



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**HİPOKSİ/RE-OKSİJENASYONA MARUZ KALAN
KARDİYOMİYOSİTLERDE METİLPREDNİZOLON'UN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve BUNSUZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

2015-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPOKSİ/RE-OKSİJENASYONA MARUZ KALAN
KARDİYOMİYOSİTLERDE METİLPREDNİZOLON'UN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve BUNSUZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

Bu tez Ank. Üni. BAP tarafından 15L0230007 no'lu proje ile desteklenmiştir.

2015-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde Yürütülmüş Olan Bu Çalışma, Aşağıdaki Jüri Tarafından
Yüksek Lisans Tezi Olarak Kabul Edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/ 08/2015



Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Oya Sena AYDOS

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kalp	1
1.1.1. Hücresel Seviyede Kalp Dokusu	2
1.2. Kardiyovasküler Hastalıklar	3
1.3. Miyokardiyal İnfarktüs ve Kardiyak Yeniden Modellenme	4
1.4. Miyokardiyal İnfarktüs ve Hipoksi	7
1.4.1. HIF1	7
1.4.2. Hipoksi / Re-Oksijenasyon (İskemi/Reperfüzyon)	7
1.5. Endoplazmik Retikulum	11
1.5.1. Endoplazmik Retikulum Stresi	12
1.5.1.1. ER Stres Yanıtında Temel Regülatörler	15
1.5.1.1.1. Temel Regülatör GRP78	16
1.5.1.1.2. PERK	18
1.5.1.1.3. ATF6	20
1.5.1.1.4. IRE1	20
1.5.1.1.5. Isı Şok Proteinleri (HSP)	23
1.5.1.1.5.1. HSP72	24
1.5.1.2. ER Stresi ve Kardiyak I/R veya H/R İlişkisi	24
1.5.1.3. ER Stres İndükleyici Ajanlar	26
1.5.2. İskemi-Reperfüzyon ve ER Stresi	28
1.6. Hücrede Ölüm Yolakları	30

1.6.1. Apoptoz	30
1.6.2. ER Stresi Aracılı Apoptoz	32
1.6.2.1. CHOP	35
1.7. UPR ve Kardiyak Hastalıklar	36
1.8. Glukokortikoidler	36
1.8.1. Glukokortikoidler'in Kardiyak Hastalıklarda Kullanımı	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Solüsyonlar	40
2.2. Hücre Kültürü	40
2.2.1. Hücrelerin Pasajlanması	41
2.2.2. Hücrelerin Hipoksik Ortamda İnkübasyonu	41
2.2.3. MTT (Dimetil Tiazol) Hücre Canlılık Testi	43
2.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	45
2.2.4.1. AC16 Hücrelerinden RNA izolasyonu	45
2.2.4.2. AC16 Hücrelerinden cDNA Sentezi	47
2.2.5. Real time PCR (qRT-PCR)	48
2.2.6. İstatistiksel Analiz	49
3. BULGULAR	50
3.1. AC16 Hücre Serisinin Mikroskop Görüntüsü	50
3.2. MTT Hücre Canlılık Testi Bulguları	50
3.3. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini	56
3.4. Eş zamanlı PCR (Real Time PCR, qRT-PCR) Bulguları	57
4. TARTIŞMA	65
4.1. Metilprednizolon'un H/R Sonrası Kardiyak Hücre Canlılığına Etkisi	67
4.2. Metilprednizolon'un Hipoksi ve ER Stres Genleri Üzerine Etkisi	69
4.2.1. HIF1 α	69
4.2.2. GRP78	70
4.2.3. PERK	72
4.2.4. IRE1	72
4.2.5. ATF6	74
4.2.6. CHOP	74
4.2.7. HSP72	77

4.2.8. BCL2 Aile Proteinleri	79
4.3. Glukokortikoidlerin Etki Mekanizması	82
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
ÖZET	89
SUMMARY	90
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	107

ÖNSÖZ

Bu tez, günümüzde en önemli mortilite nedenlerinden olan Miyokardiyal İnarktüs'ün neden olduğu ER Stres mekanizmasının hücresele seviyede araştırılması; Metilprednizolon ön-uygulanmasının, kardiyak miyositlerde oluşan hasara karşı koruyucu olabileceği ve bu koruyucu etkiyi ER-stresi regülasyonu aracılığı ile gerçekleştirirdiği düşüncesinin aydınlatılmasına yönelik bir araştırmayı kapsamaktadır.

Yüksek lisans eğitimin ve tezin oluşturulması süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, bilimsel çalışma yöntemi ve yorumsal düşünme yetisini edinmemeye olan katkılarını unutmuyacağım, araştırmacı ruhunu her daim örnek aldığım, hoşgörü ve güvenini hissettirerek beni destekleyen Değerli Hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Bilimsel metodları en iyi şekilde anlatarak öğrenmemde ve uygulamamda emekleri büyük olan ve tezin her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Tülin ÖZKAN, Dr. Aynur KARADAĞ ve Öğr.Gör Dr. Buket ALTINOK'a,

Yüksek lisans eğitimin süresince yanımda olan ve büyük yardımları ile hatırlayacağım, en yakın arkadaşlarım Somayyeh HEİDARGHOLİZADEH, Sibel ARAT ve Shahrashoub SHARİFİ'ye,

İstatistik hakkında bir bakış açısı kazanmamı sağlayan, sonuçlarımın değerlendirilmesinde emeği büyük olan, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli Dr. Can ATEŞ'e,

Yardımlarıyla bana destek olan sevgili arkadaşlarım Yalda HEKMATSHOAR ve Fuat KAPLAN'a, Meral KUTLUTÜRK ve Furkan BALBAY'a ve tüm Tıbbi Biyoloji ailesine,

Tez çalışmamı 15L0230007 numaralı proje ile maddi olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'ne,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, eğitimime ilk adımı atmamda ve devam edebilmemde emeği yadsınamayacak olan, her daim ellerini omzumda hissettiğim, sonsuz güvenleri ve sevgileri ile bu günlere gelmemi sağlayan ve tezimi kendilerine ithaf ettiğim en değerli varlığım Ailem ve Onur ŞENGÜN'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle...

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPK	AMP-Aktive edici Protein Kinaz
ASK1	Apoptoz Sinyal-Regüle Edici Kinaz1
ATF	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BAR	Bifonksiyonel Apoptozis Regülatörü
Bcl2	B-hücreli lenfoma 2
BI-1	BAX İnhibitör1
C/EBP	CCAAT/Enhancer Bağlayıcı Protein
CHOP	C/EBP Homolog Proteini
cTnI	Kardiyak Troponin I
CytC	Sitokrom-C
DMSO	Dimetilsülfoksid
DR5	Ölüm Reseptörü-5
DTT	Dithiothreitol
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
eIF2 α	Ökaryotik İnisiyasyon Faktörü 2 Alfa
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER-Aracılı Degredasyon
ERO1	ER Oksidoredüktin1
ERSE	ER Stres Yanıt Element
FBS	Fötal Dana Serumu
GPCR	G-Protein Eşlikli Reseptör
GRP78	Glukoz-Regüle Edici Protein78
H/R	Hipoksi/Re-oksijenasyon
HIF1	Hipoksi-indüklenmiş faktör-1
HPRT	Hipoksantin fosforiboziltransferaz

HRE	Hipoksi Yanıt Elementi
HSP	Isı Şok Protein
I/R	İskemi/Reperfüzyon
IL	İnterlökin
IPC	İskemik Ön-Koşullama
IRE1	İnositol-Gerektirici Enzim 1
JNK	C-Jun N-Terminal Kinaz
MANF	Mezensefalik astrosit-derive nörotrofik faktör
MCP-1	Monosit chemoattractant protein-1
MEF	Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri
MI	Miyokardiyal İnfarktüs
mitoKATP	Mitokondriyal ATP-Sensitif Potasyum Kanalları
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
MPP	Mitokondri Permeabilite Geçiş Porları
MTT	Dimetil Tiazol
Ng	Nanogram
NRF2	Nüklear Faktör-İlişkili Faktör 2
PARM-1	Prostatic androgen repressed message1
PBS	Fosfat Buffer Salın
PDI	Protein Disülfid İzomeraz
PERK	Pankreatik ER-Kinaz (PKR)-Benzeri ER Kinaz
PKA	Protein Kinaz A
RIDD	Regüle Edilmiş IRE1-Bağımlı Degredasyon
ROS	Reaktif Oksijen Türlerinin
°C	Santigrat derece
SR	Sarkoplazmik Retikulum
STC2	Stanniocalcin 2
TBE	Tris Borikasit EDTA
TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa

TRAF2	Tümör Nekroz Faktör Reseptör İlişkili Faktör2
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
XBP1	X-Box Binding Protein

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kalbin şematik çizimi ve kalp hücreleri	2
Şekil 1.2. MI sonrası kardiyak yeniden modellenme aşamaları	5
Şekil 1.3. MI sonrası kardiyak yeniden modellenme	6
Şekil 1.4. Miyokardiyal I/R hasarı	10
Şekil 1.5. UPR'nin temel regülasyonu	16
Şekil 1.6. IRE1 sinyali ve apoptotik ölüm ile ilişkisi	22
Şekil 1.7. İskemi-ER stresi ilişkisi	30
Şekil 1.8. İçsel ve dışsal yolak ile indüklenen apoptoz	31
Şekil 1.9. ER stres koşullarında sağkalım ve apoptoz sinyali	34
Şekil.2.1. Deney Planı	42
Şekil 3.1. AC16 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri	50
Şekil 3.2. AC16 hücrelerine MP muamelesi sonrası MTT ile canlılık oranları	51
Şekil 3.3. AC16 hücrelerinin hipoksi ve re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları	52
Şekil 3.4. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 3h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları	53
Şekil 3.5. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 6h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları	53
Şekil 3.6. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 12h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları	54
Şekil 3.7. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 24h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları	54
Şekil 3.8. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben tüm saatlerde H/R sonrası hücre canlılık oranları	55
Şekil 3.9. H/R ve MP ön-uygulaması sonrası H/R yapılan hücre canlılıkları	55
Şekil 3.10. İzole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü	57
Şekil 3.11. cDNA'ların HPRT referans geni ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü	57

Şekil 3.12. HSP72 geni erime eğrisi	58
Şekil 3.13. HPRT geni erime eğrisi	58
Şekil 3.14. Farklı hipoksi saatlerinde HIF1 α gen ekspresyon düzeyleri	59
Şekil 3.15. Farklı hipoksi saatlerinde GRP78 gen ekspresyon düzeyleri	60
Şekil 3.16. Farklı hipoksi saatlerinde PERK gen ekspresyonlarının düzeyi	60
Şekil 3.17. Farklı hipoksi saatlerinde IRE1 gen ekspresyon düzeyleri	61
Şekil 3.18. Farklı hipoksi saatlerinde ATF6 gen ekspresyon düzeyleri	61
Şekil 3.19. Farklı hipoksi saatlerinde CHOP gen ekspresyon düzeyleri	62
Şekil 3.20. Farklı hipoksi saatlerinde HSP72 gen ekspresyon düzeyleri	62
Şekil 3.21. Farklı hipoksi saatlerinde BAX gen ekspresyon düzeyleri	63
Şekil 3.22. Farklı hipoksi saatlerinde BCL2 gen ekspresyonlarının düzeyi	63
Şekil 3.23. Farklı hipoksi saatlerinde BAX/BCL2 gen ekspresyonlarının düzeyi	64
Şekil 3.24. Farklı hipoksi saatlerinde BCL-xL gen ekspresyonlarının düzeyi	64
Şekil 4.1. Glukokortikoid reseptör mekanizması	83

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. UPR'yi etkileyen ajanlar ve ER-aracılı apoptoz sinyali	27
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan malzeme ve gereçler	40
Çizelge 2.2. Hücre kültüründe kullanılan deney planı	43
Çizelge 2.3. cDNA sentez protokolü	47
Çizelge 2.4. RT-PCR protokolü	48
Çizelge 2.5. RT-PCR'da kullanılan primer dizileri ve bilgileri	49
Çizelge 3.1. AC16 hücrelerine MP muamelesi sonrası MTT ile canlılık yüzdeleri	51
Çizelge 3.2. AC16 hücrelerine hipoksi/reoksijenasyon sonrası MTT ile canlılık yüzdeleri	52
Çizelge 3.3. RNA bütünlük ve miktar tayinleri	56

1. GİRİŞ

1.1. Kalp

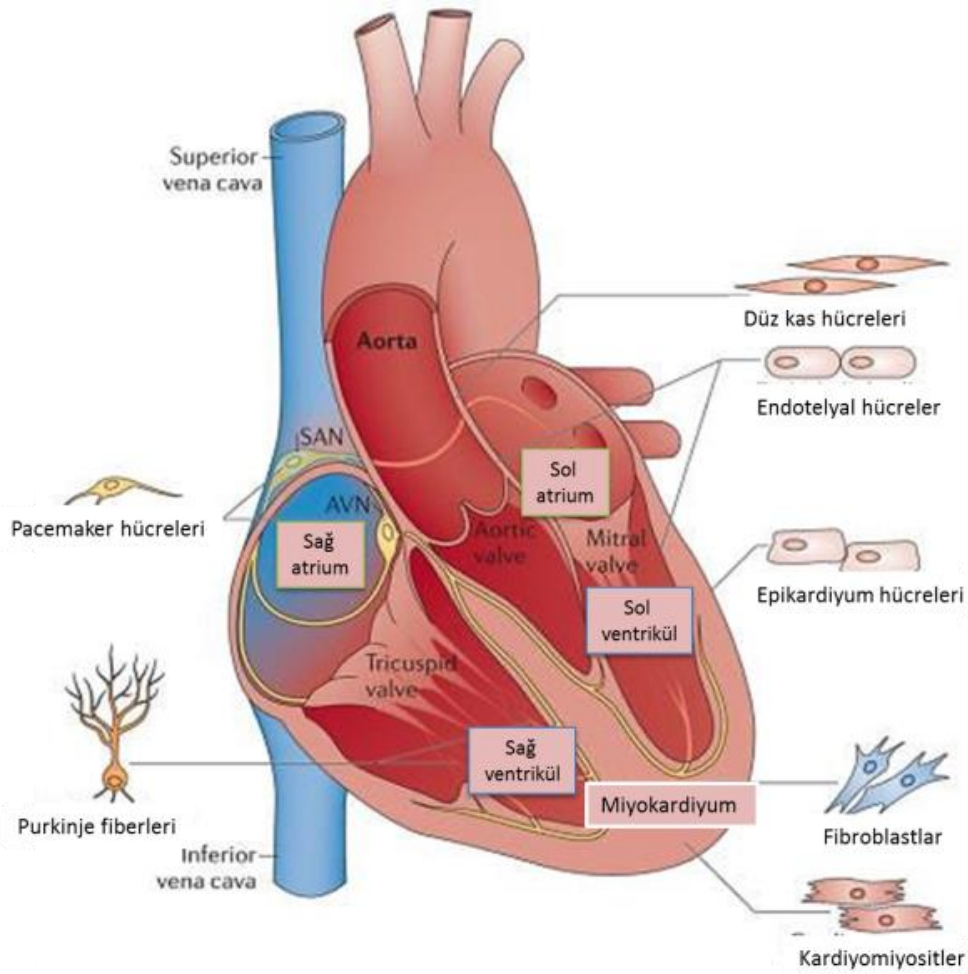
Hayati bir organ olarak kalp, mediastinum içinde akciğerler arasında, torasik kavitede yer alır. Kalbin duvarları 3 farklı tabakadan oluşur. Dış tabaka “epikardiyum” adını alırken, epikardiyum ve parietal perikardiyum arasındaki boşluk perikardiyal kavite olarak adlandırılır. Epikardiyumun altında bulunan ince orta kalp tabakası “miyokardiyum” olarak tanımlanmıştır. Kardiyak kalp kaslarının ve miyositlerin toplandığı tabakadır ve burada bulunan kas demetlerinin kasılması ile kontraksiyon sağlanır. Duvarın iç kısmı “endokardiyum” olarak adlandırılır ve iç tarafı endotel hücrelerince çevrelenmiş haldedir ve kan damarları eşlik eder.

Kardiyak siklus iki aşamadan oluşur. Kalbin kan ile dolmasını sağlayan ve “diastol” olarak adlandırılan relaksasyon periyodunu, dolan kanın vücuda pompalanmasını sağlayan “sistol” olarak adlandırılan kontraksiyon periyodu takip etmektedir.

İnsanda kalp vertikal septum aracılığıyla sağ-sol atriumlar ve devamında bulunan ventriküller ile birlikte 4 odacıktan oluşmaktadır. Atriyal kaslar çok gelişmemiş ve ince duvar kapısına sahipken ventriküler kaslar nispeten daha kalın tabakalıdır. Sol ventrikül relaksasyon halinde iken biküspid valf açık pozisyonundadır ve sol atriumdan kan ventriküle dolar. Sol ventrikül kontraksiyonu ile valf kapanır ve ventriküldeki kanın atriuma tekrar geçmesi engellenir. Sol ventrikül duvarları sağ ventriküle göre daha kalındır, çünkü daha büyük bir iş yükü taşıyarak tüm vücuda kanı pompalama görevini üstlenmiştir.

1.1.1. Hücresel Seviyede Kalp Dokusu

Güncel kanıtlar yetişkin memeli kalbinin bilinmeyen kök veya progenitör hücre kaynaklarından oluşmuş olan az sayıda kardiyomiyositten köken aldığını önermektedir (Hsieh, 2007). Hücresel seviyede kalp dokusu kardiyomiyositler, kardiyak fibroblastlar, vasküler ve nöronal hücreler, ayrıca muhtemel patolojik koşullar altında inflamatuvar hücreleri içermektedir.



Şekil 1.1. Kalbin şematik çizimi ve kalp hücreleri

1.2. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2011 yılında hazırladığı rapora göre global ölümlerin en önemli nedenidir ve tahminlere göre sadece 2004 yılında koroner arter hastalıkları dünya çapında yaklaşık 7.2 milyon insanın ölümüne neden olmuştur (WHO, 2011). American Heart Association (AHA)'nın raporuna göre koroner arter hastalıkları 2008 yılında Amerika'da her 6 ölümden 1'i oranında ölüme sebebiyet vermiştir (Roger ve ark., 2012). 2020 yılına kadar kardiyovasküler hastalıklar, toplam hastalık yükünün en önemli global sebebi olmaya devam edecektir (Braunwald ve ark., 2001).

Batı dünyasında en sık görülen ölüm nedeni olan Atherosklerozis, damar duvarının kalınlaşması (plak oluşumu) ve esnekliğinin kaybolması ile karakterize arterial hastalık grubunun bir parçasıdır. İskemik kalp hastalığının en ağır formu olan Miyokardiyal İnfarktüs (MI), ABD'deki ölümlerin %20-25'inden sorumludur (Kumar ve ark., 2000). MI %90 oranında koroner arterdeki atherosklerotik plağın rüptürü veya erezyonu neticesinde bu zeminde oluşan koroner kan akımını engellenmesiyle gelişmektedir (Cleutjens ve ark., 1999). Miyokardiyal dokuya kan akışının yeterli derecede sağlanamaması sonucunda bu durum, iskemiye ve kardiyomiyositlerin ölümüne neden olmaktadır (Cleutjens ve ark., 1999). Miyokardiyum hasarının büyüklüğü; tıkanıklığın yerine, şiddetine ve arterin reperfüze edilmesi (kendi kendine, trombolitikler kullanılarak veya perkutanöz koroner müdahale yoluyla) için geçen zamana bağlıdır (Akasaka, 2010).

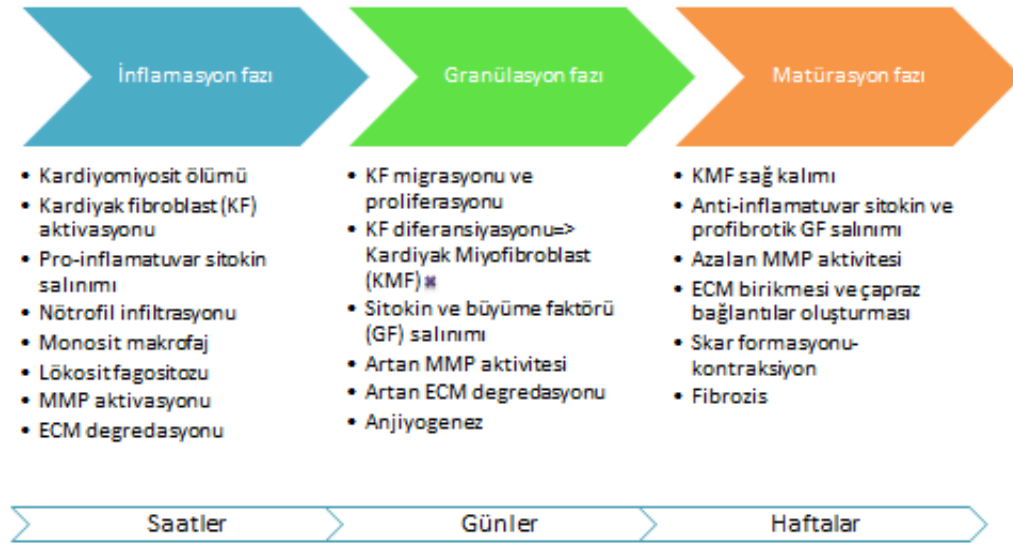
Koroner arter hastalıkları sigara kullanımı, obezite, hipertansiyon, depresyon ve ailesel kalıtım gibi bazı risk faktörleri yoluyla şiddetlenmektedir. Yeni ilaçlar, beslenme ve hayat stili değişiklikleri gibi yeni tedavi yöntemleri kalp hastaları için mortalite oranını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak kardiyak kas hasarı, post-natal kardiyomiyositlerin düşük rejeneratif potansiyelleri nedeniyle geri döndürülemez.

Yetişkin memeli kalbi normal yaşlanma sürecinde ve hastalık durumunda aslında bir dereceye kadar kardiyomiyosit rejenerasyonu gösterir. Ancak bu az miktarda kardiyomiyosit rejenerasyonu, hasarı takiben kontraktıl fonksiyonun restorasyonunda yetersiz kalmaktadır. Lokal intramuskular injeksiyon yoluyla hücre transplantasyonu, koroner arter hastalıkları tedavisinde potansiyel terapötik müdahale olarak ortaya çıkmıştır ve birçok araştırmacı kök hücre tedavileri yoluyla kardiyak doku rejenerasyonunu geliştirmeye odaklanmıştır. Hücre transplantasyonu, MI hastaları için umut vaat eden bir terapidir. Günümüzde mümkün olan tedaviler ile hastaların prognozu gelişebilmekte fakat hasarlı kalp dokusunun rejenerasyonunu yapabilecek mevcut bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Guan ve ark., 2011).

1.3. Miyokardiyal İnfarktüs ve Kardiyak Yeniden Modellenme

Hipoksi vücudun veya vücudun bir bölümünün “lokal” olarak yeterli oksijenden yoksun kalması durumudur. Dokuya yetersiz kan akışı anlamına gelen “iskemi” durumu hipoksi ile sonuçlanır ve bu durum “iskemik hipoksi” olarak adlandırılır. MI sonrasında, kardiyomiyositlerin hipoksiye bağlı nekroz ve apoptoz mekanizmaları ile ölümü sonucu oluşan doku hasarı ve nekrotik sinyaller, bir dizi mekanizma aracılığı ile miyokardiyumun tamiri için akut inflamatuvar yanıtı başlatır. İnsanlarda apoptotik hücre ölümü infarkt sonrası 6-8. saatlerde pik yapar (Cleutjens ve ark., 1999).

Post-MI kardiyak yeniden modellenme



Şekil 1.2. MI sonrası kardiyak yeniden modellenme aşamaları

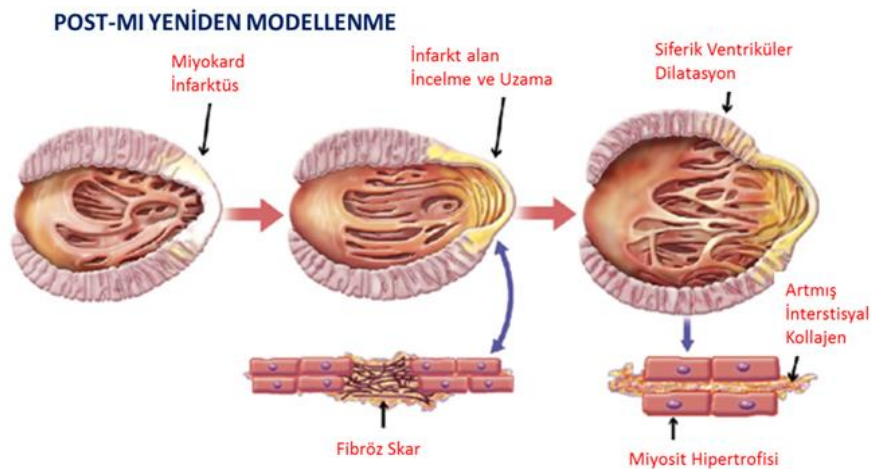
İnflamasyon fazı, MI sonrasında yaklaşık 12-16 saat içinde gerçekleşir (Daskalopoulos ve ark., 2012) ve pro-inflamatuvar İnterlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin/kemokinlerin lokal artışı ile birlikte infarkt alana nötrofil infiltrasyonu ile karakterizedir (Frangogiannis ve ark., 2002). MI sonrasında yaklaşık 3.günde, infarkt alana makrofaj infiltrasyonu olur. MI sonrası infarkt kalpte, pro-inflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1'in hızla artışı görülür (Frangogiannis ve ark., 2002). MI sonrasında yaklaşık 3.günde, infarkt alana makrofaj infiltrasyonu olur.

İnflamatuvar fazdan **fibrotik faza** geçiş, tipik olarak MI sonrasında 3-7 günler arasında gerçekleşir ve infiltre olan immün hücreler ve miyokardiyal hücreler tarafından transforming growth factor-beta (TGF- β) ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar ve fibrotik faktörlerin sentezinde artış ile kendini gösterir. İnflamasyonun baskılanması anti-inflamatuvar sitokinlerin/kemokinlerin salınması ile gerçekleşir ve bu basamakta temel rol kardiyak fibroblastlarıdır. Kardiyomiyositler ile kalp dokusunda yer alan diğer hücre tipleri arasındaki fiziksel ve biyokimyasal iletiler aracılığıyla, fibroblastlar stres veya miyokardiyum hasarına yanıt olarak aktive edilir ve ekstraselüler matriksten (ECM) nekrotik alana doğru göç ederler. Kardiyak

fibroblastlar MI'ı takiben kardiyak tamire yardım edebilmek için çok daha kontraktıl ve sentetik bir hücre tipi olan miyofibroblast fenotipine diferansiye olurlar. Miyofibroblastlar normalde sağlıklı miyokardiyumda bulunmazken, infarkt alanda bulunan en yaygın hücre tipidir ve fibrogenezin ana efektörüdür (Peterson ve ark., 1999).

Kardiyak yeniden modellenmenin Granülasyon fazı, ölü hücrelerin ortamdandan uzaklaştırılması, ECM'nin yıkımı ve iskemik dokuda re-vaskülerizasyon için anjiyogenezin uyarılması ile karakterizedir. Granülasyon fazı, insanlarda yaklaşık 1-2 ay içinde gelişir. ECM ve fibroblast-benzeri hücrelerce zengin olan fibrotik dokunun yeniden inşa edilmesi infarktüstten sonra yaklaşık 1 ay içinde meydana gelmektedir (Dewald ve ark., 2004).

Maturasyon fazında dengeli ECM yeniden modellenmesi önemlidir, çünkü yeteri kadar dayanıklı olmayan miyokardiyal duvar kardiyak dilatasyona neden olurken; aşırı veya uzamış ECM birikmesi ise fibrozis formasyonu ile sonuçlanır. Kardiyak dilatasyon primer olarak sistolik fonksiyonu etkilerken, fibrozis miyokardiyumun elastikiyetini kaybettirir ve temelde diyastolik mekanizmayı engeller (Van Nieuwenhoven ve Turner, 2013).



Şekil 1.3. MI sonrası kardiyak yeniden modellenme

İskemik alanda devam eden iskemi ve inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu ve ECM formasyonuna zarar verirken iskemik kardiyomiyositlerin ölümüne neden olarak infarkt skar dokusunun genişlemesi ile sonuçlanmaktadır. MI'ı takiben yeniden modellenmeyi ve kalp krizini önlemek amacıyla tercih edilen bir terapötik uygulama kombine olarak inflamasyonun baskılanması ile dokuya kan akımının sağlanmasıdır (Beohar ve ark., 2010).

1.4. Miyokardiyal İnfarktüs ve Hipoksi

MI'ı takiben meydana gelen apoptoz temel olarak kısa dönemli iskemiye ve devamında reperfüzyona maruz kalan miyokardiyumda gerçekleşir (Wang ve ark., 2006).

1.4.1. HIF1

Hipoksi tarafından aktive edilen en önemli transkripsiyon faktörü hypoxia inducible factor-1 (HIF1)'dir. HIF1 oksijen ile değişime uğrayabilen alfa (HIF1 α) ve stabil kalan beta alt ünitelerinden oluşmaktadır (HIF1 β). Normoksik koşullar altında HIF1 α proteini ubiquitin-aracılı degradasyon yoluyla degrade edilir. Hipoksik koşullarda ise stabilize HIF1 α , HIF1 β ile dimer oluşturur ve hipoksi response element (HRE)'in içeren hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır.

1.4.2. Hipoksi / Re-Oksijenasyon (İskemi/Reperfüzyon)

MI sonrasında gelişen uzamış iskemik süreç hücrede hasarla ve geç evre miyositlerinin ölümüyle sonuçlanan moleküler ve yapısal değişikliklere neden olarak miyokardiyal fonksiyonda bozukluk meydana getirmektedir. Günümüzde MI tedavisi, farmakolojik (trombolitikler) veya daha invaziv olan anjiyoplasti gibi tıkanan koroner arterin yeniden açılması ile sağlanan, reperfüzyon temelli bir terapiye dayanır. Reperfüzyon terapisinin etkili olabilmesi için iskemik hasarın

başlamadan hemen sonra olabildiğince çabuk uygulanması gerekir (Hochman ve Choo, 1987). Koroner akışın düzeltilmesinde bir gecikme olması halinde, kardiyak hücre ölümü ve ventriküler yeniden modellenme süreci başlar. Oksijence zengin kanın iskemik dokuya gelmesi “reperfüzyon hasarı” olarak bilinen bir zararlı etkiye de yol açmaktadır. Post-iskemik kardiyak hücre ölümünün önlenmesi, iskemik miyokard tarafından yapılan zararı sınırlamak için en iyi tedavi yöntemini oluşturabilir.

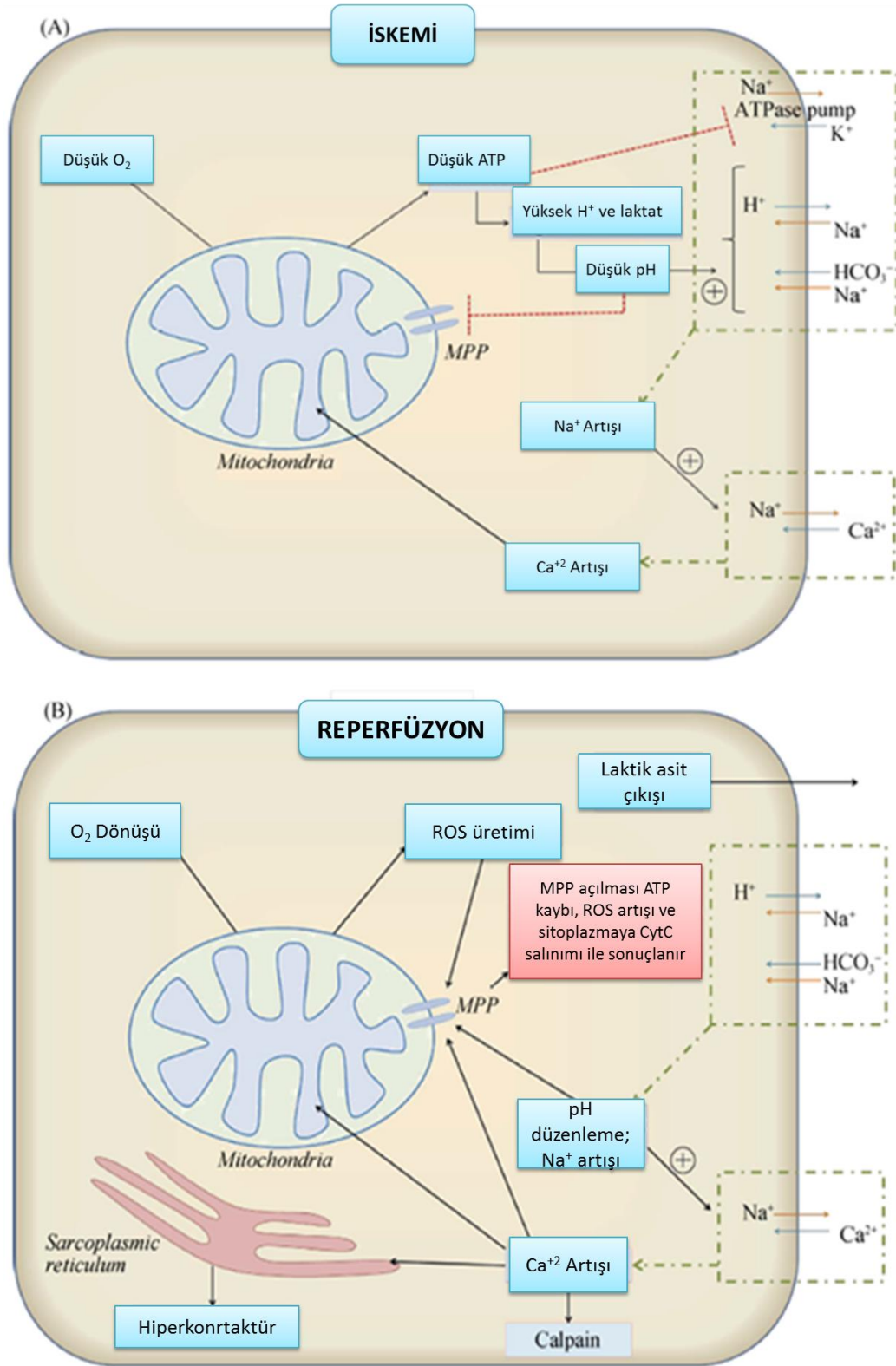
Hücrede adenosin tri-fostat'ın (ATP) yeterli olmaması, anaerobik glikolizin artmasına bağlı laktik asit üretimi ve hücrede asitliğin artması; Na^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının sitozole alınması ile seyrederek. Reperfüzyon ile birlikte hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi artar, fizyolojik pH yeniden düzenlenir, hücre içinde Ca^{+2} miktarının artmasıyla mitokondri permeabilite geçiş porları (MPP) açılır. MPP açılması mitokondrinin hasar görmesi ve mitokondriden proapoptotik Sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasına neden olarak, apoptotik iç yolağın aktivasyonu ve efektör kaspazlar aracılı hücre ölümü ile sonuçlanır.

Son yıllarda iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı geliştirilecek kardiyoprotektif stratejilere yönelik kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla ortaya atılmış olan iskemik ön-koşullama (preconditioning/ IPC): bir iskemi oluşmadan önce kalp dokusunun küçük periyotlarda iskemiye takip eden reperfüzyon sikluslarına maruz kalmasının, sonradan olası bir sürekli iskeminin yarattığı hasara karşı miyokardiyumda koruyucu etki oluşturduğunu savunan en önemli kardiyoprotektif uygulamadır (Murry ve ark., 1986). Letal iskemiye karşı miyokardiyum direnci sağlar. Sonrasında iskemik sonradan-koşullama (post-conditioning) ortaya atılmış ve buna göre reperfüzyon başlangıcında tekrar eden iskemi periyotlarının uygulanmasının da aynı şekilde miyokardiyal I/R hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2003).

IPC mekanizması tam aydınlatılamamıştır ancak iskemik kalpten salınan bradikinin, opioid peptidler, adenosin gibi G-protein eşlikli reseptör (GPCR) agonistleri tarafından sinyal transdüksiyonunun başlatılmasının, kalbin korunma mekanizması

olduğu düşünölmektedir (Downey ve ark., 2007). GPCR-ilişkili sinyal kaskadı, mitokondriyal ATP-sensitif potasyum kanallarının (mitoKATP) açılmasına neden olur. mitoKATP'nin açılması ROS üretilmesine ve mitokondriyal membran transisyonunun engellenmesine neden olarak IPC'in hücre koruma mekanizmasının parçası olarak çalışır (Forbes ve ark., 2011). Transisyonun bozulması hücreyi apoptoza karşı korur (Vigneron ve ark., 2011).

Yapılan bu çalışmalar iskemik ön ve sonradan-koşullamayı taklit eden, kardiyoprotektif etkili yeni terapötik ajanların tanımlanmasına zemin hazırlamıştır. Hayvan modellerinde uygulanan terapötik stratejilerin büyük bir kısmının kalbi I/R hasarına karşı koruduğu gösterilse de, bu terapötik ajanların büyük bir çoğunluğu klinik kullanımda bir hayal kırıklığı yaratmaktadır (Downey ve Cohen, 2009). Bu engellere rağmen miyokardiyal I/R hasarının klinik değerlendirilmesinde önerilecek yeni potensiyel ilaç hedefleri I/R patogenezi hakkındaki algımızı arttırmaktadır.



Şekil 1.4. Miyokardiyal I/R hasarı

İskemiye bağılı miyokardiyal hücre ölümü hem iskemi, hem de reperfüzyon tarafından harekete geçirilen kompleks bir biyokimyasal kaskat ile yönetilir (Şekil 1.4.) (Turer ve Hill, 2010). Miyosit hasarı, en genel anlamda iki farklı hücre ölüm yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır: nekroz ve apoptoz (Searle ve ark., 1982). Nekroz; patolojik koşullar altında lethal eksojen uyarana karşı geliştirilen akut cevaptır. Nekrotik hücre ölümü hücreşel şişme, hücre membranının rüptürü ve hücreşel bileşenlerin salınması (kreatin kinaz, troponin gibi) ve devamında gelişen inflamasyon ile karakterizedir. Apoptoz; ATP-bağımlı bir süreç olup moleküler, biyokimyasal ve morfolojik olayların bir arada seyrettiğı ölüm yolağıdır. Hücre rüptürü ile sonuçlanmaz ve inflamatuvar yanıtı başlatmaz. Apoptotik hücreler normal süreçte çevresindeki hücrelerce fagosite edilir ancak bu süreçte herhangi bir aksama olursa apoptotik hücreler sekonder nekroza yönelir. MI sonucunda hücreler daha yüksek oranda nekrotik miyositler (hem primer, hem sekonder) olarak ölüme giderken apoptotik ölüme göre daha büyük lezyonlara sebep olur (Chen-Scarabelli, 2014).

I/R hasarını takiben kaybedilen hücre sayısına nekroz ve apoptozun göreceli katkıları açık bir şekilde ortaya koyulamamıştır. Hücredeki ATP eksikliğinin derecesi, hasarlı miyositlerin ölümünde belirleyici bir faktördür (Leist ve ark., 1997). Oksijen ve enerjiden yoksun olan infarkt alanda miyositler genelde nekroz ile ölürken, yine hipoksik olan peri-infarkt bölgedeki miyokardiyal hücre ölümleri hem apoptoz hem de nekroz yoluyla olmaktadır (Anversa ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda apoptotik programın basamaklı bir şekilde gerçekleştiğine dair kanıtlar gösterilmiştir ki bunlara göre apoptoz, iskemi sırasında başlatılır ancak reperfüzyon sırasında son bulur (Freude ve ark., 2000).

1.5. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum (ER) tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, hücre homeostazının düzenlenmesinde primer göreve sahip hayati bir organeldir. Birbirine bağılı, dallanmış membran benzeri tübüller, veziküller ve sisternadan oluşan bu farklı

subselüler yapısı gereği ER sayısız fonksiyona sahiptir. Aynı zamanda mitokondri ile yakın ilişki içerisindedir. Granüllü ER, Granülsüz ER ve dış nükleer zarfın oluşturduğu bölgeleri içerir. Dış yüzeyinde ribozom taşıyıp taşıyamama durumuna göre granüllü ve granülsüz olmak üzere iki gruba ayrılır. Granüllü ER, dış yüzeyinde ribozom taşır ve plazma membran proteinleri ve ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi ve sekresyonunda temel görevi vardır. Granüllü ER özellikle antikor üreten plazma hücreleri, insülin salgılayan beta hücreleri gibi sekretuar hücrelerde çok yoğunlukta görülür. Granülsüz ER ise ribozomdan yoksundur ancak yağ asitleri ve fosfolipitlerin sentezi, lipit bilayer tabakanın teşekkülü, karbohidrat metabolizması ve kalsiyum homeostazının regülasyonunda anahtar roledir.

Sarkoplazmik retikulum (SR), ER'nin kas hücrelerinde bulunan özelleşmiş bir formudur ve kas kasılması sırasında kontraksiyon ve relaksiyonda gerekli olan büyük miktarlarda kalsiyumun depolanması ve salınması en önemli fonksiyonudur (Alberts ve ark., 2008).

1.5.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

ER oldukça dinamik bir organeldir ve kompleks fonksiyonu hücre içinden ve dışından gelen birçok parametreye bağlı olarak değişebilir. Sekrete, membran bağımlı ve bazı organel hedefli proteinlerin sentezi ve katlanmasının gerçekleştiği primer bölgedir. Yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık üçte biri, ER'ye taşınır ve burada ER şaperonları ve oksidoredüktazların yardımı ile katlanır ve bir araya gelirler (Ghaemmaghami ve ark.,2003). ER lümeni protein katlanması için uygun bir ortam olarak özelleşmiştir (Ron ve Walter, 2007). ER serbest kalsiyum konsantrasyonlarını ihtiva eder. Glukoz-Regüle edici Protein78 (GRP78) gibi ER'de yerleşik ER şaperonları, kalsiyum-bağımlı bir şekilde polipeptit hidrofobik bölgelerinin içe doğru katlanmasını sağlar (Gething, 1999).

ER lümeninde protein katlanmasının gerçekleşebilmesi için optimum koşullar ATP, Ca^{+2} ve disülfüt bağı oluşumuna imkan veren yükseltgen çevre ile sağlanmaktadır

(Gaut & Hendershot, 1993). Redoks durumu veya Ca^{+2} konsantrasyonu gibi hücrel enerji seviyelerini altüst eden koşullar, ER’de protein katlanma kapasitesini azaltmaktadır. Bu koşullar ve ilaveten proteinlerin doğru katlanmasına zarar veren, katlanma sonrası sürecini veya ER içerisinde taşınmasını engelleyen protein mutasyonları, hücre içerisinde katlanmamış proteinlerin birikmesi ve agregasyonu ile sonuçlanır. Bu hücrel olay “**ER stresi**” olarak adlandırılır. Protein katlanması, şaperon proteinleri, foldazlar, glikozile edici enzimler ve uygun kalsiyum seviyesi ve yükseltgen çevrenin interaksiyonuna bağlı kompleks bir süreçtir. ER stresi, bu sürece zarar vererek katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açar. Hücrede bu katlanmamış, yanlış katlanmış, çözünmeyen veya bir başka sebepten hasarlı proteinler hücrel fonksiyonlara zarar verir ve hücrenin canlılığına karşı proteo-toksik bir tehdit oluşturur.

ER stresinin hücreye zarar verici etkisinin üstesinden gelmek için, hücreler “**Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)**” olarak tanımlanan bir dizi adaptif ve protektif strateji geliştirmişlerdir. ER stresinin devam etmesi lethal bir etki yaratarak, hücrede ER stresi aracılı apoptozun indüklenmesine neden olur. ER stresinin indüklenmesinde nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve diyabet gibi ER stresi ile ilişkili olan birçok sistemik hastalık söz konusudur (Healy ve ark., 2009; Doyle ve ark., 2011). Sistemik hastalıklar dışında patofizyolojik uyarılar da UPR aktivasyonu yapar. Hipoksi, hipoglisemi, hipertermi, asidosis, kalsiyum seviyeleri ve enerji seviyeleri (hipoksi ve hipoglisemi tarafından kontrol edilir) gibi diğer faktörlerin etkisi, ER’nin fonksiyonunda bozukluğa sebep olarak ER lümeninde protein katlanmasında hasar ve ER stresi ve ile sonuçlanır. Hipoksi, Anjiyotensin II ve tümör nekroz faktörü (TNF)’nün, kültüre kardiyomiyositlerde adaptif ve proapoptotik yolları aktive ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Terai ve ark., 2005, Okada ve ark., 2004, Zhao ve ark, 2008).

ER oksidatif strese oldukça duyarlı olan organellerden birisidir. ER lümeni içerisinde yüksek kalsiyum konsantrasyonları, spesifik olarak ER’de yerleşik şaperonların protein katlanmasında yer alabilmeleri için gereklidir (Xu ve ark., 2005). Ancak hücrede oluşturulan ROS, İnositol 1,4,5- trifosfat kontrolündeki kanallar ve sarko-ER

Ca transport ATPazları regülasyonu ile intraluminal kalsiyumu serbest bırakır (Ermak ve Davies, 2002). Ayrıca ROS, direkt olarak ER lümeni içinde redoks homeostazını bozar ki lümen, protein katlanması ve disülfit bağ oluşumu için özelleşmiştir (Gorlach ve ark., 2006). Özetle ROS'un yanlış katlanmış protein birikimini indüklediği ve ER stresine neden olduğu düşüncesi kabul görmektedir. Miyazaki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada miyokardiyal I/R modelinde, reperfüzyon sonrası eksojen ROS (özellikle süperoksit) üretiminin, ER stresinin indüklenmesinde kritik rolü üstlendiği gösterilmiştir (Miyazaki ve ark., 2011).

ER içindeki yükseltgen çevre, protein disülfit izomeraz (PDI) ve ER oksidoredüktin 1 (ERO1) tarafından disülfit bağlarının kurulmasında temel rolde dir. ERO1 oksijen ile birlikte terminal elektron alıcısı olarak görev alır (Simmen ve ark., 2010).

Hücrede yanlış katlanan proteinler, herhangi bir tamir mekanizması olmadığı için 2 ayrı mekanizma aracılığı ile hücreden uzaklaştırılır.

- **ER-aracılı degradasyon (ERAD):** Yanlış katlanan ER proteinleri, ERAD veya retrotranslokasyon yoluyla ER'den sitozole çıkartılır (Ron ve Walter, 2007). Birçok ERAD substratı ubiquitinlenir ve proteozomlara taşınarak degrade edilir.

- **Agrezom formasyonu:** Hasarlı proteinler diğer hücre sel de brilerle birlikte juxtannükle ar kompleksler içinde bir arada bulunur ve otofaji aracılığı ile geri dönüşümleri yapılır. Bu süreç, şaperon aracılı otofaji olarak adlandırılır. Hatalı hücre sel yapıları hücre ye geri kazandıran otofajinin, ER stresi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Birçok çalışma şiddetli ER stresinin otofajik süreci aktive ettiğini ve otofajinin bloke edilmesinin hücre de ER stresini arttırarak hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir (Ogata ve ark., 2006; Yin ve ark., 2012).

Hücre de katlanmamış proteinlere karşı gelişen stres yanıtı olan UPR, stresin derecesine göre farklı bir yol izlemektedir. Hafif veya kısa süreli stres, hücre sel yanıtı aktive ederek başlatıcı stresin nötrale edilmesi veya strese adaptasyonun

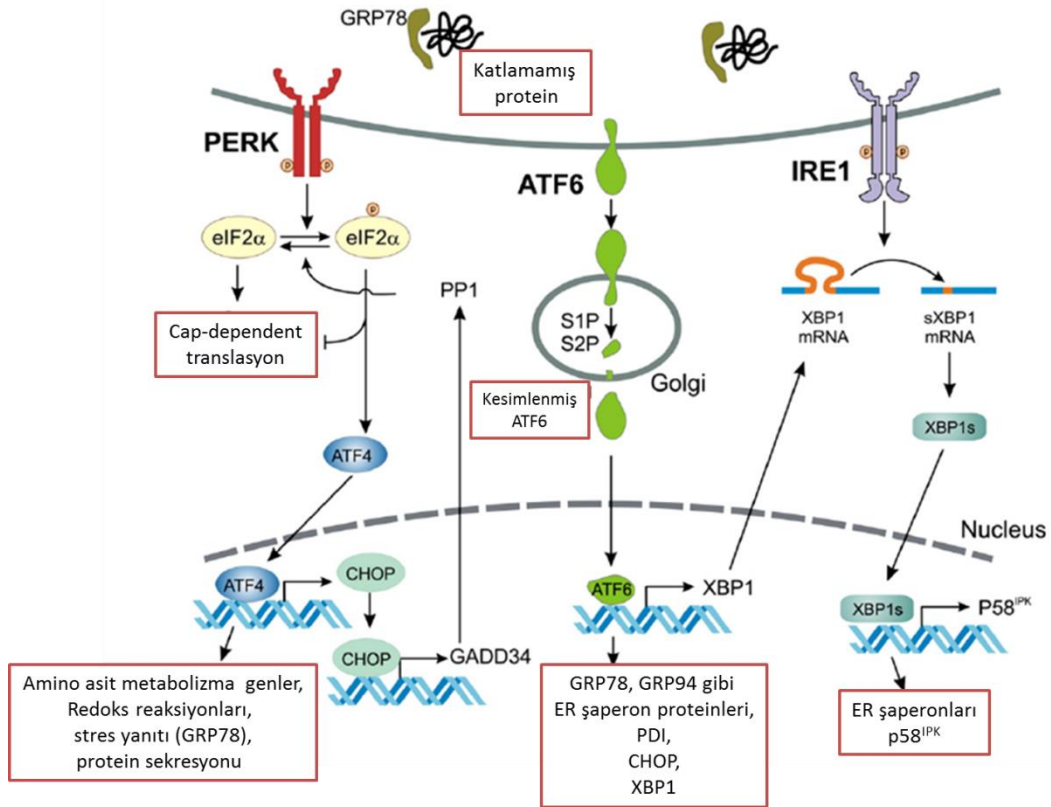
sağlanması yönünde çalışır. Ancak şiddetli veya uzun süreli stres, hücre ölümüne neden olan proapoptotik modülün aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Her iki durumda da stresi başlatıcı sinyal (ER'nin içinde biriken yanlış katlanmış proteinler) ER membranından sitoplazmaya; devamında nükleusa taşınarak gen ekspresyon paternlerini, adaptasyon-sağkalım veya apoptoz yönünde etkilemektedir.

1.5.1.1. ER Stres Yanıtında Temel Regülatörler

ER stresine karşı, hücrede fizyolojik olarak gelişen cevabın başlatılması ER'de yerleşik veya sitozolde bulunan bir dizi molekül ile yakından ilişkilidir. Kalsiyum bağımlı moleküler şaperonlar GRP78, GRP94, Calnexin, Calretikulin; posttranslasyonel modifikasyonda yer alan enzimlerden protein disülfid izomeraz (PDI), oksidoredüktaz; protein glikozilasyonu ve lipitasyonda görevli proteinler; lipid ve membran biyosentezinde görevli diğer birçok protein ER lümeninde yer almaktadır.

UPR bir düzen içinde gerçekleşen ve kompleks bir hücresel yanıt sürecidir. Pankreatik ER-kinaz (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK), Aktive edici Transkripsiyon Faktörü-6 (ATF6) ve İnositol-Gerektirici Enzim 1 (IRE1 veya ERN1) gibi 3 temel ER transmembran reseptörü aracılığı ile düzenlenir. Normal şartlardaki hücrede, her üç ER stres reseptörü de ER şaperon proteini GRP78 aracılığı ile inaktif durumunu sürdürür. ER stresini tetikleyecek koşullarda GRP78, biriken katlanmamış proteinlere bağlanmak için ER reseptörlerinden ayrılır ve süreç ER stres reseptörlerinin aktivasyonu ile UPR'nin başlatılması ile sonuçlanır.

GRP78 ile interaksiyonda olan IRE1 ve PERK'in ER-luminal bölgeleri oldukça korunmuş bölgelerdir, ancak ATF6 bu ölçüde korunmuş değildir. Mayada IRE1, GRP78 ayrılmasından ziyade, reseptör-benzeri şekilde luminal bölgelerinden katlanmamış proteinlere direkt bağlanarak aktive olmaktadır (Gardner & Walter, 2011).



Şekil 1.5. UPR'nin temel regülasyonu (Gorman ve ark., 2012)

1.5.1.1.1. Temel Regülatör GRP78

Birçok ER-proteini arasından öne çıkan GRP78'dir; çünkü kalsiyum bağlanması yapması ve protein işleme fonksiyonu gibi özellikleri nedeniyle erken ER stres/UPR başlatıcısı olarak görev almaktadır. GRP78'in kültür medyumunda glukozun sınırlı bulunması durumunda stimule edilerek hücrel stres koşullarında translasyonu arttırıldığı gösterilmiştir (Lee, 2001). Normal şartlardaki bir hücrede çok düşük miktarda eksprese olurken, özellikle ER stresi başladığında ekspresyonu arttırılır (Healy ve ark., 2009; Zhang ve Zhang, 2010).

GRP78, ER içindeki şaperon proteinleri olarak tanımlanan ısı şok protein 70 (HSP70) ailesinin bir üyesidir. Son yıllarda GRP78'in ER dışında sitozolde (Ni ve ark., 2009), mitokondride (Sun ve ark., 2006), nükleusta (Matsumoto ve Hanawalt,

2000) ve tümör hücrelerinin hücre yüzeyinde (Zhang ve ark., 2010) de bulunabileceği gösterilmiştir.

GRP78 proteinlerin katlanmamış bölgelerindeki hidrofobik rezidüleri tanır ve bu bölgelere bağlanır (Gething ve ark., 1999). ER lümeninde biriken katlanmamış proteinler, ER stres mediyatörlerine bağlanmak için GRP78 ile rekabete girer ve bu rekabet GRP78'in ayrılması sonrası mediyatörlerin aktivasyonu ile sonuçlanır. GRP78 konformasyonel değişime uğrayana kadar substrat proteinlerine bağlı olarak stabil kalır. GRP78'in üç ER stres mediyatörünün luminal bölgesinden ayrılması tamamen bu yarışmacı mekanizma ile açıklanamamış ve ko-şaperonların da GRP78 salınımını stimüle ettikleri önerilmiştir (Shen ve ark., 2005).

GRP94 ise GRP78 promotörü ile ortak transkripsiyonel regülatör elementlere sahiptir ve GRP78 ile koordineli regülasyonu yapar. ER'de yerleşik şaperonların aşırı ekspresyonu protein katlanmasına ve ER stresinin azaltılmasına yardımcı olur (Cohen ve Kelly, 2003).

Stres durumunda olmayan hücrelerde ER lümeninde bulunan GRP78, 3 farklı ER transmembran proteinine bağlanır ve bu proteinlerin aktivitesini baskılayarak inaktif halde tutar:

- 1- Pankreatik ER-kinaz (PKR)-benzeri ER kinaz (**PERK**) (Fels ve Koumenis, 2006),
- 2- Aktive edici Transkripsiyon Faktörü 6 (**ATF6**) (Sommer ve Jarosch, 2002),
- 3- İnositol-Gerektirici Enzim 1 (**IRE1**) (Ron ve Hubbard, 2008),

Hücrede ER stresi başlaması ve yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi ile birlikte GRP78 şaperonu, PERK, IRE1 ve ATF6'dan ayrılır ve bu proteinlerin aktivasyonu ile ER stres yanıtı/UPR'yi başlatmış olur (Malhotra ve Kaufman, 2007). GRP78, transkripsiyon faktörleri ATF6 (Yoshida ve ark., 1998) ve ATF4 (Luo ve ark., 2003) aracılığı ile ER stresi tarafından upregüle edilir. GRP78 proteininin artması hem ER içindeki protein katlanmasına yardım eder, hem de

PERK, ATF6 ve IRE1'in luminal bölgelerinden bağlanarak mediyatörleri inaktif edebilir. Böylece GRP78, feed-back mekanizmasının bir parçası olarak proteinlerin yeniden katlanmasına yardım eder ve UPR inaktivasyonu yapar.

1.5.1.1.2. PERK

ER stresi ile aktive olan ilk ER stres reseptörüdür. Sitoplazmik katalitik bölge ve luminal GRP78-bağlantı bölgesinden oluşan serin/threonin transmembran protein kinazdır. Stres koşulundaki hücrede UPR'nin ilk adımı olarak PERK, oligomerizasyon ve sitoplazmik katalitik bölgesinin trans-otofosforilasyonu ile aktive olur. Aktive PERK daha sonra ökaryotik inisiyasyon faktörü 2 alfa (eIF2 α) alt ünitesini fosforiller ve tranlasyon inisiyasyon kompleksinin (eIF2 α -GTP-Met-tRNAi) bir araya gelmesini engeller, böylece genel (cap-dependent) protein translasyonunu baskılamış olur (Harding ve ark., 1999). Genel protein sentezinin baskılanması hem ER'ye daha fazla protein birikimini önler; hem de siklin D1 birikimini bloke ederek hücrelerin G1 evresinde tutulmasına neden olur (Hamanaka ve ark., 2005).

PERK^{-/-} olan fare embriyonik fibroblast hücrelerinin (MEF), ER-stres indükleyici bir ajan ile muamele edildiğinde, protein translasyonunu baskılayamadıkları ve hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir. Devamında Sikloheksimid muamelesi ile translasyonun baskılanması sonucu ER-stresince indüklenen ölümün azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar katlanmamış protein birikiminin engellenmesinin, hücre sağkalımı açısından oldukça önemli olduğunu göstermektedir (Harding ve ark., 2000b).

eIF2 α fosforilasyonu ve genel protein sentezinin baskılanmasına rağmen, UPR'de görevli olan proteinlerin translasyonu, eIF2 α -bağımsız alternatif translasyon yolağı (cap-independent) ile devam eder. Bunlar arasından en iyi karakterize edilen Aktive edici Transkripsiyon Faktörü 4 (ATF4)'tür (Vattem ve Wek, 2004). ATF4, CCAAT/enhancer bağlayıcı protein (C/EBP) ailesi üyesi transkripsiyon faktörüdür.

ATF4 translasyonu, eIF2 α fosforilasyonu öncesinde upregüle olur ve amino asit metabolizması, redoks reaksiyonları, stres yanıtı ve protein sekresyonunda görevli genleri indükleyerek hücre sağ kalımını arttırıcı yönde etki yapar.

PERK aktivasyonunu takiben, ATF4 sitoprotektif etkili protein Stanniocalcin 2 (STC2) (Ito ve ark., 2004) ve GRP78'in (Luo ve ark., 2003) aktivasyonunu yapar. Bu yönü ile ATF4 iyileşme ve adaptasyon ile ilgili genlerin transkripsiyon faktörü görevindedir (Harding ve ark., 2003). Ancak ATF4 tarafından indüklenen genlerin tamamı hücre canlılığı ile ilişkili değildir. Hücrede apoptozu indüklediği düşünülen transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteini (CHOP)'un (Wang ve ark., 1996) induksiyonu ATF4 ile önemli şekilde ilişkilidir (Harding ve ark., 2000a). PERK aktivasyonu başlangıçta orta dereceli ER stresi karşısında koruyucu ve sağkalım yönünde sinyal sağlar. Ancak PERK aktivasyonu ATF4 üzerinden CHOP induksiyonu yaparak sağkalım sinyalini ölüm sinyali yönünde değiştirir.

PERK'in ikinci hedefi transkripsiyon faktörü, nüklear faktör (eritroid-derive 2)-ilişkili faktör 2 (NRF2)'dir. NRF2 fosforilasyonu, inhibitörü olan KEAP1'den ayrılarak serbest hale gelmesini ve oksidatif stres sinyali ile ilgili hedef genleri indüklemesine neden olur (Cullinan & Diehl, 2004).

Stres ile indüklenebilir protein p58^{IPK}, HSP40 ailesi üyelerindedir ve yeniden katlanma için HSP70'i uyararak stres mediyatörü PERK'in inhibitörü olarak bilinmektedir (Melville ve ark., 1999). p58^{IPK}'nin PERK'in kinaz bölgesi ile interaksiyon kurarak inhibe ettiği ve p58^{IPK} ekspresyonunun eIF2 α fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Yan ve ark., 2002; van Huizen ve ark., 2003). p58^{IPK} ekspresyonu X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) tarafından regüle edilir ve ER stres koşullarında PERK aktivitesini sınırlayarak negatif feed-back mekanizması olarak çalışır. p58^{IPK}'nin ER lümeni içinde lokalize olduğu ve GRP78'in ko-şaperonu olarak davrandığı da rapor edilmiştir (Rutkowski ve ark., 2007).

1.5.1.1.3. ATF6

ER stresinin çeşitli etkenlerle indüklenmesi sonucu PERK'i takiben ATF6 aktivasyonu gerçekleşir. ER içerisinde konstitütif olarak 90kDa transmembran proteini olarak eksprese edilir. Diğer ER stres reseptörlerinin aksine GRP78'in ayrılmasından sonra oligomerizasyon ve otofosforilasyon yapmaz; Golgi'ye transloke olarak sitozolik N-terminal temel lösin fermuar bölgesinden, SP1 ve SP2 proteazlarınca kesimlenerek 50kDa'luk çözünebilir bir fragment oluşturur (intramembran proteolizis) (Ye ve ark., 2000). Sonrasında ATF6, nükleusa transloke olarak promotorida ER stres response elementi (ERSE) taşıyan genlerin transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösterir (Yamamoto ve ark., 2005). ATF6'nın önemli hedefleri içinde şaperon proteinleri (GRP78, GRP94), Transkripsiyon Faktör XBP1, PERK inhibitör proteini p58^{IPK}, transkripsiyon faktörü CHOP (Haze ve ark., 1999; Ye ve ark., 2000; Yoshida ve ark., 2001; van Huizen ve ark., 2003) bulunmaktadır.

1.5.1.1.4. IRE1

GRP78'in ayrılmasını takiben PERK ile aynı mekanizma ile otofosforile ve aktive olarak endonükleaz fonksiyonu kazanır. Sitoplazmik kısmı içerisinde serin-treonin kinaz bölgesi ve C-terminal endoribonükleaz bölgesine sahiptir. Aktivasyonu sonrası XBP1 mRNA'sının kesimlenmesini yaparak XBP1 sprints formunun translasyonunu sağlar. XBP1'in sprints olan aktif formu, bir transkripsiyon faktörü olarak ERAD ve protein katlanmasında gerekli olan genlerin ekspresyonunu kontrol eder (Ron ve Hubbard, 2008).

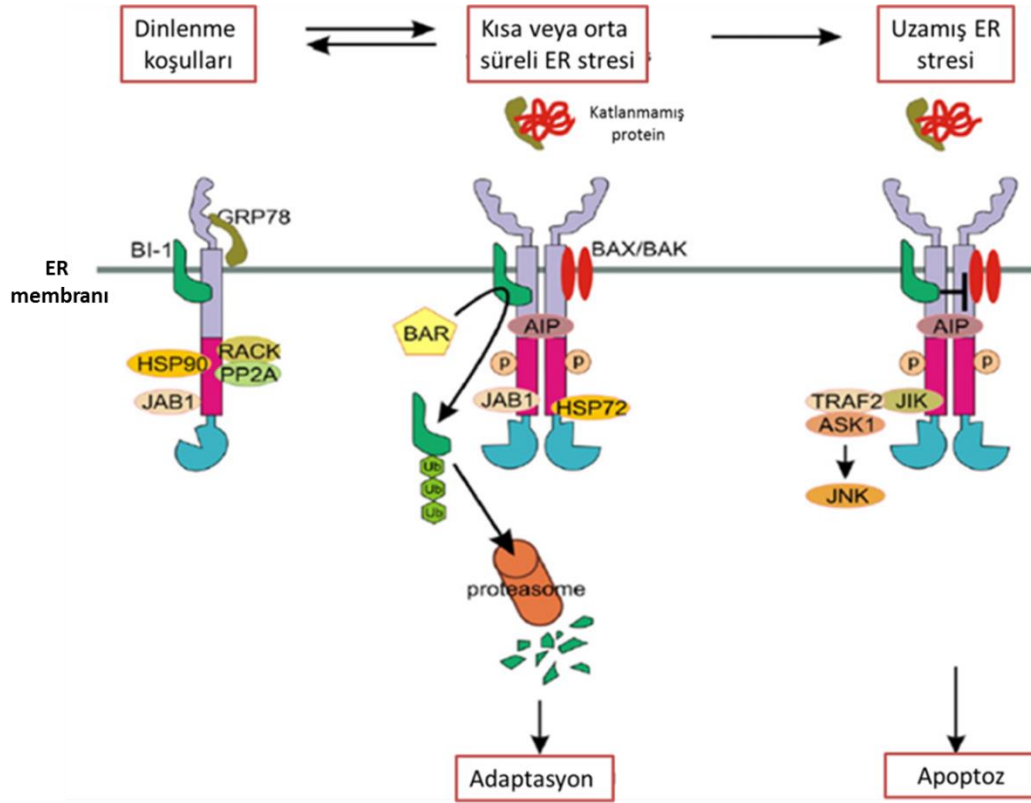
IRE1 aktivasyonu sonrası, endonükleaz aktivitesi sayesinde membran ve sekrete proteinleri kodlayan mRNA'ların hızlı bir degradasyonunu gerçekleştirir. Bu yolak "Regüle edilmiş IRE1-Bağımlı Degradasyon (RIDD)" olarak adlandırılmaktadır (Hollien ve ark., 2009).

IRE1 aktivitesi, UPRozom olarak tanımlanan ve kompleks halinde etkileşim içindeki birkaç protein tarafından düzenlenir (Hetz ve Glimcher, 2009). Deneysel olarak uzatılmış IRE1 sinyali (XBP1 splayı ile belirlendiği gibi), ER stresinden bağımsız olarak hücre sağ kalımını indükler (Lin ve ark., 2007; Lin ve ark., 2009). ER stres durumunda IRE1 PERK'ten önce inaktif olur, bu nedenle PERK sinyali hala devam ederken IRE1'in sitoprotektif fonksiyonu uzun süre devam edemez (Lin ve ark., 2007). IRE1 sinyal süresini modüle eden mekanizmalar hücre kaderini etkileyebilir.

B-hücreli Lenfoma (Bcl2) aile üyeleri, ER'de Ca^{+2} homeostazını ve ER-mitokondri iletişimini etkileyerek indirekt olarak ER stresince indüklenmiş apoptoz mekanizmasına dahil olur (Szegezdi ve ark., 2009). Bcl2 aile üyeleri ayrıca direkt olarak IRE1 ile interaksyonda bulunur, ER stresi boyunca fonksiyonunu düzenler ve IRE1 sinyali düzeyinde ER stresince indüklenmiş ölümü düzenler (Hetz ve ark., 2006) (Şekil 1.6.). BAX ve BAK, ER stres bağımlı bir şekilde IRE1 ile kompleks oluştururlar. BAX/BAK eksikliği olan hücrelerde, ER stresi sırasında XBP1 splayının ve IRE1 fosforilasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Hetz ve ark., 2006). BAX ve BAK ile IRE1 interaksyonu, IRE1 aktivasyonu için çok önemlidir ve IRE1'in pro-apoptoik sinyale doğru kaymasını mümkün kılar. BAX/BAK eksikliği olan hücrelerde, ER hedefli BH3-only proteinleri Bim veya Puma ko-ekspresyonu, XBP1 splayı olmaksızın IRE1-bağımlı olarak c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonu ile sonuçlanır (Klee ve ark., 2009).

Bax ve BAK ile IRE1 kompleksinin ayrılması BAX İnhibitör1 (BI-1)'den etkilenir. BI-1, ER ve nüklear zarf üzerinde lokalize transmembran proteindir ve BAX tarafından indüklenen hücre ölümünü baskılar (Robinson ve ark., 2011). BI-1, IRE1'in sitoplazmik kısmı ile kompleks oluşturur. BI-1 eksikliği, artmış IRE1 aktivitesi ve arttırılmış XBP1 kesimlenmesi ile sonuçlanırken, BI-1 aşırı ekspresyonu IRE1 ve Bax/BAK interaksyonunu engeller (Lisbona ve ark., 2009). BI-1, bir ER-lokalize Tip E3 ligaz olan Bifonksiyonel Apoptozis Regülatörü (BAR) tarafından proteozomal degradasyon ile regüle edilir. Böylece BI-1 tarafından yapılan IRE1 blokajı kaldırılmış olur (Rong ve ark., 2011). Ancak BAR, ER stres sırasında

downregüle olur, paralel olarak BI-1 artarak uzamış ER stresi boyunca IRE1 sinyalini inhibe eder.



Şekil 1.6. IRE1 sinyali ve apoptotik ölüm ile ilişkisi (Gorman ve ark., 2012)

IRE1'in ER stresine karşı XBP1 splayını gerçekleştirerek prosurvival yönünde etki göstermesi, ER stresinin uzaması ve katlanmamış proteinlerin hücreden elimine edilememesi sonucu proapoptotik bir mekanizmaya doğru kayar. IRE1, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR-) ilişkili faktör2 (TRAF2)'nin bir araya gelmesini uyararak apoptoz sinyal-regüle edici kinaz1 (ASK1) ve JNK aktivasyonuna neden olur (Urano ve ark., 2000; Nishitoh ve ark., 2002). Uzamış ER stresinde JNK aktivasyonu, anti-apoptotik Bcl2 grup proteinlerini inhibe ederken, proapoptotik BH3-only proteinlerinin (Bid ve Bim gibi) fosforilasyonu ve aktivasyonunu gerçekleştirir (Schönthal, 2012). Tüm bu sürecin kombinasyonu Bak ve Bax'ın oligomerizasyonuna yol açarak mitokondri dış membran permeabilizasyonunun artması ve intrinsik apoptotik sürecin başlatılması ile sonuçlanmaktadır (Jäger ve ark., 2012) (Şekil 1.6.).

1.5.1.1.5. Isı Şok Proteinleri (HSP)

Stres proteinleri olarak da bilinen HSP'ler, ekspresyonları farklı türde hücrel stresler tarafından indüklenen hayli korunmuş proteinlerdir (Concannon ve ark., 2003). HSP'lerin güçlü sitoprotektif etkileri mevcuttur ve diğer hücrel proteinlerin moleküler şaperonları olarak görev alırlar. Akut veya kronik faz stres sırasında anormal aktivasyon gösteren hücrel sinyallerin sonucu olarak proteinlerin yanlış katlanması ve agregasyonu; ayrıca düzenleyici komplekslerin hasara uğraması söz konusu olur. Protein homeostazisindeki rolleri nedeniyle şaperonların aktivasyonu hücrede dengeyi sağlamaktadır.

ER lümeni içerisinde yerleşik, protein katlanmasına yardımcı olan HSP homologu GRP78'dir. HSP'ler hem sitoplazmik hem de ER-luminal bölgesinde ER stresini regüle edebilirler. ER stres mediyatörlerinin sitoplazmik HSP'ler ile etkileşimleri, genel hücrel stres ve UPR sinyalinin bir araya getirilmesini sağlamaktadır.

Memeli HSP'leri büyüklüklerine göre iki grup altında sınıflandırılmaktadırlar: **Yüksek moleküler ağırlıklı HSP'ler**, üç büyük şaperon ailesini içerir; HSP90, HSP70 ve HSP60. Bu şaperonlardan bazıları hücrede konstitütif olarak eksprese olurken, bir kısmı stres koşullarında indüklenir. Bu proteinler farklı sub-selüler kompartmanları hedefler. Yüksek moleküler ağırlıklı HSP'ler ATP-bağımlı şaperonlardır. Konformasyonlarını düzenlemek ve ATP bağlanması için ko-şaperonlara ihtiyaç duyarlar. **Düşük moleküler ağırlıklı HSP'ler** (HSP27 gibi) ise ATP-bağımsız şaperonlardır (Parcellier ve ark., 2003).

Farklı HSP'ler arasında HSP27 ve HSP70, antikanser ilaçları, oksidatif stres veya radyoterapi sonrası kuvvetle indüklenen önemli şaperonlardır. Transforme olmamış hücrelerde çok düşük düzeylerde eksprese olurlarken, kanser hücrelerinde abundant olarak eksprese edilmektedir ve bu yönleriyle malign hastalıklarda prognostik faktör olarak kullanılabilirler (Garrido ve ark., 2006).

HSP90'ın fiziksel olarak IRE1 ve PERK'in sitoplazmik kısımları ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (Marcu ve ark., 2002). Bu interaksiyon HSP90 inhibitörleri ile engellendiğinde, IRE1 ve PERK proteinleri yarı-ömürlerinde azalma ve protein miktarında düşüş ile kendini gösterir. Ancak HSP90 inhibitörlerinin, ER stresi durumunda translasyonel azalmayı engellemediği ve azalmış miktardaki PERK'e rağmen translasyon blokajı yapıldığı da gösterilmiştir.

1.5.1.1.5.1. HSP72

Şaperon aktivitesi ATP bağımlı olan stresle-indüklenebilir HSP70 ailesi üyelerindedir (Young, 2010). Etkili aktivite için ko-şaperonlara da ihtiyaç duymaktadır. HSP72'yi aşırı eksprese eden hücrelerin ER stresince indüklenen hücre ölümüne karşı korunaklı oldukları bulunmuştur (Gupta ve ark., 2010b). Bu hücrel koruma sadece apoptotik mekanizma üzerindeki etkisine bağlı değil, aynı zamanda kesimlenmiş XBP1 splayı (sXBP1) üretilmesine de bağlıdır. HSP72 aşırı ekspresyonu, ER stresi süresince arttırılmış ve uzamış XBP1 kesimlenmesine ve IRE1 stimülasyonuna neden olur. Ko-immünprespitasyon deneyleri, IRE1 sitoplazmik kısmı ve HSP72 ATPaz bölgesi arasında bir fiziksel interaksiyon olduğunu kanıtlamıştır (Gupta ve ark., 2010a). HSP72'nin diğer UPR stres yolları ile iletişimi sağlayan merkezi bir yapısı vardır. HSP72 normalde stres altında olmayan hücrelerde eksprese olmazken, kanser hücrelerinde çok yüksek seviyelerdedir. Kanser hücrelerinde HSP72, IRE1 ile kompleks oluşturur, XBP1kesimlesini uyarır ve pro-survival sinyalleri arttırır.

1.5.1.2. ER Stresi ve Kardiyak I/R veya H/R İlişkisi

I/R veya hipoksi/re-oksjenasyon'a (H/R) maruz kalan miyokardiyumda veya kültüre kardiyomiyosit hücrelerinde hasara bağlı gelişen ER stresi ve UPR aktivasyonu yapılan sayısız çalışma ile ortaya konmuştur.

Thuerauf ve ekibinin yaptıkları çalışmada dominant negatif XBP1 ile muamele edilen kültüre kardiyak miyositlerde, XBP1 yolağının inhibe olduğu ve bağlı olarak H/R sonucu oluşan apoptozda artış tespit etmişlerdir (Thuerauf ve ark., 2006).

Martindale ve arkadaşları tarafından yapılan alışma, ATF6 yolağının miyokardiyumda oluşan I/R hasarına karşı miyokardiyumun korunmasına katkı sağladığına dair ilk çalışmadır (Martindale ve ark., 2006). Tamoksifen tarafından aktive edilen ve kardiyak-sınırlı ATF6 genini taşıyan transgenik fare modelinde çalışılmıştır. Tamoksifen muamelesiyle ATF6'nın akut aktivasyonu sonucu potansiyel koruyucu proteinlerin (GRP78, GRP94, PDI ve ERp72) ifadesinde artışa bağlı olarak I/R hasarında azalma ile nekroz ve apoptozda d şuş olduğu saptanmıştır.

Vitadello ve arkadaşları ise, XBP1 ve ATF6'nın kontrolünde olan GRP94 aşırı ekspresyonunun kalsiyum birikmesi veya iskemi nedeniyle oluşan nekrozdan H9C2 kardiyak hücrelerini koruduğunu saptamışlardır (Vitadello ve ark., 2003) Daha önce yapılan çalışmalar da koruyucu proteinler hipotezini destekler şekilde, GRP78 pre-indüksiyonunun miyositleri oksidatif hasardan koruduğunu (Zhang ve ark., 2004) göstermektedir.

ATF6 inhibitörü olan 4-(2-aminoethyl) benzen-sülfonil fl oride ile muamele edilen farelerde, kardiyak fonksiyonun azaldığı ve MI sonrası ölümün arttığı gösterilmiştir (Toko ve ark., 2010).

Kültüre kardiyomiyositlerde ATF6'nın MANF (mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor) genini indüklediği ve miRNA ile endojen MANF baskılandığında I/R sonrası hücre ölümünün arttığı ve kültür medyumuna eklenen rekombinant MANF'nin I/R aracılı  l me karşı kardiyak miyositleri koruduğu gösterilmiştir (Tadimalla ve ark., 2008).

Ayrıca ATF6 aktivasyonu ile indüklenen Derlin-3' n ERAD mekanizmasında önemli bir bileşeni kodladığı; Derlin-3 aşırı ekspresyonunun ERAD'ı arttırarak

iskemice indüklenmiş ölümden kardiyomiyositleri koruduğu bir çalışmada gösterilmiştir (Belmont ve ark., 2010).

1.5.1.3. ER Stres İndükleyici Ajanlar

ER stresini indüklediği gösterilmiş hücrede stres yaratan ve normal koşullarda da metabolizmanın birer ürünü olarak sentezlenen veya sentetik olarak üretilmiş bazı ajanlar çeşitli yollar üzerinden ER stres aktivasyonu yapabilir. ER stresinin indüklenmesi hücrede adaptif yanıt sinyallerini arttıracak için pro-survival yönünde avantaj sağlayabilir. Ancak uzamış süreli ER stresi veya çok şiddetli stresin sonucunda hücrede apoptotik kayma gerçekleşir ve pro-survival sinyallerin yerini proapoptotik sinyaller alır. Kolesterol, homosistein, glukoz, yağ asidi ve palmitat gibi metabolik faktörler ER stresini hızlandırmaktadır (Zhang, 2010, Karaskov ve ark., 2006). Sentetik olarak ise DTT (dithiothreitol) redoks durumunu, Tapsigargin kalsiyum seviyelerini ve Tunikamisin protein glikozilasyonunu değiştirerek ER'de strese ve UPR cevabının başlatılmasına neden olmaktadır (Ron ve Walter, 2007)

İskemi/reperfüzyona maruz kalan bir miyokardiyumda oksijen ve besin azlığını takip eden ani serbest oksijen radikallerinin birikiminin de ER stresini indüklediği ve miyokardiyal ölüme neden olabileceği bilinmektedir (Hausenloy ve Yellon, 2007).

Çizelge 1.1. UPR'yi etkileyen ajanlar ve ER-aracılı apoptoz sinyali (Minamino ve ark., 2010)

Ajan	Mekanizma	Potensiyel endikasyon
Phenylbutyrate	Kimyasal şaperon	Kalbin korunması (28,119) Atherosklerozun önlenmesi (88)
Tauroursodeoxycholic asit	Kimyasal şaperon	Kalbin korunması; Atherosklerozun önlenmesi (88)
BiP inducer X76	GRP78 indüksiyonu	Kalbin korunması
Curcumin104	GRP94 indüksiyonu	Kalbin korunması
Salubrinal93	eIF2 α defosforilasyonu inhibitörü	Kalbin korunması; Kardiyak hipertrofinin önlenmesi
Sunitinib96	IRE1 aktivasyonu	
EN460	ERO1 inhibitörü	ROS azalması (125)
Fused heterocyclic compound	ASK1 inhibitörü	Kalbin korunması (4,126)
SP600125	CHOP indüksiyonunun engellenmesi	Kardiyak hipertrofinin/yetmezliğin önlenmesi (28) ve Atheroskleroz
SB203580	CHOP fosforilasyonu	Kardiyak hipertrofinin/yetmezliğin önlenmesi (28) ve Atheroskleroz
TNF-α antikor	CHOP indüksiyonunun engellenmesi	Kardiyak hipertrofinin/yetmezliğin önlenmesi (28,39) ve Atheroskleroz
CS-866	Aşırı basınçla ER stresini azaltmak	Kalbin korunması (38)
Pravastatin	Aşırı basınçla ER stresini azaltmak	Kalbin korunması (38)
Pioglitazone120	ER stresini azaltmak	Kalbin korunması; Atherosklerozun önlenmesi
AICAR; metformin	AMPK aktivasyonu ile ER stresini azaltmak	Kalbin korunması (37,121); Atherosklerozun önlenmesi (82,122)
Isoproterenol	Proteozom aktivasyonu ve oluşması	Kalbin korunması (107); Atherosklerozun önlenmesi
AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxyamide-1- β -D-ribofuranoside.		

1.5.2. İskemi-Reperfüzyon ve ER Stresi

I/R hücrede, ilk amacı hücrel fonksiyonları sürdürmek olan, ancak sonuçta hücre ölümüne yol açabilecek bir sinyal kaskadını başlatır (Crow ve ark., 2004).

Hücrede I/R kardiyak miyositlerde ER stresini tetikleyebilir:

- İskemi hali mitokondriyal enerji üretimini tehlikeye atar,
- ER şaperonlarının doğru çalışmasını engelleyerek sekrete olacak ve sitozolik olmayan nascent proteinlerin agregasyonu ile sonuçlanır,
- ER'nin protein matürasyonunda kurduğu bağlardan disülfid bağ oluşumu için elzem olan yükseltgen ortamın bozulmasına yol açar,
- I/R sitozolde ve ER içinde Ca^{+2} dengesizliği yaratır, ki bu durum miyokardiyal kontraktilite ve ER şaperon fonksiyonunu hasara uğratar (Benjamin, 2006).

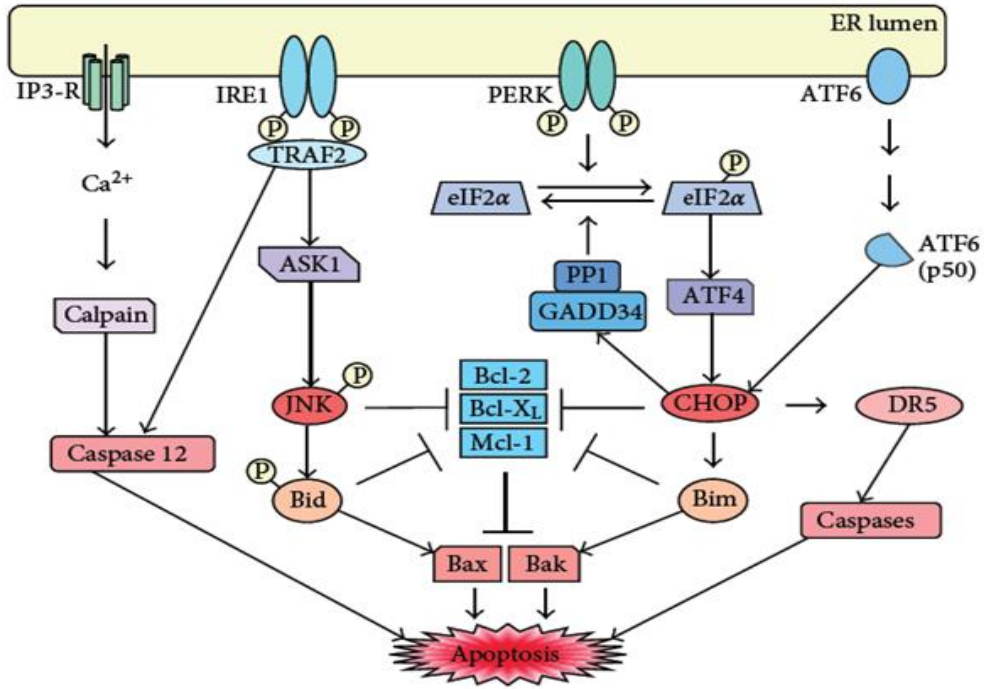
Reperfüzyon veya hafif iskemi, mitokondriyal solunum zinciri boyunca reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşmasını sağlar ve bu radikaller proteinlerin dördüncül yapılarını değiştirerek hücrede hasarlı protein birikimine neden olmaktadır (Benjamin, 2006). Tüm bu nedenlerle iskemi ve reperfüzyon sonrası kardiyak miyositlerde UPR yanıtı başlatılır.

İskeminin *in vitro* stimülasyonu sonrası kardiyak miyositlerde ER şaperonları, GRP78 ve GRP94'ün, 4 saat içinde ekspresyonları indüklenmiştir (Thuerauf ve ark., 2006). Ayrıca *in vivo* düzeyde Langendorff-perfused fare kalbinde I/R hasarı sonrası GRP78 ve GRP94'ün ekspresyonlarının arttığı da gösterilmiştir (Martindale ve ark., 2006). GRP94'ün iskemi stimülasyonu ve Ca^{+2} aşırı birikmesine karşı, kardiyak miyositleri koruduğu tespit edilmiştir (Vitadello ve ark., 2003). GRP78/94'ün aşırı ekspresyonu, I/R tarafından yaratılan ER stresi ve kardiyak hasarı veya proteozom inhibisyonunu azaltır (Reddy ve ark., 2003; Vitadello ve ark., 2003; Fu ve ark., 2008).

Hipoksi uyarısı UPR'nin her 3 kolunu da aktive ederek; eIF2 α fosforilasyonu ve ATF4 indüksiyonu (PERK yolağı); ATF6 ekspresyonu ve XBP1 mRNA ekspresyonu sonrası splyası (IRE1 yolağı) üzerinden hücrede strese karşı bir cevap oluşturur (Terai ve ark., 2005; Szegezdi ve ark., 2006; Thuerauf ve ark., 2006).

Kardiyomiyositler üzerinde yapılan çalışmalarda da hipoksi sonrası CHOP ekspresyonu *in vitro* ortamda gösterilmiş, ayrıca Kaspaz-12'de kesimlenme ve aktivasyon tespit edilmiştir (Terai ve ark., 2005; Szegezdi ve ark., 2006). CHOP veya Kaspaz-12'nin siRNA-aracılı susturulması ile iskemice indüklenen kardiyomiyosit apoptozunun azaldığı gösterilmiştir (Terai ve ark., 2005). Yapılan bu çalışmalar iskemi-ilişkili kardiyak miyosit hasarında ER stresinin rolünü göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) aşırı ekspresyonunu yapan bir fare kalbine ER stres-ilişkili genlerin transkripsiyonel olarak aktif olduğu tespit edilmiştir. MCP-1, inflamatuvar hücreleri kalbe toplayarak iskemik kalp hastalığına yol açmaktadır. İndüklenen bu genler arasında GRP78, GRP94, ATF6, ERO1, CHOP ve PDI ailesi proteinleri bulunmaktadır ayrıca özellikle dejenere olan kardiyomiyositlerde ERAD aktivasyonu görülmüştür (Azfer ve ark., 2006).



Şekil 1.7. İskemi-ER stresi ilişkisi (Schönthal, 2012)

1.6. Hücrede Ölüm Yolakları

Temel olarak hücre ölümü 3 sınıf altında toplanabilir.

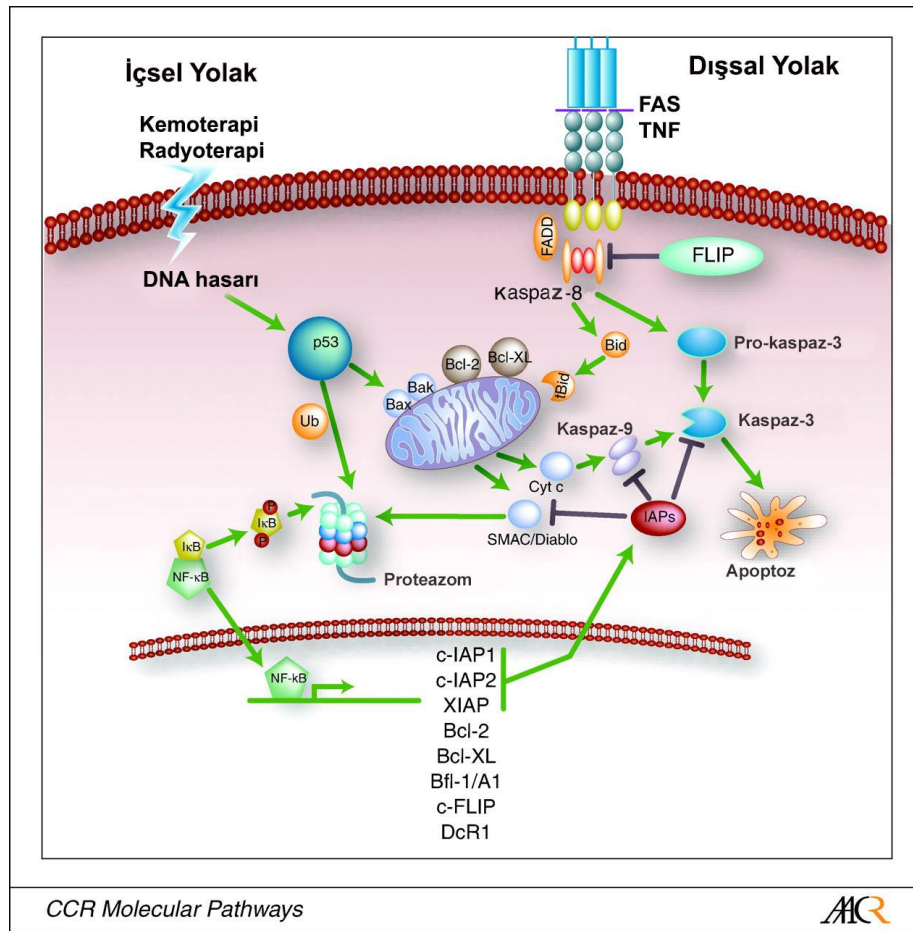
- Apoptotik hücre ölümü: Programlı hücre ölümü
- Otofajik hücre ölümü: Otofajik vakuoller aracılığı ile gerçekleşir, kromatin kondensasyonu gözlenmez.
- Nekrotik hücre ölümü: Hücrede inflamatuvar yanıtı başlatır.

1.6.1. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli olarak tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü

ifade eder (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar veya genetik faktörler sonucu aktive olan ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizmadır.

Fizyolojik açıdan bakıldığında ise apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin ortadan kaldırılmasından sorumludur. Apoptotik hücre sayısı, organizmanın sağlıklı ya da hasta olduğunu belirlemede önemli bir gösterge olduğu için apoptoz mekanizmasının hücrelerde, denge unsuru olduğu kabul edilmektedir (Thompson, 1994).



Şekil 1.8. İçsel ve dışsal yolak ile indüklenen apoptoz (de Vries ve ark., 2006)

Kemoterapi, radyoterapi ve bazı ajanlar hücrede strese ve DNA hasarına yol açmakta, bunun sonucunda tümör süpresör olarak bilinen p53 proteini artışı görülmektedir. Aynı zamanda mitokondri membranının yapısı bozularak mitokondri

zarındaki Sitokrom-C (CytC) sitoplazmaya geçerek apoptozom kompleksini aktive etmekte, bunun sonucunda da efektör kaspazlar ile DNA fragmentasyonu ve apoptoz gerçekleşmektedir.

Bir diğer yolak olan dışsal yolakta ise hücre yüzeyinde bulunan FAS veya TNF reseptörleri uyarıldığı zaman kaspazlar aktif olmakta ve apoptoz başlatılmaktadır (Şekil 1.7)

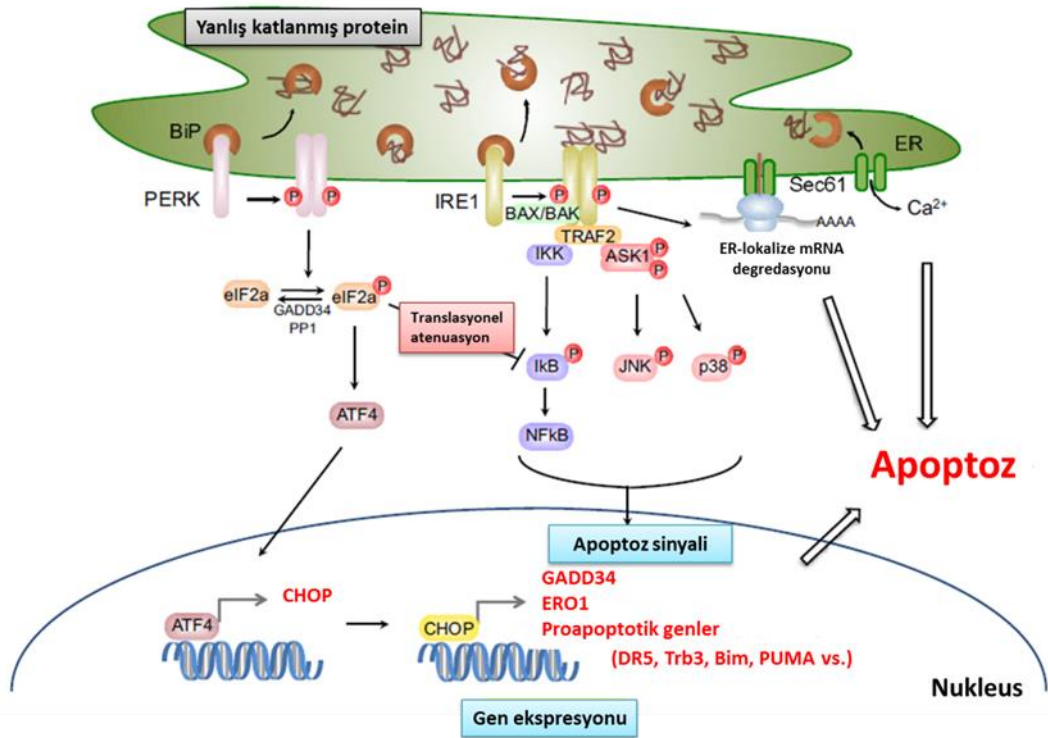
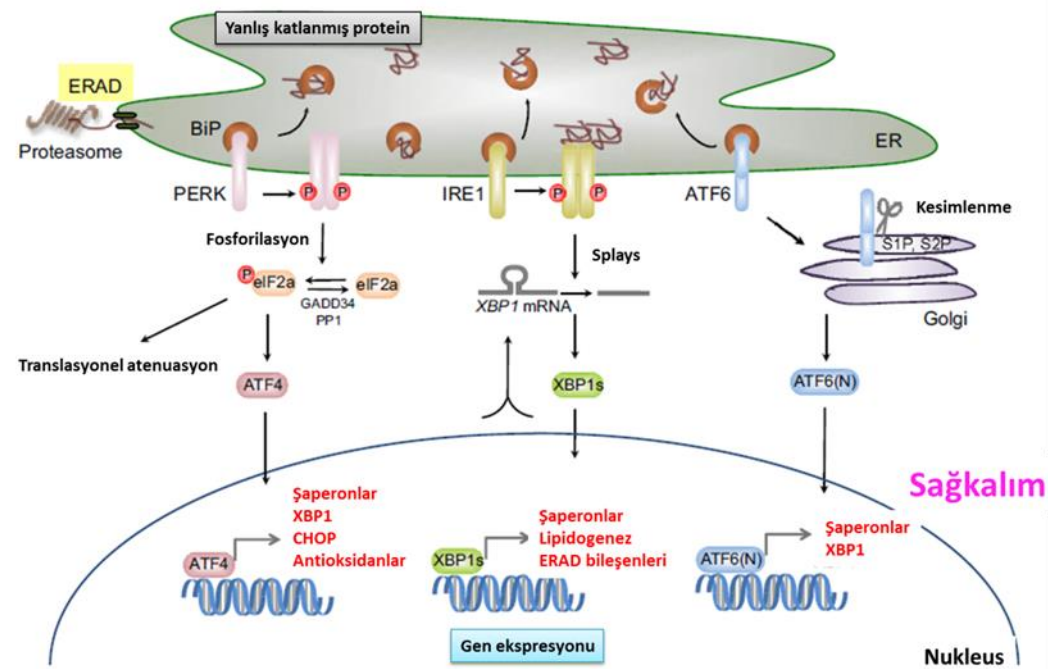
1.6.2. ER Stresi Aracılı Apoptoz

UPR'nin hücrede temel fonksiyonu adaptif genleri ve sinyalleri stimüle ederek ER homeostazını düzenlemek iken, uzamış veya aşırı ER stresi hücrelerin birkaç farklı mekanizma ile indüklenen apoptoz yoluyla ölümüne neden olmaktadır.

1) PERK/ eIF2 α / ATF4 yolağı: PERK yolağında PERK, eIF2 α fosforilasyonu ve ATF4'ü indüksiyonu yapar ve devamında ATF4, CHOP ekspresyonunu arttırarak apoptozu aktive eder. Aktive olan CHOP, transkripsiyon faktörü GADD34, ERO1 ve bazı proapoptotik faktörleri indüklerken anti apoptotik Bcl2'yi baskılar. GADD34 daha sonra eIF2 α 'yı defosforile ederek protein sentezini tekrar başlatır ve ER içinde protein birikimine neden olur. Buna ilaveten CHOP, ölüm reseptörü-5 (DR5)'i indükleyerek hücreleri ER stresi altında apoptotik stimülasyona karşı hassas hale getirir (Yamaguchi ve Wang, 2004). Stres olmayan koşullarda hücrede CHOP miktarı tanımlanamayacak kadar düşükken, akut ER stresi ile birlikte ekspresyonunda artış görülür (Schönthal, 2012).

2) IRE1 yolağı: IRE1 yolağında ise aktive olan IRE1, TRAF2 ve ASK1'i ER membranında toplar, JNK ve ASK1-bağımlı ölümü indükler. IKK-NF κ B yolağı da yine IRE1 tarafından indüklenir. IRE1 aynı zamanda hücrede protein birikimini önlemek için mRNA degradasyonu da yapar ancak uzamış streste bu durum ölüm ile sonuçlanır. IRE1/TRAF2 kompleksi, Kaspaz-12'nin proteolitik kesimlenmesini direkt olarak kolaylaştırır ve bu sayede kaspaz kaskadını başlatır.

ER stresince indüklenmiş hücre ölümü ve Bcl2 ailesi proteinleri ile ilgili ilk çalışma, Bcl2'nin aşırı ekspresyonu (veya BAX ve BAK yokluğu) sonucu hücrenin lethal ER stresine karşı korunmuş olduğunu göstermiştir (Distelhorst ve McCormick, 1996). Yapılan çalışmalar ER stresince indüklenmiş apoptozun, mitokondri üzerinden yürüyen içsel yolak tarafından kontrol edildiğini öne sürmektedir. Ancak Bcl2 ailesi üyelerinin ER membranında yerleşik ve aktif olduğu da bilinmektedir (Krajewski ve ark., 1993; Zong ve ark., 2003) ve yapay olarak ER membranında Bcl2 hedeflenmesinin ER stresine karşı koruyucu olduğu önerilmiştir (Hacki ve ark., 2000).



Şekil 1.9. ER stres koşullarında sağkalım ve apoptoz sinyali (Kadowaki ve Nishitoh, 2013)

1.6.2.1. CHOP

CHOP stres altında olmayan hücrelerde ubikuitine halde bulunurken, UPR'nin aktive olması ile indüklenir (Ron ve Habener, 1992). CHOP aşırı ekspresyonu, hücreleri ER stresine karşı farklı mekanizmalar aracılığı ile hassas hale getirir. İlk olarak CHOP'un, anti-apoptotik Bcl2 seviyelerini düşürdüğü, ayrıca BAX'ın mitokondriye translokasyonunu uyarmak suretiyle apoptozu indüklediği bilinmektedir (McCullough ve ark., 2001). İkinci olarak ise CHOP, GADD34-directed protein fosfataz-1 (PP1) ile eIF2 α defosforilasyonu ve aktivasyonu yaparak protein translasyonunu yeniden başlatır ve direkt olarak UPR'yi sonlandırabilir. Bu translasyon aktivasyonu hücrede hasarlı proteinlerin agregasyonuna ve proapoptotik proteinlerin sentezine sebebiyet vermektedir (Marciniak ve Ron, 2006).

Terai ve arkadaşlarının çalışmasında, ön-muamele olarak AMP-activated protein kinase (AMPK)'ın farmakolojik aktivatörü uygulanan hücrelerde, hipoksi ile indüklenen CHOP ve Kaspaz 12 miktarının düştüğü gösterilmiştir (Terai ve ark., 2005).

CHOP kardiyomiyositlerde, anti-apoptotik Bcl2 ve Bnip3 ekspresyonunu baskılar (Fu ve ark., 2010; McCullough ve ark., 2011). Ayrıca ER stres koşullarında Bim'in direkt olarak transkripsiyonunu indükler ve ER membranına taşınmasını uyarır (Puthalakath ve ark., 2007).

PARM-1'in (prostatic androgen repressed message 1) kardiyak hipertrofi ve takip eden kalp yetmezliği modelinde arttığı da bilinmektedir (Isodono ve ark., 2010). PARM-1 ekspresyonu ER stresi ile indüklendiği ve PERK, ATF6 ve CHOP ekspresyonunda regülasyon ile kalpte koruyucu etkisi olduğu düşünülmüştür.

CHOP, PDI reoksidasyonunu katalizleyen ERO1 α 'yı aktive eder ve süreç hidrojen peroksid üretimi ile sonuçlanır (Gross ve ark., 2006; Ozcan ve ark., 2006). ERO1 α , CHOP'un alt yolağında bulunan önemli bir apoptoz mediyatörüdür. Disülfit bağ

oluşumu sırasında ER’de ortaya çıkan ROS, oksidatif strese neden olur ve apoptotik hücre ölümüne katkı sağlar (Austin, 2009; Ron ve Walter, 2007).

1.7. UPR ve Kardiyak Hastalıklar

UPR hücrede adaptif cevabın geliştirilmesi ve prosurvival sinyallerin başlatılması ve sağ kalımın artması için oldukça önemli bir mekanizma iken; zamanla adaptif bu cevap proapoptotik sinyallere doğru kayabilir. Bu çerçevede bakıldığında kardiyovasküler hastalıkların tedavisi amacıyla UPR hedeflenmesinde 2 temel yaklaşım vardır. İlk yaklaşım stres ile başa çıkmak için UPR’nin adaptif yollarında görevli bileşenlerin uyarılmasıyla strese adaptif bir yanıt oluşturulmasıdır. İkinci yaklaşım ise UPR’nin pro-apoptotik yollarında görevli bileşenleri inaktif etmektir.

İskemik ön-koşullama veya sonradan-koşullama uygulandığında UPR aktivasyonu ilişkili kardiyak hasarın azaldığı rapor edilmiştir (Shintani ve ark., 2006; Liu ve ark., 2008).

İskemik ön-koşullama, izoproterenol ve forskolin muamelesi ile Protein Kinaz A (PKA) aktivasyonu proteozom toplanması ve aktivitesini artırır (Asai ve ark., 2009). Buna göre PKA aktivatörlerinin kullanılması, proteozom fonksiyonunu artırarak ER’de başlatılan apoptoz sinyallerini azaltabilir düşüncesi öne sürülmüştür. İskemik ön-koşullamanın kalbi, artan GRP78 ekspresyonu ile ilişkili I/R hasarına karşı koruduğu da gösterilmiştir (Shintani ve ark., 2006).

1.8. Glukokortikoidler

Fizyolojik stres günlük hayatımızın kaçınılmaz bir parçasıdır. Stres vücutta adrenal bezlerden glukokortikoidlerin sentezini ve salınmasını artırır, bu durum dolaşımda 3–16 µg/dl’den 25 µg/dl ve daha fazlasına kadar glukokortikoid taşınmasına neden olur. Glukokortikoidlerin en önemli formu, insanlarda kortizol (hidrokortizon gibi),

rodentlerde kortikosterondur. Glukokortikoidlerin aşırı üretimi, immün sistemi baskılayarak psikiyatrik hastalıklar, metabolik hastalıklar ve osteoporozu neden olurken; glukokortikoidlerin lenfositler, osteositler ve nöral hücreler gibi bir dizi hücre tipinde apoptozu indüklediği de bilinmektedir (Piazza ve Le Moal, 1996; Sun ve ark, 2008a,b,c; Chen ve Sun, 2009). Dekametazon, Kortizon, Prednizon ve Metilprednizolon gibi sentetik glukokortikoidler anti-inflamatuvar ajan ve immün-baskılayıcı özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

Glukokortikoidler, sitoplazmik glukokortikoid reseptörüne bağlanarak biyolojik fonksiyon gösterirler. Glukokortikoid reseptörü, HSP90 ailesine ait alfa (94 kDa) ve beta (90 kDa) olmak üzere iki izoformdan oluşur (Yudt ve Cidlowski, 2002). Alfa izoformu glukokortikoid bağlanması sırasında aktif iken, liganda bağlanmayan beta izoformu dominant negatif regülatör olarak fonksiyon gösterir. Ligand bağlanması sırasında, glukokortikoid reseptörü HSP90 kompleksinden ayrılarak nükleusa transloke olur ve burada Glukokortikoid Reseptör Response Element'i (AGAACA_nTTGTTCT palindromik sekansından oluşur) promotör bölgesinde taşıyan hedef genleri aktive eder. Glukokortikoid reseptörü, transkripsiyonu DNA bağlanmasından bağımsız şekilde de regüle edebilir:

- Diğer transkripsiyon faktörlerini baskılayan bir homodimer oluşturmak yoluyla,
- Histon asetil transferaz veya deasetilaz aktivitesini değiştirerek kromatin yapısının modifikasyonu yoluyla veya Kromatin-yeniden modellenme faktörü BRG1 interaksyonu yoluyla (Deroo ve Archer, 2001),
- Diğer ko-regülatörler yoluyla (Lonard ve O'Malley, 2007).

1.8.1. Glukokortikoidler'in Kardiyak Hastalıklarda Kullanımı

Glukokortikoidlerin fonksiyonu ve farmakolojik uygulanmaları hakkında birçok çalışma yürütülmüş olmasına rağmen, bu steroidlerin kalpteki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bir çalışmada kardiyo-pulmoner bypass ameliyatı

öncesi tek doz Metilprednizolon uygulanmasının miyokardiyal fonksiyonu arttırdığı gösterilmiştir (Liakopoulos ve ark., 2007). Daha önceki bir çalışmada, hidrokortizon muamelesinin köpeklerde deneysel olarak oluşturulan MI sonrası, infarkt alanını küçülttüğü tespit edilmiştir (Libby ve ark., 1973).

Glukokortikoidlerin gözlenen bu koruyucu etkilerinin aksine, Glukokortikoid reseptör geninin aşırı ekspresyonu özellikle kardiyomiyositlerde benign elektrokardiyogram anomalilerine neden olur (Sainte-Marie ve ark., 2007). Ayrıca adrenalektomi ile kortikosteroid miktarının düşmesi, sarkoplazmik retikulum-ilişkili Ca^{+2} -calmodulin kinazII protein ekspresyonunu düşürerek SR'da Ca^{+2} döngüsünü sekteye uğratar (Rao ve ark., 2001).

Hücrese seviyede, Deksametazon hücre dışına doğru K^{+} ve L-tip Ca^{+2} akışını regüle ederek aksiyon potansiyeli repolarizasyonunu sürdürür (Wang ve ark., 1999).

Chen ve ekibinin çalışmasında, 2005'te yaptıkları bir çalışmada kortikosteron uygulanan fare kardiyomiyositlerinde mikroarray analizi kullanılarak 140 genin upregüle, 108 genin ise downregüle olduğu ve upregüle genler arasında anti-apoptotik Bcl-xL ve p38 MAP kinaz, CREB, c/EBP-beta ve Sp3 transkripsiyon faktörlerinin bulunduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2005; Sun ve ark., 2008a,b; Sun ve Chen, 2008). Bu *in vitro* çalışma bizde, glukokortikoidlerin kardiyomiyositler üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu düşüncesini geliştirmiştir. *In vivo* bir başka çalışmada ise Deksametazon ile önceden muamele edilen farelerde, sol anterior desendent koroner arter tıkanması ile yaratılan hipoksi sonrası, infarkt alanının küçüldüğü, kardiyak troponin I (cTnI) salımının azaldığı, Bcl-xL ekspresyonunun arttığı ve apoptoz oranının düştüğü gösterilmiştir. Glukokortikoid reseptör antagonisti Mifepreston ile muamele sonrasında Deksametazon'un yarattığı kardiyoprotektif etkinin tersine döndüğü de tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2005).

Fare kalbine Metilprednizolon ile önceden muamele edilmesini takiben deneysel olarak yaratılan MI sonrası, I/R hasarından kalbi koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre, global iskemi öncesi belli zaman aralıklarında

Metilprednizolon uygulanan izole fare kalp hücreleri, I/R hasarına karşı korunmuş, infarkt alanın Metilprednizolon uygulanan örneklerde daha küçük olduğu gösterilmiş ve Metilprednizolon'un bu koruyucu etkisinin HSP70 ailesi proteinleri aracılığıyla olduğu tespit edilmiştir (Valen ve ark., 2000). HSP70 ailesi şaperonlarının, hücrede yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması ve normal kardiyak protein sentezinin yeniden kurulması gibi kardiyoprotektif yönde etkileri olduğu bilinmektedir (Morimoto ve ark., 1997).

Bunlara destek olarak bir başka çalışmada iskemik ön-koşullamayı taklit eden Endothelin-1 ile önceden muamele edilen kardiyomiyositlerin hipoksiye karşı toleranslarının arttığı ve bu mekanizmanın HSP70 ve GRP78 ekspresyonunun indüklenmesi aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Pan ve ark., 2004). GRP78, daha önce belirtildiği gibi HSP70 şaperon proteinleri ailesinden olup ER-stresi bağlı gelişen adaptif cevabın da anahtar proteini rolündedir. Ön-koşullama sonucu bu şaperon proteinlerinin aktivasyonu, hücrenin ER cevabı geliştiriyor olabileceğini düşündürmüş olup çalışmamızı şekillendirmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Solüsyonlar

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan malzeme ve gereçler

Besi Yeri	DMEMF12 Life Technologies- Gibco marka
Fötal Dana Serumu (FBS)	Biowest marka
Penisilin/Streptomisin	PAA marka
Hücre Dondurma Tüpleri	Greiner bio-one marka
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Greiner bio-one marka
PBS (10X)	Hyclone marka- HyQ Phosphate Buffered Saline
Flask (75 cm²)	Orange Scientific marka
TriZOL Reagent	Life Technologies (Invitrogen) marka
Metilprednizolon	Prednol-L (40mg liyofilize enjektabl ampül) Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.
Tripsin	Life Technologies- Gibco marka
cDNA Sentez Kiti	Roche marka/Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit
RT-PCR SYBR Green	Roche marka

2.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, Dr.Mercy Davidson'ın laboratuvarında geliştirilmiş, proliferasyon yeteneği kazandırılmış insan ventriküler kardiyomiyosit hücre hattı (Davidson ve ark., 2005) olan AC16 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre hattı, infarkt alan içermeyen, yetişkin ventriküler kalp dokusundan elde edilen proliferasyon yeteneği olmayan primer kardiyomiyosit hücrelerinin, SV40 onkogeni ile transforme edilmiş DWFb1p0 fibroblast hücreleri ile füzyonu sonucu elde edilmiştir. Morfolojik,

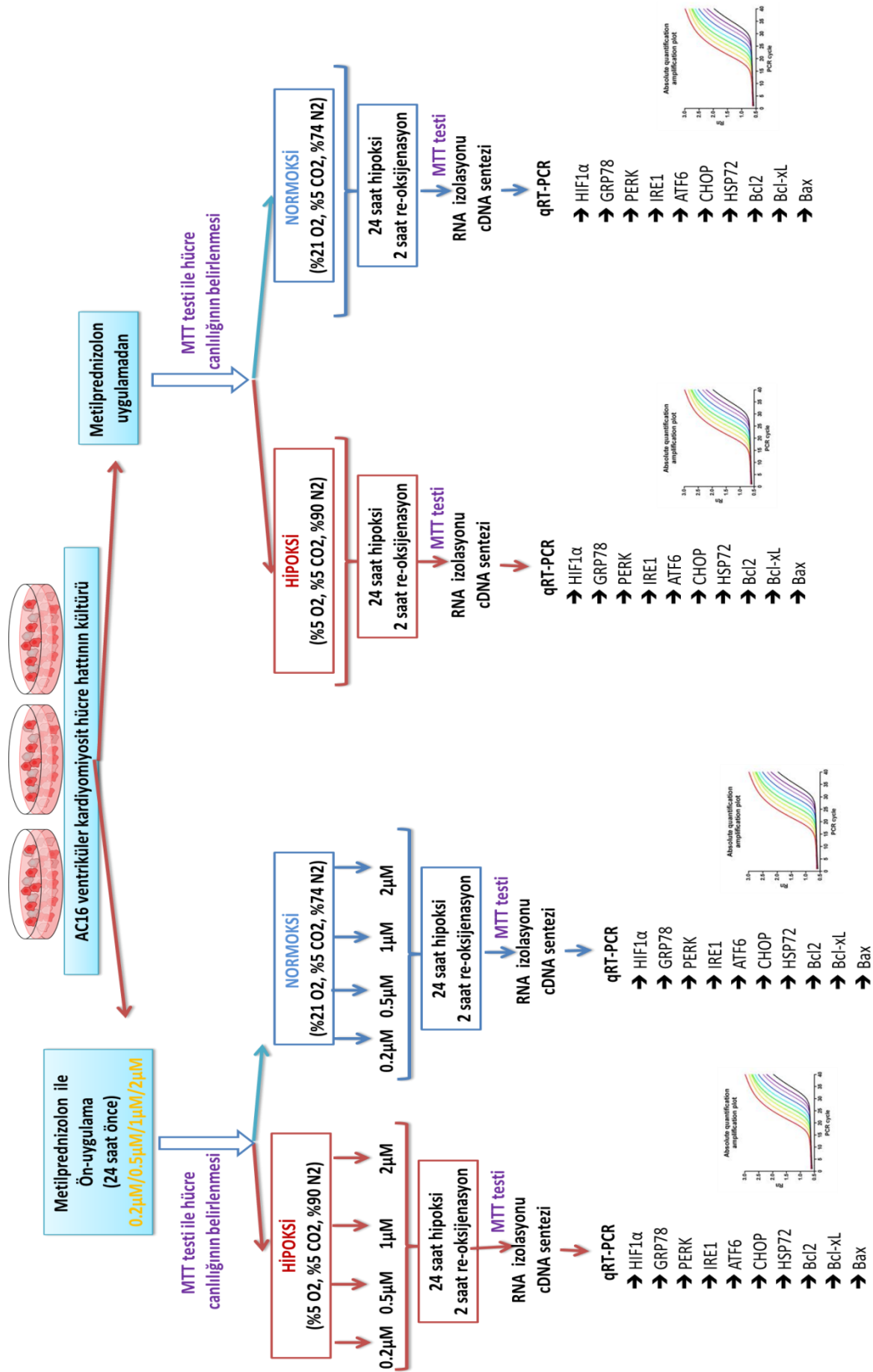
moleküler genetik ve immünohistokimyasal karakteristiklerinin kardiyomyosit hücreleriyle aynı olduğu gösterilmiş ve stabil olarak proliferasyon yeteneği kazandırılmıştır. AC16 kardiyomyosit hücre hattı için %10 FBS ve %1 oranında penicilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM-F12 besiyeri kullanılarak, bu hücreler 37°C de ve % 5 CO₂, %21 O₂ ve %74 N₂ içeren ortamda inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin 2 günde bir pasajı yapılmıştır.

2.2.1. Hücrelerin Pasajlanması

- 37°C etüvden biyogüvenlik kabinine alınan flastaki besiyeri boşaltılmıştır.
- 75'lik flaska 2,5 ml tripsin eklenerek 5 dakika süre boyunca 37°C etüvde bekletilmiştir. Bu süre içerisinde tripsin enzimi etkisi ile hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır.
- 5 dakika sonra flask tekrar kabinine alınarak tripsinin inhibisyonu için 5 ml besiyeri eklenmiştir. Besiyeri içerisinde yüzer konuma gelen hücreler besiyeriyle birlikte alınarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarılmıştır.
- Falkon tüp içerisindeki hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Üstteki besiyeri atılmıştır.
- Falkon tüpe 4 ml taze besiyeri eklenerek hücreler resüspanse edilmiş ve yeni flasklara ekim yapılmıştır.

2.2.2. Hücrelerin Hipoksik Ortamda İnkübasyonu

AC16 kardiyomyositleri, hipoksiye maruz bırakılmadan 24 saat önce, Metilprednizolon değişen dozlarda (0,2µM; 0,5µM; 1µM; 2µM; 5µM; 10µM; 25µM; 50µM; 100µM) uygulanmış; kontrol grubu olarak Metilprednizolon uygulanmayan ve hipoksi uygulanmayan hücreler kullanılmıştır. Hücreler 4 gruba ayrılacak olup deney planı aşağıdaki gibidir.



Şekil.2.1. Deney Planı

Çizelge 2.2. Hücre kültüründe kullanılan deney planı

NORMOKSİ (%21 O ₂ , %5 CO ₂ , %74 N ₂)		HIPOKSİ (%5 O ₂ , %5 CO ₂ , %90 N ₂)	
Metilprednizolon uygulanmış (Farklı dozlarda)	Metilprednizolon uygulanmamış	Metilprednizolon uygulanmış (Farklı dozlarda)	Metilprednizolon uygulanmamış

Hücreler Metilprednizolon ön-uygulanması sırasında normoksik koşullarda (% 5 CO₂, %21 O₂ ve %74 N₂) inkübe edilmiştir. Normoksik şartları takiben hücreler, %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N₂ içeren Billups-Rothenberg Hot Box System hipoksik inkübatörü içinde oluşturulan hipoksik koşullarda (hipoksi) değişen saatlerde (1,3,6,12 ve 24.h) inkübe edilmiş ve hipoksi uygulamasını takiben hücreler alınarak tekrar 2 saat normoksik (% 5 CO₂, %21 O₂ ve %74 N₂) koşullarda (re-oksijenasyon) inkübe edilmiştir. Her deney setinden sonra inkübatörden alınan hücrelerden, RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklanmıştır.

2.2.3. MTT (Dimetil Tiazol) Hücre Canlılık Testi

Metilprednizolon uygulaması ve H/R sonrası AC16 hücrelerinin canlılık düzeylerini saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızda önce iki farklı MTT değerlendirmesi yapılmıştır ilk olarak Metilprednizolon'un hücreler üzerindeki etkisini saptamak amacıyla bir MTT; daha sonra Hipoksi/Re-oksijenasyonun hücreler üzerindeki etkisini saptamak amacıyla başka bir MTT yapılmıştır. Sonuçlara göre esas çalışma planımızı oluşturan 24 saat önceden Metilprednizolon ön-uygulanmasını takiben, H/R gerçekleştirilmiş ve nihai sonuçlar bu iş planına göre hesaplanmıştır.

Bu iş planına uygun olarak aşağıdaki nihai protokol listelenmiştir.

- Kùltürü yapılan AC16 hücreleri 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 10.000 hücre olacak biçimde 100 µl hücre besiyeri karışımı şeklinde ekim yapılmış ve kuyucuklara hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlanmıştır.
- Daha sonra bu hücreler 37 °C’de, %5 CO₂’li etüvde bir gece bekletilerek yapışmaları sağlanmıştır.
- Süre sonunda yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak farklı konsantrasyonlarda Metilprednizolon içeren 250 µl besiyerleri eklenmiştir. Hazırlanan Metilprednizolon konsantrasyonları 0,2µM; 0,5µM; 1µM; 2µM; 5µM; 10µM; 25µM; 50µM; 100µM şeklindedir. Bunların yanı sıra kontrol amaçlı Metilprednizolon uygulanmayan kuyucuklara Metilprednizolon’un çözücüsü olan dH₂O ve besiyeri karışımından aynı oranda uygulanmıştır. MTT analizleri yapılırken düşük dozlar olan 0,2-10 µM grubun kontrolü ayrı; nispeten yüksek dozlar olan 25-100µM grubun kontrolü ayrı oluşturulmuştur. Her bir Metilprednizolon konsantrasyonu için en az 3 kuyucuk kullanılmıştır.
- 24 saat sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak hipoksik koşullar öncesinde FBS içermeyen besiyerinde, normal etüv koşullarında 3 saat inkübasyonu yapılmıştır.
- Bu aşamayı takiben 96 kuyulu plakalar hücre 2 gruba ayrılarak hipoksiye maruz kalacak grup hipoksik inkübatöre alınacak, normoksik grup ise normal koşullardaki inkübatörde bırakılmıştır.
- Hipoksinin farklı saatleri sonrası (1,3,6,12 ve 24) hipoksik inkübatör açılarak her saatin hücreleri alınıp üzerlerindeki serumsuz besiyeri atılarak serum ihtiva eden besiyeri ile değiştirilmiş ve re-oksijenasyonun sağlanması için normoksik inkübatöre alınmıştır.
- 2 saat re-oksijenasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri MTT solusyonu karışımı eklenmiştir (90 µl besiyeri + 10µl 5mg/ml MTT solüsyonu).
- Plak 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde 2 saat bekletilmiştir.

- Bu süre sonunda plak etüvden alınıp kuyucukların üzerindeki MTT ve besiyeri karışımı atılıp her bir kuyucuğa 100 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenmiştir.
- 96 kuyucuklu plaktaki hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometre cihazında 550 ve 690 nm'de yapılmıştır. Sonuçlar Gen5 bilgisayar programında elde edilerek Excel tablosuna aktarılmıştır.

2.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

AC16 hücrelerine I/R uygulanmasını takiben, Trizol (Invitrogen A.B.D.) ekstraksiyon reaktifi ve reaktifin protokolü kullanılarak total RNA elde edilecektir. Spektrofotometrede 260/280 dalga boyunda absorbans özeliğine göre RNA konsantrasyonu ölçülecektir. Ayrıca %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 1XTBE Tamponu (100mM Tris, 100mM Borik asit, 2mM EDTA), etidyum bromid görüntüleme yöntemiyle RNA zincirinin bütünlüğü tespit edilecektir. Elde edilen RNA'dan cDNA sentezi yapılarak qRT-PCR aşamasına geçilecektir.

2.2.4.1. AC16 Hücrelerinden RNA izolasyonu

Homojenizasyon:

- Hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edilir ve supernatant kısım atılır.
- Pelet üzerine (1×10^6 hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklenir.

Faz Ayrımı:

- Trizol ile homojenize edilmiş hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edilir.
- Her tüpe 0.2 ml kloroform eklenir ve 15-30°C'de 10 dk inkübe edilir.
- 12,000 x g.'de 2-8°C 13 dk santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrasında tüplerde faz ayırımı gözlenir ve 3 faz oluşur. RNA üst fazdadır.

RNA Çöktürmesi:

- Üst faz yeni bir ependorf tüpe aktarılır.
- Üzerine 0.5 mL izopropil alkol eklenir.
- 15-30°C'de 10dk inkübe edilir.
- Tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüj edilir.
- RNA tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluşturarak görünür hale gelir.

RNA Yıkaması:

- Süpernatant atılır ve 1 ml %75'lik etanol eklenir.
- Örnekler vorteks yapılarak, 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüj edilir.

RNA'nın Yeniden Çözülmesi:

- RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulur.
- RNA 35µl RNaz, DNaz içermeyen su içinde çözülür.
- İzole edilen RNA konsantrasyonu spektrofotometrede 260/280 dalga boyunda absorbans özeliğine göre ölçülür. Ayrıca %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 1XTBE Tamponu (100mM Tris, 100mM Borik asit, 2mM EDTA), etidyum bromid görüntüleme yöntemiyle RNA zincirinin bütünlüğü tespit edilir. Elde edilen RNA'lar cDNA sentezi için kullanılır.

2.2.4.2. AC16 Hücrelerinden cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre 1000 nanogram kullanılarak "**Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit**" (Roche, Almanya) ile c-DNA sentezlenmiştir. **Roche cDNA sentez kiti** kullanılarak aşağıda tabloda belirtilen protokol uygulanır.

Çizelge 2.3. cDNA sentez protokolü

Kalıp-Primer Mix Hazırlanışı:		
Komponentler	Hacim	Final Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	1000 ng
Random Hexamer Primer	2µl	60µM
H ₂ O, PCR-grade	Değişken	Son hacim H ₂ O ile 11.4 µl'ye tamamlanır.
Toplam Hacim	11.4 µl	
65 °C' de 10 dk → inkübasyon		
Master Mix Hazırlanışı:		
Komponentler	Hacim	Final Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer (5X)	4 µl	1X
Protector RNaz İnhibitor (40 U/ µl)	0.5 µl	20 U
Deoksinükleotid Karışımı (10 mM her bir dNTP)	2 µl	1 mM her bir dNTP
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz	1.1 µl	10 U
Toplam Hacim	20 µl	
29 °C' de 10 dk → inkübasyon		
48 °C' de 60 dk → inkübasyon		
85 °C' de 5 dk → revers transkriptaz inaktivasyon		

2.2.5. Real time PCR (qRT-PCR)

AC16 hücre serilerinde oluşan H/R hasarını ve strese karşı gelişen ER stresini tespit etmek amacıyla; GRP78, PERK, IRE1, ATF6, CHOP ve HSP72 gibi ER stresi, hipoksi (HIF1 α) ve apoptoz (BAX, BCL2, BCL-xL) ile ilgili genlerin ekspresyonu Real Time-PCR kullanılarak tespit edilmiştir. cDNA'sı yapılan her hipoksik saatin örnekleri ve kontroller kullanılarak SYBR Green floresans boyası ile primerlerin optimize edildiği sıcaklıkta kantitasyon yapılacaktır. Genlerin kantitasyonunu yapabilmek amacıyla referans gen olarak housekeeping genlerden HPRT geni kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. RT-PCR protokolü

RT-PCR Protokolü	
Master Miks Hazırlanışı	
Bileşenler	Hacim
H₂O, PCR-grade	2 μ l
Primer (10xconc) (Forward)	0,5 μ l
Primer (10xconc) (Reverse)	0,5 μ l
Sybr Green (2xconc)	5 μ l
cDNA	2 μ l
Toplam Hacim	10 μl
qRT-PCR Programı	
Denatürasyon	95°C 5dk
Amplifikasyon	95°C 30sn
	*60°C 30sn 50 siklus (*gene göre değişebilir)
	72°C 30sn
Erime	95°C 10sn
	65°C 1dk
	95°C sürekli
Soğuma	40°C 10sn

Çizelge 2.5. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri ve bilgileri

RT-PCR’da Kullanılan Primer Dizileri			
HIF1α	F=GATACCAACAGTAACCAACCTCAG R= TCACAAATCAGCACCAAGCAG	F: 63 R: 63	71 bç
GRP78	F= GTCTACTATGAAGCCCGTCCA R= CACCTCCCACAGTTTCAATACC	F: 61,53 R: 61,39	287 bç
PERK	F= AATGGGATAGTGACGAAATGG R= TCTTCTGTGTTCTCATTGGG	F: 58,28 R: 57,61	205 bç
IRE1	F= GGAATTACTGGCTTCTGATAGGAC R= GATGTTTGGGTAGATTGTTGGGA	F: 61,03 R: 61,09	93 bç
ATF6	F= AACTTTCCGTGACTAAACCT R= TTAATCTCGCCTCTAACCT	F: 57,16 R: 58,01	162 bç
CHOP	F= AAATCTTCACCACTCTTGACCCT R= GACCACTCTGTTTCCGTTTCC	F: 62,07 R: 61,64	180 bç
HSP72	F= TGCTGATCCAGGTGTACGAG R= TTGGTGATGGTGATCTTGTTGG	F: 61,81 R: 61,33	202 bç
BAX	F= GACGGCAACTTCAACTGGG R= AGGAGTCTCACCCAACCAC	F: 61,73 R: 61,33	182 bç
BCL2	F= CGGTGGGGTTCATGTGTGTGGA R= GGGGCAGGCATGTTGACTTCACT	F: 67,24 R: 67,85	280 bç
BCL-xL	F=GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCA R= CCCCATCCCGAAGAGTTCATTCA	F: 67,71 R: 66,68	164 bç

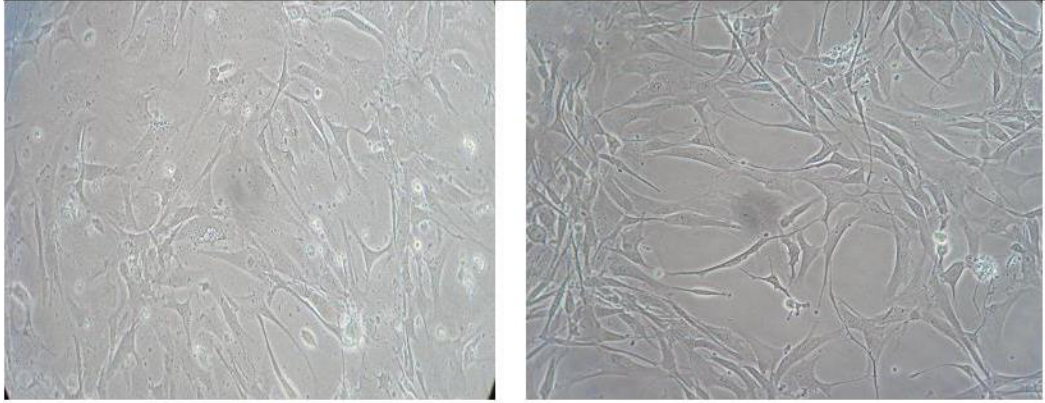
2.2.6. İstatistiksel Analiz

Araştırmanın analizlerinin gerçekleştirilmesi için SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır. Her bir değişkenin MP uygulaması yapılan gruplar ile arasındaki farklılıkların incelenmesi amacıyla iki grup arasındaki karşılaştırmalar için bağımsız gruplarda t-testi; ikiden fazla grup arasındaki farkların kıyaslanması amacıyla ise Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları ortalama ve standart sapma tanımlayıcı istatistikleri ile özetlenmiş ve istatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. AC16 Hücre Serisinin Mikroskop Görüntüsü

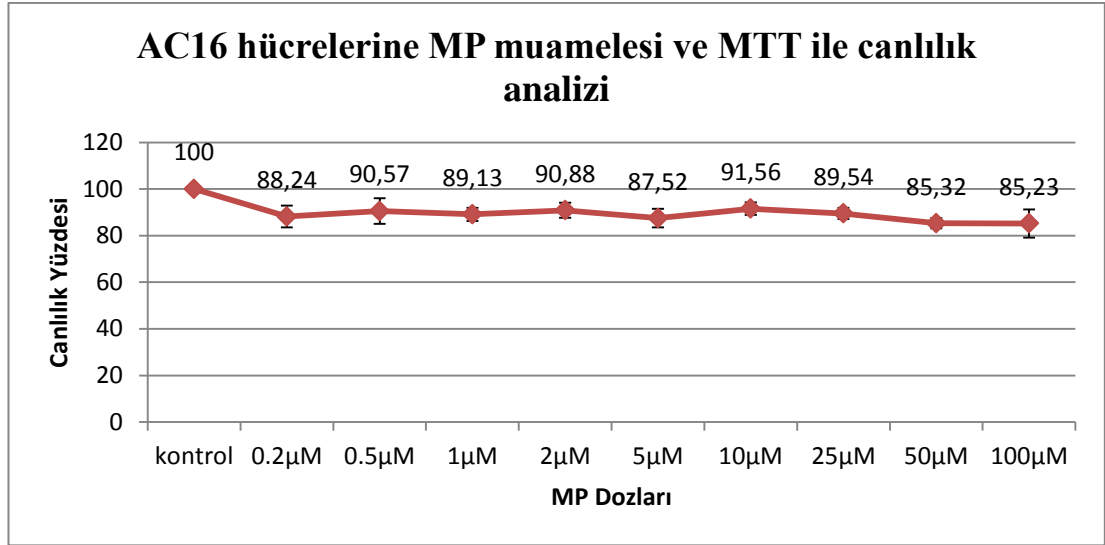
Gereç ve yöntem kısmında belirtilen şekilde inkübasyonu yapılan hücrelerin mikroskop görüntüleri inverted mikroskop yardımıyla kaydedilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. AC16 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri (40x, 100X)

3.2. MTT Hücre Canlılık Testi Bulguları

Değişen dozlarda Metilprednizolon'a maruz bırakılan AC16 hücreleri belirtilen süreler sonunda MTT Hücre Canlılık testi yardımıyla analiz edilmiştir.



Şekil 3.2. AC16 hücrelerine MP muamelesi sonrası MTT ile canlılık oranları ($p < 0,05$)

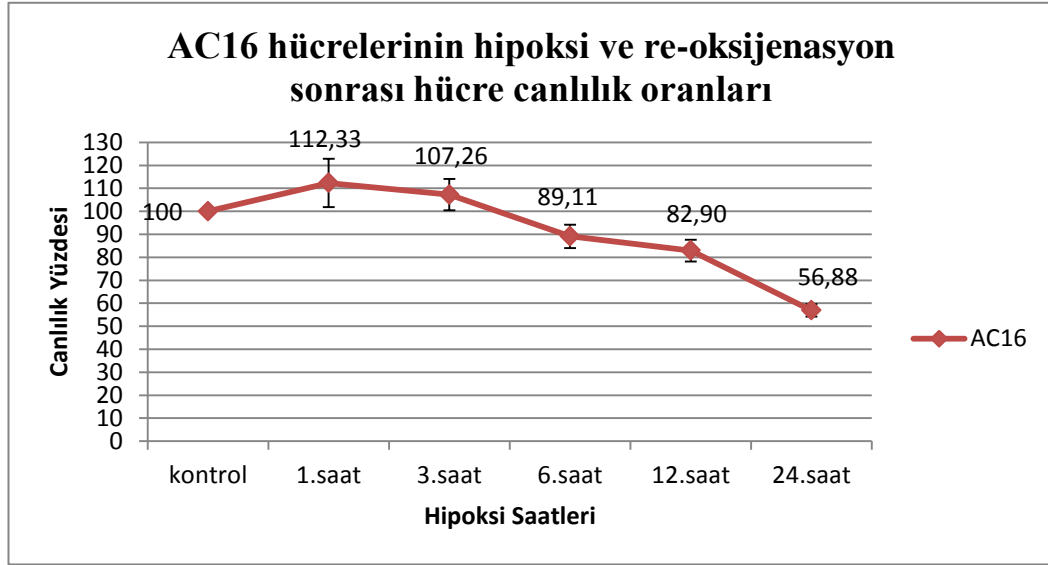
Çizelge 3.1. AC16 hücrelerine MP muamelesi sonrası MTT ile canlılık yüzdeleri

MP dozları	24. saat
Kontrol	100
0.2µM	88,24
0.5µM	90,57
1µM	89,13
2µM	90,88
5µM	87,52
10µM	91,56
25µM	89,54
50µM	85,32
100µM	85,23

Elde edilen bulgular ışığında, bazı hastalıklarda klinik kullanımı onaylanmış bir ilaç olan MP'un farklı dozlarda hücelere uygulanmasının, hücre canlılığı üzerinde toksik bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır.

MP toksisitesini gösterdikten sonra AC16 hücreleri değişen saatlerde hipoksi koşullarını takiben 2 saat re-oksijenasyona maruz bırakılmış ve hücre canlılıkları

MTT Hücre Canlılık testi yardımıyla analiz edilmiştir. Buna göre H/R muamelesi yapılmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, H/R uygulanan hücrelerdeki canlılık artış ve azalışları tüm deneme saatlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



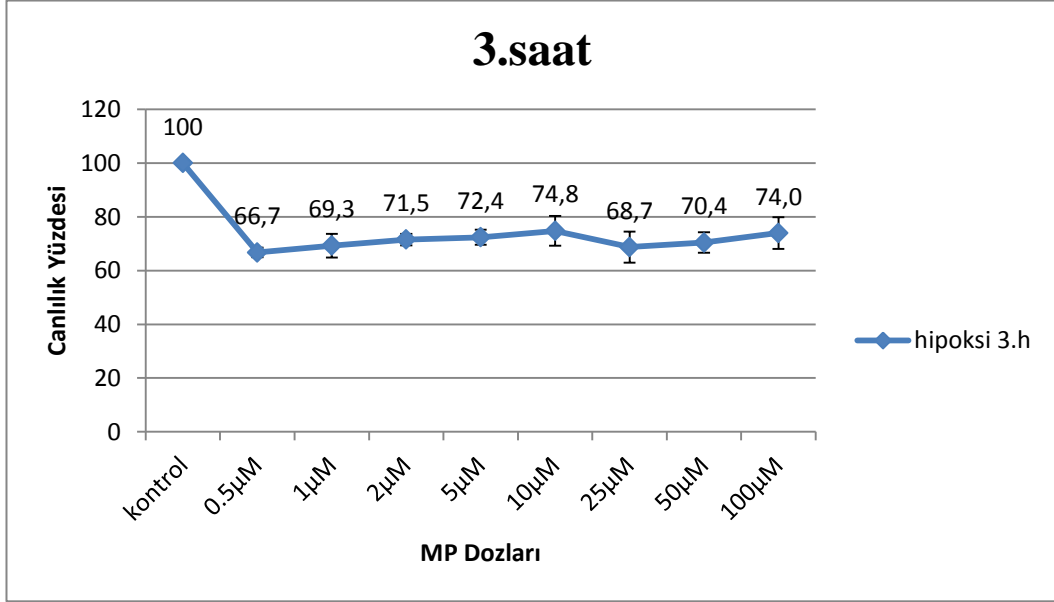
Şekil 3.3. AC16 hücrelerinin hipoksi ve re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları ($p<0,05$)

Çizelge 3.2. AC16 hücrelerine hipoksi/reoksijenasyon sonrası MTT ile canlılık yüzdeleri

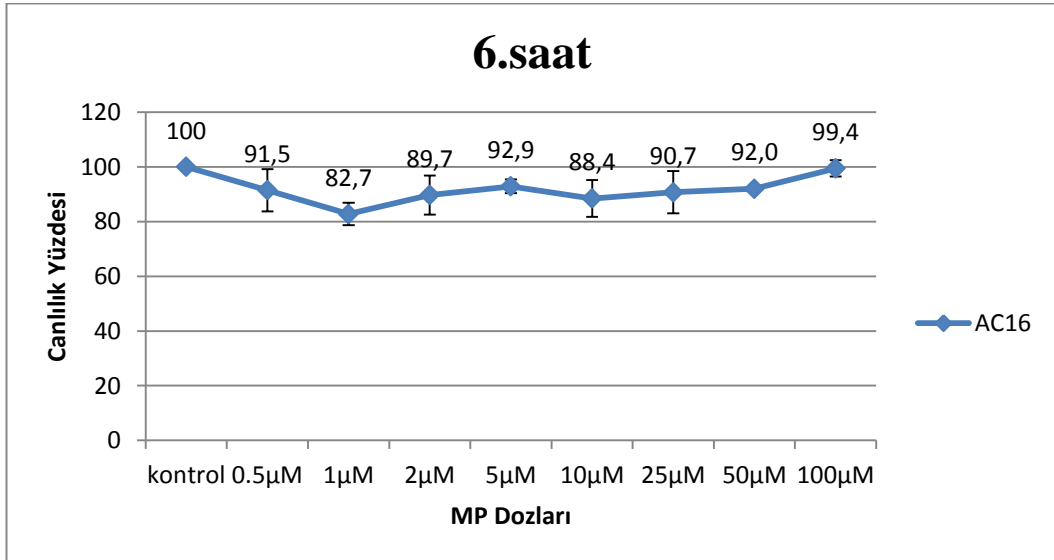
(OD değerleri cinsinden)	Hipoksi	Normoksi	Hücre canlılık oranları (%)
1.h	0,20	0,17	112,33
3.h	0,19	0,18	107,26
6.h	0,21	0,23	88,42
12.h	0,21	0,26	82,90
24.h	0,14	0,25	56,88

İlaç dozunun ve hipoksik saatlerin hücreler üzerindeki etkisi gösterildikten sonra 24 saat boyunca MP ile ön-muamelesi yapılmış AC16 hücreleri iki gruba ayrılarak hipoksik grup hipoksi inkübatöründe, diğer grup ise normal koşullarda olmak üzere belirlenen saatlerde inkübe edilmiş ve her iki grup da 2 saat re-oksijenasyona maruz

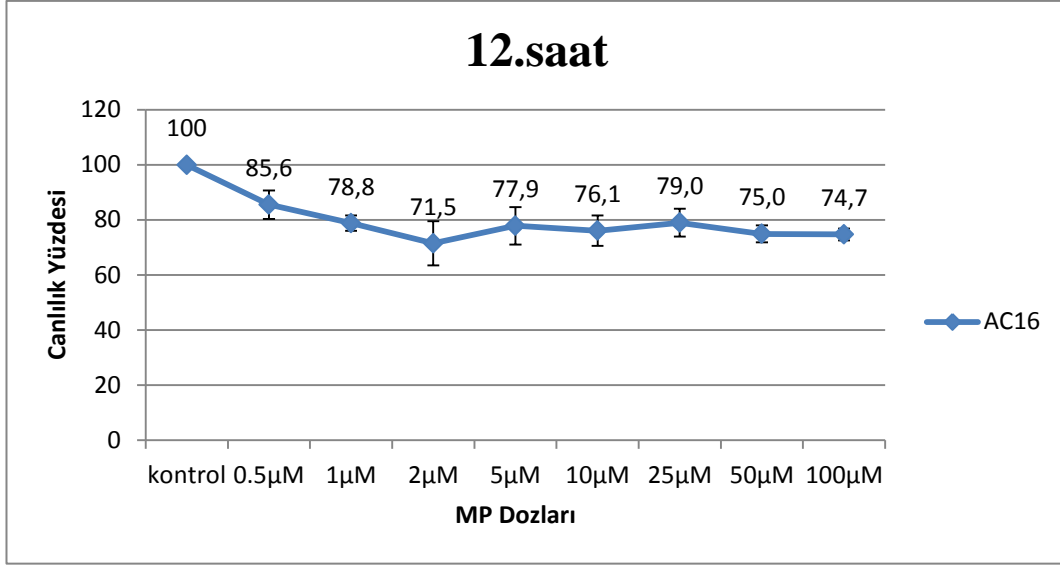
bırakılmıştır. Normoksik ilaç uygulanmamış kontrol grubuna göre, MP ön-uygulaması yapılan hipoksik hücrelerin canlılık oranları MTT Hücre Canlılık testi yardımıyla analiz edilmiştir.



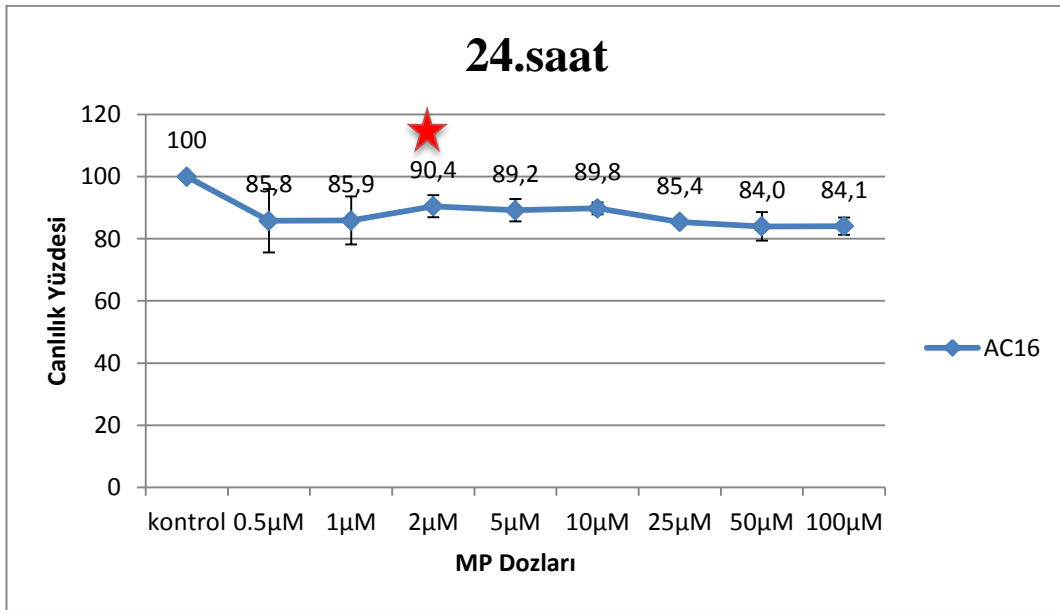
Şekil 3.4. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 3h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları ($p < 0,05$)



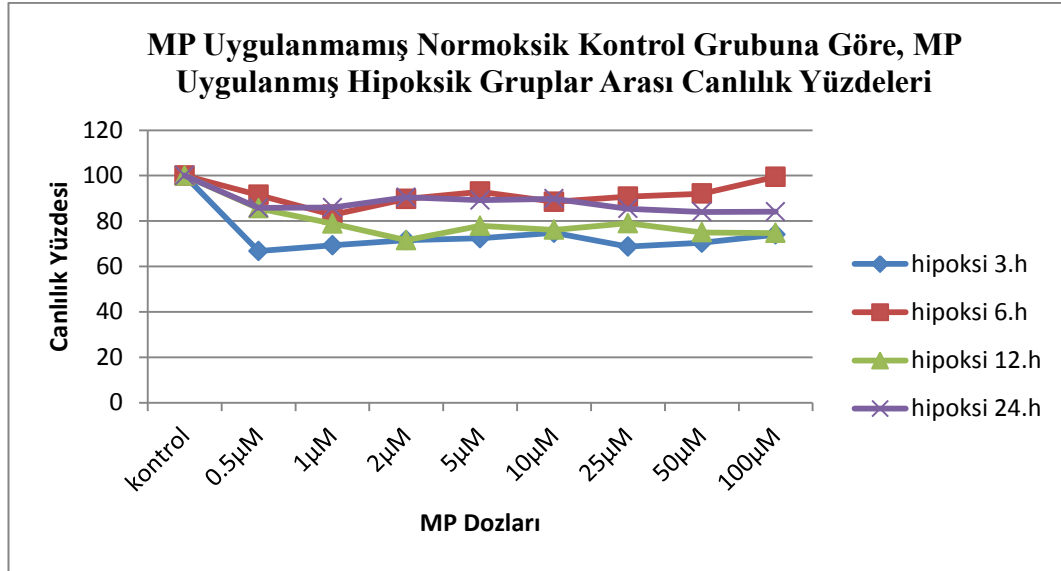
Şekil 3.5. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 6h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları ($p < 0,05$)



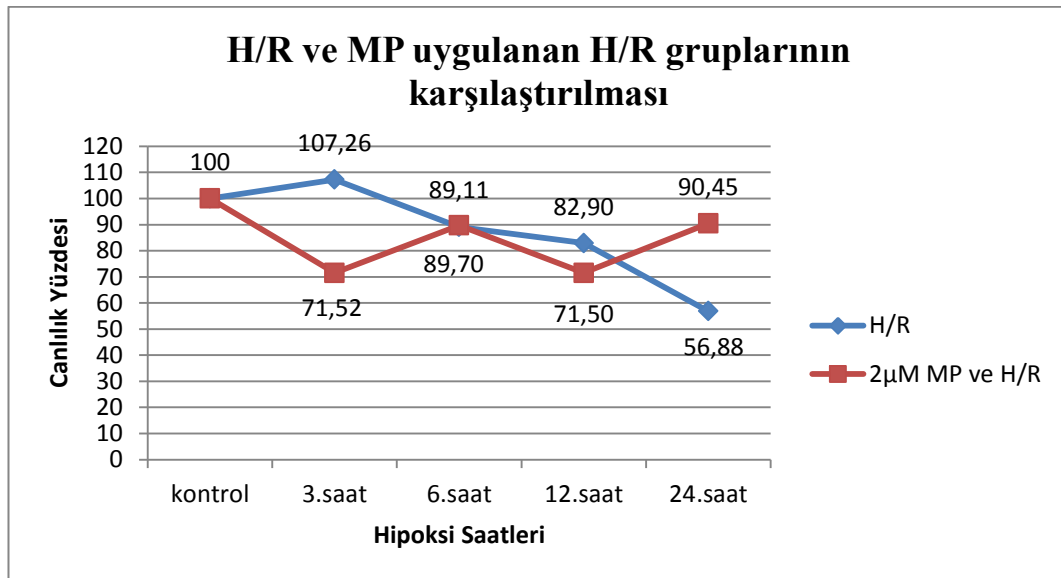
Şekil 3.6. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 12h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları ($p < 0,05$)



Şekil 3.7. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben 24h hipoksi ve 2h re-oksijenasyon sonrası hücre canlılık oranları ($p < 0,05$)



Şekil 3.8. AC16 hücrelerinin MP ön-uygulamasını takiben tüm saatlerde H/R sonrası hücre canlılık oranları



Şekil 3.9. H/R ve MP ön-uygulaması sonrası H/R yapılan hücre canlılıkları

MTT sonuçlarımıza göre MP uygulaması olmadan H/R'nin 24.saatinde hücre canlılığı yaklaşık %50'lere gerilerken, MP ön-uygulması sonrası canlılığın %90'lara yükseldiği tespit edilmiştir ve kontrol grubuna göre bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Buna göre hücre canlılığının korunmasında en etkili

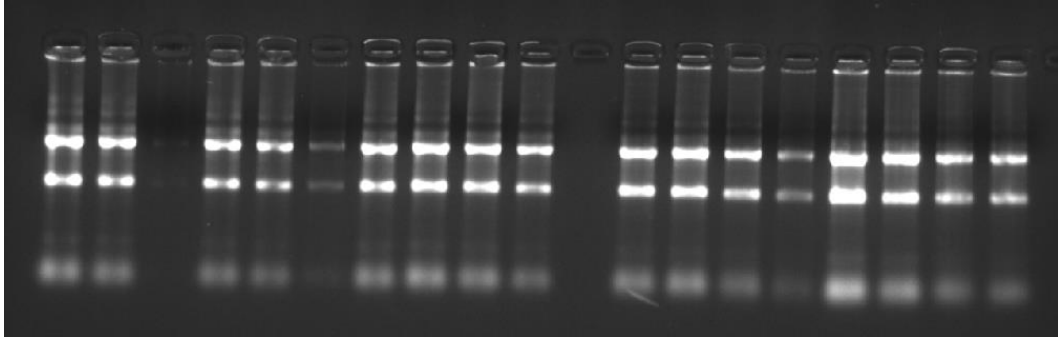
dozun 24. saatte %90,4 oranla 2 μ M MP uygulanan doz olduğuna karar verilmiştir. Yıldız simgesi ile 24. saatte etkin doz gösterilmektedir.

3.3. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini

24 saat süreyle MP'a maruz bırakılan AC16 hücreleri bu işlemleri takiben, değişen saatlerde hipoksi ve sonrasında 2 saat re-oksjenasyona maruz bırakılmış ve örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Çizelge 3.3.) ve % 1'lik agaroz jel görüntüleri (Şekil 3.10.) aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.3. RNA bütünlük ve miktar tayinleri

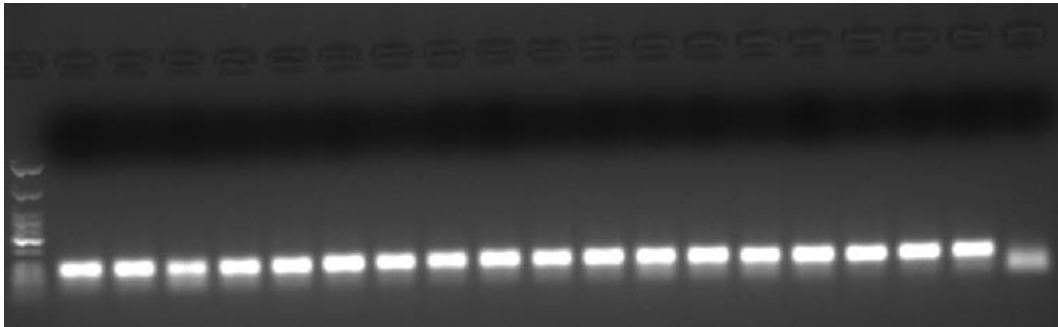
ÖRNEKLER	260/280	ng/μl
0h kontrol MP (+)	2,085	333,77
0h kontrol MP (-)	2,093	479,779
3h kontrol MP (+)	1,7	29,7005
3h kontrol MP (-)	2,0895	379,143
3h hipoksi MP (+)	2,071	387,921
3h hipoksi MP (-)	1,9945	232,434
6h kontrol MP (+)	2,0845	478,679
6h kontrol MP (-)	2,1	503,131
6h hipoksi MP (+)	2,045	408,076
6h hipoksi MP (-)	2,0715	380,389
12h kontrol MP (+)	2,0875	463,15
12h kontrol MP (-)	2,085	525,903
12h hipoksi MP (+)	2,0825	334,743
12h hipoksi MP (-)	2,064	302,787
24h kontrol MP (+)	2,112	820,911
24h kontrol MP (-)	2,095	538,242
24h hipoksi MP (+)	2,0805	324,177
24h hipoksi MP (-)	2,087	299,803



Şekil 3.10. İzole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü

3.4. Eş zamanlı PCR (Real Time PCR, qRT-PCR) Bulguları

Her biri farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerden başlangıç miktarı 1000ng olacak şekilde cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar, HPRT geni ile PCR yapılarak kontrol edilmiştir (Şekil 3.11.).

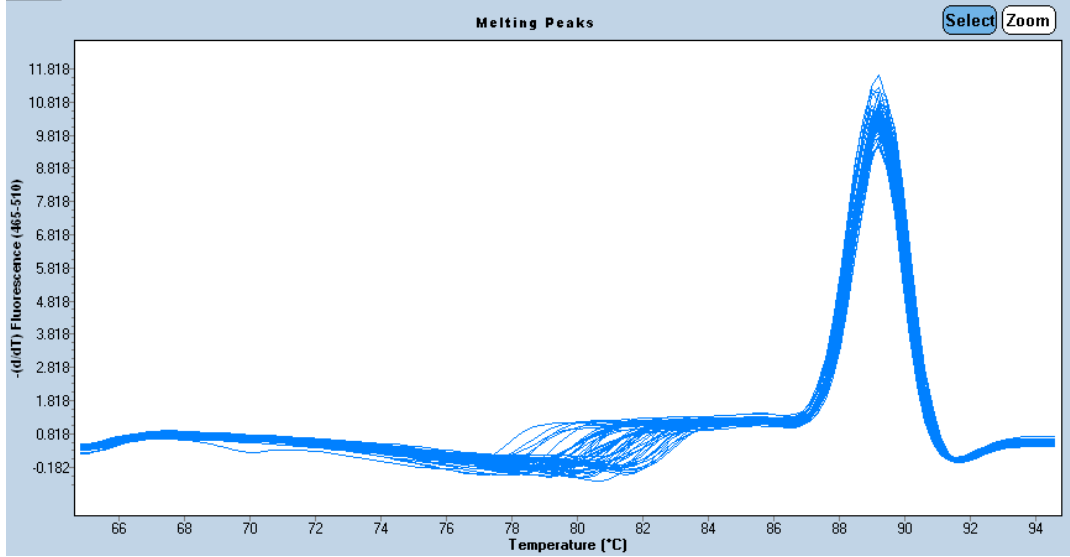


Şekil 3.11. cDNA'ların HPRT referans geni ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü

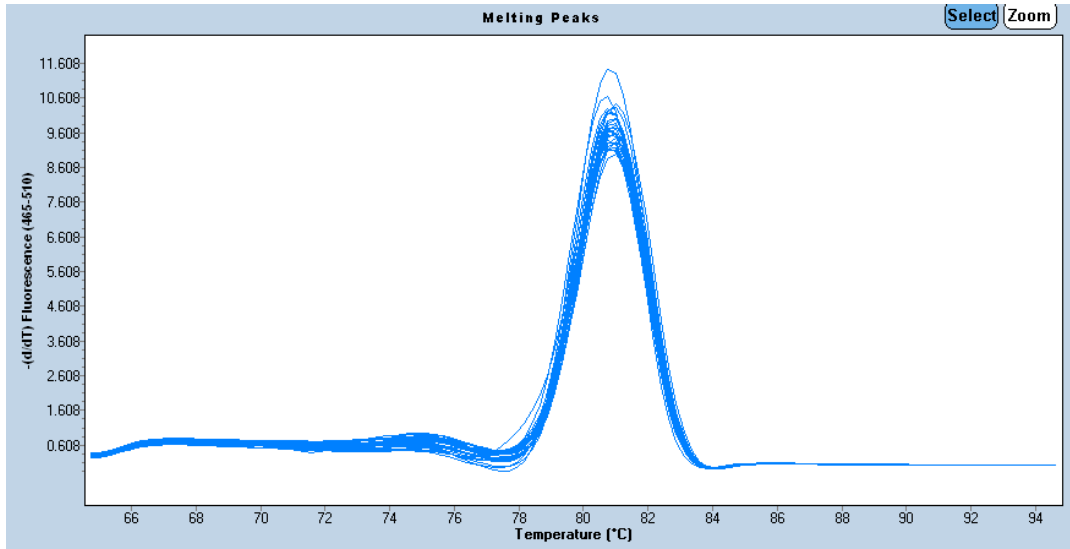
HPRT geni (Housekeeping gen) ve çalışmamızda kullanacağımız diğer genlerin optimizasyonu için yapılan PCR'ların ardından, elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR analizi sonucunda her bir örnek için üç adet Cp (Crossing point) değeri oluşturulup bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

Her qRT-PCR analizinin ardından, çoğaltılan bölgenin istenilen hedef bölge olup olmadığını ve primerin spesifikasyonunu anlayabilmek için erime eğrisi analizleri

yapılmıştır. Şekil 3.12’de HSP72 genine ve Şekil 3.13’te HPRT genine ait erime eğrisi grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 3.12. HSP72 geni erime eğrisi

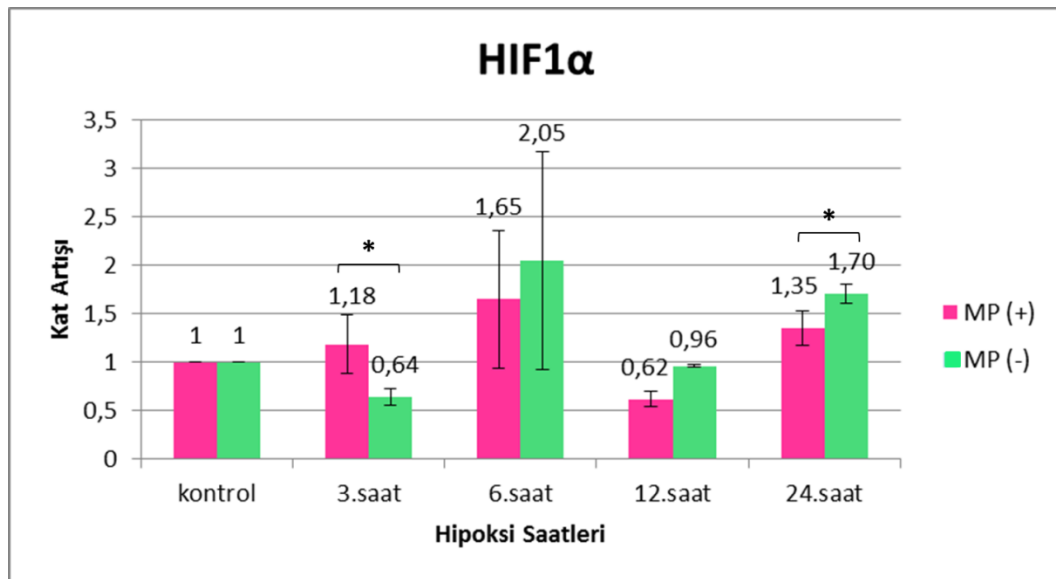


Şekil 3.13. HPRT geni erime eğrisi

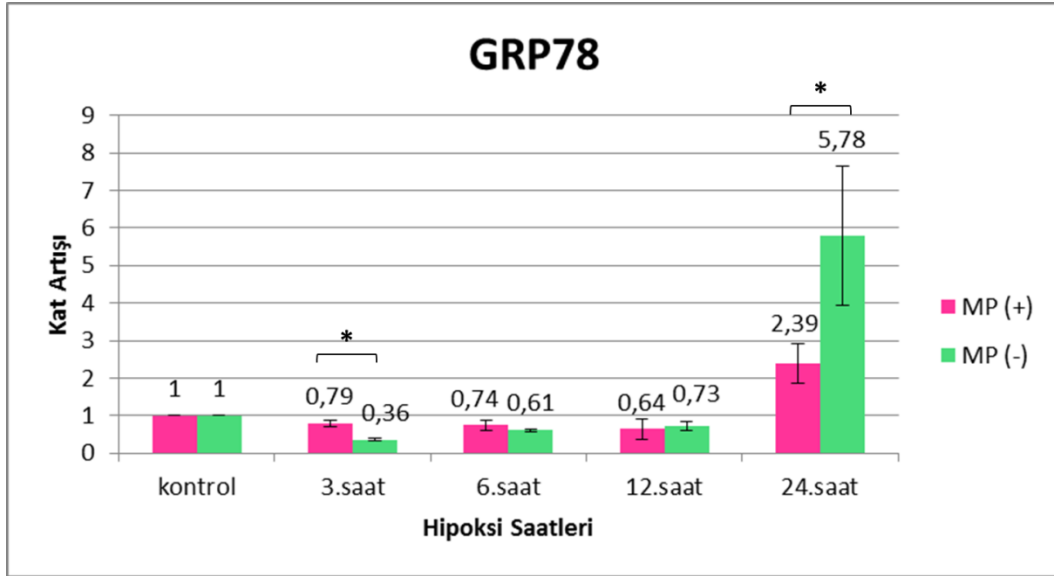
Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta CP_{\text{Hedef}}(\text{Kontrol- Örnek})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CP_{\text{Ref}}(\text{Kontrol- Örnek})}}$$

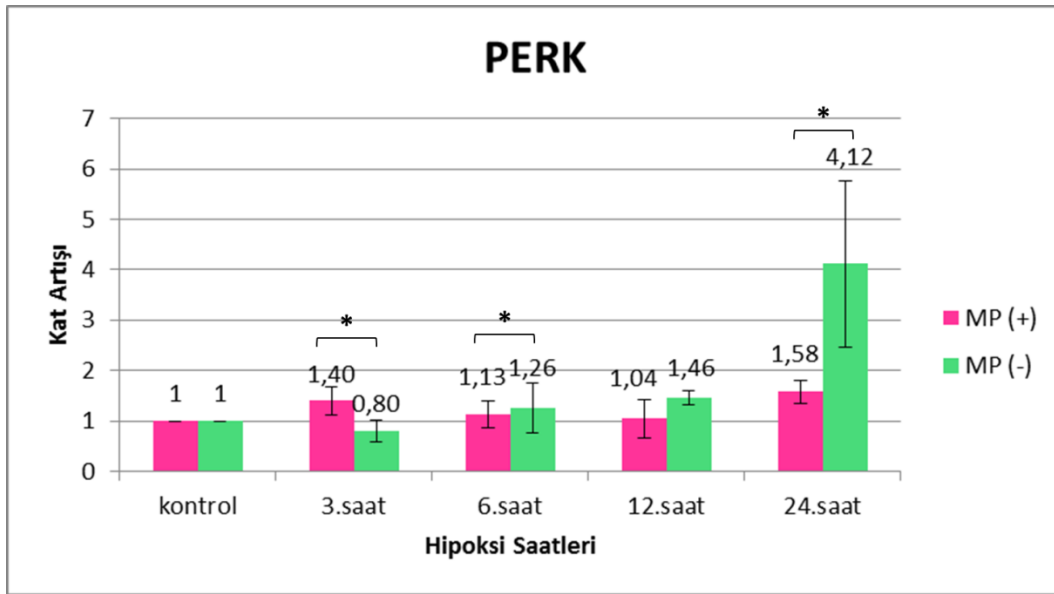
formülü kullanılmıştır. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları log2 tabanına çevrilmiştir. (R: Oran, E: Ekspresyon, Ref: Referans, CP: Kesişme Noktası) (Pfaffl, 2001). qRT-PCR sonrası HIF1 α , GRP78, PERK, IRE1, ATF6, CHOP, HSP72, BAX, BCL2, BCL-xL genlerinin ekspresyon düzeyleri aşağıdaki gibidir. İstatistik değerlendirme MP uygulanan ve uygulanmayan gruplar arası *t*-Test kullanılarak yapılmış $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Grafiklerde anlamlı bulunan sonuçlar (*) işareti ile gösterilmektedir ve $p < 0,05$ değerini simgelemektedir.



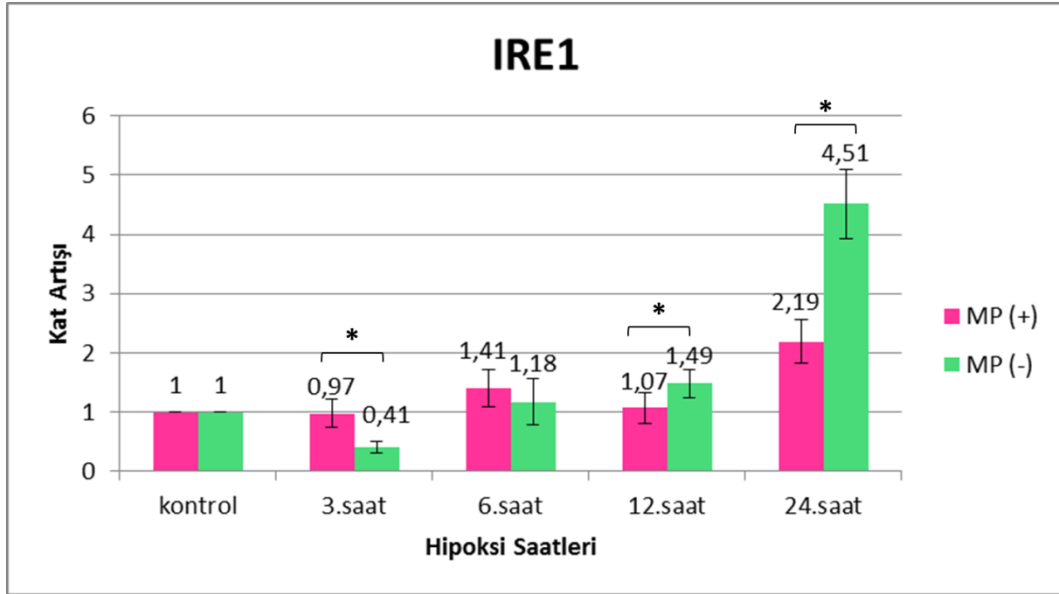
Şekil 3.14. Farklı hipoksi saatlerinde HIF1 α gen ekspresyon düzeyleri (* $p < 0,05$)



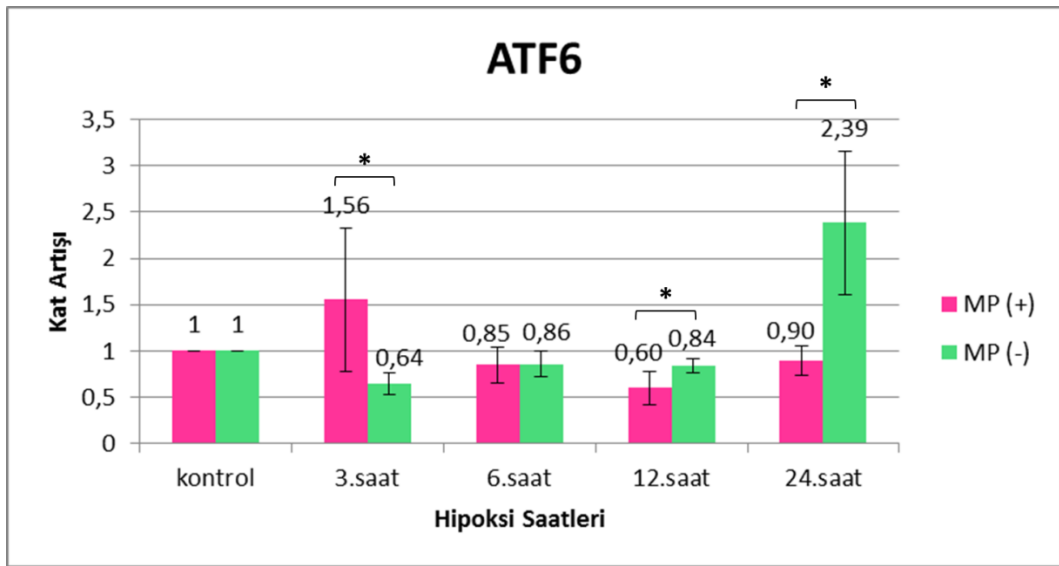
Şekil 3.15. Farklı hipoksi saatlerinde GRP78 gen ekspresyon düzeyleri (* $p < 0,05$)



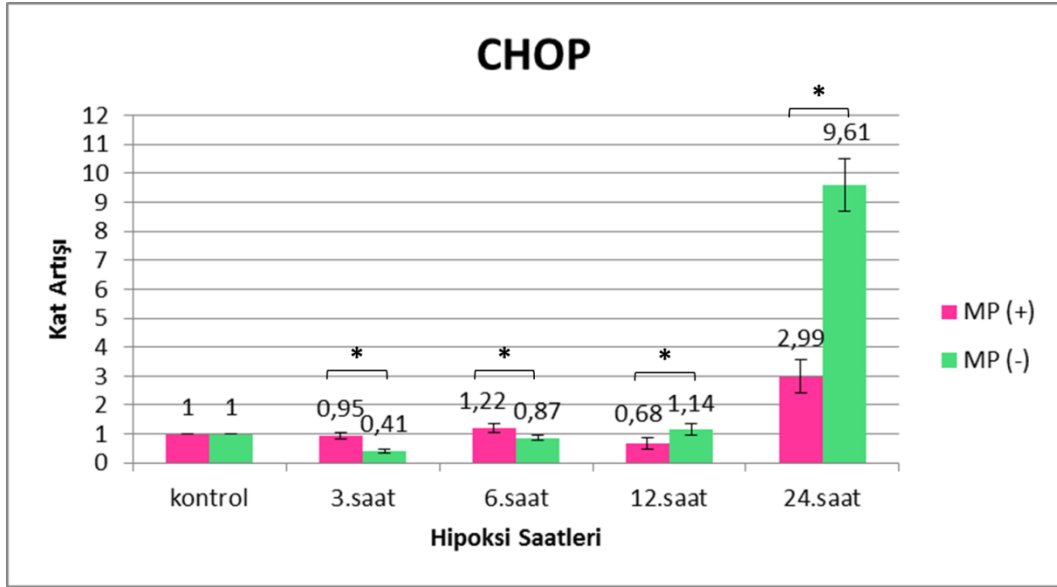
Şekil 3.16. Farklı hipoksi saatlerinde PERK gen ekspresyonlarının düzeyi (* $p < 0,05$)



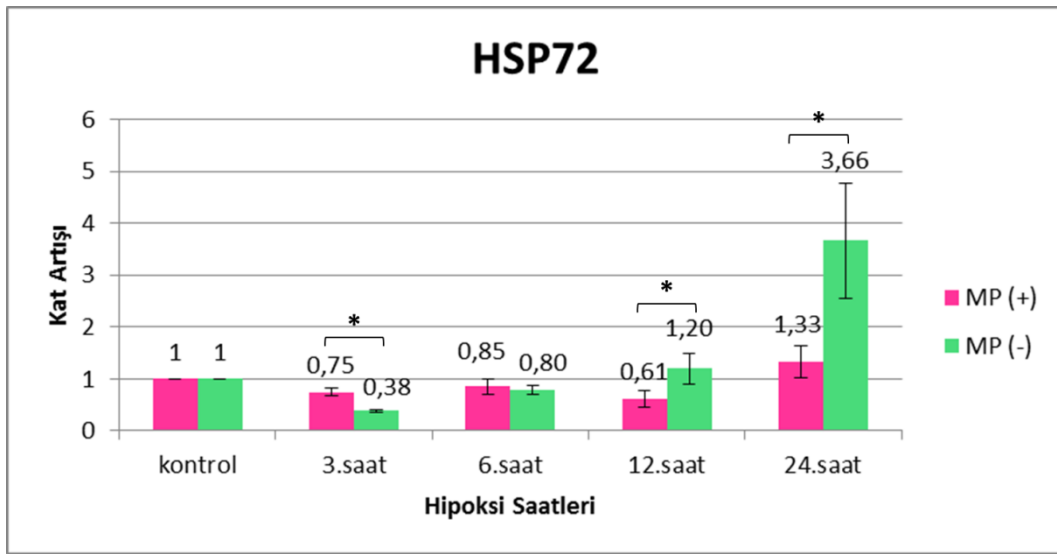
Şekil 3.17. Farklı hipoksi saatlerinde IRE1 gen ekspresyon düzeyleri (* p<0,05)



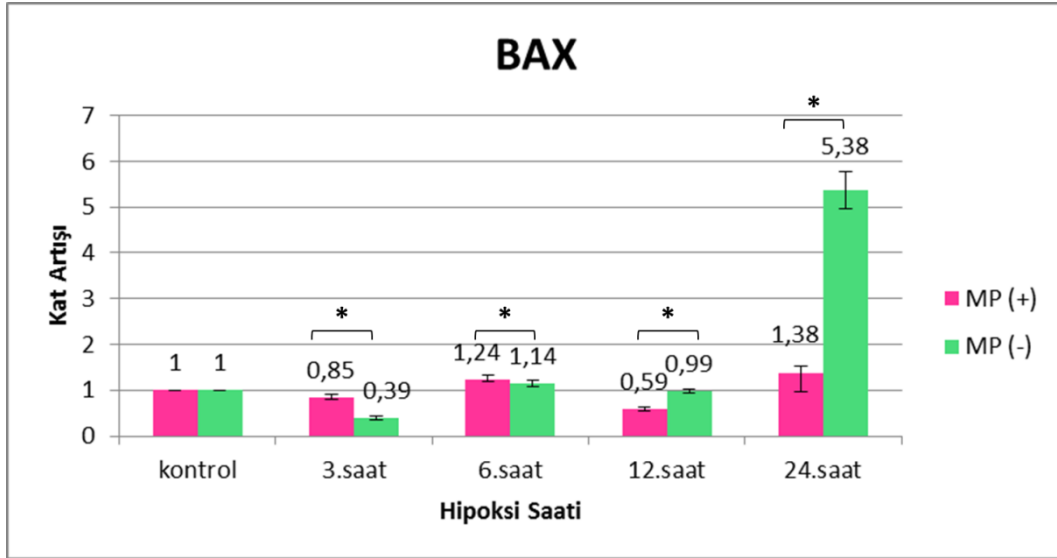
Şekil 3.18. Farklı hipoksi saatlerinde ATF6 gen ekspresyon düzeyleri (* p<0,05)



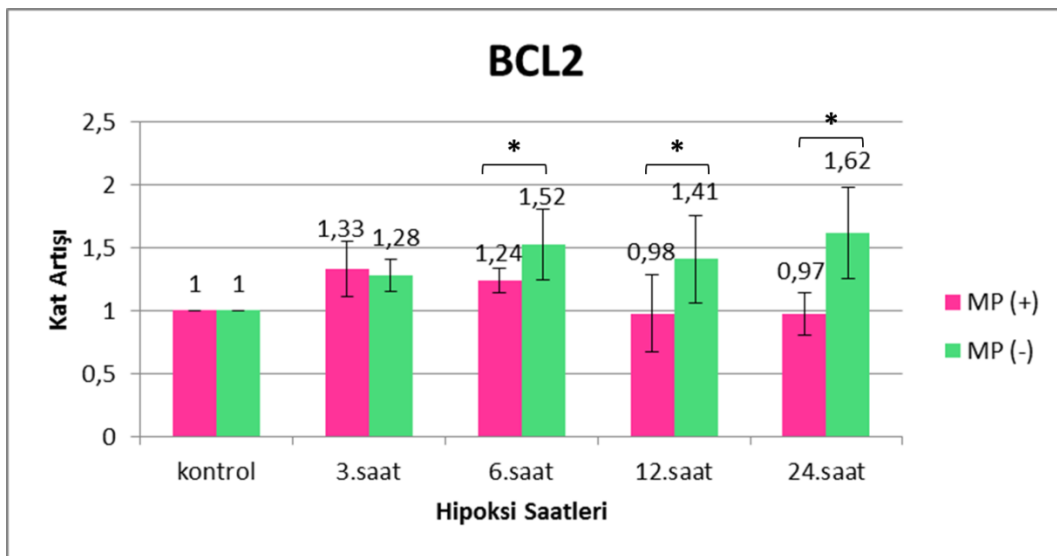
Şekil 3.19. Farklı hipoksi saatlerinde CHOP gen ekspresyon düzeyleri (* $p < 0,05$)



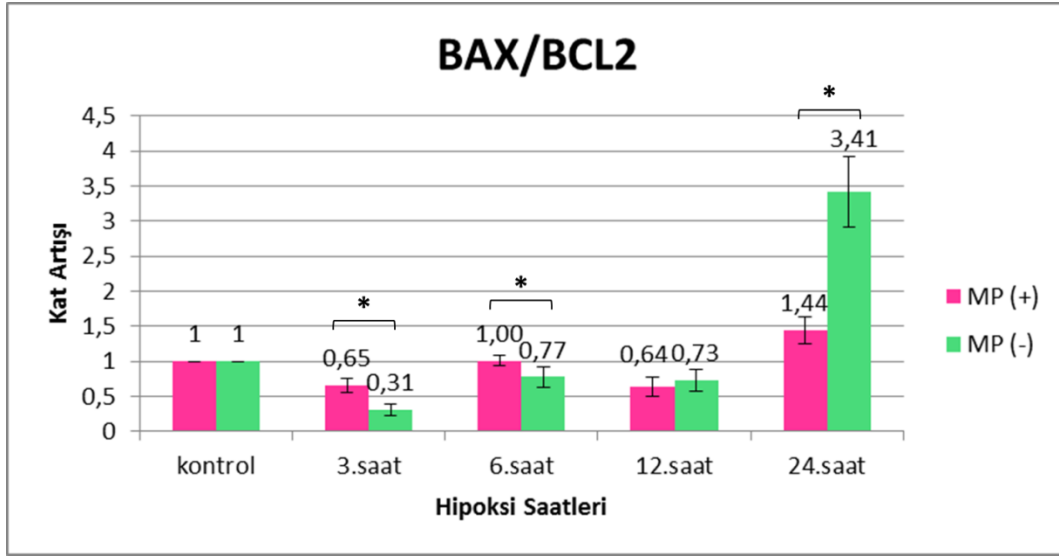
Şekil 3.20. Farklı hipoksi saatlerinde HSP72 gen ekspresyon düzeyleri (* $p < 0,05$)



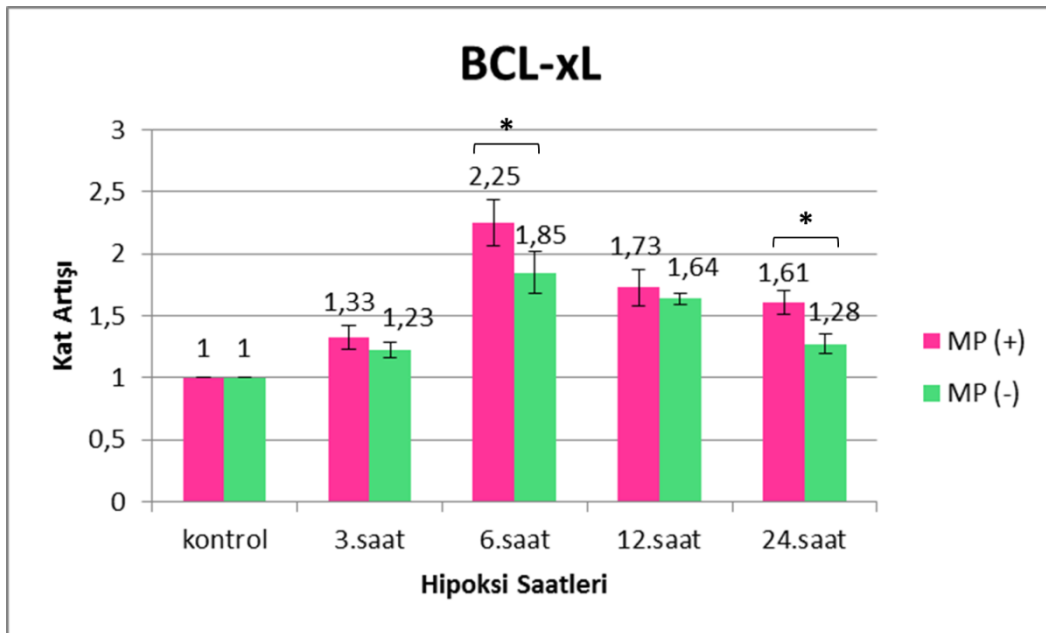
Şekil 3.21. Farklı hipoksi saatlerinde BAX gen ekspresyon düzeyleri (* $p < 0,05$)



Şekil 3.22. Farklı hipoksi saatlerinde BCL2 gen ekspresyonlarının düzeyi (* $p < 0,05$)



Şekil 3.23. Farklı hipoksi saatlerinde BAX/BCL2 gen ekspresyonlarının düzeyi (* $p < 0,05$)



Şekil 3.24. Farklı hipoksi saatlerinde BCL-xL gen ekspresyonlarının düzeyi (* $p < 0,05$)

4. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar ve özellikle Miyokardiyal İnfarktüs, gittikçe artan oranlarda meydana gelmekte ve hastaların yaşam kalitesini ve süresini tehdit eden bir unsur olarak dikkati çekmektedir. Yeni ilaçlar, beslenme ve hayat stili değişiklikleri gibi yeni tedavi yöntemleri kalp hastaları için mortalite oranını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak kardiyak kas hasarı, post-natal kardiyomiyositlerin düşük rejeneratif potansiyelleri nedeniyle geri döndürülemez. Bu sebeple hastalığın ortaya çıkmasından önce yaşam stili ve diyetle bağlı önlemlerin alınması veya olası doku hasarını minimize etmeye yönelik tedavilerin geliştirilmesini amaçlamak isabetli olacaktır. Bu amaçla şiddetli bir iskemi öncesi, kısa süreli periyotlar halinde uygulanan iskemik ön-koşullamanın mutlak iskemi sonrası kalbi iskemiye hazırlıklı hale getirerek doku hasarını azalttığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Deneysel ortamda kolaylıkla uygulanan bu metodun, klinik kullanımı ve hastaya uygulanmasının çok verimli olmaması ile birlikte kimyasal bazı ajanların iskemik ön-koşullamayı taklit ettiği de saptanmıştır.

Kalp damarlarında tıkanıklık oluşmasını takiben dokuda oksijen ve besin yönünden stres meydana gelir. ATP'nin ortamda yeterli derecede bulunmaması sonucu sitozolda Ca^{+2} yükselir ve mitokondri üzerinden seyreden bir apoptotik süreç başlar. Oluşan bu fizyolojik stres, aynı zamanda iyonik dengenin bozulması ER üzerinde bir baskı oluşmasına neden olur. Sentezlenen proteinlerin şaperonlar aracılığı ile son şeklini aldığı ve fonksiyonel hale gelerek ilgili bölgelere iletilmesini sağlayan temel mekanizma ER içerisinde cereyan eder. Olası stres koşullarında ise bozulan fizyolojik denge, oldukça hassas olan bu süreci sekteye uğratar. Hücrede katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler birikerek ER stresi olarak tanımlanan ve bu strese karşı gelişen UPR yanıtının başlatılması ile sonuçlanır. Normal koşullarda yanlış katlanan bu proteinler ubikuitin kuyrukları eklenerek, bu ubikuitinleri tanıyan reseptörleri taşıyan proteozomlara iletilir ve proteolitik olarak

degradasyonu gerçekleştirilir. Bu yolla transkripsiyon faktörleri ve hücre-döngüsü regülatörleri gibi proteinlerin yanı sıra yanlış katlanmış ve aberant proteinlerin eliminasyonu gerçekleşir ve hücrede toksisite yaratmaları engellenir (Hochstrasser, 2009).

Hücrel stres katlanmamış proteinlerin birikmesine ve sistemik degradasyonun engellenmesine neden olur. Stres yanıtı olan UPR, stres koşullarının sürmesi halinde adaptif yanıtı apoptotik yanıtı doğru geçiş ile sonuçlanır. Miyokardiyal I/R sonrası kardiyomyosit ölümünü gösteren sayısız çalışma vardır (Freude ve ark., 2000), hatta bu ölümlerden bazıları ER-stresince indüklenmiş apoptozdan kaynaklanmaktadır (Martindale ve ark., 2006; Natarajan ve ark., 2009). CHOP-aracılı, ASK1/JNK-aracılı ve Kaspaz-12 aracılı yollar üzerinden ER-stresince indüklenmiş apoptoz gerçekleşmektedir (Oyadomari ve Mori, 2004).

MI sonrası oluşan iskemi ve devamında re-oksjenasyona bağlı doku hasarı, çeşitli kimyasal ajanlar kullanılarak ve farklı yollar üzerinden azaltılmaya ve mümkünse engellenmeye çalışılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bir glukokortikoid türevi olan Metilprednizolon'un ön-uygulama olarak kullanılmasının, *in vivo* oluşturulan MI sonrası kardiyak hasarı ciddi ölçüde azalttığı ve bunu anti-apoptotik Bcl-xL aktivasyonu üzerinden sağladığı rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2005). Metilprednizolon'un iskemik kardiyak hücreler üzerindeki protektif etkisi birkaç çalışmada daha değerlendirilmiş ancak mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Liakopoulos ve ark., 2007; Sun ve ark., 2008a,b; Sun ve Chen, 2008; Valen ve ark., 2000). Bunlara ilaveten iskemik ön-koşullama sonrası HSP70 ve GRP78 ekspresyonunun arttığı ve hücrelerin hipoksiye karşı tolerans gösterdiği de bir çalışmada rapor edilmiştir (Pan ve ark., 2004). Bir başka çalışmada ise MP ön-uygulaması yapılan ve devamında deneysel MI'a maruz kalan fare kalbinde, iskemik ön-koşullama ile MP ön-uygulaması karşılaştırılmış ve benzer bir paternde hücrel koruma sağladıkları tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2011). Hipoksik (iskemik) ön-koşullamanın neonatal kardiyomyositlerde düşük miktarda ER stresini stimüle ettiği ve devam eden H/R koşullarında ER stresi ilişkili apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Ravingerova, 2007).

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmamızda MP ön-uygulaması yapılan AC16 insan ventriküler kardiyomyosit hücreleri hipoksi/re-oksijenasyon sonrası ER stres genleri ve apoptotik genler yönünden değerlendirilmiş ve MP muamelesinin ER stresi üzerinden bir protektif etkisi olup olmadığı ilk kez incelenmiştir.

4.1. Metilprednizolon'un H/R Sonrası Kardiyak Hücre Canlılığına Etkisi

Çalışmamızda AC16 insan ventriküler kardiyomyosit hücreleri ekildikten sonra değişen dozlarda (0,2 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 2 μ M; 5 μ ; 10 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M) MP uygulaması yapılmış ve ilacın herhangi bir toksik etkisi olup olmadığı MTT canlılık testi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre kullanılan MP'nin hücreler üzerinde toksik bir etkisi bulunmadığı görülmüştür. MP gibi glukokortikoid türevlerinin yüksek dozlarda kullanımında hücreler üzerinde apoptozu indükleyici ve hücre ölümünü artırıcı etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Xing ve ark., 2015; Buxant ve ark., 2015) ancak çalışmamızda belirlediğimiz düşük dozlarda herhangi bir olumsuz etki görülmemiştir.

MP doz toksisitesi olmadığı saptandıktan sonra, herhangi bir ilaç uygulaması olmaksızın hücreler farklı saatlerde hipoksiye (1h, 3h, 6h, 12h, 24h) ve takiben 2 saat re-oksijenasyona maruz kalmıştır. Yapılan MTT analizine göre uzayan hipoksi saatlerinde hücre canlılığının gittikçe düşmesiyle birlikte, özellikle 24. saatte hücrelerin canlılık oranları normoksik kontrol grubuna göre yaklaşık %56'ya kadar indiği tespit edilmiştir. 1. ve 3. saatlerde hipoksik grupta hücre canlılıklarının normoksik kontrol hücrelerinin de üzerine çıktığı görülmüştür. Canlılıktaki bu artışın hücrelerin hipoksik koşullara karşı geliştirdikleri erken bir adaptif cevaptan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bir sonraki basamakta ise daha önceden de yapılan çalışmalar ile uygun olarak 24 saat önceden (Valen ve ark., 2000) MP ön-uygulaması yapılan AC16 hücreleri, devamında H/R koşullarına tabi tutulmuştur. Yapılan MTT analizi ile 4 farklı hipoksi saatinde hücreler değerlendirilmiş ve 3 ve 12. saatlerde kontrol grubuna göre hücre

canlılıklarında kısmen düşüş görülürken; 6. ve 24. saatte hipoksik grupta hücre canlılıklarının normoksik kontrol hücrelerinin düzeyine yaklaştığı görülmüştür. Önceki sonuçlarımıza göre MP uygulanmaksızın sadece H/R yapıldığında hücrelerdeki en yüksek hücre kaybı 24.saatte (%56) gözlemlendiği için hedef olarak MP uygulaması sonrası 24.saatteki canlılık artışı belirlenmiştir. Buna göre 24. saatte ve 2 μ M MP dozu en yüksek canlılık yüzdesi ile en efektif doz olarak uygun bulunmuş ve çalışmaya bu dozla devam edilmiştir.

Valen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 12 ve 24 saat önce MP ile ön-uygulama yapılan ratlarda I/R sonrası kalpten alınan kesitler ile infarkt alanın büyüklüğü değerlendirilmiş ve MP muamelesi yapılmayan grupta I/R sonrası kardiyak hasarın daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Valen ve ark., 2000). I/R sonrası hücrede artan ROS'un yanlış katlanmış protein birikimini indüklediği ve ER stresine neden olduğu düşüncesi kabul görmektedir. Miyazaki ve arkadaşlarının çalışmasında Miyokardiyal I/R modelinde, reperfüzyon sonrası ekserif ROS (özellikle süperoksit) üretiminin, ER stresinin indüklenmesinde kritik rolü üstlendiği gösterilmiştir (Miyazaki ve ark., 2011). Xu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise kısa döngüler halinde iskemik ön-koşullama yapılan farelerde ve MP ön-muamesi yapılan farelerde, uzun süreli iskemiye takip eden reperfüzyon sonrası hiçbir muamele yapılmayan gruba göre infarkt alanda anlamlı bir azalma olduğu saptanmış ve iskemik ön-koşullama ile MP muamelesinin birbirlerine paralel şekilde protektif bir etki yarattıkları gösterilmiştir (Xu ve ark., 2011).

Yapılan bir dizi çalışmada deneysel olarak uygulanan reperfüzyon terapilerinin (iskemik ön-koşullama gibi) miyokardiyal reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmesine rağmen bu terapilerin klinik kullanımına ancak geçilebilmiştir (Yellon ve Hausenloy, 2007). Ancak bu terapilerin kullanımında en önemli soru işareti, miyokardiyal I/R sonrası uygulanan ilaçların doğru içerikle, doğru zamanda ve dozajda iletilmesinde aksaklık olabileceğidir.

Çalışmamızda MTT canlılık testi ile elde ettiğimiz sonuçlar da literatür bilgisini doğrular niteliktedir ve MP uygulanan grupta canlılık oranları, MP uygulanmayan kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

4.2. Metilprednizolon'un Hipoksi ve ER Stres Genleri Üzerine Etkisi

MP ön-uygulaması yapılan ve devamında H/R'a tabi tutulan AC16 hücreleri ile; MP uygulanmamış ve normoksik koşullarda inkübe edilen kontrol grup AC16 hücreleri arasında ER stres genleri, apoptoz ile ilişkili genler ve hipokside en önemli belirteç olduğu bilinen ve hipoksi aktivasyonunu işaret eden HIF1 α geninin ifade farklılıkları qRT-PCR metodu kullanılarak araştırılmıştır.

4.2.1. HIF1 α

Hipoksi-indüklenebilir faktör (HIF1) *HIF1A* geni tarafından kodlanan alfa ve beta alt üniteleri olmak üzere heterodimerik yapıdaki transkripsiyon faktörüdür. Hücrel hipoksinin temel regülatörü görevindedir. Normal koşullarda hücrelerde konstitütif olarak düşük seviyelerde eksprese edilir ve alfa alt ünitesi pVHL-aracılı proteaz yoluyla ile hızlı bir şekilde degrade edilir (Minet ve ark., 1999). Hipoksik koşullarda ise ekspresyonu anlamlı derecede artırılır ve alfa alt ünite degradasyonu baskılanarak beta alt ünitesi ile birleşmesi ve promotorunda "Hipoksi Yanıt Elementi" içeren hipoksi ile indüklenen genlerin transkripsiyonunu uyarır (Kallio ve ark., 1997).

Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre çalışmamızın ilk saati olan 3.saatte HIF1 α ekspresyonunda MP uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre anlamlı bir artış saptanmıştır. 6.saatte hipoksiye yanıt olarak gelişen HIF1 α aktivasyonu ise 3.saate göre daha farklı görülmektedir ancak bu artış istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Hipoksinin 3.saatinde kontrol grubuna kıyasla MP uyguladığımız grupta 1,18 kat artış tespit edilmiş; MP uygulamadığımız grupta ise 0,64 kat azalış tespit edilmiştir.

MP uygulanan grupta hipoksik cevap, uygulanmayan gruba göre 3.saatte yüksek sonraki saatlerde düşük seyretmektedir. MP uygulanmasının hipoksiye olan toleransı arttırdığı ve hücrelerin çok güçlü bir yanıtı ihtiyaç duymadığı fikri öne sürülebilir.

Glukokortikoidlerin HIF1 ve hipoksi ile ilişkileri halen tartışma konusudur ve bu konuda bir dizi çalışma mevcuttur. Roy ve arkadaşlarının çalışmasında rat kardiyak dokusunda deksametazon'un HIF1- α 'yı indüklediği rapor edilmiştir (Roy ve ark., 2009); başka bir çalışmada ise karaciğer hücrelerinde deksametazon'un HIF1 fonksiyonunu bozduğu gösterilmiştir (Wagner ve ark., 2008).

Tuuminen ve arkadaşlarının çalışmasında kalp transplantasyonu sırasında I/R hasarına karşı donöre uygulanan Metilprednizolon tedavisinin kalp dokusunda protektif bir etkisi olduğu, HIF1 α ekspresyonunu azalttığı, VEGF-A ve Endotelin1 üzerinden bir mekanizma ile kalbi koruyucu etki gösterebileceği rapor edilmiştir (Tuuminen ve ark., 2013).

Glukokortikoidlerce indüklenmiş lösün fermuar proteini (GILZ) mekanizması üzerinde hala çalışmalar devam etmektedir. Lim ve arkadaşlarının çalışmasında A549 akciğer kanseri hücre serisinde deksametazon ile indüklenen GILZ aşırı ekspresyonunun HIF1 α ekspresyonunu proteozomal degradasyon yoluyla protein seviyesinde düşürdüğü gösterilmiştir (Lim ve ark., 2014).

Glukokortikoidlerin HIF1 α ekspresyonunu nasıl düzenledikleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda edindiğimiz sonuçlarda ise 3.saatte MP uygulanan grupta HIF1 α ekspresyonu artmış olarak tespit edilmiştir.

4.2.2. GRP78

ER stresine karşı gelişen cevabın ana efektörü ve başlatıcısı konumunda olan GRP78, ER stres mediyatörleri IRE1, PERK ve ATF6'ya bağlanıp inaktif ederek

hücresinin homeostazını sürdürür. ER stresi ile birlikte mediyatörlerden ayrılır ve hücrede UPR yanıtını başlatır.

Pan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada vasokonstriktif etkili ve iskemik ön-koşullamayı taklit eden Endotelin-1 ile muamele edilen hücrelerde hipoksinin neden olduğu Laktat dehidrojenaz ve Malondialdehit miktarının düşürüldüğü ve GRP78 miktarının arttırıldığı gösterilmiştir (Pan ve ark., 2004). GRP78 ekspresyonundaki artış hem şaperon olması nedeniyle biriken katlanmamış proteinlerin yeniden konformasyonuna yardımcı olmak, hem de ER stresinin uzamasına ve apoptoza geçişe engel olmak amacıyla ER stres mediyatörleri IRE1, PERK ve ATF6'ya bağlanıp inaktif ederek bir negatif feedback mekanizması şeklinde çalışması ile ilişkilidir (Gorman ve ark., 2012). MI'ın fizyolojik bir diğer sonucu olan glukoz açlığı spesifik olarak GRP78 ve GRP94 proteinlerini aktive eder. Şaperon proteinleri olan bu proteinlerin upregülasyonu ER stresi ile hücrenin başa çıkmasına yardımcı olur ve UPR'yi tetikler.

GRP78'in bu fonksiyonları göz önüne alındığında RT-PCR sonuçlarımıza göre MP ön-uygulaması yapılan grupta, kontrol grubuna kıyasla 3, 6. ve 12. saatlerde herhangi bir artış tespit edilememiştir. GRP78 stres durumunda olmayan bir hücrede çok düşük miktarda eksprese olurken, özellikle ER stresi başladığında ekspresyonu arttırılır ve ER stresinin belirteci konumundadır (Healy ve ark., 2009; Zhang ve Zhang, 2010). Hipoksinin 24.saatinde ise MP uygulanan grupta GRP78 ekspresyonu 2,39 kat artarken; MP uygulanmayan grupta bu artış 5,78 olarak saptanmıştır. Her iki gruptaki artış da GRP78'in şaperon aktivitesi ile ilişkilendirilebilir.

Jiang ve ekibinin yaptıkları çalışmada Panax ginseng özütü (WEG) P12 hücrelerine uygulanmış, Glukokortikoid reseptöründeki (GR) ekspresyon artışına bağlı olarak GRP78, downregülasyonu olduğu gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2015). MP uyguladığımız grupta ortamdaki glukokortikoid miktarının artışına paralel artan GR'nin benzer bir mekanizma ile GRP78 ekspresyonunu düşürdüğü düşünülmektedir.

4.2.3. PERK

PERK, UPR'da aktive olan ilk yolaktır. Hücrel stres faktörlerinin olmadığı koşullarda endojen PERK, fonksiyonu prolil hidroksilaz tarafından inhibe edilir. Normoksik koşullarda PERK ubiquitinasyon yoluyla degradasyona uğratılır (Natarajan ve ark., 2009). Hipoksi, prolil hidroksilaz inhibisyonunu stimüle eder, PERK aktive edilir ve bu aktivasyon post-iskemik infarkt alanın azaltılmasında etkilidir (Ockaili ve ark., 2005). Prolil hidroksilaz aktivasyonu için moleküler oksijeni kullanır ve normoksik koşullarda PERK'de olduğu gibi oksidatif protein olan HIF1 α 'yı da inaktif halde tutar (Schofield ve Ratcliffe, 2004). Hipoksik stres koşullarında HIF1 α 'nın hızlı bir indüksiyonu yanında biriken katlanmış proteinlere cevaben aktive olan ER stres mediyatörlerinden PERK, otofosforilasyon ve aktivasyon sonucu hedefindeki protein translasyonunu baskılar ve hücrede katlanmamış protein agregasyonunu azaltmaya çalışır. Bu mekanizma hücre sağ kalımı ve adaptif cevapla ilişkilidir. PERK'in alt yolağında aktive ettiği ATF4 ise uzamış ER stresinin çözülemediği durumlarda CHOP ekspresyonunu uyarır ve PERK/ATF4/CHOP yolağı ER stresinin en temel apoptotik yanıtını oluşturur.

ER stresini takiben PERK tarafından aktive edilen ATF4, CHOP'un çok güçlü bir indükleyicisidir (Ma ve ark., 2002). PERK ekspresyonunda düşüş ATF4 ekspresyonunu ve dolaylı olarak alt yolağındaki CHOP'u etkiler. Sonuçlarımıza göre MP uygulanan grupta PERK ekspresyonu 1,58 kat iken, uygulanmayan grupta 4,12 kat artışla daha yüksek olarak tespit edilmiştir. MP uygulanan grupta PERK ekspresyonundaki düşüşün de CHOP ekspresyonunu etkilemiş olduğu ve pro-apoptotik etkinin bu yolla azalmış olabileceği düşünülmektedir.

4.2.4. IRE1

GRP78'in ayrılması ile aktive olan IRE1, ATF6'nın regüle ettiği XBP1'in kesimlenmesinden sorumludur. XBP1 öncelikle protein katlanması ve ERAD'dan sorumlu genleri düzenler. Başlangıçta ER'nin protein işleme kapasitesi artırılarak

ER stresi çözülmeye çalışılır ve süreç başarılı olursa UPR sonlandırılır. PERK inhibitörlerinin (p58^{IPK} ve GADD34) aşırı ekspresyonu yardımıyla genel protein translasyonu yeniden başlatılır (Toth ve ark., 2007). Hücrede daha fazla yanlış katlanmış protein birikmesini engellemek amacıyla IRE1 endonükleaz aktivitesi sayesinde mRNA degradasyonu (RIDD) yapar ve ER stresinin uzamasına engel olma ve hücre sağkalımını artırma yönünde çalışır (Hollien ve ark., 2009). Ancak stresin uzaması durumunda artmış IRE1 endonükleaz aktivitesi, hücrede hayati mRNA ekspresyonunu engelleyerek apoptotik yolağın aktivasyonu ile sonuçlanır.

Hücrede stresin devam etmesi adaptif cevabı bloke ederek apoptotik geçişe neden olur ve TRAF2, ASK1 ve JNK kompleksi IRE1 tarafından aktive edilerek apoptotik süreci başlatır (Urano ve ark., 2000; Nishitoh ve ark., 2002). Uzamış ER stresinde JNK aktivasyonu, anti-apoptotik Bcl2 grup proteinlerini inhibe ederken, proapoptotik BH3-only proteinlerinin (Bid ve Bim gibi) fosforilasyonu ve aktivasyonunu gerçekleştirir (Schönthal, 2012). Tüm bu sürecin kombinasyonu Bak ve Bax'ın oligomerizasyonuna yol açarak mitokondri dış membran permeabilizasyonunun artması ve intrinsik apoptotik sürecin başlatılması ile sonuçlanmaktadır (Jäger ve ark., 2012)

Çalışmamızda IRE1 24.saate kadar neredeyse bazal seviyede eksprese olurken, 24.saatte MP uygulanan grupta 2,19 kat, MP uygulanmayan grupta ise 4,51 kat artış tespit edilmiştir. GRP78 ile paralel olarak 24.saatte IRE1 ekspresyonundaki artış, ER stres yanıtının 24.satte indüklendiği ve UPR aktivasyonunun başlatılarak hipoksiye karşı yanıt oluşturulduğunu göstermektedir. İlaç uygulanmayan grupta daha yüksek IRE1 ekspresyonu tespit edilmesi ise iki neden ile ilişkilendirilebilir. Birincisi MP muamelesinin AC16 kardiyomiyositlerini H/R hasarına karşı daha toleranslı hale getiriyor olabileceği ve çok şiddetli bir UPR yanıtı oluşturmaksızın hücreler üzerinde protektif bir etkide bulunması düşüncesidir. İkinci olarak ise MP muamelesinin uzamış stres sonucu ER stresince indüklenmiş apoptozdan hücreleri koruma sağladığı, ER-stres yanıtının kısmen azaltılmış olabileceği düşüncesidir. Yapılan MTT analiz sonuçlarımız da 24.saatte ve belirlenen dozda MP uygulanmasının,

uygulanmayan gruba göre hücre canlılıklarını arttırdığı ve koruyucu yönde bir mekanizmanın aktif hale getirildiğini desteklemektedir.

4.2.5. ATF6

ATF6 transmembran ER proteini ve UPR aktivasyonu ile ER'den ayrılarak Golgi'de kesimlenir ve aktif hale gelir. Çözülebilir temel Lysin Fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörü olarak nükleusa taşınır ve burada direkt ERSE veya ATF/CRE taşıyan gen promotorlarına bağlanarak transkripsiyonel aktivasyona neden olur (Yoshida ve ark., 1998).

H9C2 kardiyak miyositlerde stresin neden olduğu ER içindeki Ca^{+2} düşüşünün, GRP78 ekspresyonunu ve ATF6 aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Thuerauf ve ark., 2006).

Transkripsiyon faktörü ATF6 iskemi tarafından indüklenir ancak reperfüzyon sırasında inaktive edilir, bu mekanizma iskemi sırasında ER stres yanıt genlerinin aktive edilmesi ve reperfüzyon aşamasında ise hücre sağkalımına neden olan ön-koşullama etkisi ile bu aktivasyonun azaltıldığı şeklinde rapor edilmiştir (Szegezdi ve ark., 2006). Çalışmamızda bu bulgu ile paralel olarak H/R uygulanmış hücrelerde ATF6 ekspresyonunda MP verilen grupta bir değişim gözlenmemiştir. MP verilmeyen grupta ise ATF6 ekspresyonunda 2,4 kat artış tespit edilmiştir. MP verilmeyen gruptaki bu artış tam olarak aydınlatılamamıştır.

4.2.6. CHOP

CHOP'un mitokondriyal dış zar üzerindeki Bcl2 aile proteinlerini etkileyerek proapoptotik BAX upregülasyonu (Fu ve ark., 2010) ve anti-apoptotik Bcl-2'nin down regülasyonu yaptığı ve (McCullough ve ark., 2001) mitokondriden Sitokrom-C salınması ile apoptotik kaspazları uyararak proapoptotik bir süreci indüklediği

bilinmektedir (Oltvai ve ark., 1993). ER stresinin çözülemediği durumlarda CHOP, BCL2 inhibisyonu ve Bim aktivasyonu yaparak apoptozu uyarmaktadır (Puthalakath ve ark., 2007). CHOP alt yolağındaki ERO1 α ekspresyonunu artırır. ERO1 α hücrede Ca⁺² salımını indükler (Li ve ark., 2009).

Kronik miyokardiyal iskemide CHOP'un knockdown edilmesinin, uzamış iskemiye takiben kardiyomiyosit apoptozunu azalttığı gösterilmiştir (Terai ve ark., 2005).

Miyazaki ve arkadaşlarının CHOP^{-/-} farelerde yaptıkları çalışmaya göre CHOP eksikliğinin iskemiye takiben reperfüze edilen miyokardiyumda oluşan apoptozu baskıladığı ve CHOP aracılı yolağın I/R sonrası kardiyomiyosit ölümünde etkili olduğu gösterilmiştir. *In vivo* miyokardiyal I/R sonrası özellikle reperfüzyona bağlı olarak artan ROS üretimi nedeniyle ER-stresince indüklenmiş ve CHOP-aracılı apoptozun aktivasyonu görülür (Miyazaki ve ark., 2011). Bu apoptotik potansiyel CHOP'un ER stresi sırasında çok fazla oranda indüklenmesi (Myoishi ve ark., 2007), mitojen aktive edici protein kinaz ASK1'in p38 yolağını aktive etmesi ve devamında CHOP'un fosforilasyonu ve aktivasyonu ile maksimal apoptotik etkiye ulaşır (Oyadomari ve Mori, 2004). ASK1 aynı zamanda JNK aracılı yolağın aktivasyonunda da görevlidir.

Larinks epidermoid karsinoma hücrelerinde (HEp2) düşük doz deksametazon uygulanmasının, CHOP ekspresyonunu düşürdüğü ve GRP78 ekspresyonunu buna paralel artırarak adaptif bir cevap oluşturduğu gösterilmiştir (Düzgün ve ark., 2013).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre ER stresi olmayan durumlarda çok düşük ekspresyonu olduğu bilinen CHOP'un hipoksi başlangıcında bazal seviyede eksprese olduğu tespit edilmiştir. İlk 12 saat içinde ekspresyonunda değişme saptanmayan CHOP'un 24.saatte ekspresyonu artırılarak stres cevabına dahil olduğu düşünülmektedir. MP uyguladığımız grupta CHOP ekspresyonu 3 kat iken; MP uygulanmayan grupta 9,61 kat artış tespit edilmiştir. CHOP'un artan ekspresyonu

ER-aracılı hücre ölümünü indükler ve yaptığımız MTT analizi ile de paralel olarak 24.saate MP uygulanmayan grupta canlılık düşük bulunmuştur.

XBP1 ve p50ATF6 da CHOP promotoruna bağlanmalarına rağmen, PERK tarafından aktive edilen ATF4, CHOP'un çok güçlü bir indükleyicisidir (Ma ve ark., 2002). PERK ekspresyonunda düşüş ATF4 ekspresyonunu ve dolaylı olarak alt yolağındaki CHOP'u etkiler. Sonuçlarımıza göre MP uygulanan grupta PERK ekspresyonu, uygulanmayan gruba göre daha düşük seyretmektedir ve bunun da CHOP ekspresyonunu etkilemiş olduğu ve pro-apoptotik etkinin bu yolla azalmış olabileceği düşünülmektedir.

Miyazaki ve grubunun çalışmasında I/R sonrası, reperfüzyonun 0,5 ve 2.saatlerinde CHOP'un indüklenmesine paralel olarak, PERK'in inaktif hale getirdiği eIF2 α 'nın defosforile ve aktive olduğu da tespit edilmiştir. eIF2 α defosforilasyonu, ER stresinin aktif olduğu hücrede ölümü tetikleyen bir mekanizmadır çünkü protein translasyonunu arttırarak hücrede daha fazla protein birikmesine neden olmaktadır. Bu çalışma da sonuçlarımızla uyumlu olarak hipoksi sonrası 2 saatlik re-oksijenasyonun neden olduğu hasarın hücrede CHOP indüksiyonuna neden olduğu düşüncesini doğrulamaktadır. Ayrıca ATF6 tarafından ekspresyonu arttırılan XBP1 ve IRE1 tarafından stimüle edilen XBP1 splayının artması da CHOP'un indüklendiği bu saatlere tekabül etmektedir (Miyazaki ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada XBP1'in ve splay formunun ekspresyonuna bakılmamıştır ancak IRE1 ekspresyonunun da CHOP'un indüklendiği saatlerde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Literatürlerde de gösterildiği gibi IRE1 uzamış ER stresine karşı apoptotik sinyalleri aktive ederek TRAF2 ve ASK1'i indüklemesi ve devamındaki CHOP fosforilasyonu ER-stresince indüklenmiş hücre ölümüne neden olmaktadır. IRE1 ekspresyonunda azalma proapoptotik sinyallerin azalması ile ilişkilidir.

Çalışmamızda artan CHOP ekspresyonunun hipoksiyi takip eden re-oksijenasyon sonrası hücrede artan ROS miktarının bir sonucu olarak PERK'in aktive ettiği ATF4 ve IRE1'in aktive ettiği ASK1 tarafından indüklendiği düşünülmektedir.

Jang ve arkadaşlarının çalışmasında Glukokortikoid Reseptör antagonisti Mifepriston ile muamele edilen renal karsinoma hücrelerinde sXBP1, GRP78 ve CHOP ekspresyonlarında artış olduğu tespit edilmiştir. Mifepriston'un doz bağımlı olarak renal karsinoma hücrelerinde apoptozu indüklediği ve CHOP'un siRNA aracılı susturulması sonrası bu etkinin azaldığı gösterilmiştir (Jang ve ark., 2015).

Glukokortikoid reseptörünün inhibisyonu karsinoma hücrelerinde pro-apoptotik ER stresini indüklemiştir. Yapılan bu çalışmanın ışığında glukokortikoid muamelesinin ve dolayısıyla reseptör aktivasyonunun hücrede anti-apoptotik etkiye sahip olabileceği çalışmamız ile de doğrulanmıştır. Reseptör inaktive edilen hücrelerde CHOP induksiyonu tespit edilmiş olup, çalışmamızda da glukokortikoid verilmeyen kardiyak hücrelerde CHOP upregülasyonu tespit edilmiştir ve glukokortikoid verilen gruptaki düşük CHOP ekspresyonunun reseptör regülasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Jang ve ark., 2015). Bir başka çalışmada ise glukokortikoid ile birlikte Mifepriston uygulaması sonrası infarkt alanın inhibitör verilmeyen gruba göre daha fazla ve kardiyak hasarın yüksek olduğu gösterilmiştir (Xu ve ark., 2011).

4.2.7. HSP72

Hücrede translasyonu yapılan proteinlerin son konformasyonunu almasına (protein katlanması) yardımcı olan, farklı türde streslere karşı aktivasyonu indüklenen, sitoprotektif etkili şaperonlardır. Bir kısmı hücrelerde konstitütif olarak eksprese olurken, bir kısmı stres koşullarına bağlı olarak indüklenmektedir. HSP72 de şaperon aktivitesi ATP bağımlı olan, stresle indüklenebilir HSP70 ailesi üyelerindendir (Young, 2010) ve normal şartlardaki hücrelerde ekspresyonu düşüktür. Çalışmamızda HSP72'nin ekspresyonu ER stres yanıtının oluşturulduğunu düşündüğümüz 24.saatte MP uygulanan grupta 1,33 kat; MP uygulanmayan grupta ise 3,66 kat olarak tespit edilmiştir. Diğer saatlerde ekspresyonunun düşük olması ER stresin indüklenmemiş olması ile ilişkilidir. MP uygulanmayan grupta fazla görülen kat artışı ise bu grupta hücrelerin H/R nedeniyle protein katlanmasının sekteye uğraması ve biriken katlanmamış proteinlere karşı şaperon aktivitesini yükseltmesi

ile açıklanabilir. MP uygulanan grupta ise oluşan H/R stresine karşı hücrelerin daha efektif bir cevap geliştirdiği ve MP uygulanmasının hücrede protein katlanma kapasitesini arttırdığı düşüncesindeyiz.

Pan ve ekibinin yaptıkları çalışmada iskemik ön-koşullamayı taklit eden Endothelin-1 ile muamele edilen hücrelerde GRP78 ve HSP72 ekspresyonunun arttığı Western Blotlama ile gösterilmiştir (Pan ve ark., 2004). HSP'lerin moleküler şaperon olmaları nedeniyle iskemik ön-koşullama sonrası mutlak bir iskemi sırasında yeni sentezlenen ve hasarlı proteinlerin tamir edilmesi görevini üstlendiği düşünülmektedir. MI öncesi glukokortikoid uygulanmasının, iskemik ön-koşullama ile benzer etkiye sahip olduğu daha önce bahsettiğimiz çalışmalarda rapor edilmiştir. Buna göre iskemik ön-koşullamayı taklit eden Endothelin-1 muamelesi hücrelerde HSP72 miktarını indüklerken, iskemik ön-koşullama ile benzer bir mekanizmaya sahip olduğunu düşündüğümüz MP ön-muamelesinin HSP72 üzerinde böyle büyük bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Valen ve grubunun 2000 yılında yaptıkları çalışmada MP ön-uygulaması sonrası I/R uygulanan farelerden aldıkları doku örneklerinde MP uygulanan grupta HSP72 proteininde artış saptanırken, HSP72'nin mRNA düzeyinde herhangi bir değişiklik göstermediği ve posttranskripsiyonel mekanizma aracılığı ile HSP72 protein seviyesinin upregüle edildiği rapor edilmiştir (Valen ve ark., 2000). mRNA düzeyine bağlı olmaksızın HSP72 protein düzeyinde görülen artışın bir diğer muhtemel nedeni glukokortikoid reseptörünün HSP90 ve HSP72 ile interaksiyonudur. HSP72 bir komponenti olmamasına rağmen, inaktif glukokortikoid reseptörü bir miktar HSP72'ye bağlı bulunur. Ortamda bulunan glukokortikoid miktarına bağlı olarak reseptörün aktive olmasıyla, hücreye HSP72 ve diğer aksesuar proteinlerin salınması gerçekleşir (Dittmar ve ark., 1998). Aynı çalışmada deksametazon ve hidrokortizon ile muamele edildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiş ve bu durumun genel bir glukokortikoid etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda MP uygulanan grupta HSP72'nin mRNA düzeyinde çok yüksek bir ekspresyon tespit edilmemesi bu mekanizma ile açıklanabilir. MP uygulanan grupta

glukokortikoid reseptörüne bağlı bulunan HSP72 proteinleri serbest hale geçerek protein seviyesinde bir artışa neden olur ve bu hücrelerde hasarlı proteinlerin katlanmasının reseptörden salınan HSP72'ler aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. MP uygulanmayan grupta ise HSP72 transkripsiyonel olarak indüklenir ve ER stresine cevaben ekspresyonu arttırılır.

4.2.8. BCL2 Aile Proteinleri

BCL2 aile proteinleri birçok kardiyovasküler hastalıkta, potansiyel terapötik hedef olarak yer almaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarı, kalsiyum deregülasyonu, oksidatif stres ve ER stresi gibi birçok uyarıya cevaben kardiyak hücre ölümünde BCL2 aile üyeleri aktif rol oynamaktadır. Anti-apoptotik BCL2 üyeleri (BCL2, BCL-xL ve Mcl-1), pro-apoptotik BAX ve Bak inhibisyonu yaparak mitokondri membran bütünlüğünü korumaktadır.

Mitokondride ve sitozolik lokalizasyonlarının dışında BCL2 aile proteinleri ER membranında da bulunur ve ER'de Ca^{+2} dengesinin sağlanmasında rolleri olduğu rapor edilmiştir (Rao ve ark., 2004). BCL2 proteininin ER stresince indüklenmiş apoptozu bloke ettiği bilinirken, BAX/Bak double nakavt hücreler ER stres aracılı hücre ölümüne karşı dirençlidir (Zong ve ark., 2001). Ayrıca BAX/Bak'ın ER stresince indüklendiği; ER-stres ilişkili transkripsiyon faktörü CHOP'un BCL2 inhibisyonu yaparak apoptozu indüklediği de rapor edilmiştir (Boyce ve Yuan, 2006). BCL2 veya BCL-xL ekspresyonunun arttırılması veya BAX ve Puma'nın baskılanması kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarına karşı korunmayı arttırmaktadır (Imahashi ve ark., 2004).

BAX, BCL2 ailesi üyesi olan önemli bir pro-apoptotik faktördür. Normal koşullardaki hücrelerde, BAX sitoplazmada lokalize halde bulunur. Apoptoz indüksiyonu ile konformasyonel değişime uğrayarak pro-apoptotik etkisi nedeniyle sitozolden mitokondriye göç eder. BAX'ın mitokondri permeabilite geçiş poru bileşenleri ile ilişkisi porun açılması, mitokondriyal membran polarizasyonunda

düşüş ve Sitokrom-C salınması sonuçlanır. Sitokrom C'nin salınması ile apoptozun içsel yolağının aktivasyonu ve efektör kaspazlar aracılı hücre ölümü ile noktalanır. Daha önceki çalışmalarda kardiyak hasarda BAX'ın upregüle olduğu gösterilmiştir (Hochhauser ve ark., 2003).

Çalışmamızda MP ön-uygulaması yapılmamış grupta H/R sonrası, MP uygulanmış gruba göre pro-apoptotik BAX ekspresyonu yaklaşık 5 kat daha fazla bulunmuştur.

Bilindiği gibi pro-apoptotik olan BAX ekspresyonu ile, anti-apoptotik BCL2 ekspresyonunun oranı hücrelerde apoptozun önemli bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Buna göre MP ön-uygulaması yapılmamış grupta H/R sonrası BAX/BCL2 ekspresyon oranı 3,41 iken, MP uygulanmış grupta BAX/BCL2 ekspresyon oranı 1,44'te kalmış ve iki grup arasındaki bu ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MTT sonuçlarımız da 24.saatte hücre canlılığının MP uygulanmayan grupta daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak 24.saatte MP uygulanmayan grupta apoptozun indüklendiği, MP uygulamasının ise kardiyak hücreleri muhtemel apoptozdan koruduğu, pro-apoptotik BAX'ın bu grupta daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

MP uygulanan grupta BAX/BCL2 oranının düşük seyretmesi MP'nin BAX ekspresyonu üzerindeki olası etkisini akla getirmiştir. Çünkü sonuçlarımıza göre 24.saatte MP uygulanan grupta BCL2 ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmamıştır. Bu sonuç bize anti-apoptotik etkinin BCL2 üzerinden sağlanmadığı ve başka bir mekanizmanın aktif olabileceğini düşündürmüştür. Bu düşünceden hareketle anti-apoptotik olan BCL-xL'nin ekspresyonu araştırılmıştır. Çalışmamızda özellikle 6. saatte BCL-xL ekspresyonu her iki grupta da anlamlı derecede artmış, ayrıca bu artışın MP uygulanan grupta MP uygulanmayan gruba göre tüm saatlerde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 24. saatte de MP uygulanan gruptaki ekspresyon (1,61 kat), uygulanmayan gruba (1,28 kat) göre daha fazla olarak görülmüştür. MP'nin hücreler üzerindeki anti-apoptotik etkisinin BCL2 üzerinden değil BCL-xL üzerinden yürütülmesi muhtemeldir. MTT sonuçlarımız ile paralel olan bu bulgu bize 6 ve 24.saatlerde artan hücre canlılıklarının, BCL-xL aracılı anti-apoptotik

mekanizma aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. MP uygulanması ile BCL-xL ekspresyonunda artış hücrelerin apoptozdan korunması ve kardiyak hasarın azaltılması yönünde çalışan en önemli bulgudur.

H/R'ye cevaben gelişen BCL-xL indüksiyonu yapılan bazı çalışmalarla da gösterilmiştir. Yine bir glukokortikoid türevi olan deksametazon'un miyokardiyumda BCL-xL ekspresyonunu promotor aktivasyonu yoluyla indüklediği ve Mifepriston uygulamasının BCL-xL aktivasyonunu engellediği saptanmıştır (Xu ve ark., 2011). BCL-xL promotorunda glukokortikoid yanıt element dizisi bulunmamasına rağmen, glukokortikoid reseptörünün BCL-xL ekspresyonunu kontrol edebildiği gösterilmiştir. Bir çalışmada fare epitel hücrelerinde, Glukokortikoid muamelesi ile aktive olan reseptörün Hormon yanıt elemente bağlanarak gen regülasyonu yaptığı rapor edilmiştir (Viegas ve ark., 2004). Bu çalışma da bizim verilerimizle paralel olarak glukokortikoid reseptör-bağımlı şekilde BCL-xL transkripsiyonel aktivasyonunun yapıldığını ortaya koymaktadır.

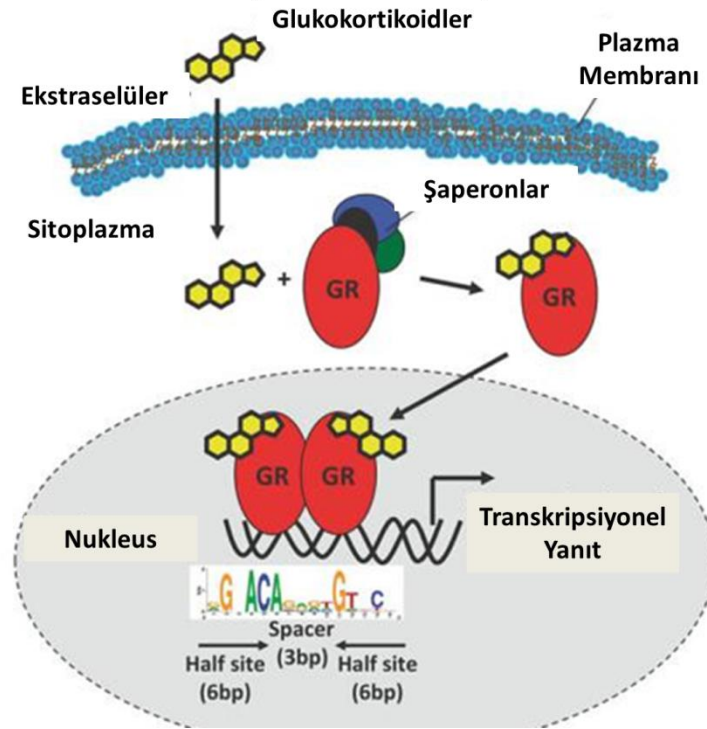
Glukokortikoid olan deksametazon ile ön-muamele edilen C6 glioma hücrelerinde staurosporin, taspigargin ve etoposide tarafından indüklenen apoptozun inhibe olduğu ve bu inhibisyonun BCL-xL indüksiyonu aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Chonghaile ve ark., 2006). Ayrıca kemoterapi ajanlarına karşı deksametazonca indüklenen direnç, BCL-xL gen ekspresyonunun arttırılmasıyla glioma hücrelerinde (Rieger ve ark., 1999) ve diğer solid malignant hücrelerde (Gascoyne ve ark., 2003) gösterilmiştir.

Proksimal tübüler hücrelerde (HK2) iskemi öncesi veya reperfüzyon öncesi tek doz deksametazon uygulanmasının, iskemi/reperfüzyon hasarının neden olduğu biyokimyasal ve histolojik akut böbrek yetmezliği hasarını azalttığı gösterilmiştir. Deksametazon'un bu hücrelerde glukokortikoid reseptörüne bağlanmasıyla promotor aktivasyonundan bağımsız olarak ERK1/2 fosforilasyonu, devamında BCLxL aktivasyonu ve iskemice indüklemiş BAX, Kaspaz9 ve Kaspaz 3 inhibisyonu yaparak apoptoz ve nekrozu azalttığı gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2009).

Doksorubisin (DOX) birçok neoplazinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır ancak DOX terapisi alan hastalarda kardiyotoksisite en önemli yan etki olarak gözlenir. Aguilar ve arkadaşlarının çalışmasında, H9C2 kardiyak hücre serisinde Glukokortikoid uygulanması ile uyarılan Lösün Fermuar (GILZ) protein ekspresyonu sonucu BCL-xL protein seviyesinde artışın DOX-indüklenmiş apoptoza karşı kardiyomiyositleri koruduğu ve bu uygulamanın glukokortikoidlerin etki mekanizması olabileceği öne sürülmüştür (Aguilar ve ark., 2014). Bu çalışmada bir başka anti-apoptotik protein BCL2 protein seviyesinde ise düşüş tespit edilmiş ve bu mekanizma BCL-xL'nin BCL2'ye göre DOX-indüklenmiş apoptoz inhibisyonunda 10 kat daha potent olması (Fiebig ve ark., 2006) ile ilişkilendirilmiştir (Aguilar ve ark., 2014). Çalışmamızda da gelişen hipoksi ve ER stresine cevaben hücre sağkalımını arttırıcı mekanizma BCL-xL ekspresyonunun arttırılması ile gerçekleşir. Yapılan çalışmalarla da glukokortikoid muamelesinin değişik hücre tiplerinde de BCL-xL ekspresyonunun indüklenmesine neden olduğu gösterilmiş, özellikle kanser hücrelerinde bu durumun kemoterapi direnci ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür.

4.3. Glukokortikoidlerin Etki Mekanizması

Hücre içinde inaktif halde bulunan glukokortikoid reseptörlerine (GR), glukokortikoidlerin bağlanması ile reseptör aktivasyonu birtakım genlerin indüksiyonu veya represyonu ile ilişkilidir. Reseptörün bu bifonksiyonel mekanizması DNA-bağlayıcı bölgesi aracılığı ile genoma bağlanması ile başlar ve ko-aktivatör proteinlerin toplanması ile direkt veya indirekt olarak RNA polimeraz II aktivitesini regüle eder.



Şekil 4.1. Glukokortikoid reseptör mekanizması (Meijnsing, 2015)

Glukokortikoidlerin etki mekanizmaları glukokortikoid reseptörünün birçok transkripsiyonel yolak üzerindeki pleiotropik etkileri ile ilişkilidir. Steroidler tarafından aktive edilen GR, Glukokortikoid Yanıt Elementi'ne (GRE) bağlanır ve NF- κ B, Annexin1 ve MAPK gibi anti-inflamatuvar transkripsiyonel yolakların regülasyonunu yapar. GR aynı zamanda direkt protein-protein interaksyonu yoluyla pro-inflamatuvar genlerin ekspresyonunu düşürür (Martens ve ark., 2005). Glukokortikoidlerin epitelyal hücrelerde ER stresini inhibe ettiği bildirilmiş ancak mekanizması aydınlatılamamıştır (Fujii ve ark., 2006; Shang ve ark., 2011).

2011 yılında yapılan bir çalışmada INS-1E hücrelerinde Glukokortikoidlerce indüklenmiş beta hücre disfonksiyonu ve ER stresi sonrası UPR aktivasyonunun ilişkisi araştırılmıştır. Prednizolon muamelesi sonrası, PERK'in aktivasyonu ve buna bağlı olarak eIF2 α fosforilasyonunun azaldığı ancak UPR'nin diğer kolları olan ATF6 ve IRE1/XBP yolaklarında glukokortikoid reseptör aracılı aktivasyon tespit edilmiştir (Linssen ve ark., 2011).

Endojen intestinal glukokortikoidlerin, intestinal barsak hastalığında inflamasyonun baskılanması ve homeostazın sağlanmasında önemli oldukları bilinmektedir (Cima ve ark., 2004). Das ve ekibinin yaptıkları çalışmada, kültüre intestinal sekretuar hücrelerinde, glukokortikoid reseptörü bağımlı şekilde, glukokortikoid olan deksametazon'un ER stresini baskıladığı, N-glikozilasyonun inhibisyonu ile UPR aktivasyonunu sağladığı, ER'de Ca^{+2} miktarını azalttığı gösterilmiştir. IRE1 β , sXBP1, ATF4 ve CHOP ekspresyonu deksametazon uygulanması sonrası önemli şekilde düşerek normal seviyelere yaklaşmıştır. Deksametazon intestinal sekretuar hücrelerde GRP78 gibi şaperon proteinleri ve EDEM1 gibi ERAD'da görevli proteinlerin upregülasyonunu yaparak doğru protein katlanma kapasitesini arttırmış ve hasarlı proteinlerin degradasyonunu sağlamıştır. Çalışmada glukokortikoidlerin ön-uygulama olarak kullanılmasının ER stres genlerinin azaltılmasında en etkili yöntem olduğu vurgulanmıştır (Das ve ark., 2013).

İnsan embriyonik böbrek 293 hücrelerinde glukoz azlığının indüklediği ER stresi, deksametazon muamelesi ile inhibe edilmiştir. ER stresinin azaltılması hücrede ATP üretiminin artırılması ile koreledir (Fujii ve ark., 2006).

Jiang ve ekibinin yaptıkları çalışmada Panax ginseng özütü (WEG) P12 (pheochromocytoma) hücrelerine uygulanmış, GR ve HDAC6 ekspresyonunu kuvvetle arttırdığı ve HSP90, Sitokrom C, Kaspaz3, Kaspaz 9 ve CHOP, GRP78, XBP-1 ve Kaspaz 12 gibi ER stres ilişkili proteinlerin downregülasyonunu yaptığı gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2015). GR ve HDAC6'nın birlikte artışı GR'ünün gen ekspresyonu üzerindeki etkisi deasetilasyon ile sağladığı ve ER stres ilişkili genlerin kromatin yapısını kapatarak transkripsiyonel represyon üzerinde etki edebileceğini düşündürmüştür.

Yaptığımız çalışmada da bir glukokortikoid türevi olan Metilprednizolon'un ER stresinin aktif olduğu 24.saatte ER stresinde etkili olan GRP78, PERK, IRE1, CHOP, ATF6 ve HSP72 genlerinin ekspresyonunu, MP uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede baskıladığı; ayrıca yine glukokortikoid reseptör bağımlı şekilde indüklendiği bilinen BCL-xL'nin MP uygulanan grupta daha yüksek ekspresyonu

olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar da MP'nin ER stres genleri üzerindeki azaltıcı etkisini ortaya koymuştur. Jiang ve ekibinin çalışması dikkate alındığında MP'nin ER stres genlerini, histon deasetilaz aktivasyonu ve transkripsiyonun baskılanması yoluyla downregüle ettiği düşünülmektedir.

ER stres cevabının stres koşullarında adaptif bir yanıt olarak ortaya çıkması, stresin uzaması durumunda apoptotik bir geçiş ile sonuçlanır. Elde ettiğimiz verilerde MP uygulanan grupta ER stres mediyatör genlerinin tamamen inhibe edilmediğini görüyoruz. Hücrede bir seviyede bu adaptif genlerin ekspresyonu, biriken yanlış katlanmış proteinlerin yeniden katlanması veya ERAD mekanizması ile degrede edilmeleri ile ilişkilidir. Glukokortikoidlerin protein katlanma kapasitesini arttırıp, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Das ve ark., 2013).

Tüm bu verilere dayanarak; ER stres mekanizmasının hipoksik koşullarda kalbin kullandığı önemli bir yolak olduğu söylenebilir. H/R sonrası ER stres yolaklarının aktivasyonu sonucu hücrelerin apoptoz ile öldükleri gözlenmektedir. Özellikle hipoksik şartlara maruz kalan insan kardiyomiyositlerinde ER stres yanıtının en etkin olarak 24.saatte aktive olduğu belirlenmiştir. Düşük doz MP uygulanan hücrelerde ise H/R'ye bağlı ölen hücrelerin ölümden korunduğu tespit edilmiştir. Düşük doz MP ön-uygulaması yapılan hücrelerde ER stres belirteçlerinin transkripsiyonel olarak baskılanmış olduğu görülmektedir. Hipoksiye bağlı gerçekleşen apoptozun düşük doz MP uygulanan kardiyomiyositleri ER stresini baskılayarak apoptozdan koruduğu ve hücrelerin sağkalımını arttırdıkları ilk kez bu tez çalışması ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak; ER stres mekanizması kalbin korunmasında rol oynamaktadır, ancak aynı zamanda ER stresinin neden olduğu otofaji ve apoptoz hasarına karşı önemli bir terapötik hedef olarak da kabul edilmelidir. UPR, ERAD ve apoptoz yolakları, ER stresinin indüklendiği kardiyovasküler hastalıkların ve özellikle H/R hasarının tedavisinde spesifik terapötik hedefler olarak kullanılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında insan ventriküler kardiyomyosit hücrelerinde H/R sonucunda gelişen apoptozun, düşük doz MP uygulanması ile ER stres yanıtı üzerinden gelişen bir mekanizma sonucu sağkalımın artırılması hedeflenmiştir.

MP ön-uygulanması yapılan AC16 insan ventriküler kardiyomyosit hücreleri uygulamadan 24 saat sonra farklı hipoksi saatlerini takiben, 2 saat re-oksijenasyona tabi tutulmuştur. MP uygulanan grup ile MP uygulanmayan grup arasında MTT canlılık analizi ve RT-PCR ile HIF1 α , GRP78, PERK, IRE1, ATF6, CHOP, HSP72, BAX, BCL2, BCL-xL genlerinin ekspresyonları analiz edilmiştir.

- 1) AC16 kardiyomyositlerin hipoksiye ve devamında re-oksijenasyona maruz kalmaları hücrelerde H/R hasarı yaratmış ve hücre ölümünü hızlandırmıştır. İnsan kardiyomyositlerine MP ön-uygulanmasının bu apoptotik etkiyi *in vitro* düzeyde bir dizi mekanizma ile tersine çevirdiği ve hücre ölümünü azalttığı ilk kez tespit edilmiştir.
- 2) Hipoksi/re-oksijenasyona bağlı koşulların indüklediği ER-stresinin, hipoksinin 24.saatinde özellikle ER stresinde önemli rolü olduğu bilinen mediyatör genler olan GRP78, PERK, IRE1, ATF6 ve HSP72'nin ifadelerindeki artışlar ile ortaya çıktığı tespit edilmiştir. MP uygulanan grupta; MP uygulanmayan gruba göre GRP78, PERK, IRE1 ve HSP72 genlerinin ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar MP uygulanan grupta H/R'nin yarattığı stresinin tolere edilebildiği ve çok yüksek bir ER-stres yanıtının oluşmadığını düşündürmüştür.

- 3) 24 saat süresince hipoksiye maruz kalan AC16 hücrelerinde MP ön-uygulaması yapıldığında %56'ya düşen canlılık oranının %90'a ulaştığı ve MP uygulamasının hücrelerde sağkalımı arttırdığı saptanmıştır.
- 4) Düşük doz MP'nin H/R hasarı olan kardiyomiyosit hücrelerinde, özellikle ER stres genlerinin ekspresyonunu baskılayarak hücreleri ER stres-aracılı apoptozdan korudukları **ilk kez** bu çalışmada belirlenmiştir.
- 5) AC16 insan ventriküler kardiyomiyosit hücre serisine MP ön-uygulaması yapılmasını takiben H/R sonrası, GRP78, PERK, IRE1, ATF6 ve HSP72 gen ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir. Özellikle CHOP ifadesindeki düşüş en fazla azalma gözlenen gen olarak dikkati çekmiştir. H/R'nin neden olduğu ER-stresi aracılı ölüm mekanizmasının en önemli aktivatörü olan bu apoptotik genin MP ön-uygulaması ile inhibisyonu sonucu hücre ölümünün azaltıldığı **ilk kez** bu tez çalışmasında belirlenmiştir.
- 6) MP uygulanmasının, ER stresinde mediyatör rolü olan genlerin ekspresyonunu düşürerek ventriküler miyositleri ER-stres aracılı ölümden koruduğu ayrıca MP uygulanmasının hücrelerde BAX ekspresyonunu baskılayıp ve BCL-xL ekspresyonunu indükleyerek proapoptotik sinyalleri başlattığı da tespit edilmiştir.
- 7) Yaptığımız bu çalışmada glukokortikoid ön-uygulamasının kardiyak hücreleri CHOP inhibisyonu yaparak ER-stres aracılı ölümden koruduğu; hücreleri H/R'un indüklediği hasara karşı anti-apoptotik sinyalleri arttırmak suretiyle sağkalım yönünde desteklediği gösterilmiştir. Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler MI riski taşıyan insanlarda düşük dozlarda MP kullanılmasının olası bir MI sonrası meydana gelecek kardiyak hasarı azaltacağı ve kalp krizinin olumsuz etkilerini hafifletebileceği hipotezini destekler niteliktedir.

- 8) Tez çalışmasında elde edilen bulgular, hedef genlerin Western Blotlama ile protein düzeyinde ekspresyonlarının gösterilmesi ile desteklenmelidir. Ayrıca Metilprednizolon'un etki düzeyini daha net ortaya çıkarabilmek adına Glukokortikoid reseptör inhibitörü (Mifepriston) uygulanması ile hedef genlerin inhibisyon sonrası tekrar çalışılması da gelecek hedeflerimiz arasındadır.

ÖZET

Hipoksi/Re-oksijenasyona Maruz Kalan Kardiyomiyositlerde Metilprednizolon'un Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Miyokardiyal İnfarktüs (MI) koroner arterde tıkanıklık neticesinde, miyokardiyal dokuya yeterli kan akışının sağlanamaması ve iskemi sonrası kardiyomiyositlerin ölümüne neden olan bir hastalıktır. Kalp dokusunda meydana gelen bu hipoksik koşullar, hücre homeostazını bozarak Endoplazmik Retikulum (ER) üzerinde bir stres oluşturur. ER stresi, hücrede katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu adaptif mekanizma olarak Katlanmamış Protein Yanıtını (UPR) başlatır. Glukokortikoid türevlerinin ön-uygulama olarak kullanılmasının, deneysel oluşturulan MI sonrası kardiyak hasarı ciddi ölçüde azalttığı yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur ancak etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışmasında, Metilprednizolon (MP) ön-uygulaması yapılan AC16 insan ventriküler kardiyomiyosit hücreleri uygulamadan 24 saat sonra hipoksi/re-oksijenasyona (H/R) tabi tutulmuştur. MP uygulanan grup ile, MP uygulanmayan grup arasında MTT canlılık analizi ve RT-PCR ile HIF1 α , GRP78, PERK, IRE1, ATF6, CHOP, HSP72, BAX, BCL2, BCL-xL genlerinin ekspresyon farklılıkları tespit ve analiz edilmiştir. MP uygulanmayan kardiyomiyositlerde H/R sonrası hücre ölümünün yüksek olduğu ve H/R'nin neden olduğu ER stresi ilişkili GRP78, PERK, IRE1, ATF6, HSP72 genlerinin ifadesi yüksek bulunarak UPR yanıtının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç MP uygulanmayan grupta, hipoksiye karşı toleransın düşük olduğu ve MP uygulamasının hücrelerde ER stresini azalttığını göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca MP ön-uygulamasının kardiyomiyosit hücrelerinde, H/R sonrası gelişen ER stres-aracılı ölüme karşı BAX ve CHOP genlerinin inhibisyonunu yaparak adaptif cevabın apoptotik yolağa geçişine engel olduğu da gösterilmiştir.

Bu sonuçlar bize MP-ön muamelesinin kardiyomiyosit hücrelerini H/R hasarına karşı dayanıklı hale getirdiği ve düşük dozlarda MP kullanımının olası bir MI'a karşı kalp dokusunda koruyucu etki gösterebileceğini özetler niteliktedir. Çalışmamızın sonuçlarına dayanarak klinik olarak uygulanması kolay ve FDA onaylı formları kolay temin edilebilen bir glukokortikoid olan MP'un, MI riski taşıyan insanlarda kullanılmasının hastalığın kötü prognozuna engel olabilecek bir ajan olduğu düşüncesindeyiz.

Anahtar Sözcükler ER Stresi, Hipoksi/Re-oksijenasyon, Metilprednizolon, Miyokardiyal İnfarktüs, UPR.

SUMMARY

Effects of the Methylprednisolone on the Endoplasmic Reticulum Stress in Cardiomyocytes exposed to Hypoxia/Reoxygenation

Myocardial Infarction (MI) is a disease which occurs in the result of coronary artery occlusion and triggers death of cardiomyocytes. Hypoxic conditions perturb the cell homeostasis in the heart and lead to cellular stress on the Endoplasmic Reticulum (ER). ER stress induces the Unfolded Protein Response (UPR) because of the aggregation of unfolded proteins. Using of glucocorticoid derivatives on the hypoxic cardiac cells, decreases the cardiac damage dramatically. However the mechanism of action is not fully understood.

In this thesis, AC16 human ventricular cell line is pre-treated with Methylprednisolone (MP) for 24 hours and following exposed to hypoxia/reoxygenation (H/R). We performed MTT viability assay and RT-PCR between MP pre-treated group and non-treated group. We analysed the alteration of HIF1 α , GRP78, PERK, IRE1, ATF6, CHOP, HSP72, BAX, BCL2, BCL-xL genes expressions between two groups. In non-treated cardiomyocytes following H/R, cell viability is lower than treated group and ER stress-associated genes include GRP78, PERK, IRE1, ATF6 and HSP72 are upregulated in consequence of excessive UPR activation. This result showed that, in non-treated group, hypoxic tolerance is poor and treatment of MP enhanced the cell survival, diminished the ER stress and inhibited the BAX and CHOP gene expressions. MP treatment prevents apoptotic shift following long term ER stress conditions.

These results show that MP pre-treatment makes cardiomyocyte cells resistant to H/R damage and using of low dosage MP has cytoprotective effect. According to our results, we recommend that using of low dosage MP for the people, at the risk of MI, prevents malign prognosis of the disease.

Key Words: ER Stress, Hypoxia/reoxygenation, Methylprednisolone, Myocardial Infarction, UPR.

KAYNAKLAR

- AGUILAR, D., STROM, J., CHEN, Q.M. (2014). Glucocorticoid Induced Leucine Zipper inhibits apoptosis of cardiomyocytes by doxorubicin. *Toxicology And Applied Pharmacology*, **276**(1), 55-62.
- AKASAKA, T. (2010). What can we expect in PCI in patients with chronic coronary artery disease. Indication of PCI for angiographically significant coronary artery stenosis without objective evidence of myocardial ischemia. *Con. Circ J.*, **75**:1, 211–217.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, NY, USA, 5th edition.
- ANVERSA, P., CHENG, W., LIU, Y. (1998). Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.*, **93** (Suppl 3): S8–S12.
- ASAI, M., TSUKAMOTO, O., MINAMINO, T., ASANUMA, H., FUJITA, M., ASANO, Y., TAKAHAMA, H., SASAKI, H., HIGO, S., ASAKURA, M., TAKASHIMA, S., HORI, M., KITAKAZE, M. (2009). PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol.*; **46**:452– 462.
- AUSTIN, R.C. (2009). The unfolded protein response in health and disease. *Antioxid Redox Signal.*, **11**:2279 –2287.
- AZFER, A., NIU, J., ROGERS, L., ADAMSKI, F., KOLATTUKUDY, P. (2006). Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**:1411-20.
- BELMONT, P.J., CHEN, W.J., SAN PEDRO, M.N., THUERAUF, D.J., LOWE, N.G., GUDE, N., .. GLEMBOTSKI, C.C. (2010). Roles for endoplasmic reticulum–associated degradation and the novel endoplasmic reticulum stress response gene derlin-3 in the ischemic heart. *Circulation Research*, **106**(2), 307-316.
- BENJAMIN, I.J. (2006). Viewing a stressful episode of ER: is ATF6 the triage nurse? *Circ. Res.*, **98**:1120:2.
- BEOHAR, N., RAPP, J., PANDYA, S., LOSORDO, D. W. (2010). Rebuilding the damaged heart: the potential of cytokines and growth factors in the treatment of ischemic heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **56**(16), 1287-1297.
- BOYCE, M., YUAN, J. (2006) Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ.*, **13**, 363-73.

- BRAUNWALD, E., FAUCI, A.S., KASPER, D.L. HAUSER, S.L., LONGO, D.L., JAMESON, J.L. (2001). Harrison's Principles of Internal Medicine (15th Edition). Mc-Graw-Hill Medical Publishing Division, Sayfa: 1377-1387.
- BUXANT, F., KINDT, N., LAURENT, G., NOËL, J. C., SAUSSEZ, S. (2015). Antiproliferative effect of dexamethasone in the MCF-7 breast cancer cell line. *Molecular Medicine Reports*, **12**(3), 4051-4054.
- CHEN, Q., ALEXANDER, D., SUN, H., XIE, L., LIN, Y., TERRAND, J., MORRISSY, S., PURDOM, S. (2005). Corticosteroids inhibit cell death induced by doxorubicin in cardiomyocytes: induction of anti-apoptosis, antioxidant and detoxification genes. *Mol. Pharm.*, **67**:1861–1873.
- CHEN, Q., SUN, H. (2009). Glucocorticoid pharmacotoxicological interactions and modulation of toxicity. *Adrenal Toxicology*, Informa, New York., 205–230.
- CHEN-SCARABELLI, C., AGRAWAL, P.R., SARAVOLATZ, L., ABUNIAT, C., SCARABELLI, G., STEPHANOU, A., LOOMBA, L., NARULA, J., SCARABELLI, T.M., KNIGHT, R. (2014). The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Geriatric Cardiology*, **11**: 338–348.
- CHONGHAILE, T.N., CONCANNON, C. G., SZEGEZDI, E., GORMAN, A. M., & SAMALI, A. (2006). Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. *Apoptosis*, **11**(7), 1247-1255.
- CIMA, I., CORAZZA, N., DICK, B., FUHRER, A., HERREN, S., JAKOB, S., AYUNÍ, E., MUELLER, C. and BRUNNER, T. (2004). Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *The Journal Of Experimental Medicine*, **200**(12), 1635-1646.
- CLEUTJENS, J.P., BLANKESTEIJN, W.M., DAEMEN, M.J., SMITS, J.F. (1999). The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res.*, **44**, 2, 232–241.
- COHEN, F.E., KELLY, J.W. (2003). Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature*; **426**:905–909.
- CONCANNON, C.G., GORMAN, A.M., SAMALI, A. (2003). On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, **8**, 61–70.
- CROW, M., MANI, K., NAM, Y., KITSIS, R. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ. Res.*, **95**:957-70.
- CULLINAN, S.B., DIEHL, J.A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.*, **279**, 20108–20117.
- DAS, I., PNG, C. W., OANCEA, I., HASNAIN, S. Z., LOURIE, R., PROCTOR, M., ERI, R.D., SHENG, Y., CRANE, D.I., FLORIN, T.H. AND MCGUCKIN, M. A. (2013). Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins. *The Journal Of Experimental Medicine*, **210**(6), 1201-1216.

- DASKALOPOULOS, E.P., JANSSEN, B.J.A., BLANKESTEIJN, W.M. (2012). Myofibroblasts in the Infarct Area: Concepts and Challenges. *Microsc. Microanal.*, **18**, 35–49.
- DAVIDSON, M.M., NESTI, C., PALENZUELA, L., WALKER, W.F., HERNANDEZ, E., PROTAS, L., AND ISAAC, N.D. (2005). Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, **39**(1), 133-147.
- DE VRIES, E.G., GIETEMA, J.A., AND DE JONG, S. (2006). Tumor Necrosis Factor–Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications. *Clinical Cancer Research*, **12**(8), 2390-2393.
- DEROO, B.J., ARCHER, T.K. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene*. **20**:3039–3046.
- DEWALD, O., REN, G., DUERR, G.D., ZOERLEIN, M., KLEMM, C., GERSCH, C., TINCEY, S., MICHAEL, L.H., ENTMAN, M.L. & FRANGOGIANNIS, N.G. (2004). Of mice and dogs: Species specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol.*, **164** (2), 665–677.
- DISTELHORST, C. W., MCCORMICK, T. S. (1996). Bcl-2 acts subsequent to and independent of Ca²⁺ fluxes to inhibit apoptosis in thapsigargin- and glucocorticoid-treated mouse lymphoma cells. *Cell Calcium.*, **19**, 473–483.
- DITTMAR, K. D., BANACH, M., GALIGNIANA, M. D., & PRATT, W. B. (1998). The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor· hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90· p60· hsp70 foldosome complex. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(13), 7358-7366.
- DOWNEY, J.M., COHEN, M.V. (2009). Why do we still not have cardioprotective drugs? *Circ J.*, **73**:1171 1177.
- DOWNEY, J.M., DAVIS, A.M., COHEN, M.V. (2007). Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev.*, **12**, 181–188.
- DOYLE, K. M., KENNEDY, D., GORMAN, A. M., GUPTA, S., HEALY, S. J., SAMALI, A. (2011). Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med.*, **15**, 2025–2039.
- DUZGUN, A., BEDİR, A., OZDEMIR, T., NAR, R., KILINC, V., SALIS, O., ... & GULTEN, S. (2013). Effect of dexamethasone on unfolded protein response genes (MTJ1, Grp78, Grp94, CHOP, HMOX-1) in HEp2 cell line.
- ERMAK, G., DAVIES, K.J. (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.*, **38**:713–721.
- FELS, D.R., KOUMENIS, C. (2006). The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biology and Therapy.*, **5**:723–728.
- FORBES, R.A., STEENBERGEN, C., MURPHY, E. 2001. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism., *Circ Res.*, **88**, 802–809.

- FRANGOIANNIS, N.G., SMITH, C.W., ENTMAN, M.L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, **53**, 31–47.
- FREUDE, B., MASTERS, T.N., ROBICSEK, F., FOKIN, A., KOSTIN, S., ZIMMERMANN, R., ULLMANN, C., LORENZ-MEYER, S., SCHAPER, J. (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardio.*, **32**:197–208.
- FU, H.Y., OKADA, K., LIAO, Y., TSUKAMOTO, O., ISOMURA, T., ASAI, M., SAWADA, T., OKUDA, K., ASANO, Y., SANADA, S., ASANUMA, H., ASAKURA, M., TAKASHIMA, S., KOMURO, I., KITAKAZE, M., MINAMINO, T. (2010). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates ER-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation*, **122**:361–369.
- FUJII, Y., KHOSHNOODI, J., TAKENAKA, H., HOSOYAMADA, M., NAKAJO, A., BESSHO, F., YAN, K. (2006). The effect of dexamethasone on defective nephrin transport caused by ER stress: a potential mechanism for the therapeutic action of glucocorticoids in the acquired glomerular diseases. *Kidney International*, **69**(8), 1350-1359.
- GARDNER, B.M., WALTER, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science*, **333**, 1891–1894.
- GARRIDO, C., BRUNET, M., DIDELOT, C., ZERMATI, Y., SCHMITT, E., KROEMER, G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*, **5**, 2592–2601.
- GASCOYNE, D.M., KYPTA, R.M., & VIVANCO, M.D.M. (2003). Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(20), 18022-18029.
- GAUT, J.R., HENDERSHOT, L.M. (1993). The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.*, **5**, 589–595.
- GETHING, M-J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol.*, **10**:465–472.
- GHAEMMAGHAMI, S., HUH, W.K., BOWER, K., HOWSON, R.W., BELLE, A., DEPHOURE, N., O'SHEA, E.K., WEISSMAN, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**:737–741.
- GORLACH, A., KLAPPA, P., KIETZMANN, T. (2006) The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal.*, **8**:1391–1418.
- GORMAN, A.M., HEALY, S.J., JÄGER, R., & SAMALI, A. (2012). Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics*, **134**(3), 306-316.
- GROSS, E., SEVIER, C.S., HELDMAN, N., VITU, E., BENTZUR, M., KAISER, C.A., THORPE, C., FASS, D. (2006). Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci.*, **103**:299 – 304.

- GUAN, X., DELO, D.M., ATALA, A. SOKER, S. (2011). In vitro cardiomyogenic potential of human amniotic fluid stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.*, **5**, 220–228.
- GUPTA, S., CUFFE, L., SZEGEZDI, E., LOGUE, S.E., NEARY, C., HEALY, S. (2010). Mechanisms of ER stress-mediated mitochondrial membrane permeabilization. *Int J Cell Biol.*, 170215.
- GUPTA, S., DEEPTI, A., DEEGAN, S., LISBONA, F., HETZ, C., SAMALI, A. (2010). HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction. *PLoS Biol.*, **8**, e1000410.
- HACKI, J., EGGER, L., MONNEY, L., CONUS, S., ROSSE, T., FELLAY, I. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*, **19**, 2286–2295.
- HAMANAKA, R., BENNETT, B., CULLINAN, S., DIEHL, J. (2005). PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Mol. Biol. Cell.*, **16**:5493-501.
- HARDING, A.H. P., NOVOA, I., ZHANG, Y., ZENG, H., WEK, R., SCHAPIRA, M. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.*, **6**, 1099–1108.
- HARDING, B.H.P., ZHANG, Y., BERTOLOTTI, A., ZENG, H., RON, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.*, **5**, 897–904.
- HARDING, H., ZHANG, Y. AND RON, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, **397**:271-4.
- HARDING, H.P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P.D., CALFON, M. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.*, **11**, 619–633.
- HAUSENLOY, D.J., YELLON, D.M. (2007). Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion. *Pharmacol Ther.*, **116**:173–191.
- HAZE, K., YOSHIDA, H., YANAGI, H., YURA, T., MORI, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell.*, **10**:3787-99.
- HEALY, S.J., GORMAN, A.M., MOUSAVI-SHAFAEI, P., GUPTA, S., SAMALI, A. (2009). Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol.*, **625**, 234–246.
- HETZ, C., BERNASCONI, P., FISHER, J., LEE, A.H., BASSIK, M.C., ANTONSSON, B. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*, **312**, 572–576.
- HETZ, C., GLIMCHER, L.H. (2009). Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome. *Mol Cell.*, **35**, 551–561.

- HOCHHAUSER, E., KIVITY, S., OFFEN, D., MAULIK, N., OTANI, H., BARHUM, Y., VIDNE, B.A. (2003). Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **284**(6), H2351-H2359.
- HOCHMAN, J.S., CHOO, H. (1987). Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation*, **75**: 299–306.
- HOCHSTRASSER, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, **458** (7237), 422-429.
- HOLLIEN, J., LIN, J.H., LI, H., STEVENS, N., WALTER, P., WEISSMAN, J. S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol.*, **186**,323–331.
- HSIEH, P.C., SEGERS, V.F., DAVIS, M.E. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.*, **13**:970-4.
- IMAHASHI, K., SCHNEIDER, M., STEENBERGEN, C., MURPHY, E. (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/ reperfusion injury. *Circ. Res.*, **95**, 734-41.
- ISODONO, K., TAKAHASHI, T., IMOTO, H., NAKANISHI, N., OGATA, T., ASADA, S., ADACHI, A., UEYAMA, T., OH, H., MATSUBARA, H. (2010). PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *PLoS One*, **5**:e9746.
- ITO, D., WALKER, J., THOMPSON, C., MOROZ, I., LIN, W., VESELITS, M., HAKIM, A., FIENBERG, A., THINAKARAN, G. (2004). Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. *Mol. Cell Biol.*, **24**: 9456-69.
- JÄGER, R., BERTRAND, M.J., GORMAN, A.M. (2012).The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biology of the Cell.*, **104**:259–270.
- JANG, J.H., MIN, K. J., KIM, S., PARK, J. W. and KWON, T.K. (2015). RU486 Induces Pro-Apoptotic Endoplasmic Reticulum Stress Through the Induction of CHOP Expression by Enhancing C/EBP δ Expression in Human Renal Carcinoma Caki Cells. *Journal Of Cellular Biochemistry*. DOI 10.1002/jcb.25278
- JIANG, Y., LI, Z., LIU, Y., LIU, X., CHANG, Q., LIAO, Y., & PAN, R. (2015). Neuroprotective effect of water extract of Panax ginseng on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells and its underlying molecule mechanisms. *Journal Of Ethnopharmacology*, **159**,102-112.
- KADOWAKI, H., & NISHITOH, H. (2013). Signaling pathways from the Endoplasmic Reticulum and their roles in disease. *Genes*, **4**(3), 306-333.

- KALLIO, P.J., PONGRATZ, I., GRADIN, K., MCGUIRE, J., POELLINGER, L. (1997). Activation of hypoxia inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94** (11): 5667–72.
- KARASKOV, E., SCOTT, C., ZHANG, L., TEODORO, T., RAVAZZOLA, M., VOLCHUK, A. (2006). Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic {beta}-cell apoptosis. *Endocrinology*; **147**:3398–3407.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H., & CURRIE, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal Of Cancer*, **26**(4), 239.
- KLEE, M., PALLAUF, K., ALCALA, S., FLEISCHER, A., PIMENTEL-MUINOS, F.X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J.*, **28**, 1757–1768.
- KRAJEWSKI, S., TANAKA, S., TAKAYAMA, S., SCHIBLER, M. J., FENTON, W., REED, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.*, **53**, 4701–4714.
- KUMAR, S., ALLEN, D. A., KIESWICH, J. E., PATEL, N. S., HARWOOD, S., MAZZON, E., RAFTERY, M.J., THIEMERMANN, C., YAQOOB, M.M. (2009). Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, **20**(11), 2412-2425.
- KUMAR,V., COTRAN R.S., ROBBINS S.L. (2000). Basic Pathology. Nobel Tip Kitapevi. Sayfa: 283-289.
- LEE, A.S. (2001).The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in Biochemical Sciences*. **26**:8:504–510.
- LEIST, M., SINGLE, B., CASTOLDI, A.F. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.*, **185**: 1481–1486.
- LI, G., MONGILLO, M., CHIN, K. T., HARDING, H., RON, D., MARKS, A. R., & TABAS, I. (2009). Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal Of Cell Biology*, **186**(6), 783-792.
- LIAKOPOULOS, O.J., SCHMITTO, J.D., KAZMAIER, S., BRAUER, A., QUINTEL, M., SCHOENDUBE, F.A., DORGE, H. (2007). Cardiopulmonary and systemic effects of methylprednisolone in patients undergoing cardiac surgery. *Ann. Thorac. Surg.*, **84**:110–118.
- LIBBY, P., MAROKO, P.R., BLOOR, C.M., SOBEL, B.E., BRAUNWALD, E. (1973). Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J. Clin. Invest.*, **52**:599 - 607.
- LIM, W., PARK, C., SHIM, M. K., LEE, Y. H., LEE, Y. M., & LEE, Y. (2014). Glucocorticoids suppress hypoxia-induced COX-2 and hypoxia inducible factor-1 α expression through the

- induction of glucocorticoid-induced leucine zipper. *British Journal Of Pharmacology*, **171**(3), 735-745.
- LIN, J. H., LI, H., ZHANG, Y., RON, D., WALTER, P. (2009). Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability. *PLoS One*, **4**, e4170.
- LIN, J.H., LI, H., YASUMURA, D., COHEN, H.R., ZHANG, C., PANNING, B. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, **318**, 944–949.
- LINSSEN, M.M., VAN RAALTE, D.H., TOONEN, E. J., ALKEMA, W., VAN DER ZON, G.C., DOKTER, W.H., and OUWENS, D.M. (2011). Prednisolone-induced beta cell dysfunction is associated with impaired endoplasmic reticulum homeostasis in INS-1E cells. *Cellular Signalling*, **23**(11), 1708-1715.
- LISBONA, F., ROJAS-RIVERA, D., THIELEN, P., ZAMORANO, S., TODD, D., MARTINON, F. (2009). BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol Cell.*, **33**, 679-691.
- LIU, X.H., ZHANG, Z.Y., SUN, S., WU, X.D. (2008). Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress. *Shock*, **30**:422– 427.
- LONARD, D.M., O'MALLEY, B.W. (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell.*, **27**:691–700.
- LUO, S., BAUMEISTER, P., YANG, S., ABCOUWER, S., LEE, A. (2003). Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.*, **278**:37375-85.
- MA, Y., BREWER, J.W., DIEHL, J.A., and HENDERSHOT, L.M. (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.*, **318**, 1351–1365
- MALHOTRA, J.D., KAUFMAN R. J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **18**:6:716–731.
- MARCINIAK, S., RON, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.*, **86**, 1133-49.
- MARCU, M. G., DOYLE, M., BERTOLOTTI, A., RON, D., HENDERSHOT, L., NECKERS, L. (2002). Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha. *Mol Cell Biol.*, **22**, 8506–8513.
- MARTENS, C., BILODEAU, S., MAIRA, M., GAUTHIER, Y. and DROUIN, J. (2005) Proteinprotein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.*, **19**:885–897.
- MARTINDALE, J.J., FERNANDEZ, R., THUERAUF, D., WHITTAKER, R., GUDE, N., SUSSMAN, M.A., GLEMBOTSKI, C.C. (2006). Endoplasmic reticulum stress gene induction

and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ. Res.*, **98**:1186-93.

- MATSUMOTO, A., HANAWALT, P.C. (2000). Histone H3 and heat shock protein GRP78 are selectively cross-linked to DNA by photoactivated gilvocarcin V in human fibroblasts. *Cancer Research*, **60**:14:3921–3926.
- MCCULLOUGH, K.D., MARTINDALE, J.L., KLOTZ, L.O., AW, T.Y., HOLBROOK, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by downregulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.*, **21**:1249 –1259.
- MEIJSING, S. H. (2015). Mechanisms of Glucocorticoid-Regulated Gene Transcription. *Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man*, 872, 59.
- MELVILLE, M.W., TAN, S.L., WAMBACH, M., SONG, J., MORIMOTO, R.I., KATZE, M.G. (1999). The cellular inhibitor of the PKR protein kinase, P58(IPK), is an influenza virus activated co-chaperone that modulates heat shock protein 70 activity. *J Biol Chem.*, **274**, 3797–3803.
- MINAMINO, T., KOMURO, I., & Kitakaze, M. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation Research*, **107**(9), 1071-1082.
- MINET, E., ERNEST, I., MICHEL, G., ROLAND, I., REMACLE, J., RAES, M., & MICHIELS, C. (1999). HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5' UTR. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, **261**(2), 534-540.
- MIYAZAKI, Y., KAIKITA, K., ENDO, M., HORIO, E., MIURA, M., TSUJITA, K., OIKE, Y. (2011). C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, **31**(5), 1124-1132.
- MORIMOTO, R.I., KLINE, M.P., BIMSTON, D.N., AND COTTO, J.J. (1997). The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.*, **32**: 17–29.
- MURRY, C.E., JENNINGS, R.B., REIMER, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, **74**:1124–1136.
- MYOISHI, M., HAO, H., MINAMINO, T., WATANABE, K., NISHIHARA, K., HATAKEYAMA, K., ASADA, Y., OKADA, K., ISHIBASHI-UEDA, H., GABBIANI, G., BOCHATON-PIALLAT, M.L., MOCHIZUKI, N., KITAKAZE, M. (2007). Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*, **116**:1226–1233.
- NATARAJAN, R., SALLOUM, F.N., FISHER, B.J., SMITHSON, L., ALMENARA, J., FOWLER, A.A. (2009). III. Prolyl hydroxylase inhibition attenuates post-ischemic cardiac injury via induction of endoplasmic reticulum stress genes. *Vascul Pharmacol.*, **51**:110 –118.

- NI, M., ZHOU, H., WEY, S., BAUMEISTER, P., LEE, A.S. (2009). Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS ONE*, **4**:8:Article ID e6868.
- NISHITOH, H., MATSUZAWA, A., TOBIUME, K. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes and Development*, **16**:11:1345–1355.
- OCKAILI, R., NATARAJAN, R., SALLOUM, F., FISHER, B. J., JONES, D., & KUKREJA, R. C. (2005). HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **289**(2), H542-H548.
- OGATA, M., HINO, S. I., SAITO, A. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Biology*, **26**:24:9220–9231.
- OKADA, K., MINAMINO, T., TSUKAMOTO, Y., LIAO, Y., TSUKAMOTO, O., TAKASHIMA, S., HIRATA, A., FUJITA, M., NAGAMACHI, Y., NAKATANI, T., YUTANI, C., OZAWA, K., OGAWA, S., TOMOIKE, H., HORI, M., KITAKAZE, M. (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*, **110**:705–712.
- OLTVAI, Z.N., MILLIMAN, C.L., KORSMEYER, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**:609–619.
- OYADOMARI, S., MORI, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.*, **11**:381–389.
- OZCAN, U., YILMAZ, E., OZCAN, L., FURUHASHI, M., VAILLANCOURT, E., SMITH, R.O., GORGUN, C.Z., HOTAMİSLİGİL, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a Mouse model of type 2 diabetes. *Science*, **313**:1137–1140.
- PAN, Y.X., LIN, L., REN, A.J., PAN, X.J., CHEN, H., TANG, C.S., YUAN, W.J. (2004). HSP70 and GRP78 induced by endothelin-1 pretreatment enhance tolerance to hypoxia in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Journal Of Cardiovascular Pharmacology*, **44**, S117-S120.
- PARCELLIER, A., GURBUXANI, S., SCHMITT, E., SOLARY, E., GARRIDO, C. (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun.*, **304**, 505–512.
- PETERSON, D.J., JU, H., HAO, J., PANAGIA, M., CHAPMAN, D.C., DIXON, I.M. (1999). Expression of Gi-2 alpha and Gs alpha in myofibroblasts localized to the infarct scar in heart failure due to myocardial infarction. *Cardiovasc Res.*, **41**, 575–585.
- PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**(9), e45-e45.
- PIAZZA, P.V., LE MOAL, M.L. (1996). Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, **36**: 359–378.

- PUTHALAKATH, H., O'REILLY, L.A., GUNN, P., LEE, L., KELLY, P.N., HUNTINGTON, N.D., HUGHES, P.D., MICHALAK, E.M., MCKIMM-BRESCHKIN, J., MOTOYAMA, N., GOTOH, T., AKIRA, S., BOUILLET, P., STRASSER, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, **129**:1337–1349.
- RAO, M.K., XU, A., NARAYANAN, N. (2001). Glucocorticoid modulation of protein phosphorylation and sarcoplasmic reticulum function in rat myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **281**:H325–H333.
- RAO, R., ELLERBY, H., BREDESEN, D. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.*, **11**, 372-80.
- RAVINGEROVA T. (2007) Intrinsic defensive mechanisms in the heart: a potential novel approach to cardiac protection against ischemic injury. *Gen Physiol Biophys.*, **26**:3–13.
- REDDY, R.K., MAO, C., BAUMEISTER, P., AUSTIN, R.C., KAUFMAN, R.J., LEE, A.S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.*, **278**: 20915–20924.
- RIEGER, J., DURKA, S., STREFFER, J., DICHGANS, J., & WELLER, M. (1999). Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cells: modulation by antioxidants, BCL-2 and dexamethasone. *European Journal Of Pharmacology*, **365**(2), 301-308.
- ROBINSON, K.S., CLEMENTS, A., WILLIAMS, A.C., BERGER, C.N., FRANKEL, G. (2011). Bax inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene*, **30**, 2391–2400.
- ROGER, V.L., GO, A.S., LLOYD-JONES, D.M., BENJAMIN, E.J., BERRY, J.D., BORDEN, W.B., BRAVATA, D.M., DAI, S., FORD, E.S., FOX, C.S., FULLERTON, H.J., GILLESPIE, C., HAILPERN, S.M., HEIT, J.A., HOWARD, V.J., KISSELA, B.M., KITTNER, S.J., LACKLAND, D.T., LICHTMAN, J.H., LISABETH, L.D., MAKUC, D.M., MARCUS, G.M., MARELLI, A., MATCHAR, D.B., MOY, C.S., MOZAFFARIAN, D., MUSSOLINO, M.E., NICHOL, G., PAYNTER, N.P., SOLIMAN, E.Z., SORLIE, P.D., SOTOODEHNIA, N., TURAN, T.N., VIRANI, S.S., WONG, N.D., WOO, D., TURNER, M.B. (2012). Heart disease and stroke statistics–2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, **125**(1):e2–e220.
- RON, D., HABENER, J. (1992). CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes. Dev.*, **6**, 439-53.
- RON, D., HUBBARD, S.R. (2008). How IRE1 reacts to ER stress. *Cell*, **132**:1:24–26.
- RON, D., WALTER, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**: 7: 519–529.
- RONG, J., CHEN, L., TOTH, J.I., TCHERPAKOV, M., PETROSKI, M.D., REED, J.C. (2011). Bifunctional apoptosis regulator (BAR), an endoplasmic reticulum (ER)-associated E3 ubiquitin ligase, modulates BI-1 protein stability and function in ER stress. *J Biol Chem.*, **286**, 1453–1463.

- ROY, S.G., DE, P., MUKHERJEE, D., CHANDER, V., KONAR, A., BANDYOPADHYAY, D., & BANDYOPADHYAY, A. (2009). Excess of glucocorticoid induces cardiac dysfunction via activating angiotensin II pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **24**(1-2), 1-10.
- RUTKOWSKI, D.T., KANG, S.W., GOODMAN, A.G., GARRISON, J.L., TAUNTON, J., KATZE, M.G. (2007). The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **18**, 3681–3691.
- SAINTE-MARIE, Y., NGUYEN DINH CAT, A., PERRIER, R., MANGIN, L., SOUKASEUM, C., PEUCHMAUR, M., TRONCHE, F., FARMAN, N., ESCOUBET, B., BENITAH, J.P., JAISSER, F. (2007). Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block. *FASEB J*, **21**:3133–3141.
- SCHOFIELD, C.J., & RATCLIFFE, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**(5), 343-354.
- SCHÖNTHAL, A. H. (2012). Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*, 2012.
- SEARLE, J., KERR, J.F., BISHOP, C.J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.*, 17 Pt **2**: 229–259.
- SHANG, Y., WANG, F., BAI, C., HUANG, Y., ZHAO, L. J., YAO, X. P., ... & SUN, S. H. (2011). Dexamethasone protects airway epithelial cell line NCI-H292 against lipopolysaccharide induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Chinese Medical Journal*, **124**(1), 38-44.
- SHEN, J., SNAPP, E. L., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., PRYWES, R. (2005). Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*, **25**, 921–932.
- SHINTANI-ISHIDA, K., NAKAJIMA, M., UEMURA, K., YOSHIDA, K. (2006). Ischemic preconditioning protects cardiomyocytes against ischemic injury by inducing GRP78. *Biochem Biophys Res Commun.*, **345**: 1600 –1605.
- SIMMEN, T., LYNES, E.M., GESSON, K., THOMAS, G. (2010). Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta.*, **1798**:1465–73.
- SOMMER, T., JAROSCH, E. (2002). BiP binding keeps ATF6 at bay. *Developmental Cell*, **3**:1:1–2.
- SUN, H., CHEN, Q.M. (2008). Inhibitors of GSK-3 prevent corticosterone from inducing COX-1 expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Toxicol.*, **8**:93–100.
- SUN, H., SHEVELEVA, E., CHEN, Q.M. (2008). Corticosteroids induce cyclooxygenase 1 expression in cardiomyocytes: role of glucocorticoid receptor and Sp3 transcription factor. *Mol. Endocrinol.*, **22**:2076–2084.
- SUN, H., SHEVELEVA, E., XU, B., INOUE, H., BOWDEN, T.G., CHEN, Q.M. (2008). Corticosteroids induce COX-2 expression in cardiomyocytes: role of glucocorticoid receptor and C/EBP-beta. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295**:915–922.

- SUN, H., XU, B., INOUE, H., CHEN, Q.M. (2008). P38 MAPK mediates COX-2 gene expression by corticosterone in cardiomyocytes. *Cell Signal.*, **20**:1952–1959.
- SZEGEZDI, E., DUFFY, A., O'MAHONEY, M.E., LOGUE, S.E., MYLOTTE, L.A., O'BRIEN, T., SAMALI, A. (2006). ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**:1406-11.
- SZEGEZDI, E., MACDONALD, D. C., NÍ CHONGHAILE, T., GUPTA, S., SAMALI, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol.*, **296**, C941–C953.
- TADIMALLA, A., BELMONT, P.J., THUERAUF, D.J., GLASSY, M.S., MARTINDALE, J.J., GUDE, N., SUSSMAN, M.A., GLEMBOTSKI, C.C. (2008). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia -inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart. *Circ Res.*, **103**:1249 –1258.
- TERAI, K., HIRAMOTO, Y., MASAKI, M., SUGIYAMA, S., KURODA, T., HORI, M., KAWASE, I., HIROTA, H. (2005). AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell Biol.*, **25**:9554-75.
- THOMPSON, E.B. (1994). Apoptosis and steroid hormones. *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.), **8**(6), 665-673.
- THUERAUF, D.J., MARCINKO, M., GUDE, N., RUBIO, M., SUSSMAN, M.A., GLEMBOTSKI, C.C. (2006). Activation of the unfolded protein response in infarcted mouse heart and hypoxic cultured cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **99**:275-82.
- TOKO, H., TAKAHASHI, H., KAYAMA, Y., OKADA, S., MINAMIINO, T., TERASAKI, F., KITaura, Y., KOMURO, I. (2010). ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. *J Mol Cell Cardiol.*, **49**:113–120.
- TURER, A.T., HILL, J.A. (2010). Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol.*, **106**: 360–368.
- TUUMINEN, R., SYRJÄLÄ, S., KREBS, R., ARNAUDOVA, R., ROUVINEN, E., NYKÄNEN, A.I., & LEMSTRÖM, K. B. (2013). Combined donor simvastatin and methylprednisolone treatment prevents ischemia-reperfusion injury in rat cardiac allografts through vasculoprotection and immunomodulation. *Transplantation*, **95**(9), 1084-1091.
- URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, **287**:5453: 664–666.
- VAN HUIZEN, R., MARTINDALE, J., GOROSPE, M., HOLBROOK, N. (2003). P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 alpha signaling. *J. Biol. Chem.*, **278**:15558-64.
- VAN NIEUWENHOVEN, F.A., TURNER, N.A. (2013). The role of cardiac fibroblasts in the transition from inflammation to fibrosis following myocardial infarction. *Vascular Pharmacology*, **58**, 182–188.

- VATTEM, K., WEK, R. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**:11269-74.
- VIEGAS, L.R., VICENT, G.P., BARANAO, J.L., BEATO, M., PECCI, A. (2004). Steroid hormones induce Bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. *J. Biol. Chem.*, **279**, 9831–9839.
- VIGNERON, F., DOS SANTOS, P., LEMOINE, S., BONNET, M., TARIOSSE, L., COUFFINHAL, T., DUPLAA, C., AND JASPARD-VINASSA, B. (2011). GSK-3b at the crossroads in the signalling of heart preconditioning: implication of mTOR and Wnt pathways. *Cardiovascular Research*, **90**, 49–56.
- VITADELLO, M., PENZO, D., PETRONILLI, V., MICHIELI, G., GOMIRATO, S., MENABO, R., DI LIISA, F., GORZA, L. (2003). Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *FASEB J.*, **17**:923-5.
- WAGNER, A. E., HUCK, G., STIEHL, D. P., JELKMANN, W., & HELLWIG-BURGEL, T. (2008). Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, **372**(2), 336-340.
- WANG, C., NEFF, D.A., KROLIKOWSKI, J.G., WEIHRAUCH, D., BIENEN-GRAEBER, M., WARLTIER, D.C. (2006). The influence of B-celllymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mito-chondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits, *Anesth Analg.*, **102**, 1355–60.
- WANG, L., FENG, Z.P., DUFF, H.J. (1999). Glucocorticoid regulation of cardiac K⁺ currents and L - type Ca²⁺ current in neonatal mice. *Circ. Res.*, **85**:168–173.
- WANG, X., LAWSON, B., BREWER, J., ZINSZNER, H., SANJAY, A., MI, L., BOORSTEIN, R., KREIBICH, G., HENDERSHOT, L., RON, D. (1996). Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol. Cell Biol.*, **16**:4273-80.
- WHO. (2011). Cardiovascular diseases (CVDs). WHO Fact Sheet N8317. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/24-05-11. Son erişim tarihi: 14.04.2014.
- XING, K., GU, B., ZHANG, P., WU, X. (2015). Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy. *BMC Immunology*, **16**(1), 39.
- XU, C., BAILLY-MAITRE, B., REED, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.*, **115**:2656–2664.
- YAMAGUCHI, H., WANG, H.G. (2004). CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress - induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, **279**:44:45495–45502.
- YAMAMOTO, K., YOSHIDA, H., KOKAME, K., KAUFMAN, R., MORI, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.*, **136**: 343-50.

- YAN, W., FRANK, C.L., KORTH, M.J., SOPHER, B.L., NOVOA, I., RON, D., (2002). Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci. U S A*, **99**, 15920–15925.
- YE, J., RAWSON, R.B., KOMURO, R., CHEN, X., DAVE, U.P., PRYWES, R., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell.*, **6**:1355-64.
- YELLON, D.M., HAUSENLOY, D.J. (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.*, **357**:1121–1135.
- YIN, J.J., LI, Y.B., WANG, Y. (2012). The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress induced pancreatic beta cell death. *Autophagy*, **8**:158–164.
- YOSHIDA, H., HAZE, K., YANAGI, H., YURA, T., MORI, K. (1998). Identification of the cisacting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.*, **273**, 33741–33749.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., YAMAMOTO, A., OKADA, T., MORI, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, **107**, 881-91.
- YOUNG, J. C. (2010). Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol.*, **88**, 291–300.
- YUDT, M.R., CIDLowski, J.A. (2002). The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol. Endocrinol.*, **16**:1719–1726.
- ZHANG, K. (2010). Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med.*, **3**:33– 40.
- ZHANG, L.H., ZHANG, X. (2010). Roles of GRP78 in physiology and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, **110**:6:1299–1305.
- ZHANG, P.L., LUN, M., TENG, J., HUANG, J., BLASICK, T.M., YIN, L., HERRERA, G.A., CHEUNG, J.Y. (2004). Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury. *Ann Clin Lab Sci.*, **34**:449–457.
- ZHAO, H., LIAO, Y., MINAMINO, T., ASANO, Y., ASAKURA, M., KIM, J., ASANUMA, H., TAKASHIMA, S., HORI, M., KITAKAZE, M. (2008). Inhibition of cardiac remodeling by pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress. *Hypertens Res.*, **31**:1977–1987.
- ZHAO, Z.Q., CORVERA, J.S., HALKOS, M.E. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **285**: H579–H588.
- ZONG, W., LINDSTEN, T., ROSS, A., MACGREGOR, G., THOMPSON, C. (2001) BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes .Dev.*, **15**, 1481-6.

ZONG, W.X., LI, C., HATZIVASSILIOU, G., LINDSTEN, T., YU, Q. C., YUAN, J. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.*, **162**, 59–69.

ÖZGEÇMİŞ

MERVE BUNSUZ

Tel: 0 (312) 430 10 10

Cep: 0532 385 72 94

Adres: Kültür Mah. Dr. Mediha Eldem Sok.
42/4 Kızılay/Çankaya/ANKARA

E posta: mervebunsuz@gmail.com

Doğum Tarihi: 18.06.1989

Doğum Yeri: ANKARA

Uyruğu: T.C.

Medeni Hali: Bekar

Ehliyet: B Sınıfı Araç Kullanma Ehliyeti

Eğitim Durumu:

2012-	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Ortalama: 3.88/ 92,20	-Yüksek Lisans
2007-2011	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Lisans Eğitimi Ortalama: 3,24/ 82.26	-Üniversite
2004-2007	Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi Ortalama: 82,65	-Lise
1996-2004	Tevfik İleri İlköğretim Okulu Ortalama: 4.89/ 97.8	-İlköğretim



Staj:

- Haziran 2010 Gülhane Askeri Tıp Akademisi (**GATA**)
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Genetik Bilim Dalı Stajı
- Temmuz 2010 Gülhane Askeri Tıp Akademisi (**GATA**)
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
In Vitro Fertilizasyon (IVF) Lab. (Tüp bebek)

Yabancı Dil:

İngilizce
(Upper Intermediate Sertifikalı-İyi Seviyede)

KPDS B seviye (86,25)

Sertifikalar :

- 19 Kasım 2014 Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama Merkezi
Kök Hücre Günü 2014
- 27-28 Eylül 2014 İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitimi (Good Laboratory Practice)
İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi (Good Manufacturing Practice)
İyi Hijyen Uygulamaları Eğitimi (Good Hygiene Practice)
ISO/IEC 17025 Laboratuvar Akreditasyonu Eğitimi
- Temmuz 2012 Gazi Üniversitesi
Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası
- 14-17 Temmuz 2010 Gazi Üniversitesi
17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi
Düzenleme Kurulu ve Katılım Sertifikası
- 27-31 Ağustos 2010 İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
V. Uluslararası katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci
Kongresi
Katılım Sertifikası
- 19-21 Şubat 2010 İstanbul Üniversitesi
VII.Uluslararası katılımlı İUGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik
Kış Okulu
Katılım Sertifikası
- Ocak 2010 Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ)
Yabancı Diller Yüksek Okulu
Upper Intermediate Düzeyi İngilizce Dil Sertifikası
- 7-8 Mart 2009 Gazi Üniversitesi ve Kuş Araştırmaları Derneği
Kuş Gözlem Ve Halkalama Eğitim Sertifikası

Bitirme Projeleri:

- 2011 Bahar** DNA Analiz Yöntemleri
Danışman: Prof. Dr. Eşref YÜKSEL
Gazi Üniversitesi
- 2010 Güz** Anestezi
Danışman: Yard. Doç. Dr. Levent BİNGÖL
Gazi Üniversitesi
- 2015 Bahar** Hipoksi/Re-oksijenasyona Maruz Kalan Kardiyomiyositlerde Metilprednizolon'un Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması
(Yüksek Lisans Tezi)
Danışman: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Teknikler :

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
Real Time PCR (RT-PCR)
DNA ve RNA İzolasyonu ve Analizi
Western Blotlama
Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi
Hücre ve Doku Kültürü Uygulamaları
Flow Sitometri Analizi

Makale:

- A. Karadağ, A., Aydos, S., Ozkan, T., Altınok, B., **Bunsuz, M.**, Heidargholizadeh, S., ... & Sunguroglu, A. (2012, September). The role of MDR1 C3435T single nucleotide polymorphism in male infertility. In FEBS JOURNAL (Vol. 279, pp. 560-561). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
- B. Aydos, S. E., Karadağ, A., Özkan, T., Altınok, B., **Bunsuz, M.**, Heidargholizadeh, S., ... & Sunguroğlu, A. (2014). Association of MDR1 C3435T and C1236T single nucleotide polymorphisms with male factor infertility. Genetics and molecular research: GMR, 14(2), 6330-6339.
- C. Demircan, K., Yukselten, Y., Bal, M., **Bunsuz, M.**, Yildiz, D. A., Sunguroglu, A., & Ugur, H. (2015). The Role of IL33 in Glioblastoma Multiforme. The FASEB Journal, 29(1 Supplement), LB142.

Projeler:

- 1) Glioblastoma Multiforme (GBM) İlaç Direncinde Rol Oynayan CD133+ Glioblastoma Kök Hücrelerini (GKH) Hedefleyen Terapötik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi/ TÜBİTAK 1003/ 2014-2017 /**BURSiYER**
- 2) Hipoksi/Re-oksijenasyona Maruz Kalan Kardiyomiyositlerde Metilprednizolon'un Endoplazmik Retikulum Stresi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması /Ankara Üniversitesi BAP/ 2015-2016/ Lisansüstü tez projesi /**ARAŞTIRMACI**

Katıldığı Kurslar:

- 2009-2010 **Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Yabancı Diller Yüksek Okulu**
İngilizce Eğitimi
- 2009-2010 **Belmek Çankaya/ Ankara**
Mozaik kursu
- 2000-2004 **Mülkiye - Ankara Üniversitesi**
Basketbol

Bilgisayar Bilgisi:

- * MS Windows
- * MS Office Programları

İlgilenilen Alanlar:

Hipoksi Mekanizması, Kardiyomiyosit Rejenerasyonu, Miyokardiyal İnfarktüs, Endoplazmik Retikulum Stresi, Kanser, Glioblastoma, Kanser Kök Hücreleri, Terapötik Monoklonal Antikorlar.