



**T.C.**

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPPOKAMPAL HT22 HÜCRE SERİLERİNDE KLOTHO PROTEİNİNİN P38 MAP  
KİNAZ İFADESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**

**Sadegül TUNCER**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman**

**Aydın RÜSTEMOĞLU**

**TOKAT- 2019**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana; desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimleri ile öğrenim sürecime ışık tutan Danışman Hocam **Doç. Dr Aydın Rüstemoğlu**'na,

Bu dönem içerisinde, bilimsel katkılarından dolayı **Prof. Dr Hacı Ömer Ateş, Doç. Dr Nevin Karakuş** ve **Doç. Dr Serbülen Yigit**'e

Laboratuvar çalışmalarımda bilgisi ve yardımları ile destek olan Doktora Öğrencisi **Sibel Demir Öztürk**, Atlas Biyoteknoloji Şirketi Genel Kordinatörü **Murat Eser Akyürek** ve **çalışanlarına**,

Çalışmamda HT22 Fare Hippocampal Nöronal Hücre Hattını temin etmem de yardımcı olan Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı **Öğretim Üyesi Doç. Dr. Betül Karademir**'e

Bilgisini ve desteğini esirgemeyen **Arş. Gör. Nihan Bozkurt, Arş. Gör. Emel Özsoy Ensari** ve Yüksek Lisans arkadaşım **Tuba Öz**'e

Bu günlere ulaşmam da hiç şüphesiz, en büyük pay sahibi olan ve desteklerini hep hissettiğim **aileme**,

**Teşekkür Ederim.**

**TOKAT-2019**

**Sadegül TUNCER**

## ÖZET

Fare, sıçan ve insan klotho proteinini kodlayan Klotho sırasıyla kromozom 5 (5; 5 G3), 12 (12p12) ve 13 (13q13.1) lokalizedir. Klotho geni insanlar, fareler ve sıçanlarda büyük oranda korunur. Klotho proteini, biri transmembran formunu (sırasıyla insan ve farede sırasıyla 1012 ve 1014 aa, ~130 kDa) ve ikincisi kısa çözülebilir formunu (550 aa, ~70 kDa) kodlayan iki mRNA türü tarafından kodlanır. Faredeki klotho gen ekspresyonundaki bir kusur insan yaşlanmasına benzer şekilde mutant farelerde kısa bir ömür ve nöronal dejenerasyon, arterioskleroz, vasküler kalsifikasyonlar, doku kalsifikasyonları amfizem, gonadal displazi, infertilite, cilt atrofisi, ataksi, hipoglisemi ve ciddi hiperfosfatemi gibi birçok hastalığa neden olduğu belirlenmiştir. Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) büyüme faktörleriyle ve diğer sinyalleşme molekülleriyle aktifleşen ve çekirdeğe transloke olan, çeşitli hücrel faaliyetlerin hücre içi sinyal iletimine aracılık eden serin-treonin protein kinazlardır. Memeli MAPK ailesi, hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinazlar (JNK; ayrıca stresle aktive olan protein kinaz veya SAPK olarak da bilinir) ve p38 ailesini kapsar. p38 geni, insanlarda 6. Kromozomun p kolu üzerinde (6p21.31) lokalizedir ve 22 eksondan oluşur. İnsanlarda ve farelerde p38 proteini 360 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı 38 kDa'dır. P38 MAPK'lar başlangıçta hiperosmolarite ve pro-enflamatuar sitokinler gibi hücrel streslere yanıt olarak aktifleşmiş proteinler olarak tanımlandı. P38 MAPK'lar dört gen tarafından kodlanır. p38 MAPK'ler: MAPK14 (p38a'yı kodlayan), MAPK11 (p38β'yi kodlayan), MAPK12 (p38γ'yi kodlayan) ve MAPK13 (p38δ'yi kodlayan) olarak rapor edilmiştir. P38 MAP kinazlar öncelikle MAPKK izoformları, MKK3 ve MKK6 tarafından fosforillenmek suretiyle aktive edilir. Hücre dışı uyaranlarla aktifleşen MAPK'lar çekirdeğe giderek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını uyarır. HT22 hipokampal hücre hattı kullanılarak Klotho proteininin p38 MAPK ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada hücre kültürü, cDNA eldesi, Real Time PCR, protein izolasyonu ve western blot yöntemi çalışılmıştır. Elde ettiğimiz Real Time Pcr ve Western Blot sonuçları baz alındığında klotho proteininin p38 MAPK sinyal yolağını inhibe ettiği ve nöron hücreleri üzerinde koruyucu etkisi olduğu söylenebilir ancak bunun net bir şekilde belirlenebilmesi için fosforillenerek aktifleşen p38'in fosfo-p38 protein miktarının da çalışılması gereklidir.

**Anahtar kelimeler:** Nörodejenerasyon, Klotho, Map Kinaz, p38 Map Kinaz, Hücre kültürü

## SUMMARY

Klotho protein is a highly conserved protein encoded by the Klotho gene localized in chromosome 5 (5; 5 G3), 12 (12p12) and 13 (13q13.1), respectively, in mouse, rat and human. The Klotho gene is alternatively transcribed into at least two mRNAs, one encoding the large transmembrane (1012 and 1014 aa, ~130 kDa, respectively in human and mouse), and the other in short soluble form (550 aa, ~70 kDa). A defect in Klotho gene expression in the mouse were caused the short life and the many diseases in mutant mice, as similar to human aging.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are serine-threonine protein kinases, which are activated by growth factors and other signaling molecules and are translocated into the nucleus, mediating intracellular signal transduction of various cellular activities. The mammalian MAPK family includes extracellular signal regulatory kinases (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases (JNK; also known as stress-activated protein kinase or SAPK) and the p38 family. The p38 gene is located on the p arm of chromosome 6 in humans (6p21.31) and consists of 22 exons. In humans and mice, the p38 protein consists of 360 amino acids and has a molecular weight of 38 kDa. P38 MAPKs were initially identified as activated proteins in response to cellular stresses such as hyperosmolarity and pro-inflammatory cytokines. P38 MAP kinases are activated primarily by phosphorylation by MAPKK isoforms, MKK3 and MKK6. Studies have shown that p38MAPK also has role in to responding to DNA damage and redox imbalance, which plays an important role in cellular aging.

In this study, the effect of Klotho protein on p38 MAPK expression in HT22 hippocampal cell line where DNA double chain fracture was produced by endosulfan, was investigated. When the Real Time PCR and Western Blot results were examined, it was observed that p38MAPK expression, which increased approximately 100 times only in Endosulfan treated cells, was limited in cells using Klotho protein. This is probably due to the suppression of the negative effects of Endosulfan by the Klotho protein. However, in order to be able to say this clearly, it is necessary to determine the level of double chain breakage in DNA and also to study the phospho-p38 protein amount of p38 which is activated by phosphorylation.

**Key words:** Aging, Klotho, p38 MAPK, Cell culture

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	ix
KISALTMA ve SİMGE LİSTESİ.....	x
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Nörodejenerasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar .....	3
2.2. Yaşlanma .....	5
2.3. DNA Hasarı .....	9
2.4. DNA Onarımı .....	11
2.4.1. DNA Onarım Mekanizmaları.....	11
2.4.1.1. Doğrudan Onarım .....	12
2.4.1.1.1. Fotoreaktivasyon ile Onarım.....	12
2.4.1.1.2. O6-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz (MGMT) ile Onarım.....	12
2.4.1.2. Dolaylı Onarım .....	13
2.4.1.2.1. Kesip Çıkarma Onarımı .....	13
2.4.1.2.2. Hatalı Eşleşme Onarımı (MMR).....	14
2.4.1.2.3. Rekombinasyonel Onarım .....	14
2.5. MAPK (Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz).....	16
2.5.1. p38 MAPK .....	20
2.5.1.1. p38 Geni ve Proteini .....	20

2.5.1.2. P38'in izoformları ve Lokalizasyonu.....	21
2.5.1.3. P38 Sinyal İletimi .....	23
2.5.1.4. p38 MAPK'nın Hücresel Süreçlerdeki Rolü .....	26
2.5.1.5. P38 Sinyal Yolağı ile İlişki Hastalıklar.....	28
2.6. Klotho .....	29
2.6.1. Klotho Geni ve Proteini .....	29
2.6.2. Klotho geni ve Yaşlanma.....	32
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>35</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler .....	35
3.2. Yöntem .....	38
3.2.1. Hücre Kültürü .....	38
3.2.1.1. Hücre Serileri .....	40
3.2.1.1.1. HT22 Hücre Serisi .....	40
3.2.1.2. Hücre Kültüründe Dikkat Edilmesi Gerekenler.....	41
3.2.1.3. Besiyeri Hazırlanması (500 ml Besiyeri için ).....	41
3.2.1.4. Stoktan Hücre Çözdürülmesi ve Ekiminin Yapılması.....	42
3.2.1.5. Canlı Hücrelerin Mikroskopta Sayımı ve Pasajlama .....	42
3.2.1.6. Hücrelerin Beslenmesi .....	46
3.2.1.7. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması .....	47
3.2.2. Endosülfan .....	48
3.2.2.1. Endosülfan'ın Çözdürülmesi ve Sitotoksisite Deneyi .....	49
3.2.3. Hücre Canlılık Testleri.....	52
3.2.3.1. XTT canlılık testi uygulaması.....	54
3.2.4. Klotho Proteinin Çözdürülmesi ve Etkili Doz Belirlenmesi.....	56
3.2.5. HT22 Hücre Serisinde Klotho ve Endosülfan Uygulanması .....	60
3.2.6. RNA izolasyonu.....	63
3.2.7. cDNA eldesi.....	64

3.2.8. Real Time PCR .....	64
3.2.9. Protein İzolasyonu .....	68
3.2.10. Western Blot Yöntemi ile Örneklerdeki P38 Protein Miktarının Belirlenmesi ....	68
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>70</b>
4.1. Real Time PCR Analizi .....	70
4.2. Western Blot Analizi .....	72
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>75</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>79</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>91</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DNA hasar yoğunluğuna ve tipine göre oluşturulan hücre yanıtı .....	10
Şekil 2.2. NHEJ ve Homolog rekombinasyon onarım mekanizmasıI .....	15
Şekil 2.3. İnsan, fare ve sıçanlarda klotho gen bölgesi .....	30
Şekil 2.4. Klotho geni mRNA transkriptleri.....	32
Şekil 2.5. Kromozom 6 üzerinde p38 geninin lokalizasyonu.....	20
Şekil 2.6. p38 MAPK'nın çeşitli dokulardaki ifade düzeyi.....	20
Şekil 2.7. P38 protein yapısı.....	21
Şekil 2.8. p38 MAPK sinyal yolağı aktivasyonu ve aktifleştirilen çeşitli substratlar.....	24
Şekil 2.9. Endosülfan moleküler yapısı.....	48
Şekil 2.10. Endosülfan 3 boyutlu yapısı .....	48
Şekil 3.1. Toma Lamı ve mikroskopta görülen birimkareler .....	44
Şekil 3.2. 96'lık well plate görüntüsü .....	50
Şekil 3.3. 6'lık well plate görüntüsü .....	60
Şekil 3.4. Real Time PCR cihazı ve izleme monitörü .....	66
Şekil 3.5. Real Time PCR-p38 erime eğrisi monitör görüntüsü .....	67
Şekil 3.6. Real Time PCR- beta-actin(ACTB) Erime eğrisi monitör görüntüsü .....	67
Şekil 4.1. p38 MAPK Real Time mRNA transkripsiyon düzeyinin örnek gruplarına göre oluşturulan grafiği .....	72



## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Yaşlanmanın stochastik ve gelişimsel- kalıtsal sınıflandırılması.....	6
<b>Tablo 2.2.</b> Klotho gen lokalizasyonu ve yapısı .....	29
<b>Tablo 2.3.</b> Klotho geni baskılanan ve aşırı eksprese olan farelerin çeşitli parametrelerinin karşılaştırılması .....	33
<b>Tablo 3.1.</b> ThermoFisher Scientific şirketi flasklara göre yaklaşık hücre sayısı.....	45
<b>Tablo 3.2.</b> ThermoFisher Scientific şirketi well-platelere göre yaklaşık hücre sayısı.....	45
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışmada uygulanan 96'lık well plate dizaynı .....	51
<b>Tablo 3.4.</b> XTT testi uygulanan well plate'in Elisa Reader cihazında okunan değerleri .....	55
<b>Tablo 3.5.</b> Klotho proteini etkili doz belirlenmesi için hazırlanan well plate dizaynı .....	58
<b>Tablo 3.6.</b> XTT testi uygulanan well plate'in Elisa Reader cihazında okunan değerleri .....	59
<b>Tablo 3.7.</b> Endosülfan ve Klotho uygulaması 6'lık well plate dizaynı .....	61
<b>Tablo 3.8.</b> Uygulama yapıldıktan sonra well plate mikroskop görüntüsü.....	62
<b>Tablo 3.9.</b> Real Time PCR analizinde kullanılacak primer baz dizileri .....	65
<b>Tablo 3.10</b> Western Blot metodu bileşenleri .....	68
<b>Tablo 4.1.</b> $\Delta\Delta Ct$ değerinin hesaplanması için yapılması gereken işlem.....	71
<b>Tablo 4.2.</b> $\Delta\Delta Ct$ metoduna göre hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin analizi.....	66
<b>Tablo 4.3.</b> p38 ve klotho proteinlerinin yüzde oranı.....	68

**KISALTMA ve SİMGE LİSTESİ**

<b>ADAM</b>	:	Disintegrin ve Metalloproteinaz (A Disintegrin And Metalloproteinase)
<b>APP</b>	:	Amyloid Precursor Protein
<b>ATF6</b>	:	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (activating transcription factor-6)
<b>BACE1</b>	:	Beta-secretase 1( $\beta$ - sekretaz 1)
<b>bç</b>	:	Baz çifti
<b>°C</b>	:	Santigrad Derece
<b>CAT</b>	:	Katalaz
<b>cDNA</b>	:	tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)
<b>CHOP</b>	:	CCAAT arttırıcı-bağlayıcı protein homolog proteini
<b>DDR</b>	:	DNA hasar yanıtı
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo Nükleik asit
<b>E</b>	:	Endosülfan
<b>ERK</b>	:	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
<b>gr</b>	:	Gram
<b>IL</b>	:	interlökin
<b>kb</b>	:	kilobaz
<b>kDa</b>	:	kilodalton
<b>KL</b>	:	Klotho
<b>LPS</b>	:	Lipopolisakkarit (Lipopolysaccharide)
<b>M</b>	:	Molar
<b>MAPK</b>	:	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz

<b>MAPKAP</b>	:	MAPK ile Active Edilmiş Protein
<b>MK</b>	:	MAPK ile active edilmiş protein kinaz
<b>MKK</b>	:	MAPK kinaz kinaz
<b>MKK</b>	:	MAP kinaz kinaz
<b>ml</b>	:	Mililitre
<b>n</b>	:	Mol
<b>p53</b>	:	Tümör protein 53
<b>PCR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik Asit
<b>RT- PCR</b>	:	Real Time PCR
<b>SNP</b>	:	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
<b>SOD</b>	:	Süperoksit Dismutaz
<b>TNF</b>	:	Tümör Nekrozis Faktör
<b>UPR</b>	:	Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded protein response)
<b>UV</b>	:	Ultraviyole Işık
<b>WHO</b>	:	Dünya Sağlık Örgütü
<b>µl</b>	:	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejenerasyon, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD), amyotrofik lateral skleroz (ALS), frontotemporal demans (FTD), Multipl Skleroz (MS), Machado-Joseph hastalığı (MJH), Amiloid Polinöropati ve spinoserebellar ataksiler (SCA) gibi benzersiz klinik özelliklere sahip, prevalansta hızla yükselen, zayıflatıcı, tedavi edilemez hastalıkların bir özelliğidir (Gitler ve ark, 2017; Arıciöğlü, 2017).

Nörojeneratif hastalıklar beynin belirli bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron hücrelerinin, kademeli olarak dejenerasyonu veya ölümünün yanı sıra bu hücrelerin içinde yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu ile oluşan Hirano, Lewy, Pick cisimcikleri ve nörofibriller gibi iplikli yapıların birikmesinden kaynaklanır ( Lahut ve ark, 2012, Batista ve Pereira, 2016; Başak ve Ozansoy, 2007; Alkan, 2008).

Yaşlanma yaygın olarak, hastalık ve ölüm riskinin artmasından sorumlu olan, ilerleyen yaşla birlikte hücre ve dokularda meydana gelen çeşitli zararlı değişikliklerin birikimi olarak tanımlanır (Tosato ve ark, 2007). Memelilerde yaşlanmaya, ilerleyici doku ve organ atrofisi, DNA, RNA, proteinler ve lipidler de hasar birikimi eşlik eder. Birkaç erken yaşlanma sendromunun ortaya çıkmasında, DNA onarım mekanizmasında meydana gelen hataların önemli rolü olduğuna dair belirgin kanıtlar vardır (Maynard ve ark, 2015).

İlk kez 1997 yılında Kuro-o arkadaşları birkaç yaşlanma fenotipinin baskılanmasında görevli olan, yaşlanma sürecini yavaşlatan bir gen keşfetti ve bu gene “Klotho” adı verildi (Kuro-o ve ark,1997). Fare, sıçan ve insan klotho genini kodlayan a-Klotho sırasıyla kromozom 5 (5; 5 G3), 12 (12p12)ve 13 ( 13q13.1) lokalizedir (Boksha ve ark,2017). Kodlayan gen dizisi beş ekson ve dört introndan oluşur ve insanlar, fareler ve sıçanlarda büyük oranda korunur (Xu ve Sun, 2015; Boksha ve ark,2017).

$\alpha$ -Klotho proteini, biri transmembran formunu (sırasıyla insan ve farede sırasıyla 1012 ve 1014 aa, -130 kDa) ve ikincisi kısa çözülebilir formunu (550 aa, ~70 kDa) kodlayan iki mRNA türü tarafından kodlanır (Kim ve ark, 2015). Klotho'nun genetik mutasyonu çoklu erken yaşlanma benzeri fenotiplere neden olur ve çarpıcı bir şekilde ömrünü kısaltır. Farelerde klotho geninin aşırı ekspresyonu yaşlanmayı geciktirir (Wang ve Sun,2009).

Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) kaskadları, çeşitli hücre dışı uyaranlara cevap veren ve büyüme, çoğalma, farklılaşma, hareketlilik, stres yanıtı, hayatta kalma ve apoptoz da dahil olmak üzere çok sayıda temel hücre işlemleri kontrol eden evrimsel korunan hücre içi sinyal iletim yollarıdır. (Plotnikov ve ark, 2011).

Memeli MAPK ailesi, hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinazlar (JNK; ayrıca stresle aktive olan protein kinaz veya SAPK olarak da bilinir) ve p38 ailesini kapsar (Eun Kyung Kim ve Eui-Ju Choi, 2010; Darling ve Cook, 2014). p38 geni birçok dokuda eksprese olur, insanlarda 6. Kromozomun p kolu üzerinde (6p21.31) lokalizedir ve 22 eksondan oluşur (NCBI).

P38, MAPK ailesinin ilk üyesi piridinimidazol ilaçlarının bir hedefi olarak ve pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe eden LPS uyarımının bir hedefi olarak hızlı bir şekilde fosforile edilen 38 kDa proteini (p38) olarak tanımlandı (Cuadrado ve Nebreda, 2010). MAPK'lar (mitojen aktiveleştirilmiş protein kinazlar) gelişme, çoğalma, farklılaşma ve apoptozu içeren çeşitli biyolojik olaylara sinyal verilmesi aracılığı eder (Iwasa ve ark, 2003). MAPK yolları en az üç farklı sinyal modülünden oluşur: ERK'ler, JNK / SAPK'ler ve p38. Her modül üç kinaz (MAPKKK, MAPK kinaz kinaz; MAPKK, MAPK kinaz; ve MAPK) içerir. MAPK'ler, aktivasyonu MAP2K kinazlar tarafından katalize edilen Thr-X-Tyr motifi üzerinde çift fosforilasyon gerektirir (Wagner ve Nebreda, 2009). P38 MAPK'nın substratlarından biri olduğu düşünülen MK5'in homolog rekombinasyonda rol oynadığına dair birkaç hipotez vardır.

Yapılan Türk ve Dünya literatürü taramasında Klotho ve p38 ilişkisini açıklamaya yönelik hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada amaç Hippokampal HT22 hücre serilerinde klotho proteininin p38 Map Kinaz ifadesi üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. NÖRODEJENERASYON VE NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Nöronlar post-mitotik hücrelerdir, yenilenemezler, ömür boyu canlı ve aktif kalmaları gerekir. Fakat yetişkinlerde zaman geçtikçe genetik ve çevresel etkenler nöronları zayıflatabilir ve öldürebilir (Gitler ve ark, 2017).

Nörodejenerasyon, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD), amyotrofik lateral skleroz (ALS), frontotemporal demans (FTD), Multipl Skleroz (MS), Machado-Joseph hastalığı (MJH), Amiloid Polinöropati ve spinoserebellar ataksiler (SCA) gibi benzersiz klinik özelliklere sahip, prevalansta hızla yükselen, zayıflatıcı, tedavi edilemez hastalıkların bir özelliğidir (Gitler ve ark, 2017; Arıcıoğlu, 2017).

Nörojeneratif hastalıklar beynin belirli bölgelerinde ortak özelliklere sahip nöron hücrelerinin ,kademeli olarak dejenerasyonu veya ölümünün yanı sıra bu hücrelerin içinde yanlış katlanmış proteinlerin agregasyonu ile oluşan Hirano, Lewy, Pick cisimcikleri ve nörofibriller gibi ipliksi yapıların birikmesinden kaynaklanır. Bu biriken moleküllerin mutasyonlar sonucu veya posttranslasyonel süreçte yanlış katlanarak çözünürlüğünün azalması ile yeni bir toksik işlev kazandığı ve yaşlı hücreler tarafından yıkımının gerçekleştirilemeyerek beyin dokusuna hasar vermesi ile oluşur. Bu hastalıklar her yaştan insanı etkileyen, zamanımızın en önemli tıbbi ve sosyo-ekonomik sorunlarından biridir( Lahut ve ark,2012, Batista ve Pereira, 2016; Başak ve Ozansoy,2007; Alkan, 2008).

Nörodejeneratif hastalıklar insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturuyor. Özellikle Alzheimer hastalığı (AD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi yaşa bağlı nörodejenerasyon, kısmen yaşlı nüfusun son yıllarda artması nedeniyle giderek yaygınlaşmaktadır. Bu hastalıklar klinik fenotipleri ve patofizyolojileri bakımından çeşitlilik gösterir - bazıları ilerleyici hafıza ve bilişsel bozulmalara neden olurken, bazıları da bir kişinin hareket etme, konuşma ve nefes alma kabiliyetini etkiler (Batista ve Pereira, 2016; Gitler ve ark, 2017; Yıldız ve ark, 2015; Balcı ve ark, 2015).

Nörojeneratif hastalıklar, her türlü günlük aktiviteyi gerçekleştirmede tam bir yetersizliğe yol açtığından dolayı hastalar ve hasta ailelerinin yaşam kalitesinde önemli derecede azalmaya sebep olur. Aile üyelerine ağır psikolojik ve finansal bir yük getirir (Gitler ve ark, 2017).

Artan yaşlanan nüfusla birlikte, bu hastalıklar aynı zamanda ulusal sağlık sistemlerinde de büyük bir yük oluşturmaktadır (Gitler ve ark, 2017).

Azalmış enerji metabolizması, oksidatif stres, ekzotoksisite (glutamat salınımı), bozulmuş  $Ca^{+2}$  dengesi ve buna ek olarak enzim sistemlerinin indüksiyonu ile mitokondri membranında meydana gelen hasar sonucu apoptoz sinyali başatılır ve nöronal hücre ölümleri meydana gelir. Fakat bu sürecin genetik nedenlerle mi yoksa spontan olarak mı başladığı henüz net olarak aydınlatılamamıştır (Balcı ve ark, 2015). Yaşla birlikte oluşan nöron dejenerasyonunun yanı sıra çocukluk çağı nörodejeneratif hastalıklarda vardır. Bu hastalıklarda sentezlenmesi gereken biyokimyasal maddelerin eksik sentezlenmesi, sentezlenememesi yada anormal birikimi ile toksik metabolitlerin birikmesi sonucu beyin dokusunun hasar görmesi söz konusudur. Çocuklar başlangıçta hastalık belirtisi göstermezler bunun nedeni ise toksik metabolitlerin birikim miktarı ile hastalık belirtileri korelasyon gösterir. Ayrıca hastalığın klinik belirtileri, klinik belirtilerin ortaya çıkma yaşı ve hastalığın seyri klinik değerlendirmede önemli parametredir (Alkan,2008).

Modern tıbbın karşılaştığı en büyük zorluklardan biri nörodejeneratif hastalıkların tedavisidir. Asıl sorun, bu bozuklukların normalde geç tespit edilmesi ve tedavi seçeneklerinin etkinliğini sınırlandırmasıdır (Batista ve Pereira,2016).

Bu yıkıcı hastalıklarla mücadele etmek için yeni ve daha etkili terapötik stratejiler geliştirmek için multidisipliner araştırmalar sürmektedir(Erkol ve Karaali Savrun,2002; Gitler ve ark, 2017). Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni bir strateji makalesinde birçok nörosteroidlerin nöron koruyucu olarak araştırıldığını belirtmiştir. (Yarım, 2013). Ayrıca otofajinin ile bu hastalıklara neden olan toksik metabolitlerin ve birikmiş mutant proteinlerin yıkılarak nöronların korunmasına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Kocatürk ve Gözüacık,2017).

Hedef nöroprotektif olan ve şaşırtıcı derecede aktif hücreleri erken ölümden kurtarmak için kullanılacak koruyucu tedavi yolları bulmaktır. Şu anda yapılan birçok çalışma insanlara benzer şekilde yaşla bilişsel gerileme gösteren hayvan modellerinde nöroprotektif ajanların araştırılmasına yöneliktir (Gitler ve ark, 2017).

## 2.2. YAŞLANMA

Gelişmiş sanayi toplumları ve gelişmekte olan ülkelerin yaşam standartları arttıkça ortalama yaşam süresinde de önemli artışlar olmuştur. Ancak ortalama yaşam süresinin artması ile yeni sorunlar ortaya çıkmıştır (Kara ve Müdüroğlu, 2008).

Harman 1981 yılında yaşlanmayı, ilerleyen yaşa eşlik eden hastalık ve ölüme karşı sürekli artan duyarlılık ile ilişkili veya sorumlu olan değişikliklerin zamanla kademeli olarak biriktiği fizyolojik değişim olarak nitelendirmiştir (Harman,1981). Günümüzde ise genetik alt yapı ile kontrol edilen yaşlanma, organizmada çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan işlevsel, yapısal ve psikolojik değişmelerin toplamı olarak nitelendirilmektedir (Öksüzokyar ve ark, 2016).

Gençlik döneminden itibaren yaş aldıkça artan mortalite oranı, yaş aldıkça meydana gelen biyokimyasal ve fizyolojik değişimler, hastalıklara karşı artan hassasiyet, azalan direnç yaşlanmanın belirgin özellikleridir (Nalbant,2006).İnsanlarda bu değişiklikler yaşam tarzı, çevre ve genetik ile bağlantılı olarak farklı oranlarda gerçekleşir (Lamster ve ark, 2016).

Bununla birlikte, zamanla meydana gelen biyolojik değişiklikler ile yaşlanma arasındaki nedensel ilişki tam olarak anlaşılmamıştır. Çok sayıda yaşlanma teorisi önerilmiştir, ancak bunların hiçbiri yaşlanmanın tüm yönlerini net bir biçimde açıklamamaktadır (Maynard ve ark, 2015).Bu süreçler birbirini dışlayan değil, karmaşık yollarla birbirini etkileyen ve DNA'da hasar birikimine neden olan süreçlerdir.

Yaşlanma teorileri için çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Yaşlanma sürecini açıklamak için geleneksel yaşlanma ve modern biyolojik yaşlanma teorileri olmak üzere birçok teori öne sürülmüştür ve çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır (Jin, 2010; Nalbant, 2006). Ancak hiçbirinin tam olarak tatmin edici olmadığı görülmektedir. Geleneksel yaşlanma teorileri yaşlanmanın bir adaptasyon olmadığını ya da genetik olarak programlanmış olduğunu savunuyor.İnsanlarda yaşlanmanın modern biyolojik teorileri iki ana kategoriye ayrılır: programlanmış ve hasar/hata teorileri. Programlanmış teoriler, yaşlanmanın biyolojik bir zaman çizelgesini takip ettiğini ima eder. Bu teori düzenleme, bakım, onarım ve savunmadan sorumlu sistemleri etkileyen gen ekspresyonundaki değişikliklere bağlı olacaktır.



Hasar veya hata teorileri, yaşlanmanın nedeni olarak çeşitli seviyelerde kümülatif hasara neden olan canlı organizmaları ve çeşitli çevresel etkenlere maruz kalma sonucu oluşan hasarı vurgular (Jin, 2010).

En çok bilinen sınıflandırma ise stochastik (dış etken) ve gelişimsel-kalıtısal (iç etken) etkenler olarak 2 ana başlık altında yaşlanmayı açıklamayı hedeflemiştir (Nalbant, 2006). Stochastik etkenler, moleküllerde rastgele meydana gelen hataların zamanla birikerek yaşlılığın gelişimine neden olduğunu düşünülür. Gelişimsel-kalıtısal etkenler ise kalıtısal olarak programlanmış mekanizmaların yaşam süreci boyunca yaşlılığın gelişimine neden olduğunu düşünülür (Nalbant,2006).

**Tablo 2.1.** Yaşlanmanın stochastik ve gelişimsel- kalıtısal sınıflandırılması

<b>Stochastik etkenler</b>	<b>Gelişimsel-kalıtısal etkenler</b>
Somatik Mutasyon ve DNA tamir Teorileri	Uzun yaşam (Longevity) genleri
Ölümcül Hata Teorisi (Error- Catastrophe)	İvmelenmiş yaşlılık Sendromları
Proteinlerin Değişikliğe Uğraması Teorisi	Nöroendokrin Teori
Serbest radikal (Oksidatif Stres)/Mitokondriyal DNA Teorisi	İmmunolojik Teori
	Hücrel Yaşlılık (Senescence) Teorisi
	Hücre Ölümü Teorisi

Yaşlanmanın altında yatan temel kimyasal işlem ilk olarak 1954'te serbest radikal yaşlanma teorisi (FRTA) ile ortaya atılmıştır; bu teoride normalde organizmalarda üretilen aktif serbest radikallerin hücrel bileşenlerle reaksiyonu, yaşlanma ile ilgili değişiklikleri başlatır (Harman, 2006).

Memelilerde yaşlanmaya, ilerleyici doku ve organ atrofisi, DNA, RNA, proteinler ve lipidlerde hasar birikimi eşlik eder. Birkaç erken yaşlanma sendromunun ortaya çıkmasında, DNA onarım mekanizmasında meydana gelen hataların önemli rolü olduğuna dair belirgin kanıtlar vardır.

DNA hasarı birikimi, postmitotik beyin dokusundaki düşük DNA onarım kapasitesi nedeniyle özellikle merkezi sinir sisteminde yaygın olabilir (Maynard ve ark, 2015).

Nükleer DNA hasarı birikiminin yanı sıra mitokondriyal DNA hasarı birikiminin de yaşlanma ile ilişkili fenotipler arasında nedensel bağlantı olduğuna dair çok miktarda kanıt vardır. DNA hasarı ve DNA onarımının nörodejenerasyon gibi yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklarla olan ilişkisinin mekanik temelini anlamak, yaşa bağlı hastalıkları kontrol altına alma ve sağlıklı bir yaşam süresini teşvik etme konusunda fikir verecektir (Maynard ve ark, 2015).

Uzun ömürlü mutant hayvanların tanımlanması ve incelenmesi, organizmaların ömrünü sınırlayan mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. SIR2 genindeki bulgular, yaşlanma oranının belirli şartlar altında düzenlenebileceğini göstermektedir. Gerçekten de, SIR2' nin artmış ekspresyonu, kıtlık koşulları altında hayatta kalmayı teşvik eden biyolojik işlemlere etki ederek ömrünü uzatır (Hekimi ve Guarente, 2003).

Bazı *Caenorhabditis elegans* mutant suşlarında yapılan çalışmalar, özellikle *age-1*, *daf-2*, *daf-23*, *clk-1* ve *isp-1* mutant gen çalışmaları, mitokondri ve diğer yerlerdeki reaktif oksijen türlerinin bu organizmanın yaşam süresinin ana belirleyicisi olduğunu düşündürmektedir (Hekimi ve Guarente, 2003).

Çeşitli memeli türlerinin yaşam süresi ile onlardan türeyen hücrelerin DNA onarım kapasitesi arasında bir korelasyon gözlemlendi. Yaşlı hücreler, özellikle mitokondriyal genomda oluşan mutasyonlarda gözlenen artıştan sorumlu olan muhtemel olan oksidatif DNA hasarını biriktirir. Mitokondriyal genomda oksidatif DNA hasarının ve mutasyonların birikmesinin mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve reaktifin kronik üretimine yol açtığını ileri süren mitokondriyal yaşlanma teorisinin temelini oluşturdu (Szczesny, 2003).

Yaşlanma sırasında hem hayvan modellerinde hemde insanlarda ilerleyici mitokondriyal disfonksiyon ve mitokondriyal genomda mutasyonların birikimi hakkında güçlü kanıtlar vardır (Szczesny, 2003; Sun ve ark, 2017). Ancak mitokondriyal mutasyonların seviyeleri ve cinsleri dokular arasında, hatta aynı dokuda bile farklılık göstermektedir (Sun ve ark, 2017).

Bazı bilim adamları artan mitokondriyal mutasyon seviyelerinin yaşlanmaya ve yaşa bağlı hastalıklara katkıda bulunduğunu iddia ederken, diğerleri bu mutasyonların yaşlanma sürecine katkıda bulunacak kadar önemli bir seviyeye ulaşıp ulaşmadığını sorguladılar.

Mitokondriyal DNA hücre başına yüz binlerce kopyada bulunduğundan, mutant mitokondriyal DNA'nın tespiti kendi başına işlev bozukluğu anlamına gelmez, çünkü önemli bir fenotip değişimi için genellikle mutasyon yükünün bir eşik değerini aşması gerektiğine inanılır (belki de belirli bir doku içindeki tüm mitokondrinin% 60'ını aşması gerektiğine inanılır) (Sun ve ark, 2017).

Yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynayan ROS'un neden olduğu en önemli baz hasarı olduğu iddia edilen 8-oksoG'nin mitokondriyal DNA'da arttığı belirtilmiştir. OGG1 (8-oksoguanin DNA glikozilaz 1) 8-oxoG için ana onarım enzimi olarak görev yapar (Copeland, 2010). Ogg1 enzimi eksik fareler (Ogg1 -/-) ve normal farelerde yapılan mutasyon çalışmaları gösterdi ki 8-oxoG miktarı oksidatif stres ile artış göstermektedir. Kontrol farelere kıyasla, Ogg1 enzimi eksik (Ogg1 - / -) farelerin karaciğer nükleer DNA'sında 8-oksoG seviyesinde 20 katlık bir artış gözlemlendi. Ogg1 - / - farelerinin karaciğer mitokondriyal DNA'sı, kontrol fare DNA'sından 30 kat daha fazla 8-oksoG içerdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, kronik oksidatif stres altında 8-oksoG miktarının 70 kat arttığı gözlemlenmiştir. Böylece mitokondrinin yaşlanma sürecinde yer alan başlıca kronik oksidatif stres kaynağı olduğu söylenebilir (Szczeny, 2003).

Ayrıca yapılan bir çalışma, yaş ile mitokondriyal (ve nükleer) genomda 8-oxoG seviyesinde gözlenen artışın, yaşlı hücrelerin tamir kapasitesinin azalmasından kaynaklandığını göstermektedir. Bu sonuçlar, DNA onarımı ve muhtemelen başka fonksiyonlar için gerekli olan proteinlerin mitokondriyal ithalatında yaşa bağlı bir düşüş olduğunu göstermektedir (Szczeny, 2003).

Kuro-o'nun farelerde yaptığı çalışmada , klotho gen bölgesine gen transferi ile yeni bir DNA parçası aktararak, tek geçişli membran protein'i kodlayan klotho geni bozuldu ve gen ifadesi azaldı. Klotho gen ekspresyonundaki azalış, insan yaşlanmasına benzeyen bir sendromla sonuçlandı ve tüm yaşlanma fenotipleri tek bir farede görüldü (Kuro-o, 2001).

Muhtemelen, memeli yaşlanmasında mtDNA mutasyonları için potansiyel bir nedensel rol için en güçlü kanıt, mtDNA polimeraz POLG'nin mutasyona uğramış (D257A) "mitokondriyal mutant fareleri" analiz edildiğinde nükleer olarak kodlanmış tek mtDNA polimeraz'ın 257 aminoasit pozisyonundaki mutasyon, normal polimeraz aktivitesini koruyan ancak yeniden okuma aktivitesini bozan bir enzim üretilmesine neden olur.

Bu yeniden okuma eksikliği bulunan POLG'nin bir veya iki kopyasını içeren fareler, önemli düzeyde mitokondriyal mutasyon seviyesi biriktirir ve farelerde homozigot vuruntu hızlandırılmış yaşlanma fenotipi sergiler (Sun ve ark, 2017).

MtDNA'ya bakılmaksızın, insanlarda mitokondriyal fonksiyon ile yaşlanma arasındaki bağlantı, belki de en iyi şekilde iskelet kası analiz edilerek incelenmiştir. Tüm çalışmalar tam bir uyum içinde olmamakla birlikte, raporların çoğu yaşlanmaya genel olarak mitokondriyal enzimlerin (örneğin sitrat sentaz) aktivitesinde (örneğin, substrat bağımlı oksijen tüketimi) bir düşüşün eşlik ettiğini belirlenmiştir. Çoğu çalışma aynı zamanda yaşlanmanın hem kitle hem de aktivite (örneğin kuvvet) açısından hızlandırılmış bir kas kaybı oranına eşlik ettiğini göstermiştir (Sun ve ark, 2017).

Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, yaşlanma sürecinde nörodegeneratif hastalıklardan yaşam biçimi ve çevre şartlarının iyileştirilmesinin yanı sıra multidisipliner antiaging araştırmalar sonucu keşfedilecek protein yada ilaçlarla korunma sağlanacağı düşünülmektedir (Kara ve Müdüroğlu, 2008).

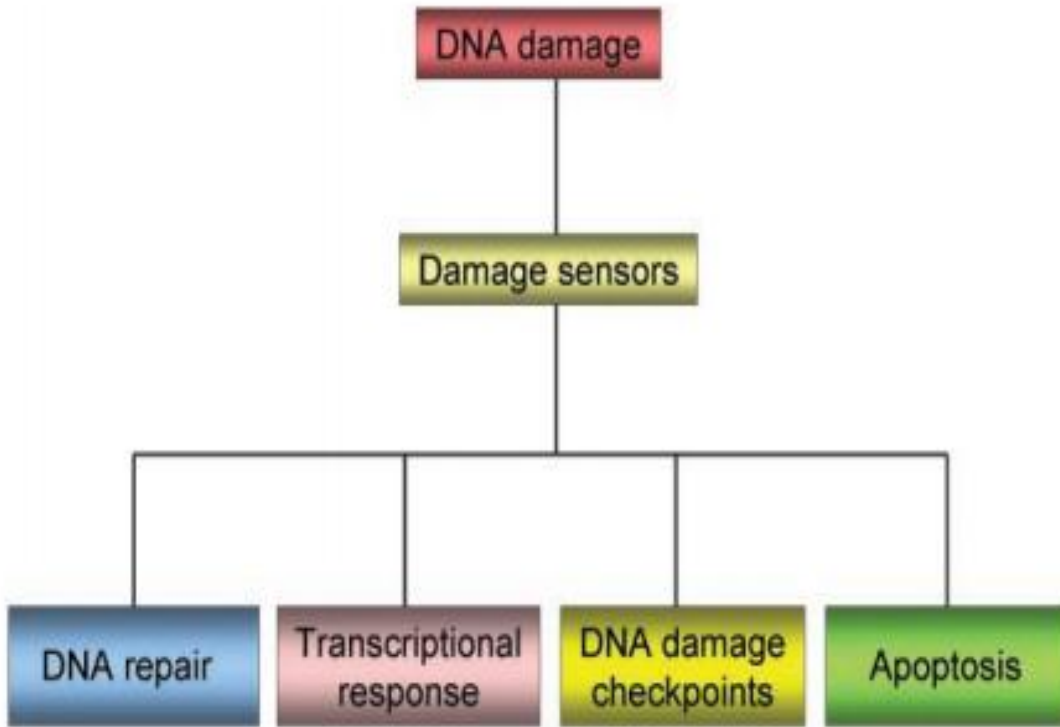
### **2.3. DNA HASARI**

DNA bazı bakteri ve virüsler dışında tüm canlı hücrelerde genetik bilginin temel taşıyıcısıdır (Sancar ve ark, 2004). DNA'nın birincil yapısı sürekli olarak replikasyon sırasında oluşan kopyalama hatalarının yanı sıra hücrel metabolizmanın yan ürünü olarak meydana gelen gelen reaktif oksijen ve nitrojen türleri, lipid peroksidasyon ürünleri, alkilasyon ajanları, reaktif karbonil türleri (endojen) ve UV ışığı, iyonize radyasyon, ağır metaller, tütün ve türevleri, kemoterapötik ilaçlar veya çeşitli kimyasal maddeler gibi (eksojen) DNA'ya zarar veren maddeler tarafından değişime maruz kalır (Sancar ve ark, 2004; Wiesmüller ve ark, 2002; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015; Negritto, 2010). Bu değişiklikler basit baz değişikliklerine neden olabilir veya delesyon, insersiyon, yer değiştirme gibi daha karmaşık değişikliklere neden olabilir (Sancar ve ark, 2004). Oluşan DNA yapısındaki değişiklikler genel olarak genetik bilgilerin korunmasında ve aktarılmasındaki temel rolü ile bağdaşmaz (Wiesmüller ve ark, 2002).

Bu tür değişiklikler DNA'da hasara neden olarak, tek hücreli organizmalarda ölüme veya dejeneratif değişikliklere, çok hücreli organizmalarda ise bu değişikliklerin birikimi çeşitli hastalıklara ve yaşlanmaya katkıda bulunur (Wiesmüller ve ark, 2002).

DNA hasarı genellikle normal hücresel süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Negritto, 2010). Spontan bozulma, replikasyon hataları ve hücresel metabolizma sonucu her gün bir memeli genomunda ortalama 105 DNA hasarı meydana geldiği tahmin edilmektedir (Iyama ve Wilson, 2013).

Genomik bütünlüğün korunması için hücre, çok sayıda, fonksiyonel olarak çeşitli proteinleri içeren çok katmanlı bir sinyal yolu olan bir DNA hasar yanıtı (DDR) yolu geliştirmiştir. Sensörler DNA lezyonlarını algılar, dönüştürücüler DDR sinyalini iletir ve efektörler DNA'da meydana gelen hasarın yoğunluğuna ve tipine bağlı olarak; hücre döngüsünün durdurulması, gen ifadesinin değişmesi, DNA tamirinin uyarılması ve programlı hücre ölümü gibi uygun yanıtı başlatır (Ray ve Fry, 2015; Sancar ve ark, 2004; Kurtoğlu ve Tekedereli; 2015). Bu işlemlerin hızlı ve verimli olması hücre canlılığı için esastır (Ray ve Fry, 2015).



**Şekil 2.1.** DNA hasar yoğunluğuna ve tipine göre oluşturulan hücre yanıtı (Sancar ve ark, 2004)

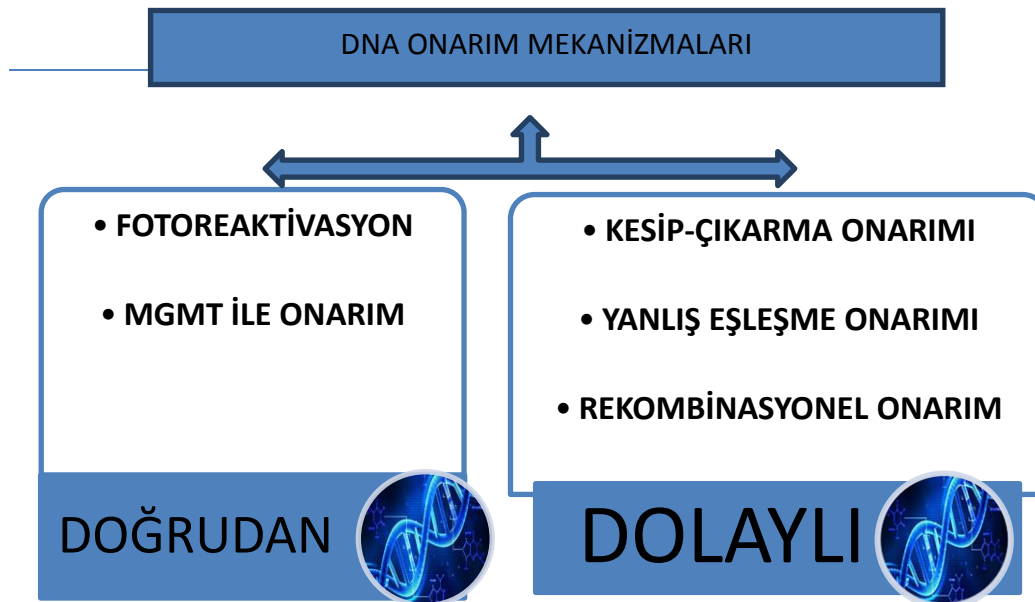
DNA hasarı birikimi özellikle kanser, nörodejenerasyon, immün yetmezlik gibi hastalıklarda önemli bir patojenik süreç olan genomik kararsızlığa yol açar ya da erken yaşlanmaya neden olur (Ray ve Fry, 2015; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).

## 2.4. DNA ONARIMI

Hücreler DNA hasarının zararlı etkilerinden korunmak, genomik bütünlüğü korumak amacıyla çeşitli DNA onarım mekanizmalarına sahiptirler (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015; Bütüner ve Kantarcı, 2006).

DNA onarımının bu mekanizmaları iki genel sınıfa ayrılabilir: (1) DNA hasarından sorumlu kimyasal reaksiyonun doğrudan geri çevrilmesi ve (2) hasarlı bazların uzaklaştırılması ve ardından yeni sentezlenmiş DNA ile değiştirilmeleri. DNA onarımı başarısız olduğunda, hücrelerin hasarla başa çıkmasını sağlamak için ek mekanizmalar geliştirilmiştir (The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition).

### 2.4.1. DNA Onarım Mekanizmaları



### **2.4.1.1. Doğrudan Onarım**

#### **2.4.1.1.1. Fotoreaktivasyon ile Onarım**

Foto-aktifleştirme muhtemelen şu anda bilinen en basit DNA onarım mekanizmasıdır. UV ışınmasıyla DNA'ya verilen pirimidin dimerleri, enerji kaynağı olarak 310-500 nm aralığında ışık kullanılarak tek bir fotoaktif edici enzimin etkisiyle onarılabilir (Cleaver, 1974). Genellikle DNA fotoliz aktifleştirici enzim olarak kullanılır. Foto-aktifleştirmede, UV ışığı ile oluşturulan siklobutan pirimidin dimerleri, daha uzun bir dalga boyuna sahip ışıkla ve aktif bölgedeki FADH<sub>2</sub> ile uyarılan foton elektron transferi ile fotoliz enzimi ile ters çevrilir ve uzaklaştırılır (Lacks, 2001). İhtiyaç duyulan kesin dalga boyu, fotoaktif edici enzimin kromoforuna veya ışığı emen bileşenine bağlıdır. Fotoreaktivasyon onarım sistemi evrensel bir onarım sistemi olarak görülmemektedir. Çünkü bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çoğu omurgalıda bu sistem bulunurken, insan dahil pek çok ökaryotik türde bulunmaz (Sancar ve ark, 2004; Negritto, 2010).

#### **2.4.1.1.2. O6-Metilguanin-DNA-Metiltransferaz (MGMT) ile Onarım**

Doğrudan onarımın bir başka şekli, alkilleyici ajanlar ve DNA arasındaki reaksiyondan kaynaklanan hasar ile ilgilidir. Alkile edici ajanlar, metil veya etil gruplarını bir DNA bazına aktarabilen ve böylece bazı kimyasal olarak değiştirebilen reaktif bileşiklerdir (Friedberg, 2001). Özellikle önemli bir hasar tipi, guaninin O6 pozisyonunun metilasyonudur, çünkü ürün O6-metilguanin, sitozin yerine timin ile tamamlayıcı baz çiftleri oluşturur (The Cell: A Molecular Approach). Alkilleyici ajanlar varlığında meydana gelen O-6-metilguanin mutajeniktir (Mehmet Ekim, 2010). O6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz (MGMT), DNA'daki yanlış eklenen metil grubunu O6-meGua'dan, geri dönüşü olmayan bir reaksiyonla enzimdeki bir sistein kalıntısına transfer ederek DNA'yı alkilasyon hasarına karşı koruyan bir intihar enzimidir (Christmann ve ark, 2011; Sancar, 1995). İntihar enzimi olarak adlandırılmasının nedeni geri dönüşümsüz olarak baskılanıp işlevsiz hale gelmesidir (Onur ve ark, 2009). Laboratuvarda bu onarım, MNNG gibi sentetik alkilleyici ajanlarla hücrelerin işlenmesiyle indüklenir (Sancar, 1995). Potansiyel olarak mutajenik kimyasal modifikasyon bu şekilde uzaklaştırılır ve orijinal guanin geri yüklenir. Bu doğrudan onarım reaksiyonunu katalize eden enzimler, insanlar dahil hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda yaygındır (The Cell: A Molecular Approach).

### **2.4.1.2. Dolaylı Onarım**

#### **2.4.1.2.1. Kesip Çıkarma Onarımı**

Doğrudan onarım, belirli tipte DNA hasarlarıyla baş etmenin etkili bir yolu olmasına rağmen, eksizyon onarımı, DNA'da çok çeşitli kimyasal değişiklikleri onarmak için daha genel bir araçtır. Eksizyon onarımı tipleri, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde en önemli DNA onarım mekanizmalarıdır. Eksizyon onarımında, hasarlı DNA serbest bazlar veya nükleotitler olarak tanınır ve çıkarılır. Elde edilen boşluk daha sonra, hasarsız tamamlayıcı iplikçik, bir şablon olarak kullanarak, yeni bir DNA iplikçikinin sentezi ile doldurulur (Krokan ve Bjoras, 2013).

Baz eksizyon onarımı (BER), DNA sarmalının yapısını önemli ölçüde bozmayan küçük baz lezyonlarını düzeltir. Bu tür bir hasar genel olarak, deaminasyon, oksidasyon veya metilasyondan kaynaklanır ve spontan olarak meydana gelen DNA mutasyonlarının sonucudur (The Cell: A Molecular Approach).

Deoksiriboz ile hasarlı DNA bazı arasındaki bağı kesen enzimler şimdi DNA glikosilazları olarak adlandırılmaktadır. Toplu olarak bu enzimler, her biri örtüşen özelliklere sahip bir veya birkaç DNA glikosilaz tarafından tanınan çok sayıda baz lezyonun baz eksizyon onarımını başlatır. DNA glikosilazlar genel olarak evrimde iyi korunur. BER yolu, lezyonun türüne bağlı olarak, en az 11 farklı DNA glikosilazından biri tarafından başlatılır (The Cell: A Molecular Approach).

Nükleotid eksizyon onarım (NER) mekanizması genel olarak; Hasarın tanınması, protein kompleksinin hasarı içeren 24-32 nükleotidlik bölgeye bağlanıp çift yönlü kesim yapması ve kesilen parçanın [eksizyon]uzaklaştırılması, kesilen parçanın yerinin DNA polimeraz enzimi tarafından hatasız bir şekilde doldurulması ve DNA çift zincirinin bütünlüğünün sağlanması için sentezlenen oligonükleotidin DNA ile ligasyonu basamakları sırasıyla gerçekleşmektedir (Kulaksız ve Sancar, 2007; Koç, 2010).

Memeli NER mekanizması oldukça komplekstir ve kseroderma pigmentozum grup A [XPA]proteini, replikasyon proteini A [RPA], kseroderma pigmentozum grup C [XPC]proteini, transkripsiyon faktörü IIIH [TFIIH], kseroderma pigmentozum grup G proteini [XPG] gibi farklı fonksiyonlara sahip 30'dan fazla protein görev almaktadır (Kulaksız ve Sancar, 2007; Sancar, 2016; Koç, 2010).



#### **2.4.1.2.2. Hatalı Eşleşme Onarımı (MMR)**

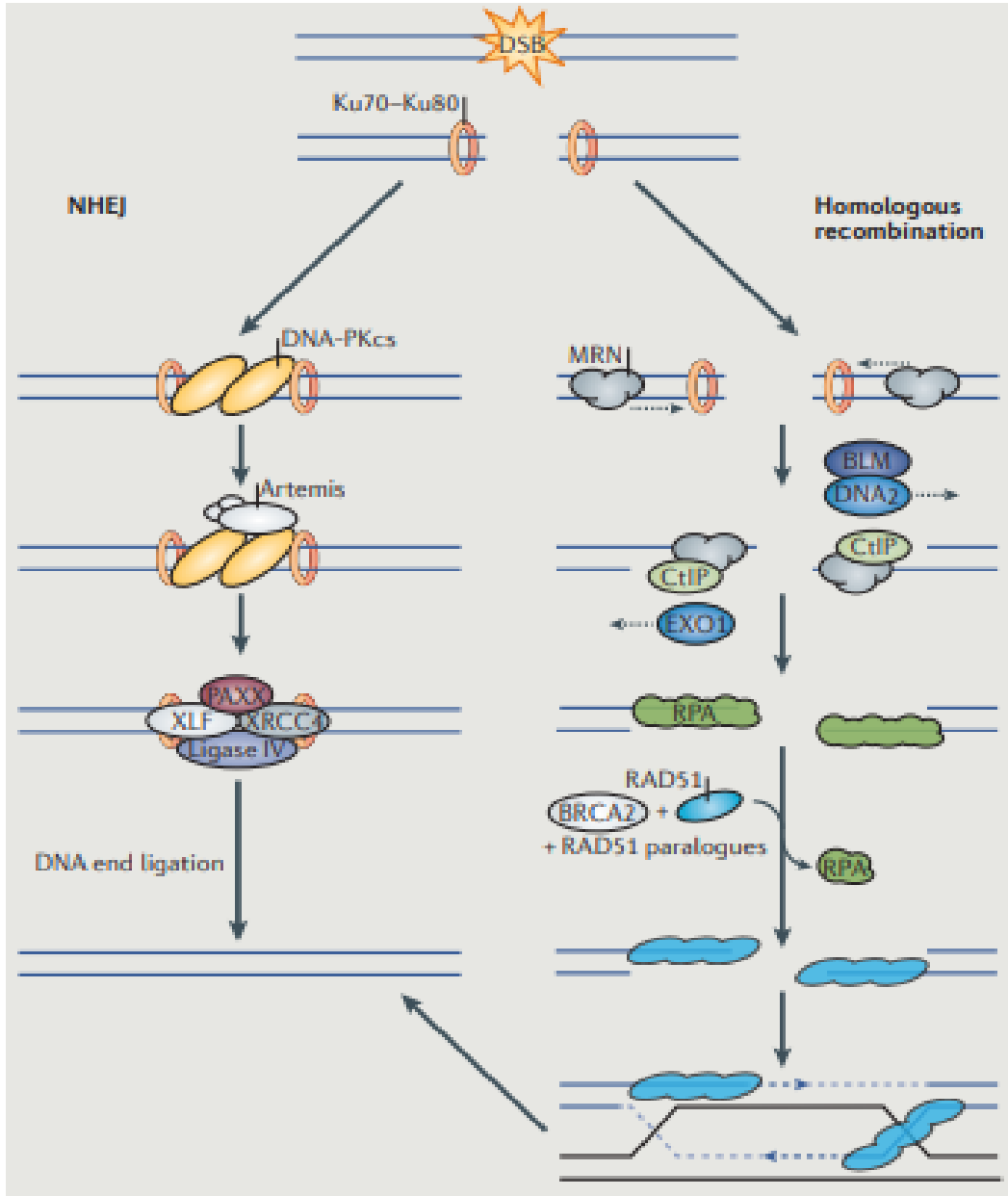
Yanlış eşleşme onarımı (MMR) DNA replikasyonu esnasında meydana gelen ve çift sarmalda normal bazların hatalı eşleşmesi şeklindeki hataları düzeltir. Özel bir metilaz tarafından *E.Coli* DNA'sındaki 5' (GATC) dizisindeki adenin nükleotidleri metillenir (Hsieh ve Yamane, 2008). Replikasyon sonrasında yeni sentezlenen zincirdeki adenin nükleotidlerinin metillenmesi için gerekli birkaç dakikalık sürede mutS olarak adlandırılan bir protein zincir üzerinde tarama yaparak hatalı eşleşen bazları bulur ve bir protein kompleksi tarafından hatalı bazların olduğu DNA parçası kesilerek uzaklaştırılır (Hsieh ve Yamane, 2008; MARINUS, 2012). *E.Coli* MMR onarım mekanizmasında görev alan mutS, mutH, ekzonükleaz I gibi çok sayıda proteinin ökaryot homologları vardır ve MMR ile DNA stabilitesinin korunmasını sağlarlar (Li, 2007; Reiss, 2003).

#### **2.4.1.2.3. Rekombinasyonel Onarım**

DNA çift zincir kırıkları (DSBs), DNA hasarının en ciddi, toksik, onarımı zor formlarıdır. (Kelley, 2016). Onarılmazlarsa kromozomlar kırılarak genetik bilgi kaybına neden olur ve hücre ölümü ile sonuçlanabilir (Schwertman, 2016). Doğru şekilde onarılmazsa, DSB'ler mutasyonlara, silmelere, yer değiştirmelere ve genom amplifikasyonlarına yol açabilir (Kelley, 2016). DSB her ne kadar iyinize radyasyon gibi ekzojen ajanların etkisiyle tesadüfi olarak oluşup patolojik olsa da, bu tür kopmalar, tomurcuklanan mayada mayotik rekombinasyon ve çiftleşme gibi önemli fizyolojik süreçlerde, T lenfosit reseptörünün yeniden düzenlenmesi ve lenfosit olgunlaşması sırasında sırasında V (D) J rekombinasyonu ile de ortaya çıkar (Schwertman, 2016; Bütüner ve Kantarcı, 2006).

Ökaryotik hücreler çift zincir kırıklarının tamiri için homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolog rekombinasyon onarımı (HRR) mekanizmasını kullanır (Jasin ve Rothstein, 2013). Bu mekanizmalardan hangisinin kullanılacağı devam eden hücre döngüsü aşamasına, gereken onarımların karmaşıklığına ve hasarlı DNA uçlarının yeniden birleştirilmesinin kolay (kör) veya zor (dirty) olmasına bağlıdır (Kelley, 2016). NHEJ herhangi bir hücre döngüsü aşamasında çalışabilir, ancak en çok G0 ve G1'de (DNA replikasyonu öncesi) etkindir, oysa HRR aktivitesi S ve G2 fazları sırasında (replikasyondan sonra) gerçekleşir (Kelley, 2016).

NHEJ daha hızlıdır, DSB'lerde daha sık kullanılır ve HRR'den daha basittir; Ancak NHEJ daha fazla hataya açıktır. HRR'nin daha uzun, daha titiz kardeş kromatit şablon temelli etkinliği, en yüksek kalitede onarım yapılmasını sağlar (Schwertman, 2016).



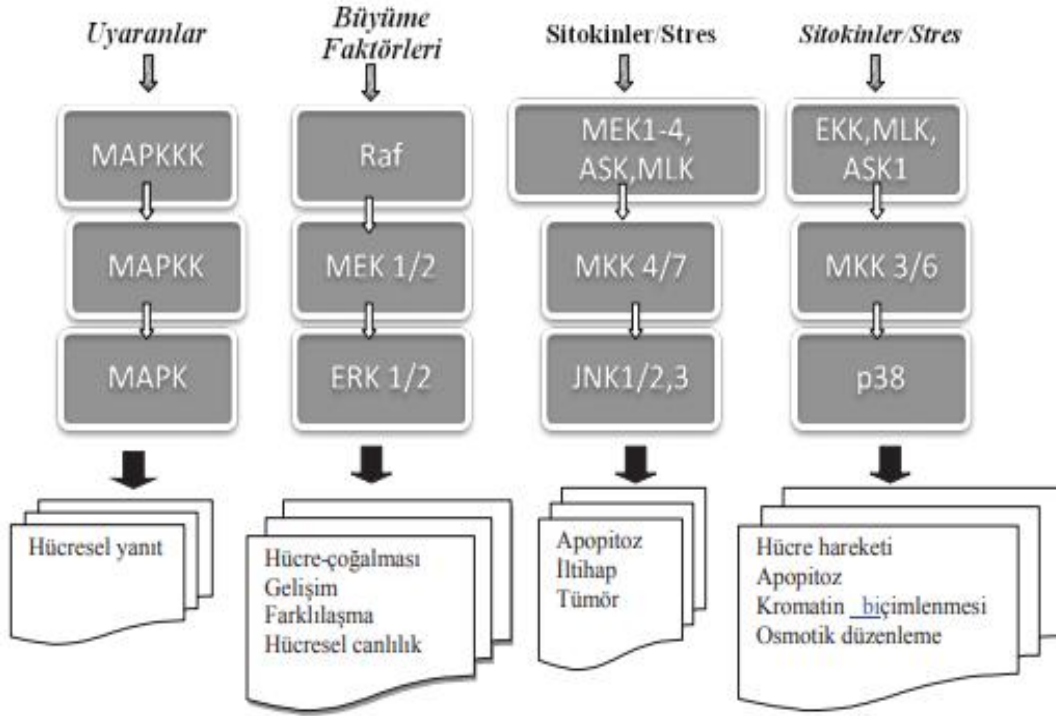
**Şekil 2.2.** NHEJ ve Homolog rekombinasyon onarım mekanizması (Schwertman ve ark, 2016)

## 2.5. MAPK (Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz)

Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) kaskadları, çeşitli hücre dışı uyaranlara cevap veren ve büyüme, çoğalma, farklılaşma, hareketlilik, stres yanıtı, hayatta kalma ve apoptoz da dahil olmak üzere çok sayıda temel hücresel işlemi kontrol eden evrimsel korunan hücre içi sinyal iletim yollarıdır (Plotnikov ve ark, 2011).

Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) büyüme faktörleriyle ve diğer sinyalleme molekülleriyle aktifleşen ve çekirdeğe transloke olan, çeşitli hücresel faaliyetlerin hücre içi sinyal iletimine aracılık eden serin-treonin protein kinazlardır (Eun Kyung Kim ve Eui-Ju Choi, 2010; Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010). İnsan genomunda 14 MAPK geni olduğu bilinmektedir (Küçükkaya ve Afrasyap, 2012). Memeli MAPK ailesi, hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinazlar (JNK; ayrıca stresle aktive olan protein kinaz veya SAPK olarak da bilinir) ve p38 ailesini kapsar. Bu enzimlerin her birinin birkaç izoformu vardır: ERK (1/ 2/ 4), p38 (- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  ve - $\delta$ ) ve JNK (1/ 2/ 3) (Eun Kyung Kim ve Eui-Ju Choi, 2010; Darling ve Cook, 2014).

MAPK ailesi üç katmanlı kinaz sinyalleşme kaskadları vasıtasıyla aktive edilir. Aktivasyon döngülerinde çift treonin / tirozin motifi ile tanımlanır, bunların aktivasyonu için fosforilasyonu gereklidir: ERK1 / 2 (Thr-Glu-Tyr), JNK (Thr-Pro-Tyr) ve p38 (Thr-Gly-Tyr) (Darling ve Cook, 2014).



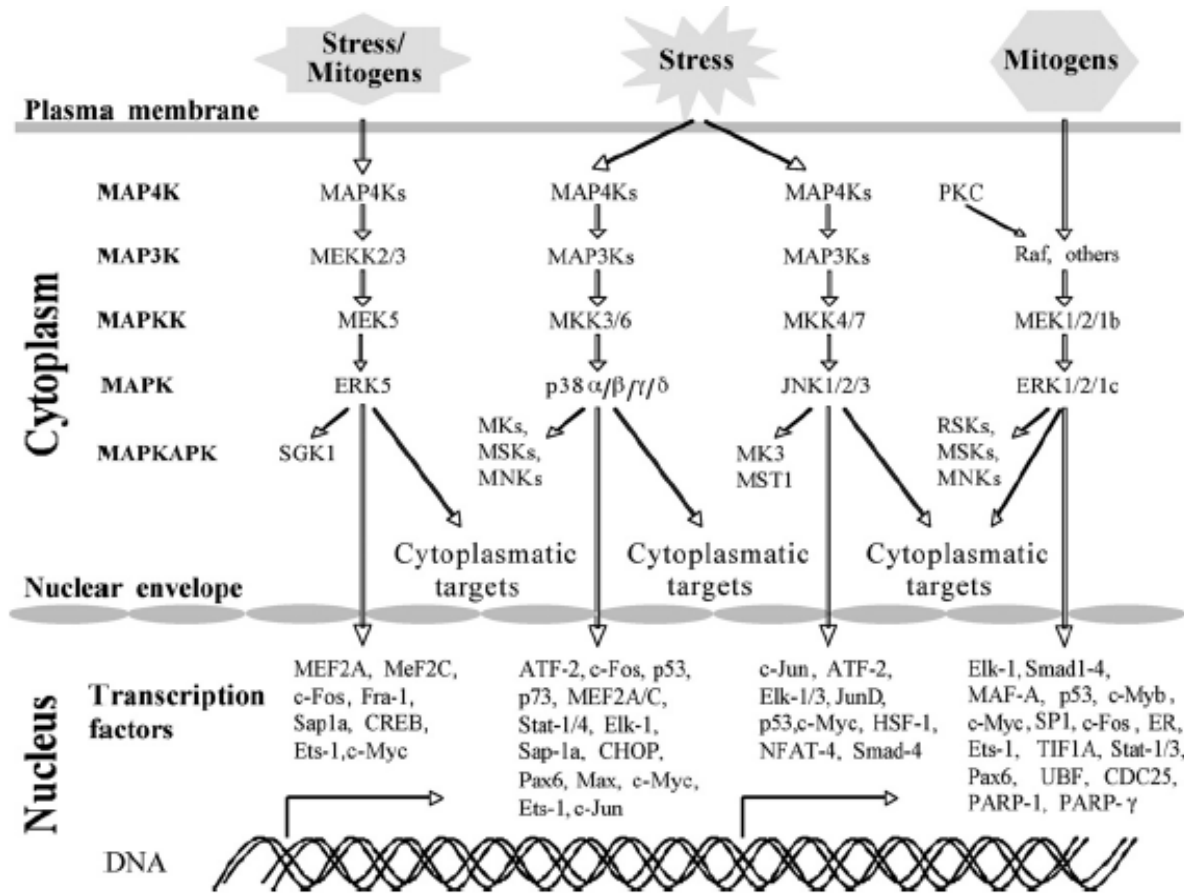
**Şekil 2.3.** MAPK sinyal yolağı uyarınları ve sinyal mekanizması (Küçükkaya ve Afrasyap, 2012)

Hücre dışı uyarınlarla aktifleşen MAPK'lar çekirdeğe giderek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını uyarır (Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

MAPK sinyalleşmesinin biyolojik sonuçları, MAPK'nin subselüler lokalizasyonu, diğerlerinin sağladığı MAPK aktivasyonunun ve kombinasyon sinyalleşme girişlerinin büyüklüğü ve süresi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır (Darling ve Cook, 2014).

MAPK basamakları çeşitli uyarılmış hücreSEL işlemleri düzenleyen merkezi sinyal yolaklarıdır. Bu nedenle, bu kaskadların düzensizliği veya yanlış işleyişi, kanser, diyabet, otoimmün hastalıklar ve gelişimsel anormallikler gibi hastalıkların indüksiyonunda ve ilerlemesinde rol oynar (Plotnikov ve ark, 2010).

Bu fizyolojik ve patolojik fonksiyonların birçoğuna çeşitli düzenleyici genlerin MAPK-bağımlı transkripsiyonu aracılık eder. Transkripsiyonu ve sonuçta ortaya çıkan fonksiyonları indüklemek için, kaskadlar aracılığıyla iletilen sinyallerin, transkripsiyon faktörlerinin ve kromatin remodeling enzimlerinin aktivitesini modüle edebilmeleri için çekirdeğe girmesi gerekir (Plotnikov ve ark,2010).



Şekil 2.4. MAPK sinyal kaskadı aracılığıyla modüle edilen çeşitli transkripsiyon faktörleri

Her basamak, üç çekirdek kinazdan oluşur (MAP3K, MAPKK ve MAPK). Kaskadların her birinde sinyal, sıralı fosforilasyon ve sıralı kinazların aktivasyonları ile yayılır ve sonunda hedef düzenleyici proteinlerin MAPK ve MAPKAPK bileşenleri tarafından fosforilasyonuna yol açar (Alexander ve ark, 2010).

MAPK kaskadlarının bileşenleri ile sekans benzerliklerini paylaşan diğer kinazlar da tanımlanmıştır (örn. ERK3 / 4 ve ERK7 / 8). Bununla birlikte, bu kinazların farklı aktivasyon modu, gerçek MAPK basamaklarının bileşenleri olmadıklarını göstermektedir (Alexander ve ark, 2010).

Raf ve MEK (MAP kinaz veya ERK kinaz) protein kinazı tarafından ERK aktivasyonu gerçekleştirilir. Büyüme faktörü yada stres ile uyarılan reseptör GTP-bağlayan ve Raf'la etkileşen protein Ras'ın aktifleşmesini sağlar. Aktifleşen Ras MEK'i fosforiller, MEK ise ERK'yı serin- treonin kalıntılarında fosforilleyerek aktive eder ve ERK'nın çekirdekteki ve sitozoldeki transkripsiyon faktörlerini fosforillemesi gerçekleşir (Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010). JNK ve p38 MAP aktivasyonunda ise Ras'dan farklı, küçük GTP bağlayan proteinler aracılık eder (Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

MAPK'lar, katalitik alanın amino ve karboksi terminal lobları arasında kısmen yapılandırılmamış bir segmentte (aktivasyon döngüsü) tirozin ve treonin artıklarının ikili fosforilasyonu ile aktive edilir. Treonin kalıntısındaki fosforilasyon, aktif bölge katalitik kalıntılarının geometrisini geliştirir ve MAPK'nın yüzeyinde amino terminal bölgesini aktivasyon döngüsüne bağlayan ve aktif bölge yarığının kapanmasını teşvik eden hidrojen bağlarının oluşmasına yol açar. Tirozin kalıntısı üzerindeki fosforilasyon, yeni hidrojen bağlarının oluşmasına ve substrat-etkileşim bölgelerinde yapısal bir değişiklik oluşmasını sağlar (Hotamisligil ve Davis, 2019).

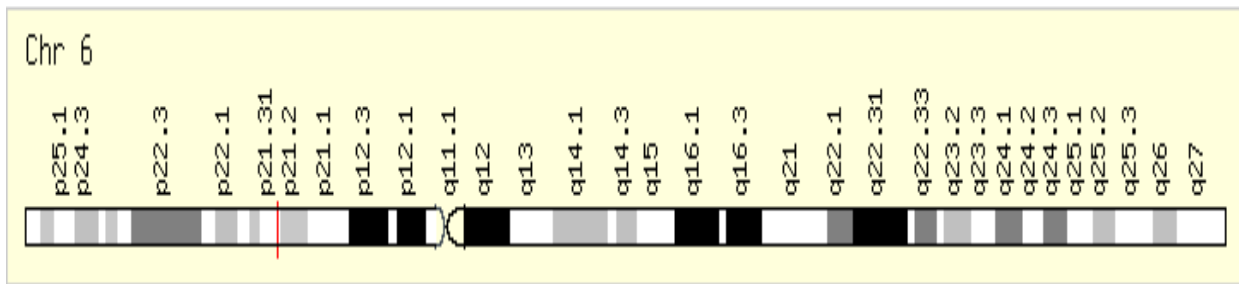
Biyoinformatik analizler birçok MAPK substratı tanımlamıştır. Kimyasal genetik yöntemler ve kütle spektroskopisi, MAPK substratlarının spesifik dokularda daha kapsamlı bir analizine olanak sağlamıştır. Bunlar, birçok biyolojik işleme katılan membran, sitosolik ve nükleer proteinleri ve özellikle ATF2 (JNK1 / 2/3 ve p38a / b MAPK ile aktive edilir), Jun (JNK1 / 2/3 ile aktive edilir), MEF2C (p38a / b MAPK ve ERK5 ile aktive edilir) ve Elk1 (JNK1 / 2/3, p38a / b MAPK ve ERK1 / 2 tarafından aktive edilir) gibi birçok transkripsiyon faktörünü içerir. Diğer MAPK hedefleri arasında eEF2K (p38g / d MAPK ile aktive edilir), MK2 / 3 dahil olmak üzere MAPK'lar tarafından fosforile edilmiş ve aktive edilmiş protein kinazlar bulunur (Hotamisligil ve Davis, 2019).

Felç, Epilepsi, Alzheimer, Parkinson, ALS (Amiyotropik Lateral Skleroz) hastalıkları ve çeşitli kanserler MAPK sinyal yolağı iletiminde rol olan genlerde meydana gelen mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

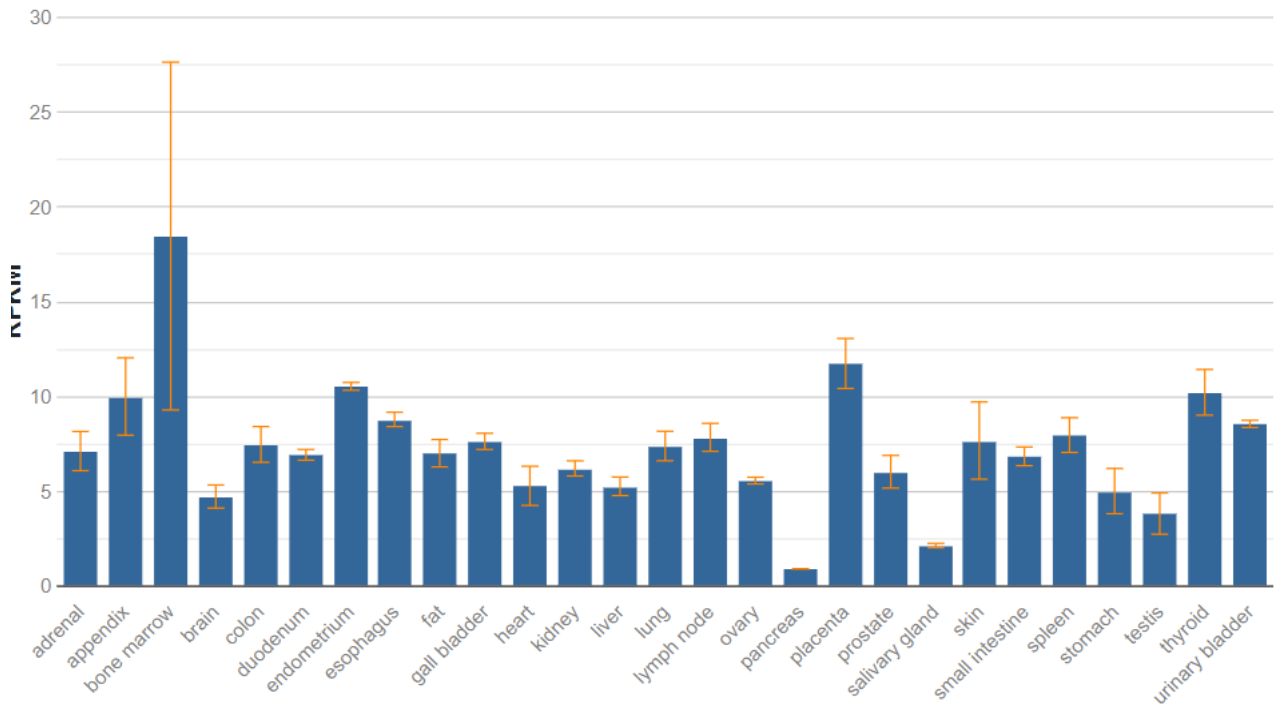
## 2.5.1. p38 MAPK

### 2.5.1.1. p38 Geni ve Proteini

p38 geni, insanlarda 6. Kromozomun p kolu üzerinde (6p21.31) lokalizedir ve 22 eksondan oluşur (NCBI). p38 geni CSBP; EXIP; Mxi2; CSBP1; CSBP2; CSPB1; PRKM14; PRKM15; SAPK2A ve p38ALPHA olarak farklı isimlerle bilinir ve birçok dokuda eksprese olur (NCBI).



Şekil 2.5 Kromozom 6 üzerinde p38 geninin lokalizasyonu (NCBI)



Şekil 2.6 p38 MAPK'nın çeşitli dokulardaki ifade düzeyi (NCBI)

Farelerde (*Mus musculus*) ise kromozom 17 üzerinde lokalize olmuştur, 15 eksondan oluşur ve beyinde dahil olmak üzere çok sayıda dokuda eksprese edilir (NCBI). İnsanlarda ve farelerde p38 proteini 360 aminoasitten oluşur (NCBI) ve molekül ağırlığı 38 kDA' dır (Ferrer ve ark, 2001).



Şekil 2.3. P38 protein yapısı (Kaieda ve ark, 2019)

#### 2.5.1.2. P38'in izoformları ve Lokalizasyonu

P38 MAPK'lar başlangıçta hiperosmolarite ve pro-enflamatuar sitokinler gibi hücrel streslere yanıt olarak aktifleşmiş proteinler olarak tanımlandı (Darling ve Cook, 2014).

P38 MAPK'lar iki alt gruba (p38  $\alpha$  /  $\beta$  ve p38  $\gamma$  /  $\delta$  izoformlarını kodlayan) bölünebilen dört gen tarafından kodlanır. p38 MAPK'ler: MAPK14 (p38a'yı kodlayan), MAPK11 (p38 $\beta$ 'yi kodlayan), MAPK12 (p38 $\gamma$ 'yi kodlayan) ve MAPK13 (p38 $\delta$ 'yi kodlayan) olarak rapor edilmiştir(Wagner ve Nebreda, 2009).

Bu p38 izoformları yedekli olmayan fonksiyonlar ve küçük molekülü inhibitörlere karşı farklı hassasiyetler gösterir (Cuenda ve Rousseau, 2007).

p38'in homologları çeşitli organizmalarda korunmuş ve maya (hog1) , solucan (pmk-2), sinek (p38a, b, c) ve kurbağa da (p38) tanımlanmıştır. (Zarubın ve Han, 2005).



p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  her yerde açık bir şekilde ifade edilir ve birbiriyle örtüşen fonksiyonlara sahip olabilecek yakından ilişkili proteinlerdir(Wagner ve Nebreda, 2009). p38 $\alpha$  çoğu hücre tipinde oldukça bol olmasına rağmen, p38 $\beta$  düşük seviyelerde ve p38 MAPK sinyallemesine katkısı açık değildir. ). p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$ , daha sınırlı bir doku dağılımı sergiler ve daha yaygın olarak eksprese edilen aile üyelerine kıyasla farklı substrat spesifikliklerine sahiptir (Darling ve Cook, 2014). p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$ 'nın özel işlevlere sahip olmaları muhtemeldir (Wagner ve Nebreda, 2009)

p38 $\alpha$  izoformu hücre tiplerinin çoğunda en bol olanıdır. Çeşitli fare modelleri, p38 $\alpha$ 'nın sitokin üretimi, enflamatuar tepkiler ve hücre proliferasyonunu kontrol etmek için önemli olduğunu göstermiştir. Transkripsiyon faktörleri ATF2 (gelişim, hücre büyümesi ve hayatta kalma konusunda çeşitli rollere sahip transkripsiyon faktörü), DDIT3 (DNA hasarına cevap olarak üretilir) ve tümör baskılayıcı p53 dahil olmak üzere bir dizi doğrudan substrat tanımlanmıştır (Whitmarsh, 2010).

p38  $\alpha$ , ERK2 ile% 50 amino asit özdeşliğine sahiptir ve hiperosmolariteye yanıt olarak aktive edilen tomurcuklanan maya hog1 geninin ürünü için önemli bir homoloji taşır. (Roux ve Blenis, 2004).

Diğer üç p38 grubu üyesi bir süredir biliniyor olmasına rağmen, aktivasyonları hakkında çok az şey bilinmektedir. Her dört p38 grup üyesinin de benzer aktivasyon profilleri gösterdiğini gösteren araştırmalara rağmen, kinetikte ve bu izoformların aktivasyon seviyesinde farklılıklar gözlemlendi (Zarubin ve Han, 2005).

Her ne kadar p38 MAPK topolojik olarak ERK2'ye benzese de, fosforilasyon Dudak (aktif bölgeye yakın bir düzenleyici halka) p38'de farklı bir katlanma gösterir. Peptid substrat bağlanma bölgesi ve ATP bağlanma bölgesi de ERK2'den farklıdır. MAP kinazlar farklı aktive edici enzimler, substratlar ve inhibitörler için spesifiktir (Wang ve ark, 1997).

P38 izoformlarının aktivasyonu, aktivasyon döngülerindeki korunmuş bir Thr-Gly-Tyr motifinin MEK3 / 6 katalizli çift fosforilasyonundan kaynaklanır(Darling ve Cook, 2014). Aktif olmayan ve aktif (fosforlanmış) p38'in yapıları X-ışını kristalografisi ile çözülmüştür. Fosforile edilmiş Thr-Gly-Tyr motifinin ve aktivasyon döngüsünün uzunluğunun ERK2 ve JNK'de farklı olduğu bulundu, bu da muhtemelen p38'in substrat spesifikliğine katkıda bulunur. (Roux and Blenis, 2004).

p38'in hücrelerin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında bulunduğu gösterilmiştir, ancak hücre uyarımı üzerine, p38'in hücresel yerleşimi iyi anlaşılmamıştır. Bazı kanıtlar, aktivasyonun ardından p38'in sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirdiğini, ancak diğer verilerin, aktifleştirilmiş p38'in uyarılmış hücrelerin sitoplazmasında da bulunduğunu göstermektedir. (Roux and Blenis, 2004).

p38 MAPK sinyal yolları, UV, ısı ve osmotik koşullar gibi çevresel değişiklikler, enflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyarıların neden olduğu hücre içi ve hücre dışı streslerle uyarılır (Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010; Zarubin ve Han, 2005; Park ve ark, 2014). Bu uyarıların çokluğu, p38 $\alpha$  aktivasyonunun sadece uyarı farklılığına değil, aynı zamanda hücre tipine de bağlı olduğunun belirlenmesi ile daha da karmaşık hale gelir. (Zarubin ve Han, 2005).

### ***2.5.1.3. P38 Sinyal İletimi***

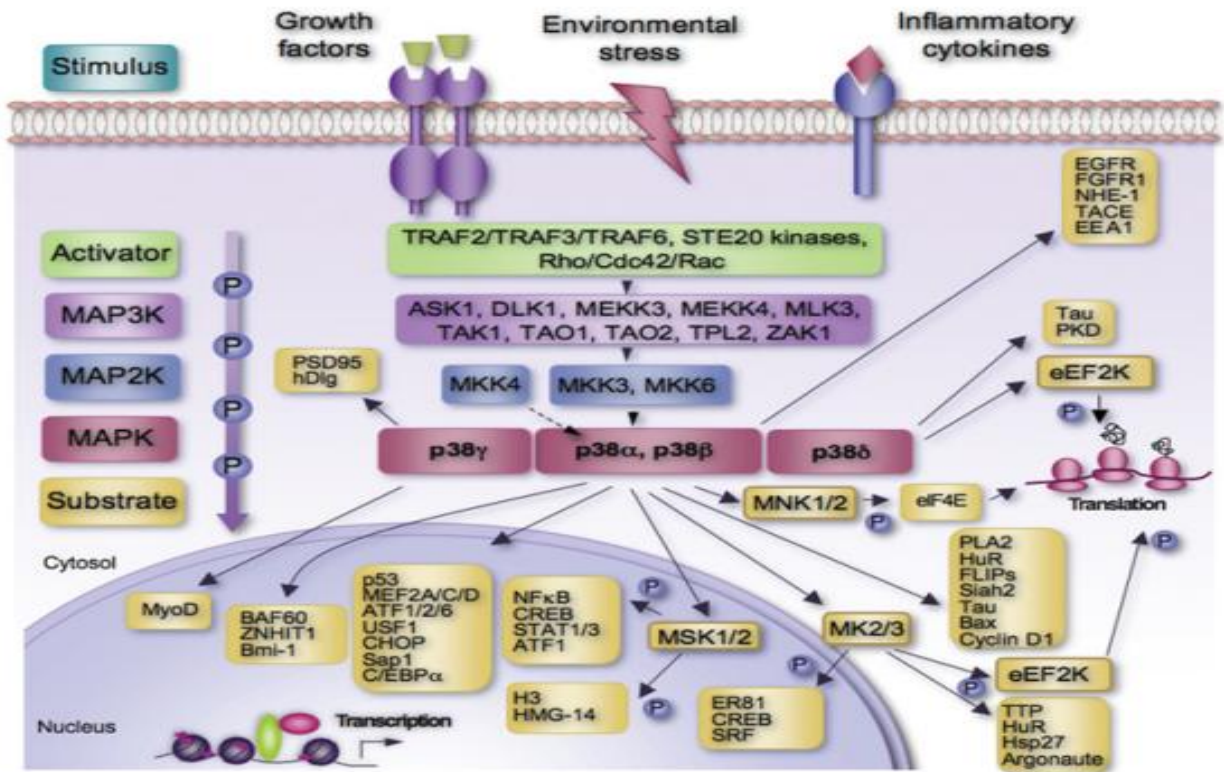
MEK3 ve MEK6 çeşitli fiziksel ve kimyasal streslere cevap olarak aktif hale gelen bir MAPKKK bolluğu ile aktive edilir. MEK3 ve MEK6, p38 için ERK1 / 2 veya JNK'yı aktive etmedikleri için yüksek bir özgüllük derecesi gösterir (Roux ve Blenis, 2004).

MEK4, p38'e karşı bazı MAPKK aktivitesine sahip olan bilinen bir JNK kinazıdır; bu, MEK4'ün, p38 ve JNK yolları için bir entegrasyon bölgesini temsil ettiğini gösterir. MEK6, tüm p38 izoformlarını aktive ederken, MEK3 p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  izoformlarını fosforile ettiği için biraz seçicidir. P38 aktivasyonundaki spesifikliğin, MEK3 / 6 ve farklı p38 izoformları arasında fonksiyonel komplekslerin oluşumu ve aktivasyonun seçici olarak tanınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Roux ve Blenis, 2004).

Reseptörlerin aktifleştirilmesi ya da çevresel koşulların neden olduğu stres koşulları tarafından uyarılması üzerine gelen sinyaller MAP4K'lar ve MAP3K aracılığıyla küçük GTPaz benzeri adaptör proteinlere iletilir. Kaskadın MAP3K seviyesindeki bir veya daha fazla bileşen tarafından aktarılmasından sonra, sinyaller, çoğunlukla MKK3 ve MKK6 olan, ancak bazı durumlarda, MKK4'ü de içerebilen, p38 kaskadının MAPKK bileşenlerinin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu indükler (Plotnikov ve ark, 2010).

Bu aşamada sinyaller, kaskadın MAPK katmanında (32-54 kDa) dört izoforma ve birkaç fonksiyonel alternatif eklenmiş forma iletilir. Bu bileşenler, aktivasyon döngülerinde Thr-Gly-Tyr bölgesi içindeki düzenleyici Thr ve Tyr'nin fosforilasyonu nedeniyle aktive edilir (Plotnikov ve ark,2010). JNK'dan farklı olarak, p38 kaskadı MAPKAPK katmanında, MAPKAPK2-5 , MNK1 / 2 ve MSK1 / 2 dahil olmak üzere birkaç bileşene sahiptir. MNK1 / 2 ve MSK1, ERK1 / 2 kaskadı ile paylaşılır ve bu nedenle bu iki MAPK kaskadı arasında bir sinyal entegrasyon noktasıdır. Son olarak sinyaller, p38'ler veya MAPKAPK'lar tarafından, kaskad tarafından indüklenen ve düzenlenen birçok işlemde sorumlu olan hedef molekülleri iletir (Plotnikov ve ark, 2010; Hotamisligil ve Davis, 2019).

İlginç bir şekilde, p38'lerin aktivasyonuna MAPKK'dan bağımsız bir şekilde otofosforilasyonun aracılık etmesi de mümkündür. Bu aktivasyon türü, ya uyarlayıcı proteinler Tab1 ile uyarılmış etkileşim, ya da Tyr323'ün ZAP-70 ile fosforilasyonu ya da sırayla geliştirilmiş bir katalizör oluşturan lipidik fosfatidil inositol analogları ile etkileşime girmesi ile uyarılır (Plotnikov ve ark, 2010).



**Şekil 2.4.** p38 MAPK sinyal yolağı aktivasyonu ve aktifleştirilen çeşitli substratlar (Cuadrado ve Nebreda, 2010)

P38 MAPK'lar öncelikle MAPKK izoformları , MKK3 ve MKK6 tarafından aktive edilir, ancak MKK4'ün küçük bir katkısı tespit edilebildi. Tüm p38 MAPK izoformları MKK3 ve MKK6 tarafından aktive edilse de, p38δ MKK3 tarafından MKK6'dan anlamlı bir şekilde daha güçlü şekilde aktive edilir (Hotamisligil ve Davis, 2019).

MAPK, MAPK aktive edici protein kinazlar (MAPKAPK) olarak adlandırılan diğer protein kinazlar dahil olmak üzere çeşitli substratları fosforile edebilir (Lindin ve ark, 2013).

Fare ve insan genomlarında MAPK ile aktifleştirilen protein (MAPKAP) kinazlar (MK'ler), MK2, MK3 / 3pK ve MK5 / PRAK (p38-düzenlenmiş ve aktive edilmiş kinaz) tanımlandı. Bunlar MAPK'ların farklı fonksiyonlara sahip substratlarıdır. MAPKAPK ailesi, ribozomal-S6-kinazları (RSK1-4), MAPK-etkileşimli kinazları (MNK1 ve 2), mitojen ve stres ile aktive olan kinazları (MSK1 ve 2), MAPKAPK-2 (MK2) ve MAPKAPK- 3 (MK3) ve MAPKAPK- 5 (MK5)'i kapsar (Shiryayev ve Moens, 2010).

Genel olarak MK2 ve MK3'ün p38MAPK için iyi niyetli substratlar olduğu kabul edilmekle birlikte, MK5'in bir p38MAPK substratı olarak gerçekliği tartışmalıdır.

MK5 ve insan homologu PRAK (p38 ile düzenlenmiş / aktif protein kinaz) ilk önce 1998 yılında iki bağımsız grup tarafından izole edildi (Lindin ve ark, 2013). Molekül ağırlığı 54 kDa olan protein kinazın p38 MAPK ile fosforile edilmiş ve aktive edilmiş olduğunu gösterdi. MK2, MK3 ve MK5'in dizi homolojisi yüksek olmasına rağmen farklı substratlara sahiptir. Bu üç kinaz ayrıca görünür fonksiyonel benzerlikler de gösterir (Shiryayev ve Moens, 2010). Kodlanmış protein çekirdekte bulunur, ancak fosforilasyon ve aktivasyon üzerine sitoplazmaya yer değiştirir ( NCBI).

MK5 genine hiçbir analog, omurgasızlarda veya bitkilerde mevcut görünmemektedir, ancak omurgalı MK5 proteini, insan MK5 ile% 87 ila 99 amino asit kimliğini paylaşan omurgalılar içinde yüksek oranda korunmuş bir protein kinazdır (Lindin ve ark, 2013).

MK5 ve p38 MAPK hücrelerde fiziksel olarak etkileşime girebilir, ancak MK2'nin baskınlığı ve MK5'in p38MAPK için düşük afinitesi nedeniyle bu tür kompleksler sınırlıdır ve bu nedenle tespit edilmesi zordur. Bununla birlikte, hücrenin bazı gelişimsel veya fizyolojik durumları veya ortak hedeflerde (örneğin, GLUT4) ortak lokalizasyon, bu iki proteinin etkileşmesine izin verebilir (Shiryayev ve Moens, 2010).

#### 2.5.1.4. p38 MAPK'nun Hücresel Süreçlerdeki Rolü

ER stresi, hücre ER homeostazını restore edemediğinde apoptoziyi başlatabilen katlanmamış protein cevabını (UPR) tetikler (Nobuhiro Morishima ve ark, 2011). UPR (unfolded protein response) ASK1-MKK4 / 7-JNK sinyalini aktive eder ve bunun için mekanizma bilinmese de ERK1 / 2 aktivasyonunu destekler. Bununla birlikte, MEKK4-MKK3 / 4/6-p38 sinyali ayrıca UPR aracılığıyla CHOP ve ATF6'nın p38'e bağlı fosforilasyonunu modüle eder (Darling ve Cook, 2014).

GADD153 olarak da bilinen CCAAT arttırıcı-bağlayıcı protein homolog proteini (CHOP), hücresel çoğalma, farklılaşma ve ekspresyon ile ilgili işlemlerin düzenlenmesinde yer alan CCAAT / arttırıcı bağlayıcı protein (C / EBP) transkripsiyon faktörleri ailesine aittir (Li ve ark, 2014). ATF6 (Activating Transcription Factor) ise endoplazmik retikulum (ER) stresi sırasında katlanmış protein tepkisi (UPR) için hedef genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bir ER stres sensörü / dönüştürücüsü olarak işlev görür ve ER stresine bağlı proteolizin ardından, ER chaperonları şifreleyen genlerin promotörlerinde bulunan cis etkili bir ER stres yanıt elemanı (ERSE) vasıtasıyla bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (GeneCards Human Database).

ASK1 çeşitli hücre içi streslere cevap olarak p38 MAPK yollarını aktive eden, strese duyarlı bir MAP3K'dır (Watanabe ve ark, 2015). Yapılan çalışmada ASK1 ekspresyonu olmayan nakavt fareler, MAPK sinyalleşmesinde ciddi kusurlar gösterir. Oksidatif strese cevap sırasında aktive olan MAPK'lar, MAPKKK'lerin TAO grubunun üyelerini fosforilleyerek aktive eden ATM protein kinazının DNA hasar tepkisi sırasında aktive edilmesini sağlar. Daha önce ASK1'in JNK ve p38'i aktive ederek oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne aracılık ettiğini gösterildi. Bu mekanizma, stresle aktive edilen MAPK sinyalleşmesinin p38 dalı için seçici görünmektedir (Hotamisligil ve Davis, 2019; Watanabe ve ark, 2015).

Mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETC) disfonksiyonu tarafından üretilen endojen ROS, önemli bir stres düzenleyici olan p38 MAPK yolunu aktive eder ve bu nedenle stres ile ilişkili yaşlanma bozukluklarına önemli bir katkıda bulunur (Brobey ve ark, 2015).

*Saccharomyces cerevisiae*'da p38 homologu Hogl, öncelikle ozmotik stres ile aktive edilir ve yüksek ozmolariteye karşı savaşmak ve adapte olmak için spesifik bir gen ekspresyon programına aracılık eder. Bu, kısmen, Hogl'in aracılık ettiği, ozmotik strese cevap veren genlerin promotörlerini hedef alan bir dizi transkripsiyon faktörünü düzenlemektedir (Whitmarsh, 2010).

Stres yanıtındaki rollerinin yanı sıra p38 immünolojik etkilerin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Gerçekten de, p38'lerin iltihaplanmanın uyarılmasında anahtar bir bileşen olarak hareket ettiği ve şu anda otoimmün hastalıklar, iltihapla ilgili hastalıklar için önemli terapötik hedefler olduğu düşünülmektedir (Plotnikov ve ark, 2010).

*Caenorhabditis elegans*'ta yapılan genetik deneyler, doğuştan gelen bağışıklıkta p38 için bir rol oluşturmuş ve transkripsiyon profillemesi, p38'in patojen-yanıt genlerinin yeniden düzenlenmesi için gerekli olduğunu göstermiştir (Whitmarsh, 2010).

Park ve arkadaşları, HT22 hippocampal nöronal hücre hattında yapmış olduğu çalışmada, glutamatın HT22 hücrelerinin ölümü ile ilişkili olan ERK' nın kalıcı aktivasyonuna yol açtığını ortaya çıkardı.

Sonuçlar glutamatın neden olduğu oksidatif toksisitenin, JNK, ERK ve p38 dahil olmak üzere MAPK'ların fosforilasyonuna yol açtığını ve bunun da kalıcı nöronal hücre ölümü ile sonuçlandığını gösterdi (Park ve ark, 2015).

Diğer MAPK basamaklarından farklı olarak, p38'lerin, öncelikle Ras bağımlı ve bağımsız transformasyon, istila ve ayrıca apoptozu indükleyerek bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Plotnikov ve ark, 2010). Bununla birlikte, daha az sayıda durumda, p38'lerin, özellikle kansere bağlı inflamasyon ya da hücre döngüsünün düzenlenmesindeki rolünden dolayı kanser ilerlemesini tetiklediği gösterilmiştir (Yang ve ark, 2013).

P38'in aktivasyonu hücre proliferasyonunu teşvik edebilir veya hücre döngüsün durmasını tetikleyebilir (Darling ve Cook, 2014). Büyüme faktörü stimülasyonunun ardından p38, siklin D1 ekspresyonunu ve transkripsiyonel baskılayıcı retinoblastoma ile ilişkili proteinin fosforilasyonunu indükleyen geçici aktivasyona uğrar. Rb'nin fosforilasyonu, E2F'den ayrışmasını ve hücre çoğalmasını uyardıktan önce S-faz giriş geninin transkripsiyonunu artırır (Darling ve Cook, 2014).

Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri p16, p21 veya p27'nin indüksiyonu yoluyla hücre döngüsü durdurulmasını destekler. Hücre döngüsü düzenlemesine ek olarak, p38 aktivasyonu transkripsiyonel aktivatör p53'ün p38'e bağlı fosforilasyonu, stabilizasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini artırır. Apoptozun indüklenmesi pro-apoptotik proteinler PUMA ve NOXA' nın ekspresyonunu içeren p53-hedef genlerin ekspresyonunun artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Darling ve Cook, 2014).

Yapılan çalışmalar p38 aktivitesinin normal immün ve inflamatuvar yanıtlar için kritik olduğunu gösterir. p38, makrofajlarda, nötrofillerde ve T hücrelerinde sitokinler, kemokinler ve bakteriyel lipopolisakarit dahil olmak üzere sayısız hücre dışı iltihap araçları tarafından aktive edilir (Huang ve Chi, 2009; Roux ve Blenis, 2004).

p38, kemotaksi, ekzositoz, yapışma ve apoptoz da dahil olmak üzere makrofaj ve nötrofil fonksiyonel tepkilerine katılır ve ayrıca gamma interferon üretimini düzenleyerek T-hücre farklılaşmasına ve apoptozisine aracılık eder. P38 ayrıca bu proseste yer alan spesifik hücrel mRNA'ları stabilize ederek immün yanıtı düzenler (Cuenda ve Rousseau, 2007).

Sonuç olarak, p38 MAPK sıklıkla stresle aktive olan MAPK'ler olarak adlandırılır. Enflamatuvar sitokinlere ve fiziksel / kimyasal ortamda meydana gelen birçok değişime ve ayrıca DNA hasarı ve redoks dengesizliğine yanıt verirler (Cuenda ve Rousseau, 2007; Hotamisligil ve Davis, 2019).

#### ***2.5.1.5. P38 Sinyal Yolağı ile İlişki Hastalıklar***

İn vivo çalışmalar, stresle aktive olan MAPK'ların felç, epilepsi, alzheimer hastalığı ve parkinson hastalığı dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıklarda kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Strese aktive edilmiş MAPK'lar tarafından düzenlenen hücre ölümü de tümör gelişimi sırasında önemli bir rol oynayabilir (Cuenda ve Rousseau, 2007; Hotamisligil ve Davis, 2019).

Ek olarak, p38'lerin kardiyovasküler hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir ve bu aktivitenin inhibisyonunun kardiyokoruyucu bir etkisi vardır. Ayrıca, nörodejeneratif hastalıkların indüklenmesi, diyabette ve hatta kanserde de rol oynamıştır (Park ve ark, 2015; Cuenda ve Rousseau, 2007; Yang ve ark, 2013).

## 2.6. KLOTHO

### 2.6.1. *Klotho Geni ve Proteini*

Kuro-o arkadaşları 1997 yılında birkaç yaşlanma fenotipinin baskılanmasında görevli yani yaşlanma sürecini yavaşlatan bir gen keşfetti ve bu gene “Klotho” adı verildi. Klotho, Antik Yunan Mitolojisindeki üç Kader Tanrıça’sından birisi ve yaşam ipliğini eğirmek anlamına gelir (Boksha ve ark, 2017; Kuro-o ve ark, 1997). Fare, sıçan ve insan klotho proteinini kodlayan Klotho geni sırasıyla kromozom 5 (5; 5 G3), 12 (12p12) ve 13 (13q13.1) lokalizedir. Kodlayan gen dizisi beş ekson ve dört introndan oluşur (Boksha ve ark, 2017). Fare ve insan KL genlerinde üçüncü ekzonda bir alternatif mRNA işlenmesi ile oluşturulan mRNA'nın translasyonundan üretilen kısa formlu, salgılanan  $\alpha$ -Klotho proteinini kodlar. Salgılanan  $\alpha$ -Klotho, insanlarda ve farelerde sırasıyla 1650 ve 1647 nükleotit mRNA'larından çevrilir. Sıçanlarda ise salgılanan  $\alpha$ -Klotho tespit edilmedi (Xu ve Sun, 2015).

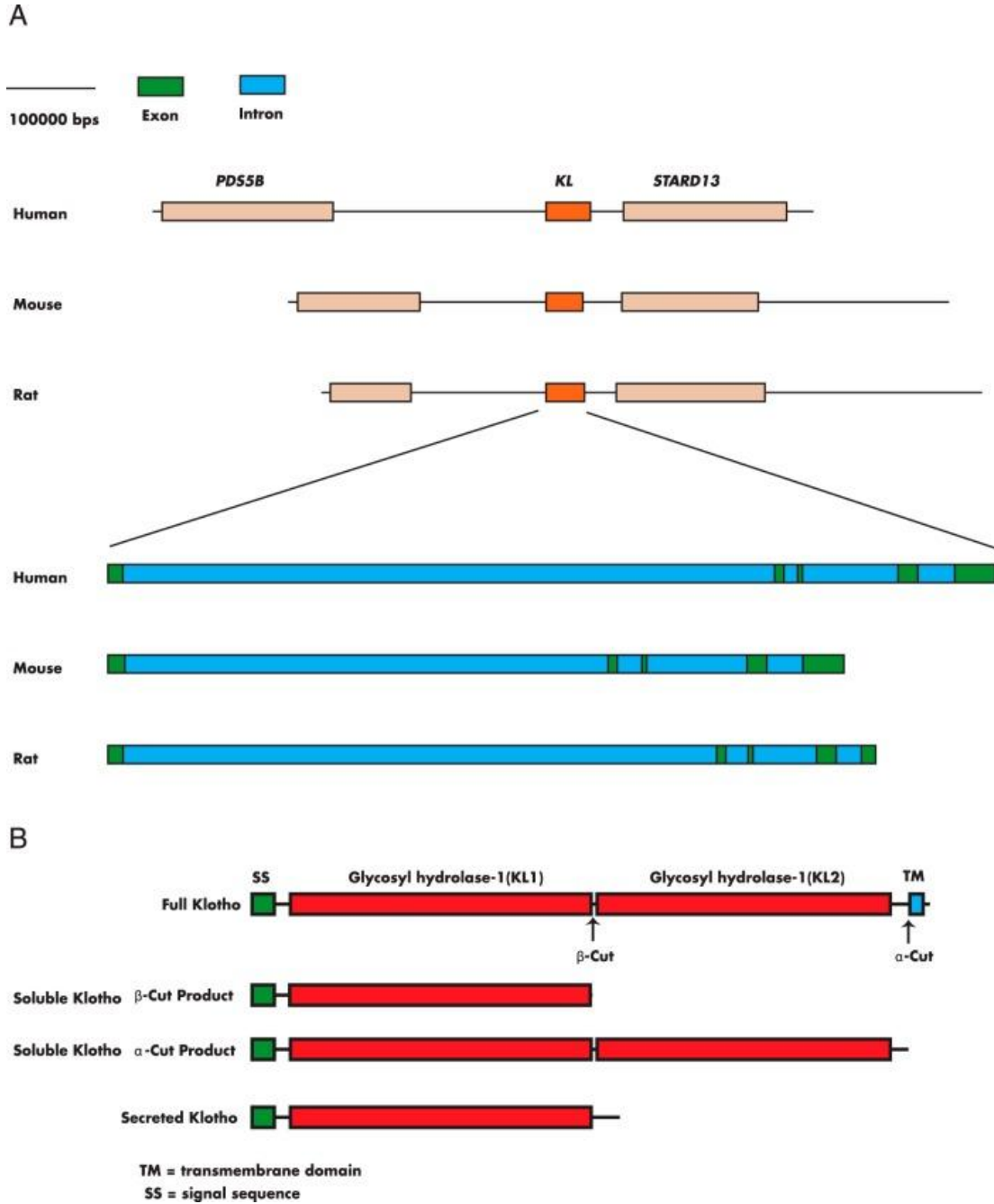
**Tablo 1.2.** Klotho gen lokalizasyonu ve yapısı (Wang ve Sun, 2009)

	Fare	Rat	İnsan
Gen Lokasyonu	5q12	12q12	13q12
Membran Form (ORF)	3042 bp	3042 bp	3036 bp
Salgılanan Form (ORF)	1650 bp	-	1647 bp
Membran protein uzunluğu	1014 a.a	1014 a.a	1012 a.a
Salgılanan protein uzunluğu	550 a.a	-	549 a.a

*Klotho* geni insanlar, fareler ve sıçanlarda büyük oranda korunur. Özellikle,  $\alpha$ -Klotho protein sekansı insanlar ve fareler arasında% 98 aynıdır. Ayrıca *Danio rerio* (zebra balığı) ve *Caenorhabditis elegans*'ta da bulunur (Xu ve Sun, 2015).



*Danio rerio* KL geni, kromozom 10 üzerinde bulunur ve komşu genler, sırasıyla insan ve fare PDS5B ve STARD13 genlerine homolog olan Fryb ve LOC100534680'dir. *C.elegans*'ta ise C50F7.10 ve E02H9.5 olmak üzere iki olası ortolog tanımlanmıştır. İki gen, farklı kromozomlar üzerinde bulunur ve % 79 oranında sekans benzerliği saptandı (Xu ve Sun, 2015).



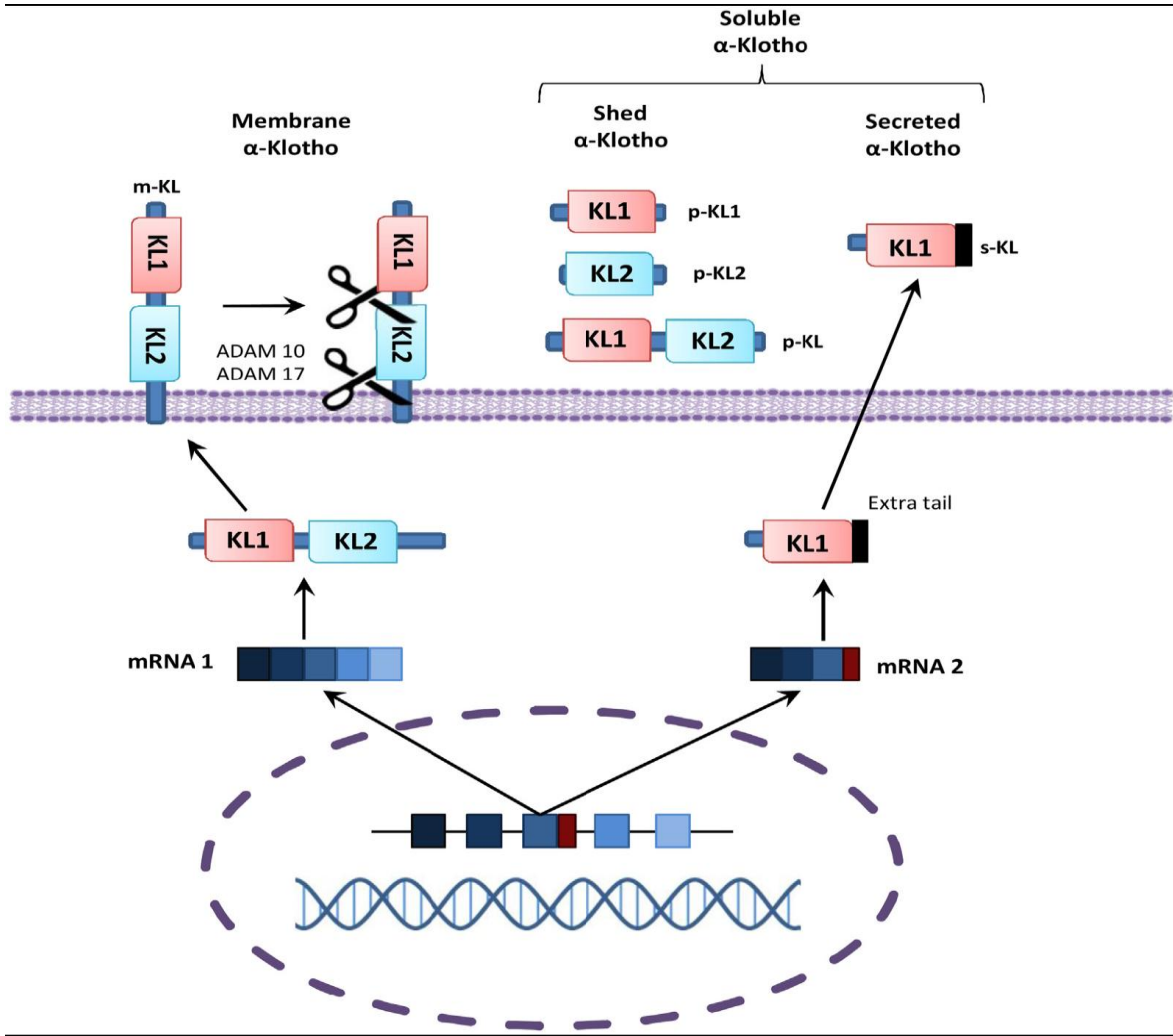
Şekil 2.9. İnsan, fare ve sıçanlarda klotho gen bölgesi (Xu ve Sun, 2015)

KL geni, hücre dışı alanı L-glukozidazlarla homoloji taşıyan tek geçişli bir membran proteinini kodlar (Shiraki-Iidaa ve ark, 1998). Promotör bölgesi bir TATA kutusundan yoksundur ve SP1 için dört potansiyel bağlama bölgesi içerir (Shiraki-Iidaa ve ark, 1998).

$\alpha$ -Klotho proteini, biri transmembran formunu (sırasıyla insan ve farede sırasıyla 1012 ve 1014 aa, ~130 kDa) ve ikincisi kısa çözülebilir formunu (550 aa, ~70 kDa) kodlayan iki mRNA türü tarafından kodlanır. mRNA'lerden biri hücre dışı alanı bakteri ve bitkilere ait  $\beta$ -glukuronidaz enzimi ile homoloji taşıyan iki katlı iç tekrarlardan oluşan (KL1 ve KL2 olarak adlandırılır), 1012 amino asitli tek geçişli bir membran proteinini kodlar (Matsumura ve ark,1998; Ohyaama ve ark,1998; Shiraki-Iidaa, 1998; Torbus Paluszczak ve ark, 2018). Transmembran KL proteini ve transmembran proteinin kesilmesiyle oluşan 3 farklı protein başlangıçta 130 kDa tek geçişli bir transmembran protein üreten aynı mRNA transkriptinin ürünüdür Transmembran proteinin ADAM10, ADAM17 ve  $\beta$ -APP kesme enzimi 1 (BACE1) tarafından proteolitik kesilmeyle oluşan "shed form" olarak adlandırılıp, hücre yüzeyinden serbest bırakılan üç farklı çözülebilir protein oluşur (Paluszczak ve ark, 2018; Cararo-Lopes ve ark, 2017). Diğer mRNA ise "salgılanan" olarak da adlandırılan kısa çözülebilir form kodlar. Bu salgılanan protein alternatif işleme ile diğer proteinlerden ayrı bir mRNA'dan üretilir. Salgılanan Klotho proteini 62 kDa molekül ağırlığındadır ve 549 amino asitten oluşur ( Lim ve ark, 2015).

Bu salgılanan form sadece farelerde ve insanlarda tespit edildi (Xu ve Sun, 2015; Cararo-Lopes ve ark, 2017). Salgılanan klotho C-terminal bölgesinin bir kısmında membran formunun sekansından farklı , kısa sekans taşır (Wang ve Sun, 2009).

Membran klotho proteini N-terminalinde kısa bir sinyal dizisi, C terminalinde kısa transmembran kısım ve hücre içi dizi taşır. 1012 aminoasitlik membran klotho proteininin 980 amino asitlik bir kısmı hücre dışı bölgeyi oluştururken, 21 amino asitlik kısmı hücre içi bölgeyi oluşturur. (Cararo-Lopes, ve ark, 2017; Kuro-o ve ark, 1997).



Şekil 2.10. Klotho geni mRNA transkriptleri (Cararo-Lopes ve ark, 2017)

### 2.6.2. Klotho geni ve Yaşlanma

Makoto Kuro-o ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma ile klothoyu aşırı eksprese eden transgenik farelerin diğer vahşi tip farelere nispeten %30- 40 daha uzun ömre sahip olduğunu ve klotho geni baskılanan farelerin ise ortalama 2 ay ömre sahip olduğunu yani yabanil tip fare ömrünün sadece %5-6'sı kadar olduğunu belirlemiştir. Klotho geni baskılanan transgenik farelerin vahşi tip olanlara göre ortalama 3-4 hafta erken yaşlanmaya başladığı ve büyüme geriliği olduğu bunun da sinyal yollarının inaktive edilmesiyle meydana geldiği belirtilmiştir (Kuro-o ve ark, 1997).

Ayrıca klotho geni baskılanan transgenik fareler ve Klotho geni aşırı eksprese edilen fareler birçok parametre baz alınarak karşılaştırılmıştır ve Klotho geninin vücutta birçok görevde rol aldığı gösterilmiştir. (Wang ve Sun, 2009; Bloch ve ark,2009; Dalton ve ark, 2017).

**Tablo 2.2.** Klotho geni baskılanan ve aşırı eksprese olan farelerin çeşitli parametrelerinin karşılaştırılması

Parametre	Klotho geni baskılanan fareler	Klotho geni aşırı eksprese edilen fare
Vücut ağırlığı	Büyüme geriliği gösteriyor	Normal
Ortalama yaşam süresi	2,5- 3 yıl ömre sahip yabanil tip fareler için yaklaşık 2 ay	Yabanil tip farelerden yaklaşık %20- 30 daha uzun
Maksimal yaşam süresi	100 günden daha az	936 günden daha fazla
İnsülin	İnsülin salgılaması azaldı ve İnsüline duyarlı hale geldi	İnsülin ve IGF-1 sinyallemesine karşı artan direnç gösterdi
Fosfor homeostazisi	Hiperfosfatemi yani kandaki fosfor oranında artış	Normal
Kalsiyum homeostazisi	Çeşitli organlarda ektopik kalsifikasyon	Normal
Hastalıklar	Hipogonadizm, kısırlık, erken timik farklılaşma, ektopik kalsifikasyon, kemik mineral yoğunluğunda azalma, deri ve kas atrofisi, ataksi, amfizem, bilişsel bozukluk, duyma kaybı, vasküler kalsifikasyon , vasküler endotel hücrelerde NO (Nitrik Oksit) sentezinde azalma	Angiotensin-2 uyarımlı böbrek hasarından korunma, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> uyarımlı apoptozun baskılanması, Arteriyoskleroz için risk faktörlerinde azalma, duyma yeteneğinde artış

Faredeki klotho gen ekspresyonundaki bir kusur insan yaşlanmasına benzer şekilde mutant farelerde kısa bir ömür ve nöronal dejenerasyon, arterioskleroz, vasküler kalsifikasyonlar, doku kalsifikasyonları amfizem, gonadal displazi, infertilite, cilt atrofisi, ataksi, hipoglisemi ve ciddi hiperfosfatemi gibi birçok hastalığa neden olduğu belirlenmiştir (Lim ve ark, 2015; Dalton ve ark, 2017).

Klotho geninin ekspresyonu dokuya özgüdür fakat önemli olan vücut sıvılarındaki serbest Klotho proteini seviyesidir. Böbrek, koroid pleksus ve beyin parankimi dokularında yüksek seviyede ekspresyon gözlenirken , hipofiz, paratiroid bezi, pankreas, üreme organları, mesane, bağırsaklar ve kaslarda diğer dokulara göre daha az eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Boksha ve ark, 2017).

İnsanlarda, serumdaki toplam Klotho protein seviyesi yaşla birlikte düşerken, kısa ömürlülük ve osteoporoz, koroner arter hastalığı ve inme gibi yaşa bağlı hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili klotho geninde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tanımlanmıştır (Dalton ve ark, 2017).

Klotho'nun hangi mekanizma ile yaşlanmayı geciktirdiği tam olarak açıklanamamıştır. Nasıl nöroprotektif etki gösteriyor sorusunun cevabı ise hala aranmaktadır. Bu çalışmada Klotho proteininin p38 MAPK ifadesi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) destekli bu projede Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Betül Karademir'den temin edilen "HT22 Fare Hippocampal Nöronal Hücre Hattı" kullanılmıştır. Çalışmanın hücre kültürü deneylerinde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarı, moleküler deneylerde ise Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı ile Elisa Laboratuvarı kullanılmıştır.

Çalışmanın deney sıralaması HT22 hücre serisinin belirli koşullar altında çoğaltılması, Endosülfan'ın hücre üzerindeki lethal dozunun (LD50) XTT canlılık testi ile belirlenmesi, DNA'da kırık oluşturmak için çoğaltılan hücreye Endosülfan uygulanması, Klotho'nun hücrelere belirli dozlarda uygulanarak XTT testi ile etkili dozun belirlenmesi, daha sonra Klotho 12,16 saatler ile Endosülfan'ın 12, 16 saat uygulamalarının yapılması ve XTT testi ile canlılık kontrolü, daha sonra örneklerden RNA izolasyonu yapılması, cDNA sentezi, Real Time PCR yapılması ve analizi, son olarak hücre örneklerinden protein izole edilerek Western Blot yöntemi ile ekspresyon analizinin yapılması olarak gerçekleşmiştir.

### 3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

1. Laminar kabin; LABgard Class 2 Biological Safety Cabinet
2. Otomatik pipet; MotoPet
3. Serolojik pipet; Costar Stripette 5ml, Lot No:31815007
4. 50'lik falcon; Lab Solute, Lot No:50CB027
5. 25'lik falcon; SPL, Lot No: 50015
6. İverted Mikroskop ; Olympus CKX41, Bin Oküler
7. 75 cm<sup>2</sup>'lik flask; SPL
8. 25cm<sup>2</sup>'lik flask; SPL, Lot No:18B70TM110002
9. Crovial Tüp; Biologix 18-8204
10. Hücre kültür plate(12 well); Costar, Lot No:21517016
11. FBS(Fetal Bovine Serum) ; Capricorn, Lot No:CP18-2138

12. L-Glutamin Solüsyonu ; Capricorn, Lot No:CP17-1725
13. Penisilin-Streptomisin ; Gibco, Lot No:1953092
14. %0.25 Tripsin-Edta(1X) ; Gibco, Lot No:25200-056
15. %96'lık Etanol ; TEKKİM (Teksoll), Lot No:020118185001
16. EndosülfanPESTENAL ; Sigma-Aldrich, Lot No:BCBT1374
17. DMSO ; Sigma-Aldrich, Lot No:SZBE1610V
18. Steril Filtre ; Sartorius, Lot No:70975103
19. 96'lık Hücre kültür plate (96 well) ; Costar, Lot No:199120301
20. 6'lık Hücre kültür plate (6 well) ; Costar, Lot No:31712035
21. Santrifüj ; Hettich Mikro 120
22. Santrifüj ; Hettich Mikro 200R
23. Hassas Terazı ; KERN ABJ 220-4 M
24. Mikropipetler ; Gilson 10'luk, 200'lük, 1000'lik
25. Toma Labı
26. Sıvı Azot Tankı ; international Cryogenics, 43355
27. CO<sub>2</sub>'li Etüv ; Memmert
28. Santrifüj ; Rotofix 32
29. Su Banyosu ; Memmert, Tip: WNB14
30. +4 Buzdolabı ; Uğur
31. -20 Buzdolabı ; Haier Bio Medical
32. -86 Buzdolabı ; Nuaire, Model No: NU-9483E
33. Besiyeri ; Capricorn, DMEM High Glucose (4.5 g/l), Lot No: CP18-2212
34. PBS ; Capricorn Dulbecco's PBS(1X), Lot No: CP18-2007
35. XTT Hücre Canlılık Kiti(1000) ; Biotum , Cat No:30007
36. Klotho (50 ug) ; R and D Systems (rmKlotho), Lot No:QWL1117081
37. cDNA Kiti ; GeneAll 2X HyperScript
38. Elisa Reader ; Heales MB-530
39. RNA İzolasyon Kiti ; GeneAll Hybrid-R Total RNA Purification
40. HT22 Fare Hippocampal Nöronal Hücre Hattı
41. P38 MAPK-Forward Primer 20 bp, (5'-GCC CCA GTA GTC AGA AGC AG-3') ; Sentegen
42. P38 MAPK-Reverse Primer 20 bp (5'-TAG GGGCTG AAG AGA GGT GA-3'); Sentegen
43. NUPAGE % 4-12 BT gel 1.0 MM 10W per box, Cat No:NP0321

44. Water for Molecular Biology 1000 ml, Cat No: MB11101
45. 0.5lik tüp, Cat No: 80-0500
46. Ponceau S Staining Solution Cat No: MB19201
47. NZY Supreme ECL HRP Substrate, Cat No: MB19301
48. BlueSafe 1000 mL, Cat No: MB15201
49. PRIMARY ANTIBODY, Cat No: EPP13703
50. SECONDARY ANTIBODY-GOAT ANTİ RABBİT, Cat No: SAEP003
51. Western Breeze Chemiluminescent Kit, Cat No: WB7106
52. ProtinEx total protein extraction solution 100ml preps, Cat No: 701-001
53. QUBIT PROTEIN ASSAY KIT, 100 1 KIT, Cat No: Q33211
54. 1.5ml, Clear, locking teeth, RNase & DNase Free, 500 Tubes/box, Cat No: 80-0015
55. 15ml, Plug-seal cap, PP, Conical, bulk pack, 50 Tubes/Bag, Cat No: 10-0152
56. 50ml, Plug-seal cap, PP, Conical, bulk pack, 50 Tubes/Bag, Cat No: 10-0502
57. 10µl Racked, Sterile, RNase & DNase Free, Clear,96 Tips/Rack, Cat No: 21-0010
58. 200µl Racked, Sterile, RNase & DNase Free, Yellow, 96 Tips/rack, 10 Racks, Cat No: 21-0200
59. iBlot™ Transfer Stack, nitrocellulose, mini Cat No: IB301032
60. 1ml Racked, Sterile, RNase & DNase Free, Blue, 100 Tips/rack, 10 Racks, Cat No: 21-1000
61. Polypropylene, 81-wells, -90°C to 121°C, 5 Assorted Colors20 Boxes/Cas
62. filtre kağıdı, Cat No: 90-9081
63. NZYBlue Protein Marker 100 lanes, Cat No: MB17601
64. NUPAGE SAMPLE REDUCING AGENT 10ML, Cat No: NP0009
65. NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X), Cat No: NP0008
66. NUPAGE Transfer Buffer (20X), Cat No: NP0006
67. Güç kaynağı
68. Dikey elektroforez sistemi
69. Otoklavlanmış distile su
70. P38-Elabnsince ( E-AB-34076)- 38 kDA



## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü prensibi ilk olarak 20. yüzyılın başlarında hayvan hücresi davranışını gözlemlemek amacıyla, bir embriyolog olan Roux'un, birkaç gün boyunca tavuk embriyosunu korumak için ılık tuzlu su kullandığında ortaya çıktı. Bu nedenle hücre kültürü, doğal ortamlarından (in vivo) hücrelerin izole edilmesi ve daha sonra büyümesi için uygun olan yapay bir ortamda in vitro çoğaltılması ve yetiştirilmesi olarak tanımlanmıştır (Hudu, 2016).

Hücre kültürü genellikle orijinal dokudan alınan (enzimatik, mekanik veya kimyasal ayrışma yoluyla), bir birincil kültürden veya kontrollü bir sıkı laboratuvar koşulları (sıcaklık, gaz, basınç ve sterilité) altında bir hücre hattından alınan dağılmış hücrelerin bir süspansiyonu şeklinde gerçekleştirilir (Philippeos ve ark, 2011).

Hücreler normal dokudan elde edilebilir (örneğin, cilt biyopsisi) yada klinik prosedürler ve etik kaygılar izin verirse hastaların tedavisinin bir parçası olarak ameliyat sırasında çıkarılan hastalıklı dokulardan (örn., karaciğer tümörü biyopsisi) elde edilebilir(Philippeos ve ark, 2011). İnsan hücrelerinin kültürü, in vivo olarak kolayca mümkün olmayan insan metabolizması ve fizyolojisi çalışmalarına izin veren yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Philippeos ve ark, 2011).

Hücrelerle dokulardan izole edilebilirlerse, günler ile haftalar boyunca hücre kültürleri oluşturma olasılığı vardır. Alternatifler ise in vivo yapıyı muhafaza etmelerine rağmen, genellikle kısa süreli hücre canlılıklarından dolayı derhal kullanılması gereken doku dilimleri ve biyopsileri kullanmaktır (Philippeos ve ark, 2011).

Ölümsüz hücre hatları sıklıkla birincil hücrelerin yerine araştırmada kullanılır. Maliyet etkin, kullanımı kolay, sınırsız malzeme tedariki sağlama ve hayvan ve insan dokusu kullanımıyla ilgili etik kaygıları atlatma gibi çeşitli avantajlar sunarlar. Hücre hatları ayrıca tutarlı bir örnek ve tekrarlanabilir sonuçlar sağladığından değerli olan saf bir hücre popülasyonu sağlar (Kaur ve Dufour, 2012). Ayrıca kültürler doğrudan hücreye erişimi olan tanımlanmış reaktiflerle muamele edilebilir.

Doku örnekleri düzenli olarak heterojendir; Ancak bir ya da iki pasajda, kültürlenmiş hücre hatları her transferde ve seçici olarak rasgele karıştırıldıkları için homojen hale gelir. (Philippeos ve ark, 2011).

Hücre kültürü monoklonal antikor gelişimi, aşı üretimi, ilaç metabolizması ve sitotoksiteyi test etmek, gen fonksiyonunun incelenmesi, yapay doku üretimi ve biyolojik bileşiklerin sentezlenmesi, viral enfeksiyon varlığının saptanması ve yeni keşfedilen patojenler için hızlı testler oluşturmak gibi birçok alanda kullanılır (Hudu, 2016; Kaur ve Dufour, 2012).

Hücre kültürleri üç bölümde incelenir; Primer (birincil) hücre kültürleri, sekonder hücre kültürleri ve sürekli hücre kültürleri (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

Primer hücre kültürü, hücrelerin bir ana hayvan veya bitki dokusundan enzimatik veya mekanik önlemlerle ayrılması ve hücrelerin büyümesinin kontrollü çevre koşulları altında cam veya plastik kaplarda uygun bir substrat içinde tutulmasıdır. Birincil kültürdeki hücreler, orijinal dokudaki hücrelerle aynı karyotipte (bir ökaryotik hücrenin çekirdeğindeki kromozomların sayısı ve görünümü) bulunur.

Kültürlerdeki hücreler mevcut tüm substratı işgal ettiğinde veya süspansiyon kültürlerindeki hücreler daha fazla büyümeyi desteklemek için ortamın kapasitesini aştığında, hücre çoğalması azalmaya veya tamamen durmaya başlar. Sürekli büyüme için en uygun hücre yoğunluğunu korumak ve daha fazla çoğalmayı uyarmak için birincil kültürün alt kültürlenmesi gerekir. Bu işlem ikincil hücre kültürü olarak bilinir.

İkincil hücre kültürü sırasında, birincil kültürden gelen hücreler, taze büyüme ortamı olan yeni bir kaba aktarılır. İşlem, önceki büyüme ortamının çıkarılmasını ve yapışık primer kültürlerdeki yapışık hücrelerin ayrışmasını içerir. Sekonder hücre kültürü, periyodik olarak büyüyen alan ve taze besin maddeleri içeren hücrelere sahip olmak, böylece hücrelerin ömrünü uzatmak ve kültürdeki bir dizi hücreyi genişletmek için gereklidir.

İkincil kültür, bir birincil kültürün belirli bir hacminin eşit miktarda yeni bir büyüme ortamı içinde kültürlenmesi, hücre çizgilerinin uzun süreli korunmasını sağlar. Örneğin endüstriyel işlemlerde veya bilimsel deneylerde, hücre sayısını artırmak için daha büyük bir taze büyüme ortamı halinde ikincil kültürleme yapılır. Sürekli hücre kültürü ise sonsuz pasajları yapılabilen, kromozom sayıları değişkenlik gösteren, genellikle kötü huylu tümör hücrelerinden elde edilir (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

### **3.2.1.1. Hücre Serileri**

Her hücre hattının kendine has özellikleri vardır ve özelliklerine uygun belirli çalışmalar için kullanılabilir. Bu nedenle, hücre çizgilerinin kökenlerini, özelliklerini iyice araştırmak ve çalışmaya en uygun hücre hattını seçmek önemlidir (Romano ve ark, 2009). Chang karaciğer HeLa hücreleri (serviksin glandüler kanseri), Hep-2, IM-9 (Epstein-Barr virüs transfekte edilmiş B hücreli lenfoblastoid seri), TSU-Pr1 T24 hücreleri (mesane kanseri), PPC-1 (PC-3 hücreleri (prostat kanseri), DAMI (HEL hücreleri (erythroleukemia), 3T3 ( fibroblast ( fare embriyo), PtK1 (epitel hücresi (sıçan, kangru böbrek), SP2( plazma hücresi ( fare myeloma) gibi 6000'den fazla hücre hattı tanımlanmıştır (Akçalı, 2010).

#### **3.2.1.1.1. HT22 (HT-22 Fare Hipokampal Nöron Hücre Serisi) Hücre Serisi**

Bu çalışmada kullanılacak olan HT22, HT-4 hücre hattından alt klonlanmış ölümsüzleştirilmiş bir fare hipokampal hücre hattıdır. Ebeveyn HT-4 hücre çizgisi, sıcaklığa duyarlı SV40 T-antijeni (2) ile fare nöronal dokularının ölümsüzleştirilmesinden türetilmiştir. Hipokampus, temporal lobun içine gömülü karmaşık bir beyin yapısıdır. Öğrenme ve hafızada önemli bir rolü vardır. Çeşitli uyaranlardan zarar gören kırılgan bir yapıdır. Araştırmalar ayrıca çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozukluklarda da etkilendiğini göstermiştir (Dhikav ve Anand, 2012). Örneğin, yaşlılarda en yıkıcı demans formunun, Alzheimer hastalığının, entorinal korteks ve hipokampüste en erken, en ciddi patolojik değişikliklere sahip olduğu ve artan hafıza kaybına ve diğer bilişsel gerilemeye yol açtığı gösterilmiştir (Liu ve ark, 2009). ancak ayrıntılı mekanizmalar açıklanmaya devam etmektedir (Liu ve ark, 2009). HT-22, glutamat'a karşı oldukça hassastır ve bu nedenle nöronal hücrelerde glutamatın neden olduğu toksisiteyi incelemek için sıklıkla bir model sistem olarak kullanılır.

Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Betül Karademir'den temin edilen "HT22 hücre serisi" kuru buzla dondurulmuş halde ulaşıldıktan sonra hemen hücrenin çözülmesi ve ekimi yapılmıştır.

### **3.2.1.2. Hücre Kültüründe Dikkat Edilmesi Gerekenler**

Öncelikle kültür yapılırken kullanılan bütün solüsyonlar 37°C’de su banyosunda ısıtıldı ve öyle kullanıldı. Hücre kültürü için kullanılan tüm malzemeler steril olarak temin edildi. Diğer sarf malzemeler ise 121 °C’de otoklavlanarak kullanıldı.

Her çalışmada laminar kabin çalışmaya başlamadan 5-10 dakika önce açılarak hava sirkülasyonu sağlandı, daha sonra %10’luk çamaşır suyu ile iyice temizlendikten sonra %70’lik etanol ile steril edildi. Her çalışmadan önce ve sonra kabin steril edildi, çalışma bittikten sonra kabin UV lambası en az 30 dakika açıldı. Ayrıca hücre kültür laboratuvarındaki UV lambası belirli aralıklarla açılarak kontaminasyon riski azaltıldı. Laboratuvarda mutlaka önlük, eldiven, bone kullanıldı ve biyogüvenlik kurallarına uyuldu. Kontaminasyon riskini azaltmak için ayrıca galoşta kullanıldı. Laminar kabinin içerisine alınacak tüm solüsyon ve araç-gereçler %70’lik alkol ile silindi.

Tüm cihaz ve ekipmanların yanı sıra CO<sub>2</sub>’li etüvün bakımları, ayarları, CO<sub>2</sub> miktarı ve otoklavlanmış su miktarı rutin olarak kontrol edildi. CO<sub>2</sub>’li etüvde çapraz kontaminasyon (farklı hücre serilerinin aynı flaskta ürememesi) olmaması için her hücre serisi farklı katlarda inkübe edilerek çalışıldı. 1 hafta-10 gün arayla laboratuvar ve tüm laboratuvardaki tüm cihazlar %10 çamaşır suyu ile temizlenip ardından %70’lik alkol ile dezenfekte edilmelidir. Haftalık temizlik rutini sonrasında UV lambası gece boyu açılarak sterilizasyon sağlanmalıdır.

### **3.2.1.3. Besiyeri Hazırlanması (500 ml Besiyeri için )**

Serum inaktivasyonu için FBS ( fetal bovine serum) 55°C’ye ısıtılmış su banyosunda 30 dakika inkübe edilir.

Besiyeri ve Penisilin/Sreptomisin 37°C’de 15-20 dakika inkübe edilir.

Serumun total hacme oranı %10 olarak ayarlanır ve 50ml FBS eklenir.

%1 Pen/Strep olacak şekilde 5-6ml antibiyotik besiyerine aktarılır.

%1 L-glutamin olacak şekilde 5-6 ml eklenir.

Besiyeri homojen bir şekilde karıştırılır.

### **3.2.1.4. Stoktan Hücre Çözdürülmesi ve Ekiminin Yapılması**

Hücre çözdürülürken 37°C'ye ısıtılmış su banyosunda kısa süre bekletilip içerisindeki buz tamamen kaybolmadan (yaklaşık 45 saniye) kabine alınır ve crovial tüpte bulunan 1 ml hücre-besiyeri karışımı 15'lik falkona aktarılır, ardından crovial tüp 2 kez daha 1 ml besiyeri ile yıkanır ve falkon tüpe aktarılır. Falkon tüp 1200-2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir ve kabine tekrar alınır. Süpernatant yani üstte kalan besiyeri peleti kaldırmayacak şekilde dikkatlice pipet yardımı ile atılır. Pelet, falkonun dip kısmında gözle görülecek şekildedir. Geriye kalan pelet 25cm<sup>2</sup>'lik flask'a ekilmek üzere 5-6 ml besiyeri içerisinde homojenize edilir ve flask'ın taban yüzeyine değmeyecek şekilde hafifçe flaska aktarılır. Kültür flaskının üzerine ekim yapılan tarih, pasaj sayısı mutlaka yazılmalıdır. Hücre kültürü deneyleri yapılmadan önce hücre serisinin özellikleri, besiyeri içeriği, pasaj süresi ile ilgili literatür taraması yapılarak hücreye yapılacak işlemler hakkında bilgi sahibi olunmalıdır. Ekim yapıldıktan sonra flask İverted mikroskop altında detaylı olarak incelenmeli, hücrelerin homojen dağılıp dağılmadığı kontrol edilmelidir. Daha sonra flask %5-5,5 yoğunluğunda CO<sub>2</sub>, % 95 nem ve 37°C'ye ayarlanmış CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılır.

### **3.2.1.5. Canlı Hücrelerin Mikroskopta Sayımı ve Pasajlama**

Kültürde çoğalan hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalma hızları düşer ve zamanla durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gerekir. Hücre tipine göre çoğalma süreleri farklı olduğundan literatür taraması iyi yapılmalı ve hücre hakkında bilgi sahibi olunmalıdır. HT22 hücre serisi embriyonik sinir hücresi olduğundan çoğalma hızı oldukça hızlıdır.

Öncelikle hücre ekimi yapıldıktan sonra her gün mikroskop altında kontrol edilir ve hücre yoğunluğu flask tabanının %70-75'ini kapladığı zaman pasajlama yapılır. Pasajlama yapılmadan önce hücre sayımı yapılır. Hücre kültürü deney şartları hazırlandıktan sonra flask etüvden çıkarılır ve mikroskop altında yoğunluğu, kontaminasyon olup olmadığı incelenir. Eğer % 70-75 yoğun hücre var ise sayım yapılır ve sonuca göre pasajlama işlemine devam edilir. Hücrenin besiyeri tamamen serolojik pipet ile çekilir.

25 cm<sup>2</sup>'lik flask 5-6 ml, 75cm<sup>2</sup>'lik flask ise 10-12 ml PBS ile flask dik tutularak, tabanına zarar vermeyecek şekilde yıkanır ve PBS çekilir. PBS ile yıkama besiyerinin tamamen flasktan uzaklaşması için gereklidir. Eğer besiyeri ortamdan tamamen uzaklaşmaz ise bir sonraki adımda eklenecek olan Tripsin-Edta'nın etkisi engellenir. Daha sonra 25cm<sup>2</sup>'lik flask için 0,8-1 ml, 75cm<sup>2</sup>'lik flask için 1,8-2,5 ml Tripsin-Edta eklenerek flask CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılır. Tripsin-Edta 37°C'de aktive olur ve hücrelerin flask tabanından ayrılmasını sağlar. 5-8 dakika arası CO<sub>2</sub>'li etüvde bekleyen hücreler etüvden çıkarılarak mikroskop altında incelenir, Tüm hücreler flask tabanından ayrılmış ise eklenen Tripsin-Edta'nın 2-3 katı kadar besiyeri flaskta eklenerek Tripsin-Edta,hücre, besiyeri karışımı elde edilir. Bu karışım daha sonra tamamen çekilerek 15'lik falkona aktarılır ve 1500-2000 rpm'de santrifüj edilerek pelet elde edilir. Süpernatant atılır, elde edilen pelet 1 ml besiyerinde çözdürülür ve sayım için hazır hale getirilir. 1 ml besiyeri-hücre karışımından 20 µl alınır, 20µl Tripan Blue boya ile Pcr tüpünde yavaşça homojenize edilir ve bu homojenize karışımdan mikropipetle 20µl alınarak thoma lamının üzerine bırakılır ve üzerine yavaşça lamel kapatılarak, hücrelerin thoma lamının üzerinde yayılması sağlanır. Hücre sayımı yaparken 4x4=16 yada genellikle 5x5=25 birim kareden oluşan thoma lamı kullanılır.



**Şekil 5.** Toma Lamı ve mikroskopta görülen birimkareler

Bu yöntemde, 1 mm'lik alanda mikroskop altında belirli hacimde canlı hücre sayımı yapılarak hesaplama yardımıyla numunenin bir ml'sinde bulunan hücre sayısının belirlenir. Mikroskop altında karelerin bulunduğu kısımda tarama yapılarak hücre sayımı yapılır. 16 birim kare için çapraz 4, 25 birim kare için çapraz 5 birim kare sayılarak hesaplama yapılır. İdeal olarak 1 birim kare yani 1 mm'lik alanda 30 ile 300 arasında hücre olmalıdır. Eğer daha fazla hücre var ise seyreltilme yapılarak sayım işlemi yapılmalıdır. Ölü hücreler Tripan Blue boyası ile maviye boyanır, canlı hücreler ise boyanmaz. 4 birim kare sayıldıktan sonra bulunan hücre sayısı X 4 X dilusyon oranı X 10000 = 1 ml'ye düşen hücre sayısı şeklinde hesaplama yapılır. Çıkan sonuca göre pasajlama yapılırken hücrelerin kaç flaska bölüneceğine yada stok alınıp alınmayacağına karar verilir.

ThermoFisher Scientific şirketinin belirttiği flask ve well plate'lere göre besiyeri miktarı ve yaklaşık hücre sayısı tablo 3.1 ve tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** ThermoFisher Scientific şirketi flaslara göre yaklaşık hücre sayısı

Flask	Yüzey alanı (cm <sup>2</sup> )	Ekilen hücre sayısı	%70 yoğunluk hücre sayısı	Besiyeri hacmi (ml)
T-25	25	0.7 x 10 <sup>6</sup>	2.8 x 10 <sup>6</sup>	3-5
T-75	75	2.1 x 10 <sup>6</sup>	8.4 x 10 <sup>6</sup>	8-15
T-125	125	4.9 x 10 <sup>6</sup>	23.3 x 10 <sup>6</sup>	35-53
T-225	225	6.3 x 10 <sup>6</sup>	30 x 10 <sup>6</sup>	45-68

**Tablo 3.2.** ThermoFisher Scientific şirketi well-plate'lere göre yaklaşık hücre sayısı

Plate	Yüzey alanı cm <sup>2</sup>	Ekilen hücre sayısı	%70 yoğunluk hücre sayısı	Besiyeri hacmi (ml)
6 well	9,6	0,3x 10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>	1-3
12 well	3,5	0,1x10 <sup>6</sup>	0,5x10 <sup>6</sup>	1-2
24 well	1,9	0,05x10 <sup>6</sup>	0,24x10 <sup>6</sup>	0,5-1
48 well	1,1	0,03x10 <sup>6</sup>	0,12x10 <sup>6</sup>	0,2-0,4
96 well	0,32	0,01x10 <sup>6</sup>	0,04x10 <sup>6</sup>	0,1-0,2

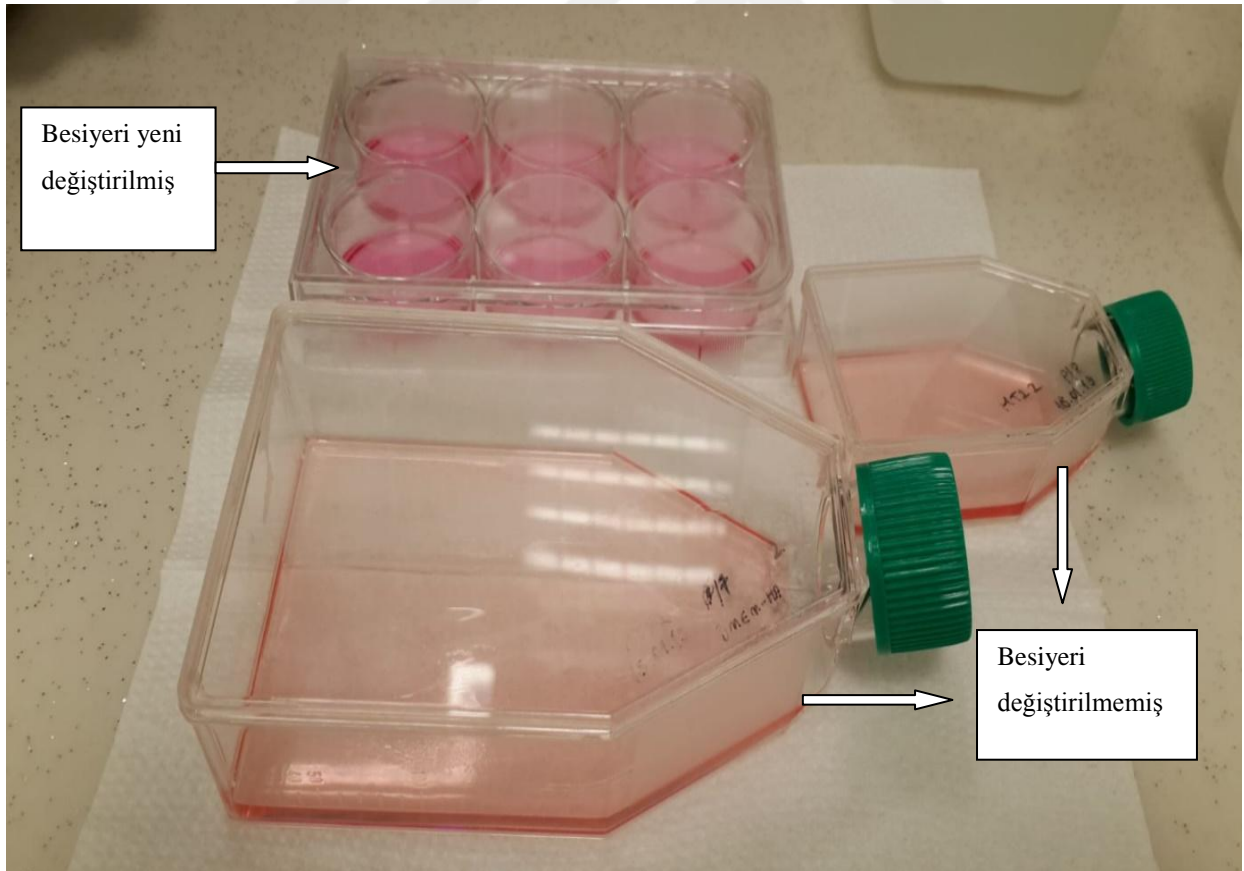
Hücre sayımına göre hücrelerin kaç flaska ekileceğine karar verilir ve hücre-besiyeri homojen karışımı besiyeri ile seyreltilir, homojenize edilerek flaslara ekim yapılır. Tekrar CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılır ve tekrar %70 yoğunluğa gelene kadar bekletilir ve gerekiyorsa tekrar pasajlama işlemi yapılır.



### 3.2.1.6. Hücrelerin Beslenmesi

Hücreler, stoktan çıkarılıp ekim yapıldıktan sonra strese girerler ve % 70 yoğunluğa ulaşmaları gecikebilir. Böyle bir durumda flasklardaki besiyerinin belirli zaman aralıklarında değiştirilmesi gereklidir. Örneğin HT22 hücre serisi stoktan açıldıktan sonra 6-8 gün sonra %70 yoğunluğa ulaşırsa, ilk ekim yapıldıktan 2 gün sonra eğer hücreler tamamen flask tabanına yapışmış ise besiyeri değiştirerek hücrelerin zenginleştirilmiş besiyeri içeriğinden daha fazla yararlanmasını sağlarız. Besiyeri değiştirme zamanı, pH değişikliğinden dolayı besiyeri renginin değişmesi ile de anlaşılır. Fakat hücre kültür deneylerinde genellikle 2 günde bir besiyeri değiştirme rutin olarak yapılır. Besiyeri değiştirilirken flask tabanına değmeyecek şekilde flask dik tutulur ve serolojik pipet ile tüm besiyeri çekilir. Daha sonra flask yüzey alanına göre belirtilen miktarda besiyeri eklenir.

**Şekil 3.2.** Hücre kültüründe besiyeri renk değişimi



### 3.2.1.7. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler deney için hazır hale gelene kadar çoğaltılır ve pasajlanır. Primer hücre serisi elde etmek uzun uğraşlar gerektirdiğinden yada hücre serisi temin etmek maddi ve zaman olarak kayıp olduğundan dolayı elde var olan değerli hücre hatlarının ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere korunabilmesi, çalışma sırasında aynı pasaj sayısındaki hücreler ile tekrar etme olasılığı yada ileriki çalışmalarda aynı pasaj numarasındaki hücreler ile farklı zamanlarda çalışmalar yapabilmek için hücrelerin saklanması gereklidir. Bu işlem 'stok alma' olarak adlandırılır. Stok alma işleminde pasaj sayısı önemlidir. Çünkü pasaj sayısı arttıkça hücre fenotipik ve genotipik değişimlere uğrar. Buda deneyler için istenmeyen farklılıklara neden olur. Bu istenmeyen durumları en aza indirmek için hücreler düşük pasaj sayısında iken stok alınır. Stoktan açılan hücreler 1-2 pasaj çoğaltıldıktan sonra stok alınabilir. %70 yoğunluğa ulaşmış flasklardan pasaj yapılırken hücre sayısı fazla ise hücre dondurulmak için ayrılır.

Dondurma işleminde Tripsin-Edta ile kaldırılan besiyeri ile yıkanıp santrifüj edildikten sonra sayım yapılır. Flaska ekilecek ve stok alınacak hücre sayısı belirlenir ve uygun miktarda besiyeri ile seyreltildikten sonra crovial tüplere hücre sayısı yaklaşık 1 milyon olacak şekilde 900 µl besiyeri-hücre karışımı, 100 µl kriyoprotektan madde eklenir.

Crovial tüp buzdolabına kaldırılmadan önce tüpün üzerine hangi hücre serisine ait olduğu, stok alma tarihi, pasaj numarası ve stok alan kişinin adı yazılır ve parafilm ile ağzı sıkıca kapatılır. Daha sonra bu tüpler kademeli olarak dondurulmak üzere 20 dakika +4°C'de 20 dakika, -20°C'de 20 dakika bekletilir, son olarak -80°C buzdolabına kaldırılır. Saklama işleminde -80°C'lik buzdolabı kullanılır fakat saklama süresi -196 °C olan sıvı azot içerisinde saklama süresine göre nispeten daha kısadır. Bu yüzden laboratuvarında sıvı azot tankı kullanılırsa hücre serileri daha uzun ömürlü saklanabilir.

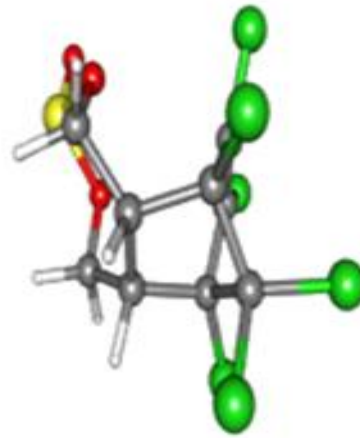
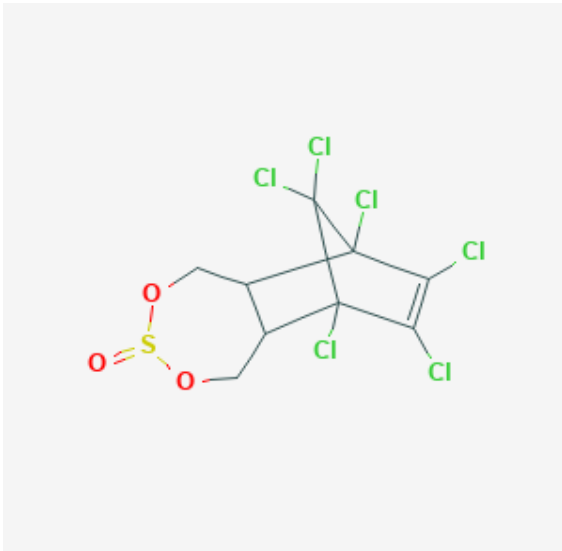
Kriyoprotektan maddeler hücrelerin osmotik şoka maruz kalmasını engellemek için hücre içine hızlı bir şekilde difüze olup su dengesini sağlamasının yanı sıra dondurma ve çözme sırasında elektrolit miktarını azaltır, hücre içerisindeki suyun buz kristallerine dönüşmesini engellerler. DMSO, gliserol, Rowe karışımı kriyoprotektan olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kriyoprotektan madde olarak 100µl DMSO (dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. Ayrıca hücrelerin dondurulması aşamasında son yıllarda hücre hasarını azaltmak için çeşitli şeker ve proteinler membran stabilizatörü olarak kullanılmaktadır. Sükroz, trehaloz ve Bovin serum albümin bu stabilizatörlerden birkaçıdır (Duran ve ark, 2001).

### 3.2.2. Endosülfan

Moleküler formül : C<sub>9</sub> H<sub>6</sub> Cl<sub>6</sub> O<sub>3</sub>S

Moleküler ağırlık : 406.93 g / mol

Diğer Kimyasal isimler : Benzopiren , Thiodan, Thiosulfan, Thionex



Şekil 3.3. Endosülfan moleküler yapısı

Şekil 3.4. Endosülfan 3 boyutlu yapısı

PubChem

Endosülfan (6,7,8,9,10,10-heksakloro-1,5,5a, 6,9,9a-heksahidro-6,9-metano-2,3,4-benzo (e) dioksathiepin-3- oksit) geniş spektrumlu klorlu bir siklodien insektisittir ( Lee ve ark, 2006). Endosülfan tarımda 50 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Analogların çoğunun kullanımı yasaklanmasına rağmen, endosülfan daha az çevresel dayanıklılığa sahip olduğu için günümüzde hala kullanılmaktadır ( Silva ve Gammon, 2009).

Endosülfan yutulma, soluma ve cilt teması ile absorbe edilir(Omurtag ve ark, 2008). Endosülfan bir nörotoksindir. Vücuda alındığında çeşitli baş dönmesi ve bilinç kaybı gibi nörolojik semptomların yanısıra gastrointestinal ve metabolik bozukluklara neden olabileceği hatta ölüme yol açabileceği kaynaklarda belirtilmiştir (Yıldız ve ark, 2008).

Yapılan bir çalışmada, endosülfana maruz kalmanın sıçanlarda kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini artırdığı ve kalp dokusunun zarar görmesine yol açtığı bildirilmiştir (Wei ve ark, 2017). Endosülfan dahil organik klorlu pestisitler reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırarak DNA, protein ve lipitlerin oksidatif hasarına ve genomik kararsızlığa neden olur (Xu ve ark, 2018; Shao ve ark, 2012). Superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) biyolojik sistemlerin serbest radikal saldırılarına karşı antioksidan koruyucu kapasitelerinde önemli bir rol oynayan antioksidan enzimlerdir (Omurtag ve ark, 2008). Spesifik olarak SOD, süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksite dönüştürürken, CAT, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürerek serbest radikalleri zararsız forma dönüştürürler (Ighodaro ve Akinloye, 2017).

Shao ve ark. Zebra balığı üzerinde yaptıkları çalışmada 7 ve 14. maruz kalma günlerinde en düşük endosülfan konsantrasyonlarında SOD ve CAT aktivitesinde hafif bir artış, yüksek doz Endosülfan da ise SOD VE CAT aktivitesinde önemli bir azalma olduğu bildirildi (Shao ve ark, 2012). ROS üretimini hücre ve dokulardaki sabit durum konsantrasyonunda tutmak için, artan ROS miktarını ortadan kaldırmak için CAT ve SOD'un aktivitesinin artacağı bildirilmiştir (Mittler, 2002). Bu enzimlerin aktivitesindeki azalmanın serbest radikallere bağlı olarak lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu enzim inhibisyonu ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (Özkurt ve ark, 2012). Ayrıca oksidatif DNA hasarın göstergesi olan 8-OH-2-guanozin miktarında artışa neden olur (Belge- Kurutaş ve Kılınç, 2003).

Dünya sağlık örgütü Endosülfan'ı orta derecede tehlikeli bir madde olarak sınıflandırılmıştır (WHO 1984; Bajpayee ve ark, 2006). 30'dan fazla gelişmekte olan veya gelişmiş ülke endosülfan kullanımını yasaklamış olsa da, diğer birçok ülke (Avrupa Birliği, Hindistan, Endonezya, Avustralya, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Çin, Tayland dahil) kullanmaya veya üretmeye devam ediyor (Shao ve ark, 2012).

### **3.2.2.1. Endosülfan'ın Çözdürülmesi ve Sitotoksisite Deneyi**

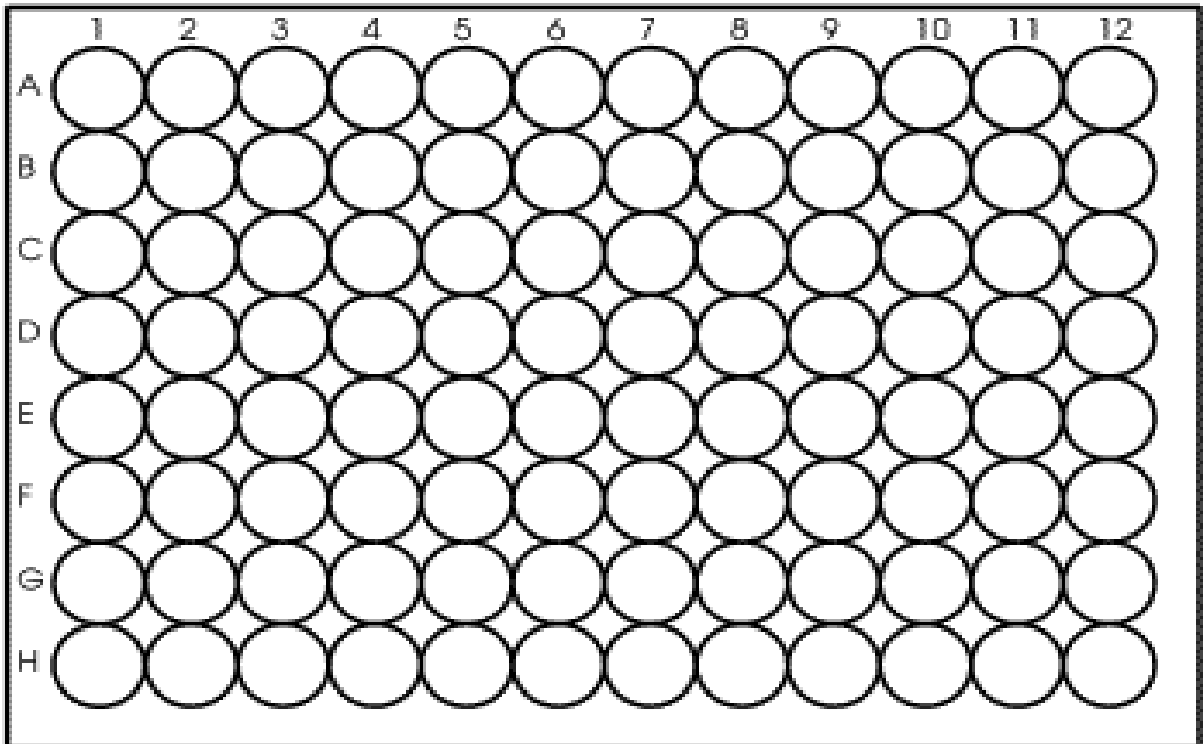
Hassas terazide 0,001 gr tartılan Endosülfan 1350 µl DMSO'da yaklaşık 5-6 dakika pipetaj yapılarak homojenize bir şekilde tamamen çözdürüldü (20mM). Hazırlanan bu solüsyon sitotoksisite deneylerinde ana stok olarak kullanılmak üzere etiketlendi.

20 mM ana stoğundan mikropipetle 25 µl Endosülfan çekilerek 975 µl DMEM-HA içerisinde çözüldü ve ara stok olarak etiketlendi (0,5 mM= 500 µM ). Hazırlanan bu stokun yarı ömrü kısa olduğundan dolayı belirli aralıklarla taze olarak yeniden hazırlanmalıdır.

11.07.2018'de stoktan 25'lik flaska açılan HT22 hücre serisi(P3) etüve kaldırıldı. 24 saat sonra besiyeri değiştirildi. Her gün rutin olarak hücreler gözlemlendi. Stoktan açıldıktan 48 saat sonra tekrar besiyeri değiştirilerek hücrelerin besiyerinden daha fazla yararlanması ve ölü hücrelerden arınması sağlandı. Ekim yapıldıktan 72 saat sonra 25'lik flasktan 2 tane 75'lik flaska pasaj yapıldı(P4).

2 gün sonra 75'lik flaskların birisi %70 yoğunluğa ulaştığı için ayım yapılarak hücre sayısına göre pasaj yapıldı(P5)ve hücrelerinbir kısmı 96'lık well plate'e ekildi. Kalan hücrelerden 1 tane 75'lik flask pasaj yapıldı, gerisi ise dondurularak ileriki çalışmalarda kullanılmak için stoklandı.

Hücre ekilen kuyucuk başına 100 $\mu$ l'de homojenize edilmiş yaklaşık 20000 hücre ekimi yapıldı ve CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonra hücreler flask tabanına tamamen tutunduğundabütün besiyerleri çekildi, PBS ile yıkama yapıldı ve Endosülfan uygulandı.



Şekil 3.5. 96'lık well plate görüntüsü



B2-F2, B3-F3, B4-F4 arası boş besiyeri (DMEM-HA; %10 FBS,%1 Pen-Streptomisin,%1 L-glutamin)

B5-F5, B6-F6, B7-F7 arası hücre+ besiyeri (kontrol)

B8-B10 arası 10  $\mu$ M Endosülfan;

C8-C10 arası 25  $\mu$ M Endosülfan,

D8-D10 arası 50  $\mu$ M Endosülfan,

E8-E10 arası 75  $\mu$ M Endosülfan,

F8-F10 arası 100  $\mu$ M Endosülfan dozu uygulandı.

0,5 mM Endosülfan ara stoğundan aşağıdaki gibi belirli miktarlarda alınarak son hacim 330  $\mu$ l (3 tekrar çalışılması için) olacak şekilde 10, 25, 50, 75 ve 100  $\mu$ M'lık 5 ependorf hazırlandı ve pipetaj yapılarak homojenize edildikten sonra her kuyucuğa 110  $\mu$ l olacak şekilde 96'lık well plate'e uygulama yapıldı.

1. 6,6  $\mu$ l Endosülfan + 323,4  $\mu$ l DMEM-HA.....10  $\mu$ M
2. 16,5  $\mu$ l Endosülfan + 313,5  $\mu$ l DMEM-HA.....25  $\mu$ M
3. 33  $\mu$ l Endosülfan + 297  $\mu$ l DMEM-HA .....50  $\mu$ M
4. 49,5  $\mu$ l Endosülfan + 280,5  $\mu$ l DMEM-HA.....75  $\mu$ M
5. 66  $\mu$ l Endosülfan + 264  $\mu$ l DMEM-HA.....100  $\mu$ M

### 3.2.3. Hücre Canlılık Testleri

Sitotoksosite deneylerinde son aşama canlı-ölü hücre miktarının belirlenmesidir. Hücre toksisite deneylerinde hücre canlılığının belirlenmesi için çok sayıda method vardır. Bunlar kolorimetrik, enzimatik ve luminometrik metodlardır (Tokur ve Aksoy, 2017).

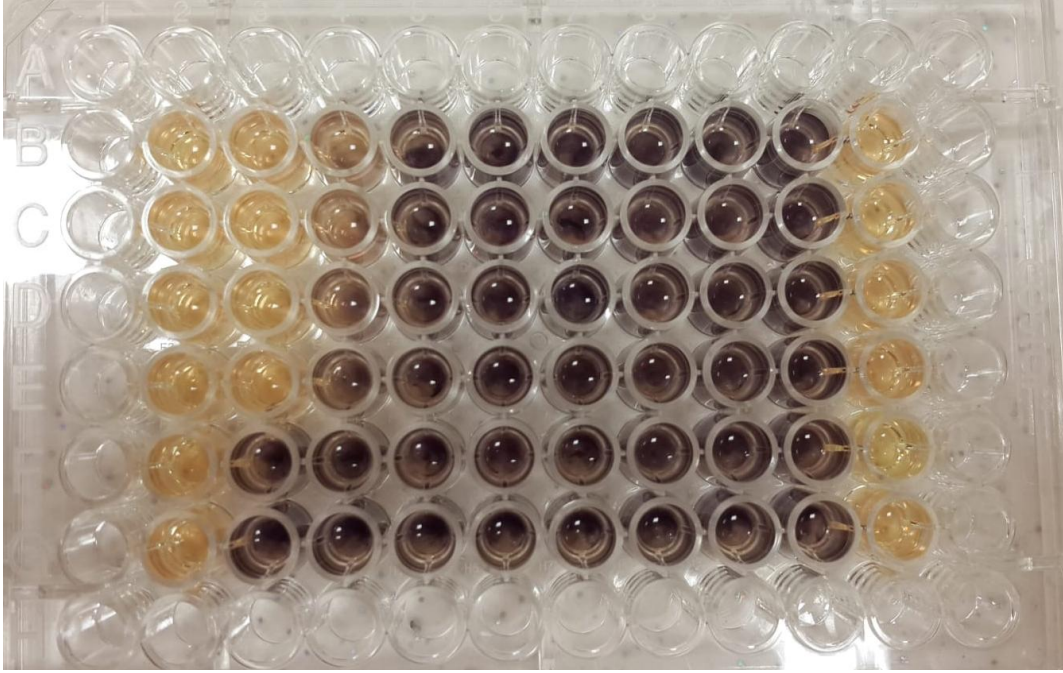
MTT ( 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür),

MTS(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2Htetrazolyum),

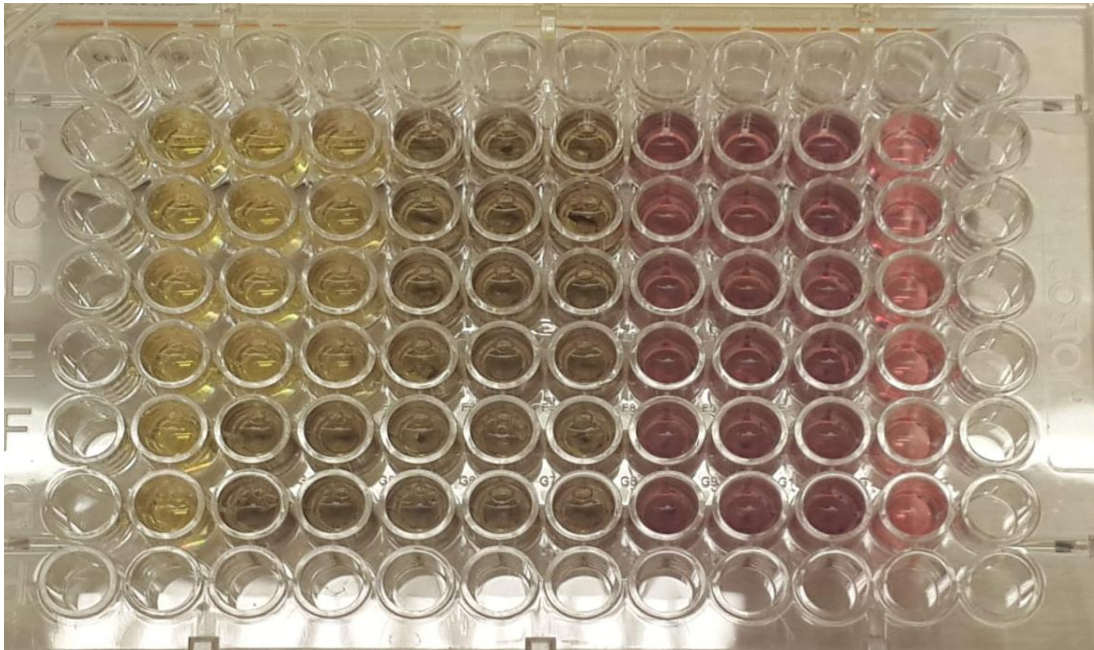
XTT(2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5karboksianilid),

WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum gibi canlılık testleri kullanılarak canlı hücrelerin ölçülmesi sağlanır (Tokur ve Aksoy, 2017; Martin ve Clynes, 1993).

Bu yöntemlerde nötr kırmızı, kristal menekşe boya gibi çeşitli boyalarla hücrelerin boyanmasının yanı sıra tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ile hücre canlılığı ölçümü yapılır (Feoktistova ve ark, 2016; Martin ve Clynes, 1993).



Şekil 3.6. Canlılık Testi uygulama sırasında renk değişimi



Şekil 3.7. Canlılık Testi uygulama sonrası görünüm (4 saat)



Floresans ve biyoluminesans kullanılarak Luminometrik metod ile hücre canlılığı ölçümü yapılır. Bu yöntemde floresans özellikteki maddeler yada lusiferaz adı verilen spesifik enzimler kullanılarak canlı hücrelerin tespiti yapılır. Hücre içerisindeki ATP miktarının ölçülmesi ile hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı belirlenebilir. Biyoluminesans ATP testi en hassas, hızlı ve seçicidir. ATP konsantrasyonu spektrofotometrik saptama ile enzimatik yöntemler, radyoaktif ve kromatografik yöntemler ile belirlenir (Lomakina ve ark, 2015; Tokur ve Aksoy, 2017). Enzimatik yöntemde ise ilaç olarak uygulanan madde hücre bütünlüğüne zarar verdiğinde yada hücre ölümüne neden olduğunda salınan belirli enzimlerin miktar tayinine göre canlılık ölçümü yapılması esasına dayanır. Bu yöntemde en çok kullanılan enzim laktat dehidrogenaz (LDH) enzimidir (Tokur ve Aksoy, 2017).

Bu çalışmada Endosülfan uygulanan 96'lık well plate CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldıktan 24 saat sonra XTT canlılık testi yapılarak Endosülfan'ın lethal dozu(LD50) belirlendi. XTT Hücre Canlılığı Test Kiti, standart mikropilaya absorban okuyucuları kullanılarak canlı hücre sayısının belirlenmesi için basit bir yöntem sağlar. Canlı hücre sayısının belirlenmesi, hücre çoğalma hızını değerlendirmek ve sitotoksik ajanları taramak için sıklıkla kullanılır. XTT bir tetrazolium türevidir. Canlı hücrelerdeki XTT'yi azaltan mitokondriyal enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olması sonucu oluşan turuncu renk ile gözle görülebilir belirteç olmasının yanı sıra 475 nm dalga boyunda absorbanı ölçülerek canlı hücre miktarları bulunur.

### ***3.2.3.1. XTT canlılık testi uygulaması***

96 plate' kuyucuk başına 5000- 10000 hücre ekilerek 48 ile 72 saat içinde %70 yoğunluğa ulaşması beklenir, fakat bu çalışmada 20000 hücre ekildi 24 saat sonra %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra XTT testi yapıldı. Endosülfan uygulamasından 24 saat sonra 96 well plate inkübatörden çıkarıldı, mikroskopta tüm kuyucuklar tarandı ve alkollenip laminar kabine alındı. Tüm kuyucuklardaki besiyeri mikropipetle çekildi ve 100 µl PBS ile hücre ekilen tüm kuyucuklar yıkanarak PBS çekildi. Besiyeri ve hücre olan tüm kuyucuklara %10 FBS,%1 Pen-streptomisin,%1 L-glutamin içeren 100 µl DMEM-HA eklendi.

XTT canlılık kiti içerisinde; XTT Solution (5X10 ml), Activation reagent PMS (5X 10µl) solüsyonları vardı.

55 kuyucuk için XTT uygulanacak ve kit protokolünde 100 µl besiyeri bulunan her kuyucuk için 25 µl XTT karışım eklenmesi gerektiği bildirildi.

55X25 µl =1375 µl karışımın tüm kuyucuklar için yeterli miktarda olduğu hesaplandı.

Önce kitteki her iki solüsyon vorteks yapılarak homojenize hale getirildi. 1500 ml XTT Solüsyonu için 10 µl Activation Reagent eklenmesi gerekiyorsa, 1,375 ml XTT solüsyonu için 9,2 µl Aktivasyon Reagent 1,5'luk ependorf içinde iyice homojenize edildi. Hazırlanan XTT karışımı mikropipetle kuyucuk başına 25 µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı. XTT karışımı eklendikten sonra well plate hafifçe çalkalanıp CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. 2 saat sonra inkübatörden çıkarılıp Elisa reader cihazında 492 nm dalga boyunda okutuldu.

**Tablo 3.4.** XTT testi uygulanan well plate'in Elisa Reader cihazında okunan değerleri

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
boş	besiyeri	besiyeri	besiyeri	kontrol	kontrol	kontrol	doz	doz	doz	besiyeri	besiyeri	
0.0275	0.0305	0.0274	0.027	0.0268	0.0276	0.0262	0.0261	0.0287	0.0286	0.0289	0.0282	
0.0258	0.2736	0.2811	0.2712	0.4837	0.523	0.4628	0.4962	0.3964	0.4376	0.3165	0.3385	10
0.0237	0.2578	0.2597	0.251	0.4527	0.5382	0.5171	0.415	0.4301	0.4491	0.2986	0.3297	25
0.0325	0.2696	0.2704	0.2754	0.4996	0.548	0.5486	0.4065	0.3515	0.4073	0.3077	0.3796	50
0.0318	0.2897	0.2623	0.267	0.5249	0.4727	0.4454	0.2871	0.294	0.3216	0.3209	0.33	75
0.0283	0.2766	0.2941	0.2943	0.3921	0.3884	0.4057	0.2791	0.3029	0.3132	0.3394	0.4758	100
0.0322	0.0323	0.0307	0.0293	0.0297	0.0297	0.0293	0.03	0.0293	0.0299	0.0312	0.0316	
0.0303	0.0351	0.0304	0.0305	0.0323	0.0369	0.0317	0.0297	0.0309	0.0327	0.038	0.0325	

XTT sonuçları analizine göre ;

E10  $\mu\text{M}$ .....%81 oranında canlı hücre

E25  $\mu\text{M}$  .....%76oranında canlı hücre

E50  $\mu\text{M}$  .....%55 oranında canlı hücre

E75  $\mu\text{M}$  .....%14 oranında canlı hücre

E100  $\mu\text{M}$  .....%12 oranında canlı hücre tespit edildi.

HT22 Mouse Hippocampal Nöronal hücre serisinde Endosülfan'ın LD50 dozu 50  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi.

#### **3.2.4. Klotho Proteinin Çözdürülmesi ve Etkili Doz Belirlenmesi**

>%90 saflıkta elde edilmiş 50  $\mu\text{g}$  Klotho proteini PBS, Gliserol veya EDTA'da çözdürülüp filtre edilmiş 21,9  $\mu\text{l}$  çözelti olarak temin edildi. Konsantrasyonu 2,31  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'dir. Koruyucu paketlerle nakliyesi sağlandı. Saklama koşullarında bildirilen 'tekrarlanan dondurup çözme işlemi protein yapısına zarar verir, temin edildikten hemen sonra -70 °C'de 12 ay, 2 ile 8 °C arasında 1 ay bozulmadan saklanabilir' uyarısından dolayı temin edildikten hemen sonra pipetaj yapılarak homojenize edildi ve 4 farklı 0,2'lik pcr tüpüne total hacim 5,47  $\mu\text{l}$  olacak şekilde ayrıldı.

21,9  $\mu\text{l}/4=5,47$   $\mu\text{l}$  şeklinde 4 parçaya ayrıldı.

3 tüp ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C buzdolabına kaldırıldı. Geriye kalan tüp ise 1258  $\mu\text{l}$  besiyeri eklenerek son hacim 1263  $\mu\text{l}$  olacak şekilde homojenize edildi. Yoğunluk 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  olacak şekilde ara stok hazırlandı.

Klotho proteininin etkili dozunu belirlemek için 96'lık well plate'e kuyucuk başına 100  $\mu\text{l}$  içerisinde homojenize dağılmış 15.000 HT22 hücresi ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde bekletildi. 24 saat sonra hücreler mikroskop altında incelendi. Tüm hücrelerin yapışması için well plate 12 saat daha  $\text{CO}_2$ 'li inkübatöre kaldırıldı. 36 saat sonra tüm kuyucuklardaki besiyeri mikropipetle çekilerek dozaj uygulanacak kuyucuklara son hacim 110  $\mu\text{l}$  olacak şekilde doza uygun hesaplanan besiyeri+ Klotho eklendi. Doz uygulanmayan boş besiyeri ve kontrol olan kuyucuklara ise 110  $\mu\text{l}$  besiyeri eklendi.

0,04 µg/ml Klotho dozu için 100 µl besiyeri+ 10 µl Klotho=110 µl,

0,05 µg/ml Klotho dozu için 90 µl besiyeri +20 µl Klotho=110 µl,

0,06 µg/ml Klotho dozu için 80 µl besiyeri+ 30 µl Klotho=110 µl,

0,07 µg/ml Klotho dozu için 70 µl besiyeri+ 40 µl Klotho=110 µl,

0,08 µg/ml Klotho dozu için 60 µl besiyeri + 50 µl Klotho=110 µl,

0,09 µg/ml Klotho dozu için 50 µl besiyeri + 60 µl Klotho=110 µl,

0,1 µg/ml Klotho dozu için 40 µl besiyeri +70 µl Klotho=110 µl,

0,2 µg/ml Klotho dozu için 30 µl besiyeri + 80 µl Klotho=110 µl,

0,3 µg/ml Klotho dozu için 20 µl besiyeri + 90 µl Klotho=110 µl,

0,4 µg/ml Klotho dozu için 10 µl besiyeri + 100 µl Klotho=110 µlkuyucuklara eklendi.

Klotho'nun etki süresi 12 saat olacak şekilde 96 well plate CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı.

**Tablo 3.5.** Klotho proteini etkili doz belirlenmesi için hazırlanan well plate dizaynı

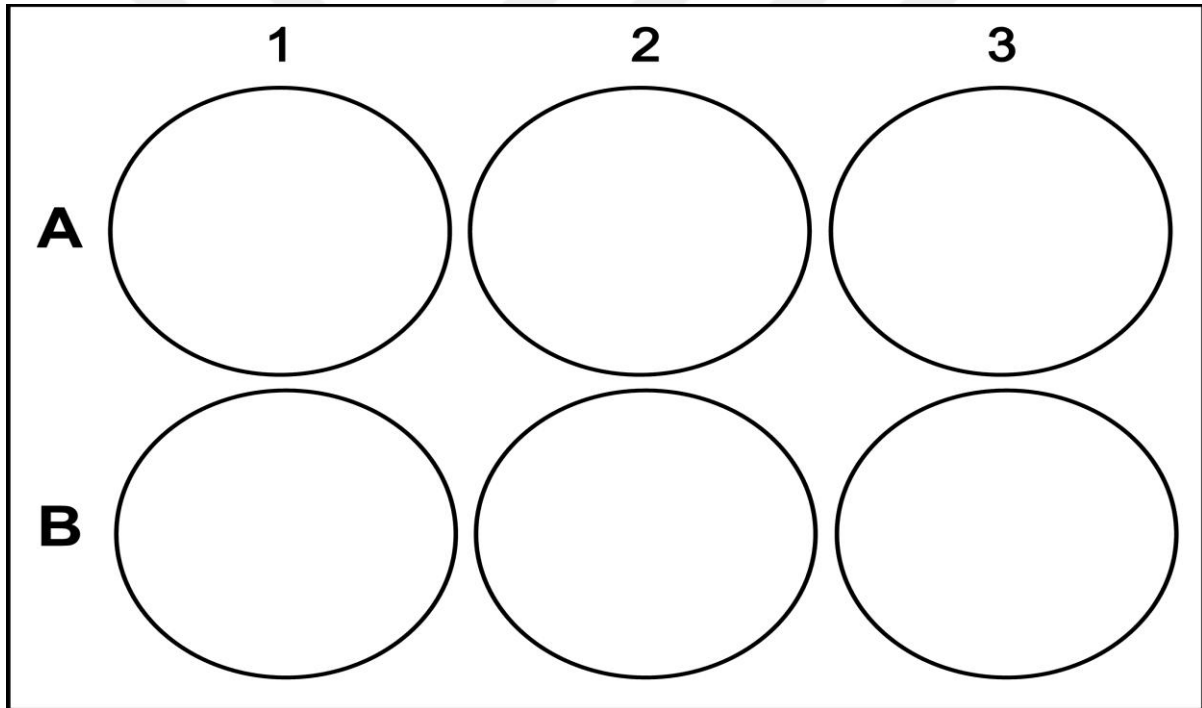
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		0,04 µg	0,05 µg	0,06 µg	0,07 µg	0,08 µg	0,09 µg	0,1 µg	0,2 µg	0,3 µg	0,4 µg	
A	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank
B	boş besiye ri	0,04 klotho	0,05 klotho	0,06 klotho	0,07 klotho	0,08 klotho	0,09 klotho	0,1 klotho	0,2 klotho	0,3 klotho	0,4 klotho	boş besiye ri
C	boş besiye ri	0,04 klotho	0,05 klotho	0,06 klotho	0,07 klotho	0,08 klotho	0,09 klotho	0,1 klotho	0,2 klotho	0,3 klotho	0,4 klotho	boş besiye ri
D	boş besiye ri	0,04 klotho	0,05 klotho	0,06 klotho	0,07 klotho	0,08 klotho	0,09 klotho	0,1 klotho	0,2 klotho	0,3 klotho	0,4 klotho	boş besiye ri
E	boş besiye ri	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	Hücre Kntrl	boş besiye ri
F	boş besiye ri	boş besiye ri	boş besiye ri	boş besiye ri	boş besiy eri	boş besiy eri	boş besiye ri	boş besiy eri	boş besiye ri	boş besiy eri	boş besiy eri	boş besiye ri
G	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	Blank
H	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	blank	Blank

12 saat sonra inkübatörden çıkarılan well plate mikroskopta incelendi, XTT yapılmak üzere tüm kuyucuklardaki besiyeri ve besiyeri+klotho karışımı mikropipetle çekildi, 100 µl PBS ile tüm hücre bulunan kuyucuklar yıkandı ve PBS geri çekildi. Plate düzenindeki hücre ve besiyeri olan tüm kuyucuklara 100 µl DMEM-HA eklendi.



### 3.2.5. HT22 Hücre Serisinde Klotho ve Endosülfan Uygulanması

6 well plate'in 5 kuyucuğuna hücre sayımı yapılarak pasaj 5'ten kuyucuk başına 300.000 hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra hücreler %70 yoğunluğa eriştiğinde tablo 3.7'deki uygulama yapıldı. Endosülfan DMSO'da çözdürüldüğünden dolayı Endosülfan uygulanmayan kuyucuklara da DMSO yoğunluğu kadar DMSO ekleyerek tüm hücreler aynı şartlarda inkübe edildi. Daha sonra çalışılacak Real Time PCR ve Western Blot yöntemi için yeterli miktarda RNA ve protein elde etmek için aynı anda, aynı uygulamaların yapıldığı 3 plate çalışıldı.



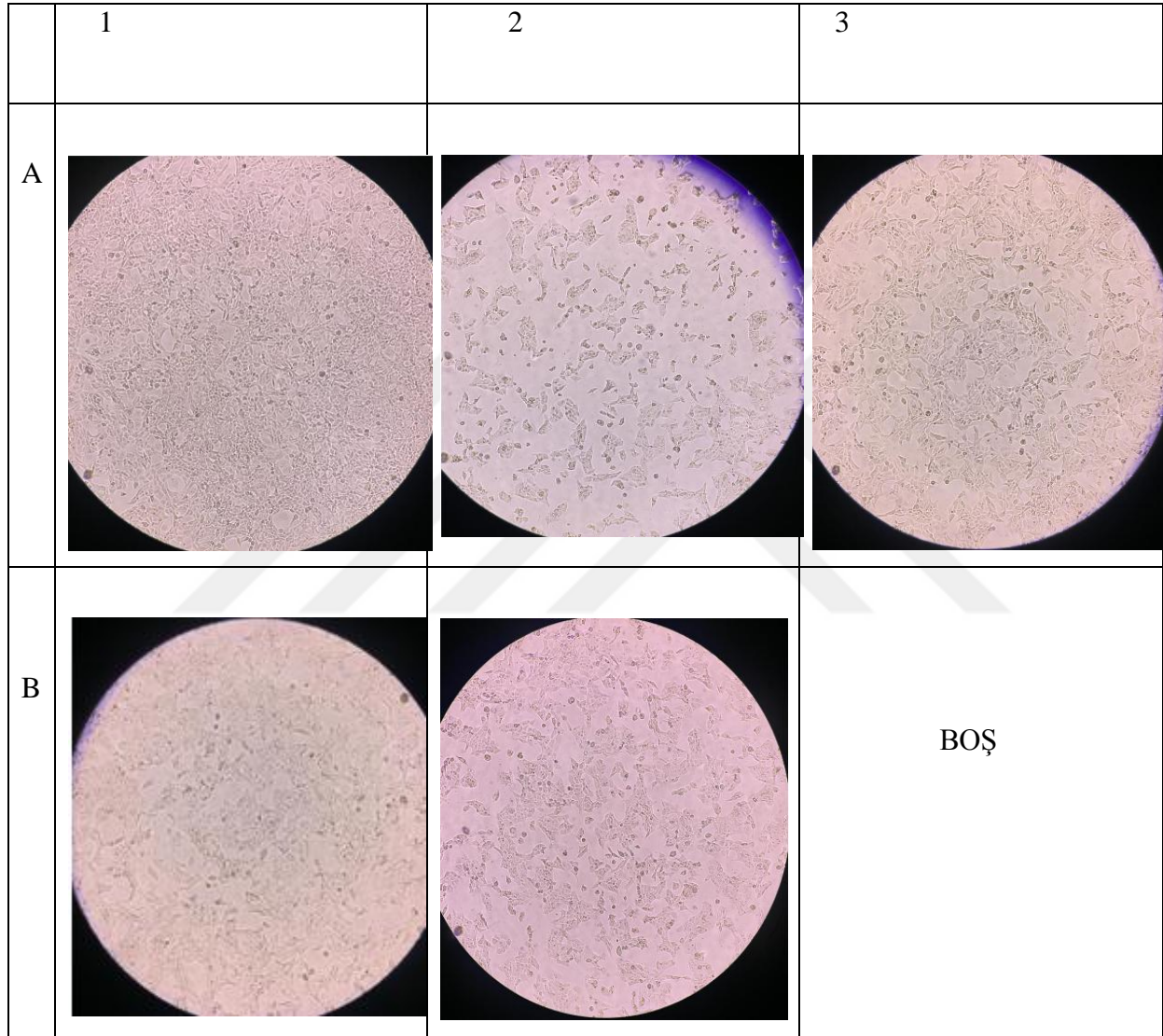
Şekil 3.8. 6'lık well plate görüntüsü

**Tablo 3.7.** Endosülfan ve Klotho uygulaması 6'lık well plate dizaynı

	1	2	3
A	Hücre (Kontrol ) ( Sadece 12 saat önce 5µl DMSO konuldu)  Total hacim 2 ml	Endosülfan (50 µM) uygulaması (12 saat önce 20 mM'lık stoktan 5 µl konuldu) Total hacim 2 ml	Klotho (konsantrasyon 0,01 µg/ml) (0,3 µg/ml) - 12 saat uygulaması (stoktan 60 µl Klotho+ 5 µl DMSO konuldu) Endosülfan 16 saat uygulaması 20 mM'lık stoktan 5 µl konuldu. Total hacim 2 ml
B	Klotho (konsantrasyon 0,01 µg/ ml) (0,3 µg/ml)- 16 saat uygulaması (stoktan 60 µl Klotho + Endosülfan 12 saat uygulaması 20 mM'lık stoktan 5 µl konuldu. Total hacim 2 ml	Klotho (konsantrasyon 0,01 µg/ ml ) (0,3 µg/ml)+ Endosülfan 12 saat-eş zamanlı uygulama 60 µl Klotho + 20 mM'lık stoktan 5 µl Endosülfan konuldu. Total hacim 2 ml	BOŞ



**Şekil 3.9.** Uygulama yapıldıktan sonra well plate mikroskop görüntüsü.



Well plate'deki hücreler pasajlama tekniğinde olduğu gibi tripsin uygulayarak kaldırıldı, santrifüj edildi ve elde edilen peletler ayrı ayrı ependorflarda 1 ml besiyeri içerisinde çözdürüldü. 1 ml hücre-besiyeri karışımının 750  $\mu$ l'si western blot yönteminde kullanılmak üzere protein izolasyonu için ayrılıp -80 °C buzdolabına kaldırıldı. Geriye kalan 250  $\mu$ l ise RNA izolasyonu için kullanıldı.

### 3.2.6. RNA izolasyonu

250 µl hücre- besiyeri santrifüj edilerek pelet 500 µl Riboex içerisinde pipetaj veya vortex ile çözüldü (~2-5 x 10<sup>6</sup> hücre için- 500 µl Riboex, ~10 x 10<sup>6</sup> hücre için 1 ml Riboex).

Homojenat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra -70°C'de bekletilebilir yada hemen çalışılabilir. Homojenata 100 µl kloroform eklendi ve 15-20 saniye alt üst edildi. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra soğutmalı santrifüjde 4°C'de 12,000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Faz ayrımı oluşan tüpte en üstteki faz mikropipetle çekilerek temiz bir ependorfa aktarıldı.

Kit prospektüsünde ependorfa aktarılan miktarın eklene Riboex'in yarısı kadar olduğu kabul edilerek aynı) RBI buffer eklenmesi bildirildiği için 250 µl RBI buffer eklendi. Yavaşça pipetaj yapılarak karışması sağlanan homojenat kit içeriğinde temin edilen spin kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında 10,000 g'de 30 saniye santrifül edildi, toplama tüpündeki sıvı dökülerek tekrar aynı işlem tekrar edildi. Daha sonra 500 µL SW1 buffer spin kolona eklendi. Oda sıcaklığında 10,000 g'de 30 saniye santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı tekrar döküldü. Spin kolona RNW buffer eklenip 10,000 g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra toplama tüpündeki sıvı döküldü. 10,000 g'de 1 dakika boyunca tekrar santrifüj edildikten sonra alttaki toplama tüpü atılır ve spin kolon temiz ependorfa aktarılır. 30 µl Nükleaz free water spin kolona aktarıldı , oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilip 11,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA'nın yoğunluğu Qubit cihazında ölçüldü. Son olarak elde edilen RNA, cDNA sentezinde kullanılmak üzere – 80 °C buzdolabına kaldırıldı.

Örneklerin RNA Qubit ölçümleri;

Kontrol :	100µg/ml
Klotho 16:	20,9 µg/ml
Klotho 12:	49,7 µg/ml
Endosülfan:	10,8 µg/ml
Endosülfan+ Klotho:	51,2 µg/ml

### 3.2.7. *cDNA eldesi*

Revers-Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla hücrelerden izole edilen RNA'nın tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi gerçekleşir. Bu yöntem gen ekspresyonu analizlerinin yapılabilirdiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Klasik cDNA sentez yönteminde reaksiyon bileşeni olarak RNaz inhibitörü, revers transkriptaz enzimi, dNTP'ler, RT buffer, RNA ve spesifik primerler eklenir. Ancak bu çalışmada hazır cDNA kiti kullanıldı.

cDNA Master mix Bileşenleri;

- 10X RTaz reaksiyon buffer
- 0,1 M DTT
- Hyperscript Ters Transkriptaz Enzimi (200 U/ul)
- ZymAll Rnaz inhibitör
- OligodT primer
- Random hexamer
- dNTP

Her bir örnek için total RNA miktarı mikropipetle ölçülerek elde edilen RNA'nın tamamı cDNA çevrildi. Bunun için 45 µl RNA-150 µl RT master mix-105 µl Nükleaz free water olacak şekilde tüm örnekler için ayrı ayrı tüp hazırlandı. Bu karışım etiketlenen özel Real Time Pcr plate'lerine aktarıldı ve Real Time Pcr cihazında 55°C'de 1 saat, 85°C'de 5 dakika şeklinde hazırlanan programda çalıştırıldı. Elde edilen cDNA'lar Real time PCR'da kullanılmak üzere etiketlendi.

### 3.2.8. *Real Time PCR*

Bu yöntemde Syber Green , Eva Green gibi çeşitli floresan boyalar kullanılır. Floresan boya sadece çift zincirli DNA'nın minör oluşuna bağlandığında floresan ışımaya yapar. Çift zincirli DNA'ya primer bağlanıp uzama gerçekleşirken floresan boya oluklara bağlanır. Amplifikasyon süresince DNA miktarındaki artışa orantılı olarak floresan miktarı da artar ve bu artış Real Time cihaz ekranından eş zamanlı olarak takip edilebilir (Kubulay, 2016; Günel, 2007).

Öncelikle elde edilen cDNA'ların konsantrasyonlarını eşitlemek amacıyla sulandırma yapıldı. Reaksiyonda p38 ve  $\beta$ -actin spesifik primerleri literatür araştırması yapıp, belirtilen baz dizileri sentezlettilerilerek kullanıldı.

50 nM konsantrasyonunda olan primerlerden; 10  $\mu$ l Forward primer, 10  $\mu$ l Reverse primer, 80  $\mu$ l Nükleaz free water bir tüpte karıştırılarak 10 nM konsantrasyonunda primer mix, Real Time PCR'da kullanılmak üzere elde edildi (klotho,p38). 5X konsantrasyonundaki Rox, 1X olacak şekilde sulandırıldı.

Real Time Pcr reaksiyon bileşenleri;

Eva green	10 $\mu$ l
Primer mix	2 $\mu$ l
1X Rox	1 $\mu$ l
Nükleaz free water	4 $\mu$ l
cDNA	3 $\mu$ l

Total hacim 20  $\mu$ l olacak şekilde cihazda oluşturulan dizayna göre real time plate'lerinde karışım hazırlandı.

**Tablo 3.8.** Real Time PCR analizinde kullanılacak primer baz dizileri

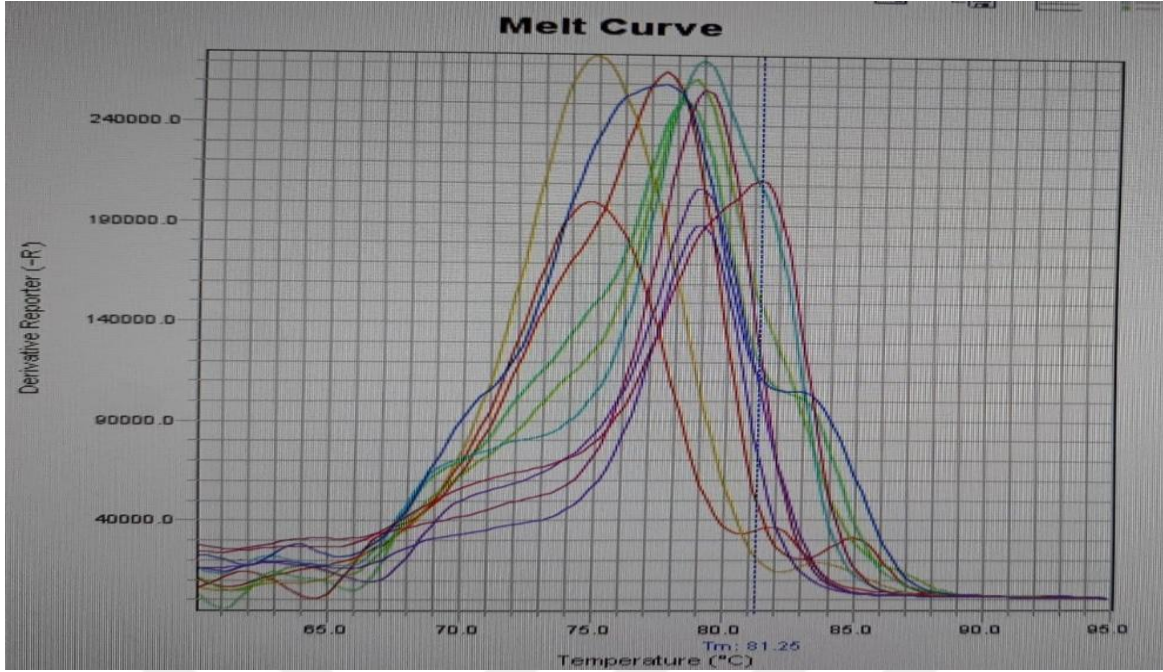
Transkript	Primer Sekansları	
p38	Forward	<b>5'-GCCCCAGTAGTCAGAAGCAG-3'</b>
	Reverse	<b>5'-TAGGGGCTGAAGAGAGGTGA-3'</b>
ACTB	Forward	<b>5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCC-3'</b>
	Reverse	<b>5'-CACGCAGCTCATTGTAGAAGG-3'</b>
Klotho	Forward	<b>5'-CACAGAGGTTACAGCATCAG-3'</b>
	Reverse	<b>5'-CAGCAAAGTCAACACAGTAGGA-3'</b>

Başlangıç denatürasyon sıcaklığı ve süresi :	95°C/10 dakika
Döngü sayısı :	40 cycle
Denatürasyon sıcaklık ve süresi :	95 °C/ 15 Saniye
Primer/prob bağlanma sıcaklık ve süresi :	60 °C/60Saniye
Uzama sıcaklık ve süresi :	72 °C/ 30 Saniye
Kitte kullanılan boyanın ismi :	Rox-

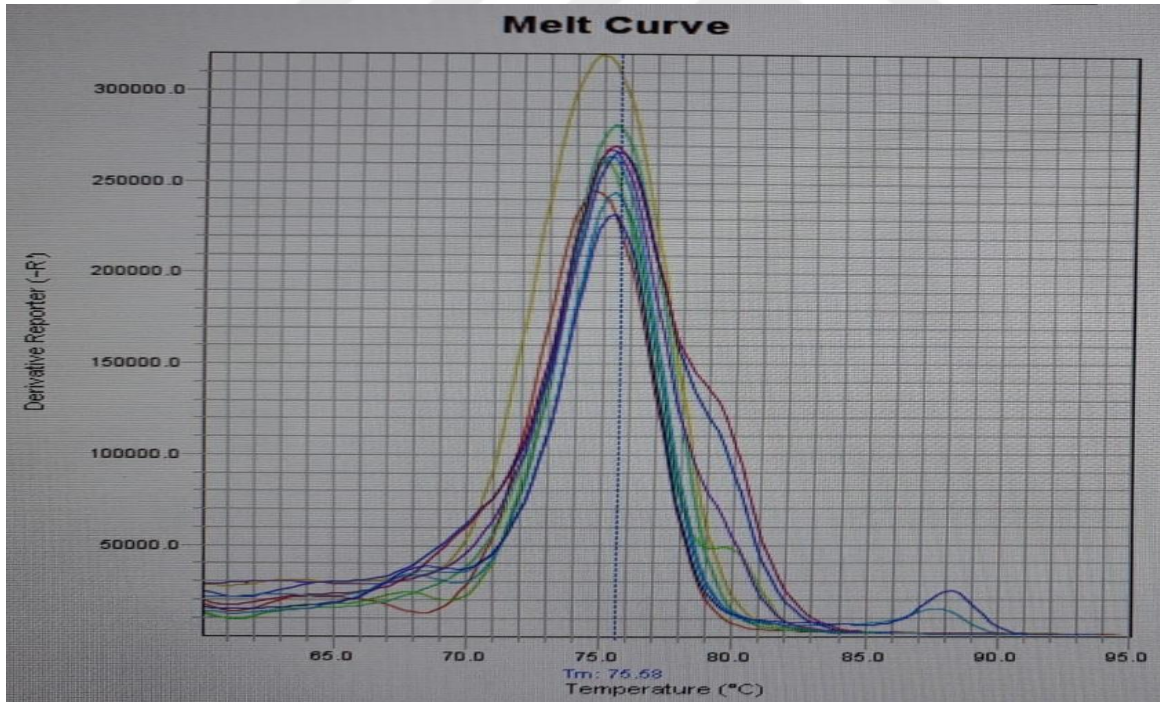
Real-time PCR analizi için internal house keeping gen olarak  $\beta$ -actin (ACTB) kullanıldı. RT-PCR tamamlandıktan sonra sonuçlar PCR sistemi içerisindeki comparative CT metoduna göre analiz edildi.



Şekil 3.10. Real Time PCR cihazı ve izleme monitörü



Şekil 3.11. Real Time PCR-p38 erime eğrisi monitör görüntüsü



Şekil 6. Real Time PCR-BETA -actin(ACTB) Erime eğrisi monitör görüntüsü

### 3.2.9. Protein İzolasyonu

2500 g'de 3 dakika santrifüj edilen her bir grup için hücre-besiyeri süspansiyonundan besiyeri çekildi ve pelet 10 ml buzda soğutulmuş PBS ile dikkatlice yıkandı. 2500 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve PBS uzaklaştırıldı. Pelete 100 µl ProtinEx eklendi, dikkatlice pipetlenerek çözdürüldü ve karışım 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. 900 µl daha ProtinEx eklenip iyice karıştırılarak 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 16000 g'de +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant yeni tüpe alınıp western blot çalışmaları için kullanıldı.

### 3.2.10. Western Blot Yöntemi ile Örneklerdeki P38 Protein Miktarının Belirlenmesi

Kan, doku, vücut sıvıları gibi herhangi bir örnekten elde edilen ve birçok protein arasında hedef proteinin varlığını ve miktarını belirlemek amacıyla kullanılan, yaygın olarak birçok örnek grubu arasında protein miktar analizinin yapılabildiği moleküler yöntemdir (Özel ve ark, 2014). Örnekteki proteinler, SDS-PAGE elektroforezi ile elektriksel ortamda jel üzerinde moleküler ağırlıkları ile orantılı olarak yürürler ve bantlar oluştururlar. Göç etme katottan (- kutup ) anoda doğru (+ kutup) olur (Üstüner, 2010).

**Tablo 3.9.** Western Blot metodu bileşenleri

Sample (Örnek)	50 ul
4X LDS (Lityum Dodesil Sülfat)	10 ul
10X Sample Reducing Agent (Örnek İndükleyici Ajan)	4 ul
ddH <sub>2</sub> O	-

1. Jel altındaki bantlar çıkarıldı kuyuları yıkandı ve boş bir şekilde 150 voltta 5 dakika elektroforez yapıldı.
2. 70 C' 10 dk kaynatılan proteinler buz üzerine alındı ve soğuduktan sonra jele 60 ul örnek yüklendi.
3. Örnekler jele KONTROL-E-K12-K16-E+K şeklinde yüklendi.
4. 110 voltta 60 dk yürütülen proteinler i-blot cihazında membrana transfer edildi .

5. Ardından membran ponceous solüsyonu ile boyandı ve total protein varlığı kontrol edildi. Membran görüntüsünde total protein görüldüğü için devam edildi.
6. Bloklama solüsyonu konularak 1.30 saat inkübasyon yapıldı.
7. 1:500 oranında dilüe edilerek hazırlanan primer antikor eklendi ve overnight inkübasyon yapıldı.(bloklama ne ile yapılıyorsa antikor dilüsyonu da aynı solüsyon ile yapılmalıdır.)
8. 3X5 dk arayla yıkamaları yapıldı.
9. SAEP003 (Goat Anti Rabbit-elabscience) antikorunu 1:1000 oranında dilüe edildi. Membrana eklendi. 45 dakika +4 de çalkalayıcı da bekledi.
10. Ardından 3x5 dk arayla yıkamaları yapıldı.
11. 2x2 dk arayla distile su ile yıkama yapıldı.
12. Ecl substrate eklendi ve görüntü alındı.



## 4. BULGULAR

Çalışmada hücre kültür yöntemi ile HT22 fare hippocampal nöronal hücrelerine Endosülfan, 12 saatlik Klotho uygulama, 16 saatlik Klotho uygulama, eş zamanlı Klotho ve Endosülfan uygulaması yapıldı. Oluşturulan bu gruplardan elde edilen örnekler Real Time PCR ve Western Blot yöntemi kullanılarak p38 MAPK proteininin gen ekspresyon analizi yapıldı.

### 4.1. REAL TIME PCR ANALİZİ

Çalışılan her örneğin p38 MAPK ve Klotho mRNA transkripsiyon düzeyinin belirlenmesi için kurulan Real Time PCR'da amplifikasyon tamamlandıktan sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait CT değerleri (kopya eşiği değeri) PCR cihazından Microsoft Office Professional Plus 2010 Excel programına aktarıldı. Aktarılan CT değerleri her bir örnek grubu için aşağıdaki gibi hesaplanarak mRNA transkripsiyon düzeyleri belirlendi ve excel grafiği oluşturuldu.

Genellikle house-keeping gen olarak adlandırılan kontrol genleri, farklı örnekler arasındaki mRNA seviyelerini normalleştirmek için sıklıkla referans olarak kullanılır. Bununla birlikte, bu genlerin ekspresyon seviyesi dokular veya hücreler arasında değişebilir fakat aynı hücre ve dokuda sabit ekspresyon seviyesi gösterirler. Bu nedenle housekeeping genlerinin seçimi gen ekspresyon çalışmaları için kritik öneme sahiptir (Silver ve ark, 2006; Eisenberg ve Levanon, 2013). Housekeeping genler birçok biyoteknolojik uygulamada ve genomik çalışmada kalibrasyon aracı olarak kullanılırlar (Eisenberg ve Levanon, 2013). Bu çalışmada kontrol gen olarak ACTB geni (housekeeping gen) kullanılarak hedef genin transkripsiyon seviyesi belirlendi.

**Tablo 4.1.**  $\Delta\Delta Ct$  değerinin hesaplaması

Her bir örnek için ;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ ACTB}) \text{ denek grubu} - (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ ACTB}) \text{ kontrol grubu}$$

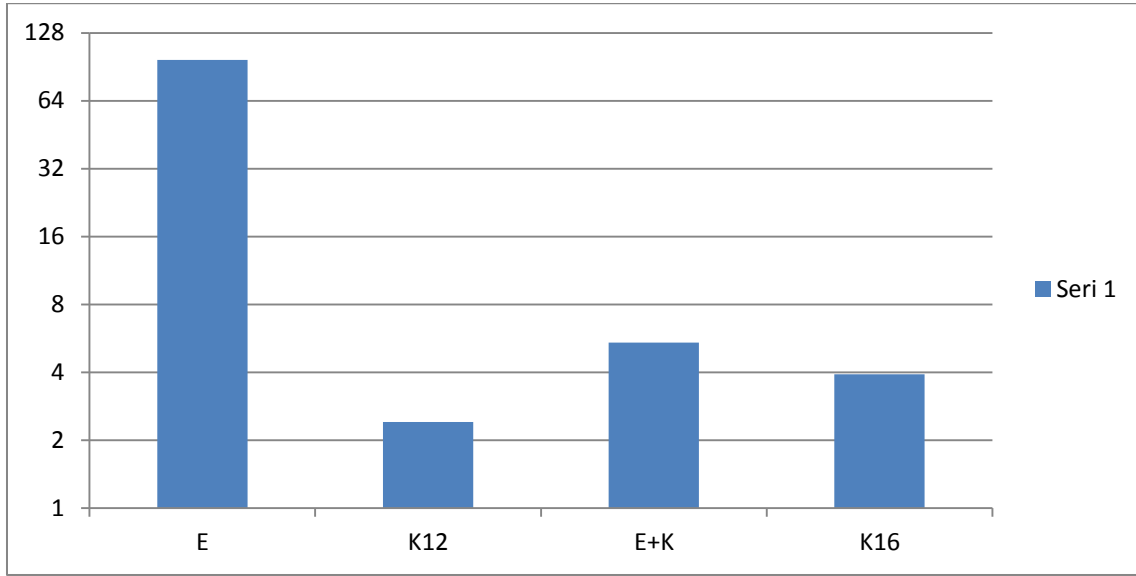
Ct değerleri her bir örnek için karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak hesaplandı. Hesaplanan değerlerden, örnek grupları arasındaki transkripsiyon düzey değişimleri gösterilmek üzere grafik oluşturuldu.

**Tablo 4.2.**  $\Delta\Delta Ct$  metoduna göre hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin analizi

ÖRNEK	P38	CT	ACTB	$\Delta Ct$	KONTROL	KONTROL	$\Delta Ct$
	MEAN	CT	MEAN		P38	CT	
					MEAN	CT MEAN	
<b>E</b>	23.27	30.74		-7.47	29.49	30.36	-0.87
<b>K 12</b>	28.91	31.05		-2.14	29.49	30.36	-0.87
<b>E+K</b>	24.05	27.36		-3.31	29.49	30.36	-0.87
<b>K 16</b>	26.64	29.48		-2.84	29.49	30.36	-0.87

$$\Delta\Delta Ct \quad 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

-6.6	97.00586
-1.27	2.411616
-2.44	5.426417
-1.97	3.917681



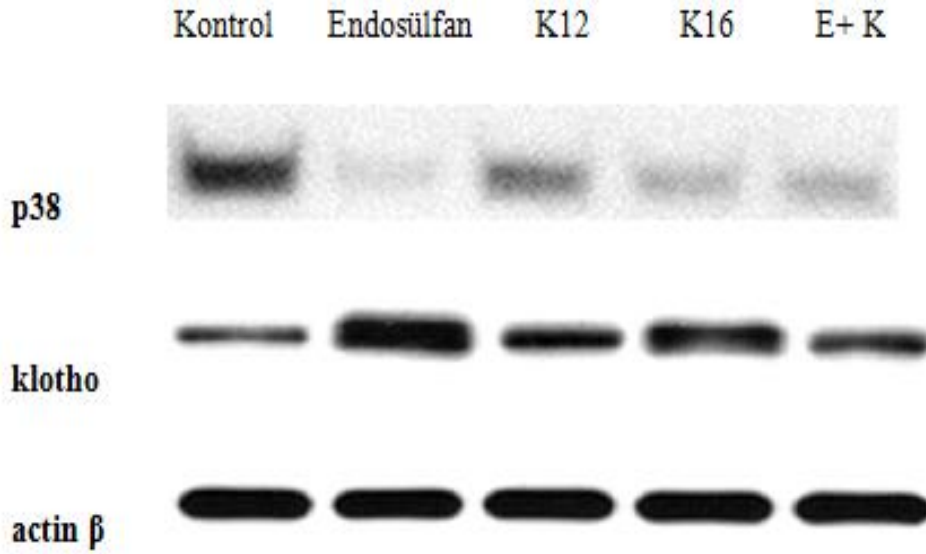
**Şekil 7.** p38 MAPK Real Time mRNA transkripsiyon düzeyinin örnek gruplarına göre oluşturulan grafiği

Kurulan Real Time Pcr sonuçlarına göre;

Sadece Endosülfan uygulanan HT22 hücrelerinde kontrol hücrelerindeki mRNA transkripsiyon seviyesine göre p38 MAPK transkripsiyonu 97 kat artmış , 12 saat Klotho uygulamasında yaklaşık 2,5 kat, 16 saat uygulamasında ise yaklaşık 4 kat artmıştır. Klotho ve Endosülfan eş zamanlı uygulamasında ise yaklaşık 5 buçuk kat artmıştır.

#### 4.2. WESTERN BLOT ANALİZİ

Yapılan western blot yöntemi sonucunda elde edilen en son aşama proteinlerin görüntülenmesidir. Proteinler görüntüleme cihazına alınarak proteinlerin görüntüleri bilgisayara aktarıldı ve şekil 4.2'deki görüntü elde edildi.



Şekil 4.2. p38 ve klotho proteinlerinin yüzde oranı

p38	bölge	yüzde	Klotho	bölge	yüzde
K	17888.806	39.410	K	11198.953	10.907
E	2015.368	4.440	E	32954.782	32.097
K12	14411.510	31.750	K12	18226.761	17.752
K16	5540.095	12.205	K16	24838.338	24.192
E+K	5535.489	12.195	E+K	15454.004	15.052

Tablo 4.3. Western Blot Uygulamasında elde edilen protein verileri

Western blot sonucuna göre;

sadece Endosülfan uygulanan hücrelerde kontrol hücrelere göre p38 protein miktarı yaklaşık 8,5 kat , 12 saat klotho uygulaması yapılan hücrelerde 1,2 kat, 16 saat klotho uygulaması yapılan hücrelerde 3,2 kat azaldığı görülmektedir. Eş zamanlı Klotho ve Endosülfan uygulamasında ise p38 protein miktarının yaklaşık 3,2 kat azaldığı görülmektedir.

Klotho proteinin miktarı ise;

sadece Endosülfan uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre 3 kat, 12 saat klotho uygulaması yapılan hücrelerde yaklaşık 1,6 kat, 16 saat klotho uygulaması yapılan hücrelerde yaklaşık 2,2 kat arttığı görülmektedir. Eş zamanlı Klotho ve Endosülfan uygulamasında ise klotho protein miktarının yaklaşık 1,4 kat arttığı görülmektedir.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kl geni ilk kez 1997 yılında Kuro-o ve arkadaşları tarafından farelerde tanımlanmıştır. Fare, sıçan ve insan klotho proteinini kodlayan Klotho geni sırasıyla kromozom 5, 12 ve 13'de lokalizedir. Kodlayan gen dizisi beş ekson ve dört introndan oluşur (Boksha ve ark, 2017). Makoto Kuro-o ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma ile klothoyu aşırı eksprese eden transgenik farelerin diğer vahşi tip farelere nispeten %30- 40 daha uzun ömre sahip olduğunu ve klotho geni baskılanan farelerin ise ortalama 2 ay ömre sahip olduğunu yani yabanil tip fare ömrünün sadece %5-6'sı kadar olduğunu belirlemiştir (Kuro-o ve ark, 1997). Klotho geni baskılanan transgenik farelerin vahşi tip olanlara göre ortalama 3-4 hafta erken yaşlanmaya başladığı ve büyüme geriliği olduğu bunun da sinyal yollarının inaktive edilmesiyle meydana geldiği belirtilmiştir (Kuro-o ve ark, 1997).

Faredeki klotho gen ekspresyonundaki bir kusur insan yaşlanmasına benzer şekilde mutant farelerde kısa bir ömür ve nöronal dejenerasyon, arterioskleroz, vasküler kalsifikasyonlar, doku kalsifikasyonları amfizem, gonadal displazi, infertilite, cilt atrofisi, ataksi, hipoglisemi ve ciddi hiperfosfatemi gibi birçok hastalığa neden olduğu belirlenmiştir (Lim ve ark,2015; Dalton ve ark, 2017). İnsanlarda, serumdaki toplam Klotho protein seviyesi yaşla birlikte düşerken, kısa ömürlülük ve osteoporoz, koroner arter hastalığı ve inme gibi yaşa bağlı hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkili klotho geninde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tanımlanmıştır (Dalton ve ark, 2017).

Mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK'ler), hücre sinyalleşmesinde ve gen ekspresyonunda kritik bir rol oynayan evrimsel olarak korunan moleküllerin bir ailesidir (Ji, ve Suter, 2007). P38, MAPK ailesinin ilk üyesi piridinilimidazol ilaçlarının bir hedefi olarak ve pro-enflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe eden LPS uyarımının bir hedefi olarak hızlı bir şekilde fosforile edilen 38 kDa proteini (p38) olarak tanımlandı (Cuadrado ve Nebreda, 2010). MAPK'lar (mitojen aktive edilmiş protein kinazlar) gelişme, çoğalma, farklılaşma ve apoptozu içeren çeşitli biyolojik olaylara sinyal verilmesi aracılık eder (Iwasa ve ark, 2003).

MAPK yolları en az üç farklı sinyal modülünden oluşur: ERK'ler, JNK / SAPK'ler ve p38. Her modül üç kinaz (MAPKKK, MAPK kinaz kinaz; MAPKK, MAPK kinaz; ve MAPK) içerir. MAPK'ler, aktivasyonu MAP2K kinazlar tarafından katalize edilen Thr-X-Tyr motifi üzerinde çift fosforilasyon gerektirir (Wagner ve Nebreda, 2009).

Aktivasyondan sonra diğer protein kinazları ve birçok transkripsiyon faktörlerini içeren, hedef substratların spesifik serin ve treonin kalıntılarını fosforile eder (Wagner ve Nebreda, 2009). Hem transkripsiyonel hem de transkripsiyonel olmayan düzenleme ile hücre dışı uyarıcıların çeşitli hücrel cevaplara dönüştürmede önemli olan sinyal bileşenleridir (Ji, ve Suter, 2007).

Buna karşılık, JNK ve p38 yolları, reaktif oksijen türlerini (ROS), UV ışığını, X ışınlarını ve enflamatuar sitokinleri içeren hücrel stres ile aktive edilir ve hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması, apoptoz, spesifik hücre tiplerinin göçünü kontrol ettiklerinden iltihaplanma, doku homeostazı gibi hücrel süreçlerde kilit rol oynarlar (Iwasa ve ark, 2003; Wagner ve Nebreda, 2009).

Mitokondri içinde üretilen ROS mitokondriyal DNA ve diğer bileşenlere doğrudan zarar verebilir. Benzer şekilde, mitokondriyal oksidanlar, p53'ün ve diğer DNA hasar yollarının aktivasyonuna yol açan nükleer DNA'ya zarar verebilir. JNK ve p38 gibi stresle aktive olan kinazları içeren sitosolik elementlerin potansiyel hedefler olabileceği düşünülmüştür. Buradan yola çıkarak proteinlerin oksidatif modifikasyonunun yaşlanmada önemli bir unsur olduğu düşünülmüştür (Balaban ve ark, 2005).

Iwasa ve ekip arkadaşları toplam ya da aktive edilmiş JNK ve p38 düzeylerini spesifik antikolar kullanarak genç ve yaşlanmış NHF (normal insan fibroblast) WI-38 hücrelerinde inceledi. Toplam JNK ve p38 miktarları esas olarak iki hücre tipi için aynıydı. Bununla birlikte, yaşlanmış hücrelerde fosforile (aktif) p38 miktarında genç hücrelere göre üç ila dört kat artış olduğu tespit edildi (Iwasa ve ark, 2003). Tobiume ve ekip arkadaşları 2001 yılında yaptığı bir çalışmada TNF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi reaktif oksijen türleri (ROS) dahil olmak üzere çeşitli sitotoksik streslere cevap olarak aktive olan ASK1' in JNK/p38 sinyal yolağını ve apoptozu sürekli aktive ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak p38 ve fosfo-p38'in stres durumunda apoptozun indüklenmesinde rol oynadığı düşünülmüştür (Tobiume ve ark, 2001).

Brobey ve arkadaşları yaptıkları çalışmada klotho nakavt farelerin (klkl) ve klotho'yu (EFmKL46 veya EFmKL48) aşırı ifade eden transgenik fareler üreterek reaktif oksijen türlerinin (ROS) duyarlı apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1 (ASK1) / p38 MAPK yolağının bu farelerin beyindeki stres seviyelerini nasıl düzenlediği çalışmışlardır. Elde ettikleri bulgular beyindeki Klotho aşırı ekspresyonunun, p38 MAPK aracılı oksidatif strese karşı hafifletici etkiler ürettiğini açıkça göstermektedir. Sonuçlar klotho aşırı ekspresyonunun, kısmen p38 MAPK aktivasyon seviyesini modüle ederek dopaminerjik nöronları oksidatif hasara karşı önemli ölçüde koruduğunu göstermektedir. Bu yüzden klotho'yu olası bir antioksidan efektör olarak tanımladılar ( Brobey ve ark, 2015).

Bu çalışmada hippocampal HTT22 hücre serisi kullanılarak bir nöroprotektif olduğu belirlenen klotho proteininin homolog rekombinasyonda görev aldığı düşünülen p38 MAPK proteini ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımız klotho proteini ile p38 MAPK sinyal yolağının arasında anlamlı bir ilişki olabileceğini göstermiştir.

Çalışma bulgularımıza dayanarak elde ettiğimiz sonuçlarda sadece endosülfan uygulanan hücrelerde p38 mRNA seviyesi yüksek oranda artarken protein miktarının oldukça az olduğu görülmektedir. Buda hücrelerde oluşan DNA hasarı durumunda p38 MAPK sinyal yolağının aktive olduğunu gösterdi. 12 ve 16 saatlik Klotho proteininin uygulandığı hücrelerde ise p38 MAPK mRNA seviyesi daha düşükken protein miktarının Endosülfan uygulanan hücrelere oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Buda Klotho proteininin p38 MAPK sinyal yolağını baskıladığını gösterdi. Eş zamanlı uygulamada ise p38 MAPK mRNA seviyesi daha düşükken protein miktarının Endosülfan uygulanan hücrelere oranla daha fazla olduğu görülmüştür.

Sadece endosülfan uygulanan hücrelerde p38 protein miktarı kontrol hücrelere kıyasla azalırken klotho proteini miktarı yüksek oranda artmıştır. 12 saatlik klotho uygulamasında p38 miktarı kontrol hücrelere kıyasla azalırken klotho proteini miktarının arttığı, 16 saatlik klotho uygulamasında ise p38 protein miktarı daha da azalırken klotho proteini miktarı artmıştır. Burada klotho proteininin p38 proteini ile ters orantılı olarak arttığını azaldığı görülmektedir. Eş zamanlı uygulama ise p38 miktarının azaldığını klotho proteininin miktarının ise 12 saatlik klotho uygulamasına yakın bir miktarda olduğu görülmüştür.



Bu sonuçlar baz alındığında Endosülfanın ROS üzerinden oluşturduğu negatif etkininklotho proteini tarafından azaltıldığı görülmüştür. Sonuç olarak klotho proteininin p38 MAPK sinyal yolağını inhibe ettiği ve nöron hücreleri üzerinde koruyucu etkisi olduğu söylenebilir ancak bunun net bir şekilde belirlenebilmesi için fosforillenerek aktifleşen p38'in fosfo-p38 protein miktarının da çalışılması gereklidir. Bu çalışmanın zayıf yönünde eksikliği aktif p38 (phospo-p38) protein miktarının çalışılmamasıdır.



## 6. KAYNAKLAR

(NALBANT S., 2006.Yaşlanmanın Biyolojisi, Türk Fiz Tıp Rehab Derg 2006;52(Özel Ek A):A12-A17

AKÇALI A., 2010. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi, Türk Onkoloji Dergisi 2010;25(3):119-123

ALKAN A., 2008, The Imaging of Neurodegenerative Diseases in Childhood, Türkiye Klinikleri J Radiol-Special Topics. 2008;1(3):86-108

Arıcıoğlu F, 2017,Neuroinflammation in the Neurobiology of Neurodegenerative Diseases, Türkiye Klinikleri Pharmacology

Bajpayee, M., Pandey, A. K., Zaidi, S., Musarrat, J., Parmar, D., Mathur, N., ... Dhawan, A. (2006). DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(9), 682–692.doi:10.1002/em.20255

Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T., 2005. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, 120(4), 483–495.doi:10.1016/j.cell.2005.02.001

BALCI S. Y., ERASLAN M., TEMEL A., 2015.Glokom, Parkinson hastalığı ve nörodejenerasyon, Marmara Medical Journal 2015; 28: 8-12

Başak N., Ozansoy M., 2007 .Tauopathies: A Distinct Class of Neurodegenerative Disorders. . 2007; 13(1): 1-29;

Batista, P.,& Pereira, A., 2016. Quality of Life in Patients with Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neurology and Neuroscience*, 7(1).doi:10.21767/2171-6625.100074

Belge- Kurutaş E., Kılınç M., 2003. Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkisi, ARŞİV 2003; 12:215

Bloch, L., Sineshchekova, O., Reichenbach, D., Reiss, K., Saftig, P., Kuro-o, M., & Kaether, C.,2009. Klotho is a substrate for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase. *FEBS Letters*, 583(19), 3221–3224.doi:10.1016/j.febslet.2009.09.009

**Boksha, I. S., Prokhorova, T. A., Savushkina, O. K., & Tereshkina, E. B., 2017.** Klotho protein: Its role in aging and central nervous system pathology. *Biochemistry (Moscow)*, 82(9), 990–1005.doi:10.1134/s0006297917090024

**Brobey, R. K., German, D., Sonsalla, P. K., Gurnani, P., Pastor, J., Hsieh, C.-C., ... Rosenblatt, K. P., 2015.** Klotho Protects Dopaminergic Neuron Oxidant-Induced Degeneration by Modulating ASK1 and p38 MAPK Signaling Pathways. *PLOS ONE*, 10(10), e0139914.doi:10.1371/journal.pone.0139914

**Cararo-Lopes, M. M., Mazucanti, C. H. Y., Scavone, C., Kawamoto, E. M., & Berwick, D. C., 2017.** The relevance of  $\alpha$ -KLOTTHO to the central nervous system: Some key questions. *Ageing Research Reviews*, 36, 137–148.doi:10.1016/j.arr.2017.03.003

**Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W. P., & Kaina, B., 2011.** O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1816(2), 179–190.doi:10.1016/j.bbcan.2011.06.002

**Cleaver J. E.,1974.** Repair Processes for Photochemical Damage in Mammalian Cells, *Advances in Radiation Biology*.

**Copeland, W. C., 2009.** The Mitochondrial DNA Polymerase in Health and Disease. *Genome Stability and Human Diseases*, 211–222.doi:10.1007/978-90-481-3471-7\_11

**Cuadrado, A.,& Nebreda, A. R., 2010.** Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3), 403–417.doi:10.1042/bj20100323

**Cuenda, A.,& Rousseau, S., 2007.** p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1358–1375.doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010

**Çiçek C., Bilgiç A., 2006.** KLİNİK VİROLOJİ LABORATUVARINDA UZMANLIK ÖĞRENCİSİNE VERİLEN HÜCRE KÜLTÜRÜ EĞİTİM PROGRAMI: BİR MODEL, *enfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2006; 20 (3): 231-241

**Dalton, G. D., Xie, J., An, S.-W., & Huang, C.-L., 2017.** New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Frontiers in Endocrinology*, 8.doi:10.3389/fendo.2017.00323

**Darling, N. J., & Cook, S. J., 2014.** The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(10), 2150–2163. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.01.009

**Debeleş-Bütüner B., Kantarcı G., 2006.** Mutasyon , DNA Hasarı , Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi, *Ankara Ecz. Fak. Dergisi* 35 (2) 149 – 170

**Dhikav, V., & Anand, K., 2012.** Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239. doi:10.4103/0972-2327.104323

**Duran N., Yarkın F., Allahverdiyev A. M., 2001.** The Effect Of The Various Freezing Methods On The Cell Viability Of Cryopreserved Hep-2 And Rabbit Kidney Cells. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2001; 58(2): 53-60

**Eisenberg, E., & Levanon, E. Y., 2013.** Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10), 569–574. doi:10.1016/j.tig.2013.05.010

**Ekim M., 2010.** Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde o<sup>6</sup>-metilguanin dna metiltransferaz geni promoter metilasyon profilinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi

**Erkol G, Karaali Savrun F., 2002.** Frontotemporal dementia. *Cerrahpaşa J Med* 2002; 33: 256-260

**Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M., 2016.** Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), pdb.prot087379. doi:10.1101/pdb.prot087379

**Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., & Puig, B., 2001.** Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *Journal of Neural Transmission*, 108(12), 1397–1415. doi:10.1007/s007020100016

**Friedberg, E. C., 2001.** DNA Repair. *Encyclopedia of Genetics*, 558–564. doi:10.1006/rwgn.2001.0366

**GeneCards Human Database**

**Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017).** Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease Models & Mechanisms*, 10(5), 499–502. doi:10.1242/dmm.030205

**GÜNEL T., 2007.** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”, *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007, 27:763-767

**Harman D., 2006.** Free Radical Theory of Aging: An Update Increasing the Functional Life Span, *Annals of the New York Academy of Sciences*; doi.org/10.1196/annals.1354.003)

**Harman, D., 1981.** The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 7124–7128. doi:10.1073/pnas.78.11.7124

**Hekimi, S.,Guarente L., 2003.** Genetics and the Specificity of the Aging Process. *Science*, 299(5611), 1351–1354. doi:10.1126/science.1082358

**Hotamisligil, G. S.,& Davis, R. J., 2016.** Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(10), a006072. doi:10.1101/cshperspect.a006072

**Hsieh, P.,& Yamane, K., 2008.** DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7-8), 391–407. doi:10.1016/j.mad.2008.02.012

**Huang, G., Shi, L. Z., & Chi, H.,2009.** Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, 48(3), 161–169. doi:10.1016/j.cyto.2009.08.002

**Hudu, S. A., 2016.** Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. doi:10.7860/jcdr/2016/15837.7460

**Ighodaro, O. M.,& Akinloye, O. A., 2017.** First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001

**Iwasa, H., Han, J., & Ishikawa, F., 2003.** Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(2), 131–144. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00620.x

**Iyama, T., & Wilson, D. M., 2013.** DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620–636. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015

**Jasin, M. And Rothstein, R., 2013.** Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a012740–a012740. doi:10.1101/cshperspect.a012740

**Ji, R.-R., & Suter, M. R., 2007.** p38 MAPK, Microglial Signaling, and Neuropathic Pain. *Molecular Pain*, 3, 1744–8069–3–33. doi:10.1186/1744-8069-3-33

**Jin K., 2010.** Modern Biological Theories of Aging, *Aging and Disease*, Volume 1, Number 2; 72-74, October 2010

**Kaieda, A., Takahashi, M., Fukuda, H., Okamoto, R., Morimoto, S., Gotoh, M., Miwatashi, S., 2019.** Structure-based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Imidazo[4,5-b]pyridin-2-one-based p38 MAP Kinase Inhibitors: Part 1. *ChemMedChem*. doi:10.1002/cmhc.201900129

**KARA İ., MÜDÜROĞLU A., 2008.** İnflamasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklar, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28(Suppl):S115-S118

**Kaur, G., & Dufour, J. M., 2012.** Cell lines. *Spermatogenesis*, 2(1), 1–5. doi:10.4161/spmg.19885

**Kelley, M. R., & Fishel, M. L., 2016.** Overview of DNA repair pathways, current targets, and clinical trials bench to clinic. *DNA Repair in Cancer Therapy*, 1–54. doi:10.1016/b978-0-12-803582-5.00001-2

**Kim, E. K., & Choi, E.-J., 2010.** Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009

**Kim, J.-H., Hwang, K.-H., Park, K.-S., Kong, I. D., & Cha, S.-K., 2015.** Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. *Journal of Lifestyle Medicine*, 5(1), 1–6. doi:10.15280/jlm.2015.5.1.1

**Kocatürk N. M., Gözüacık D., 2017.** Otofaji ve Nörodejeneratif Hastalıklar, *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics* 2017;5(1):11-20

**KOÇ E., 2010.** Küçük Hücreli OLMAYAN Akciğer Kanserlerinde ‘‘Excision Repair Cross-Complementing Group-1’’ (ERCC1) Geni T19007C VE C8092A Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi

**Krokan, H. E.,& Bjoras, M., 2013.** Base Excision Repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(4), a012583–a012583.doi:10.1101/cshperspect.a012583

**KUBULAY B., 2016.** Deneysel Yangı Oluşturulmuş Gökkuşığı Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss WALBAUM, 1792) Timolün Apoptoz Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi.

**Kulaksız G., Sancar A., 2007.** Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser, Türk Biyokimya Dergisi 2007; 32 (3); 104–111

**Kuro-o, M., 2001.** Disease model: human aging. Trends in Molecular Medicine, 7(4), 179–181.doi:10.1016/s1471-4914(01)01921-9

**Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohshima Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima, Y., 1997.** Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature, 390(6655), 45–51.doi:10.1038/36285

**Kurtoğlu E. L., Tekedereli İ., 2015.** DNA ONARIM MEKANİZMALARI, Balıkesir Sağlık Bil Derg Cilt:4 Sayı:3 Aralık 2015, DOI:10.5505/bsbd.2015.52523

**Küçükkaya B., Afrasyap L., 2012.** Mitojenle etkinleşen protein kinazların heterotrimerik G proteinleri ile düzenlenmesi, Türk Biyokimya Dergisi, doi: 10.5505/tjb.2013.62534

**Lahut S., Özeş B., Ağar S., Başak A. N., 2012,** TDP-43 Proteinopatileri: Nörodejeneratif Konformasyon Bozukluğu Hastalıklarında Yeni Bir Oyuncu, DO I: 10.4274/Tnd.58561

**Lamster, I. B., Asadourian, L., Del Carmen, T., & Friedman, P. K., 2016.** The aging mouth: differentiating normal aging from disease. Periodontology 2000, 72(1), 96–107.doi:10.1111/prd.12131

**Lee, H.-K., Moon, J.-K., Chang, C.-H., Choi, H., Park, H.-W., Park, B.-S., Lee HS, Hwang EC, Lee YD, Liu KH and Kim, J.-H., 2006.** STEREOSELECTIVE METABOLISM OF ENDOSULFAN BY HUMAN LIVER MICROSOMES AND HUMAN

CYTOCHROME P450 ISOFORMS. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(7), 1090–1095. doi:10.1124/dmd.105.009134

**Li, G.-M., 2007.** Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85–98. doi:10.1038/cr.2007.115

**Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., & Chen, Z., 2014.** New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46(8), 629–640. doi:10.1093/abbs/gmu048

**Lim, K., Groen, A., Molostvov, G., Lu, T., Lilley, K. S., Snead, D., James S., Wilkinson I. B., Ting S., Hsiao Li-Li, Hiemstra T. F., Zehnder, D., 2015.**  $\alpha$ -Klotho Expression in Human Tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(10), E1308–E1318. doi:10.1210/jc.2015-1800

**Lindin, I., Wuxiuer, Y., Kufareva, I., Abagyan, R., Moens, U., Sylte, I., & Ravna, A., 2013.** Homology modeling and ligand docking of Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5 (MK5). *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 10(1), 56. doi:10.1186/1742-4682-10-56

**Liu, J., Li, L., & Suo, W. Z., 2009.** HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sciences*, 84(9-10), 267–271. doi:10.1016/j.lfs.2008.12.008

**Lomakina, G. Y., Modestova, Y. A., & Ugarova, N. N., 2015.** Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*, 80(6), 701–713. doi:10.1134/s0006297915060061

**M. Cristina Negritto, 2010.** Repairing Double-Strand DNA Breaks, *Nature Education* 3(9):26

**Marinus, M. G., 2012.** DNA Mismatch Repair. *EcoSal Plus*, 5(1). doi:10.1128/ecosalplus.7.2.5

**Martin, A., & Clynes, M., 1993.** Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11(1), 49–58. doi:10.1007/bf00749057

**Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-Iida, T., Nagai, R., Kuro-o, M., & Nabeshima, Y., 1998.** Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane



and Secreted Klotho Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(3), 626–630. doi:10.1006/bbrc.1997.8019

**Maynard, S., Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Croteau, D. L., & Bohr, V. A., 2015.** DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(10), a025130. doi:10.1101/cshperspect.a025130

**Mittler R., 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410. doi:10.1016/S1360-1385(02)02312-9

**Morishima, N., Nakanishi, K., & Nakano, A., 2011.** Activating Transcription Factor-6 (ATF6) Mediates Apoptosis with Reduction of Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (Mcl-1) Protein via Induction of WW Domain Binding Protein 1. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 35227–35235. doi:10.1074/jbc.m111.233502

**Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Masuda, H., Nakamura, T., Aihara, Y., Kaname, T., ... Nagail, R., 1998.** Molecular Cloning of Ratklotho cDNA: Markedly Decreased Expression of klotho by Acute Inflammatory Stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(3), 920–925. doi:10.1006/bbrc.1998.9576

**Omurtag, G. Z., Tozan, A., Şehirli, A. Ö., & Şener, G., 2008.** Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *Journal of Pineal Research*, 44(4), 432–438. doi:10.1111/j.1600-079x.2007.00546.x

**Onur E., Tuğrul B., Bozyiğit F., 2009.** DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009; 7(2): 61-70

**Öksüzokyar M. M., Eryiğit S. Ç., Öğüt Düzen K., Erdoğan Mergen B., Sökmen Ü. N., Öğüt S., 2016.** Biyolojik yaşlanma nedenleri ve etkileri. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.* 4(1): 34-41

**Özel-Demiralp D., İğci N., Peker S., Ayhan B., 2014,** *Temel Proteomik Stratejiler*, Ankara Üniversitesi Yayınevi, ISBN: 978-605-136-148-2, 2014

**Özkurt G., Gökçen A., Çamkerten İ., Şahin T., Balkan B. M., Boz M., 2012.** Doğal Enfekte Nematotlu Kilis Keçilerinde Eritrosit SOD, CAT, GPx Enzim Aktiviteleri ve MDA Düzeyi, *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 1(2):107-110, 2012).

**PARK, S. Y., JUNG, W. J., KANG, J. S., KIM, C.-M., PARK, G., & CHOI, Y.-W., 2014.** Neuroprotective effects of  $\alpha$ -iso-cubebene against glutamate-induced damage in the HT22 hippocampal neuronal cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(2), 525–532.doi:10.3892/ijmm.2014.2031

**Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R., 2011.** Introduction to Cell Culture. *Human Cell Culture Protocols*, 1–13.doi:10.1007/978-1-61779-367-7\_1

**Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R., 2011.** The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619–1633.doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.012

**Ray, P. D., & Fry, R. C., 2015.** The Cell. *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*, 11–42.doi:10.1016/b978-0-12-801564-3.00002-x

**Reiss, B., 2003.** Homologous Recombination and Gene Targeting in Plant Cells. *International Review of Cytology*, 85–139. doi:10.1016/s0074-7696(03)28003-7

**Romano, P., Manniello, A., Aresu, O., Armento, M., Cesaro, M., & Parodi, B., 2009.** Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D925–D932.doi:10.1093/nar/gkn730

**Roux, P. P., & Blenis, J., 2004.** ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 320–344.doi:10.1128/mnbr.68.2.320-344.2004

**S.A. Lacks, in Encyclopedia of Genetics, 2001**

**Sancar A., 1995.** DNA Repair in Humans, *Anu. Rev. Genetics* 1995. 29:69-105

**Sancar A., 2016.** Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition*, 55(30), 8502–8527.doi:10.1002/anie.20160152

**Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S., 2004.** Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85.doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303. .073723

**Schwertman, P., Bekker-Jensen, S., & Mailand, N., 2016.** Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), 379–394.doi:10.1038/nrm.2016.58

**Shao, B., Zhu, L., Dong, M., Wang, J., Wang, J., Xie, H., ... Zhu, S., 2012.** DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology*, 21(5), 1533–1540.doi:10.1007/s10646-012-0907-2

**Shiraki-Iida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagaic R., Kuru-o M., Nabeshima, Y., 1998.** Structure of the mouseklothogene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein1. *FEBS Letters*, 424(1-2), 6–10. doi:10.1016/s0014-5793(98)00127-6

**Shiryaev, A.,& Moens, U., 2010.** Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: Ménage à trois or ménage à quatre? *Cellular Signalling*, 22(8), 1185–1192.doi:10.1016/j.cellsig.2010.03.002

**Silva, M. H.,& Gammon, D., 2009.** An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 86(1), 1–28.doi:10.1002/bdrb.20183

**Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S., 2006.** *BMC Molecular Biology*, 7(1), 33. doi:10.1186/1471-2199-7-33

**Sun, N., Youle, R. J., & Finkel, T., 2016.** The Mitochondrial Basis of Aging. *Molecular Cell*, 61(5), 654–666.doi:10.1016/j.molcel.2016.01.028

**SÜMER TURANLIGİL N. C., UYANIKGİL Y., 2010.** Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Klinik Yansımaları, *ARŞİV* 2010; 19: 180

**Szczesny, B., Hazra, T. K., Papaconstantinou, J., Mitra, S., & Boldogh, I., 2003.** Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 10670–10675.doi:10.1073/pnas.1932854100

**The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition**

**Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., ... Ichijo, H., 2001.** ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Reports*, 2(3), 222–228. doi:10.1093/embo-reports/kve046

**TOKUR, O , AKSOY, A., 2017.** In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118. DOI: 10.31196/huvfd.325794

**Torbus-Paluszczak, M., Bartman, W., & Adamczyk-Sowa, M., 2018.** Klotho protein in neurodegenerative disorders. *Neurological Sciences*.doi:10.1007/s10072-018-3496-x

**Tosato M., Zamboni V., Ferrini A., Cesari M., 2007.** The aging process and potential interventions to extend life expectancy, *Clinical Interventions in Aging* 2007:2(3) 401–412

**Üstüner D., 2010.** Tümör Hücrelerinde Western Blotlama Uygulamaları, *TÜBAV Bilim Dergisi*, Cilt:3, Sayı:4, Sayfa:330-334

**Wagner, E. F.,& Nebreda, Á. R., 2009.** Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 537–549. doi:10.1038/nrc2694

**Wang, Y.,& Sun, Z., 2009.** Current understanding of klotho. *Ageing Research Reviews*, 8(1), 43–51.doi:10.1016/j.arr.2008.10.002

**Wang, Z., Harkins, P. C., Ulevitch, R. J., Han, J., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J., 1997.** The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2327–2332.doi:10.1073/pnas.94.6.2327

**Watanabe, T., Sekine, S., Naguro, I., Sekine, Y., & Ichijo, H., 2015.** Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)-p38 Pathway-dependent Cytoplasmic Translocation of the Orphan Nuclear Receptor NR4A2 Is Required for Oxidative Stress-induced Necrosis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 10791–10803.doi:10.1074/jbc.m114.623280

**Wei, J., Zhang, L., Ren, L., Zhang, J., Liu, J., Duan, J., ... Sun, Z., 2017.** Endosulfan induces cell dysfunction through cycle arrest resulting from DNA damage and DNA damage response signaling pathways. *Science of The Total Environment*, 589, 97–106.doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.154

**Whitmarsh, A. J., 2010.** A central role for p38 MAPK in the early transcriptional response to stress. *BMC Biology*, 8(1), 47.doi:10.1186/1741-7007-8-47

**Wiesmüller, L., Ford, J. M., & Schiestl, R. H., 2002.** DNA Damage, Repair, and Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2(2), 45–45.doi:10.1155/s1110724302001985

**Xu, D., Liang, D., Guo, Y., & Sun, Y., 2018.** Endosulfan causes the alterations of DNA damage response through ATM-p53 signaling pathway in human leukemia cells. *Environmental Pollution*, 238, 1048–1055.doi:10.1016/j.envpol.2018.03.044

**Xu, Y.,& Sun, Z. (2015).** Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. *Endocrine Reviews*, 36(2), 174–193. doi:10.1210/er.2013-1079

**Yang, S.-H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J., 2013.** MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513(1), 1–13.doi:10.1016/j.gene.2012.10.033

**YARIM G. F., 2013.** A new strategy in treatment of neurodegenerative diseases: Neurosteroids , *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 60, 79-83

**Yıldız M., Gürger M., Bozdemir M.N., ,Baştürk M., Ateşçelik M., Kılıçarslan I ve Eken C., 2008.** Endosulfan Zehirlenmesi: Üç Olgu Sunumu, *Akademik Acil Tıp Dergisi*, Eylül 2008 Cilt:7 Sayı:1 [44-46]

**ZARUBIN, T.,& HAN, J., 2005.** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 15(1), 11–18.doi:10.1038/sj.cr.7290257

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Sadegül TUNCER

**Doğum Tarihi/Yeri:** 05.06.1993/ TORUL

**Öğrenim Durumu:**

Derece	Bölüm/ Program	Eğitim Kurumu	Yıl
Lise	Fen Bilimleri	Ali Fuat Kadirbeyoğlu Anadolu Lisesi	2008-2011
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi	2012-2016
Y. Lisans	Tıbbi Biyoloji	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi	2016-2019