

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MESİAL TEMPORAL SKLEROZDA HÜCRE ÖLÜM VE SAĞ KALIM  
MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ**

**Uzm. Dr. Neşe DERİCİOĞLU**

**Nöroelektrofizyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2006**

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MESİAL TEMPORAL SKLEROZDA HÜCRE ÖLÜM VE SAĞ KALIM  
MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ**

**Uzm. Dr. Neşe DERİCİOĞLU**

**Nöroelektrofizyoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. Abdurrahman CİĞER**  
**Prof. Dr. Serap SAYGI**

**ANKARA**

**2006**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Nöroelektrofizyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof Dr Abdurrahman Ciğer  
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof Dr Abdurrahman Ciğer  
Hacettepe Üniversitesi

Prof Dr Serap Saygı  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof Dr Erhan Bilir  
Gazi Üniversitesi

Üye: Prof Dr Mehmet Demirci  
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof Dr Turgay Dalkara  
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof Dr Hakan S Orer  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Nöroloji eğitimimden sonra beni Nöroelektrofizyoloji doktora programına yönlendirerek gerek klinik elektrofizyoloji, gerek epilepsi konusundaki bilgi ve deneyimlerimi arttırma fırsatı veren, sayın tez hocalarım Prof Dr Serap Saygı ve Prof Dr Abdurrahman Ciğer'e en derin teşekkürlerimi sunuyorum. Beyin Araştırma Laboratuvarı'ndaki deneysel çalışmalarım sırasında zengin bilgi birikimiyle bana yön gösteren ve laboratuvarındaki teknik olanakları kullanma fırsatı sunan sayın hocam Prof Dr Turgay Dalkara'ya ve Patoloji AD'dan, özellikle teknik konulardaki yardımını esirgemeyen hocam Prof Dr Figen Söylemezoğlu'na çok teşekkür ediyorum. Yine Patoloji AD'nda görevli teknik elemanlara, çalışmalarım sırasında gösterdikleri kolaylıklar ve cömertlik için teşekkür etmek istiyorum. Ve son olarak, eğitimime her zaman büyük önem ve sınırsız destek veren sevgili aileme yanımda oldukları için çok çok teşekkür ediyorum.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 0201101005)

## ÖZET

**Dericioğlu, N., Mesial temporal sklerozlu hastaların hippocampal dokusunda hücre ölüm ve sağ kalım mekanizmalarının incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nöroelektrofizyoloji Programı Doktora Tezi. Ankara, 2006.** Hippocampal skleroza bağlı temporal lob epilepsisi (mesial temporal lob epilepsi sendromu) en sık görülen fokal epilepsi türüdür. Mesial yapıların cerrahi rezeksiyonu hastaların % 60-80'inde büyük ölçüde nöbet kontrolü sağlamaktadır. Bu da hippocampal sklerozda görülen ağır derecedeki seçici nöron kaybı ve sinaptik reorganizasyonun nöbetlerin oluşumu ve devamı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle hücre kaybını engellemenin, hastalığın ilerleyici seyri üzerinde olumlu yönde etki yapması mümkündür. Bu çalışmada, hücre ölümünde apoptotik mekanizmaların ne şekilde rol oynadığı ve hücre sağ kalımında bazı koruyucu yolların nasıl düzenlendiğini araştırmak amaçlanmıştır. Merkezimizde 2001-2003 yılları arasında MTLES nedeniyle anterior temporal lobektomi ve amigdalohippocampektomi geçiren ve rasgele seçilen 25 hastada pro-apoptotik ve anti-apoptotik mekanizmalarda rol oynayan bazı anahtar moleküllerin hippocampal dokudaki varlığı incelenmiştir. Apoptotik hücre ölümü için Bax (intrinsik apoptotik yol), tBid (ekstrinsik apoptotik yol) ve AIF (non-kaspaz yolu) antikorumları; hücre sağ kalım mekanizmaları için ise apoptozu baskılayan proteinlerden c-IAP1, c-IAP2 ve Hsp70 antikorumları kullanarak immünohistokimyasal yöntemlerle deneyler yapılmış ve hippocampusun farklı anatomik bölgelerinde (CA1, CA2, CA3, dentat girus, hilus ve subiculum) boyanan hücrelerin oranı tespit edilmiştir. Sonuçlar, epileptik olmayan otopsi kontrol verileriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. İncelemeler sonucunda Bax ve tBid immünreaktivitesinin hasta popülasyonunda anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık AIF'in nükleer translokasyonunun olmadığını görülmüştür. c-IAP1 ve c-IAP2 ekspresyonu sadece hasta grubunda meydana gelirken Hsp70 immünreaktivitesi kontrollere kıyasla hastalarda anlamlı derecede artmış olarak saptanmıştır. Elde edilen bulgular mesial temporal lob epilepsi sendromu hastalarında hippocampal dokuda apoptotik hücre ölüm yollarının aktive olduğunu göstermektedir. Buna karşılık sağ kalan nöronlarda apoptotik ölüm yollarını frenleyen bazı proteinlerin de önemli oranda arttığı anlaşılmaktadır ve literatür verilerini destekler niteliktedir. Ancak c-IAP1 ve c-IAP2 proteinlerinin mesial temporal sklerozlu hasta hippocampusundaki rolü ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Mesial temporal lob epilepsi sendromunda görülen ağır nöron kaybı ve ilerleyici hastalık seyrini yavaşlatmak/durdurmak amacıyla pro-apoptotik molekülleri baskılayan veya anti-apoptotik protein sentezini uyaran yeni tedavi stratejileri geliştirmek mümkün gibi görünmektedir.

Anahtar kelimeler: epilepsi, mesial temoral skleroz, apoptoz  
Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B. (0201101005)

## ABSTRACT

**Dericioğlu, N., Cell death and survival mechanisms in the hippocampal tissue of patients with mesial temporal sclerosis. Hacettepe University Institute of Health Sciences. PhD thesis in Neuroelectrophysiology. Ankara, 2006.** Temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis (mesial temporal lobe epilepsy syndrome) is the most common type of focal epilepsy. Surgical resection of the mesial temporal structures renders 60-80 % of these patients seizure free. This finding supports the idea that the severe neuronal loss observed in the hippocampus may somehow lead to synaptic reorganization and thus contribute to the progressive nature of the disease. Therefore prevention of cell loss may slow down or prevent epileptogenesis and seizure occurrence. In this study we aimed to investigate the pro-apoptotic and anti-apoptotic mechanisms, in cell death and survival respectively, in epileptic human hippocampi. Twenty five patients were selected randomly among those who underwent anterior temporal lobectomy with amygdalohippocampectomy due to mesial temporal lobe epilepsy in our center between 2001-2003. We applied immunohistochemical techniques and for cell death, we investigated the presence of pro-apoptotic molecules Bax (intrinsic apoptotic pathway) and tBid (extrinsic apoptotic pathway) in the tissue. Additionally we looked for the nuclear translocation of AIF, which is presumed to be a caspase independent pathway. Regarding the mechanisms of cell survival, we searched for the expression profile of the following proteins: c-IAP1, c-IAP2 and Hsp70. Cells that were stained were counted in different regions of the hippocampus, namely CA1, CA2, CA3, dentate gyrus, hilus and subiculum. The results were compared with non-epileptic autopsy controls. We observed that Bax and tBid immunoreactivity were significantly increased in patient hippocampi. There was no nuclear translocation of AIF. c-IAP1 and c-IAP2 were absent in control hippocampi whereas the expression was dramatic in the patients in all hippocampal subfields. Finally, Hsp70 immunoreactivity was significantly increased in all surviving neurons in patient hippocampi and degenerating neurons failed to express Hsp70 at all. Our findings indicate that both pro-apoptotic and anti-apoptotic mechanisms are activated in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. Future investigations may provide novel therapeutic strategies that will inhibit pro-apoptotic cell death or promote anti-apoptotic cell survival mechanisms.

Key words: epilepsy, mesial temporal sclerosis, apoptosis

Supported by H.Ü.B.A.B (0201101005)

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mesial Temporal Lob Epilepsi Sendromu	4
2.2. Mesial Temporal Yapıların Anatomisi	6
2.3. Mesial Temporal Lob Epilepsisinin Patofizyolojisi	8
2.4. Mesial Temporal Lob Epilepsisinde nöron kaybı	13
2.5. Apoptozun tanımı	14
2.6. Apotozda genel mekanizmalar	15
2.7. Kaspazlar (Sistein aspartat spesifik proteazlar)	17
2.8. Bcl-2 Ailesi Proteinleri	17
2.9. AIF	20
2.10. Apoptoz baskılayıcı proteinler (IAP ailesi)	22
2.11. İnsanlarda IAP ekspresyonu ve fonksiyonları	23
2.12. Kaspaz inhibitörü olarak IAP'lar	24
2.13. Apoptozun düzenlenmesinde HSPler	25
2.14. Hsp aracılı apoptoz inhibisyonu	26
2.14.1. İntrinsik Apoptotik Yol modülasyonu	26
2.14.2. Ekstrinsik Apoptotik Yol modülasyonu	27
2.14.3. Apoptotik sinyalizasyonda Hsp'lerin rolü	29
2.15. Epilepsi ve Apoptoz	30
2.15.1. Deneysel Epilepsi Modellerinde Apoptotik Yollar	30
2.15.2. Epilepsi hastalarında apoptotik yollar	36

3. BİREYLER VE YÖNTEM	39
3.1. Hasta seçimi	39
3.2. İmmünohistokimya çalışmaları	41
3.3. Hücre sayımı	43
3.4. İstatistik	43
4. BULGULAR	44
4.1. MTS hipokampusunda genel bulgular	44
4.2. Bax bulguları	44
4.3. c-IAP1 ve c-IAP2 bulguları	44
4.4. AIF bulguları	44
4.5. Hsp70 bulguları	45
4.6. tBid bulguları	45
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR	62
KAYNAKLAR	64

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	: apoptosis inducing factor
Apaf-1	: apoptotic protease activating factor-1
Ask-1	: apoptosis signal regulating kinase 1
BH	: Bcl-2 homology
BIR	: baculoviral IAP repeat
BSA	: bovine serum albumin
CA	: Cornu Ammunis
CAD	: caspase activated DNAase
CARD	: caspase recruitment domain
CREB	: cAMP response-element binding
DAP	: death associated protein
Daxx	: Death associated protein
DD:	death domain
DED	: death effector domain
DG	: Dentat girus
DISC	: death inducing signalling complex
DR	: death receptor
EAY	: ekstrinsik apoptotik yol
ER	: endoplazmik retikulum
FAD	: flavin adenine dinucleotide
FADD	: Fas associated death domain
FasL	: Fas ligandı
FDG-PET	: Fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography
FK	: febril konvulziyon
FKHR	: Forkhead in rhabdomyosarcoma
FLIP	: FADD-like interleukin converting enzyme inhibitory protein
GFAP:	: glial fibriler asidik protein
HS	: hippokampal skleroz
Hsp	: heath shock protein
IAP	: inhibitor of apoptosis protein
ICAD	: inhibitor of caspase activated DNAase
IGF-1	: insulin-like growth factor-1
I $\kappa$ B	: inhibitor- $\kappa$ B
IKK	: inhibitor- $\kappa$ B kinase
İAY	: intrinsik apoptotik yol
JNK	: c-JUN-N-terminal kinase
KA	: kainik asit
MAP	: mitogen activated protein
MLS	: mitochondrial localization sequence
MRG	: manyetik rezonans görüntüleme
MTLES	: Mesial Temporal Lob Epilepsi Sendromu
NAD(P)H	: nicotinamide-adenine dinucleotide (phospho) dehydrogenase
NeuN:	: nöron spesifik nükleer protein
NGF	: nerve growth factor
NF- $\kappa$ B	: nuclear factor- $\kappa$ B

NMDA	: N-methyl-D-aspartate
PARP	: poly-ADP-ribose polymerase
PBS	: phosphate buffered saline
PDGF	: platelet derived growth factor
PI3K	: phosphatidylinosito 3-kinase
PKA	: protein kinase A
pNFP:	: fosforile nörofilaman protein
RIP	: Receptor interacting protein
ROCK1	: Rho kinase 1
Smac/Diablo	: second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI)
SODD	: silencer of death domain
SPECT	: single photon emission computed tomography
Tbid	: truncated Bid
TLE	: Temporal lob epilepsisi
TNF	: tumor necrosis factor
TNFR	: TNF receptor
TRADD	: TNF receptor associated death domain
TRAIL	: TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL	: TNF related apoptotsis inducing ligand
TUNEL	: terminal deoxynucleotidyl dUTP nick-end labelling
UBC	: ubiquitin conjugating

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Mesial temporal sklerozda kranial MRG görüntüsü	5
2.2. Hippokampusun şematik görüntüsü	7
2.3. Normal insan hippokampusunun histolojik görüntüsü	8
2.4. Hippokampusun iç yapısındaki sinaptik bağlantılar	9
2.5. Mesial temporal sklerozlu hastada hippokampusun histo-patolojik görüntüsü	13
2.6. Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar	16
2.7. Bcl-2 ailesi üyeleri	18
2.8. İnsanlarda IAP ailesi üyeleri	23
2.9. Ekstrinsik apoptotik yolda Hsp'lerin görevi	27
4.1. Otopsi ve MTS hippokampusu CA1 bölgesinde Bax boyanması	48
4.2. Otopsi ve MTS hippokampusu dentat girus ve CA4 bölgesinde Bax boyanması	49
4.3. Otopsi ve MTS hippokampusu CA2 bölgesinde c-IAP1 boyanması	50
4.4. Otopsi ve MTS hippokampusu dentat girus ve CA4 bölgesinde ve MTS subikulumunda c-IAP1 boyanması	51
4.5. Otopsi ve MTS hippokampusu CA2 bölgesinde c-IAP2 boyanması	52
4.6. Otopsi ve MTS hippokampusu dentat girus ve CA4 bölgesinde ve MTS subikulumunda c-IAP2 boyanması	53
4.7. Otopsi ve MTS hippokampusu CA4 bölgesinde AIF boyanması	54
4.8. Otopsi ve MTS hippokampusu dentat girus ve CA4 bölgesinde ve MTS CA2 bölgesinde Hsp70 boyanması	55
4.9. Otopsi ve MTS hippokampusu dentat girus ve CA4 bölgesinde tBid boyanması	56

**TABLÖLAR**

	Sayfa
3.1. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri	40
3.2. Çalışmada kullanılan antikorlar için uygulanan teknik koşullar	42
4.1. Bax antikorı ile elde edilen bulguları	45
4.2. c-IAP1 antikorı ile elde edilen bulguları	46
4.3. c-IAP2 antikorı ile elde edilen bulguları	46
4.4. tBid antikorı ile elde edilen bulguları	47

## GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi çeşitli nedenlere bağlı olarak gelişen ve tekrarlayan nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Yüzde bire yaklaşan prevalansı ile epilepsi, toplumda en sık görülen nörolojik hastalıklardan biridir. Erişkin epilepsi hasta popülasyonunun % 75'ini parsiyel epilepsiler oluşturmaktadır. Parsiyel nöbetler çoğunlukla temporal lobdan kaynaklanmaktadır. Temporal lob epilepsileri (TLE) arasında en sık gözlenenini ise hippocampal sklerozla birlikte giden mesial temporal lob epilepsi sendromudur (MTLES).

Mesial temporal lob epilepsi sendromunun kendine özgü klinik belirtileri, laboratuvar bulguları, etiyoloji, patogenezi ve klinik gidişi bulunmaktadır. Cerrahi tedaviye oldukça iyi yanıt veren MTLES'nin klinik ve laboratuvar bulguları pek çok araştırma neticesinde oldukça ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Hastaların öyküsünde uzamış febril konvulziyon (FK) ve ailede epilepsi görülme oranı yüksektir. Özellikle 4 yaşın altında geçirilen FK, kafa travması, enfeksiyon gibi etkenleri takiben tekrarlayan nöbetler genellikle ilk dekadın ikinci yarısında ortaya çıkar. Birkaç yıllık remisyonu takiben adölesan dönemde yeniden ortaya çıkan bu nöbetler çoğunlukla ilaca dirençlidir. En sık görülen nöbet tipi kompleks parsiyel nöbetlerdir. Yakın hafıza kusuru dışında bu hastaların nörolojik muayeneleri genellikle normaldir. En fazla kullanılan görüntüleme yöntemi olan MRG'de tek taraflı hipokampal atrofi, anterior temporal lob atrofisi ve dilate temporal horn görülür. Nöbetler genellikle hipokampustan kaynaklanır ancak epileptojenik alan daha geniştir. Farklı serilerde, postoperatif takip süresi ile de ilişkili olarak farklı prognostik rakamlar verilmesine rağmen genellikle anterior temporal lobektomiye takiben hastaların % 70-80'inde nöbet kontrolü sağlanmaktadır.

Epilepsi ile beyin hasarı arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Deneysel ve klinik çalışmalar uzamış nöbetlerin veya status epileptikus durumunun beyinde nöronal kayba yol açtığını göstermektedir. Beynin diğer bölgelerinde (serebral korteks, serebellum) de nöronal hasar görülmekle

birlikte gözlenen en sık patolojik bulgu hippocampusun Cornu Ammonis (CA) sektörlerindeki hücre kaybıdır (1). Klinik pratikte epilepsinin nedenlerini sonuçlarından ayırt etmek genellikle güçtür. Ancak yüksek rezolusyonlu nöro-görüntüleme yöntemleri, nöbet geçirmeye devam eden epilepsi hastalarında hasarın ilerlemekte olduğunu ortaya koymuştur (2-5). Nöbetlerin devamı, özellikle hafıza fonksiyonları başta olmak üzere, kognitif yıkıma da neden olur (4). Bu nedenlerden dolayı nöbetlerin tetiklediği nöronal ölümün moleküler mekanizmalarını belirlemeye yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Özellikle son zamanlarda hippocampal nöron kaybında apoptotik mekanizmaların önemli rol oynayabileceğine dair veriler elde edilmektedir. Bilindiği gibi apoptosis, bir dizi intrasellüler kaskadın tetiklenmesi sonucunda aktif olarak gerçekleştirilen ve nekrozdan farklı olarak inflamatuvar yanıtın gözlenmediği bir hücre ölüm şeklidir. Aktif protein sentezini gerektiren bu hücre ölüm şekli kaspaz (tümü apoptotik) ve Bcl-2 (bazıları apoptotik, bazıları antiapoptotik) ailelerine mensup proteinler tarafından gerçekleştirilir. Apoptosis en az iki ayrı ölüm yolundan biriyle meydana gelir: ekstrinsik yol ve intrinsik yol. Ekstrinsik yolda, hücre membranında yer alan TNF reseptör ailesine üye bazı reseptörlere uygun ligandın bağlanması sonucunda kaspaz 8 aktif hale getirilir. Aktive olan kaspaz 8, apoptotik substratları doğrudan kesebileceği gibi prokaspaz 3'ü aktive ederek de apoptotik substratların kesilmesinde rol oynayabilir. Ayrıca Bcl-2 ailesinden Bid'i keserek aktif formu olan tBid'e dönüştürür ve mitokondri üzerinden apoptotik süreci etkileyebilir. İntrinsik yolda ise herhangi bir nedenle meydana gelen DNA hasarı veya diğer bazı mekanizmalar Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik Bax'ı uyarır. Aktive olan Bax diğer bazı proteinlerin de yardımıyla mitokondri dışı membranında gözenekler açarak intermembranöz aralıkta bulunan sitokrom c'nin (ve diğer bazı pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin) sitoplazmaya geçmesine neden olur. Sitoplazmaya geçen sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz 9 ile birleşerek yine pro-kaspaz 3'ü aktive edecek olan apoptozomu meydana getirir. Bunların dışında bir diğer yol da her iki yolu devre dışı bırakarak (kaspaz aktivasyonunu gerektirmeyen)

mitokondrilerden salındıktan sonra direkt olarak nukleusa transloke olan ve DNA hasarı meydana getiren apoptoz indükleyici faktördür (AIF).

Bu çalışmada, nöbetlerin hangi ölüm yolu ile (ekstrinsik, intrinsik veya kaspazdan bağımsız AIF yolu) tetiklendiğini araştırmak amaçlanmıştır. Ekstrinsik apoptotik yol için tBid, intrinsik apoptotik yol için ise hücrelerde Bax'ın mitokondrial translokasyonuna bakılması, ayrıca kaspaz dışı ölüm yolu için AIF'in nükleusta lokalize olup olmadığının incelenmesi hedeflenmiştir.

Hippokampusun özellikle belli bölgelerinde ağır nöron kaybı olduğunu ifade etmiştik. Ancak yıllarca süren nöbetlere rağmen hippokampusta tam nöron kaybı olmamakta, özellikle de CA2 sektörü belirgin ölçüde korunmaktadır. Hayatta kalan hücrelerin kendilerini nasıl koruduğu ise bir diğer ilginç noktadır. Burada teorik olarak akla gelen olasılıklardan biri bu hücrelerin fazla miktarda anti-apoptotik molekül, *inhibitor of apoptosis protein* (IAP) ve *heat shock protein* (Hsp) sentezledikleridir.

Çalışmamızda, insan hippocampusunda az miktarda eksprese edildikleri bilinen c-IAP-1 ve c-IAP-2'nin (IAP ailesine üye iki anti-apoptotik protein) ekspresyona bakmak hedeflenmiştir. Yine Hsp ailesinden Hsp70'in hippokampal nöronlardaki varlığını incelemek amaçlanmıştır.

Elde edilecek veriler, MTLES hastalarında hippokampal hücre kaybı ve sağ kalım mekanizmalarını aydınlatmaya yardımcı olabilir. Nöronal hasarın ilerlemesini engellemeye yönelik olarak geliştirilecek tedavi stratejileri ise epileptogenezin engellenmesine/yavaşlatılmasına ve hastalarda gözlenen kognitif disfonksiyonun azalmasına katkıda bulunabilir.

## GENEL BİLGİLER

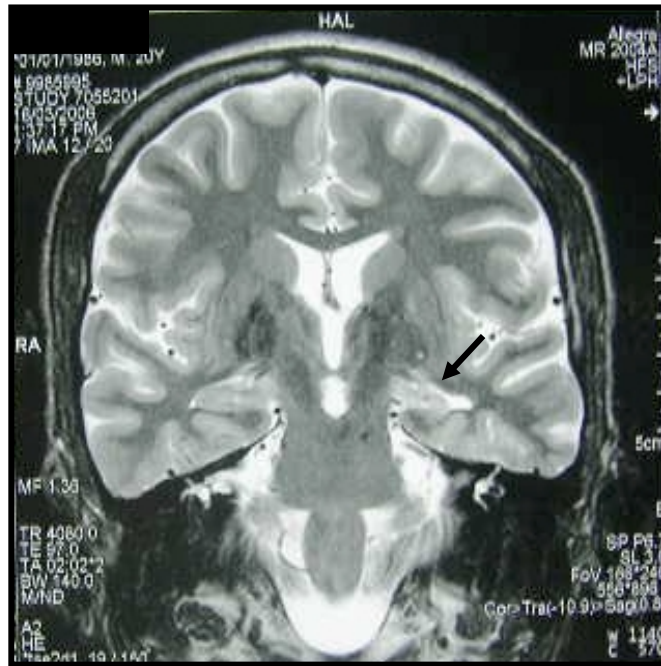
### 2.1. Mesial Temporal Lob Epilepsi Sendromu

Rezektif cerrahi tedaviye aday olan epilepsi hastalarının büyük bir kısmında nöbetler, tek hemisferde lokalize cerrahi rezeksiyona uygun epileptojenik lezyonlardan kaynaklanmaktadır. Epilepsi cerrahisinde en sık uygulanan operasyon türü anterior temporal lobektomidir ve en sık gözlenen lezyon hippokampal sklerozdur (6). Bu nedenle mesial temporal dokular üzerinde sayısız araştırmalar yapılmış ve patofizyolojik mekanizmaların aydınlatılmasına çalışılmıştır. Kendine özgü klinik özellikleri bulunan, ilaca dirençli kompleks parsiyel nöbetlere neden olan ve cerrahi tedaviye oldukça iyi yanıt veren MTLES pek çok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır (7,8).

Bu hastaların öyküsüne bakıldığında uzamış FK insidansının ve ailede epilepsi görülme oranının arttığı dikkati çekmektedir. Özellikle 4 yaşın altında geçirilen FK, kafa travması, enfeksiyon gibi etkenleri takiben tekrarlayan nöbetler genellikle ilk dekadın ikinci yarısında ortaya çıkmaktadır. Birkaç yıllık remisyonu takiben adölesan dönemde yeniden ortaya çıkan bu nöbetler çoğunlukla ilaca dirençlidir. Auralar sıktır ve bazen tek başına da gözlenebilirler. Buna karşılık sekonder jeneralize nöbetler daha seyrekdir. En sık gözlenen aura epigastrik yükselme hissi şeklindedir. Bunun yanı sıra koku ve tat duyusunda kısa süreli değişikliklere, korku vb psişik semptomlara da rastlanmaktadır. Kompleks parsiyel nöbetler genellikle motor hareketlerde duraklama ve boş bakma ile başlar. Oroalimenter ve kompleks otomatizmalar sıktır. İktal foküsün kontrolateralinde üst ekstremitede distonik postür gelişebilir. Postiktal dönemde oriyantasyon bozukluğu, yakın hafıza kusuru, disfazi (lisan için dominant olan hemisfer etkilendiğinde) sıklıkla gözlenir. İnteriktal dönemde ise davranış bozuklukları (genellikle depresyon) görmek mümkündür. Yakın hafıza kusuru dışında bu hastaların nörolojik muayeneleri genellikle normaldir. Ancak devam eden nöbetlerin kognitif yıkıma neden olabileceği öne sürülmüştür (4).

EEG incelemelerinde bazal elektrotlarda maksimum amplitüde sahip anterior temporalde lokalize unilateral veya bilateral epileptiform deşarjlar gözlenir. Unilateral mezial temporal alanda intermittan veya sürekli ritmik yavaşlama görmek de olasıdır. Kompleks parsiyel semptomlara eşlik eden ekstrakranial iktal deşarjlar çoğunlukla 5-7 Hz ritmik aktiviteden meydana gelir. Derin elektrotlarla yapılan çalışmalarda en sık gözlenen patern yüksek amplitüdü ritmik diken veya keskin dalgalardır. Geliştiği zaman kontrolateral tarafa propagasyon yavaşdır.

En fazla kullanılan görüntüleme yöntemi olan MRG'de tek taraflı hippocampal atrofi, küçük temporal lob ve dilate temporal horn gözlenmektedir (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Çalışma grubumuzdaki hastalardan birine ait olan koronal T2A MRG kesitinde sol hipokampusta belirgin atrofi ve hiperintensitenin yanısıra temporal hornun dilatasyonu görülmektedir.

İnteriktal FDG-PET çalışmalarıyla ipsilateral talamus ve bazal ganglionları içine alan temporal lob hipometabolizması tespit edilebilir. İnteriktal SPECT ile temporal lobda hipoperfüzyon, iktal SPECT ile de hiperperfüzyon saptanmaktadır. Nöropsikolojik testlerde materyal spesifik

hafıza kusuru, kontrolateral intrakarotid sodyum amobarbital enjeksiyonu (WADA testi) ile de amnezi gözlenmektedir. Anterior temporal lobektomiye takiben bu hastaların % 70-80'inde nöbetlerin sona erdiği bildirilmektedir (9).

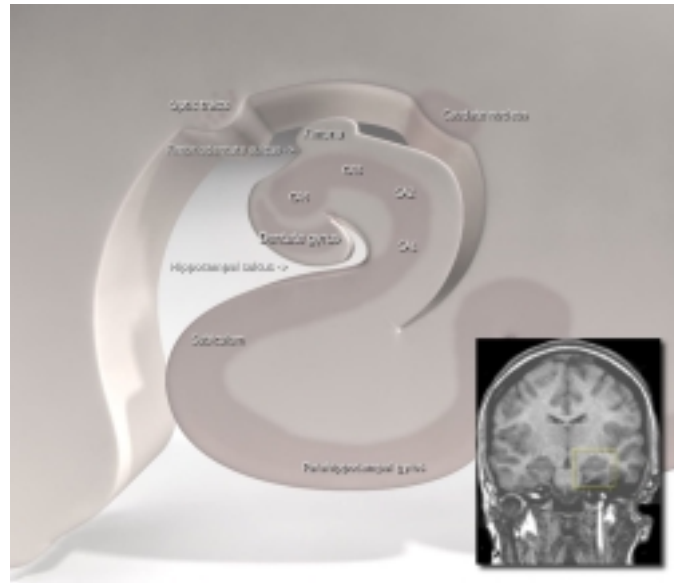
## 2.2. Mesial Temporal Yapıların Anatomisi

Hippokampusta gözlenen patolojik bulgulara geçmeden önce hippokampusun yapısını tanıtmakta yarar vardır. Hippokampal formasyon temporal lobun inferomesial bölgesinde yer alır. Entorinal korteks (parahippokampal girus), CA, Dentat girus (DG) ve subikulumdan oluşan fonksiyonel bir birimdir (Şekil 2.2) (10). Mesensefalona olan komşuluğundan dolayı yarım ay şeklindedir. Lateral ventrikülün inferior hornunun tabanında, kollateral sulkusun medialindedir. Hippokampal formasyon iç içe girmiş birkaç küçük girusun oluşturduğu kompleks bir yapıyı barındırır. Lateralden mediale, inferiordan superiora doğru hippokampal formasyon parahippocampal girus, subiculum, hippocampal sulkus, dentat girus, alveus, fimbria ve koroid fissürden meydana gelir. Denizatına olan benzerliğinden dolayı "hippokampus" adı verilen yapı baş, gövde ve kuyruk olmak üzere (ventralden dorsale doğru) 3 kısımda incelenir. Konveks ventriküler yüzeyi ependima ile örtülüdür. Ependimanın hemen altında hippokampal nöronlardan köken alan aksonların oluşturduğu, alveus adı verilen ince bir beyaz cevher tabakası bulunur. Bu aksonlar posteromediale hareket ederek forniks ile bağlantılı, fimbria adı verilen bir demeti oluştururlar. Hippocampus posteriorda korpus kallozum spleniumunun altında sonlanır.

Hippocampus, CA ve DG'un iç içe girmelerinden oluşan bilaminar bir yapıdır. Altı nöron tabakasından oluşan neokorteksten farklı olarak CA ve DG 3 katlı nöron tabakasından oluşur ve korteksin en ilkel yapısı olarak "allokorteks" adını alır. Hippocampus komşuluğundaki subikulum ve entorinal bölge allokorteks ile neokorteks arasındaki geçiş bölgesini oluşturur.

Koronal kesitlerde CA'nın farklı türde piramidal nöronlardan oluşan ve CA1, CA2, CA3 ve CA4 (veya hilus) olarak isimlendirilen 4 ayrı bölgeyi

barındırdığı göze çarpmaktadır (Şekil 2.3). CA1 bölgesi birkaç alt bölge bulunan subiculum (prosubiculum, subiculum proper, presubiculum) ile devamlılık halindedir. Parasubiculum ise subiculumu entorinal kortekse bağlar (Bkz. Şekil 2.2). Subiculum komşuluğundaki CA1 bölgesi piramidal nöronları küçük üçgen şekilli somalara sahiptirler ve dağınık yerleşim gösterirler. CA2 bölgesi ise sık yerleşimli, büyük ve oval yapıda somaları bulunan piramidal nöronları barındırır. CA3 bölgesi, DG'un konkavitesine doğru kıvrılmakta olan CA genusunda yer alır. Piramidal nöron somaları CA2'dekine benzemekle beraber daha dağınık yerleşimlidir. Ancak bu bölgenin en belirgin özelliği, DG'tan gelen ve "Mossy" lifleri adı verilen ince miyelinsiz lif sonlanmalarını içermesidir. CA4, DG'un hilusunda yer alır. Büyük ve oval yapıları olan hücrelerin yanısıra mossy liflerini ve büyük miyelinli lifleri de içerir.

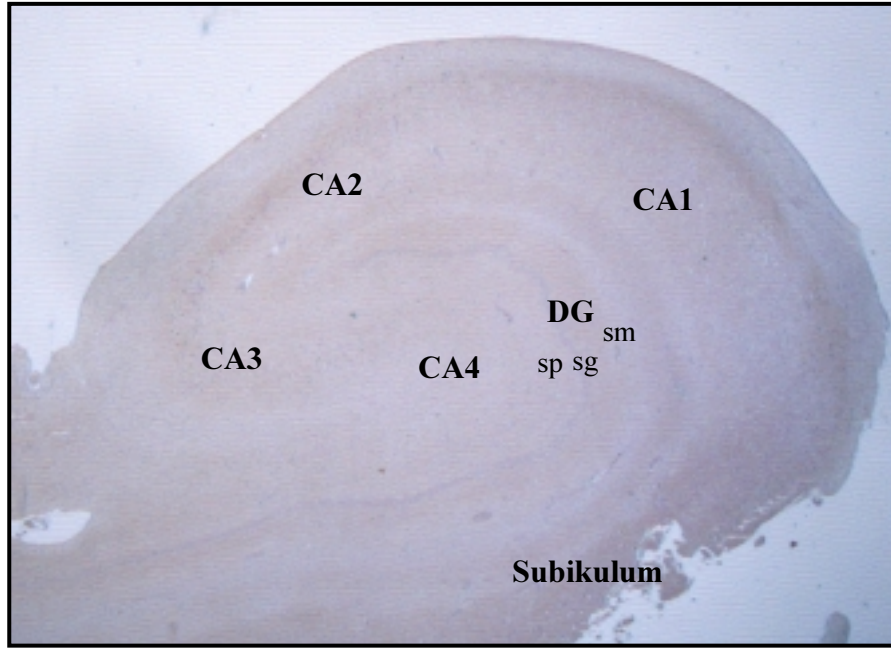


**Şekil 2.2:** Koronal beyin kesitinde hipokampusun iç yapısı ve parahippokampal girus ile olan bağlantısı şematik olarak görülmektedir.

Hippocampus [online]. Wikipedia, the free encyclopedia.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus'tan> alınmıştır (10).

Dentat Girus'un yapısı CA kadar kompleks değildir. Stratum molekulare, stratum granulosum ve polimorfik tabakadan meydana gelir (Bkz. Şekil 2.3).



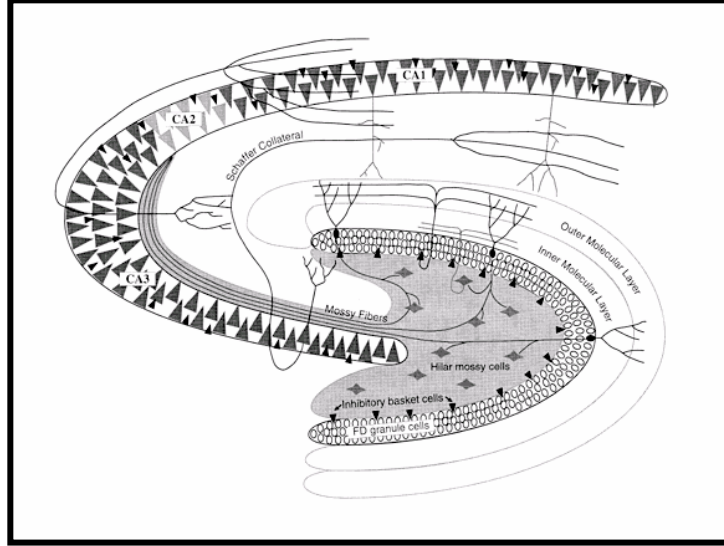
**Şekil 2.3:** HÜ Patoloji AD laboratuvarından alınan normal görünümlü insan hippocampusunda CA ve DG ile subikulum ilişkisi görülmektedir. (x10) (sp: stratum polymorphicum, sg: stratum granulosum, sm: stratum moleculare)

Küçük ve yuvarlak somalı granüler nöronlar DG'un en önemli tabakası olan stratum granulosumda yer alır. Stratum molekulare, bu hücrelerin dendritlerinin oluşturduğu tabakadır. Entorinal korteksten "perforan yol" ile gelen lifler, granüler hücrelerle burada sinaps yapar. Polimorfik tabaka CA4'ü granüler tabakaya bağlamaktadır. Granüler hücrelerin aksonları daha önce bahsedilen "Mossy" liflerini oluşturur. Lifler polimorfik tabakadan geçerek CA3 ve CA4'teki nöronları inerve eder. CA3 nöronlarından çıkan aksonlar ise "Schaffer" kollaterallerini oluşturup CA1 nöronlarını uyarır (Şekil 2.4) (11).

### 2.3. Mesial Temporal Lob Epilepsisinin Patofizyolojisi

İlk kez 1825'te, Bouchet ve Cazauvieilh TLE'li 14 otopsi vakası üzerinde yaptıkları gros çalışmalar sonucu hippocampusun patolojik bir görünüm aldığını bildirilmişlerdir (12). 1880'de Sommer asimetrik hippocampal atrofinin epilepsi ile ilişkisinden söz etmiştir (13). Daha sonra

1936'da Stauder hippocampal nöron kaybının kompleks parsiyel nöbetlerle ilişkili olduğu düşüncesini ilk kez ortaya atmıştır (14).



**Şekil 2. 4:** Hippokampusun iç yapısındaki sinaptik bağlantılar görülmektedir- Mathern GW, Babb TL ve Armstrong DL. Hippocampal sclerosis, "Epilepsy: a comprehensive text book" (Ed. Engel J Jr ve Pedley TA)'den alınmıştır (11).

Yüz elli yılı aşkın bir süredir yapılan pek çok bilimsel araştırma temporal lob epilepsisinin patofizyolojik mekanizmalarına ışık tutmuştur. Son 30 yıla kadar bu çalışmaların çoğu TLE'nde meydana gelen patolojik değişiklikleri tanımlayıcı nitelikteydi. Son zamanlarda ise beyin dokusunu araştırmak amacıyla elektrofizyolojik, biyokimyasal ve farmakolojik teknikler kullanılarak epileptogenezden sorumlu olabilecek sinaptik, reseptör, membran, ikincil mesajcı ve diğer moleküler mekanizmalar üzerinde durulmaktadır.

Yapılan incelemeler TLE'nde nöbetlerin hippocampustan kaynaklandığını göstermektedir. İnvaziv elektrofizyolojik yöntemlerle interiktal ve iktal epileptiform deşarjların mesial temporal yapılardan kaynaklandığı gösterilmiştir. Hippokampusun dahil edildiği cerrahi rezeksiyonlar sonrası daha iyi nöbet kontrolünün sağlanması da

hippokampusun epileptogenezde rol aldığını kanıtlamıştır (15). Ancak buna yönelik mekanizmalar tam anlamıyla açıklığa kavuşabilmiş değildir.

MTLES hastalarının % 40'ında hipokampustaki granüler hücrelerde, % 50'ye varabilen kayıp ve saçılma (16,17) görülmektedir. Kalan granüler nöronlarda perforan yol uyarısıyla artmış eksitabilite olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (18,19). Granüler nöronların dendritlerinde uzama ve dallanmadaki artışın buna katkısı olabileceği düşünülmektedir (20). Yine bazı granüler nöronların akson kollateralleri iç moleküler tabakaya uzanarak diğer granüler nöronların dendritleri ile sinaps yapmaktadır (mossy lif filizlenmesi) (21). Bu akson kollateralleri çinko ile birlikte dinorfin içerir (22,23). Dinorfin glutamatla ko-lokalizedir (24). Dinorfin, glutamat reseptör aracılı nörotransmisyonu ve voltaja bağımlı  $Ca^{++}$  kanallarını inhibe eder. Non-sklerotik hipokampusta dinorfin uygulaması granüler nöronlarda, voltaja bağımlı  $Ca^{++}$  kanallarında doza bağlı inhibisyon yaparken MTLES hastalarında çok daha az sayıda granüler hücrede  $Ca^{++}$  kanal inhibisyonu görülmektedir (25). Bu durum hasta hipokampuslarının moleküler tabakasında çok daha az sayıda  $\kappa$ -opioid reseptörü bulunmasından kaynaklanmaktadır (22). Bahsedilen patolojik değişikliklerin mossy lif kollaterallerinden artmış glutamat salınımına ve dolayısıyla artmış granüler hücre uyarılabilirliğine neden olması mümkündür.

DG hücrelerinin aktivitesi farklı nörotransmitterler ve onların reseptörleri tarafından düzenlenmektedir ve MTLES hipokampusunda bunların bazılarında değişiklik olduğu bildirilmiştir (26). Hilusta nöropeptid Y, somatostatin ve P maddesi (substance P) içeren internöronlarda belirgin kayıp meydana gelmektedir (27). Geride kalan nöronların akson kollateralleri DG'un tüm moleküler tabakasına yayılır ve granüler hücrelerin apikal dendritleriyle sinaps yapar (28). MTLES hipokampuslarında moleküler tabakada NPY aksonlarının kontrollere oranla arttığı gösterilmiştir (27). Aynı zamanda nöropeptid Y'nin, inhibisyondan sorumlu Y2 reseptörlerinde de artış meydana gelmektedir. Bu değişikliklerin granüler nöronların uyarılabilirliğini azaltma yönünde gelişen adaptif mekanizmalar

olduğu düşünölmektedir. Benzer değışiklikler somatostatinerjik sistemde de bildirilmiştir (29).

Artmış nöronal uyarılabilirliği açıklamaya çabalayan en önemli hipotezlerden biri GABA aracılı inhibisyonda azalma olduğu şeklindedir. Hippokampusun DG bölgesinde GABA'eriik inhibisyonu sağlayan iki tür internöron bulunmaktadır: sepet hücreleri ve Chandelier hücreleri. Bazı çalışmalarda sklerotik hippokampusun DG'nda GABA'eriik internöronların etkilenmediği bildirilmektedir (30,31). Başka çalışmalarda, hilusta bulunan ve granüler nöronların somalarıyla akson başlangıç bölgelerine inhibitör girdi sağlayan parvalbumin içerikli internöronların belirgin şekilde azaldığı ancak yer yer bu nöronların kurduğu sinapslarda artış olduğu iddia edilmektedir (32). Özetle, GABA'eriik input değışmemekte hatta belki artmaktadır. MTLES'de GABA-A reseptörlerinin dağılımı DG'da azalmaktadır (33). Ancak DG ve hilusta kalan nöronlarda GABA-B ekspresyonu artmaktadır (34,35). Bu bulgu, glutamaterjik salınımda presinaptik inhibisyonun arttığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, MTLES'de granüler nöronların artmış uyarılabilirliği azalmış inhibisyondan değil artmış eksitasyondan kaynaklanıyor gibi görölmektedir.

Granüler nöronların artmış uyarılabilirliği mossy hücreleri ve CA3 piramidal nöronları vasıtasıyla meydana gelmektedir. Her iki hücre grubu da granüler nöronlardan glutamaterjik input almaktadır. Mossy hücreleri granüler nöronlara geri projekte olmaktadır. Mossy hücreleri ile CA3 piramidal nöronları glutamaterjik GluR1 reseptörlerini artmış oranda eksprese etmektedirler (36). Normalden fazla miktarda uyarılan bu hücreler kurdukları bağlantılar aracılığı ile granüler nöron uyarılabilirliğini arttırmaktadır. DG'ta astrositlerin ekstrasellüler potasyumu yeterince temizleyememesi ve glutamat taşıyıcılarının kaybı MTLES'de meydana gelen diğer değışikliklerden bazılarıdır (37,38).

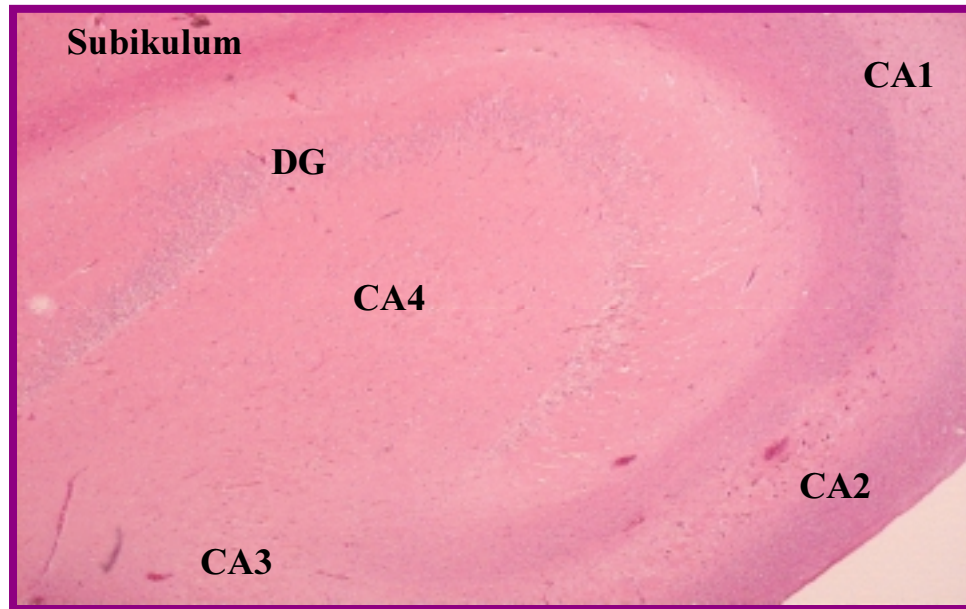
Cornu Ammonis, temporal lobun en duyarlı bölgelerinden biridir (39-41). Temporal lob epilepsisinde kaybolan temel hücre tipi piramidal tabakadaki nöronlardır. Sklerotik hippokampuslarda, nöronun fakir piramidal tabakada bulunan internöronlar büyük ölçüde korunmaktadır. Bu

tabakada gözlenen nöron kaybı ve sinaptik reorganizasyonun TLE'nde meydana gelen epileptogenezden sorumlu olabileceği düşüncesine oldukça büyük ağırlık verilmiştir. Özellikle inhibitör ağlardaki değişiklikler çok çalışılmış (42,43) ve bariz piramidal nöron kaybı gelişiminden önce bile epileptik CA1 bölgesinde yoğun sinaptik reorganizasyon geliştiği bildirilmiştir. Kalbindin ve parvalbumin (muhtemelen GABA'erjik) pozitif nöronlar bu reorganizasyonda yer almakta ve inhibitör nöronlar üzerindeki inhibisyonu arttırarak kalan piramidal nöronlar üzerinde disinhibisyon oluşturmakta, bu da anormal senkronizasyonla nöbet-benzeri aktivitelerin devamına neden olmaktadır (43). Son zamanlarda nöronların yanısıra hipokampusta gözlenen gliozise de giderek daha fazla önem verilmektedir. Bazı araştırmacılar, nöbetlerin devamından (hatta başlangıcından) glialarda meydana gelen değişiklikleri sorumlu tutmaktadır. Sodyum kanallarının sayısında artış,  $K_{ir}$  potasium kanal fonksiyonlarında bozulma (44-46); GluR1 mRNA düzeylerinde artış (47) ve glutamin sentetaz enzim düzeylerinde azalma (48,49) bildirilen değişikliklerden bazılarıdır.

Subikulum, hipokampal formasyonun majör efferent yollarının köken aldığı noktadır (50) ve daha da önemlisi hipokampustaki eksitasyonun beynin diğer bölgelerine de yayılarak tipik klinik belirtilerin ortaya çıkmasında rol oynayan bir bölgedir. Mesial temporal lob epilepsi hastalarında subikulum oldukça iyi korunmuştur ve burada nöron kaybı gözlenmemektedir (51,52). Ancak in vitro çalışmalarda, sklerotik hipokampusların subikulum bölgesinde spontan ritmik aktivitenin başladığı ve bunun insanlarda görülen interiktal deşarjlara büyük benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (53). Bu spontan aktivite, subikulumda piramidal hücre ve internöronlardan oluşan küçük bir topluluktan başlıyor gibi görünmekte ve hem glutamaterjik hem de GABA'erjik sinyalizasyonun rol aldığı düşünülmektedir, zira spontan aktivite glutamat ve GABA-A antagonistleriyle baskılanabilmektedir.

#### 2.4. Mesial Temporal Lob Epilepsisinde nöron kaybı:

Mesial temporal lob epilepsi sendromu hastalarının hipokampusu histopatolojik olarak oldukça stereotipik bir patern göstermektedir. CA1 ve CA4'te ağır derecede segmental nöron kaybı gözlenirken CA2 ve DG nöronlarının nisbeten korunduğu görülmektedir (Şekil 2.5). Ek olarak entorinal korteksin 3. tabakasında ve amigdalanın lateral çekirdeğinde de nöron kaybı olduğunu iddia eden araştırmalar bulunmaktadır (54-56). Tüm segmentlerde yoğun fibriller astrogliosis meydana geldiğinden hipokampus hem küçük hem de sert bir görünüm almaktadır.



**Şekil 2.5:** Çalışma grubundaki bir hastaya ait MTLES hipokampusunda CA1, CA3 ve CA4'te kontrollere oranla artmış nöron kaybı görülmektedir. DG'ta granüler hücrelerde saçılma ve CA2'de nöron varlığının nispeten korunduğu dikkati çekmektedir.

Uzun zaman boyunca nöbetlerin hipokampal sklerozun bir nedeni mi yoksa sonucu mu oldukları konusu tartışılmıştır. Margerison ve Corsellis'in 1966'da epileptik insan dokusunda yaptıkları çalışmada serebellum, talamus ve amigdalada hasar gözlenmesi nöbetlerin hücre kaybına neden olabileceği fikrini desteklemiştir (39). Özellikle 1990'larda pek çok laboratuvarında yapılan bir dizi deney neticesinde de kısa süreli

tekrarlayıcı nöbetlerin nöron kaybına neden oldukları gösterilmiştir (57,58). Cavazos ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptığı bir çalışmada indüklenen nöbetlerle hipokampus, entorinal korteks ve rostral endopiriform nukleusta gözlenen nöron kaybının nöbet sayısı ile orantılı olduğu bulunmuştur (58). Yine “kindling” modellerinde nöron spesifik enolaz (nöronal hasar belirteci) düzeylerinde artış bildirilmiştir (59,60). Buna karşılık, hayvan modellerinde spontan nöbetlerin gelişmesinden önce hayvanlarda status epileptikus indüklenmekte ve bu durum başlı başına ciddi nöron kaybına neden olmaktadır (61). Bazı araştırmacılar kindling veya status epileptikus sırasında duyarlı nöronların kaybolduğunu, ancak daha sonra tekrarlayan nöbetler sırasında ek nöronal kayıp olmadığını öne sürmektedirler (61). Öte yandan genetik mutasyonlu hayvanlarda başlangıçtaki beyin hasarı olmaksızın tekrarlayıcı nöbetlerin nöron kaybına yol açtığını gösteren araştırmalar da bulunmaktadır (62,63). Sonuç olarak, tek bir nöbet muhtemelen çok az sayıda nöronda hasar yapmaktadır, ancak uzun vadede nöbetlerin kümülatif etkisi kendini ciddi nöronal kayıp olarak gösterebilmektedir.

## **2.5. Apoptozun tanımı**

Apoptoz, sağlıklı dokuların gelişimi ve devamlılığı için kritik olan fizyolojik bir programlanmış hücre ölümüdür. Kanser, otoimmün hastalıklar, doku iskemisi ve nörodejeneratif hastalıklarda hücre ölüm mekanizmalarında bozukluk söz konusudur.

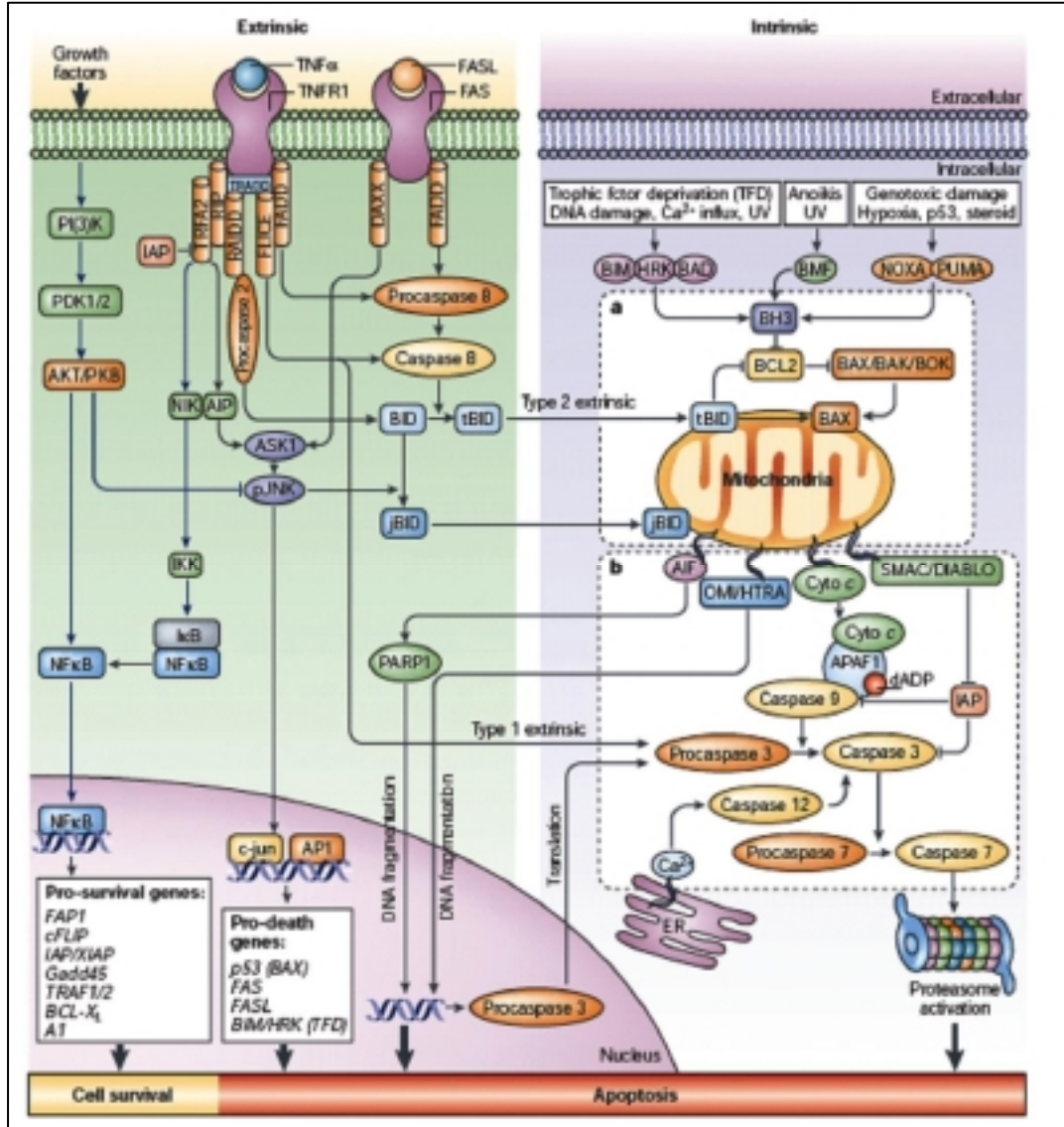
Apoptoz, temel olarak morfolojik bir fenomendir. Işık mikroskopisinde karakteristik özellikleri olan kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma, plasma membranında kabarcık oluşumu (blebbing) ve hücre büzülmesi ile karakterizedir. Sonunda hücre, membranla kaplı küçük parçalar haline dönüşmekte (apoptotik cisimcikler) ve bunlar da inflamatuvar yanıtı tetiklemeksizin fagositozla ortadan kaldırılmaktadır.

## 2.6. Apoptozda genel mekanizmalar

Hücrelerde apoptozun gerçekleşmesini sağlayan temel moleküller kaspazlardır ve bunların harekete geçmesini sağlayan değişik mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlardan biri TNF (tumor necrosis factor) reseptör ailesi aracılığı ile gerçekleşmektedir ve aynı zamanda ekstrinsik apoptotik yol (EAY) olarak da bilinmektedir (Şekil 2.6 (64)). Bu yolu tetikleyen reseptörler hücre zarında bulunmaktadır ve kendilerine özgü ligandların bağlanmasıyla ölüm sinyalizasyonunu başlatmaktadırlar (65,66). Bu reseptörler (Fas ve TNFR1 gibi) TNF reseptör ailesine üyeler ve sitozolik kısımlarında *death domain* (DD) adı verilen bölgeler bulunmaktadır. Fas ligandının (FasL) bağlanması üzerine üç reseptör bir araya gelmekte (trimerizasyon) ve daha sonra DD bölgeleri aracılığı ile yine DD bölgesi içeren adaptör proteinlere (ör: *Fas associated death domain* (FADD)) bağlanmaktadırlar. Öte yanda FADD aynı zamanda *death effector domain* (DED) bölgesine de sahiptir ve onun vasıtasıyla pro-kaspaz 8'e (ki o da DED bölgesi içermektedir) bağlanabilir. Fas, FasL, FADD ve pro-kaspaz 8'den oluşan bu komplekse *death inducing signalling complex* (DISC) adı verilmektedir. Daha sonra aktif hale gelen kaspaz 8, Bid ve kaspaz 3'ü aktive ederek ölümü olayını başlatmaktadır. Diğer ölüm reseptörlerinden DR4 ve DR5, TRAIL tarafından uyarılmaktadır. Yine DD bölgeleri aracılığı ile FADD ile iletişime geçip DISC'i oluştururlar. TNFR1, apoptoz için olduğu kadar proliferasyon (inflamatuvar reaksiyonlarda) için de sinyal yoludur. Bu reseptöre ilk bağlanan adaptör molekül TRADD'dır. Buna FADD adaptörünün bağlanması durumunda apoptoz tetiklenirken RIP1 veya TRAFF bağlanması halinde anti-apoptotik mekanizmalar harekete geçmektedir (67).

İkinci yol ise mitokondrial yoldur (intrinsik apoptotik yol (İAY) da denir) ve bu yolda mitokondrilerden salınan bazı moleküller kaspazları aktive ederek apoptoza zemin hazırlamaktadırlar (68,69) (Bkz. Şekil 2.6). Mitokondriden salınan sitokrom c, Apaf-1 ile bağlantıya girerek kaspaz aktivasyonunu başlatır (70). Apaf-1 normal koşullarda sitoplazmada inaktif halde bulunur, ancak sitokrom c'nin bağlanması Apaf-1'in agregasyonuna

yol açar (71,72). Oligomerize Apaf-1 kompleksi pro-kaspaz 9'a bağlanarak onu aktive eder (73). Farklı yollar olarak görülmelerine ve bağımsız olarak hareket edebilmelerine rağmen EAY ve İAY pek çok düzeyde (ör: tBid aracılığıyla) birbiriyle iletişime geçebilmektedir. Yapılan pek çok deneyle kaspaz-8'in TNF ölüm reseptör yolunda, kaspaz-9'un da mitokondrial yolda apikal kaspaz olduğu kanıtlanmıştır (74,75).



**Şekil 2.6:** Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar-Benn SC ve Woolf C. Adult neuron survival strategies-slamming on the brakes. Nat Rev Neurosci., 5 (9), 686-700, 2004'ten alınmıştır (64).

## 2.7. Kaspazlar (Sistein aspartat spesifik proteazlar):

Apoptozda görülen morfolojik değişikliklere neden olan moleküller kaspazlardır. Bunlar intrasellüler sistein proteazlar olarak bilinen bir ailedir ve substratlarını her zaman aspartat rezidülerinden sonra keserler (76). Bugüne kadar tanımlanan 14 memeli kaspazı bulunmaktadır (77). Bu proteinler genellikle pro-enzim olarak sentezlenirler ve kaspaz şalesindeki diğer kaspazlar tarafından kesilerek etkin hale getirilirler (78). Aktivasyon sırasında N-terminalindeki ön-bölge (pro-domain) atılırken, aktif enzimin büyük (~20 kd) ve küçük (~10 kd) alt birimleri ortaya çıkarılır. Aktif enzimler iki büyük ve iki küçük alt-birimden oluşan heterotetramerler haline gelir ve her enzimde iki aktif bölge bulunur (79). İşlevsel açıdan kaspazlar üç ayrı grupta toplanabilir: **1-DED** (kaspaz 8 ve 10'da) veya **CARD** (kaspaz 2 ve 9'da) gibi uzun (>90 amino asit) ön-bölgeleri bulunan "başlatıcı kaspazlar"; **2-kısa ön-bölge** içeren "efektör kaspazlar" (kaspaz 3, 6 ve 7) ve **3-apoptozdan çok sitokinlerin olgunlaşmasında rol oynayan diğer kaspazlar** (kaspaz 1, 4 ve 5) (80). Başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları etkin hale getirir. Bunlar da apoptotik morfolojinin tüm özelliklerini ortaya çıkaran hücrel substratları keserler. Efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3 etkin hale getirildiğinde hücre içinde son derece önemli işlevleri olan substratları etkisiz hale getirir (ör: ICAD, ROCK1, PARP, aktin, fodrin ve lamin). Etkin kaspaz-3 membranda kabarcık oluşumuna, DNA parçalanmasına ve hücrel yapının kaybolarak sonunda ölüme neden olur.

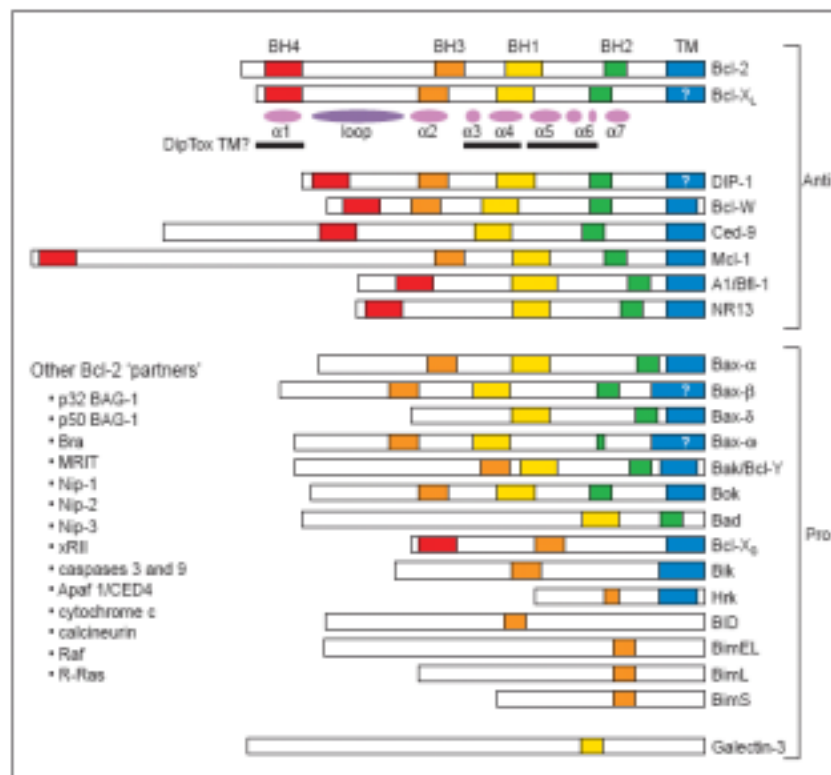
## 2.8. Bcl-2 Ailesi Proteinleri:

Apoptozun mitokondrial ayağı Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından gerçekleştirilir. Bu ailede hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeler bulunur ve bu üyelerin çoğu birbirine bağlanarak kompleks bir homo ve heterodimer ağı oluştururlar (81,82). Sonuçta hücrenin yaşam veya ölüm kararını pro ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin relatif oranı belirler.

İnsanlarda bugüne kadar Bcl-2 ailesine ait 20 üye tanımlanmıştır (Şekil 2.7 (83)). Bunlardan Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W ve Boo anti-apoptotik etkiye sahipken, Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-XS,

APR (Noxa), p193, Bcl-G, Nip3 ve Nix (BNIP) pro-apoptotik olarak bilinmektedir. Bazı Bcl-2 genleri alternatif bağlanma (splicing) ile iki veya daha fazla sayıda protein ürünü verebilmektedir ve bunlardan bazıları pro-apoptotik (ör: Bcl-XS) bazıları anti-apoptotik (ör: Bcl-XL) olabilmektedir. Yine bazı durumlarda pro-apoptotik, diğer durumlarda anti-apoptotik olabilen üyeler de vardır (ör: Boo, Bcl-2, Bax) (84,85).

Üç boyutlu yapılarına bakıldığında Bcl-2 ailesi proteinleri genel olarak iki gruba ayrılabilir. Bu gruplardan biri, yapısal olarak gözenek oluşturan



**Şekil 2.7:** Bcl-2 ailesi üyeleri-Kinloch RA, Treheme JM, Furness LM ve Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. Trends Pharmacol Sci., 20, 35-42, 1999'dan alınmıştır (83).

(pore-forming) bakteri toksinlerine benzer (86). Bu proteinler hem pro-apoptotik (Bax, Bak, Bok, Boo) hem de anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Boo) üyeleri içerir. Bu proteinler bir dizi korunmuş amino asit sekansını barındırır, ör: BH (Bcl-2 homoloji) bölgelerinden BH1, BH2, BH3

ve bazen BH4. Diğer grupta yer alan proteinlerde ise ortak olan tek yapı BH3 bölgesidir ve burada Bad, Bik, Bim, Hrk, Bcl-GS, p193 ve APR (Noxa) bulunmaktadır. Bu proteinlerin hepsi pro-apoptotiktir ve ölümcül etkileri, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerine bağlanarak dimerler oluşturmalarına ve onların etkisini yok etmelerine dayanmaktadır. Dimerizasyonu oluşturan kısım BH3 bölgesidir. Yine de belirtmek gerekir ki BH3 aracılığı ile sağlanan interaksiyonlar her zaman antagonistik etkiye sahip değildir, ör: Bid'in BH3 bölgesi ile Bax'a bağlanması Bax'ı aktive eder. Pek çok Bcl-2 ailesi proteini mitokondri membranında konstitütif olarak bulunur. Buna karşılık diğerleri ancak belli uyaranlarla aktive olduktan sonra bu organeli hedeflerler, ör: Bcl-2 ve Bcl-XL, karboksi terminalindeki hidrofobik transmembran bölgeleri aracılığıyla dış mitokondri membranına tutunurlar. Bazı Bcl-2 proteinleri aynı zamanda endoplazmik retikulum ve nükleer zarfa da tutunurlar (69). Pro-apoptotik Bid, Bim ve Bad ise normal koşullarda sitozolde yer alırlar. Bid, kaspaz-8 tarafından N-terminalindeki 52 amino asitlik bölge kesilip BH3 bölgesi açığa çıkarıldıktan sonra mitokondri membranına sokulabilir (87). Kaspaz-8 ile aktif hale getirilen Bid, EAY ile İAY arasında bağlantı sağlaması açısından önem arz etmektedir. Buna karşılık Bim, mikrotübül-asosiye "dynein" hafif zinciri ile mikrotübüle bağlanır ve ancak bu bağlantının kopmasından sonra serbest kalarak mitokondri dış membranında bulunan anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine BH3 ile bağlanarak onları etkisiz hale getirir. Bir üçüncü mekanizma ise pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin mitokondri membranına transloke olmalarının fosforilasyonla kontrol edilmesidir, ör: Bad fosforile halde (bazen 14-3-3 ile kompleks oluşturarak) sitozolde bulunur. Bazı protein kinazların (ör:Akt) Bad'ı fosforile ettikleri ve bu şekilde Bcl-2 ve Bcl-XL ile dimerizasyonunun engellenerek pro-apoptotik etkisinin baskılandığı gösterilmiştir (88). İntrasellüler  $Ca^{++}$  düzeyinin arttığı durumlarda  $Ca^{++}$ -Kalmodülin'e bağlı bir fosfataz olan kalsinörin Bad'ı de-fosforile ederek aktifleştirir. Hippokampal nöronlarda, glutamat kalsinörin aracılığı ile Bad'ı de-fosforile ederek Bcl-XL ile dimer oluşturmaya neden olur (89). İlginç olarak Bax, karboksi terminalinde transmembran bölgesine sahip olmasına rağmen sitozol ile mitokondri

arasında hareket eder. Sitozoldeki Bax'ın transmembran bölgesi genelde maskelenmiş halde bulunur (90). Bazı apoptotik uyarılar (özellikle hücrel pH değişimi), Bax'ın konformasyonel değişim geçirmesine ve mitokondri dış membranına transloke olmasına neden olurlar. Bcl-2 proteinlerinin mitokondri zarında nasıl etki ettikleri hala tartışma konusudur (69). Ancak bilinen şudur ki pro-apoptotik üyeler sitokrom c salınımını arttırırken anti-apoptotik üyeler bunu baskılamaya çalışırlar. Sitokrom c salınımı mitokondri dış zarında, pro-apoptotik proteinler tarafından oluşturulan gözenek/kanal benzeri yapılardan meydana gelebileceği gibi ozmotik dengenin bozulması ve mitokondrilerin şişerek çatlaması sonucu da olabilir (69,91). Burada kaspazların rolü yoktur. Sitokrom c'nin yanısıra Bcl-2 proteinleri mitokondrilerden başka proteinlerin de salınmasına neden olabilirler: **1**-kaspaz-2, 3 ve 9 (bazı hücrelerde) (92); **2**-AIF (93) ve **3**-Smac/Diablo (IAP inhibitörü) (94).

## **2.9. AIF:**

Memelilerde AIF öncülü (precursor), N-terminalinde MLS sekansı (mitochondrial localization sequence) (1-100. rezidüleri) içerir ve daha büyük olan C-terminali (121-610) bakteriyel oksidoredüktazlara benzerlik gösterir (93). AIF homologlarının aynı zamanda omurgasızlarda, mantar ve bitkilerde de bulunması evrim sırasında korunmuş olduğunu göstermektedir. AIF geni farelerde X kromozomunun A6 bölgesinde (insanlarda Xq25-26'ya karşılık gelir) bulunur (95). Gen toplam 17 ekson içerir. AIF öncülü, nükleer bir gen tarafından kodlanır ve sitoplazmada sentezlenen protein mitokondrial intermembran aralığına alındıktan sonra MLS proteolitik olarak atılır, protein yeniden katlanırken FAD'yi de yapısına dahil eder ve AIF (57kDa) olgun halini alır. AIF hem embriyonik gelişim sırasındaki hücrelerde hem de erişkin hücrelerin mitokondrilerinde yaygın olarak bulunur (95). FAD'a sıkıca bağlandığından flavoproteinler kategorisinde yer alır. NAD(P)H oksidaz ve monodehidroaskorbat redüktaz aktivitelere sahiptir (96). Olgun insan AIF'i oksidoredüktazlara çok benzeyen bir kristal yapıya sahiptir. NAD(P)H ve/veya FAD'nin varlığı veya yokluğu apoptotik etkisini

değiştirmez (96). Bu da apoptojenik etkisinden oksidoredüktaz işlevinin sorumlu olmadığını gösterir. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde AIF'in katalize ettiği redoks reaksiyonları tam olarak bilinmemektedir. In vitro koşullarda, AIF sitokrom c'nin redüksiyonunu katalize eder (96). Alternatif (veya ek) olarak mitokondri düzeyinde anti-oksidan görevi olabilir.

AIF'in hücre içine mikroenjeksiyon yoluyla uygulanması çok kısa bir süre içinde (3 saatten daha kısa) apoptoz belirtilerinin ortaya çıkmasını sağlar (93). AIF bir kez sitoplazmaya çıktıktan sonra mitokondrilerden daha fazla miktarda AIF salınmasına neden olur. AIF ile indüklenen apoptoz, Bcl-2'nin aşırı miktarda ekspresyonu ile (muhtemelen AIF'i mitokondride hapsederek) ertelenebilir (97). Mitokondrilerden salındıktan sonra nukleusa transloke olan AIF (93) periferal kromatin yoğunlaşması ve yüksek moleküler ağırlıklı (50kbp) DNA parçalanmasına neden olur. AIF ile DNA arasındaki elektrostatik ilişki DNA sekansından bağımsızdır. AIF'in DNA yoğunlaşması ve parçalanmasını nasıl gerçekleştirdiği tam olarak bilinmemektedir. Bunun için 3 farklı mekanizma öne sürülebilir: **1**-AIF intrinsik nukleaz aktivitesine sahip olabilir; **2**- AIF'in DNA ile ilişkisi DNA'nın latent nukleazlara duyarlılığını artırabilir; **3**-AIF "downstream" nukleazları uyararak kısmi kromatinoliz sağlayabilir. Bazı apoptoz modellerinde AIF oldukça önemlidir; özellikle de akut ve kronik nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen postmitotik nöron ölümlerinde. Akut nöronal apoptoz travma, hipoglisemi, geçici iskemi, sitotoksik ajanlar, DNA hasarı vb durumlarda görülür. DNA hasarıyla tetiklenen AIF translokasyonu ve apoptoz, p53'ün ve onun transkripsiyonel hedefi olan Bax'ın varlığına bağlıdır (98). NMDA ile indüklenen apoptozun ise PARP'ın varlığına dayandığı gösterilmiştir (99).

AIF'in "kaspaz-dışı" apoptotik etkisi bazı "knockout" modellerde ortaya konmuştur (100). Ancak unutulmamalıdır ki AIF ile kaspazlar arasında birkaç farklı düzeyde iletişim kurulmaktadır. Kaspaz aktivasyonu apoptozun erken fazlarında uyarıldığında, ör: Fas yoluyla, AIF'in mitokondriden salınımı kaspaz-8 aktivasyonuna bağlıdır (101). Aktif kaspazlar ve kaspazla aktive edilen tBid, saflaştırılmış mitokondrilerden AIF salınımını sağlayabilir (102). Öte yandan in vitro koşullarda AIF izole

mitokondrilerden sitokrom c salınımını sağlayabilir (93). Bazı hücre ölüm tetikleme paradigmlarında AIF sitokrom c'den önce salınır (93,95,99) ve AIF'in nötralizasyonu hem sitokrom c salınımını hem de hücre ölümünü baskılayabilir. Bu bulgular, en azından bazı durumlarda, AIF'in sitokrom c'ye bağlı kaspaz aktivasyon şelalesi için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ancak başka hücre ölüm modellerinde, mitokondriler AIF'i sitokrom c'den sonra salar (98), bu da apoptoz sırasında mitokondrial membran geçirgenliğinin farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir.

AIF ile interaksiyona giren tek Hsp molekülü Hsp70'tir (103). Aşırı miktarda Hsp70 ekspresyonunun hücreleri AIF'in apoptojenik etkisinden koruduğu gösterilmiştir (103). Özetle, AIF ve kaspazlar hücre ölüm şelalesinde işbirliği yapabilir ve bu sürece katılımları, apoptozu tetikleyen özgül uyarana veya belki de hücre tipine bağlı olabilir. Bazı durumlarda, kromatin yoğunlaşması gibi apoptotik belirleyicileri önlemek için hem kaspazların hem de AIF'in aynı anda nötralize edilmesi gerekmektedir.

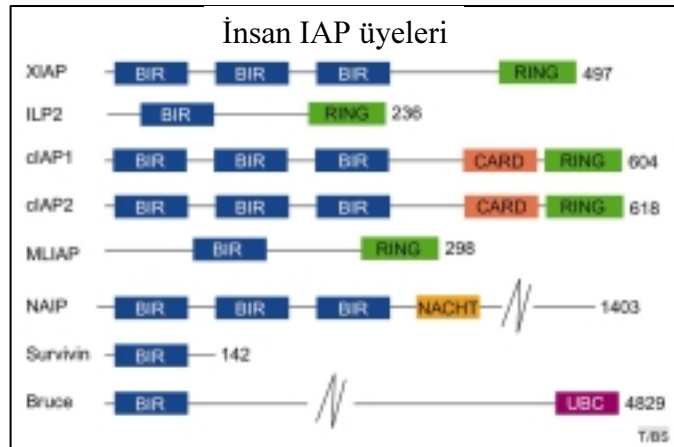
## **2.10. Apoptoz baskılayıcı proteinler (IAP ailesi)**

İlk olarak bakulovirüslerde keşfedilen IAP'lar, virüsle enfekte olan hücrelerde ölümü baskılamada görev almaktadırlar. İlginç olarak, bazı bakuloviral IAP'ların memeli hücrelerinde ektopik ekspresyonu apoptozu baskılamaktadır. Bunun anlamı hücre ölüm programlarının farklı türler arasında korunduğu ve apoptozu önlemek için IAP'ların benzer mekanizmaları kullandığıdır. Bazı çalışmalar, IAP'ların biyokimyasal fonksiyonlarını aydınlatmaya yardımcı olduysa da IAP'ların etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.

IAP ailesindeki proteinler, BIR (baculoviral IAP repeat) adı verilen yaklaşık 70 aminoasitlik özgül bir bölge ile karakterizedirler. Apoptoz baskılayıcılarının ilk kez Lois Miller ve arkadaşları (104,105) tarafından bakulovirüs genomundaki keşiflerinden dolayı bu isim verilmiştir. Çeşitli virüs ve hayvan türlerindeki IAP proteinlerinde en fazla 3 adet BIR bölgesi bulunabilmektedir (Şekil 2.8 (106)). İnsan IAP BIR bölgelerinin anti-apoptotik aktivite için gerekli ve yeterli oldukları gösterilmiştir (107, 108). Ancak her

BIR bölgesinde anti-apoptotik aktivite bulunmamaktadır, bu nedenle her birinin kendine özgü fonksiyonları olduğu düşünülmektedir.

Bugüne kadar IAP'larla yapılan yapı-işlev çalışmaları apoptozun baskılanması için en az bir adet BIR bölgesinin gerekli olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra bazı IAP'larda, belli koşullar altında farklı bölgelerinin de gerekli olduğu görülmektedir, ör: bazı canlılarda karboksi terminaline yakın bulunan RING bölgesi gibi. İnsanlarda c-IAP1, c-IAP2 ve XIAP proteinleri RING bölgesi olmaksızın anti-apoptotik etki göstermektedir. Yine insanlarda c-IAP1 ve c-IAP2 proteinleri BIR ile RING bölgeleri arasında CARD (caspase recruitment domain) bölgesini barındırmaktadır. IAP üyelerinden BRUCE'ta yer alan bir diğer yapısal birim de UBC (ubiquitin conjugating) bölgesidir. Bu nedenle BRUCE'un apoptoz proteinleri ile ubiquitin-proteozom yolu arasında fonksiyonel bir bağ kurması muhtemeldir.



**Şekil 2.8:** İnsanlarda IAP üyelerinin şematik görüntüsü-Stennicke HR, Ryan CA ve Salvesen GS. Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. Trends Biochem Sci., 27(2), 94-101, 2002'den alınmıştır (106).

### 2.11. İnsanlarda IAP ekspresyonu ve fonksiyonları:

Bugüne kadar insanlarda 9 IAP üyesi saptanmıştır: c-IAP1 (HIAP-2), c-IAP2 (HIAP-1), XIAP (hILP), NAIP, MLIAP, ILP2, Survivin, BRUCE (Apollon) ve Livin (KIAP). XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP ve Survivin'in artmış

ekspresyonu, farklı uyarılar tarafından tetiklenen apoptozu baskılayabilmektedir (109). Tümü apoptozu önleyebilmekle birlikte bu proteinlerin hücrelerdeki ekspresyonu farklılık göstermektedir. XIAP mRNA'sı kandaki lökositler dışında incelenen tüm erişkin ve fetal hücrelerde eksprese edilmektedir ve ailenin en yaygın eksprese edilen üyesidir (109). c-IAP1 ve c-IAP2 en fazla böbrek, bağırsak, karaciğer ve akciğerde ve en az merkezi sinir sisteminde eksprese edilmektedir (110). Her iki IAP'ın da dokudaki dağılımı benzer olmakla birlikte c-IAP1 ekspresyonu daha fazladır. NAIP mRNA'sı erişkin karaciğer, plasenta ve az miktarda da beyinde bulunmaktadır (111). IAP'lar arasında en kısıtlı ekspresyona sahip üye Survivin'dir. Promotor bölgesinin yapısal özellikleri nedeniyle hücre siklüsü tarafından düzenlenen ve muhtemelen bölünen hücrelerde eksprese edilen bir proteindir (112).

## **2.12. Kaspaz inhibitörü olarak IAP'lar:**

Bazı IAP üyelerinin (XIAP, c-IAP1, c-IAP2) kaspazları direkt olarak inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (107,108). Bu IAP'lar kaspaz-3, 7 ve 9'a bağlanarak etkilerini baskılamakta ancak kaspaz 1, 6, 8 veya 10 üzerinde etki göstermemektedir (107,108,113). Benzer şekilde Survivin de kaspaz-3, 7 ve 9'u inhibe edebilmektedir. IAP'lar kaspaz-8'i bloke etmemekle birlikte onun substratı olan kaspaz-3'ü inhibe ederek kaspaz-8'in başlattığı proteolitik şelaleyi baskılayabilmektedirler (107,108,113). Benzer şekilde mitokondrial yolda XIAP, c-IAP1 ve c-IAP2 pro-kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp sitokrom c salınımının indüklediği aktivasyonu engelleyebilmektedir (113). IAP proteinlerinin aşırı eksprese edildiği durumlarda, Bax ve diğer pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin tetiklediği apoptoz da önlenmektedir. IAP'lar Bax aracılı sitokrom c salınımını inhibe etmemektedir. Bu durum, insan IAP'larının (en azından XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ve Survivin) kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu Bax, Bik, Bak ve sitokrom c'nin distalinde inhibe ettiğini göstermektedir (107,108,113). XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ve Survivin'in kaspaz-3 ve 7'ye bağlanarak inaktive edebilmesi için bu kaspazların aktif hale gelmiş olması gerekmektedir. Buna

karşılık kaspaz-9'un hem aktif hem de pro-kaspaz formuna bağlanabilmektedirler.

IAP'lar kaspazlara 1:1 veya 2:1 oranında bağlanmaktadır (107,108). Kaspaz 3 ve 7'ye karşı XIAP, c-IAP1 ve c-IAP2'nin inhibitör katsayıları ( $K_i$ ) yaklaşık 0.2-10 nM arasında değiştiğinden IAP'ların oldukça potent proteaz inhibitörleri olduğu söylenebilir. IAP'ların inhibitör mekanizmaları tam olarak bilinmemekte, ancak peptid bağının hidrolizi ile olmadığı düşünülmektedir (107,108). Kompetitif inhibisyon yapmaları mümkündür. Çinko vb metaller tarafından kaspazların inhibe edilmesi, BIR bölgelerinin metale bağlanarak da etki edebileceklerini düşündürmektedir.

### **2.13. Apoptozun düzenlenmesinde HSP'ler:**

Isı şoku yanıtı ilk kez 1962'de Ritossa tarafından *Drosophila* tükrük bezlerinde gözlenmiştir (114). O günden bu yana pek çok araştırmacı bu yanıtın, bakterilerden hayvanlara kadar tüm canlılarda son derece yaygın ve çok iyi korunmuş olduğunu, ayrıca hücreleri farklı kimyasal ve fizyolojik stres (ısı şoku, kemoterapötik ajanlar, besin yokluğu, radyasyon, poliglutamin tekrarları, TNF...gibi) faktörlerine karşı korumak için gerekli bir savunma mekanizması olduğunu kanıtlamışlardır (115,116). Stres faktörleri hücrenin hidrasyon ve redoks durumunu etkileyerek yanlış katlanan protein miktarının artmasına ve farklılaşmış biyolojik aktivitelerinin hücreye zarar vermesine neden olmaktadır. Hücreler bu stres faktörleri karşısında Hsp (heath shock protein) adı verilen bir dizi moleküler şaperonun sentezini artırırlar. Bu proteinler ağırlıklarına göre sınıflanır ve Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve küçük Hsp ailelerini içerirler. Her ailede konstitütif olarak oluşturulan, belli koşullarda indüklenen ve/veya farklı hücre kompartmanlarına yönlendirilen üyeler bulunur. Bu alanda yapılan araştırmalar genel olarak Hsp'lerin koruyucu etkisinin proteinlerin yanlış katlanmasını önlemek, tekrar doğru katlanmalarını sağlayarak işlevsel hale getirmekten ibaret olduğunu belirtmekteydi (115). Ancak son zamanlarda Hsp'lerin daha başka işlevlerinin de olduğu, anti-apoptotik etki

gösterebilecekleri, fakat bunun mutlaka yukarda bahsedilen “şaperon” etkisinden kaynaklanması gerekmediği gösterilmiştir (117).

Hsp'lerin şaperon etkisi, ATP bağlanması ve Hsp proteini ile hedef polipeptid arasında bir dizi hidroliz ve nükleotid değişimi ile giden döngülerle meydana gelir. ATP'ye bağlı Hsp'lerin afinitesi düşük iken, ADP'ye bağlı Hsp'ler peptidlere daha yavaş ancak dengeli bir biçimde bağlanırlar. Yüksek işlevsellik aynı zamanda diğer ko-faktörler ve ko-şaperonların (Hsp40, Hip, Hop) bağlanmasına da bağlıdır.

## **2.14. Hsp aracılı apoptoz inhibisyonu**

### **2.14.1. İntrinsik Apoptotik Yol modülasyonu:**

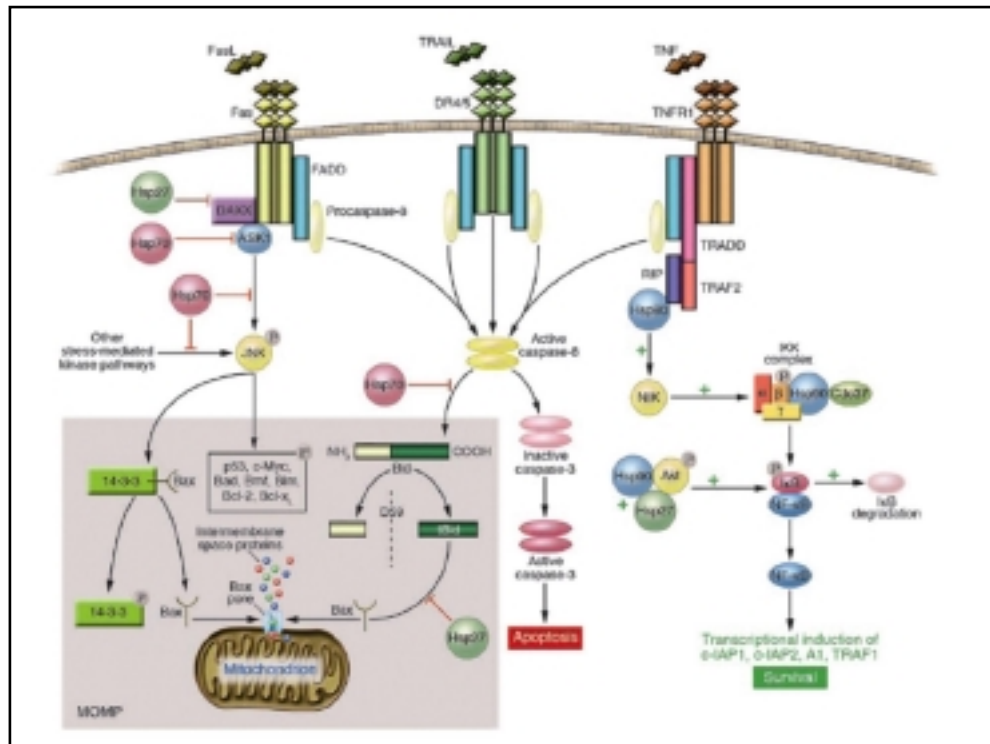
Stresi takiben, Hsp'ler mitokondrilerden pro-apoptotik faktörlerin salınmasını düzenlerler (118). Kaspaz-8'in oluşturduğu tBid'in mitokondrilerden Bax aracılı pro-apoptotik faktörlerin salınımını tetiklediğinden bahsedilmiştir. Son zamanlarda yapılan iki çalışma Hsp70 ve Hsp27'nin Bid aracılı apoptozda modülatör etki gösterdiğini öne sürmüştür (119,120). Hsp27'nin aktin mikofilamanlarını stabilize ederek tBid'in mitokondriye translokasyonunu önlediği düşünülmektedir (120). Öte yandan Hsp70'in TNF yoluyla indüklenen tBid oluşumunu önlediği ve bunu şaperon etkisinden bağımsız olarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (119). Hsp70 aynı zamanda sitokrom c ve Smac salınımına neden olan MAP kinaz JNK'nin aktivitesini de baskılamaktadır. Yeni veriler, Hsp70 ile ko-şaperonu Hsp40'ın mitokondriye Bax translokasyonunu engellediğini göstermektedir (121).

Hsp'ler mitokondrilerden sonraki (downstream) apoptotik basamakları da modüle edebilirler. Li ve arkadaşlarının gösterdiğine göre Hsp70 kaspaz aktivitesini sitokrom c'den sonra, ancak kaspaz-3 aktivasyonundan önceki bir noktada baskılamaktadır (122). Hsp70, Apaf-1'e bağlanarak aktif apoptozom oluşumunu ve kaspaz-9 aktivasyonunu önlemektedir (123). Hsp90 ve Hsp27 de Apaf-1'e bağlanarak oligomerizasyonunu engellemektedir. Hsp'lerin aktif kaspazların etkisini de baskılayabileceği iddia edilmektedir. Hsp27, pro-kaspaz-3'e bağlanarak, kaspaz-9 tarafından aktive edilmesini engellemektedir. Küçük Hsp'lerden  $\alpha\beta$  kristallin kaspaz-8

ve sitokrom c aracılı kaspaz-3 aktivasyonunu engellemektedir (124). Kaspazlar bir kez aktive olduktan sonra hücre sağ kalımının ne şekilde sonuçlandığı tam olarak bilinmemektedir. Hsp'lerin kaspaz baskılayıcı özellikleri, aktif kaspazları baskılayabilen IAP'larınkine benzemektedir.

### 2.14.2. Ekstrinsik Apoptotik Yol modülasyonu:

Hsp'lerin Fas, TNF ve TRAIL ölüm reseptörleriyle tetiklenen apoptotik süreci modüle edebilecekleri gösterilmiştir. Fas ile indüklenen yolu, Hsp70 ve Hsp40'ın da aralarında bulunduğu birkaç Hsp regüle edebilmektedir (125) (Şekil 2.9 (126)). Fas'la indüklenen yolda, tipik olarak FADD aracılığı ile kaspaz-8 aktivasyonu olmakla birlikte alternatif bir yol daha vardır. Bu yolda



**Şekil 2.9:** Ekstrinsik apoptotik yolda Hsp'lerin görevi-Beere HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. J Clin Invest, 115, 2633-2639, 2005'den alınmıştır (126).

farklı bir adaptör molekül olan Daxx için içine girer ve MAPKKK, Ask-1 aktivasyonuna (127) ve böylece SAPK/JNK yoluyla apoptoza neden olur. Hsp27 Daxx'a ve Hsp70 de Ask-1'e bağlanarak apoptozu baskılayabilir. Bazı araştırmacılar, farklı hücre türlerinde Hsp27 ve Hsp70'in TRAIL ve TNF reseptörleriyle tetiklenen apoptozu da baskılayabileceğini öne sürmüştür (128,129). Buna karşılık başka araştırmacılar Hsp70 ile Hsp90'ın TNF ve Fas yolunda apoptozu indükleyici etki gösterebildiklerini iddia etmiştir (125). Hsp'lerin TNF yolundaki rollerinin belirlenmesinde ortaya çıkan zorluk, TNF'nin güçlü bir apoptoz indükleyici olmasının yanısıra NF-kB üzerinden oldukça etkili anti-apoptotik mekanizmaları da tetikleyebilmesinde yatmaktadır. Büyük olasılıkla TNF sinyalizasyonunu gerçekleştiren koşulların özellikleri, TNF ligandlarının oluşturduğu nihai yanıtta Hsp'lerin nasıl rol oynayacağını belirlemektedir. TNF yolunda apoptozu baskılayan Hsp'ler için birkaç ayrı mekanizma öne sürülmüştür: fosfolipaz A2 aktivasyonunun baskılanması, reaktif oksijen türlerinin inhibisyonu ve glutatyon düzeylerinin artması ile intrasellüler kalsium ve fosfataz aktivitelerinin düzenlenmesi (125,130,131).

TNFR1, FADD ve kaspaz-8 yoluyla apoptozu tetikleyebilir veya NF-kB yoluyla anti-apoptotik faktörler olan TRAF1, TRAF2, c-IAP1, c-IAP2 (132) ve Bcl-2 homoloğu A1'in (133) gen ekspresyonunu indükleyerek sağ kalımı teşvik edebilir. TNF ve benzeri uyarılar, NF-kB inhibitörü olan I $\kappa$ B'nin fosforilasyonunu tetikleyerek ubikitinizasyonunu ve proteozomal yıkımını sağlamaktadır (134). Bu durumda serbest kalan NF-kB nükleusa transloke olarak hedef genleri uyarmaktadır. I $\kappa$ B'nin fosforilasyonunu I $\kappa$ B kinaz (IKK) sağlar. IKK kompleksi, bir adet düzenleyici alt birim (IKK $\gamma$ ) ve iki adet katalitik alt birimden (IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$ ) oluşur. Son dönemde yapılan bazı çalışmalar, Hsp'lerin anti-apoptotik etkilerini IKK kompleksinin stabilitesini ve aktivitesini modüle ederek gerçekleştirdiklerini göstermektedir. Hsp90, RIP ve TRAF-2 aracılığı ile TNFR1'e bağlanarak NF-kB yolunu uyarmakta ve dolayısıyla da hücre sağ kalımı lehinde rol oynamaktadır. Hsp27, poli-ubikitinlenmiş I $\kappa$ B'nin proteosomal yıkımını uyararak NF-kB aktivitesini ve sağ kalımı arttırmaktadır (135). Hsp90 ve Hsp27'nin aksine Hsp70 IKK

kompleksi ile iletişime girmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, Hsp70 ve Hsp90 ile proteozom aracılı protein yıkımı arasında işlevsel bir bağlantının varlığını ortaya koymuştur. Yine son birkaç yılda yapılan araştırmalarda apoptotik yolda anahtar görevi gören Bid (136), Bcl-2 (137) ve Bim (138) gibi bazı düzenleyicilerin ubiquitine bağımlı döngüleri olduğu ifade edilmiştir. Bu durumda Hsp'ler ve ilişkili molekülleri, apoptotik proteinlerin proteozom aracılığı ile yıkımını sağlayarak da hücrelerin ölüme duyarlılıklarını kontrol edebilmektedir.

### **2.14.3. Apoptotik sinyalizasyonda Hsp'lerin rolü:**

JNK apoptotik süreçte rol alan bazı proteinlerin etkisini düzenlemekte ve Hsp70'in anti-apoptotik etkisi için iyi bir apikal hedef teşkil etmektedir. JNK aktivasyonu Hsp70 tarafından güçlü bir şekilde bastırılmaktadır. Stresin JNK defosforilasyonunu baskılayıcı etkisi Hsp70 tarafından engellenmekte ve dolayısıyla JNK etkisiz kalmaktadır. Sitokrom c salınımına neden olan c-Myc ve p53, JNK tarafından fosforile edilmektedir. JNK aynı zamanda anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL'yi de fosforile ederek inaktif hale getirmektedir. Yine son zamanlarda mitokondriden Smac/DIABLO salımında da etkisi olduğu gösterilmiştir (139). Özetle Hsp70, JNK yolunda sitokrom c'nin açığa çıkmasını baskılayan önemli bir şaperondur.

IGF-1, NGF ve PDGF gibi bazı sitokinler PI3K ve Akt yoluyla hücre sağ kalımını teşvik etmektedir. Akt apoptozda görevli bazı proteinleri fosforile eden bir kinazdır, ör: Bad'ı fosforile ederek Bcl-XL'den ayrılmasını ve sitozolik 14-3-3 tarafından hapsedilmesini sağlamaktadır. Bu durum Bad'ın mitokondriye transloke olarak pro-apoptotik faktörleri açığa çıkarmasını engellemektedir (140). Akt, bazı hücre ölüm genlerinin ekspresyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerini kontrol etmektedir. Aynı zamanda FKHL1'i fosforile ederek nukleusa geçişini engellemekte ve böylece hedef genlerinden olan Fas ligandı (FasL), IGF-1 bağlayıcı protein ve muhtemelen Bim'in ekspresyonunu engellemektedir. Akt bununla da yetinmeyip IκB'yi fosforile etmekte ve yaşam destekleyici proteinler olan c-IAP1, c-IAP2 ve Bcl-2 protein A1 genlerinin NF-κB aracılı transkripsiyonunu

uyarmaktadır. Bazı çalışmalar Hsp90 ve Hsp27'nin Akt etkinliğine olumlu katkı sağladığını göstermiştir. Hsp90 ve Cdc37'nin Akt ile oluşturduğu kompleks, Akt'in karalılığını ve etkinliğini arttırmaktadır (141). Hsp90 inhibitörlerinin tetiklediği Akt yıkımı, Bax aracılı sitokrom c ve Smac/DIABLO salınımını (ki Bcl-2 ve Bcl-XL tarafından baskılanır) uyarmaktadır. Hsp27 de Akt üzerinde etkiye sahiptir. Akt aracılı Hsp27 fosforilasyonu, bu iki protein arasındaki iletişimi güçlendirip Akt'in kararlılığını sağlayarak hücre sağ kalımını olumlu yönde etkilemektedir (142).

## **2.15. Epilepsi ve Apoptoz**

### **2.15.1. Deneysel Epilepsi Modellerinde Apoptotik Yollar**

#### **Apoptotik yolların nöbetler tarafından tetiklenmesi**

Nöbetlere bağlı beyin hasarında apoptoz ve bununla ilişkili biyokimyasal mekanizmalar üzerindeki araştırmalar 1990'ların ortalarında başlamıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda sıçan beyinlerinde, uzamış nöbetlerden sonra, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl dUTP nick end labelling) yöntemiyle in situ apoptotik DNA parçalanması saptanmıştır (143,144). Hücre fenotip analizleri, bu tür hücrelerin % 90'dan fazlasının nöronlardan oluştuğunu ortaya koymuştur (145,146). Kısa nöbetlerden sonra ölen az sayıdaki nöronda da DNA parçalanması saptanmıştır (147,148). Ancak epileptik sıçan modellerinde, oldukça az sayıda dejenere nöron "klasik apoptotik morfoloji" sergilemektedir (149-152). Bu bulgular, en azından sıçan modellerinde, nöbetlerin neden olduğu hücre ölümünün apoptozun her özelliğini göstermediğini ifade etmektedir. Buna karşılık, fare hippokampusundaki dejenere ve TUNEL pozitif hücrelerin yaklaşık 1/3'ü apoptotik nükleer değişiklikler göstermektedir (153).

#### **Nöbetler sonrasında EAY aktivasyonu:**

Epilepsi modellerinde, ölüm reseptörüyle ilişkili ekstrinsik yolda yer alan 3 kaspazdan ikisinin (kaspaz-2 ve kaspaz-8) bu süreçte rol oynadığı gösterilmiştir. Her iki kaspaz da erişkin beyinde konstitütif olarak eksprese

edilmektedir ve yapılan çalışmalar ikisinin de nöbet indüksiyonundan kısa bir süre sonra aktive olduğunu belirtmektedir (145,146). Farelerde yapılan çalışmalar da nöbetlerin kaspaz-8 aktivasyonunu indüklediğini göstermektedir (153).

Nöbetlerden sonra ekstrinsik yolu aktive eden mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Ekstrinsik apoptotik yolda yer alan bazı ölüm reseptörlerinin (TNFR1, Fas, DR4) beyinde konstitütif olarak bulunması muhtemeldir (145,154,155). Bugün bilinen modeller doğrultusunda, DR ligandının TNFR1 ve Fas gibi yüzey reseptörlerine bağlanarak DISC'i oluşturması nöbetlere bağlı kaspaz-8 aktivasyonunu tetikliyor gibi görünmektedir. Kaspaz-8, nöbet indüksiyonundan sonra yaklaşık 40 dakika içinde aktive olduğundan (145,146) TNF $\alpha$ , FasL ve/veya TRAIL'in konstitütif olarak ortamda bulunması gerekir. Hem TNF $\alpha$  hem de FasL'nın erişkin sıçan hipokampusunda (nöbetlerden önce ve sonra) bulunduğu gösterilmiştir (154,156). Buna karşılık TRAIL'in normal veya epileptik beyinde bulunmadığı ifade edilmiştir (155,157). TNF $\alpha$  nötralizan antikollarının nöroprotektif etkiye sahip olması (154), bu mekanizmanın tanımlandığı şekilde çalıştığını düşündürmektedir. Nöbetlerin ölüm reseptörlerini aktive ettiğini gösteren bir diğer delil de nöbetlerden sonra sıçan hipokampusunda DISC komponentlerinin varlığıdır (154,158). Ölüm reseptörlerinin majör intrasellüler komponentleri de (TRADD, ve FADD) sıçan hipokampusunda konstitütif olarak bulunmaktadır ve FADD ekspresyonu nöbetlerden sonra artmaktadır (145).

Ölüm reseptör sinyalizasyonunun ilerlemesi en az iki protein tarafından durdurulabilir: FLIP (FADD-like interleukin converting enzyme inhibitory protein) ve SODD (silencer of death domains). FLIP hakkında yeterince bilgi bulunmamakla birlikte nöbetlerden sonra hipokampal CA3 nöronlarında SODD ekspresyonunun hızla azaldığı gösterilmiştir (154). Tüm bulgular ekstrinsik apoptotik yolun nöbetlerden sonra aktive olduğunu göstermektedir.

### **Nöbetler sonrasında İAY aktivasyonu**

Nöbetlerden sonra mitokondrilerde kalsium biriktiği uzun zamandır bilinmektedir (159). Ayrıca, nöbetlerden sonra 2 saat içinde Bax molekülleri mitokondri dış membranında birikmekte (160) ve bu sitokrom c salınımıyla eş zamana denk gelmektedir (161). Bir diğer olası mekanizma da mitokondrilerden kalpain aracılı AIF salınımıdır (162). Ortama salınan sitokrom c'nin nöbetlerden sonra hippokampusta Apaf-1'e bağlandığı (163) ve daha sonra kaspaz-9'un kesilerek proteolitik aktivenin arttığı kanıtlanmıştır (145,163,164).

Nöbetlerin tetiklediği nöronal ölüm sırasında intrinsik yoldaki ilerlemenin IAP ailesi tarafından düzenlenebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Nöbetlerden sonra, dejenere olan nöronlarda XIAP'ın kaybolduğu gösterilmiştir (165). Sıçanlardaki nöbetler, cIAP2 ekspresyonunu azaltmamakla birlikte Bcl-10'a bağlanarak nötralize olmasına neden olmaktadır (154).

İntrinsik yoldaki çalışmalar mitokondriler üzerinde yoğunlaşmakla birlikte nöbete bağlı nöronal ölüme endoplazmik retikülümün (ER) da önemli rol oynadığına dair deliller bulunmaktadır. Endoplazmik retikülüm stresörleri arasında oksidatif stres, intraselüler kalsium dengesindeki bozulma ve TNFR1 aktivasyonu bulunmaktadır. Nöbetlerden sonra genel bir ER stres cevabı gelişir ve TRAF2 ile apoptosis signal-regulating kinase-1 (Ask-1) aktive olmaktadır (154,166). Ek olarak, 150-kDa oxygen-regulated protein (ER spesifik moleküler şaperon) nöbetlerin tetiklediği nöronal ölüme karşı koruyucu etki göstermektedir (167). In vitro koşullarda, nöbetler sırasında seramid (ER aracılı kalsium salınımı yoluyla apoptozu tetikler) oluşumu da gösterilmiştir (168). Ancak bu konudaki veriler henüz sınırlıdır ve ER yolunun nöbetlere bağlı apoptozda ne derecede ağırlıklı olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar genel olarak EAY'un İAY'dan daha önce aktive olduğunu göstermektedir. Kaspaz-8'in kesimi, mitokondrial disfonksiyon ve kaspaz-9 kesiminden önce olmaktadır (145,163). Kaspaz-8'in daha önce aktive olduğunu gösteren diğer deliller ise şöyledir: 1-

kaspaz-8 kesiminin önlenmesi, kaspaz-9 kesiminin önlenmesinde göre hipokampusta daha fazla koruyucu etki göstermektedir (145,163); **2-** kaspaz-8 kesiminin engellenmesi sitokrom c salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonunu azaltmaktadır (145); **3-**kaspaz-9 inhibisyonu, kaspaz-3 aktivasyonu üzerinde fazla etki göstermezken kaspaz-8 aktivasyonunun önlenmesi hem kaspaz-3 hem de kaspaz-9 aktivitesini azaltmaktadır (145,163).

### **Nöbetler sonrasında eksekütif kaspaz aktivasyonu**

Nöbetlere bağlı nöronal ölüm araştırmalarında üzerinde en çok çalışılan apoptoz düzenleyicilerinden biri kaspaz-3'tür. Kaspaz-3 mRNA ve protein sentezi nöbetlerden sonra hem hipokampus hem de ekstrapokampal dokularda artmaktadır (169-172). Nöbetlerden sonra ayrıca kesilmiş kaspaz-3'ün de hipokampus ve ekstrapokampal dokularda bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (161,171-177). Kaspaz-3 aktivasyonu için indirekt bulgular ise ICAD (inhibitor of caspase activated DNAase) ve spektrin yıkım ürünlerinin varlığıdır (178). Bunlara rağmen, nöbetlerden sonra kaspaz-3 aktivasyonu olmadığını iddia eden çalışmalar da bulunmaktadır (179).

Düşük miktarda olmakla birlikte erişkin beyinde kaspaz-7 eksprese edilmektedir (152), ancak sıçanlarda (en azından intra-amigdala KA enjeksiyonu ile) aktive olduğu gösterilememiştir. Bunula birlikte hipokampus ve temporal neokortekste kaspaz-7 ekspresyonunun artması hala bu kaspazın epilepsi modelinde apoptotik hücre ölümünde rol alabileceğini düşündürmektedir (152).

Nöronal ölümde bir diğer önemli mediatör kaspaz-6'dır. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada epileptik ratlarda kaspaz-6 aktivasyonu gösterilmiştir (152,177,180). Nöronların kaspaz-6 aktivitesine özellikle duyarlı olmalarının nedenlerinden biri IAP'ların kaspaz-6'ya bağlanmaması olabilir. Aktive kaspaz-6'nın dendritlerde yoğun olarak bulunması, apoptozun yanı sıra hasarlanmış hipokampusun yeniden şekillenmesinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

### **Nöbetlerle tetiklenen nöronal ölümden Bcl-2 ailesi**

Kaspazlar gibi Bcl-2 ailesi proteinleri de nöbetlere bağılı nöronal ölümden rol oynarlar. Pro-apoptotik fonksiyonu olanlar arasında en çok çalışılan ve nöbetlerden sonra artmış olduğu tespit edilen üye Bax'tır (181-183). Bax'ın yanı sıra nöbetler Bcl-Xs artışına da neden olurlar (184). Nöbetlerden sonra Bid ekspresyonu değışmemekle birlikte kesilerek aktif formu olan p15'e (tBid) dönüşmektedir (145,185). Nöbetlerden sonra ayrıca Bim ekspresyonu da artmakta, Bad ise değışmemektedir (156,160,185). Ancak bu bulguların kullanılan deneysel modellere bağılı olarak değışebileceği de akılda tutulmalıdır.

Nöbetlerden sonra anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-W ekspresyonunun değıştiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (160,181,185). Anti-apoptotik Akt nöbetlerden sonra kortekste nöron ölümünü inhibe etmekte ve bunu büyük olasılıkla Bad veya Bim ekspresyonu ve/veya fonksiyonunu baskılayarak gerçekleştirmektedir (156,160).

Pek çok Bcl-2 ailesi proteini beyinde konstitütif olarak eksprese edildiğinden protein miktarındaki ve hatta subsellüler lokalizasyondaki değışiklikler "aktivasyon" derecesini tam olarak tanımlamaya yetmez. Aktivasyonu daha iyi anlamının yolu aslında protein-protein interaksiyonundaki değışikliğe bakmaktır. Bu tür değışiklikler nöbetlerde bildirilmiştir: In vivo ve in vitro koşullardaki nöbetlerden sonra Bad bağılı bulunduğu 14-3-3 proteininden ayrılıp anti-apoptotik Bcl-XL'ye bağlanmaktadır (160). Bim normal koşullarda dynein'e bağlanmış olarak bulunur, ancak nöbetlerden sonra Bcl-W ile interaksiyonu artar (156). Nöbetler aynı zamanda Bcl-10'un c-IAP2'ye bağlanmasını da artırır (154). Sıçanlarda KA ile indüklenen nöbetlerden sonra Bcl-2 fonksiyonel olarak inaktive edilmektedir (183).

### **Diğer apoptotik düzenleyiciler**

Nöbete bağılı nöronal ölüm mekanizmalarında ağırlıklı olarak kaspaz ve Bcl-2 ailelerinin çalışılmış olmasına rağmen apoptozda etkili olan diğer bazı ailelerdeki genler de nöbete-bağılı nöronal ölümden rol alabilir.

Bunlardan en çok çalışılanı ve bazı modellerde nöbetler tarafından tetiklendiği gösterilen tümör baskılayıcı gen p53'tür. Bax vb proteinleri indükleyerek apoptozu tetiklediği düşünülmektedir. Diğer modülatörler ve yollar şunlardır: MAP (mitogen-activated protein) kinaz şelalesi (154); CREB (cAMP response-element binding protein) (186); DAP (death associated protein) (158,187); NF-κB (188); katepsinler (189) ve AIF (190). Bunların yanı sıra inflamatuvar sitokinler ve kalpainlerin de nöbete-bağlı apoptotik nöron ölümünde rol oynaması muhtemeldir (191,192).

### **Apoptotik yollar ve epileptogenez**

Apoptotik yolların aktivitesi, ilk travmaya bağlı majör nöronal ölümden (ör: status epileptikusa bağlı) sonra epileptogenez sürecinde de devam etmektedir. Pitkanen ve ark eksekütif kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-6 aktivitesinin epileptogenez sırasında da aktif olduklarını göstermişlerdir (172,180). Kaspaz-3 aktivasyonu, nöbet indüksiyonundan sonraki 7. günde (epileptogenezin hala devam ettiği sırada) maksimum düzeye ulaşmaktadır (172). Ne var ki bu sırada kaspaz-3 fonksiyonunun inhibe edilmesi anti-epileptojenik aktivite göstermemektedir (172). Bununla birlikte bu çalışmadan elde edilen veriler, DEVDfmk (kaspaz-3 inhibitörü) uygulamasının epileptik sıçan sayısını ve mossy lif filizlenmesini azaltmış olabileceğini vurgulamaktadır.

Daha önce de bahsedildiği gibi epileptogenez sırasında hippokampal piramidal nöronların apikal dendritlerinde kaspaz-6 aktivasyonu saptanması (180) bu kaspaza yönelik inhibitörlerin epileptogenez gelişimini engellemede rol oynayabileceklerini düşündürmektedir. Aktive kaspaz-6'nın substratları iyi bilinmemekle birlikte olası adaylar arasında yapısal proteinler ve iyon kanalları bulunmaktadır. In vivo koşullarda, epileptogenez sırasındaki kaspaz substratlarının bilinmesi yeni bir tedavi yaklaşımının gelişmesine öncülük edebilir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin epileptogenezdeki rolü iyi bilinmemektedir, ancak apoptotik yolun proksimalinde yer aldıkları düşünülürse araştırılması gereken bir alan olduğu kolayca anlaşılabilir.

### 2.15.2. Epilepsi hastalarında apoptotik yollar

Temporal lob epilepsi hastalarında apoptotik yolların aktive olduğunu gösteren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Cerrahi sırasında çıkarılan dokuda (hippokampus ve ekstrapokokampal temporal neokortekste) kaspazların ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktive olduğunu gösteren ipuçları vardır (156,187,193-195). Kontrollerle kıyaslandığında, temporal neokortekste kaspaz-3 ekspresyonu ve aktivasyonunun anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (193). Aynı çalışmada inflamatuvar bir kaspaz olan kaspaz-1'in de aktive olduğu ifade edilmiştir. Her iki kaspaz için de henüz hippokampus verileri bulunmamaktadır. Bu veriler, kronik epileptik süreçte kaspaz aktivasyonunun önemli bir özellik olduğunu göstermektedir. Nöbete bağlı nöron ölümünün kaspaz inhibitörleri ile azaldığının gösterilmesi, refrakter epilepsili hastalarda dejeneratif sürecin ilerlemesinde kaspazların önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir (2,3,5).

Epileptik insan dokusunda bazı Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonunda değişiklik olduğu gösterilmiştir (156,187,194,195). Kalitatif çalışmalarla insan hippokampusunda Bax ekspresyonunun arttığı ifade edilmektedir (194,195). Aynı bulguya neokortekste rastlanmamıştır (193). Hippokampusta kesilmiş Bid'e rastlanmakta (187), ancak Bid ve Bad ekspresyonu değişmemektedir (156). İlginç olarak, kontrollerle karşılaştırıldığında hasta dokusunda Bim ekspresyonunun daha az olduğu saptanmıştır (156). Artmış Bcl-2 ekspresyonu için kalitatif (194) ve kantitatif (193) deliller bulunmaktadır. Öte yandan temporal neokortekste de Bcl-XL artışı bildirilmiştir (193). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerindeki artmış veya azalmış ekspresyonun tam olarak ne anlama geldiğini ve altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Eldeki veriler, en azından epilepsi hastalarında apoptotik yolların aktive olduğunu göstermektedir. Bu deliller aynı zamanda adaptif koruyucu mekanizmaların harekete geçtiğini, ancak pro-apoptotik BH3 üyelerinin her nasılsa bu mekanizmaları alt ederek kaspazları aktif hale getirmeyi başardığını ve nörodejeneratif sürecin ilerlemesine yol açtıklarını

düşündürmektedir. Bunlara ek olarak diğer bazı moleküllerle de ilgili veriler ortaya çıkmaya başlamıştır. Temporal lob epilepsili hastaların beyinde kontrollere oranla antiapoptotik Akt fosforilasyonunda (aktivasyonunda) artış saptanmıştır (156). Bugüne kadar ilgi daha çok mitokondrial yol üzerinde odaklandıysa da son dönemde endoplazmik retikulumdaki DAP (genel olarak pro-apoptotik etkiye sahip) kinaz ve onun E3 ligazı olan DIP-1 (DAP kinaz interacting protein-1) düzeylerinde ciddi derecede artış olduğu da gösterilmiştir (187).

### **Tedavi girişimleri**

Nöbetlere bağlı nöronal hücre ölümünde apoptotik yollar üzerinden terapötik girişimleri incelemeyi hedefleyen bir dizi deney yapılmıştır. Bu konudaki çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

### **Ölüm reseptörleri ve EAY kaspazları:**

Kaspaz 8'in, IETDfmk kullanarak, in vivo koşullarda inhibe edilmesinin nöbetlere bağlı nöronal ölümü hippokampusta yaklaşık % 50 oranında azalttığı gösterilmiştir (145). İlginç olarak, nöbetlerden sonra ölüm reseptör ligandlarına karşı kullanılan nötralizan antikörlerle ölüm reseptör aktivasyonunun ehgellenmesi daha az koruyucu etki göstermiştir (154). Ölüm reseptörleri ve/veya onların intrasellüler adaptör proteinleri epileptik insan beyinde de eksprese edilmektedir (155,187), ancak eldeki veriler doğrultusunda bu yolun tedavi için kullanılabilirliği şimdilik kuşkuludur.

Nöbetlerden sonra kaspaz-2 inhibisyonunun (aktive olduğu gösterilmesine rağmen) nöroprotektif olmadığı saptanmıştır (146).

### **İntrinsik yol ve eksekütif kaspazlar:**

Kaspaz-3 inhibitörlerinin, nöbetlere de neden olabilecek bazı beyin hasarı modellerinde (ör: travma) nöronal kayba karşı etkili oldukları bulunmuştur (196). Status epileptikus sonrası gelişen nöron kaybını önlemede üzerinde en çok çalışılan mediatör kaspaz-3'tür. Temporal lob neokorteksinde ve hippokampusta, kaspaz-3 inhibitörü DEVDfmk

kullanımının nöroprotektif etki gösterdiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (161,176,197). Bunun yanısıra, bakulovirusten türetilen ve geniş spektrumlu kaspaz inhibitörü olan p35, sıçanlarda KA ile indüklenen nöbetler sonrasında görülen nöron kaybını azaltmaktadır (198) ve p35 transgenik hayvanlar nöbetlerin yol açtığı hasara daha dirençlidirler (199). Kaspaz-9 inhibitörü LEHDFmk'nın da nöbet sonrasında hippocampusta hücre kaybına karşı koruyucu etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (163,197). Ayrıca her kaspaz inhibitörünün nöbetlerden sonra koruyucu etkisinin olmadığı gösterilmiştir (146).

### **Bcl-2 ailesi:**

Bcl-2 proteinlerini hedefleyen farmakolojik inhibitörlerin nöroprotektif potansiyelleri iyi bilinmemektedir, zira in vivo kullanım için yeterince ajan bulunmamaktadır. Hippokampusta nöbetlerden sonra koruyucu etkisi olduğu gösterilen kalsinörin inhibisyonu, Bad aktivasyonunu önlemektedir (160). Transkripsiyon düzenleyicilerinden FKHR ve FKHR-1'in fosfataz blokörleri ile inhibe edilmesi, Bim ekspresyonunu azaltarak nöbetlere karşı koruyucu etki göstermektedir (156). Aynı çalışmada, in vitro koşullarda Bim'e karşı antisens oligonükleotidler kullanılarak da hücre hasarının azaldığı saptanmıştır. Viral vektörler aracılığı ile Bcl-2'nin fazla miktarda eksprese edilmesi de umut vaat eden bir yöntem gibi görülmektedir (200). İlginç olarak, Bak "knockout" farelerde nöbetlerin ve hasarın daha şiddetli olduğu saptanmıştır (201). Bu konuda en etkili tedavi stratejilerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

## BİREYLER ve YÖNTEM

### 3.1. Hasta seçimi

Klinik, interiktal EEG ve kranial MRG bulguları ile MTLE düşünülen hastalar Erişkin Video-EEG Monitorizasyonu Ünitesine yatırılarak 32 kanallı dijital EEG ile yeterli sayıda nöbetleri kaydedilene kadar incelenmektedir. İktal semiyoloji, uzun interiktal ve iktal kayıtlar incelenerek nöbetlerden sorumlu alan(lar) saptanmaktadır. Gerekli görüldüğü takdirde hastalara interiktal/iktal SPECT, FDG-PET de yapılabilmektedir. Bulgular haftalık Epilepsi Cerrahisi toplantısında multidisipliner bir ortamda tartışıldıktan sonra uygun hastalara operasyon kararı alınmaktadır. Preoperatif dönemde hastalara intrakarotid amobarbital testi (WADA) yapılarak dominant hemisfer tayini yapılmaktadır. Ayrıca mesial temporal yapıların tek taraflı alınması sonrası gelişebilecek önemli bir komplikasyon olan “postoperatif amnezi” tehlikesine karşı kontrolateral mesial temporal yapıların durumu test edilmektedir. Mesial temporal lob epilepsisi için standard, hipokampus ve amigdalayı içeren temporal lobektomi yapılmaktadır. Rezeksiyon sınırları, hemisferin dominant-non dominant olmasına göre belirlenmektedir. Cerrahi ile çıkarılan dokular formaldehit tespitli parafin bloklardan elde edilen kesitler hematoksil-eozin, sinaptofizin, NeuN, GFAP ve pNFP ile boyanarak değerlendirilmektedir. Ayrıca parafin bloklar arşivlenmekte ve yanısıra taze donmuş spesimenler DNA doku bankasında saklanmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan hipokampal dokular, merkezimizde 2001-2003 yılları arasında MTLES nedeniyle ameliyat edilen 32 hasta arasından seçildi. Hematoksil ile boyanmış olan preparatların incelenmesinden sonra uygun görülen kesitler çalışmaya alındı. Çalışmaya dahil edilen 25 hastanın (16K, 9E; yaş:15-49 (ort:28)) demografik özellikleri Tablo 3.1’de özetlenmiştir. Vakalardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak *poly-L-lysin* kaplı camların üzerine yapıştırıldı. Tüm deneyler sırasında, antikorun çalıştığını kanıtlamak için pozitif kontroller (ilgili antikorun mutlaka eksprese edildiği bilinen doku; bizim çalışmamızda genellikle kanser dokuları) ve negatif kontroller (boyanmanın non-spesifik olmadığını kanıtlamak için

primer antikorun kullanılmadığı, ancak tüm diğer aşamaların aynı olduğu kanser dokusu) kullanıldı. Ayrıca bulgularımızı normal beyin dokusuyla (epileptik olmayan ve herhangi başka bir nedenle ölen otopsi vakaları) karşılaştırabilmek için otopsi kontrolleri de aynı deneyler sırasında boyandı. Deneylere başlamadan önce her antikor için pozitif kontrol olabilecek insan dokusunun saptanması amacıyla aşağıda tanımlanan şekilde bir dizi immünohistokimyasal deney yapıldı. Teknik nedenlerle her antikoru her hastada çalışmak mümkün olmadı (Bkz. Tablo 3.1).

**Tablo 3.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri**

Hasta no ve kodu:	Cinsiyet	Lezyon tarafı	Ameliyat yaşı	Epilepsi süresi (yıl)	AEİ	Risk faktörleri	Nöbet sıklığı	Son nöbet (gün)	Çalışılan antikor
1-ZY	K	Sol	32	30	CBZ (1200) VGB (500)	Travma	1-6/ay	1	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
2-EB	K	Sol	23	20	CBZ (900) PRM (500) TPM (150)	FK	6-8/ay	29?	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
3-AU	K	Sağ	21	19.5	OXC (900) PRM (500)	FK	2-3/ay	14?	Bax, tBid IAP1-2 AIF
4-ED	E	Sol	48	43	CBZ (1200) VGB (2000) Barb (125)	Travma, ailede epilepsi	2-3 ayda bir	3	Bax, tBid IAP1-2 AIF
5-AS	K	Sağ	44	42.5	GBP (900) CBZ (1000)	FK? Ailedede epilepsi	1-2/ay	7?	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
6-ND	E	Sağ	24	21	CBZ (400) GBP (800) DPH (100)	FK, travma	4/ay	2	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
7-NS	K	Sağ	28	27	CBZ (800) GBP (600)	FK, ailedede epilepsi	6-7/ay	3?	Bax, AIF IAP1-2 tBid, Hsp70
8-GK	K	Sağ	20	19	LTG (300) OXC (1200)	FK, ailedede FK	2-3/ay	?	AIF
9-EC	E	Sağ	19	18	VGB (1000) CBZ (1200)	FK, ailedede epilepsi	5-10/ay	?	Bax, AIF IAP1-2
10-HT	E	Sağ	37	36.5	GBP (1600) Barb (150)	FK, travma	1-5/ay	3	Bax, AIF IAP1-2
11-AS	E	Sol	24	23.5	OXC (1800)	Ailedede FK	1-6/ay	?	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
12-OK	E	Sağ	33	17	CBZ (800)	Bilinen yok	4/ay	4	Bax, AIF IAP1-2
13-YA	E	Sağ	22	20	PRM (750) LTG (200) CBZ (800)	Ailedede FK, enfeksiyon	3-4/ay	?	IAP1-2 AIF

**Tablo 3.1 Devamı: Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri**

Hasta no ve kodu:	Cinsiyet	Lezyon tarafı	Ameliyat yaşı	Epilepsi süresi (yıl)	AEİ	Risk faktörleri	Nöbet sıklığı	Son nöbet (gün)	Çalışılan antikor
14-EY	E	Sağ	29	28	OXCB (1500)	FK, ailede epilepsi	2/ay	?	Bax, AIF
15-ŞA	K	Sol	49	48	LTG (100) CBZ (1200)	FK; ailede epilepsi	5-6/ay	2	Bax, AIF, IAP1-2
16-RA	K	Sol	21	20.5	GBP (900) OXCB (1200)	FK, ailede FK ve epilepsi	5-7/ay	?	Bax, AIF IAP1-2
17-PÖ	K	Sağ	15	14.5	GBP (900) CBZ (800)	FK	1-2/ay	2	Bax, AIF IAP1-2
18-İM	K	Sağ	31	25	OXCB (1200)	Menenjit	2/ay	?	IAP1 AIF
19-ÖK	K	Sağ	28	27	CBZ (2000) PRM (1000) LTG (125)	Aşı sonrası havale	8-12/ay	9	Bax, AIF IAP1-2 Hsp70
20-MH	K	Sol	27	15	CBZ (600) Barb (200)	Bilinen yok	8-10/ay	?	IAP1 AIF
21-NY	K	Sol	31	29	VGB (1500) CBZ (400)	FK	?	1	IAP1-2 AIF
22-MU	K	Sol	17	7	OXCB (1200)	Travma, ailede epilepsi	2-3/ay	7	IAP1-2 AIF
23-AK	K	Sağ	34	17	CBZ (1200)	Travma	1/ay	3	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
24-EÖ	E	Sağ	21	17	LTG (200) CBZ (800)	Travma, menenjit	4/ay	?	Bax, tBid IAP1-2 AIF, Hsp70
25-AA	K	Sol	23	22	GBP (400) VGB (1000)	FK	1/ay	1	Bax, tBid IAP1-2 AIF

CBZ: karbamazepin, VGB: vigabatrin, PRM: primidon, TPM: topiramat, OXCB: okskarbazepin, Barb: barbeksaklon, GBP: gabapentin, DPH: difenilhidantoin, LTG: lamotrijin

### 3.2. İmmünohistokimya çalışmaları:

İmmünohistokimyasal deneyler kısaca şu şekilde yapıldı: Parafin kesitler 80°C'de 1 saat boyunca etüvde bekletilerek deparafinizasyon yapıldı. Daha sonra etüvden çıkarılan kesitler ksilolde 3 kez 5'er dakika bekletildikten sonra yine 3 kez 5'er dakika boyunca alkolden geçirildi. Bazı antikorlar için (Tablo 3.2'de belirtilmiştir) antijen açığa çıkarma yöntemi kullanıldı. Bunun için distile suyla yıkanan preparatlar düdüklü tencerede 0.1 M sitrat tamponlu solusyonla 3 dakika basınçlı "pişirme"ye maruz bırakıldı.

Bunu takiben % 3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika blokaj uygulandı. Daha sonra PBS ile yıkanan preparatlara protein blokaj solusyonu damlatıldı. Yaklaşık 15 dakika sonra primer antikor tabloda belirtilen süre ve konsantrasyonlarda damlatılarak yine aşağıda belirtilen koşullarda bekletildi.

**Tablo 3.2:** Çalışmada kullanılan antikorlar için uygulanan teknik koşullar

Antikor	Primer antikor özellikleri	Konsantrasyon	Bekleme koşulları	Kontrol doku	Antijen açığa çıkarma
Bax	Rabbit poliklonal, Santa Cruz	1/250	1 saat oda ısısı	meme karsinomu	+
tBid	Rabbit poliklonal, Biosource	1/100	+4°C, bir gece	glioma	+
AIF	Goat poliklonal, Santa Cruz	1/100	+4°C, bir gece	meme karsinomu	+
c-IAP1	Rabbit poliklonal, Santa Cruz	1/50	+4°C, bir gece	glioma	+
c-IAP2	Rabbit poliklonal, Santa Cruz	1/50	+4°C, bir gece	glioma	+
Hsp70	Mouse monoklonal, Sigma	1/100	+4°C, bir gece	meme karsinomu	-

Takiben preparatlar 3 kez 5'er dakika süresince PBS ile yıkandı ve sekonder antikor damlatıldı. On-onbeş dakika sonra PBS ile yıkama işlemi benzer şekilde tekrarlanıp tersiyer antikor damlatıldı ve yine 10-15 dakika beklendikten sonra preparatlar PBS ile yıkandı. Daha sonra reaksiyonun görünür hale gelmesi için, preparatlara D-aminobenzidin (DAB) damlatılarak

kahverengi boyanmanın (dokuda çalışılan antijenin varlığını göstermektedir) gerçekleşmesi beklendi. Kesitler bu işlemde sonra suyla yıkandı ve hematoksin ile (c-IAP1 için metilen yeşili) boyandı. Preparatlar yukarıda tanımlandığı gibi tekrar alkol ve takiben ksilolde bekletildikten sonra kurutulup entelan ile kapatıldı. AIF dışındaki tüm antikörlerde, protein blokajı ile sekonder ve tersiyer antikörler için evrensel kitler kullanıldı. AIF için % 10 BSA ile 30 dakika protein blokajı uygulandı. Sekonder antikor olarak anti-goat (1/200) damlatılıp 1 saat beklendi. PBS yıkamasından sonra damlatılan tersiyer antikor 30 dakika bekletildi ve yıkamalardan sonra işlemler yukarıda anlatıldığı şekilde devam edip sonlandırıldı. Parafin kesitler başka bir deneyde Hoechst ile kapatılarak çekirdek boyanması olup olmadığına da bakıldı.

### **3.3. Hücre sayımı:**

Preparatların boyanmasından sonra kesitlerde, Nikon Eclipse E-600 ışık mikroskopunda, x40 büyütmede (görüntüyü 400 kez büyütür) hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı hippokampusun altı mikroanatomik bölgesinde gerçekleştirildi. Bu bölgeler: 1-hilus (CA4); 2-CA3; 3-CA2; 4-CA1; 5-subiculum ve 6-DG olarak belirlendi. Mikroanatomik bölgelerde x40 büyütmede görülen boyanmış nöronların, tüm nöronlara oranı kaydedildi. Hasta kesitlerinden elde edilen sayımlar otopsi kontrol kesitleri ile karşılaştırıldı.

### **3.4. İstatistik:**

Gruplar arasındaki (hasta-otopsi kontrol) farklılıklar Bax, c-IAP1, c-IAP2 ve tBid antikörleri için her anatomik bölgede (hilus, CA1, CA2, CA3, DG ve subiculum) ayrı ayrı hesaplandı. Mann-Whitney testi SPSS yazılım programı aracılığı ile uygulandı. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### 4.1. MTS hippocampusunda genel bulgular

İncelenen tüm hasta kesitlerinde genel olarak CA4 (hilus), CA3 ve özellikle CA1'de çok belirgin nöron kaybı gözlemlendi. CA2 bölgesinde nöronlar genel olarak korunmuştu. Dentat girus'ta (bazı hastalarda daha belirgin olmak üzere) kontrollere kıyasla granüler hücre kaybı ve yere yer bu hücrelerde oldukça dramatik saçılma (dispersiyon) dikkati çekti. Subiculum'da nöronların korunmuş oldukları gözlemlendi.

### 4.2. Bax bulguları

Bax antikoru ile yapılan boyamalarda, hasta grubunda tüm sektörlerde kontrollere oranla anlamlı derecede artmış nöron boyanması görüldü (Tablo 4.1) (Şekil 4.1 ve 4.2). Bax'ın mitokondrial boyanmayı destekler nitelikte, sitoplazmada granüler paternde boyandığı dikkati çekti (Şekil 4.2E). Otopsi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, hastalarda hem boyanan nöron sayısının hem de tek bir nörondaki boyanma derecesinin daha fazla olduğu saptandı.

### 4.3. c-IAP1 ve c-IAP2 bulguları

c-IAP-1 ve c-IAP-2 antikoru ile otopsi kontrollerinde bekleneceği gibi boyanma hemen hemen hiç görülmedi. Buna karşılık hasta grubunda tüm hippocampal sektörlerde son derece yoğun homojen paternde sitoplazmik hücre boyanması görüldü (Tablo 4.2 ve 4.3) (Şekil 4.3-4.6). Ayrıca c-IAP-1 ile yapılan çalışmada boyanmanın hem sitoplazmik hem de nükleer olabileceği görüldü (Şekil 4.4E). İncelenen hippocampal sektörler içinde, sadece subiculumda *nükleer* boyanmanın kontrollere göre anlamlı derecede arttığı saptandı ( $p=0.015$ ).

### 4.4. AIF bulguları

AIF antikoruyla incelenen tüm hippocampal bölgelerde (hem hasta hem kontrollerde) belirgin, granüler paternde, sitoplazmik boyanma

olmasına rağmen ne kontrol ne de hasta kesitlerinde nükleer boyanma görülmedi (Şekil 4.7).

#### 4.5. Hsp70 bulguları

HSP70 boyamalarında otopsi preparatlarında tüm hücrelerde soluk sitoplazmik bir boyanma izlendi (Şekil 4.8A). Hasta kesitlerine bakıldığında ise, incelenen tüm hippokampal bölgelerde sağlıklı görünen hücrelerde boyanmanın sitoplazmada belirgin derecede arttığı (Şekil 4.8 B,C), buna karşılık dejenere nöronlarda hiç boyanma olmadığı görüldü.

#### 4.6. tBid bulguları

tBid antikoruyla, hücrelerde homojen sitoplazmik boyanma görüldü. Elde edilen veriler hilus, CA3, DG ve subikulumda boyanmanın otopsi kontrollerine göre anlamlı derecede arttığını ortaya koydu (Tablo 4.4) (Şekil 4.9). CA2 bölgesinde fark saptanamazken CA1 bölgesindeki farkın neredeyse anlamlı sayılabilecek kadar sınırdaki olduğu görüldü.

**Tablo-4.1:** Bax antikorları ile elde edilen bulgular

Hippokampus bölgesi	Boyanan hücre (%)		p değeri
	hasta	kontrol	
<b>Hilus</b> (ortalama $\pm$ SS)	97 $\pm$ 8	24 $\pm$ 16	0.001
Median (minimum-maksimum)	100 (66-100)	30 (0-35)	
<b>CA3</b>	89 $\pm$ 27	22 $\pm$ 15	0.021
	100 (0-100)	22 (11-33)	
<b>CA2</b>	91 $\pm$ 22	15 $\pm$ 9	0.006
	100 (18-100)	15 (9-22)	
<b>CA1</b>	100 $\pm$ 0	0	0.001
	100 (100-100)	0 (0-0)	
<b>DG</b>	40 $\pm$ 18	1 $\pm$ 1	0.002
	41 (4-78)	0 (0-3)	
<b>Subikulum</b>	79 $\pm$ 28	4 $\pm$ 6	0.001
	100 (16-100)	2 (0-12)	

**Tablo-4.2:** IAP-1 antikoru ile elde edilen bulgular

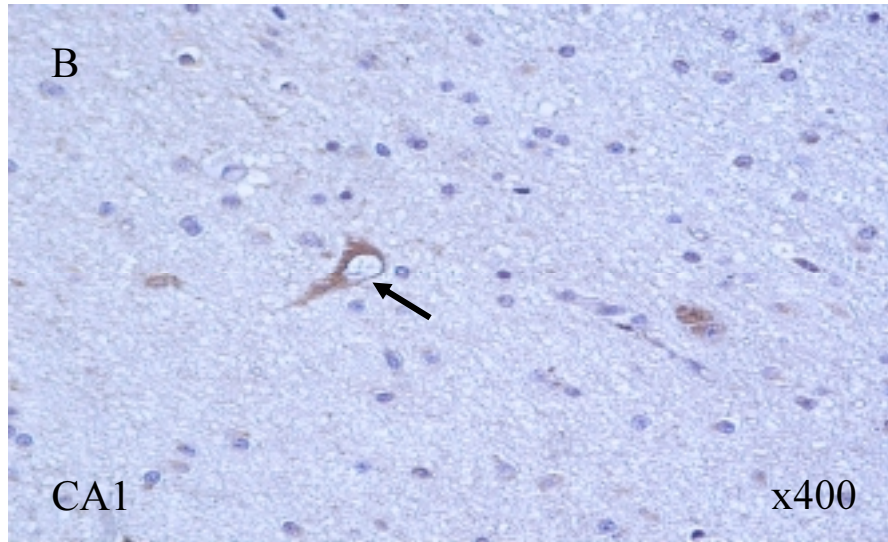
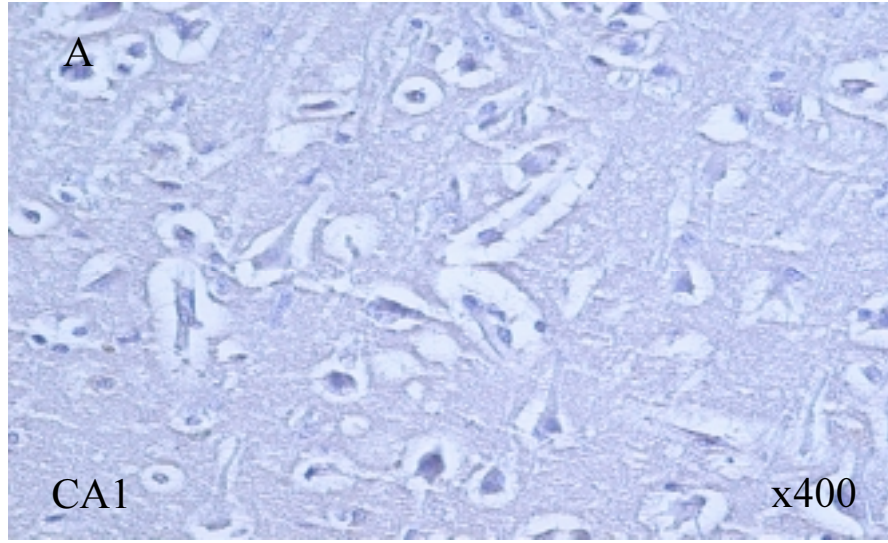
Hippokampus bölgesi	Boyanan hücre (%)		p değeri
	hasta	kontrol	
<b>Hilus</b>	100±0 100 (100-100)	1±2 0 (0-4)	0.000
<b>CA3</b>	100±0 100 (100-100)	0 0 (0-0)	0.000
<b>CA2</b>	95±12 100 (54-100)	0 0 (0-0)	0.001
<b>CA1</b>	100±0 100 (100-100)	0 0 (0-0)	0.000
<b>DG</b>	47±16 42 (20-79)	0 0 (0-0)	0.001
<b>Subikulum</b>	94±13 100 (52-100)	0 0 (0-0)	0.000

**Tablo-4.3:** IAP-2 antikoru ile elde edilen bulgular

Hippokampus bölgesi	Boyanan hücre (%)		p değeri
	hasta	kontrol	
<b>Hilus</b>	94±15 100 (50-100)	0 0 (0-0)	0.002
<b>CA3</b>	97±5 100 (83-100)	0 0 (0-0)	0.006
<b>CA2</b>	96±11 100 (57-100)	0 0 (0-0)	0.001
<b>CA1</b>	100±0 100 (100-100)	0 0 (0-0)	0.000
<b>DG</b>	47±15 45 (14-75)	0 0 (0-0)	0.022
<b>Subikulum</b>	97±6 100 (80-100)	0 0 (0-0)	0.003

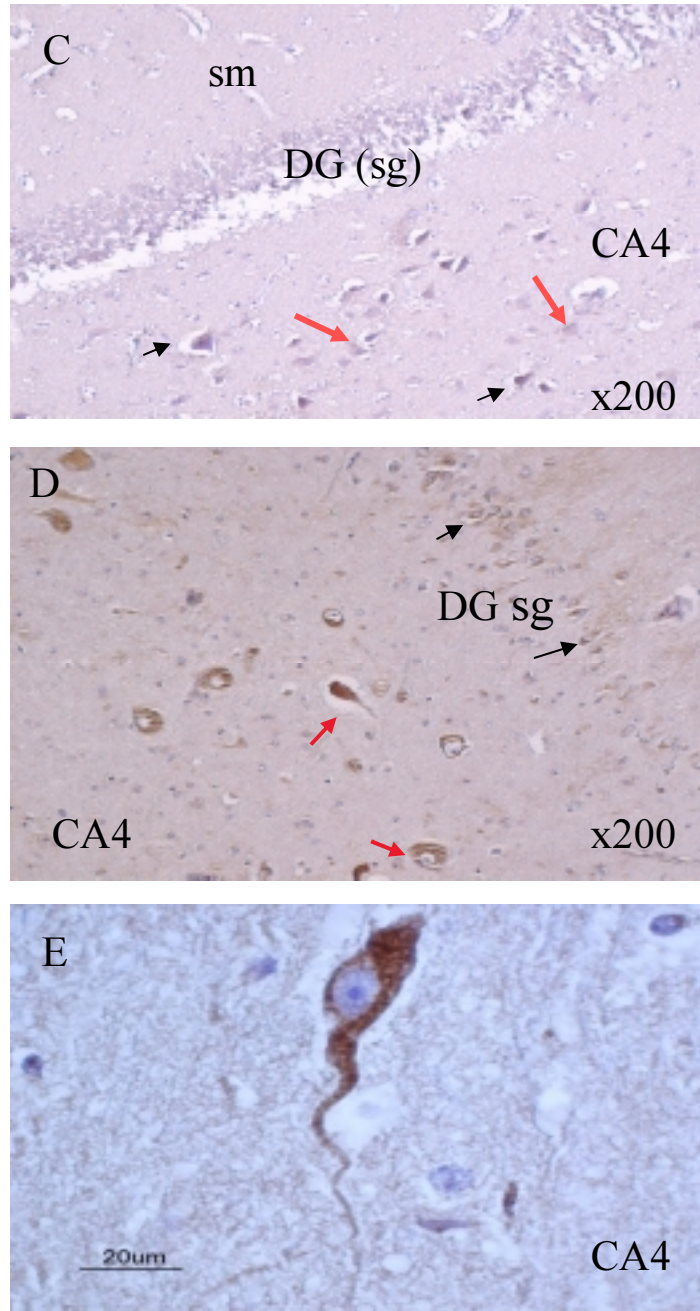
**Tablo-4.4:** tBid antikorları ile elde edilen bulgular

Hippokampus bölgesi	Boyanan hücre (%)		p değeri
	hasta	kontrol	
<b>Hilus</b>	93±15 0 (0-100)	63±17 93 (87-100)	0.021
<b>CA3</b>	100±0 0 (0-100)	90±2 49 (23-76)	0.018
<b>CA2</b>	97±7 24 (0-83)	91±12 (9-78)	0.23
<b>CA1</b>	100±0 0 (0-88)	92±8 44 (4-85)	0.051
<b>DG</b>	57±44 0 (0-17)	1±2 10 (0-20)	0.024
<b>Subikulum</b>	84±22 9 (0-63)	38±22 58 (58-58)	0.021

**Bax Bulguları**

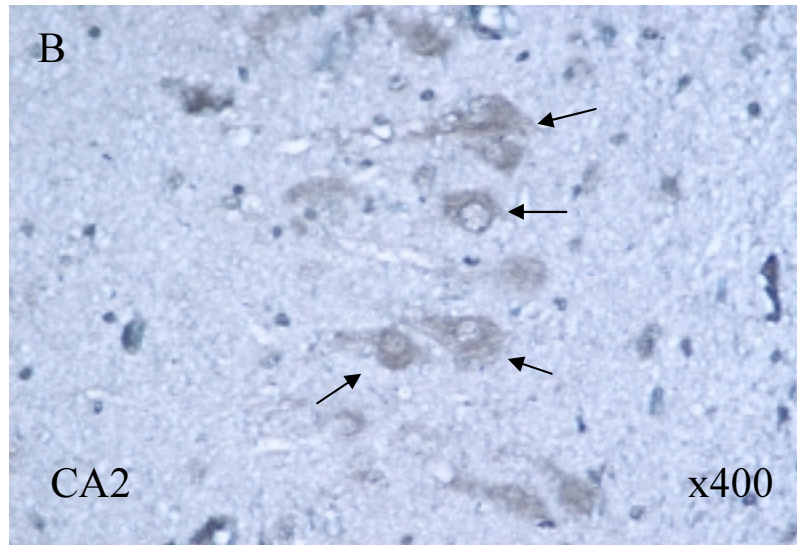
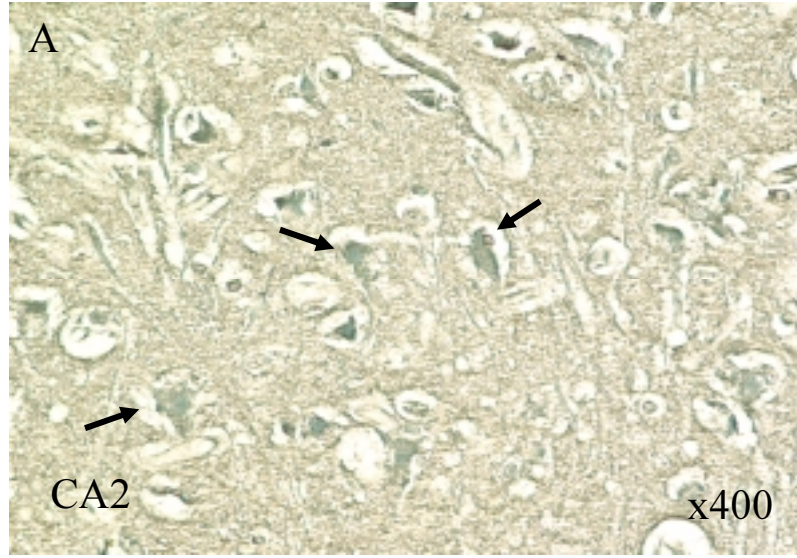
**Şekil 4.1:** Otopsi (A) ve MTS (B) hipokampusunda CA1 bölgesinde Bax antikoruyla boyanma. Otopsi hipokampusunda belirgin boyanma izlenmezken, ağır nöron kaybının görüldüğü MTS hasta CA1 bölgesindeki nöronda belirgin kahverengi sitoplazmik boyanma izlenmektedir.

### Bax Bulguları



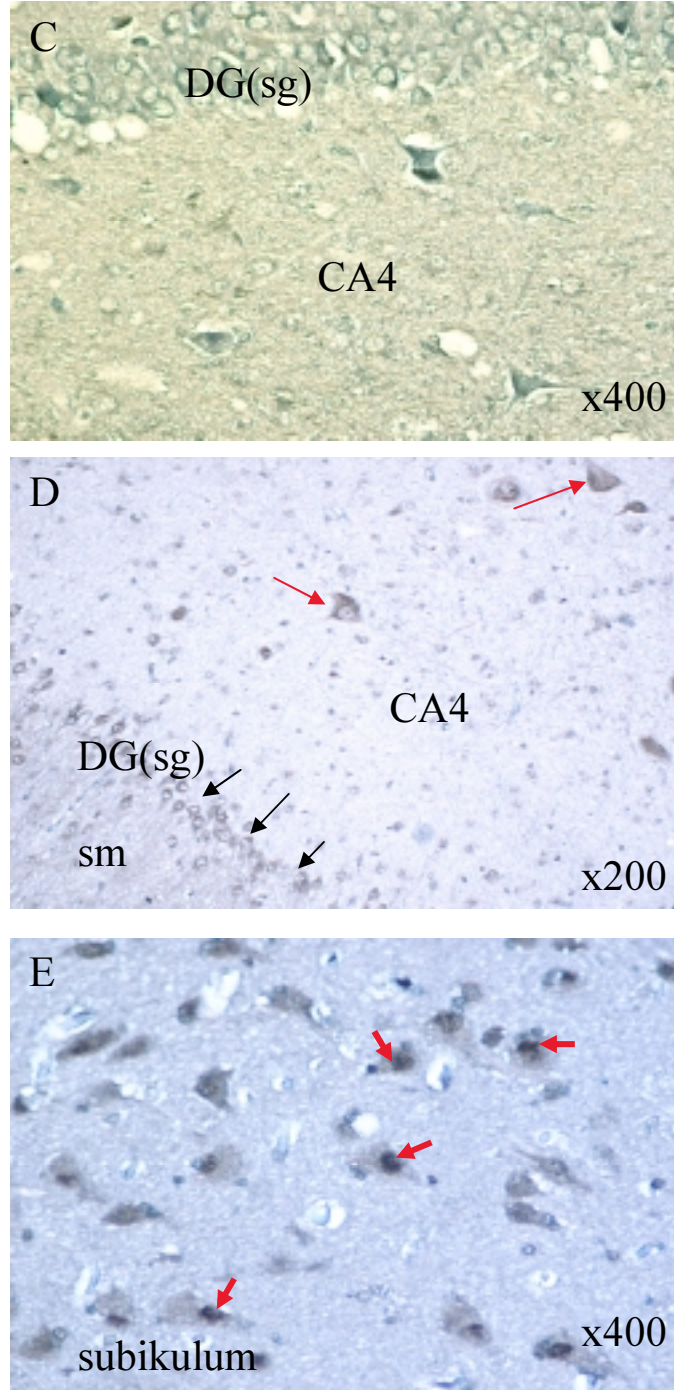
**Şekil 4.2:** Otopsi (C) ve MTS (D) hipokampusu DG ve CA4 bölgesinde Bax antikor boyanması. Otopsi kesitinde nöron boyanması zemin boyanmasından çok farklı değildir (kırmızı oklar) ve ancak bazı dejenere hücrelerde şüpheli boyanma izlenmektedir (siyah oklar). Buna karşılık MTS hipokampusunda hem CA4 (kırmızı oklar), hem DG granüler nöronlarında (siyah oklar) belirgin kahverengi sitoplazmik boyanma görülmektedir. Büyük büyütmede (E) boyanmanın aslında sitoplazmada granüler paternde olduğu dikkati çekmektedir.

### c-IAP1 Bulguları



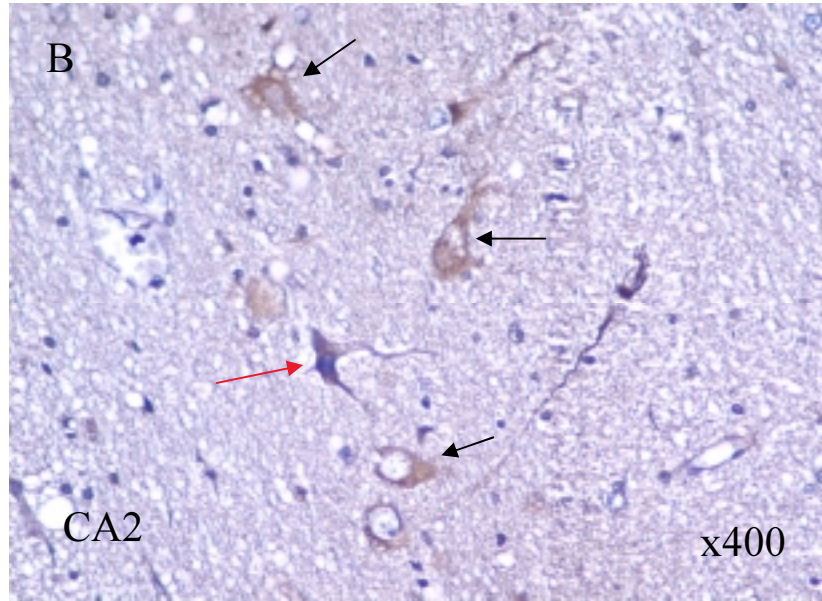
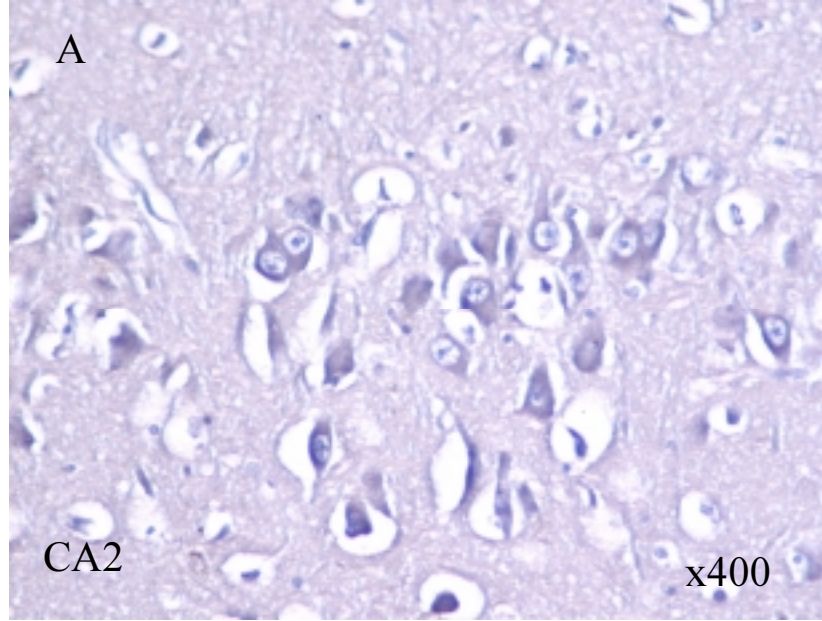
**Şekil 4.3:** Otopsi (A) ve MTS (B) hippocampusunda CA2 bölgesinde c-IAP1 antikor boyanması. Otopsi kesitinde nöronların dejenere olduğu görülmektedir. Kullanılan zemin boyaması nedeniyle nöronlar yeşil renkli görülmekte ve kahverengi boyanma dikkati çekmemektedir. MTS hasta kesitinde ise sağ kalan normal görünümlü nöronlarda yeşil zemin üzerinde kahverengi boyanma görülmektedir.

### c-IAP1 Bulguları



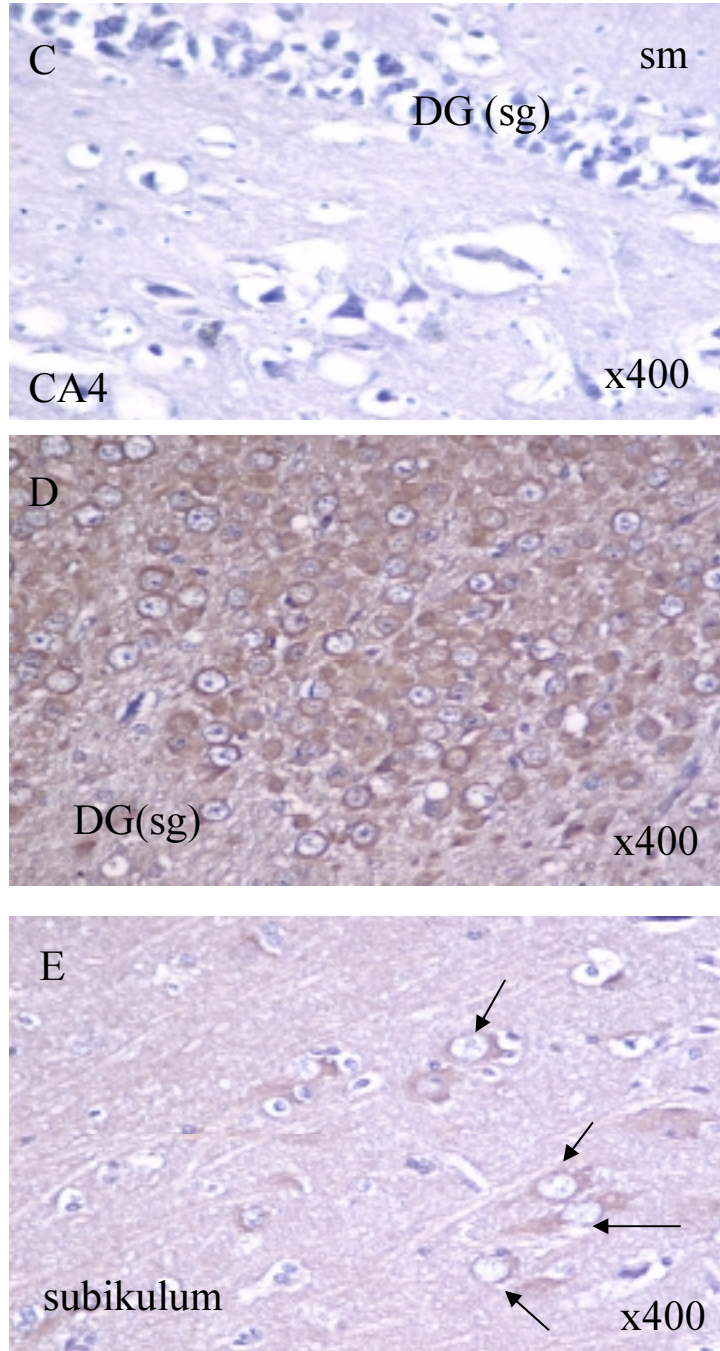
**Şekil 4.4:** Otopsi (C) ve MTS (D) DG ve CA4 bölgesinde c-IAP1 antikor boyanması. Otopsi vakasında zemin boyanması dışında boyanma gözlenmezken MTS dokusunda hem CA4 (kırmızı oklar), hem granüler nöronlarda (siyah oklar) kahverengi boyanma izlenmektedir. MTS kesiti subikulum bölgesinde (E) ise sitoplazma ile birlikte yoğun çekirdek boyanması dikkati çekmektedir.

### c-IAP2 Bulguları



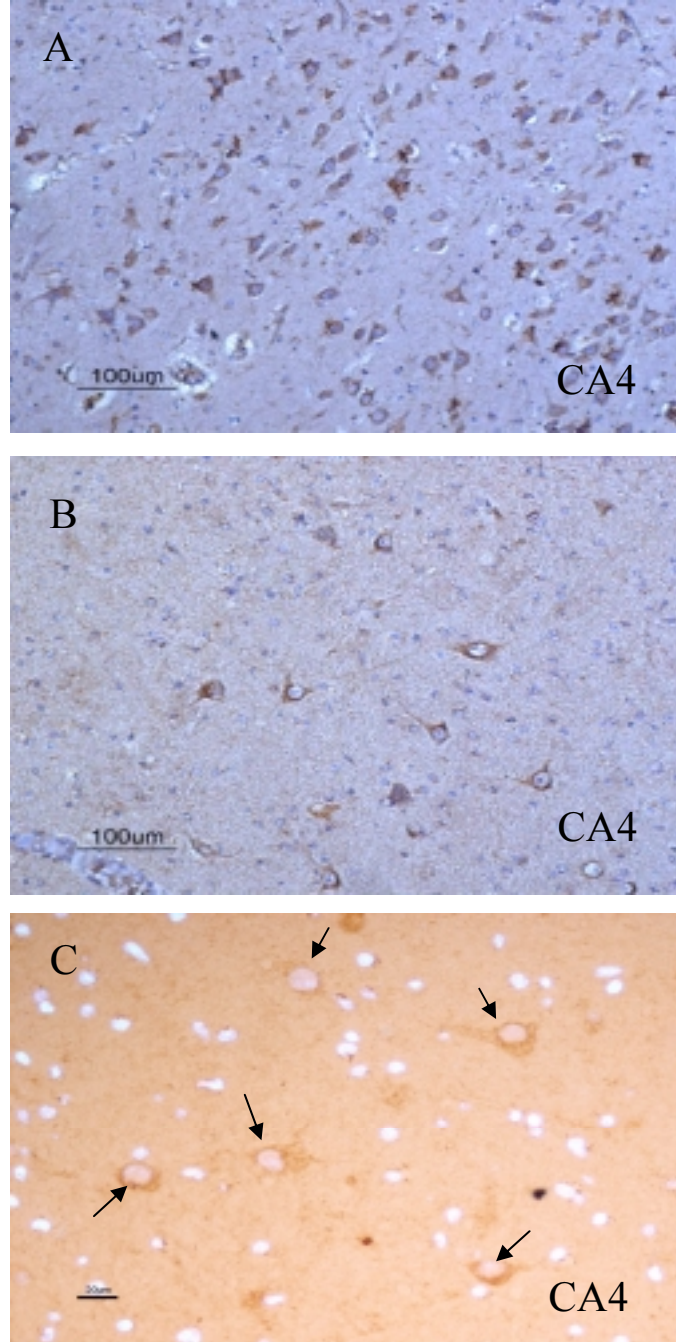
**Şekil 4.5:** Otopsi (A) ve MTS (B) hipokampusunda CA2 bölgesinde c-IAP2 antikor boyanması. Otopsi kesitinde nöronlarda zeminden farklı bir boyanma görülmemektedir. Buna karşılık MTS CA2 kesitinde sağlıklı görünen nöronlarda yoğun boyanma izlenmektedir (siyah oklar). Kesitteki dejenerere nöronda (kırmızı ok) boyanmanın nispeten daha az olduğu söylenebilir.

### c-IAP2 Bulguları



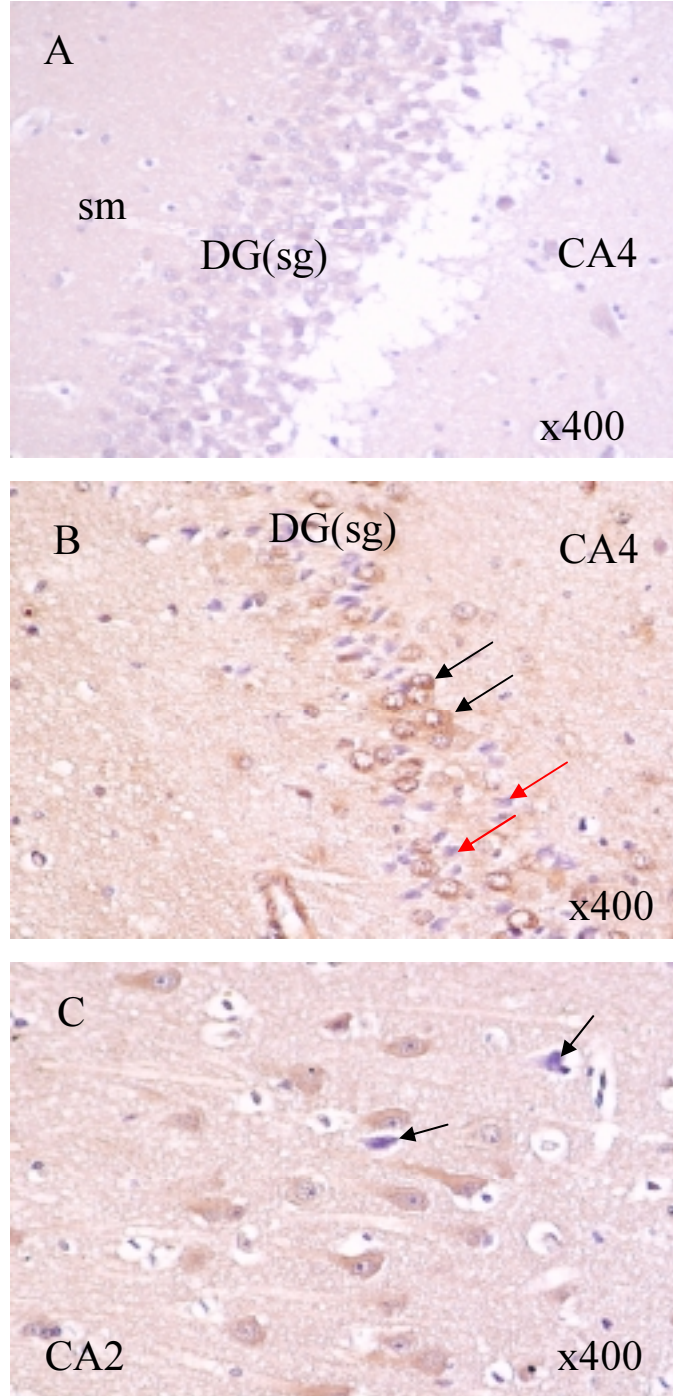
**Şekil 4.6:** Otopsi (C) ve MTS (D) hipokampusunda DG bölgesinde c-IAP2 antikor boyanması. Otopsi kesitinde boyanma izlenmemektedir. MTS kesiti DG bölgesinde ise son derece yoğun granüler hücre boyanması görülmektedir. Ayrıca DG nöronlarındaki bariz saçılma dikkati çekmektedir. MTS kesiti subikulum bölgesinde (E) sağlıklı nöronların sitoplazmik boyanma gösterdiği ve c-IAP1'in aksine çekirdek boyanması olmadığı görülmektedir.

### AIF Bulguları



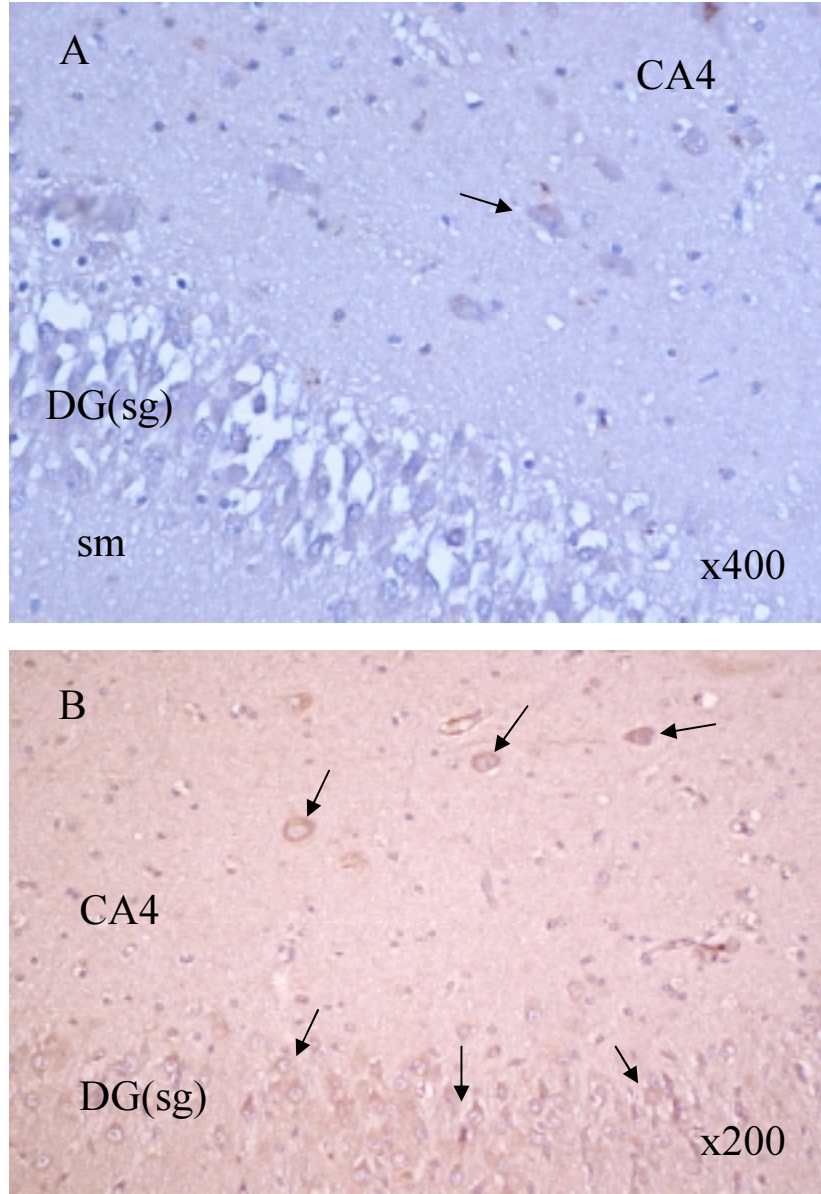
**Şekil 4.7:** Otopsi (A) ve MTS (B) hipokampal kesitinde AIF antikorü ile elde edilen CA4 bölgesindeki boyanma. Her iki kesitte de hücrelerde homojen sitoplazmik boyanma izlenmekte ve kesitler arasında boyanma farkı gözlenmemektedir. Ancak MTS CA4 bölgesinde belirgin nöron kaybı dikkati çekmektedir. MTS CA4 bölgesinde Hoechst ile çekirdek boyanması (C). Hücre sitoplazmaları kahverengi, çekirdekler mavi olarak izlenmektedir. Çekirdek sınırları içinde kahverengi boyanma gözlenmemektedir. Küçük ve parlak mavi renkli boyanmalar glia çekirdeklerine aittir.

### Hsp70 Bulguları



**Şekil 4.8:** Otopsi (A) ve MTS (B) hipokampusu DG ve CA4 bölgesinde Hsp70 antikor boyanması. Otopsi kesitlerinde, hücrelerde zemin boyanmasına yakın soluk renkli boyanma izlenirken, MTS kesitinde sağlıklı görünen granüler hücrelerde yoğun boyanma izlenmektedir (siyah ok). Dejenere hücreler (kırmızı ok) boyanmamıştır. Benzer bulgular MTS CA2 bölgesindeki (C) piramidal nöronlarda da izlenmektedir (dejenere ve Hsp70 eksprese etmeyen nöronlar okla gösterimiştir).

### tBid Bulguları



**Şekil 4.9:** Otopsi (A) ve MTS (B) hippocampusu DG ve CA4 bölgelerinde tBid antikor boyanması. Otopsi kesitlerinde daha az sayıda nöronda ve daha soluk renkli boyanma görülmektedir. MTS kesitinde ise belirgin piramidal ve granüler hücre boyanması izlenmektedir.

## TARTIŞMA:

Çalışmamızdan elde edilen veriler, MTLES hastalarında gözlenen hippocampal nöron kaybından apoptotik hücre ölümünün sorumlu olabileceğini göstermektedir. Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının, sağ kalan nöronların önemli bir kısmında tetiklendiği anlaşılmaktadır. Apoptotik süreçte hem ekstrinsik (tBid) hem de intrinsik (mitokondrial Bax) yol aktive olmaktadır. Özellikle Bax'ın mitokondrial translokasyonu piramidal hücrelerde daha belirgin olmak üzere yaygın olarak görülmektedir. Kaspazdan bağımsız (AIF) apoptotik yolların aktivasyonuna ilişkin delile bu çalışmada rastlanmamıştır. Ancak, apoptotik ölüm yollarının aktivasyonuna rağmen, özellikle CA2 (kısmen CA3) ve DG ile subikulumda önemli sayıda nöron canlılığını devam ettirebilmektedir. Bu da anti-apoptotik fren mekanizmalarının iş başında olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim c-IAP1 ve c-IAP2 ile HSP70 proteinlerinin belirgin derecede tüm sağ kalan nöronlarda eksprese edildiği gözlenmektedir.

Bugüne kadar epilepsisi olan insan dokusunda apoptotik ölüm mekanizmalarını araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bunların çoğu geçtiğimiz aylarda yayınlanmıştır (156,187,193-195,202,203). Araştırmalar ağırlıklı olarak Bcl-2 (156,193,194,203) ve kaspaz (187,193,202,203) aileleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Pro-apoptotik Bcl-2 üyelerinden Bax (193-195,203), Bid (203), Bim (156), ve Bad (203) ile ilgili veriler bulunmaktadır. Bax immünreaktivitesini inceleyen araştırmalarda nöronal boyanmanın arttığı bildirilmiştir (194,195). Bax sitoplazmada konstitütif olarak bulunduğundan bu verilerin dikkatli yorumlanması gerekmektedir. Çalışmamızda kullanılan Bax antikorunun özelliği ise mitokondriye transloke olmuş Bax moleküllerine özgü olmasıdır ve dolayısıyla Bax'ın aktive olduğunu göstermektedir (204). Bugüne kadar epileptik insan dokusunda Bid ile yapılan ilk çalışmada (187) western blot yöntemiyle mitokondrilerde tBid'in varlığı gösterilmiştir. Daha sonra Yamamoto ve ark (203) ER fraksiyonunda bulunan Bid miktarının hastalarla

kontroller arasında fark göstermediğini ve tBid'in yine bu fraksiyonda bulunmadığını ifade etmişlerdir. Unilateral amigdalya KA enjeksiyonu ile yapılan epileptik hayvan modelinde Henshall ve ark (145) Bid'in kesilerek tBid haline dönüştürüldüğünü ve bunun nöbetlerden hemen sonra beyin dokusunda saptandığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda epileptik hippokampus dokusunda tBid'in varlığı iHK yöntemlerle gösterilmiştir. Kontrol dokularla karşılaştırıldığında neredeyse tüm bölgelerde bu immünreaktivitenin arttığı gözlenmiştir. Normal koşullar altında insan beyinde tBid'in oluşumu konusunda bilgi bulunmamaktadır. Teorik olarak böyle bir dönüşümün hiç olmaması veya çok az miktarda olması beklenir. tBid'in stres altında çok hızlı bir şekilde oluştuğunun göz önünde bulundurulması halinde kontrol grubumuzda tBid immünreaktivitesinin görülmesi şaşırtıcı değildir. Hasta grubunda artmış olması ise epileptik dokuların sürekli strese maruz kaldığının bir göstergesidir. Nöbetlerin sitokinlerin salınımını arttırdığı da bilinen bir gerçektir (192). Bu moleküller membrandaki reseptörlerine bağlanarak ekstrinsik apoptotik yolu aktive ediyor ve tBid düzeylerini artırıyor olabilirler. tBid varlığı hastaların pre-operatif dönemde geçirdiği son nöbet zamanı ile ilişkili değildir, zira 1-14 gün arasında görülebilmektedir. Literatürde diğer pro-apoptotik Bcl-2 üyelerinden Bim ve Bad ile elde edilen sonuçlar ilginçtir. Hasta dokusunda mikrosomal fraksiyonda Bad'ın varlığına rastlanmamıştır. Epileptik hayvan modelinde ise (160) hasarlanmış hippokampusta Bad'ın, bağlı bulunduğu 14-3-3 proteininden ayrılarak Bcl-XL'ye bağlandığı ve böylece pro-apoptotik Bax'ı serbest bıraktığı bildirilmiştir. Buna karşılık sağlıklı görünen neokortekste, muhtemelen artmış Akt fosforilasyonuna bağlı olarak Bad'ın inhibe edildiği öne sürülmüştür. Bim ekspresyonunu inceleyen bir çalışmada Shinoda ve ark (156) epileptik hasta hippokampusunda beklenen aksine Bim ekspresyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Buna karşılık aynı çalışmada status epileptikus sonrası sıçanlarda Bim ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Araştırmacılar epileptik hasta dokusunda, programlanmış hücre ölüm yollarının deneysel modellerde geliştirilen akut

nöbetlerin tetiklediği yollardan farklı olabileceğini ve bunun da muhtemel adaptasyon mekanizmaları sonucu gelişmiş olabileceğini ifade etmişlerdir.

Epileptik insan beyinde kaspaz 1, 3, 6, 7, 8 ve 9 ile çalışmalar bildirilmiştir (193,202,203). Henshall ve ark (193) TLE hastalarının neokorteksinde aktif kaspaz 1 ile pro-kaspaz 3 ve aktif kaspaz 3 düzeylerinin kontrollere oranla belirgin derecede arttığını saptamışlardır. Buna karşılık başka bir araştırmada (202) epileptik hasta hippocampusunda az sayıdaki hücrede aktif kaspaz 3 görüldüğü (kontrollerde görülmezken) bildirilmiştir. Uysal ve ark'nın (194) epileptik hasta hippocampusundaki nöronların % 10'unda Fractin (kaspazla kesilen Aktin) pozitifliği saptaması da kaspaz aktivasyonunun bir diğer indirekt göstergesidir. Bid aktivasyonunu (tBid oluşumu) inceleyen araştırmalarında Henshall ve ark (187) kaspaz 8 aktivasyonunun da bekleneceği üzere nöbetlerden hemen sonra beyin dokusunda saptandığını ifade etmişlerdir. İnsan epileptik hippocampusunda, ER fraksiyonunda Yamamoto ve ark (203) pro-kaspaz 6, 7 ve 9 düzeylerinin kontrollere göre arttığını, ayrıca hasta beyinlerinde aktif kaspaz 7 ve 9'un da saptandığını bildirmişlerdir.

Pro-apoptotik mekanizmalara kıyasla, epileptik insan beyinde anti-apoptotik mekanizmaları inceleyen daha az sayıda çalışma bulunmaktadır. Uysal ve ark (194) Bcl-2 ekspresyonunun hippocampusun bazı nöronlarında ve reaktif astrositlerin çoğunda arttığını bildirmişlerdir. Henshall ve ark (193) ise Bcl-2 ile Bcl-XL'nin neokortekste arttığını western blot yöntemiyle göstermişlerdir. Apoptoz inhibitör protein (IAP) ailesinden bugüne kadar bildirilen tek çalışma epileptik insan hippocampusunda XIAP'ın aktif kaspaz 7'ye büyük ölçüde bağlandığını ve bu şekilde aktif kaspaz 7'nin etkisini azalttığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda da IAP ailesinden iki üyenin (c-IAP1 ve c-IAP2) ekspresyonunun hasta hippocampuslarında önemli derecede arttığı, buna karşılık kontrol dokularda hemen hemen hiç görülmediği saptanmıştır. Bu iki proteinin epilepside ne şekilde etkilendiğini bugüne kadar bildiren insan veya hayvan çalışması bulunmamaktadır. İlginç olarak c-IAP1'in subikulum nöronlarında hem sitoplazmik hem de nükleer yerleşim gösterdiği dikkati çekmiştir. c-IAP1'in sub-sellüler yerleşiminin

anlamı ve önemi konusunda literatürde yeterince bilgi bulunmamaktadır. c-IAP1 ve c-IAP2 nukleusla sitoplazma arasında gidip gelebilen proteinlerdir. TRAF2 ile ko-eksprese edildikleri durumlarda ağırlıklı olarak sitoplazmada tutulurlar. c-IAP1'in hem sitoplazmada hem nukleusta bulunabileceği bildirilmiştir (205-208). c-IAP1'in ağırlıklı olarak nukleusta yerleşmesi anti-apoptotik etkisini azaltmamaktadır. Apoptotik uyarıların c-IAP1'in nukleustan çıkıp sitoplazmaya geçmesine neden olduğu ve bu geçişin kaspaz inhibitörleri tarafından engellendiği bildirilmiştir (209). c-IAP1'in hücre döngüsünde rol oynadığı ve bu proteini fazla miktarda eksprese eden hücrelerin G2-M fazında biriktikleri bildirilmiştir (209). Epileptik insan hipokampusunda aynı zamanda nöronal siklin B ekspresyonunun nukleusta kontrollere oranla belirgin derecede arttığı bildirilmiştir (195). Araştırmacılar, bu bulguyu nöronların hücre bölünme döngüsüne girerek G2 fazına kadar geldikleri şeklinde yorumlamışlardır. Çalışmamızda ilginç olarak bazı hastaların sadece subikulum bölgesinde nukleer c-IAP1 varlığı saptanmıştır. Bu bulgunun ne anlama geldiği, subikulum nöronlarının sağ kalımına katkıda bulunup bulunmadığı (bilindiği gibi subikulumda nöron kaybı görülmemektedir) henüz bilinmemektedir ve daha ayrıntılı olarak araştırılması gereken bir konu gibi görünmektedir. Anti-apoptotik özelliği olan diğer proteinlerden GRP78 ve GRP94 ile kalneksin (ER şaperonları) çalışmaları geçtiğimiz aylarda insan hipokampusunda yayınlanmıştır (203). Araştırmacılar tanımlanan proteinlerin hipokampus dokusundan elde edilen mikrozomal fraksiyonda kontrollere oranla anlamlı derecede arttığını bildirmektedirler. Çalışmamızda bir diğer şaperon, Hsp70'in kontrollere kıyasla epileptik insan hipokampusunda belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Hsp70 tüm sağlıklı hücrelerde yoğun olarak eksprese edilirken dejenere nöronlarda Hsp70 varlığına, en azından İHK yöntemlerle, rastlanmamıştır. Bundan farklı olarak c-IAP1 ve c-IAP2'yi eksprese eden nöronların bir kısmı dejenere olabilmektedir. Bu durum, Hsp70'in oldukça önemli bir anti-apoptotik molekül olduğunu düşündürmektedir, zira Hsp70, c-IAP1 ve c-IAP2'ye göre pek çok değişik basamakta devreye girerek anti-apoptotik etki gösterebilmektedir. Daha önce epileptik insan hipokampusunda Hsp70'in

varlığı ile ilgili tek makale yayınlanmıştır (210). Epileptik hasta beyinlerinde, ani ve beklenmedik ölümün nöbetlerden kaynaklanmış olabileceği düşüncesini test etmek amacıyla c-Jun ve Hsp70 ekspresyonunu inceleyen araştırmacılar, kontrol grubu olarak kullandıkları MTLES hippocampuslarında Hsp70 ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Bir diğer Hsp proteini olan Hsp27 ile de ilgili epilepsi hastalarında literatürde iki yayın bulunmaktadır (211,212). Altta yatan patolojiden bağımsız olarak alınan temporal lob spesimeninde Hsp27'nin belirgin derecede ve non-spesifik olarak arttığı bildirilmiştir (211). Diğer çalışmada ise ilaca dirençli epilepsi hastalarından alınan temporal neokorteks dokusunda Hsp27 artışı bildirilmiştir (212). İyi bilinen bir diğer Hsp proteini olan Hsp90 ile ilgili henüz insan ve hayvan çalışmaları bildirilmemiştir. c-IAP1 ve c-IAP2 ekspresyonunun artması, yine MTLES hippocampal dokusunda kontrollere oranla artmış NF-kB ekspresyonunun bildirilmesi (213), bu hastalarda TNF $\alpha$  yolunun uyarılmış olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bu yolda önemli fonksiyonları olan Hsp90'ın da artmış ekspresyon göstermesi mümkündür. Nitekim MTLES hippocampuslarında gen ekspresyon paternlerini inceleyen bir araştırmada Gerçeker ve ark Hsp90 mRNA düzeylerinin kontrollere oranla 9 kat arttığını göstermiştir (214). Benzer bir araştırmada ise epileptik insan hippocampusunda Hsp ailesinden  $\alpha\beta$  kristalin'in arttığı bildirilmiştir (215).

Sonuç olarak, MTS'de görülen nöron kaybından apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının sorumlu olması muhtemeldir. Bundan sonra yapılacak çalışmalar, nöron ölümünü engelleyen stratejilerin (pro-apoptotik moleküllerin baskılanması veya anti-apoptotik olanların ekspresyonunun arttırılması) hastalığın fizyopatolojisi ve ilerlemesine ne derece katkı sağlayacağını ortaya koyacaktır.

## SONUÇLAR

1- Mesial temporal sklerozlu hastaların hippocampusunda rezidüel piramidal nöronlarda Bax immünreaktivitesi belirgin derecede artmıştır. Bu bulgu intrinsik apoptotik yolların aktive olduğunu ve Bax'ın sitoplazmadan mitokondrial membrana transloke olduğunu göstermektedir.

2-tBid, hasta hippocampuslarında incelenen sektörlerin büyük bir kısmında non-epileptik otopsi kontrollerine göre artmıştır. Bu bulgu, apikal kaspaz olan kaspaz-8'in aktif hale geçtiğinin dolaylı bir göstergesidir. Öte yandan bu da bazı ligandların (sitokinler vb) TNF reseptör ailesine bağlanarak ekstrinsik apoptotik yolu aktive edebileceğini göstermektedir.

3-Kontrol veya hasta hippocampuslarında, nöron sitoplazmasında yoğun olarak izlenen AIF'in nükleer translokasyonuna rastlanmamıştır. Bu bulgu, AIF'in tanımlanan hasta grubunda nöronal ölüm mekanizmalarına katkıda bulunmadığını düşündürmektedir. Hsp70'in AIF'in nükleer translokasyonunu engelleyebileceği bilinmektedir. Nitekim Hsp70, hasta grubunda belirgin derecede artmıştır. Ancak AIF'in nöbetlerden sonra hızla (saatler içinde) aktive olup nöronal hasar yapması ve cerrahiye kadar geçen süre içinde etkilenen nöronların ortadan kaldırılması da teorik olarak mümkündür.

4-Beyinde çok az miktarda eksprese edildikleri bilinen apoptoz baskılayıcı IAP protein ailesinden c-IAP1 ve c-IAP2 beklendiği gibi otopsi kontrollerinde hemen hemen hiç saptanmamıştır. Buna karşılık her iki protein de hasta hippocampuslarında dramatik derecede artmıştır. Bu bulgu, hücrelerde anti-apoptotik koruyucu mekanizmaların da pro-apoptotiklerle birlikte tetiklendiğini ifade etmektedir.

5-Moleküler şaperonlardan Hsp70, otopsi beyinlerinde çok az miktarda saptanmıştır. Bu proteinin insan beyinde konstitütif olarak az miktarda bulunması mümkündür. Ancak hasta grubunda çok belirgin derecede

artmıştır. Dejenere nöronlarda saptanmaması, pek çok basamakta etki ederek hücre sağ kalımını kolaylaştıran bu proteinin ekspresyonunun durması halinde hücrelerin pro-apoptotik mekanizmalara yenik düşebileceğini düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Meldrum BS, Bruton CJ. Epilepsy. Greenfield's neuropathology (Ed. J.H. Adama ve L.W. Duchen)'de, New York: Oxford University Press, s. 1246-83, 1992.
2. Briellmann RS, Berkovic SF, Syngeniotis A, King MA, Jackson GD. Seizure-associated hippocampal volume loss: a longitudinal magnetic resonance study of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.*, 51, 641-44, 2002.
3. Fuerst D, Shah J, Shah A, Watson C. Hippocampal sclerosis is a progressive disorder: a longitudinal volumetric MRI study. *Ann Neurol.*, 53, 413-16, 2003.
4. Jokeit H, Ebner A, Arnold S, Schuller M. Bilateral reductions of hippocampal volume, glucose metabolism and Wada hemispheric memory performance are related to the duration of mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurol.*, 246, 926-33, 1999.
5. Kalviainen R, Salmenpera T, Partanen K. Recurrent seizures may cause hippocampal damage in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 50, 1377-82, 1998.
6. Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy, "Surgical Treatment of the Epilepsies" (Ed. Engel J Jr)'da, New York: Raven Pres, 511-540, 1987.
7. Engel J Jr. Recent advances in surgical treatment of temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Scand*, 86 (Suppl 140), 71-80, 1992.
8. Wieser HG, Engel J Jr, Williamson PD, Babb TL, Gloor P. Surgically remediabile temporal lobe syndromes. "Surgical Treatment of the Epilepsies" (Ed. Engel J Jr)'da II Baskı. New York: Raven Pres, 49-63, 1993.

9. Engel J Jr, Van Ness P, Rasmussen TB, Ojemann LM. Outcome with respect to epileptic seizures. "Surgical treatment of the epilepsies" (Ed. Engel J Jr)'da II Baskı. New York: Raven Pres, 609-21, 1993.
10. Hippocampus [online]. Wikipedia, the free encyclopedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus> [05/09/2006].
11. Mathern GW, Babb TL ve Armstrong DL. Hippocampal sclerosis, "Epilepsy: a comprehensive text book" (Ed. Engel J Jr ve Pedley TA)'de. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 133-155, 1997.
12. Bouchet C, Cazauvieilh JB. De l'épilepsie considerée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. Recherche sur la nature et le siège de ces deux maladies; mémoire qui a remporté le prix au concours établi par M. Esquirol Arch Gen Med, 9, 510-542, 1825.
13. Sommer W. Erkankung des Ammonshorns als aetiologisches moment der epilepsie. Arc Psychiatr Nervenkr, 10, 631-675, 1880.
14. Stauder KH. Epilepsie und schlafenlappen. Arch Psychiatr Nervenkr, 104, 181-211, 1936.
15. Engel J Jr. Seizures and epilepsy. Philadelphia: F.A.Davis, 1989.
16. Houser CR. Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy. "The dentate gyrus and its role in seizures" (Ed. Ribak CE, Gall CM, Mody I)'de. Amsterdam: Elsevier, 223-34, 1992.
17. Thom M, Martinian L, Williams G. Cell proliferation and granule cell dispersion in human hippocampal sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol., 64, 194-201, 2005.
18. Masukawa L, Higashima M, Kim J, Spencer DD. Epileptiform discharges evoked in hippocampal brain slices from epileptic patients. Brain Res., 493, 168-74, 1989.

19. Williamson A. Electrophysiology of epileptic human neocortical and hippocampal neurons maintained in vitro. *Clin Neurosci.*, 2, 47-52, 1994.
20. von Kampe G, Spencer DD, de Lanerolle NC. Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. *Hippocampus*, 7, 472-88, 1997.
21. Frank JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. Physiologic and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia*, 36, 543-58, 1995.
22. de Lanerolle NC, Williamson A, Meredith C. Dynorphin and the kappa 1 ligand H-U69,539 binding in the human epileptogenic hippocampus. *Epilepsy Res.*, 28, 189-205, 1997.
23. Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE. Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci.*, 10, 267-82, 1990.
24. Terrian DM, Johnston D, Claiborne BJ. Glutamate and dynorphin release from a subcellular fraction enriched in hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res Bull.*, 21, 343-51, 1988.
25. Jeub M, Lie A, Blümcke I. Loss of dynorphin mediated inhibition of voltage dependent  $Ca^{++}$  currents in hippocampal granule cells isolated from epilepsy patients is associated with mossy fiber sprouting. *Neuroscience*, 94, 465-71, 1999.
26. de Lanerolle NC. The pathology of the epilepsies: insights from pathology to mechanisms of causation of temporal lobe epilepsy. "Pediatric epilepsy: diagnosis and therapy" (Ed. Pellock WEDJM, Buergois BFD)'de. New York: Demos, 45-60, 2001.

27. de Lanerolle NC, Kim JH, Robins RJ, Spencer DD. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*, 495, 387-95, 1989.
28. Philips MW. Synaptic and pathway remodelling of the human hippocampus in temporal lobe epilepsy. Doctoral thesis, Yale University; 1993.
29. Binaschi A, Bregola G, Simonato M. On the role of somatostatin in seizure control: clues from the hippocampus. *Rev Neurosci.*, 14, 285-301, 2003.
30. Babb TL, Pretorius JK, Crandall PH. Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci.*, 9, 2562-74, 1989.
31. Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci.*, 15, 3990-4004, 1995.
32. Wittner L, Magloczky ZS, Borhegyi P. Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, 108, 587-600, 2001.
33. Johnson EW, de Lanerolle NC, Kim JH. Central and peripheral benzodiazepine receptors: opposite changes in human epileptic tissue. *Neurology*, 42, 811-815, 1992.
34. Furtinger S, Pirker S, Czech T. Increased expression of  $\gamma$  aminobutyric acid type B receptors in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett.*, 352, 141-145, 2003.
35. Princivalle AP, Duncan JS, Thom M. GABA-B1a, GABA-B1b and GABA-B2 mRNA variants expression in hippocampus resected from patients with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 122, 975-984, 2003.

36. Eid T, Kovacs I, Spencer DD. Novel expression of AMPA-receptor subunit GluR1 on mossy cells and CA3 pyramidal neurons in the human epileptogenic hippocampus. *Eur J Neurosci.*, 15, 517-27, 2002.
37. Bordey A, Spencer DD. Significant electrophysiological alterations in dentate gyrus glia but not in CA1 glia from humans with epilepsy with temporal sclerosis. *Epilepsia*, 43, 264, 2002.
38. Bordey A, Wang D, Spencer DD. Reduction of glutamate transporter function in dentate gyrus glial cells but not in CA1 glial cells from humans with epilepsy and temporal lobe sclerosis. *Epilepsia*, 43, 266, 2002.
39. Margerison Jh, Corsellis JAN. Epilepsy and the temporal lobes. *Brain*, 89, 499-530, 1966.
40. Corsellis JAN. The incidence of Ammon's horn sclerosis. *Brain*, 80, 193-208, 1955.
41. Falconer M. Mesial temporal (Ammon's horn) sclerosis as a common cause of epilepsy: etiology, treatment and revention. *Lancet*, 2, 767-70, 1974.
42. Wittner L, Eross L, Czirjak P. Survivng CA1 pyramidal cells receive intact perisomatic inhibitory input in thehuman epileptic hippocampus. *Brain*, 128, 138-152, 2005.
43. Wittner L, Eross L, Szabo S. Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 115, 961-78, 2002.
44. Bordey A, Sontheimer H. Properties of human glial cells associated with epileptic tissue. *Epilepsy Res.*, 32, 286-303, 1998.

45. O'Connor ER, Sontheimer H, Spencer DD. Astrocytes from human hippocampal epileptogenic foci exhibit action potential-like responses. *Epilepsia*, 39, 347-354, 1998.
46. Schroder W, Hinterkeuser S, Seifert G. Functional and molecular properties of human astrocytes in acute hippocampal slices obtained from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 41, S181-S184, 2000.
47. Seifert G, Schroder W, Hinterkeuser S. Changes in flip/flop splicing of astroglial AMPA receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43(Suppl 5), 162-167, 2002.
48. Eid T, Thomas MJ, Spencer DD. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: a possible mechanism for elevated extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*, 363, 28-37, 2004.
49. Vander Hel WS, Notenboom RGE, Bos IWM,. Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 64, 326-33, 2005.
50. Amaral DG, Insausti R. Hippocampal formation. "The human nervous system" (Ed. Paxinos G)'de. San Diego: Academic Press, s. 711-756, 1990.
51. Fisher PD, Sperber EF, Moshe SL. Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev.*, 20, 563, 1998.
52. Kim JH, Guimaraes PO, Shen MY,. Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol.*, 80, 41-45, 1990.
53. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*, 298, 1418-1421, 2002.

54. Miller LA, McLahlan RS, Bouwer MS. Amygdalar sclerosis: preoperative indicators and outcome after temporal lobectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 57, 1099-1105, 1994.
55. Wolf HK, Aliashkevich AF, Blümcke I. Neuronal loss and gliosis of the amygdaloid nucleus in temporal lobe epilepsy. A quantitative analysis of 70 surgical specimens. *Acta Neuropathol.*, 93, 606-610, 1997.
56. Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.*, 32, 233-53, 1998.
57. Cavazos JE, Sutula TP. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.*, 527, 1-6, 1990.
58. Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci.*, 14, 3106-3121, 1994.
59. Jorgensen OS, Bolwig TG. Synaptic proteins after electroconvulsive stimulation. *Science*, 205, 705-707, 1979.
60. Hansen A, Jorgensen OS, Bolwig TG. Hippocampal kindling alters the concentration of glia fibrillary acidic protein and other marker proteins in rat brain. *Brain Res.*, 531, 307-11, 1990.
61. Pitkanen A, Nissinen J, Nairismagi J. Progression of neuronal damage after SE and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Prog Brain Res.*, 135, 67-83, 2002.
62. Dam AM. Epilepsy and neuronal loss in the hippocampus. *Epilepsia*, 21, 617-629, 1980.

63. Qiao X, Noebels JL. Developmental analysis of hippocampal mossy fiber outgrowth in a mutant mouse with inherited spike-wave seizures. *J Neurosci.*, 13, 4622-4635, 1993.
64. Benn SC ve Woolf C. Adult neuron survival strategies-slammng on the brakes. *Nat Rev Neurosci.*, 5(9), 686-700, 2004.
65. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-46, 1997.
66. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Ann Rev Immunol.*, 17, 331-367, 1999.
67. Mc Ewan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.*, 14, 477-492, 2002.
68. Reed JC. Cytochrome c: can't live with it; can't live without it. *Cell*, 91, 559-562, 1997.
69. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312, 1998.
70. Zou H, Henzel WJ, Liu X. Apaf-1, a human protein homologous to *C elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase 3. *Cell*, 90, 405-413, 1997.
71. Zou H, Li Y, Liu X. An Apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase 9. *J Biol Chem.*, 274, 11549-11556, 1999.
72. Saleh A, Srinivasula S, Acharya S. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase 9 activation. *J Biol Chem.*, 274, 17941-17945, 1999.
73. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-489, 1997.

74. Juo P, Kuo CJ, Yuan J. Essential requirement for caspase 8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol.*, 8, 1001-1008, 1998.
75. Hakem R, Hakem A, Duncan GS. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94, 339-352, 1998.
76. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171, 1996.
77. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.*, 69, 217-245, 2000.
78. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann HS. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.*, 68, 383-424, 1999.
79. Cryns V, Yuan Y. Proteases to die for. *Genes Dev.*, 13, 371, 1999.
80. Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.*, 10, 649-655, 2000.
81. Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326, 1998.
82. Reed J. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17, 3225-3236, 1998.
83. Kinloch RA, Treherne JM, Furness LM ve Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci.*, 20, 35-42, 1999.
84. Middleton G, Nunez G, Davies AM. Bax promotes neuronal survival and antagonizes the survival effects of neurotrophic factors. *Development*, 122, 695-701, 1996.
85. Song Q, Kuang Y, Dixit VM. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J*, 18, 167-178, 1999.

86. Schendel S, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion channels. *Cell Death Differ.*,5, 372-380, 1998.
87. Schendel S, Azimov R, Pawlowski K. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem.*, 274, 21932-1936, 1999.
88. Franke TF, Cantley LC. A bad kinase makes good. *Nature*, 390, 116-117, 1997.
89. Wang HG, Pathan N, Ethell I. Calcineurin promotes apoptosis by dephosphorylating BAD. *Science*, 284, 339-343, 1998.
90. Nechushtan A, Smith C, Hsu YT. Conformation of the Bax c-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J*, 18, 2330-2341, 1999.
91. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.*, 6, 513-519, 2000.
92. Susin SA, Lornzo HK, Zamzami N. Mitochondrial release of caspases 2 and 9 during the apoptotic process. *J Exp Med.*, 189, 382-394, 1999.
93. Susin SA, Lornzo HK, Zamzami N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor (AIF). *Nature*, 397, 441-446, 1999.
94. Du C, Fang M. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42, 2000.
95. Daugas E, Nochy D, Ravagnan M. Apoptosis inducing factor: an ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis regulation. *FEBS Lett.*, 476, 118-123, 2000.
96. Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L. NADH-oxidase activity of mitochondrial apoptosis inducing factor (AIF). *J Biol Chem.*, 276, 16391-16398, 2001.

97. Loeffler M, Daugas E, Susin SA. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis inducing factor. *FASEB J.*, 15, 758-767, 2001.
98. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG. Apoptosis inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol.*, 158, 507-517, 2002.
99. Yu S, Wang H, Poitras MF. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis inducing factor. *Science*, 297, 259-263, 2002.
100. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.*, 192, 571-579, 2000.
101. Susin SA, Zamzami N, Castedo M. The central executioner of apoptosis. Multiple links between protein activation and mitochondria in Fas/Apo-1/CD-95 and ceramide induced apoptosis. *J Exp Med.*, 186, 25-37, 1997.
102. Zamzami N, El Hamel C, Munoz C. Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene*, 19, 6342-6350, 2000.
103. Ravagnan L, Gurbuxani SA, Susin SA. Heat shock protein 70 antagonises apoptosis inducing factor. *Nat Cell Biol.*, 31, 839-843, 2001.
104. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis inhibiting baculoviral gene with a zinc-finger like motif. *J Virol.*, 67, 2168-2174, 1993.
105. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.*, 68, 2521-2528, 1994.

106. Stennicke HR, Ryan CA ve Salvesen GS. Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci.*, 27(2), 94-101, 2002.
107. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature*, 388, 300-303, 1997.
108. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R. The c-IAP1 and c-IAP2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.*, 16, 6914-6925, 1997.
109. Liston P, Roy N, Tamai K. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, 379, 349-353, 1996.
110. Young SS, Liston P, Xuan YJ. Genomic organization of the physical map of the human inhibitors of apoptosis: HIAP1, HIAP2. *Mamm Genome*, 10(1), 44-48, 1999.
111. Roy N, Mahadevan MS, Mc Lean M. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 80, 167-178, 1995.
112. Li F, Ambrosini G, Chu EY. Cell cycle control of apoptosis and mitotic spindle check point by survivin. *Nature*, 396, 580-584, 1998.
113. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR. IAPs block apoptotic events induced by caspase 8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, 17, 2215-2223, 1998.
114. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571-573, 1962.
115. Lindquist S. The heat shock response. *Annu Rev Biochem.*, 55, 1151-1191, 1986.
116. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259, 1409-1410, 1993.

117. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E. Heat shock proteins, cellular chaperons that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 505-512, 2003.
118. Mosser DD, Caron AW, Bourget L. The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Moll Cell Biol.*, 20, 7146-7159, 2000.
119. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD. Hsp72 and stress kinase c-Jun-N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor induced apoptosis. *Moll Cell Biol.*, 22, 3415-3424, 2002.
120. Paul C, Manero F, Gonin S. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Moll Cell Biol.*, 22, 816-834, 2002.
121. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Diff.*, 11, 390-402, 2004.
122. Li CY, Lee JS, Ko YG. Hsp70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase 3 activation. *J Biol Chem.*, 275, 25665-25671, 2000.
123. Beere HM, Wolf BB, Cain K. Hsp70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase 9 to to the apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.*, 2, 469-475, 2000.
124. Kamradt MC, Chen F, Cryns VL. The small heat shock protein  $\alpha\beta$ -crystallin negatively regulates cytochrome c and caspase 8 dependent activation of caspase 3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem.*, 276, 16059-16063, 2001.
125. Liossis SN, Ding XZ, Kiang JG. Overexpression of the Hsp70 enhances the TCR/CD3 and Fas/Apo-1/CD-95 mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells. *J Immunol.*, 56, 68-75, 1997.

126. Beere HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*, 115, 2633-2639, 2005.
127. Chang HY, Nishitoh H, Yang X. Activation of apoptosis signal regulating kinase (Ask-1) by the adaptor protein daxx. *Science*, 281, 1860-1863, 1998.
128. Ozoren N, El Deiry W. Heat shock protects HCT 116 and H460 cells from TRAIL induced apoptosis. *Exp Cell Res.*, 281, 175-181, 2003.
129. Jaattela M, Wissing D, Bauer PA. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J*, 11, 3507-3512, 1992.
130. Jaattela M and Wissing D. Heat shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity, possible mechanism of self protection. *J Exp Med.*, 177, 231-236, 1993.
131. Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X. Human hsp27 and human  $\alpha\beta$ -crystallin expression mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against  $\text{TNF}\alpha$  induced cell death. *EMBO J.*, 15, 2695-2706, 1996.
132. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG. NF-kB apoptosis, induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase 8 activation. *Science*, 281, 1680-1683, 1998.
133. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW. NF-kB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy induced apoptosis. *Mol Cell Biol.*, 19, 5923-5929, 1999.
134. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site specific phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by a novel ubiquitination dependent kinase activity. *Cell*, 84, 853-862, 1996.

135. Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S. HSP27 is a ubiquitin binding protein involved in I $\kappa$ B $\alpha$  proteosomal degradation. *Mol Cell Biol.*, 23, 5790-5802, 2003.
136. Breitschopf K, Zeiher A, Dimmeler S. Ubiquitin mediated degradation of the proapoptotic active form of Bid. A functional consequence of apoptosis induction. *J Biol Chem.*, 275, 21648-21652, 2000.
137. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin dependent degradation, a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med.*, 189, 1815-1822, 1999.
138. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of pro-apoptotic BH3 only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J.*, 22, 6653-6664, 2003.
139. Chauhan D, Li G, Hideshima T. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem.*, 278, 17593-17596, 2003.
140. Zha J, Harada E, Yang J. Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-XL. *Cell*, 87, 619-628, 1996.
141. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci.*, 97, 10832-10837, 2000.
142. Rane M, Coxon PY, Powell DW. P38 kinase-dependent MAPKPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide dependent kinase 2 for Akt in human neutrophils. *J Biol Chem.*, 276, 3517-3523, 2001.
143. Filipkowski RK, Heyman M, Kaminska B. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport*, 5, 1538-1540, 1994.

144. Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Contagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J, Ben-Ari Y. Kainate induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 63 (1), 7-18, 1994.
145. Henshall DC, Bonislawski DP, Skradski SL. Cleavage of Bid may amplify caspase 8 induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiol Dis.*, 8, 568-580, 2001.
146. Henshall DC, Skradski SL, Lan J. Caspase 2 activation is redundant during seizure induced neuronal death. *J Neurochem.*, 77, 886-895, 2001.
147. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (16), 10432-10437, 1997.
148. Zhang LX, Smith MA, Li XL. Apoptosis of hippocampal neurons after amygdala kindled seizures. *Brain Res Mol Brain Res.*, 55 (2), 198-208, 1998.
149. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Kainic acid induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*, 98 (1), 41-53, 2000.
150. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*, 41, S9-13, 2000.
151. Henshall DC, Sinclair J, Simon RP. Spatio-temporal profile of DNA fragmentation and its relationship to patterns of epileptiform activity following focally evoked limbic seizures. *Brain Res.*, 858 (2), 290-302, 2000.

152. Henshall DC, Skradski SL, Meller R et al. Expression and differential processing of caspase 6 and 7 in relation to specific epileptiform EEG patterns following limbic seizures. *Neurobiol Dis.*, 10, 71-87, 2002.
153. Shinoda S, Araki T, Lan JQ. Development of a model of seizure induced hippocampal injury with features of programmed cell death in the BALB/c mouse. *J Neurosci Res.*, 76, 121-128, 2004.
154. Shinoda S, Skradski SL, Araki T. Formation of a tumor necrosis factor receptor 1 molecular scaffolding complex and activation of apoptosis signal regulating kinase 1 during seizure induced neuronal death. *Eur J Neurosci.*, 17, 2065-2076, 2003.
155. Dorr J, Bechmann I, Waiczies S. Lack of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand but presence of its receptors in the human brain. *J Neurosci.*, 22, RC209, 2002.
156. Shinoda S, Schindler CK, Meller R. Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in temporal lobe epilepsy. *J Clin Invest.*, 113, 1059-1068, 2004.
157. Martin- Villalba A, Herr I; Jeremias I. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediate ischemia induced apoptosis in neurons. *J Neurosci.*, 19, 3809-3817, 1999.
158. Henshall DC, Araki T, Schindler CK. Expression of death associated protein kinase and recruitment to the tumor necrosis signaling pathway following brief seizures. *J Neurochem.*, 86, 1260-1270, 2003.
159. Griffiths T, Evans MC, Meldrum BS. Status epilepticus: the reversability of calcium loading and acute neuronal pathological changes in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 12, 557-567, 1984.

160. Henshall DC, Araki T, Schindler CK. Activation of Bcl-2 associated death protein and counter response of Akt within cell populations during seizure induced neuronal death. *J Neurosci.*, 22, 8458-8465, 2002.
161. Henshall DC, Chen J, Simon RP. Involvement of caspase 3 like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *J Neurochem*, 74,1215-1223, 2000.
162. Polster BM, Etxebarria A, Basanez G. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem.*, 280, 6447-6454, 2004.
163. Henshall DC, Bonislawski DP, Skradski DP. Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase 9 during seizure induced neuronal death. *Cell Death Differ.*, 8, 1169-1181, 2001.
164. Li TF, Luo YM, Lu CZ. The expression of Smac and XIAP in rat hippocampus following limbic seizure induced by kainic acid injection into amigdaloid nucleus. *Sheng Li Xue Bao.*, 56, 172-177, 2004.
165. Korhonen L, Belluardo N, Lindholm D. Regulation of X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein in kainic acid induced neuronal death in the rat hippocampus. *Mol Cell Neurosci.*, 17, 364-372, 2001.
166. Jang YS, Lee MY, Choi SH. Expression of B/K protein in the hippocampus of kainate induced rat seizure model. *Brain Res.*, 999, 203-211, 2004.
167. Kitao Y, Ozawa K, Miyazaki M. Expression of the endoplasmic reticulum molecular chaperone (OPR150) rescues hippocampal neurons from glutamate toxicity. *J Clin Invest.*, 108, 1439-1450, 2001.
168. Mikati MA, Abi-Habib RJ, El Saban ME. Hippocampal programmed cell death after status epilepticus: evidence for NMDA-receptor and ceramide-mediated mechanisms. *Epilepsia*, 44, 282-291, 2003.

169. Akbar MT, Wells DJ, Latchman DS. Heat shock protein 27 shows a distinctive widespread spatial and temporal pattern of induction in CNS glial and neuronal cells compared to heat shock protein 70 and caspase 3 following kainate administration. *Brain Res Mol Brain Res.*, 93, 148-163, 2001.
170. Ferrer I, Lopez E, Blanco R. Differential c-Fos and caspase expression following kainic acid excitotoxicity. *Acta Neuropathol (Berlin)*, 99, 245-256, 2000.
171. Gillardon F, Bottiger B, Schmitz B. Activation of CPP32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. *Mol Brain Res.*, 50, 16-22, 1997.
172. Narkilahti S, Pirttila TJ, Lukasiuk K. Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat. *Eur J Neurosci.*, 18, 1486-1496, 2003.
173. Araki T, Simon RP, Taki W. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. *J Neurosci Res.*, 69, 614-621, 2002.
174. Faherty CJ, Xanthoudakis S, Smeyne RJ. Caspase 3 dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res.*, 70 (1), 159-163, 1999.
175. Gervais FG, Xu D, Robertson GS. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell*, 97, 395-406, 1999.
176. Kondratyev A, Gale K. Intracerebral injection of caspase 3 inhibitor prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. *Brain Res Mol Brain Res.*, 75, 216-224, 2000.

177. Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem.*, 277, 34295-34302, 2002.
178. Kondratyev A, Gale K. Latency to onset of status epilepticus determines molecular mechanisms of seizure induced cell death. *Brain Res Mol Brain Res.*, 121, 86-94, 2004.
179. Fujikawa DG, Ke X, Trinidad RB. Caspase 3 is not activated in seizure induced neuronal necrosis with internucleosomal DNA cleavage. *J Neurochem.*, 83, 229-240, 2002.
180. Narkilahti S, Pitkanen A. Caspase 6 expression in the rat hippocampus during epileptogenesis and epilepsy. *Neuroscience*, 131, 887-897, 2005.
181. Ananth C, Thameem S, Dheen S. Domoic acid induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase 3) and microglial response. *J Neurosci Res.*, 66, 177-190, 2001.
182. Gillardon F, Wickert H, Zimmermann M. Upregulation of bax and downregulation of bcl-2 is associated with kainate induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett.*, 192, 85-88, 1995.
183. Korhonen L, Belluardo N, Mudo G. Increase in Bcl-2 phosphorylation and reduced levels of BH3 only Bcl-2 family proteins in kainic acid mediated neuronal death in the rat brain. *Eur J Neurosci.*, 18, 1121-1134, 2003.
184. Kondratyev A, Sahibzada N, Gale K. Electroconvulsive shock exposure prevents neuronal apoptosis after kainic acid evoked status epilepticus. *Brain Res Mol Brain Res.*, 91, 1-13, 2001.

185. Schindler CK, Shinoda S, Simon RP. Subcellular distribution of Bcl-2 family proteins and 14-3-3 within the rat hippocampus during seizure induced neuronal death in the rat. *Neurosci Lett*, 356, 163-166, 2004.
186. Moore AN, Waxham MN, Dash PK. Neuronal activity increases the phosphorylation of the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus and cortex. *J Biol Chem.*, 271, 14214-14220, 1996.
187. Henshall DC, Schindler CK, So NK. Death associated protein kinase expression in human temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.*, 55, 485-494, 2004.
188. Albeni BC. Potential roles for tumor necrosis factor and NF-kB in seizure activity. *J Neurosci Res.*, 66, 151-154, 2001.
189. Houseweart MK, Vilaythong A, Yin XM. Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1). *Cell Death Differ.*, 10, 1329-1335, 2003.
190. Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP. Apoptosis inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by Bax dependent and Bax independent mechanisms. *J Neurosci.*, 25, 1324-1334, 2005.
191. Goll DE, Thompson VF, Li H. The calpain system. *Physiol Rev.*, 83, 731-801, 2003.
192. Jankowski JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol.*, 63, 125-149, 2001.
193. Henshall DC, Clark RS, Adelson PD. Alterations in Bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 55, 250-257, 2000.

194. Uysal H, Cevik IU, Soylemezoglu F. Is the cell death in mesial temporal sclerosis apoptotic? *Epilepsia*, 44, 778-784, 2003.
195. Nagy Z, Esiri MM. Neuronal cyclin expression in the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol.*, 150, 240-247, 1998.
196. Liou AKF, Clark RS, Henshall DC. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress activated signalling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol.*, 69, 103-142, 2003.
197. Narkilahti S, Nissinen J, Pitkanen A. Administration of caspase 3 inhibitor during and after status epilepticus in rat: effect on neuronal damage and epileptogenesis. *Neuropharmacology*, 44, 1068-1088, 2003.
198. Roy M, Hom JJ, Sapolsky RM. HSV mediated delivery of virally derived anti-apoptotic genes protects the rat hippocampus from damage following excitotoxicity, but not metabolic disruption. *Gene Therapy*, 9, 214-219, 2002.
199. Viswanath V, Wu Z, Fonck C. Transgenic mice neuronally expressing baculoviral p35 are resistant to diverse types of induced apoptosis, including seizure associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2270-2275, 2000.
200. McLaughlin J, Roozendaal B, Dumas T. Sparing of neuronal function postseizure with gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 12804-12809, 2000.
201. Fannjiang Y, Kim CH, Huganir RL. Bak alters neuronal excitability and can switch from anti- to pro-death function during postnatal development. *Dev Cell.*, 4, 575-585, 2003.

202. Schindler CK, Pearson EG, Bonner HP. Caspase-3 cleavage and nuclear localization of caspase-activated DNase in human temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 26, 583-589, 2006.
203. Yamamoto A, Murphy N, Schindler CK. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 65(3), 217-225, 2006.
204. Hartmann A, Michel PP, Troadec JD. Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J Neurochem.*, 76, 1785-1793, 2001.
205. Ekedahl J, Joseph B, Grigoriyev ME. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in small- and non-small cell lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.*, 279, 277-290, 2002.
206. Ponnelle T, Chapusot C, Martin L. Subcellular expression of c-IAP1 and c-IAP2 in colorectal cancers: relationships with clinicopathological features and prognosis. *Pathol Res Pract.*, 199, 723-731, 2003.
207. McEleny KR, Watson RW, Coffey RN. Inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. *Prostate*, 51, 133-140, 2002.
208. Plenchette S, Cathelin S, Rebe C. Translocation of the inhibitor of apoptosis protein c-IAP1 from the nucleus to the Golgi in hematopoietic cells undergoing differentiation: a nuclear export signal mediated event. *Blood*, 104, 2035-2043, 2004.
209. Samuel T, Okada K, Huer M. cIAP1 localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer Res.*, 65(1), 210-218, 2005.
210. Thom M, Seetah S, Sisodiya S. Sudden and unexpected death in epilepsy (SUDEP): evidence of acute neuronal injury using Hsp70 and c-JUN immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 29, 132-143, 2003.

211. Erdamar S, Zhen-Qing Z, Winifred J. Corpora amylacea and heat shock protein 27 in Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 59, 698-706, 2000.
212. Bidmon HJ, Görg B, Palomero-Gallagher N. Heat shock protein-27 is upregulated in the temporal cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia*, 45(12), 1549-1559, 2004.
213. Crespel A, Coubes P, Rousset MC. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Res.*, 952, 159-169, 2002.
214. Özbaş-Gerçeker F, Redeker S, Boer K. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 138, 457-474, 2006.
215. Becker AJ, Chen J, Zien A. Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Euro J Neurosci.*, 18, 2792-2802, 2003.