BAŞAR OKU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2006

BAŞAR OKU İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST. YÜKSEK LİSANS TEZİ İSTANBUL-2006

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Difteri Toksini etkisinde K562 ve HL-60 hücrelerinde programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecinde rol alan bazı proteinlerin mRNA düzeyinde gen ekspresyon oranlarının belirlenmesi ve karşılaştırılması

BAŞAR OKU

DANIŞMAN
PROF. DR. SİNA GÖKÇE

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans / Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı :
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora ( )
Anabilim Dalı :
Tez Sahibi :
Tez Başlığı :
Sınav Yeri :
Sınav Tarihi :

Tez Sınav Jürisi

1."Ünvanı Adı Soyadı" , Xxxxx Üniv., Xxxxx Fak./Yük.Ok./Enst., Xxxxx ABD. "Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek"

2."Ünvanı Adı Soyadı" , Xxxxx Üniv., Xxxxx Fak./Yük.Ok./Enst., Xxxxx ABD. "Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek"

3."Ünvanı Adı Soyadı" , Xxxxx Üniv., Xxxxx Fak./Yük.Ok./Enst., Xxxxx ABD. "Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek"

4."Ünvanı Adı Soyadı" , Xxxxx Üniv., Xxxxx Fak./Yük.Ok./Enst., Xxxxx ABD. "Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek"

5."Ünvanı Adı Soyadı" , Xxxxx Üniv., Xxxxx Fak./Yük.Ok./Enst., Xxxxx ABD. "Tez Danışmanı/Tez İzleme Komitesi Üyesi olanlar isimden sonra parantez içinde belirtilecek"

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Başar Oku

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, tezimle ilgili her aşamada engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili hocam *Dr. Duran Üstek*'e ;

Sevgili danışman hocam *Prof. Dr. Sina Gökçe*'ye;

Hücre kültürü laboratuvarında bana tüm imkanlarını sunan *Prof. Dr. Ayhan Bilir*'e ve tezimin hücre kültürü çalışmalarında büyük emeği geçen *Füsun Öncü*'ye;

Tez konumun belirlenmesinde ve devamında fikirlerini benimle paylaşan *Dr. Muhammet Bektaş*'a;

Tezimin teknik ve deneysel kısımlarında yardımlarını esirgemeyen *Dr. Cumhur G. Ekmekçi*' ye ve *Aris Çakiris*'e teşekkür ederim

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştirma Projeleri Birimi tarafından T-823/27122005 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR LİSTESİ

ŞEKİLLER LİSTESİ

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aa: Amino asit

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

ANT: Adenin nükleotid translokatör

Apaf-1: Apoptoz proteaz aktifleştiren faktör 1

ATP: Adenozin trifosfat

bç: Baz çifti

CAD: Kaspaz aktiflenmiş DNaz

cDNA: Komplementer (tümleyici) DNA

Da: Dalton

dATP: Deoksiadenin trifosfat

dCTP: Deoksisistidin trifosfat

dGTP: Deoksiguanin trifosfat

DT: Difteri toksini

dH_2O: Damıtık su

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat

dUTP: Deoksiurasil trifosfat

eEF2: Elongasyon faktörü 2

gr: Gram

H_2O_2: Hidrojen peroksit

IAP: apoptoz inhibitörleri

ICE: Interleukin-1b-Converting Enzimi

kb: Kilobaz

kDa: Kilodalton

mg: Miligram

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

mRNA: Haberci RNA

MW: Moleküler ağırlık

ng: nanogram

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

Q-PCR: Kantitatif PCR

RNA: Ribonükleik asit

RNaz: Ribonükleaz

rRNA: Ribozomal RNA

rpm: Dakikada devir sayısı

smac/DIABLO: second mitokondri-derive kaspaz aktivatörü/ düşük pI değerli direkt IAP bağlayan protein

ssDNA: Tek iplikli DNA

TGF-B: Transform edici Büyüme Faktörü

TNF: Tümör nekroz faktör

TNF-α: Tümör nekroz faktör-alfa

TRAIL: TNF ilişkili Apoptoz-Indükleyici Ligand

VDAC: voltaj bağımlı anyon kanalı

XIAP: X-linkli apoptoz inhibitörü

ÖZET

Oku B.

Difteri Toksini etkisinde K562 ve HL-60 hücrelerinde programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecinde rol alan bazı proteinlerin mRNA düzeyinde gen ekspresyon oranlarının belirlenmesi ve karşılaştırılması

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. (2006).

DT, NAD varlığında eEF2'yi ADP-ribozilleyerek inaktifleştirir, böylece protein sentezinin durmasına yol açar. K562 gibi bazı hücre soylarında, DT protein sentezini etkin biçimde durdurmasına karşın, sitotoksik bir etki göstermemektedir. DT protein sentezinin inhibisyonunun yanı sıra hücre iskeletinin yıkımına ve nükleozomlararası DNA kırılmasına yol açar Bu çalışmada, protein sentezinin inhibisyonu ile toksine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki mRNA düzeyinde açıklanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla DT varlığında ve yokluğunda DT'ne duyarlı HL-60 ve DT'ne dirençli K562 hücrelerinden DT verildikten sonra 0., 1., 3., 6. ve 12. saatlerde örnekler alınıp RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra cDNA elde edildi ve apoptozla ilişkili Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve Sitokrom C genlerinin ekspresyonları gerçek zamanlı Q-PCR yöntemi kullanılarak incelendi. Bu çalışmada, K562 hücrelerinde DT varlığında Sitokrom C geninin ekspresyonunun azaldığı, HL-60 hücrelerinde ise çok daha fazla azaldığı gözlenmiştir. K562 hücrelerinde DT varlığında Bcl-2 geninin ekspresyonunun arttığı, HL-60 hücrelerinde ise DT varlığında Bcl-2 geninin ekspresyonunun yok denecek kadar azaldığı gözlenmiştir. DT varlığında 0. ve 3. saatler arasında Kaspaz 3'ün ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ancak bu çalışma protein düzeyinde başka yöntemlerle de doğrulanmalıdır. Her iki hücre tipinde de Kaspaz 9 geninin ekspresyonunda Kaspaz 3'e göre gen ekspresyonu çok daha azdır. HL-60 hücrelerinde DT varlığında Kaspaz-9 geninin ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. K562 hücrelerinde ise Kaspaz-9 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca yapılan canlılık tayini sayımlarında hem K562 hem HL-60 hücrelerinde DT uygulanmış hücrelerde ölüm yüzdesi kontrol hücrelere göre daha yüksek çıkmıştır. Bu çalışmanın verilerinin, mRNA düzeyinde ekspresyonuna baktığımız genlerin protein düzeyinde de aynı zaman diliminde ve aynı miktarda DT varlığında farklı yöntemlerle karşılaştırılması uygun olacaktır. Çalışmamızın sonuçlarının bundan sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Difteri Toksini, Apoptoz, Kaspazlar, Kantitatif PCR, Bcl-2

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-823/27122005 no'lu proje olarak desteklemiştir.

ABSTRACT

Oku, B. Determination and comparison of mRNA level gene expression rates of several proteins which play role in programmed cell death (apoptosis) in DT exposed K562 and HL-60 cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Biophysics Department. İstanbul. 2006.

DT catalyzes transfer of ADP-ribose moiety of NAD into a covalent linkage with eEF2. ADP-ribosylation results in inactivation of eEF2 and respectively inhibition of protein synthesis. The inhibition of protein synthesis due to ADP-ribosylation of eEF2 has been regarded as the primary, if not sole event in DT-induced cytotoxicity. DT induces programmed cell death aside from its inhibitory effects on protein synthesis. Cells exposed to such toxins reveal internucleosomal DNA cleavage and also increase in caspase-3-like activity, which are characteristics of apoptosis. Indeed, DT inhibits protein synthesis, without exerting any cytotoxic effect in cell lines like K562. The findings suggest that protein synthesis inhibition itself is necessary, but may not be sufficent to induce apoptosis, and additional mechanisms likely come into play to unfold the cytotoxic effect. The clarification of these mechanism(s) is necessary in order to gain further insight into the sequence of DT-promoted events leading to cell death. We isolated total RNA and prepared cDNA from our cell cultures. We analysed the expression of the Casp-3, Casp-9, Bcl-2 and Cytochrome C genes using real-time quantitative PCR (QPCR) method. We observed that in both K562 and HL-60 cell lines the gene expression of Cytochrome C protein decreased when DT was added. Also we observed that in K562 cell lines the expression of Bcl-2 protein increased while in HL-60 cell lines the expression of Bcl-2 decreased when DT was added. We could not observe any significant difference in the expression of Casp-9 in K562 cell lines but in HL-60 cell lines the expression of Casp-9 gene decreased when DT was used. We also observed that the death percent in both cell lines were higher when DT was added. Also we observed that in both of the cell lines the expression of Casp-3 protein increased in the first 3 hours. This study provided new insights about the expression of Casp-3, Casp-9, Bcl-2 and Cytchrome C genes but should be examined by protein protocols as well.

Key Words: Diphtheria Toxin (DT), Apoptosis, Caspases, Q-PCR, Bcl-2

This study was supported by The Research Support Unit of Istanbul University as the project no T-823/27122005.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) morfolojik, biyolojik ve genetik değişimlerle karakterize bir hücre ölüm şeklidir. Çok hücreli organizmalarda yaşam süresini doldurmuş ya da genetik hasar görmüş hücrelerin ölümünü sağlayarak türün ve gelecek nesillerin yaşamının devamında çok önemli roller üstlenir (1,2). Hücre ölümü embriyonal gelişim sürecinde, dokuların yeniden yapılanmasında gereksinim duyulmayan hücrelerin tasfiyesi aşamasında görev alan fizyolojik bir olaydır.

Apoptoz; büzülme, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve hücrenin fagositozla ortadan kaldırılması aşamalarını içermektedir (4). Apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin pek çoğu mitokondri ile ilişkilidir (6). Ölümcül sinyal sonucunda denge apoptoz yönünde değişirse mitokondri zar geçirgenliği artmakta ve sitokrom C gibi proteinler sitoplazmaya geçmekte ve apoptozomları oluşturmaktadır (29). Yüksek molekül ağırlıklı bu yapılar kaspaz aktifleşme sürecini başlatmaktadır.

Mitokondri membranında apoptotik proteinlerin açığa çıkması Bcl-2 ailesine mensup anti-apoptotik ve apoptotik temsilcileri arasındaki dengeye bağlıdır (30-35). TNF, FAS ligandı, hücrelerdeki reseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşen yolağın yanı sıra kimyasal, ışınlama, hipoksi ve DNA hasarı gibi koşullarda aktifleşen yolaklar mitokondrilerde buluşmaktadır. Bu farklı yolakların aşamaları ve ayrıntıları henüz ortaya konamamıştır.

Difteri toksini (DT), NAD'yi ADP-riboz ve nikotinamide ayrıştırdıktan sonra ADP-ribozu elongasyon faktörü 2 (eEF2) üzerine transfer ederek protein sentezinin inhibisyonuna sebep olmaktadır (52). Difteri toksininin, amino ucundaki 21 kD'luk A fragmanı (FA) 149. glutamik asit üzerinden ADP-ribozun aktarımını gerçekleştirmektedir. Difteri toksininin B fragmanı (FB) (39 kDa) holotoksinin hücreye bağlanmasını sağlar. Endositozla hücre içine alınan FA ise ADP-riboziltransferaz etkinliğiyle protein sentezini inhibe eder. Ortaya çıkan sitotoksik etki protein sentezini durdurur. Ancak DT'nin ayrıca DNA kırılması ve hücre iskelet yıkımına sebep olması bu bulguyu sorgulamamız gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca toksine karşı dirençli olan bazı hücrelerde (K562 gibi) protein sentezinin inhibe olmasına karşılık sitotoksik etkinin olmaması bu düşüncemizi desteklemektedir.

Bu çalışmada DT'nin bu etkisinin dolaylı incelenebilmesi ve apoptotik süreçte aldığı rolün ortaya çıkarılması için apoptotik süreçte rol alan Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2, Sitokrom C gibi proteinlerin mRNA gen ekspresyon oranlarına bakıldı. Çalışmanın amacı DT'nin sitotoksik etkisine ışık tutmaktadır. Bu amaca yönelik olarak çalışmanın DT'ne duyarlı (HL-60) ve dirençli (K562) hücrelerde karşılaştırmalı olarak yürütülmesi öngörülmüştür. Bunun için K562 ve HL-60 hücrelerinde mRNA ekspresyon oranlarına bakılarak kontrol hücrelerle karşılaştırıldı. Bu işlem için kültür ortamında üretilen K562 ve HL-60 hücrelerinden, DT varlığında ve yokluğunda RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Uygun primerler varlığında Q-PCR tekniği kullanılarak ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada apoptoz ve toksin ile ilgili bu proteinlerin toksin varlığında mRNA düzeylerindeki değişim olup olmadığı ve bu değişimin boyutu ortaya konmaya amaçlanmıştır. Apoptotik proteinlerin DT varlığında nasıl etkilendiği mRNA düzeyinde daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmada apoptoz ve DT ile ilgili proteinlerin DT varlığında mRNA düzeylerindeki değişim olup olmadığı ve bu değişimin boyutu ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmanın DT'nin sitoplazmik etkilerinin mRNA düzeyinde aydınlatılmasının ötesinde apoptoz sürecine ilişkin bilgi dağarcığımıza önemli katkılar sağlaması, immünotoksin olarak kanser tedavisinde uygulama bulan bu teorinin ya da tedavinin bu amaçla daha bilinçli bir biçimde değerlendirilmesi için bundan sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hücre Ölümü

Hücre ölümü çok uzun yıllar boyunca sağlık ve yaşam bilimlerinde çevre koşulları ya da hücre dışı etmenlerin etkileri altında gelişen, kontrol dışı bir süreç olarak görülmüştür. Bu görüş hücre ölümünün genelde patolojik koşullarda gözlenmesinden de destek almıştır. Günümüzde hücre ölümünün şiddet içerikli, hücrenin iç dengesinin ve yapısal bütünlüğünün hızla ortadan kalkışıyla seyreden bu türü nekroz terimiyle tanımlanmaktadır. Nekroz, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterize, ani ağır iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir.

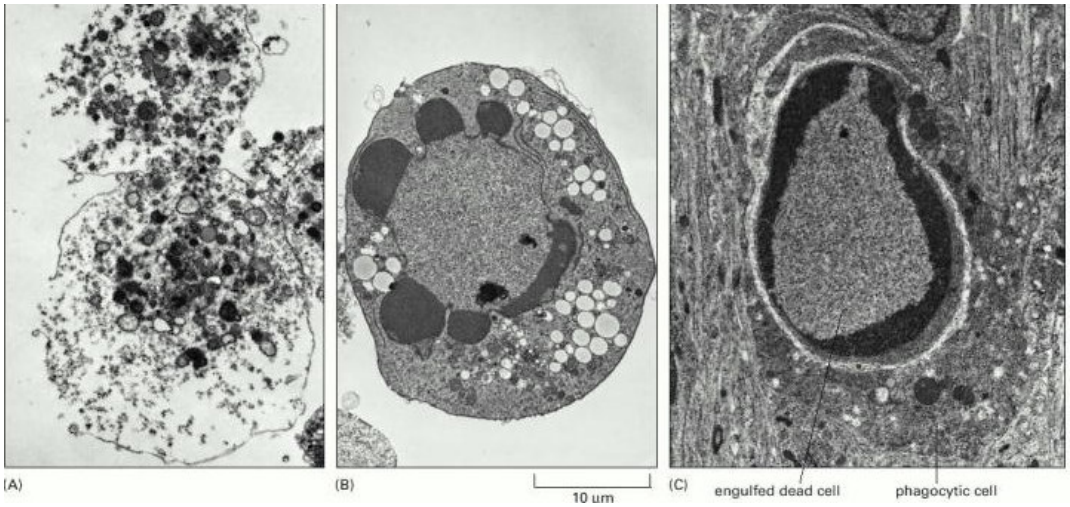
Hücre ölümü diğer yandan embriyonal gelişmede, dokuların yeniden yapılanmasında da gözlenen, artık gereksinmeyen hücrelerin tasfiyesine hizmet eden fizyolojik bir olaydır. Hücre ölümünün bu ikinci türü hücresel etmenlerin kontrolü altında düzenle gerçekleşen aktif bir süreçtir (1,2). Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü (3) olarak bilinen bu süreç son yıllardaki çalışmalarda ana hatlarıyla açıklığa kavuşturulmuştur. Programlanmış hücre ölümünün sunduğu tipik tablo hücre büzülmesi, nukleozomlararası DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve hücrenin son aşamada fagositozla ortadan kaldırılacak olan membranla çevrili apoptotik kalıntılara dönüşmesini kapsamaktadır (programlanmış hücre ölümü tip 1) (4). Buna karşılık, lizozom etkileşmesiyle devreye giren ve hücrenin altyapılarının öz sindirimi ile sonuçlanan süreç (4,5) programlanmış hücre ölümü tip 2 olarak tanımlanmaktadır.

2.1.1 Hücre Ölümünde Morfolojik Değişiklikler

Apoptozda, tek bir hücrede görülen hücresel büzüşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması ile hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (13). Apoptotik uyarım alan hücrenin hacmi yarıya düşer, çevre ile olan bağlantıları kesilir ve mikrovillusları kaybolur. Plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur (zeiozis yapısı). Transglutaminaz enziminin etkisiyle zarda tomurcuklanma ve parçalara ayrılma görülür. Hücre zarında içten dışa fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek kondensasyonunu takiben sitozolik Ca++ düzeyinde önemli bir artış olur ve sonrasında kromatin kondansasyonu olur yani nukleozomlar arası bağlantı bölgeleri ayrılır. 180-200 baz çifti uzunluğunda parçalar

agaroz elektroforezinde merdiven görüntüsü oluşturur (18). İnternükleozomal DNA parçalanmasına kalsiyum artışına duyarlı endonükleazların sebep olduğu düşünülmektedir. Hücrenin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili apoptotik cisimcikler oluşur. Normalde hücre zarında iki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi vardır. İç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin ve dış tabakada fosfatidilkolin (PC) asimetrik dağılmıştır. Bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesiyle sonuçlanır. Bu, apoptotik cisimciğin fagositozu için uyarıdır (8). Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar veya komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Apoptoz 30-60 dakikada tamamlanır (13).

Nekrozda, apoptozdan farklı olarak hücrede büzüşme yerine şişme olur. Hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs döngüsü ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi veya çeşitli toksinler patolojik hücre ölümü yani nekroza sebep olur (19). Hücre tarafından genlerle programlanmayan ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen nekrotik hücre ölümünde enerji kaybı sebebiyle hücre zarının geçirgenliği bozulur ve fazla miktarda sodyum ile su hücre içerisine girdiği için hücre şişer. Ayrıca mitokondirilerde değişme gözlenir, diğer organeller plazma içinde dağılır. Şişme sonucunda hücre zarı patlar ve bütünlüğünü kaybeder, proteolitik enzimler içeren plazma hücreler arası boşluğa sızar, doku çevresinde inflamasyon oluşturur (20,21).



Şekil 2-1: Hücre ölümü (61).

(A)'da nekroz (B) ve (C)'de ise apoptoz ile ölmüş hücrelerin elektron mikroskobu görüntüleri verilmiş. (A)'da hücre patlamış gibi görülüyor, (B) ve (C)'de ise küçülme var. (Courtesy of Julia Burne.)

2.1.2 Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz) Mekanizması

Apoptoz, Yunanca'da apo(ayrı) ve ptozis(düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuştur ve sonbaharda yaprak dökümü demektir (6,7,8,9). 1972 yılında ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından fizyolojik hücre ölümü ifadesi tanımlanmıştır (10). Wyllie ve Kerr glukokortikoidlere maruz kalan timüs hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir çalışma ile apoptozu göstermiştir (6).

Apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre değişir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (6). Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, TNF, TGF-B, Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler gibi uyaranlar apoptozda etkilidir (6,8,12,13). Özellikle protoonkojenlerin (c-myc gibi) çoğu apoptozun regülasyonunda yer alır (14). Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler (6). Apoptozda, hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermese de, bazen apoptoz dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da nekroz apoptoz gelişmesine yol açabilir (13).

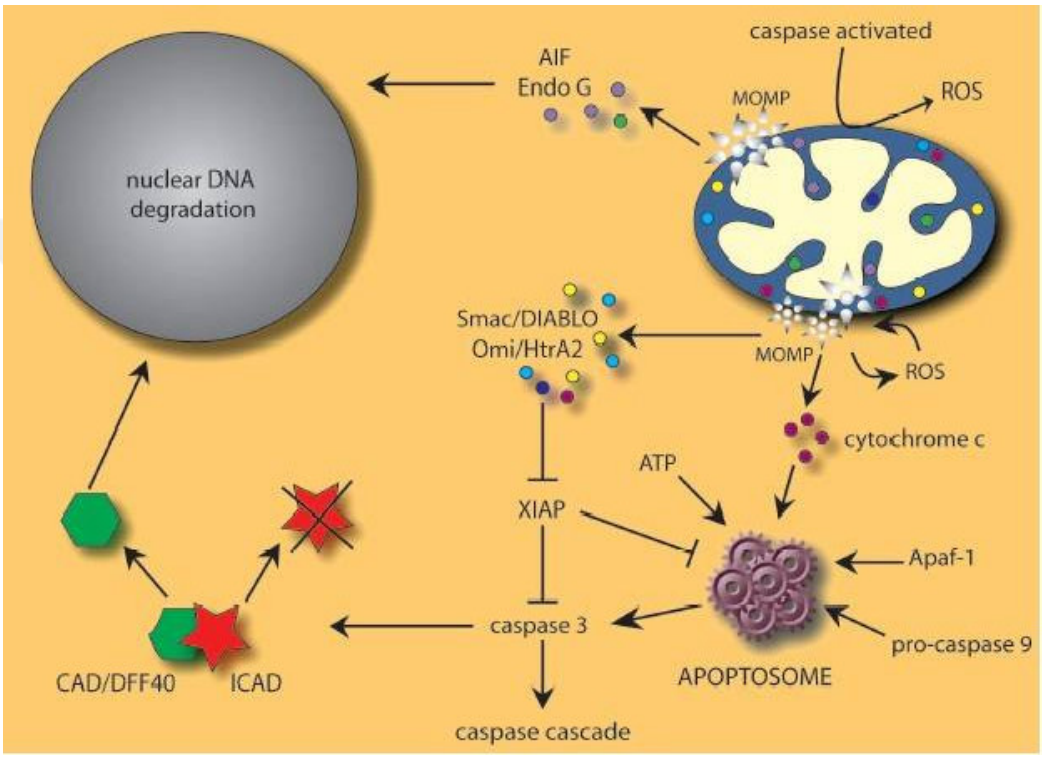
2.1.3 Apoptozun Gen Regülasyonu

Apoptoz mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir. *C elegans'*ın gelişim sürecinde 1090 somatik hücre oluşur; ama bunlardan 131 hücre ölür. Bu programlı hücre ölümünü gerçekleştiren ced-3 ve ced-4 genlerinden biri ya da her ikisi de mutasyona uğradığı zaman bu 131 hücre yaşamaya devam etmektedir (16,22,23). Ced-3 geni bir sistein proteazı şifrelemektedir ve memelilerdeki sistein proteazlardan ICE'ye; Ced-4 ise kalsiyuma bağlı bir proteini şifrelemekte ve memelilerde apaf-1'e benzemektedir. Ced-9'un insandaki homoloğu Bcl-2 proto-onkojen gen ailesi ise apoptozu durdurmaktadır (17,23,24). Ölüm sinyali, gen ekspresyonu 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 nükleotid azlığı, DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola girer (8).

İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazandırır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (8).

Programlı hücre ölümünün regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır (8,26). Bcl-2 ailesinin 20 üyesi belirlenmiştir (27); bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır (proapoptotik genler). Proapoptotik genler Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) diye ikiye ayrılır (15). Mitokondiri ve çekirdek zarlarının veya endoplazmik retikulum zarının üzerinde bulunan Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (8,21). Bcl-2 ile Bax etkileşiminde Bcl-2 nin oranı daha fazla ise hücre yaşamını sürdürür, Bax daha fazla ise hücre ölüme gider (18). Apoptotik ya da anti-apoptotik proteinlerin pek çoğunun mitokondriyle ilişkisi olduğu bilinmektedir. Apoptotik süreçte mitokondrinin merkezi bir rol oynadığı bulunmuştur (6). Mitokondiriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa' luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve bu protein, mitokondirinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında bulunur (28). Bu proteinler, iyon alış-verişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Antiapoptotik bir gen olan Bcl-xL'in mitokondiriyal hasarı engelleyerek mitokondiriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz inhibisyonu gerçekleşir (15). Bcl-2 ailesi aynı zamanda reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol eder (13). Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Ölümcül sinyal ya da komut sonra Bax proteinleri, mitokondiri zarının permeabilite geçiş poruna doğru yönelip buraya bağlanırlar. Bu bağlanma, mitokondri membranının seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom C ve AIF gibi mitokondiri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF, doğrudan kromatin kondansasyonunun ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelir. Sitoplazmadaki sitokrom C apoptozun en son basamağında görev alır.

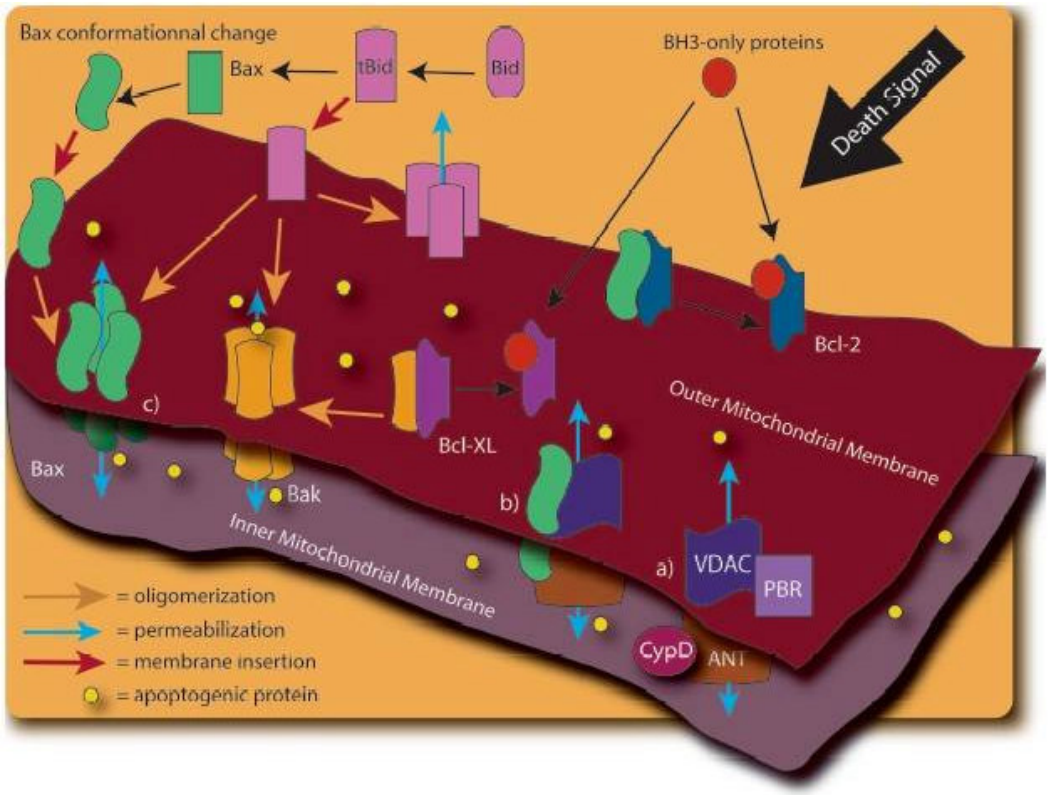
Sitokrom-C, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1' i aktive eder (8). Sitokrom C'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu komplekse apoptosom denir (29). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (8). Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır (21).



Şekil 2-2: apoptoz (1).

Mitokondri membranının apoptotik proteinlerin açığa çıkacağı biçimde değişmesi Bcl-2 protein ailesinin karşıt etkinlikteki temsilcilerinin arasındaki dengeye bağlıdır (30-35). Bcl-2 geni, insanda B hücrelerinden kaynaklanan lenfoma hücrelerinde yürütülen çalışmalarda bulunmuştur. Bcl-2 geni bu hücrelerde translokasyonla Ig-ağır zincir lokusundaki artırıcı dizilerin denetimi altına girerek, sürgit etkinlik kazanmakta, böylece bu hücrelerin sınırsız çoğalmalarına (ölümsüzleşmelerine) neden olmaktadır. Bcl-2 gibi, bu ailenin başka temsilcileri de anti-apoptotik etkinliğe sahiptir. Ancak, Bax gibi diğer temsilciler ise apoptoz başlatıcı etkinlikleriyle tanınmaktadır. Mitokondrinin dış zarı ile ilişkili bir konumda bulunan bu proteinler arasındaki denge ölümcül uyarı üzerine apoptoz yönünde değişmekte ve Bax bir dizi proteinle (ANT, VDAC vb) etkileşerek mitokondri geçirgenliğinin artmasına (MDT (mitokondri permeabilitesi)) yol açmaktadır. Bcl-2 ailesinin karşıt etkinlikteki temsilcilerinin arasındaki dengeyi

aralarında gerçekleşen etkileşim sağlanmaktadır. Bu etkileşim bu proteinlerin özgün α-sarmal (BH (Bcl-2 homolojisi)) dizilerinin oluşturduğu hidrofobik cepler üzerinden gerçekleşmektedir (36,37).



Şekil 2-3: Mitokondri membranı (1).

Mitokondrini dış membranı geçirgenliğinden sorumlu mekanizmalar hala tartışmalıdır. Aslında pek çok modeller gözlemlenmiştir: A) Geçirgenlik Geçiş Deliği (PTP). PTP voltaj bağımlı anyon kanalları (VDAC), Adenin Nükleotid translokator (ANT) gibi pekçok protein içerir. PTP'nin açılmasıyla apoptotik mitokondrial faktörler salınır. B) Bir önceki modelin bir varyasyonu da Bcl-2 ailesinin Bax gibi proapoptotik üyeleri VDAC ve/veya ANT ile etkileşime girerek mitokondri geçirgenliğini değiştirir. C) Proapoptotik proteinlerin salınımı pro ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki dengeye bağlıdır.

Belirtildiği gibi, mitokondri çeşitli ölümcül uyaranların tetiklediği yollakların bir kavşak noktasını oluşturmaktadır. Bu tür uyaranlara, örneğin TNF yada FAS ligandı, hücredeki reseptörlerine (CD95 / Fas / Apo-1 sistemi) bağlanmasıyla aktifleşen yollağın yanı sıra glikokortikoitlerin, çeşitli kimyasalların etkisiyle, ya da ışınlama, hipoksi ve DNA hasarı gibi farklı koşullar altında aktifleşen farklı süreçler de mitokondri kavşağında buluşmaktadır. Bu farklı yolakların aşamaları henüz ayrıntıyla tanımlanmamıştır ve etkileri yol açtıkları (apoptotik yada öz sindirime dayalı (otofajik) ölüm türlerine göre sınıflandırılmaktadır.

Programlı hücre ölümü mekanizmasında üç temel grup rol alır: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler (kaspazlar) (13,21). Ölüm reseptörleri, TNF reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (*Ölüm Domaini*) adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar (13). 6 tane ölüm reseptörü (CD95 (APO-1/Fas), TRAILR1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6) bilinmektedir (38). Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (CAD) aracılığı ile DNA yıkımına neden olur (13). Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur. Diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon dizisi başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır, bu sırada nukleazlar da aktive olarak DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir (12). Sitokrom C'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır (39,40).

Apoptoz süreci uyaranların tetiklediği farklı yolakların üzerinden gerçekleşebilmektedir. Genelde bu yolaklar kaspaz adı verilen özgün bir sistein proteaz sisteminin aktifleşmesiyle sonuçlanmaktadır (41). Normalde öncül enzim (simojen) biçiminde hücrede bulunan kaspazlar ölümcül uyaranların başlattığı zincirleme aktifleşme süreci açığa çıkmaktadır.

Kaspazlar birbirini izleyen bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1,4,5,11,12,13,14), proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 2,8,9,10) ve uygulayıcıları (efektör kaspazlar) (kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar (13,15).

Tablo 2-1: Belli başlı kaspazlar.

Kaspaz-1 (ICE)
Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICEre_{II})
Kaspaz-5 (ICErel_{III}, TY)
Kaspaz-6 (Mch2)
Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
Kaspaz-10 (Mch4)
Kaspaz-11 (ICH-3)
Kaspaz-12
Kaspaz-13 (ERICE)
Kaspaz-14 (MICE)

Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler. Ölümü esas gerçekleştiren uygulayıcı (effektör) kaspazları aktifleştirirler. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (13). Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır (11). Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) effektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (13). Ayrıca IAP ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenirler (8). Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu sebeple *c-asp-ases* adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (8,11).

Ölümcül sinyal ya da komut geldiğinde bu proteinler arasındaki denge apoptoz yönünde değişmekte ve sitokrom c gibi mitokondriye özgü, proteinler sitoplazmada açığa çıkarak apoptoz sürecini başlatan kompleksler oluşmaktadır: örneğin, sitokrom c, Apaf-1, dATP ve prokaspaz 9'un birlikte oluşturduğu "apoptozom" adı verilen yüksek molekül ağırlıklı kompleks kaspaz aktifleşme sürecini başlatmaktadır (42-46).

Apoptozom, XIAP adı verilen düzenleyici proteinin denetimi altındadır (47). XIAP kaspaz 3 ve kaspaz 9'un aktifleşmiş türlerini bağlayarak kaspaz aktifleşme sürecini engellemektedir. XIAP'in bu engelleyici etkisi mitokondrinin iç ve dış zarları

arasında konumlanmış proteinler (smac/DIABLO) tarafından ortadan kaldırılmaktadır (48,49). Kaspaz aktifleşmesinden bağımsız olarak, mitokondriden açığı çıkan diğer bazı proteinler ise AIF ve endo G (endonükleaz G) programlanmış hücre ölümü 1 tipi apoptoz sürecinde gözlenen kromatin kondensasyonuna ve DNA parçalanmasına yol açmaktadır (50,51).

2.2. Difteri Toksini (DT)

Difteri, Corynebacterium diphtheriae'nın etken olduğu akut bir infeksiyon hastalığıdır. Hastalığın patogenezinde difteri basilinin oluşturduğu toksinin lokal ve jeneralize etkisi rol oynamaktadır. C. diphtheriae; sporsuz, kapsülsüz, hareketsiz, aerop, pleomorfik boyanan, 2-6 µm boyunda ve 0,5-1 µm eninde gram pozitif çomak şeklinde bir bakteridir. Boyalı preparatlarda Çin harfleri gibi duruşları tipiktir. Gram boyası yanında Neisser veya Albert boyaları gibi daha spesifik boyalarla boyandığında basil gövdesi sarı- kahverengi, basilin uç kısımlarında bulunan metakromatik cisimcikler (Babes- Ernst cisimcikleri) mor boyanır.

DT, difteri basilinin hücre dışı bir ürünü olup, protein yapısındadır; ısı, ışık ve bekleme ile toksin özelliğini yitirir, toksoid hale döner. Toksinin etki mekanizması şöyledir. Difteri hastalığının patogenezinden sorumlu olan DT bakterinin hücre dışı bir ürünü olup, 62.000 dalton molokül ağırlığında bir polipeptiddir. Bu toksin; A (aktif) ve B (bağlanma) olmak üzere iki alt kısımdan oluşur. B kısmı memeli hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak, A kısmının hücreye girişini sağlar. Toksinin A kısmı toksik etkilidir, toksik etkisini ribozomlarda polipeptid molekülünün uzamasında rol alan eEF2'yi inaktive ederek gösterir. Protein sentezinin bu şekilde durması hücrenin ölümüne yol açar. DT güçlü bir toksindir, insan vücudunda bütün hücrelere toksik etkili olmakla birlikte; kalp (myokardit), sinirler (demiyelinizasyon), ve böbrek (tübüler nekroz) üzerine daha fazla toksindir.

DT gerek yapı ve gerekse etkisi açısından oldukça iyi tanımlanmış bakteri toksinlerinden biridir (52). 1960'lı yılların sonlarından beri bu toksinin NAD'nin varlığında eEF2'yi ADP-ribozilleyerek inaktifleştirdiği, böylece protein sentezinin durmasına yol açtığı bilinmektedir.

Sınırlı bir proteolitik sindirim ve bir zincir içi S-S bağının indirgenmesiyle difteri toksini iki parçaya ayrışmaktadır. Toksinin N-terminal bölümüne karşılık gelen ve A fragmenti (FA) olarak adlandırılan parça ADP-riboziltransferaz etkinliğine

sahiptir. Buna karşın, B fragmenti (FB) holotoksinin hücreye bağlanmasını sağlamaktadır. Toksinin ikinci aşamada endositik bir süreçte iki parçaya ayrılmasından sonra FA sitoplazmaya ulaşmaktadır (53, 54).

Enzimatik açıdan etkin parça olması (ADP-riboziltransferaz etkinliğine sahip), hücre içine ulaşarak protein sentezini durdurması nedeniyle onyıllar boyunca FA sitotoksik etkiden tek başına sorumlu parça olarak görülmüştür. Aynı şekilde, sitotoksik etkinin de yalnızca protein sentezinin inhibisyonuna dayandığı düşüncesi genel kabul görmüştür (55,56). Ancak, protein sentezinin inhibisyonu ile toksine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki tam açıklığa kavuşmuş değildir. Çalışmalar DT'nin protein sentezinin inhibisyonunun yanı sıra hücre iskeletinin yıkımına ve nükleozomlararası DNA kırılmasına yol açtığını da göstermektedir (57).

Bu olaylar protein sentezi inhibisyonunu belirli bir ara ile izlemekte, programlanmış hücre ölümü tip I'de gözlenen olaylarla özleşmektedir. FA'nın bunların ötesinde DNaz I tipi bir endonükleaz etkinliğine sahip olduğu da gösterilmiştir (57-59).

Diğer yandan, K562 ve Vero gibi bazı hücre soylarında, DT protein sentezi etkin biçimde durdurmasına karşın, sitotoksik (hücreleri öldürücü) bir etki göstermemektedir. Bu bulgular DT'nin sitotoksik etkisinin yalnızca protein sentezinin durmasıyla açıklanamayacağını, protein sentezinin durmasının sitotoksil süreçteki önemli ancak tek aşama olmadığını düşündürmektedir. Protein sentezini durduran risin gibi toksinler ile blastisidin-S, kasugamisin, sikloheksimit gibi antibiyotiklerin sitotoksik etkileri ise daha iyi tanımlanmıştır. Bütün bu etmenlerin, DT'nin aksine, ortak paydalarının ribozom ile etkileşerek neden oldukları ribostatik etki (ribozomal stres) üzerinden SAPK / JNK (stress activated protein kinase/ C-Jun N-terminal kinase) yolağını aktifleştirmek olduğu gösterilmiştir (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

DMEM: 0,85 g/l $NaHCO_3$, 3,574 g/l Hepes, 0,584 g/l L-Glutamin, 13,65 g/l Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) karışımı hazırlandıktan sonra seyreltik HCl ile pH=7,2 olacak şekilde ayarlandı. Medyum filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 4ºC'de saklandı. Kullanılacağı zaman 10 ml Fetal Dana serumu, 1 ml penisilin 10.000 U/ml, Streptomisin 10.000 mg/ml DMEM karışımı ile 100 ml'ye tamamlandı.

EDTA: 0,5M'lık EDTA çözeltisi damıtık su içinde 10 N'lik NaOH ile pH'ı 8,0'a ayarlanarak yapıldı.

Etidyum Bromür (EtBr): 5 mg/ml çözelti, 0,5 gr EtBr'ün 50 ml damıtık suda çözülmesiyle hazırlandı. Çözelti koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklandı.

PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi): 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na_2HPO_4 ve 0,24 gr KH_2PO_4 800 ml damıtık suda çözülüp HCl ile pH'sı 7,4'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi damıtık suyla 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilip oda sıcaklığında saklandı.

RNA Örnek Yükleme Tamponu: %50 (w/v) gliserol, 1mM EDTA (pH=8,0), %25 (w/v) bromofenol mavisi ve % 0,25 (w/v) ksilen siyanol FF içerecek şekilde hazırlandı.

Tripan mavisi: 100 ml PBS ile 400 mg tripan mavisi karıştırılarak elde edildi ve +4ºC'de saklandı.

Tris-asetat EDTA- TAE (10X): 1 litrede 242 gr Tris baz, 57,1 ml glasiyel asetik asit ve 100 ml 0,5M EDTA, ddH_2O ile 1 litreye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar

Aseptik sistem süzme cihazı	(Millipore)
Buzdolabı ve Derin Dondurucu	(+4ºC ve -20ºC Arçelik)
CCD kamera-bilgisayar donanımı	(Mitsubishi-Macintosh)

CO_2 tertibatlı hücre inkübatörü	(Hereaus, B-5060 EK-CO2)
Çalkalamalı su banyosu	(Memmert)
Çeker ocak	(Kermanlar)
Derin Dondurucu	(-80ºC Memmert)
Distile su cihazı	(Kermanlar)
Elektroforez aleti	(Stratagene)
Güç Kaynağı	(Stratagene)
Hassas terazi	(Shimadzu)
Laminar akım sistemli steril çalışma tezgahı	(Hereaus, EL-2448)
Magnetik karıştırıcı	(MK 318 Nüve)
Mikroskop	(Olympus I.M.)
Masaüstü mini santrifüj	(Hettich-Eppendorf)
Masaüstü santrifüj +4ºC	(Heraeus)
Otoklav	(Kermanlar)
Otomatik Pipetler	(Gilson-Eppendorf)
PH metre	(Corning)
Real-Time PCR cihazı	(Light cycler-Roche)
Santrifüj	(Hettich Universal 2S)
Sıvı azot tankı	(34xT Taylor-Whartoni)
Spektrofotometre	(Biotech Photometer WPA)
Spektrofotometre	(Spectronic 21D, Milton Roy)
Steril kültür şişeleri (25 veya 75'lik flasklar)	(Falcon)
Steril santrifüj tüpleri	(Falcon)
UV-transluminatör	(Fotodyne)
Vorteks	(MS1 Minishaker)

3.3 Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Çalışma grubunu İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı ve Histoloji Anabilim Dalı hücre bankalarından elde edilen HL-60 ve K562 hücreleri oluşturmuştur. Bu hücreler, daha önceden %10 DMSO ve %90 serum varlığında kriyo tüpler içerisinde, sıvı nitrojen ortamında saklandıklarından çalışma öncesi tekrar kültür için hazırlanmaları gerekti. %10 Serum, Streptomosin ve penisilin içeren %1 oranında antibiyotik ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içeren kültür ortamında 37ºC'ta ve %5 CO_2 varlığında nemli ortam koşullarında yeterince çoğaltıldı. Elde edilen hücrelerin yarısına Difteri Toksini verildi, diğer yarısı ise kontrol olarak kullanıldı. Difteri toksini verildikten hemen sonra 0., 1., 3., 6. ve 12. saatlerde alınan hücrelerden RNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA elde edildi. Bu örneklerden daha sonra cDNA sentezi yapıldı. Son olarak da bu cDNA'lar kullanılarak, programlı hücre ölümünde (apoptozda) rol alan Bcl-2, Sitokrom C, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı (real-time) kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) kullanılarak incelendi.

3.3.1 Hücre Kültürü

3.3.1.1 Sterilizasyon

Çalışmaya başlamadan önce ve çalışma sırasında kullanılacak olan materyal otoklavlanarak, çözeltiler ise elek boyutu 0,22 µm olan filtreden steril bir kap içine süzülerek sterilize edildi. Laboratuvar tezgahlarının üzeri ve laminar akım kabinlerinin içi %70 izopropil alkol ile silinmek suretiyle temizlendi. Cam malzemenin sterilizasyonu 150-180ºC kuru ısıda 1-1,5 saat tutulmasıyla sağlandı.

3.3.1.2 Hücre Çözme

Hücreler bulundukları medyum içinde kriyojenik bir ajan (DMSO ya da gliserol) eklenerek sıvı azot içinde sınırsız süreyle dondurulabilir. Sıvı azot tankından çıkardığımız hücre saklama tüpleri 37ºC'lik su banyosuna yerleştirildi. 3 dakika içinde çözülen tüpler kurulanıp alkolle silindikten sonra laminar akım altında hücreler pipetle karıştırılıp alındı ve içinde 9 ml medyum bulunan santrifüj tüpüne konup karıştırıldı. Dakikada 1.500 devirle 5 dakika çevrildikten sonra üst sıvı atıldı ve dipteki peletin üzerine serumlu kültür medyumu konuldu ve pipetle karıştırıldıtan sonra T-flask içine aktarıldı ve üzerine 19 ml serumlu medyum konuldu. 24 saat sonra flasktan 10'ar ml medyum alınıp pasaj yapıldı.

3.3.1.3 Hücrelerin pasajı

Pasaj işlemi, kültür şişelerinde çoğalan hücrelerin belirli bir yoğunluğa ulaştıkları zaman yani konfluent duruma gelmeden seyreltilip başka kültür şişelerine aktarılması işlemidir.

Kültür kapları (flasklar) invert mikroskopla haftada en az 2 defa kontrol edildi. Pasajlama zamanı gelen kültür kaplarındaki hücreler steril pipet ile flasklardan toplanarak kapaklı ve konik tabanlı 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine konarak 1.500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atılarak tüpün dibine çökmüş hücreler üzerine 5 ml medyum konarak steril pastör pipetleri yardımıyla hücre süspansüyonu haline getirildi. Bu pipetaj işlemi sırasında medyumun köpürtülmemesine dikkat edildi. Hücreler hemositometrik kamarada sayılarak kaydedildi. Daha sonra hücreler yeni flasklara ekildi. 25 cm^2'lik flask için 5 ml, 75 cm^2'lik flask için 10 ml medyum konuldu. Hücre ekiminde ekilecek hücre sayısının $5x10^4$ hücre/ml ile $5x10^5$ hücre/ml arasında olmasına dikkat edildi. Flaskların kapakları inkübatör havasının girebileceği şekilde hafif aralık bırakılarak 37 °C, %5 CO_2 ve %95 hava karışımı sağlayan inkübatöre yerleştirildi. Hücre kültürü medyumumuzu fizyolojik aralıktaki pH değerlerini (pH=7,0-7,4) sürdürecek şekilde sodyum bikarbonat ile tamponladığımızdan %5 karbondioksit içeren gaz ortamında tutulmaları gerekiyordu. Asit pH'larda medyum sarı bazik pH'larda ise koyu kırmızı renkte görülür. Flasklar her 2 veya 3 günde bir, renkleri kırmızıdan sarıya dönüştüğünde mikroskopta da kontrol edilerek, hücrelere pasaj yapıldı.

3.3.1.4 Hücre Sayımı ve Canlılık Tayini

Hücreler santrifüj edildikten ve yeniden süspanse edildikten sonra, süspansüyon steril bir santrifüj tüpünde tripan mavisi ile 1:1 oranında hafifçe karıştırıldı. 5 dakika beklendikten sonra bir damla karışım kapiller etkiyle hemositometre kamarasına kondu. Hemositometrenin bir kenarı boyunca 5 kare içindeki ölü (boyanmış) ve toplam hücre miktarları sayıldı. Her sayımda 4 kare sayıldı ve aritmetik ortalamaları alınarak elde edilen sayı önce 10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı bulundu. Daha sonra da bu çarpım süspanse edilen hacim miktarı ile çarpılarak toplam hücre sayısı belirlendi.

3.3.1.5 Hücrelere Difteri toksini verilmesi

Bu çalışmada Refik Saydam Enstitüsünden sağlanan 1 mg/ml'lik Difteri Toksini stoğundan 20 µl alıp 180 µl bidistile su eklenip 100 ng/ml yeni bir stok elde edildi.

12 saatlik deneyimize başlarken bir tanesi kontrol olarak kullanılacak K562 hücreleri için, bir tanesi Difteri Toksini verilecek K562 hücreleri için, br tanesi kontrol olarak kullanılacak HL-60 hücreleri için ve bir tanesi Difteri Toksini verilecek HL-60 hücreleri için olmak üzere steril 6 kuyucuğu bulunan hücre plakalarından toplam 4 tane alınıp her bir kuyucuğa 5'er ml DMEM medyumu konuldu. Hangi kuyucuklara hangi hücrenin ekileceği, hangi kuyucuklara Difteri Toksini verileceği, hangi saatte hangi kuyucuktan hücre alınacağı belirlendikten sonra hücre pasajı yapıp saydığımız hücrelerden her kuyucuğa 1'er milyon hücre gelecek şekilde hücre ekildi. Difteri toksini verilecek kuyucuklara 10'ar µl yeni Difteri Toksini stoğundan verildi. Yani hücrelere 200 ng/ml Difteri Toksini verilmiş oldu.

Daha sonra sırasıyla 0., 1., 3., 6., ve 12. saatlerde ve her defasında kontrol olarak kullanılan K562 hücreleri bulunan hücre plakasındaki bir kuyucuktan, Difteri Toksini verilen K562 hücreleri bulunan hücre plakasındaki bir kuyucuktan, kontrol olarak kullanılan HL-60 hücreleri bulunan hücre plakasındaki bir kuyucuktan ve Difteri Toksini verilen HL-60 hücreleri bulunan hücre plakasındaki bir kuyucuktan olmak üzere 4'er örnek hücre steril pipet yardımıyla kuyucuklardan toplanarak kapaklı ve konik tabanlı 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine konarak 4.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj öncesi her örnekten 100 µl alınarak sayım yapıldı ve canlılık tayini için steril bir santrifüj tüpünde tripan mavisi ile 1:1 oranında hafifçe karıştırıldı. 5 dakika beklendikten sonra bir damla karışım kapiller etkiyle hemositometre kamarasına kondu. Hemositometrenin bir kenarı boyunca 5 kare içindeki ölü (boyanmış) ve toplam hücre miktarları sayıldı. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atılarak tüpün dibine çökmüş hücreler üzerine 200 µl PBS (Fosfat tamponlu tuz eriyiği) içinde süspanse edildi. Daha sonra hemen RNA izolasyonuna geçildi.

3.3.2 RNA İzolasyonu

Üretilen hücrelerden total RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Tissue Kit-Roche) kullanılarak RNA elde edildi. Difteri toksini verildikten hemen sonra sırasıyla 0., 1., 3., 6. ve 12. saatlerde 4'er örnek alınarak her defasında ayrı ayrı RNA izolasyonu yapıldı.

200 µl PBS (Fosfat tamponlu tuz eriyiği) içinde süspanse edilen hücreler 2 ml'lik Dnaz ve RNaz Free tüpler içine konuldu. Sonra aynı tüpler içindeki her örnek üzerine 400'er µl kitte bulunan lizis bağlanma tamponu eklenip Dnaz ve Rnaz-Free pipet uçları ile iyice pipetaj yapıldı. Kitten çıkan toplama tüpleri içine filtreli tüpleri yerleştirildi. Daha sonra 2 ml'lik tüpler içindeki karışımlar ayrı ayrı hazırladığımız filreli tüplerin filtreleri üzerine pipetle aktarıldı. Daha sonra 25 saniye boyunca 10.000 rpm'de oda sıcaklığında masaüstü santrifüjde örneklerimiz çevrildi ve santrifüj sonucu toplama tüplerinde biriken sıvı atıldı ve filtreler geri aynı toplama tüpleri içine yerleştirildi. Her örnek için 90 µl DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µl DNaz 1 olacak şekilde 1,5 ml'lik Dnaz-RNaz Free tüp içinde bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan 100'er µl alınıp içinde örnek bulunan filtre üzerine döküldü. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 15 dakikalık sürenin sonunda her bir örnek için ayrı ayrı filtreler üzerine 500'er µl kitte bulunan yıkama tamponu I pipetle aktarıldı ve bu şekilde 25 saniye boyunca 10.000 rpm'de oda sıcaklığında masaüstü santrifüjde çevrildi ve toplama tüplerinde biriken sıvılar döküldü. Daha sonra her bir örnek için ayrı ayrı filtre üzerine 500'er µl kitte bulunan yıkama tamponu II eklendi ve bu şekilde 25 saniye boyunca 10.000 rpm'de oda sıcaklığında masaüstü santrifüjde çevrildi ve toplama tüplerinde biriken sıvılar döküldü. Daha sonra her bir örnek için ayrı ayrı filtre üzerine 200'er µl yıkama tamponu II eklendi ve bu şekilde 2 dakika boyunca 13.400 rpm'de oda sıcaklığında masaüstü santrifüjde çevrildi ve toplama tüplerinde biriken sıvılar ve toplama tüpleri atıldı. Filtreli tüplerin herbiri biriktirme tüplerinden ayrıldıktan sonra 1,5 ml'lik Dnaz-RNaz Free tüpler içine yerleştirildi. Son olarak, RNA eldesi için, filtreler üzerine 30'ar µl elüsyon tampon sıvısı eklendi ve bu şekilde örnekler 1 dakika boyunca 10.000 rpm'de oda sıcaklığında masaüstü santrifüjde çevrildi. 1,5 ml Dnaz-RNaz Free tüpler içinde biriken RNA'lardan 2'şer µl agaroz jelde görüntülemek için ayrıldıktan sonra, izole edilen RNA'lar hemen daha sonra kullanılmak üzere -80ºC'ye kaldırıldı.

3.3.3 Agaroz Jel Elektroforezi:

Elde edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi, %1'lik agoroz jel elektroforezinde görüntülendi.

3.3.3.1 Agaroz Jel Hazırlanması ve RNA Görüntülenmesi

Elektroforez jel tepsisine tarakları yerleştirildi. Daha sonra 0,5gram agaroz tartılarak 50 ml TAE solüsyonu içinde bir beherde çözündürüldü. Solüsyon mikrodalga fırında homojenize olana dek kaynatıldı. Bunu takiben 56ºC'a kadar soğutularak içerisine 10 mg/ml stok olarak hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 3 µl çeker ocak altında eklendikten sonra sıvı haldeki agaroz elektroforez tepsisine döküldü. Jelin donması beklendi. Jel donduktan sonra tepsi 1X TAE solüsyonu içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi ve taraklar çıkarıldı.

RNA örneklerinin jel kuyucuklarına çökmesini sağlamak amacıyla 6X brom fenol mavisi de içeren yükleme tamponu solüsyonundan 1 µl, 2 µl total RNA ve 4 µl ddH_2O karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Tüm örnekler yüklendikten hemen sonra tankın elektrotları güç kaynağına bağlandı ve 80-90 V altında örnekler jelde yaklaşık 15-30 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel U.V. ışığı altında CCD kamera ile görüntülenerek printer çıktıları alındı.

3.3.4 RT-PCR ile cDNA sentezi :

RNA görüntülerine bakarak cDNA sentezinde ne kadar RNA alınması gerektiğine karar verildi. RNA miktarlarını eşitlemek için bazı örneklere deiyonize su eklendi.

toplam RNA	: 10µl (1 µg/µl),
random primer	: 1 µl (0,3 µg/µl),
Su	: 11 µl.
Toplam	: 22 µl.

Her bir örnek için ayrı ayrı 1,5 ml Dnaz-RNaz Free tüpler içine önce 0,1-5 µg toplam RNA, 0,2 µg random hekzamer konuldu ve daha sonra toplam karışımı 22 µl'ye tamamlayacak kadar deiyonize su eklendi ve karışım 70°C'de 5 dakika inkübe

edildikten sonra buza konuldu. Bu arada beklerken her bir örnek başına aşağıdaki miktarlar gelecek şekilde bir karışım hazırlandı.

5x Ters Transkriptaz tamponu	: 8 µl,
10 mM dNTP karışımı	: 4 µl,
RNaz inhibitör (20 U/µl)	: 1 µl,
Su	: 3,5 µl,
Ters Transkriptaz (200 U/µl)	: 1,5 µl.
Toplam	: 18 µl

Sırayla her bir örnek için ayrı ayrı 8 µl kadar reaksiyon tamponu, 4 µl kadar 10mM dNTP (FERMENTAS) karışımı, 20U Ribonuclease Inhibitor (FERMENTAS), 200U RevertAid M-MuLV Ters Transkriptaz (FERMENTAS) enzimi ve daha sonra her örnek için toplamı 18 µl'ye tamamlayacak kadar deiyonize su eklendi. Buzda beklemekte olan her örnek üzerine bu karışımdan 18 µl eklendi. Daha sonra PCR makinasında önce 25°C'de 10 dakika ve daha sonra 42°C'de 60 dakika bekletildi. Son olarak reaksiyonu durdurmak için 70°C'de 10 dakika ısıtıldı ve 10 dakikanın sonunda örnekler buza konuldu. Daha sonra cDNA örnekleri -20°C'ye kaldırıldı.

3.3.5 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR ile Gen Ekspresyonu Analizi:

Deneylerimizde Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2 ve Sitokrom-C genlerinin amplifikasyonunu belirleyebilmek için SYBR Green I boyası kullanıldı.

SYBR Green I floresan ışımayı saptamak için en sık kullanılan boyadır. SYBR Green I, çift iplikli DNA'ya bağlanır. Ortamdaki çift iplikli DNA sayısı arttıkça, yani amplifiye olan cDNA miktarı arttıkça elde edilen floresan miktarı da artar.

PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı erime eğrisi (melting curve) yöntemi ile kontrol edildi. Erime ısısı (T_m), genin amplifikasyon ürününün %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu değer genin dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PCR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler.

3.3.5.1 Primerler

cDNA kullanılarak, Difteri Toksini verilmiş hücrelerle ve verilmemiş kontrol hücrelerinde apoptoz mekanizmasında rol alan Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2 ve Sitokrom C genlerinin ekspresyonu incelendi. Bu amaçla aşağıdaki tablodaki primer setleri Sequencher Version 4.1.4 demo bilgisayar programı kullanılarak dizayn edilip kullanıldı.

Tablo 3-1: Gen ekspresyonu incelenecek genlerin primer dizileri.

		Primer dizileri	Primer Boyu	Ürün Boyu bç	Gİ No
Casp-3	F	5'-ATT GTG GAA TTG ATG CGT G-3'	22 bç	218 bç	51464381
	R	5'-AGT TCT GTA CCA CGG CAG G-3'	21 bç		
Casp-9	F	5'-TGA GGA CCT TCG ACC AGC-3'	21 bç	124 bç	51459255
	R	5'-ACG TAC CAG GAG CCA CTC-3'	21 bç		
Bcl-2	F	5'-AGG AAG TGA ACA TTT CGG TGA C-3'	21 bç	174	14121606
	R	5'-GCT CAG TTC CAG GAC CAG GC-3'	21 bç		
Sitokrom -C	F	5'-AGGCCCCTGGATACTCTTACA CAG-3'	21 bç	126	14121650
	R	5'-TCAGTGTATCCTCTCCCCAGA TG-3'	21 bç		

Bcl-2, Sitokrom C, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 genlerinin amplifikasyonu Light Cycler (Roche Diagnostics) aleti kullanılarak yapıldı. Kantitatif değerlendirme

yapabilmek amacıyla ekspresyonu sabit olduğu varsayılan "housekeeping" gen (internal kontrol) olarak β2-mikroglobulin geni aşağıdaki primerler kullanılarak amplifiye edildi:

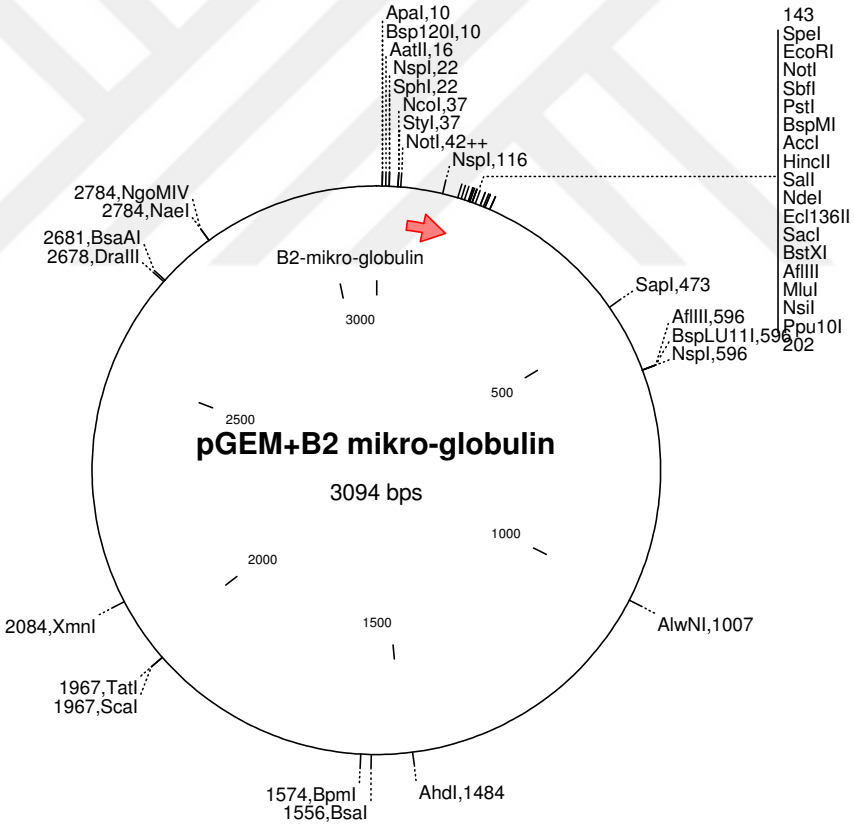
B2-micF 5' TGC CGT GTG AAC CAT GTG AC 3'

B2-micR 5' ACC TCC ATG ATG CTG CTT ACA 3'

Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2 ve Sitokrom-C genlerinin ekspresyon oranı, houskeeping (her dokuda aynı düzeyde anlatıma giren) genlerinkine oranlandı.

3.3.5.2 STANDART EĞRİ'NİN HAZIRLANMASI

Daha önceki çalışmalarımız için pGEM vektorüne klonlanmış olan β2-mikroglobulin geni standart eğri hazırlanmasında kullanıldı.



Şekil 3-1: pGEM vektorüne klonlanmış olan β2-mikroglobulin geni.

Klonlanmış β2-mikroglobulin geni kullanılarak, 1000 fentogram dilusyondan başlanarak 10'ar kat azalan 4 dilüsyon kullanılarak 4 standart oluşturuldu.

3.3.5.3 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR:

Primerler (5pmol/µl)	1µl
Sybr Green mix 2X (Roche)	5 µl
cDNA	2 µl
Toplam	10 µl

Not: Sybr Green karışımı: Takara Ex Taq Hot start, dNTP karışımı, Mg +2 ve Sybr Green I boyası içermektedir.

Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2 ve Sitokrom C genlerinin amplifikasyonunun tespiti için aşağıdaki kantitatif PCR koşulları kullanıldı.

Tablo 3-2: Q-PCR Koşulları.

Program 1: Denatürasyon

Segment	Sıcaklık	Zaman	Eğim
1	95°C	10 saniye	20

Program 2: Amplifikasyon

Segment	Sıcaklık	Zaman	Eğim
1	95°C	5 saniye	20
2	55°C	10 saniye	20
3	72°C	10 saniye	20
4	77°C	5 saniye	20

Program 3: Erime Eğrisi analizi

Segment	Sıcaklık	Zaman	Eğim
1	95°C	0	20
2	65°C	15	20
3	95°C	0	0.1

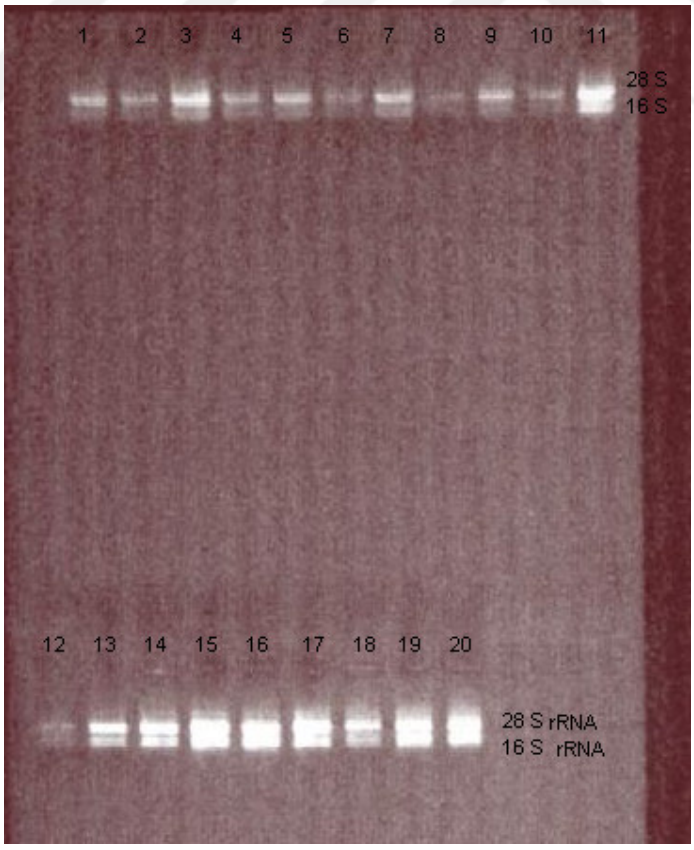
Program 4: Soğutma

Segment	Sıcaklık	Eğim
1	40°C	20

4. BULGULAR

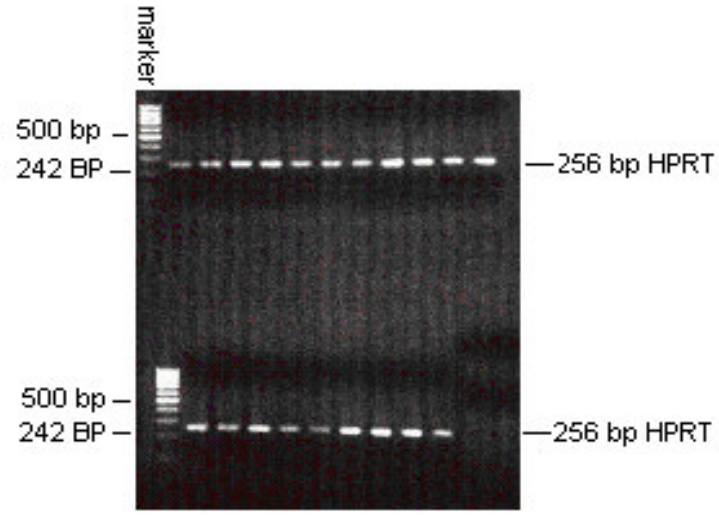
Çalışma grubunu İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik ve Histoloji Anabilim Dalı hücre bankalarından elde edilen K562 ve HL-60 hücreleri oluşturmuştur. Bu hücreler, %10 DMSO ve %90 serum varlığında kriyo tüpler içerisinde, sıvı nitrojen ortamında saklandıklarından çalışma öncesi tekrar kültür için hazırlanmaları gerekti. %10 Serum, Streptomosin ve penisilin içeren %1 oranında antibiyotik ve Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içeren kültür ortamında 37°C'de ve %5 CO_2 varlığında nemli ortam koşullarında yeterince çoğaltıldı.

Difteri toksini verilen hücrelerle, verilmeyen kontrol hücrelerinden 0., 1., 3., 6. ve 12. saatlerde alınan her bir örnek için anında total RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi %1'lik agoroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.1).



Şekil 4-1: Tüm RNA örneklerinin % 1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.

Daha sonra cDNA elde edildi ve bunların özgünlükleri bir house keeping gen olan HPRT ile kontrol edildi(Şekil 4-2).



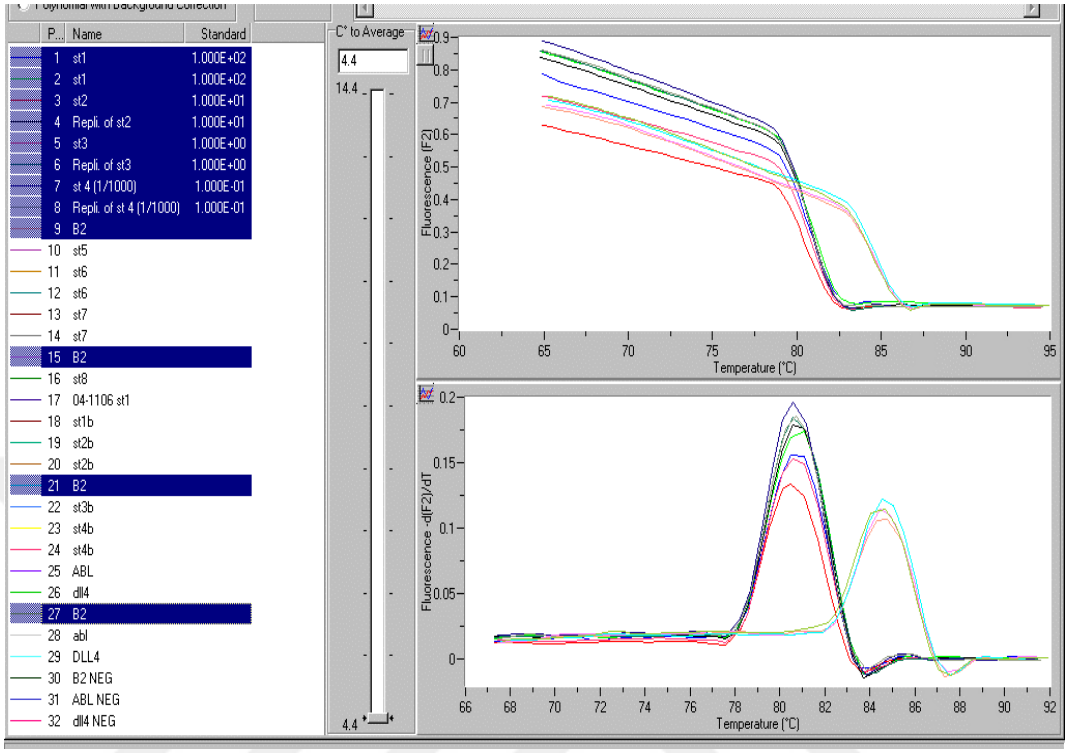
Şekil 4-2: cDNA sentezi kontrolü için HPRT geni kullanıldı.

Hedeflenen genlerin ekspresyonları gerçek zamanlı PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) kullanarak incelendi.

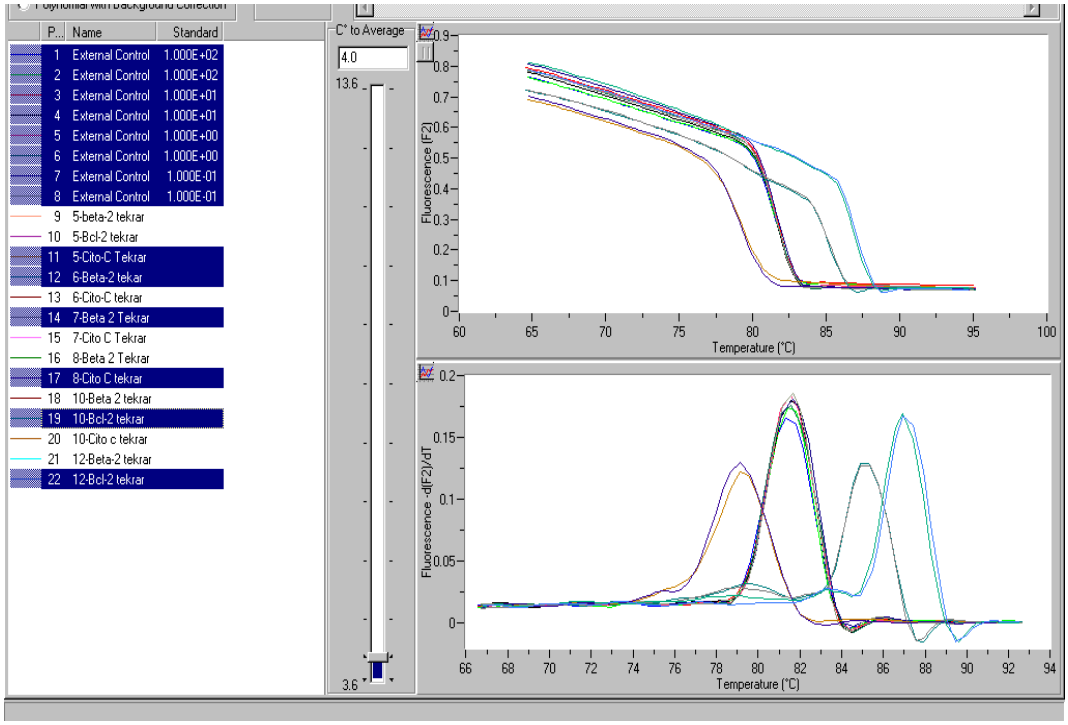
Ayrıca, Light Cycler'da elde edilen ürünlerin özgünlüklerinin kontrolü amacıyla, her ürün için ayrı ayrı erime eğrisi analizi sonuçları ve grafikleri kontrol edildi. Şekillerde de görülebileceği gibi hedef bölgeler dışında (β2-mikroglobulin, CASP-3, CASP-9, Bcl-2 ve Sitokrom C) spesifik olmayan bir amplifikasyona rastlanmadı. Her gene ait erime eğrisi tek tek değerlendirildi (Tablo 4.1).

Tablo 4-1: PCR fragmanlarımızın Erime Eğrisi (Tm) değerleri.

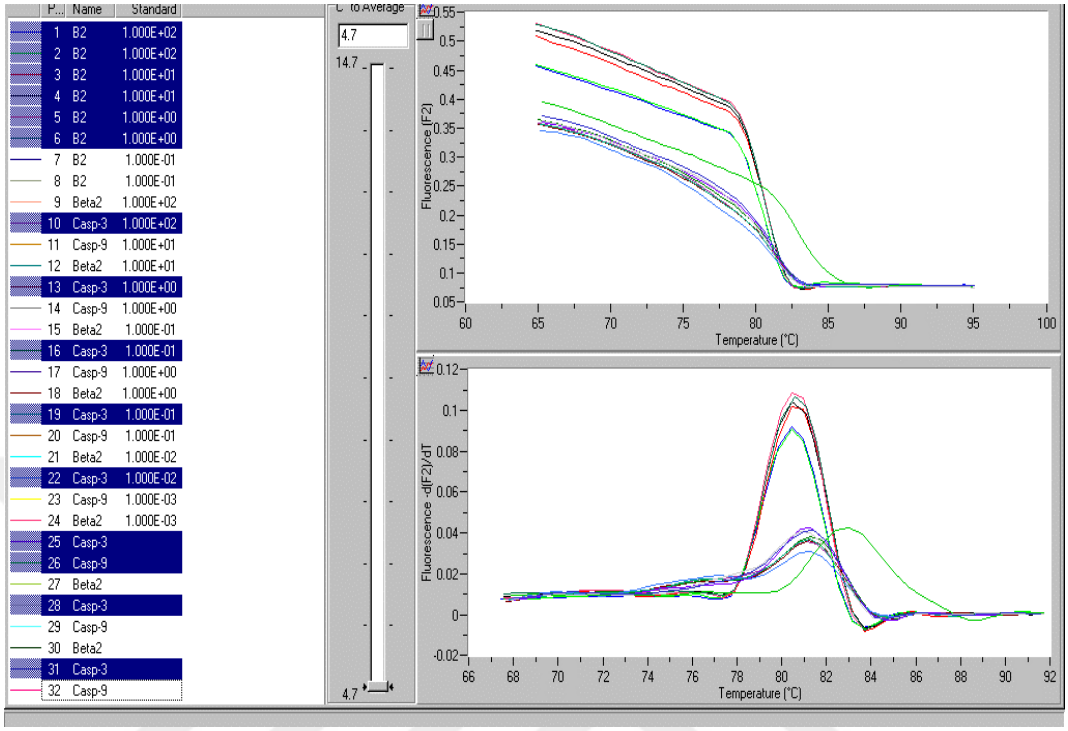
Çalışılan genler	Erime Eğrisi
Kaspaz-3	**81ºC**
Kaspaz-9	**83,5ºC**
Bcl-2	**86,5ºC**
Sitokrom C	**79 ºC**
β2-mikroglobulin	**85 ºC**



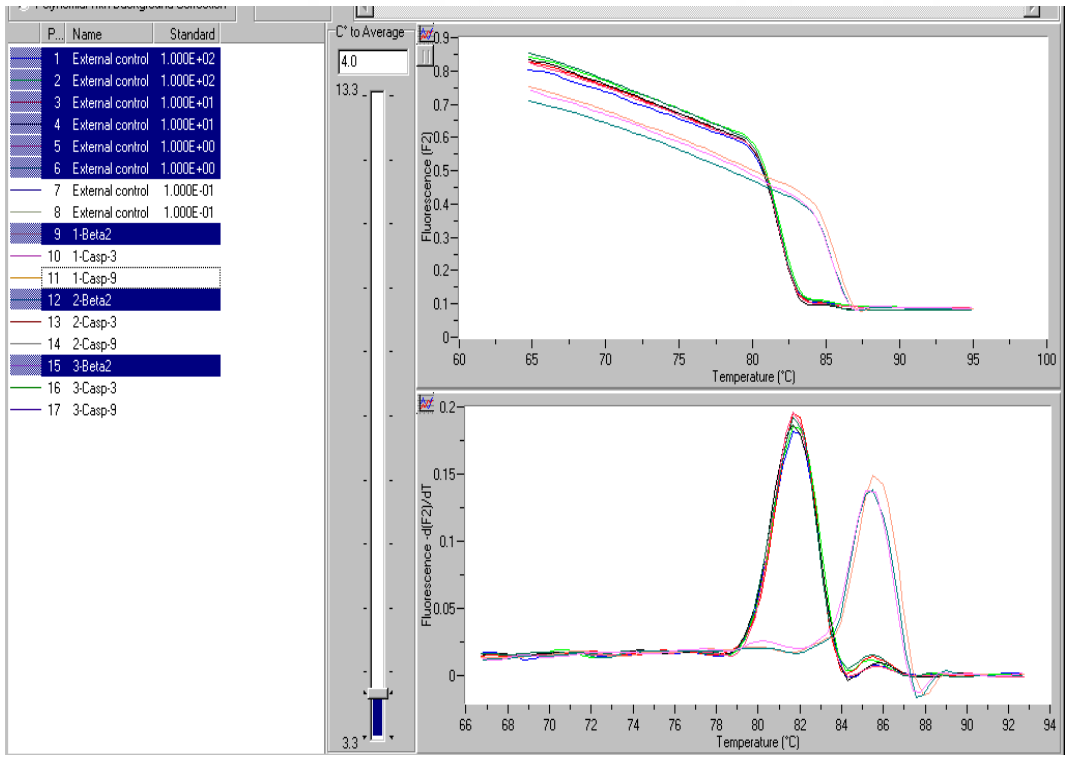
Şekil 4-3: 1, 2, 3 ve 4 no'lu örnekler için β2-mikroglobulin erime eğrisi değerleri ve grafikler.



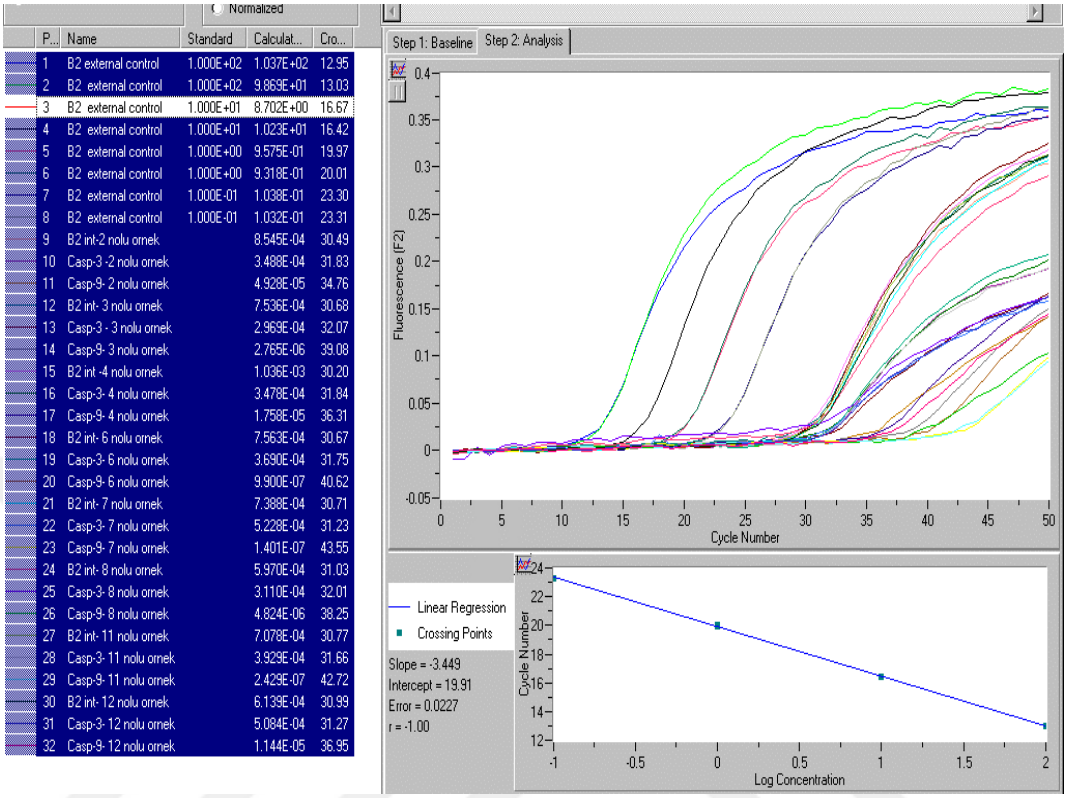
Şekil 4-4: 5, 6, 7, 8, 10, 12 no'lu örnekler için β2-mikroglobulin, Bcl-2 ve Sitokrom C gen ürünlerine ait erime eğrisi değerleri ve grafikler.



Şekil 4-5: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 no'lu örnekler için β2-mikroglobulin, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 genleri ürünlerine ait erime eğrisi değerleri ve grafikler.



Şekil 4-6: 1, 2, 3nolu örnekler için β2-mikroglobulin erime eğrisi değerleri ve grafik.



Şekil 4-7: Genlerin ekspresyon dereceleri.

Bu sonuçlar elde edildikten sonra, örneklerin Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2 ve Sitokrom C gen ekspresyon dereceleri standart eğri (curve) değerleri kullanılarak (pGEM+β2-mikroglobulin plasmid) ve internal kontrol (β2-mikroglobulin) genlerinin ekspresyon dereceleri ile oranlanarak göreceli ifade birimleri (GİB) hesaplandı.

Standart eğri de β2-mikroglobulin ile hazırlandığı için GİB değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

GİB = Hedef gen ekspresyonu / B2-mikroglobulin ekspresyonu

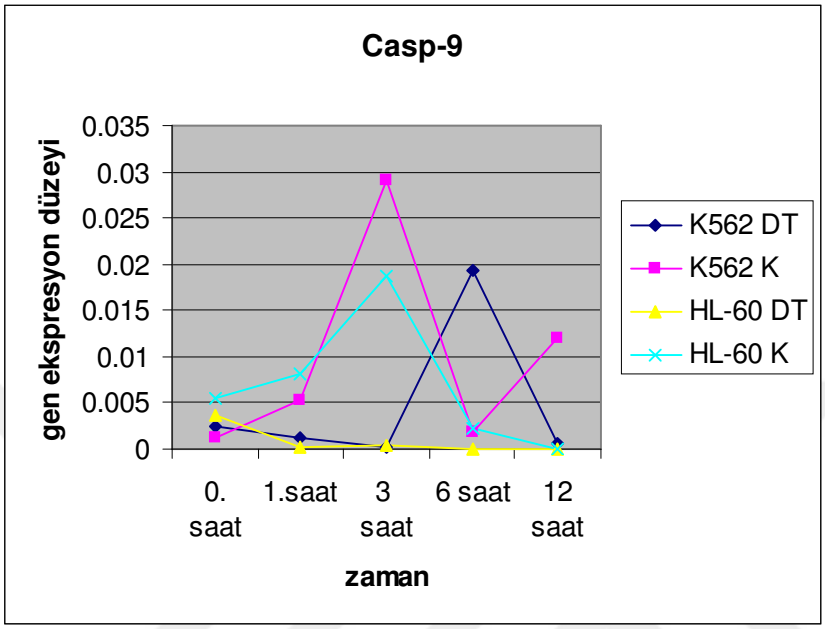
Çalışma grubunda elde edilen Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bcl-2 ve Sitokrom C göreceli ekspresyon değerleri Tablo 4-2 ve Tablo 4-3'te verildi.

Tablo 4-2: Tüm örneklerde Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 genlerinin gerçek zamanlı kantitatif PCR (Q-PCR) sonrasında hesaplanan göreceli ekspresyon değerleri.

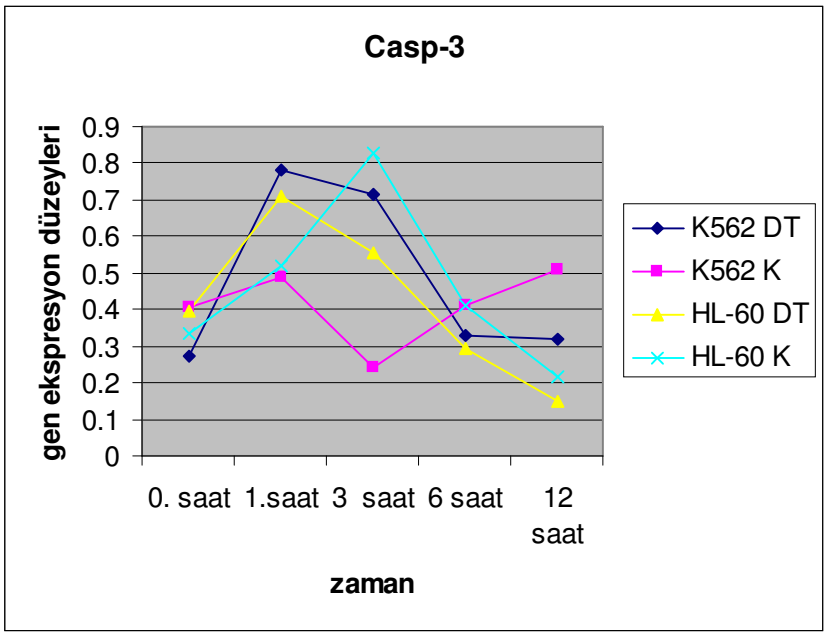
	Kaspaz-9	Kaspaz-3
01- K562 DT (0.saat)	0,002452064	0,271611021
02- K562 K (0.saat)	0,001240501	0,408191925
03- HL-60 DT (0.saat)	0,003669055	0,393975584
04- HL-60 K (0.saat)	0,005569112	0,335714286
05- K562 DT (1.saat)	0,001294643	0,783234127
06- K562 K (1.saat)	0,005209004	0,487901626
07- HL-60 DT (1.saat)	0,000189632	0,707634001
08- HL-60 K (1.saat)	0,008080402	0,520938023
09- K562 DT (3.saat)	0,000300983	0,717199017
10- K562 K (3.saat)	0,029495017	0,240990864
11- HL-60 DT (3.saat)	0,000343176	0,555100311
12- HL-60 K (3.saat)	0,018634957	0,828147907
13- K562 DT (6.saat)	0,019361121	0,327741715
14- K562 K (6.saat)	0,001876433	0,411532951
15- HL-60 DT (6.saat)	0	0,292936674
16- HL-60 K (6.saat)	0,002236744	0,409634055
17- K562 DT (12.saat)	0,000618022	0,321337489
18- K562 K (12.saat)	0,012076839	0,508155129
19- HL-60 DT (12.saat)	0	0,146802326
20- HL-60 K (12.saat)	0	0,213932532

Tablo 4-3: Tüm örneklerde Bcl-2 ve Sitokrom C genleri için, gerçek zamanlı kantitatif PCR (Q-PCR) sonrası hesaplanan göreceli gen ekspresyon değerleri.

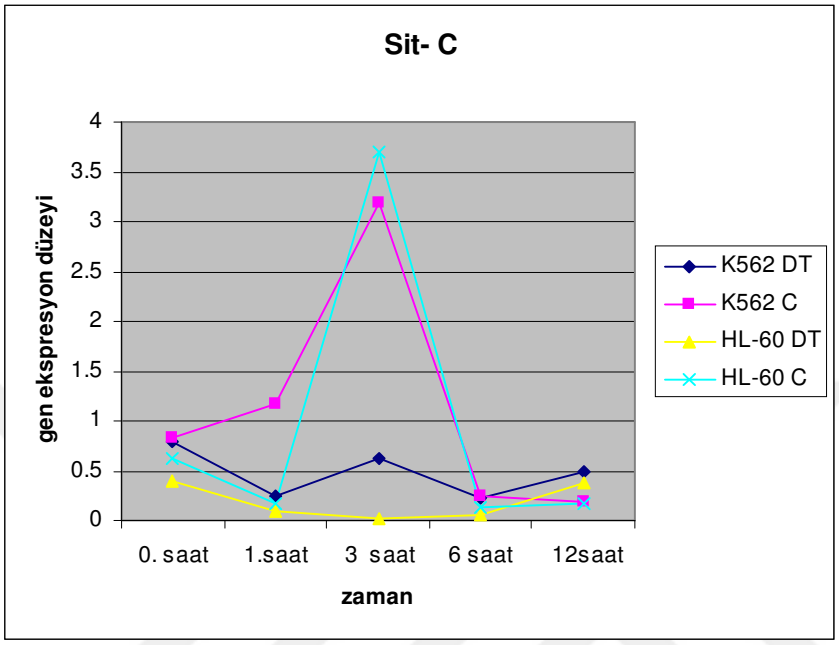
	Bcl-2	Sitokrom C
01- K562 DT (0.saat)	0,021982128	0,788708367
02- K562 K (0.saat)	0,018945218	0,830807047
03- HL-60 DT (0.saat)	0,011534805	0,39602649
04- HL-60 K (0.saat)	0,015491379	0,624413793
05- K562 DT (1.saat)	0,001632062	0,240983948
06- K562 K (1.saat)	0,000631354	1,165895838
07- HL-60 DT (1.saat)	0,00766663	0,08733255
08- HL-60 K (1.saat)	0	0,161269325
09- K562 DT (3.saat)	0,055901383	0,622989408
10- K562 K (3.saat)	0,031034483	3,188300701
11- HL-60 DT (3.saat)	0	0,01437421
12- HL-60 K (3.saat)	0,028946474	3,700791066
13- K562 DT (6.saat)	0,016276916	0,222652885
14- K562 K (6.saat)	0,022604273	0,254526958
15- HL-60 DT (6.saat)	0,003209248	0,063851881
16- HL-60 K (6.saat)	0,017838676	0,138572906
17- K562 DT (12.saat)	0,018727273	0,489197861
18- K562 K (12.saat)	0,00959144	0,184587116
19- HL-60 DT (12.saat)	0,022912173	0,380431433
20- HL-60 K (12.saat)	0,017295498	0,166296766



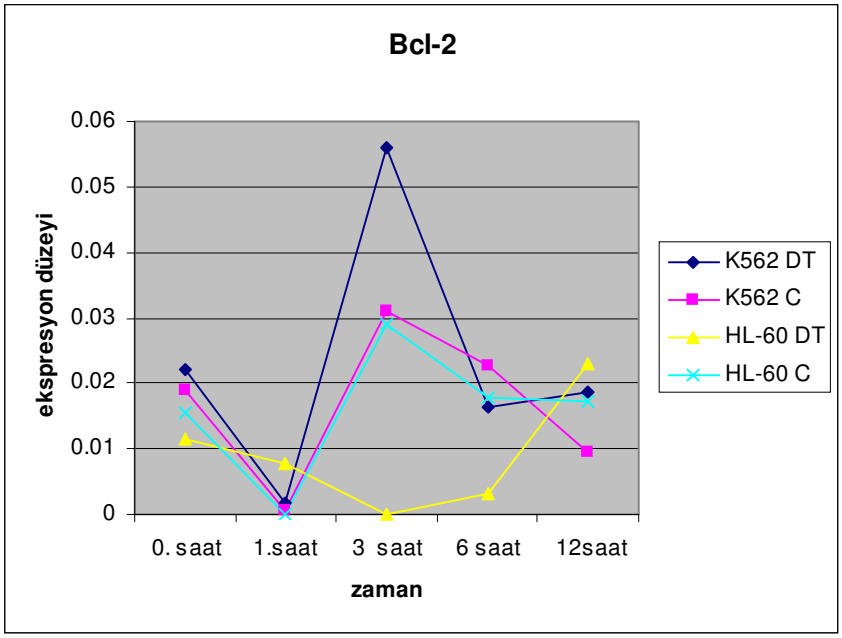
Şekil 4-8: Kaspaz-9 geni ekpresyonunun tüm hücre gruplarında göreceli ekspresyon değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafik.



Şekil 4-9: Kaspaz-3 geni ekpresyonunun tüm hücre gruplarında göreceli ekspresyon değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafik.



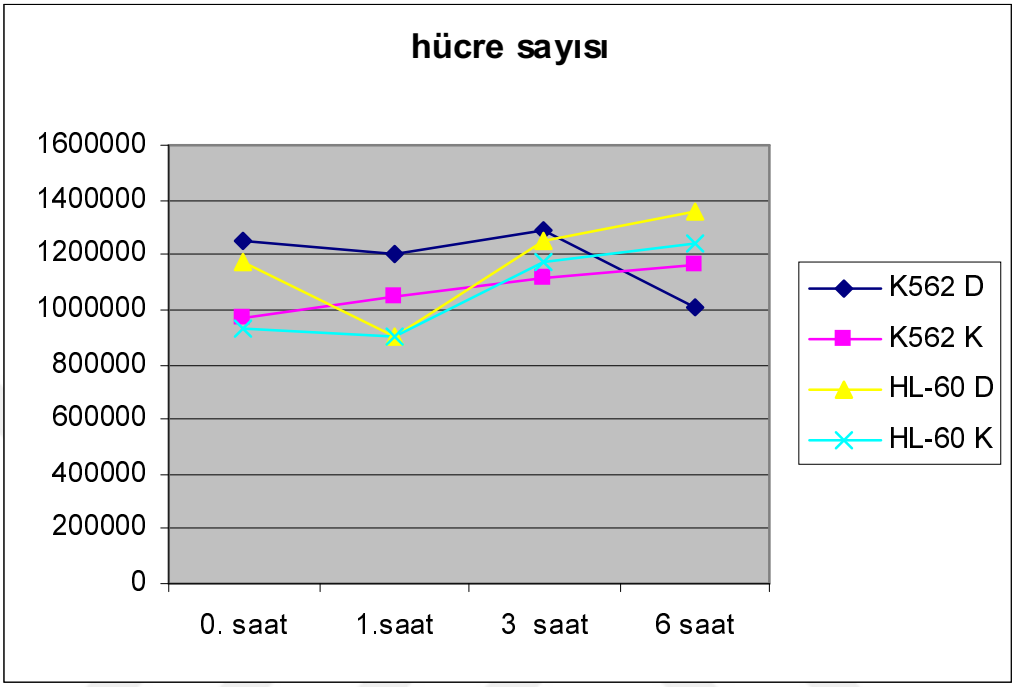
Şekil 4-10: Sitokrom C geni ekpresyonunun tüm hücre gruplarında göreceli ekspresyon değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafik.



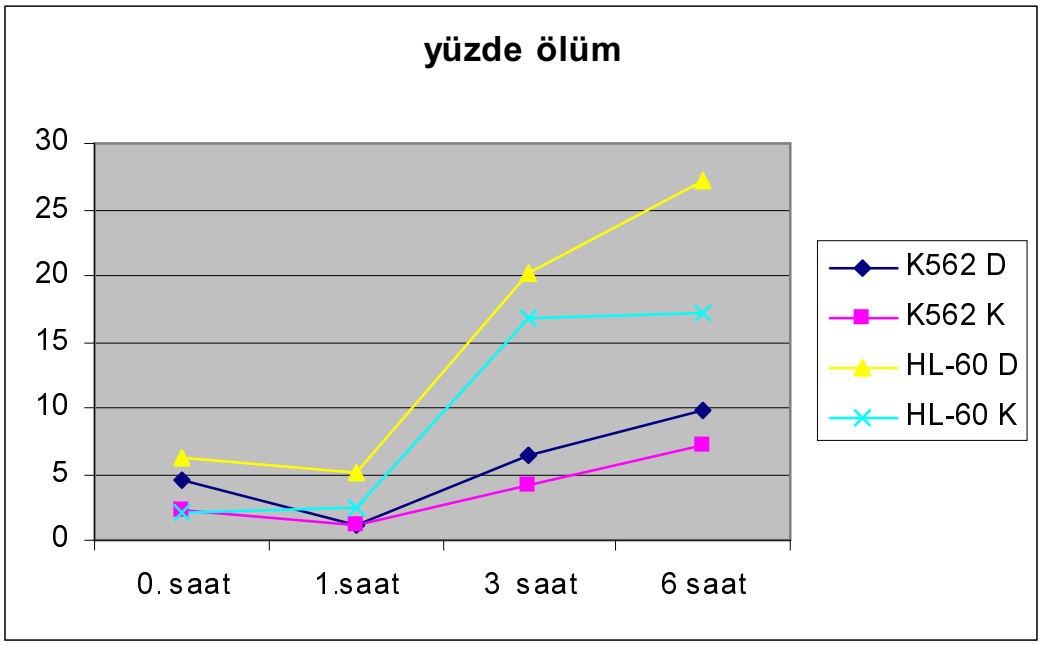
Şekil 4-11: Bcl-2 geni ekpresyonunun tüm hücre gruplarında göreceli ekspresyon değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafik.

Tablo 4-4: Hücre sayımı sonuçları ve canlılık tayini sonuçları.

	hücre sayısı	toplam	ölü	yüzde ölüm
01- K562 DT (0.saat)	**1.252.500**	**88**	**4**	**4,55**
02- K562 K (0.saat)	**967.500**	**88**	**2**	**2,27**
03- HL-60 DT (0.saat)	**1.177.500**	**96**	**6**	**6,25**
04- HL-60 K (0.saat)	**930.000**	**93**	**2**	**2,15**
05- K562 DT (1.saat)	**1.200.000**	**82**	**1**	**1,22**
06- K562 K (1.saat)	**1.042.500**	**93**	**1**	**1,08**
07- HL-60 DT (1.saat)	**900.000**	**79**	**4**	**5,06**
08- HL-60 K (1.saat)	**900.000**	**81**	**2**	**2,47**
09- K562 DT (3.saat)	**1.290.000**	**77**	**5**	**6,49**
10- K562 K (3.saat)	**1.117.500**	**98**	**4**	**4,08**
11- HL-60 DT (3.saat)	**1.252.500**	**153**	**31**	**20,26**
12- HL-60 K (3.saat)	**1.170.000**	**77**	**13**	**16,88**
13- K562 DT (6.saat)	**1.005.000**	**164**	**16**	**9,76**
14- K562 K (6.saat)	**1.162.500**	**200**	**39**	**19,5**
15- HL-60 DT (6.saat)	**1.357.500**	**334**	**91**	**27,25**
16- HL-60 K (6.saat)	**1.237.500**	**169**	**29**	**17,16**



Şekil 4-12: Hücre sayımı sonuçlarının zamanla değişimi.



Şekil 4-13: Hücrelerin ölüm yüzdelerinin zamanla değişimi.

5. TARTIŞMA

Difteri Toksini (DT), toksik etkisini ribozomlarda polipeptid molekülünün uzamasında rol alan ökaryotik elongasyon faktörü 2 (eEF2)'yi inaktive ederek ya da bir başka deyişle NAD'nin varlığında eEF2'yi ADP-ribozilleyerek inaktifleştirip protein sentezinin durmasına yol açar (52). DT, protein sentezi inhibisyonu yanı sıra hücre iskeletinin yıkımına ve nükleozomlararası DNA kırılmasına sebep olur (57). Ancak, protein sentezinin inhibisyonu ile toksine bağlı hücre ölümü arasındaki ilişki tam açıklığa kavuşmuş değildir. K562 hücre soyunda, DT protein sentezi etkin biçimde durdurmasına karşın, sitotoksik (hücreleri öldürücü) bir etki göstermez. Bu da DT'nin sitotoksik etkisinin yalnızca protein sentezinin durmasıyla açıklanamayacağını düşündürmektedir.

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), çok hücreli organizmalarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edip organizmanın iç dengesinin devamlılığını sağlayan fizyolojik bir olaydır (1,2). Apoptoz; büzülme, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve hücrenin fagositozla ortadan kaldırılması aşamalarını içerir (4). Bu süreçte, kaspaz ailesi üyeleri ile Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları önemlidir.

Bu çalışmada difteri toksininin apoptotik süreçte aldığı rolün ortaya çıkarılabilmesi için apoptotik süreçte rol alan Caspase-3, Caspase-9, Bcl-2 ve Sitokrom C genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir. Bu amaçla Difteri Toksinine dirençli K562 hücreleri ile Difteri Toksinine duyarlı HL-60 hücrelerinde söz konusu genlerin mRNA düzeyinde ekspresyonları gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemiyle DT varlığında ve yokluğunda incelenmiştir.

Bulguları tartışmaya geçmeden önce, kullanılan yöntemin ekspresyon analizi ile ilgili olası sorunlarını tartışmakta yarar vardır. Bu çalışmada söz konusu genlerin mRNA düzeyinde ekspresyonları gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemiyle incelenmiş ve elde edilen veriler protein düzeyinde doğrulanmamıştır. Bu nedenle verilerin, bundan sonraki araştırılmaların planlanmasına zemin hazirlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Bu çalışma sonucunda; K562 hücrelerinde DT konmuş hücrelerdeki Sitokrom C geninin ekspresyonunun DT konmamış kontrol hücrelerinkine göre daha az olduğu gözlenmiştir. HL-60 hücrelerinde ise DT konmuş hücrelerde Sitokrom C geninin ekspresyonu kontrol hücrelerinkine göre çok daha fazla azaldığı gözlenmiştir. Bu durum K562 hücrelerinin DT'ne dirençli olması HL-60 hücrelerinin duyarlı olması ile ilgili olabilir. K562 hücrelerinde DT konmuş hücrelerdeki Bcl-2 geninin ekspresyonunun DT konmamış kontrol hücrelerinkine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. HL-60 hücrelerinde ise DT varlığında Bcl-2 geninin ekspresyonu yok denecek kadar az, Sitokrom C ekspresyonu ise kontrol hücrelerine göre çok düşük bulunmuştur. Bcl-2 antiapoptotik bir gen olduğundan apoptoza giden hücrelerde mRNA sentezinin az olması beklenen bir sonuçtur. Apoptozda mitokondriden salınarak Kaspaz yolağının aktifleşmesine sebep olan Sitokrom C ekspresyonunun bu çalışmada düşük çıkması bu yolağın çalışmadığı anlamına gelmeyebilir. Çünkü mitokondri içindeki mevcut Sitokrom C'nin sitoplazmaya salınması konusunda mRNA düzeyi yeterli bilgi vermemektedir. Bunun için protein düzeyinde çalışılması yararlı olacaktır ya da burada apoptotik süreç mitokondri üzerinden değil de diğer bir yolaktan Kaspaz aktivasyonu sonucu oluşmuş olabilir.

HL-60 hücrelerinde DT konmuş hücrelerdeki Kaspaz-9 geninin ekspresyonunun DT konmamış kontrol hücrelerinkine göre yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. Apoptotik bir gen olan Kaspaz-9'un ekspresyonu K562 hücrelerinde ise DT varlığında kontrol hücrelerinkine göre gecikmeyle ama yaklaşık olarak aynı miktarda olmuştur. Ayrıca hem K562 hem HL-60 hücrelerinde DT varlığında Kaspaz 3 geninin ekspresyonu 0. ve 3. saatler aralığında anlamlı bir şekilde artmaktadır. Her iki hücre tipinde de Kaspaz 9 geninin ekspresyonunda Kaspaz-3'e göre gen ekspresyonu çok daha azdır. Tüm bu çalışmalarda mRNA düzeylerindeki artış 3.saatlere denk gelmekte olup bunun üzerinde düşünülmesi daha fazla örnekte çalışılması sonuçları daha anlamlı kılacaktır.

Bu çalışmanın verilerinin, mRNA düzeyinde ekspresyonuna baktığımız genlerin protein düzeyinde de aynı zaman diliminde ve aynı miktarda DT varlığında farklı yöntemlerle karşılaştırılması uygun olacaktır.

Difteri Toksininin B fragmanının, Bcl-2 ailesinin temsilcileri ile önemli dizi benzerliğine sahip olduğu ortaya konmuştur (38). Bu benzerlikler Bcl-2 proteinlerinin

apoptotik temsilcilerinin mitokondri zarında kanallar açtığı düşüncesinin ilk kanıtları olarak değerlendirilmiştir. Ancak, DT'nin hücre içindeki akıbeti bilinmemektedir. Bu durumda FB mitokondri zar geçirgenliğini arttırıyorsa bunun sonucunda mitokondriden Sitokrom C'nin salınmasıyla apoptoz gerçekleşecektir.

Çalışmamızda elde edilen ekspresyon değerleri, her hücrede ifade edilen ve 'housekeeping' gen olarak kabul edilen diğer bir gen ile karşılaştırılarak göreceli olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber, bulgular bölümünde de tartışıldığı gibi hedef gende çoğaltılan ürünün büyüklüğü, hedeflenen genom bölgesi ve diğer PCR reaksiyonu değişkenlerine bağlı olarak, PCR etkinliği de ekspresyon değerleri üzerine etkili olmaktadır. Bu sonuçta, çoğaltılan ürünün diğerlerinden büyüklüğü ve/veya diğer PCR değişkenleri rol oynamış olabilir.

Buna bağlı olarak, hücre soyu ile laboratuar koşullarında elde edilen sonuçların farklılıklar içermesi beklenebilir. Mevcut koşullarda, protein düzeyinde ekspresyonun incelenmesi sorunun aydınlatılmasına yardımcı olacaktır. Bu verilerin mutlaka apoptotik hücrelerde hem mRNA hem de protein ekspresyonu düzeyinde doğrulanması gereklidir. Bu nedenle, verilerimizin diğer koşullarda da doğrulanması, kanser araştırmaları için de önemli bir konuyu gündeme getirecektir.

Çalışmamızın sonuçlarının bundan sonraki araştırmaların planlanmasına zemin hazırlayacak öncü veriler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bras, M., Oueenan, B., Susin, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc).* 2005; **78**: 232-239.

2. Song, Z., Steller, H. Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1999; **9**: 49-52.

3. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Cruie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972; **26**: 239-257.

4. Clarke, P.G.H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat.Embryol*. 1990; **181**: 195-213.

5. Schweichel, J.U., Merker, H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; **7**:253-266.

6. Hızel N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; **6**: 196-7.

7. Bylinsky G. Cell suicide: the birth of a mega- market. *Fortune* 1995; **131**: 75-6.

8. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; **4**: 332-9.

9. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics* 1999; **33**: 29-55.

10. Kidd VJ. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual Review of Physiology* 1998; **60**: 533-73 .

11. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; **8**: 1-5.

12. King KL, Cidlowski JA.Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology* 1998; **60**: 601-17.

13. Büyükgebiz O, Caferler JS. *Apoptoz. Sendrom* 2001; **13**: 102-7.

14. Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual Review of Physiology* 1998; **60**: 575-600.

15. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1999; **15**: 269-90.

16. Hart S. The drama of cellular death. Bioscience 1994; **44**: 451-5.

17. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell. New York: Garland* Publishing. 1994: 1076.

18. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication of The American College of Chest Physicians (CHEST)* 2000; **117**: 1771-7.

19. Thompson EB. Apoptosis. *Annual Review of Physiology* 1998; **60**: 525-32 .

20. Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health and Research World* 1997; **21**: 325-30.

21. Hetts SW. To die or not to die.*The Journal of The American Medical Association (JAMA)* 1998; **279**: 300-7.

22. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; **266** :699-717.

23. Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology* 1997; **59**: 349-63.

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

25. Gilchrist, D.G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 1998; **36**: 393-414.

26. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* 1998; **16**: 395-419.

27. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/(Clinical Research Ed.) (BMJ)* 2001; **322**: 1536-8.

28. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annual Review of Microbiology* 1999; **53**: 577-628.

29. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2000; **14**: 1340-44.

30. Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmler, M., Schaerer, E., Martinou, J. C., and Tschopp, J. The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J. Cell Biol*. 1994; **126**: 1059-1068.

31. Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T., and Reed, J. C. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem*. 1995; **270**: 11962-11969.

32. Hunter, J. J., Bond, B. L., and Parslow, T. G. Functional dissection of the human Bc12 protein: sequence requirements for inhibition of apoptosis. *Mol. Cell. Biol*. 1996; **16**: 877-883.

33. Huang, D. C., Adams, J. M., and Cory, S. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J.* 1998; **17**: 1029-1039.

34. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; **97**: 3100-3105.

35. Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., and Tsujimoto, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem* 2000*;* **275**: 12321-12325.

36. Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L., and Fesik, S. W. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; **381**: 335-341.

37. Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. () *Science* 1997*;* **275**: 983-986.

38. Eichhorst ST, Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. *The Lancet* 2001; **358**: 345-6.

39. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)* 2001; **98**: 13884-8.

40. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* 2000; **69**: 217-45.

41. Clark Anat. *Embryol.*1990; **181**: 195-213.

42. Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemerson, R., and Wang, X. *Cell* 1996; **86**: 147-157.

43. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. *Cell* 1997; **90**: 405-413.

44. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X. Lutschg, A., and Wang, X. *Cell* 1997*;* **90**: 405-413.

45. Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., and Cohen, G.M. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* 1999; **274:** 22686-22692.

46. Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, c., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X. M. and Cohen, G.M. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem*. 2000; **275**: 6067-6070.

47. Bratton, S.B., Walker, G., Srinivasula, S.M., Sun, X. M., Alnemri, E. S., and Cohen, G.M. *EMBO J*. 2001; **20**: 998-1009.

48. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch , M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, GE., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; **102**: 43-53.

49. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. *Cell* 2000; **102**: 33-42.

50. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; **397**: 441-446.

51. Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C., and Kroemer, G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 2000; **192**: 571-580.

52. Collier RJ. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century.*Toxicon* 2001; **39**: 1793-803.

53. Sandvig K, Olsnes S. Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol*. 1980; **87**: 828-32.

54. Draper, R.K, Simon, MI. *J Cell Biol*. 1980; **87**: 849-54.

55. Pappenheimer. AM.**,** Gill DM. *Science*. 1973 ; **26** : 353-358.

56. Collier RJ.. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* 1975; **39**: 54-85.

57. Kusano,I., Kageyama,A., Tamura, T., Oda, T., Muramatsu, T. Enhancement of diphtheria toxin-induced apoptosis in Vero cells by combination treatment with brefeldin A and okadaic acid. *Cell Struct Funct*. 2001; **26**: 279-288.

58. Nakamura, L.T., and Wisnieski, B.J. Characterization of the deoxyribonuclease activity of diphtheria toxin. *J. Biol.Chem*. 1990; **265**: 5237-5241.

59. Lessnick, S.L., Lyczak, J.B., Bruce, C., Lewis, D.G., Kim, P.S., Stolowitz, M.L.,Hood, L., and Wisnieski, B.J. Localization of diphtheria toxin nuclease activity to fragment A. *J. Bact.* 1992; **174**: 2032-2038.

60. Johnson, C.R., Jiffer, T., Fischer, U.M., Ruvolo, P.P., Jarvis, W.D. Requirement for SAPK-JNK signaling in the induction of apoptosis by ribosomal stress in REH lymphoid leukemia cells. *Leukemia.* 2003; **17:** 2140-2148.

61. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell* 4th Edition 2002; **17:** 1011.

ETİK KURUL KARARI