., Deng, W., and Yu, L. (2010) L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul Pept.* 161(1-3): p. 58-66.
157. Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Okamura, M., Du, S., Kasai, A., *et al.* (2008) Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem.* 283(7): p. 4252-60.
158. Yousefipour, Z., Oyekan, A., and Newaz, M. (2010) Interaction of oxidative stress, nitric oxide and peroxisome proliferator activated receptor gamma in acute renal failure. *Pharmacol Ther.* 125(3): p. 436-45.

159. Yu, W., Sheng, M., Xu, R., Yu, J., Cui, K., Tong, J., *et al.* (2013) Berberine protects human renal proximal tubular cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibiting endoplasmic reticulum and mitochondrial stress pathways. *J Transl Med.* 11: p. 24.
160. Yu, Y.Q., Liu, L.C., Wang, F.C., Liang, Y., Cha, D.Q., Zhang, J.J., *et al.* (2010) Induction profile of MANF/ARMET by cerebral ischemia and its implication for neuron protection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(1): p. 79-91.
161. Zepeda, A.B., Pessoa, A., Jr., Castillo, R.L., Figueroa, C.A., Pulgar, V.M., and Farias, J.G. (2013) Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct.* 31(6): p. 451-9.
162. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., *et al.* (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12(7): p. 982-95.

ÖZGEÇMİŞ

SOYADI: AYDIN KÖSE

ADI: Fadime

DOĞUM YERİ: Ceyhan/Adana

DOĞUM TARİHİ: 06.04.1983

ADRES: Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Biyokimya A.D.

E-POSTA: fadime.aydin@ege.edu.tr

TELEFON: 0232 3111010/ 3986
0532 508 3768 (GSM)

FAKS: 0232 3885258

YABANCI DİL: İngilizce

EĞİTİM

2009-..... Doktora, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyokimya (Eczacılık) Programı

2006-2009 Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Biyokimya (Eczacılık) Programı

2001-2006 Lisans, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

İŞ

2006- Araştırma Görevlisi
Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya A.D. Bornova / İzmir