



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BCL-2 PROTEİNİNİN APOPTOZ YOLAKLARI ÜZERİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mukaddes ÇOLAKOĞULLARI

(DOKTORA TEZİ)

Danışman:Doç.Dr. Engin ULUKAYA

Bursa-2007

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	56
TEŞEKKÜR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	63

## ÖZET

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, organizmada fizyolojik süreçlerin yanı sıra çeşitli patolojilerin ortaya çıkışındaki mekanizmalarda da rol oynamaktadır. Apoptoz sürecindeki dengenin bozulması, hastalıkların ortaya çıkışını tetiklemektedir. Bu sürecin engellenmesinde Bcl-2 proteininin artan ekspresyonu önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada anti-apoptotik etkinliği bilinen Bcl-2 proteininin, Ultraviole (UV) irradyasyonu,  $\alpha$ -keto isokaproik asit (KİKA) veya Staurosporine (SSP) ile indüklenen hücre ölümü sürecinde olası koruyucu etkinliğinin Bcl-2 proteinini aşırı eksprese eden Rat 1 fibroblastlar aracılığı ile incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın verilerine göre, UV-B irradyasyonu ile indüklenen Rat 1 fibroblastlarının ölümünde, Bcl-2 proteinin varlığı hücre ölümünden kısmen korumaktadır. UV-B'ye bağlı olan hücre sel stres nedeniyle c-Jun N-terminal kinaz (JNK) enzimleri bifazik fosforilasyon ile aktive olmaktadır. Bcl-2'nin aşırı varlığı JNK'nin ikinci fosforilasyon dalgasında gecikmeye neden olmaktadır. D-JNK inhibitörünün kullanılması hücre yaşamı oranını arttırdığı gibi Bcl-2'nin kırılmasını da engellemiştir. Bu veriler, JNK ve Bcl-2 arasında dinamik bir etkileşim olduğuna işaret etmektedir. JNK enzimi, UV-B irradyasyonu sonucunda tetiklenen hücre ölümünde Bcl-2 fonksiyonunu düzenleyen üst yolda yer alıyor görünmektedir. Ayrıca Bcl-2 proteini KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümüne karşı Rat 1 fibroblastlarda kısmen koruyucu etki göstermiştir ve pan-kaspaz inhibitörü olan Q-VD'nin kullanımı hücre yaşam süresini uzatmıştır.

Sonuçta bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler, Bcl-2 proteininin UV irradyasyonu, KİKA ve SSP ile indüklenen Rat 1 fibroblast hücre ölümünde koruyucu etkili olduğunu desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:**

Apoptoz, Bcl-2, Ultraviole (UV),  $\alpha$ -keto isokaproik asit (KİKA), Staurosporine (SSP)

## SUMMARY

### EFFECT OF BCL-2 PROTEIN ON APOPTOTIC PATHWAYS

Apoptosis, programmed cell death, plays a role not only in physiological processes but also in pathological conditions. A shift in apoptotic processes triggers the development of some diseases. Bcl-2 protein has an important role in the inhibition of apoptosis. In this study, the possible anti-apoptotic effect of Bcl-2 on ultraviolet (UV) irradiation,  $\alpha$ -keto isocaproic acid (KICA) or staurosporine (SSP) induced cell death of Rat 1 fibroblasts has been elucidated.

According to the results of this study, overexpression of Bcl-2 protein delayed UV-induced cell death. Following UV irradiation, we observed a biphasic activation of c-Jun N-terminal kinases (JNK) in both wild type and Bcl-2 overexpressing Rat-1 fibroblasts. Second phase was significantly delayed in Bcl-2 overexpressing fibroblasts that were more resistant to UV-induced cell death compared to wild type Rat-1 cells. The addition of a specific JNK inhibitory peptide to Rat-1 fibroblasts before UV irradiation not only increased survival but also decreased Bcl-2 cleavage. Our data suggest that there is a dynamic interaction between Bcl-2 and JNK, and JNKs may also act as upstream regulators of Bcl-2 function. Overexpression of Bcl-2 protein also showed a protective effect on KICA- and SSP- induced cell death. Increased survival of Rat 1 fibroblasts with co-treatment of Q-VD, a pan-caspase inhibitor, during KICA and SSP induced cell death suggests that caspases are involved.

In conclusion, overexpression of Bcl-2 protein showed a protective effect on UV-, KICA- and SSP-induced cell death.

#### Key words:

Apoptosis, Bcl-2, Ultraviolet (UV),  $\alpha$ -keto isocaproic acid (KICA), Staurosporine (SSP)

## GİRİŞ

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, organizmada fizyolojik süreçlerin yanı sıra çeşitli patolojilerin ortaya çıkışındaki mekanizmalarda da rol oynamaktadır. Apoptoz sürecindeki dengenin bozulması, hastalıkların ortaya çıkışını tetiklemektedir. Bu sürecin engellenmesinde Bcl-2 proteininin artmış ekspresyonunun önemli rol oynamaktadır (1). Mitokondriyal membran üzerinde bulunan Bcl-2, hücreyi ölüme götüren yolağı başta sitokrom C'nin salınımını bloke ederek engellemektedir (2-4). Bu mekanizma stres etkenlerine bağlı olarak gelişen hücre ölümlerinin engellenmesinde önemli görünmektedir. Bu etkenler ultraviyole (UV) irradasyonu gibi dış kaynaklı etkenler olabileceği gibi metabolik bozukluklara bağlı olarak biriken metabolitler de olabilir.

UV irradasyonu, oksijen radikallerinin üretimini artırarak hücre membranının hasarlanmasına ve DNA kırıklarının oluşmasına neden olarak hücrenin ölümüne ya da kanser hücresine dönüşmesine zemin hazırlayabilmektedir (5). UV uygulanması sonucunda stres enzimleri arasında yer alan c-Jun N-terminal kinazlar (JNKler) aktive olmaktadır (6). JNKlerin, apoptoz yollarında son derece önemli rol oynadığı bilinen kaspazların, özellikle kaspaz-3'ün aktive olmasını sağlayarak apoptozun gelişiminde rol oynadığına dair raporlar yayınlanmıştır (7). Mitokondrinin dış membranında yer alan Bcl-2 proteininin ise JNK etkisi ile aktiflenen yolağı baskıladığına dair bulguların yanı sıra (8, 9), aktif JNK enziminin Bcl-2'nin etkisini saf dışı bıraktığına dair veriler de literatürde yer almaktadır (10, 11). JNK ve Bcl-2'nin apoptotik süreçte olan etkileşimi netlik kazanmamıştır.

Metabolik kalıtsal bir hastalık olan Akçaağaç şurubu hastalığı (maple syrup urine disease-MSUD),  $\alpha$ -ketoasit dehidrogenaz enzim eksikliğinden kaynaklanmaktadır (12). Vücutta lösin, izolösin, valin gibi aminoasitlerin ve onların alfa-ketoasit derivelerinin özellikle  $\alpha$ -keto isokaproik asidin (KİKA) birikimiyle seyrederek (13). KİKA'nın birikiminin glial ve nöronal hücrelerde apoptozu indüklediği ve nörodejenerasyona yol açtığı rapor edilmiştir (14, 15). Ancak KİKA'nın indüklediği hücre ölümünün kaspaz bağımlı veya bağımsız yollardan ilerleyebileceğine dair veriler tam bir birlik içinde değildir.

Staurosporine (SSP) bir proteaz inhibitörüdür ve pek çok hücre tipinde güçlü bir apoptoz indükleyicisi olarak tanınmıştır. SSP'nin apoptozu indükleme mekanizması tam

anlaşılmamakla birlikte genel olarak mitokondrial apoptotik yolağın kritik rol oynadığına inanılmaktadır (16, 17). Ancak Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun SSP'nin öldürücü etkisinden korumada tam olarak etkili olmadığı saptanmıştır (18). KİKA'ya benzer şekilde, SSP'nin etki mekanizmasının hem kaspaz-bağımlı hem de –bağımsız yollarla olduğuna dair raporlar yayınlanmıştır (19, 20). SSP ile indüklenen apoptozda hücre tipine göre değişebilen çoklu mekanizmaların varlığı söz konusu olabilir.

Bu çalışmada anti-apoptotik etkinliği bilinen Bcl-2 proteininin, UV irradyasyonu, KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümü sürecinde olası koruyucu etkinliğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

## GENEL BİLGİLER

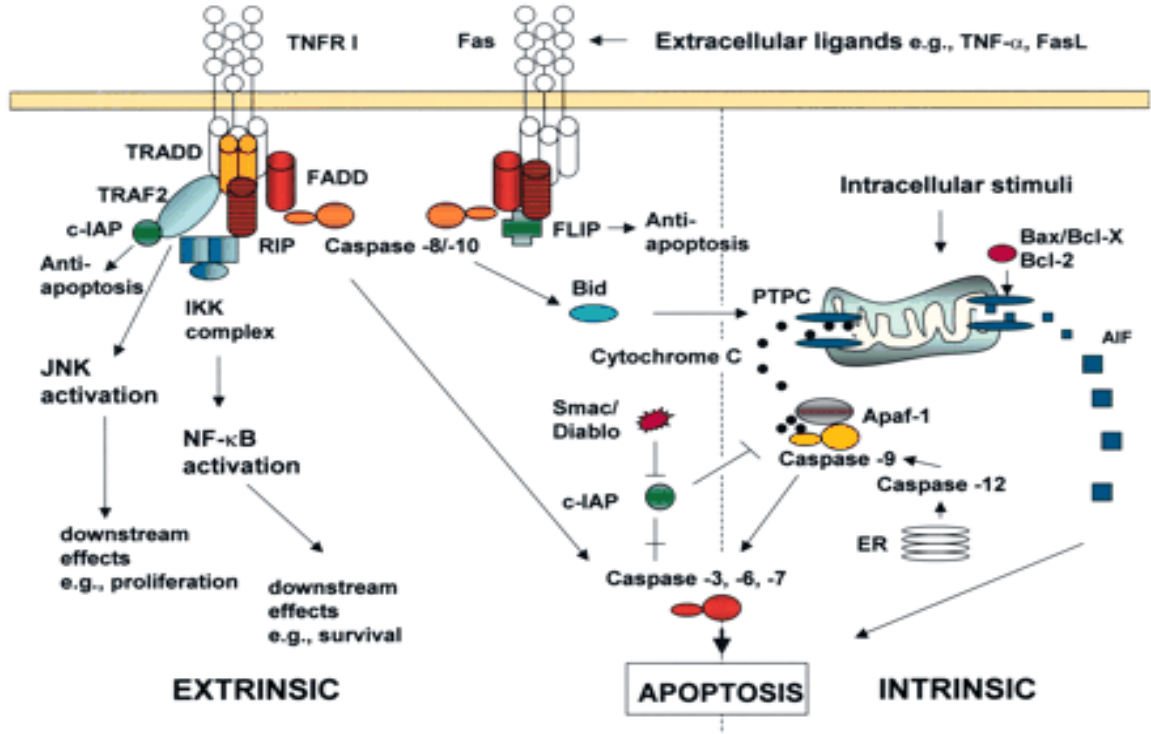
### A) APOPTOZUN CANLI ORGANİZMADAKİ YERİ VE ÖNEMİ

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (21).

Tüm canlıların en küçük işlevsel birimi olan hücrede ölüm, patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşir. Başlıca iki hücre ölüm şekli olan nekroz, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterizedir ve ani iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir (22). Bu tür hücre içi denetim mekanizmalarının etkisi yoktur. Hücre kendi isteği ile ölmez. Diğer bir hücre ölüm şekli olan fizyolojik ölüm yolu ise yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak hücreler arası dengeyi ve hücrelerin canlılıklarını sürdürmeyi sağlar (23). 1920'li yıllardan beri bilinen ve nekrozdaki farklı olarak hücre büzülmesi görülmesi nedeniyle "büzülme nekrozu" olarak adlandırılan fizyolojik hücre ölümünün, büyük oranda önceden kestirilebilir (programlanmış), kesin şekilsel (morfolojik) nitelikleri olan bir süreç olduğu 1970'lerde Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ileri sürülmüştür (24). Genetik olarak belirlenen aktif bir süreç olan programlanmış hücre ölümünün günümüzde en az iki ayrı şekli olduğu belirtilmektedir (25).

- 1. Apoptotik programlanmış hücre ölümü:** Apoptoz, eski Yunanca "apo" (ayrı) ve "ptosis" (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Klasik Yunan tarihçisi James Cormack'ın önerisiyle "apoptoz" olarak adlandırılmıştır (24). Yeni doğanda timusun gerilemesi bu tip hücre ölümünün en klasik örneğidir.

2. **Apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümü:** Apoptozda görülen yapısal değişiklikler izlenmeden programlanmış bir olay sonucu hücre ölümünün gerçekleşmesidir. Canlı organizmanın oluşum (embriyogenezis) ve başkalaşma (metamorfoz) sürecinde birçok organın ortadan kalkması bu tipe örnektir (25).



Resim-1- Apoptoz yollarının düzenlenmesi (Zeiss CJ Vet Pathol 40:481-495 (2003)).

### Apoptozun Şekilsel Özellikleri (Morfolojisi)

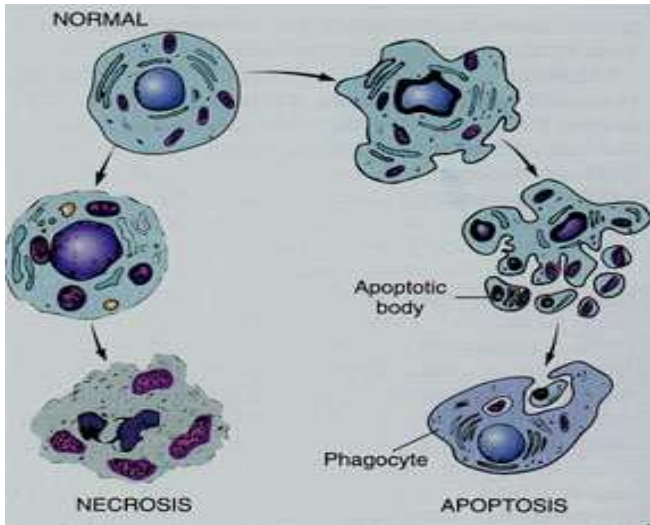
Apoptoz, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler görülmez. Belirlenen ilk şekilsel değişiklik kromatinin çekirdek zarının altında yoğunlaşarak değişik boyutta yarım ay ya da oval şekillerde iyi sınırlı yoğun kitleler haline gelmesidir. Çekirdek merkezinde osmiofilik granül kümeleri oluşturmak üzere çekirdekçik kromatini dağıtır. Fibriler protein merkez yoğunlaşmış çekirdek kromatinin iç yüzeyinde yoğun granüler kitle oluşturur. Bu çekirdek değişiklikleriyle aynı anda apoptotik hücre komşu hücrelerden ayrılır ya da bağlantı noktaları ortadan kalkar. Mikrovilluslar gibi özel yüzey yapıları kaybolur ve düzgün sınırlı hale gelir. Hücre hacmi azalır, hücre yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller yoğunlaşır, düz endoplazmik retikulum genişler. Yoğunlaşmış sitoplazmada vakuoller oluşur. Genişleyen sisternalar hücre zarı ile birleşerek hücre



yüzeyine doğru tomurcuklanmalar oluştururlar. Sitoplazmik flamanlar yan yana ve hücre yüzeyine paralel tabakalar şeklinde toplanırlar (24, 26).

Bu dönemde iç içe geçen ya da hemen ardından gelen devrede hücre yüzeyinde tomurcuklanma ve çekirdek sınırında düzensizlik vardır. Bunların ayrılması ile çekirdek ve sitoplazma değişik boyutlarda “apoptotik cisimcikler” oluşturur. Bu cisimler epitelyal yüzeyden dökülebilir ya da çoğunlukla komşu normal parankimal hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilirler (24, 26).

Son aşama kalıntı çekirdek ve sitoplazmik yapıların genellikle fagosite eden hücrenin fagozomu içinde lizozomal enzimlerle parçalandığı “in vitro otoliz” dönemidir. Hücre parçalanması sırasında hücre içi elemanlar hücreler arası aralığa dağılmadığı, proteolitik enzimler ya da toksik oksijen salınımı olmadığı için yangısal yanıt oluşmaz ve komşu hücrenin hasarlanması önlenir (24, 26).



Resim-2- Apoptoz ve nekrozisin morfolojik değişiklikleri

### **Apoptotik Hücrelerdeki Biyokimyasal Değişiklikler**

Kromatin değişikliklerinin başlamasından kısa süre önce, hücresel aktivitelere ve sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyumun sitoplazma içi miktarında hafif artma görülür (25, 27). Bu artış bazı sessiz enzimleri aktive ederek bazı yapısal değişikliklere yol açar. Kalsiyuma bağlı endonükleaz ve transglutaminaz bu enzimler arasındadır (25, 27).

Çekirdek değişikliklerine endojen kalsiyum-magnezyum bağımlı nükleazların aktivasyonu neden olur (28-30). Nükleozomlar arasında kromatini bölerler ve apoptotik

hücre DNA'sı hepsinin uzunluğu 180-200 baz çifti ve katları olan parçalara ayrılır. Bu parçalar agaroz jel elektroforezde apoptoza özgü merdiven görünümünü oluştururlar (23).

Apoptoza yönelen hücrede şekilsel değişiklikler gelişmeden ve DNA parçalanması görülmeden önce  $\beta$ -tubulin haberci RNA ve daha sonra  $\beta$ -tubulin miktarı artar (31).

Çoğu apoptotik hücre daha önce kendilerinde bulunmayan transglutaminaz aktivitesi gösterir. Bu enzim apoptotik hücrelerin sitoplazmik proteinleri arasında  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lizin bağları oluşumuna yol açar. Bu çapraz bağlı transglutamin proteinler sitoplazma zarı altında keratinize hücredekine benzer SDS-dirençli kabuk oluştururlar. Bu yapı, fagosite edilmelerinden önce apoptotik cisimlerin içindeki tehlikeli hücre içi enzimlerin salınımını önler. Apoptotik hücrelerin sınırlarının bozulması ve büzüşme bu enzim aktivitesi ile olabilir. Kalpain gibi kalsiyuma bağımlı proteazlar da hücre yapısının bozulmasına katkıda bulunabilirler (31). Apoptoz sırasında hücre zarındaki fosfolipid dağılımı da değişir. Hücre zarı iç yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfolipidlerin zarın dış yüzüne çıkar.

#### Apoptotik Sürecin Başlaması:

Apoptozun genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgilerimiz *Caenorhabditis elegans* ile yapılan ayrıntılı incelemeye dayanmaktadır (32). 1986'da Robert Horvitz, *C. elegans*'ta normal embriyogenez ve hücre ölümü için en az 3 genin gerekli olduğunu gösterdi. Ced-3, Ced-4 ve Ced-9 adı verilen bu genler olmadan apoptoz görülmediği ve gelişme olmadığı gözlemi Dr. Horvitz'e 2002'de Nobel ödülü kazandırdı (21).

Apoptoz biyolojisinde iki evre görülür:

1. Programlı ölüm kararının verilmesi
  - Uyarı
  - Uyarının hücre tarafından tanınması
  - Ölüm kararının verilmesi
  - Ölüm
2. Programlı olarak ölen hücrenin ortadan kaldırılması

Apoptoz uyarısı alan hücre bir hazırlık döneminden geçer. Geriye dönüşümlü olan bu dönemde hücrelerin sitoplazmasında bazı genlerin uyardığı mRNA ve protein yapımı olduğu görülür. Protein yapımını önleyen ajanlar apoptozisi önlemektedir (26, 33). Ancak apoptozis sırasında değişmez şekilde ortaya çıkan metabolik bir olay dizisi bulunmamaktadır. Aktif RNA ve protein sentezine duyulan gereksinim hücre tipine ve

apoptotik uyarının türüne bağlıdır. Bu durum hemen bütün hücrelerde fizyolojik hücre ölümünü baskılayan ya da başlatan düzenleyici proteinlerin bulunması ile açıklanabilir. Belli bir hücre tipinde baskılayıcıların ve başlatıcıların göreceli yıkım hızları apoptozu başlatan ya da durduran RNA ve protein sentezini düzenler (33).

Her çeşit hücrede kaçınılmaz olarak apoptozu yol açacak uyarıcı sinyal yoktur. Hücrede apoptoz olup olmaması hücrenin sinyale yanıtının doğası kadar apoptoz baskılayıcı moleküllerin var olup olmamasına bağlıdır.

Sitokinler, hormonlar, toksinler, fiziksel ajanlar ve büyüme faktörlerinin azalması gibi pek çok etken, Fas ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptörlerinin uyarılması apoptozu başlatabilir (34, 35). Çeşitli yollarla aktive olabilen apoptoz süreci daha sonra tek bir anayol ile devam eder (36). Apoptozu başlatan en önemli mekanizmalar fizik olaylar, ( $\gamma$ - ya da UV radyasyon), DNA alkilasyonu (Mitomisin C ile karşılaştırma), topoizomeraz aktivitesinin değişmesi (etoposid tedavisi), reaktif oksijen türleri ya da mitoz defektleri ile oluşan DNA hasarı olarak görünmektedir (37, 38). Reaktif oksijen türleri ve düzenleyicileri önemli bir başlatıcı etkindir. Reaktif oksijen yapımı sonucu görülen lipid peroksidasyonu farklı etkenlerin başlattığı apoptoz ile ilişkilidir. Ancak çok düşük oksijen düzeylerinde de apoptozun görülmesi apoptozda reaktif oksijen türlerine mutlaka gerek duyulmadığını, apoptoz sürecinin başlatılmasını kolaylaştıran fakat doğrudan yol açmayan hücre içi sinyallerden biri olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir. TNF'nin apoptozu başlatma yeteğinde süperoksid dismutaz düzeylerinin göze çarpan etkisi Fas'ın başlattığı hücre ölümünde görülmez. Başka başlatıcı yollar da bulunmaktadır (25, 37).

Apoptoz dış (ekstrensek) ve iç (intrensek) olmak üzere başlıca iki yol aracılığı ile gerçekleşir.

1) Dış (ekstrensek) yollar:

Apoptozun dış yolu TNF ailesi hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili apoptosis uyarıcı ligandlar (TRAIL) ve Fas ligantları bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörler (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/Trail-R2, CAR-1) ve (Fas/CD95/APO1) reseptörü belli bir amino asit dizilimi ve homolojiyi paylaşır (39, 40). Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligand bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarının kıyaslanması bu moleküllerde kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesinin (DD) bulunduğunu gösterir. Bu bölgeler apoptozun başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir. Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRAAD

ve FADD/Mort-1adlı adaptör proteinlerine bağlanırlar. Bu adaptör proteinlerden birinin ektopik yapımı apoptozu uyarabilmektedir. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan bölgesine (DED) bağlanan protein etkileşme bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir “Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksi (DISC)” oluşturur. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretir. Apoptozu başlatma yeteneklerini hasarlayan TNFR ya da Fas mutasyonlarında sitoplazmik ölüm bölümü proteinlerinin bağlanmasının bozulması, bu moleküllerin Fas ve TNFR’e bağlı apoptozda önemli rol oynadıklarının göstergesidir (34). Normalde, “Ölüm Bölgesi Susturucusu (SODD)” olarak adlandırılan protein ile uyarılmamış reseptörlerin sitoplazmik DD uçları maskelenerek reseptörlerin kendiliğinden sinyal oluşturması önlenir. Reseptörün uyarılması ile SODD ölüm ucundan ayrılır ve DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir (40, 41).

Yakın zamana kadar sadece yapısal bir molekül olarak işlev gördüğüne inanılan hücre zarının ana maddesi sfingomyelin, sfingomyelinaz ile ikincil ulak (messenger) olarak davranan seramid’e (ceramid) hidrolize olur.  $\gamma$ -ışınlama, TNF ya da Fas bağlanması ile başlatılan apoptotik sinyaller sfingomyelin yolunu seramid yapımını başlatmak üzere aktive eder. Asidik sfingomyelinazın apoptotik sinyalin taşınmasında özellikle önemli olabileceği belirtilmektedir (37, 42).

## 2) İntrensek yol:

Apoptozun daha yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, örneğin sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlayan sıkıntılı duruma yanıt olarak aktive olur. İç yoldaki apoptotik sinyal iletiminde mitokondrinin temel bir rolü bulunmaktadır. Ayrıca Fas kaynaklı sinyalin hücre tipine bağlı olarak mitokondri yoluyla da kaspazı aktive etmesi mümkündür (34). Mitokondri apoptoz sırasında sitoplazmaya geçerek ölüm programının akışını aktive eden birkaç faktör taşır. Bunlar sitokrom c ve “Apoptozu Uyarıcı Faktör (AIF)” adlı doğal bir faktördür. Bcl-2 bu faktörlerin sitoplazmaya salınımını önlemektedir (43).

AIF canlı hücrede mitokondri zarları arasında yerleşmiş, bakteriyel ferredoksin ya da NADH oksidoredüktazlarına benzerlik gösteren ve çekirdek tarafından kodlanan, proteaz özelliğinde olan 57 kDa’lık bir flavoproteindir. AIF sitoplazmik faktörler olmadığında apoptotik çekirdek değişikliklerini başlatır ve kaspazı aktive eder. Siklosporin A gibi zar geçirgenlik değişimi baskılayıcıları tarafından bazı apoptoz şekillerinin durdurulabilmesi apoptozdaki rolünün önemini göstermektedir (43).

Sitokrom c mitokondrial elektron aktarım sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış zarı arasındaki bölgede yerleşmiştir. Salınımı Bcl-2 proteinler tarafından düzenlenen ve kaspazların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. dATP (ya da ATP) ve sitoplazmik faktör Apaf-1 (Ced-4'ün memelideki eşdeğeri) ile birlikte sitoplazmaya salınımı, Kaspaz-9'un kendini ve sonra cellat Kaspaz-3'ü aktive etmesi ile sonuçlanır. Apaf-1, Kaspaz-9'un bağlama bölgesiyle etkileşerek bu kaspazı aktive eder. İnsan Apaf-1 proteini kaspazla etkileşmek için bir aktivasyon basamağı gerektirir. Aktivasyon için gereken bilinen tek mekanizma sitokrom c'dir (44).

AIF ve sitokrom c salınımı, "membran potansiyel kaybı ( $\Delta\psi_m$ )" ve "membran geçirgenlik değişmesi (PT)" gibi işlev bozukluklarına bağlıdır.  $\Delta\psi_m$ ' de kollaps apoptozisin klişe özelliğidir (45).

### **Apoptotik Ölüm Sinyalinin Tanınması**

Apoptotik sinyallerin en büyük alıcı grubu hücre döngüsünde önemli rolleri olan moleküllerdir. Apoptozu kontrol ettiği en iyi anlaşılmiş olan genler c-myc, p53, ve Bcl-2'dir (46). c-myc proteinin yapımı diğer yaşam faktörlerinin varlığına bağlı olarak hücreyi hem çoğalmaya hem apoptoza götürür.

Apoptozun iki ana düzenleyicisi p53 ve Bcl-2'dir. Başlangıçta bir onkoprotein olarak belirlendiyse de yabancıl (wild) p53 proteininin özellikle DNA hasarlanmasına yanıt olarak hücre ölümünü başlatıcı işlev gördüğü açıklık kazanmıştır.

### **Apoptozun Son Aşaması: Ölüm Makinası**

Farklı organizmalarda çeşitli dokulara ait hücreler önemli oranda benzer şekilsel özelliklerle apoptoza giderler. Bir türde apoptozu düzenleyen genler diğer türlerde de benzer işlevlere sahiptirler. Bu gözlem, evrimsel gelişim sırasında korunmuş, kimi yazarlar tarafından cellat (executioner) olarak adlandırılan bir ana apoptoz makinesi olduğunu düşündürmektedir. Gözlemler bu "cellat"ın sitoplazmada yerleşmiş olduğunu ve çoğu hücrede büyük oranda ya da tam olarak önceden bulunduğunu düşündürmektedir (37).

Bu proteazlar apoptoz süreci için önemli görünmektedir. Bu proteazları bloke eden peptitler apoptozu durdurabilmektedir (47). Proteazların hücre ölümünde iki rolü bulunmaktadır:

- 1) Özel hücre bölümlerinde oluşan ölüm sinyallerinin iletimi ve

2) Bazılarının aktivasyonu, bazılarının inaktivasyonu ile sonuçlanan çok sayıda hücrel proteinin parçalanması.

Serin proteaz ailesi başlatma sürecinde rol alırken sistein proteaz ailesi cellat işlevinde bulunur (48). Anayol proteaz dizisini (kaskad) “Kaspazlar (Caspases)” denilen tek bir sistein proteaz ailesi oluşturur (37). Bu yol Bcl-2 ailesi ve IAP ailesi gibi hücre ölüm karşıtı proteinler tarafından ters yönde etkilenir. İnsan ve farede ondört kaspaz belirlenmiştir. Bunların 11’i insanda bulunmaktadır. Kaspazlar prekürsör (inaktif) zimojen olarak üretilir. Katalitik (p10 ve p20 alt üniteleri) bölge ve N-ucunda bağlanma bölgesi (prodomain) vardır. Aktive olmaları için protealikle C-ucundaki aspartik asit kalıntılarının ayrılması gerekir. Sıklıkla bağlanma bölgesinin uzaklaşması ile katalitik bölge iki alt üniteye ayrılır. Ayrılan büyük ve küçük alt üniteler katalitik ünite oluşturmak üzere bir araya gelir. Aktif kaspaz iki p10 ve iki p20 alt ünitesi içeren ve iki aktif bölgesi olan bir heterotetramerdir. Aktif bölge sistein ve histidin uçları büyük bir alt ünite, substrattaki aspartatlara bağlanarak parçalanmayı oluşturan arginin uçları ise küçük alt ünite de bulunur. Kaspazlar aspartat bölgelerinden substratlarını parçaladığı ve kendileri de aspartat bölgelerinin parçalanmasıyla aktive olduklarından proteolitik bir şelale başlatma potansiyelleri vardır. Yapı ve işlevlerine göre 3 grupta toplanırlar (49).

1. Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: Kaspaz-1, Kaspaz-4, Kaspaz-5, Kaspaz-11, Kaspaz-12, Kaspaz-13 ve Kaspaz-14. Fakat Kaspaz-1 ve -4 apoptozda da rol oynar;
2. Çeşitli hücrel proteinleri parçalayan ve küçük bir bağlanma bölgesi olan cellat kaspazlar: Kaspaz-3, -6, ve -7’dir. Bunlara Sınıf II ya da sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar da denilir;
3. Sinyal iletiminde yer alan ve cellat kaspazları aktive eden aktivasyon kaspazlar: Kaspaz-2, Kaspaz-8 (FLICE/MACH), Kaspaz-9 ve Kaspaz-10. Sınıf I ya da başlatıcı (initiatör) kaspazlar denilen bu kaspazların uzun bir bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler CARD ve DED olarak adlandırılırlar. Bu uçlara bağlanacak özel moleküller yoluyla aktive olurlar. Kaspaz-2 ve -9’da CARD bağlanma bölgesi bulunurken, Kaspaz-8 ve -10’da DED bağlanma bölgesi vardır. Kaspaz-2’deki CARD aktivasyonu için homodimerizasyon gerekir iken Kaspaz-9’daki CARD Apaf-1 ile etkileşir (50). Sitokrom c ve dATP ile oligomerize olan Apaf-1’in inaktif Kaspaz-9 ile etkileşimi Kaspaz-9’da otoaktivasyon etkisi yapar. Kaspaz-8’deki DED

bölgesi adaptör proteinlerin DED bölgeleri ile etkileşerek aktive olur ve kaspaz aktivasyon dizisini başlatır (37, 49).

Bu proteazlar apoptoz süreci için önemli görünmektedir. Bu proteazları bloke eden peptitler apoptozu durdurabilmektedir (47). Proteazların hücre ölümünde iki rolü bulunmaktadır:

- 3) Özel hücre bölümlerinde oluşan ölüm sinyallerinin iletimi ve
- 4) Bazılarının aktivasyonu, bazılarının inaktivasyonu ile sonuçlanan çok sayıda hücre proteinin parçalanması.

Serin proteaz ailesi başlatma sürecinde rol alırken sistein proteaz ailesi cellat işlevinde bulunur (48).

### **Apoptozu Belirleme Yöntemleri**

Şekilsel özellikler, apoptozun değerlendirilmesinde en güvenilir yöntemlerden biridir. Ancak değişikliklerin oldukça kısa sürede ortaya çıkması ve tek tek hücrelerde görülmesi yetersiz kalmasına neden olabildiğinden başka belirleme yöntemleri geliştirilmiştir (53, 26). Bunların içinde en sık kullanılan DNA agaroz jel elektroforezidir. DNA'nın 180-200 baz çiftinin katları parçalara ayrılmasından ötürü merdiven örneği gösterir. Apoptotik hücrelerin boyutlarının küçülmesi ve azalmış DNA içeriği nedeniyle akım hücre ölçerler ile (Flow cytometry) hipodiploid (sub-G1=A0) pik gözlenmesi apoptozun değerlendirilmesini sağlayan bir diğer yöntemdir. Ayrıca parafin kesitlerde terminal deoksitransferaz yoluyla bio-dUTP "nick-end" işaretleme ve "in situ end" işaretleme yöntemleri geliştirilmiştir. İlkinde terminal transferaz, ikincisinde DNA polimeraz DNA zincir kırıklarında biotinlenen nükleotidlere girer ve işaretlenmiş DNA immunohistokimyasal olarak gösterilir. Ancak nekrozda da DNA zincir kırıkları görülebildiğinden sonuçların yorumlanmasında dikkatli olmak gerekir (28).

Hücre içi ATP düzeyi de hücre ölüm şeklinin belirlenmesinde önemlidir. Apoptoz ATP'ye bağımlı iken nekroz değildir. Bazı ölüm uyarıları ATP varlığında apoptozu uyarır, ATPaz ise nekroza neden olur. Kaspaz aktivasyonunun işlevsel akışında sitoplazmik apoptotik etkileycilerin çekirdek içine aktif taşınması ATP'ye bağlıdır. Ancak hangi basamağın ATP'ye bağlı olduğunun belirlenmesi gerekmektedir (54).

### **B) BCL-2 PROTEİNİ VE AİLESİ**

C. elegans'taki benzeri Ced-9 olan Bcl-2 değişik uyarılarla oluşan apoptozu baskılayabilmektedir (47). İlk kez 1985'te B hücreli lenfomada t(14;18) kromozomal

translokasyonunda keşfedildiği için Bcl-2 adı verilmiş olmasına rağmen insanlarda görülen kanserlerin yarısında anormal yüksek düzeylerde ve/veya hatalı Bcl-2 proteini yapımı vardır. İnsanda en az 17 Bcl-2 ailesi üyesi vardır. Bcl-2 ailesi proteinler birkaç  $\alpha$ -heliks yumağını içeren benzer protein yapısını paylaşır. Bunlar 4'e kadar numaralanan BH bölgesi olarak adlandırılır. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve işlevsel durumlarına göre 3 grup altında sınıflandırılırlar (51, 52):

- 1) Bcl-2 alt grubu Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır. Proteinin C-ucundan zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri dış zarına yerleşirler;
- 2) Bax alt grubu Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler ve hepsi pro-apoptotiktir. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik göstermeleri en azından kısmen hücre içi zarlarda (mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı) kanallar oluşturma potansiyelleri olabileceğini düşündürür. Bax difteri toksininin yapısal olarak tam benzeridir. Bu toksin, endozomal/lizozomal zarlarda mRNA çevirimi (translokasyon) baskılayıcı adenizin 5'-difosfat ribozile edici polipeptid A alt ünitesinin sitoplazmaya geçmesini sağlayacak büyüklükte kanallar oluşturarak hücreyi öldürür;
- 3) Bik alt grubu proapoptotik Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunlar yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler olarak da adlandırılırlar. Belirgin özellikle heterodimerler oluşturulmaları ve böylece eşlerinin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamalarıdır.

Bcl-2 işlevleri en azından kısmen protein-protein etkileşimi şeklindedir. Birbirlerine BH3 bölgelerinden bağlanarak dimerize olurlar, homo ve heterodimerler oluştururlar. Bax, Bcl-2 ile heterodimerize ve kendisi ile homodimerize olur. Bax hücrede aşırı yapıldığında apoptotik ölüm artar iken Bcl-2 aşırı yapıldığında Bax ile heterodimerize olur ve apoptotik ölüm baskılanır. p53 aktive olduğunda Bax yapımını uyarır. Bax proteini de mitokondri de yerleşmiştir. Bu durumda antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin apoptotik Bcl-2 proteinlerine oranı azalır. Mitokondride Bax miktarının artması ile Bax-Bax homodimeri oluşur. Bu durum, mitokondride por oluşturarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı ile Apaf-1 aktivasyonuna neden olur (44). Bcl-XL, Bcl-2'ye benzer, apoptozu baskılar. Bak, Bcl-2 ailesi üyesidir ve işlevsel olarak Bax'a benzer, Bcl-2 ve Bcl-XL ile etkileşerek onların aktivitesine karşı koyar.

Bcl-2 dağılımı hücre tipine bağlı olarak değişen bir hücre içi zar proteinidir. Bcl-2'nin en fazla yerleştiği yerler mitokondri, düz endoplazmik retikulum (ER) ve çekirdek



çevresindeki zardır. Mitokondri dış zarı, ER ve çekirdek zarı reaktif oksijen türlerinin yapıldığı yerlerdir.

Bcl-2 her hücre ölümünü önlemez. Timositlerin negatif seçiminde etkisi yoktur. Sitotoksik T hücreye bağlı apoptozu bazen önleyebilmesi sonuçların doza bağlı olabileceğini düşündürür. Ancak Bcl-2'nin (1) Hematopoetik, lenfoid ve fibroblastik hücrelerde büyüme kaybı; (2) nöronlarda nörotropik faktörlerin olmaması; (3) ultraviyole ve  $\gamma$ -radyasyon (4) ısı-şoku (heat-shock); (5) bazı sitotoksik lenfokin tipleri (TNF); (6) kalsiyum iyonoforları; (7) bazı virus tipleri; (8) L-glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterler ve (9) serbest radikal yapımını uyaran ajanlar ile oluşan hücre ölümlerini engellediği gösterilmiştir. Çok farklı uyarılar ve hücre içi yollardan oluşan apoptozu baskılayabilmesi Bcl-2'nin bu yolların birbirine yaklaşmasından sonra işlev gördüğünü düşündürmektedir. Bcl-2'nin koruyucu işlevleri (1) hücre ölüm durdurucusu olarak işlev görebilmesi için gereken eşleşme proteinlerinin yokluğunda; (2) Bcl-2 proteinini inhibe eden proteinlerin yüksek düzeyde bulunması halinde ve (3) Bcl-2 proteinin işlevlerini bozan çeviri sonrası (post-translational) değişikliklerin uyarılması durumunda yetersizleşir (51).

### C) C-JUN-NH<sub>2</sub>-TERMİNAL KİNAZLAR

c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinazlar (JNKler) MAPK ailesine ait enzimlerdir. JNK ilk defa Kyriakis ve ark. tarafından tanımlanmış ve rodent karaciğerinde sikloheksimid maruziyetine bağlı olarak aktive olan protein kinaz olarak purifiye edilmiştir (55).

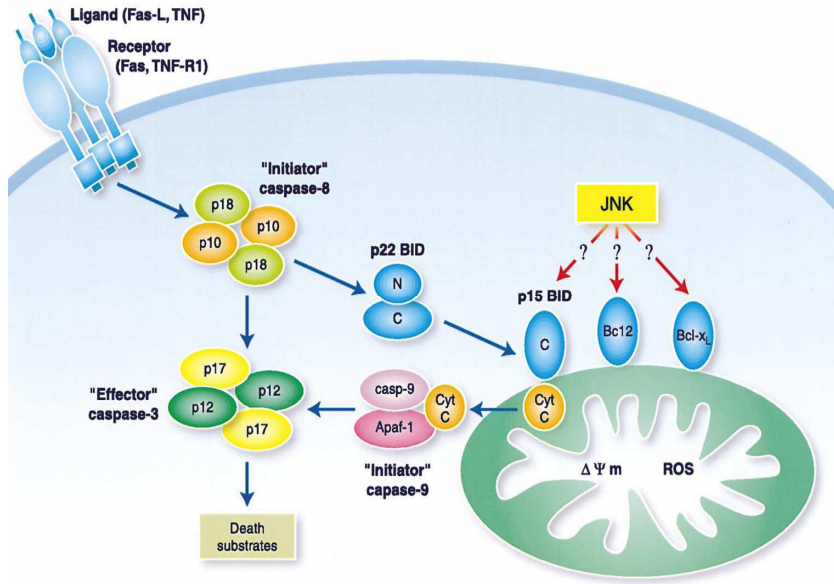
JNK protein kinazlar üç gen tarafından kodlanırlar. *Jnk1* ve *Jnk2* genleri pek çok hücrede bolca eksprese edilirken *Jnk3* beyin, kalp ve testis olmak üzere daha sınırlı oranda eksprese edilir. Bu genler alternatif olarak 'splicing' yaparak on adet JNK izoformu oluştururlar (56). Bu üç genin kodladığı transkripsiyon ürünlerinden 46 kDa ve 55 kDa ağırlığında proteinler kodlanır.

JNKler, üst yolaktaki enzimlerinin aracılığı ile Thr183 ve Thy185 amino asitlerinin ikili fosforilasyonu sonucunda aktive edilir. JNK protein kinazları, Thr ve Tyr'in MKK4 ve MKK7 aracılığı ile fosforillenmesi sonucunda aktive kazanırlar (57). Aktive olan JNKler kendisine ait çeşitli hedef substratları ki bunların arasında pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri bulunmaktadır (58-61). JNK'nin inaktivitesi Ser fosfotazlar, Tyr fosfotazlar ve ikili spesifik fosfotazları içeren bir grup fosfotazlar aracılığıyla olur (62).

JNKler çeşitli stres koşullarında aktive olabilirler (63). JNK yolağı apoptoz gibi çeşitli fizyolojik süreçlerle ilişkili görülmektedir (64- 66). JNKler apoptotik cevaba hem hücre ölümünü destekleyen genlerin transkripsiyonu indükleyerek hem de mitokondrial

apoptotik yolu düzenleyerek katkıda bulunur (57). Çeşitli stress faktörlerinin arasında UV'nin, JNKleri aktive eden bir ajan olduğu bilinmektedir (63, 67).

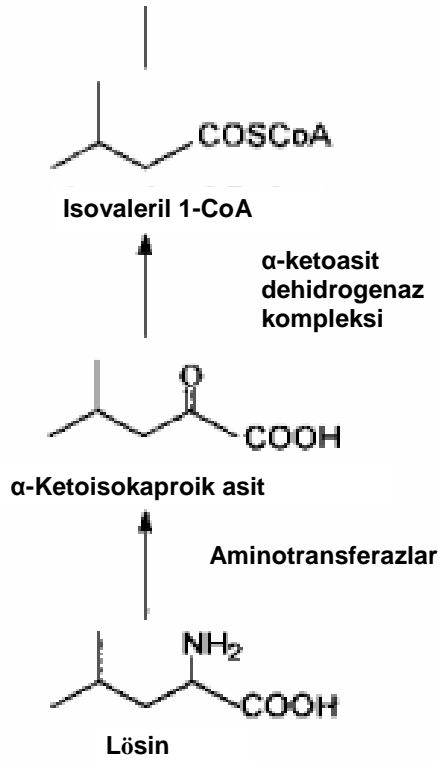
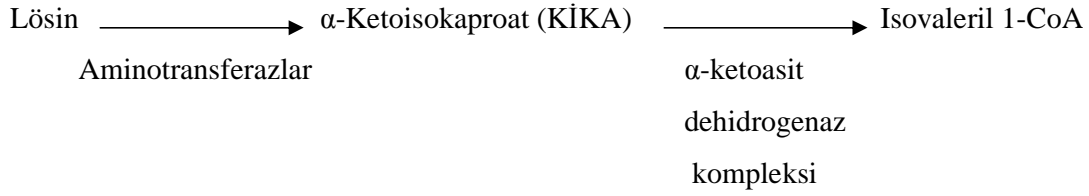
Bcl-2'nin fosforilasyonunun Bcl-2'nin hücre ölümünü baskılayıcı etkisini azalttığına dair yayınlar mevcuttur (59-61). Ancak bu veriler fosforilasyon sonrasında Bcl-2'nin anti-apoptotik etkisinin arttığına dair yayınlarla zıtlık göstermektedir (9, 11, 68). Fosforilasyon sonrasında stabilize olduğu düşünülen Bcl-2'nin ubiquitin aracılı degradasyondan korunduğu düşünülmektedir (69, 70). Bcl-2'nin fosforile olması sonrasında pro-apoptotik mi yoksa anti-apoptik mi davranış gösterdiği tam olarak açık değildir.



Resim-3- Bcl-2 ve JNK'in apoptoz yolları üzerine olan olası etkileşimi (Davis RJ. Cell 103:239-252, 2000.)

#### D) ALFA-İSOKAPROİK ASİT

Akçaağaç şurubu hastalığı, otozomal resesif olarak kalıtım gösteren, dallı zincirli alfa ketoasit dehidrojenaz enzim kompleksinin eksikliğine bağlı lösin, izölösin, valin ve bunların ketoasitlerinin vücut doku ve sıvılarında birikerek toksik etki gösterdiği metabolik bir hastalıktır. Tanı plazma lösin, izölösin, valin, alloizölösin düzeylerinin yükseldiği ve alanin düzeyinin azaldığı gösterilerek kesinleştirilir. İdrarda da lösin, izölösin, valin ve bu aminoasitlerin ketoasitleri artmış olarak saptanır. Kalıcı gelişimsel, kognitif ve nörolojik hasarı önlemek amacıyla bu aminoasitlerin ve toksik metabolitlerinin vücuttan uzaklaştırılması gerekir (71).



Artan MSUD metabolitlerinin özellikle de  $\alpha$ -ketoisokaproik asidin hücre kültürü ortamında glial ve nöronal hücrelerde apoptozu indüklediğini gösterilmiştir (14-15). Apoptoz bu hücrelerde hücresel solunumda azalma ile ilişkili görünür iken solunum zinciri fonksiyonunda, erken dönemdeki mitokondriyal membran potansiyelinde ve sitozole sitokrom c salınımında herhangi bir değişiklik saptamamışlardır. Alfa-ketoisokaproik asidin intraserebral enjeksiyonla gelişen sıçan beynine varılması, belirgin olarak nöronal apoptozu tetiklemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda MSUD'daki nörodejenerasyon en azından bir etki mekanizması yolu ile dallı zincirli amino asitlerin birikimine ve  $\alpha$ -keto asit derivelerinin birikimine bağlı olarak sitokrom c bağımsız bir yoldan apoptoz tetiklenmektedir. MSUD metabolitlerine maruziyetten sonra meydana gelen hücresel solunum hasarının tetikleyici mi yoksa apoptotik hücre ölümünün sonucu mu olduğu açık değildir.

## **E) STAUROSPORINE**

Staurosporine (SSP) bir proteaz inhibitörüdür ve pek çok hücre tipinde güçlü bir apoptoz indükleyicisi olarak tanınmıştır. SSP'nin apoptozu indükleme mekanizması tam anlaşılmamakla birlikte genel olarak mitokondrial apoptotik yolağın kritik rol oynadığına inanılmaktadır (16, 17). Ancak Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun SSP'nin öldürücü etkisinden korumada tam olarak etkili olmadığı saptanmıştır (18). Benzer şekilde SSP'nin etki mekanizmasının hem kaspaz-bağımlı hem de –bağımsız yollarla olduğuna dair raporlar yayınlanmıştır (19, 20). SSP ile indüklenen apoptozda hücre tipine göre değişebilen çoklu mekanizmaların varlığı söz konusu olabilir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1) Kullanılan Materyal ve Ayıraçlar

Hücre kültürü plakaları Triple Red firmasından (Thame, İngiltere); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Foetal Calf Serum (FCS), Tripsin-EDTA solusyonu, Penisilin/Streptomisin solusyonu, proteaz inhibitör kokteyli (II), Puromisin, Amniyum persulfat, TEMED SIGMA firmasından (Gillingham, İngiltere); PVDF membranları Milipore Corporation'dan (Bedford, MA, USA); LumiGlo kemiluminesense kit Cell Signalling Technologies'den (NEB, Hitchin, İngiltere); ECL Hyperfilm ve rabbit anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody Amersham Biosciences'dan (Little Chalfont, İngiltere) tedarik edilmiştir. JNK, fosfo-JNK, kırılmış kaspaz-3, kırılmış kaspaz-9, kırılmış PARP, SAPK/JNK test kitleri Cell Signaling Technology (NEB, Hitchin, İngiltere) ve Bcl-2 antikoruna Santa Cruz firmasından (ABD),  $\alpha$ -tubulin ve  $\beta$ -aktin monoklonal antikorları ABCAM firmasından tedarik edildi. JNK'ı inhibe eden peptid, D-JNKI, Qbiogene-Alexis UK (Nottingham, İngiltere), Hoescht33342 boyası Molecular Probes'tan (Eugene, Oregon, ABD), 'Cell Death Kit' Roche Applied Science (İngiltere), LF-106.M UV lambası (230 V-50/60 Hz) ise UVITEC Limited'dan elde edildi.

### 2) Deneylerde Kullanılan Hücre Tipleri ve Hücre Kültür Koşulları:

Bcl-2 proteininin apoptoz yolları üzerindeki etkinliğini in vitro koşullarda araştırmak amacıyla iki hücre dizisi deneylerde kullanılması planlanmıştır. Bunlar:

- 1) Rat1 fibroblast vahşi tip "wild type" (vt)
- 2) Rat1 fibroblast -Bcl-2 (virus aracılığıyla Bcl-2 proteini ile transfekte edilmiş hücreler)

*Bcl-2* geni ile transfekte edilmiş olan Rat1 fibroblast hücreleri Bcl-2 proteininin apoptoza giden yolda etki mekanizmasının ayırt edilmesinde, Rat1 vt hücre dizisi ise apoptoza giden yolda kontrol olarak kullanılmıştır.

Hücrelerin tek katmanlı yapışan hücreler halinde çoğalmasını sağlamak amacıyla %10 FCS ve %1 Penisilin/streptomisin içeren DMEM kullanıldı. Hücreler haftada 2 kere medium değiştirilerek beslendi ve pozitif seleksiyon amacı ile Bcl-2 ile transfekte edilmiş olan Rat1 fibroblastlar Puromisin ile muamele edildi. Deneylerde kullanılmak üzere ekilen hücrelerdeki %0.5 FCS kullanıldı.

### 3) Apoptoz indüksiyonu:

Apoptoz sürecinin başlatılması için farklı etkenler kullanılmıştır. Bunlar :

- 1) UV-B olarak bilinen 312 nm dalga boyunda ışık yayan lamba kullanılmıştır.
- 2) alfa-ketoisokaproik asit (her kullanımdan önce DMEM içinde taze olarak hazırlanıp, 0.22 µm porluk filtre ile sterilize edilerek kullanılmıştır.)
- 3) Staurosporine (DMSO içinde 1 mM'lık stok konsantrasyonları -80 °C'de saklanmıştır.)

### 4) MTT Yaşam Tayin Metodu (MTT Viability Assay)

Renk değişimi prensibine dayanan MTT metodu, metabolik olarak aktif olan hücrelerde bulunan mitokondriyal bir enzim olan suksinat dehidrojenazın suda çözünebilir MTT bileşimini (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-phenyltetrazolium bromide) (berrak sarı bir solüsyon) suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazon reaksiyon bileşimine dönüşümünü temelinde dayanır ve canlı hücre metabolizmasını gösterir.

MTT stok solüsyonu 5 mg/ml steril PBS konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlandı.

MTT maddesi ışığa duyarlı olduğu için aluminium folyoya sarılarak, + 4 °C de saklandı.

MTT lizis tamponu %20 (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS) distile suda çözülüp, aynı hacimde dimethylfluoride (DMF) in eklenmesi ile hazırlandı.

Hücreler 100 mikroL % 0.5 fetal sıgır serum içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Uygun miktarda stres yapıcı etkenle muamele edildikten sonra 25 mikroL MTT stok solüsyon her kuyucuğa eklenerek, 2 saat inkübasyona devam edildi. Bu sürenin sonunda 100 mikroL MTT lizis tamponu her kuyucuğa eklenerek, 2 saatlik inkübasyon süresinde oluşmuş olan formazon bileşiminin optik dansitesi okunabilecek bir bileşiğe dönüşmesi sağlandı. Lizisin tam sağlanması için bir gece inkübatörde bırakılarak, ertesi gün 562 nm' deki optik dansite (absorbans) elde edildi (OPTImax tunable microplate reader, Molecular Devices, UK). Kör olarak MTT ile muamele edilmemiş ancak lize edilmiş hücrelerden elde edilen absorbanslar kullanıldı.

Hücre yaşam yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{Yaşayan hücre \%} = \frac{(\text{tedavi verilen hücrelerin OD-lizis kontrollerin OD})}{(\text{sağlıklı hücrelerin OD-lizis kontrollerin OD})} \times 100$$

### 5) Hücre lizatlarının hazırlanması:

Stres etkenine farklı sürelerde maruz bırakılan hücrelerin çeşitli inkübasyon zaman aralıklarından sonra mediumları yüzen hücreleri kaybetmemek amacıyla tüplerde toplandı ve santrifüj edildi. Geri kalan hücreler buz soğukluğunda steril PBS ile yıkanarak, aspire edildi. Daha sonra hücreler buz üzerinde plakadan kazınarak, 10 mL soğuk PBS içinde toplanıp santrifüj tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin tüpün dibinde toplanması sağlandı. Supernatan atılarak dipte kalan pelet uygun miktarda Triton lizis tamponu ile (TLB) (20 mM sodium phosphate, 137 mM NaCl, 25 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate, 2mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 510 glycerol ve %1 Triton X-100) karıştırıldı. Bu safhada mediumdan elde edilen hücre presipitatu ile karıştırıldı. Her iki hücre peletleri de lize edilip vortekslelendikten sonra 1.5 mL küçük santrifüj tüplerine aktarılarak her bir tüpe 1 mM sodium vanadate ve proteaz inhibitörleri eklenerek buz üzerinde 20 dakika aralıklı vortekslemek suretiyle bekletildi. Bu surenin sonunda tüpler +4 °C'de 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Protein içeriğinin olduğu süpernatant başka bir tüpe aktararak kullanılana kadar -80 °C'de saklandı.

### 6) Protein Tayin Metodu:

Hücre lizatlarının elde edilmesinden sonra protein içeriklerinin belirlenmesi önemli bir basamaktır. Ticari olarak satılan PIERCE BCA protein kiti (BCA Protein Assay Kit, ürün no:23225, PIERCE, ABD) alkali ortamda proteinlerce indirgenen bakır iyonları (biüret reaksiyonu) ile bicinchoninic asidin şelasyon yapması prensibine dayanır. Reaksiyon sonucunda oluşan mor renkli bileşiğin 562 nm'de meydana getirdiği optik dansite, solüsyondaki protein miktarıyla doğru orantılıdır.

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonu, miktarı bilinen protein standartları (sığır serum albüminin 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 ve 2 mikrog/mL konsantrasyonları) yardımı ile hesaplandı. Doksan altı kuyucuklu plakaların kuyucuklarına 10 mikrogL protein standartları ve hücre lizatları pipetlendi. BCA ayırıcının çalışma solüsyonundan 100 mikrogL (Solüsyon A:solüsyon B=50:1) her kuyucuğun üzerine eklendi. Kör değeri elde etmek için hücre lizatında kullanılan lizis tamponu numuneler gibi çalışıldı. On beş dakika 37 °C'de inkübasyonun ardından 562 nm'de her kuyucuğa ait optik dansite mikropLaka okuyucu yardımı ile elde edildi. Lizatların konsantrasyonu protein standartlarıyla oluşturulan eğri grafiği kullanılarak hesaplandı.

## 7) Western Blotting Tekniği ile Protein Belirlenmesi:

Hücre lizatlarındaki proteinlerin, moleküler büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan bir metoddur.

### Örneklerin hazırlanması:

BCA metodu yardımı ile protein konsantrasyonları hesaplanan hücre lizatları, eşdeğer protein konsantrasyonuna sahip olacak şekilde hücre lizis tamponu kullanılarak hazırlandı. 5X örnek tamponu ( $\beta$ -mercaptoethanol, glycerol, SDS, bromophenol-blue ve Tris-HCl, pH 6.8) her örnek içine solüsyon içindeki son konsantrasyonu 1X olacak şekilde pipetlendi. Örnek tamponundaki SDS proteinleri sararak onlara negatif yük kazandırma kabiliyetine sahiptir. Bromophenol-blue boyası ise proteinlerin blot üzerinde görünmesini sağlamaktadır. Örnek tamponunun eklenmesinin ardından, numuneler 95 °C'de jele yükleme öncesinde 3 dakika ısıtılarak, protein interaksiyonlarının kırılması ve proteinlerin denature edilmesi sağlandı.

### Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Poliakrilamid jeller hedef proteinin molekül büyüklüğüne göre %10 ya da %13 olacak şekilde hazırlandı. Her %10'luk "resolving" jel (10 mL'lik) 3.3 mL %30 acrylamide, 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 mikroL %10'luk SDS ve 4.1 mL deiyonize sudan oluşmaktadır. Jel içeriği karıştırılır ve 20 dakika aralıklı vorteklemelerle gaz içeriğinin çıkması için beklenir. TEMED'den 15 mikroL ve %10'luk ammonium persulfate (APS)'den 50 mikroL daha önce hazırlanmış olan karışıma eklenerek, polimerizasyon işlemleri başlatıldı. Karışım karıştırılarak, hemen daha önce hazırlanmış olan jel hazırlama plakalarının arasına döküldü. Polimerizasyonu saptamak ve hava giriş çıkışını engellemek için jelin üst kısmı deiyonize su ile kaplandı. Jelin polimerizasyonu için beklenen 30 dakikanın ardından, jelin üzerini kaplayan su döküldü ve "stacking" jel bir önceki jelin üzerinde katman oluşturacak şekilde jel plakalarının arasına döküldü. Tarak yardımı ile örneklerin pipetleneceği kuyucuklar oluşturularak, 2. jelinde polimerize olması için 30 dakika beklendi. Daha sonra tarak çıkarıldı. Örneklerin yüklendiği bu jel, diğerinden farklı olarak sadece 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) içermektedir.

Jeller elektofrez tanklarına yerleştirilerek, "running buffer" (%10 10XSDS, %90 distile su) içinde numunelerin yüklenmesinden önce elektrik akımına (200 V) 10 dakika boyunca maruz bırakıldı (Pre-run).

"Pre-run" dan sonra, tankın içine "running buffer" takviyesi yapılarak, önce 10-20 mikroL hacminde Rainbow marker ilk kuyucuğa pipetlendi. Bunun ardından numuneler



dikkatlice jelin kuyucuklarına pipetlendi. Jeldeki proteinler 200V'luk akimin altında yaklaşık bir saat kadar (bromophenol-blue boyasının jelde görünmez olana kadar) yürütüldü.

#### Jel transferi ve immunoblotting:

Proteinlerin antikor ile saptanmasından önce, jeldeki protein içeriği polyvinyil difluoride immobilon-P (PVDF) membrana aktarılmalıdır.

Elektroforez tamamlandıktan sonra , jeller dikkatlice jel plakalarından ayrılır ve soğuk transfer tamponunda (5.82 g Trizma-bazı, 2.93 g glisin, 800 mL distile su icinde çözülür, üzerine yavaşça köpük oluşturmada 3.75 mL %10'luk SDS eklenir, ve son olarak 200 mL methanol ile karıştırılır) 20 dakika bekletilir. PVDF membranlar metanol içinde (30 saniye) aktive edilir, su ile yıkanır ve transfer tamponu içinde kullanılana kadar bırakılır.

Transfer "sandwich"i pozitif yüklü olacak plakada yapılmaya başlanır. Önce ilk katman olarak yine transfer tamponu içinde ıslatılmış kalın filtre süngerleri kullanılır. Bunun üzerine PVDF membran ve daha sonra jel ve en son olarak yine filtre sünger konarak, sandwich tamamlanır. Her yeni katmanın yerleştirilmesi sırasında hava kabarcığınının kalmamasına özellikle dikkat edilmelidir. Negatif yüklü plaka katmanının üzerine yerleştirilir ve proteinlerin jelden PVDF membrana transferi 1 saat kadar 40V akim altında gerçekleştirilir. Bu yöntem ile jel içinde SDS ile kaplanmış negatif yüklü proteinlerin elektrik akimi altında pozitif alana doğru yani PVDF membrana doğru ilerlemesi sağlanmaktadır.

Transfer tamamlandıktan sonra, membranlar ayrılır, kurutulur ve methanol ile tekrar aktive edilir ve su ile yıkanır. Daha sonra membranlar 1 saat boyunca oda sıcaklığında "blocking" solüsyonu içinde (% 5'lik süt tozu, Tween içeren 1X Triton tamponlu içinde hazırlanır) inkübe edilir. Bu basamak ile antikorun özgül olmayan bağlanma noktaları bloke edilir. Sürenin sonunda membranlar yıkanmadan, birinci antikor ile membranlar muamele edilir. Membranlar, 5 mL antikor tamponu (% 0.5 ya da %5 süt tozu içeren 1X triton tampon solüsyonu) içinde uygun dilüsyonda hazırlanmış olan birinci antikor ile +4 °C' de 1 gece boyunca inkübe edilir.

Ertesi gün, membranlar 3 er kere 10 dakikalık sürelerle TBS-T yıkama tamponu ile yıkanır. Daha sonra uygun ikinci antikor ile membranlar muamele edilir. İkinci antikor % 5 süt tozu/1XTBS solüsyonu içinde uygun konsantrasyonda hazırlanır. Membran başına 10

mL olacak şekilde 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Sürenin sonunda tekrar 3'er kere 10'ar dakikalık sürelerle yıkama yapılır.

En sonunda membranlar saydam naylon folyo üzerine yerleştirilir, 1.0 mL LumiGlo Çalışma ayıracı (ayıracı1:ayıracı2=1:1) membranların üzerine pipetlenir. Daha sonra naylon folyonun membranlar üzerine kapatılması ile karışım uzaklaştırılır. Membranların üzerinden bir pipet yuvarlanarak folyonun kenarları kapatılır. Daha sonra radyografi filmi (Hyperfilm ECL) X-Ray kaseti içinde uygun süre membranlara maruz bırakılır ve karanlık ortamda film yıkanır. İkinci antikorun sağlamış olduğu kemiluminisans sayesinde film üzerinde ilgilenilen proteinlere ait bandlar görüntülenmiş olur.

### **8) JNK Aktivitesinin İn Vitro Saptanması:**

JNK aktivitesi, JNK enzimine özgü bir peptid kullanılarak tespit edilmiştir (Cell - Signaling Technology, İngiltere). Kısaca, hücre lizatları (100 µg protein) olarak GST-c-Jun ile füzyon proteini içeren boncuklar ile +4 °C'de bir gece (16 saat) inkübe edildi. Yıkamadan sonra, boncuklar, ATP ve kinaz içeren tampon ile tekrar süspansiyon edilir ve süspansiyon fosforillenme sürecinin oluşabilmesi için 30 °C'de 30 dk süre ile bir karıştırıcı üzerinde inkübe edilir. Reaksiyon PAGE örnek yükleme tamponu eklenerek inhibe edilir. Proteinlerin %10'luk poliakrilamid jelde elektroforez ile ayrımı sağlanır ve PVDF membranlara transfer edilir. Daha sonra fosfo-c-Jun (Ser63) primer antikoruna bir gece +4 °C'de inkübe edilir. Son olarak, blotlar kemiluminesans ile görüntülenebilir hale getirilir ve dansitometrik analizi yapılarak değerlendirilir.

### **9) Sitoplazmik Histon-ilişkili DNA Parçalarının Saptanması**

Sitoplazmik histon-ilişkili DNA fragmanları kantitatif sandwich enzim immünoassay prensibi ile saptanmıştır. Bunun için hem histonlara hem de DNA'ya karşı üretilmiş fare monoklonal antikorları kullanılmıştır. Böylece hücre lizatı içindeki sitoplazmik fraksiyona ait mono- ve oligo-nükleozomlar spesifik olarak saptanabilmiştir (Cell Death Detection ELISA PLUS kit, Roche Diagnostics, Lewes, E. Sussex, İngiltere). Son basamakta meydana gelen renk değişimi mikropłaka okuyucu yardımı ile 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (SpectraMax Gemini, Molecular Devices, CA, ABD). Örneklerin ikili ölçümün ortalaması alınıp, arka plan değerleri çıkarıldıktan sonra değerlendirilmiştir.

### **10) Tripan Mavisi Ölü Hücre Dışlama Testi**

Hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra 1:1 oranda (10 µl +10µl) Tripan mavisi ile karıştırıldı. Üç dakikalık bekleme süresinden sonra hemositometre aracılığı ile mavi boyanan ve boyanmayan hücreler sayıldı. Mavi olarak boyanan hücreler membran bütünlüğü kaybolmuş olan hücreleri göstermektedir. Ancak 10 dakikayı geçen Tripan mavisi uygulamaları yanlış pozitif cevaba neden olacağı için değerlendirilmedi.

### **11) Nulear Piknozun Hoesch33342 Boyaması ile Saptanması**

Hücreler 12000 hücre/0.1 mL DMEM 0.5 % FCS içinde 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Sekiz saatlik inkübasyon sonrasında, hücreler UV-B'ye maruz bırakıldı ve 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, Hoescht33342 boyası son konsantrasyonu 40 µg/ml olacak şekilde her kuyucuğa pipetlendi. Daha sonra hücreler % 4'lük paraformaldehit'te 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler PBS ile nazikce yıkandıktan sonra floresans mikroskop yardımı ile görüntülendi Her kuyucuktan 10 alan kullanılarak ortalama 1000 hücre sayıldı.

### **12) İstatistiksel Değerlendirme**

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS (11.1) paket programı kullanıldı ve veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Birbirinden bağımsız gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu belirlemede parametrik olmayan testlerden Mann-Whitney U kullanıldı.

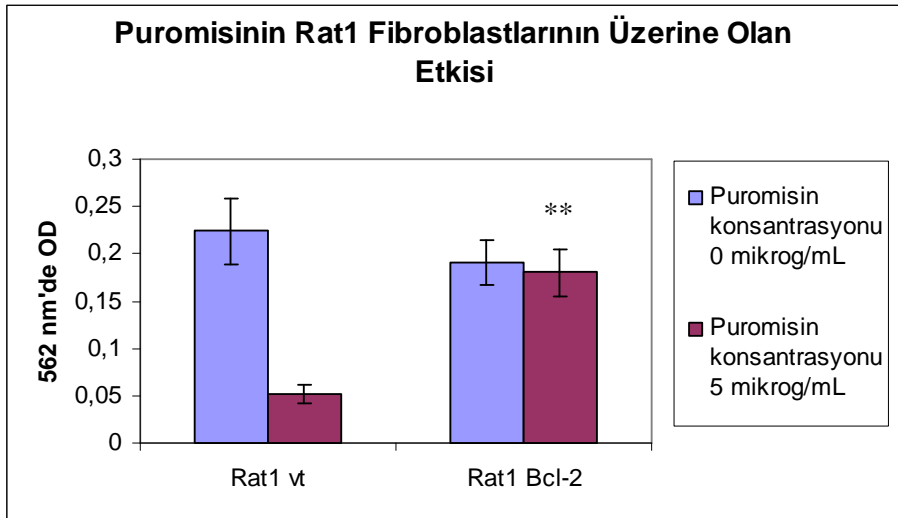
## BULGULAR

### 1. BCL-2 PROTEİNİ AÇISINDAN İKİ HÜCRE TİPİNİN FARKLILIĞININ TESPİT EDİLMESİ

Rat 1 vt hücreler daha önce *Bcl-2* geni ile transfekte edilerek, Bcl-2 proteinini çok daha fazla eksprese eden Rat1 fibroblast hücreleri elde edilmişti. Bu prosedürün etkinliğini doğrulamak amacıyla her iki hücre tipinin Puromisin'e olan duyarlılıkları ve Bcl-2 protein miktarları tespit edildi.

#### 1.1. Puromisin'e Karşı Olan Duyarlılığının Teyit Edilmesi

Puromisin ile muamele edilmiş ve edilmemiş her iki hücre tipine ait MTT metoduna ile elde edilen sonuçlar Şekil-1'de görülmektedir. Buna göre Puromisin eklenmesi sonrasında Rat 1 vt hücrelerinin sadece %20'si canlılıklarını 24 saatlik inkübasyon sonrasında sürdürebilir iken *Bcl-2* geni yanı sıra Puromisin direnç geni taşıyan Rat 1 hücrelerinin % 95'i canlılıklarını korumuşlardır. Işık mikroskobu yardımı ile de hücre ölümü izlenmiş ve vahşi tip Rat 1 fibroblastların nerdeyse tamamının öldüğü gözlemlenmiştir. Rat 1 Bcl-2 tip hücreler düzenli olarak Puromisin ile muamele edilerek, sadece dirençli olan hücrelerin deneylerde kullanılması sağlanmıştır.

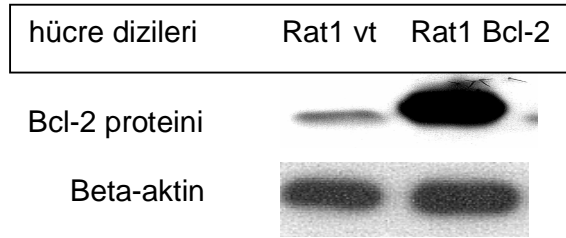


Şekil-1-Rat 1 hücre tiplerinin Puromisin'e olan duyarlılıklarının incelenmesi

\*\*, 5 mikrog/mL Puromisin kullanımı Rat 1 vt hücrelerinin canlılık yüzdesini Rat 1 Bcl-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaltmıştır,  $p < 0.01$ , (n=8).

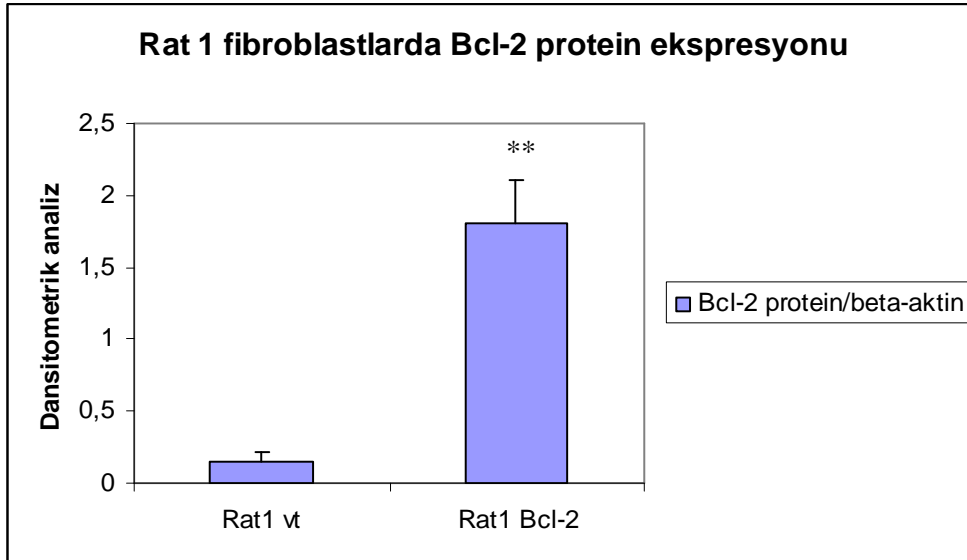
## 1.2. Bcl-2 Proteininin Rat 1 Fibroblast Hücre Lizatlarında Belirlenmesi

Bcl-2 proteininin her iki hücre tipindeki ekspresyonu Western blot analiz yöntemi ile saptanmıştır (Şekil-2). Buna göre her iki hücre tipinde de Bcl-2 proteini bulunmakla birlikte, *Bcl-2* geni ile transfekte edilen hücrelerde çok daha yoğun olarak bulunmaktadır.



Şekil-2- Bcl-2 protein miktarlarının Rat 1 fibroblast hücre lizatlarında gösterilmesi (western blot protein analizi metodu)

Western blot analizinden elde edilen Bcl-2 protein bantlarının dansitometrik olarak yapılan analizi Şekil-3'te görülmektedir. Bcl-2 proteininin miktarı yükleme kontrolü olarak kullanılan  $\beta$ -aktin proteinine göre normalize edilmiştir.

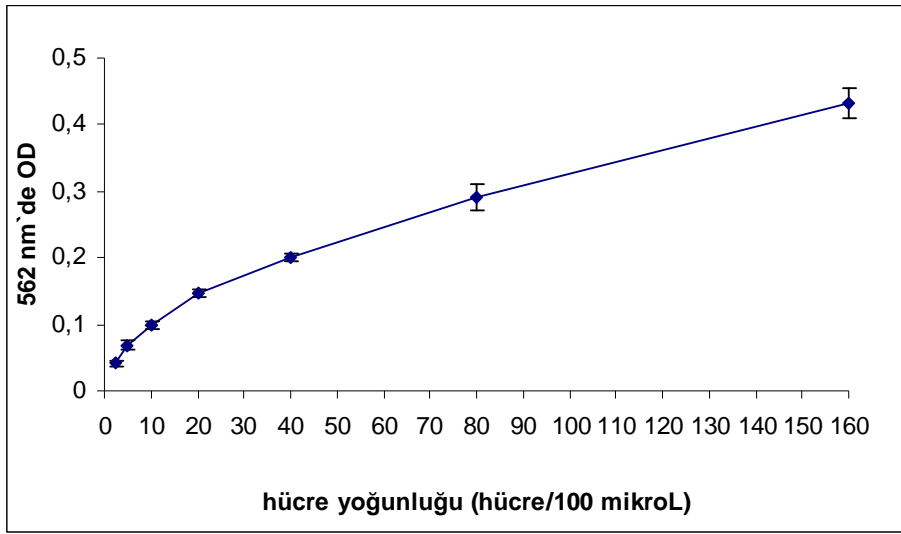


Şekil-3- Rat 1 fibroblastlarına ait Bcl-2 protein bantlarının dansitometrik analizi

\*\**Bcl-2* protein miktarı, Rat1 Bcl-2 hücre dizisinde Rat 1 vt hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır,  $p < 0.01$ , ( $n=3$ ).

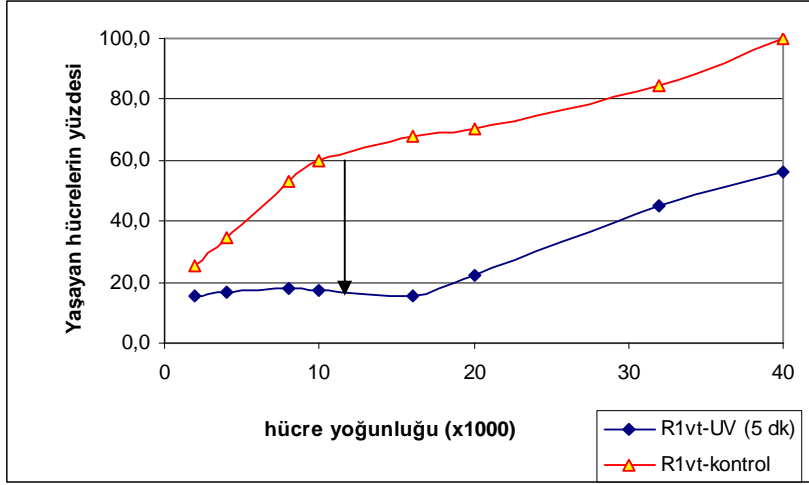
## 2. DENEYLERDE KULLANILMASI UYGUN HÜCRE SAYISININ BELİRLENMESİ

Deneyleerde kullanımı en uygun hücre sayısının belirlenebilmesi için Rat 1 vt hücreler, farklı yoğunluklarda 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve bir gecelik (16 saat) inkübasyon sonrasında MTT metodu yardımı ile yaşayan hücre sayısı saptandı. Elde edilen sonuçlara göre, oluşan formazon bileşiğinin renk şiddeti 20000 hücre/0.1mL üzerindeki yoğunluklarda doğrusallığını kaybetmektedir (Şekil-4).



Şekil-4- Rat 1 vt fibroblastlarının hücre yoğunluğunun belirlenmesi (Grafikteki hücre yoğunluğu x1000 ile ifade edilmektedir) (MTT Metodu) (n=8).

Oluşan renk şiddetinin doğrusallığının korunduğu optimal hücre sayısının belirlenmesi amacı ile Rat 1 vt hücre dizisi 40000 hücre/0.1mL ve altındaki hücre yoğunlukları 5 dakika UV-B irradyasyonuna maruz bırakıldı. Yaşayan hücre yüzdesi MTT deneyi aracılığı ile belirlendi. (Şekil-5). UV-B irradyasyonuna maruz bırakılan ve bırakılmayan hücreler arasında en çok farkın 12000 hücre/0.1mL hücre yoğunluğunda olduğu görülerek, daha sonraki deneylerde bu yoğunluğun kullanılmasına karar verildi.

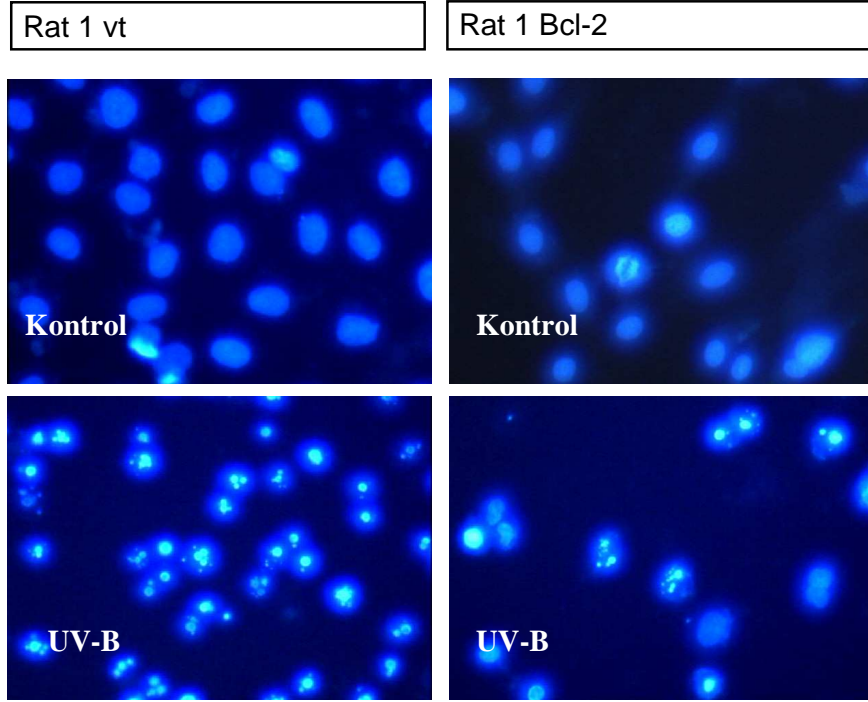


Şekil-5- Kontrol ve UV ile muamele edilmiş Rat 1 vt fibroblastlar arasındaki farkın en iyi ayırt edilebileceği hücre yoğunluğunun belirlenmesi (MTT Metodu) (n=8).

### 3. BCL-2'NİN UV-B İRRADYASYONU İLE İNDÜKLENEN APOPTOZ YOLAKLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN VE JNK ENZİMİ İLE OLAN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

#### 3.1. UV-B İrradyasyonunun Doza Bağlı Etkisinin Saptanması

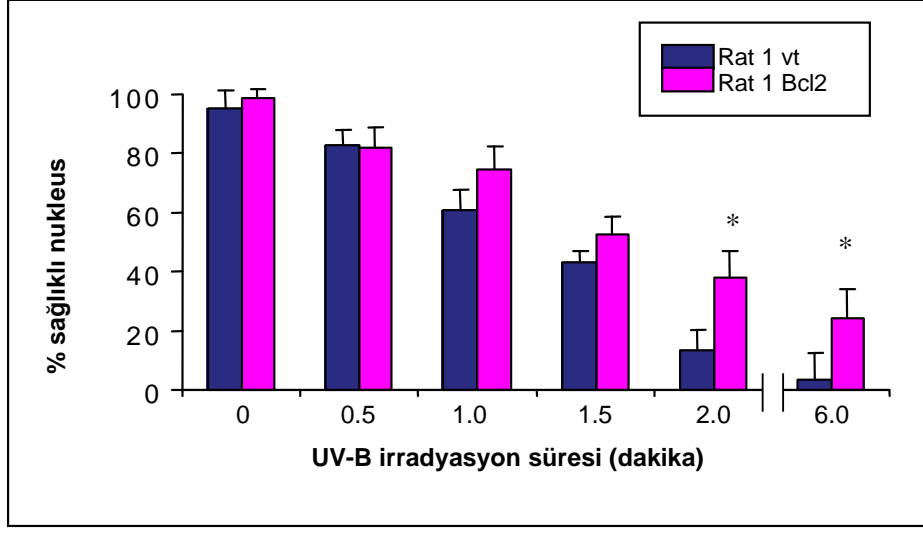
UV-B irradyasyonunun her iki fibroblast tipi üzerine olan etkisini incelemek amacıyla öncelikle UV-B dozuna bağlı değişen hücre yaşam grafikleri Hoescht33342 çekirdek boyaması ile elde edildi ile belirlendi. Floresans mikroskobu yardımı ile çekilen resimler Şekil-6'da görülmektedir. Her iki hücre tipinin kontrol hücrelerinde nukleuslar oval ve Hoescht 33342 boyası koyu mavi olarak görülmektedir. UV'ye 6 dakika maruz bırakılan hücrelerin 24 saatlik inkübasyon sonrasındaki nukleuslar piknotik ve fragmante görünümündedir. Rat 1 vt hücre tipinde hiç normal nukleus bulunmaz iken Bcl-2 ile taşıyan hücrelerin bazıları hala normal benzeri bir morfoloji göstermektedir.



Şekil-6- UV-B irradyasyonuna maruz bırakılan Rat 1 vt ve Rat 1 Bcl-2 fibroblastların nuklear morfolojilerinin incelenmesi (Hoescht 33342 nuklear boyanma metodu).

Değişen dozlarda uygulanan UV sonrasında değişen nuklear morfolojiye göre elde edilen veriler Şekil-7’de görülmektedir. Her iki fibroblast tipinin de artan dozdaki UV-B irradyasyonundan etkilendiği azalan sağlıklı nukleus sayısından anlaşılmaktadır. Ancak Bcl-2 proteinini daha fazla bulunduran tip fibroblastlar 1 dakika ve üzerindeki UV-B irradyasyon dozlarına karşı daha fazla direnç göstermektedir.



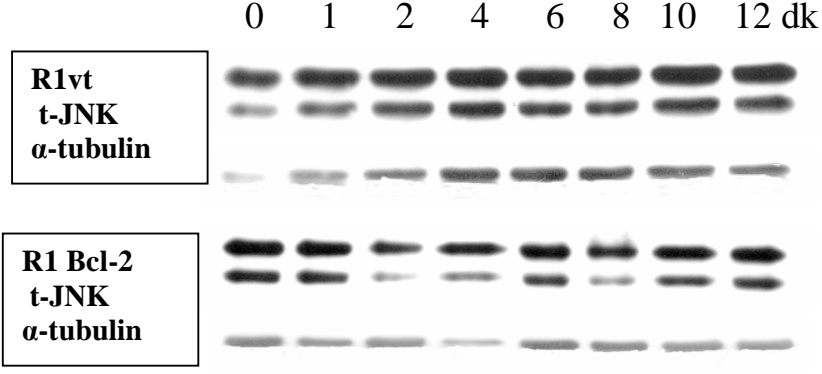


Şekil-7-Artan UV-B dozuna bağlı olarak elde edilen sağlıklı nukleus oranı (Hoescht 33342 nuklear boyama metodu)

\*, Rat1 Bcl-2 hücre dizisinde sağlıklı görünen nukleus yüzdesi aynı tedaviyi alan Rat 1 vt hücrelerindeki ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır,  $p < 0.05$ , (n=3).

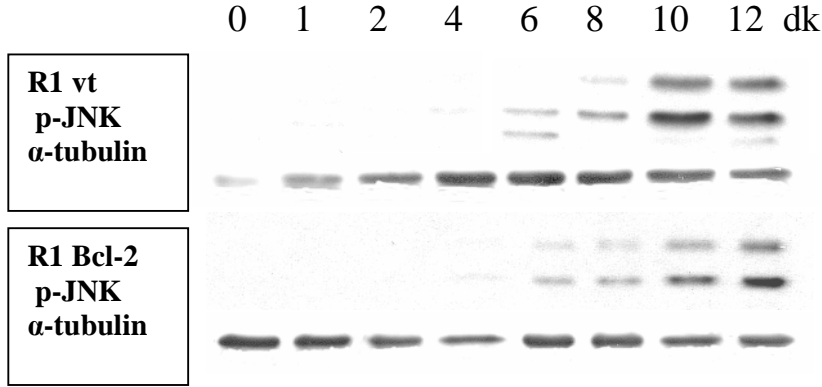
### 3.2. UV-B ırradyasyonunun Doza Bağlı Olarak JNK Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi

UV-B'nin strese bağlı olarak aktive olan JNK enzimi fosforilasyonu üzerine olan etkisini incelemek amacıyla, Rat 1 fibroblastlara artan sürelerle UV-B ırradyasyonu uygulandı. Uygulama süresi de dahil toplam 20 dakika sonra elde edilen hücre lizatlarında total ve fosforile JNK protein değişimi incelendi. Western blot analizi sonrası elde edilen total JNK ve fosforile JNK protein bantları sırasıyla Şekil-8 ve 9'da görülmektedir.



Şekil-8- Rat 1 fibroblast hücrelerinde total JNK'ın farklı UV-B irradyasyonuna göre değişiminin incelenmesi (western blot protein analizi metodu)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 ve 12 dakika arasında değişen UV-B irradyasyon uygulamaları sonrasında hem vt hem Bcl-2'yi daha fazla eksprese eden Rat 1 fibroblastlarda total JNK ekspresyonu açısından önemli bir farklılık saptanmadı.



Şekil-9- Rat 1 fibroblast hücrelerinde fosfo-JNK'ın farklı UV-B irradyasyonuna göre değişiminin incelenmesi (western blot protein analizi metodu)

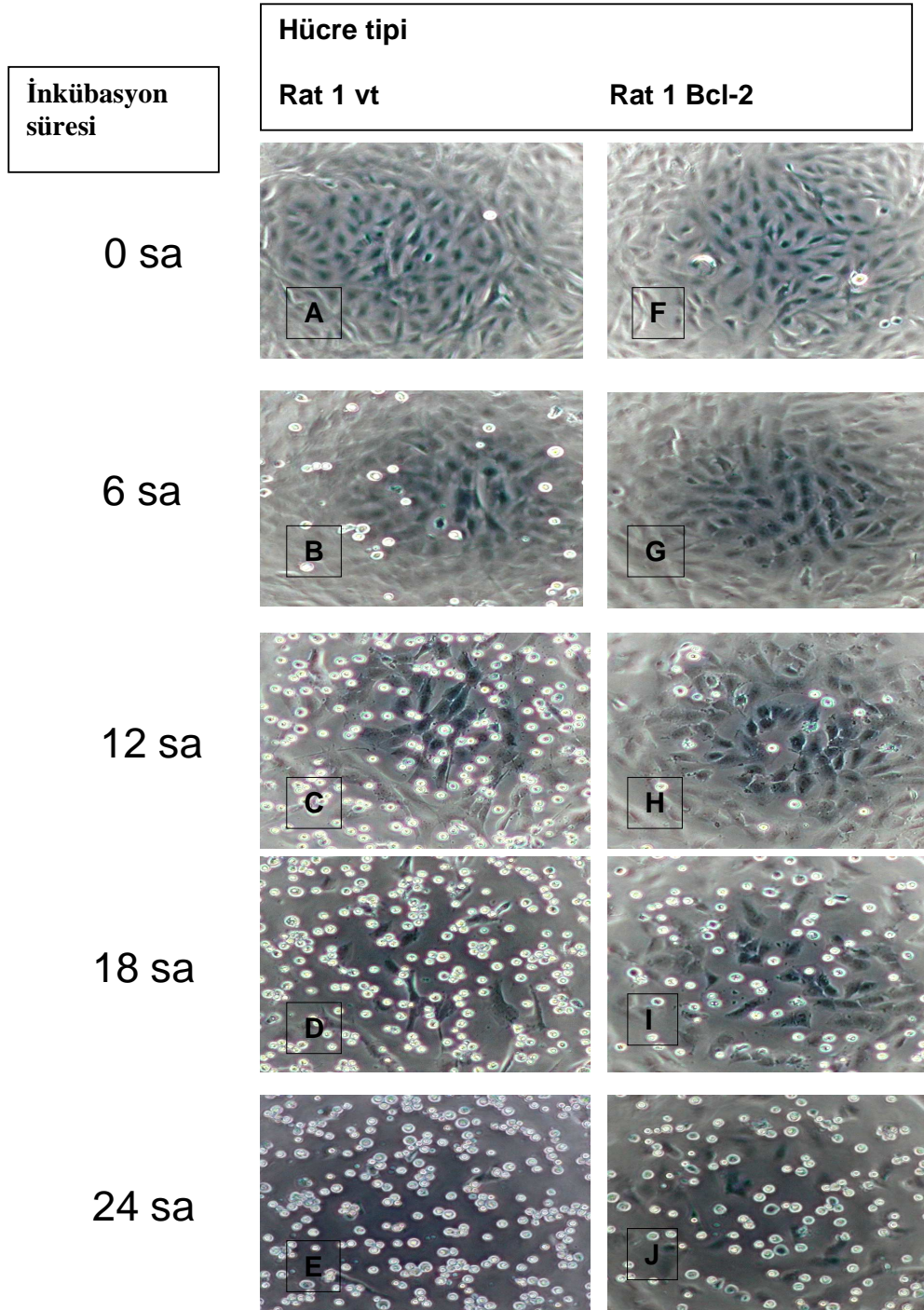
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 1 ve 12 dakika arasında değişen UV-B irradyasyon uygulamaları sonucunda 6 dakikalık irradyasyonun her iki Rat 1 fibroblast hücre dizisinde fosforile JNK ekspresyonunu indüklediği saptanmıştır (Şekil-9) .

Daha önceki deneylerde UV-B süresine bağlı olarak değişen hücre yaşam grafiği çizilmiştir. Buna göre, altı dakikalık UV-B uygulamasından 24 saat inkübasyon sonrasında Rat 1 vt fibroblastların sadece %5'i, Bcl-2'yi daha fazla eksprese eden hücrelerin ise %25'i kadarı canlılıklarını sürdürebilmekte idi (Şekil-7). Elde edilen bu veriler doğrultusunda hücreleri ölüme götüren ve JNK fosforilasyonunu sağlayan altı dakikalık UV-B dozlarının sonraki deneylerde uygulanmasına karar verildi.

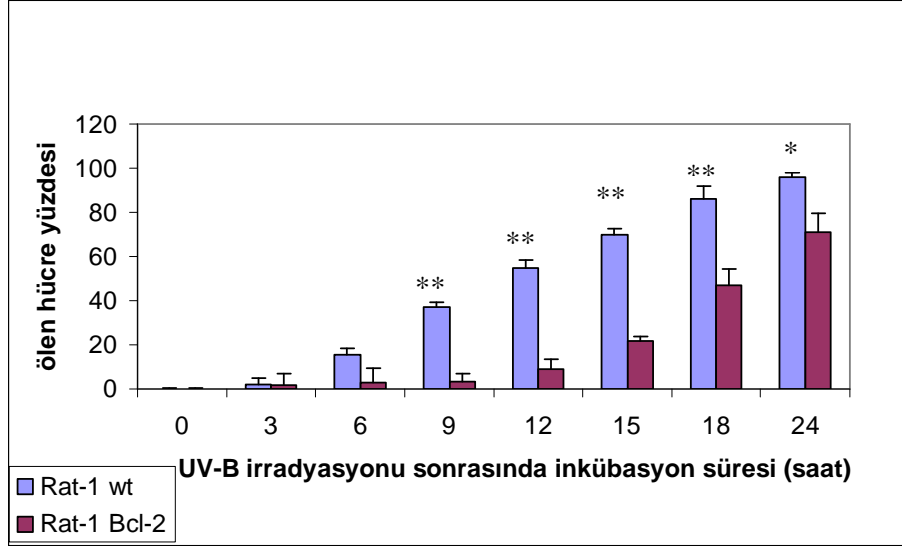
### **3.3. UV-B İrradyasyonunun Zamana Bağlı Olarak Hücre Yaşam Süresine Ve JNK Fosforilasyonu Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi**

Altı dakikalık UV-B irradyasyonu her iki hücre tipini de 48 saatlik inkübasyon sonrasında ölüme götürmektedir. Ancak bu sürece Bcl-2 proteininin nasıl bir etkisi olduğunu incelemek amacıyla hücrelerin zamana bağlı olarak değişimleri incelendi. Bunun için her iki hücre tipi de 6 dakikalık UV-B irradyasyonuna maruz bırakıldı ve düzenli aralıklarla faz kontrast mikroskobu yardımı ile fotoğrafları çekilerek görüntüldü (Şekil-10). Ayrıca bu zaman aralıklarında hücreler tripan mavisi dışlama testi (trypan blue exclusion test) kullanılarak ölü hücrelerin miktarı belirlendi (Şekil-11).

Bcl-2'yi daha fazla içeren fibroblastlarda hücre ölümünün tetiklenmesi, vt ile karşılaştırıldığında çok daha sonra başlamaktadır (Şekil-10 ve 11). Bu da bize yüksek doz UV-B uygulamasından sonra Bcl-2'nin hücre ölümünü durdurmamakla birlikte yavaşlattığına işaret etmektedir.



Şekil-10- UV-B irradasyonu sonrasında Rat 1 vt ve Rat 1 Bcl-2 fibroblastların inkübasyon süresindeki faz-kontrast mikroskobu yardımı ile elde edilen görüntüleri



Şekil-11- UV-B irradyasyonu sonrasında elde edilen Rat 1 wt ve Rat 1 Bcl-2 fibroblastların yaşam yüzdeleri (Tripkan mavisi dışlama testi)

\*, Rat1 wt hücre dizisinde ölen hücre yüzdesi aynı tedaviyi alan Rat 1 Bcl-2 hücrelerine göre anlamlı olarak artmıştır,  $p<0.05$ , (n=3).

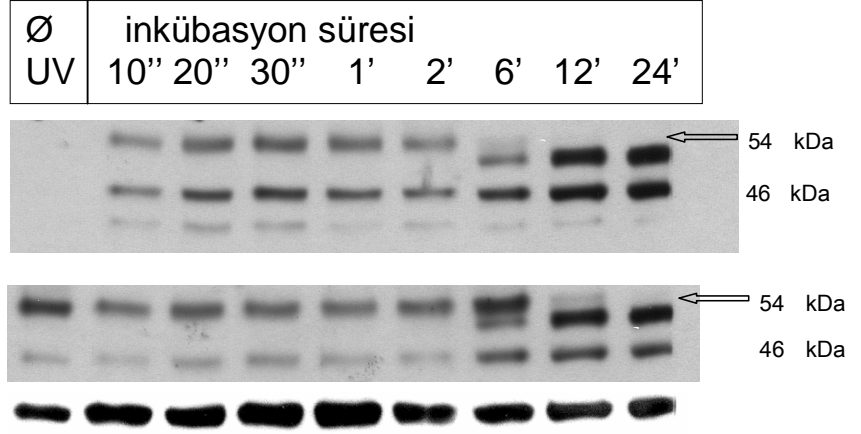
\*\* , Rat1 wt hücre dizisinde ölen hücre yüzdesi aynı inkübasyon dilimindeki Rat 1 Bcl-2 hücrelerine göre anlamlı olarak artmıştır,  $p<0.01$ , (n=3).

Bcl-2'nin daha fazla eksprese olduğu Rat 1 fibroblastlarda UV-B irradyasyonu ile indüklenen hücre ölümünü geciktirdiğini gösterilmesinin ardından, bu sürecin JNK enzimine olan etkisinin incelenmesi amacıyla benzer bir deney düzeneği hazırlandı. Altı dakikalık UV-B irradyasyonu uygulamasının ardından farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen hücre lizatlarında total ve fosforillenmiş JNK miktarı ve değişimleri Western blot analizi ile incelendi (Şekil-12, Panel A ve B).

Buna göre, her iki Rat 1 fibroblast dizisinde UV-B irradyasyonu sonrasında iki dalga halinde gelişen JNK fosforilasyonu izlenmiştir. İlk dalga inkübasyonun 10. dakikasında başlayıp, 30. dakikada en yüksek noktaya ulaşarak, iki saatin içinde azalmaktadır (Şekil-12 ve 13). JNK'nin fosforilasyonunun ikinci fazı ise Bcl-2'yi daha fazla eksprese eden fibroblastlarda gecikmiş ve inkübasyonun 24. saatinde tekrar izlenmiştir.

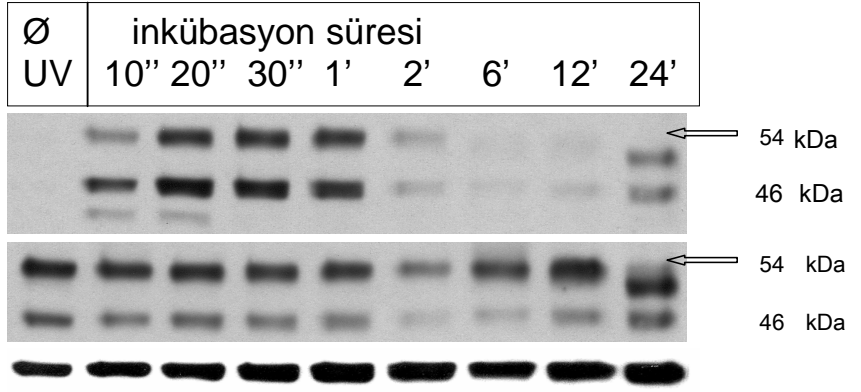
Panel A

R1 vt  
fosforil JNK  
total JNK  
 $\alpha$  tubulin



Panel B

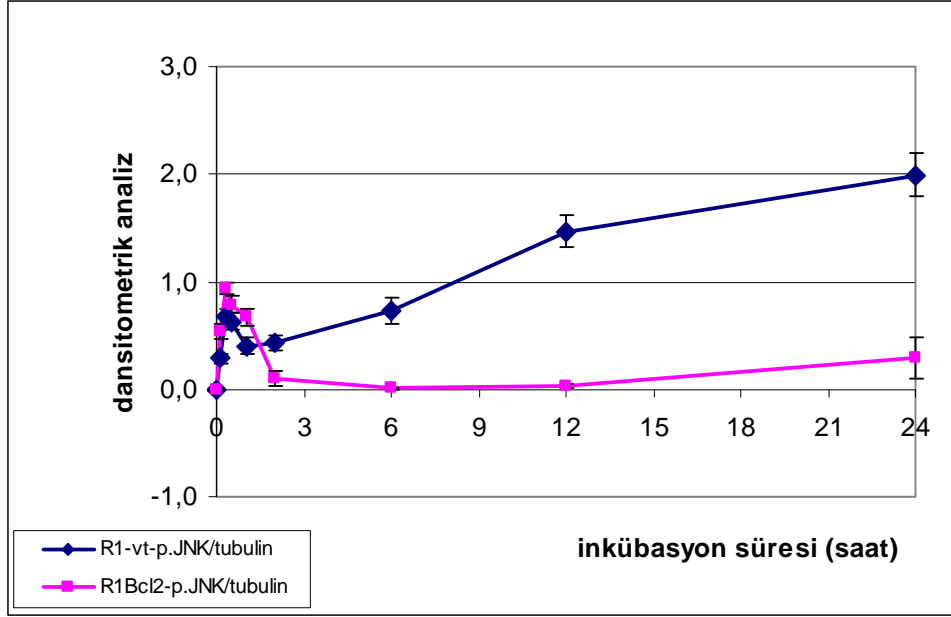
R1 Bcl-2  
fosforil\_JNK  
total JNK  
 $\alpha$  tubulin  
-



Şekil-12- UV-B irradasyonu ile indüklenen hücre ölümünde bi-fazik JNK fosforilasyonunun görüntülenmesi (western blot protein analizi metodu)

JNK enziminin 54 ve 46 kDa ağırlığındaki iki izoenzimi de Şekil-12'de görülmektedir. İlginç olarak, Rat 1 vt fibroblastlarda inkübasyonun 6. saatinde, Rat 1 Bcl-2 hücre tipinde ise inkübasyonun 24. saatinde 54 kDa'luk izoform, Şekil-12 üzerinde okla işaret edildiği gibi moleküler ağırlığı daha hafif olan bir izoforma yerini bırakmıştır.

Dikkatlice incelendiğinde, Rat 1 vt fibroblastların 6. saatindeki inkübasyonunda total JNK'da 54 kDa'a denk gelen moleküler ağırlık hizasında iki adet bant izlenmektedir. Bunlardan sadece daha düşük moleküler ağırlığa sahip olan fosforillenmiştir (Şekil-12-Panel A). Benzer geçiş paterni, Rat 1 Bcl-2 fibroblastlarında inkübasyonun 24. saatinde de gözlenmektedir (Şekil-12-Panel B).

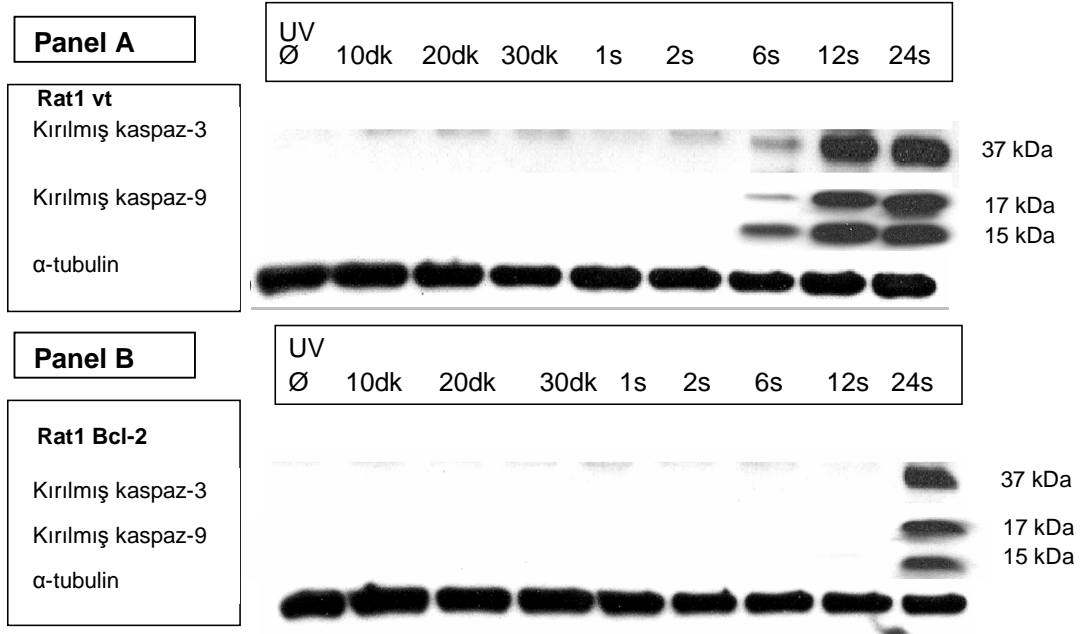


Şekil-13- UV-B ile indüklenen hücre ölümünde bi-fazik JNK fosforilasyonunun dansitometrik analizi (n=2).

Western blot analizi ile elde edilen JNK fosforilasyonuna ait veriler, daha önce yine aynı deney düzeneği ile çekilen faz kontrast resimleri ve ölü hücrelerin sayımının yapıldığı sonuçlar bir araya getirildiğinde, hücre ölümünün şiddetli bir şekilde ivme kazandığı zaman dilimi ile 54 kDa JNK izoenziminin daha düşük moleküler ağırlıkta izlendiği noktaya denk gelmesi dikkate değerdir. Bu veriler, masif hücre ölümünün, JNK fosforilasyonunun ikinci fazı ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

### 3.4. UV-B İrradyasyonuna Bağlı Olarak Gelişen Hücre Ölümünde Kaspaz-9 ve -3'ün Aktivasyonunun İncelenmesi

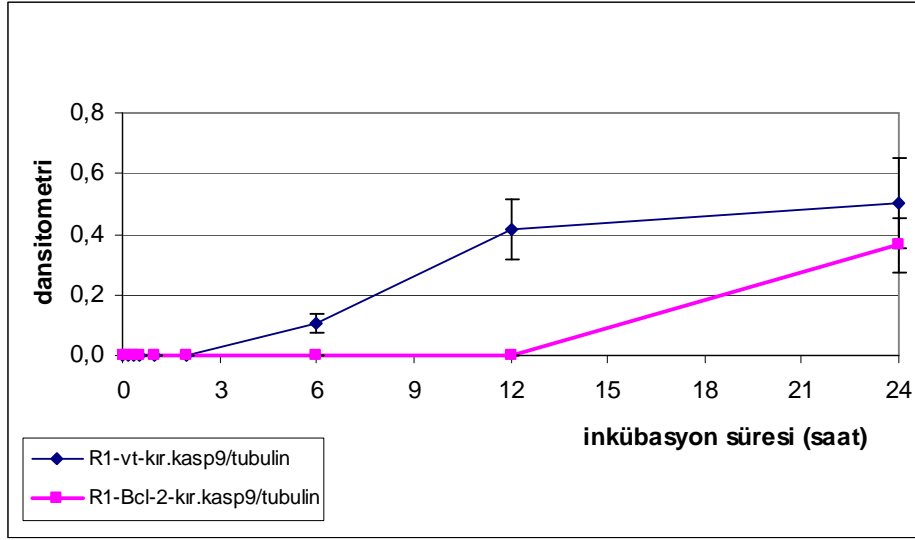
UV-B irradyasyonu ile tetiklenen Rat 1 fibroblast hücre ölümünde apoptozun ilerlemesinde rol oynayan kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün varlığı değerlendirildi. Bunun için daha önce Şekil-12'de bahsedilen deney düzeneği aracılığı ile kaspaz-9 ve -3'ün kırılmış formları western blot tekniği yardımı ile değerlendirildi (Şekil-14-Panel A ve B). Ayrıca elde edilen protein bantlarının dansitometrik analizi yapılarak, yükleme kontrolü olan  $\beta$ -tubulin aracılığı ile normalize edildi (Şekil-15a ve 15b).



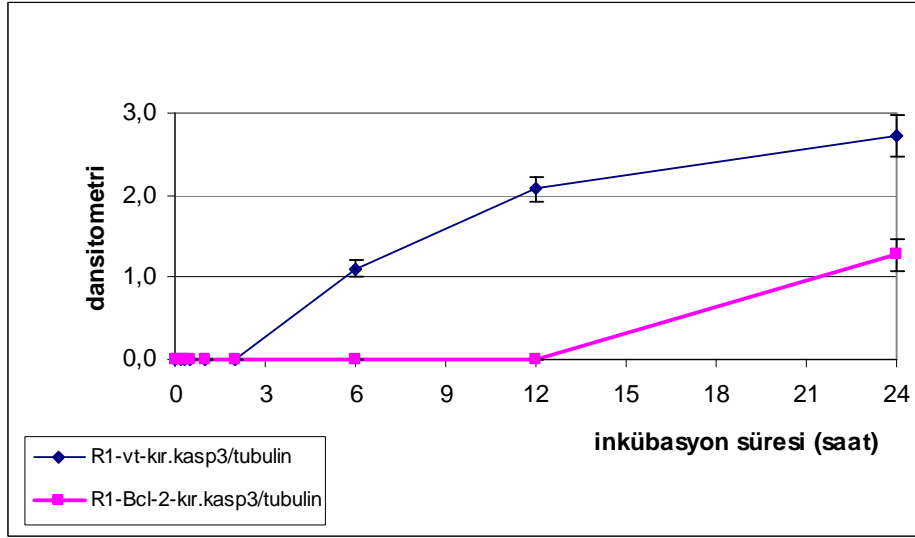
Şekil-14- Rat 1 fibroblastlarda UV-B irradasyonu sonrasında tetiklenen kaspaz-9 ve -3'ün inkübasyona bağılı olarak değişimi (western blot protein analiz metodu)

Şekil-14'te görüldüğü gibi Rat 1 fibroblastlarda UV-B irradasyonu sonrasında inkübasyon süresine bağılı olarak hem kaspaz-9 hem de -3 kırılarak aktif forma dönüşmüştür. Ancak Panel A ve B karşılaştırıldığında, her iki kaspazın da aktifleşmesinin Bcl-2 proteinini daha fazla eksprese eden hücre tipinde inkübasyonun 24. saatine kadar geciktiğini görmekteyiz. Bu bulgu bize UV-B'ye bağılı gelişen hücre ölümünde kaspazların yer aldığını yani apoptotik süreçlerin işlediğini göstermektedir ve Bcl-2 proteininin aşırı varlığının apoptozu geciktirici yönde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.





Şekil-15a-Rat 1 fibroblastlarda UV-B irradyasyonu sonrasında tetiklenen kaspaz-9'un densitometrik analizi (n=2).



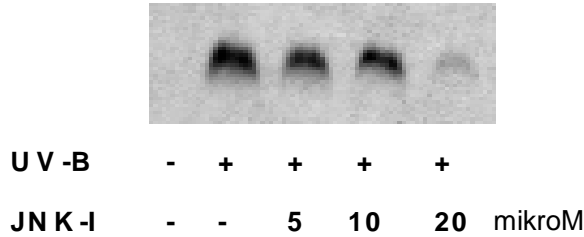
Şekil-15b- Rat 1 fibroblastlarda UV-B irradyasyonu sonrasında tetiklenen kaspaz-3'ün densitometrik analizi (n=2).

Bu noktaya kadar elde edilen tüm sonuçlar dikkate alındığında kaspaz-9 ve -3'ün kırıldığı ile JNK'nin fosforile olduğu ve hatta daha 54 kDa'tan düşük moleküler ağırlıklı izoforma geçiş yaptığı zaman dilimi birbiri ile benzerlik göstermektedir. Bu da bize aralarında bir ilişki olabileceği olasılığını işaret etmektedir.

Bu ilişkiyi değerlendirebilmek amacıyla, JNK enziminin fosforillenmesinde etkili olmayan ancak onun aktif olarak işlev görmesini engelleyen bir inhibitör, D-JNKI, kullanılarak Rat 1 fibroblastlarının hücre yaşam süresi ve kaspazların kırılması üzerindeki olası etkisinin incelenmesine karar verildi.

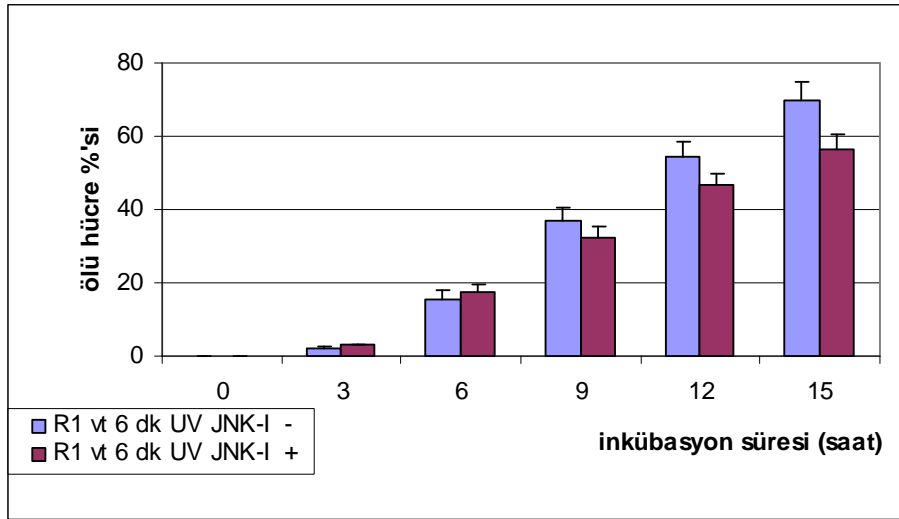
### 3.5. JNK İnhibitörünün UV-B İrradyasyonuna Bağlı Olarak İndüklenen Apoptozdaki Etkinliğinin İncelenmesi

JNK'nin UV-B ile indüklenen kaspaz 3 ve -9'un yer aldığı apoptoz yolağındaki rolünü araştırmak amacıyla, ilk önce etkin D-JNKI dozu belirlendi. Farklı dozlarda D-JNKI'ü UV-B irradyasyonundan 90 dk önce tatbik edildi ve UV-B irradyasyonunun tetiklediği 1. faz JNK aktivasyonunun pik yaptığı zaman dilimi olan inkübasyonun 30. dakikasında hücreler toplandı. Yapılan in vitro JNK kinaz aktivite testinden elde edilen sonuçlara göre 20 mikrom'lık D-JNK-I'ünün JNK'nin fonksiyonunu dikkate değer oranda azalttığı gözlemlendi (Şekil-16).

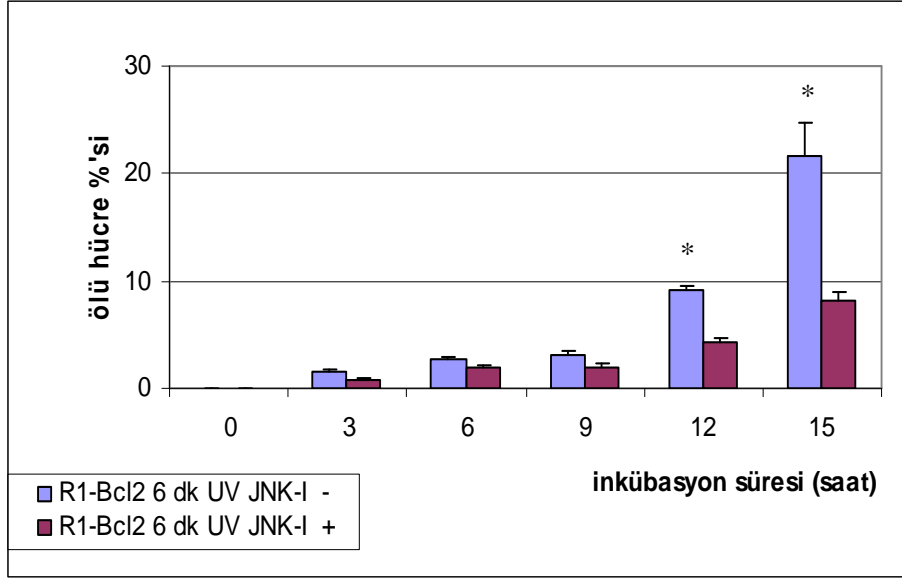


Şekil-16- JNK-I'nün JNK aktivasyonu üzerine olan etkinliğinin gösterilmesi (Western blot analizi)

D-JNKI'nin zamana bağlı olarak hücre yaşamı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, UV-B uygulamasından 90 dk önce 20 mikroM D-JNK-I ile muamele edildi ve belirli inkübasyon zaman dilimlerinde ölü hücreler tripan mavisi dışlama deneyi ile belirlendi. Bundan elde edilen sonuçlara göre, JNK-I'nün hem vt hem de Bcl-2'yi aşırı eksprese eden hücrelerin yaşam oranını arttırdığı görülmektedir (Şekil-17 ve Şekil-18). Sonuçta, UV-B irradyasyonu öncesinde uygulanan JNK-I'nün ilk fazı oluşturan JNK aktivasyonunu engellediğini göstermiştik ve bu uygulama hücre yaşam oranını her iki hücre tipinde de arttırmaktadır.



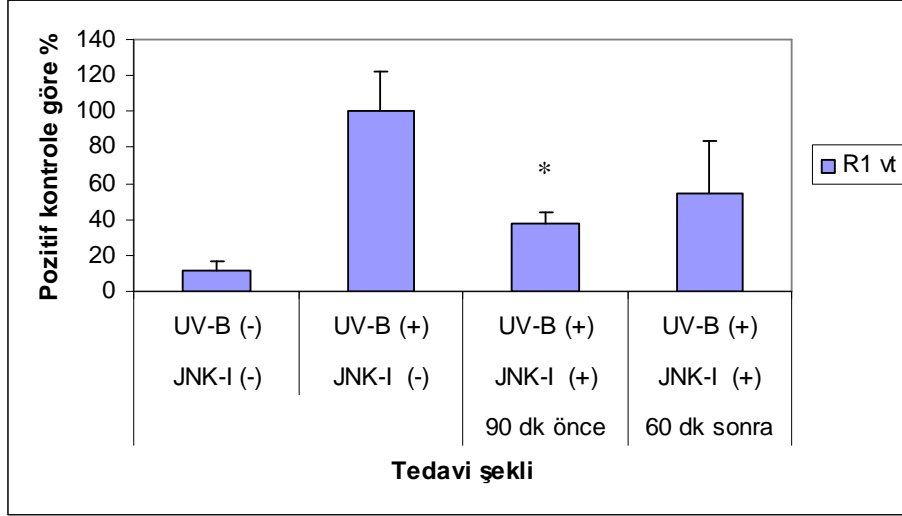
Şekil-17- UV-B irradyasyonu ile indüklenen Rat 1 vt fibroblast hücrelerinin yaşam süresi üzerine JNK-I'nün etkisi (Tripan mavisi dışlama testi) (n=3).



Şekil-18- UV-B irradyasyonu ile indüklenen Rat 1 Bcl-2 fibroblast hücrelerinin yaşam yüzdesi üzerine D-JNK-I'nün etkisi(Tripan mavisi dışlama testi)

\*, D-JNKI ile inkübe edilen ve edilmeyen Rat1 Bcl-2 hücre dizisinde aynı inkübasyon diliminde ölen hücre yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır,  $p < 0.05$ , (n=3).

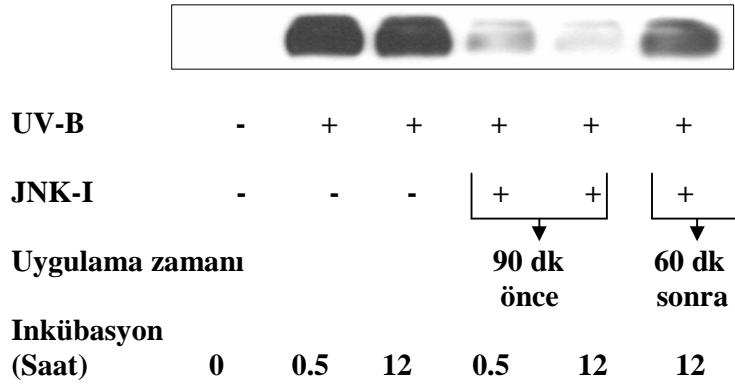
Uygulanan bu inhibitörün, ikinci dalga JNK aktivasyonuna olan etkisini incelemek ve her iki fazın Rat 1 fibroblastları ölümü üzerine olan etkisini ayırt etmenin gerekli olduğuna karar verildi. Bunu etkiyi değerlendirebilmek için ya UV-B uygulaması öncesinde ya da ilk fosforilasyon fazının sona erdiği inkübasyonun 1 saatinin sonunda D-JNK-I ile Rat 1 vt fibroblastlar muamele edildi ve inkübasyonun 12. saatinde hücreler DNA fragmantasyon oluşumu ve JNK aktivitesi bakımından değerlendirildi (Şekil-19 ve 20)



Şekil-19- D-JNK-I'ün UV-B ile indüklenen DNA fragmentasyonu üzerine olan etkisi (ELISA metodu)

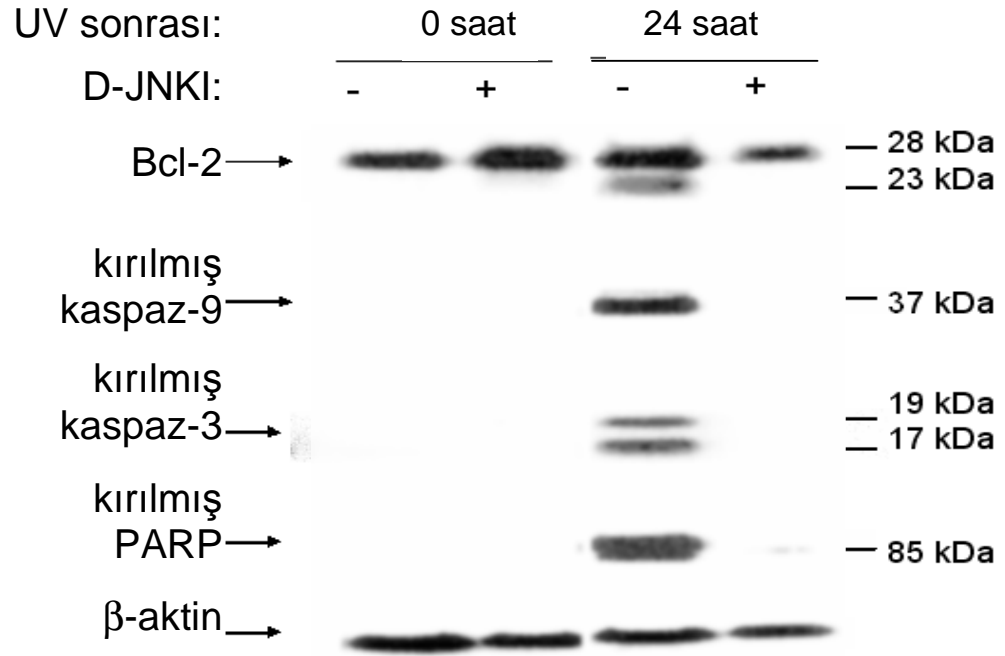
\*, UV-B irradyasyonundan 90 dk önce D-JNK-I ile inkübe edilen Rat1 vt hücrelerinde DNA fragmentasyonun, UV-B ile muamele edilen ancak D-JNK-I kullanılmayan hücrelere göre istatistiksel olarak daha az olduğu saptanmıştır,  $p < 0.05$ , (n=3).

D-JNK-I'nün UV-B uygulamasından 90 dakika önce ve 60 dk sonra uygulanması hem DNA fragmentasyonu sonucunda meydana gelen oligonükleotid oluşumunu (Şekil-19) hem de JNK aktivasyonunu (Şekil-20) azaltmaktadır. Ancak her iki deney de göstermiştir ki ilk JNK aktivasyon fazından sonra eklenen D-JNK-I'ü ikinci aktivasyon fazına daha az etkili olmaktadır.



Şekil-20-JNK-I'ün UV-B ile indüklenen JNK aktivasyonu üzerine olan etkisi (Western blot protein analiz metodu)

JNK'ın UV-B ile indüklenen apoptoz yolağında Bcl-2'nin üst ya da alt yolağında olup olmadığını anlayabilmek amacıyla, Rat 1 Bcl-2 fibroblastları daha önceki deneylerde olduğu gibi UV-B irradyasyonu öncesi JNK-I ile muamele edildi ve 24 saat sonra elde edilen hücre lizatlarında kaspaz-9, kaspaz-3, PARP ve Bcl-2 kırılmaları incelendi (Şekil-21).



Şekil-21- UV-B öncesi uygulanan JNK-I'ünün kaspaz-3, kaspaz-9, PARP ve Bcl-2 kırılmasına olan etkisi (Western blot protein analizi metodu)

JNK-I'nün kullanımının kaspaz-9 ve -3'ün aktifleşmesini, PARP'ın kırılmasını ve daha da önemlisi Bcl-2 proteininin kırılmasını geciktirmiş olması, JNK'ın UV-B ile indüklenen apoptotik süreçte Bcl-2'nin üst yolağında olduğuna dair kanıtları güçlendirmektedir.

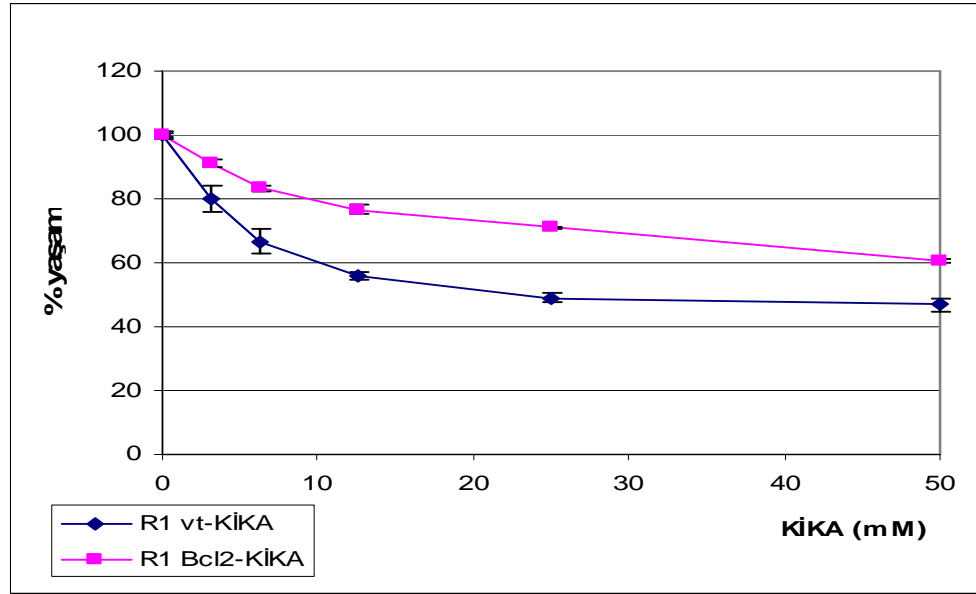
Sonuçta, verilerimiz Rat 1 fibroblastlarda UV-B ile indüklenen apoptozda Bcl-2 proteinin varlığı bu süreci geciktirerek kısmi koruma sağladığı ve ayrıca, strese bağlı aktiflenen JNK enziminin Bcl-2'nin apoptozu geciktirici özelliği üzerinde negatif rol oynadığı yönündedir.

## 4. Bcl-2 PROTEİNİN KİKA VE SSP İLE İNDÜKLENEN APOPTOZ YOLAKLARINA OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

### 4.1. KİKA'nın doza bağı etkisinin saptanması

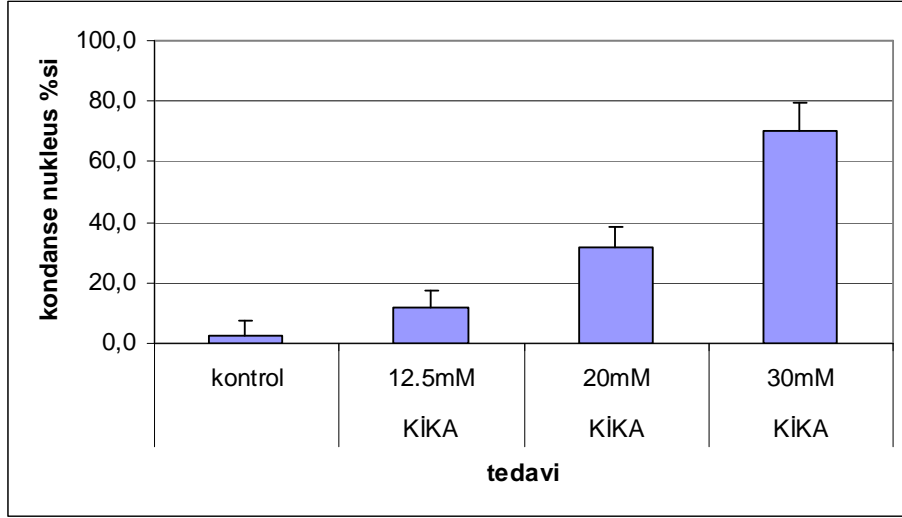
KİKA ve SSP'nin her iki fibroblast tipi üzerine olan etkini incelemek amacıyla öncelikle doza bağı değişen hücre yaşam grafikleri hem MTT metodu hem de Hoescht 33342 boyaması ile elde edildi.

KİKA'nın Rat 1 fibroblastların yaşam oranlarını doz artışına bağı olarak azalttığı ve Bcl-2'yi daha fazla eksprese eden fibroblastların KİKA'nın etkisine karşı daha dirençli olduğu Şekil-22'de görülmektedir. KİKA'nın Rat 1 vt hücreler üzerinde etkin olduğu dozların nüklear morfolojik olarak da değerlendirilmesi Şekil-23 ve 26'da görülmektedir.



Şekil-22- KİKA'nın doza bağı olarak Rat 1 fibroblastlarının yaşam oranı üzerindeki etkisi (MTT metodu)



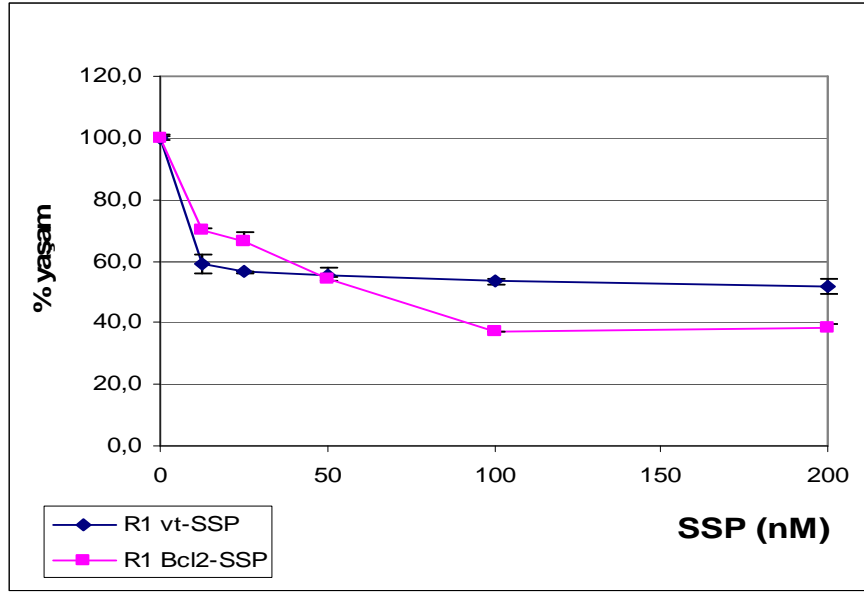


Şekil-23- KİKA'nın doza bağlı olarak Rat 1 vt fibroblastlarının yaşam oranı üzerindeki etkisi (Hoescht 33342 nuklear boyama metodu)

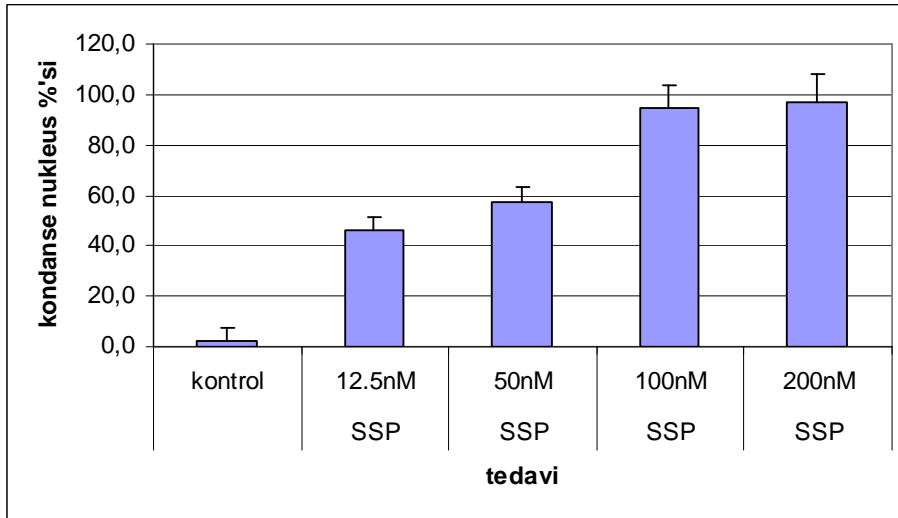
KİKA'nın 20 mM dozlarının bundan sonraki deneylerde kullanılmasına karar verildi.

#### 4.2. SSP'nin Doza Bağlı Etkisinin Saptanması

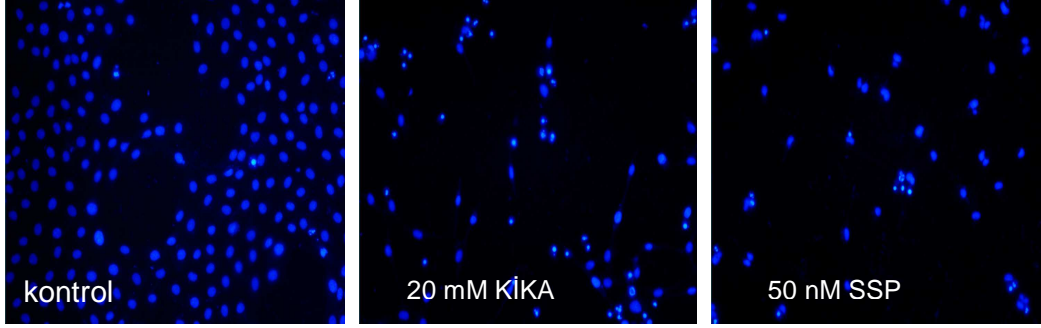
SSP'nin artan dozlarının Rat 1 fibroblastların yaşam oranını azalttığı ve Bcl-2'yi daha fazla eksprese eden fibroblastların SSP'nin etkisine karşı daha dirençli olduğu Şekil-24'de görülmektedir. Ancak MTT metodu ile belirlenen yaşam grafiğinde Rat 1 Bcl-2 fibroblastları 50 nM ve üzerindeki dozlara daha hassas gibi bulunmuştur. Bunun MTT metodunun prensibinde yatan bir aksaklıktan kaynaklanabileceğini dikkate alarak, SSP'nin Rat 1 vt hücreler üzerindeki doza bağlı etkisi Hoescht33342 boyaması sonrasında nuklear morfolojideki değişiklikler yardımı ile saptandı (Şekil-25 ve 26).



Şekil-24- SSP'nin doza bağlı olarak Rat 1 fibroblastlarının yaşam oranı üzerindeki etkisi (MTT metodu) (n=4).



Şekil-25- SSP'nin doza bağlı olarak Rat 1 vt fibroblastlarının yaşam oranı üzerindeki etkisi (Hoescht 33342 nuklear boyama metodu) (n=3).

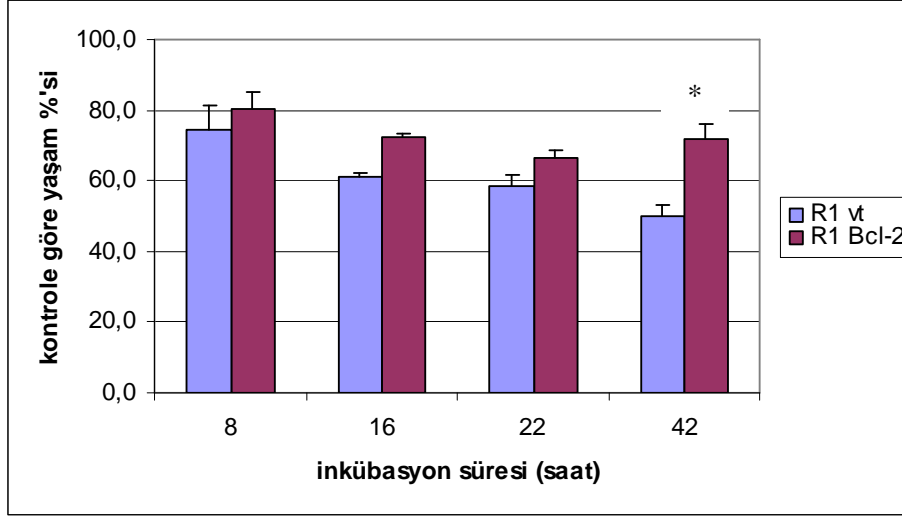


Şekil-26- SSP ve KİKA'nın Rat 1 vt fibroblastlarının nüklear morfoloji üzerine yaptığı etki

SSP'nin 50 nM dozlarının bundan sonraki deneylerde kullanılmasına karar verildi.

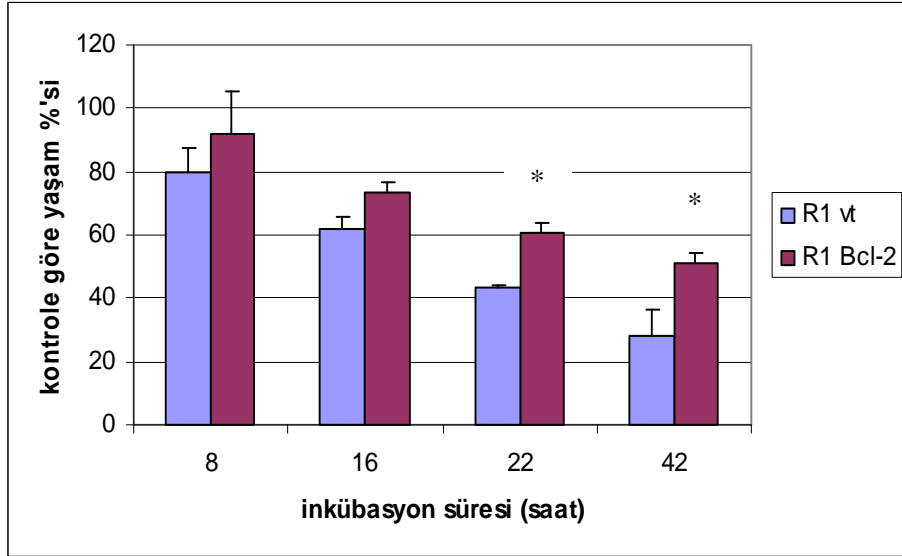
#### **4.3. KİKA ve SSP'nin Zamana Bağlı Olarak Yaşam Süresi Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi**

Bcl-2'yi daha çok eksprese eden fibroblastlar hem 20 mM KİKA hem de 50 nM SSP'nin uygulamalarında, Rat 1 vt fibroblastlara göre daha fazla yaşam yüzdesi sağlamışlardır (Şekil-27 ve 28). Bu da bize Bcl-2 proteininin KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümünde kısmen koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil-27- KİKA'nın Rat 1 fibroblastlar üzerine zamana bağlı olarak etkisinin incelenmesi (MTT Metodu)

\*, Rat1 Bcl-2 fibroblastların yaşam yüzdesi aynı inkübasyon dilimindeki vt fibroblastlara göre anlamlı olarak artmıştır,  $p < 0.05$ , (n=4).



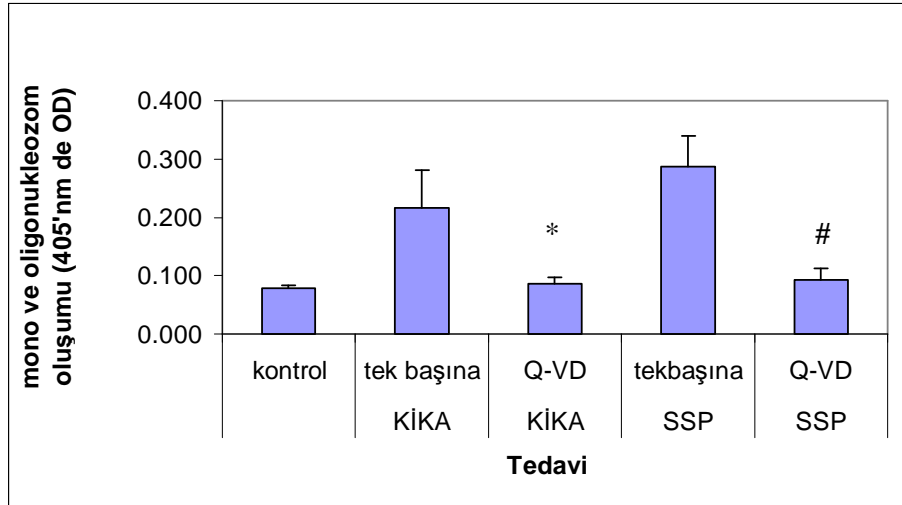
Şekil-28- SSP'nin Rat 1 fibroblastlar üzerine zamana bağlı olarak etkisinin incelenmesi (MTT Metodu)

\*, Rat1 Bcl-2 fibroblastların yaşam yüzdesi aynı inkübasyon dilimindeki vt fibroblastlara göre anlamlı olarak artmıştır,  $p < 0.05$ , (n=4).

#### 4.4. Kaspaz İnhibitörü Olan Q-VD'nin KİKA Ve SSP İle İndüklenen Hücre Ölümüne Olan Etkisi

KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümünde apoptoz yolaklarının oynadığı rolü aydınlatılmak için fibroblastlar, SSP ya da KİKA muamelesinden 1 saat öncesinde bir pan-kaspaz inhibitörü olan Q-VD (25 mikrom) ile muamele edildi. On iki saatlik inkübasyonu takiben, sitoplazmik fraksiyondaki DNA fragmentasyonunu gösteren mono- ve oligo-nükleozomlar ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Buna göre pan-kaspaz inhibitörü olan Q-VD, hem KİKA hem de SSP'ye bağlı olarak oluşan mono ve oligonükleozomların miktarını azaltmıştır (Şekil-29).

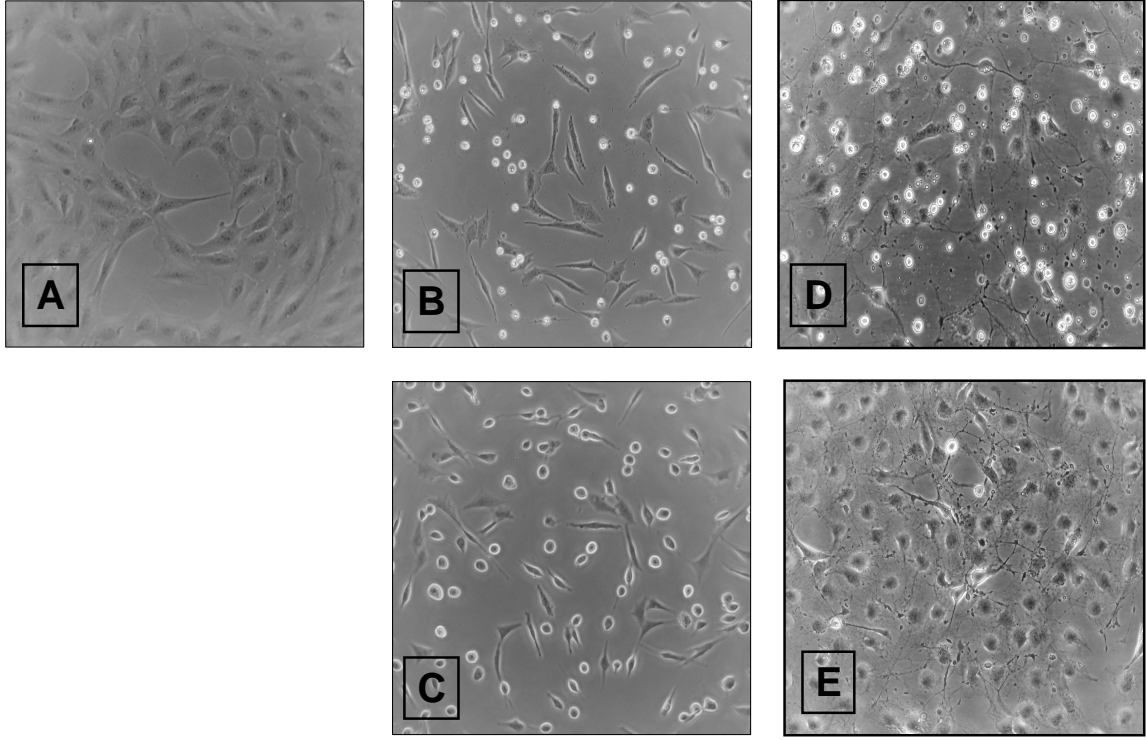
Ayrıca Q-VD'nin koruyucu etkinliğinin daha uzun sürede sürüp sürmediğini anlayabilmek için fibroblastlar bu sefer, KİKA ve SSP ile 16 saat inkübe edilmesinin ardından, medyum değiştirilerek 2 gün daha inkübe edildi. Q-VD'nin bu etkisini gösteren faz kontrast mikroskopu ile çekilen resimler Şekil-30'de görülmektedir. Apoptotik süreçte kaspaz enzimlerini inhibe eden Q-VD'nin hem KİKA hem de SSP'ye bağlı gelişen hücre ölümünde koruyucu bir rol oynadığı saptanmıştır.



Şekil-29- Pan-kaspaz inhibitörü olan Q-VD'nin KİKA ve SSP'ye bağlı oluşan mono ve oligonükleozom miktarına olan etkisi (ELISA metodu)

\*, Q-VD'nin KİKA ile birlikte kullanılması mono- ve oligo-nükleozom oluşumunu sadece KİKA kullanımına göre anlamlı olarak azaltmıştır,  $p < 0.05$ .

#, Q-VD'nin SSP ile birlikte kullanılması mono- ve oligonükleozom oluşumunu sadece SSP kullanımına göre anlamlı olarak azaltmıştır,  $p < 0.05$ .



Şekil-30- KİKA ve SSP tedavisi öncesinde Q-VD ile muamele edilen Rat 1 fibroblastların 16 saatlik inkübasyon sonrasında çekilen faz kontrast resimleri (A- kontrol, B- 20mM KİKA, C- 20 mM KİKA uygulaması öncesinde 25 µM Q-VD uygulaması, D- 50nM SSP, E- 50nm SSP uygulaması öncesinde 25 µM Q-VD uygulaması).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptoz yollarının, kanserleşme eğilimi gösteren bazı durumlarda aktive edilmesi organizmanın yararına olabilecek iken metabolik durumlardan kaynaklanan patolojilerde ise inhibe edilmesi organizmanın yararına olabilir. Bcl-2 proteini apoptoz yollarını baskılayarak kanser hücrelerinin yaşam sürvisini arttırarak organizmanın dengesinin bozulmasına neden olur iken hipoksi-iskemi gibi hücre ölümü ile giden durumlarda organizmanın yararına olabilir. Bu çalışmada, Bcl-2 proteininin UV irradyasyonu, KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümünde koruyucu etkili olduğu gösterildi.

### **1) Bcl-2 proteininin UV-B irradyasyonu ile indüklenen hücre ölümü üzerine olan koruyucu etkisinin incelenmesi**

Bu çalışmada, UV-B irradyasyonu ile indüklenen Rat 1 fibroblastlarının ölümünde kısaca şu sonuçları elde ettik: (1) Bcl-2 proteinin varlığı Rat 1 fibroblastları UV-B irradyasyonunun ölümüne götürücü etkisinden kısmen korumaktadır. (2) UV-B'ye bağlı olan hücrel stres nedeniyle JNK enzimleri bifazik fosforilasyon ile aktive olmaktadır. (3) Bcl-2'nin aşırı varlığı JNK'nin ikinci fosforilasyon dalgasında gecikmeye neden olmaktadır. (4) D-JNKI'ün kullanılması hücre yaşamını oranını arttırdığı gibi Bcl-2'nin kırılmasını da engellemiştir. Bu veriler, JNK ve Bcl-2 arasında dinamik bir etkileşim olduğuna işaret etmektedir.

Bizim çalışmamızda UV-B irradyasyonu sonrasında indüklenen hücre ölümünde Bcl-2 proteinin varlığı JNK fosforilasyonunu durdurmamış ancak belirli bir zaman dilimine kadar duraklatmıştır. Bu da bize Bcl-2 proteininin JNK enzimi üzerine olan etkisinin geçici olduğuna işaret etmektedir. Park ve ark.'nın göstermiş olduğu gibi JNK1'in Bcl-2'yi de aşırı eksprese eden hücrelerde aşırı üretilmesi Bcl-2'nin sağladığı anti-apoptotik etkiyi tesirsiz kılmaktadır (10). Bu araştırmacılar tarafından, Bcl-2'nin etkisinin geçersiz kılınabilmesi için JNK1 aktivasyonunun belirli bir eşik değeri geçmesi gerektiği öne sürülmüştür. JNK yolağının baskılanması Bcl-2'nin engellediği hücre ölümünde kritik bir rol oynamaktadır (10). Tüm veriler ışığında, JNK enzimi ve Bcl-2 proteini arasında dinamik bir denge bulunduğunu söyleyebiliriz. Bu dengede JNK aktivitesinin etkinliğine bağlı olarak Bcl-2 proteini JNK aktivitesini belirli bir süre geciktirebilmektedir.

Bizim verilerimizle uyumlu olarak Berlung ve ark. nın daha önce saptadıkları gibi JNK fosforilasyonunun ilk fazının (54 ve 46 kDa proteinleri) ortaya çıkışı hızlı olarak

gerçekleşmektedir (7). Hem vahşi tip hem de Bcl-2'yi daha fazla üreten tip fibroblastlarda fosforilasyonun ilk dalgası UV-B irradyasyonu sonrasında ilk 10 dakikada gerçekleşip, 2 saat içinde kaybolur iken, daha sonra gelen ikinci fosforilasyonun Bcl-2 üreten tipte dikkate değer şekilde gecikmesi, erken fosforilasyonun Bcl-2 proteininden etkilenmezken, ikinci fosforilasyonun Bcl-2 varlığına bağlı olarak negatif yönde etkilendiğine işaret etmektedir. Burada en önemli soru JNK fosforilasyonu Bcl-2 tarafından bloklanmasından mı yoksa JNK ve Bcl-2'nin fiziksel olarak birleşmesinden dolayı mı fosfo-JNK dedeksiyonu sağlanamamaktadır. UV irradyasyonu sonrasında çeşitli hücrelerde aktive olmuş JNK'ın mitokondriye ve nukleusa transloke olduğu gösterilmiştir (59, 72). Olasılıkla, Deng ve ark (2001) tarafından gösterildiği gibi IL-3 yoksunluğuna maruz bırakılan hücrelerde JNK1 enzimi in vitro koşullarda Bcl-2 proteinini direkt olarak fosforile edebilmekte, Bcl-2 ile aynı lokalizasyonda bulunmakta ve Bcl-2'nin hücre yaşamını uzatıcı etkisine aracılık etmektedir (11). Önemli olarak bu çalışmada, JNK enziminin ikinci dalga fosforilasyonunda p54 olarak saptanan izoformun moleküler ağırlığında değişiklik olduğu, daha hafif bir izoforma ya da yapıya dönüştüğünü gözlemledik. İkinci fazın başlangıcı her iki hücre tipinde de farklı zaman dilimine olmakla birlikte, her iki hücre tipinde benzer izoform değişim paterni gözlenmektedir. Western blot analizinin gösterdiği gibi Rat1 vt tipte ve Rat 1 Bcl-2 fibroblast hücrelerinde sırasıyla inkübasyonun 6. ve 24. saatinde total JNK protein tayininde hem 54 kDa hem de <54 kDa aynı anda izlenmektedir. Ancak sadece <54 kDa olan formun fosforillendiğini gözlemekteyiz. Bu da bize kaspaz-9 ve 3'ün aktive olduğu döneme denk gelen fosforilasyonun üst yolaktaki kinazlar tarafından seçici olarak hedeflendiğini göstermektedir. Hem JNK2 hem de JNK3, 54 kDa moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Bu nedenle hangi izoformun spesifik olarak fosforile olduğunu söylemek zordur. Ancak 46 kDa moleküler ağırlıklı JNK1 enziminin her iki fosforilasyon fazında da sabit olduğu görülmektedir. TNF- $\alpha$  ile muamele edilen NIH-3T3 ve Rat mesangial hücrelerde bifazik JNK fosforilasyon paterni göstermişlerdir. Birinci JNK fosforilasyon fazı geçici, kaspazdan bağımsız ve apoptozun öncesinde görülmektedir. Ancak aynı hücrelerdeki ikinci faz fosforilasyon hem apoptoz ile çakışmakta hem de kaspazlara bağımlıdır (73, 74). Bifazik JNK enzim fosforilasyonu Mielke ve Herdegen (2002) ile Xiao ve ark. (2005) tarafından da rapor edilmiştir (65, 75). Ancak bu veriler ilginç olarak hücre ölümü değil ama differansiyasyon çalışmalarından kaynaklanmıştır. Mielke ve Herdegen (2002) TNF-a aracılığı ile differansiye olan PC12 hücrelerinde JNK1 enziminin hızlı ve geçici aktivasyonu sonrasında yine kalıcı JNK1 aktivasyonu izlemişlerdir (75). Ancak her iki



araştırmada da p54 kDa'luk izoformun ikinci aktivasyon dalgasında daha düşük moleküler ağırlıklı forma dönüştüğüne dair bir veri bulunmamaktadır. Büyük olasılıkla farklı hücre sistemlerinde farklı uyaranlara karşı JNK sinyal sistemi aktivasyonunda farklılıklar gözlenmektedir.

Lei ve ark. na göre, JNK enziminin kaspaza bağımlı olmayan yolak aracılığı ile, ki büyük olasılıkla Bax aktivasyonuna neden olarak, sitokrom c'nin mitokondriden salınımına neden olmaktadır (76). Bcl-2'nin kaspaz-3 bağımlı kırılması ve küçük pro-apoptotik Bcl-2 fragmanını oluşturması daha önce rapor edilmişti (77). Bizim deneysel modelimizde, UV-B irradyasyonu öncesinde spesifik JNK inhibe edici peptidin kullanımı kaspaz-9 ve -3'ün kırılmasını geciktirmiştir. Ayrıca dikkate değer başka bir nokta da, kaspaz-3 aktivasyonuna bağlı olarak kırılan histon ile ilişkili DNA fragmanlarının oluşumunu ve Bcl-2'nin kırılmasını geciktirmiştir.

D-JNKI'nin JNK fosforilasyonunun birinci fazından önce ve sonra Rat 1 fibroblastların muamele edilmesi, JNK aktivasyonunu engellemiştir. Ayrıca histon-ilişkili DNA fragmanlarının oluşumunu da azaltmıştır. JNK'nin bifazik aktivasyonu iki nöronal differansiyasyon çalışmasında daha gösterilmiştir (65, 75). Xiao ve ark. (2006) N1 hücrelerinde NGF ile indüklenen nöronal diferansiyasyonda erken ve geç olmak üzere bifazik JNK fosforilasyonu gözlemlenmişlerdir. Spesifik JNK inhibitörü, SP600125, kullanarak her iki fazın da inhibisyonu N1 hücrelerinde nöritogenez oluşumunu baskılamıştır (78). Bu sonuçlar, dinamik bir JNK aktivasyonunun nörit oluşumunda anahtar rol oynadığı ve bifazik fosforilasyonun bu süreçte önemli olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre Rat 1 fibroblast hücrelerinde JNK aktivasyonu UV-B ile indüklenen hücre ölümünde etkin rol oynamaktadır. Bcl-2 ve JNK aktivitesi arasında dinamik bir etkileşim olduğuna işaret etmektedir. Sonuçta, UV-B irradyasyonu sonucunda tetiklenen hücre ölümünde JNK enzimi Bcl-2 fonksiyonunu düzenleyen üst yolda yer alıyor görünmektedir.

## **2) Bcl-2 proteininin KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümü üzerine olan etkisinin incelenmesi**

Bu çalışmanın sonuçlarına göre (1) Bcl-2 proteini KİKA ve SSP ile indüklenen hücre ölümüne karşı Rat 1 fibroblastlarda kısmen koruyucu etki göstermiştir ve (2) Pan-kaspaz inhibitörü olan Q-VD'nin kullanımı hücre sürvisini uzatmıştır.

MSUD'da biriken metabolitlerinin sıçan serebellumunun myelin oluşumu (79) ve MSUD'lu hastalardan elde edilen lenfoblastoid hücre dizilerinde belirgin büyüme inhisyonu (80) gibi toksik etkileri olduğu daha önce gösterilmişti. Jouvett ve ark. 1 MSUD metabolitlerinin apoptotik hücre ölümünü indüklediğini ve apoptotik nukleusların klasik morfoloji ile uyumlu olduğunu göstermişlerdir. Bu morfoloji KİKA'nın kaspaz aktivasyonu ve nukleozom merdiveni oluşumunda rol oynadığının delilidir. Dahası ne IETK-FMK ne de DEVD-FMK kaspaz inhibitörlerinin MTT oluşumunun azalmasını engellemediği göz önünde bulundurulursa, ne Kaspaz-8 ne de kaspaz-3 'ün KİKA'nın indüklediği apoptotik yolda ana bileşen olmadıklarına işaret etmektedir. KİKA ile indüklenen apoptozun kaspaz-bağımsız yollarla meydana gelebileceği birbirinden bağımsız olarak devam eden çalışmalarla desteklenmektedir (81-86). Ancak başka yönden, BAF'ın koruyucu etkisi ve PARP'ın karakteristik kırılması KİKA ile indüklenen apoptozda diğer kaspazların rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmanın bulgularına göre de kaspazların pan-kaspaz inhibitörü ile inhibe edilmesinin yaşayan hücre sayısını artırması kaspazların KİKA ile indüklenen hücre ölümünde rol oynadığına işaret etmektedir. Bissel ve ark. (1974), KİKA'nın fare fibroblastlarının replikasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemiştir (87) ve Zielke ve ark. (1997) sıçan beyinde enerji metabolizmasını azattığını bildirmiştir (88). Daha önceki çalışmalar KİKA'nın mitokondrial piruvatı ve  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenazı (89- 91) ve piruvat ve  $\beta$ -hidroksibütirat translokazları (92) inhibe ederek enerji metabolizmasını bozduğunu önermektedir. Dahası, apoptotik cezalandırma mitokondrial sitokrom c'nin sitozole salınması ile belirgin hale gelmektedir (2, 3). Bu da bozulmuş mitokondrial fonksiyon eksojen sitokrom c eklenmesi ile büyük oranda düzeltilebilmektedir (93). Çünkü KİKA ile muamele edilen hücrelerde mitokondrial değişiklikler şekilsel düzeyde apoptoz ile uyumludur ve bu değişikliklerin KİKA'nın yarattığı değişiklikleri mi yansıttığı yoksa apoptozun sonuçları mı olduğu tam olarak açık değildir. Jouvett ve ark (2000)'nin sonuçlarına göre KİKA hücre solunumunu belirgin şekilde azaltmıştır ve bu C6 hücrelerinde geri dönüşümsüz apoptotik ölümü ile paralel gitmektedir. Mitokondrial sitokrom c'nin salınımı apoptotik hücre ölümü için şart değildir fakat çeşitli hücre tiplerinde apoptotik tetikleyiciye bağımlıdır (94-97). Aslında sitozole salınımı olmaksızın artmış mitokondrial sitokrom c seviyeleri gözlenmiştir (14, 97). MSUD metabolitlerine maruziyetten sonra meydana gelen hücre solunum hasarının tetikleyici mi yoksa apoptotik hücre ölümünün sonucu mu olduğu açık değildir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre Bcl-2 proteinin varlığı ve kaspazların inhibisyonu Rat 1 fibroblastları KİKA'nın zarar verici etkisinden tam olarak korumamış olsa bile kısmi koruma sağlaması, kaspaz bağımlı yolların da aktive olduğunu göstermektedir.

Staurosporine uzun süreden beri pek çok hücrede apoptoz başlatıcısı olarak kullanılmaktadır ancak mekanizması henüz tamamen anlaşılamamıştır. Etki mekanizmasının kemoterapötik ilaçlar ve hücre ölümü indükleyicisi olan apoptotik etkili ajanlardan farklı etki mekanizması olduğuna dair yayınlar çoğalmaktadır (19, 20).

SSP tarafından indüklenen apoptozdan en az iki yolun sorumlu olduğu görünmektedir. Biricisi, staurosporine ile indüklenen mitokondrial membran permeabilitesi (MMP) üzerine olan değişikliklerdir. Staurosporine ile 6 saatlik muameleden sonra sitokrom c ile Smac/DIABLO'nun sitozole salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonu ile kendisini gösterir. Staurosporinin MMP'deki değişiklikleri nasıl etkilediği tam olarak açık değildir. Melanoma hücrelerinde, Bcl-2 proteinin aşırı üretilmesi SSP uygulanması sonrasında görülen DCM'i inhibe ederek, apoptoz kinetiğinde belirgin bir yavaşlamaya neden olmuştur. Bcl-2'nin aşırı üretilmesi SSP ile indüklenen apoptozu sadece kısmen durdurmuştur bu da başka bir yolağın daha olduğuna işaret etmektedir. Bu ikinci yol, daha yavaş bir kinetiğe sahip görünmektedir. Geniş spektrumlu kaspaz inhibitörü SSP ile indüklenen L1210 hücre ölümünün erken safhasını (<3 saat) bloklayabilmesine rağmen daha geç (<12 saat) safhayı geciktirmemiştir (20). MCF-7 hücre dizileri ile yapılan çalışmalar kaspaz-bağımlı ve -bağımsız yolların rol aldığını göstermektedir (19).

Bcl-2'nin varlığı SSP'ye bağlı gelişen hücre ölümünde koruyucu etki göstermektedir. Kaspazların inhibisyonunun hücre sürvisini pozitif yönde etkilemesi, tamamen olmasa da SSP'nin kaspaz-bağımlı yollardan fonksiyon gördüğünü düşündürmektedir.

### **3) JNK ve Kaspaz İnhibitörlerinin Kullanımlarının Önemi**

Apoptoz ile giden hücre ölümleri, doku hasarlarında kurtarılabilecek hücrelerin sayısının azalmasına neden olduğu için sınırlandırılması tüm organizmanın yararına olabilecek bir durumdur. Bizim çalışmamızda hem JNK hem de kaspaz inhibitörlerinin çeşitli hücre ölümünü indükleyen ajanlara karşı kısmen de olsa koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu inhibitörlerin klinikte kullanımı açısından ileri düzeyde araştırmaları gelecekte doku hararı ile giden hastalıkların klinik seyrinin iyileştirilmesinde faydalı olabilir görünmektedir.

## KAYNAKLAR

1. SENTMAN CL, SHUTTER JR, HOCKENBERY D, KANAGAWA O, KORSMEYER SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*, 67(5):879-88, 1991.
2. KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, NEWMYER DD The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275(5303):1132-6, 1997.
3. YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275(5303):1129-32, 1997.
4. CHENG EH, WEI MC, WEILER S, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 8:705-11, 2001.
5. KULMS D, SCHWARZ T Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6):837-41, 2002.
6. ADLER V, SCHAFFER A, KIM J, DOLAN L, RONAI Z. UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J Biol Chem*, 270(44):26071-7, 1995.
7. BERGLUND CM, RADESATER AC, PERSSON MA, BUDD HAEBERLEIN SL. UV-induced apoptosis in SH-SY5Y cells: contribution to apoptosis by JNK signaling and cytochrome c. *J Neurosci Res*, 78(4):580-9, 2004.
8. MANOME Y, WEICHSELBAUM RR, KUFE DW, FINE HA. Effect of Bcl-2 on ionizing radiation and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced internucleosomal DNA fragmentation and cell survival in human myeloid leukemia cells. *Oncol Res*, 5(3):139-44, 1993.
9. ITO T, DENG X, CARR B, MAY WS. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 272(18):11671-3, 1997.
10. PARK J, KIM I, OH YJ, LEE K, HAN PL, CHOI EJ. Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an anti-apoptotic action of Bcl-2. *J Biol Chem*, 272(27):16725-8, 1997.
11. DENG X, XIAO L, LANG W, GAO F, RUVOLO P, MAY WS Jr. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*, 276(26):23681-8, 2001.
12. CHUANG DT AND SHIH VE. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). Editors: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, L. Sly and E. Valle, Editors, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eighth ed.), McGraw-Hill, New York (2001), pp. 1971-2005
13. W.L. Nyhan. Maple syrup urine disease: branched-chain ketoaciduria. In: W.L. Nyhan, Editor, *Abnormalities in Amino Acid Metabolism in Clinical Medicine*, Appleton-Century-Crofts, Norwalk (1984), pp. 21-35.
14. JOUVET P, KOZMA M, MEHMET H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann N Y Acad Sci*, 926:116-21, 2000.
15. JOUVET P, RUSTIN P, POCOCK JM, FELDERHOFF-MUESER U, MAZARAKIS ND, SARRAF C, JOASHI U, KOZMA M, GREENWOOD K, EDWARDS AD, MEHMET H. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell*, 11(5):1919-32, 2000.

16. TAFANI M, MINCHENKO DA, SERRONI A, FARBER JL. Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res*, 61:2459–66, 2001.
17. TAFANI M, COHN JA, KARPINICH NO. Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem*, 277:49569–76, 2002.
18. USTE VJ, SANCHEZ-LOPEZ I, SOLE C. The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 80:126–39, 2002.
19. LY, CHIU SM, OLEINICK NL. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Exp Cell Res*, 283:135–45, 2003.
20. BELMOKHTAR CA, HILLION J, SEGAL-BENDIRDJIAN E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, 20:3354–62, 2001.
21. MAK T. The E. Donnall Thomas Lecture--apoptosis: "tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant*, 9(8):483-8, 2003.
22. KANE AB. Redefining cell death. *Am J Pathol*, 146(1):1-2, 1995.
23. HOCKENBERY D. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 146(1):16-9, 1995.
24. CUMMINGS MC, WINTERFORD CM, WALKER NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*, 21(1):88-101, 1997.
25. MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1):3-15, 1995.
26. KERR JF, WINTERFORD CM, HARMON BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73(8):2013-26, 1994.
27. MASON RP. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential. *Cancer*. 85(10):2093-102, 1999.
28. WYLLIE AH, ARENDS MJ, MORRIS RG, WALKER SW, EVAN G. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol*, 4(6):389-97, 1992.
29. CONROY LA, ALEXANDER DR. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia*, 10(9):1422-35, 1996.
30. RIBEIRO JM, CARSON DA. Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*, 32(35):9129-36, 1993.
31. WYLLIE AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*, 11(2):95-103, 1992.
32. STEWART BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, 86(17):1286-96, 1994.
33. JOZA N, KROEMER G, PENNINGER JM. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet*, 18(3):142-9, 2002.
34. BAZZONI F, BEUTLER B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*, 334(26):1717-25, 1996.
35. RUDIN CM, VAN DONGEN J, THOMPSON CB. Apoptotic signaling in lymphocytes. *Curr Opin Hematol*, 3(1):35-40, 1996.
36. OWENS GP, COHEN JJ. Identification of genes involved in programmed cell death. *Cancer Metastasis Rev*, 11(2):149-56, 1992.
37. GREEN DR, MARTIN SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol*, 7(5):694-703, 1995.
38. HICKMAN JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 11(2):121-39, 1992.

39. BAUD V, KARIN M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11(9):372-7, 2001.
40. PORTER AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 9(10):394-401, 1999.
41. REED JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 17(9):2941-53, 1999.
42. LUCCI A, HAN TY, LIU YY, GIULIANO AE, CABOT MC. Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer*, 86(2):300-11, 1999.
43. FENNELL DA, COTTER FE. Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy. *Br J Haematol*, 111(1):52-60, 2000.
44. ROSSE T, OLIVIER R, MONNEY L, RAGER M, CONUS S, FELLAY I, JANSEN B, BORNER C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391(6666):496-9, 1998.
45. COSTANTINI P, JACOTOT E, DECAUDIN D, KROEMER G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 92(13):1042-53, 2000.
46. LOTEM J, SACHS L. Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Differ*, 4(1):41-7, 1993.
47. STEWART BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, 86(17):1286-96, 1994.
48. MCCUBREY JA, MAY WS, DURONIO V, MUFSON A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*, 14(1):9-21, 2000.
49. Michalke M 2001.
50. MARTIN SJ. Dealing the CARDS between life and death. *Trends Cell Biol*, 11(5):188-9, 2001.
51. YANG E, KORSMEYER SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88(2):386-401, 1996.
52. WICKREMASINGHE RG, HOFFBRAND AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, 93(11):3587-600, 1999.
53. HOCKENBERY D. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 146(1):16-9, 1995.
54. PROKOCIMER M, ROTTER V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. *Blood*, 84(8):2391-411, 1994.
55. KYRIAKIS JM, AVRUCH J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem*, 265(28):17355-63, 1990.
56. GUPTA S, BARRETT T, WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, SLUSS HK, DERIJARD B, DAVIS RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*, 15(11):2760-70, 1996.
57. TOURNIER C, WHITMARSH AJ, CAVANAGH J, BARRETT T, DAVIS RJ. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol*, 19(2):1569-81, 1999.
58. DENG X, XIAO L, LANG W, GAO F, RUVOLO P, MAY WS JR. Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem*, 276(26):23681-8, 2001.
59. KHARBANDA S, SAXENA S, YOSHIDA K, PANDEY P, KANEKI M, WANG Q, CHENG K, CHEN YN, CAMPBELL A, SUDHA T, YUAN ZM, NARULA J, WEICHSELBAUM R, NALIN C, KUFE D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria

- and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 275(1):322-7, 2000.
60. MAUNDRELL K, ANTONSSON B, MAGNENAT E, CAMPS M, MUDA M, CHABERT C, GILLIERON C, BOSCHERT U, VIAL-KNECHT E, MARTINOU JC, ARKINSTALL S. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem*, 272(40):25238-42, 1997.
61. YAMAMOTO K, ICHIJO H, KORSMEYER SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*, 19(12):8469-78, 1999.
62. KEYSE SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 12(2):186-92, 2000.
63. DAVIS RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2):239-52, 2000.
64. VERHEIJ M, BOSE R, LIN XH, YAO B, JARVIS WD, GRANT S, BIRRER MJ, SZABO E, ZON LI, KYRIAKIS JM, HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, FUKS Z, KOLESNICK RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*, (6569):75-9, 1996.
65. XIAO J, PRADHAN A, LIU Y. Functional role of JNK in neuritogenesis of PC12-N1 cells. *Neurosci Lett*. 2005 Oct 6 doi:10.1016/j.neulet.2005.09.024
66. JOHNSON NL, GARDNER AM, DIENER KM, LANGE-CARTER CA, GLEAVY J, JARPE MB, MINDEN A, KARIN M, ZON LI, JOHNSON GL. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase induce cell death. *J Biol Chem*, 271(6):3229-37, 1996.
67. SCHAEFFER HJ, WEBER MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 19(4):2435-44, 1999.
68. RUVOLO PP, DENG X, MAY WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15(4):515-22, 2001.
69. BREITSCHOPF K, HAENDELER J, MALCHOW P, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 20(5):1886-96, 2000.
70. DIMMELER S, BREITSCHOPF K, HAENDELER J, ZEIHNER AM. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med*, 189(11):1815-22, 1999.
71. *Biyokimya Kitabı*
72. KAWASAKI H, MORIGUCHI T, MATSUDA S, LI HZ, NAKAMURA S, SHIMOHAMA S, KIMURA J, GOTOH Y, NISHIDA E. Ras-dependent and Ras-independent activation pathways for the stress-activated-protein-kinase cascade. *Eur J Biochem*, 241(2):315-21, 1996.
73. ROULSTON A, REINHARD C, AMIRI P, WILLIAMS LT. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, 273(17):10232-9, 1998.
74. GUO YL, BAYSAL K, KANG B, YANG LJ, WILLIAMSON JR. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem*, 273(7):4027-34, 1998.
75. MIELKE K, HERDEGEN T. Fatal shift of signal transduction is an integral part of neuronal differentiation: JNKs realize TNFalpha-mediated apoptosis in neuronlike, but not naive, PC12 cells. *Mol Cell Neurosci*, 20(2):211-24, 2002.

76. LEI K, NIMNUAL A, ZONG WX, KENNEDY NJ, FLAVELL RA, THOMPSON CB, BAR-SAGI D, DAVIS RJ. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol*, 22(13):4929-42, 2002.
77. LIANG Y, YAN C, NYLANDER KD, SCHOR NF. Early events in Bcl-2-enhanced apoptosis. *Apoptosis*, 8(6):609-16, 2003.
78. XIAO J, PRADHAN A, LIU Y. Functional role of JNK in neuritogenesis of PC12-N1 cells. *Neurosci Lett*, 392(3):231-4, 2006.
79. SILBERBERG, D. Maple syrup urine disease metabolites studied in cerebellum cultures. *J. Neurochem*, 16:1141-1146, 1969.
80. SKAPER S, MOLDEN D, AND SEEGMILLER J. Maple syrup urine disease: branched-chain amino acid concentrations and metabolism in cultured human lymphoblasts. *Biochem, Genet*, 14:527, 1976.
81. MILLER TM, MOLDER KL, KNUDSON CM, CREEDON DJ, DESHMUKH M, KORSMEYER SJ, AND JOHNSON EM JR. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J. Cell Biol*, 139:205-217, 1997.
82. HA HC, WOSTER PM, AND CASERO RA JR. Unsymmetrically substituted polyamine analogue induces caspase-independent programmed cell death in Bcl-2-overexpressing cells. *Cancer Res*, 58:2711-2714, 1998.
83. MONNEY L, OTTER I, OLIVIER R, OZER HL, HAAS A.L, OMURA S, AND BORNER C. Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J. Biol. Chem*, 273:6121-6131, 1998.
84. DRENOU B, BLANCHETEAU V, BURGESS DH, FAUCHET R, CHARRON DJ, AND MOONEY NA. A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J. Immunol*, 163:4115-4124, 1999.
85. MATEO V, LAGNEAUX L, BRON D, BIRON G, ARMANT M, DELESPESE G, AND SARFATI M. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Med*, 5:1277-1284, 1999.
86. JONES BE., LO CR, LIU H, SRINIVASAN A, STREETZ K, VALENTINO KL, AND CZAJA MJ Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J. Biol. Chem*, 275:705-712, 2000.
87. BISSEL M, BENSCH K, AND HERMAN M. Effects of maple syrup urine disease metabolites on mouse L-fibroblasts in vitro: a fine structural and biochemical study. *J. Neurochem*, 22:957-964, 1974.
88. ZIELKE HR, HUANG Y, BAAB PJ, COLLINS RM, ZIELKE CL, AND TILDON JT. Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. *Neurochem. Res*, 22:1159-1164, 1997.
89. DREYFUS P, AND PRENSKY A. Further observations on the biochemical lesion in maple syrup urine disease. *Nature*, 214:276, 1967.
90. WALAJTYS-RODE E, AND WILLIAMSON J. Effects of branched chain a-ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. *J. Biol. Chem*, 255:413-418, 1980.
91. JACKSON, R., AND SINGER, T. Inhibition of the 2-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes of beef heart by branched chain keto acids. *J. Biol. Chem*, 258:1857-1865, 1983.
92. LAND J, MOBRAY J, AND CLARK J. Control of pyruvate and b-hydroxybutyrate utilization in rat brain mitochondria and its relevance to phenylketonuria and maple syrup urine disease. *J. Neurochem*, 26:823-830, 1976.



93. KRIPPNER A, MATSUNO-YAGI A, GOTTLIEB R, AND BABIOR B. Loss of function of cytochrome c in jurkat cells undergoing Fasmediated apoptosis. *J. Biol. Chem*, 271:21629–21636, 1996.
94. ADACHI S, CROSS AR, BABIOR BM, AND GOTTLIEB RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem*, 272:21878–21882, 1997.
95. CHAUHAN D, PANDEY P, OGATA A, TEOH G, KRETT N, HALGREN R, ROSEN S, KUFE D, KHARBANDA S, AND ANDERSON K. Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem*, 272:29995–29997, 1997.
96. LI F, SRINIVASAN A, WANG Y, ARMSTRONG R, TOMASELLI K, AND FRITZ L. Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem*, 272:30299–30305, 1997.
97. TANG D, LI L, ZHU Z, AND JOSHI B. Apoptosis in the absence of cytochrome c accumulation in the cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 242:380–384, 1998.

## TEŞEKKÜR

Biyokimya doktora çalıŐmalarım süresince yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danıŐmanım Doç. Dr. Engin Ulukaya'ya öncelikle teşekkür etmeyi zevkli bir borç bilirim. Tez projemin tasarlanması ve deneysel verilerin toplanması sırasında son derece önemli rol oynayan Dr. Hüseyin Mehmet ve Dr. Grisha Pirianova'a sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum. Her zaman destek ve yol gösterici olarak akademik yaşamında rol oynayan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman Tokullugil'in sevgi ve Őükranlarımı kabul etmesini rica ediyorum.

Imperial College London (İngiltere)'deki çalıŐmalarım sırasında maddi destek sağlayan TUBİTAK ve Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü'ne katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

Her zaman beni destekleyen anne ve babama minnet ve Őükran duygularımı sunuyorum.

## ÖZGEÇMİŞ

1973, Karşıyaka, İzmir doğumluyum. İlkokuk öğrenimimi Talat Paşa İlkokulu'nda, orta öğrenimimi ise Bornova Anadolu Lisesi'nde 1992 tamamladım. Aynı yıl Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başlayarak, 1998 yılında tıp doktoru olarak mezun oldum. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 1999 yılında başladığım ihtisası 2003 yılında tamamladım. Aynı yıl Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde doktora eğitimime başlayarak, bu süre içinde Imperial College London (Londra, İngiltere)'de apoptoz ve kök hücre biyolojisi alanında çalışma fırsatı elde ettim. Halen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzman doktor olarak görevime devam etmekteyim.