

Epstein Barr Virüs rekombinant proteinleri EBNA1 ve LMP1'in
INS1-E (832/13) beta hücre kültüründe Endoplasmik Reticulum
(ER) stres markırları, apoptoz ve hücre proliferasyonu üzerine
etkisi

Proje Kodu: 1002

Proje No: 113S153

Proje Yürütücüsü

Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

Araştırmacı

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Bursiyer

Merve ŞEN

EKİM 2014
AFYONKARAHİSAR

ÖNSÖZ

Diyabet, günümüzde global bir sağlık sorunudur. Yapılan projeksiyonlara göre 2030 yılında dünya üzerinde bu hastalıktan etkilenmiş yaklaşık 366 milyon kişi olacaktır. Günümüzde ise diyabet çalışmaları hücresel düzeyden organel düzeyine inmiş durumdadır. Yine günümüzde birçok hastalığın Endoplasmik Reticulum(ER) stresi ile indüklenen apoptozisle alakalı olduğu kanısı hâkimdir.

Bu proje önerisinde daha önce antidiyabetik/antihiperglisemik, beta hücreleri üzerine proliferatif etkinliği çalışılmamış olan ve literatür verileri ile proliferatif etkinlikte olduğu kanıtlanan Epstein Barr Virüs(EBV) üzerinde durulmuştur. EBV'nin proliferatif etkinliğini özellikle iki mediator protein - EBNA1 ve LMP1- üzerinden yürüttüğü bilinmektedir. Bu bağlamda projenin ana hedefi, ilgili proteinlerin beta hücre kültürüne uygulanmaları ile; insülin sekresyonu, apoptoz, ER stresi ve beta hücre proliferasyonunun nasıl etkileneceğini belirlemektir. Bu amaçla INS1-E(832/13) pankreatik beta hücre kültüründe thapsigargin ile deneysel ER stres modeli oluşturulmuş, ilgili viral proteinlerin uygulamasından önce, ER stres modeli, ER stres markerı genlerin ekspresyon düzeylerine bakılarak test edilmiştir. Bunu takiben EBNA1 ve LMP1 rekombinant viral proteinlerinin hücre kültürüne uygulanmaları gerçekleştirilmiş olup, uygulamalar sonrası apoptoz belirleme çalışmalarında; antiapoptotik ve proapoptotik genlerin RT-PCR ile gen ekspresyon analizleri yapılmıştır, aynı zamanda TUNEL boyaması ile immünohistokimyasal olarak apoptotik indeks belirlenmiş ve destekleme amaçlı Comet Assay ile DNA hasar skorlaması yapılmıştır. ER stresinin viral protein uygulamalarından nasıl etkilendiği ise ilgili ER stres markerlarının gen ekspresyon düzeylerinin analizi ile yorumlanmıştır.

Projede kurulan hipotezlerin doğrultusunda bu proje, *viroterapi* ajan olarak EBV'ün diyabet tedavisinde kullanılabilirliğine yol gösterici olma potansiyeline sahip olup ileri muhtemel çalışmalara da bir zemin oluşturacak ilk araştırma özelliğindedir.

Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 113S153).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER	3
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ	5
ÖZET	7
ABSTRACT	8
1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	9
1.1.Diabetes Mellitus	9
1.2.Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)	9
1.3.Diyabet Patogenezinde Beta Hücre Apoptozisinin Rolü	11
1.4.Endoplasmik Reticulum (ER) Stresi	13
1.5.ER Stresine Cevap Yolları	13
1.6.Endoplasmik Retikulum (ER) Şaperon Proteinleri	18
1.7.Tip 2 diyabet ve ER stres-aracılı β -hücre apoptozisi	20
1.8. Epstein Barr Virus	21
1.8.1. Epstein-Barr Virüs, Proliferasyon ve Onkogenez	22
1.8.2. Hodgkin hastalığı	23
1.9.Proliferatif Ajan Olarak Epstein-Barr Nuclear Antigen1(EBNA1)Prot	23
1.10. Proliferatif Ajan Olarak Latent Membrane Protein 1 (LMP1)	24
1.10.1. LMP1'in proliferatif etkinlikte olduğunu gösteren literatür verileri.	25
1.10.2. LMP1 İlişkili Biyokimyasal Yolaklar	25
1.11. İleri Sürülen Hipotezler	26
2.GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1.Hücre kültürü	29
2.2.Hücre pasajı	29
2.3.Hücre kültüründe ER stres modelinin oluşturulması	29
2.4. LMP1 ve EBNA1 Rekombinant Proteinlerinin H. Kül. Uyg.	30
2.5.İnsülin sekresyon ölçümü	30
2.6.Protein ölçümleri	30
2.7.RNA izolasyonu ve Real Time QRT-PCR ile mRNA ekspresyon analizleri	31
2.8.Apoptozis Belirleme Çalışmaları	33
2.8.1. TUNEL ASSAY	33
2.8.2.Comet Assay Analizi	34

2.8.3.MTT Hücre Viabilite ölçüm testi	35
2.9.İstatiksel Analizler	36
3.BULGULAR	37
3.1.İnsülin Değerleri	37
3.2.Real Time QRT-PCR mRNA Ekspresyon Düzeyleri	38
3.2.1.Beta hücre proliferasyonundan sorumlu genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri	38
3.2.2.ER stresi belirteçleri olan genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri	43
3.2.3.Apoptozla ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri	46
3.4. TUNEL ASSAY	53
3.3.COMET Analiz Sonuçları	53
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	55
5.REFERANSLAR	59

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Beta hücre apoptozunda potansiyel uyarıcılar.	11
Tablo 2. Oligonükleotid primer dizileri ve PCR programları.	32
Tablo 3. Hücre içi (lizat) ve sekrete (medyum) insülin konsantrasyonları.	37
Tablo 4. Beta hücre proliferasyonu, apoptozu ve ER stresi ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.	40
Tablo 5. Comet skorları.	54
Şekil 1. Beta hücre kütlesi kontrol mekanizması.	9
Şekil 2. ER stres cevapları.	16
Şekil 3. ER stres sinyal yolları.	18
Şekil 4. Glikoprotein katlanması ve katlanmayan glikoproteinlerin degradasyonu.	19
Şekil 5. Comet Assay'de görsel skorlama.	35
Şekil 6. Hücre içi/dışı insülin konsantrasyonları	38
Şekil 7. FoxO1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	41
Şekil 8. PDX 1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	41
Şekil 9. B-katenin mRNA ekspresyon düzeyleri.	42
Şekil 10. Wnt-4 mRNA ekspresyon düzeyleri.	42
Şekil 11. TCF7L2 mRNA ekspresyon düzeyleri.	43
Şekil 12. GRP78 mRNA ekspresyon düzeyleri.	43
Şekil 13. CHOP mRNA ekspresyon düzeyleri.	44
Şekil 14. ATF-4 mRNA ekspresyon düzeyleri.	44
Şekil 15. ATF-6 mRNA ekspresyon düzeyleri.	45
Şekil 16. PERK geni mRNA ekspresyon düzeyleri.	45
Şekil 17. p53 mRNA ekspresyon düzeyleri.	47
Şekil 18. NF κ B mRNA ekspresyon düzeyleri.	47
Şekil 19. TNF α mRNA ekspresyon düzeyleri.	48
Şekil 20. IFN- γ mRNA ekspresyon düzeyleri.	48
Şekil 21. Kaspaz-3 (CAS-3) mRNA ekspresyon düzeyleri.	49
Şekil 22. Kaspaz-8 (CAS-8) mRNA ekspresyon düzeyleri.	49
Şekil 23. Kaspaz-12 (CAS-12) mRNA ekspresyon düzeyleri.	50
Şekil 24. JNK mRNA ekspresyon düzeyleri.	50
Şekil 25. Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyleri.	51
Şekil 26. Bcl-xL mRNA ekspresyon düzeyleri.	51

Şekil 27. IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri.	52
Şekil 28. p35 mRNA ekspresyon düzeyleri.	52
Şekil 29. Bax mRNA ekspresyon düzeyleri.	53
Şekil 30. Comet skorları.	55

ÖZET

Diyabet prevalansı ve insidansı günümüz dünyasında her geçen gün artmakta olan bir sağlık sorunudur. Diyabetin humoral ve dokusal bulguları zengin olmasına rağmen komplikasyonlarının oldukça fazla olması diyabet tanı ve tedavisini önemli kılmaktadır.

Bugün içerisinde diyabetinde sayıldığı bir çok hastalığın Endoplasmik Reticulum (ER) stresi ile indüklenen apoptozisle alakalı olduğu kanısı hakimdir. Nitekim yapılan çalışmalarda pankreatik beta hücrelerinde ER organelinin protein alım ve katlama kapasitesi arasındaki dengesizlikten doğan ER stresi ile indüklenen apoptozisin diyabete neden olduğu vurgulanmaktadır.

Epstein-Barr Virüs(EBV); Lenfokriptovirüs bir virus olup, bu tür viruslerin genel olarak B lenfositlerde latent enfeksiyon yaptıkları dönemlerde hücre proliferasyonuna ve transformasyon sürecine katkıda buldukları bilinmektedir. EBV'nin proliferatif etkinliği iki mediatör protein aracılığıyla(Epstein Bar Nuclear Antigen1-EBNA1 ve Latent Membrane Protein1-LMP1) gerçekleşmektedir. Tip 2 diyabet hastalarında uzun süren anti diyabetik tedaviler esnasında, pankreatik hücre kayıpları ve pankreatik kütlenin azalması sonucu eksojen insülin kullanımına geçilmektedir. Bu çalışmada pankreatik hücre kayıplarının rekombinant viral EBV protenleri uygulanarak tersine çevirmenin araştırılması amaçlanmıştır. Yanı sıra ilgili proteinlerin DNA hasarı, ER Stresi üzerine etkileri ve insülin sentez-salınımına nasıl katkıda bulunabilecekleri de araştırılmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda ticari olarak elde edilen rekombinant EBNA1 ve LMP1 proteinlerinin Lethal Doz 50 çalışması sonrası her iki proteinin 0,1 ppm ve 0,5 ppm'lik dozlarının çalışma için kullanılmasına karar verilmiştir. Bu proteinlerin belirtilen dozları uygulandıktan sonra proliferasyonun bu durumdan ne derece etkilendiğinin tespit edilebilmesi için proliferasyondan sorumlu oldukları bilinen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Diğer taraftan DNA hasarı için Comet Assay ve ER stres için ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri de test edilmiştir.

RT-PCR çalışmaları neticesinde ER stres markerları olan AFT4, ATF6, PERK, GRP78 ve CHOP genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde thapsigargin grubunda DMSO Kontrol grubuna göre sırasıyla; 10,62 kat, 19 kat, 15,03 kat, 6,63 kat ve 8,05 kat artışlar saptanmıştır. ER stres markerı olan genlerdeki bu yükselişin çalışmada kullanılan ilgili proteinler vasıtasıyla baskılandığı da belirlenmiştir.

Çalışmada sonuç olarak; EBV rekombinant proteinleri LMP1 ve EBNA1'in proliferasyondan sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerini artırdığı aynı zamanda ER stres markerı genlerin ekspresyon düzeylerini baskılayarak da ER stresinin neden olduğu beta hücre kayıplarının tersine döndürülmesinde avantaj sağlayabileceği ve bu bakımdan daha üst düzey çalışmalar ile desteklendiği takdirde antidiyabetik tedavilerde viroterapik ajanlar olarak kullanılabilmesinin yolunun açılması potansiyeli bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: LMP1, EBNA1, ER stresi, INS-1E (832/13) beta hücresi, İnsülin

ABSTRACT

The effects of Epstein Barr Virus recombinant proteins EBNA 1 and LMP 1 on the Endoplasmic Reticulum (ER) stress markers, apoptosis and cell proliferation in INS1-E beta cell (832/13) culture

The prevalence and incidence of diabetes is a health problem that increases almost every day today's world. Although humoral and histologic findings of diabetes complications are diverse; the high numbers of complications cause the diagnosis and treatment of diabetes to be extremely important.

Today, it is believed that a large number of diseases, including diabetes, are related to the Endoplasmic Reticulum (ER) stress-induced apoptosis. Indeed, it is emphasized that studies in pancreatic beta cells and folding capacity of the ER organelle protein intake resulting from the imbalance between the apoptosis induced by ER stress caused by diabetes.

Epstein-Barr Virus(EBV); Lenfocriptovirüs is a virus, such viruses in general the latent infection in B lymphocytes during periods of cell proliferation and are known to contribute to the transformation process. Proliferative activity of EBV proteins occurs via two mediators (Epstein Barr Nuclear Antigen1-EBNA1 and latent membrane Protein1-LMP1). Type 2 diabetic patients treated for a long time during the anti-diabetic pancreatic cell loss and resulting decrease in pancreatic mass lead to the use of exogenous insulin. In this study, it is aimed to investigate that recombinant viral EBV protein of pancreatic cell loss those applying to reverse. In addition to that related proteins as well as DNA damage and stress effects on insulin synthesis and release and their contributions were also investigated.

For that purpose, commercially obtained recombinant proteins LMP1 Lethal Dose 50 EBNA1 and after operation 0.1 ppm and 0.5 ppm doses of either protein, were decided to be studied. Upon application of these proteins indicated dose proliferation is affected by this order to determine to what extent they are known to be responsible for the proliferation of mRNA expression levels of genes was investigated. Comet assay for DNA damage and on the other hand to ER stress, levels of mRNA expression of the gene of interest were tested.

As a result of RT-PCR applications, mRNA expression levels of genes of AFT4, ATF6, PERK, GRP78 and CHOP, which are ER stress markers, orderly increased 10-fold, 19-fold, 15,03-fold, 6,63-fold, and 8,05-fold according to DMSO control group in thapsigargin group. It is observed this increase on the expression of the genes which are ER stress marker is repressed by interest proteins.

As a result; the conclusion was that EBV recombinant proteins LMP1 and EBNA1 proliferation genes which are responsible for expression levels increased but also ER stress marker gene expression level by suppressing the ER stress-induced beta cell loss in reversing would be advantageous and therefore higher levels work and if supported antidiabetic treatments virotherapy as agents the ability to use the potential opening of the way.

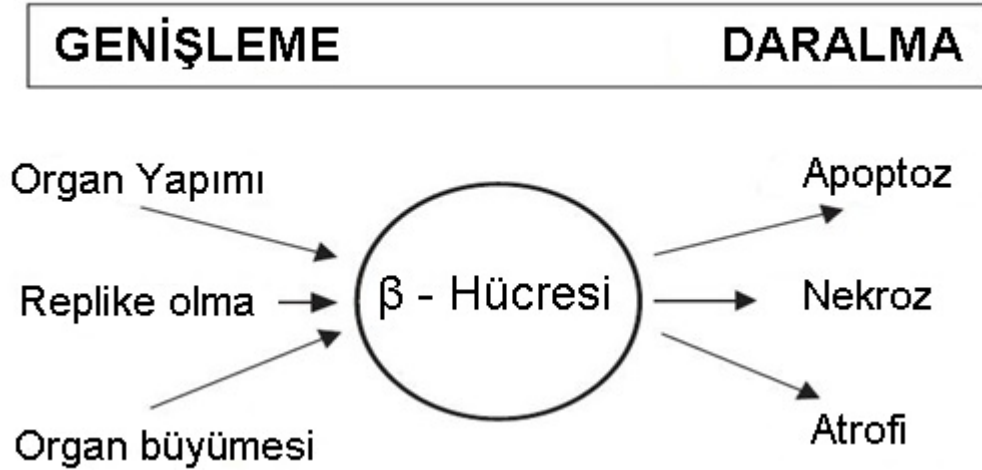
Keywords: LMP1, EBNA1, ER stress, INS-1E (832/13) beta cell, Insulin

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus; insülin üretim veya aktivitesindeki yetersizlikten doğan kan glukoz seviyesinin yüksek olmasıyla karakterize, metabolik bir hastalıktır. Diyabetin tip1 ve tip2 olmak üzere iki ana formu bulunmaktadır. Her iki tipte progresif pankreatik beta hücre kayıplarıyla karakterizedir (GURZOV ve ark. 2008).

Organizmada bulunan dokularda proliferasyon ve neogenez ile apoptosis genelde denge halindedir (Şekil 1). Bu dengenin apoptosis yönünde bozulması veya nekroza kayması, diyabet hastalarındaki beta hücre kayıplarında olduğu gibi doku hasarlarına neden olabilmektedir. Özellikle Tip2 Diabetes Mellitus (T2DM) hastalarındaki beta hücre kayıplarının temel nedeninin apoptosis olduğuna inanılmaktadır. Bunun en güzel göstergesinin T2DM hastalarındaki beta hücrelerinde, apoptotik mediatörler olan kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivitelerinin yükselmesi olduğu ifade edilmektedir. Fakat T2DM'la karakterize insülin sekresyonundaki değişikliklerde, beta hücre kayıplarının tahmin edilen sonuçları yeterince açıklanamamaktadır (GIRARD, 2008; LUPI ve DEL PRATO, 2008).



Şekil 1. Beta hücre kütlesi kontrol mekanizması (LUPI ve DEL PRATO, 2008)

1.2. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)

Programlı hücre ölümü (apoptoz) hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi

olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (HAMPTON ve ORRENIUS, 1998). Apoptoz mekanizmasında üç temel grup molekül rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar).

Ölüm reseptörleri; TNF (*Tumour Necrosis Factor*) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (*Death Domain*) adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar (BÜYÜKGEBİZ ve CAFERLER, 2001). Bilinen altı tane ölüm reseptörü, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF*Related Apoptosis-Inducing Ligand*)-R1, TRAILR2, TNF-R1, DR3 ve DR6 dır (EICHHORST ve KRAMMER, 2001). Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (*caspaseactivated DNase; CAD*) aracılığı ile DNA yıkımına neden olunur (BÜYÜKGEBİZ ve CAFERLER, 2001).

Apoptoz birçok fizyolojik ve patolojik olayda etkin rol oynamaktadır. Fizyolojik olayların başında hücre yapım-yıkımı gelir. Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılarak yeni hücrelere yer açılır. Patolojik olarak sayabileceğimiz olaylarda ise; tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında rol oynar. Yine hormona bağımlı olarak dokularda patolojik atrofi sırasında; örneğin kastrasyondan sonra prostat atrofisi ya da glukokortikoid kullanımından sonra timusta lenfosit kaybı apoptoz yoluyla olur. Pankreas, tükrük bezi, böbrek tubulusları gibi parankimatöz organlarda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofide gözlenir. Yine kanserde apoptoz mekanizmasının yeri ve önemi büyüktür ve kanser tedavi planlarında bir numaralı araştırma alanını apoptotik süreç mekanizması oluşturmaktadır. Bu nedenle apoptoz mekanizması tam olarak anlaşıldığında bu sayılan hastalıkların tedavisi de mümkün olabilecektir (FADEEL ve ark., 1999; RENEHAN ve ark., 2001).

Apoptozun önemi; çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır (TOMATIR, 2003). Son yıllardaki çalışmalar β hücrelerinde Endoplazmik Retikulum (ER)'un apoptotik ölüm sinyallerinin iletilmesinde önemli bir organel olduğunu göstermiştir.

1.3. Diyabet Patogenezinde Beta Hücre Apoptozisinin Rolü

Pankreatik beta hücreleri insulin sekresyonu ile ilişkili glukoz homeostazisinde çok önemli bir role sahiptirler. Beta hücrelerinin hem sayısal hem de hacimsel olarak değişimleri dinamik olarak değişik fizyolojik ve patolojik koşulların etkisi altındadır (BONNER, 2000). Fizyolojik şartlarda yaşam boyunca düşük düzeyde beta hücre ölümleri ile proliferasyonu arasında bir denge mevcuttur. Ancak, beta hücrelerinin aşırı kaybının diyabete ve hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin ortak özelliği olan beta hücre disfonksiyonuna neden olduğu kabul edilir (MATHIS, 2001; EIZIRIK ve POULSEN, 2001). Tip 1 diyabette, beta hücreleri otoimmün ve yangısal proseslerle seçici olarak yok edilirler ve bu durum insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile sonuçlanır. Tip 2 diyabette hastalığın ilerlemesinde esas etkili olan faktör, sıklıkla şişmanlık ve fiziksel aktivite azlığı ile ilişkili olan insülin direncidir. Fakat bu durum, sadece beta hücrelerinin artan insülin ihtiyacını karşılayamamaları sonucu oluşur. Her iki durumda da, beta hücre ölümlerinin esas yolu apoptozis olarak telakki edilir. Beta hücrelerinde gelişen apoptozis, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, membran geçiş özelliği olan değişik maddeler, büyüme faktörlerinin yetersizliği, metabolik ve sinyal yollarındaki aksaklıklar gibi değişik uyaranlara bağlı olarak ortaya çıkar (Tablo 1). Ölüm reseptörlerinin bağlanması ve DNA hasarı apoptozisin başlatıcıları olarak kabul edilirler ve mitokondrial membran permabilitesini ve kaspazların aktivasyonunu indüklerler. Son çalışmalar, endoplazmik retikulumun (ER) stres aracılı apoptozise duyarlı bir organel olduğunu ve apoptotik sinyalleri iletebildiğini göstermektedir.

Tablo 1. Beta hücre apoptozunda potansiyel uyarıcılar.

Ölüm reseptörleri

- Fas ligand/Fas reseptör (MATHIS ve ark., 2001)
- Perforin (MATHIS ve ark., 2001)
- Sitokinler (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) (MATHIS ve ark., 2001; EIZIRIK ve POULSEN, 2001)

Membranı geçebilen aracı moleküller

- Reaktif oksijen türleri (hidrojen peroksit, hidroksil radikali) (KANETO ve ark., 1999)
- Reaktif azot türleri (nitrik oksit, peroksinitrit) (OYADOMARI ve ark., 2001)
- İkilleştirici ajanlar (streptozotosin, MMS) (SAINI ve ark., 1996; DELANEY ve ark., 1995)
- Seramid (UNGER, 2002)

Yetersiz büyüme faktörleri

- IGF-1 (WITHERS ve ark., 1999; WITHERS ve ark., 1998)
 - EGF (MIETTINEN ve ark., 2000)
 - FGF (HART ve ark., 2000)
-

Metabolik ve sinyal yollarında yetersizlik

- Artış
 - Glukoz (BIARNÉS ve ark., 2002; LIU ve ark., 2000)
 - Serbest yağ asitleri (UNGER, 2002)
 - Amilin (ZHANG ve ark., 1999)
 - Kalsiyum (OYADOMARI ve ark., 2001; ZHOU ve ark., 1998)
 - Azalış
 - Hücre döngüsü düzenleyicisi (siklin bağımlı kinaz 4) (RANE ve ark., 1999)
 - Transkripsiyon faktörü (BETA/NeuroD, HNF-1 α) (WOBSER ve ark., 2002; NAYA ve ark., 1997)
 - Mitokondri fonksiyonu (mitokondriyal transkripsiyon faktörü A) (SILVA ve ark., 2000)
 - ER stres değiştirici (PERK) (HARDING ve ark., 2000)
-

Diyabet hastaları için risk faktörü olarak ifade edilen ve insan genomundaki yeri araştırılan transkripsiyon faktörü TCF7L2 (transcription faktor 7-like 2) 2006 yılında keşfedilmiştir. Bu transkripsiyon faktörünün proliferasyon, hücre korunması ve insülin sekresyonunu içeren β hücre fonksiyonlarını düzenleyen ve endokrin pankreasın etkilerini geliştiren Wnt sinyal ağının en önemli üyesi olabileceği ifade edilmektedir. TCF7L2, "canonncal pathway" şeklinde bilinen Wnt/ β -katenin yolunu kullanarak, cyclin D ve c-myc genleri gibi Wnt sinyallerine cevap verecek genleri uyararak hücre poliferasyonunu artırmakta, insülin sekresyonunun kontrolünü sağlamaktadır (WELTERS ve KULKARNI, 2008; CAUCHI ve EROGUEL, 2008).

TCF7L2'nin iskelet kasları dışında beta hücreleri de dahil olmak üzere birçok dokuda üretilmekte olduğu ve obez diyabet hastalarında sekresyonunun azaldığı ifade edilmektedir. Yine aynı çalışmada beta hücrelerinde aktif TCF7L2 düzeylerinin değişiminin diyabetin ilerlemesine ve defektif insülin sekresyonuna neden olabileceğine değinilmektedir (SHU ve ark., 2008).

TCF7L2 faktörü, glukoz homeostasisine pro-glukagonun gen ekspresyonu üzerinden, ince barsağın L hücrelerinde ilgili genleri kodlayarak ve GLP-1 sentezini sağlayarak etki etmektedir (SHU ve ark., 2008).

TCF7L2, beta hücrelerini glukozun ve stokinlerin neden olduğu toksisiteye karşı korumakta, bununla birlikte kaspaz 3 aktivitesini dışürerek apoptosis derecesini azaltmaktadır. Bu etkilerinin bir kısmını, GLP-1 aracılığıyla aktifleşen PKA'nın β -katenini

uyarmasına bağılı olarak transkripsiyon faktörü FoxO1 aracılığı ile gerçekleştirdiği ve böylelikle beta hücrelerini koruyarak poliferasyonu sağladığı bildirilmektedir (WELTERS ve KULKARNİ, 2008).

1.4. Endoplasmik Reticulum (ER) Stresi

ER ökaryotik hücrelerde salgı proteinlerinin sentez ve salgılanma yolağında ana organeldir. β hücrelerinde ER'da insülin başta olmak üzere, plazma membran proteinleri ve lizozomal proteinlerin sentezleri, glikozilasyonları ve üç boyutlu yapıyı kazanmaları için "katlanmaları" gerekir. ER'daki katlanmalardan sorumlu proteinler, **foldazlar** (katlanmayı katalizleyen enzimler ve moleküller) ve **saperonlar** (agregasyonu önleyerek protein katlanmasına yardımcı olan proteinler) olmak üzere iki sınıfta toplanırlar. Bazı koşullarda bu işlem mekanizması bozulabilir. Örneğin oksijen, glukoz, pH, ATP ve kalsiyum iyon konsantrasyonlarındaki değişiklikler yanlış katlanmış veya hiç katlanamamış proteinlerin üretilmesine neden olur. Bu proteinler de hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını bozar; bu işlem "proteotoksosite" ya da "ER stresi" olarak adlandırılır. ER stresi çeşitli koşullarda protein glikolizasyonunun bozulması, disülfid bağların oluşumunda azalma, ER lümeninde Ca^{+2} azalması, ER'dan Golgi'ye protein transportunun bozulması gibi nedenlerle ortaya çıkar. Hücreler, ER stresine karşı hücrel bir korunma mekanizmasına sahiptir ve dört farklı cevap yolağı ile hücre ER stresinden korunmaya (ER stresine cevap) çalışır (OZTURK, 2008).

1.5. ER Stresine Cevap Yolları

1) ER Stresinde Şaperon proteinlerin transkripsiyonel düzeyde uyarılması

ER'da protein katlanmaları, Bip/GRP78 ve GRP94 gibi ER şaperon proteinleri ve protein disülfid izomeraz (PDI) ile peptidil-prolil izomeraz gibi enzimler tarafından kolaylaştırılır. Bu proteinler ER stresi ile uyarılırlar ve bu uyarılma transkripsiyonel düzeyde kontrol edilir. ER stresi koşullarında, hücreler ER'dan çekirdeğe doğru, katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen hücre içi sinyal yolunu aktive ederler. UPR'nin hedef genleri promotör bölgelerinde ortak bir bölgeyi paylaşırlar ki bu bölge ER stres cevap elementi (ERSE) veya katlanmamış protein cevap elementi (UPRE) olarak bilinir. Son zamanlarda, ATF6 (YOSHIDA ve ark., 1999) ve XBP-1'in (YOSHIDA ve ark., 2001) memeli hücre UPR'si için transkripsiyon faktörleri oldukları rapor edilmektedir. ATF6, ER'da lokalize olmuş tip II transmembran protein (p90ATF6) olarak sentez edilir ve ER stres aracılı proteolizis ile aktive olur (YOSHIDA ve ark., 2000). ER stresi, ATF6'nın ER'dan golgiye taşınmasını uyarır (CHEN ve ark., 2002) ki; golgide ATF6 iki aşamalı bir işleme maruz kalır. İlk önce ATF-6'nın ER-lümeni kısmı bölge-1 proteazla (S1P) ve sonra da transmembran kısmı bölge-2 proteazla etkileşime girer. Bağlanan N-terminal

sitoplazmik uç (p50ATF6) çekirdeğe tranport edilir ve orada NF-Y ile birlikte ERSE'ye bağlanır; sonuçta UPR hedef genleri uyarılır. XBP-1 ERSE'ye bağlanır. XBP-1 mRNA'sı ER stresine cevap olarak uç uca bağlanır ve bu UPR hedef genlerinin uyarılmasında yüksek transkripsiyonel aktiviteye sahiptir. XBP-1 mRNA'sının bağlanması IRE1 aktivasyonuna ihtiyaç duyar. IRE1 ER'da lokalize olan tip1 transmembran endonükleazdır. Stresiz koşullarda, ER şaperon Bip IREa'nın ER lümeni bölgesine (domain) bağlanır ve bu proteini inaktif formda tutar. ER stresi varlığında ise, Bip katlanmamış proteinlere bağlanır ve böylece yarışmalı olarak IREa'dan ayrılır, bu da oligomerizasyon ve transotofosforilasyonla IREa'nın aktive olmasına neden olur (BERTOLOTTI ve ark., 2000). XBP-1 mRNA'sı ER stresi sonucu ATF-6 aktivasyonu ile uyarılır. Ters olarak, ATF6 mRNA'sı ER stresi ile uyarılmaz. Bu nedenle, ER stresinin düşük düzeyde ve erken döneminde ATF6'nın; oysaki şiddetli ve geç fazında hem ATF6'nın hem de XBP-1'in aktive olduğu söylenebilir (YOSHIDA ve ark., 2001).

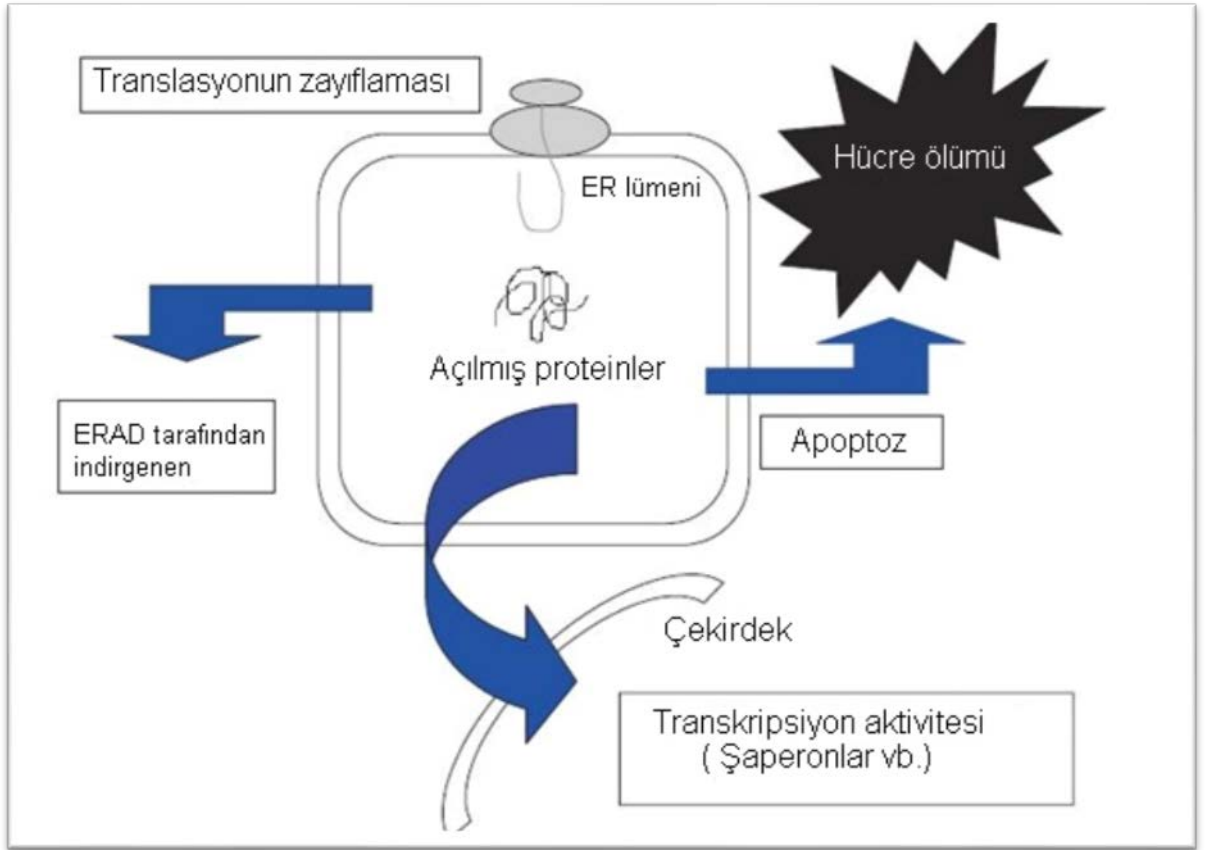
2) ER stresinin tranlasyonel düzeyde zayıflatılması

ER'da, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması bozulunca mRNA translasyonu zayıflatılır ve katlanmamış proteinlerin daha ileri düzeyde üretimi baskılanır. Bu olay, eIF2a'nın fosforilasyonu ile henüz translasyon aşamasının başlangıcında meydana gelir. EIF2a faktörü başlatıcı Met-tRNA'nın ribozoma bağlanmasına aracılık eder. EIF2a'nın alfa alt ünitesinin Ser51 pozisyonunda fosforilasyonu bu aşamayı boke eder ve protein sentezi inhibe olur. Pankreatik endoplazmik retikulum eIF2 α kinaz (PERK), ER stresi sırasında bu fosforilasyondan sorumlu olan kinazdır (SHI ve ark., 1998). PERK ER'de lokalize olmuş, tip 1 transmembran serin/threonin kinazdır. IRE1 α gibi, PERK'in aktivasyonu da Bip'in ER lümeni domaininden ayrılması ile tetiklenir ve bu oligomerizasyona ve transotofosforilasyona öncülük eder (BERTOLOTTI ve ark., 2000). IRE1 ve PERK'in lümen domainleri zayıf bir homoloji (yaklaşık %20 benzerlik) gösterirler; buna rağmen ER stresine duyarlılıkta fonksiyonel olarak değişiklik gösterebildikleri rapor edilmiştir (BERTOLOTTI ve ark., 2000). PERK, translasyonel zayıflatmada esas etkili olan düzenleyicidir ki bu olay ER stresi sırasında hücrenin hayati devamlılığı için esansiyeldir. PERK sinyal mekanizmasının sonlandırılması PERK-Bip kompleksinin oluşumu ve eIF2a'nın GADD34 ile defosforilasyonu sonucu gerçekleşir (NOVOA ve ark., 2001). GADD34, ER stresi sonrası gelişen translasyonel baskılanmadan geri dönüşü teşvik eden negatif feed back döngüsü olarak rol oynayabilmektedir. Memeli hücrelerinde bilinen 2 önemli IRE1 proteini IRE1 α ve IRE1 β 'dir ve her ikisi de ER stres-sinyal iletim yollarında rol alırlar. Bundan başka IRE1 β 'nin 28s rRNA'yı bağlayarak protein sentezini baskıladığı da rapor edilmektedir (IWAWAKI ve ark., 2001). IRE1 α pankreasta en baskın olanıdır ve sürekli olarak eksprese edilirken, IRE1 β ise barsak epitel hücrelerinde özel olarak sentezlenirler.

3) ER stresinde hatalı katlanan proteinlerin yıkılması (ERAD)

ER stresinde hatalı katlanan proteinler ER-kalite kontrol sistemi tarafından tespit edilirler ve ER'dan sitosole taşınarak yıkılırlar. Bu işlem ER-aracılı yıkılma (ERAD) olarak adlandırılır. Bu işlemin ilk basamağı hatalı katlanmış proteinlerin tanınmasıdır. Hatalı katlanan glikoproteinlerin yıkılması işleminde Man8-bağlı lektin sinyal tanıyıcı faktör olarak görev alır (JAKOB ve ark., 1998). İşlemin 2. basamağı hatalı katlanmış olan proteinlerin yakalanması ve katlanmalarıdır. Kalneksin (CNX) ve kalretikulin (CRT), ER dirençli lektin-benzeri şaperonlar hatalı katlanmış proteine bağlanırlar. Üçüncü aşamada sitosole taşıma işlemi gerçekleştirilir. Sitosolde ubikitin-konjuge enzimler hatalı katlanmış proteinleri 26S proteozom vasıtasıyla yıkılmak üzere hedef alırlar. Hatalı proteinlerin yıkılması işlemi protein ubikitinle reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Bu aşamada görev alan enzimler maya da identifiye edilmişlerdir ancak insandaki homologları henüz bilinmemektedir. Maya hücrelerinde yapılan son çalışmalar, hatalı katlanmış proteinlerin ER'da etkili bir şekilde yıkılmasının UPR'yi gerektirdiğini ve ERAD sisteminde görev alan birçok genin UPR ile uyarıldığını göstermektedir (CASAGRANDE ve ark., 2000). Bu bulgular, ERAD sistemi kapasitesinin ER stresi koşullarında sınırlı olduğunu, yeterli olmadığını ima etmektedir.

ER'nin protein katlama kapasitesi ile protein sentezine talep arasındaki uyumsuzluk ER stresini uyarır. Şişmanlık ve uzun süre sülfonilüreler ile tedavi gibi koşullar altında insülin sekresyonuna ihtiyaç artar. Bu da, bozulmuş insülin sekresyonuna doğru giden aşırı yüklenmiş β hücrelerine neden olabilir. Bu koşullar altındaki β hücre fonksiyonunun bozulması "pankreatik β hücresinin tükenmesi" olarak tanımlanmaktadır. β hücrelerine aşırı yüklenilerek kronik ER stresi uyarılır, böylece hücre fonksiyon bozukluğu ve apoptoz yolu ile beta hücre kitlesinde önemli bir azalma ortaya çıkar (Şekil 2).



Şekil 2. ER stres cevapları (RAJAN ve ark., 2007).

4) ER stresinde apoptozisin uyarılması

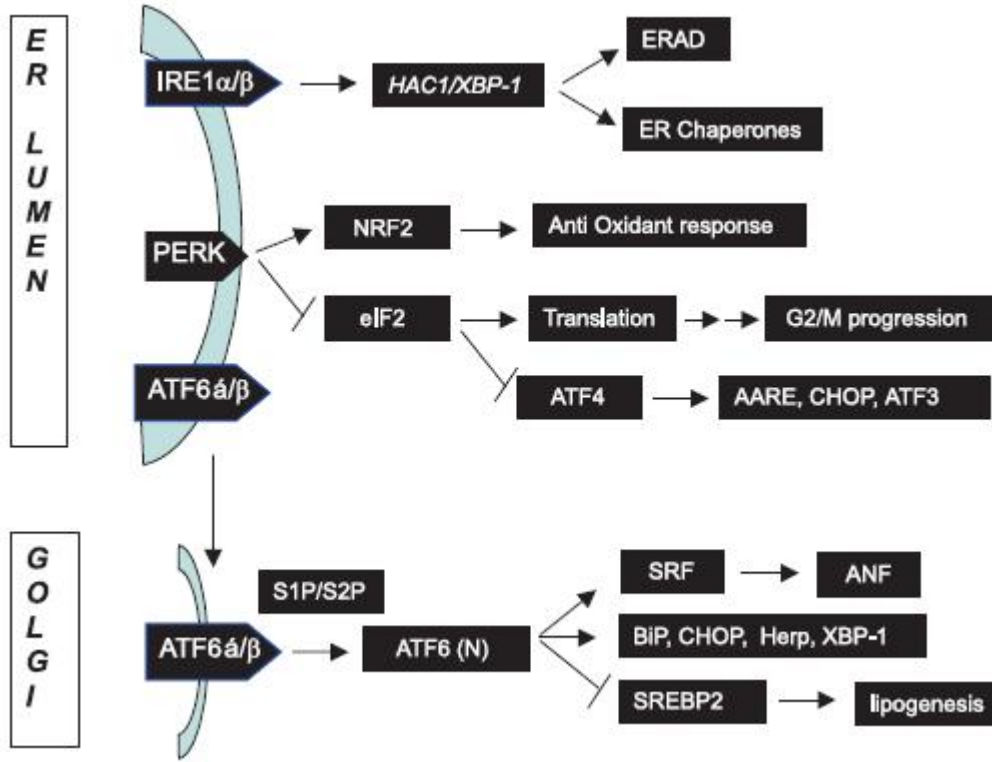
Son yıllardaki çalışmalar beta hücrelerindeki ER stresinin hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin gelişiminde etkili olduğunu göstermektedir. β hücreleri yoğun olarak insülin sentezlemesi ve salgılaması nedeniyle sıklıkla ER stresine maruz kalan hücrelerdir. ER stresi ile ilişkili apoptozun gelişiminde 3 ayrı yolak tespit edilmiştir (Şekil 3).

a) Transkripsiyonel uyarı yolağı: Birincisi, transkripsiyon faktör ailesinin üyesi olan CHOP/GADD153 geninin transkripsiyonel düzeyde uyarılmasıdır. CHOP, fizyolojik koşullarda ya sentezlenmez ya da düşük düzeyde sentez edilir. Fakat ER stresine cevap olarak, transkripsiyon düzeyinde güçlü bir şekilde uyarılır (WANG ve ark., 1996). CHOP'un aşırı uyarılması büyümede duraklamaya ve apoptozise neden olur (BARONE ve ark., 1994). CHOP geninden yoksun fareler normal bir gelişim ve fertilitate gösterirlerken; ER stresine cevapta apoptozis oluşumunda azalma sergilerler (ZINSZNER ve ark., 1998). Bu nedenle, CHOP ER stres aracılı apoptozisin uyarılmasında önemli bir rol üstlenir. UPR cevabında ER şaperonları gibi CHOP geninin transkripsiyonu hem IRE1 yolu (WANG ve ark., 1998) hem de ATF6 yolu (YOSHIDA ve ark., 2000) ile uyarılır. İlave olarak, CHOP ayrıca PERK yolağında transkripsiyon faktörü ATF4'ün translasyonel indüksiyonu ile de uyarılır (HARDING ve ark., 2000). ATF4 birçok hücre tipinde yüksek düzeyde eksprese

edilir fakat ER stresi ya da amino asit azalması sırasında eIF2 α fosforile olmadan etkili bir şekilde translasyonu gerçekleşemez. CHOP ayrıca posttranslasyonel düzeyde de regüle edilir. CHOP'un Ser78 ve Ser81. pozisyonlarda p38 MAP kinaz tarafından fosforilasyonu, transkripsiyonel aktivitesini artırır (WANG ve ark., 1996). CHOP, ER stresi ile genlerin uyarılmasına aracılık edebilir. Stresle uyarılan karbonik anhidraz VI'nın hücre proton konsantrasyonunu artırarak ve hücre içi pH'ı düşürerek apoptozisi desteklediği ifade edilmektedir (SOK ve ark., 1996). Bunun nedeni proapoptotik regülatör Bax'ın düşük pH'da yüksek aktivite göstermesidir (ANTONSSON ve ark., 1997). CHOP'un Bcl-2 proteini baskıladığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artırdığı bildirilmiştir (NAKAGAWA ve ark., 2000).

b) c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) yolağı: ER stresinde ikinci apoptotik yol cJUN NH₂-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu yoludur. JNK'lar gen ekspresyonunu düzenleyen ve stres durumunda apoptozis ile hayatta kalma arasında verilecek karara katılan sinyal ileti proteinlerinin bir ailesidir. ER stresi JNK'ları IRE1 α ve IRE1 β üzerinden aktive eder. JNK aktivasyonunun ve p38 yolunun devamlılığı apoptozis sinyal düzenleyici kinaz (ASK1)'in aktivasyonunu gerektirir ki; bu, hücreyi apoptoza götürür (TOBIUME ve ark., 2001).

c) Kaspaz-12 aktifleşmesiyle: Üçüncü yol ise kaspaz 12'nin aktivasyonudur. Kaspaz 12, ER membranının sitosolik tarafında lokalize olmuştur ve ER stresi ile aktive edilir. Ölüm reseptörleri ya da mitokondri aracılı apoptotik sinyallerle aktive olduğu belirgin değildir. Kaspaz 12 noksan fareler ER stres aracılı apoptozise direnç göstermektedirler. Kaspaz 12'nin m-kalpain (NAKAGAWA ve ark., 2000), IRE1 α /TRAF2 (YONEDA ve ark., 2001) ve kaspaz 7 (RAO ve ark., 2001) tarafından aktive edildiği rapor edilmiştir. m-kalpain sitosolik Ca tarafından aktive edilen nötral sistein endopeptidazdır. Aktive m-kalpain sırasıyla prokaspaz 12 ve Bcl-xL'nin yakalanmasından, kaspaz 12'nin aktivasyonu ve Bcl-xL'nin inaktivasyonundan sorumludur (RAO ve ark., 2001). Sitosolik Ca artışı kaspaz 12'yi m-kalpain vasıtasıyla aktive edebilmesine rağmen, kaspaz 12'nin neden sadece ER stresi ile aktive olduğu bilinmemektedir. ER stresi sırasında, sitosolik kaspaz 7'nin ER'ye transfer edildiği rapor edilmiştir (MAURICIO ve ark., 1998). Kaspaz-7 kaspaz12 ile etkileşime girer ve onun öncül domainine bağlanarak onu aktif hale getirir. Bununla birlikte, kaspaz-7'nin ER'ye transferi sadece ER stresi ile değil aynı zamanda Fas tarafından da uyarılır (CHANDLER ve ark., 1998). Buradan hareketle, kaspaz-7'nin, ER stresine cevapta sinyalleri iletecek diğer adaptör moleküllere ihtiyacı olduğu söylenebilir.



Şekil 3. ER stres sinyal yolları (RAJAN ve ark., 2007).

ER stres ileti proteinlerinden IRE1 α ve PERK'in adacık β hücrelerinde yüksek oranda sentezlendiği gösterilmiştir. Bu da β hücrelerinde proteinlerin doğru katlanmalarının sıkı bir kontrol altında olduğunun göstergesidir. Hatalı protein katlanmaları sonucunda beta hücrelerinin ER stresine cevap yollarını kullandığı ve bazı koşullarda da hücrenin apoptoza gittiği ve bunun sonucu beta hücre kayıpları ile diyabetin ortaya çıktığını gösteren çok sayıda çalışma vardır.

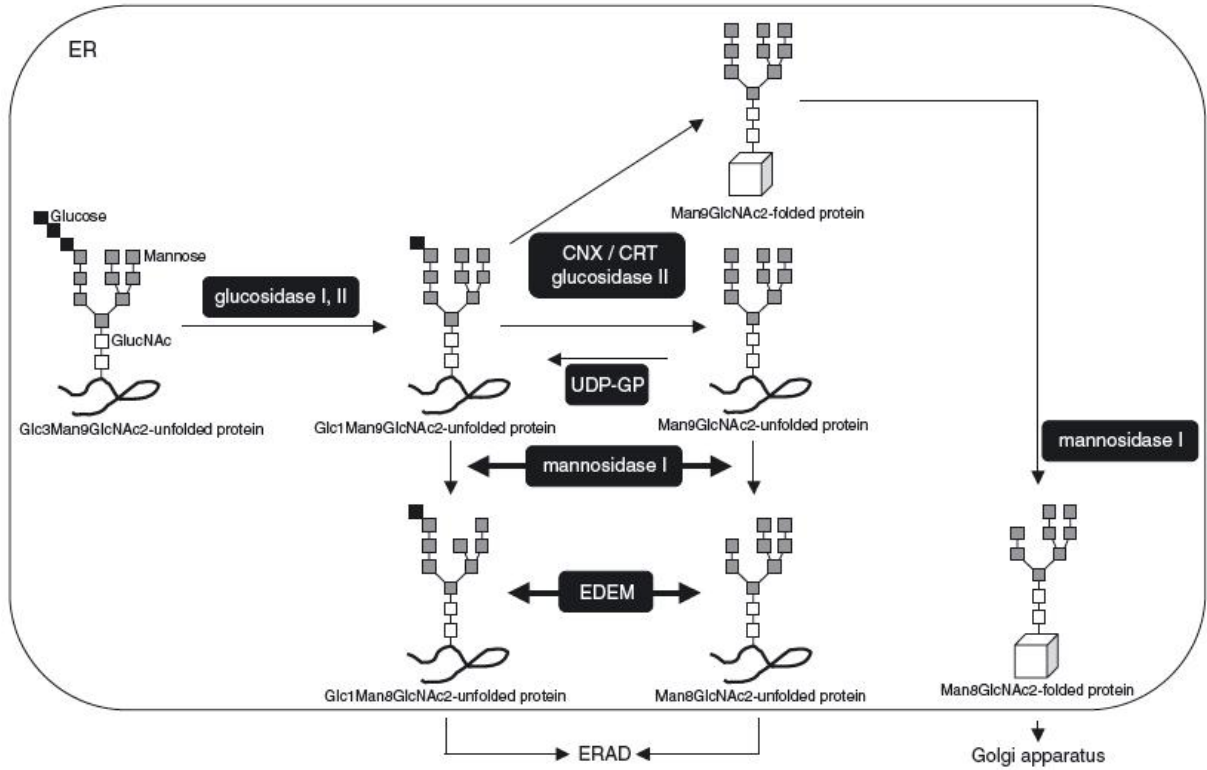
1.6. Endoplasmik Retikulum (ER) Şaperon Proteinleri

BiP (Binding Protein)/Glucose Regulated Protein (GRP) 78'in ER şaperonu olduğu bilinmektedir ve Isı-Şok Protein (Heat Shock Protein) HSP 70 ailesine mensuptur. BiP katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgelerindeki bağları, kendi substrat bağlanma bölgesi yolunu kullanarak ATP'nin hidrolizi ile konformasyonel değişiklikleri uyarır (YOSHIDA, 2007).

Oksijen regüle edici protein (OPR)150/GRP 170 bir ER şaperonudur ve HSP 110 ailesi (HSP70 in bir alt ailesi) mensubudur. Proteinlerin katlanmasını BiP'e benzer bir mekanizma yolu ile kolaylaştırır. Hipoksiye cevapta görev almaktadır. ER dnaJ (ERdj), ERdj3/human ER asociated dnaJ (HEDJ), ERdj4, ERdj5, SEC63, ve p58IPK HSP40 ailesine

bensup ER şaperonlarıdır. BiP'in ATPaz aktivitesinin regülasyonundan sorumlu şaperonlardır. BiP ilişkili Protein (BAP) nükleotid değişimini artırarak BiP'in görevlerini ayarlar. GRP94; HSP90 ailesine ait bir ER şaperonudur ve ATP'nin hidrolizi ile protein katlanmalarına yardımcı olmaktadır. FKB13; FKB ailesine ait bir peptidil-prolil izomerazdır. Sekretuar proteinlerin genel katlanma prosesinde görevlidir (YOSHIDA, 2007).

Kalneksin ve kalretikülin glikoprotein katlanmalarına yol açan spesifik ER şaperon proteinleridir. İki glikoz artığı ne zaman glikozidaz I ve II tarafından koparılır ve sadece bir glukoz rezidüsü kalırsa kalneksin ve kalretikülin alıcı proteini katlar. Son glukoz artığı glikozidaz II tarafından kırıldığı zaman, kalneksin ve kalretikülin alıcı proteini bırakır ve UDP glikoz-glikoprotein-glikoziltransferaz'a bağlanır (Şekil 4). Eğer protein sorunsuz bir şekilde katlanırsa protein enzimden bırakılır ve golgi aparatına taşınır. Eğer protein katlanmazsa UDP glukoz-glikoprotein glikoziltransferaz bir glukoz artığını bağlar ve kalneksin ve kalretiküline geri döner. Bu katlanma sürecinin adı kalneksin siklusudur. Kalneksin ve kalretikülin sırasıyla transmembran ve luminal proteinler olmalarına karşın benzer moleküler yapı ve formları paylaşırlar (DEPREZ ve ark., 2005).



Şekil 4. Glikoprotein katlanması ve katlanmayan glikoproteinlerin degradasyonu (YOSHIDA, 2007).

1.7. Tip 2 diyabet ve ER stres-aracılı β -hücre apoptozisi

Diyabet hastalığının en yaygın formu tip 2 diyabettir ve genelde erişkinlerde obezite ile ilişkili olarak ortaya çıkar. Hastalık insülin sekresyonunda (β -hücre fonksiyon yetersizliği) ve insüline duyarlılıkta azalma (insülin direnci) durumlarının kombinasyonu ile karakterizedir. Normal beta hücre fonksiyonuna sahip bireyler, obezite gibi koşullarda insülin sentezini artırarak insülin direncine adapte olabilirler. İnsülin direncini kırmak amacıyla artan ihtiyaca cevap vermek üzere sürekli insülin sentezi beta hücrelerinde ilerleyen bir yetmezliğe ve sonunda hiperglisemiye neden olur. Obez insanların yaklaşık %10-15'inde diyabet gelişmektedir (DeFRONZO ve FERRANNINI, 1991). Bu yüzden, tip 2 diyabetin patogeneğinde beta hücre fonksiyon bozukluğu kilit faktördür. İnsülin sekresyonundaki yetersizliğe ilave olarak, beta hücre kütleindeki azalma da fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır. Aslında çok sayıda çalışma, tip 2 diyabetik hastalarda muhtemelen β -hücrelerinin apoptotik ölümünden kaynaklı β -hücre kütleinde azalma olduğunu göstermektedir (STEFAN ve ark., 1982).

İnsülinin aşırı sekresyonu, diyabet öncesi evrede ya da tip 2 diyabetin erken diyabetik fazında sıklıkla görülür. İnsülin direnci ve uzun süreli sülfonilüre tedavisi sonucu insülin sekresyonuna duyulan ihtiyacın artması β -hücrelerinde aşırı yüklenmeye ve sonuçta insülin sekresyonunda azalmaya neden olabilir. Sülfonilüre grubu ilaçlar oral hipoglisemik ajanlardır ve β -hücrelerini insülin sekresyonu yapmak üzere uyarırlar. Bu koşullar altında gelişen β -hücre fonksiyon bozukluğu "pankreatik β -hücre yoğunluğu" olarak ifade edilir. İlişkili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. ER stresine duyarlılık hücreden hücreye farklılık gösterir. β -hücreleri belkide ER stresine en duyarlı hücrelerdir (19). ER stresini ileten (düzenleyen) proteinler olan Ire1 α ve PERK pankreatik β -hücrelerinde yüksek oranda sentezlenirler. Bu muhtemelen β -hücrelerinin yüksek düzeyde protein sentezi ile donatılmış olması ile ilişkilidir. ER stres iletilici bu proteinlerin yüksek düzeyde sentez edilmeleri, β -hücrelerinde sentezlenen proteinlerin sıkı bir şekilde kalite kontrollerinin yapılabilmesi için gerekli olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, ER'daki protein trafiğindeki aksaklık hücrenin ölümüne neden olabilir. β -hücreleri ER stres aracılı apoptozise yüksek derecede duyarlıdır. Spontan olarak hiperglisemi tablosu gösteren mutant Akita farelerinde insülitis ya da obezite olmadan β -hücre kütleinde azalma gelişir (YOSHIOKA ve ark., 1997). Devamlı olarak gerçekleşen hiperglisemi tablosuna CHOP'un uyarılması ve β -hücre apoptozisinin eşlik ettiği rapor edilmiştir (OYADOMARI ve ark., 2002). Sürekli hiperglisemi gösteren Akita farelerinde diyabet gelişmesi durumunda, ER şaperon Bip ve ER stres ilişkili apoptozis faktörü CHOP'un mRNA sentezleri pankreasda uyarılır. Mutant insülinin aşırı eksprese edildiği fare MIN6 β -hücrelerinde CHOP ekspresyonu uyarılır ve apoptozis gelişir. Bununla birlikte CHOP geni

susturulmuş olan homozigot Akita farelerinde, diyabetin oluşumu engellenememektedir. Bu nedenle, CHOP'un dışında JNK ve kaspaz-12 gibi diğer yolların da apoptoziste etkili olabileceği söylenebilir.

Son yapılan çalışmalar, PERK'den yoksun fareler ve eIF2- α fosforilasyon bölgesinde mutasyon oluşturulan farelerde, β -hücrelerinin ER stresine daha duyarlı olduklarını göstermiştir (HARDING ve ark., 2001). PERK noksan fareler yaşamlarının 4. haftasında belirgin bir hiperglisemi gösterirler ve doğum sonrası dönemde β -hücrelerinde artan bir apoptozis oranına sahiptirler. Bu farelerin pankreas langerhans adacıklarının elektron mikroskop görüntülerine bakıldığında beta hücrelerinin endoplazmik retikulumlarının genişlediği, sekretör granüllerin büyüklüğünde ve sayısında azalma olduğu görülmüştür. Benzer değişiklikler Akita farelerin adacıklarında da görülmüştür (WANG ve ark., 1999). PERK yolağı, fizyolojik koşullarda yeni protein sentezinin ER katlama kapasitesini aşmaması yönünde bir sigorta ya da garantör görevi görür. β -hücreleri translasyonel zayıflatmanın yokluğuna oldukça duyarlı hücrelerdir ki bunun devamında apoptozisle sonuçlanan bir ER stresine maruz kalırlar. Oysaki diğer hücreler bu koşullara kolaylıkla adapte olabilmeye yeteneğine sahiptirler. Bu nedendir ki; PERK yolağı β -hücrelerinde protein sentezinin fizyolojik yükünde esansiyel bir yoldur.

Tüm bu bilgilerden hareketle, β -hücrelerinde ER diyabetin gelişimini modifiye edebilme potansiyeli taşımaktadır. Protein sentezine duyulan ihtiyaç ile ER'un protein katlama kapasitesi arasındaki dengesizlik ER stresini tetikleyebilir. Tip2 diyabette, ER'da düşük düzeyde ve uzun süreli olarak devam eden protein yanlış katlanmalarının β -hücre kayıplarına neden olabileceği söylenebilir. β -hücrelerine aşırı yüklenilmesi kronik ER stresine neden olabilir. β -hücrelerinde ER stresi aracılı apoptozis üzerine yapılacak çalışmalar diyabetin patogenezinde yeni mekanizmaların aydınlatılmasına ve tedavi hedeflerinin iyi belirlenmesine ışık tutacaktır.

1.8. Epstein Barr Virüs (EBV)

Epstein-Barr Virüs Gamma-1 herpesvirüs veya lenfokriptovirüs ailesine aittir. Lenfokriptovirüs ailesinde yer alan virüsler yalnız primatlarda enfeksiyon yaparlar. Bu virüslerin içinde sadece EBV insanlarda da enfeksiyon yapar (Kutok JL ve Wang F. 2006). Epstein-Barr Virüs ait olduğu Lenfokriptovirüs genusunun diğer üyeleri gibi litik, persistan, latent ve transformasyona neden olabilen enfeksiyonlara yol açar (Arman D. 2002). Bütün insan popülasyonlarında hayatın ilk dekadında EBV ile enfekte olma oranı %95'den fazladır (Kutok JL ve Wang F. 2006).

Epstein-Barr Virüsün aynı zamanda gastrik karsinom ve oral skuamöz hücreli kanser ile de ilişkisi gösterilmiştir (6). Epstein-Barr Virüs ile meme kanserleri arasındaki

ilişki bazı çalışmalarda yüksek oranda bulunurken bazı çalışmalarda ilişki olmadığı belirtilmiştir (Bonnet M. 1999, Chu JS. 1998).

Lenfokriptovirüsler B lenfositlerde latent enfeksiyonun yanı sıra genellikle sınırlı enfeksiyon yaparlar. Lenfokriptovirüsler B lenfositlerde latent enfeksiyon yaptıklarında bu olay, *hücre proliferasyonuna ve transformasyon sürecine* katkıda bulunan uzun süre sınırlı latent gen ürünlerinin yapımı ile sonuçlanır (Beaulieu BL ve Sullivan JL. 1999).

Epstein-Barr Virüsün genomu 172 kb'dır ve yaklaşık 100 gen kodlamaktadır. Latent EBV enfeksiyonunda B lenfositlerin ölümsüzleşmesi ile ilişkili yapılar 6 EBV nükleer antijen (EBNA; EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C ve EBNA-LP), 2 latent membran proteini (LMP-1, LMP-2), 2 küçük, translasyona uğramamış ve poliadenile olmamış RNA (EBER-1 ve EBER-2) ve BamH1-A bölgesi transkriptlerini (BARTs) kapsamaktadır (Kutok JL ve Wang F. 2006). Bu proje önerisi kapsamında aşağıda belirtilecek olan nedenlerden ötürü INS1E (832/13) beta hücre kültürüne uygulanacak EBV rekombinant proteinleri olarak; EBNA1 ve LMP1 tercih edilmiştir.

1.8.1. Epstein-Barr Virüs, Proliferasyon ve Onkogenez

a. Epstein-Barr Virüs çeşitli lenfoproliferatif hastalıklara neden olabilir (Doğan B. 2005). Bunlar:

- 1. Hemofagositik lenfohistiositoz:** Benign bir hastalıktır, histiositik proliferasyon ve hemofagositoz ile karakterizedir. Epstein-Barr virüs ile enfekte lenfositler *TNF- α* ve *IFN- γ* salınımını artırır. Bu yapılar makrofaj aktivasyonuna neden olur. Hastalık ateş, lenfadenopati, hepatosplenonegali, hepatit, pansitopeni ve koagülopati ile kendini gösterir (Doğan B. 2005).
- 2. Lenfoid Granülomatozis:** Lenfoid sistemin EBV ile ilişkili damar hasarı ile karakterize bozukluğudur. Ateş, bulantı, kilo kaybı ve öksürük görülür. Bir immün yetmezlik durumu vardır (Doğan B. 2005).

b. Bunun yanında Epstein-Barr Virüs malign hastalıklara da neden olabilmektedir. Bunların başlıcaları:

1. Burkitt lenfoma:

Epstein-Barr Virüs ile ilişkili ve biyolojik, yerleşim yönlerinden birbirlerinden farklı 3 klinik şekli vardır. Bunlar endemik, sporadik ve immün yetmezlikli kişilerle ilişkili varyantlardır. Burkitt lenfomanın endemik formu, Afrikanın ekvatoryal bölgelerinde ve Papua Yeni Gine'de sıkça (50-100/106) görülür. Tümör hücrelerinde EBV'nin varlığı ile endemik BL arasında hemen hemen %100 ilişki vardır.

Epstein-Barr Virüs primer olarak B lenfositleri enfekte eder ve proliferere olabileceği blastlara ulaşır. Epstein-Barr Virüs nüklear antijen-2 ve LMP-1 lenfositlerin ölümsüzlüğü açısından önemlidir.

1.8.2. Hodgkin hastalığı:

Hodgkin lenfoma (HL) klinik olarak agresif ama tedavi ile sağ kalım oranları yüksek; malign lenfoma gurubunda kabul edilen heterojen bir hastalıktır (Kim LH. Ve ark. 2004). Hodgkin ve Reed-Sternberg Hücrelerinin (HRS) orijininin lenfoid kökenli olduğunun saptanması nedeniyle Hodgkin Hastalığı olan adlandırma yerini HL'ya bırakmıştır. Genellikle lenf düğümlerinde ve en sık servikal bölgede ve çoğunlukla genç erişkinlerde gözlenmektedir. Etiyopatogenezinin açıklanmasında önemli gelişmeler olmasına karşın belirsizlikler hala sürmektedir. Enfeksiyon ile ilişkisine yönelik epidemiyolojik, klinik, ve histopatolojik kesin bulgular vardır(Sarac S. ve ark. 2005, Straathof KCM. Ve ark. 2003). Epstein-Barr virüsünün (EBV) rolü serolojik çalışmalarda ve biyopsi materyallerinde sıklıkla bulunan EBV genomuyla desteklenir. EBV-HL ilişkisi bilinen bir konu olmasına karşın EBV'nün hastalığın gelişimindeki rolü ve prognostik önemi tartışmalıdır.

1.9. Proliferatif Ajan Olarak Epstein-Barr Nuclear Antigen1 (EBNA1) Proteini

EBNA1, epizomal EBV genomunun korunumu ve replikasyonu için gerekli olan ve DNA bağlayan bir proteindir. Bu fonksiyon, EBNA1'in viral replikasyonun plazmid orijini olan "oriP"ye bağlanmasıyla kazanılmıştır (Sample ve Kieff, 1996). EBNA1 aynı zamanda Qp'nin kendi ekspresyonunu ters yönde ayarlamak için aşağı doğru olan iki bölgesi ile etkileşir (Nonkwelo ve ark., 1996). EBNA 1 transkripsiyonal bir transaktivatör olarak hareket ederek Cp ve LMP 1 promotorunu regüle eder (Sample ve Kieff, 1996). EBNA1 proteini, farklı EBV izolatlarında farklı büyüklüğe sahip glisin-glisin-alanin (Gly-Gly-Ala) tekrar dizileri içerir (Sample ve Kieff, 1996). Bu tekrar alanı sınırlandırılmış MHC class 1'in cis etkili inhibitörüdür ve antijen sürecini ubiquitin-proteozom kaskadı yolu ile inhibe ederek fonksiyonu açığa çıkarır (Levitskaya ve ark., 1995). EBNA 1 oluşturan peptidlerdeki hata hedef hücrelerde eksprese olduğunda inefektif CD8+ T-hücrelerinin EBNA1 cevabı ile sonuçlanır (Wilson ve ark, 1996).

Yapılan bir çalışmada, transgenik farelerdeki B-hücrelerinde EBNA1 ekspresyonu B-hücre proliferasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu da onkogeneziste EBNA1'in direkt rolü olabileceğini öne sürmektedir (Wilson, 1996).

EBNA1 epizomal replikasyon ve viral genomun devamlılığı için gereklidir (Beaulieu BL ve ark. 1999). Epstein-Barr Virüs ile enfekte olan tüm hücreler mutlaka

EBNA-1 sentezler. Virüsün hücrede persistansı için EBNA-1 gereklidir ve EBNA-1 sentezlemeyen rekombinant virüsler, B lenfositleri ölümsüzleştiremezler (Yaung LS. ve ark. 2003). Latent EBV enfeksiyonunda enfekte hücrenin çekirdeğindeki tüm kromozom ile EBNA-1 ilişkilidir ve latent replikasyon orjini (Ori P) ve kromozomal proteinlerin her ikisinde birbirleri ile etkileşmeleri EBV epizomlarının yeni nesil hücrelere geçişini sağlar (Beaulieu BL ve ark. 1999). Epstein-Barr Virüs nükleer antijen-1'in santral kısmı gly-ala tekrarlarından oluşur (Yaung LS. ve ark. 2003). Bu bölgeler immün sistemden kaçışta önemlidir. Bu tekrar bölgeleri, ubiquitin/proteasome antijen işleme yolunu inhibe ederek viral proteinlerin işlenmesini ve MHC Sınıf-1 aracılı sunumunu önler. Böylece EBV sitotoksik T lenfositlere (CTL) sunulamaz ve CTL'lerin cevabı engellenir (Doğan B. 2005).

EBNA1 EBV latent gen ekspresyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynar ve EBV replikon plazmid replikasyonu için gerekli olan tek viral bir proteindir (Elizabeth R. ve ark. 2000). Ancak EBNA1'in proliferasyondan sorumlu transkripsiyon faktörlerini hangi mekanizmalarla artırdığı gizemini korumaktadır.

1.10. Proliferatif Ajan Olarak Latent Membrane Protein 1 (LMP1)

LMP1'in fonksiyonunda en az dört adet kaskad bulunmaktadır. Bunlar NF-kB, JNK/AP-1, p38/MAPK ve JAK/STAT' dir. LMP1'in C terminalinde en az iki aktive eden bölge bulunur. Bunlar CTAR1 ve CTAR2'dir (C-terminal 'i aktive eden bölgeler 1 ve 2). CTAR1 membrana proksimal olarak lokalizedir (aminoasit 351-386) ve EBV⁺ B-hücrelerinin uzun dönem gelişimi için gereklidir (Izumi ve Kieff, 1997). LMP1'in lenfositlerdeki ekspresyonu, transkripsiyon faktörü NF-kB' nin aktivasyonu ve anti-apoptotik bir gen olan bcl-2 ve A20 geninin ekspresyonunun denetlenmesi gibi çeşitli hücresel değişiklikleri indüklemektedir (Laherty ve ark., 1992; Rowe ve ark., 1994). Transkripsiyon faktörü NF-kB'nin aktivasyonu doğrusal olmayan hücre sinyalindeki LMP1'in önemindeki ilk belirtidir. Hem CTAR1, hem de CTAR2, NF-kB'yi bağımsız olarak aktive edebilir (Huen ve ark., 1995). CTAR2, NF-kB aktivasyonuna arabuluculuk yapan LMP1'in büyük çoğunluğunun (%70-80) tümör nekrosiz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkili ölüm domain proteini (TRADD) ile etkileşimini açıklar. Geri kalan NF-kB aktivasyonuna arabuluculuk yapan LMP1'in %20-30'u CTAR1 P²⁰⁴XQ²⁰⁶XT²⁰⁸ motifinden elde edilir. Bu motif TNF ile ilişkili birçok faktörle etkileşmektedir (Devergne ve ark., 1996).

LMP1, JNK (c-Jun N-terminal kinaz) kaskatını yalnızca CTAR2 yolu ile aktive eder (Eliopoulos ve ark., 1999). Oysa p38/MAPK kaskatının aktivasyonunda hem CTAR1 hem de CTAR2 arabuluculuk etmektedir. LMP1'in C-terminalindeki 33 baz çiftlik tekrara sahip prolince zengin bir dizi Janus kinaz 3 (JAK3)'ün aktivasyonuna arabuluculuk eder (Gires ve ark., 1999). LMP1'in plazma membranı içindeki agregasyonu için kritik bir önkoşuldur

ve transmembran domeynlerin instrinsik bir özelliği olarak ortaya çıkar (Gires ve ark., 1997). LMP1, lipid yığınlarında zenginleştirilmiştir ve hücre iskeletiyle ilişkidir. Transmembran domeynleri, LMP1'i lipid yığınlarına yönlendirmekten sorumludur, oysa LMP1'in TRAF molekülleriyle etkileşimi LMP1'in hücre iskeletiyle ilişkisi için önemlidir (Higuchi, 2001).

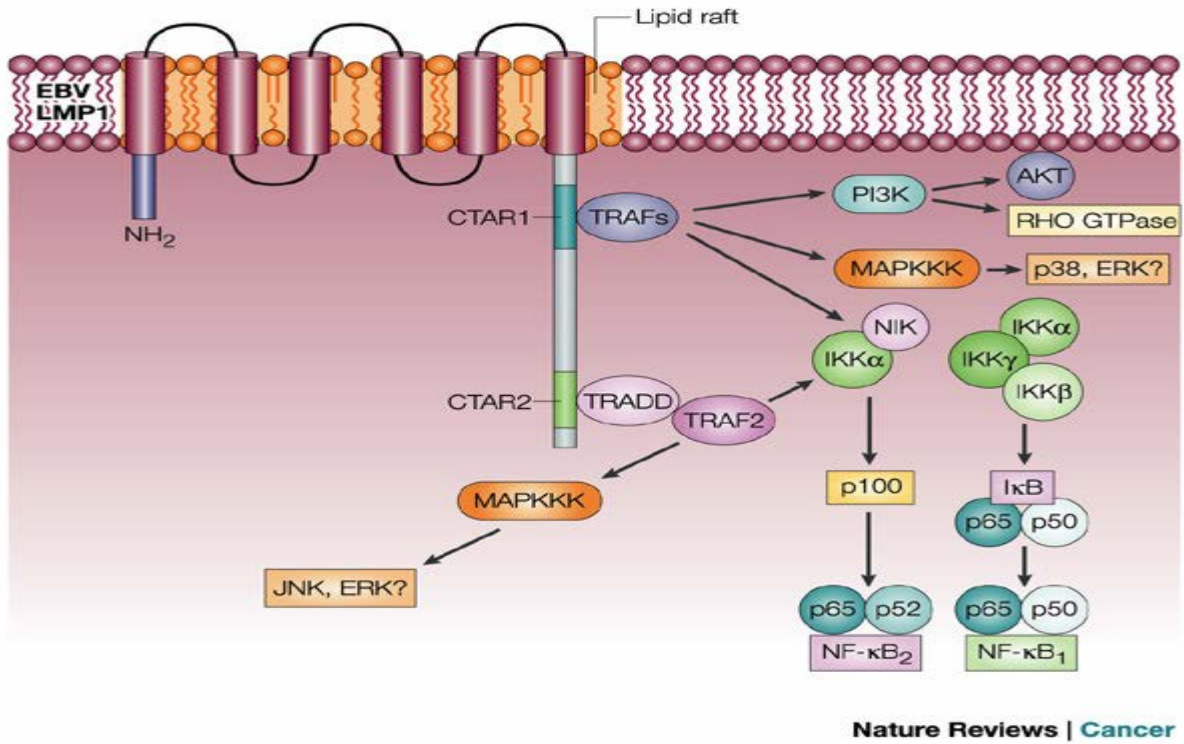
1.10.1. LMP1'in proliferatif etkinlikte olduğunu gösteren literatür verileri.

1. LMP1, promotörü EBNA-2'ye yanıt elementi taşır (Beaulieu BL ve ark. 1999).
2. Hücre yüzey adezyon moleküllerinin artışına yol açar (Yaung LS. ve ark. 2003).
3. Hücrel onkogen *bcl-2'nin yapımını artırarak* EBV ile enfekte B lenfositleri apoptozisten korur (Beaulieu BL ve ark. 1999).
4. Latent membran protein geninin fibroblastlara transferinde, normalde tümör oluşturmeyen fibroblast dizilerinden bazılarının tümör hücresi haline geçtiği görülmüştür (Beaulieu BL ve ark. 1999).
5. İn vitro olarak; proliferasyonun devamı ve B lenfositlerdeki ölümsüzlüğün devamı açısından gerekli olduğu gösterilmiştir (Niedobitek G. ve ark. 2001).
6. Hücrel adezyon moleküllerinden lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (LFA)1, LFA3 ve ICAM1 ifadenmesine neden olurlar. Bu nedenle, LMP-1 ifade eden hücreler çok sık kümeleşirler. Bu moleküller B lenfositlerle T lenfositler arasında LFA3/CD2 ve LFA1/ICAM1 adezyon yolları ile bağlantı kurar ve EBV ile transforme olmuş B lenfositlerin CTL (sitotoksik T lenfosit) 'ler aracılığı ile eliminasyonunda önemlidir. Sitotoksik T lenfosit aracılı lizis özellikle immünsüpresif hastalarda tedavide kullanılmaktadır (Beaulieu BL ve ark. 1999).
7. B lenfosit aktivasyon moleküllerinin (CD23, CD39, CD40 ve CD44 gibi) ifadenmesini uyarır (Niedobitek G. ve ark. 2001).
8. Latent membran protein-1 ile oluşan uyarı CD40 ile oluşan uyarı ile sinyal yayılım yolları ve molekülleri bakımından paralellik gösterir (Beaulieu BL ve ark. 1999).

1.10.2. LMP1 İlişkili Biyokimyasal Yolaklar

Epstein-Barr Virüs LMP-1, 63 kilodalton ağırlığında integral membran proteini ve üç ana parçaya bölünebilir: ilk parça; LMP-1'i plazma membranına bağlayan ve proteini yönlendiren bir amino terminal sitoplazmik kuyruk (1-23.aminoasitler), ikinci parça; LMP-1 agregasyon ve oligomerizasyondan sorumlu altı hidrofobik transmembran

düğüm (24-186. aminoasitler) ve üçüncü parça; molekülün sinyal aktivitesininin büyük bölümünü oluşturan uzun karboksiterminal sitoplazmik bölgedir (187-386. aminoasitler). Nükleer faktör-kB (NFkB) transkripsiyon faktör yolunu aktive edebilme yeteneklerine göre iki farklı fonksiyonel bölge; C-terminal aktivasyon bölgeleri 1 ve 2 (CTAR1 ve CTAR2) olarak tanımlanmışlardır (Zheng H. ve ark 2007). Latent membran protein-1'in sinyal etkisi tümör nekroz faktör (TNF) reseptör, TNF reseptör ilişkili faktör (TRAF)'ün CTAR1 ile 13 direk olarak veya CTAR2'ye bağlanan ölüm bölgesi içeren protein TNF aracılıklı ölüm domaini (TRADD) ile indirek olarak etkileşmeleri sonucu ortaya çıkar (Eliopoulos AG ve Young LS, 2001). Bu adaptör proteinler NF-kB-indükleyen kinaz (NIK) ve IκB kinazları (IKK) içeren bir multiprotein katalitik kompleks oluştururlar. Bu hem klasik IκB alfa bağımlı NF-kB yolunun (p50-p65 heterodimerlerini içerir) aktivasyonu, hem de p52-p65 heterodimerlerinin oluşumu için p100 NF-2κB işlenmesi ile sonuçlanır (Eliopoulos AG ve ark. 2003). (Şekil 1).



Şekil 1: EBV LMP1 ilişkili yollar (Eliopoulos AG ve ark. 2003).

1.11. İleri Sürülen Hipotezler

Literatür verilerinden anlaşılmaktadır ki uzun süreli (10 yıl ve üzeri) oral antidiyabetik tedavilerinde vücut ister istemez eksojen insüline bağımlı hale gelmektedir (Qian L. 2008). Buda diyabetikler açısından diyabetik komplikasyonlarla mücadele etmenin yanında sosyal endikasyonları da (insülini devamlı yanında taşıma, her an her

yerde vücuduna zerk etme problemi, umutsuzluğa teslim olma vb.) beraberinde getirmektedir. Özellikle insülin sekresyonunu artırmaya yönelik tasarlanan oral antidiyabetik ilaçların (sülfonilüre vb.) uzun süreli kullanımları sonucunda artık bilimsel bir gerçeklik olarak Endoplasmik Retikulum organelinden kaynaklanan stress ile beta hücreleri apoptoza sürüklenerek beta hücre kütleleri azalmaktadır (Yoshida H, 2007). Bu bağlamda çalışmanın amacı her ne sebeple olursa olsun beta hücre kütlelerindeki azalmadan kaynaklanan eksojen insüline geçiş dönemlerinin tedavisine yeni bir yaklaşım geliştirmek ve hatta yeni bir antidiyabetik ajana öncülük etmek ya da ilerleyen dönemler için söylenebilir ki viroterapi ajanı tasarlanmasına zemin hazırlamaktır. Bu amaçla yapılan literatür taramalarında EBV oldukça ilgi çekici bulunmuştur. EBV'nin proliferatif etkinliğini ise iki ana protein aracılığıyla yapması nedeniyle bu iki proteine odaklanılmış ve bu iki proteinin beta hücre kütlelerini artırma amacıyla proliferatif ajan olarak kullanılabilir mi sorusuna yanıt aramak amaçlanmıştır. Proje amacı itibarıyla bu bakımdan ülkemizin ve dünyanın en büyük sağlık problemlerinden ve sağlık harcamalarının büyük bir çoğunluğunu oluşturan diyabetik komplikasyonların önlenirliği / kontrol altında tutulabilirliği açısından oldukça önem taşımaktadır.

Projenin hedeflerini ve erişilmek istenen sonuçları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- **Hedef 1:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerine EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanması sonucunda proliferasyonun gen düzeyinde nasıl etkilendiğinin tespiti.
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 1:** Proliferasyondan sorumlu olan bazı genlerin (FoxO1, PDX-1, β -katenin, Wnt, TCF7L2) ekspresyon düzeylerinin analizi.
- **Hedef 2:** EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanmasının pankreas beta hücre apoptozunda etkili olup olmadığını göstermek.
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 2:** Apoptotik süreçte rol oynayan NF κ B, sitokinler (TNF α , IFN γ , IL-1 β), kaspaz 3, 8 ve 12 ile JNK'nın; hem ER aracılı apoptosiz faktörü hem de ER stres markeri olan CHOP'un, antiapoptotik faktörler bcl2 ve bcl-xL'nin gen ekspresyon düzeylerinin analizleri. Bunların yanında immünohistokimyasal olarak TUNEL methodu ile apoptotik indeksin belirlenmesi.
- **Hedef 3:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerine EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanmasının; Endoplasmik Reticulum (ER) stresi üzerine etkisini belirlemek.

- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 3:** ER stres belirteçlerinden olan GRP-78, ATF4 ve ATF-6 ile PERK'in gen ekspresyon düzeyleri.
- **Hedef 4:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerine; EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanması ile İnsülin sekresyonu arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 4:** "Glucose Stimulated İnsulin Secretion" testi ile ELISA yöntemi kullanılarak insülin analizleri.
- **Hedef 5:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerinde; EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanması sonucunda beta hücrelerinin DNA hasarı açısından tetkik edilmesi
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 5:** EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinleri uygulanan ve uygulanmayan beta hücre kültürlerinde Comet Assay analizi ile DNA hasar skorlarının karşılaştırılması.
- **Hedef 6:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerinde; EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanması ile beta hücre sayısının nasıl etkilendiğinin tespiti
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 6:** EBV uygulanan ve uygulanmayan beta hücre kültürlerinde MTT hücre viabilete testi.
- **Hedef 7:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerine EBV LMP1 rekombinant proteini uygulaması sonucunda hücre kümeleşmelerinin olup olmayacağı ve ICAM1 ifadenmesinin nasıl etkileneceği.
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 7:** LMP1 rekombinant proteini uygulanan beta hücre kültüründe ICAM1 gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi.
- **Hedef 8:** INS1-E (832/13) pankreatik beta hücrelerine EBV LMP1 ve EBV EBNA1 rekombinant proteinlerinin uygulanması sonucunda beta hücre proliferasyonunun bu durumdan nasıl etkilendiğinin tespiti.
- **Erişilmek istenen sonuç(-lar) 8:** Hedef 8 doğrultusunda manipüle edilen beta hücre kültüründe, immünohistokimyasal olarak PCNA protokolü beta hücre proliferasyonunun analiz edilmesi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre kültürü

Hücrelerin homojen popülasyonlarından oluşması nedeniyle hücre kültürleri günümüz fen ve sağlık bilimleri araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır. Pankreas beta hücreleri ile ilgili in vitro çalışmalarda değişik mutant hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında MIN6 (fare), INS-1 (rat), HIT-T15 (hamster), BRIN-BD11 (rat) gibi beta hücre hatları sayılabilir. Bu çalışmada rat INS-1 beta hücre kültürü kullanılacaktır. Bu hücreler klonal insülin üreten insülinoma hücreleridir ve yüksek glukoza hassastırlar.

Hücre kültürü flasklarında süspansiyon ortamında hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması basamakları aşağıda verilmiştir.

2.2. Hücre pasajı

Hücreler %10 (v/v) oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal buzağı serumu (FCS) ve 5 mM glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 1 mM sodyum piruvat, 50 mikroM 2-merkaptotanol ve 10 mM HEPES içeren RPMI 1640 besi yerinde 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edildi. Hücreleri çoğaltmak amacıyla yaklaşık cm karede 4x10⁴ hücre yoğunluğu olacak şekilde 75 cm²'lik flaslara 3x10⁶ hücre 20 ml besi yeri içeren kültür kabına (150-mm flask) konarak 4-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Süspansiyon steril kapaklı tüplere aktarılarak 400xg ve 25°C'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre tortusu elde edildi. Pelet üzerine tüp hacminin yaklaşık 1/3'ü kadar taze besi yeri sıvısı konarak pipet ile karıştırılacak ve buradan alınan 20µl hücre süspansiyonu ile 90 µl tampon (1xPBS + %1 FCS) ve 100 µl tripan mavisini eppendorf içinde karıştırıldı. Mikroskopik incelemede karışımda beyaz renkte canlı hücreler ile mavi renkte ölü hücrelerin mililitredeki sayısı hemositometre üzerinde belirlendi.

2.3. Hücre kültüründe ER stres modelinin oluşturulması

Flasklar içerisinde çoğaltılan hücreler 1-2 dakika süreyle tripsin (1ml %0.25) ile muamele edilerek hücrelerin flask tabanından serbest kalması sağlandı. Serbest bırakılan hücre toplulukları pipet ile toplanarak kapaklı tüp içinde yukarıda belirtildiği gibi santrifüj sonrası RPMI ile yıkandıktan sonra hücre sayımı yapılarak *ER stresini* oluşturmak için 8x10⁵/ml hücre olacak şekilde flaslara dağıtıldı. Komple medyumda ve 37°C, %5 CO₂

ortamda bir gece inkübasyonun ardından PBS ile bir kez yıkanmasının ardından çalışma için kullanıldı.

Hücreler ER stresi oluşturmak için 10^{-8} mol/l thapsigargin (THAPS) (DMSO içinde) ile 18 saat süreyle muamele edildi.

2.4. LMP1 ve EBNA1 Rekombinant Proteinlerinin Hücre Kültürüne Uygulanması

EBV rekombinant proteinleri LMP1 ve EBNA1 ticari olarak elde edilmiştir. Yapılan LD50 doz denemelerinde her iki protein için de 0,1 ppm ve 0,5 ppm dozlarda uygulanmalarına karar verilmiştir.

2.5. İnsülin sekresyon ölçümü

Hücreler glukoz içermeyen Krebs-Ringer bikarbonat HEPES (KRBH) tamponu (135 mM NaCl, 3,6 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂ ve 10 mMHEPES, pH7,4 BSA (0,1%) ile 2 kez yıkandıktan sonra 37 °C de 30 dk süreyle aynı mediumda inkübe edildi. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı. İnkübasyon pleytin buz üzerine konması ile durduruldu. Süpernatant sekrete edilen insülin düzeyinin ölçümü için toplandı. Hücreler asit-etanol ile hücreSEL insülin ölçümü öncesinde ekstrakte edildi. Sekrete edilen insülin ve hücreSEL insülin ölçümleri spesifik ELISA kiti (Millipore, Rat/Mouse Insulin ELISA kit Cat. EZRMI-13K) kullanılarak fotometrik yöntemle yapıldı.

2.6. Protein ölçümleri

İnkübasyonlar sonrası hücreleri yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flaslara tripsin (1ml %0.25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif çırpma hareketleri ile hücreler serbest bırakıldı. Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C, 400 xg devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet elde edildi. Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifüj) üzerine hücre lizis tamponu eklendi. Lizis tampon şu karışımdan oluşmuştur: %1 Triton X-100 (v/v), 50mM HEPES bafır pH 7.2, 10mM EDTA, 100mM NaH₂PO₄,2H₂O, %8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (aprotinin, PMSF, leupeptin, NaF). Deterjanda çözünmeyen proteinler 12 000 xg, 4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj ile uzaklaştırılarak supernatant elde edildi. Supernatanların içerdiği protein düzeyleri standart olarak sığır serum albumininin kullanıldığı Bradford metodu ile ölçüldü.

Çalışmalarda gruplarda aynı pasajdan elde edilen hücreler kullanıldı, araştırmanın her aşamasında sterilizasyona azami özen gösterildi. Her deney 3 tekrardan oluştu ve

elde edilen ortalama değerler SPSS istatistik programında One-Way ANOVA kullanılarak değerlendirildi.

2.7. RNA izolasyonu ve Real Time QRT-PCR ile mRNA ekspresyon analizleri

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi yapılacak transkripsiyon analizlerinde kullanılacak total RNA hazır ticari kit kullanarak hazırlandı. Kontroller ve her bir gruptan inkübasyon sonu alınan 1×10^7 sayıda hücre üzerine 1ml RNA izolasyon kiti konuldu ve kılavuzunda belirtildiği gibi yaklaşık 2 saatlik süre sonunda total RNA hazırlanarak miktarı ve saflığı spektrofotometrede (OD 260nm ve 280nm'de) belirlendi. RNA/DNA oranı 1.7 ve üzeri olanlar çalışmada kullanıldı. Ayrıca her bir izolattan 2.5 µg alınarak %1'lik agarozda yürütüldü ve total RNA'nın varlığı UV lamba altında gözlemlendi.

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA'dan 1 µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Daha sonra her bir örneğe ait cDNA'den 1 µl alınarak üzerine SYBR green master mix ve bir çift primer (oligonükleotid) eklendi. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup literatürde daha önce belirtilen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak elde edildi ve reaksiyonda yaklaşık 100 ng düzeyinde kullanıldı (Tablo 2). Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (PFAFFL, 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{beta\ actin})_{denek\ grubu} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{beta\ actin})_{kontrol\ grubu}$$

formülü uygulandı; hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. PCR çalışmalarında her gruptan 5 örnek rastgele seçildi ve bunların 3 tekrarı yapılarak ortalamaları alındı.

Real Time PCR sisteminde sybr green boyası çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak, bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır.

PCR çalışmaları ile ekspresyon düzeyi belirlenen genler:

- Beta hücre proliferasyonundan sorumlu olan FoxO1, PDX-1, β -katenin, Wnt ve TCF7L2;
- Ölüm habercileri olan NF κ B, TNF- α , IL1- β , IFN- γ ; apoptosisle ilgili olan kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 12, JNK, Bcl-2 ve Bcl-xL;
- ER stresi markerları GRP-78, CHOP, ATF-4, ATF-6 ve PERK

Tablo 2. Oligonükleotid primer dizileri ve PCR programları.

Gen	Primer Dizisi	PCR Programı	Döngü
p53	F-5'CGGAGGTCGTGAGACGCTG'3 R-5'CACATGTAAGTGTAGTGGATGGTGG'3	94°-1 dk/59°-1dk/72°-1dk	40
Kaspaz-3	F-5'GAGCACTGGAATGTCATCTCGCTCTG'3 R-5'TACAGGAAGTCAGCCTCCACCGGTATC'3	94°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	40
Kaspaz-12	F-5'TCCGACAGCACATTCTGGTC'3 R-5'CCCTTTGCTTGTGGATACCCA'3	94°-1 dk/57°-1 dk/72°-1 dk	35
Kaspaz-8	F-5'TGAAGGAGCTGCTTTTCCAT'3 R-5'ATCAAGCAGGCTCGAGTTGT'3	95°-1 dk/60°-1 dk/72°-30s	45
TNF- α	F-5'AGCCAGGCAGGTTCCGTCCTC'3 R-5'TTACTGTGCCACCCAGCCGAC'3	94-1 dk/65-1 dk/72-1 dk	35
Bcl-2	F-5'CAGCTGCACCTGACGCCCTT'3 R-5'CCCAGCCTCCGTTATTCTGGA'3	94°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	40
IL-1 β	F-5'GCTATGGCAACTGTCCCTGAA'3 R-5'ATCCCACGAGTCACAGAGGACG'3	94°-1 dk/57°-1 dk/72°-1 dk	35
IL-6	F-5'ATGAAGTTTCTCTCTGCAAGAGAC'3 R-5'CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC'3	95°-30s/55°-1 dk/72°-1 dk	50
FoxO1	F-5'GTGAACACCATGCCTCACAC'3 R-5'CACAGTCCAAGCGCTCAATA'3	95°-15 s/60°-1 dk/72°-1 dk	40
CHOP	F-5'CACTACTCTTGACCCTGCATCC'3 R-5'CTTCATGCGCTGTTTCCCAGC'3	94°-1 dk/57°-1 dk/72°-1 dk	35
GRP78	F-5'CTGGGTACATTTGATCTGACTGG'3 R-5'GCATCCTGGTGGCTTCCAGCCATTC'3	95°-30 s/58°-30 s/72°-45 s	30
ATF4	F-5'TCTGTATGAGCCCTGAGTCTACCT'3 R5'GGTCATAAAGTGTGGGTCGAGAACCAC'3	94°-1 dk/59°-1 dk/72°-1 dk	40
ATF6	F-5'GGATTTGATGCCTTGGGAGTCAGAC'3 R-5'ATTTTTTTCTTTGGAGTCAGTCCAT'3	94°-1 dk/59°-1 dk/72°-1 dk	40
NF κ B	F-5'TCCCAAGCCAGCACCCAGC'3 R-5'GGCCCCCAAGTCTTCATCAGC'3	94°-20 s/70°-40 s/72°-3 dk	35
PERK	F-5'AGGAGTCTGAACTCAGTGCCA'3 R-5'GCTCCCTGTTTGGGAGACGGA'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	35
PDX-1	F-5'GGCTTAACCTAAACGCCACA'3 R-5'GGGACCGCTCAAGTTTGTA'3	94°-1dk/59°-1 dk/72°-1 dk	30
Bcl-xL	F-5'GAACCTTTCCGGGATGGGGTA'3 R-5'CAGAACTACACCAGCCACAGTC'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	35
Wnt-4	F-5'GCCACGCACTAAAGGAGAAG'3 R-5'GGCCTTAGACGTCTTGTTC'3	94°-1 dk/61°-1 dk/72°-1 dk	40
TCF7L2	F-5'GCCTCTCATCACGTACAGCA'3 R-5'GGATGGGGATTGTCTCTAC'3	95°-30 sn/58°-1 dk/72°-1 dk	35
IFN- γ	F-5'ATCTGGAGGAAGTGGCAAAGGACG'3 R-5'CCTTAGGCTAGATTCTGGTGACAGC'3	93°-1 dk/55°-1 dk/72°-1 dk	40
JNK-1	F-5'TCAGACCCATGCTAAGCCAGC'3 R-5'AGGTGCTTGATTCCACACAGCA'3	95°-30 s/59°-1 dk/72°-1 dk	40
β -Katenin	F-5'GCTAAAATGGCAGTGCGCCTA'3 R-5'GTGGTCCACAGGAGCTTCTCG'3	95°-1 dk/58°-1 dk/72°-1 dk	35

β -Aktin	F-5'/CATCGTCACCAACTGGGACGAC'3 R-5'/CGTGGCCATCTCTTGCTCGAAG'3	93°-15 s/55°-30 s/68°-1 dk	30
Bax	F-5'/AGAAGCTGAGCGAGTGTCTCC'3 R-5'/GCCTTGAGCACCAGTTTGCTA'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	40
P35	F-5'/AAAGGCCACACTGTTTGAGGA'3 R-5'/CCTCTCCAAGGCAGTACCGA'3	95°-30 s/58°-1 dk/72°-1 dk	40

2.8. Apoptozis Belirleme Çalışmaları

Apoptoz, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlenir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri (bcl-2, bcl-xL, bax, bak, bad) apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir (TILLI ve ark., 2002 ; ROSSEN ve ark., 1998 ; DELEHEDDE ve ark., 1999). Gelişim ve diferansiyasyon boyunca canlılığın düzenlenmesinde fonksiyon görürler. Normalde fetal ve adult dokuda eksprese edilen bcl-2, hücre proliferasyonuna neden olmadan hücrenin canlılığını sağlayan apoptoz inhibitörüdür (RAMDIAL, 2000). Overekspresyonu radyasyon, UV, p53, kemoterapötik ilaçlar gibi değişik stimuluslar tarafından başlatılan hücre ölümünü engeller ya da belirgin biçimde azaltır (TILLI ve ark., 2002 ; CHO ve ark., 2001). Bunu genel apoptoz yolunu kapatarak yapar. Bax protein (bcl-2-associated x protein) ise bcl-2 ile yüksek derecede yapısal benzerlik göstermesine rağmen proapoptotik aktivite gösterir (TILLI ve ark., 2002). Bax overekspresyonu homodimerizasyon ile sonuçlanır ve bcl-2 protein ile heterodimer formu oluşturarak onu inaktive eder. Böylece bcl-2 fonksiyonu engellendiğinden apoptoz indüksiyonu başlar (TILLI ve ark., 2002 ; CHO, 2001). Normal epidermiste bcl-2 bazal hücre tabakasında ve matür kıl follikülünde eksprese edilirken, bax protein çoğunlukla suprabazal hücrelerde eksprese edilmektedir (TILLI ve ark., 2002 ; DELEHEDDE ve ark., 1999).

Bu bağlamda apoptosis belirleme çalışmalarında; hücre kültürü lizatlarından; proapoptotik olarak bax ve p53 gen ekspresyonu, antiapoptotik olarak ise Bcl-2 ve p35 gen ekspresyonu analizi yapılmıştır.

2.8.1. TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) ASSAY:

Hücreler immunohistokimyasal boyamada olduğu gibi fibronektin kaplı lameller üzerine ekilecek ve %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dk tespit edilecek. Tespitten sonra PBS ile yıkanacak ve permeabilizasyon için %0.1 triton X-100 ile hücreler 2 dakika buz üzerinde inkübe edilecek. Bundan sonraki aşama in situ cell Death detection kit POD (Roche)'in önerdiği protokole göre yapılacaktır. Boyama sonrası % olarak apoptotik indeks belirlenecektir.

2.8.2. Comet Assay Analizi

Yukarıda belirtilen apoptozis belirleme yöntemlerini desteklemek adına DNA hasar tespitinde kullanılan Comet Assay'den faydalanılmıştır. Choucroun ve ark. (2001), Fas antijeni eksprese eden Jurkat hücreleri ile yaptıkları çalışmada; Fas antikoru ile uyarılmış apoptozisin olabildiğince erken dönemde comet görüntüleri kullanılarak tespit edilebileceğini ve comet görüntülerinin apoptotik risk mevcut olduğu durumlarda genotoksisite indikatörü olarak kullanılamayacağını göstermişlerdir.

INS-1E (832/13) hücre kültürü izolatlarından medium hızla uzaklaştırıldıktan sonra soğuk PBS tamponu ile süspense edildi. Yine aynı tamponda hücreler 2100 rpm' de 10 dakika ve 0°C de santrüfjü edilerek iki kez yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra PBS tamponu ile PBS ile mm³'te 10⁶ hücre olacak şekilde süspense edildi.

a. Slaytların hazırlanması: PBS içerisinde hazırlanan %1'lik normal kaynama dereceli agaroz (NMA) jel solüsyonundan 80-100 µl alınarak lam üzerine damlatıldıktan sonra lamın yüzeyine agarozun yayılması sağlandı. Agarozlu lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. PBS ile mm³'te 10⁶ hücre olacak şekilde süspense edilmiş hücrelerden 10 ul alındı ve 80 ul %0.5'lik düşük kaynama dereceli agaroz (LMA) ile karıştırılarak (37 °C), hızlı bir şekilde, daha önce hazırlanmış lamın (birinci agaroz tabakalı) üzerine damlatılıp bir lamel kapatılarak yayıldı. Lamlar buz kasetleri veya buzlu yüzey üzerine konarak 5 dk süre ile bekletilip slaytın donması sağlandı ve lamel uzaklaştırılıp son olarak da 75 µl LMA (%0.5) agaroz solüsyonu 3. tabakayı oluşturacak şekilde 2. tabakanın üzerine ince bir kat halinde tabakalandırılarak slaytın hazırlanması tamamlanmış oldu.

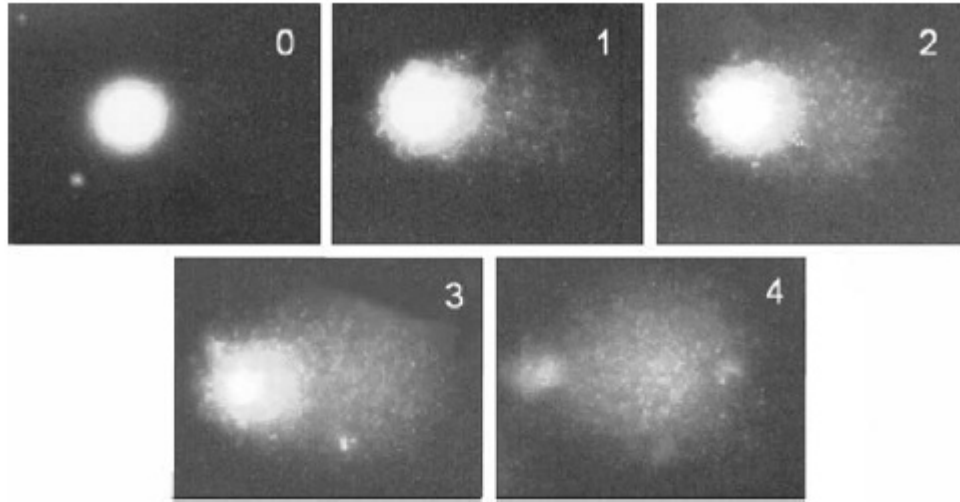
b. Lizis: Hücre ve çekirdek zarını lize edip DNA sarmallarının agaroz içerisinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla, slaytlar buz soğukluğunda tutulan lizis solüsyonu (2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Trizma, , 10% DMSO, and 1% Triton X-100, pH 10) içerisine konuldu ve 1 gece, karanlıkta, 4°C'de (buzdolabında) bekletildi.

c. DNA sarmalının çözülmesi ve elektroforez: Elektroforez işlemi öncesinde DNA zincirinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (300mM NaOH ve 1mM Na₂EDTA, pH.13) 20 dakika boyunca ve 2-5°C'de, karanlıkta bekletildi. Elektroforez işlemi aynı tampon içerisinde, 4°C'de buzdolabında 25 dakika boyunca, 25V (0.96 V/cm) ve yaklaşık olarak 300 mA akım koşullarında yapıldı.

d. Nötralizasyon ve boyama işlemleri: Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, alkali tampon çözeltisinin slaytlardan uzaklaştırılması için slaytların her biri 5 ml 0.4 M Tris HCl (pH 7.5) ile 3 dk yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Nötralizasyon

tamamlandıktan sonra slaytlar 20 µg/ml'lik 50 µl ethidium bromide ile boyandı ve 4 saat içinde değerlendirme yapıldı.

e. Değerlendirme: Ethidium bromide ile boyanan slaytlardan floresan mikroskop ile elde edilen DNA görüntüleri değerlendirildi. Değerlendirme işlemi görsel skorlama şeklinde yarı kantitatif olarak yapıldı. Kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görüntüsünün tespiti hasarsız hücrelerin varlığı anlamına gelmektedir. Bu görünüm non-migration (göç yok) olarak değerlendirildi. Eğer DNA hasarı oluşmuş ise fragmentlerin ya da zincir kırılmalarının miktarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak düzensiz kenarlı bir görünüm elde edilmektedir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olmaktadır. Bu görünüme stretch ya da low migration denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (Comet, high migration) şeklini alır. Son aşama ise apoptozistir. Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri puanlandırıldı. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1'den 4'e kadar puanlandırıldı (Şekil 5) ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirildi.



Şekil 5. Comet Assay'de görsel skorlama (COLLINS ve ark., 1995).

2.8.3. MTT Hücre Viabilite ölçüm testi

MTT hücre viabilite testi ile INS-1E hücrelerindeki ölüm oranını tespit ederek, apoptozun yukarıdaki yöntemlerle belirlenmesinin desteklenmesi amaçlanmıştır. Akalin ve Incesu (2005), CO25 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, MTT ve akridin oranje yöntemleri kullanılarak apoptotik oranı belirlemişlerdir.

2×10^4 hücre/ml de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan, 100 µl 96 kuyulu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğuna aktarıldı ve aynı zamanda hücrelere 0,0002-0,001-0,002-0,01-0,02-0,1 mg/ml konsantrasyonlarında bileşenler eklenerek 37 °C'de inkübe edildi. 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası (5 mg/ml) ilave edildi ve hücreler 37 °C' de 2 saat daha inkübe edildi. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmış ve her bir kuyuya 200 µl DMSO eklenerek 10 dakika inkübe edilmişlerdir. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi (DENIZOT ve LANG, 1986).

2.9. İstatiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen sonuçlar SPSS 9.05 (1999) istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapıldı; istatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulanıp, veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

3. BULGULAR

3.1. İnsülin Değerleri

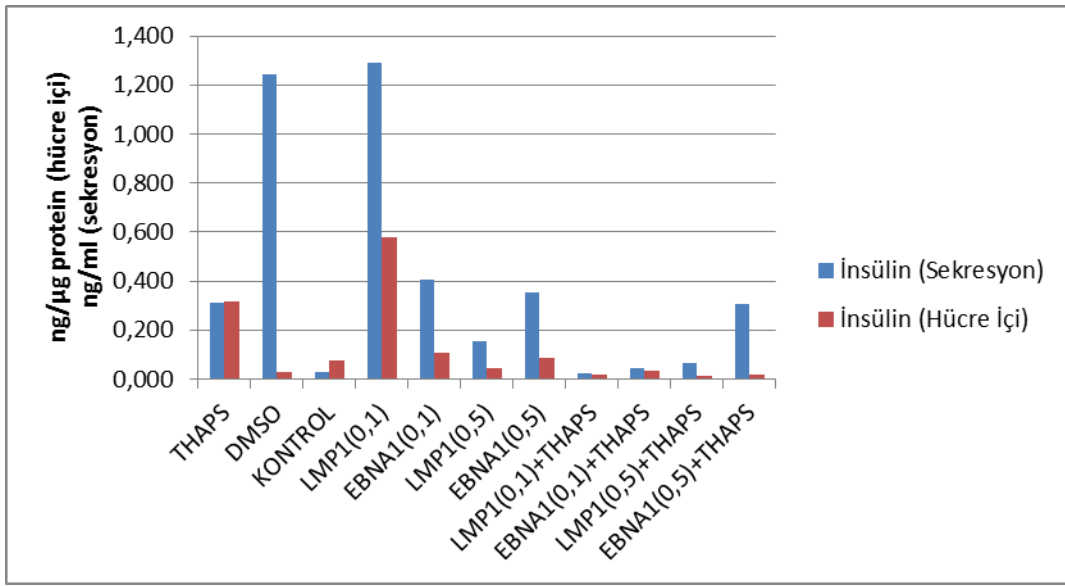
Thapsigargin grubunda (ER stres grubu) kontrol grubuna nazaran hem hücre içi insülin hem de sekrete insülin konsantrasyonlarında istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde artış tesbit edilmiştir. Thapsigargin ile ER stres modeli oluşturulmuş ve EBV rekombinant protein uygulanmış olan gruplarda ise thapsigargin grubuna göre hücre içi ve dışı insülin konsantrasyonlarında (insülin sentez ve salınımında) istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde –EBNA1(0,5)+THAPS grubunu hariç- düşüşler tesbit edilmiştir.

Tablo 3. Hücre içi (lizat) ve sekrete (medyum) insülin konsantrasyonları.

GRUP	İNSULİN KONSANTRASYONU	
	Hücre içi İnsülin (ng/µg protein)	Sekrete İnsülin (ng/ml)
THAPS	0,314±0,0787 ^c	0,313±0,106 ^b
DMSO	0,027±0,013 ^a	1,245±0,215 ^c
KONTROL	0,073±0,017 ^{a,b}	0,026±0,004 ^a
LMP1(0,1)	0,58±0,164 ^d	1,293±0,176 ^c
EBNA1(0,1)	0,108±0,012 ^b	0,407±0,072 ^b
LMP1(0,5)	0,042±0,009 ^{a,b}	0,152±0,046 ^a
EBNA1(0,5)	0,085±0,016 ^{a,b}	0,353±0,079 ^b
LMP1(0,1)+THAPS	0,016±0,003 ^a	0,021±0,004 ^a

EBNA1(0,1)+THAPS	0,031±0,007 ^{a,b}	0,043±0,008 ^a
LMP1(0,5)+THAPS	0,0138±0,003 ^a	0,064±0,014 ^a
EBNA1(0,5)+THAPS	0,0184±0,005 ^a	0,307±0,088 ^b

EBV rekombinant proteinlerinden LMP1'in 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta; insülin sentez ve salınımında kontrol grubuna nazaran istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde artışlar tesbit edilmiştir. Yine EBNA1 rekombinant proteininin 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta ise sadece insülin salınımında (sekretre insülin) kontrol grubuna nazaran istatistiki bir artış söz konusu olmuştur (Şekil 6). Bu değişikliklerle alakalı tartışma bölümünde ayrıntılı yorumlar tutulmuştur.



Şekil 6. Hücre içi/dışı insülin konsantrasyonları. KONT: Kontrol grubu, DMSO: Dimetil sülfoksit grubu, THAPS: Thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu.

3.2. Real Time QRT-PCR mRNA Ekspresyon Düzeyleri

3.2.1. Beta hücre proliferasyonundan sorumlu genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri

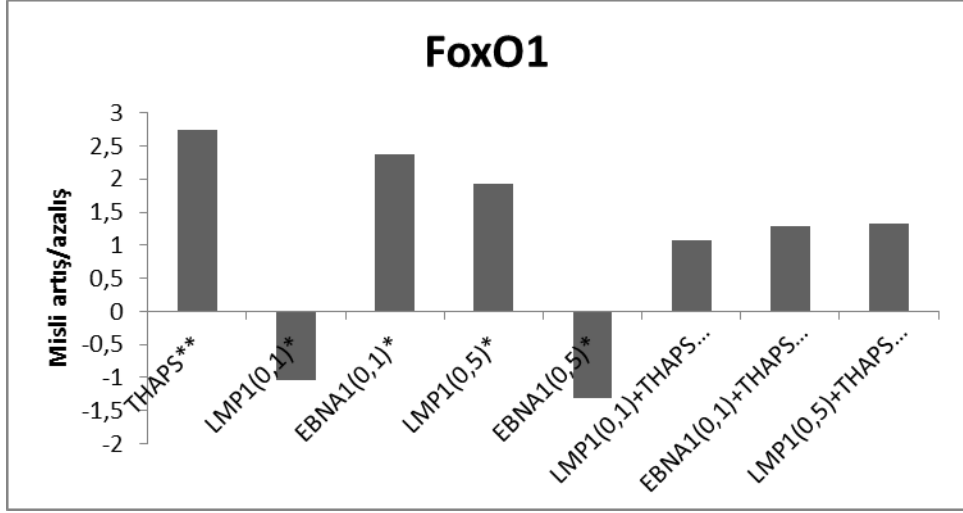
Beta hücre proliferasyonundan sorumlu oldukları literatür verilerince belirtilen (FoxO1, PDX-1, Wnt-4, TCF7L2 ve β -Katenin) genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri; thapsigargin grubunda kontrol grubuna göre FoxO1'i 2,75 misli, PDX-1'i 2,05 misli, Wnt-4'ü 2,23 misli, TCF7L2'yi 7,16 ve β -Katenin'i 15,24 kat artırmıştır. Epstein Barr Virus

rekombinant proteinleri EBNA1 ve LMP1 proteinlerinden proliferasyonu en iyi uyaran dozun EBNA1'in 0,5 ppm lik dozu olduğu sonucu ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinden anlaşılmıştır (Tablo4). Bu bakımdan EBNA1 0,5 ppm'lik dozda uygulanan deney grubunda kontrol grubuna göre; FoxO1, PDX1, Wnt4, TCF7L2 ve β -Katenin genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini sırasıyla 2,37 misli, 6,48 misli, 4,25 misli, 3,8 misli ve 1,4 misli artırmıştır. (Tablo 4, Şekil 7,8,9,10,11). Aynı şekilde EBNA1 proteininin 0,5 ppm'lik uygulandığı ve deneysel ER stres modeli geliştirilmiş olan grupta (EBNA1(0,5)+Thaps grubu) thapsigargin grubuna nazaran aynı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde β -Katenin hariç sırasıyla 1,31 misli, 2,26 misli, 1,4 misli ve 2,1 misli artışlar gösterilirken, aydınlatılmaya muhtaç olduğunu düşündürecek bir biçimde β -Katenin'i ise 4,59 misli baskılamıştır (Şekil 9, Tablo 4). Diğer taraftan LMP1 rekombinant proteininin 0,1ppm'lik ve 0,5 ppm'lik uygulamalarında hücre proliferasyonunu artırıcı kayda değeri sonuçlara ulaşılammıştır.

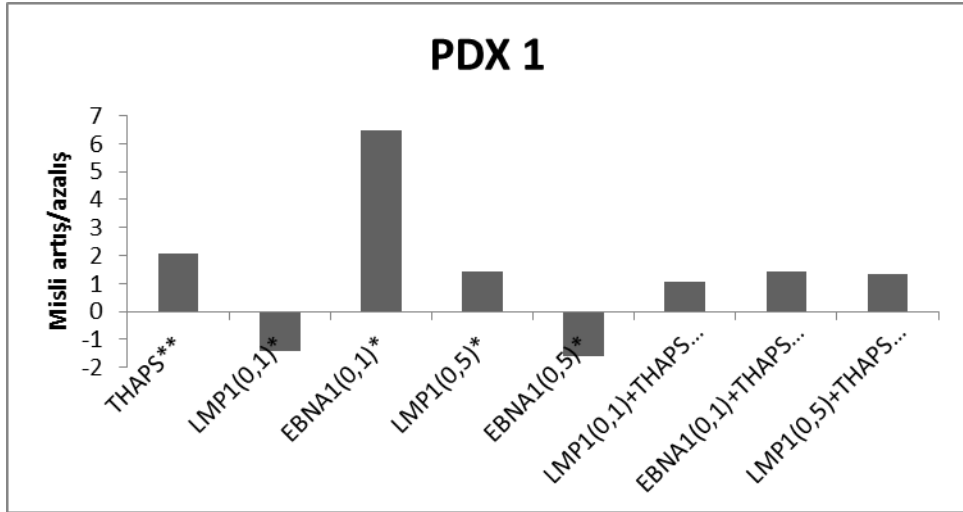
Tablo 4. Beta hücre proliferasyonu, apoptozu ve ER stresi ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri (misli değışiklik#).

	THAPS**	LMP1(0,1)*	EBNA1(0,1)*	LMP1(0,5)*	EBNA1(0,5)*	LMP1(0,1)+THAPS***	EBNA1(0,1)+THAPS***	LMP1(0,5)+THAPS***	EBNA1(0,5)+THAPS***
GRP 78	6,63	-7,75	-1,33	-5,75	-3,89	1,87	-4,33	-5,46	-3,59
PDX 1	2,05	-1,44	6,48	1,41	-1,58	1,05	1,45	1,35	2,26
TNF α	-1,14	-1,13	2,47	-1,01	1,12	-2,02	-3,44	-2,14	-1,19
Wnt 4	2,23	-1,54	4,25	1,43	-1,61	1,18	-1,06	1,1	1,4
p 53	5,61	1,13	9,41	1,51	-1,13	1,31	1	1,2	1,95
ATF 6	19	1,42	1,85	2,7	-1,13	1,64	1,92	1,52	1,66
ATF 4	10,62	-1,92	4,62	1,72	-1,21	1,91	2,17	1,38	2,57
CAS 3	3,91	1,00	12,78	2,18	-1,09	-1,05	-1,12	-1,09	-1,07
Bcl-2	1,28	-1,12	2,05	1,35	-1,38	-1,24	-1,56	-1,2	-1,2
CAS 8	-1,31	2,69	5,66	2,28	1,28	-16,67	-44,32	-63,26	-18
FoxO1	2,75	-1,04	2,37	1,92	-1,31	1,07	1,28	1,32	1,31
CAS 12	-1,01	1,12	1,31	-1,36	1,16	-1,14	1,05	-1,17	1,4
CHOP	8,05	-1,65	4,47	2,02	-1,03	1,61	2,28	2,02	2,79
JNK	4,02	1,37	4,5	1,58	-2	1,05	1,38	1,35	1,38
NFkB	3	10,8	154,34	1,13	-1,91	-97	-34,85	-83,67	-39,85
TCF7L2	7,16	1,06	3,8	1,66	-1,3	1,78	1,35	1,42	2,1
PERK	15,03	1,06	1,23	2,22	1,15	2,03	3,5	2,66	2,71
BCL-xL	1,25	10,5	24,02	2,45	-7,17	-23,2	-43,11	-54,56	-20,29
IFN γ	-2,01	-1,55	2,25	1,16	-1,21	1,55	2,32	1,72	4,19
IL - 6	2,63	-2,09	4,82	1,7	-1,1	2,4	2,28	-1,43	9,15
β Katenin	15,24	-1,1	1,4	2,32	-1,23	-5,87	-4,19	-6,75	-4,59
p35	3,78	-1,13	7,39	1,52	-1,42	1,11	1,12	1,24	2,32
Bax	2,63	1,34	10,48	1,7	-1,12	-1,17	-1,42	-1,33	-1,09

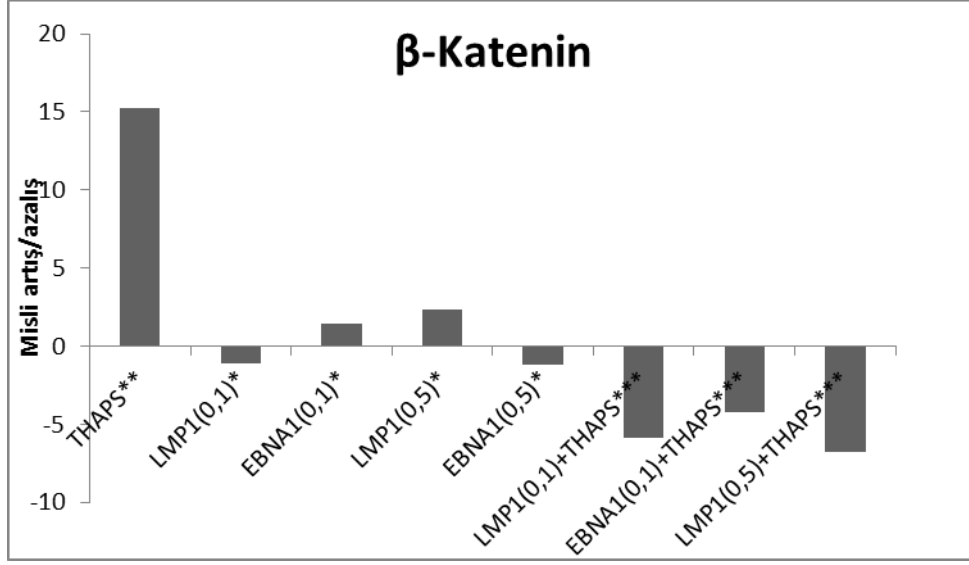
*: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre. KONT: Kontrol grubu, DMSO: Dimetil sülfoksit grubu, THAPS: Thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm'lik Latent Membrane Protein1 grubu, EBNA1(0,1): 0,1ppm'lik Epstein Barr Virus Nuclear Antigen1 grubu, LMP1(0,5): 0,5 ppm'lik Latent Membrane Protein1 grubu, EBNA1(0,5): 0,5 ppm'lik Epstein Barr Virus Nuclear Antigen1 grubu #: Misli değışiklikler uyarılma (+) ve baskılanma (-) olarak ifade edilmiştir.



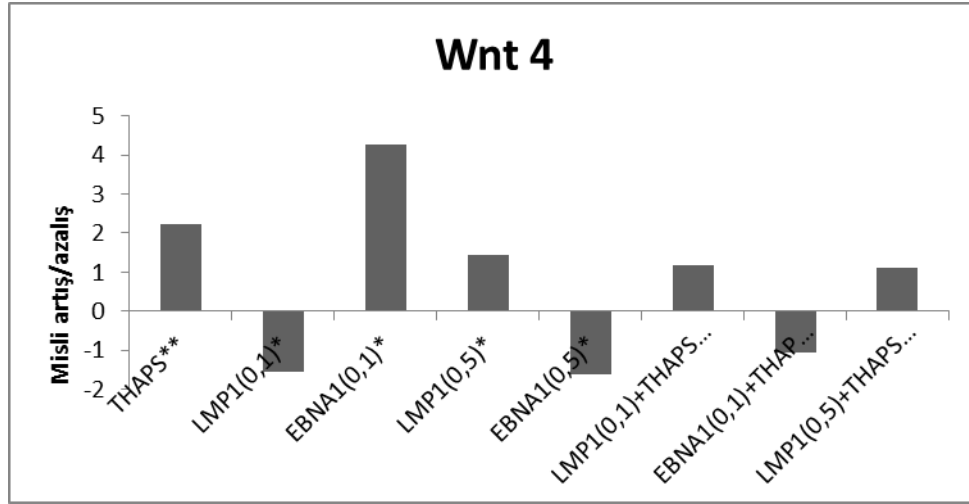
Şekil 7. FoxO1 mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



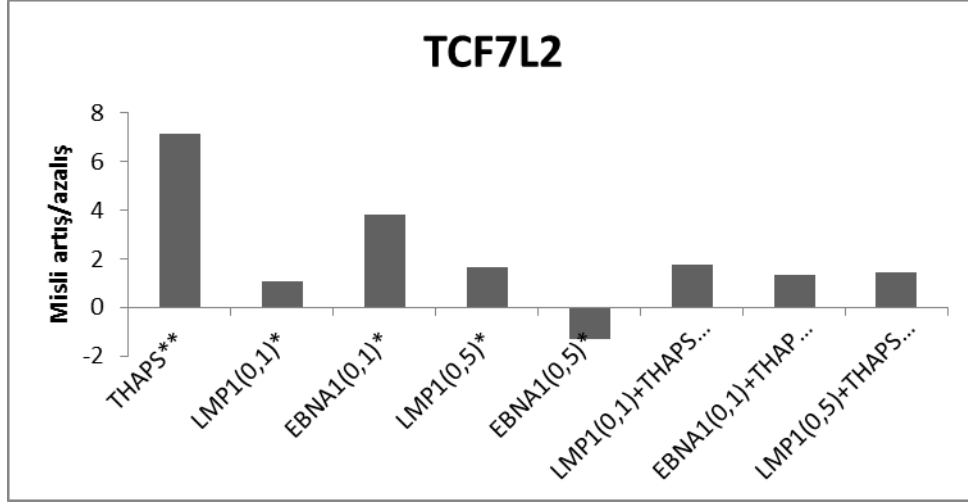
Şekil 8. PDX 1 mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 9. B-kenenin mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



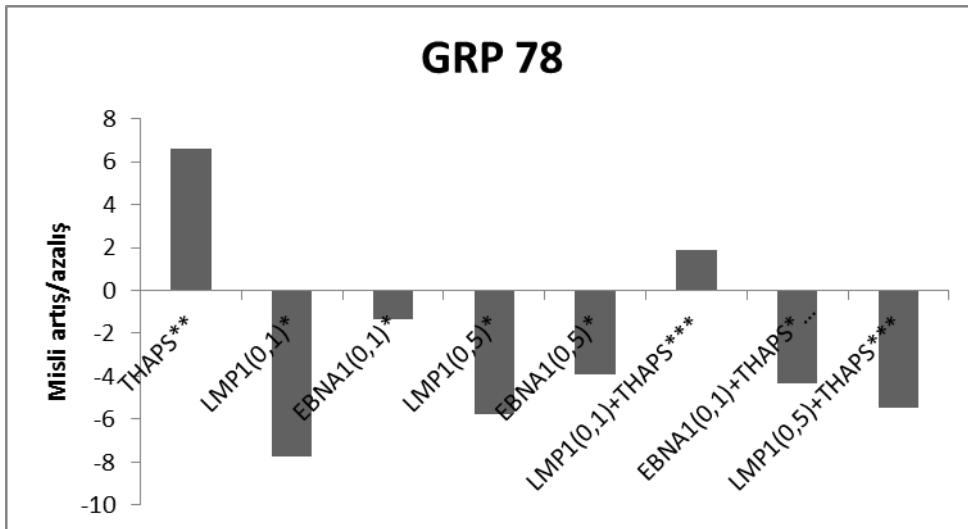
Şekil 10. Wnt-4 mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 11. TCF7L2 mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

3.2.2. ER stresi belirteçleri olan genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri

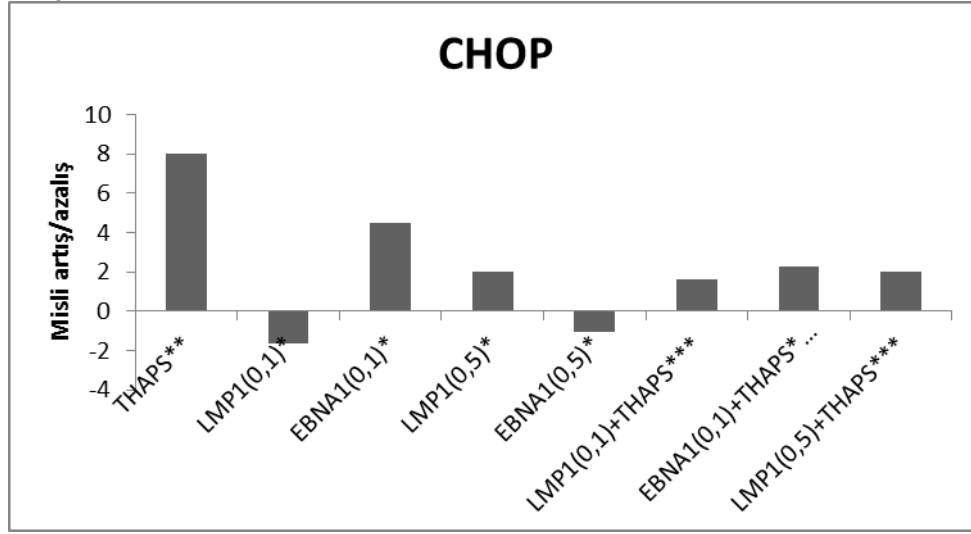
GRP78 geni ER stres göstergesi olarak kabul görmüş ER stres markerlarından biridir. Bu bakımdan thapsigargin grubunda GRP78 mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 6,63 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak GRP78 geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,87 misli, -4,33 misli, -5,46 misli ve -3,59 misli azalış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. GRP78 mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

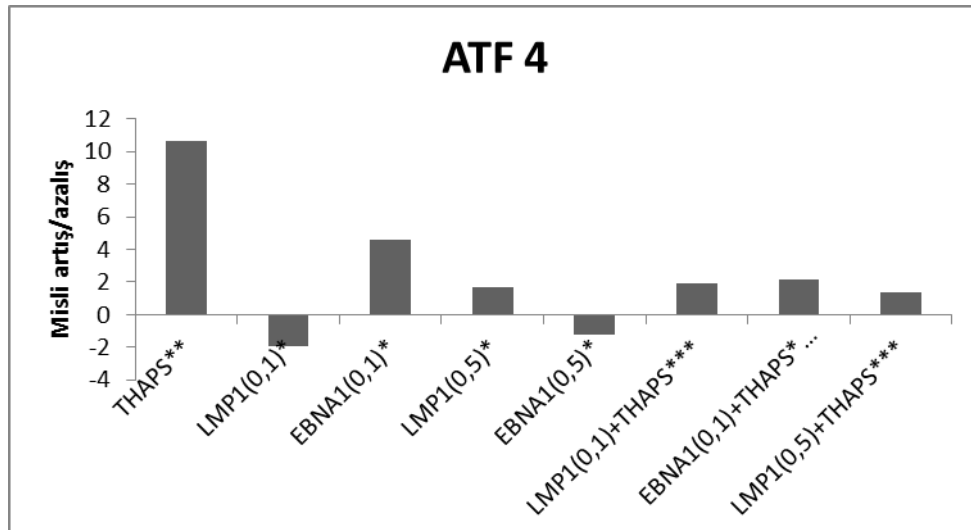
CHOP geni ER stres göstergesi olarak kabul gören bir diğer ER stres markerlarıdır. Bu bakımdan thapsigargin grubunda CHOP mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 8,05 misli artış göstermiştir. ER stres markerı olarak CHOP geni mRNA

ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,61 misli, 2,28 misli, 2,02 misli ve 2,79 misli azalış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4 ve Şekil 13).



Şekil 13. CHOP mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

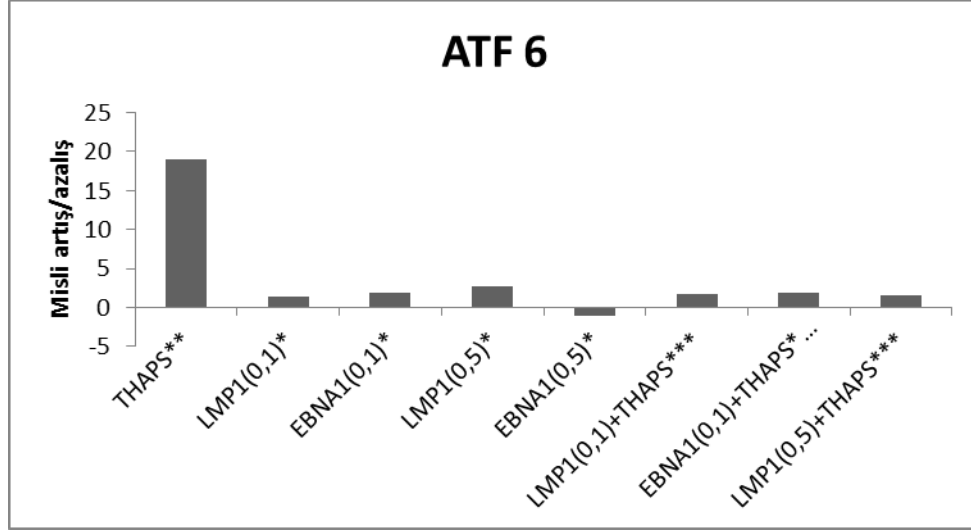
Bir başka ER stres belirteci ATF4 genidir. Bu bakımdan thapsigargin grubunda ATF4 mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 10,62 misli artış göstermiştir. ER stres markeri olarak ATF4 geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,91 misli, 2,17 misli, 1,38 misli ve 2,57 misli artış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4 ve Şekil 14).



Şekil 14. ATF-4 mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

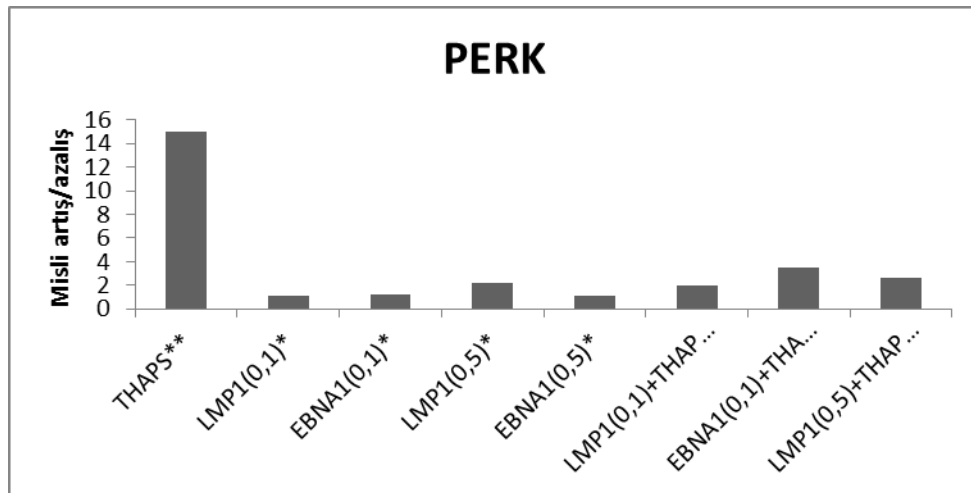
Bir diğer ER stres belirteci olarak ATF6 geni mRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde thapsigargin grubunda ATF4 mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol

grubuna göre 19 misli artış göstermiştir. ER stres markeri olarak ATF6 geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 1,64 misli, 1,92 misli, 1,52 misli ve 1,66 misli artış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4 ve Şekil 15).



Şekil 15. ATF-6 mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

ER stres belirteci olarak son ele alınan gen PERK olmuştur. Thapsigargin grubunda PERK mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 15,03 misli artış göstermiştir. ER stres markeri olarak PERK geni mRNA ekspresyon düzeyleri LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5) +thapsigargin, EBNA1 (0,1) +thapsigargin ve EBNA1 (0,5) +thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre sırasıyla; 2,03 misli, 3,5 misli, 2,66 misli ve 2,71 misli artış olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4 ve Şekil 16).

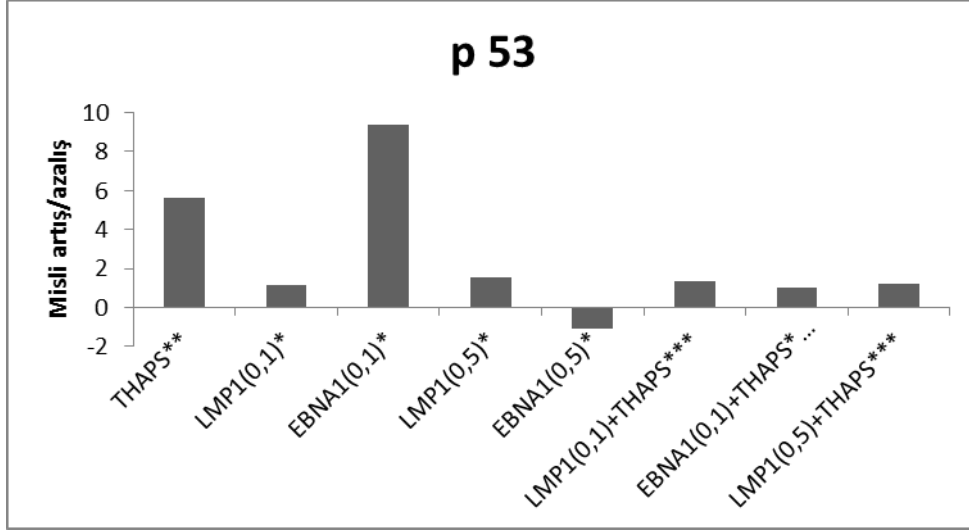


Şekil 16. PERK geni mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

3.2.3. Apoptozla ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri

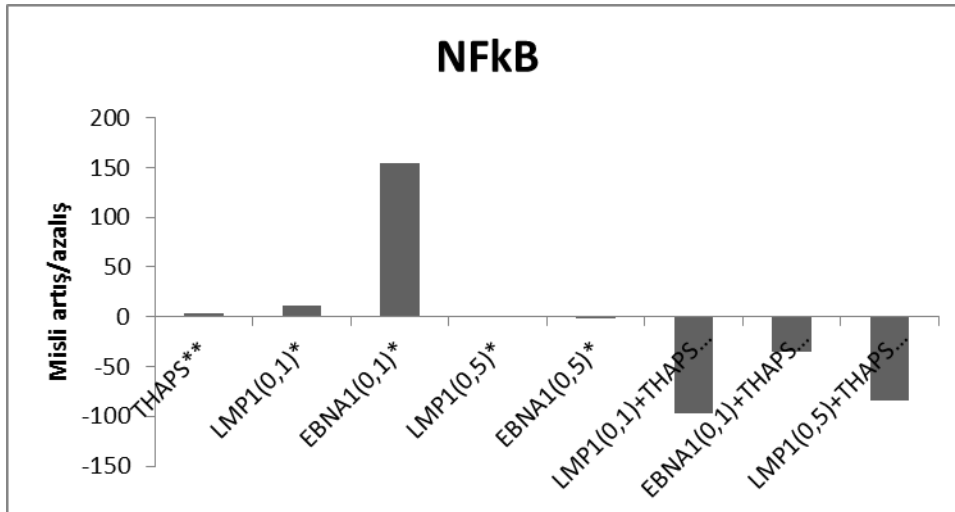
Proapoptotik oldukları literatür özetinde ilgili literatürlerce belirtilen cas3, cas8, cas12, TNF- α , p53, JNK, IFN- γ ve bax genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildiğinde ilgili genler LMP1(0,1) grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla; 1,00 misli (değişim yok), 2,69 misli, 1,12 misli, -1,13 misli, 1,13 misli, 1,37 misli, -1,55 misli ve 1,34 misli artış/azalış tesbit edilmiştir (Tablo4, Şekil 17,19,21,22,23,24,29). Aynı şekilde EBNA1 (0,1) grubunda ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna nazaran; 12,78 misli, 5,66 misli, 1,31 misli, 2,47 misli, 9,41 misli, 4,5 misli, 2,25 misli ve 10,48 misli artış olduğu tesbit edilmiştir. LMP1 ve EBNA1'in 0,5 ppm dozda uygulandığı gruplarda ise ilgili proapoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde ılımlı artış ve azalışlar gözlemlenmiştir. (Tablo 4 ve Şekil 17). Aynı genler için thapsigargin grubunda DMSO kontrol grubuna nazaran 3,91 misli, -1,31 misli, -1,01 misli, -1,14 misli, 5,61 misli, 4,02 misli, -2,01 misli ve 2,63 misli artış/azalışlar tesbit edilmiştir. LMP1 (0,05)+Thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna göre ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla; -1,09 misli, -63,26 misli, -1,17 misli -2,14 misli, 1,2 misli, 1,35 misli, 1,72 misli, -1,33 misli artış/azalışlar tesbit edilmiştir. EBNA1 (0,1)+thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna göre ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla;-1,12 misli, -44,32 misli, 1,05 misli, -3,44 misli, 1,00 misli (değişim yok), 1,38 misli, 2,32 misli ve -1,42 misli artış/azalışlar tesbit edilmiştir. Diğer taraftan proinflamatuvar belirteçler olarak IL-6 ve IFN- γ mRNA ekspresyon düzeylerinde; çalışmada kullanılan ilgili rekombinant proteinler açısından anlamlı olabilecek sonuçlara ulaşılamamıştır (Tablo4, Şekil 20,27).

Antiapoptotik genler olarak çalışmaya dahil edilen Bcl2, Bcl-xL ve p35 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildiğinde Thapsigargin grubunda DMSO Kontrol grubuna göre ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; 1,28 misli, 1,25 misli ve 3,78 misli artış tesbit edilmiştir (Şekil 25,26,28). LMP1 (0,5) +thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna göre ilgili antiapoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; -1,2 misli, -54,56 misli ve 1,24 misli azalış/artış tesbit edilmiştir (Şekil 25,26,28). EBNA1 (0,1)+thapsigargin grubunda thapsigargin grubuna nazaran aynı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; -1,56 misli, -43,11 misli ve 1,12 misli azalış/artış tesbit edilmiştir (Şekil 25,26,28). LMP1 (0,1) grubunda kontrol grubuna göre ilgili anti-apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; -1,12 misli, 10,5 misli,-1,13 misli artış/azalışlar tesbit edilirken aynı genlerde EBNA1 (0,1) grubunda kontrol grubuna nazaran ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; 2,05 misli, 24,02 misli ve 7,39 misli artışlar tesbit edilmiştir.

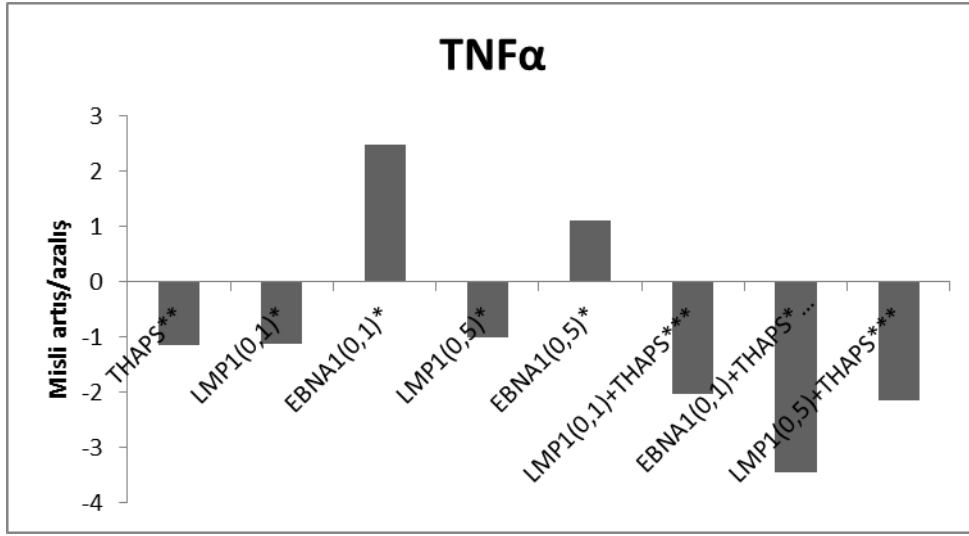


Şekil 17. p53 mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

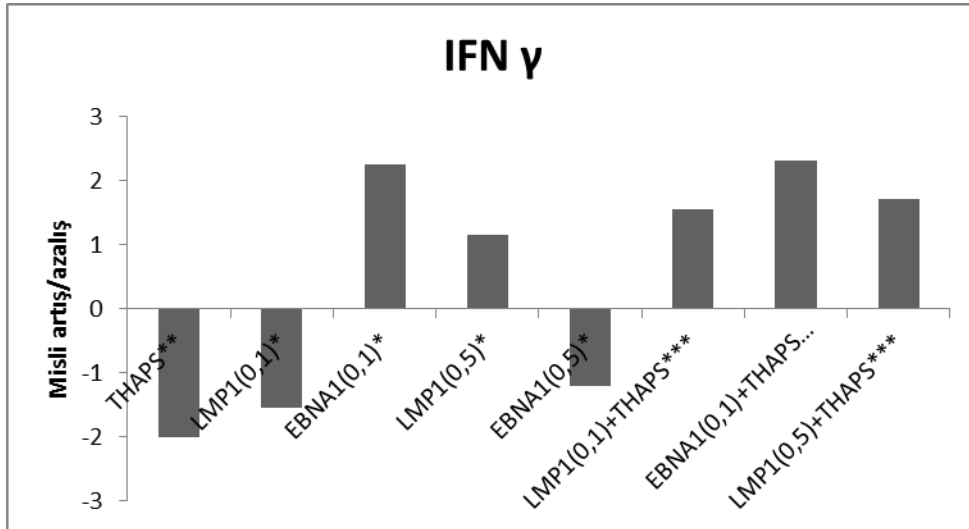
THAPS grubunda NF κ B mRNA ekspresyon düzeyi DMSO kontrol grubuna göre 3 misli düzeyde uyarılmıştır. Buna karşın Thapsigargin ile kombine edilen LMP1 ve EBNA1 proteinlerinin 0,1 ve 0,5 pmm lik dozlarının uygulandığı gruplarda ise NF κ B mRNA ekspresyon düzeylerinde oldukça yüksek miktarlarda baskılanmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu açıdan LMP1 (0,1)+thapsigargin, LMP1 (0,5)+thapsigargin, EBNA1 (0,1)+thapsigargin ve EBNA1 (0,5)+thapsigargin gruplarında thapsigargin grubuna göre NF κ B mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla; -97 misli, -83,67 misli, -34,85 misli ve 39,85 misli baskılandığı tesbit edilmiştir. LMP1 ve EBNA1 rekombinant proteinlerinin tek başına uygulandıkları gruplar olan LMP1 (0,1), LMP1 (0,5), EBNA1 (0,1) ve EBNA1 (0,5) gruplarında NF κ B mRNA ekspresyon düzeylerinde sırasıyla; 10,8 misli, 154,34 misli, 1,13 misli ve -1,91 misli artış/azalışlar gözlemlenmiştir. (Tablo 4 ve Şekil 18).



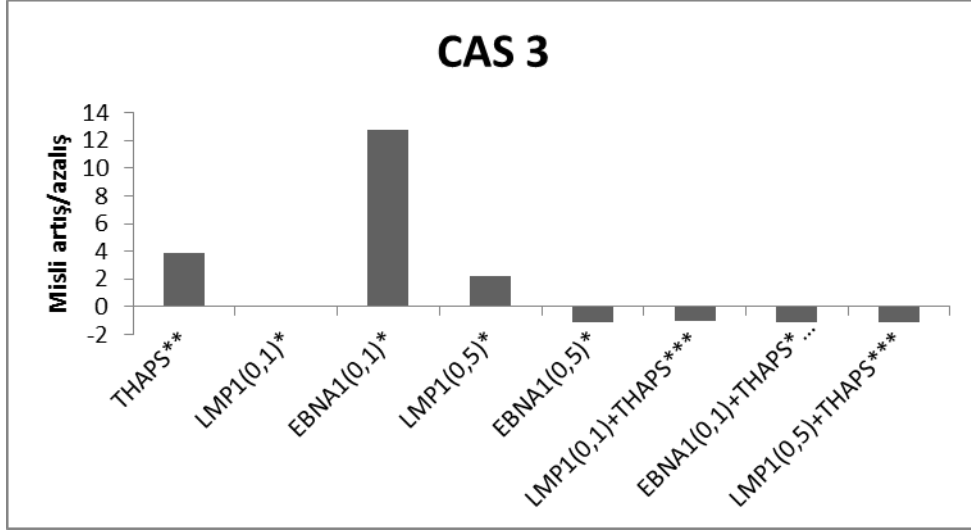
Şekil 18. NF κ B mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



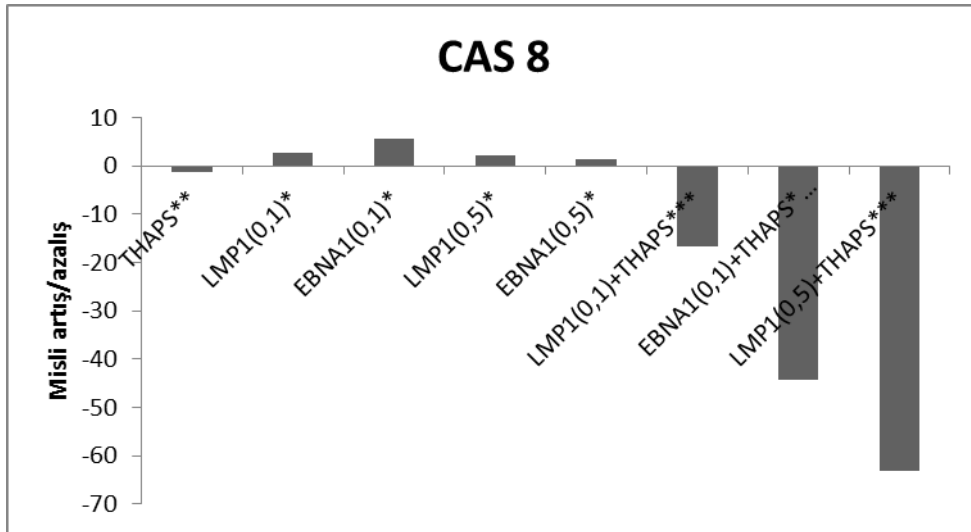
Şekil 19. TNFα mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



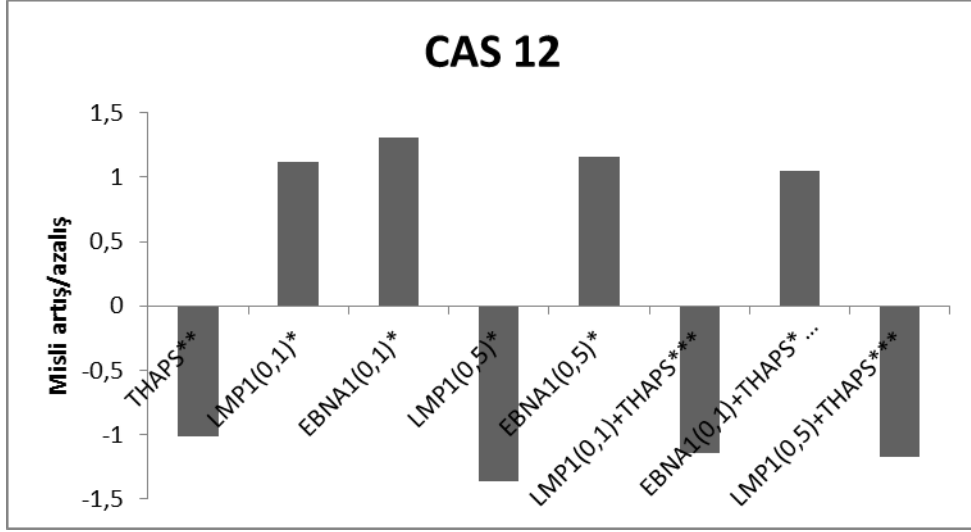
Şekil 20. IFN-γ mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



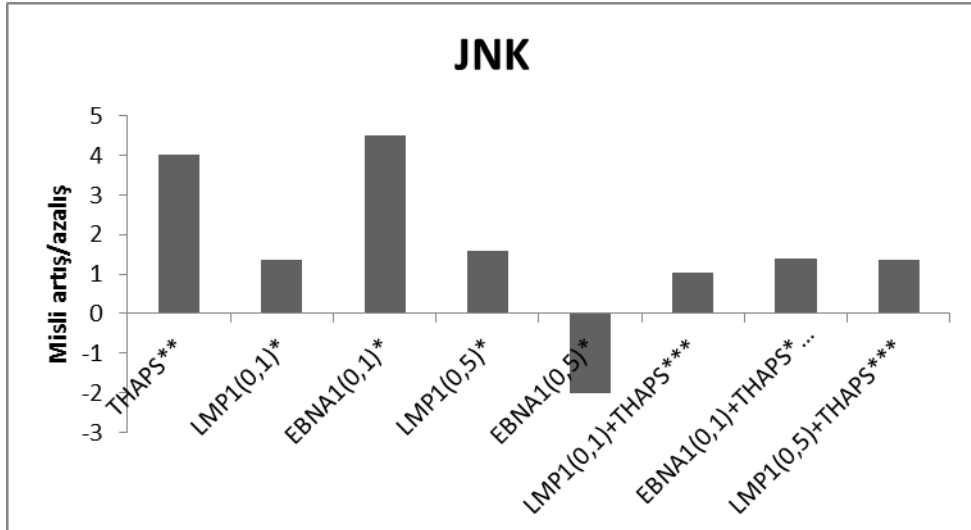
Şekil 21. Kaspaz-3 (CAS-3) mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



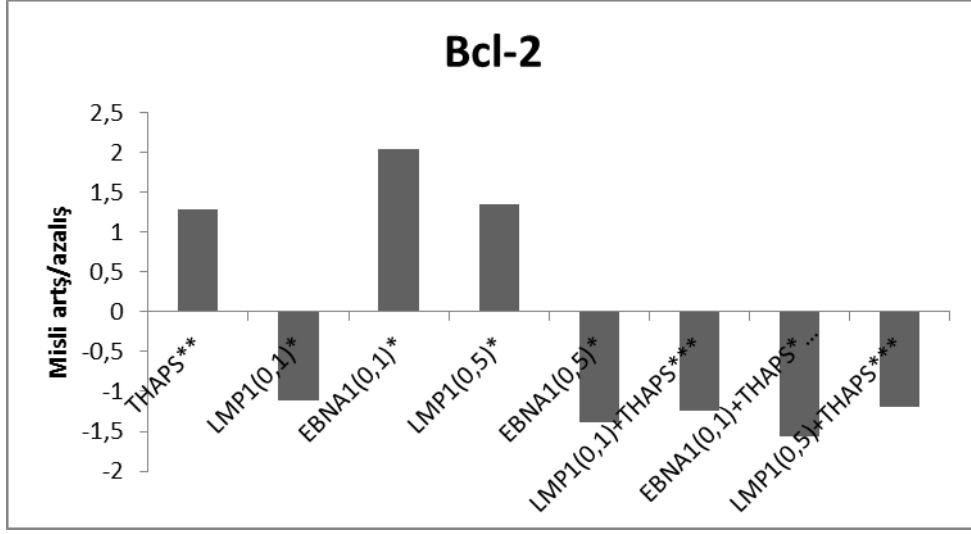
Şekil 22. Kaspaz-8 (CAS-8) mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



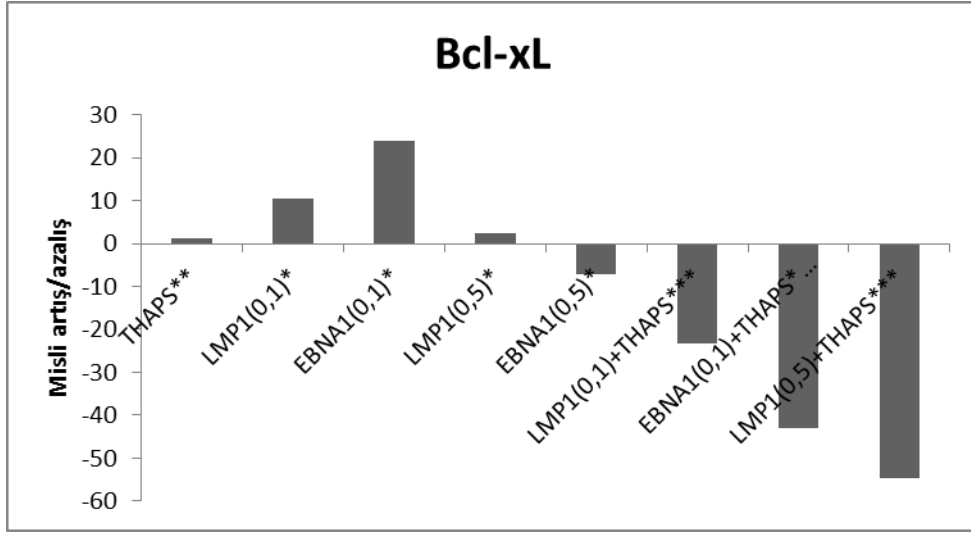
Şekil 23. Kaspaz-12 (CAS-12) mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



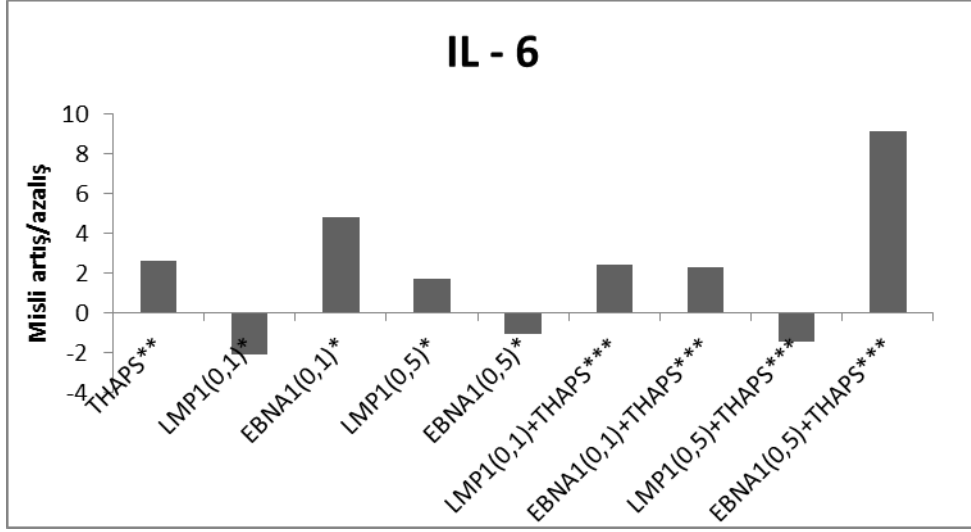
Şekil 24. JNK mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



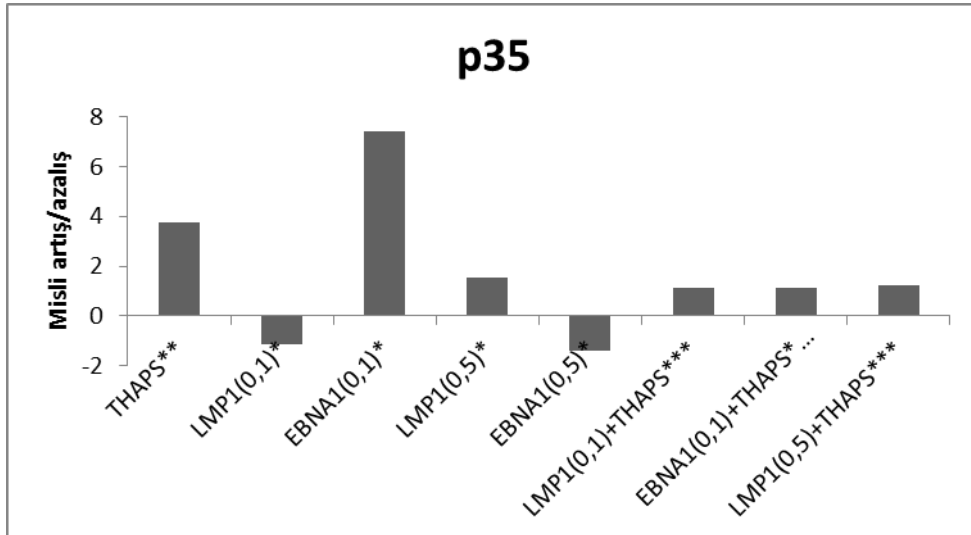
Şekil 25. Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



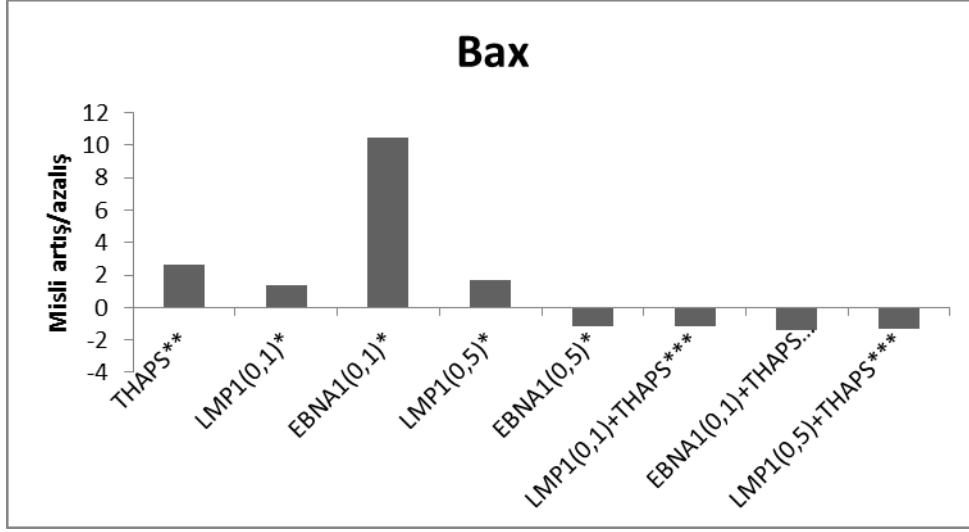
Şekil 26. Bcl-xL mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 27. IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 28. p35 mRNA ekspresyon düzeyleri. *:Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar



Şekil 29. Bax mRNA ekspresyon düzeyleri. *: Kontrol grubuna göre, **: DMSO Kontrol grubuna göre, ***Thapsigargin grubuna göre misli artış/azalışlar

3.4. TUNEL ASSAY SONUÇLARI

TUNEL Assay çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı kullanılarak yapılmıştır. TUNEL Assay çalışması için; iki farklı kit (Roche; In Situ Cell Death Detection Kit, POD ve Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; Lot:2243505) ile toplamda 7 deneme yapılmıştır. Her bir deneme sonucunda yapılan mikroskopik analizlerde apoptotik hücelere rastlanamamıştır.

3.3. COMET Analiz Sonuçları

DNA hasarı comet yöntemi ile floresan mikroskopunda analiz edilirken her lamda rastgele seçilmiş 100 hücre görsel skorumla (arbitrary unit) ile değerlendirildi. Hücrelerdeki DNA hasar derecesini belirlemek için her bir hücreye (hücrelerde görülebilecek kuyruk göçü, kuyruk momenti, kuyruk yoğunluğu ve baş çapı gibi değişiklikler göz önünde bulundurularak) verilen skorlar (0, 1, 2, 3) aracılığı ile 0-400 AU arasında değişebilecek bir değerlendirme yapıldı.

Hücelere %40 DMSO'da çözülen 10^{-8} mol/L thapsigargin uygulaması sonucunda (THAPS grubu) meydana gelen DNA hasar skoru $69,4 \pm 3,6$ AU olarak tespit edildi. Thapsigargin uygulaması sonucu oluşan DNA hasarının, kontrol ve thapsigarginin çözücüsü DMSO uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu görüldü (Tablo 4 ve Şekil 30).

ER stres tetikleyicisi olarak Thapsigarginin uygulandığı grupta karşımıza çıkan DNA hasarı araştırmamız kapsamında oluşturulan EBNA1(0,1)+Thaps. Grubu hariç diğer tüm gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Thapsigarginin bu etkisini kullandığımız rekombinant proteinlerin ne derece etki ettiklerini anlamamız için ilgili proteinlerin thapsigargin ile beraber uygulandıklara gruplar ele alındığında EBNA1(0,1)+Thaps. Grubu hariç diğer tüm uygulamalar thapsigarginin neden olduğu DNA hasarını istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde azaltmayı başarmıştır. Bu açıdan thapsigarginin neden olduğu DNA hasarını baskılamada en iyi etkiyi sergileyen iki grup LMP(0,5)+Thaps.ve EBNA1(0,5)+thapsigargin grupları olmuştur. İlgili gruplarda sırasıyla görsel comet skorları $13,2\pm 3$ ve $9,2\pm 1,9$ olarak tesbit edilmiştir. (Tablo 5 ve Şekil 30).

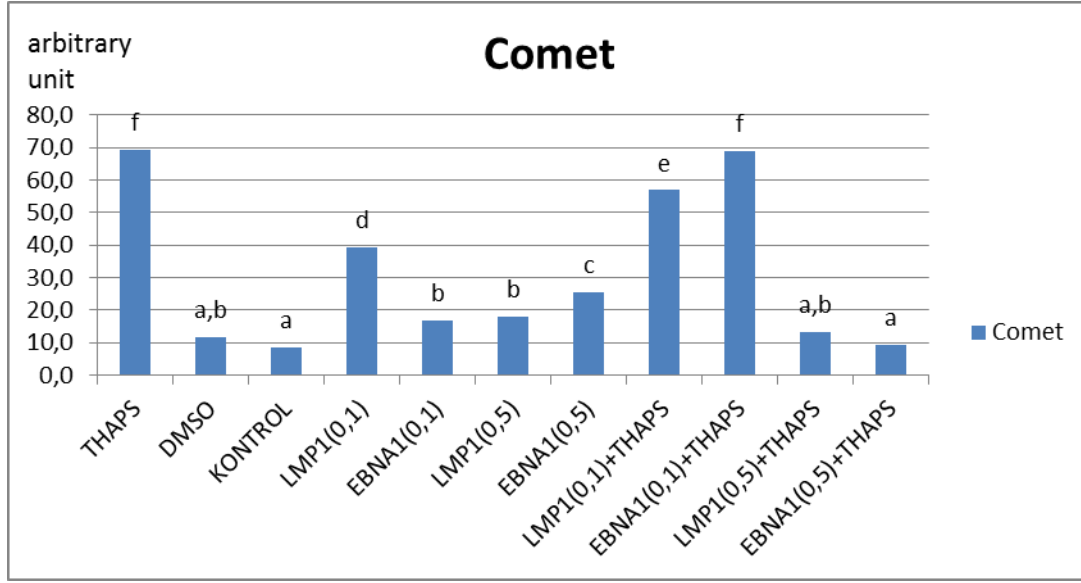
Başka bir açıdan ise LMP1 ve EBNA1 rekombinant preoteinlerinin uygulandığı tüm gruplarda da kontrol grubuna nazaran istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde yine DNA hasarlarının oluştuğu tesbi edilmiştir.

Tablo 5. Comet skorları.

Gruplar	DNA Hasarı (AU)
THAPS	$69,4\pm 3,6^f$
DMSO	$11,8\pm 1,7^{a,b}$
KONTROL	$8,6\pm 1,1^a$
LMP1(0,1)	$39,4\pm 11,3^d$
EBNA1(0,1)	$16,8\pm 0,8^b$
LMP1(0,5)	$18\pm 3,5^b$
EBNA1(0,5)	$25,4\pm 2,7^c$
LMP1(0,1)+THAPS	$56,8\pm 0,8^e$
EBNA1(0,1)+THAPS	69 ± 11^f
LMP1(0,5)+THAPS	$13,2\pm 3^{a,b}$
EBNA1(0,5)+THAPS	$9,2\pm 1,9^a$

a, b, c, d,e,f,: Farklı üstlü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatikselsel olarak önemlidir ($p<0.05$). AU: Arbitrary Unit, KONT: Kontrol grubu, DMSO: Dimetil sülfoksit grubu, THAPS: Thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,1): 0,1ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,5): 0,5ppm latent membran protein1 grubu, LMP1(0,1)+Thaps.: 0,1ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu, LMP1(0,5)+Thaps.: 0,5ppm latent membran protein1 + thapsigargin grubu.

Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde LMP1 ve EBNA1 rekombinant proteinlerinin thapsigarginle oluşturulan DNA hasarını azaltmada istatistiki açıdan anlamlı olacak şekilde etkili olduğu tesbit edilmiş olmasına rağmen tek başlarında kullanıldıkların ise kontrol grubuna nazaran DNA hasarı oluşturmada da istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde etkili olduğu belirlendi (Tablo 5 ve Şekil 30).



Şekil 30. Comet skorları. Farklı harfler ile sembolize edilen gruplar arasında istatistikî açıdan anlamlı farklılıklar mevcuttur.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

ER stres markerları olan GRP78, ATF4, ATF6, CHOP ve PERK genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde THAPS grubunda DMSO KONT grubuna nazaran sırasıyla; 6,63 misli, 10,62 misli, 19 misli, 8,05 misli ve 15,03 misli artış olduğu gözlenlenmiştir. Bu bize; projede deneysel ER stres modeli oluşumunun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Thapsigargin uygulaması ile ilgili ER stres markerı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki bu artış projede kullanılan EBV rekombinant protein uygulamaları ile önemli ölçüde değişiklikler göstermiştir. Proje sonuç raporunun bulgular kısmında da değinilen miktarlarda; rekombinant proteinlerin (LMP1 ve EBNA1) uygulanmaları ile ER stres markerı genlerin mRNA ekspresyon düzeylerin de önemli miktarlarda baskılanmalar olduğu tesbit edilmiştir. Bu bakımdan proje sonuç raporunda LMP1 ve EBNA1 için ER stresini baskılamada ya da etkilerini azaltma da yeni umutlar verme potansiyeline sahip olduğu yorumu tutulmuştur.

Literatür özetinde de belirtildiği gibi ER stresi pankreatik beta hücre kayıplarına neden olarak beta hücre kitlesinde azalmalara neden olmakta bu da kişileri eksojen insüline bağımlı hala getirmektedir. Bu açıdan ilgili sonuçlar ele alındığında LMP1 ve EBNA1 protein uygulamaları anti ER stressorü olarak antidiyabetik tedavide kullanılıp kullanılamayacağı konusunun araştırılması gerektiği önümüze çıkan ve sorulması gereken sorular arasında dikkat çekmektedir.

Bir başka açıdan ER stresi ele alındığında; THAPS grubunda mRNA ekspresyon düzeylerinde artış tesbit edilen proapoptotik genlerden p53 ve JNK genlerinin (sırasıyla; 5,61 misli ve 4,02 misli artış) LMP1 ve EBNA1 protein uygulamaları ile p53 geninde yaklaşık 4 kat ve JNK geninde ise yaklaşık 3 katlık bir azalmaya neden olduğu tesbit edilmiştir. Bu sonuç bu bakımdan bize LMP1 ve EBNA1 için ER stresinin neden olduğu apoptotik belirteçlerin yüksekliğini baskılaması bakımından ileriki çalışmalarla bu baskılanmanın nedenlerinin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Pankreatik beta hücre proliferasyonu açısından en dikkat edici bulgulara EBNA1 proteininin 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta rastlanmıştır. Bu bakımdan ilgili proteinin ilgili dozu proliferasyondan sorumlu oldukları bilinen genler olan; PDX1, Wnt4, FoxO1, TCF7L' ve β -Katenin genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini sırasıyla; 6,48 misli, 4,25 misli, 2,37 misli, 3,8 misli ve 1,4 misli artırmıştır. LMP1 proteininin 0,1 ppm ve 0,5 ppm lik dozları için böyle bir tablo söz konusu olmamıştır. Bu sonuçlar da bize göstermektedir ki LMP1 proteini ER stresinin bertarafı açısından EBNA1 ile ön plana çıkmıştır ve fakat aynı derece proliferasyon üzerin etkisinden söz edilememiştir.

İnsülin sentez ve salınımı açısından LMP1 ve EBNA1 proteinleri değerlendirildiğinde karşımıza proliferasyon sürecini hızlandıran genlere ait mRNA ekspresyon sonuçlarıyla paralellik teşkil edecek bulgulara ulaşılmıştır. Bu bağlamda LMP1'in 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta insülin sentez ve salınımı kontrol grubuna nazaran istatistiki anlamlılık teşkil edecek şekilde uyarıldığı tesbit edilmiştir. Aynı şekilde EBNA1 proteininin 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta ise insülin salınımı kontrol grubuna nazaran istatistiki anlamlılık verecek şekilde yükseltildiği tesbit edilmiştir. Öte yandan EBNA1 (0,1) grubunda kontrol grubuna nazaran insülin sentezinin arttığı ve fakat bu artışın istatistiki bir önem arz etmediği tesbit edilmiştir. LMP1 ve EBNA1 proteinlerinin insülin sentez ve salınımını bu yönde değiştirmelerinin nedeni araştırıldığında karşımıza çıkan ilgi durumsalar LMP1 ve EBNA1 rekombinant proteinlerinin hem ER stresini baskılandıkları hem de hücre proliferasyonunu uyardıklarıdır. Ne var ki LMP1 ve EBNA1 proteinlerinin 0,1 ve 0,5 ppm dozda uygulanmaları bu yönde olumlu sonuçlar doğurmuş olsa da COMET analizlerinde karşımıza çıkan sonuçlar her iki proteininin de ilgili dozlarının DNA hasar oluşumuna neden olduğudur. İlgili proteinler bu açıdan ele alındığında DNA hasar oluşumuna neden olmalarının sebepleri açıklığa kavuşturulacak olursa ve bu durum kontrol altına alınabilirse gelecek çalışmalarda antidiyabetik viroterapik ajanlar olarak kullanılabilmesinin yolu açılabilir. Yine bu konuyla alakalı bir başka literatür verisinde; Gou Y., ve ark. (2014) yaptıkları araştırmada EBV ile enfekte edilmiş nasofaringial karsinoma hücrelerinde DNA hasarı ile EBV enfeksiyonları arasında bir korelasyonun

olduğunu göstermişlerdir. Bu bakımdan projede ortaya çıkan sonuçların literatür verileriyle de uyumluluk gösterdiği söylenebilir.

Ju Y. ark. 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, JNK aktivasyonunun baskılandığı durumlarda FoxO1 geninin de baskılanacağını göstermişlerdir. Bu projenin bulgular kısmında da değinildiği gibi EBNA1 proteininin 0,1 ppm dozu FoxO1 geninin mRNA ekspresyon düzeyini kontrol grubuna nazaran 2,37 misli artırırken 0,5 ppm'lik dozu -1,31 KAT baskılamıştır. Bu farklılığın nedeni olarak aynı gruptaki JNK gen aktivasyonlarına baktığımızda EBNA1 (0,1) grubunda JNK geni kontrole nazaran 2,37 misli artarken EBNA1 (0,5) grubunda -2,0 misli baskılamıştır. Bu bağlamda bu sonuçLAR Ju Y. ve ark.'nın verileri ile örtüşmektedir ve iki doz arasındaki proliferatif farklılığın da buradan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hayakawa J. ve ark. (2003)'nin yaptıkları çalışmada DNA hasarının JNK aktivasyonuna neden olduğunu comet assay ile göstermişlerdir. Çalışmamızda gösterilmiştir ki; EBNA1 (0,1) grubunda proje hedeflerine uygun doğrultuda proliferasyondan sorumlu genlerin aktivasyonu sağlanmıştır ancak ilgili protein DNA hasarına da neden olmuştur. Bu sonuç üzerinde durduğumuzda yukarıda verilen literatür verisinden yararlanarak ilgili sonuçla alakalı; EBNA 0,1 ppm dozda DNA hasarını kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak artırmıştır ve bu EBNA1 (0,1) grubunda JNK aktivitesinin kontrole göre 4,5 kat artışıyla sonuçlanmıştır. Yine literatür verilerinden edindiğimiz bilgilere göre; JNK'lar gen ekspresyonunu düzenleyen ve stres durumunda apoptozis ile hayatta kalma arasında verilecek karara katılan sinyal ileti proteinlerinin bir ailesidir. ER stresi JNK'ları IRE1 α ve IRE1 β üzerinden aktive eder. JNK aktivasyonunun ve p38 yolunun devamlılığı apoptozis sinyal düzenleyici kinaz (ASK1)'in aktivasyonunu gerektirir ki; bu, hücreyi apoptoza götürür (TOBIUME ve ark., 2001). EBNA1 (0,1) grubundaki kontrol grubuna nazaran 4,5 katlık JNK aktivasyonu aynı grupta proapoptotik genlerden olan p53, cas3 ve cas 8'in mRNA gen ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna nazaran dramatik şekilde sırasıyla; 9,41 misli, 12,78 misli ve 5,66 misli artırmıştır. Bu sonuçlar ilgili literatür verileri ile uyum göstermesi bakımından dikkate değer bulunmuştur. Eğer ileriye yönelik çalışmalarda, EBNA1 ve LMP1 için neden DNA hasarına ve proapoptotik genlerin ekspresyonuna neden oluyor sorusunun cevabı aranacak olursa bu bahsedilen noktanın bir başlangıç noktası olabileceği düşünülmektedir.

Laherty ve ark., (1992) ve Rowe ve ark. (1994) yaptıkları çalışmalara göre; LMP1'in lenfositlerdeki ekspresyonu, transkripsiyon faktörü NF-kB' nin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda da beta hücre kültüründe gösterilmiştir ki; LMP1 0,1 ppm dozda uygulandığı grupta Nfkb'nin mRNA ekspresyon düzeyini kontrol grubuna nazaran 10,8 kat artırmıştır. Ancak ilginç ve açıklayamadığımız ve üzerinde durulması

gerektiğini düşündüğümüz bir biçimde LMP1(0,1) +THAPS grubunda NFkB geninin ekspresyonunu -97 kat baskılanmıştır.

Tran T.M., ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın NFkB ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde EBNA1 (0,1) grubunda kontrol grubuna nazaran TNF- α ekspresyon düzeyi 2,47 misli artış gösterirken buna karşın NFkB mRNA ekspresyon düzeyi kontrol grubuna nazaran 154,34 misli dramatik bir artış göstermiştir.

De Leo A., ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada LMP1 proteinine ait geni LMP1 siRNA kullanarak gen susturması yaptıklarında antiproliferatif etkinliğin artırıldığını göstermişlerdir. Bu demek oluyor ki LMP1'in varlığı hücre proliferasyonu için önem arz etmektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde LMP1 (0,5) grubunda hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilen genlerin ekspresyon düzeylerinde artışların olduğu tespit edilmiştir. Ancak LMP1 (0,1) grubunda beta-katenin geni hariç bu artışlardan söz etmek mümkün olmamıştır.

Projede elde edilen bulgular ve literatür verilerinden elde edilen bilgiler ışığında; sonuç olarak EBV rekombinant proteinleri LMP1 ve EBNA1'in proliferasyondan sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerini artırdığı aynı zamanda ER stres markeri genlerin ekspresyon düzeylerini baskılayarak da ER stresinin neden olduğu beta hücre kayıplarının tersine döndürülmesinde avantaj sağlayabileceği ve bu bakımdan daha üst düzey çalışmalar ile desteklendiği takdirde antidiyabetik tedavilerde viroterapik ajanlar olarak kullanılabilmesinin yolunun açılması potansiyeli bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmanın handikapı olabileceğini düşündüğümüz bir sonucu ise ilgili proteinlerin DNA hasarına neden olmasıdır. Ancak literatür verileri incelendiğinde bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan bir çok ilacın da belirli dozlarda DNA hasarına uğrattıkları gözlemlenmiştir. Örneğin aspartam (Meier I. ve ark. 1990), atrofina (Yamada T., ve ark. 1997) ketamine (Rudin M., ve ark. 2005) vb. Bu bağlamda LMP1 ve EBNA1 için kontrol grubuna nazaran DNA hasarı oluşturuyor olmaları, ileri de verecekleri muhtemel faydalarından daha fazla önem arz etmeyebilir.

5. REFERANSLAR

- AKALIN G, Incesu Z, The effect of 1,3 BIS (Heteroary1 substituted) benzene derivatives on apoptosis of N-Ras transformed Mouse skeletal muscle cell, J. Fac. Pharm, Ankara (1) 1 -15, (2005).
- ANTONSSON B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science. 18, 277(5324), 370-2, (1997).
- ARMAN D. Epstein-Barr Virus. In: Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 2nd ed. Nobel Pres, 2002; 1197-1201.
- BARONE MV, Crozat A, Tabae A, Philipson L, Ron D. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. Genes Dev. 8(4), 453-64, (1994).
- BEAULIEU BL, Sullivan JL. Epstein-Barr virus. Clinical Virology 2nd ed 1999; 479-495.
- BERTOLOTI A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol. 2(6), 326-32, (2000).
- BIARNÉS M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. Diabetes. 51(1), 66-72, (2002).
- BONNER-WEIR S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. Endocrinology. 141(6), 1926-9, (2000).
- BONNET M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancer. J Natl Cancer Inst 1999; 91 (16): 1376-81.
- BÜYÜKGEBİZ O, Caferler JS. Apoptoz. Sendrom, 13, 102-7, (2001).
- CASAGRANDE R, Stern P, Diehn M, Shamu C, Osario M, Zúñiga M, Brown PO, Ploegh H. Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway. Mol Cell. 5(4), 729-35, (2000).

- CAUCHI S, Eroglu P, TCF7L2 genetic defect and type 2 diabetes. *Curr. Diab Rep.*, 8(2), 149-155, (2008).
- CHANDLER JM, Cohen GM, MacFarlane M. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem.* 273(18), 10815-8, (1998).
- CHEN X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* 277(15), 13045-52, (2002).
- CHO S, Hahm J-H, Hong Y-S. Analysis of p53 and bax mutations, loss of heterozygosity, p53 and bcl2 expression and apoptosis in basal cell carcinoma in Korean patients. *Br J Dermatol*, 144, 841-848, (2001).
- CHOUCROUN P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD, Comet assay and early apoptosis., *Mutat Res.* 478(1-2), 89-96, (2001).
- CHU JS, Chen CC, Chang KJ. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett* 1998; 124: 53-7.
- COLLINS AR, Ma AG, Duthie SJ, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. *Mutat Res*, 336, 69–77, (1995).
- DE LEO A., Arena G., Stecca C., Raciti M., Mattia E. Resveratrol inhibits proliferation and survival of Epstein Barr virus-infected Burkitt's lymphoma cells depending on viral latency program. *Mol Cancer Res.*2011 Oct;9(10):1346-55. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0145. Epub 2011 Aug 19.
- DeFRONZO RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991 Mar;14(3):173-94.
- DELANEY CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O₆-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 22, 50(12), 2015-20, (1995).
- DELEHEDDE M, Cho SH, Sarkiss M, Brisbay S, Davies M, El-Naggar AK, McDonnell TJ. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*, 85, 1514-22, (1999).

- DENIAUD A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C and Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, 27, 285-299, (2008).
- DENIZOT F, Lang R, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immun Meth.* 89, 271–277, (1986).
- DEPREZ P, Gautschi M & Helenius A, More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin / calreticulin cycle. *Mol Cell* 19, 183–195, (2005).
- DEVERGNE O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* 16: 7098-7108.
- DOĞAN B. Tekrarlayan tonsillit hastalarının tonsil dokularında EBV'nin gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu ile kantitatif tespiti ve serum VCA-IgG titreleri ile korelasyonu. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi 2005
- EIZIRIK DL, Poulsen TM, A choice of death-the signal-transduction of immune-mediated beta cell apoptosis, *Diabetologia*, 44, 2115-2133, (2001).
- ELIOPOULOS AG, Caamano JH, Flavell J, Reynolds GM, Murray PG, Poyet JL, et al. Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway *Oncogene* 2003; 22 (48): 7557-69.
- ELIOPOULOS AG, Young LS. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol.* 2001; 11: 435-44.
- ELIOPOULOS, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., Young, L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274: 16085-16096.
- ELIZABETH R. Leight and Bill Sugden. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein±Barr virüs. *Rev. Med. Virol.* 2000; 10: 83±100.

- FADEEL B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 699-717, (1999).
- GIRES, O., Zimmeristrobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M. Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active
- GIRES, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo. J.* 18: 3064-3073.
- GOU Y., Sun C., Hu L., He J., Zhang C., Feng Y., Zhang P., Kong X., Xiao L., Li Y. Correlation between DNA damage and EB virus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*.2014 Feb;30(2):184-7.
- GURZOV EN, Ortis F, Bakiri L, Wagner EF, Eizirik DL, JunB Inhibits ER Stress and Apoptosis in Pancreatic Beta Cells. *PLoS ONE*, 3(8), 3030, (2008).
- HAMPTON MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8:1-5.
- HARDING HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 6(5), 1099-108, (2000).
- HARDING HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*. 7(6), 1153-63, (2001).
- HART AW, Baeza N, Apelqvist A, Edlund H. Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature*. 408(6814), 864-8, (2000).
- HAYAKAWA J., Depatia C., Ohmichi M., Mercola D., The Activation of c-Jun NH2-terminal Kinase (JNK) by DNA-damaging Agents Serves to Promote Drug Resistance via Activating Transcription Factor 2 (ATF2)-dependent Enhanced DNA Repair. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:20582-20592. (2003).
- HIGUCHI, M., Izumi, K.M., Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4675-7680.

- IWAWAKI T, Hosoda A, Okuda T, Kamigori Y, Nomura-Furuwatari C, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol.* 3(2), 158-64, (2001).
- IZUMI K.M., Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12592-12597.
- JAKOB CA, Burda P, Roth J, Aebi M. Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol.* 142(5), 1223-33, (1998).
- JU Y., Xu T, Zhang H, Yu A. FOXO1-dependent DNA damage repair is regulated by JNK in lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2014 Apr;44(4):1284-92. doi: 10.3892/ijo.2014.2269. Epub 2014 Jan 21.
- KANETO H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 1999 Dec;48(12):2398-406.
- KIM LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 2004; 44(3):257-67.
- KUTOK JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 375-404.
- LAHERTY, C., Hu, H., Opiari, A., Wang, F., Dixit, V. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor, KB. *J. Biol. Chem.* 267: 24157-24160.
- LEVITSKAYA, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwaldmullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375: 685-688.
- LIU K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6), 2820-5, (2000).

- LUPI R, Del Prato S, β -cell apoptosis in type 2 diabetes: quantitative and functional consequences. *Diabetes&Metabolism*, 34, 56-64, (2008).
- MATHIS D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414(6865), 792-8, (2001).
- MAURICIO D, Mandrup-Poulsen T, Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes*. 47(10), 1537-43, (1998).
- MEIER I., Shephard S. E., Lutz WK. Nitrosation of aspartic acid, aspartame, and glycine ethylester. Alkylation of 4-(p-nitrobenzyl)pyridine (NBP) in vitro and binding to DNA in the rat. *Mutat Res*.1990 May;238(3):193-201.
- MIETTINEN PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development*, 127(12), 2617-27, (2000).
- NAKAGAWA T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 150(4), 887-94, (2000).
- NAKAGAWA T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 403(6765), 98-103, (2000).
- NAYA FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.*, 11(18), 2323-34, (1997).
- NIEDOBITEK G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 149-70.
- NONKWELO, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A., Sample, J. (1996). Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J. Virol*. 70: 623-627.
- NOVOA I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol*. 153(5), 1011-22, (2001).

- OYADOMARI S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest.* 109(4), 525-32, (2002).
- OYADOMARI S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19), 10845-50, (2001).
- OZTURK M. Programlı hücre ölümü sempozyumu kitabı, 2008.
- PFÄFFL MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res,* 29(9), e45, (2001).
- RAJAN SS, Srinivasan V, Balasubramanyam M, Tatu U, Endoplasmic reticulum (ER) stress and diabetes. *Indian J Med Res,* 125, 411-424, (2007).
- RAMDIAL PK, Madaree A, Reddy R, Chetty R. Bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol,* 27, 283-291, (2000).
- RANE SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet,* 22(1), 44-52, (1999).
- RAO RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem,* 276(36), 33869-74, (2001).
- RENEHAN AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/(Clinical Research Ed.) (BMJ),* 322, 1536-8, (2001).
- ROSSEN K, Karabulut Thorup A, Hou-Jensen K, Krag Jacobsen G. Bax protein is not expressed by basal cell carcinomas. *Br J Dermatol,* 139, 472-474, (1998).
- ROWE, M., Peng Pilon, M., Huen, D., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E., Rickinson, A.B. (1994). Upregulation of bcl-2 by the Epstein- Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell specific response that is delayed relative to NF-KB Activation and to induction to cell surface markers. *J. Virol.* 68: 5602-5612.
- RUDİN M., Ben-Abraham R., Gazit V., Tendler Y., Tashlykov V., Katz Y. Single-dose ketamine administration induces apoptosis in neonatal mouse brain. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2005;16(4):231-43.

- SAINI KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int.* 39(6), 1229-36, (1996).
- SAMPLE J., Kieff E. (1990). Transcription of the Epstein-Barr Virus Genome during Latency in Growth-Transformed Lymphocytes. *J. Virol.* 64(4): 1667-1674.
- SARAC S, Akyol MU, Kanbur B, Poyraz A ve ark. Bcl-2 and LMP1 expression in nasopharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* 2001; 22(6):377-82.
- SHI Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol*, 18(12), 7499-509, (1998).
- SILVA JP, Köhler M, Graff C, Oldfors A, Magnuson MA, Berggren PO, Larsson NG. Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet*, 26(3), 336-40, (2000).
- SOK J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol*, 19(1), 495-504, (1999).
- STEFAN Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*, 31(8 Pt 1), 694-700, (1982).
- STRAATHOF KCM, Bollard CM, Rooney CM, Heshlop HE. Immunotherapy for Epstein-Barr-Virus Associated Cancers in Children. *The Oncologist* 2003; 8:83-98.
- TILLI CMLJ, Stavast-Kooy AJW, Ramaekers FCS, Neumann HAM. Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 29, 79-87, (2002).
- TOBIUME K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2(3), 222-8, (2001).
- TOMATIR AG, Apoptosis programmed cell death, *T Klin J Med Sci*, 23, 499-508, (2003).
- TRAN TM, Temkin V, Shi B, Pagliari L, Daniel S, Ferran C, Pope RM. TNF α -induced macrophage death via caspase-dependent and independent pathways. *Apoptosis*. 2009 Mar;14(3):320-32. doi: 10.1007/s10495-009-0311-4. (2009).
- UNGER RH, Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53, 319-36, (2002).

- WANG J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*, 103(1), 27-37, (1999).
- WANG XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J*, 17(19), 5708-17, (1998).
- WANG XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol*, 16(8), 4273-80, (1996).
- WANG XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 272(5266), 1347-9, (1996).
- WELTERS HJ, Kulkarni RN, Wnt signaling: relevance to β -cel biology and diabetes. *Trends in Endocrinology and metabolism*, 19, 349-355, (2008).
- WILSON, J.B., Bell, J.L., Levine, A.J. (1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo. J.* 15: 3117-3126.
- WITHERS DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, 23(1), 32-40, (1999).
- WITHERS DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900-4, (1998).
- WOBSER H, Düsselmann H, Kögel D, Wang H, Reimertz C, Wollheim CB, Byrne MM, Prehn JH. Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. *J Biol Chem*, 277(8), 6413-21, (2002).
- YAUNG LS, Murray PG. EBV and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22: 5108-21.
- YONEDA T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*, 276(17), 13935-40, (2001).
- YOSHIDA H, ER stress and diseases, *FEBS Journal*, 274, 630-658, (2007).

- YOSHIDA H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33741-9. Erratum in: *J Biol Chem*, 274(4), 2592, (1999).
- YOSHIDA H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107(7), 881-91, (2001).
- YOSHIDA H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 20(18), 6755-67, (2000).
- YOSHIOKA M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, 46(5), 887-94, (1997).
- ZHENG H, Li L, Hu D, Deng X, Cao Y. Role of Epstein-Barr Virus encoded Latent Membrane Protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cellular & Molecular Immunology* 2007;4(3): 185-96.
- ZHOU YP, Teng D, Dralyuk F, Ostrega D, Roe MW, Philipson L, Polonsky KS. Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca²⁺ stores and arachidonic acid metabolism. *J Clin Invest*, 101(8), 1623-32, (1998).
- ZINSZNER H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12(7), 982-95, (1998).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. MUSTAFA ALTINDIŞ
Proje No:	113S153
Proje Başlığı:	Epstein Barr Virüs Rekombinant Proteinleri Ebna1 Ve Lmp1'in Ins1-E (832/13) Beta Hücre Kültüründe Endoplasmik Reticulum (Er) Stres Markırları, Apoptoz Ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	SEFA ÇELİK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	SAKARYA Ü. TIP F. TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/08/2013 - 01/08/2014
Onaylanan Bütçe:	29950.0
Harcanan Bütçe:	29950.0
Öz:	<p>Diyabet prevalansı ve insidansı günümüz dünyasında her geçen gün artmakta olan bir sağlık sorunudur. Diyabetin humoral ve dokusal bulguları zengin olmasına rağmen komplikasyonlarının oldukça fazla olması diyabet tanı ve tedavisini önemli kılmaktadır. Bugün içerisinde diyabetinde sayıldığı bir çok hastalığın Endoplasmik Reticulum (ER) stres ile indüklenen apoptozisle alakalı olduğu kanısı hakimdir. Nitekim yapılan çalışmalarda pankreatik beta hücrelerinde ER organelinin protein alım ve katlama kapasitesi arasındaki dengesizlikten doğan ER stres ile indüklenen apoptozisin diyabete neden olduğu vurgulanmaktadır.</p> <p>Epstein-Barr Virüs(EBV); Lenfokriptovirüs bir virus olup, bu tür viruslerin genel olarak B lenfositlerde latent enfeksiyon yaptıkları dönemlerde hücre proliferasyonuna ve transformasyon sürecine katkıda buldukları bilinmektedir. EBV'nin proliferatif etkinliği iki mediatör protein aracılığıyla(Epstein Bar Nuclear Antigen1-EBNA1 ve Latent Membrane Protein1-LMP1) gerçekleşmektedir. Tip 2 diyabet hastalarında uzun süren anti diyabetik tedaviler esnasında, pankreatik hücre kayıpları ve pankreatik kütlelinin azalması sonucu eksojen insülin kullanımına geçilmektedir. Bu çalışmada pankreatik hücre kayıplarının rekombinant viral EBV protenleri uygulanarak tersine çevirmenin araştırılması amaçlanmıştır. Yanı sıra ilgili proteinlerin DNA hasarı, ER Stresi üzerine etkileri ve insülin sentez-salınımına nasıl katkıda bulunabilecekleri de araştırılmıştır.</p> <p>Bu amaçlar doğrultusunda ticari olarak elde edilen rekombinant EBNA1 ve LMP1 proteinlerinin Lethal Doz 50 çalışması sonrası her iki proteinin 0,1 ppm ve 0,5 ppm'lik dozlarının çalışma için kullanılmasına karar verilmiştir. Bu proteinlerin belirtilen dozları uygulandıktan sonra proliferasyonun bu durumdan ne derece etkilendiğinin tespit edilebilmesi için proliferasyondan sorumlu oldukları bilinen genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Diğer taraftan DNA hasarı için Comet Assay ve ER stres için ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri de test edilmiştir.</p> <p>RT-PCR çalışmaları neticesinde ER stres markerları olan AFT4, ATF6, PERK, GRP78 ve CHOP genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde thapsigargin grubunda DMSO Kontrol grubuna göre sırasıyla; 10,62 kat, 19 kat, 15,03 kat, 6,63 kat ve 8,05 kat artışlar saptanmıştır. ER stres markerı olan genlerdeki bu yükselişin çalışmada kullanılan ilgili proteinler vasıtasıyla baskılandığı da belirlenmiştir.</p> <p>Çalışmada sonuç olarak; EBV rekombinant proteinleri LMP1 ve EBNA1'in proliferasyondan sorumlu genlerin ekspresyon düzeylerini artırdığı aynı zamanda ER stres markerı genlerin ekspresyon düzeylerini baskılayarak da ER stresinin neden olduğu beta hücre kayıplarının tersine döndürülmesinde avantaj sağlayabileceği ve bu bakımdan daha üst düzey çalışmalar ile desteklendiği takdirde antidiyabetik tedavilerde viroterapi ajanları olarak kullanılabilmesinin yolunun açılması potansiyeli bulunduğu sonucuna varılmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	LMP1, EBNA1, ER stres, INS-1E (832/13) beta hücresi, İnsülin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır