

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**KRONİK BÖBREK YETERSİZLİĞİ HASTALARINDA
İDRAR BULUNDURMAYAN MESANE DOKUSUNDA
APOPTOTİK BULGULARIN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Hilal FINDIK**

**Danışman
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Eş Danışmanı
Doç. Dr. Pınar ATA**

İstanbul – 2013

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**KRONİK BÖBREK YETERSİZLİĞİ HASTALARINDA
İDRAR BULUNDURMAYAN MESANE DOKUSUNDA
APOPTOTİK BULGULARIN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Hilal FINDIK**

**Danışman
Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Eş Danışmanı
Doç. Dr. Pınar ATA**

İstanbul – 2013

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2012 – 2013 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nin bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın tamamlanması süresince büyük bir gayret ve özveriyle çalışmamı takip eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsü bana destek olan eş danışmanın Sayın Doç.Dr. Pınar ATA'ya ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU'na teşekkür ederim. Bu çalışmaya hasta bilgi ve örneklerini temin eden Doç. Dr. İzzet TİTİZ ve Uzm. Dr. Ali Murat GÖKÇE' ye de ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan arkadaşım Kaan GÜNDOĞDU' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca bana destek olan ve beni bu günlere getiren sevgili anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul, 2013

Hilal FINDIK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİLLER.....	V
TABLolar.....	VI
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Mesanenin Histolojisi.....	1
1.2. Kronik Böbrek Yetmezliği.....	1
1.2.1. Renal Transplantasyon.....	2
1.3. Apoptozis.....	2
1.3.1. Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptozis Oluşturulması.....	3
1.3.1.1. Mitokondri ve Apoptozis.....	3
1.3.1.2. Bcl-2 Familyası.....	4
1.3.1.3. Mitokondride Sitokrom c Salınımının Kontrolü.....	8
1.3.1.4. Apoptozom Oluşumu.....	9
1.3.2. Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi.....	12
1.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması.....	13
1.3.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü.....	13
1.3.4.1. Antiapoptotik Proteinler.....	14
1.3.4.2. Proapoptotik Proteinler.....	15
1.3.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler.....	16
1.3.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler.....	18
1.3.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	19
1.3.7.1. Fiziksel Farklılıklar.....	19
1.3.7.2. Morfolojik Farklılıklar.....	20
1.3.8. Fagositoz.....	21
1.3.9. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar.....	21
1.3.9.1. Fizyolojik Olaylar.....	21
1.3.9.2. Patolojik Olaylar.....	22
1.4. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (Quantitative Real Time PZR, qRT-PZR).....	22
2. AMAÇ.....	25
3. GEREÇLER.....	27
3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler.....	27
3.2. Araştırma İçin Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Markaları.....	27
3.3. RNA izolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	27
3.4. cDNA Sentezi İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	28

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	28
3.6. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (Quantitative Real Time PZR, qRT-PZR) İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar.....	28
3.7. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar.....	28
4. YÖNTEMLER.....	29
4.1. Doku Eldesi.....	29
4.2. Dokudan RNA İzolasyonu.....	29
4.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	30
4.4. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması.....	31
4.5. cDNA Sentezi.....	31
4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	32
4.6.1. Primer Çiftlerinin Tasarlanması.....	32
4.6.2. Primerlerin Sulandırılması.....	33
4.6.3. Primer Optimizasyonu.....	33
4.6.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	34
4.6.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	34
4.6.5. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (Quantitative Real Time PZR, qRT-PZR).....	35
4.7. İstatistiksel Analiz.....	36
5. SONUÇLAR.....	37
5.1. RNA İzolasyonu Sonuçları.....	37
5.2. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları.....	38
5.3. qRT-PZR Analiz Sonuçları.....	40
5.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri.....	41
5.3.2. Gen İfade Değişikliği Oranlarının Hesaplanması ve Sonuçları.....	43
5.3.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	50
6. TARTIŞMA.....	52
7. KAYNAKLAR.....	55
8. ÖZGEÇMİŞ.....	61

KISALTMALAR

AIF	: Apoptozis uyarıcı faktör
BH	: Bcl-2 homolog alanın
CARD	: Kaspaz toplama alanı
cDNA	: Complementary DNA
dNTP	: Deoksiribonükleotitler
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
EtBr	: Ethidium Bromide
F Primer	: Forward Primer
FADD	: Fas bağımlı ölüm domain proteini
Fas L	: Fas ligand
ICE	: Interleukin-1b-Converting Enzyme
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: milimolar
mRNA	: Messenger RNA Mesajcı RNA
nmol	: nanomol
PCR	: Polimerase Chain Reaction
pmol	: pikomol
qRT-PCR	: Quantitative Real Time PCR, Kantitatif Eş Zamanlı PCR
R Primer	: Revers Primer
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RT	: Reverse Transcriptase
SDBY	: Son dönem böbrek yetersizliği
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptör
U	: Unite
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 1.1. Apoptozisin mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 familya üyeleri	5
Şekil 1.2. Pro-apoptotik Bcl-2 familya üyelerinin katıldığı apoptozis sinyal oluşum metabolik yolu.....	7
Şekil 1.3. Çoklu apoptotik metabolik yollar mitokondriden yayılır	8
Şekil 1.4. Apoptozomda mitokondri aracılı kaspaz aktivasyonu.....	10
Şekil 1.5. Kaspaz kaskad aktivasyonu	10
Şekil 1.6. Mitokondriden salınan apoptozis efektörleri	11
Şekil 1.7. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi	12
Şekil 1.8. Apoptozu indükleyen faktörler	16
Şekil 1.9. Apoptoz esnasında Ca iyonunun rolü	17
Şekil 1.10. Apoptosis'in Morfolojik değişiklikleri	19
Şekil 1.11. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar	20
Şekil 4.1. Dokudan RNA İzolasyonu Basamakları.....	30
Şekil 5.1. Fas amplifikasyon eğrisi grafiği	45
Şekil 5.2. Fas L amplifikasyon eğrisi grafiği	45
Şekil 5.3. Bcl-2 amplifikasyon eğrisi grafiği	46
Şekil 5.4. Bax amplifikasyon eğrisi grafiği.....	46
Şekil 5.5. Beta Actin amplifikasyon eğrisi grafiği.....	47
Şekil 5.6. Nakil sonrası kontrole gelen hastaların bcl-2 ve bax oranları	47
Şekil 5.7. Nakil sonrası kontrole gelen hastaların fas ve fas l ifade düzeyleri.....	48
Şekil 5.8. Nakil sırasında doku alınan hasta bireylerin fas ve fas l ifade düzeyleri... 48	
Şekil 5.9. Nakil sırasında doku alınan hasta bireylerin bcl-2 ve bax ifade düzeyleri 49	
Şekil 5.10. Sağlıklı bireylerin bcl-2 ve bax ifade düzeyleri.....	49
Şekil 5.11. Sağlıklı bireylerin Fas ve Fas L ifade düzeyleri	50

TABLolar

	Sayfa No
Tablo 3.1. Laboratuvarda kullanılan cihazlar ve markaları	27
Tablo 4.1. cDNA sentezi için gerekli bileşen miktarları	31
Tablo 4.2. RT karışım bileşenleri	32
Tablo 4.3. qRT-PZR'da kullanılan primerler	33
Tablo 4.4. qRT-PZR'da kullanılan primerleri sulandırmak için gerekli hesaplamalar .	33
Tablo 4.5. PZR protokolü	34
Tablo 4.6. PZR optimizasyonu termal döngü koşulları	34
Tablo 4.7. qRT-PZR Reaksiyon Koşulları	35
Tablo 4.8. qRT-PZR termal döngü koşulları	36
Tablo 4.9. qRT-PZR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları	36
Tablo 5.1. Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları	37
Tablo 5.2. Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları	38
Tablo 5.3. Ürolojik rahatsızlık nedeniyle hastaneye gelen ancak hiçbir ürolojik problemi saptanmayan sağlıklı doku örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları.....	38
Tablo 5.4. 10 ng/µl RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları	39
Tablo 5.5. 10 ng/µl RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları	40
Tablo 5.6. 10 ng/µl RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları	40
Tablo 5.7. Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerine ait Cp Değerleri	41
Tablo 5.8. Ürolojik rahatsızlık nedeniyle hastaneye gelen ancak hiçbir ürolojik problemi saptanmayan sağlıklı doku örneklerine ait Cp değerleri	42
Tablo 5.9. Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerine ait Cp Değerleri	42
Tablo 5.10. Nakilden sonra kontrol biyopsi alınan hasta doku örneklerinin referans gene göre ifade değişikliği oranları ve bu oranların log ₂ tabanındaki karşılıkları	43
Tablo 5.11. Nakil sırasında alınan hasta doku örneklerinin referans gene göre ifade değişikliği oranları ve bu oranların log ₂ tabanındaki karşılıkları	44
Tablo 5.12. Ürolojik rahatsızlık nedeniyle hastaneye gelen ancak hiçbir ürolojik problemi saptanmayan sağlıklı doku örneklerinin referans gene göre gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log ₂ tabanındaki karşılıkları	44
Tablo 5.13. Cinsiyete ve yaşa göre yapılan ki-kare analiz sonuçları.....	50
Tablo 5.14. Tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçlarına göre en düşük ve en yüksek Cp değerleri.....	50
Tablo 5.15. Nakil öncesi ve sağlıklı bireylerde p değerleri.....	51

Tablo 5.16. Nakil sonrası ve sağlıklı bireylerde p değerleri.....	51
--	----

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Hilal FINDIK
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Eylül 2013

ÖZET

KRONİK BÖBREK YETERSİZLİĞİ HASTALARINDA İDRAR BULUNDURMAYAN MESANE DOKUSUNDA APOPTOTİK BULGULARIN İNCELENMESİ

Kronik böbrek yetersizliği hastalarında idrar çıkışı olmamaktadır. Bu da mesane epitelyumunda *kullanılmayan organ atrofisine* neden olabilir. Atrofiye giden her organ apoptoz sürecinin başlamasıyla farklılaşır. Apoptoz sürecinin tespit edilmesi için Bcl-2, Bax, Fas ve Fas ligandının dokudaki ekspresyonları önemlidir.

Bu tez çalışmasında kronik böbrek hastalarında idrar çıkışının azalması sonucu fonksiyonel olmayan üretelyumun apoptotoz süreci değerlendirilmiştir. Dokulardan RNA izole edilmiş ve cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezinden sonra konsantrasyonlar ölçüldü. ROX boyası kullanılarak Kantitatif Eş Zamanlı PZR ile ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Nakil öncesi mesane dokularında apoptotik belirteçlerde (Bcl-2, bax, Fas ve Fas ligand) belirgin bir artış saptandı. Nakil sonrası mesane dokularında da referans gene göre artış saptandı, ancak nakil öncesine göre daha düşük seviyede gözlemlendi. Nakil öncesi mesane üretelyumunda atrofiye bağlı apoptoz gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler : Kronik böbrek yetersizliği, apoptoz, atrofi, kantitatif eş zamanlı pqr

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Hilal FINDIK
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
Degree Awarded and Date : Master of Science – September 2013

ABSTRACT

ANALYSIS OF APOPTOTIC INDICATIONS IN URINE DEPRIVED BLADDER TISSUES OF PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE

In End Stage Renal Disease since there is no urinary outflow and there may be unused organ atrophy at the bladder urothelium. All organs have differentiation when apoptosis is active. Expression of Bcl-2, Bax, Fas and Fas L are very important for determine apoptosis process.

In this study, we analyzed apoptotic process in chronic renal failure patients in the dysfunctional urothelium. RNA extraction and cDNA synthesis done from the bladder samples. After cDNA synthesis, concentrations were measured. Expression analysis were optimized using ROX dye with quantitative real-time PCR. β -actin is used as internal control as a reference. Apoptotic marker levels (Bcl-2, Bax, Fas ve Fas ligand) increased in Pre transplant bladder samples . Apoptotic marker levels (Bcl-2, bax, Fas ve Fas ligand) increased in post transplant bladder samples. But this increase lower than post transplant bladder sample. Apoptotic process is severity in pre transplant dysfunction bladder samples. There was unused organ atrophy at the bladder urothelium.

Key Words : Chronic Renal Failure, Apoptosis, Athrophy, Quantitative Real Time PCR

1. GİRİŞ

1.1. Mesanenin Histolojisi

Mesane iç yüzeyi ürotelyum (transizyonel) epiteli ile döşelidir. Epitelin altında sırası ile lamina propria, muskularis propria ve adventisya (seroza) vardır (Başaklar, 2008) .

Mesane, üreter ve renal pelvis ürotelyal epitelle döşelidir (Stacy ve diğ., 2007). Ürotelyumun kalınlığı anatomik lokalizasyonuna ve distansiyon derecesine göre değişir. Minör kalikslerde iki veya üç sıralıdır. Kasılmış mesanede 6-7 sıralı iken dolu mesanede üç sıralı görülebilir (Stacy ve diğ., 2007). Ürotelyum üç bölümden oluşmuştur; süperfisyal hücreler, intermedier hücreler, bazal hücreler (Sternberg ve diğ., 2004).

Süperfisyal hücreler, üriner yüzeyi örten, büyük, eliptik, eozinofilik sitoplazmalı bazen binükleuslu olabilen, şemsiye hücresi olarakta bilinen hücrelerdir. İntermedier hücreler, kontrakte mesanede beş hücre kalınlığında olabilirler. Bol vakuollü sitoplazmalı, nükleusu oval ince kromatinli, nukleolü küçük ya da olmayan hücrelerdir. Bazal hücre tabakası sadece kontrakte mesanede belirgindir ve tek sıralı kübik hücrelerden oluşur (Sternberg ve diğ., 2004).

1.2. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), çeşitli hastalıklara bağlı olarak nefronların progresif ve geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize bir sendromdur (Erek, 1995).

Kronik böbrek yetersizliği günümüzde görülme sıklığı hızla artmakta olan bir hastalıktır. Ülkemizde yılda ortalama 15000 hastaya son dönem böbrek yetersizliği (SDBY) tanısı konmaktadır ve milyon nüfus başına 390 SDBY hastasının bulunduğu belirlenmiştir. Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre Türkiye’de 25000’in üzerinde hasta diyaliz tedavisi ile yaşamını sürdürmektedir. Son dönem böbrek yetmezliği

prevelansı, 60-75 yaş grubunda böbrek hastalığı insidansının artması mortalite oranlarının hemen hemen sabit kalmasına bağlı olarak geçen on yılda yaklaşık %8 artmıştır (Erek, 1995).

Son dönem böbrek yetersizliği olan hastalarda renal replasman tedavileri; hemodiyaliz, periton diyalizi yada renal transplantasyondur (Akoğlu ve Süleymanlar, 1996).

1.2.1. Renal Transplantasyon

Transplantasyon, son dönem böbrek yetmezliğinin seçkin tedavi şeklidir. Çünkü transplantasyon ile, diyaliz tedavilerinde olduğu gibi böbrek fonksiyonlarından bazıları değil tamamı yerine getirilir. Ayrıca diyaliz işleminin oluşturduğu fiziksel ve psikolojik zorluklar ortadan kalktığından yaşam kalitesi daha iyidir. Fakat transplantasyon yapılabilmesi için alıcının hayatı tehdit eden ekstrerenal komplikasyonlarının olmaması gerekir. Primer oksalozis, tedavi edilemeyen psikoz, immünespresif tedavi ile progresyon gösterebilecek bir hastalığın olması transplantasyona engeldir (Walsh ve diğ., 2002).

1.3. Apoptozis

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (Ameisen, 1996). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (Kiess ve Gallaher, 1998).

Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Kerr ve diğ., 2004).

Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Touchette ve diğ., 1991). Hücre

proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (Cummings ve diğ., 1997). Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Majno ve Torisl, 1995).

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (Wyllie, 1980).

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir (Cohen, 1993a). Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir (Cohen, 1993b).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plasma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Lu ve diğ., 2000).

Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir (Gavrieli ve diğ., 1992).

1.3.1. Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptozis Oluşturulması:

1.31.1. Mitokondri ve Apoptozis

Apoptotik yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya

salınması) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Kumar ve diğ., 2005). Mitokondri, membranlar arası alandan sitoplazmaya sitokrom c ve apoptozis uyarıcı faktör (AIF) gibi apoptotik faktörlerin salınımı ile apoptozisin pek çok formunda önemli rol oynar (Tsujimoto ve Shimizu, 2000).

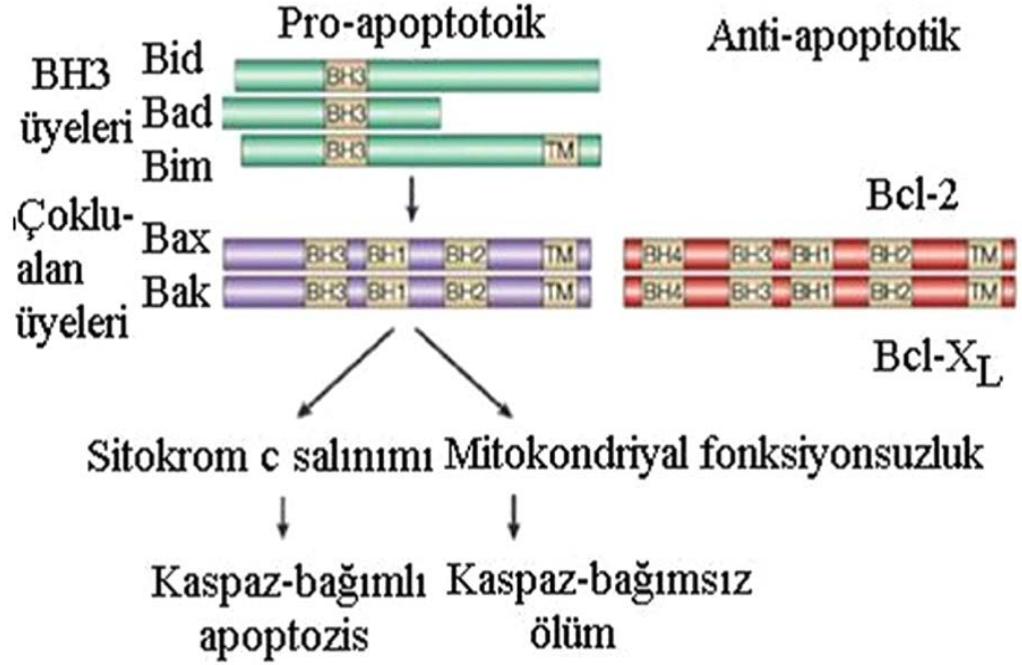
Sitokrom c, elektron transport zincirine ve oksidatif fosforilasyona katılır. Sağlıklı hücrelerde sitokrom c, mitokondride membranlar arası boşlukta yer alır (Hu, 2003). Sitotoksik ilaçlar, gelişme faktörü eksikliği, reaktif oksijen türleri ve DNA hasarı gibi değişik hücrel stresler sitokrom c'nin salınmasını harekete geçirir. Sitokrom c'nin salınması, Bcl-2 ailesi üyeleri ile düzenlenir (Chang ve Yang, 2000).

1.3.1.2. Bcl-2 Familyası

Bcl-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur (Altunkaynak ve Özbek, 2008). Bcl-2 familyası birbirine zıt etkili iki gruptan oluşur. Bu grupların biri anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL gibi), diğeri ise pro-apoptotiktir (Bax, Bid gibi) (Şekil 1.1.). Anti-apoptotik grup apoptozisi baskılayıcı, pro-apoptotik grup ise apoptozisi indükleyici etkiye sahiptir. Anti-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin salınmasını engeller; pro-apoptotik olanlar ise sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasını indükler (Kumar ve diğ., 2005). Hücrelerin apoptotik uyarıya hassaslığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır (Burlacu, 2003). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerin aşırı ifadesi apoptozisi baskılamak, pro-apoptotik üyelerin aşırı ifadesi apoptozise neden olur (Kumar ve diğ., 2005).

Bütün Bcl-2 familya üyeleri, 4 Bcl-2 homolog alanın (BH) en azından birini içermesi ile karakterize edilir (Şekil 1.1.). Bu alanlar BH1, BH2, BH3, BH4 olarak ifade edilir ve α -heliks segmentlerine karşılık gelir. Anti-apoptotik Bcl-2 üyeleri (Bcl-2 ve Bcl-XL), bu 4 alana (BH1, BH2, BH3, BH4) sahipken, pro-apoptotik üyeler ilk α -heliks segmentinin (BH4) kaybı ile karakterize edilir (Burlacu, 2003). Pro-apoptotik proteinler de iki alt gruba ayrılır. Bu alt gruplardan biri yapılarında BH1, BH2 ve BH3 bulundurur (örneğin Bax, Bak, Bok). Diğeri ise sadece BH3 alanı içerir (örneğin Bid, Bad, Bim) (Kumar ve diğ., 2005). BH3 alanı pro-apoptotik üyelerde ölüm alanı olarak kabul edilir (Şekil 1.1.). Bcl-2 familya üyelerinin önemli bir özelliği, bu proteinler arasında etkisizleştirme yarışına neden olan heterodimerler

ve homodimerler oluşturma yeteneklerinin oluşudur (Burlacu, 2003). Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki heterodimerizasyon, birbirlerinin biyolojik etkilerini inhibe eder (Matsuzawa ve Ichijo, 2001).



Şekil 1.1. Apoptozisin mitokondri yolunda yer alan Bcl-2 ailesi üyeleri (Jesenberger ve Jentsch, 2002)

Anti-apoptotik Bcl-2 üyelerine karşı pro-apoptotik Bcl-2 üyelerinin önemli bir kısmı, ölüm sinyalinin yokluğunda ayrı kompartmanlarda lokalize olur. Anti-apoptotik üyeler, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) ve nükleer membranda bulunan integral membran proteinleridir. Aksine pro-apoptotik üyelerin hemen hemen tamamı ölüm sinyalinden önce sitozol veya hücre iskeletinde lokalize olur. Ölüm sinyalini takiben pro-apoptotik üyeler, konformasyonel bir değişime uğrar ve konformasyonel değişim onların membranlara, özellikle mitokondriyal dış membrana hedeflenmesini ve birleşmesini sağlar (Gross ve diğ., 1999).

Bcl-2 üyeleri, mitokondri membranındaki çeşitli gözenekleri düzenler ve porlar açıldığında önceden bahsedilen sitokrom c gibi pro-apoptotik moleküllerin salınımına yol açar. Sitokrom c, apoptozis proteaz aktive edici faktör 1'e (Apaf-1) bağlandığında kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9'un aktivasyonu, kaçınılmaz ölümle sonuçlanan efektör kaspazların (kaspaz 3, 6 ve 7) kaskadını harekete geçirir (Dragovich ve diğ., 1998).

Bcl-2 familya proteinlerinin aktivasyon mekanizmaları her familya üyesi için farklıdır (Sprick ve Walczak, 2004). Bu aktivasyon mekanizmaları;

1. Dimerizasyon
2. Fosforilasyon
3. Proteolitik Bölünme
4. Translokasyon

olarak adlandırılmaktadır.

1. Dimerizasyon

Bcl-2 familya üyeleri, homo veya heterodimer oluşturma yetenekleri ile apoptozisin regülasyonunda fonksiyon gösterirler (Burlacu, 2003). Bcl-2 dimerlerinin bulunması, aktif veya inaktif Bcl-2 üyelerinin bulunmasını açıklar. Sato, Bcl-2 familya üyeleri arasında etkileşimleri aşağıdaki şekilde belirtmiştir (Sato ve diğ., 1994).

- Bcl-2 ile Bax
- Bcl-2 ile Bcl-2
- Bcl-2 ile Bcl-XL
- Bcl-2 ile Bcl-XS
- Bcl-2 ile Mcl-1
- Bcl-XL ile Bcl-XL
- Bcl-XL ile Mcl-1
- Bax ile Mcl-1

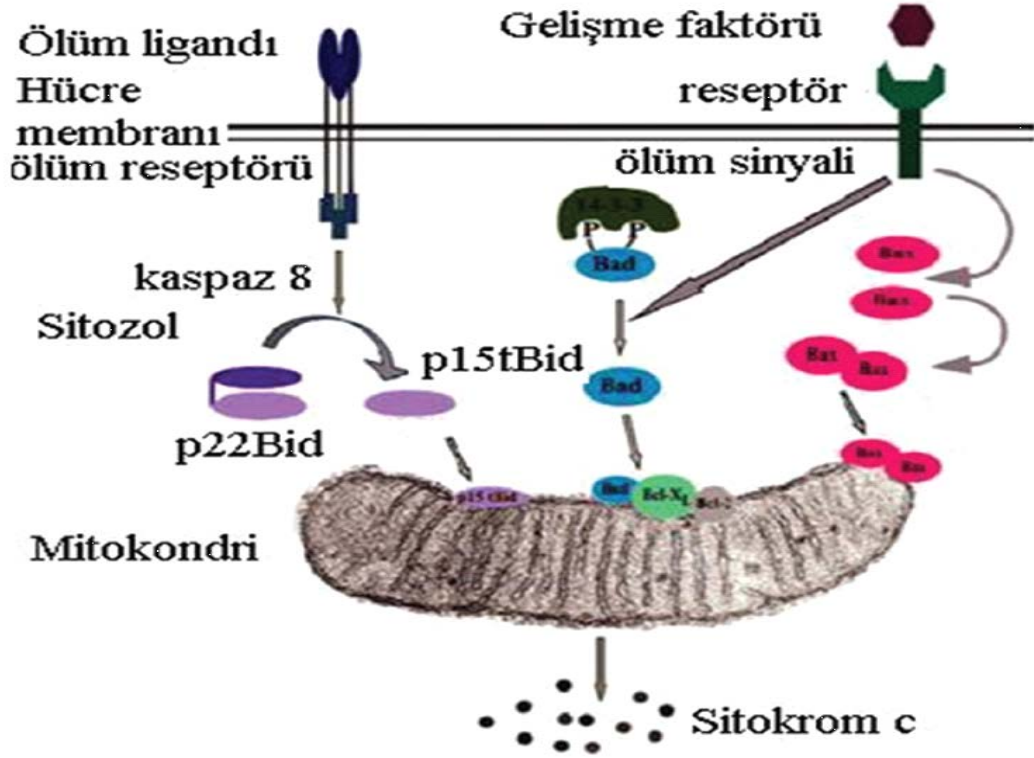
2. Fosforilasyon

Pro-apoptotik protein Bad, fosforilasyon-defosforilasyon ile düzenlenir. Normal koşullarda Bad, yaşam faktörlerinin etkisiyle ve serin-treonin kinaz Akt/PKA yolu aracılığı ile fosforile formda tutulur (Matsuzawa ve Ichijo, 2001). Bad, iki serin bölgesinde (Ser-112 ve Ser-136) fosforile edilir ve 14-3-3 molekülü ile sitoplazmada tutulur (Şekil 1.3.) (Gross ve diğ., 1999).

Ölüm sinyali ile Bad, defosforile edilir (Gross ve diğ., 1999). Kalsiyum bağımlı fosfataz (calcineurin), Bad'ın defosforilasyonundan sorumludur (Springer ve diğ., 2000). Defosforile Bad, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak ve bu proteinleri etkisizleştirerek apoptozisi destekler (Downward, 2004). Serbest kalan Bad, mitokondri membranında Bcl-XL-Bcl-2 heterodimerine katılır (Şekil 1.2.). Sadece defosforile Bad, Bcl-XL'ye bağlanma yeteneğindedir. Bu yüzden fosforilasyonu inaktivasyonuna neden olurken defosforile Bad, BH3 alanının ortaya çıkmasından dolayı aktiftir (Burlacu, 2003).

3. Proteolitik Bölünme

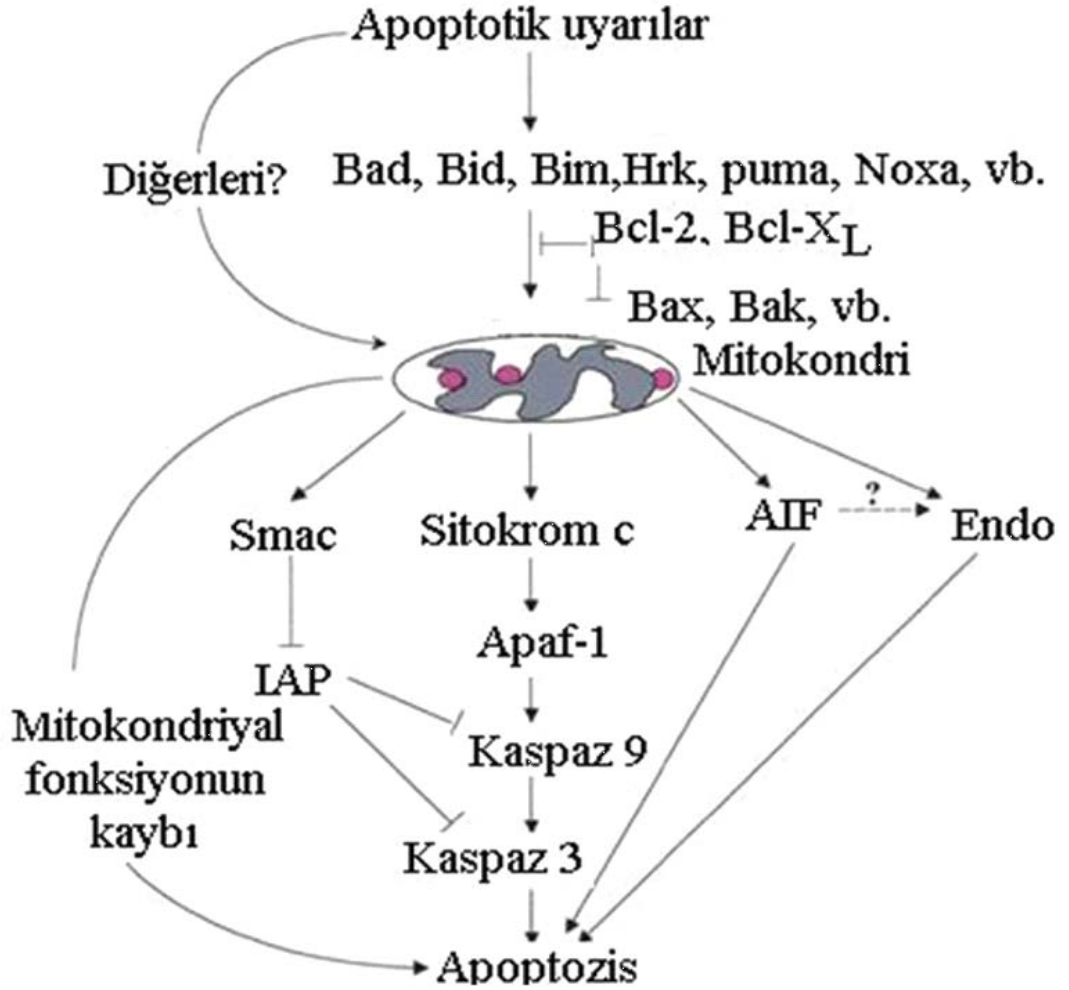
Bid, sadece bir BH3 içerir ve normalde uzun esaniyeek bir halkaya sahip bir protein olarak sitoplazmada inaktif bir formda bulunur (Burlacu, 2003). Apoptozisi harekete geçirmenin bir yolu, Fas ölüm reseptör yoludur. Fas ligand ile Fas'ın aktivasyonu, kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar. Kaspaz 8 ile Bid'in bölünmesi, p15 karboksi-terminal fragmenti oluşturur. Kesik p15 (tBid), mitokondri membranına yerleşir (Şekil 1.2) (Gross ve diğ., 1999) ve mitokondri proteinleri ile etkileşerek apoptozise neden olur (Burlacu, 2003).



Şekil 1.2. Pro-apoptotik Bcl-2 familya üyelerinin katıldığı apoptozis sinyal oluşum metabolik yolu (Burlacu, 2003).

4. Translokasyon

Pro-apoptotik protein Bax'ın aktivasyonu, hem translokasyonu hem de dimerizasyonu gerektirir. Normal koşullarda Bax, sitozolde monomerik formda bulunur. Apoptotik bir sinyal, Bax-Bax homodimerlerinin oluşumuna ve sitozolden mitokondriye translokasyonuna neden olur. Burada Bax, integral bir membran protein haline gelir. Bununla beraber, Bax dimerizasyonunun sitozolde mi yoksa mitokondri membranında mı olduğu açık değildir (Şekil 1.2.) (Burlacu, 2003).



Şekil 1.3. Çoklu apoptotik metabolik yollar mitokondriden yayılır (Wang, 2001)

1.3.1.3. Mitokondride Sitokrom c Salınımının Kontrolü

Bcl-2 familya proteinleri, intrasellüler membranların iyon ve proteinlere permeabilitesini düzenleme kapasitesine sahiptirler. Pro-apoptotik familya üyeleri içinde özellikle Bax ve Bid, membranlarda kanallar oluşturma ve düzenleme yeteneğine sahiptir. Anti-apoptotik familya üyeleri ise membran kanal oluşumu

üzerinde zıt etkiye sahiptir. Bcl-2 familya üyelerinin membran permeabilitesini kontrol ettiği üç mekanizma biliniyor (Downward, 2004).

1. Membranda novo protein kanalları oluşturmak
2. Önceden bulunan mitokondri membran gözenekleri ile etkileşmek ve yeniden düzenlemek
3. Lipit gözenekleri oluşturmak için membrandaki lipit oranını değiştirmek

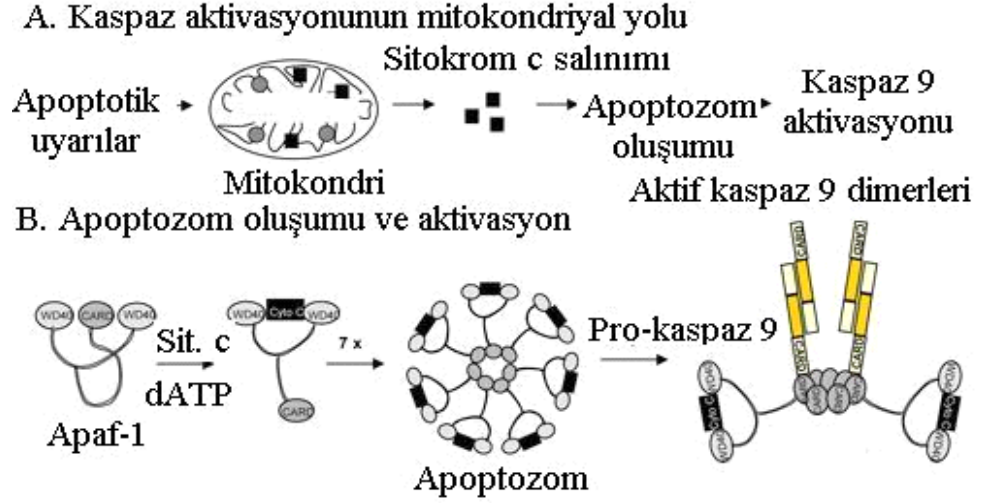
1.3.1.4. Apoptozom Oluşumu

Mitokondriden salınan sitokrom c, sitozolik protein Apaf-1'e bağlanır (Peter ve diğ., 1997). Apaf-1, *C. elegans* CED-4'ün memeli homologudur. Yaklaşık bir düzine WD-40 tekrarı içeren uzun bir C-terminaline sahiptir. N-terminalinde ise kaspaz toplama alanı (CARD) bulunur. WD-40 motifi, protein-protein etkileşimi için gereklidir ve proteinin geri kalanı üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (Chang ve Yang, 2000).

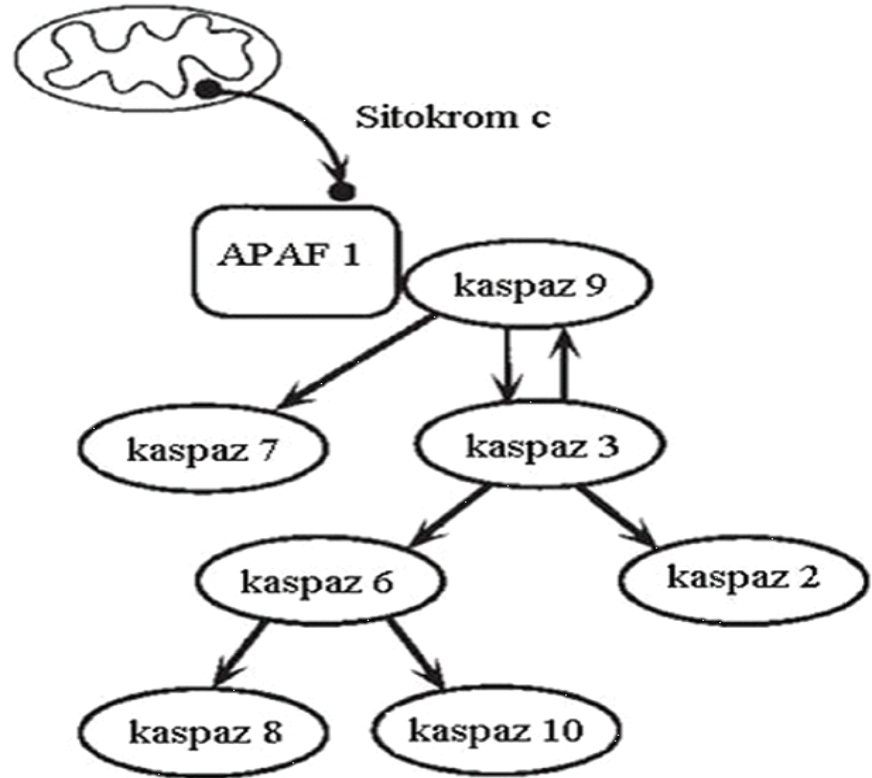
Sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder. Ardından ATP'nin katılmasıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9'a dönüşmesine ve diğer efektör kaspazların aktivasyonuna yol açar (Şekil 1.3.) (Kumar ve diğ., 2005). dATP ve sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması bu inhibitör etkiyi ortadan kaldırır (Chang ve Yang, 2000). Sitokrom c, Apaf-1'de WD-40 tekrar alanına bağlanır. Apaf-1, sitokrom c'yi sarar. Sitokrom c'nin bağlanması Apaf-1'de konformasyonel bir değişime neden olur. Konformasyonel değişim, Apaf-1'in oligomerizasyonunu sağlar (Cain ve diğ., 2001). Bu yapı 7 Apaf-1, 7 sitokrom c ve 7 ATP molekülü içerir. Apoptozom olarak bilinen bu tekerlek benzeri yapı, 7 molekül prokaspaz 9'un komplekse katılımını sağlar (Peter ve diğ., 1997). Apaf-1, N-terminal CARD alanı ile prokaspaz 9'un CARD alanına bağlanır. Apaf-1 ve prokaspaz 9, 1:1 oranında bir kompleks oluşturur (Chang ve Yang, 2000). Bu da *apoptozom* adı verilen tekerlek benzeri bir yapının oluşumu ile sonuçlanır (Şekil 1.4.) (Peter ve diğ., 1997).

Sonuçta kaspaz 9 aktive olur ve kaspaz kaskadını başlatır. Kaspaz 9, prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspaz 9'a geri bildirim yapabilir (pozitif feed back) (Peter ve diğ., 1997). Bu durumda daha fazla prokaspaz 9 aktive olur. Aktive olan kaspaz 9 daha fazla prokaspaz 3 ve prokaspaz 7'yi aktive eder. Kaspaz 3

daha sonra diğer sonlandırıcı kaspazları (prokaspaz-6 ve prokaspaz-2) bölmeye ve aktive etmeye devam eder (Peter ve diğ., 1997). Kaspaz 6, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'u bölmeye ve aktive etmeye devam eder (Şekil 1.5.). Böylece dönüşümsüz hücre intiharına yol açan kaspaz kaskadı başlar (Peter ve diğ., 1997).

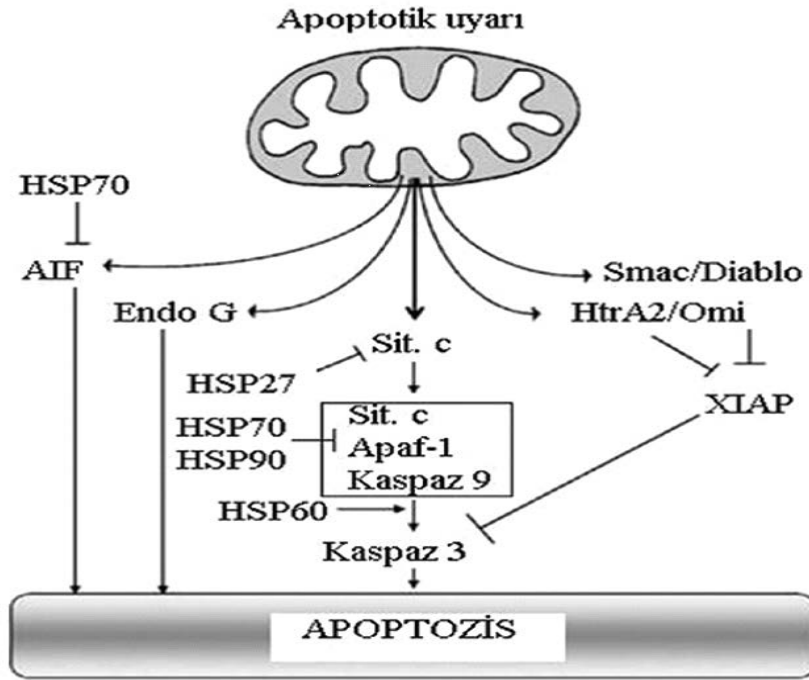


Şekil 1.4. Apoptozomda mitokondri aracılı kaspaz aktivasyonu; A. Apoptotik uyarıcı sitokrom c'nin membranlar arası alandan sitoplazmaya salınmasını uyarır. B. Sitokrom c ve dATP ile Apaf-1 heptamerik oluşumu sağlayan konformasyon kazanır (Gewies, 2003)



Şekil 1.5. Kaspaz kaskad aktivasyonu (Slee ve diğ., 1999)

Mitokondri aracılı apoptozis üç önemli özelliğe sahiptir. Birincisi, birçok faktör hücre ölümünü harekete geçirmek için fonksiyon gösterir. Sitokrom c'nin salınması, kaspazları aktive eder. Smac'ın salınması, kaspazlar üzerinde IAP inhibisyonunu uzaklaştırır. Endo G ve AIF'in salınması, DNA fragmentasyonuna ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. İkincisi, metabolik yol apoptotik sinyali çoğaltma yeteneğindedir. Aktif kaspazlar, Bcl-2 familya proteinlerini bölebilir ve böylece daha çok mitokondriyal hasara neden olabilir. Aktif kaspazlar mitokondriyal hasar için sinyal olan DNA kırıklarını oluşturmak için DNaz'ları aktive edebilme yeteneğindedir. Üçüncüsü, kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız metabolik yollar uygun şekilde fonksiyon göstermese bile, apoptotik sinyalin neden olduğu mitokondriyal fonksiyonsuzluk pasif olarak hücre ölümüne neden olabilir (Şekil 1.6.) (Wang, 2001).



Şekil 1.6. Mitokondriden salınan apoptozis efektörleri (Garrido ve diğ., 2006)

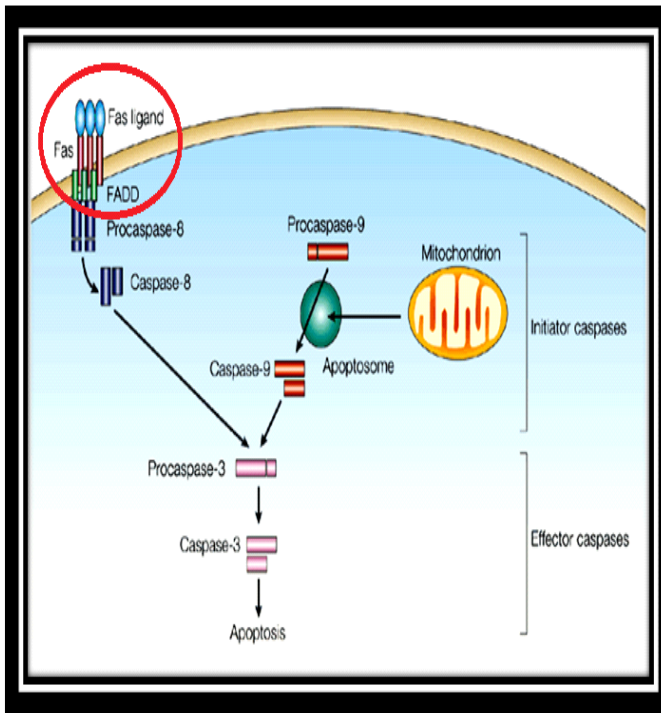
Mitokondri aracılı apoptozisi incelemekten çıkan sonuç, hücre ölümünü engellemenin en iyi yolu, mitokondriyal hasar meydana gelmeden önce apoptotik sinyalleri bloke etmektir (Wang, 2001).

1.3.2. Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi:

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır (Şekil 1.7.). Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (Örn: Sitotoksik-C hücrelerinin hedef hücre yüzeyine bağlanarak Fas-L üretmesi sonrası oligodendrositlerde görülen apoptotik dejenerasyon, ölüm) (Keane ve diğ., 2001).

SCI reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılıdır. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir (Banasiak ve Haddad, 1998).

Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptozis oluşumunda Fas ve p-75'in sorumlu olduğu gösterilmiştir (Banasiak ve Haddad, 1998). Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (Banasiak ve Haddad, 1998) (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7: Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi.

1.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması:

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir. Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (Nakamura ve diğ., 2000). Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki kalsiyum seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur (Rao ve diğ., 2001). Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve diğ., 2001). Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (Bao ve Liu, 2003).

1.3.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir. *C. elegans*'ın gelişim sürecinde 1090 somatik hücre oluşmaktadır; fakat bunlardan 131 hücre ölmektedir. Bu programlı hücre ölümünü gerçekleştiren genler, araştırmacılar tarafından *ced-3* ve *ced-4* olarak tanımlanmıştır. Bu genlerden biri ya da her ikisi de mutasyona uğradığı zaman bu 131 hücre yaşamaya devam etmektedir (Ashkenazi ve Dixit, 1998). *Ced-3* geni bir sistein proteazı şifrelemektedir ve memelilerdeki sistein proteazlardan ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme)'ye benzemektedir. *Ced-4* ise kalsiyuma bağlı bir proteini şifrelemekte ve memelilerde *apaf-1* ile homoloji göstermektedir. *Ced-9*'un insandaki homoloğu olan *Bcl-2* proto-onkogen gen ailesi ise apoptozu durdurmaktadır (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Bugün nematodlardan başka bitki, hayvan gibi bütün canlı gruplarında apoptoz çalışmaları sürmektedir (Gilchrist, 1998). Apoptozun regülasyonu nematodlardan insana kadar çoğu aynı gen kontrol süreci ile oldukça sıkı bir biçimde korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ifadesi ile düzenlenebilmesine rağmen, süreç genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb) veya sitokinlerin olmaması gibi (eritropoietin vb) farklı uyaranlarla harekete geçirilebilir.

DNA tek veya çift iplik parçaları ve nükleotit azlığı, DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile bağlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola girer (Israels ve Israels, 1999).

1.3.4.1. Antiapoptotik Proteinler

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir (Akins ve diğ., 1996). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir (Caotes ve diğ., 1996). Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (Şekil 1.8.) (Wyllie, 1995).

p-53:

Apoptozisi düzenleyen bir diğer gen, tümör baskılayıcı p-53 genidir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptozisi başlatır (Banasiak ve Haddad, 1998). DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptozisle yok edilir (Nakano, 1997).

c-myc:

Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur (Evan ve diğ., 1992). C-myc protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, her ikisi de yeterli ise çoğalma olur, c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptozis görülür (Wagner ve diğ., 1993).

Bcl-2 ve Bcl-xl:

Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir

(Newton ve diğ., 1992). Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir.

Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür (Newton ve diğ., 1992). Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membran dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinörine bağlanır (Newton ve diğ., 1992). Bcl-x1 mitokondri membran dışında lokalizedir. Bcl-x1 ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozisi engeller (Keane ve diğ., 2001). Bcl-x1 kaspaz aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önler (Newton ve diğ., 1992).

Bax ve bad proteinleri etkilerini diğer bir protein ailesi; kaspazlar üzerinden gerçekleştirir. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkar. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive edilir. (Newton ve diğ., 1992).

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP:

Antiapoptotik protein ailesinden apoptozis protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır.

Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler (Keane ve diğ., 2001).

Apoptozis protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (Keane ve diğ., 2001).

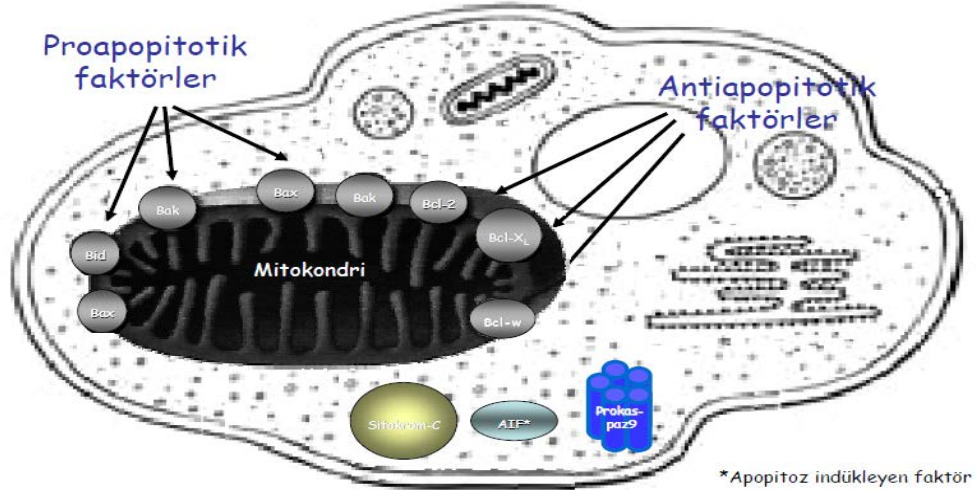
1.3.4.2. Proapoptotik Proteinler

Bax, Bad ve Bid

Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı ile sitozolik bax mitokondriye yönelir ve çeşitli değişimler sonucunda bax'ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkar ve sitokrom-c salınımına neden olur. Kalpain tarafından bax salınımı uyarılarak sitokrom-c açığa çıkar (Wingrave ve diğ., 2003). Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur.

Apoptozis sırasında bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-2'yi bad'dan ayrılır (Wingrave ve diğ., 2003).

Bid, bcl-2'yi inaktive etmek veya bax'ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir (Newton ve Strasser, 1998). Endojen bid'in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur (Şekil 1.8.) (Rao ve diğ., 2001).



Şekil 1.8 : Apoptozu indükleyen faktörler

1.3.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler

Apoptotik sinyal iletimi ile ilgili bu güne kadar elde edilen bilgiler, hücre içi diğer sinyallerin iletiminden sorumlu olan bazı molekül ve enzimlerin, apoptozisteki sinyal iletiminde de rolleri olduğunu göstermektedir (Eastman, 1995).

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyum apoptoziste de rol oynar (Şekil 9). Hücre içindeki kalsiyum iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir (Cohen, 1993). Sitoplazmadaki kalsiyum iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. kalsiyum adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir (Brinley ve diğ., 1978). C-AMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içi c-AMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyardığı bildirilmiştir. Kalsiyumdan bağımsız olarak da apoptozis olabileceği gösterilmiştir (Brinley ve diğ., 1978). Sitoplazmada artan kalsiyum, inaktif durumdaki kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları

Bu asimetri ATP'ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır (Cohen, 1993). Apoptotik indüksiyon olduğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algırlar ve fagosite eder (Bortner ve diğ., 1995).

Protein Kinazlar: Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır (Cohen, 1993). Bu enzimlerden protein kinaz-A, apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur (Eastman, 1995).

1.3.6. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

1. Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (Balakumran ve diğ., 1996) (Şekil 10).

2. Hücre Büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (Balakumran ve diğ., 1996) (Şekil 1.10.).

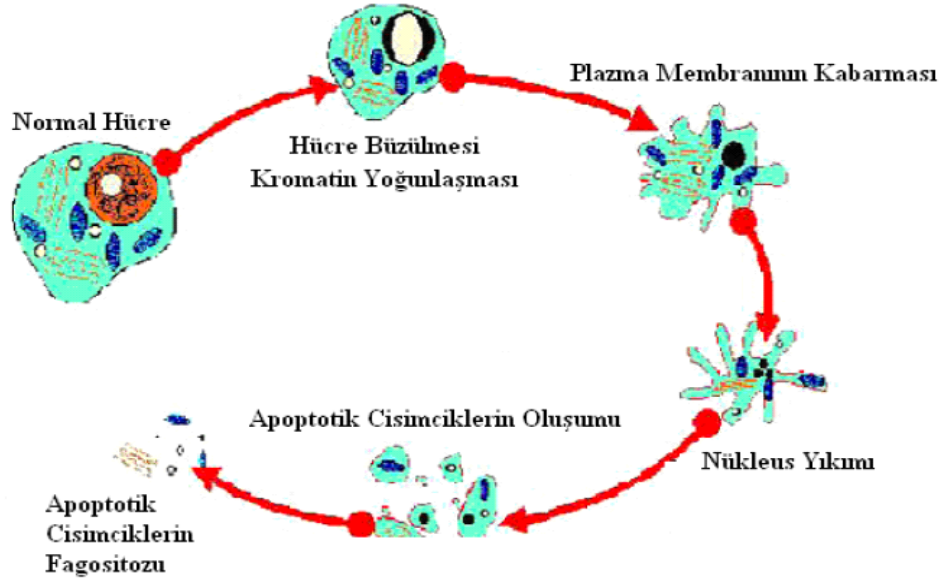
3. Kromatin Yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek gözenekleri seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçi genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (Balakumran ve diğ., 1996) (Şekil 1.10.).

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (Balakumran ve diğ., 1996) (Şekil 1.10.).

Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfolipidlerin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfolipidlerin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (Balakumran ve diğ., 1996) (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10: Apoptozis'in Morfolojik değişiklikleri (Balakumran ve diğ., 1996)

1.3.7. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır (Şekil 1.11.)

1.3.7.1. Fiziksel Farklılıklar

1- Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (Cohen J, 1993).

2- Nekroz fizyolojik olmayan uyarılarla başlar, apoptozis fizyolojik uyarılarla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) (Cohen J, 1993).

3- Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosit edilir. (Cohen J, 1993).

Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (Cohen J, 1993).

1.3.7.2. Morfolojik Farklılıklar

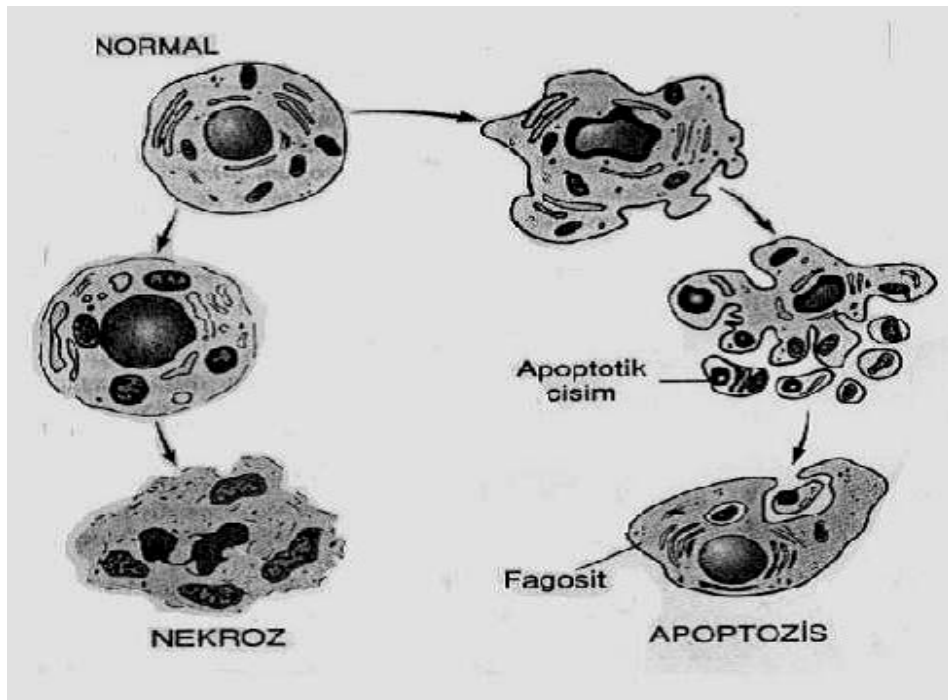
1- Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (Cohen J, 1993).

2- Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (Cohen J, 1993).

3- Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (Cohen J, 1993). (63).

4- Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur (Cohen J, 1993).

5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste; apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (Cohen J, 1993). (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar (Cohen J, 1993).

1.3.8. Fagositoz

Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptoziste ölü hücre fagositozla ortadan kaldırılır. Apoptozis sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosite etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler (Majno ve Torisl, 1995).

Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalır (Majno ve Torisl, 1995).

1.3.9. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esaniyeasında apoptozise rastlamak mümkündür. Örnek olarak, Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir (Bellamy ve diğ., 1995).

Apoptozis ayrıca her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (Majno ve Torisl, 1995). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (Bellamy ve diğ., 1995). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (Cummings ve diğ., 1997). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (Cohen, 1993). Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

1.3.9.1. Fizyolojik Olaylar:

a- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyon) (Levison ve Hopvwood, 1976).

b- Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (Cohen, 1993).

c- Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri) (Cohen, 1993).

d- İmmün hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin deplesyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması) (Cohen, 1993).

1.3.9.2. Patolojik Olaylar:

a- Tümörlerde hücre olumu (hem büyüme hem de regresyon aşamasında) (Cohen, 1993).

b- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) (Bellamy ve diğ., 1995).

c- Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) (Schwartzman ve Cidloski, 1993).

d- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) (Cohen, 1993).

e- Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) (Schwartzman ve Cidloski, 1993).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral infeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Hetts, 1998).

1.4. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Gen ekspresyonu, DNA'da mevcut olan genetik bilginin mRNA ve protein düzeyinde ifade edilmesidir. Bir başka tanım ile gen dizilerinin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesi sürecidir. Bu durum genlerin açık (işlevsel) olup olmadıkları olarak da tanımlanabilir. Farklı fizyolojik veya patolojik durumlarda hücrenin genetik bilgi akışı değişir. Hücrenin genetik bilgi akışının incelenbilmesi, doku veya organizmada değişen durum karşısında hangi yolların çalışmaya başladığı ve hangi

yolakların kapandığı konusunda bilgi verir (Bustin ve diğ., 2005, Nolan ve diğ., 2006).

Günümüzde protein yapısındaki modifikasyonlar ve protein – protein etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla protein çalışmaları kullanılırken, hücre ve dokularda fizyolojik veya patolojik bir etkinin cevabının incelenebilmesi amacıyla mRNA ekspresyon çalışmalarına başvurulmaktadır (Bustin ve diğ., 2005, Nolan ve diğ., 2006).

Eş zamanlı PZR tekniğinde mRNA üzerinden revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenir ve gene özgül primerler ile PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirilir. Bu teknik ile gen ekspresyonu semikantitatif veya kantitatif olarak analiz edilebilir. Kantitatif eş zamanlı PZR analizleri, özellikle Eş zamanlı PZR cihazları kullanılarak gen ekspresyon miktarının sayısal olarak belirlenebildiği çalışmalardır (Bustin ve diğ., 2005, Nolan ve diğ., 2006).

Kantitatif PZR uygulamaları, hücre ve dokuların çevresel uyarılara verdikleri mRNA düzeyindeki cevabın incelenmesi için başvurulan yöntemlerdir. İki farklı örnek arasında PZR tekniği ile miktar karşılaştırması yaparken, deneysel ve örneklerin doğasından gelen farklılıklar olabilir. Eş zamanlı PZR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için, farklı fizyolojik veya patolojik şartlarda ekspresyonu değişmeyen bir başka gen ürünü mRNA ile normalize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Normalizasyon amacıyla, çeşitli doku ve hücre tiplerinde ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren referans genler kullanılmaktadır (Bustin ve diğ., 2005, Nolan ve diğ., 2006).

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) Real Time PZR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Womg ve Medrano 2005).

Florimetrik PZR yöntemi ile yapılan kantitasyon çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri

karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PZR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır (Pfaffl, 2001).

2. AMAÇ

Kronik böbrek yetmezliği hastalarında idrar çıkışı olmamaktadır (Akoğlu ve Süleymanlar, 1996). İdrar mesane için son derece önemli yaşamsal bir faktördür. İdrarda bulunan iç ve dış faktörler sayesinde üreteriyum hücreleri yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmektedirler (Khandelwal ve diğ., 2009). Eğer mesaneye idrar girişi olmazsa yaşamsal fonksiyonlar gerilemeye başlar. Hücrede kullanılmamaya bağlı atrofik olaylar meydana gelir. Hücreler farklılaşır ve karakter değişimine uğramaya başlar. Hücre ölümü hızla devam eder ve hücre savunma mekanizması olarak apoptoz sürecini başlatır.

Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu hem *bcl-2/bax* oranına hem de *fas/fas ligandı* oranına bağlıdır. Bu nedenle çalışmamızda hem mitokondriyel yolak hem de ölüm reseptörü yolağı incelendi.

Literatür incelendiğinde *bcl-2*, *bax*, *fas*, *fas ligandı* ifadelerinin mesanedeki düzeylerinin incelendiği çalışmalar genellikle mesane tümörleriyle alakalıdır. Normal mesane mukozasının epitel hücrelerinin bazalinde *bcl-2* ekspresyonu tespit edilebilir. Ancak; bazal tabaka dışında *bcl-2* birikimi özellikle yüksek dereceli, ilerlemiş mesane kanserlerinde gösterilmiştir (Nakopoulou ve diğ., 1998). *Fas-Fas ligand* sistemi değişici epitel karsinomunda temel apoptotik yollardan biridir (Maas ve diğ., 2004).

Literatürde idrardan yoksun mesane dokularında üreteriyum farklılaşması üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. *Stahlschmidt ve arkadaşlarının* yaptığı çalışmada, üreteriyum farklılaşmasıyla ilgili olduğu düşünülen antiijenlere bakılmıştır. İlginç bir şekilde idrarda bulunan epitelium büyüme faktörleri ortadan kalktığında mesanenin yaşamsal fonksiyonlarına devam ettiği saptanmıştır (Stahlschmidt ve diğ., 2005)

Bu çalışma doğrultusunda aşağıdaki hipotezler öne sürülmüş ve test edilmiştir:

- ✓ İdrar mesane için yaşamsal bir faktördür.
- ✓ İdrardan yoksun üreteriyumda atrofiler meydana gelir. Dolayısıyla hücre kendini korumaya alarak apoptotik süreci başlatır.

- ✓ İdrar bulundurmeyen dokularda apoptotik belirteçlerde artış olur. Ancak mesanenin idrara maruz kalmasıyla apoptotik süreç azalarak, belirteçlerin ifade seviyelerinde azalma olur.

Bu çalışma bu konularla alakalı yapılan ilk çalışma olması bakımından önemlidir. Çalışmanın bir önemi de nakil hastalarından alınan dokuların çok değerli olmasından kaynaklanmaktadır. Yani bu dokular nakille eş zamanlı alınmıştır. Hiçbir şekilde idrar girişi ve çıkışı olmayan mesane dokusu kullanılmıştır. Ayrıca nakil sonrası kontrole gelen idrar giriş ve çıkışı başlamış hastaların dokularıyla da karşılaştırma yapılarak, belki de mesanenin karakter değişiminde apoptotik süreçlerin çok önemli bir yerinin olduğu ortaya çıkacaktır.

3. GEREÇLER

3.1. Araştırmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada kullanılan 46 adet hastanın doku 25 tanesi nakil sırasında alınan doku, 12 tanesi nakilden sonra kontrol biyopsi alınan doku, 9 tanesi sağlıklı birey dokusudur ve doku örnekleri 2009-2012 yılları arasında Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi'nden temin edilmiş olup -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Araştırma İçin Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Tablo 3.1. Laboratuvarda kullanılan cihazlar ve markaları

CİHAZLAR	MARKA
Görüntüleme Sistemleri	Vilber Lourmant ETX-26.MX
Isıtıcı	Labart, SH-5 Heating Stirrer
Manyetik Karıştırıcılar	MR3001
Spektrofotometreler	Nanodrop ND-1000
Thermo Cycler	Techne TC-512
Santrifüjler	Centrolit II-BL Centrifuge
Tartı	Hassas Terazı, XB220 A (Presica)
Vorteks	Heidolph REAX
Derin Dondurucular	-80°C , Thermo Fisher Scientific
Mikropipet Seti	0,2-2, 1-10, 2-20,10-100, 20-200, 200-1000 μl 'lik Finnpipette (ThermoScientific, FİNLANDİYA)
Doku parçalama cihazı	MagNA Lyser Parçalama Cihazı MagNA Lyser Green Beads tüpü, Katalog No: 03 358 941 001
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	LightCycler® 2.0 Instrument LightCycler® 2.0 Sample Carousel (20 μl) 2 LightCycler® Capping Tools

3.3. RNA izolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

Örneklerden kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Roche High Pure RNA Tissue Kit (50) (Katalog No: 12 033 674 001) kullanılmıştır.

3.4. cDNA Sentezi İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

Örneklerden kit kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Roche, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Katalog No: 04 379 012 001) kullanılmıştır.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

10X MgCl₂'süz Tampon : 200 mM (NH₄)₂SO₄, 750 mM Tris-HCl (pH 8,8), % 0,1 Tween 20 (Fermentas, Litvanya)

MgCl₂ : dH₂O'da 25 mM (Fermentas, Litvanya)

Deoksiribonükleotitler (dNTP) : 10 mM (Fermentas, Litvanya)

Taq DNA Polimeraz : 5u/µl (Fermentas, Litvanya)

3.6. Kantitatif Eş Zamanlı PZR İçin Gerekli Enzim ve Kimyasallar

Solis BioDyne - 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPZR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Katalog No: 08-24-00001) kullanılarak ifade seviyeleri tespit edilmiştir.

3.7. Elektroforez İçin Kullanılan Tamponlar ve Kimyasallar

Agaroz (Bio Basic Inc., Agarose A)

EtBr (Scharlau ET0109),

Trisma Base (Amresco, 0826),

Borik asit (Amresco, 0588)

EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (Sigma E5134)

4. YÖNTEMLER

4.1. Doku Eldesi

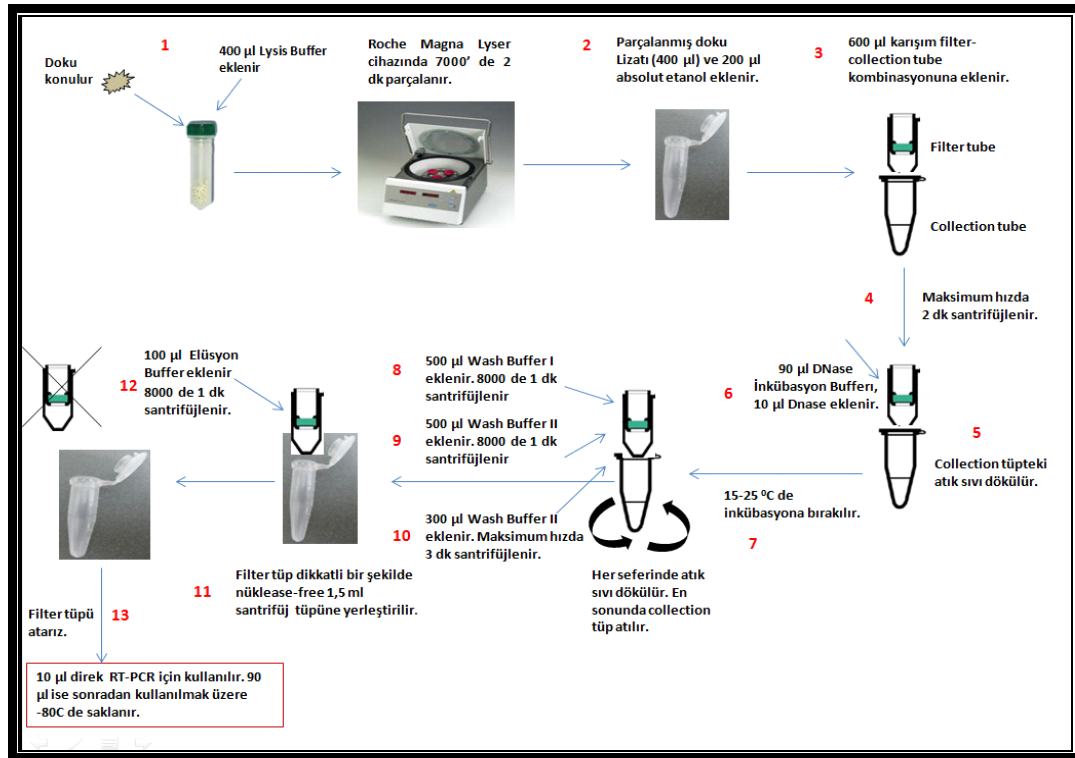
Nakil sırasındaki hastaların mesanelerinden doku alımı gerçekleştirilmiştir. Nakil sonrası kontrol amaçlı gelen hastaların mesanelerinden doku alımı gerçekleştirilmiştir. Ürolojik muayene için gelen ancak sonucu temiz olan hastaların mesanelerinden doku alımı gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri eppendorf tüpleri içinde, sıvı azota alınarak donduruldu. Tüm örnekler RNA izolasyonu aşamasına kadar -80°C ' de saklandı.

4.2. Dokudan RNA İzasyonu

Çalışma boyunca tüm RNA izolasyonları aşağıdaki Roche High Pure RNA Tissue Kit protokolü esas alınarak gerçekleştirilmiştir:

- Parçalama tüpü içine dokunun tamamı konulur. Üzerine 400 μl Lysis Buffer eklenir. Parçalama cihazına yerleştirilir ve 7000 rpm' de 2 dakika doku parçalanır.
- Nükleazdan arınmış 1,5 ml santrifüj tüpünün içine parçalanmış doku lizatı eklenir (400 μl). Lizatın üstüne 200 μl absöüt etanol eklenir ve iyice karıştırılır.
- Filtre tüp ve toplama tüp birleştirilir. 600 μl karışım bu tüp kombinasyonuna eklenir.
- Maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilir.
- *Eğer ıslaklık varsa, tekrar santrifüjlenir.*
- Santrifüjden sonra toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.
- 90 μl DNase İnkübasyon Bufferı, 10 μl DNase I çalışma solüsyonu eklenir.
- 15 - 25°C de inkübasyona bırakılır.
- 500 μl Wash Buffer I eklenir. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.

- 500 µl Wash Buffer II eklenir. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.
- 300 µl Wash Buffer II eklenir. Maksimum hızda 3 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpündeki atık sıvı dökülür.
- Dikkatli bir şekilde kolon çıkarılır. Filtre tüp, santrifüj tüpünün içine konulur.
- Üzerine 100 µl Elüsyon Buffer eklenir. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenir.
- Mikrosantrifüj tüpü şimdi izole edilmiş RNA içermektedir. 10 µl direk RT-PZR için kullanılır. 90 µl ise sonradan kullanılmak üzere -80°C de saklanır.



Şekil 4.1. : Dokudan RNA İzolasyonu Basamağı

4.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi

Elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için Nanodrop kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Bunun için 1.5 µl RNA alınarak cihazın üzerine damlatılıp, miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Geriye kalan RNA lar cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.4. RNA Konsantrasyonlarının Ayarlanması

260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Fenol, protein veya benzeri diğer safsızlıkların olması durumunda bu oranlar belirtilen aralığın dışında çıkmaktadır.

4.5. cDNA Sentezi

İzolasyon sonrası elde edilen RNA molekülü tek zincirli yapısı sebebiyle kırılığandır, kolay parçalanır. Sonraki aşamalarda yapılacak işlemler içinse dayanıklı, sağlam bir moleküle ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaç doğrultusunda yapılan işlem bu RNA molekülünden, ters transkriptaz (Reverse Transcriptase, RT) enzimiyle DNA kopyasının sentezi işlemi yani komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezidir. cDNA sentezinde Roche, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Katalog No: 04 379 012 001) protokolü kullanılmıştır:

- Tüm donmuş bileşenler çözündürülür. Kullanmadan önce kısa bir santrifüjleme yapılır. Tüm bileşenler çalışma boyunca buz üzerinde muhafaza edilir.
- Steril, PZR tüpü buz üzerine konular, Tablo 4.1. de belirtilen miktarlarda primer karışımı hazırlanır.

Tablo 4.1. cDNA sentezi için gerekli bileşen miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
Poly(A) ⁺ mRNA	<i>*10 ng Poly(A)⁺ mRNA olacak şekilde ayarlanır.</i>
Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer, 50pmol/μl	1μl
Su	<i>*Son hacmi 13' e tamamlamak üzere değişik miktarlarda su eklenir.</i>
Toplam	13 μl

- Primer karışımı 10 dakika, 65⁰C de denatüre edilir. Denatürasyon bitince hızlı bir şekilde buz üzerine alınır.

- Tüpe Tablo 4.2. de belirtilen RT karışım bileşenleri eklenir.

Tablo 4.2. RT karışım bileşenleri

BİLEŞEN	MİKTAR (µl)
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5×conc.	4
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	0.5
Deoxynucleotide Mix, 10mM	2
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/µl	0.5
Total	7
Final Miktar	20

- Karışımları ekledikten sonra elimizle hafifçe sallayarak birbirlerine karışması sağlanır. Vortekslenmez!
- Karıştırdıktan sonra tüpler hemen PZR cihazı içine konulur (Buharı minimize etmek için).
- 10 dakika 25⁰C de, 30 dakika 55⁰C inkübasyona bırakılır.
- 85⁰C de 5 dakika ısıtılır. Reaksiyon bitince tüpler hemen buz üzerine alınır.
- cDNA lar -20⁰C de saklanır.

4.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR, yüksek sıcaklıkta yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak, bir termal döngü cihazı yardımıyla DNA'nın *in vitro* olarak çoğaltılması işlemidir. Bu yöntem günümüzde moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır.

4.6.1. Primer Çiftlerinin Tasarlanması

Fas ve Fas Ligandı ve Beta Aktin Yamana ve ark. yaptığı çalışmadaki primer dizini referans alınmıştır (Yamana ve diğ., 2005).

Bax ve Bcl-2 Jun L1 ve ark. yaptığı çalışmadaki primer dizini referans alınmıştır (Jun L1 ve diğ., 2011)

Tablo 4.3.'de qRT-PZR'da kullanılan primerlere ait diziler mevcuttur:

Tablo 4.3. qRT-PZR’da kullanılan primerler

Gen	Primer Dizisi	Tm
Fas	F:ATGCTGGGCATCTGGACCCT	63.0
	R: GCCATGTCCTTCATCACACAA	59.0
Fas L	F:AACTCAAGGTCCATGCCTCTG	61.0
	R: GGTGAGTTGAGGAGCTACAGACA	65.0
Bax	F:AAGAAGCTGAGCGAGT	48.0
	R: GGCGCAATCATCCTCTG	58.0
Bcl-2	F:GATGACTGAGTACCTGAA	52.0
	R: AGGAGAAAATCAAACAGAG	49.0
Beta Actin	F:AATGCTTCTAGGCGGACT	54.0
	R: ACTCCCAGGGAGACCAAA	56.0

4.6.2. Primerlerin Sulandırılması

Primerler 1µl’ de 100 pmol olacak şekilde sulandırılmıştır. Önce nmol değeri pmole dönüştürülmüştür. Sonra 1µl’ de 100 pmol olacak şekilde su eklenilmiştir.

Tablo 4.4. qRT-PZR’da kullanılan primerleri sulandırmak için gerekli hesaplamalar

PRİMER	nmol (Ana stok)	pmol	dH ₂ O µl (1µl/100pmol)
Fas F	27,5	27500	275
Fas R	27,5	27500	275
FasL F	22,8	22800	228
FasL R	23,7	23700	237
Bax F	23,8	23800	238
Bax R	24,9	24900	249
Bcl-2 F	23,7	23700	237
Bcl-2 R	19,9	19900	199
Beta Actin F	27,1	27100	271
Beta Actin R	21,9	21900	219

4.6.3. Primer Optimizasyonu

Primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak için primerler belli sıcaklık aralığında denenmiştir. Bu reaksiyonlarda hasta örneklerine

ait cDNA'lar kullanılmıştır. Tablo 4.5.'de miktarları belirtilen reaktifler ve Tablo 4.6.'deki termal döngü koşulları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.5. PZR protokolü

Reaktif	Miktar (µl)
10X Taq tamponu (Fermentas)	2,5
MgCl ₂ (Fermentas, 25 mM)	2
dNTP (Fermentas, 10 mM)	0,5
F Primer (10 pmol/µl)	1,25
R Primer (10 pmol/µl)	1,25
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,2
dH ₂ O	15,3
cDNA	2
Toplam Hacim	25

Tablo 4.6. PZR optimizasyonu termal döngü koşulları

(* 46°C - 61°C arasındaki sıcaklık değerleri kullanılmıştır.)

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	5 dakika	1
95	10 saniye	30
Değişken*	15 saniye	
72	20 saniye	
72	10 dakika	1
10	15 dakika	

4.6.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

4. 6.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

1. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

5x TBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)

54 gr Trisma Base, 27,5 gr Borik asit ve 20 ml 0,5 M EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) 1000 ml'ye dH₂O ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Ethidium Bromide, EtBr (10 mg/ml)

EtBr, son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde sulandırılarak hazırlanmıştır.

2. Agaroz Jelin Hazırlanması

Jel hazırlığı için öncelikle 2 gr/100 ml olacak şekilde hassas terazide agaroz tartılır. Ana stokta 5X olarak hazırlanmış, dH₂O ilavesiyle 1X olacak biçimde seyreltilmiş olan TBE, 2 gr agarozla son hacim 100 ml olacak biçimde ilave edilir. Hazırlanan bu karışımın ısıtıcıda çözünmesi sağlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra bir süre soğuması beklenir, ardından içine 5 µl EtBr eklenir. İyi karıştırılmasının ardından çözelti, donması için jel tablasına dökülerek 25-30 dakika bekletilir.

3. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

Kullanıma hazır hale gelmiş olan %2'lik jel, içinde 1x TBE bulunan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilir. PZR ürünleri, 5 µl PZR ürünü, 5 µl yükleme boyası ile karıştırılarak mikropipet yardımıyla jele yüklenir ve jel 120 voltta ~30 dakika yürütülür. Ardından jel görüntüleme sisteminde görüntülenir.

4.6.5. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Hasta örnekleri cDNA'ları ile aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır:

- Tüm donmuş reaktanları çözündürülür. Kullanmadan önce kısa bir santrifüjleme yapılır. Tüm reaktanlar çalışma boyunca buz üzerinde muhafaza edilir.
- Tablo 4.7. doğrultusunda reaksiyon karışımı hazırlanır.

Tablo 4.7. qRT-PZR reaksiyon koşulları

Bileşen	Miktar (µl)
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPZR Mix Plus (ROX)	3
Primer F (10 pmol/µl)	0.35
Primer R (10 pmol/µl)	0.35
cDNA	0,5
dH ₂ O	10,8
Total	15

- Hazırlanan reaksiyon karışım her bir tüpte 15 µl olacak biçimde dağıtılır. Tüplerin ağzı kapatılır.

- Santrifüj içine tüpler konulur ve çok kısa santrifüjlenir.
- Santrifüjden sonra cihaza tüpler yerleştirilir.
- Cihaz Tablo 4.8.'de belirtilen termal döngü koşullarına uygun biçimde ayarlanmıştır:

Tablo 4.8. qRT-PZR termal döngü koşulları

(* Amplifikasyon basamağındaki değişken sıcaklık her primer çiftine göre farklılık göstermektedir.)

Program	Döngü	Analiz Modu	Sıcaklık (°C)	Süre
Program 1	1	Denetürasyon	95	15 dakika
Program 2	45	Amplifikasyon	95	10 saniye
			*Değişken	15 saniye
			72	15 saniye

- Deney protokolünün sonlanması ardından sonuçlar cihazın yazılımında bulunan programlar doğrultusunda analiz edilir.

Tablo 4.3.'da dizi bilgileri verilmiş olan bu primerlerin, yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.9.'de mevcuttur:

Tablo 4.9. qRT-PZR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları

Gen	Optimum Sıcaklık (°C)
Fas	59
Fas L	59
Bcl-2	59
Bax	50
Beta Actin	58 ve 59

4.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi gerçekleştirilirken *SPSS 16.0* programı kullanılmıştır. Veriler *Mann-Whitney U* kullanılarak analiz edilmiştir. Nakil öncesi ve nakil sonrası hasta grubu karşılaştırılmıştır. Ayrıca hiç hastalığı olmayan sağlıklı bireylerle hastalıklı bireyler de karşılaştırılmıştır. Yaşa ve cinsiyete göre de ifade düzeylerine bakılmıştır.

5. SONUÇLAR

5.1. RNA İzolasyonu Sonuçları

Tüm örneklerden RNA izolasyonu protokolü kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılmış olan Nanodrop ölçümleri Tablo 5.1-2-3.'de mevcuttur:

Tablo 5.1. Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Nakil Hastası	Konsantrasyon (ng/µl)	Faktör	A260/280
1	3,1	40	2,05
2	2	40	1,82
3	3,1	40	2,05
4	2,8	40	1,93
5	2,9	40	1,96
6	4,6	40	2,01
7	2,5	40	1,91
8	8,9	40	2,19
9	8,4	40	2,16
10	2,6	40	1,82
11	5,2	40	1,98
12	2,9	40	1,96
13	2,3	40	1,87
14	3,1	40	2,05
15	2,6	40	1,82
16	3	40	2,01
17	2,4	40	1,86
18	3,4	40	1,97
19	3,5	40	1,92
20	2,1	40	1,81
21	3,1	40	2,06
22	3,4	40	2,13
23	23,9	40	2,06

24	10,2	40	2,13
25	4,2	40	1,85

Tablo 5.2. Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Nakil Hastası	Konsantrasyon (ng/µl)	Faktör	A260/280
1	2,5	40	1,92
2	2	40	1,87
3	1,8	40	1,98
4	1,7	40	1,95
5	1,6	40	1,82
6	1,3	40	1,84
7	6,3	40	2,16
8	2,6	40	1,93
9	3	40	1,89
10	37,4	40	2,14
11	3,7	40	1,97
12	5,2	40	1,81

Tablo 5.3 Ürolojik rahatsızlık nedeniyle hastaneye gelen ancak hiçbir ürolojik problemi saptanmayan sağlıklı doku örneklerine ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

Nakil Hastası	Konsantrasyon (ng/µl)	Faktör	A260/280
1	2,1	40	2,03
2	1,1	40	2,19
3	5,6	40	2,07
4	3,4	40	1,89
5	4,8	40	1,92
6	5,2	40	2,02
7	6,7	40	2,08
8	3,5	40	1,94
9	3,2	40	1,97

5.2. cDNA Sentezi İçin Gerekli RNA Miktarları

Çalışmanın nihai hedefi örneklerdeki hedef gen ifade değişikliklerinin tespiti olduğu için, başlangıçtaki transkript sayısının eşit olması büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip örneklerin her biri, başlangıç RNA miktarı 10 ng/μl olacak biçimde ayarlanmıştır ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten izolasyon sonucu elde edilen RNA ana stoğundan cDNA sentezi için ne kadar alınması gerektiği Tablo 5.4 – 5.5 – 5.6.'da mevcuttur.

Tablo 5.4. 10 ng/μl RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Nakil Hastası	Poly(A) ⁺ mRNA [μl]	Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer [μl]	dH ₂ O [μl]
1.	3,2	1	8,8
2.	5	1	7
3.	3,2	1	8,8
4.	3,5	1	8,5
5.	3,4	1	8,6
6.	2,1	1	9,9
7.	4	1	8
8.	1,1	1	10,9
9.	1,1	1	10,9
10.	3,8	1	8,2
11.	1,9	1	10,1
12.	3,4	1	8,6
13.	4,3	1	7,7
14.	3,2	1	8,8
15.	3,8	1	8,2
16.	3,3	1	8,7
17.	4,1	1	7,9
18.	2,9	1	9,1
19.	2,8	1	9,2
20.	4,7	1	7,3
21.	3,2	1	8,8
22.	2,9	1	9,1
23.	0,41	1	11,59
24.	0,9	1	11,1

25.	2,3	1	9,7
-----	-----	---	-----

Tablo 5.5. 10 ng/ μ l RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Kontrol Biyopsi	Poly(A) ⁺ mRNA [μ l]	Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer [μ l]	dH ₂ O [μ l]
1.	4	1	8
2.	5	1	7
3.	5,5	1	6,5
4.	5,8	1	6,2
5.	6,25	1	5,75
6.	7,6	1	4,4
7.	1,5	1	10,5
8.	3,8	1	8,2
9.	3,3	1	8,7
10.	0,2	1	11,8
11.	2,7	1	9,3
12.	1,9	1	10,1

Tablo 5.6. 10 ng/ μ l RNA için stoktan alınması gereken RNA miktarları

Sağlıklı Birey	Poly(A) ⁺ mRNA [μ l]	Anchored-oligo(dT) ₁₈ primer [μ l]	dH ₂ O [μ l]
1.	2,1	1	9,9
2.	1,1	1	10,9
3.	5,6	1	6,4
4.	3,4	1	8,6
5.	4,8	1	7,2
6.	5,2	1	6,8
7.	6,7	1	5,3
8.	3,5	1	8,5
9.	3,2	1	8,8

5.3. qRT-PZR Analiz Sonuçları

Her bir hedef gen için (Fas, FasL, Bax, Bcl2, Beta Globulin) tasarlanmış primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının saptanması amacıyla yapılan optimizasyon PZR'larının ardından elde edilen örnek cDNA'ları ile qRT-PZR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçla izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ifade düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak referans genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak referans genin ifade düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ifade düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır (Bustin ve diğ., 2005).

Çalışmamızda normalizasyon amacı ile, çeşitli koşullarda ifadesinin değişmediği bilinen bir referans gen olarak *beta actin* kullanılmıştır. Aynı şartlarda, aynı miktarlarda ve eş zamanlı olarak her hastaya ait referans gen kullanılmıştır. Böylelikle eşit şartlarda ifade düzeylerindeki farklılıklar tespit edilmiştir. Dolayısıyla hata olasılığı da en aza düşürülmüştür.

5.3.1. Amplifikasyon Eğrileri ve Ortalama Cp Değerleri

Gerçekleştirilmiş olan her qRT-PZR deneyinin sonunda, hedef gene özgü primerlerin örnek cDNA'sı üzerinde uygun bölgelere bağlanması ile bu transkriptin logaritmik olarak artışı gösteren amplifikasyon eğrisi grafikleri oluşmaktadır. Oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber ROX daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Bu floresan ışımaların eşik değerini geçtiği döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Hastalara ait Cp değerleri tablo 5.7 - 5.8 - 5.9 belirtildiği gibidir.

Tablo 5.7. : Nakilden Sonra Kontrol Biyopsi Alınan Hasta Doku Örneklerine ait Cp Değerleri

Hasta No	Fas	Fas L	Beta	BCL2	Beta	Bax	Beta
1.	27,48	27,78	26,97	31,24	26,07	28,12	26,15
2.	26,98	32,27	26,25	32,65	26,88	27,14	26,87

3.	28,62	33,24	26,78	30,25	26,12	26,42	26,45
4.	26,34	32,11	26,26	31,47	26,86	27,45	26,83
5.	27,12	32,54	26,82	32,04	26,43	28,89	26,31
6.	27,6	31,48	26	33,61	26,48	29,25	26,85
7.	27,09	32,95	26,21	35,12	26,36	27,72	26,84
8.	28,87	37,2	26,76	30,48	26,77	28,83	26,41
9.	27,85	32,27	26,51	34,75	26,59	27,78	26,05
10.	28,11	38,62	26,67	33,82	26,09	29,93	26,67
11.	32,58	37,26	26,53	32,26	26,25	28,94	26,24
12.	30,73	38,05	26,91	30,49	26,16	26,95	26,31

Tablo 5.8. : Ürolojik rahatsızlık nedeniyle hastaneye gelen ancak hiçbir ürolojik problemi saptanmayan sağlıklı doku örneklerine ait Cp değerleri

Hasta No	Fas	Fas L	Beta	BCL2	Beta	Bax	Beta
1.	27,57	28,95	26,05	27,4	26,24	27,66	26,52
2.	28,17	28,65	26,47	27,14	26,58	26,98	26,17
3.	26,34	27,36	26,24	28,14	26,76	26,63	26,57
4.	27,68	28,95	26,31	28,53	26,51	27,45	26,37
5.	25,36	28,37	26,45	27,61	26,82	28,23	26,96
6.	27,19	28,64	26,84	27,89	26,26	25,57	26,22
7.	26,31	28,42	26,41	29,04	26,02	26,46	26,24
8.	26,05	27,13	26,39	28,53	26,15	26,73	26,6
9.	26,09	27,14	26,57	29,17	26,71	28,78	26,96

Tablo 5.9. : Nakil Sırasında Alınan Hasta Doku Örneklerine ait Cp Değerleri

Hasta No	Fas	Fas L	Beta	BCL2	Beta	Bax	Beta
1.	38,19	47,08	26,79	20,13	26,89	31,6	26,55
2.	39,1	48,95	26,9	20,76	26,99	34,85	26,25
3.	36,78	46,07	26,44	20,82	26,65	35,03	26,14
4.	37,53	47,13	26,6	21,2	26,26	40,66	26,07
5.	39,98	42,68	26,86	20,37	26,83	39,97	26,61
6.	38,43	41,95	26,42	22,05	26,57	31,34	26,36
7.	39,54	45,22	26,95	19,62	26,67	30,77	26,82
8.	43,21	45,73	26,9	22,94	26,19	32,92	26,3
9.	37,91	42,83	26,16	22,8	26,19	30,96	26,15
10.	38,79	42,75	26,82	19,72	26,93	33,24	26,96
11.	38,15	42,34	26,61	24,15	26,31	36,62	26,54
12.	28,31	43,26	26,36	19,54	26,11	36,35	26,83
13.	33,8	49,64	28,82	19,43	26,56	38,05	26,57
14.	30,3	46,35	26,3	19,69	26,02	36,54	26,64
15.	37,92	48,52	26,15	21,6	26,97	36,92	26,51
16.	38,96	45,97	26,96	25,14	26,94	35,19	26,02
17.	37,96	44,79	26,54	18,25	26,94	39,1	26,36

18.	40,03	46,24	26,83	23,27	26,36	34,07	25,99
19.	37,31	44,82	26,57	21,47	26,76	39,5	26,31
20.	38,69	44	26,92	25,05	26,31	33,48	26,54
21.	37,31	45,78	26,37	23,85	26,14	32,85	26,93
22.	38,77	44,3	26,84	21,76	26,91	40,9	26,92
23.	42,77	49,33	26,62	22,06	26,27	38,11	26,37
24.	40,48	48,29	26,26	20,26	26,91	37,64	26,84
25.	39,62	47,64	26,38	21,65	26,51	40,04	26,62

5.3.2. Gen İfade Değişikliği Oranlarının Hesaplanması ve Sonuçları

Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır. Bu formül amplifikasyon etkinliği değeri olan E değerini 2 olarak reaksiyon etkinliğinin %100 olduğunu kabul eder. Formülün açık hali aşağıdaki gibidir:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ Hedef Gen} - \Delta Ct \text{ Referans Gen})}$$

Hedef Gen : Bcl-2, Bax, Fas, Fas Ligandı

Referans Gen: Beta Aktin

Bu formül doğrultusunda hesaplanan gen ifadesi değişim oranları, daha sonra log2 tabanına çevrilmiştir. Bunun yapılmasının sebebi, bu değişimlerinin ifade edilmiş biçimlerini kolaylaştırmaktır. Her bir hedef gen için örneklere ait gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanındaki karşılıkları Tablo 5.10-11-12’de mevcuttur.

Tablo 5.10. Nakilden sonra kontrol biyopsi alınan hasta doku örneklerinin referans gene göre ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

Hasta No	Fas	Fas L	BCL2	Bax
1	0,51	0,81	5,17	1,97
2	0,73	6,02	5,77	0,27
3	1,84	6,46	4,13	-0,03
4	0,08	5,85	4,61	0,62
5	0,3	5,72	5,61	2,58
6	1,6	5,48	7,13	2,4
7	0,88	6,74	8,76	0,88

8	2,11	10,44	3,71	2,42
9	1,34	5,76	8,16	1,73
10	1,44	11,95	7,73	3,26
11	6,05	10,73	6,01	2,7
12	3,82	11,14	4,33	0,64

Tablo 5.11. Nakil sırasında alınan hasta doku örneklerinin referans gene göre ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

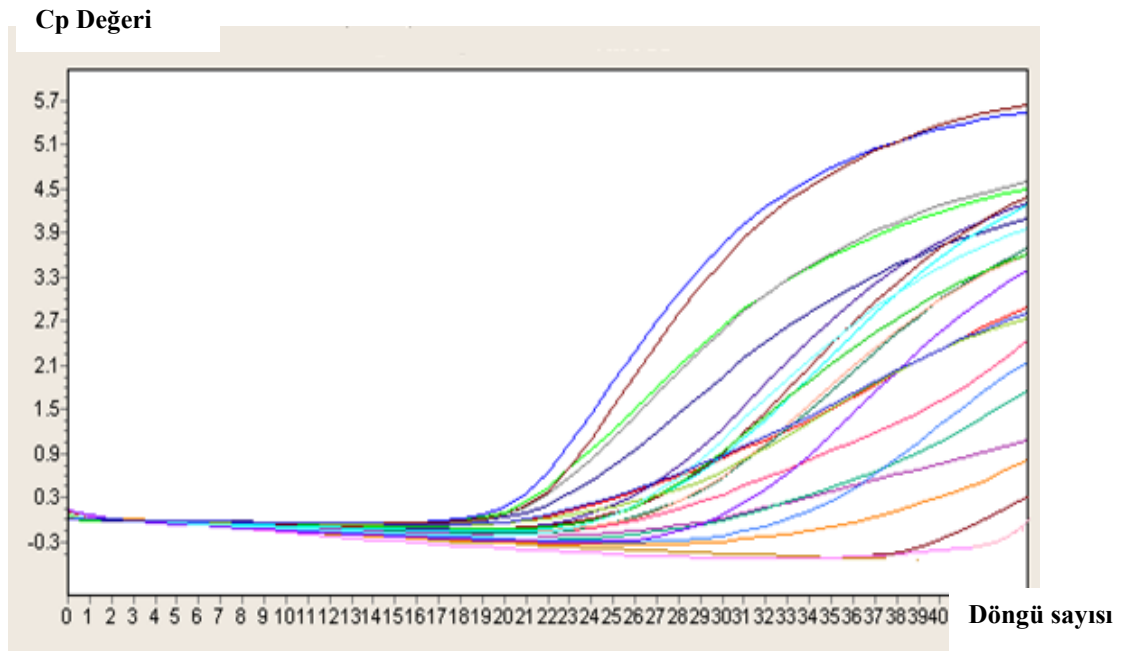
Hasta No	Fas	Fas L	BCL2	Bax
1	11,4	20,29	-6,76	5,05
2	12,2	22,05	-6,23	8,6
3	10,34	19,63	-5,83	8,89
4	10,93	20,53	-5,06	14,59
5	13,12	15,82	-6,46	13,36
6	12,01	15,53	-4,52	4,98
7	12,59	18,27	-7,05	3,95
8	16,31	18,83	-3,25	6,62
9	11,75	16,67	-3,39	4,81
10	11,97	15,93	-7,21	6,28
11	11,54	15,73	-2,16	10,08
12	1,95	16,9	-6,57	9,52
13	4,98	20,82	-7,13	11,48
14	4	20,05	-6,33	9,9
15	11,77	22,37	-5,37	10,41
16	12	19,01	-1,8	9,17
17	11,42	18,25	-8,69	12,74
18	13,2	19,41	-3,09	8,08
19	10,74	18,25	-5,29	13,19
20	11,77	17,08	-1,26	6,94
21	10,94	19,41	-2,29	5,92
22	11,93	17,46	-5,15	13,98
23	16,15	22,71	-4,21	11,74
24	14,22	22,03	-6,65	10,8
25	13,24	21,26	-4,86	13,42

Tablo 5.12 Ürolojik rahatsızlık nedeniyle hastaneye gelen ancak hiçbir ürolojik problemi saptanmayan sağlıklı doku örneklerinin referans gene göre gen ifade değişikliği oranları ve bu oranların log2 tabanındaki karşılıkları

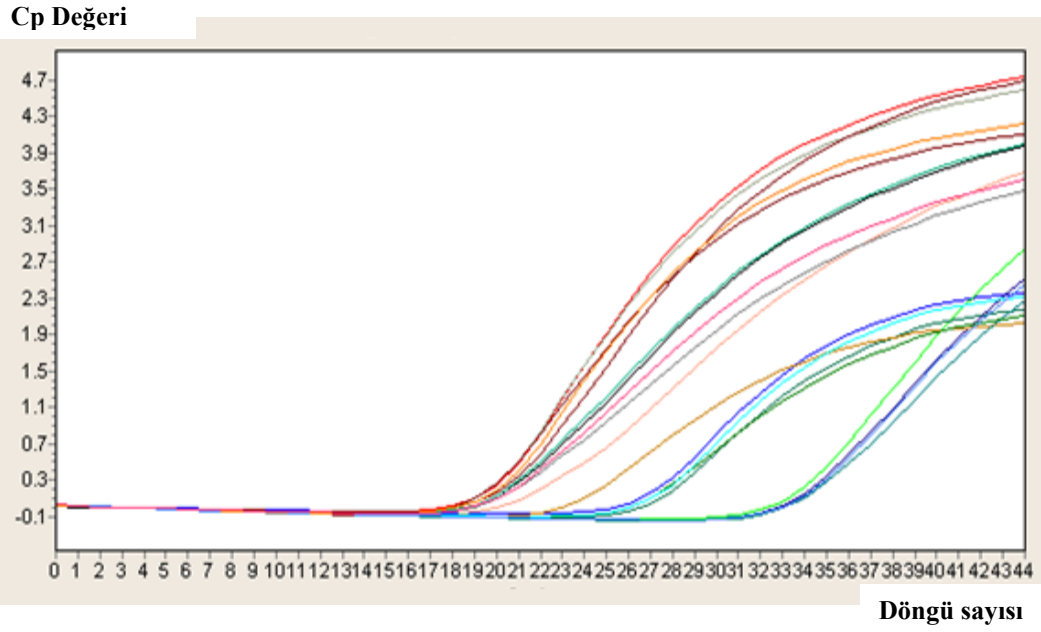
Hasta No	Fas	Fas L	BCL2	Bax
----------	-----	-------	------	-----

1	1,52	2,9	1,16	1,14
2	1,7	2,18	0,56	0,81
3	0,1	1,12	1,38	0,06
4	1,37	2,64	2,02	1,08
5	-1,09	1,92	0,79	1,27
6	0,35	1,8	1,63	-0,65
7	-0,1	2,01	3,02	0,22
8	-0,34	0,74	2,38	0,13
9	-0,48	0,57	2,46	1,82

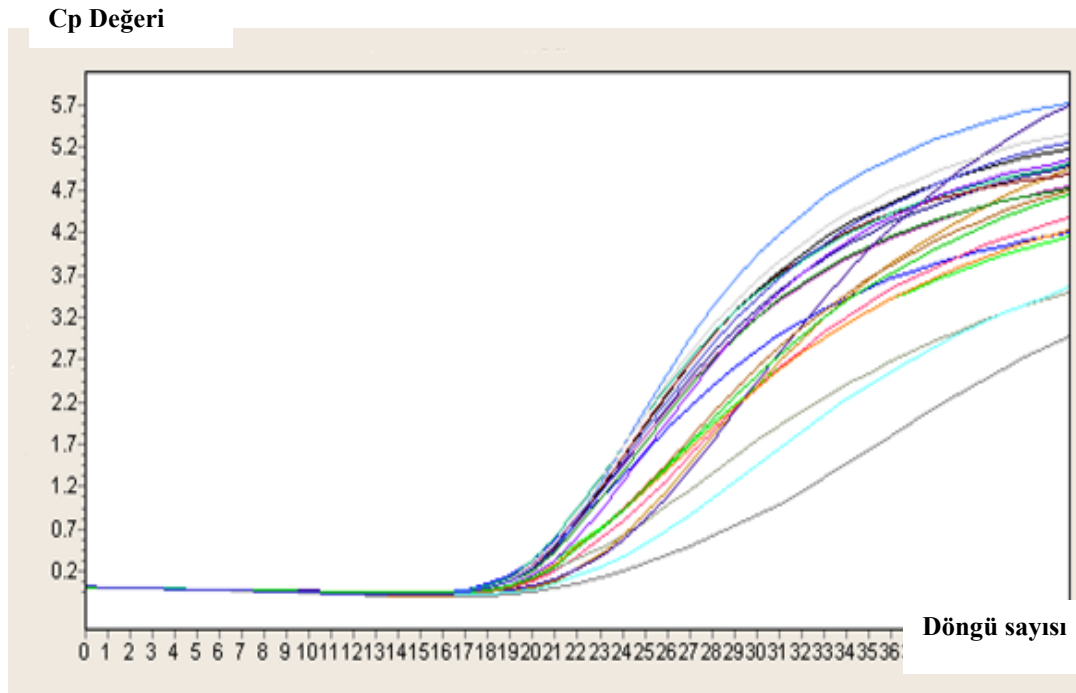
Gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanına göre karşılığı olan değerlerin negatif olması, ilgili örnekten hedef gen ifadesinin azaldığını; değerin pozitif olması ise, hedef gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir.



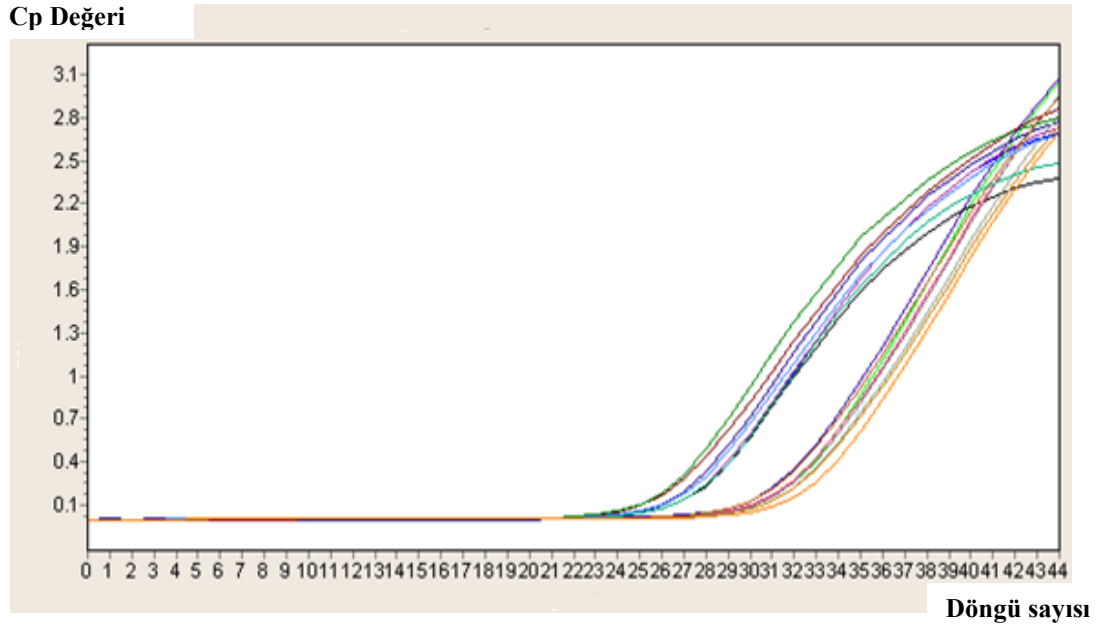
şekil 5.1. Fas amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 59°C)



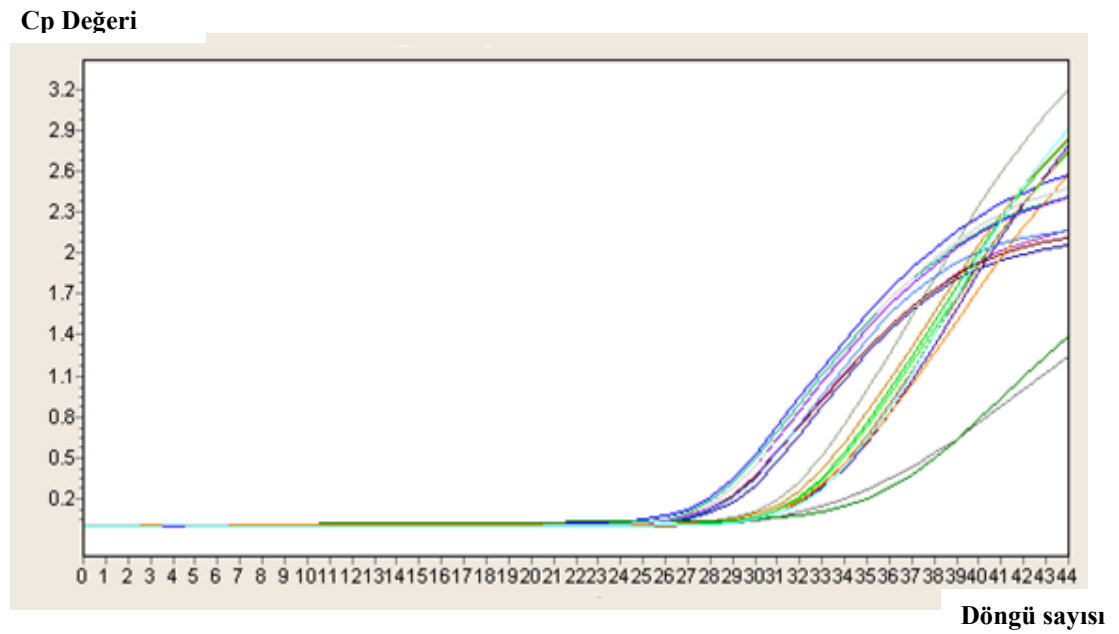
Şekil 5.2. Fas L amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 59°C)



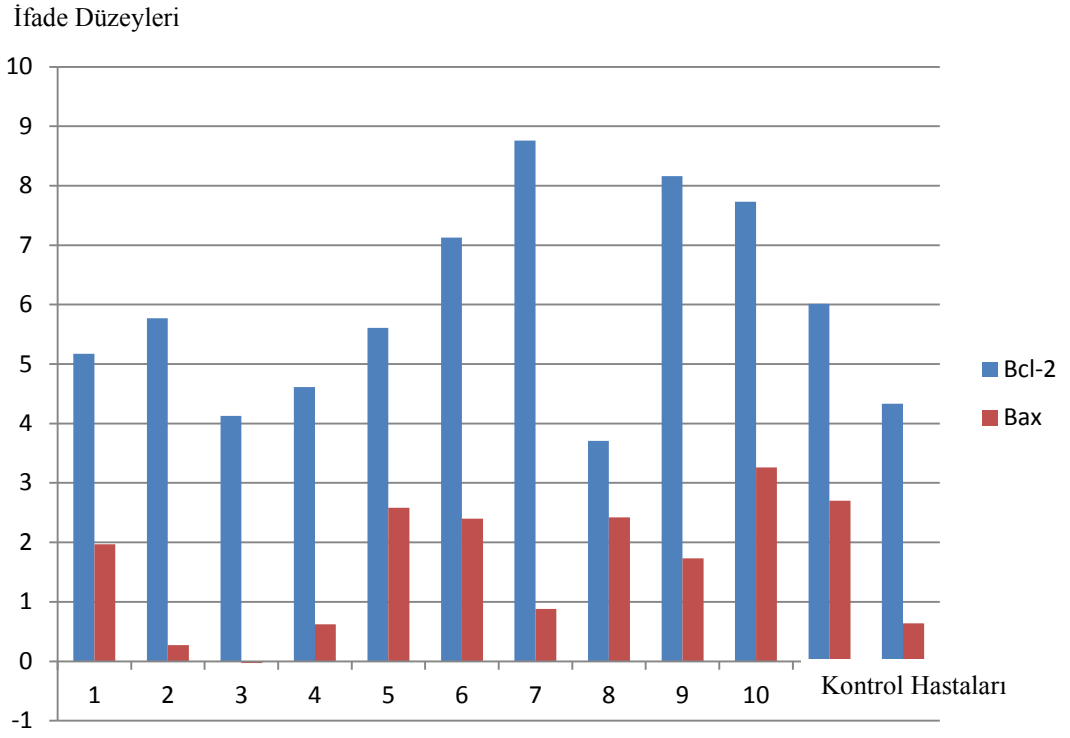
Şekil 5.3. Bcl-2 amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 59°C)



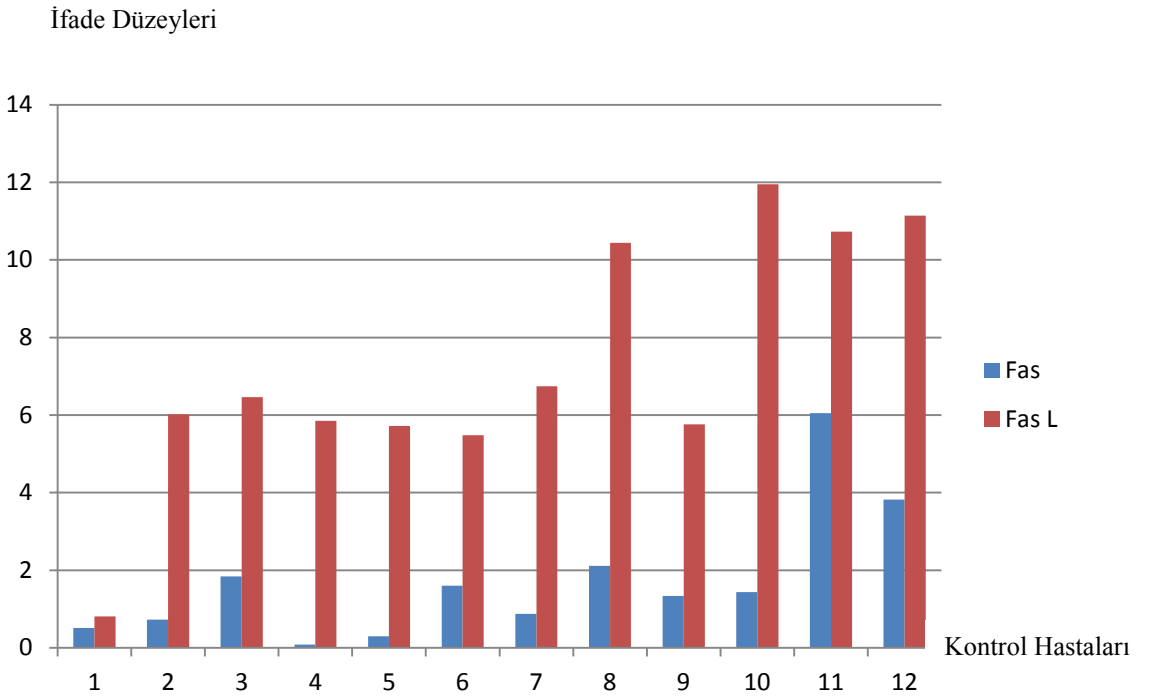
Şekil 5.4. Bax amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 50°C)



Şekil 5.5. Beta Actin amplifikasyon eğrisi grafiği (bağlanma sıcaklığı, 58 ve 59°C)

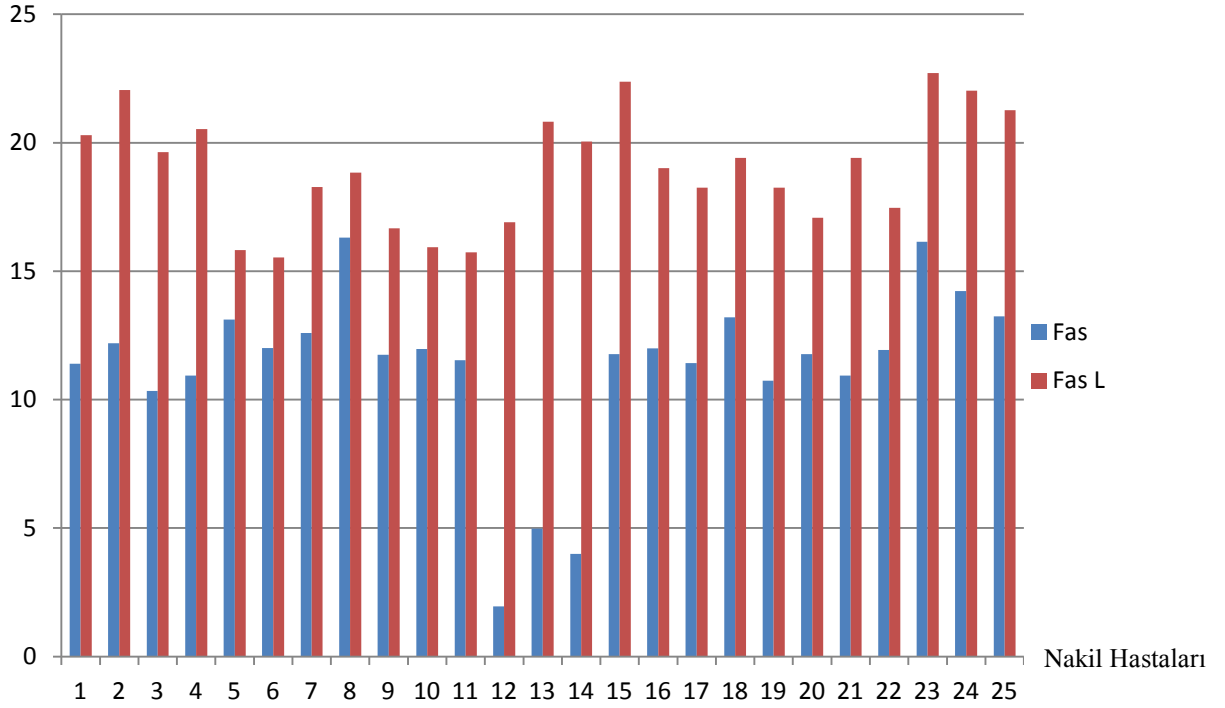


Şekil 5.6. Nakil sonrası kontrole gelen hastaların bcl-2 ve bax ifade düzeyleri



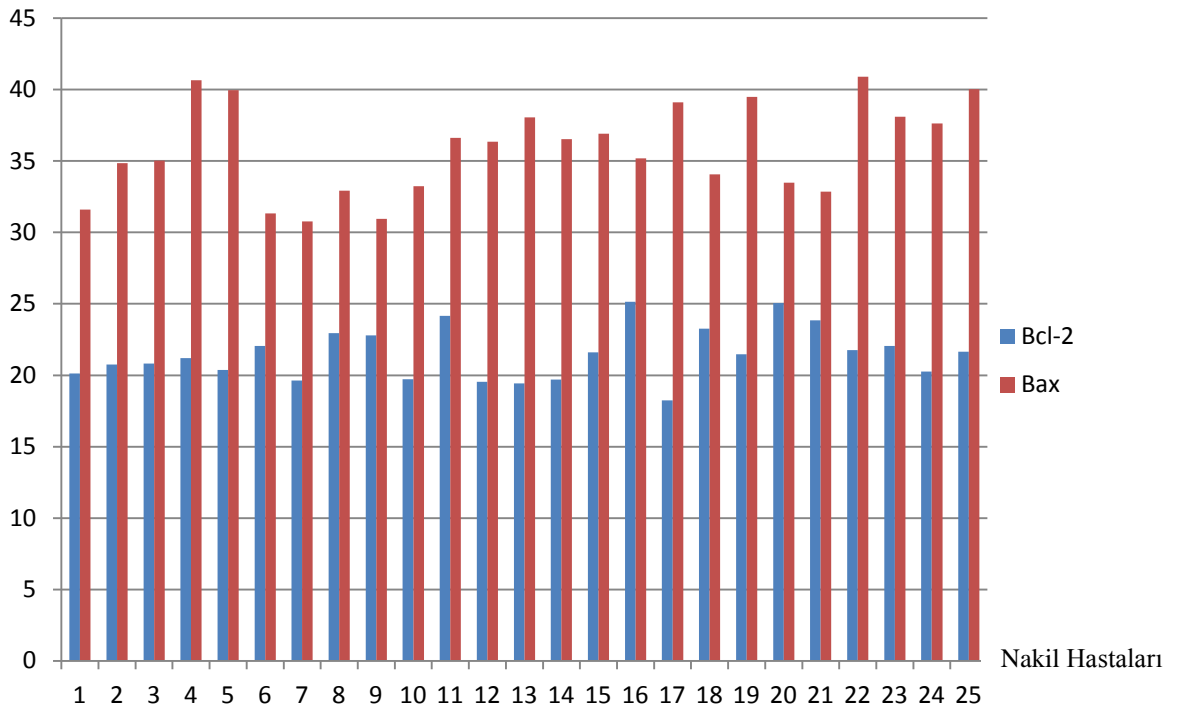
Şekil 5.7. Nakil sonrası kontrole gelen hastaların fas ve fas l ifade düzeyleri

İfade Düzeyleri



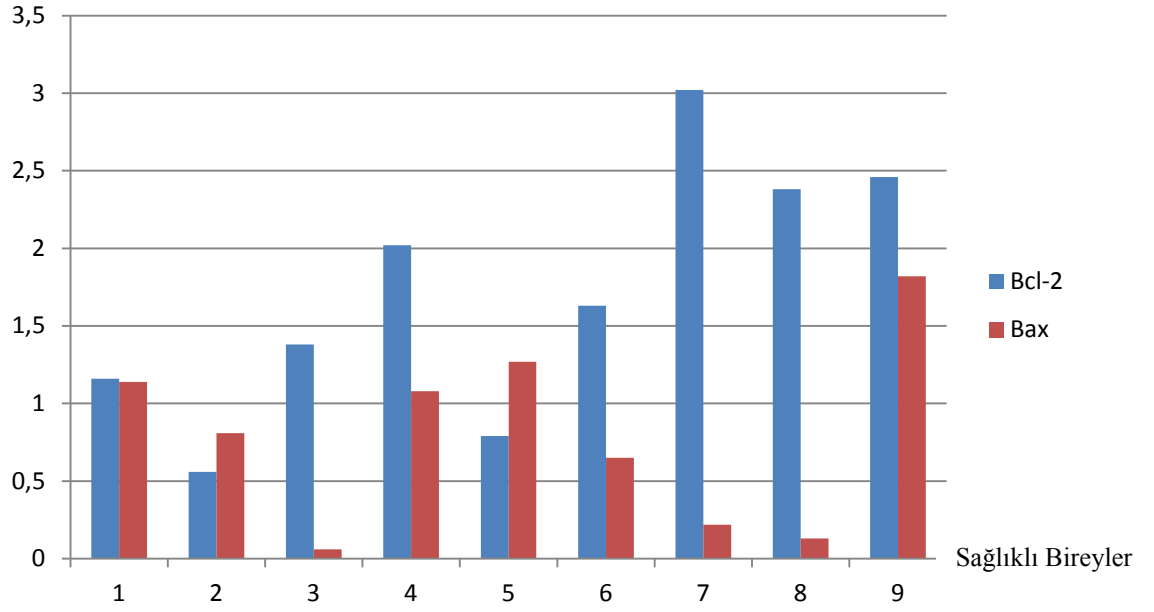
Şekil 5.8. Nakil sırasında doku alınan hasta bireylerin fas ve fas l ifade düzeyleri

İfade Düzeyleri



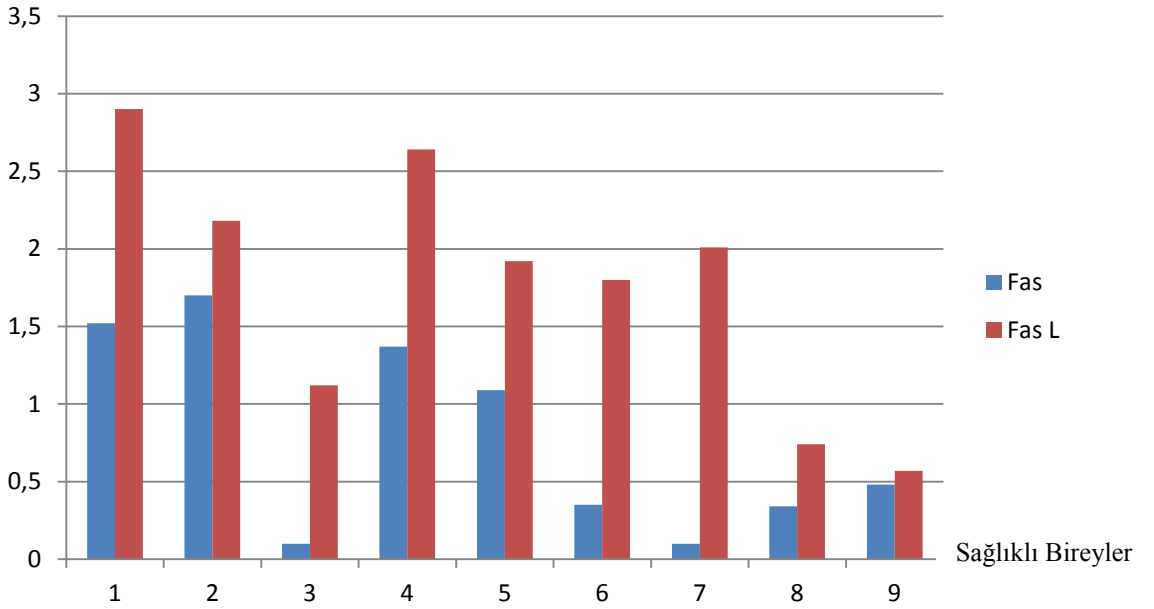
Şekil 5.9. Nakil sırasında doku alınan hasta bireylerin bcl-2 ve bax ifade düzeyleri

İfade Düzeyleri



Şekil 5.10. Sağlıklı bireylerin Bcl-2 ve Bax ifade düzeyleri

İfade Düzeyleri



Şekil 5.11. Sağlıklı bireylerin Fas ve Fas L ifade düzeyleri

5.3.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Nakil öncesi ve sonrası bireyler karşılaştırıldığında:

Cinsiyete göre (kadın-erkek) ve yaşa göre (kırk yaş altı, kırk yaş üstü) yapılan ki-kare analizlerinde Fas, Fas L, Bcl-2, Bax ifadelerinde anlamlı olarak farklılık bulunmamıştır. ($p>0.05$).

Tablo 5.13. Cinsiyete ve yaşa göre yapılan ki-kare analiz sonuçları

	Nakil Öncesi	Nakil Sonrası
Kadın	0.13	0.67
Erkek	0.69	0.85
≤ 40 Yaş	0.24	0.48
≥ 40 Yaş	0.52	0.29

($p<0.05$ ise anlamlı kabul edilmiştir.)

Tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçlarına göre en düşük ve en yüksek ifade seviyeleri:

Tablo 5.14. Tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçlarına göre en düşük ve en yüksek Cp değerleri

Gen	Cp Değeri
Fas	26,34 +/- 43,21
Fas L	27,78 +/- 49,64
Bcl-2	18,25 +/- 35,12
Bax	26,42 +/- 40,90
Beta Actin	25,97 +/- 26,92

Nakil öncesi ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, nakil öncesi hastalarda Fas, Fas L, Bcl-2, Bax ifadelerinde anlamlı olarak farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). İç kontrol geni beta aktin ifadesinin farklılık göstermediği saptandı ($p>0.05$).

Tablo 5.15. Nakil öncesi ve sağlıklı bireylerde p değerleri

Nakil öncesi	Sağlıklı Bireyler
Fas	0.027*
Fas L	0.013*
Bcl-2	0.036*
Bax	0.021*
Beta Actin	0.24

(* $p<0.05$ ise anlamlı)

Nakil Sonrası ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, nakil sonrası hastalarda Fas, Fas L, Bcl-2 ifadelerinde anlamlı olarak farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak Bax ve iç kontrol geni beta aktin ifadesinin farklılık göstermediği saptandı ($p>0.05$).

Tablo 5.16. Nakil sonrası ve sağlıklı bireylerde p değerleri

Nakil Sonrası	Sağlıklı Bireyler
Fas	0.012*
Fas L	0.034*
Bcl-2	0.028*
Bax	0.042*
Beta Actin	0.24

(*p<0.05 ise anlamlı)

6. TARTIŞMA

Bu çalışma, *idrara çıkışı olmayan hastaların mesanelerindeki apoptotik etkilerin* incelendiği tek araştırmadır.

Çalışmamızda idrardan yoksun mesanedeki apoptotik süreci inceledik. İdrar çıkışı olmayan, bu nedenle uzun süre hemodiyalize girmiş hastaların nakil sırasında mesanelerinden parça alınmış olup, genetik saati sıfırlanmış, aktif olmayan mesanedeki apoptotik değişimler gözlemlenmiştir. Mesanede kullanılmamasına bağlı olarak hücrenin atrofiye gitmesini ve bunun da apoptoz ile olabileceği hipotezini test ettik ve sonuçlarımız hipotezimizle paralel çıktı. Nakil sırasında alınan hasta bireylerin aktif olmayan mesane dokularında apoptotik belirteçlerde referans gene göre artış saptandı (Tablo 5.9.). Nakil sonrası hastaların mesanelerine idrar girişi oldu ve mesane aktif hale geldi. Dolayısıyla apoptotik belirteçlerde referans

gene göre artış gözlemlendi, ancak nakil sırasındaki hastalara oranla daha az bir artış görüldü (Tablo 5.7.). Apoptotik süreç azalarak, hücre normale dönmeye başladı. Sağlıklı bireylerde ise apoptotik belirteçlerin referans gene göre çok az ifade edildikleri saptandı (Tablo 5.8.).

Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması sonucu Bcl-2 homodimerleri şekillenir. Böylece apoptoz inhibe edilir. Oysa aşırı Bax apoptozu aktive eder (Miyoshito ve diğ., 1994). Bizim verilerimizde literatür bilgilerine paralel olarak sonuçlandı.

Nakil sırasındaki hasta dokularında bcl-2 ifadesi referans gene göre azalmış olarak tespit edildi (Şekil 5.9.). Hesaplamalar sonucu ifade düzeyleri negatif değerlerde saptandı. Bax ifadesinde referans gene göre belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 5.9.). Hesaplamalar sonucu ifade düzeyleri pozitif değerlerde saptandı (Tablo 5.11.). Yani nakil sırasında alınan dokularda bax ifadesi aşırı artış gösterirken bcl-2 ifadesinde belirgin bir düşüş saptandı. Bu da gösteriyor ki nakil sırasında alınan dokularda hücreler apoptotik süreçte bulunmaktadır.

Halbuki nakil sonrası kontrol amaçlı alınan hasta dokularında bcl-2 ifade seviyesi referans gene göre artmış olarak tespit edildi (Şekil 5.6.). Hesaplamalar sonucu ifade düzeyleri pozitif değerlerde saptandı. Bax ifade düzeylerinde ise referans gene göre çok az artış saptandı (Şekil 5.6.). Hesaplamalar sonucu ifade düzeyleri pozitif değerlerde saptandı (Tablo 5.10.). Yani nakil sonrası mesaneye idrar girişinin olması apoptotik sürecin azalmasına yol açmıştır. Ancak süreç hala devam etmektedir. Ayrıca nakil öncesi hastalarla kıyaslandığında bax ifadesinde belirgin bir düşüş, bcl-2 ifadesinde ise belirgin bir artış gözlemlendi. Aktif olmayan mesane apoptoza gitmiştir. Nakil sonrası idrarla yüzleşmiş ve aktif olan mesanede ise bax seviyesinde referans gene göre azalma görülürken, bcl-2 seviyesinde referans gene göre artış gözlemlenmiştir.

Nakil sırasındaki hasta dokularında Fas ve Fas L ifade seviyelerinde referans gene göre artış gözlemlenmiştir (Şekil 5.8.) (Tablo 5.11.). Nakil sonrası kontrol amaçlı gelen dokularda ise Fas ve Fas L ifade seviyelerinde referans gene göre yine artış vardır (Şekil 5.7.) (Tablo 5.10.). Ancak nakil sırasındaki hasta dokularıyla karşılaştırıldığında önemli bir azalma tespit edilmiştir. Yani idrar bulunmayan ve

aktif olmayan mesanede apoptoz gerçekleşmiş ve ifade seviyeleri artmıştır. Ancak mesanenin idrarla yüzleşmesi sonucu bu seviyelerde azalma tespit edilmiş.

Ayrıca Fas ve Fas L ifade seviyelerini karşılaştırdığımızda tüm hasta gruplarında Fas L ifade seviyelerinin (27,78 +/- 49,64 Cp) Fas ifadesinden (26,34 +/- 43,21 Cp) daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bcl-2 ve Bax ifade seviyelerini karşılaştırdığımızda tüm hasta gruplarında Bax ifade seviyelerinin (26,42 +/- 40,90 Cp), Bcl-2 ifadesinden (18,25 +/- 35,12 Cp) daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bu da gösteriyor ki, idrardan yoksun mesanede apoptotik süreç başlamış ve proapoptotik belirteçlerde belirgin artış saptanmıştır.

Çalışmada apoptozun iki yolağı birden incelenmiştir. Verilerimize göre apoptozun ağırlıklı olarak ölüm reseptörü yolağı üzerinden olduğu saptandı.

Uzun süre hemodiyalize girdiğı ve idrar giriş ve çıkışının olmadığı bilinen hasta dokularında apoptotik belirteçlerin ifade düzeyleri en yüksek saptandı (Tablo 5.11.). Normalde bu hastalarda mesane aktif olmadığı için ve uzun süreli kullanılmadığı için kanserleşmenin sık görülmesi lazım. Ancak literatür tarandığında görüldü ki nakil hastalarında mesane kanseri riski çok azdır. Belki de hücre bu fonksiyonel olmayan süreçte apoptoza giderek kendini korumaya alıyor. Dolayısıyla kanserleşmenin önüne geçilmiş oluyor. Bunun daha iyi anlaşılabilmesi için p53 ifade düzeylerine de bakılabilir. Böylece nakil hastalarının uzun dönem hemodiyalize girmesine rağmen kanserleşmenin az görülmesinin sebebi daha net bir şekilde açıklanmış olabilir.

7. KAYNAKLAR

Akins P T, Liu P K, Hsu C Y. *Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?*. Stroke 27: 1682- 1687, 1996.

Akoğlu E, Süleymanlar G. *Kronik Böbrek Yetersizliği, Temel İç Hastalıkları*,1996: 769- 776, Güneş Kitapevi

Altunkaynak BZ. ve Özbek E. *Programmed Cell Death: What is the Apoptosis?* Tıp Araştırmaları Dergisi. 2008;6(2): 93 -104.

Ameisen J S. *The origin of programmed cell death*. Science 272: 1278, 1996.

Ashkenazi A, Dixit VM. *Death receptors: Signaling and Modulation*. Science 2001; 281:1305-8 1998.

Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. *Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats*. Toxicol Appl Pharmacol 139: 122-127, 1996.

Banasiak K J and Haddad G G. *Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death*. Brain Res 797: 295-304, 1998.

Bao F and Liu D. *Peroxyntirite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3*. Neuroscience 116: 59-70, 2003.

Başaklar A.C, Skandalakis *Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri II*, Bölüm: 24, Palme Yayıncılık, Ankara, 2008:1345-1377

Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. *Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis*. Cancer Biology 6: 3-16, 1995.

Bortner C D, Odernburg N B E, Crdowski J A. *The role of fragmentation in apoptosis*. Trends in Cell Biology 5: 21-28, 1995.

Brinley F J J, Tiffert T, Scarpa A. *Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ*. J Gen Physiol 72: 101-127, 1978.

Burlacu A. *Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins*. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2003;7(3): 249-257.

Bustin, S.A., Benes,V. , Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. *Quantitative real-time RT-PZR – a perspective*. Journal of Molecular Endocrinology 34, 597–601.

Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG. and Cohen, GM. *Physiological Concentrations of K⁺ Inhibit Cytochrome c-dependent Formation of the Apoptosome*. The Journal of Biological. Chemistry. 2001;276(45): 41985-41990.

Candé C, Cecconi F, Desen P. and Kroemer G. *Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?*, Journal of Cell Science, 2002;115(24): 4727-4734.

Caotes P J, Hales S A, Hall P A. *The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha*. J Pathol 178: 71-7, 1996.

Chang HY. and Yang X. *Proteases for Cell Suicide: functions and Regulation of Caspases*. Microbiology and molecular biology reviews, 1092-2172/00/\$04.0010 Dec. 2000, p. 821–846

Cohen J J. *Apoptosis*. Immunol Today 14: 126-130, 1993b.

Cohen J J. *Apoptosis: The physiological pathway of cell death*. Hosp Pract 15: 35-43, 1993a.

Collins J A, Cynthia C A, Young K K, Vesely J M. *Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis*. J Histochem Cytochem 45: 923-934, 1997.

Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. *Apoptosis*. Am J Surg Pathol 21: 88-101, 1997.

- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Arsdale TV, Zhou, Q and Srinivasula SM. *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. The EMBO Journal. 1998;17(8): 2215–2223.
- Downward J. *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004; 15(2): 177-182
- Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. *Signal transduction pathways that regulate cell survival and death*. Oncogene. 1998; 17: 3207-3213.
- Earnshaw W C. Nuclear changes in apoptosis. Curr Opin Cell Biol 7: 337-43, 1995
- Brinley F J J, Tiffert T, Scarpa A. *Mitochondria and other calcium buffers of squid axon studied in situ*. J Gen Physiol 72: 101-127, 1978.
- Earnshaw WC, Martins LM. and Kaufmann SH. *Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis*. Annual Review of Biochemistry. 1999;68: 383-424.
- Eastman A. *Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis*. Cancer Biology 6: 45- 52, 1995.
- Erek E. Nefroloji. *Böbrek Yetmezliği*, 1995:258-294
- Evan G L, Wyllie A H, Gilbert G S, Littlewood T D, Lond H, Breaks M. *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. Cell 69: 119-128, 1992.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C. and Kroemer G. *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. Cell Death and Differentiation, 2006;13: 1423-1433.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol 119: 493-501, 1992.
- Gewies A. *Introduction to Apoptosis*. ApoReview. 2003;1-26.
- Gilchrist, D.G. *Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide*. Annual Review of Phytopathology 1998; 36:393-414.
- Gross A, McDonnell JM. and Korsmeyer SJ. *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes&Development. 1999;13, 1899-1911.
- Hetts S W. To die or not to die: *An overview of apoptosis and its role in disease*. JAMA 278: 300-307, 1998.
- Hu, X. *Proteolytic signaling by TNF α : caspase activation and IB degradation*. Cytokine, 2003; 21(6): 286-294.
- Israels LG, Israels ED. *Apoptosis*. The Oncologist 1999; 4:332-9.

Jesenberger V. and Jentsch S. *Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2002;3, 112-121.

Jun Li, Haifeng Wang, Zhen Ma, Wenxing Fan, Yanfeng Li, Bingbing Han, Zhijia Zhang and Jiansong Wang, *TAT-Apoptin induces apoptosis in the human bladder cancer EJ cell line and regulates Bax, Bcl-2, caspase-3 and survivin expression*. Experimental and Therapeutic Medicine 3: 1033-1038, 2012

K Yamana, V Bilim, N Hara, T Kasahara, T Itoi, R Maruyama, T Nishiyama, K Takahashi and Y Tomita, *Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression*. British Journal of Cancer (2005) 93, 544 – 551

Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. *Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury*. J Neuropathol Exp Neurol 60: 422-429, 2001.

Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. *Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 26: 239-245, 1972.

Khandelwal P., Soman N. Abraham and Gerard Apodaca, *Cell biology and physiology of the uroepithelium*, Am J Physiol Renal Physiol 297:F1477-F1501, 2009

Kiess W, Gallaher B. *Hormonal control of programmed cell death apoptosis*. Eur J Endocrin 18: 482-491, 1998.

In: Kumar Levison D A, Hopwood D: *Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium*. J Pathol 119: 159-166, 1976.

Li LY, Luo X and Wang X. *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature. 2001; 412: 95-99.

Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. *Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis*. Spine 25: 1859-1866, 2000.

Maas S, Warskulat U, Steinhoff C ve ark. *Decreased Fas expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status*. Urology, 2004; 63:392-397

Majno G, Torisl A. *Apoptosis oncosis and necrosis*. Am J Pathol 146: 3-15, 1995.

Matsuzawa A. and Ichijo H.. *Molecular Mechanisms of the Decision between Life and Death: Regulation of Apoptosis by Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*. The Journal of Biochemistry. 2001;130(1): 1-8.

Miyoshito T, Krajewski S, Krajewski M, et al. *Tumor suppressor P53 is regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo*. Oncogene 1994; 9: 1799-1805.

Moffitt KL, Martin SL. and Walker B. *The emerging role of serine proteases in apoptosis*. Biochemical Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88: 355-365.

Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, et al. *Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis*. J Cell Biol 150: 731-740, 2000.

Nakano R. *Apoptosis: Gene directed cell death*. Horm Res 48: 2-4, 1997.

Nakopoulou L, Vourelakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA: *The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates*. Hum Pathol 1998; 29(2): 146-54.

Newton K, Strasser A: *The Bcl-2 family and cell death regulation*. Curr Opin Genet Dev 8: 68-75, 1998.

Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. E. 2006. *Quantification of mRNA using real-time RT PCR*. Nature Protocols, 1(3):1559-1582.

Öztürk F. *Apoptosis*. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2002;9(2):143-148.

Peter ME, Heufelder AE. and Hengartner MO. *Advances in apoptosis research*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(24):12736-12737.

Pfaffl, M.W. 2001. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PZR*. Nucleic Acids Research 29 - E45

Rao R V, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation*. J Biol Chem 276: 869-874, 2001.

Sana MG, Correia JS, Ducrey O, Lee J, Nomoto K and Schrantz N et al. *IAP Suppression of Apoptosis Involves Distinct Mechanisms: the TAK1/JNK1 Signaling Cascade and Caspase Inhibition*. Molecular Cellular Biology. 2002; 22(6): 1754-1766.

Sato T, Hanada M, Bodrug S, Irie S, Iwama N, Boise LH. *Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(20): 9238-9242.

Schwartzman R A, Cidloski J A. *Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death*. Endocrine Reviews 14: 133-144, 1993.

Sharpe JC, Arnoult D. and Youle RJ. *Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2004;1644(2-3): 107-113.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA and Newmeyer DD, et al. *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of*

caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. Journal of Cell Biology. 1999;144(2): 281-291.

Sprick MR. and Walczak H. *The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2004;1644(2-3): 125-132.

Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA. and Kennedy SE. *Calcineurin-Mediated BAD Dephosphorylation Activates the Caspase-3 Apoptotic Cascade in Traumatic Spinal Cord Injury.* The Journal of Neuroscience. 2000;20(19):7246–7251.

Sternberg Stephen S, Mills Stacey E, Carter Darryl, Greenson Joel K, Reuter Victor E, Stoler Mark H. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology* Volum II, 4 nd Ed, Chapter: 14, Philadelphia 2004: 2035-2066

Takahara H, Sakatoku J, Cockett A T K. *The pathophysiology of varicocele in male infertility.* Fertil Steril. 55: 861-868, 1991.

Touchette N, Fogle S. *Apoptosis: it chimes with mitosis.* JNH Res 3:75, 1991.

Tsujimoto Y. and Shimizu S. *Bcl-2 family: Life-or-death switch.* FEBS Letters. 2000;466(1): 6-10.

V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran *Pathologic Basis of Disease.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p.3-46.

Vaux DL. and Silke J. *Mammalian mitochondrial IAP binding proteins.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003;304(9): 499-504.

Wagner A J, Small M B, Itoy N. *Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2.* Mol Cell Biol 13: 2432-2440, 1993.

Walsh, P.C., Retik, A.B., Vaughan, Jr., E.D., and Wein, A.J., PC. *Anatomic radical retropubic prostatectomy.* In Campbell's Textbook of Urology, Eighth Edition, (eds), W.B. Saunders, Philadelphia, 2002, pp. 3107-3129.

Wang X. *The expanding role of mitochondria in apoptosis.* Genes&Development. 2001;15, 2922–2933.

Wingrave J M, Schaecher K E, Sribnick E A. *Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats.* Journal of Neuroscience Res.73: 95-104, 2003

Wong. M. L. and Medrano J. F. 2005. *Review: Real Time PZR for mRNA quantitation.* Biotechniques 39(1),75-85.

Wyllie A H. *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.* Nature 284: 555- 556, 1980.

Wyllie A H. *The genetic regulation of apoptosis*. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 97-104, 1995

Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML. and Chunying Du1 C. *Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis*. Genes & Development. 2003;17:1487–1496.

8- ÖZGEÇMİŞ

Hilal FINDIK, 05.12.1985 tarihinde Isparta’ da doğdu. 2004 yılında İstanbul Üsküdar Anadolu Lisesi’ nden mezun olduktan sonra yine aynı yıl Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü’ nde başladığı yüksek öğrenimini 2008 yılında tamamladı.

Yüksek lisans eğitimine 2011 yılında Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne girerek devam etti.

