

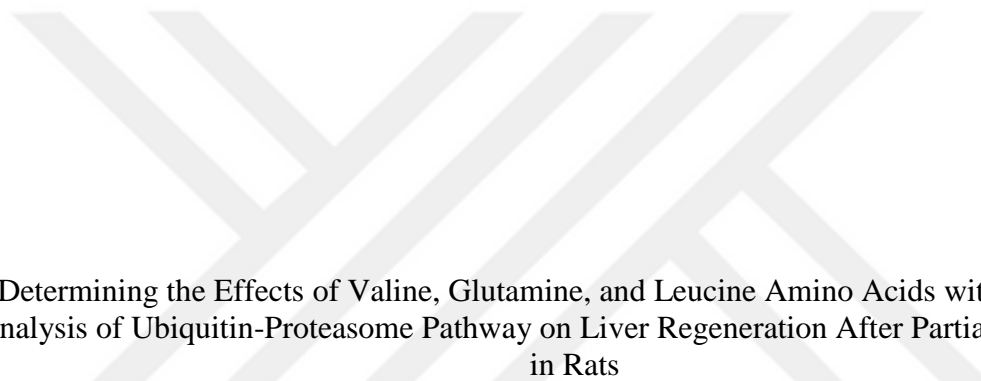
Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonunda Valin, Glutamin ve
Lösin Amino Asitlerinin Ubiquitin-Proteozom Yolağı Üzerine Etkisinin PCR Array Analizi ile
Belirlenmesi

Laman Rasulzade

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2018



Determining the Effects of Valine, Glutamine, and Leucine Amino Acids with PCR Array
Analysis of Ubiquitin-Proteasome Pathway on Liver Regeneration After Partial Hepatectomy
in Rats

Laman Rasulzade

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

Sep 2018

Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonunda Valin, Glutamin ve
Lösin Amino Asitlerinin Ubiquitin Proteozom Yolağı Üzerine Etkisinin PCR Array Analizi ile
Belirlenmesi

Laman Rasulzade

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mediha Canbek

Eylül 2018

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mediha CANBEK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sıçanlarda Parsiyel Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonunda Valin, Glutamin ve Lösin Amino Asitlerinin Ubiquitin Proteozom Yolağı Üzerine Etkisinin PCR Array Analizi ile Belirlenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın bütün aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Tez çalışmamda yaptığım hayvan deneylerini, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ nun 534/2016 numaralı kararına göre gerçekleştirdiğimi beyan ederim. 26/09/2018

Laman Rasulzade

İmza

ÖZET

Çalışmamızda valin, glutamin ve lösin amino asitlerinin sıçanlarda parsiyal hepatektomiden sonra, karaciğer rejenerasyonu üzerine etkilerinin in vivo ortamda Ubiquitin Proteozom Yolağı üzerinden PCR array tekniği kullanılarak genetik profillerinin çıkartılıp karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Karaciğer rejenerasyonunun bir takım stimulatör ve inhibitör uyarıların karşılıklı karmaşık ilişkileri sonucu düzenlendiği kabul edilmektedir. Büyüme yanıtının başlaması hepatositler ve non-parankimal hücreler, ekstra sellüler matriks, metabolitler ve besinler arasındaki kompleks etkileşimler sonucu olmaktadır. Dallı zincir içeren amino asitler (lösin, izolösin, valin) (DZAA) protein sentezi için bir substrat oluşturmasının yanı sıra DZAA'ların birçok hücre fonksiyonunu da kontrol ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Karaciğer hasarı sonrası amino asit uygulaması yapılan çalışmalar daha çok serum konsantrasyon düzeyi ve hepatosite growth factor (HGF) üzerine olan etkileri şeklindedir. Çalışmamızda glutamin, valin ve lösin aminoasitlerinin sıçanlarda parsiyel hepatektomiden sonra karaciğer rejenerasyonu üzerine etkileri, Ubiquitin Proteozom Yolağı üzerinden PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) array yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bu aminoasitlerin karaciğer rejenerasyonundaki etkilerinin karşılaştırmalı olarak belirlenmesi, karaciğer hasarının iyileştirilmesindeki rollerinin ortaya konması ve tıbbi, fizyolojik, farmakolojik vb. çalışmalarda bu amino asitlerin yaygın olarak kullanılmasını sağlamak hedeflerimizi oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ubiquitin Proteozom Yolağı, Amino Asitler, Karaciğer Rejenerasyonu

SUMMARY

In our study, it was aimed to compare the effects of valine, glutamine, and leucine amino acids on hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats by using PCR array technique over Ubiquitin-Proteasome Pathway in vivo to determine genetic profiling. Experimental studies have shown that post-partial hepatectomy, liver regeneration is a beneficial effect of the administration of amino acids such as L-Glutamine, L-Arginine, and L-Glycine. However, there is no study of the impact of leucine and valine on post-prandial liver regeneration process and signaling pathways from branched-chain amino acids (BCAA).

It was accepted that liver regeneration was eventually regulated by some mutually complex associations of stimuli and inhibitory stimuli. The onset of the growth response is the result of complex interactions between hepatocytes and non-parenchymal cells, extracellular matrix, metabolites, and nutrients. Studies have shown that branched-chain amino acids (BCAA) (valine, leucine, and isoleucine) not only form a substrate for protein synthesis but also control many cell functions.

The studies on amino acid administration after liver damage are mostly of serum concentration level and effects on hepatocyte growth factor (HGF). In our study, the effects of glutamine, valine, and leucine amino acids on liver regeneration after partial hepatectomy in rats were determined using the Ubiquitin Protease Pathway polymerase chain reaction (PCR) array method.

The comparative determination of the effects of these amino acids in liver regeneration, the role of improving liver damage, and the use of medicinal, physiological, we aim to ensure that these amino acids are widely used in studies.

Keywords: Ubiquitin-Proteasome Pathway, Amino Acids, Liver Regeneration

TEŞEKKÜR

Derslerimde ve Yüksek Lisans Tez çalışmalarında bana danışmanlık eden ve beni yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mediha CANBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Tez çalışmamda bilgilerini, deneyimlerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Emre CEYHAN ve Sayın Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU hocalarıma, deneylerimi yaparken hep yanımda olan Sayın Arş. Gör. Ayşe ÖZMEN YAYLACI hocama teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında her zaman beni bilgilendiren desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşım Arş. Gör. Burak BERBER'e teşekkür ederim.

Tez yazımı konusunda bilgilerini ve desteklerini her zaman hissettiren sevgili arkadaşım Maşude Yağış PİYALE'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, sabır gösteren, her zaman yanımda olan annem Dr. Ulduz AFANDİYEVA'ya ve kardeşim Ramin RASULZADE'ye teşekkür ederim.

Tez yazımı sırasında yardımlarını esirgemeyen ve beni destekleyen sevgili arkadaşım Kağan KILIÇ'a teşekkür ederim.

Tez yazımı sırasında manevi desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan sevgili öğrencilerim ve arkadaşlarım Akın KARAHASAN ve Behiç KOYUTÜRK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
2.1. Karaciğer Yapısı	5
2.1.1. Sıçan karaciğeri	8
2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Moleküler Yapısı	9
2.3. Ubiquitinler	12
2.4. Ubiquitin Proteozom Yolağı	17
2.4.1. Ubiquitin proteozom yolağında görevli bazı genler	22
2.5. Amino Asitler	41
2.5.1. Valin	41
2.5.2. Glutamin	42
2.5.3. Lösin	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM	45
3.1. Deney Hayvanları	45
3.2. Deney Grupları	46
3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler	47
3.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi	50
3.4.1. RT-PCR analizi	50
3.4.1.1. <u>Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu</u>	51
3.4.1.2. <u>RNA örneklerinin konsantrasyonlarının eşitlenmesi</u>	52
3.4.1.3. <u>RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi</u>	53
3.4.1.4. <u>cDNA örneklerinin seyreltilmesi</u>	54
3.4.1.5. <u>RT-PCR Array analizi</u>	54

İÇİNDEKİLER (devam)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
EK AÇIKLAMALAR	77
Ek Açıklamalar – A: Etik Kurul Raporu	77



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan karaciğerinin anatomik ve histolojik yapısı (Burtis, C.A. vd., 2015).	7
2.2. Sıçan karaciğeri (Waynforth, H.B. ve Flecknell, P.A., 1994).	9
2.3. Parsiyal hepatektomi oranına göre sıçan karaciğer anatomisi. Gri renkle gösterilen; fonksiyonel karaciğer lobları, beyaz renkle gösterilen; fonksiyonel olmayan karaciğer lobları(Palmes, D. ve Spiegel, H.U 2004).	10
2.4. Ubiquitin molekülünün yapısı (Welchman, R.L. vd., 2005).	13
2.5. Ubiquitin'in substrata bağlanması (Hochstrasser, M., 2009).	16
2.6. Ubiquitinasyon ve protein degradasyonu (Anonim, 2018a).	18
2.7. 26S proteozomun yapısı (McDonald, 1997).	21
2.8. Valin amino asidi kimyasal formülü (PubChem).	41
2.9. Glutamin amino asidi kimyasak yapısı (PubChem).	42
2.10. Lösin amino asidi kimyasal formülü (PubChem).	43
3.1. Karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi.	48
3.2. Karaciğer loplarmı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak sağ orta ve sol yan loplarmın ayrılması.	48
3.3. Karaciğer loplarmına ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanması.	49
3.4. Bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmesi.	49
4.1. Konrol grubuna göre Grup II'de görülen gen ifadeleri.	66
4.2. Konrol grubuna göre Grup III'de görülen gen ifadeleri.	66
4.3. Konrol grubuna göre Grup IV'de görülen gen ifadeleri.	67
4.4. Konrol grubuna göre Grup V'de görülen gen ifadeleri.	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan).....	58
4.2. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan) (devam).	60
4.3. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan) (devam).	61
4.4. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan) (devam).	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg

µL

g

kg

L

mL

ng

pH

°C

fg

Açıklama

Mikrogram

Mikrolitre

Gram

Kilogram

Litre

Mililitre

Nanogram

Hidrojen Potansiyeli

Santigrat

Fentogram

Kısaltmalar

ATP

BCAA

CCl₄

DNA

DZAA

E1

E2

E3

EGF

HGF

IL-6

Ki-67

M

mRNA

Açıklama

Adenozin tri fosfat

Branched chain amino acids

Karbon tetra klörür

Deoksiribonükleik asit

Dallı zincirli amino asitler

Ubiquitin aktivasyon enzimi

Ubiquitin konjuge edici enzim

Ubiquitin ligaz enzimi

Epidermal büyüme faktörü

Hepatosit büyüme faktörü

İnterlökin-6

Proliferation marker

Mitoz fazı

Haberci Ribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar****Açıklama**

RNA

Ribonükleik asit

PBS

Fosfat tampon çözeltisi

PCR

Polimeraz zincirreaksiyonu

PCNA

Proliferating cell nuclear antigen

PH

Parsiyel hepatektomi

S

DNA sentez fazı

TGF

Tumor growth factor

TNF

Tumor necrosis factor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi olarak, hasar görmüş karaciğerin daha hızlı iyileştirilmesi için çeşitli ilaçların kullanımına başvurulmaktadır. Fakat birçok kimyasal ilaç tedavisinde olduğu gibi, yan etkiler görülür. Bu nedenle, son günlerde destek tedavi olarak dallanmış zincir içeren aminoasitlerin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Holecek, M., 2010; Ishikawa, T., 2012).

Karaciğer güçlü rejenerasyon kapasitesi ve karmaşık fonksiyonları ile farklı özellikleri olan bir organdır (Taub, R., 2004; Michalopoulos, G.K., 2007). Karaciğer çeşitli nedenlerle zarar gördüğünde, fonksiyonel kütlesini tamamlama yönünde proliferasyon ve replikasyona başlayabilir. Karaciğer loblarının bir kısmının cerrahi olarak çıkarılması (parsiyal hepatektomi – PH) ve hepatositlerin virüs ya da kimyasallar nedeniyle zarar görmesi gibi durumlarda hepatosit replikasyonunun arttığı görülür. Normalde nadiren bölünen hepatositler için bu özellik son derece önemlidir. Karaciğer, önemli doku kaybı durumlarında kendisini birkaç hafta içerisinde onarabilecek hücreler arası eşsiz bir etkileşim ve karmaşık bir mediatör sistemine sahiptir.

Rejenerasyon süreci bir takım sitokin ve büyüme faktörlerinin rol aldığı sinyallerle gerçekleşir. Buna göre karaciğer rejenerasyonu için kabul gören genel görüş, organizmada meydana gelen sinyallerin düzenleyici etkisi ile karaciğerin ideal boyutuna gelene kadar devam eden ve ileri derecede organize olmuş bir olaylar zinciridir. Karaciğer rejenerasyonunun bir takım stimulatör ve inhibitör uyarıların karşılıklı karmaşık ilişkileri sonucu düzenlendiği kabul edilmektedir (Jentsch, S., 1992; Fausto, N. vd., 2006). Büyüme yanıtının başlaması; hepatositler ve non-parankimal hücreler, ekstrasellüler matriks, endokrin, otokrin, parakrin ve nöroregülatör faktörler, serbest oksijen radikalleri, metabolitler ve besinler arasındaki karmaşık etkileşimler sonucu olmaktadır (Ankoma-Sey, V., 1999).

Karaciğer rejenerasyon uyarısı gelmeden önce hepatositlerin hemen hemen hepsi G0 fazındadırlar. Hücre döngüsünün, uyarının gelmesinden sonra ilerleme fazından çok başlama fazının büyüme faktörlerine gereksinimi vardır. PH'a yanıt olarak kalan hepatositlerde düşük DNA sentez oranı yaklaşık 12 saat devam eder ve takiben hepatositlerin bir kısmı S fazına girmeye başlar. Mitoz DNA sentezinden 6–8 saat sonrasına kadar devam eder (Ankoma-Sey, V., 1999; Fausto, N., 2000). Rejenerasyon yanıtı bir takım sinyal yolları ile gerçekleşmektedir. Bir sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hareketi, metabolizması ve davranışı, apoptoz gibi önemli olayların düzenlenmesinde görevli bir takım hücre içi yanıtları başlatır.

Glutamin, Lösin ve Valin gibi kas yıkımını engelleyen bir amino asittir. Glutamin karaciğerde birikmiş olan toksit maddelerin ve amoniyakın vücuttan atılmasını sağlar. Aktaş ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada Glutamin ile enteral nütrisyonun majör karaciğer rezeksiyonu sonrasında karaciğer rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Glutaminin karaciğer hücre proliferasyonu için gerekli enerji kaynağını oluşturduğu, karaciğer rejenerasyonunu tetikleyen ve güçlendiren çeşitli faktörleri kapsayan intestinal protein sentezini arttırdığı ve intestinal hücrelerin sayılarının korunmasını ve protein sentezinin artımını sağlayarak bakteriyel translokasyonu ve endotoksin üretimini azalttığı gösterilmiştir (Katmer, T. vd., 1994; Berber, İ. vd., 1996; Vatansev, C. vd., 2001).

Lösin ve valin dallanmış zincir içeren aminoasitlerdir (DZAA). DZAA içeren amino asitler proteinlerin yapılarını oluşturmalarının yanı sıra enerji kaynağı, çeşitli metabolitlerin öncüleri ve sinyal molekülleri olarak görev almaktadırlar. DZAA' lar, hücrelerin hayatta kalınımı, rejenerasyon, süreçleri üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Karaciğer rejenerasyonunda besinsel ve metabolik desteğin önemi yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Özellikle glikoz, yağ asitleri ve bazı aminoasitler karaciğer rejenerasyonunda yararlı etki gösterir (Holecek, M., 2010). Son yapılan çalışmalar, DZAA' ların hepatoselüler karsinomayı ve fibrozu engeleyici etkisinin olduğunu ayrıca sağ kalınım oranını arttırdığı yönündedir.

Cha ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Dietilnitrozamin ile uyarılmış sıçan karaciğerinde fibroz doku ve hepatoselüler karsinoma gelişimine karşı, diyet takviyesi ile verilen DZAA' nın antifibrotik etkisini ve hepatoselüler karsinoma için kemopreventif olduğunu ortaya koymuştur (Cha, J.H. vd., 2013). Iwasa ve arkadaşları CCl₄ kullanarak karaciğer fibrozu yapılan sıçanlarda 16 haftaya kadar diyetle verilen DZAA' ların, azaltılmış oksitativ strese bağlı olarak hayatta kalma süresini uzattığını ve glikoz metabolizmasını geliştirdiğini ortaya koymuştur (Iwasa, M. vd., 2013). Bir başka çalışmada granül halinde verilen DZAA' nın sirozda, hayatta kalma süresini arttırdığı bildirilmiştir (Ishikawa, T., 2012). L-Glutaminin HGF salınımı için bir sinyal oluşturduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Lawson, C.M. vd., 2011).

Ubiquitin, yüksek oranda korunmuş, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, ısıya dayanıklı, 76 amino asitlik bir polipeptittir. ATP bağımlı proteolitik yoldan sorumludur. Ubiquitin hedef proteinlere, Ubiquitin aktive edici enzim (E1), Ubiquitin bağlayıcı enzim (E2) ve tanıyıcı protein (E3) yardımı ile kovalent olarak bağlanır. Poli-Ubiquitin zinciri eklenen proteinler daha sonra 26S proteozom tarafından yıkılırlar (Peng, J. vd., 2016). Regülatör proteinlerin Ubiquitin aracılı yıkımı, hücre siklus progresyonu, sinyal ileti, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozis gibi metabolik olayların kontrolünde önemli rol oynar (Olsen, S.K. vd., 2010).

Ubiquitin ayrıca birçok hastalığın patolojisi ile ilişkilidir (Güney, Y. ve Bilgihan, A., 2002). Tüm ökaryotlarda, Ubiquitin sistemi önemli non-lizozomal proteolitik bir yoldur (Fujimuro, M. vd., 1994). Amino asit siklusunun sağlanması ve hatalı istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması için proteinler yıkılır. Yıkılma seçici bir olaydır. Ökaryotlarda hücre içi proteinlerin yıkımı için iki önemli yol mevcuttur.

- 1) Uzun ömürlü hücre içi proteinler lizozomlarda ATP'den bağımsız bir yol aracılığıyla yıkılır.
- 2) Kısa ömürlü veya hatalı proteinler ise sitozolde ATP bağımlı Ubiquitin (Ub) aracılı sistem ile yıkılır (Fujimuro, M. vd., 1994).

Çeşitli karaciğer hasarlarında DZAA' takviyesi yaşam kalitesiyle ilişkili olarak sağlığın daha iyi olması ve yaşam süresinin uzaması için önemlidir (Holecek, M., 2010). Yapılan pek çok çalışmada DZAA' lar ile tedavide canlıya veriliş yolu, diyet ve beslenme şeklinde olup yararlı etkileri de ortaya konmuştur. Ancak diğer ilaç veriliş yolları ile yapılan çalışma sayısı çok azdır (Takeshita, S. vd., 2009; Hagiwara, A. vd., 2012; Ishikawa, T., 2012). Bu nedenle çalışmamızda, intraperitoneal olarak DZAA içeren amino asitlerden lösin ve valin PH sonrası deney hayvanlarımıza 1 g/kg (1 ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) şeklinde uygulanmıştır. Bunlara ek olarak DZAA olmayan ancak iyileştirici etkisi bilinen glutamin amino asidi de aynı dozda verilmiştir. Deney sonunda Ubiquitin Proteozom Yolağı RT-PCR array analizi ile değerlendirilmiştir.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Karaciğer Yapısı

Vücuttaki en büyük organ olan karaciğer, insanlarda yaklaşık 1,2–1.5 kg ağırlığındadır. Yani bir yetişkin vücudunun %2'lik bir kısmını oluşturur (Lefkowitz, J.H., 2011). Karaciğer vücutta karın boşluğunun sağ üst kadranında, diyaframın alt kısmında yerleşmiştir. Göğüs kafesi tarafından çevrelenmiştir (Abdel-Misih, S.R. ve Bloomston, M., 2010).

Karaciğer, iki anatomik loba ayrılır. Sağ lob, sol lobdan 6 kat daha büyüktür. Sağ lobun arka kısmında kaudat lob, alt kısmında kuadrat lob bulunur (Lefkowitz, J.H., 2011).

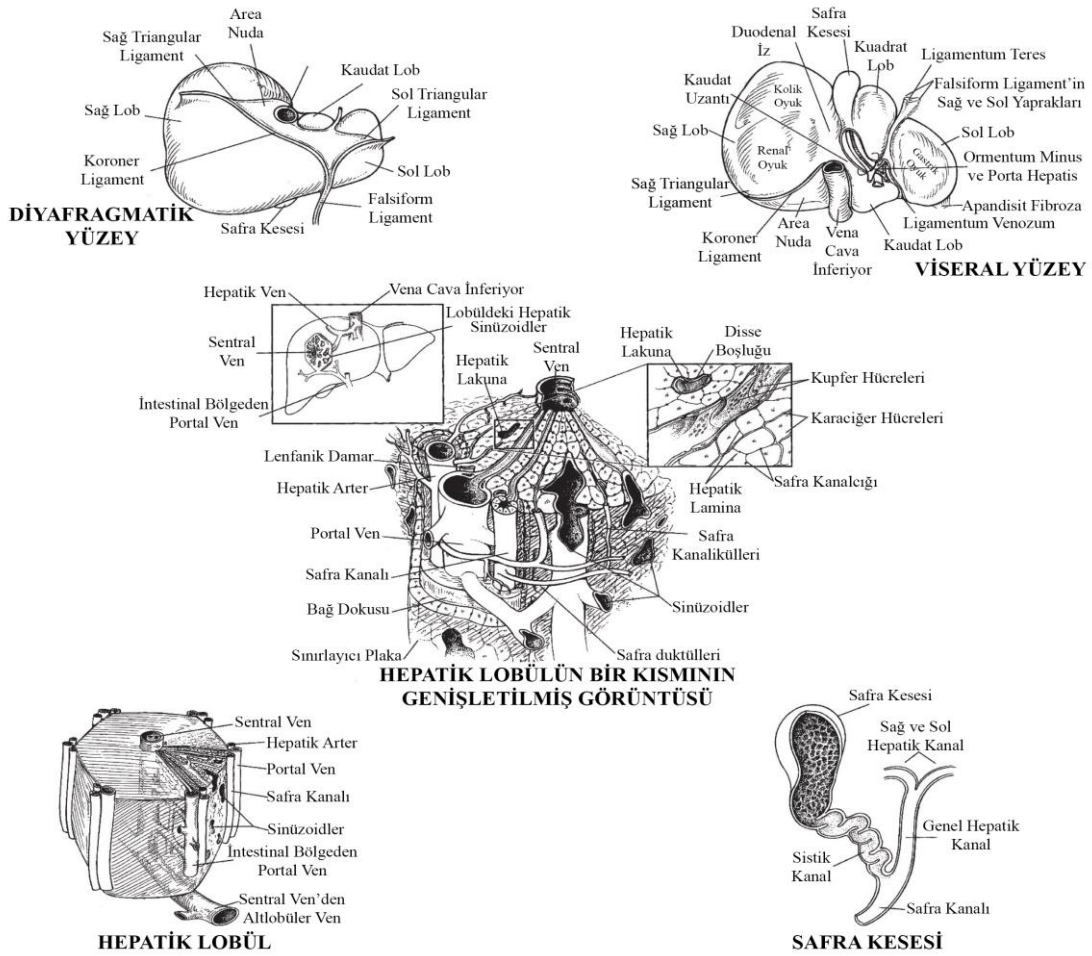
Karaciğer, lobül denilen altıgen şeklindeki çapı 1–1,3 mm ve boyu 1,5–2 mm olan yapılardan oluşur (Şekil 2.1). Karaciğerin temel fonksiyonel ünitesi karaciğer lobülüdür. Her lobülün merkezinde santral ven yer alır. Santral ven, hepatosit ve sinuzoidlerden oluşur. Santral ven hepatik venlere açılır. Her lobül, santral venin etrafında silindirik olarak sıralanmış hepatositlerden oluşur. Hepatositler karaciğer hücrelerinin %60'ını oluşturur. Her lobülün çevresinde 4–5 portal triad bulunur. Burada hepatik arteriyaller, portal venüller, safra kanalcıkları, lenfatikler ve sinirler vardır.

Karaciğer dokusu %60 oranında hepatosit denilen hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler yaklaşık 30 µm çapında, çok köşeli bir yapıya sahiptir. Hepatositlerde 3 farklı yüzey vardır (Şekil 2.1). Bunlar; sinüzoidal ve Disse aralığına bakan yüzey, kanaliküler yüzey ve komşu hepatositlere bakan yüzey olarak ayrılır. Bu hücreler karaciğerde çoğu metabolik ve sentetik fonksiyonu üstlenirler (Bruns, D.E. ve Burtis, C.A., 2015).

Disse aralığı, hepatositler ve sinüzoidal endotelyal hücreler arasındaki dokudur. Bu doku portal zonda lenflerden dışa doğru akan doku sıvısını içerir. Sinüzoidal basınç arttığında Disse aralığında lenf üretimi artar ve hepatic venöz akışın engellendiği noktada asit üretiminin artışı sağlanır. Hepatositler buldukları asinar bölgeye göre farklı yapısal ve fonksiyonel özellikler taşır (Burtis, C.A. vd., 2015).

Hepatositlerin 4 temel fonksiyonu vardır.

- 1-) Safra Sentezi
- 2-) Depolama
- 3-) Biyotransformasyon
- 4-) Kan Bileşenlerinin Sentezi



Şekil 2.1. İnsan karaciğerinin anatomik ve histolojik yapısı (Burtis, C.A. vd., 2015).

Karaciğerde çift yönden kan akışı sağlanır (Eroschenko, V.P. ve Di Fiore, M.S., 2013). Portal ven kanı dalaktan ve besin bakımından zengin kanı gastrointestinal sistemden taşır. Kanın yaklaşık %70'i bu şekilde sağlanır. Diğer taraftan hepatic arter oksijen zengin kanı taşır. Bu iki kaynak birleşerek sinüzoidlere ulaşır. Sinüzoidler delikli endotel hücreleri ve fagositik Kupffer hücreleriyle astarlanmıştır. Kupffer hücreleri monositlerden köken alır. Bakteriler gibi yabancı maddeleri hidrolitik enzimlerle parçalayan lizozom içerirler. Diğer bir fagositik özellik taşıyan hücre tipi de pit (çukur) hücreleri denilen natural killer hücrelerdir (Bruns, D.E. ve Burtis, C.A., 2015).

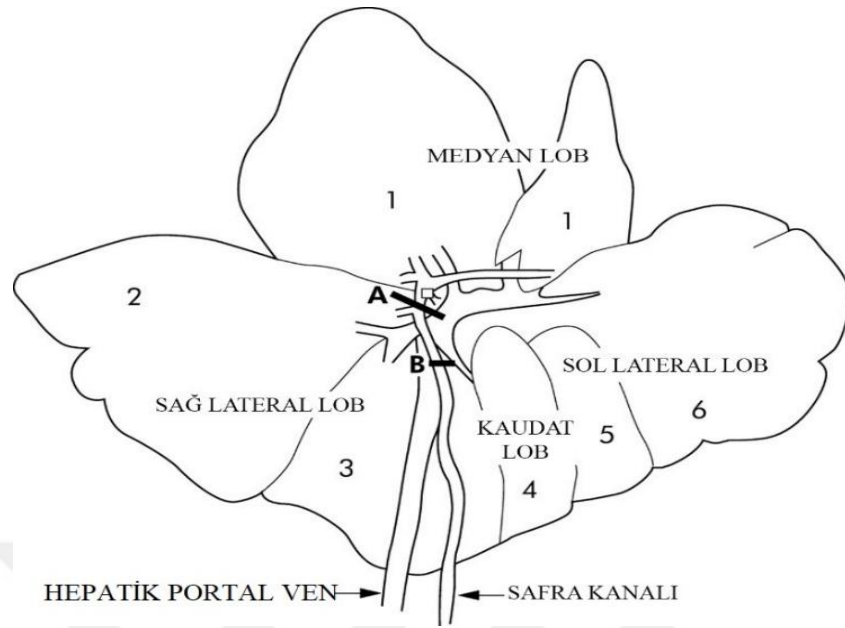
Stelate hücreleri, sinüzoidlerin endotelial astarı ve disse aralığı arasında yer alır. Bu hücreler dinlenme evresinde A vitamini gibi yağda çözünen vitaminlerin depolanmasında görev yapar. Uyarıldıklarında fonksiyonel ve morfolojik olarak değişim geçirirler böylece kollajen sentezlerler; fibroz ve sirozdan sorumlu hücreleri oluştururlar (Burtis, C.A. vd., 2015).

Solid organlar arasında rejenere olabilen yegane organ karaciğerdir. Karaciğerin geniş bir bölümü çıkarılabilir ve karaciğer yine önceki tam boyutuna ulaşabilecek şekilde rejenere olabilir. Karaciğer vücudun en büyük kan rezervini oluşturur. Dolaşımında sıvı yükünde artış olduğunda karaciğer 200 – 400 mL kanı depolayabilir. Endojen ve ekzojen maddelerin detoksifikasyonu ve eliminasyonu için merkezi organdır. İnce bağırsaktan emilen suda çözünen besinlerin, mineral ve vitaminlerin (aminoasitler, monosakkaritler ve yağ asitleri) çoğu portal kan aracılığı ile karaciğere taşınır (Granit, D., 2015).

2.1.1. Sıçan karaciğeri

Karaciğer ağırlığı sıçanlarda, vücut ağırlığının yaklaşık %4'ünü teşkil etmektedir (Kogure, K. vd., 1999; Palmes, D. ve Spiegel, H.U 2004). Sıçan karaciğeri sağ ve sol meydan, sağ ve sol lateral ve kaudat loblardan oluşan multi-lobüler bir yapıya sahiptir.

Üst üste yığınlar halinde bulunan sıçan karaciğerinde sadece kaudat lob mide ile bu yığından ayrılır. Medyan lob, en büyük lobdur ve sol lateral lob ile ilişkilidir (Şekil 2.2). Kaudat lob, portal ven ve inferior vena cavanın sol tarafında ve sol lateral lobun arkasında konumlanmış olup, iki bölümden oluşmuştur (Gershbein, L.L. ve Elias, H., 1954; Martins, P.N.A. ve Neuhaus, P., 2007).



Şekil 2.2. Sıçan karaciğeri (Waynforth, H.B. ve Flecknell, P.A., 1994).

2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Moleküler Yapısı

Karaciğer güçlü rejenerasyon kapasitesi ve karmaşık fonksiyonları ile farklı özellikleri olan bir organdır. Yaralanma veya rezeksiyondan sonra karaciğerin kendini onarabilme kabiliyeti uzun süredir bilim adamlarının ilgisini çekmektedir (Taub, R., 2004).

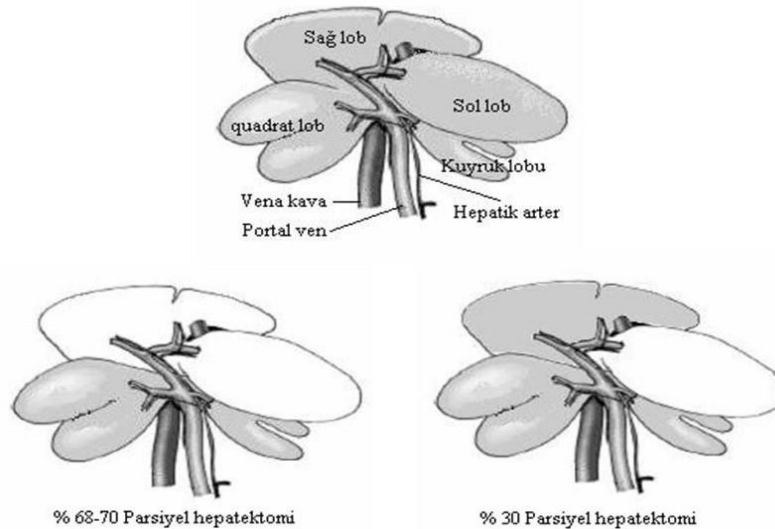
Gerçek anlamda karaciğer rejenerasyonu fikrini ilk kez ortaya atan bilim adamı 1833'te Cruveilhier olmuştur (Nuzzo, G. vd., 1996). İlk deneysel çalışmalarda Amerikalı bilim adamı Higgins ve Anderson (1931) tarafından sıçanlarda eter anestezi altında subtotal lobektomiyle (%75-80) orta ve sol lobu çıkartılmıştır. Sonuç olarak %75'lik karaciğer kütesinin kaybının bir ayda giderildiğini rapor etmişlerdir (Higgins, G.M. ve Anderson, R.M., 1931).

Karaciğer rejenerasyonunda organın morfolojisi parsiyel hepatektomi sonrası orijinal şekline dönmez. Rezeksiyondan sonra karaciğer rejenerasyonunu düzenleyen mekanizmaların bazıları değişebilir bu işlem anatomik olmaktan ziyade fonksiyoneldir (Fausto, N., 2000).

Karaciğerin 2/3'ü alınan sıçanlarda rejenerasyon cevabı maksimumdur (Higgins, G.M. ve Anderson, R.M., 1931). Daha küçük oranlarda parankim çıkarıldığında ise onarım daha yavaş ilerler. 2/3'ü aşan rezeksiyonlarda DNA sentezi ve mitotik aktivitede bozulma gerçekleşir.

Sıçanlarda %90 oranında hepatektomi rejenerasyon olmaksızın ölüme yol açabilir (Eguchi, S. vd., 1996). Rejenerasyon, kalan karaciğer dokusunun asiner yapısının proliferasyonuna bağlıdır. Parsiyal hepatektomiden (Şekil 2.3) sonraki ilk 24 saat içerisinde aktif hücre replikasyonu başlar ve organ ilk ağırlığına erişinceye kadar devam eder. İlk on gün içinde büyük ölçüde rejenerasyon oluşur ve bu olay dört haftada tamamlanır. Rejenerasyon daha çok yeni lobüller oluşması ve artık lobüllerin genişlemesi şeklinde olur. Kalan hepatositlerde DNA sentezi sıçanlarda ilk 24 saat içerisinde pik yapar ve dokudaki mitotik aktiviteyi artırır. Rejenerasyon esnasında hepatositlerin büyük çoğunluğu bir veya iki sefer proliferasyon olmaktadır (Taub, R., 2004).

Parsiyal hepatektomiden sonra karaciğerin yapısını oluşturan hücreler içerisinde, hepatositler hücre siklusuna en hızlı başlayan hücrelerdir. Bu hücrelerdeki değişiklikler dakikalar içerisinde meydana gelmektedir (Mars, W.M. vd., 1995; Best, J. vd., 2013).



Şekil 2.3. Parsiyal hepatektomi oranına göre sıçan karaciğer anatomisi. Gri renkle gösterilen; fonksiyonel karaciğer lobları, beyaz renkle gösterilen; fonksiyonel olmayan karaciğer lobları (Palmes, D. ve Spiegel, H.U 2004).

Hepatositlerdeki en üst DNA sentezi 24. saatte görülmektedir. Hepatositleri sırasıyla epitelyum hücreleri, kupffer hücreleri, ve endotel hücreleri izlemektedir. Hepatosit proliferasyonu lobülün periportal alanından perisantral alanına doğru mitoz dalgası şeklinde yayılır (Zimmermann, A., 2004). Santral ven çevresindeki glutemin sentetaz enzimi içeren hepatositler hücre replikasyonuna en son katılan hücrelerdir.

Normal koşullar altında hepatositler hücre döngüsünün G_0 fazındadırlar. Doku hasarı veya kaybı sonrasında hepatositler hücre siklusundaki sakin fazdan (G_0) pre-replikatif faza (G_1) girerek hücre bölünmesine yol açar. Bunu takiben DNA sentezi (S fazı) ve mitoz (M) ile hücre bölünme olayları başlar. DNA sentezi için gereken proteinlerin yapım dönemi G_1 fazında tamamlanır. Daha sonra hücre DNA replikasyonunu gerçekleştirir (S fazı). Bu fazı proliferatif hücre çekirdek antijeni (PCNA) ve Ki-67 (proliferasyon marker) gibi artan S fazı proteinlerinin ekspresyonlarını göstererek tanımlamak mümkündür (Giagnis, C. vd., 2006). Replikasyon sonrası hücre bölünmesi için gereken moleküllerin sentezi G_2 fazında tamamlanır. Daha sonra mitoz gerçekleşerek yeni hücreler ortaya çıkar (Court, F.G. vd., 2002). PH sonrası hücrelerin G_0 fazından G_1 fazına geçmesine sebep olan olaylar “priming” daha sonra hücre döngüsünün tamamlanması ise “progresyon” olarak tanımlanır.

PH’a yanıt olarak kalan hepatositlerde düşük DNA sentez oranı yaklaşık 12 saat devam eder ve takiben hepatositlerin bir kısmı S fazına girmeye başlar. Mitoz DNA sentezinden 6–8 saat sonrasına kadar devam eder (Ankoma-Sey, V., 1999; Fausto, N., 2000).

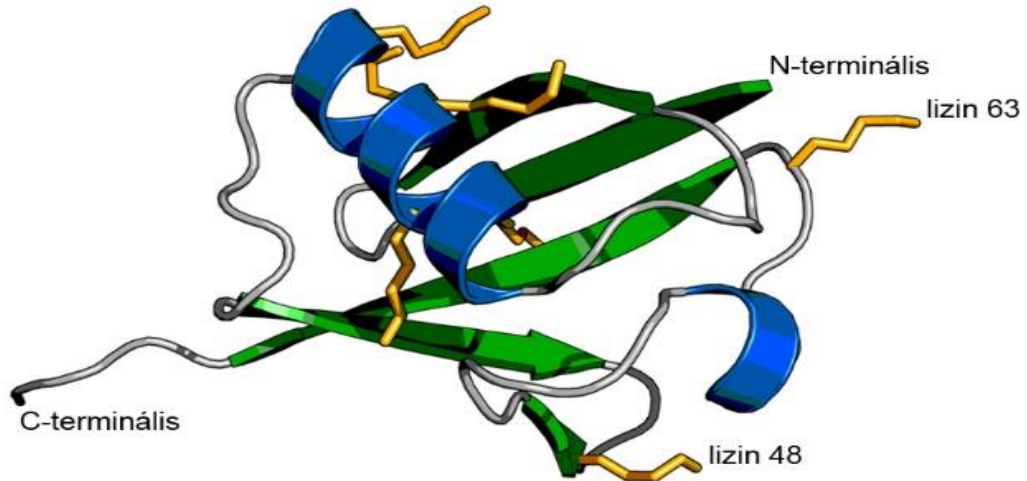
Rejenerasyon süreci bir takım sitokin ve büyüme faktörlerinin rol aldığı sinyallerle gerçekleşir. Bu saptamalardan yola çıkarak karaciğer rejenerasyonu için kabul gören genel görüş, organizmada meydana gelen sinyallerin düzenleyici etkisi ile karaciğerin optimum boyutuna gelene kadar devam eden ve ileri derecede organize olmuş bir olaylar zinciridir (Ankoma-Sey, V., 1999; Fausto, N., 2000).

Karaciğer rejenerasyonunun bir takım stimilatör ve inhibitör uyarıların karşılıklı karmaşık ilişkileri sonucu düzenlendiği kabul edilmektedir (Michalopoulos, G.K. ve DeFrances, M., 2005; Fausto, N. vd., 2006). Büyüme yanıtının başlaması hepatositler ve non-parankimal hücreler, ekstra sellüler matriks, endokrin, otokrin, parankim ve nöroregülatör faktörler, serbest oksijen radikalleri, metabolitler ve besinler arasındaki kompleks etkileşimler sonucu olmaktadır. Başlatıcı sinyaller; EGF, TNF, IL-6, insülin ve matriks değişikliklerini içerirken, iletici sinyaller ise HGF, TGF, EGF, insülin olarak görülmektedir (Ankoma-Sey, V., 1999).

2.3. Ubiquitinler

Ubiquitinler farklı sekanslara sahip ancak yapısal olarak oldukça benzer proteinlerdir. Bu proteinlerin olgun formları, genellikle, proteolitik süreçlerden sonra açığa çıkan di-glisin sekansı ile işaretlidir (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004)

Ubiquitin molekülü anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümüyle ilgili hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler homeostatik mekanizmaya katılır. Ubiquitin (Şekil 2.4) 76 aminoasitlik küçük bir peptid olup hedef substratlara E1 (ubiquitin aktifleştirici enzim), E2 (ubiquitin konjuge edici enzimler) ve E3 (ubiquitin ligaz) denen 3 enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile bağlanan ve onları proteozom adlı subcellüler organelere hedef gösteren bir moleküldür (Spataro, V. vd., 1998).



Şekil 2.4. Ubiquitin molekülünün yapısı (Welchman, R.L. vd., 2005).

Proteinlerin katlanması ya da protein komplekslerinin oluşumu endoplazmik retikulumda organelde gerçekleşir. Yanlış katlanan proteinler endoplazmik retikulum şaperonlarını içeren bir sistem tarafından tanınır, çoklu ubiquitinlerle işaretlenir (poliubiquitinlenme) ve 26S proteozom aracılığıyla yıkılır (Strous G.J. ve Gent, J., 2002). Yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık üçte biri sentezlendiği dakikada proteozomlar tarafından yıkılır. 26S Proteozom 2400 kDa'lık bir kompleksdir ve 40'dan fazla alt birim içerir. Benzer şekilde, katlanmamış protein de tehlikelidir ve gen ekspresyonunu uyarabilir. Bu, translasyonel streştir ve meydana gelen yanıt da ısı-şok yanıtıdır (Lesley, S.A. vd., 2002; Rudd, P.M. vd., 2002). 26S proteozom bir 20S ana yapıdan ve iki 19S düzenleyici yapıdan oluşur.

Prokaryotlarda buna fonksiyon bakımından analog olan herhangi bir molekül bulunmamaktadır. Yani prokaryotlarda bilinen, başka bir proteine kovalent bağlanarak sinyal görevi gören bir protein yoktur. Ancak prokaryotlarda da protein-ubiquitinlerin ortası bulunur ve ubiquitin katlanmaları gösterir (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Hedef proteinin amino grubu ile modiflerin terminal (son) glisin'i arasında isopeptid bağı oluşur (Ubiquitin benzeri modifier-Ubi). Genellikle amino grubuna bir lizin kalıntısı katılır ancak N-terminal ubiquitinasyon da bilinmektedir (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004; Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Nedd8 ve Sumo gibi üyeler ökaryotlarda geniş olarak yayılmıştır. Fat10 ve ISG15 gibi lineer di-ubiquitin analogları ve single domain proteini olan Ufm1 yalnızca memelilerde bulunur (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Urm1 yeni keşfedilmiş bir proteindir ve ubiquitinlerden çok ThiS/MoaD grubuna yakındır. Ayrıca Hub1 proteini benzersiz olan di-tirazin motifi içerir. Mayalarda, bu ailenin üyelerinin TOR sinyalindeki ve hücre polaritesindeki rolü iyi anlaşılammıştır (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Atg8 ve Atg12 ubiquitinden önemli ölçüde büyüktür ancak mekanik olarak ilişkilidir. Ayrıca yapısal ilişki de olasıdır. Her ikisi de makrotofaji denilen, sitoplazmik bölgelerin özelleşmiş çift zarlı yapılar tarafından yutulup lizozoma gönderilmesi olayında rol alırlar. Atg8 fosfatidil-eterol-aminin amino grubuna bağlı iken, Atg12 bu yolda başka bir proteile bağlanarak Atg8'in otofajik zarla ilişkisine aracılık eder (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Ubiquitin sadece 3 ve 76. konumlar bakımından insan ve mayada farklılık gösterir. Ubiquitin dikkate değer korunumu, çeşitli biyolojik fonksiyonlarının bir sonucu olarak tüm molekül üzerinde güçlü bir baskı oluşturduğunu düşündürmektedir (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004). Ubiquitin, proteozomal ve lizozomal proteolizde iyi anlaşılmiş, fonksiyonel olarak belirgin bir sinyaldir. Ayrıca çekirdek altı olaylarda non-proteolitik sinyaldir (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004). Geçtiğimiz birkaç yılda ökaryotik ubiquitin-benzeri modifikasyonların temel fonksiyonlarının anlaşılması konusunda önemli aşamalar kaydedilmiştir (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004; Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Sumoylation (Sumo'nun hedefe bağlanması) substratların lokalizasyonu ve aktivitesine öncülük ederek nükleo-sitoplazmik transport ve hücre döngüsünün ilerlemesini düzenler (Nandi, D. vd., 2006).

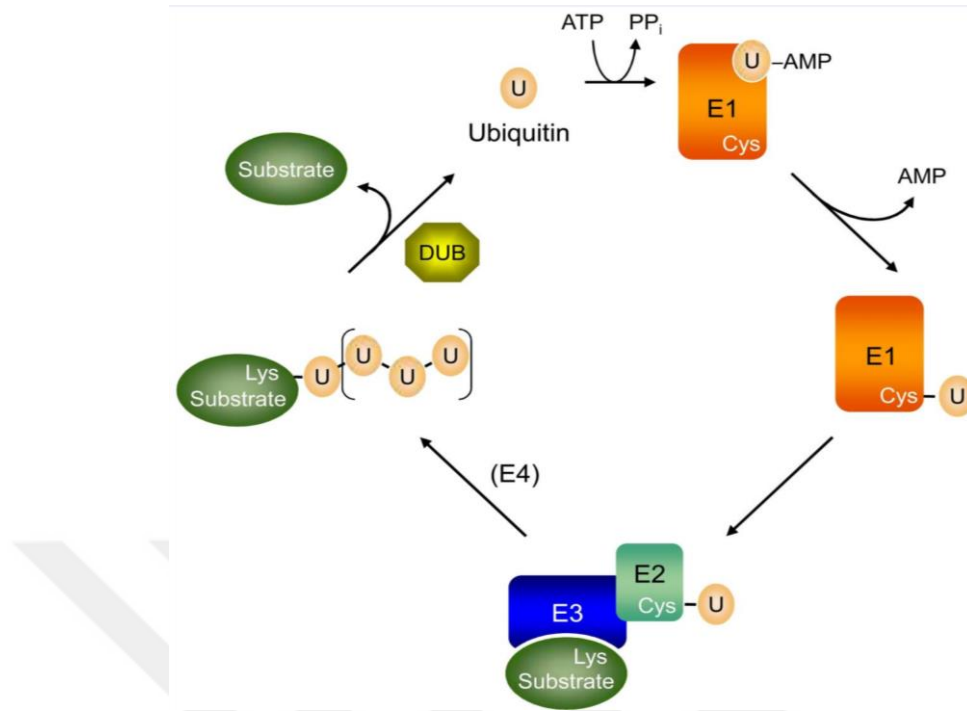
ISG15 konjugasyonu normal gelişim ve interferon α/β -aracılı viral enfeksiyon yanıtında önemli rol oynar, ancak spesifik özellikleri henüz bilinmemektedir (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004). Fat10'un fonksiyonları da henüz belirlenmemiştir. MHC class I locusu tarafından kodlanır ve sitokinle indüklenmiş apoptozda görev aldığı düşünülmektedir (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Ubiquitinlerin biyolojik fonksiyonları tam olarak anlaşılammıştır. Ayrıca biyokimyasal fonksiyonları ile ilgili bilgilerimiz de eksiktir. Temel olarak modifiye edici protein, spesifik hedef proteinin amino grubuna bağlanır ve bir şekilde tanınarak downstream olaylarının başlamasına öncülük eder. Bu olaylar tamamen protein modifiye edici molekülün kimliğine, lokasyonuna ve substratın kimliğine bağlıdır (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Ubiquitinin içinde bulunduğu duruma göre polimerizasyon durumu da önemlidir. Ubiquitinin substratlara monomer olarak veya poliubiquitin zinciri denilen isopeptid-bağlı polimerler olarak bağlanabilir. Bu zincirin yapısı substratın akıbetini etkileyebilir. Örneğin proteozomlara K48 hedef substratları üzerinden bağlanan poliubiquitin zincirleri fonksiyon bakımından bu yan zincirlerin önemli hale gelmesine neden olmaktadır (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004; Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004; Nandi, D. vd., 2006).

Poly-Sumo zincirleri hücrelerde iyi gözlemlenmiş olmalarına rağmen, mayalarda herhangi esansiyel bir fonksiyon göstermemektedir. Sumo'nun belirli substratlara bağlanması bunların ubiquitin tarafından modifikasyonunda korunmasını sağlar ve böylece ubiquitinasyonun sonuçlarını engeller (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Ubiquitinlerin substratlara bağlanması genellikle 3 aşamada gerçekleşir (Şekil 2.5) Başlangıç aktivasyon aşaması E1 ile katalizlenir. Ara basamakta Ubiquitin E2 konjugasyon enzimine kovalent bağlanır. Son basamakta Ubiquitin nihai hedefi olan substratın amino grubuna ulaşır. Son basamak genellikle E3 ligaz enzimiyle gerçekleştirilir (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).



Şekil 2.5. Ubiquitin'in substrata bağlanması (Hochstrasser, M., 2009).

Aktivasyon Enzimleri E1

Protein konjugasyon reaksiyonlarında ilk görev substratın amino grubunu hedeflemek üzere Ubiquitin proteinin C-terminal bölgesinin aktive edilmesidir. Bu reaksiyonlar spesifik E1 enzimleri yardımıyla gerçekleştirilir (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004; Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Ökaryotlarda aktivasyon reaksiyonu 2 aşamadan oluşur; Ubl-adenilat aracı molekülünün oluşumu, bunun E1 sistein kalıntısı ile etkileşimiyle devam eder. Böylece E1-Ubiquitin thiol ester oluşur. Genellikle her Ubiquitin'nin kendisine özel tek bir E1 enzimi vardır. Bu durum ubiquitin için bile geçerlidir. Hatta bunun büyük downstream konjugasyon faktörü dizilerine rağmen. Ubiquitin-adenilat aracısının oluşumu ubiquitin-benzeri protein yollarında en eski bilinen reaksiyondur (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

2.4. Ubiquitin Proteozom Yolağı

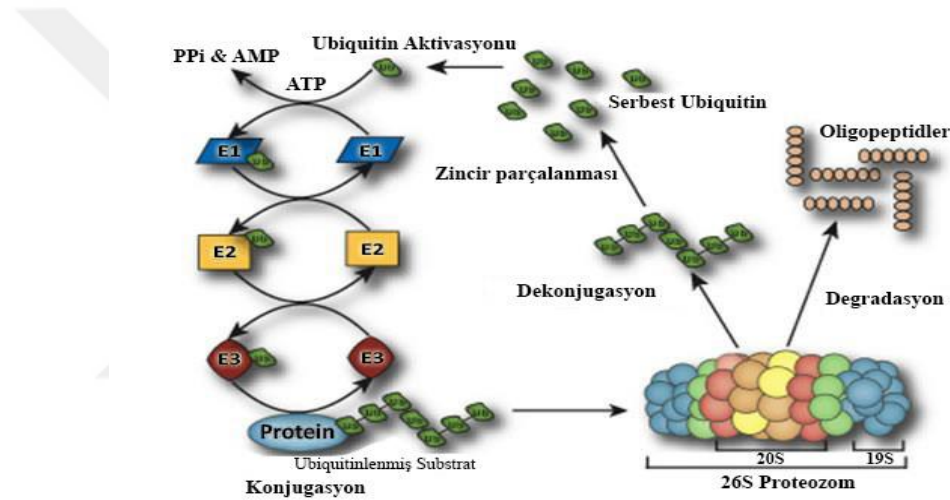
Ubiquitin Proteozom Yolağının;

- Antijen işleme
- Apoptoz
- Organel biyogenezi
- Hücre döngüsü ve bölünme
- DNA tamiri ve transkripsiyon
- Farklılaşma ve gelişim
- Bağışıklık yanıtı ve inflamasyon
- Nöron ve kas degradasyonu
- Morfogenez
- Hücre yüzey reseptörleri ve iyon kanallarının yapımı
- Stres ve ekstraselüler düzenleyicilere yanıt
- Ribozom biyogenezi
- Viral enfeksiyonlar gibi bir çok hücrel süreçlerde düzenleyici rolü vardır.

Hücrel protein degradasyonu çeşitli hücre kompartımanlarında gerçekleşmektedir. Buna ek olarak düzenleyici intermembran proteolizi, hücre farklılaşması lipid metabolizması, katlanmamış proteinlere yani Alzheimer gibi süreçlerde büyük oranda etkilidir (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004; Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004).

Sitozolik protein degradasyonunun çoğunluğu ubiquitin proteozom sistemi ile gerçekleşir (Şekil 2.6). Bu süreçte hücrel proteinler parçalanma için hedeflenirler. Proteinler bu yolda evrimsel olarak korunmuş ubiquitin denilen multimerlerle işaretlenerek 26S proteozom adı verilen büyük sitozolik proteazlarla parçalanırlar (Nandi, D. vd., 2006).

Proteinlerin parçalanmasının başlangıç evresi tam olarak anlaşılmamış olsa da bu olay spesifik sekansların varlığına (siklinlerin yıkımı) veya amino terminal uca bağlıdır. Örneğin N-terminal bölgesi temel amino asit içeren proteinler, küçük amino asit içeren proteinlere göre daha kararsız bir yapıdadır. Ayrıca denatürasyona bağlı olarak hidrofobik parça içeren yaşlanmış proteinler de parçalanmaya yönlendirilebilir. Daha önemlisi ise hücre sinyal olayları proteinleri post-translasyonel modifikasyonlara tabi tuttuğundan bu olaylar bütünü de proteinleri degradasyona götürebilir (Pickart, C.M. ve Eddins, M.J., 2004; Varshavsky, A., 2005).



Şekil 2.6. Ubiquitinasyon ve protein degradasyonu (Anonim, 2018a).

Ökaryotlarda degrade edilecek proteinler çoğunlukla poliubiquitinlenir ve ATP bağımlı proteaz regülatörlerine bağlanırlar. Bu katlanmış proteinler ATP hidrolizi ile tetiklenen konformasyon (yapı) değişiklikleri geçirerek regülatörler aracılığıyla açılırlar (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004).

Daha sonra açılmış proteinler proteinlerde yer alan proteolitik kompartımanlara yerleşirler. Son olarak polipeptidler ATP bağımlı olmayan şekilde endopeptidazlar, amino peptidazlar ve kanoksi peptidazlar ile degrade edilirler. Hücresel proteinler, 76 amino asit içeren ubiquitin ile etiketlenmiş 26S proteozom yardımıyla ATP bağımlı olarak degrade olurlar (Chandu, D. ve Nandi, D., 2004; Nandi, D. vd., 2006).

Bir proteinin ubiquitin-proteozom yolağı aracılığı ile yıkılması iki aşamayla başlar: Birincisi, hedef substrat çoklu ubiquitin zincirlerine kovalent olarak tutunması, ikincisi ise tutunan proteinin, ubiquitini serbest bırakacak şekilde yıkımıdır (Hershko, A. vd., 1980; van Nocker S.T. vd., 1996).

Ubiquitin substratlarına konjugasyonunda birinci aşama aralarında hücre siklusu kontrolü, DNA tamirini, ribozom benzeri organellerin biyosentezini, MHC sınıf I antijen sunumu ve enflamatuvar yanıtını, hücre yüzey proteinlerinin endositozu ve iyon kanallarının modülasyonunu, nöronal ağların morfojenizini, NF-κB'ye bağımlı sinyalleme kaskadları ve transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesini, uzun süreli hafıza ve biyoritmin oluşumunu, apoptozu, farklılaşmayı, stres yanıtını ve protein kalitesinin kontrolünü içeren birçok hücre içi işleme katılır (Hershko, A. ve Ciechanover, A., 1998).

Ubiquitin, proteozomdan bağımsız olarak da çalışabilir. Buna bir başka örnek de histon Ubiquitinlenmesinin, heterokromatinin gevşemesine neden olması ve transkripsiyon faktörlerinin promotorda birikmesi olarak verilebilir (Spataro, V. vd., 1998).

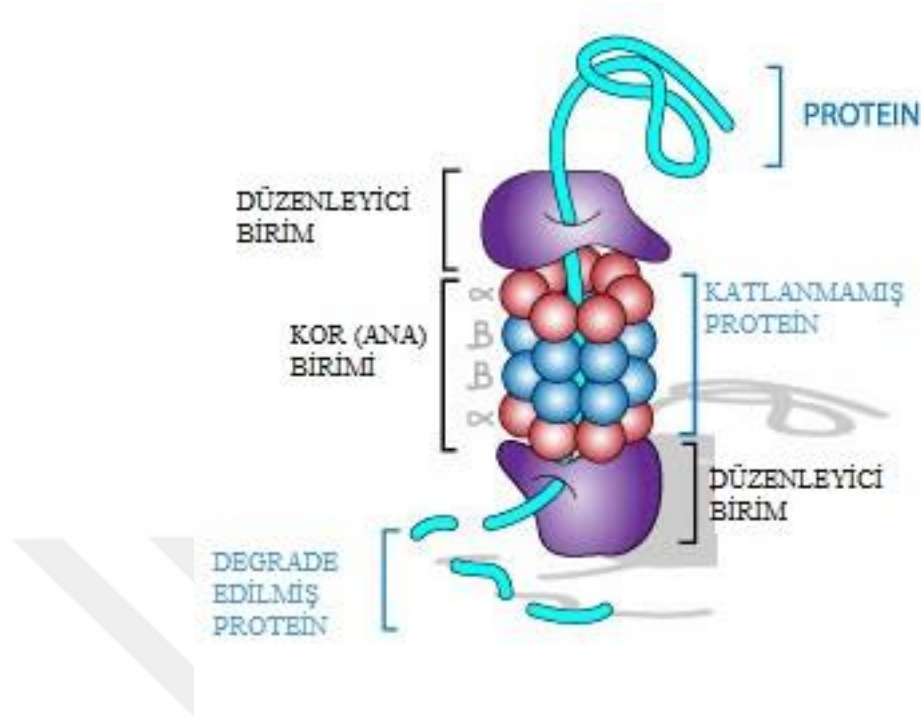
Ubiquitin Proteozom Yolu hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa-ömürlü proteinlerin yıkımda önemli roller oynayan bir proteolitik yoldur. Proteinlerin amino asitlere kadar yıkılmasının dışında bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF-κB) kısmi yıkımından (işlenerek olgulaşmasında) ve aktivasyonundan da sorumludur.

Proteozom inhibitörleri MG132 ve lactacystin ile yapılan çalışmalar ubiquitin-proteozom yolunun hücre içindeki proteinlerin %80'den fazlasının yıkımından sorumlu olduğunu göstermektedir. Hedef proteinler yıkılmadan önce ubiquitin ile (76 amino asitlik bir protein) ile işaretlenirler. Daha sonra hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zincir oluşturulduktan sonra poliubiquitine olmuş protein 26S proteozoma yönlendirilir. 26S proteozomda işaretlenmiş olan hedef protein peptidlere kadar yıkılırlar (Jentsch, S., 1992; Hershko, A. ve Ciechanover, A., 1998; Boudreau, H.E. vd., 2007).

Ubiquitin, yıkılacak olan proteinlere bağlanmadan önce ilk olarak ubiquitin aktive edici enzimde (E1)'e transfer edilir. Aktive edilen ubiquitin daha sonra benzer şekilde E1 enziminden ubiquitin konjugasyon enzimidaki (E2) bir sistin amino asidine aktarılır. Bu E2 enzimleri yıkılacak olan proteinlere ubiquitin molekülünü ubiquitin ligaz (E3) enzimi yardımı ile direkt aktarır veya ubiquitin E3 enzimine aktarıldıktan sonra substrat proteinlere aktarılır.

Son aşamada, 97 ubiquitin hedef proteindeki bir lizin amino asidine aktarılır. Daha sonra diğer bir ubiquitin molekülü ilk bağlanmış olan ubiquitin molekülünün 48. pozisyonunda bulunan lizin amino asidine eklenir ve benzer reaksiyonlar tekrar ederek hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri sentezlenir (Chau, V. vd., 1989).

26S proteozom 26S proteozom sitoplazmada ve çekirdekte bulunan multikatalitik, tüm hayat formlarında bulunan ve yaklaşık 64 alt birimden oluşan büyük bir proteazdır (Şekil 2.7). Görevleri arasında, misfolded (hatalı katlanmış), anormal, hücre döngüsü proteinlerinde siklinler, transkripsiyon faktörlerinin işlenmesi ve yıkımı, hücre döngüsünün durdurulması, immün-cevap ve apoptozis bulunmaktadır. 26S proteozom, 1 tane 20S proteozom ve 2 tane 19S düzenleyici kompleksten oluşan 2.5 MDa ağırlığında bir proteazdır.



Şekil 2.7. 26S proteozomun yapısı (McDonald, H.B. ve Byers, B., 1997).

Ubiquitin-protein konjugatları, 26S proteozomun 19S düzenleyici kompleksi tarafından tanınır, hedef protein çözülür, 20S kor kompleksi içine gönderilir ve burada peptitlere kadar yıkılır. 19S düzenleyici kompleksi iki alt kompleksten oluşmaktadır: Base (20S komplekse yakın kompleks) ve Lid (kapak). Base kompleksinde ATPaz aktivitesi içeren 6 protein ve ubiquitin tanıyan S5a proteini bulunmaktadır. ATPaz enzimlerinin substrat proteinlerin üç boyutlu yapılarının çözülmesi ve proteolitik aktiviteleri içeren 20S kompartımanı içine gönderilmesinden sorumlu olduğu sanılıyor. Protein yıkımı için Lid kompleksine de ihtiyaç vardır. Lid sekiz alt birimden oluşmaktadır. İşlevi tam olarak bilinmemesine rağmen ubiquitine olmuş proteinlerin tanınması ve deubiquitinasyondan sorumludur. 19S kompleks 20S kompleksin her iki ucuna eklenmektedir. Prokaryotik ve ökaryotik 20S kompleksi (700 kDa) 7 α ve 7 β alt birimlerinin oluşturduğu 4 tabakalı silindirik bir yapıdır (Yerlikaya, A. vd., 1996; Hershko, A. ve Ciechanover, A., 1998).

Prokaryotlarda buna fonksiyon bakımından analog olan herhangi bir molekül bulunmamaktadır. Yani prokaryotlarda bilinen, başka bir proteine kovalent bağlanarak sinyal görevi yapan bir protein yoktur. Ancak prokaryotlarda da protein–ubiquitinlerin atası–bulunmaktadır ve bunlar ubiquitin katlanmaları gösterirler (Hershko, A. ve Ciechanover, A., 1998).

2.4.1. Ubiquitin proteozom yolağında görevli bazı genler

- *Anapc11 anaphase promoting complex subunit 11:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Mitozda active olur G₁ fazı süresince de aktif kalır ve G₁/S geçişinde hızlıca inaktive olur. Hücre bölünmesi, metafaz-anafaz geçişinde pozitif regülatördür.

- *Anapc2 anaphase promoting complex subunit 2 (APC2):*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Metafaz-anafaz geçişinde fonksiyon gösterir. Hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin degradasyonunu sağlar. Mitotik siklinler ve anafaz inhibitörünü ubiquitinleyerek (26S proteozom tarafından parçalanırlar) metafaz-anafaz geçişini sağlar.

- *Arih1 ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1:*

E3 ubiquitin ligazdır. Hayatta kalım ile ilişkili Olduğu düşünülmektedir. Bu geni taşımayan *D. melanogaster*'ler nadiren erişkinlik dönemine kadar hayatta kalabilmişlerdir. Hayatta kalanlarda da yaşam süresi kısalmış, sürekli titremeler ortaya çıkmış, morfolojik bozukluklar oluşmuş ve merkezi sinir sisteminde motor fonksiyon bozuklukları görülmüştür. Hücre proliferasyonunda rol oynar.

- *Atg7 ATG7 autophagy related 7 homolog:*

E1-like ubiquitin aktivasyon enzimi kodlar. Otofaji ve vakuol transportunda gereklidir. Metabolik stress sırasında, hücre döngüsü ve hayatta kalımını düzenlemek için p53 aktivitesini ayarlar. Otofaji ve apoptozun pozitif regülasyonunu sağlar.

- *Bard1 BRCA1 associated RING domain 1:*

E3 ubiquitin ligazdır. BRCA1'in N-terminal bölgesiyle ilişki içindedir. BRCA1-BARD1 heterodimeri Lys-6-ilişkili poliubiquitin zincirlerinin oluşumuna aracılık eder ve DNA tamiri, ubiquitinasyon ve genomik dengenin devamlılığı için transkripsiyonel regülasyon vb. birçok hücresel yolağı koordine eder. DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü kontrolünde önemli rol oynar. Tümör süpresör özelliği vardır. Hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun pozitif regülasyonunda rol oynar.

- *Brca1 Breast cancer 1, early onset:*

E3 ubiquitin ligaz ailesindedir. Genomik dengenin sürdürülmesi ve tümör repressör özelliği vardır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar, ailesel meme kanseri nedenlerinin %40'ını oluşturur. Transkripsiyon, çift zincir DNA kırıkları tamiri ve rekombinasyonda rol alır. E3 ubiquitin ligaz fonksiyonu tümör repressör özelliği için önemlidir. BRCA1-BARD1 kompleksi, birçok hücresel yolda koordinasyon görevi yapar. Normal hücre döngüsünde G2-Mitoz ilerlemesi için gereklidir. Bunun yanında DNA metilasyonunun düzenlenmesi, östrojene yanıt ve apoptozun düzenlenmesinde rol alır.

- *Brca2 Breast cancer 2, early onset:*

BRCA1 gibi bu gendeki mutasyonlar da ailesel meme kanseri ve yumurtalık kanseri sebebidir. Aynı şekilde genom stabilitesinde de görevlidir. Ayrıca beyin gelişimi, hücre yaşlanması, sitokinez, iç hücre kitlesi hücre proliferasyonu (morulanın ortası), telomer onarımı (rekombinasyon ile), oosit olgunlaşması vb. olaylarda görevlidir.

- *Brcc3 BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3:*

E3 ubiquitin ligaz fonksiyonu vardır. BRCA1-BRCA2 içeren kompleksin alt birimidir. Bu kompleks, DNA kırılma bölgelerinde BRCA1 birikiminden sorumludur. Bu bölgelerde, DNA hasarına yanıt oluşturur. Mitotik hücre döngüsü ve DNA çift zincir kırıkları tamiri yollarında görevlidir. Hücre bölünmesi, G2 DNA hasar kontrol noktası, mitotik çekirdek bölünmesinde rol oynar.

- *Btrc beta-transducin repeat containing:*

E3 ubiquitin ligaz ailesindedir. F-box proteini kodlar. Fosforlanmış NFKBIA'yı ubiquitinleyerek degradasyonunu sağlar, böylece NF-kB'yi active eder. G₂/Mitoz geçişini sağlar. Sirkadiyen ritimlerin pozitif regülasyonunda, WNT sinyal yolağında ve NF-kB yolağı düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

- *Cbl Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence:*

RING-finger E3 ubiquitin ligazdır. Ubiquitin, E2 ubiquitin konjugasyon enziminden spesifik substratlara transferine aracılık eder. Birçok sinyal transdüksiyon yolağında negatif düzenleyici rolü oynar. Birçok kanser türünde mutasyona uğradığı görülmüştür. Osteoblast farklılaşması ve apoptozda görevlidir.

- *Cdc34 cell division cycle 34 homolog (UBC3):*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimini kodlar. Bu protein büyük bir multiprotein kompleksinin bir parçasıdır. Bu kompleks, hücre döngüsü G₁ regülatörlerinin ubiquitin aracılı degradasyonunda ve DNA replikasyonunun başlatılmasında gereklidir. İmmun system ve TNF- α /NF-kB sinyal yollarında görevlidir. SCF (SKP2) E3 ubiquitin ligaz kompleksi ile birlikte çalışarak bazı genlerin ubiquitinlenmesi ve degradasyonuyla hücre proliferasyonunu düzenler. G₂/Mitoz geçişinin düzenlenmesinde ve G₁/S geçişinde rol oynar.

- Cul1 cullin 1:

E3 ubiquitin ligazdır. SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) kompleksinin ana bileşenidir. Bu kompleks hücre döngüsünün ilerleyişinde görevli proteinlerin ubiquitinasyonu (hücre döngüsünün negative regülasyonu), sinyal transdüksiyon ve transkripsiyonda görevlidir. Ayrıca bu gen G₁/S ve G₂/Mitoz geçişlerinde, intrinsik apoptotik yolda, hücre proliferasyonunun negatif regülasyonunda ve organ morfogenezinde rol oynamaktadır.

- Cul2 cullin 2:

ECS (ElonginB/C-CUL2/5-SOCS-box protein) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin ana bileşenidir. Hücre döngüsünün negatif regülasyonunda (G₁/S geçiş → döngünün durdurulması) rol oynar. Tümör süressor olduğu düşünülmektedir.

- Cul3 cullin 3:

(BTB-CUL3-RBX1) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin merkezi bileşenidir. Mitoz bölünmede gereklidir. En çok yumurtalıklarda ifade edilirken; karaciğer, kalp, akciğer, böbrek vb.de ifadesi daha zayıftır. Hücre göçü, hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonu, metafaz-anafaz geçişinin pozitif regülasyonu, karaciğer morfogenezi ve G₁/S geçişinde rol oynar.

- Cul4b cullin 4B:

Cullin-RING E3 ubiquitin ligaz kompleksi bileşenidir. DNA çift zincir kırıkları tamirinde, mitotic hücre döngüsünde G₁/S geçişinin pozitif regülasyonunda görevlidir.

- Cul5 cullin 5:

SCF-like ECS (Elongin-Cullin2/5-SOCS-box protein) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bileşenidir. Hücre döngüsünün durdurulması, hücre proliferasyonunun negative regülasyonu, intrinsik apoptotik yolda ve hücre yüzey vazopressin reseptörlerinin oluşumunda rol oynar.

- Ddb1 damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa:

Birçok farklı DCX (DDB1-CUL4-x-box) E3 ubiquitin ligaz kompleksinde yer alır. DNA tamirinde gereklidir. DDB2'ye birleşerek UV hasarlı DNA bağlayıcı protein kompleksini (UV-DDB kompleksi) oluşturur. Apoptozun negative regülasyonu, DNA hasarının belirlenmesi ve tamiri, mitotik hücre döngüsünde faz geçişlerinin düzenlenmesinde rol oynar.

- Fbxo11 F-box protein 11:

SCF (SKP1-cullin-F-box) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin substrat tanıma bileşenidir. P53 yolağıyla ilişkilidir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi (çıkış), tümör gelişimi ve metastazda rol oynar.

- Fbxo32 F-box protein 32:

SCF (SKP1-cullin-F-box) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşenidir. Fosforilasyon aracılı ubiquitinasyon fonksiyonu gösterir. Kas atrofisi sırasında yüksek oranda ifade edilir.

- Fbxo4 F-box protein 4:

SCF (SKP1-cullin-F-box) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşenidir. Telomer onarımında rol oynar.

- *Fbxo6 F-box protein 6:*

SCF (SKP1-cullin-F-box) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşenidir. Hücre döngüsünün kontrolü, DNA hasarı kontrol noktası, katlanmamış proteinlere yanıt oluşturma fonksiyonları gösterir.

- *Fbxw9 F-box and WD repeat domain containing 9:*

SCF (SKP1-cullin-F-box) E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşenidir. *C. elegans*'da larval gelişim sırasında nöronlarda ifade edilir.

- *Hecw2 HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Protein modifikasyonu ve ubiquitinasyonu yollarında görevlidir. TP73'ün ubiquitinasyonuna aracılık eder ve stabilizasyonunu sağlar. TP73 aracılı transkripsiyon aktivitesini artırır.

- *Itch itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse):*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. İnflamasyon yollarında kontrol görevi yapar. JUN'u ubiquitinleyerek, lizozomlarda parçalanmasına aracılık eder. Apoptotik yolda negatif regülatördür. Hücre büyümesinin düzenlenmesini kontrol eder.

- *March5 membrane-associated ring finger (C3HC4) 5:*

Mitokondri dışı zarında bulunan E3 ubiquitin ligazdır. Mitofusin-2 ve DRP1'i düzenleyerek, mitokondri morfolojisini kontrol eder. nBunu mitokondriyal fisyonunda pozitif regülatör olma özelliği ile gerçekleştirir. n Morfolojinin kontrolüyle hücre yaşlanmasını engeller.

- *Mdm2 Mdm2 p53 binding protein homolog:*

Çekirdekte bulunan E3 ubiquitin ligazlardandır. P53 tümör repressörünün negatif regülatörüdür. P53'ün ubiquitinasyonu ve degradasyonu ile tümör oluşumunu tetikler. P53 ve P73 aracılı hücre döngüsü durdurulmasını ve apoptozu inhibe eder. Hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonunda, ilaç yanıtının oluşturulmasında ve damar oluşumunda rol oynar.

- *Mib1 mindbomb homolog 1 (Drosophila):*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Delta aracılı NOTCH sinyal yolağında hücre içi Delta domainini ubiquitinleyerek yolağın pozitif regülasyonunu sağlar. Delta reseptörlerinin endositozuna öncülük eder. Damar oluşumunda rol oynar.

- *Mocs3 molybdenum cofactor synthesis 3 (UBA4):*

E1 ubiquitin aktivasyon homolog enzimi kodlar. Molybdenum kofaktörüdür (MoCo). Bütün molibdoenzimlerin fonksiyonları için gereklidir. tRNA modifikasyonunda rol alır.

- *Mul1 mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1:*

Zayıf bir E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Akt1'i ubiquitinleyerek AKT yolağında düzenleyici rol oynar. Enzim mitokondri dışı zarında bulunur ve burada mitokondriyel morfoloji ve Akt, JNK ve NF- κ B gibi birçok yolak üzerinden apoptozu düzenler, hücre büyümesinin negatif regülasyonunda rol alır.

- *Nae1 NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1:*

Dimerik UBA3-NAE1 E1 enziminin düzenleyici alt birimidir. E1 NEDD8'i aktive ederek UBE2M'nin katalitik Sistein bölgesine transfer eder. S/Mitoz kontrol noktası ile hücre döngüsünün ilerleyişi için gereklidir. Aşırı ekspresyonu NEDD8 konjugasyonunun bozulmasıyla apoptozu tetikler.

- *Nedd8 neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8:*

Ubiquitin benzeri protein olarak sınıflandırılır. Hücre döngüsünün kontrolünde ve embriyogenezde rol oynar.

- *Park2 Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin:*

E3 ubiquitin ligaz ailesindedir. Mutasyona uğradığında genç yaşta Parkinson hastalığının ortaya çıkmasına yol açar. TP53'ün transkripsiyonunu baskılayarak hücre ölümünün negatif regülasyonunu sağlar. Oksidatif stres yanıtı oluşturur.

- *Rfwd2 ring finger and WD repeat domain 2 (RNF200):*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Hücre döngüsü, mitoz ve P53 yollarıyla ilişkilidir. JUN'un ubiquitinasyonu ve degradasyonunda direkt etkilidir. Böylece p53 aracılı transkripsiyon ve apoptozu sonlandırır, Akt aktivasyonuna öncülük eder ve hücre hayatta kalımını teşvik eder.

- *Rlim ring finger protein, LIM domain interacting (RNF12):*

E3 ubiquitin ligaz ailesindedir. TERF1'in ubiquitinlenmesi ve degradasyonu aracılığıyla telomere uzunluğu ilişkili büyümenin baskılanmasında rol oynar. X kromozomunun rasgele inaktivasyonu ve transkripsiyonun düzenlenmesinde rolü vardır.

- *Rnf144b ring finger protein 144B:*

E3 ubiquitin ligaz ailesindedir. İmmun sistem ve p53 efektörleri ilişkilidir. UBE2L3 ve UBE2L6 gibi E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerinden ubiquitini alarak p53 bağımlı/kaspaz bağımsız mekanizmalar ile apoptozu uyarır. Aşırı ekspresyonu BAX'ın (proapoptotik) ubiquitin aracılı stabilitesini azaltır. Böylece hücre ölümü engellenir. Ancak kendi başına antiapoptotik değildir.

- *Rnf167 ring finger protein 167:*

Tek başına E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterebildiği gibi E3 kompleksinin bir parçası da olabilir. Hücre döngüsünün negatif regülasyonunda görevlidir.

- *Rnf180 ring finger protein 180:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Endoplazmik retikulumda bulunur. Norepinefrin metabolizmasında rol oynar.

- *Rnf2 ring finger protein 2:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Histon H2A'nın Lys-119'dan monoubiquitinasyonunu sağlar. HOX genleriyle ilişkilidir. Anterior ve posterior eksenlerin belirlenmesi, germ hücresi gelişimi, mitotic hücre döngüsü gibi olaylarda görev yapar.

- *Rnf20 ring finger protein 20:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Histon H2B'nin monoubiquitinasyonu ile kromozom yapısını düzenler. P53'ün pozitif regülasyonunu sağlar, buna göre tümör repressor olarak kabul edilir. Hücre göçünün negatif regülasyonunda rol oynar. HOX genlerinin transkripsiyonel aktiviteleri için gereklidir.

- *Rnf34 ring finger protein 34:*

Protein-protein ve protein-DNA etkileşimleriyle ilişkili RING-finger motiflerindedir. E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. CASP8 ve CASP10'u ubiquitinleyerek degradasyonlarına yol açar, böylece ekstrinsik apoptotik yolağın negatif regülasyonunu sağlar.

- *Rnf40 ring finger protein 40:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. RING-finger grubu içerisindedir. Bir tümör süpresör olan RB1 ile etkileşimi vardır. HOX genlerinin transkripsiyonel aktiviteleri için gereklidir. Histon H2B'nin monoubiquitinasyonunda rol alır.

- *Rnf6 ring finger protein (C3H2C3 type) 6:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Potansiyel tümör repressörü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca germinal diferansiyasyon sırasında transkripsiyonel düzenleyici rolü oynar. Aksonlarda aşırı büyümenin negatif regülatörüdür.

- *Rnf8 ring finger protein 8:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. RING-finger ve FHA domain içerir. Hücre bölünmesi ve DNA çift zincir kırıkları tamirinde rol alır. Yokluğunda hücre büyümesi ve hücre döngüsü durdurulur.

- *Sae1 SUMO1 activating enzyme subunit 1:*

Ubiquitin benzeri olarak sınıflandırılır. UBA2 ile heterodimer oluşturur. Bu heterodimer SUMO1, 2, 3 ve muhtemlen 4 için E1 aktivitesi gösterir. SUMO proteinlerinin ATP ile aktivasyonunu sağlar. Mitotik hücre döngüsünün pozitif regülasyonunda rol oynar.

- *Skp1 S-phase kinase-associated protein 1:*

SCF E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bileşenidir. Hücre döngüsünün ilerlemesi, sinyal transdüksiyon ve transkripsiyonda rol oynar. Mitozda G2/M geçişinde görevlidir.

- *Skp2 S-phase kinase-associated protein 2 (p45):*

SCF E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bileşenidir. Hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonunda rol oynar. Apoptozun düzenlenmesini sağlar. G₁/S ve G₂/Mitoz geçişlerinde gereklidir.

- *Smurf1 SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Hücre motilitesi (hareketlilik), hücre sinyali, polaritesi ve farklılaşmasında rol oynar.

- *Smurf2 SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Hepatit C ile ilişkilidir. Transkripsiyonun negatif regülasyonu ve trophoblast hücre göçünün pozitif regülasyonunda rol alır.

- *Stub1 STIP1 homology and U-Box containing protein 1:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Yanlış katlanmış proteinlere yanıt ve DNA tamirinde rol alır. Tümör repressör özelliği gösterir.

- *Syvn1 synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. p53'ü sitoplazmada ayrıştırarak degradasyonunu teşvik eder. Böylece p53'ün transkripsiyon, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptoz fonksiyonlarını negatif yönde düzenler.

- *Tmem189 transmembrane protein 189:*

E2 ubiquitin türevidir. Ligaz aktivitesi gösterir. Bütün E2 ailesi üyelerine benzer özellik göstermesinin yanında katalitik Sistein bölgesinden yoksundur. Fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

- *Tp53 tumor protein p53:*

Tümör repressör genidir. Hücre döngüsünün durdurulması, apoptozun pozitif regülasyonu ve hücre yaşlanmasında rol oynar. Mutasyonu kanser gelişimi görülebilir.

- *Uba1 ubiquitin-like modifier activating enzyme 1:*

E1 ubiquitin aktivasyon ailesindedir. Hücresel proteinlerin ubiquitin-proteozom aracılı degradasyonunda proteinlerin ilkin işaretlenmelerini katalizler. DNA tamiri ve replikasyon stresine yanıtın oluşturulmasında gereklidir.

- *Uba2 ubiquitin-like modifier activating enzyme 2 (SAE2):*

E1 aktivasyon enzimlerindedir. SAE1 ile heterodimerizasyon oluşturur. Bu heterodimer SUMO1, 2, 3 ve muhtemelen 4 için E1 ligaz aktivitesi gösterir.

- *Uba3 ubiquitin-like modifier activating enzyme 3:*

E1 aktivasyon enzimlerindedir. AppBp1 ile heterodimer oluşturarak NEDD8'i aktive eder. Bu da hücre döngüsü, hücre sinyali ve embriyogenezde düzenleyici rol oynar. Endomitotik hücre döngüsünde gereklidir.

- *Uba5 ubiquitin-like modifier activating enzyme 5:*

E1 benzeri enzim olarak tanımlanır. UFM1 ve SUMO2'yi aktive eder. ER stresine yanıt oluşturur.

- *Uba6 ubiquitin-like modifier activating enzyme 6:*

E1 aktivasyon enzimlerindedir. Ubiquitin benzeri proteinlerin aktivasyonu ve konjugasyonunda görevlidir. İmmun yanıt yolağında fonksiyon gösterir.

- *Ube2a ubiquitin-conjugating enzyme E2A:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. Replikasyon sonrası DNA hasar tamiri için gereklidir ve muhtemelen düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonunda fonksiyonu vardır. Mutasyona uğramasıyla mental gerilik ortaya çıkar.

- *Ube2b ubiquitin-conjugating enzyme E2B:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. Replikasyon sonrası DNA hasar tamiri için gereklidir. İmmun sistem ve DNA çift zincir kırıkları tamirinde görevlidir. WNT sinyal yolağında fonksiyonu vardır. DNA hasarının belirlenmesi ve hasara yanıt, kromatin susturulmasının onarımı, mayotik telomere kümelenmesi, apoptozun negatif regülasyonu, ilaç yanıtı ve spermatogenez gibi olaylarda rol oynar.

- *Ube2c ubiquitin-conjugating enzyme E2C:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. Mitotik siklinlerin parçalanması ve hücre döngüsünün ilerlemesinde görevlidir. Kanserin ilerlemesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. İmmun yanıt, hücre senesens, mitozdan çıkışın pozitif regülasyonu gibi olaylarda rol oynamaktadır.

- *Ube2d1 ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. P53'ü ubiquitinler. Mitotik hücre döngüsünde rol alır.

- *Ube2d3 ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. P53'ü ubiquitinler. Apoptoz ve DNA tamirinde rol alır.

- *Ube2e2 ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindedir. DNA hasarına hücresel yanıt ve G₁/S geçişinin pozitif regülasyonunda rol alır.

- *Ube2e3 ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindedir. İmmun yanıt ve adherens junctionların yeniden yapılandırılmasında işlev görür. Hücre büyümesinin engellenmesinde rol aldığı düşünülmektedir.

- *Ube2g1 ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindedir. Kaslara özel proteinlerin yıkımında görevli olduğu düşünülmektedir. İmmun yanıt ve adherens junctionların yeniden yapılandırılmasında işlev görür.

- *Ube2g2 ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindedir. Kaslarda yüksek oranda ifade edilir. İmmun sistemede işlevi vardır. İnterferon betaya hücresel yanıt oluşturmada rol alır. ER aracılı yanlış katlanmış protein degradasyonunda görevlidir.

- *Ube2i ubiquitin-conjugating enzyme E2I:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindedir. Çekirdek yapısının korunması, kromozom ayrılması ve hücre bölünmesinde rol oynar.

- *Ube2j1 ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindedir. ER zarında yer alır. Yanlış katlanmış proteinlerin selektif degradasyonuna yol açar. İmmun sistem ve adherens junctionların yapılandırılmasında rol oynar.

- *Ube2j2 ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. ER zarında yer alır. Yanlış katlanmış proteinlerin selektif degradasyonuna yol açar. İmmun sistem ve adherens junctionların yapılandırılmasında rol oynar.

- *Ube2k ubiquitin-conjugating enzyme E2K:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. Lipit taşıyan makrofajların apoptozunun baskılanmasıyla köpük hücresi oluşumuna yol açar. Bunu p53'ün ubiquitinasyonu ve degradasyonu aracılığıyla yapar. NF-kB'nin ubiquitinasyonu ve proteolitik süreçleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

- *Ube2l3 ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. Hücre döngüsünün faz geçişleri, hücre proliferasyonu gibi olaylarda rol oynar. İlik oluşumunda işlev gördüğü düşünülmektedir.

- *Ube2l6 ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. İmmun sistemde görev alır. Tip I interferon üretiminin negatif regülasyonunu sağlar.

- *Ube2m ubiquitin-conjugating enzyme E2M:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. NIK/NF-kB sinyal yolağı ve nöronlarda apoptotik sürecin pozitif regülasyonunda rol alır.

- *Ube2n ubiquitin-conjugating enzyme E2N:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. Replikasyon sonrası DNA tamirinde önemli rol oynamaktadır. İmmun sistem ve interferon gamma yollarıyla ilişkilidir. DNA çift zincir kırıkları tamiri, histon ubiquitinasyonu, NF-kB transkripsiyon faktörünün pozitif regülasyonu, UBE2V1-UBE2N ve UBE2V2-UBE2N heterodimerlerinin oluşumu gibi olaylarda görev yapar. Lys-63 bağlantılı poliubiquitin zincirlerinin oluşumuyla hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar. Hücre döngüsü ve farklılaşması ve bunların kontrolünde rol alır.

- *Ube2q1 ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 1:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. İmmun yanıt ve adherens junctionların yeniden yapılandırılmasında işlev görür. Dişilerde hormonal homeostazla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Fertilizasyon, üreme sisteminin gelişimi ve çiftleşme davranışının oluşumunda rol alır.

- *Ube2q2 ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. İmmun sistemde görev alır. Hücre iskeleti fonksiyonu ve düzenlenmesine işlev görür. İnhibe edildiğinde hücreler uzun bir profaz arrestine girer (profaz durur). Erken mitoz kontrol noktasını uyarır.

- *Ube2q2l ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2-like:*

İmmun sistemde görev alır. Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmaya göre, hücre döngüsünün devamlılığının düzenlenmesi, DNA hasar tamiri, kromozom/kromatin dengesinin sağlanması gibi görevleri olduğu düşünülmektedir.

- *Ube2s ubiquitin-conjugating enzyme E2S:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. İmmun yanıt ve adherens junctionların yeniden yapılandırılmasında işlev görür. Hücre döngüsü ve mitozdan çıkış olaylarında rol alır.

- *Ube2t ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative):*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. DNA çift zincir kırıkları tamiri ve adherens junctionların yapılandırılmasında görevlidir. BRCA1'in ubiquitinasyonu ve degradasyonuna aracılık eder. Kromatin bağlayıcı olarak işlev görür.

- *Ube2v1 ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1:*

E2 ubiquitin ailesinin farklı bir üyesidir. Katalitik aktivite için gereken sisteinden yoksundur. İmmun sistemde işlevi vardır. Hücre farklılaşması, DNA tamirinin regülasyonu, transkripsiyonun regülasyonu, NF-kB transkripsiyon faktörünün pozitif regülasyonu gibi olaylarda rol alır.

- *Ube2v2 ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2:*

E2 ubiquitin ailesinin farklı bir üyesidir. Katalitik aktivite için gereken sisteinden yoksundur. İmmun sistem ve mitotik hücre döngüsünde görevlidir. Hücre döngüsü ve farklılaşmasının kontrolü ile bu sürecin ilerleyişini sağlar, Hatasız DNA tamir yolağında işlev görür ve DNA hasarı sonrası hücre hayatta kalımına katkıda bulunur. Hücre proliferasyonuna rol oynar.

- *Ube2z ubiquitin-conjugating enzyme E2Z:*

E2 ubiquitin konjugasyon enzimlerindendir. İmmun sistemde işlevi vardır. Apoptozun düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir.

- *Ube4a ubiquitination factor E4A:*

U-box ubiquitin ligaz ailesindedir. Securin'in poliubiquitinasyonu ile kromozom kondensasyonu ve ayrılmasında kritik rol oynamaktadır ve multiubiquitin zincir birleşmesinde görevlidir. Spesifik E1 ve E2 ligazlara bağlantıyı sağlayan, E3 ligaz görevi gördüğü düşünülmektedir.

- *Uchl1 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) (PARK5):*

Peptidaz C12 ailesindedir. Thiol proteaz enzimi işlevi vardır. Hücre döngüsünün düzenlenmesi, MAPK aktivitesinin negatif regülasyonu, hücre proliferasyonu ve kas gelişiminde rol oynar.

- *Uchl3 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase):*

Deubiquitinasyon ailesindedir. Proteaz aktivitesi gösterir. Polipeptidlerden ubiquitin'in uzaklaştırılmasını sağlar.

- *Uchl5 ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5:*

Deubiquitinasyon ailesindedir. 26S proteozomun 19S düzenleyici alt birimidir. DNA rekombinasyonu ve tamirinde rol alır.

- *Vhl von Hippel-Lindau tumor suppressor:*

E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Tümör süpresör genidir. Mutasyonu ile ailesel von Hippel sendromu ortaya çıkmaktadır. İmmun sistem ve hücre yaşlanmasında görevlidir. Hücre morfogenezinde, apoptotik sürecin ve hücre proliferasyonunun negatif regülasyonunda ve hücre farklılaşmasının pozitif regülasyonunda rol oynar.

- Wwp1 WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1:

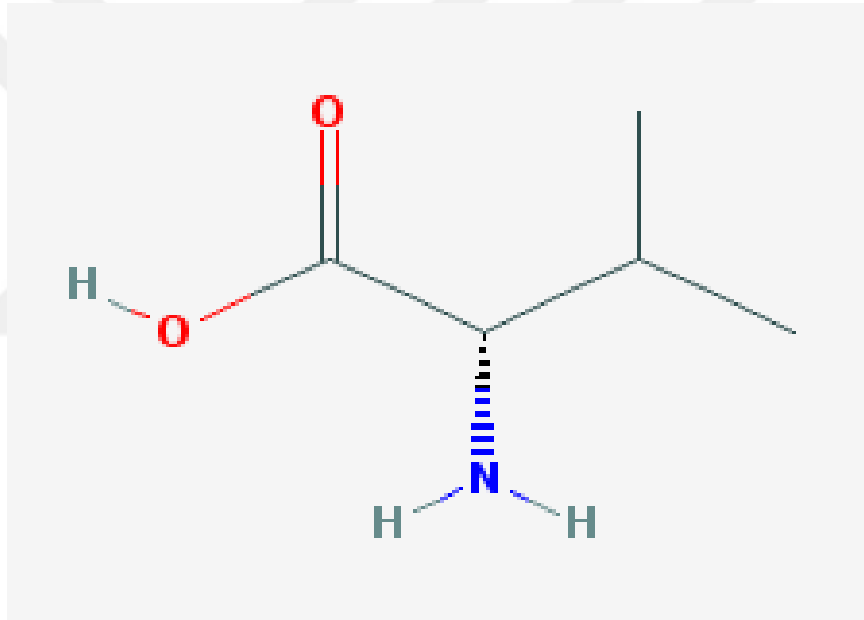
E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gösterir. Protein degradasyonu, RNA splayısı ve transkripsiyon gibi birçok hücrel olayda fonksiyon gösterir. Merkezi sinir sistemi gelişimi, DNA transkripsiyonun negatif regülasyonu ve sinyal transdüksiyon aktivitesi gibi olaylarda rol alır.

- ✓ E1 Ubiquitin aktivasyon enzimleri → Atg7, Mocs3, Nae1, Uba1, Uba2, Uba3, Uba5, Uba6
- ✓ E2 Ubiquitin konjugasyon enzimleri → Cdc34, Ube2a, Ube2b, Ube2c, Ube2d1, Ube2d3, Ube2e2, Ube2e3, Ube2g1, Ube2g2, Ube2i, Ube2j1, Ube2j2, Ube2k, Ube2l3, Ube2l6, Ube2m, Ube2n, Ube2q1, Ube2q2, Ube2q2l, Ube2s, Ube2t, Ube2v1, Ube2v2, Ube2z, Tmem189
- ✓ E3 Ubiquitin ligaz enzimleri → Anapc11, Anapc2, Arih1, Bard1, Brca1, Brca2, Brcc3, Btrc, Cbl, Cul1, Cul2, Cul3, Cul4b, Cul5, Ddb1, Fbxo11, Fbxo32, Fbxo4, Fbxo6, Fbxw9, Hecw2, Itch, March5, Mdm2, Mib1, Mul1, Park2, Rfwd2, Rlim, Rnf144b, Rnf167, Rnf180, Rnf2, Rnf20, Rnf34, Rnf40, Rnf6, Rnf8, Skp1, Skp2, Smurf1, Smurf2, Stub1, Syvn1, Ube4a, Vhl, Wwp1
- ✓ De-ubiquitinasyon enzimleri → Uchl1, Uchl3, Uchl5

2.5. Amino Asitler

2.5.1. Valin

Valin, proteinleri oluşturan 20 aminoasitten birisidir. Beslenme açısından dışarıdan alınması zorunlu (esansiyel) olan amino asitlerdendir (Şekil 2.8). Valin, yan zinciri herhangi bir yük taşımadığı için nötr bir aminoasittir (Hardy, M., 1985). Vücut geliştirme yapanlar tarafından lösin ve izo-lösin ile birlikte kullanıldığında kas kütlelerinde artış sağladığı bilinmektedir (Fouré, A. ve Bendahan, D., 2017).

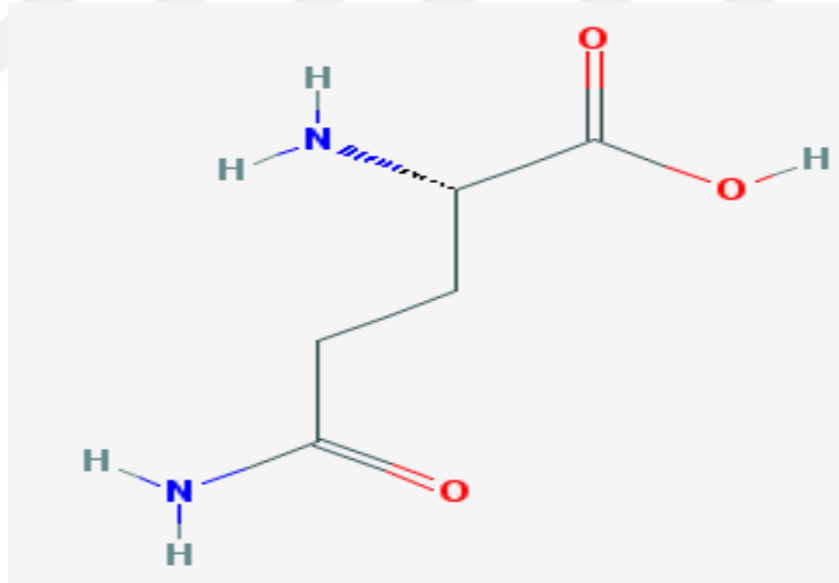


Şekil 2.8. Valin amino asidi kimyasal formülü (PubChem).

2.5.2. Glutamin

Glutamin, proteinleri oluşturan 20 aminoasitten birisidir. Yan zincirinde karboksamit grubu içerir (Şekil 2.9). Polar özelliktedir, ancak fizyolojik pH'da yüksüzdür. Pürin ve pirimidin sentezi ve amino gruplarının plazmada taşınmasında rol oynar. Böbrek tübülüs hücresinde serbest amonyak oluşturur. Glutamin, aminoşeker sentezinde amino grubu vericisi olarak yer alır.

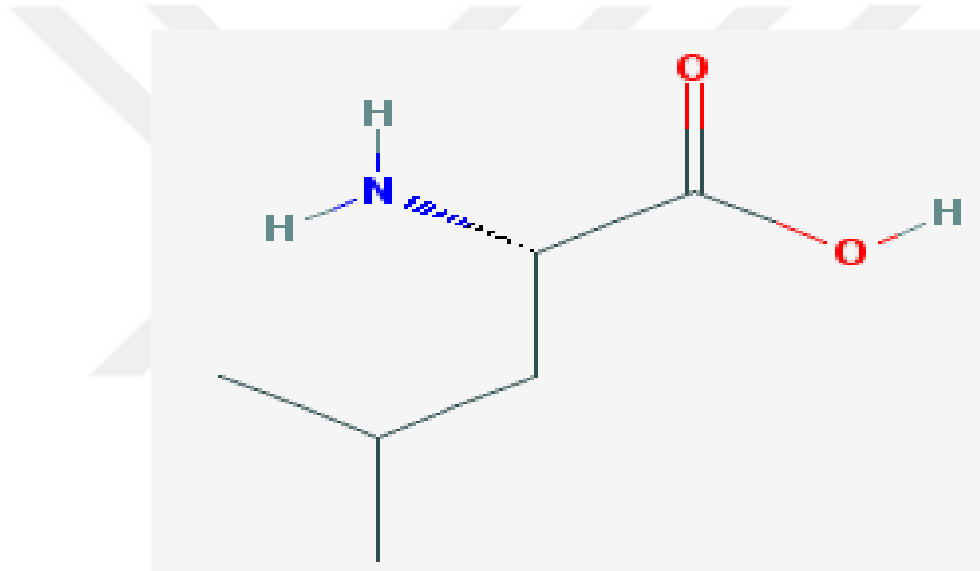
Molekül bir tam olarak ele alındığında, yüklü değildir. Bu yüzden elektiriksel alanda zwitter iyonları dolaşamazlar. Tam olarak değinecek olursak izo elektiriksel noktada (belirli bir pH-değerinde) çok düşükte olsa su içinde çözülebilmektedir. Glutamin tozu, vücutta karbonhidratların tekrar sentezlenmesini sağlaması ve büyüme hormonu seviyelerini arttırması sebebiyle besin takviyesi olarak sporcular ve vücut geliştirme ile ilgilenen kişiler tarafından da kullanılabilir (Hardy, M., 1985).



Şekil 2.9. Glutamin amino asidi kimyasak yapısı (PubChem).

2.5.3. L6sün

L6sün (Leu), DNA tarafından kodlanan 20 aminoasitten biridir. Dallanmış zincir içeren bir amino asittir (Şekil 2.10). İzol6sün ve l6sün birbirlerinin izomeridirler. Beslenme açısından l6sün dışarıdan alınması zorunlu (esansiyel) olan bir aminoasittir. Diğer birçok amino asitte olduğu gibi bu amino asitinde hem L- hem de D- isomeri vardır. L6sün kaslar için çok önemli olan bir amino asittir. Vücutta kaslardaki ve karaciğerdeki protein biyosentezini destekleyerek kas proteinlerinin yapımına ve hasar görmüş olanların iyileşmesini sağlamaktadır (Kurpad, A.V. vd., 2006).



Şekil 2.10. L6sün amino asidi kimyasal formülü (PubChem).

Valin ve L6sün dallanmış zincir içeren aminoasitlerdendir. DZAA içeren amino asitler proteinlerin yapılarını oluşturmalarının yanı sıra enerji kaynağı, çeşitli metabolitlerin öncüleri ve sinyal molekülleri olarak görev almaktadırlar. DZAA' lar, hücrelerin hayatta kalınımı, rejenerasyon, süreçleri üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Karaciğer rejenerasyonunda besinsel ve metabolik desteğin önemi yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Özellikle glikoz, yağ asitleri ve bazı aminoasitler karaciğer rejenerasyonunda yararlı etki gösterir (Holecek, M., 2010).

Son yapılan alışmalar, DZAA içeren aminoasitlerin hepatoselüler karsinomayı ve fibrozu engeleyici etkisinin olduğunu ayrıca sağ kalınım oranını arttırdığı yönündedir. Cha ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Dietilnitrozamin ile uyarılmış sıçan karaciğerinde fibroz doku ve hepatoselüler karsinoma gelişimine karşı, diyet takviyesi ile verilen DZAA' nın antifibrotik etkisini ve hepatosellar karsinoma için kemopreventif olduğunu ortaya koymuştur (Cha, J.H. vd., 2013). Iwasa ve arkadaşları CCl₄ kullanarak karaciğer fibrozu yapılan sıçanlarda 16 haftaya kadar diyetle verilen DZAA' içeren amino asitlerin, azaltılmış oksitatif strese bağlı olarak hayatta kalma süresini uzattığını ve glikoz metabolizmasını geliştirdiğini ortaya koymuştur (Iwasa, M. vd., 2013). Bir başka çalışmada granül halinde verilen DZAA' ların sirozda, hayatta kalma süresini arttırdığı bildirilmiştir (Ishikawa, T., 2012). L-Glutaminin HGF salınımı için bir sinyal oluşturduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Lawson, C.M. vd., 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamız; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun'nun 534/2016 sayılı iznine dayanılarak yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Tüm deney hayvanları T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından temin edilmiştir. Deneyimiz için 200-250 gr ağırlığında erkek Wistar albino ırkı sıçanlar seçilmiştir. Hayvanlar deney süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırılması olan, ısı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatılmıştır. Deneye başlanmadan önce tüm hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre içinde hayvanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslenmiş ve çeşme suyu verilmiştir.

3.2. Deney Grupları

Deneyimizde 200-250 gr ağırlığında erkek Wistar albino ırkı sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde n=3' er sıçan olmak üzere toplam 5 grup oluşturuldu. Bunlar;

Grup I: Kontrol grubu olup madde uygulaması yapılmadan laparotomi yapılmıştır. Karaciğerin alınacak kısmı dışarı çıkarılmış ve etrafından ip geçirilerek ameliyatın stresi uygulanmıştır ancak hepatektomi uygulanmadan kapatılmış ve sonrasında diseksiyon yapılmıştır. PCR array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom Yolağına ait 8'i kontrol (housekeeping) olmak üzere 96 genin profilleri incelenmiştir.

Grup II: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, i.p. olarak 1 ml 10 mM PBS uygulaması yapılmış ve 6 saat sonra diseksiyon yapılmıştır. PCR array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 8'i kontrol (housekeeping) olmak üzere 96 genin profilleri incelenmiştir.

Grup III: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, intraperitonel (i.p.) olarak 1 g/kg valin (1 ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) uygulaması yapılmış ve 6 saat sonra diseksiyon yapılmıştır. PCR array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 8'i kontrol (housekeeping) olmak üzere 96 genin profilleri incelenmiştir.

Grup VI: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, i.p. olarak 1 g/kg glutamin (1ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) uygulaması yapılmış ve 6 saat sonra diseksiyon yapılmıştır. PCR array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 8'i kontrol (housekeeping) olmak üzere 96 genin profilleri incelenmiştir.

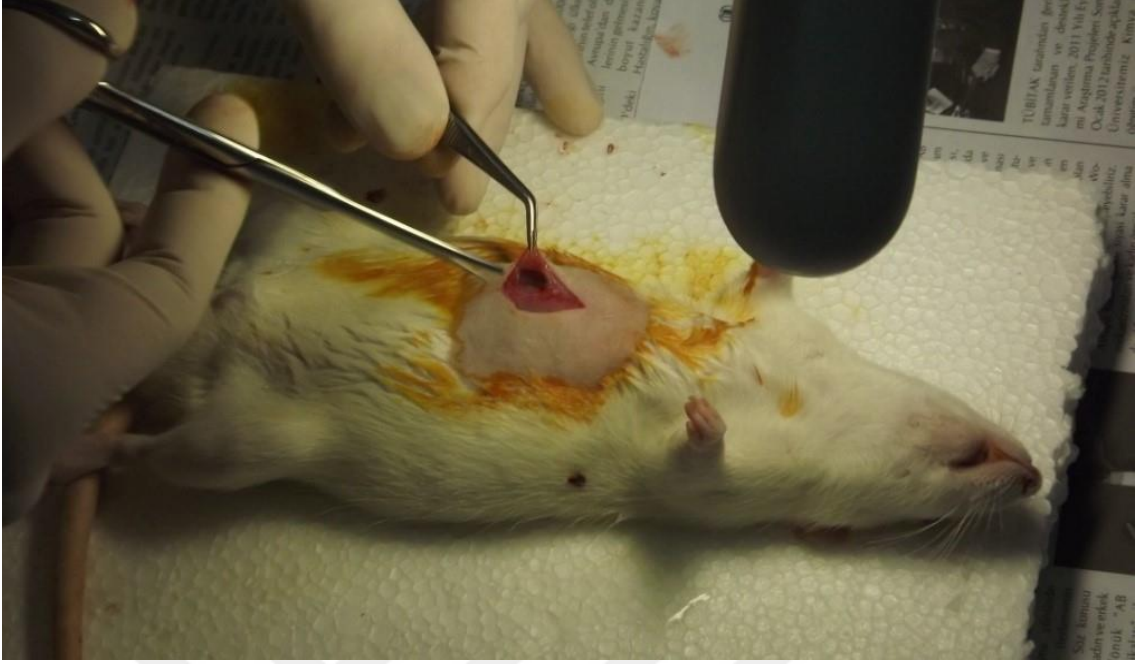
Grup V: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, i.p. olarak 1 g/kg lösin (1ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) uygulaması yapılmış ve 6 saat sonra diseksiyon yapılmıştır. PCR array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 8'i kontrol (housekeeping) olmak üzere 96 genin profilleri incelenmiştir.

Deneyisel çalışmalarımızda ticari olarak sağlanan %99 saflıktaki lösin, valin ve glutamin kullanılmıştır.

3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler ile gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarına ait hayvanların anestezisi, kas içine 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin ile yapılmıştır.

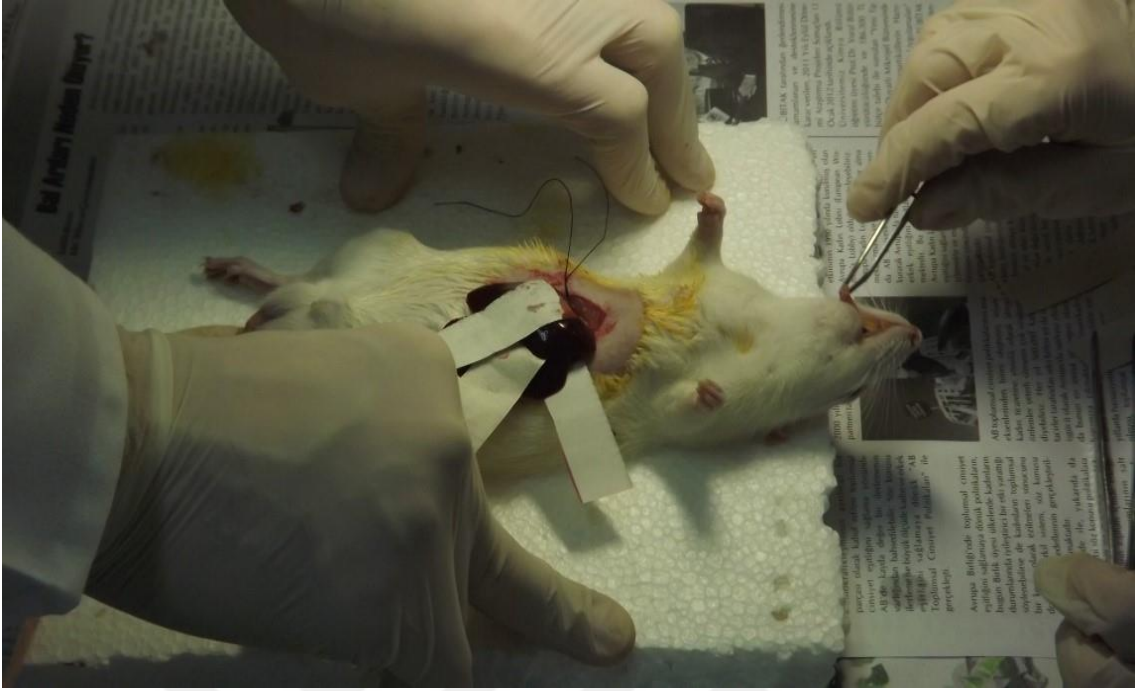
Parsiyal hepatektomi (PH) yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip işlem başlatılmıştır. Cerrahi uygulama bölgesi %70' lik etilalkol ile temizliği yapılmış Higgins ve Anderson (Higgins, G.M. ve Anderson, R.M.) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirilmiştir. Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm' lik bir orta hat kesisi ile laparotomi yapılmış (Şekil 3.1) ve karaciğer loplarını birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68-70 oranında kütesini teşkil eden öndeki sağ orta ve sol yan loplari ayrılmıştır (Şekil 3.2). Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanmış (Şekil 3.3) ve bağıın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).



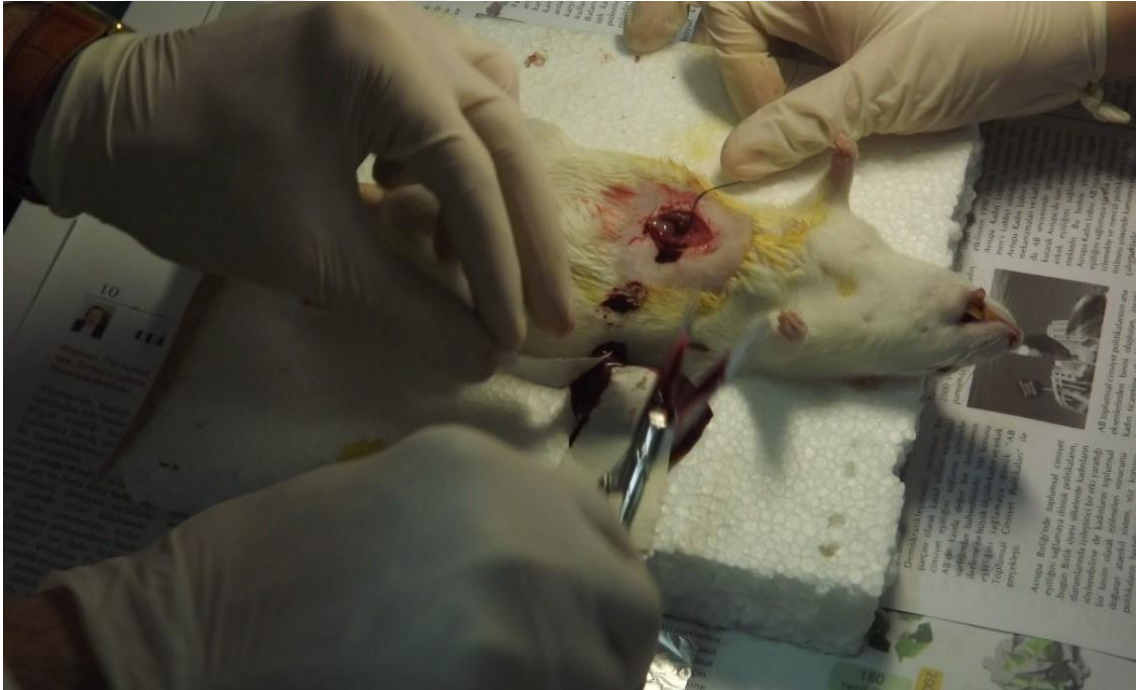
Şekil 3.1. Karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi.



Şekil 3.2. Karaciğer loplarnı birbirine bağlayan zarlar ayrılarak sağ orta ve sol yan loplarn ayrılması.



Şekil 3.3. Karaciğer loplarna ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanması.



Şekil 3.4. Bağıın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmesi.

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine karşı karın boşluğuna steril serum fizyolojik (SF) verilmiştir. Daha sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek suturele dikilerek laparotomi bölgesi kapatılmış ve antiseptik solüsyon ile laparotomi bölgesi temizlenmiştir.

Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın deney süresince (6 saat) yaşatılmıştır. 6 saatlik süre sonunda deney hayvanları, kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülüp orta hat kesisi yapılarak karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

3.4. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda kalpten kanın alınmasından hemen sonra her bir hayvana ait karaciğer çıkarılmış ve serum fizyolojik ile hızlıca yıkanmıştır. %70 parsiyel hepatektomi işlemi uygulanmış gruplara ait karaciğer dokusu örnekleri, RT-PCR analizi için -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4.1. RT-PCR analizi

Ubiquitin Proteozom Yolağına ait; Anapc11, Anapc2, Arih1, Atg7, Bard1, Brca1, Brca2, Brcc3, Btrc, Cbl, Cdc34, Cul1, Cul2, Cul3, Cul4b, Cul5, Ddb1, Fbxo11, Fbxo32, Fbxo4, Fbxo6, Fbxw9, Hecw2, Itch, March5, Mdm2, Mib1, Mocs3, Mul1, Nae1, Nedd8, Park2, Rfwd2, Rlim, Rnf144b, Rnf167, Rnf180, Rnf2, Rnf20, Rnf34, Rnf40, Rnf6, Rnf8, Sae1, Skp1, Skp2, Smurf1, Smurf2, Stub1, Syvn1, Tmem189, Tp53, Uba1, Uba2, Uba3, Uba5, Uba6, Ube2a, Ube2b, Ube2c, Ube2d1, Ube2d3, Ube2e2, Ube2e3, Ube2g1, Ube2g2, Ube2i, Ube2j1, Ube2j2, Ube2k, Ube2l3, Ube2l6, Ube2m, Ube2n, Ube2q1, Ube2q2, Ube2q2l, Ube2s, Ube2t, Ube2v1, Ube2v2, Ube2z, Ube4a, Uchl1, Uchl3, Uchl5, Vhl ve Wwp1 genlerini kodlayan gen bölgelerinin aktivitesi aşağıdaki malzeme ve yöntemler kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.1.1. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu

Karaciğer doku örnekleri Pure Link Ambion LifeTech (Cat. No: 12183018A) kullanılarak TRIzol (Ambion, Cat. No: 15596-026) yardımıyla izole edilmiştir. RNA eldesi aşağıdaki aşamalara göre yapılmıştır.

1. 600 mg karaciğer örnekleri 1 mL TRIzol ve Next Advance ZrOB05-RNA 0,5 mm RNase-free boncuk kullanılarak Next Advance Bullet Blender Storm 24 homojenizatör ile homojenize edilmiştir.
2. TRIzol içeren lizatlar oda sıcaklığında nükleoprotein komplekslerinin ayrışmasını sağlamak için 5 dk ünkübasyona bırakılmıştır.
3. Daha sonra 0,2 mL kloroform lizatlar üzerine eklenmiştir ve 15 sn boyunca tüpler elde titreştirilerek çalkalanmıştır.
4. 2-3 dk boyunca lizatlar oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
5. Örnekler 12000xg'de 15dk +4°C'da santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası karışım zayıf faz, kırmızı fenol kloroform fazı, ara faz ve renksiz RNA içeren üst faza ayrılmıştır (Üst fazın hacmi ~600 µL'dir).
7. RNA içeren renksiz üst fazdan RNaz-free tüplere ~400µL aktarılmıştır.
8. Daha sonra tüplere eşit hacimde %70 etanol eklenmiştir.
9. Karışım iyice vortexlenmiştir.
10. Etanol eklendikten sonra oluşabilecek çökeltileri dağıtmak için tüpler ters yüz edilmiştir.
11. Örneklerden ≤700µL koleksiyon tüpleri içeren Spin kartuşlara transfer edilmiştir.
12. 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir.
13. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atılmış ve koleksiyon tüpü Spin kartuşa geri takılmıştır. Bütün örnek işleminden geçinceye kadar 12 ve 13. basamaklar tekrar edilmiştir.
14. Spin kartuşların üzerine 700µL Wash Buffer I eklenmiştir. Kartuşlar 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı ve aynı koleksiyon tüpü atılmıştır. Spin kartuşa yeni bir koleksiyon tüpü takılmıştır
15. Kartuşa 500µL etanollü Wash Buffer II eklenmiştir.

16. 12000xg'de oda sıcaklığında 15sn santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde biriken sıvı atılmış ve aynı koleksiyon tüpü kartuşa geri takılmıştır.
17. 16 ve 17. basamaklar tek seferliğine tekrar edilmiştir.
18. 12000xg'de oda sıcaklığında 1dk membrane kuruyuncaya kadar santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atıldı ve Spin kartuş geri kazanım tüpüne yerleştirilmiştir.
19. 30-100µL RNaz-free su Spin kartuşların merkezine eklenmiştir.
20. Örnekler oda sıcaklığında 1dk inkübe edilmiştir.
21. Geri kazanım tüpüne yerleştirilen Spin kartuşlar oda sıcaklığında $\geq 12000xg$ 'de 2dk santrifüj edilmiştir.
22. Arındırılmış RNA'lar hemen kullanım için birkaç saat buz üzerinde ya da uzun süreli saklama için $-80^{\circ}C$ 'da saklanmıştır.
23. Elde edilen RNA'lar NanoDrop ND_1000 Spectrophotometer cihazı ile 1 µL örnek kullanılarak ölçülmüştür.

3.4.1.2. RNA örneklerinin konsantrasyonlarının eşitlenmesi

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C1 → okunan RNA konsantrasyonu ng/µL

V1 → eldeki RNA örneğinden alınacak miktar µL

C2 → sabit sayı=200 ng/µL

V2 → seyreltme sonrası kuyucuklardaki toplam hacim (10 µL)

Buna göre örnek sayımıza göre eldeki RNA örneklerinin her biri için ayrı ayrı hesaplama yapılarak eşit konsantrasyonda 10 µL' lik RNA örnekleri elde edilmiştir.

3.4.1.3. RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi

RT-PCR işleminde gerekli olan cDNA için RNA örnekleri High-Capacity RNAto-cDNATM Kit (Marka, Cat. No: 4368814) kullanılarak belirtilen protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışılacak gen sayısına göre kuyucuklara 10 µL 2X RT Master Mix kuyucuklara eklenir. RT reaksiyon karışımı plate içine bölünmüştür.

1. Master Mix' in hazırlanışı (tek bir örnek için miktarlar)

- 2 µL 10X RT Buffer x40
- 0,8 µL 25X dNTP mix x40
- 2 µL 10X RT Random Primer x40
- 1 µL Reverse transcriptase enzimi ve x40
- 4,2 µL Nuclease free su eklenerek master mix hazırlanır. x40

2. Çalışılacak gen sayısına göre her bir kuyucuğa hazırlanan master mix 10 µL eklenmiştir. Üzerine yine önceden hazırlanan RNA örnekleri 10 µL olacak şekilde ilave edilmiştir (toplam hacim 20 µL). Herhangi bir hava kabarcığını ortadan kaldırmak ve içeriğin aşağı inmesi için plate kısa bir süre santrifüj edilmiştir.
3. Plate'in üzeri adhesive film ile kaplanmıştır.
4. Revers transkripsiyon reaksiyonunu başlatmak için plate bir süre buz üzerinde tutulmuştur.
5. 37°C'de 1 saat reaksiyon için inkübe edildi. 5dk 95°C'ye kadar ısıtılarak reaksiyon durdurulmuş ve 4°C'de tutulmuştur (İnkübasyon kolaylığı için reaksiyon, bir thermal cyler içinde gerçekleştirilebilir).
6. Elde edilen cDNA, RT-PCR uygulaması için kullanılmıştır (Elde edilen cDNA, -15°C ile -25°C arasında uzun süreli olarak saklanabilir).

3.4.1.4. cDNA örneklerinin seyreltilmesi

cDNA sentezi sonrası her örnek için 40 µL cDNA elde edilmiştir.

1. Çalışma sırasında kuyucuklara eklenecek cDNA konsantrasyonunun 100 ng – 100 fg arasında olması gerekmektedir.
2. Çalışmamızda her bir örnek için 96 gen bakılmıştır. Bu açıdan pipetleme sırasında oluşabilecek kayıplar da göz önünde bulundurularak seyreltme işlemi yapılmıştır. Çalışmamızda 125 örnek için hesaplama yapılmıştır.
 - $C1 \times V1 = C2 \times V2$
 - $200 \times 20 = C2 \times 125$
 - $C2 = 32 \text{ ng}$
 - Sonuç (32 ng) 100 ng – 100 fg konsantrasyonları arasında bir sayı olduğundan seyreltme bu şekilde yapılmıştır.
3. cDNA örnekleri 20 µL'lik ikişer kuyucukta yer almaktadır. Buna göre örneklerin toplam 125 µL olması için kuyucuklara 42,5 µL Nuclease free su eklenmiştir.

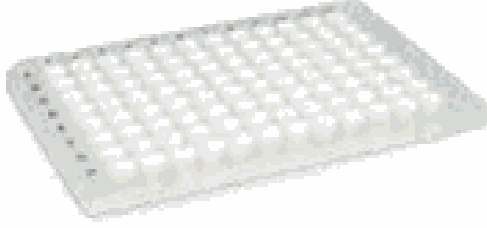
Bundan sonraki aşamada RT-PCR geçilecektir.

3.4.1.5. RT-PCR Array analizi

cDNA'lar gen ekspresyon analizi için mikro litrede 200 ng eşitlenerek kullanılmıştır. Bundan sonraki aşamada RT-PCR geçilecektir. Step One Plus marka RT-PCR cihazına uyumlu Gen ekspresyon master mix ve Gene Expression Assay kitleri kullanılarak RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR işlemi 50°C'de 2dk, 95°C'de 10dk, 95°C'de 15sn, 60°C'de 1dk olarak uygulanmıştır.

Gen ifadeleri β-Actin, B2M, GAPD, GUSP, HPRT1, PGK1, PPIA, RPL13A genlerine göre değerlendirilmiştir. RT-PCR'da RealTimePrimers marka primer paneli kullanılmıştır. Kullanılan panelin ürün kodu: Rat Ubiquitin Signaling Library

A. Ana Stok Plate Hazırlanması

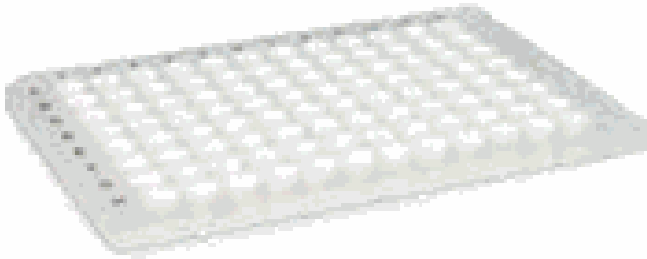


Stock plate

- Add 40 μ L dH₂O
- Primer conc = 10 μ M
- Re-seal and store at -20 or -80C

Stok plate'in her bir kuyucuğuna 40 μ L Nülease-free su ilave edilerek liyofinize haldeki primerler sulandırılmıştır. Bu durumda her bir kuyucuktaki primer konsantrasyonu 10 μ M olmaktadır. Stok plate' den çalışma için gerekli miktarda primer alınarak ara plate oluşturularak çalışma plateleri hazırlanmıştır.

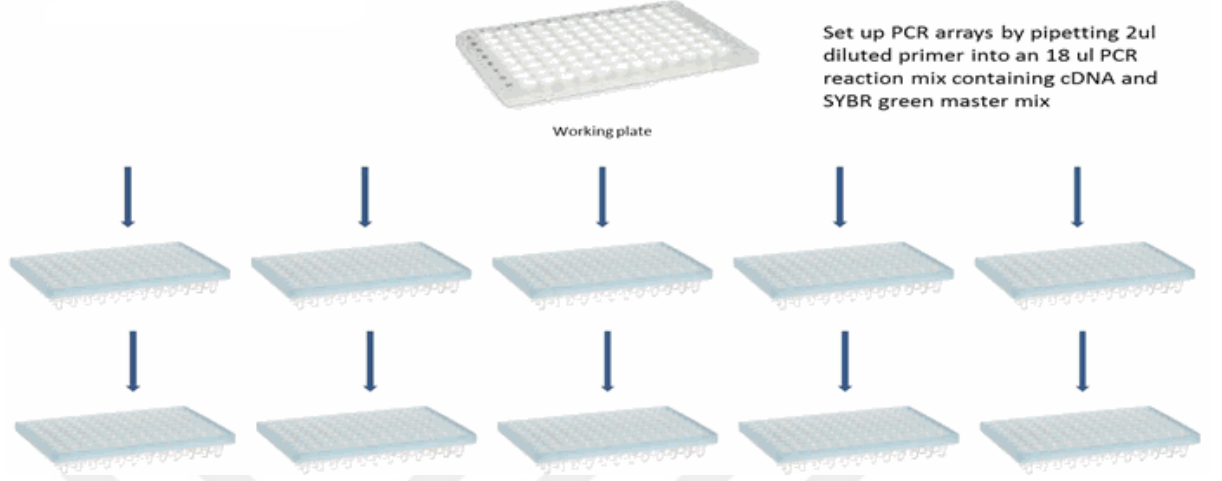
B. Çalışma Plate'i Hazırlanması



Working plate

Çalışma plate'i hazırlanırken uygulanacak olan çalışmada kullanılacak miktarlar hesaplanmıştır. Reaksiyon plateleri esas alınarak bu işlem uygulanmıştır. Örneğin 20 farklı örnek için çalışılacaksa, 20 reaksiyon plate'i olacaktır. Her bir kuyucukta 10 μ L' lik örnek olacağı zaman hazırlanacak ara plate'ten 1 μ L primer konulacaktır. Buna göre de oluşabilecek kayıplar göz önüne alındığında toplam 30 μ L primer bulunan ara stok plate hazırlanmıştır. Protokole göre ara stok hazırlanırken konsantrasyonlar 9:1 oranında olmaktadır. 30 μ L 9:1 oranında primer elde etmek için 1/9, 3 ile çarpılır ve elde edilen 3/27 oranı kurulur. Buna göre her bir kuyucuğa 3 μ L primer ve 27 μ L Nülease-free su ilave edilerek ara plate hazırlanmıştır.

C. Reaksiyon Plate'inin Hazırlanması



Örnek reaksiyon karışımı (10 μ L):

Nülease-free su : 3 μ L

Primer (Ara stoktan) : 1 μ L

SYBR Green : 5 μ L

cDNA : 1 μ L

Hazırlanan plate'lerin üzeri film ile kapatıldıktan sonra, hava kabarcığı kalmaması için iyice vortekslenmiştir. Daha sonra bu plate'ler ABI StepOnePlus PCR cihazında, standart modda okutulmuştur. Çalışılan primerlerin protokolüne göre PCR' da 50 cycle yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Gruplara ait deney hayvanlarından elde edilen karaciğer doku örneklerinin; Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genleri RT-PCR array analizi ile incelenmiş, gruplar arası farklılıklar değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri Sham grubuna göre karşılaştırılmıştır, bu karşılaştırma ACTB gibi housekeeping genlerin seviyesine göre yapılmıştır.

Buna göre deney gruplarından olan Grup III' de (Valin); Bard1, Brca2, Cb1, Cdc34, Cul1, Fbxo32, Fbxo4, Fbxw9, Hecw2, Rlim, Rnf167, Rnf180, Sae1, Smurf2, Uba2, Ube2a, Ube2c, Ube2g1, Ube2m, Ube2q2, Ube2z, Ube4a ve Vhl genleri olmak üzere 23 genin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1 - Çizelge 4.4).

Bu genlerden; Brca2, Cul1, Hecw2, Sae1, Ube2a, Ube2c ve Ube2m genleri hücre döğüsünün ilerlemesi ve rejenerasyon açısından önemlidir (Reyes-Turcu, F.E. vd., 2009; Cheng, R. vd., 2017; Park, J.A. ve Kwon, Y.G., 2018). 2/3 oranında PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin ifadesinde hızlı bir artış olduğu ifade edilmektedir (Bachofner, M. vd., 2017). Ubiquitinasyon sürecinin NF-κB gibi rejenerasyonda etkili olduğu bilinen bir yolağı active ettiği bilinmektedir. Ubiquitinasyon NF-κB' nın ilerleyişini sağlamaktadır (Palombella, V.J. vd., 1994). Ubiquitin Yolağı İκB kompleksini inhibe ederek NF-κB sürecinin ilerlemesini sağlar (Alkalay, I. vd., 1995).

Çizelge 4.1. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan).

GEN	Kontrol Grubuna Göre			
	Grup II (PBS)	Grup III (Val)	Grup IV (Glu)	Grup V (Leu)
ANAPC11	0.31↓	0.33↓	0.99	4.19↑
ANAPC2	0.09↓	0.00↓	0.00↓	0.15↓
ARIH1	0.97	0.67	0.65	0.54
ATG7	2.36↑	1.05	0.47↓	7.10↑
BARD1	10.74↑	17.56↑	11.11↑	117.87↑
BRCA1	0.65	0.17↓	0.15↓	0.24↓
BRCA2	13.63↑	32.70↑	6.59↑	15.65↑
BRCC3	0.92	0.02↓	0.01↓	5.37↑
BTRC	2.07↑	0.02↓	0.03↓	5.90↑
CBL	13.05↑	62.01↑	8.21↑	83.93↑
CDC34	2.84↑	2.61↑	1.07	13.81↑
CUL1	1.91	2.86↑	1.01	0.14↓
CUL2	0.64	0.00↓	0.01↓	139.85↑
CUL3	1.00	0.04↓	0.59	0.32↓
CUL4B	0.73	0.02↓	1.01	0.89
CUL5	0.42↓	0.02↓	2.40↑	9.43↑
DDB1	0.95	0.03↓	0.35↓	3.05↑
FBXO11	2.89↑	1.58	1.01	3.24↑
FBXO32	75.00↑	52.75↑	55.46↑	175.39↑
FBXO4	0.17↓	5.81↑	0.97	0.08↓
FBXO6	1.73	0.03↓	10.58↑	111.52↑
FBXW9	6.68↑	28.46↑	4.20↑	21.62↑

Grup IV'te (glutamin) Bard1, Brca2, Cbl, Cul5, Fbxo32, Fbxo6, Fbxw9, Hecw2, Mul1, Rlim, Skp2, Uba2, Uba5, Ube2c, Ube2e3, Ube2g1, Ube2m, Ube2q2, Ube4a ve Vhl genleri olmak üzere 20 genin ifadesinde artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1 -).

Bard1 geni Brca genleri için önemli role sahiptir. Tümör süpresor özelliği vardır. Brca2 geninin aktivasyonunu sağlar. Brca genleri mitozda G₂-Mitoz geçişlerinde önemli bir role sahiptir. Bu genler bir nevi kontrol sağlamaktadırlar (Jin, Y. vd., 1997). Çalışmamızda bütün gruplarda artış gösterdiği belirlenmiştir. Grup V'te (lösin) (Çizelge 4.1) diğer gruplara göre oldukça fazla bir artış vardır.

F-box ailesi üyelerinden Fbxo6 geni, hücre proliferasyonunda, hücre döngüsünün kontrolünde ve DNA hasarlarının önlenmesinde rol almaktadır (Zhang, Y.W. vd., 2009). Fbxo6 geni Grup V'te yüksek oranda artış göstermiştir (Çizelge 4.1).

Huang ve ark. yaptığı çalışmaya göre Rlim, p15 ve p21 genlerinin upregülasyonunu sağlayarak hepatosellüler karsinomayı baskılamaktadır. Hepatosellüler karsinomanın önemli bir supressörüdür. Bu genin aşırı ekspresyonu hücre büyümesinin ve hücre döngüsü ilerlemesinin durdurulmasını sağlar (Huang, Y. vd., 2017). Çalışmamızda, bütün gruplarda artış göstermiştir. Ancak en yüksek artış Grup V'te (Çizelge 4.2) görülmektedir. Buna göre, karaciğer rejenerasyonu sırasında, döngünün ve aşırı büyümenin engellenmesi açısından bütün gruplarda bu şekilde artış olması beklenen bir sonuçtur. Lösin bu açıdan bu genin ekspresyonu üzerinde diğerlerine göre daha olumlu bir etki etmiştir.

Mul1 geni NF- κ B' nin aktivatörüdür. Akt yolağında da düzenleyici rolü vardır (Matsuda, A. vd., 2003; Peng, J. vd., 2016). NF- κ B ubiquitinlendiğinde aktive olur (Palombella, V.J. vd., 1994). Çalışmamızda Grup IV ve Grup 5' te anlamlı artış göstermiştir (Çizelge 4.2). Ubiquitin yolağı, NF- κ B yolağı ile ilişkili olduğundan bu yolakta rol alan Mul1 geninin bu gruplarda artış göstermiş olması beklenen bir sonuç olmaktadır.

Skp2 mitozda G₁/S ve G₂/M noktalarında geçişleri sağlar (Inuzuka, H. vd., 2012). Deney gruplarımızda anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Çizelge 4.2. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan) (devam).

GEN	Kontrol Grubuna Göre			
	Grup II (PBS)	Grup III (Val)	Grup IV (Glu)	Grup V (Leu)
HECW2	5.18↑	2.59↑	2.88↑	10.94↑
ITCH	1.32	1.16	0.68	3.10↑
MARCH5	4.30↑	1.38	0.30↓	6.99↑
MIB1	0.14↓	1.20	0.02↓	0.54
MOCS3	0.22↓	0.10↓	1.28	4.94↑
MUL1	2.51↑	1.78	3.57↑	34.64↑
NAE1	0.37↓	0.21↓	1.60	0.60
NDM2	1.03	0.84	0.45↓	0.11↓
NEDD8	0.40↓	0.26↓	0.26↓	3.09↑
PARK2	0.76	1.12	0.67	5.97↑
RFWD2	0.44↓	0.03↓	0.51	10.52↑
RLIM	59.26↑	40.91↑	13.12↑	160.28↑
RNF144B	9.93↑	1.67	0.90	6.64↑
RNF167	1.95	6.28↑	1.39	0.33↓
RNF180	3.04↑	2.97↑	0.39↓	6.97↑
RNF2	0.34↓	0.04↓	1.61	0.18↓
RNF20	0.75	0.81	0.01↓	0.05↓
RNF34	0.24↓	0.53	0.70	3.08↑
RNF40	0.03↓	0.29↓	0.44↓	1.30
RNF6	1.05	0.46↓	0.40↓	1.34
RNF8	0.46↓	0.49↓	0.42↓	1.52
SAE1	0.54	2.22↑	0.80	0.24↓

Grup V' te (lösin) Anapc11, Atg7, Bard1, Brca2, Brcc3, Btrc, Cbl, Cdc34, Cul2, Cul5, Ddb1, Fbxo11, Fbxo32, Fbxo6, Fbxw9, Hecw2, Itch, March5, Mocs3, Mull1, Nedd8, Park2, Rfwd2, Rlim, Rnf144b, Rnf180, Rnf34, Skp1, Smurf1, Smurf2, Stub1, Syvn1, Tmem189, Tp53, Uba5, Uba6, Ube2c, Ube2d1, Ube2d3, Ube2j1, Ube2j2, Ube2k, Ube2m, Ube2q1, Ube2q2, Ube2v1, Ube2v2, Ube4a, Uchl1, Vhl ve Wwp1 genleri olmak üzere 51 genin ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1 - Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan) (devam).

GEN	Kontrol Grubuna Göre			
	Grup II (PBS)	Grup III (Val)	Grup IV (Glu)	Grup V (Leu)
SKP1	0.04↓	0.01↓	0.53	2.69↑
SKP2	2.41↑	0.04↓	9.71↑	0.24↓
SMURF1	5.00↑	1.56	1.89	5.49↑
SMURF2	0.48↓	3.03↑	1.58	2.13↑
STUB1	26.15↑	1.46	0.96	11.37↑
SYVN1	1.06	0.64	0.21↓	4.58↑
TMEM189	1.66	0.04↓	0.55	6.30↑
TP53	0.05↓	0.53	0.25↓	2.86↑
UBA1	0.71	0.52	0.35↓	0.82
UBA2	31.75↑	52.51↑	29.93↑	9.50↑
UBA3	0.66	0.01↓	0.29↓	0.07↓
UBA5	2.27↑	1.08	4.66↑	4.69↑
UBA6	0.19↓	0.06↓	0.16↓	6.33↑
UBE2A	0.60	2.07↑	0.15↓	0.09↓
UBE2B	0.19↓	0.27↓	0.23↓	0.20↓
UBE2C	16.48↑	202.87↑	36.50↑	861.74↑
UBE2D1	0.51	0.08↓	0.03↓	6.92↑
UBE2D3	3.13↑	0.47↓	0.78	32.10↑
UBE2E2	0.50↓	0.01↓	1.36	1.32
UBE2E3	0.30↓	0.12↓	11.74↑	1.13
UBE2G1	2.24↑	2.33↑	2.26↑	0.24↓
UBE2G2	0.03↓	0.06↓	0.49↓	0.07↓

Anapc11 mitoz başlangıcında aktive olur ve G₁ fazı süresince aktif olarak kalır. S fazına geçişte ise inaktif hale gelir. Hücre bölünmesinde metafaz-anafaz geçişinde pozitif regülatördür (Chang, L. vd., 2014). Hücre siklusunda E3 ubiquitin ligaz aktivitesinde önemli bir role sahiptir. SCF ligazlar hücre döngüsü boyunca aktifken, Anapc11 sadece metafaz ve bir sonraki G₁ fazı arasında aktive olur. Aktif olduğu sürede mitozdan çıkışı da düzenler. Böylece hücre döngüsünün stabilizasyonunu sağlar (Bassermann, F. vd., 2014). Bizim çalışmamızda Anapc11 sadece lösin (grup V) grubunda artış göstermiştir (Çizelge 4.1). Glutamin grubunda (grup IV), değişim olmamış (Çizelge 4.1). Grup III (valin) ve çözücü grubu olan Grup II'de ise düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Brc3, hücre bölünmesinde G₂ fazında çekirdek bölünmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Dong, Y. vd., 2003). DNA kırıklarının meydana geldiği bölgelerde hasara yanıt oluşturulmasında rol oynamaktadır (Chen, S. vd., 2010). Brc3 geninin phospho-ERK ve hücre proliferasyonunda etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Boudreau, H.E. vd., 2007). Çalışmamızda sadece Grup V' te (lösin) artış göstermiştir (Çizelge 4.1). Buna göre lösinin proliferasyon üzerinde uyarıcı etkisi diğer amino asitlere göre daha fazladır denilebilir.

Btrc, NF-kB'nin aktivasyonunda ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Yaron, A. vd., 1998). Btrc bazı özel dokularda hücre proliferasyonunda etkilidir. Bazı dokularda ise tam tersi büyümeyi engelleyici bir etki yapmaktadır (Yamasaki, L. ve Pagano, M., 2004). Yapılan bir çalışmada embriyonik dönemde farede beyin, akciğer ve karaciğerde en yüksek seviyede ifade edildiği görülmüştür (Winston, J.T. vd., 1999). Çalışmamızda sadece Grup V' te artış görülmüştür (Çizelge 4.1). Böylece lösinin bu geni uyarıcı bir etkisi olduğu söylenebilir.

Cdc34, hücre döngüsünde G₁ fazında regülasyonu sağlaması ve TNF- α /NF-kB sinyal yollarında görevli olduğu belirtilmiştir. G₁'den S fazına geçişte rol oynamaktadır (King, R.W. vd., 1996). Bu açıdan çalışmamız için önemlidir. SCF (SKP2) E3 ubiquitin ligaz kompleksi ile birlikte çalışarak bazı genlerin ubiquitinlenmesi ve protein degradasyonu ile hücre proliferasyonunu düzenler (Kaiser, P. vd., 2000). Çalışmamızda Cdc34 geni Valin ve Lösin gruplarında artış göstermiştir. Gluamin grubunda ise anlamı bir değişim olmamıştır (Çizelge 4.1).

Cul2 geni Cdc53 ailesindedir. Vhl geni ile kararlı bir kompleks oluşturur. Bu yapı hücre döngüsü sırasında, hücrenin tümöre dönüşümünü engeller (Pause, A. vd., 1997). Çalışmamızda Grup V' te oldukça yüksek bir oranda artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Yamaji ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ddb1 geninin hepatositlerde delesyona uğraması rejenerasyon ve tümör oluşumunu uyarmaktadır. Böylece hepatositlerde DNA replikasyonu önlenir ve telafi için Ddb1 ifade eden hepatositlerin proliferasyonu uyarılır. Bu durumda hepatosellüler karsinoma gelişimine yol açılır (Yamaji, S. vd., 2010). Çalışmamızda çok az bir miktarda Grup V' te artış göstermiştir (Çizelge 4.1).

E3 ubiquitin ligaz ailesinden olan Itch geni p63 ve p73 adlı transkripsiyon faktörlerine bağlanarak bunların degradasyonuna yol açar. Bu şekilde kompleks oluşturarak hücre döngüsü ve hücre ölümünde rol oynar (Allocati, N. vd., 2012). Çalışmamızda sadece Grup V' te çok az bir artış göstermiştir (Çizelge 4.2).

Ubiquitin benzeri molekül ailesinden olan Nedd8 diğer proteinlere bağlanarak hücre döngüsü ilerlemesinde rol alır. Tüm Cul ailesi proteinleri, Nedd8' in hedefindedir. Ubiquitin aracılı protein degradasyonunda önemli bir role sahip olan Skp1/Cul-1/F-box kompleksinin bileşenidir. Buna göre, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve morfogenezde öneme sahip olan protein degradasyon yollarının regülasyonunu sağlar (Tateishi, K. vd., 2001). Sadece Grup V' te ufak bir artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

Sae1, SUMO gibi ubiquitin benzeri proteinlerin aktivasyonunda rol alır (Olsen, S.K. vd., 2010). SUMO, proteinlerde post trasnlasyonel modifikasyonlar yaparak birçok farklı hücre içi olaylarda görev yapmalarını sağlar (Johnson, E.S., 2004). Mitozda görev yaptığı tahmin edilmesine ragmen yapılan literatür taramalarına göre rejenerasyonda rol alıp almadığı bilinmemektedir. Çalışmamızda sadece Valin grubunda çok az bir artış olmuş, diğer grupların hiçbirisinde anlamlı bir artış olmamıştır (Çizelge 4.2).

Rfwd2, hücre hayatta kalımında rol oynar. Mitozun düzenlenmesi açısından önemlidir (Bianchi, E. vd., 2003). Çalışmamızda sadece Grup V' te artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

Rnf34, apoptozun negatif düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir. Kaspazların ubiquitinlenmesini sağlar (Anonim, 2014). Çalışmamızda sadece Grup V' te küçük bir artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

E3 ubiquitin ligaz ailesinden olan Smurf2, hücre senesensinde kritik bir role sahiptir. Farelerde yapılan çalışmaya göre Smurf2 geni yaşlanma ile beraber artış göstermiştir. Hematopoietik kök hücrelerin yenilenmesi ve yaşlanmada rol oynadığı belirtilmiş olup, yokluğunda hücre proliferasyonun arttığı gözlemlenmiştir (Ramkumar, C. vd., 2014). Çalışmamızda Grup III ve Grup V'te çok az miktarda artış gözlemlenmiş. Diğer gruplarda önemli bir değişim gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.3).

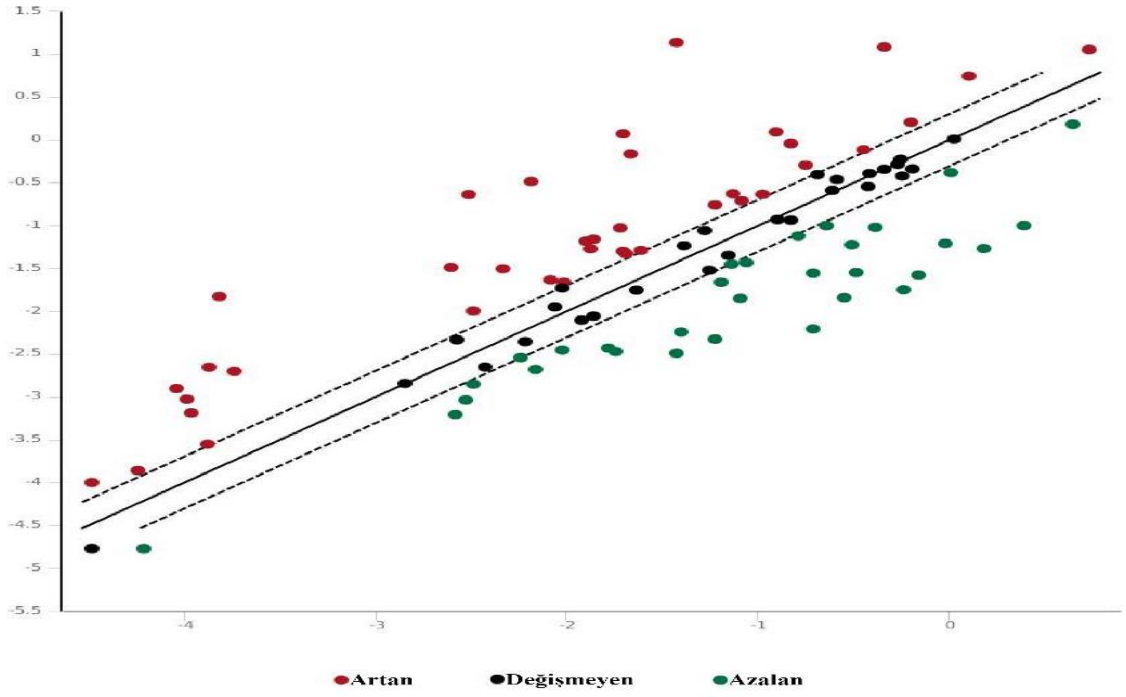
Ube ailesi üyeleri mitotik hücre döğüsünde ve DNA tamirinde rol oynamaktadır (Anonim, 2018b). Plafker ve ark. yaptığı çalışmaya göre Ube2e3 geni retinal pigment hücrelerinin proliferasyonunda rol almaktadır (Plafker, K.S. vd., 2008; Plafker, K.S. vd., 2018). Bu genin yokluğu hücre senesensini uyarır (Plafker, K.S. vd., 2018). Çalışmamızda sadece Grup IV' te anlamlı artış göstermiştir (Çizelge 4.3 - Çizelge 4.4). Yapılan literatür araştırmalarında karaciğer rejenerasyonundaki rolü ile ilgili bir kaynağa rastlanmamıştır.

Çizelge 4.4. Ubiquitin Proteozom Yolağına ait genlerin artış ve azalışları (Kırmızı: artan, Yeşil: azalan) (devam).

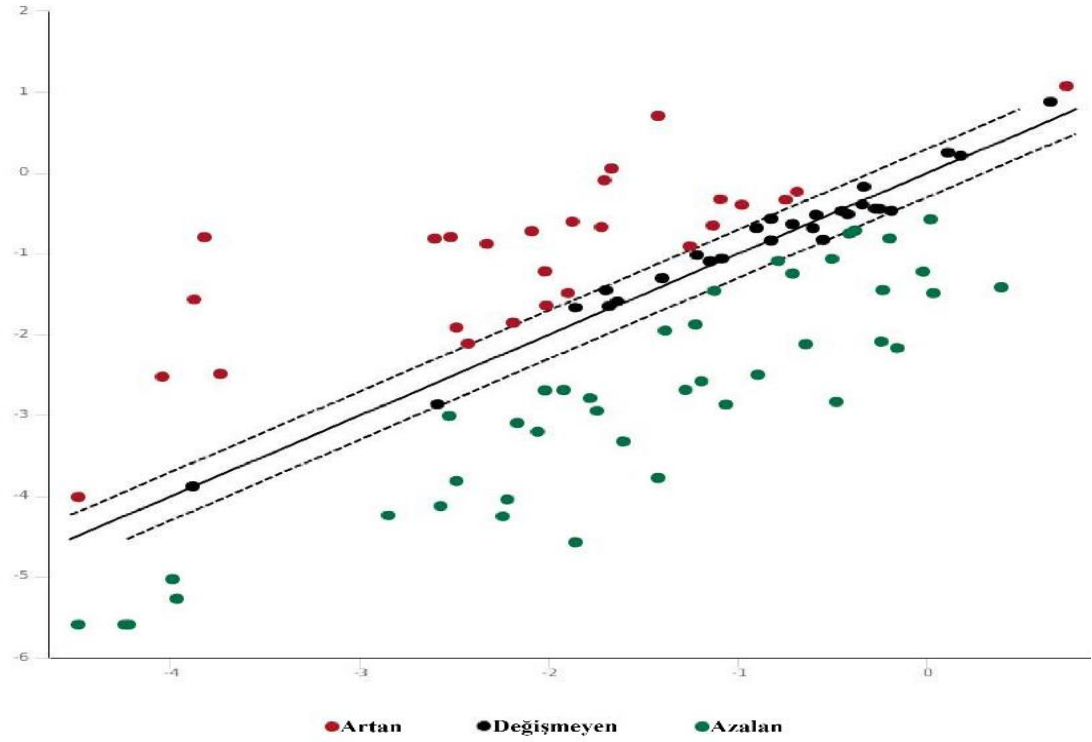
GEN	Kontrol Grubuna Göre Artan (↑) Azalan (↓) Genler			
	Grup II (PBS)	Grup III (Val)	Gup IV (Glu)	Grip V (Leu)
UBE2I	0.06↓	0.06↓	0.39↓	0.00↓
UBE2J1	0.99	0.88	0.62	2.28↑
UBE2J2	0.04↓	0.02↓	0.39↓	5.93↑
UBE2K	0.78	0.98	0.46↓	2.29↑
UBE2L3	0.09↓	0.00↓	0.05↓	0.00↓
UBE2L6	0.14↓	1.26	0.34↓	0.20↓
UBE2M	2.83↑	23.17↑	12.91↑	348.36↑
UBE2N	0.63	1.12	1.03	0.57
UBE2Q1	2.15↑	0.94	0.60	5.66↑
UBE2Q2	50.06↑	2.14↑	34.22↑	152.69↑
UBE2Q2L	0.43↓	0.05↓	0.07↓	1.05
UBE2S	2.52↑	0.24↓	0.63	0.12↓
UBE2T	1.28	0.07↓	0.48↓	0.86
UBE2V1	6.04↑	1.80	0.87	5.67↑
UBE2V2	0.23↓	0.47↓	0.25↓	3.63↑
UBE2Z	2.19↑	3.80↑	0.01↓	1.36
UBE4A	4.94↑	11.22↑	5.54↑	18.78↑
UCHL1	2.12↑	0.99	1.16	7.52↑
UCHL3	0.28↓	0.04↓	0.02↓	0.22↓
UCHL5	5.96↑	0.05↓	0.08↓	0.13↓
VHL	4.02↑	18.69↑	6.77↑	26.99↑
WWP1	9.16↑	0.09↓	0.94	5.94↑

Uchl1, Hücre döngüsünün düzenlenmesi, MAPK aktivitesinin negatif regülasyonu, hücre proliferasyonu ve kas gelişiminde rol oynar (Anonim, 2012). Çalışmamızda sadece Grup V' te artış gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4).

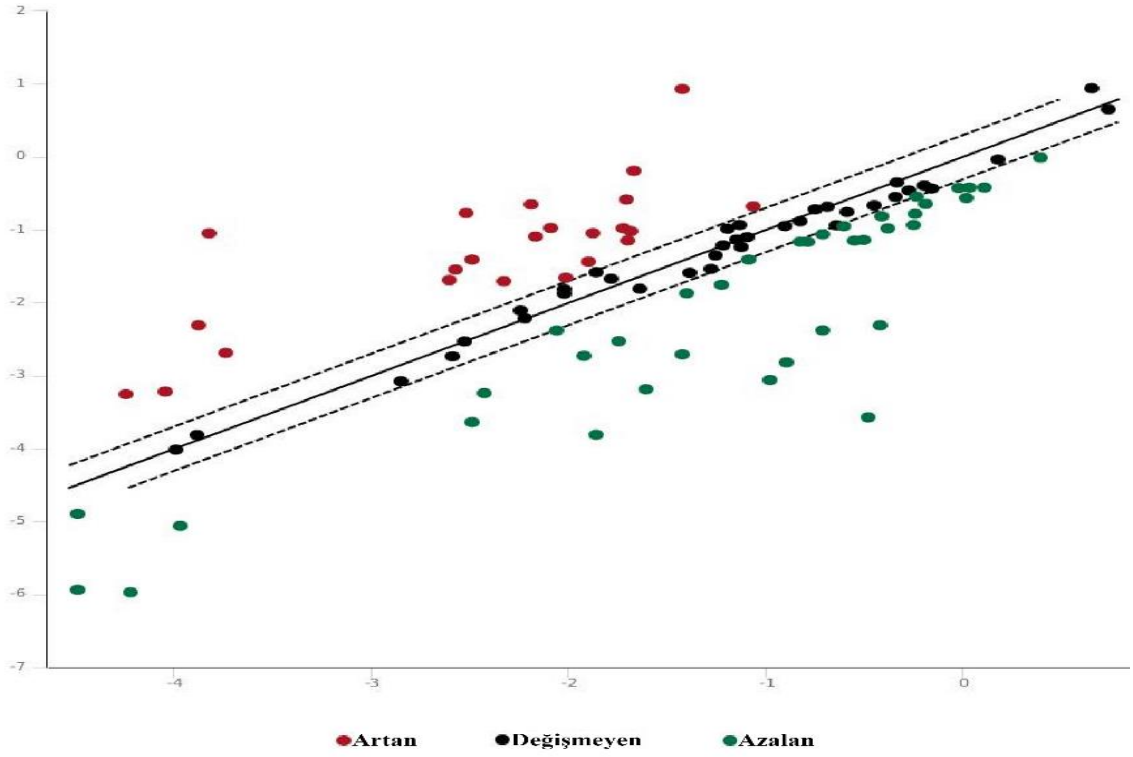
Gruplar arası değerlendirme yapıldığında en fazla Grup V gen ifadelerinde artış görülmüştür. Buna göre lösin amino asidinin rejenerasyon ve ameliyat sonrası iyileşme açısından diğer amino asitlere göre daha etkili olduğu söylenebilir. Gruplara ait gen ifadelerinin artış ve azalışları, Şekil 4.1 - Şekil 4.4' te gösterilmiştir.



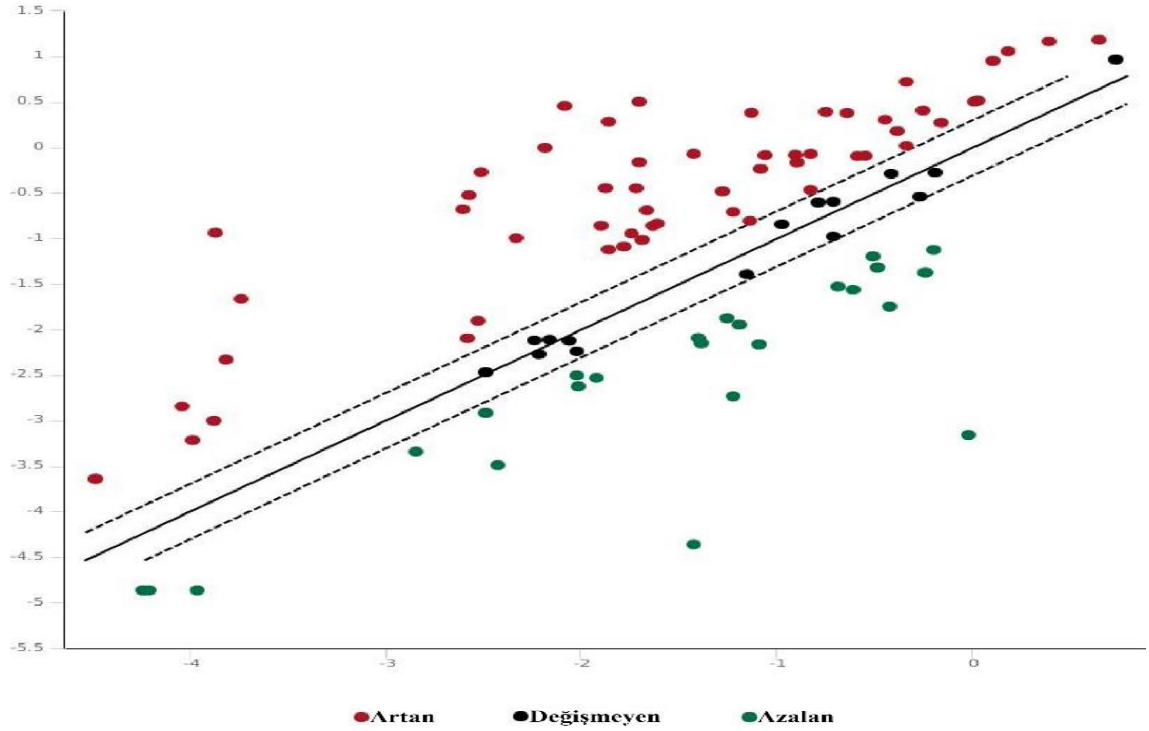
Şekil 4.1. Kontrol grubuna göre Grup II'de görülen gen ifadeleri.



Şekil 4.2. Kontrol grubuna göre Grup III'de görülen gen ifadeleri.



Şekil 4.3. Konrol grubuna göre Grup IV'de görülen gen ifadeleri.



Şekil 4.4. Konrol grubuna göre Grup V'de görülen gen ifadeleri.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda parsiyel hepatektomi sonrası uyarılan karaciğer rejenerasyonuna Valin, Glutamin ve Lösin aminoasitlerinin etkisi Ubiquitin Proteozom Yolağı üzerinden araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre uygulanan dozlar PH sonrası rejenerasyonu pozitif yönde etkilemiştir. Üç aminoasit arasından bu etkiyi en fazla gösteren Lösin olmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda %70 PH'den sonra ip olarak tek doz uygulanmış olan amino asitlerin sıçan karaciğerinde Ubiquitin Proteozom Yolağını tetikleyerek fonksiyonel yetmezliği ortadan kaldırdığı düşüncesine varılmıştır. Bu düşüncemiz Ubiquitin Proteozom Yolağına ait 88 genin PCR array analizi ile desteklenmiştir. Valin, Glutamin ve Lösin Ubiquitin yolağı üzerindeki olumlu etkisini yolaktaki belirli gen ifadeleri üzerinden göstermiştir. Bu amino asitlerin rejeneratif etkisinin, tamamlayıcı tıp uygulamaları açısından önemli olabileceğini, çalışmamıza ek olarak aynı deneysel modelde, bu yolak üzerinden farklı zaman ve dozlardaki etkilerinin de araştırılmasının katkı sağlayabileceği görüşündeyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Misih, S. R. ve Bloomston, M., 2010, Liver Anatomy, Surgical Clinics, 90(4), 643-653.
- Aktaş, H., Kılıçturgay, A. S., Öztürk, E., Işık, Ö., Şehitoğlu, İ., 2010, Parsiyel Hepatektomi Uygulanmış Sıçanlarda Enteral Glutaminin Karaciğer Rejenerasyonu, Karaciğer Fonksiyonları ve Bakteriyel Translokasyona Etkisi, Ulusal Cerrahi Dergisi, 26(3), 129-135.
- Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A., Ben-Neriah, Y., 1995, Stimulation-Dependent I Kappa B Alpha Phosphorylation Marks the NF-Kappa B Inhibitor for Degradation via the Ubiquitin-Proteasome Pathway, Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(23), 10599-10603.
- Allocati, N., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2012, P63/p73 in the Control of Cell Cycle and Cell Death, Experimental Cell Research, 318 (11), 1285-1290.
- Ankoma-Sey, V., 1999, Hepatic Regeneration-Revisiting the Myth of Prometheus, News Physiol Sci., Aug;14: 149-155. doi:10.1016/S0168-8278(00)80412-2
- Anonim, 2012, <https://www.Genecards.Org/cgi-bin/carddisp.Pl?Gene=uchl1>.
- Anonim, 2014, <https://www.Genecards.Org/cgi-bin/carddisp.Pl?Gene=rnf34&keywords=rnf34>.
- Anonim, 2018a, <http://www.Bostonbiochem.Com/about/ubiquitin-proteasome-pathway-upp>.
- Anonim, 2018b, <https://ghr.Nlm.Nih.Gov/gene/ube3a>.
- Bachofner, M., Speicher, T., Bogorad, R.L., Muzumdar, S., Derrer, C. P., vd., 2017, Large-Scale Quantitative Proteomics Identifies the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 as an Essential Regulator of Liver Regeneration, Developmental Cell, 42(6), 616-625.
- Bassermann, F., Eichner, F., Pagano, M., 2014, The Ubiquitin-Proteasome System — Implications for Cell Cycle Control and the Targeted Treatment of Cancer, Biochimica et Biophysica Acta, 1843, 150–162.
- Berber, İ., Gürleyik, E., Gürleyik, G., Gürler, N., Bilgiç, L., 1996, Obstrüktif İkterde Oluşan Bakteriyel Translokasyon Üzerine Glutamin ve Sodyum Deoksikolat'ın Etkileri, Ulusal Cerrahi Dergisi, 12, 409-414.
- Best, J., Dollé, L., Manka, P., Coombes, J., van Grunsven, L.A., Syn, W. K., 2013, Role of Liver Progenitors in Acute Liver Injury, Frontiers in physiology, 4, 258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bianchi, E., Denti, S., Catena, R., Rossetti, G., Polo, S., vd., 2003, Characterization of Human Constitutive Photomorphogenesis Protein 1, a Ring Finger Ubiquitin Ligase that Interacts with Jun Transcription Factors and Modulates their Transcriptional Activity, *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19682-19690.
- Boudreau, H.E., Broustas, C.G., Gokhale, P.C., Kumar, D., Mewani, R.R., vd., 2007, Expression of Brcc3, a Novel Cell Cycle-Regulated Molecule, is Associated with Increased Phospho-Erk and Cell Proliferation, *International Journal Of Molecular Medicine*, 19(1), 29-39.
- Bruns, D.E., Burtis, C.A. 2015, Liver Disease. In *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (pp. 702).
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., 2015, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis*.
- Cha, J.H., Bae, S.H., Kim, H.L., Park, N.R., Choi, E.S., vd., 2013, Branched-Chain Amino Acids Ameliorate Fibrosis and Suppress Tumor Growth in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma with Liver Cirrhosis, *PLoS One*, 8(11), e77899.
- Chandu, D., Nandi, D., 2004, *Modulation of Protein Stability in Cancer Therapy* (Vol. 155).
- Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S.H., Barford, D., 2014, Molecular Architecture and Mechanism of the Anaphase-Promoting Complex, *Nature*, 513(7518), 388.
- Chau, V., Tobias, J.W, Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., vd., 1989, A Multiubiquitin Chain is Confined to specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein, *Science*, 243, 1576-1583.
- Chen, S., He, Y., Ding, J., Jiang, Y., Jia, S., vd., 2010, An Insertion/Deletion Polymorphism in the 3' untranslated Region of β -transducin Repeat-Containing Protein (β trcp) is Associated with Susceptibility for Hepatocellular Carcinoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 552-556.
- Cheng, R., Liang, X., Zhao, Q., Lian, Z., Tang, L., vd., 2017, *Apcdh1 Controls Cell Cycle Entry During Liver Regeneration*, *Experimental Cell Research*, 354(2), 78-84.
- Court, F.G., Wemyss-Holden, S.A., Dennison, A.R., Maddern, G.J., 2002, The Mystery of liver Regeneration, *British Journal of Surgery*, 89(9), 1089-1095.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dong, Y., Hakimi, M.A., Chen, X., Kumaraswamy, E., Cooch, N.S., vd., 2003, Regulation of BRCC, a Holoenzyme Complex Containing BRCA1 and BRCA2, by a Signalosome-Like Subunit and its Role in DNA Repair, *Molecular Cell*, 12(5), 1087-1099.
- Eguchi, S., Kamlot, A., Ljubimova, J., 1996, Fulminant Hepatic Failure in Rats: Survival and Effect on Blood Chemistry and Liver Regeneration, *Hepatology*, 24, 1452-1459.
- Eroschenko, V.P., Di Fiore, M.S. 2013, Digestive System: Liver, Gallbladder, and Pancreas. In *Di Fiore's Atlas Of Histology With Functional Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins. (pp. 319).
- Fausto, N., 2000, Liver Regeneration, *Journal of Hepatology*, 32, 19-31.
- Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., 2006, Liver Regeneration, *Hepatology*, 43(1), 45-53.
- Fouré, A., Bendahan, D., 2017, Is Branched-Chain Amino Acids Supplementation an Efficient Nutritional Strategy to Alleviate Skeletal Muscle Damage? A Systematic Review, *Nutrients*, 9(10), 1047.
- Fujimuro, M., Sawada, H., Yokosawa, H., 1994, Production, and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Multi-Ubiquitin Chains of Polyubiquitinated Proteins, *FEBS Letters*, 349, 173-180.
- Gershbein, L.L., Elias, H., 1954, Observations on the Anatomy of the Rat Liver, *Leon L. Gershbein Hans Elias*, 120(1), 85-98.
- Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., 2006, DNA Repair Systems as Targets of Cadmium Toxicity, *Toxicology and applied pharmacology*, 213(3), 282-290.
- Granit, D., 2015, Karaciğer Anatomi ve Fizyolojisi, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology Special Topics*, 8(1), 1-6.
- Güney, Y., Bilgihan, A., 2002, Ubikitin Sistem, *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 616-619.
- Hagiwara, A., Nishimaya, M., Ishizaki, S., 2012, Branched-Chain Amino Acids Prevent Insulin-Induced Hepatic Tumor Cell Proliferation by Inducing Apoptosis through mTORC1 and mTORC2-Dependent Mechanisms, *J. Cell. Physiol*, 227, 2097–2105.
- Hardy, M., 1985, The Protein Amino Acids. In: G. C. Barrett (herausgeber): *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. In Chapman and Hall (s. 9).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998, The Ubiquitin System, *Annu Rev Biochem*, 67, 425-479.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., Rose, I.A., 1980, Proposed Role of ATP in Protein Breakdown: Conjugation of Protein with Multiple Chains of the Polypeptide of ATP Dependent Proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 1783-1786.
- Higgins, G.M., Anderson, R.M., 1931, Experimental Pathology of Liver. I. Restoration of Liver White Rat following Partial Surgical Removal, *Arch Pathol*, 12, 186-202.
- Hochstrasser, M., 2009, Origin and Function of Ubiquitin-Like Proteins, *Nature*, 458(7237), 422.
- Holecek, M., 2010, Three Targets of branched-Chain Amino Acid Supplementation in the treatment of liver disease, *Nutrition*, 26(5), 482-490.
- Huang, Y., Nie, M., Li, C., Zhao, Y., Li, J., vd., 2017, Rlim Suppresses Hepatocellular Carcinogenesis by Up-Regulating p15 and p21, *Oncotarget*, 8(47), 83075.
- Inuzuka, H., Gao, D., Finley, L.W., Yang, W., Wan, L., vd., 2012, Acetylation-Dependent Regulation of SKP2 Function, *Cell*, 150(1), 179-193.
- Ishikawa, T., 2012, Branched-Chain Amino Acids to Tyrosine Ratio Value as a Potential Prognostic Factor for Hepatocellular Carcinoma, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18(17), 2005.
- Iwasa, M., Kobayashi, Y., Mifuji-Moroka, R., Hara, N., Miyachi, H., vd., 2013, Branched-Chain Amino Acid Supplementation Reduces Oxidative Stress and Prolongs Survival in Rats with Advanced Liver Cirrhosis, *PLoS One*, 8(8), 1-11.
- Jentsch, S., 1992, The Ubiquitin-Conjugation System, *Annu Rev Genet.*, 26, 179-207.
- Jin, Y., Xu, X.L., Yang, M.C.W., Wei, F., Aji, T.C., vd., 1997 R. Cell Cycle-Dependent Colocalization of Bard1 and Brca1 Proteins in Discrete Nuclear Domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 12075-12080.
- Johnson, E.S., 2004, Protein Modification by SUMO, *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 355-382.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., Reed, S.I., 2000, Regulation of Transcription by Ubiquitination Without Proteolysis: Cdc34/Scf^{met30}-Mediated Inactivation of the Transcription Factor Met4, *Cell*, 102, 303-314.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Katmer, T., Erbil, Y., Önder, H., Gürler, N., Yavuzer, D., İnce, Ü., 1994, Total Parenteral Beslenmede Bakteriyel Translokasyon ve Glutamin Kullanımı, *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 10, 193-199.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., Kirschner, M.W., 1996, How Proteolysis Drives the Cell Cycle, *Science*, 274(5293), 1652-1659.
- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H., Makuuchi, M., 1999, A Comparative Study of the Anatomy of Rat and Human Livers., *J Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 6(2), 171-175.
- Kurpad, A.V., Regan, M.M., Raj, T., Gnanou, J.V., 2006, Branched-Chain Amino Acid Requirements in Healthy Adult Human Subjects, *J. Nutr.*, 136(1), 256S–263S.
- Lawson, C.M., Miller, K.R., Smith, V.L., McClave, S.A., 2011, Appropriate Protein and Specific Amino Acid Delivery can Improve Patient Outcome: Fact Or Fantasy?, *Curr Gastroenterol Rep*, 13, 380–387.
- Lefkowitz, J.H.. 2011, *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*, 12th Edition.
- Lesley, S.A., Graziano, J., Cho, C.Y., Knuth, M.W., Klock, H.E., 2002, Gene Expression Response to Misfolded Protein as a Screen for Soluble Recombinant Protein, *Protein Engineering*, 15(2), 153-160.
- Mars, W.M., Liu, M.L., Kitson, R.P., Goldfarb, R.H., Gabauer, M.K., Michalopoulos, G.K., 1995, Immediate early detection of Urokinase Receptor After Partial Hepatectomy and its Implications for Initiation of Liver Regeneration, *Hepatology*, 21, 1695–1701.
- Martins, P.N.A., Neuhaus, P., 2007, *Surgical Anatomy of the Liver, Hepatic Vasculature and Bile Ducts in the Rat*, *Liver International*.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., vd., 2003, Large-Scale Identification and Characterization of Human Genes that Activate NF-kappa-b and MAPK signaling Pathways, *Oncogene*, 22(21), 3307-3318.
- McDonald, H. B., Byers, B., 1997, A Proteasome Cap Subunit Required for Spindle Pole Body Duplication in Yeast., *The Journal of cell biology*, 137(3), 539-553.
- Michalopoulos, G.K., 2007, Liver Regeneration, *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 286-300.
- Michalopoulos, G.K., DeFrances, M., 2005, Liver Regeneration, In *Regenerative Medicine I*, 101-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D., 2006, The Ubiquitin-Proteasome System, *J. Biosci.*, 31(1), 137-155.
- Nuzzo, G., Giuliani, F., Giovannini, I., Tebala, G.D., De Cosmo, G., 1996, Hepatic Resections in Normothermic Ischemia, *Surgery*, 120(5), 852-858.
- Olsen, S.K., Capili, A.D., Lu, X., Tan, D.S., Lima, C.D., 2010, Active Site Remodeling Accompanies Thioester Bond Formation in the SUMO E1, *Nature* 463, 906-912.
- Palmes, D., Spiegel, H.U 2004, Animal Models of Liver Regeneration, *Biomaterials*, 25, 1601-1611.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T., 1994, The Ubiquitin-Proteasome Pathway is Required for Processing the NF- κ B1 Precursor Protein and the Activation of NF- κ b, *Cell*, 78(5), 773-785.
- Park, J.A., Kwon, Y.G., 2018, Hippo-Yap/Taz Signaling in Angiogenesis, *BMB Reports*, 51(3), 157.
- Pause, A., Lee, S., Worrell, R.A., Chen, D.Y., Burgess, W.H., vd., 1997, The von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor Gene Product Forms a Stable Complex with Human Cul-2, a Member of the Cdc53 Family of Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2156-2161.
- Peng, J., Ren, K.D., Yang, J., Luo, X.J., 2016, Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase 1: A Key Enzyme in Regulation of Mitochondrial Dynamics and Functions, *Mitochondrion*, 28, 49-53.
- Pickart, C.M., Eddins, M.J., 2004, Ubiquitin: Structures, Functions, Mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1695(2004), 55-72.
- Plafker, K.S., Farjo, K.M., Wiechmann, A.F., Plafker, S.M., 2008, The Human Ubiquitin-Conjugating Enzyme, Ube2e3, is Required for Proliferation of Retinal Pigment Epithelial Cell, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49 (12), 5611-5618.
- Plafker, K.S., Zyla, K., Berry, W., Plafker, S.M., 2018, Loss of the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Ube2e3 Induces Cellular Senescence, *Redox biology*, 17, 411-422.
- PubChem, 2018, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-valine#section=chemical-gene-co-occurrences-in-literature>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)


- Ramkumar, C., Kong, Y., Trabucco, S.E., Gerstein, R.M., Zhang, H., 2014, Smurf2 Regulates Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Aging, *Aging Cell*, 13, 478–486.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., Wilkinson, K.D., 2009, Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes, *Annual Review of Biochemistry*, 78, 363-397.
- Rudd, P.M., Merry, A.H., Wormald, M.R., Dwek, R.A., 2002, Glycosylation and Prion Protein, *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5), 578-586.
- Spataro, V., Norbury, C., Harris, A.L., 1998, The Ubiquitin-Proteasome Pathway in Cancer, *British Journal Of Cancer*, 77(3), 448-455.
- Strous G.J, J., Gent, 2002, Dimerization, Ubiquitylation and Endocytosis go Together in Growth Hormone Receptor Function, *FEBS Letters*, 529, 102-109.
- Takeshita, S., Ichikawa, T., Nakao, K., Miyaaki, H., Shibata, H., vd., 2009, A Snack Enriched with Oral Branched-Chain Amino Acids Prevents a Fall in Albumin in Patients with Liver Cirrhosis Undergoing Chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma, *Nutrition Research*, 29, 89–93.
- Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K., Chiba, T., 2001, The Nedd8 System is Essential for Cell Cycle Progression and Morphogenetic Pathway in Mice, *The Journal of Cell Biology*, 155(4), 571-580.
- Taub, R., 2004, Liver Regeneration: From Myth to Mechanism, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 836.
- van Nocker S.T., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., vd., 1996, The Multiubiquitin-Chain Binding Protein Mub1 is a Component of the 26s Proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and Plays a Nonessential, Substrate-Specific Role in Protein Turnover, *Mol. Cell. Biol.*, 16, 6020–6028.
- Varshavsky, A., 2005, Ubiquitin Fusion Technique, and Related Methods, *Methods in Enzymology*, 399, 777-799.
- Vatansev, C., Aksoy, F., Kartal, A., Bilici, S., Belviranlı, M., Karaman, Ö., 2001, The Effect of L-Glutamine on Intestinal Adaptation in the Rats After Sialoadenectomy and Small Bowel Resection, *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 17(4), 220-225.
- Waynforth, H.B., Flecknell, P.A., 1994, *Experimental and Surgical Technique in the Rat*, Academic Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Welchman, R.L., Gordon, C., Mayer, R.J., 2005, Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins as Multifunctional Signals, *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(8), 599.
- Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J., Harper, J.W., 1999, The SCF(Beta-Trcp)-Ubiquitin Ligase Complex Associates Specifically with Phosphorylated Destruction Motifs in I-Kappa-B-Alpha and Beta-Catenin and stimulates I-Kappa-B-Alpha Ubiquitination In-Vitro, *Genes Dev.*, 13, 270-283.
- Yamaji, S., Zhang, M., Zhang, J., Endo, Y., Bibikova, E., vd., 2010, Hepatocyte-Specific Deletion of Ddb1 Induces Liver Regeneration and Tumorigenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201015793.
- Yamasaki, L., Pagano, M., 2004, Cell Cycle, Proteolysis, and Cancer, *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 623-628.
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., vd., 1998, Identification of the Receptor Component of the I-Kappa-B-Alpha-Ubiquitin Ligase, *Nature*, 396, 590-594.
- Yerlikaya, A., Hilt, W, ., Wolf, D.H., 1996, Proteasomes: Destruction as a Programme, *Trends Biochem Sci.*, 21, 96-102.
- Zhang, Y.W., Brognard, J., Coughlin, C., You, Z., Dolled-Filhart, M., vd., 2009, The F Box Protein Fbx6 Regulates Chk1 Stability and Cellular Sensitivity to Replication Stress, *Molecular Cell*, 35(4), 442-453.
- Zimmermann, A., 2004, Regulation of Liver Regeneration, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(4), 6-10.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar – A: Etik Kurul Raporu







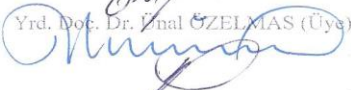




T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 28. 07. 2016
TOPLANTI SAYISI	: 98
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 534
KARAR NUMARASI	: 534
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Mediha CANBEK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Yük. Lis. Öğr. Leman RASULZADE Arş. Gör. Ayşe ÖZMEN YAYACI Arş. Gör. Dr. Emre CEYHAN
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar albino (18 adet erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen / Edebiyat Fakültesi Biyoloji / Moleküler Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Mediha CANBEK'in araştırma yürütücüsü olduğu 534/2016 kayıt numaralı ve "Sıçanlarda parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda bazı amino asitlerin ubiquitin proteozom yoluğı üzerine olan etkisinin mini array analizi ile belirlenmesi" konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiğı şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Keyser BROL (Başkan)

 Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)	 Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)
 Prof. Dr. Emel ULUPINAR (Üye)	 Doç. Dr. Ergül YILDIRIM (Üye)
 Yrd. Doç. Dr. Enal ÖZELMAS (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Burdan KIRIMLIOĞLU (Üye)
 Yrd. Doç. Dr. Vet. Hek. Oya ERALP İNAN (Üye)	 Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)
 Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)	



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen / Edebiyat Fakültesi Biyoloji / Moleküler Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi **Prof. Dr. Mediha CANBEK**'in araştırma yürütücüsü olduğu 534/2016 kayıt numaralı ve "Sıçanlarda parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda bazı amino asitlerin ubiquitin proteozom yolağı üzerine olan etkisinin mini array analizi ile belirlenmesi" konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Deney Hayvanları ve Gruplar: Deneyimizde 200-250 gr ağırlığında erkek *Wistar albino* ırkı sıçanlar kullanılacaktır. Çalışmamızda n=3 olmak üzere rastgele seçimle 6 grup oluşturulacaktır.

Grup I: Düz kontrol grubu olup hiç bir cerrahi işlem ve madde uygulaması yapılmayacaktır. Mini array (mikro dizi) yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 88 genin profilleri incelenecektir.

Grup II: Sham kontrol grubu olup sadece laparotomi yapılacak, madde uygulaması yapılmayacaktır. Mini array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 88 genin profilleri incelenecektir.

Grup III: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, i.p. olarak 1 ml 10 mM PBS uygulaması yapılacaktır. Mini array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 88 genin profilleri incelenecektir.

Grup IV: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, intraperitoneal (i.p.) olarak 1g.kg⁻¹ valin (1 ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) uygulaması yapılacaktır. Mini array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 88 genin profilleri incelenecektir.

Grup V: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, i.p. olarak 1g.kg⁻¹ glutamin (1ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) uygulaması yapılacaktır. Mini array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 88 genin profilleri incelenecektir.

Grup VI: PH grubu olup %70 PH'dan sonra, i.p. olarak 1g.kg⁻¹ lösin (1ml 10 mM PBS içerisinde çözünerek) uygulaması yapılacaktır. Mini array yöntemi ile Ubiquitin Proteozom yolağına ait 88 genin profilleri incelenecektir.

Daha önce alınan 389/2014 numaralı etik raporuna göre 201419D27 projeden elde edilen dokular kullanarak sadece RT-PCR analizi yapılacağından hayvan temini gerekmemektedir.

Hepatektomi İşlemi: Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak tüm cerrahi işlemler 09.00 ile 12.00 saatleri arasında yapılmıştır. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulanacaktır (Lapczynski et al., 2008; Chen ve Viljoen, 2010) Parsiyal hepatektomi yapılacak deney hayvanı, sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip işlem başlatılacaktır. Cerrahi uygulama bölgesi %70'lik