BETÜL ÇATALGÖL

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2009

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

CİLT FİBROBLAST HÜCRELERİNİN UV KAYNAKLI HASARINDA PROTEİN OKSİDASYONU VE PROTEİN REGÜLASYONUNUN ROLÜNÜN İNCELENMESİ

BETÜL ÇATALGÖL

DANIŞMAN
PROF. DR. BUKET ALPERTUNGA

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmasötik Toksikoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Farmasötik Toksikoloji A.B.D.
Tez Sahibi : Betül Çatalgöl
Tez Başlığı : Cilt Fibroblast Hücrelerinin UV Kaynaklı Hasarında Protein Oksidasyonu ve Protein Regülasyonunun Rolünün İncelenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fak. B Blok Seminer Salonu
Sınav Tarihi : 13 / 11 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof. Dr. Buket Alpertunga, İstanbul Üni. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

2.Prof. Dr. Semra Sardaş, Marmara Üni. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

3.Prof. Dr. Gülden Z. Omurtag, Marmara Üni. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

4.Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan, İstanbul Üni. Eczacılık Fak. Farmakoloji A.B.D.

5.Yard. Doç. Dr. Gül Özhan, İstanbul Üni. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji A.B.D.

BEYAN

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

BETÜL ÇATALGÖL(İmza)



İTHAF

"Babam, annem ve eşime ithaf ediyorum"

TEŞEKKÜR

Her yönden verdiği destek için değerli danışman hocam Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya;

Bütün deneysel aşamalarda değerli fikirlerini ve laboratuvarını benimle paylaşan Prof. Dr. Tilman Grune'ye;

Hohenheim Üniversitesi'nde maddi ve manevi her konuda destek olan arkadaşlarım Dr. Nicolle Breusing, Stephanie Grimm, Dr. Tobias Jung, Annika Höhn, Andrea Flaccus ve Dagma Mvondo'ya;

Çeşitli kimyasal ve hücre grupları için yardımı olan Prof.Dr.Efstatios Gonos, Bertrand Friguet, Lars Oliver Klotz ve Peter Voss'a;

Her zaman desteklerini hissettiğim Yard. Doç. Dr. Gül Özhan, Yard. Doç. Dr. Sibel Özden ve Esra Sebahat Yıldız'a;

Almanya'da kalış süremde gösterdiği sabır, anlayış için ve bana her konuda verdiği destek için eşim Sadık Çatalgöl'e;

Bütün eğitim hayatım boyunca yanımda olduklarını bildiğim babam ve anneme;

Teşekkür ederim.

Tezde gerçekleştirilen yurt dışı çalışmaları, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2214 Yurt Dışı Araştırma Burs programı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Ultraviyole A Toksisitesi 2
2.2. Ciltte UVA Radyasyonun Etkileri 3
2.3. Hücresel ve Moleküler Düzeyde UVA Radyasyonun Etkileri 5
2.4. Oksidatif Stres ve Oluşturduğu Hasarlar 8
2.5. Protein Oksidasyonu 8
2.6. Protein Tamir Sistemleri 10
2.7. Proteoliz 11
2.8. Proteazomal Degradasyon 13
2.9. Proteazom İnhibisyonu 17
2.10. Matriks Metalloproteinazlar 18
2.11. Transkripsiyon Faktörleri 19
3. GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 21
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler 24
3.3. Deneysel İşlemler 26
3.3.1. Hücre Kültürü 26
3.3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Reaktifler ve İnkübasyon Koşulları 26
3.3.1.2. Hücre Kültürü Aşamaları 27

3.3.2. MTT Canlılık Tayini 28
3.3.2.1. MTT Canlılık Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 28
3.3.2.2. MTT Canlılık Tayininin Uygulanışı 29
3.3.3. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini 29
3.3.3.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 29
3.3.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini Uygulanışı 29
3.3.4. Lowry Yöntemiyle Protein Tayini 29
3.3.4.1. Lowry Yöntemiyle Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 29
3.3.4.2. Lowry Yöntemiyle Protein Tayini Uygulanışı 30
3.3.5. Protein Karbonil Tayini 30
3.3.5.1. Protein Karbonil Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 30
3.3.5.2. Protein Karbonil Tayini Uygulanışı 32
3.3.6. Proteazom Aktivitesi Tayini 32
3.3.6.1. Proteazom Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 32
3.3.6.2. Proteazom Aktivitesi Tayini Uygulanışı 33
3.3.7. İmmunoblot Yöntemi 34
3.3.7.1. İmmunoblot Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 34
3.3.7.2. İmmunoblot Yöntemi ile Protein Ekspresyonu Tayini 36
3.3.8. Sıvı Sintilasyon Yöntemi 37
3.3.8.1. Sıvı Sintilasyon Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 37
3.3.8.2. Sıvı Sintilasyon Yöntemi ile Proteoliz ve Protein Agregatları Tayini 38
3.3.9. Kantitatif PCR (qPCR) Yöntemi 39
3.3.9.1. Kantitatif PCR Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 39
3.3.9.2. Kantitatif PCR Yöntemi ile mRNA Ekspresyonlarının Analizi 41
3.3.10. Otofloresans Görüntüleme 42
3.3.11. Yeşil Floresans Protein ile Transfeksiyon Yöntemi 42
3.3.11.1. Yeşil Floresans Protein ile Transfeksiyon Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler 42
3.3.11.2. Yeşil Floresans Protein ile Transfeksiyon Yöntemi ile AP-1 Aktivasyonu Tayini 42
4. BULGULAR 44
4.1. UVA Radyasyon Sonrası MTT Canlılık Tayini Değerleri 44
4.2. Protein Karbonil Tayini Değerleri 44

4.3. Proteazom Aktivitesi Tayini Değerleri 45
4.4. Proteazom Protein Miktar Tayini Değerleri 46
4.5. NaN_3 İnkübasyonu ile Proteazom Aktivitesi Tayini Değerleri 46
4.6. $NDPO_2$ Uygulaması ile Proteazom Aktivitesi Tayini Değerleri 46
4.7. İzole Proteazom ile Aktivite Tayini Değerleri 48
4.8. Proteoliz Tayini Değerleri 48
4.9. Protein Agregatları Tayini Değerleri 48
4.10. MMP-1 ve TIMP-1 mRNA Ekspresyonları Tayini 50
4.11. Lipofusinin Hücre Sitoplazmasına Alımı Tayini 50
4.12. Lipofusin İnkübasyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri 51
4.13. Lipofusin İnkübasyonu Sonrası MMP-1 ve TIMP-1 mRNA Ekspresyonları 51
4.14. Laktasistin İnkübasyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri 52
4.15. Laktasistin inkübasyonu sonrası MMP-1 ve TIMP-1 mRNA Ekspresyonları 53
4.16. β_5 Transfeksiyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri 54
4.17. β_5 Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MTT Canlılık Tayini Değerleri 54
4.18. β_5 Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MMP-1 mRNA Ekspresyonu 55
4.19. MsrA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MTT Canlılık Tayini Değerleri 56
4.20. MsrA Transfeksiyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri 57
4.21. MsrA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MMP-1 mRNA Ekspresyonu 57
4.22. UVA, Lipofusin ve Laktasistinin c-jun Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerine Etkisi 58
4.23. UVA ve Laktasistinin AP-1 İndüksiyonu Üzerine Etkisi 60
4.24. Laktasistin Kaynaklı MMP-1 mRNA Ekspresyonunda JNK İnhibitörlerinin Etkisi 60
5. TARTIŞMA 62
KAYNAKLAR 68
ÖZGEÇMİŞ 83

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: UVR maruziyeti ile memeli hücrelerinde indüklenen proteinler.....6
Tablo 2-2: Proteazom için spesifik proteaz inhibitörleri.....17
Tablo 2-3: Matriks metalloproteinazların çeşitleri.....19
Tablo 3-1: Proteazom aktivite tayininde 96 kuyulu mikroplakta bir kuyunun dizaynı ..34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Cildin tabakalarında UV penetrasyonu 3
Şekil 2-2: Hücre İçerisinde Farklı Kompartmanlardaki Proteazlar.....11
Şekil 2-3: Oksidatif stres gelişimi ve protein havuzuna etkisi.....13
Şekil 2-4: Memeli 20S proteazomun yapısı.....15
Şekil 2-5: 20S proteazom-laktasistin etkileşimi.....18
Şekil 3-1: Cilt fibroblast hücrelerinin mikroskobik görüntüsü.....27
Şekil 3-2: UVA radyasyonun gerçekleştirildiği tank 28
Şekil 3-3: İmmunoblot yönteminde proteinlerin jelden membrana transferi için kurulan düzenek.....37
Şekil 4-1: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde canlılığa etkisi. 44
Şekil 4-2: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde protein karbonil oluşumuna etkisi. 45
Şekil 4-3: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde proteazom aktivitesine etkisi.....45
Şekil 4-4: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi miktarına etkisi 46
Şekil 4-5: NaN_3 uygulamasının UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde neden olduğu proteazom inhibisyonuna etkisi. 47
Şekil 4-6: $NDPO_2$ uygulamasının fibroblast hücrelerinde ve izole proteazomda proteazom aktivitesine etkisi.....47
Şekil 4-7: UVA radyasyonun izole proteazomda enzim aktivitesi üzerine etkisi. 48
Şekil 4-8: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde proteoliz üzerine etkisi.....49
Şekil 4-9: UVA uygulamasının fibroblast hücrelerinde proteinlerin deterjanda çözünme özelliğine ve protein agregat oluşumu üzerine etkisi. 49
Şekil 4-10: UVA uygulamasının fibroblast hücrelerinde MMP-1 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi.....50
Şekil 4-11: Lipofusinin hücre sitoplazmasına alımını gösteren floresans mikroskobi görüntüleri ve kantifikasyonu. 51
Şekil 4-12: Lipofusinin fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi aktivitesi üzerine etkisi. 52
Şekil 4-13: Lipofusinin fibroblast hücrelerinde MMP-1 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....52

Şekil 4-14: Laktasistinin fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi aktivitesi üzerine etkisi 53
Şekil 4-15: Laktasistinin fibroblast hücrelerinde MMP-1 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....54
Şekil 4-16: β_5 transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi aktivitesi üzerine etkisi. 55
Şekil 4-17: β_5 transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası canlılığa etkisi. 55
Şekil 4-18: β_5 transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası MMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi.....56
Şekil 4-19: : MsrA transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası canlılığa etkisi. 57
Şekil 4-20: MsrA transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası proteazom aktivitesine etkisi.....58
Şekil 4-21: MsrA transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası MMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi. 59
Şekil 4-22: UVA, lipofusin ve laktasistinin c-jun ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerine etkisi. 59
Şekil 4-23: UVA ve laktasistinin AP-1 aktivasyonu üzerine etkisi. 60
Şekil 4-24: JNK inhibitörlerinin laktasistin kaynaklı MMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi. 61
Şekil 5-1: Protein agregat yapısının proteazom enzimini tıkayarak inhibisyonu. 65
Şekil 5-2: UVA uygulama sonrası protein agregatları ve proteazomun rolü. 67

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AA:	Araşidonik asid
ADP:	Adenozin difosfat
APS:	Amonyumperoksodisülfat
ATP:	Adenozin trifosfat
AGE:	İleri derecede glisillenmiş ürün
AP-1:	Aktivatör protein-1
BSA:	Sığır serum albumini
CD95L:	CD95 ligand
DMEM:	Dulbecco's modifiye eagle's besiyeri
DMSO:	Dimetilsülfoksid
DNA:	Deoksiribo nükleik asid
EPA:	Çevre koruma acentesi
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
Fos:	FBJ mürin osteojenik sarkom
GM-CSF:	Granülosit makrofaj-koloni stimüle eden faktör
HIV:	İnsan immün yetmezlik virüsü
H_2O_2:	Hidrojen peroksid
ICAM:	Hücreler arası adezyon molekülü
IFN:	İnterferon
IL:	İnterlökin
JNK-1:	C-jun N-terminal kinaz-1
JNKi:	C-jun N-terminal kinaz inhibitörü
Jun:	Avian sarkom-17
MAPK:	Mitojen aktif protein kinaz
MCA:	7-Amino-4-metilkumarin
MED:	Minimal eritem doz
MMP-1:	Matriks metalloproteinaz-1
Msr:	Metiyonin sülfoksid redüktaz

MT-MMP:	Mitokondriyel matriks metalloproteinaz
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NaN_3:	Sodyum azid
NDP:	3,3'-(1,4-naftilidin) dipropiyonat
$NDPO_2$:	3,3'-(1,4-naftilidin) dipropiyonat-1,4-endoperoksid disodyum
NFκB:	Nükleer faktör kappa B
NMSC:	Nonmelanoma cilt kanseri
$^1O_2$:	Singlet oksijen
$O_2^{\cdot}$:	Süperoksid
$OH^{\cdot}$:	Hidroksil radikali
p_i-c-jun:	Fosforile c-jun
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz
PUVA:	Psoralens ve ultraviyole A
Raf-1:	3611 mürin sarkom
SCC:	Skuamöz hücre karsinoması
Src:	Sarkoma
SSB:	Tek zincir kırılması
Suc-LLVY-MCA:	Süksinil-lösin-lösin-valin-tirozin-metilkumarin
TGF:	Tümör büyüme faktörü
TIMP-1:	Doku inhibitör metalloproteinaz-1
TNF:	Tümör nekroz faktör
Ub:	Ubikutin
UVR:	Ultraviyole radyasyon
UVA:	Ultraviyole A
UVB:	Ultraviyole B
UVC:	Ultraviyole C
WHO:	Dünya sağlık örgütü

ÖZET

Çatalgöl, B. (2009). Cilt Fibroblast Hücrelerinin UV Kaynaklı Hasarında Protein Oksidasyonu ve Protein Regülasyonunun Rolünün İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Fotohasar ultraviyole radyasyonun (UVR) sonuçları olan ciltteki değişiklerle boy gösteren çok yönlü bir problemdir. UVR'un en yaygın ve bilinen kaynağı güneştir ve güneş ışığının dünya yüzeyine ulaşan başlıca bileşeni ultraviyole A (UVA)'dır. UVA hasarının en önemli mekanizmalarından birisi özellikle singlet moleküler oksijen olmak üzere reaktif oksijen türlerinin oluşumudur ki bunlar insan cilt fibroblast hücrelerinde matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1) gibi genlerin ekpresyonunu indükler. Doku inhibitör metalloproteinaz-1 (TIMP-1) ile dengesiz olarak MMP-1 ekspresyonunun artışı, bağ dokusunun bozulmasına yol açar ve fotohasarda oluşan gözle görülür değişiklikler için muhtemel mekanizmadır.

Bu çalışmada, protein oksidasyonu ve şiddetli protein oksidasyonu ile oluşan proteazom inhibisyonunun UVA radyasyona cevap olarak MMP-1 ekspresyonunu indüklediği gözlenmiştir. Ayrıca proteazom inhibisyonunun MMP-1 ekspresyonunda rol oynayan muhtemel transkripsiyon yolaklarından (avian sarkom-17) c-jun ve fosforile c-jun (p_i-c-jun) akümülasyonu ve takiben aktivatör protein-1 (AP-1) aktivasyonuna neden olduğu saptanmıştır. Proteazom inhibisyonunun rolü çapraz-bağlı proteinler, proteazom inhibitörü laktasistin ve proteazom, metiyonin sülfoksid redüktaz (Msr) overeksprese hücrelerle doğrulanmıştır. Sonuçlar şiddetli oksidasyon sonrası proteazom inhibisyonunun UVA sinyal cevabında önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Ultraviyole A, protein oksidasyonu, proteazom, matriks metalloproteinaz-1, c-jun

Bu çalışma esnasında Stuttgart Hohenheim Üniversitesi'nde gerçekleştirilen aşama, TÜBİTAK tarafından 2214 Yurt Dışı Araştırma Bursu ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Catalgol, B. (2009). Protein oxidation and protein regulation in UV induced damage of skin fibroblast cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Photodamage is a multifaceted problem which refers to changes in the skin that are the results of ultraviolet irradiation (UVR). Sun is the most prevalent, well known source of UVR and the major component of sunlight that reaches the earth's surface is the ultraviolet A (UVA) region. One of the most important mechanisms in the UVA damage is the generation of reactive oxygen species especially singlet molecular oxygen that mimics the induction of the expression of genes such as matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in human dermal fibroblasts. The imbalanced overexpression of MMP-1 with respect to tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) leads to breakdown of connective tissue and is the possible mechanism for visible changes in photodamage.

In the present study, we observed that protein oxidation and consequently proteasome inhibition caused by severe protein oxidation mediates the upregulation of MMP-1 expression in response to the stimulation of UVA irradiation. We also found out that the proteasomal inhibition led to c-jun and phosphorylated c-jun (p_i-c-jun) accumulation and consequently activator protein-1 (AP-1) activation which are possible transcription pathways play role in MMP-1 expression. We also confirmed the role of proteasome inhibition by using cross-linked proteins, proteasome inhibitor lactacystin and proteasome, methionine sulfoxide reductase (Msr) overexpressed cells. The results demonstrate that proteasome inhibition following severe oxidation has a crucial role in the signal response of UVA.

Key Words: Ultraviolet A, protein oxidation, proteasome, matrix metalloproteinase-1, c-jun

In the present study, the part took place in Stuttgart Hohenheim University was supported by the TUBITAK with 2214 Research Grant.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Solar UVA radyasyon insan cildinde in vivo olarak ve cilt hücrelerinde in vitro olarak gerçekleşen maruziyetlerde çeşitli sinyal mekanizmalarının indükleyicisidir. Bu mekanizmalardan en önemlisi ekstraselüler protein degradasyonuna neden olan ve bu yolla ciltte hasara neden olan matriks MMP-1 ekspresyonunda meydana gelen artıştır. Bu artışta, biyokimyasal yolak açısından bakıldığında indükleyici ilk basamak olarak UVA radyasyonun neden olduğu singlet oksijen radikalinin rolü ön planda tutulmaktadır. Singlet oksijen radikali oluşumunun, oksidatif stresi takiben aktivatör protein-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve ardından MMP-1 ekspresyonu artışına neden olduğu bilinmektedir. Fakat bu sinyal modelinde, singlet oksijen oluşumu ile transkripsiyon faktörü AP-1 aktivasyonu arasındaki yolak tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu konuda kollajen degradasyonunun yer aldığı cilt dermis tabakasındaki fibroblast hücrelerinde okside protein oluşumu ilgi odağıdır. Normal koşullar altında, okside proteinler proteazom enzimleri tarafından degrade edilmektedir. Proteazom enzimleri, özellikle sitozol ve çekirdekte lokalize olmuştur. Proteazomal sistemde 20S proteazom olarak bilinen ana yapı, çeşitli peptidler tarafından regüle edilmektedir, fakat aynı zamanda hiçbir regülatör olmadan da proteinleri degrade etme özelliğine sahiptir. Birçok hastalık ve oksidatif hasar durumlarında, proteazom aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Proteazom aktivitesi inhibisyonunda da başlıca sebebin protein oksidasyonu sonucu protein agregatlarının oluşumu olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada amacımız, cilt fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon hasarında singlet oksijen kaynaklı mekanizmayla protein oksidasyonu oluşumunu ve proteazom aktivitesindeki azalmayı gözlemlemektir. Bu şekilde intraselüler protein degradasyonunun azalması ile transkripsiyon faktörü AP-1 ve kollajen degradasyonunda görevli enzim olan MMP-1 ekspresyonları arasında bağlantı oluşturarak UVA kaynaklı hasarda önemli rolü olan bir yolağı aydınlatmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ultraviyole A Toksisitesi

Fotobiyoloji, bütün elektromanyetik spektrumdaki enerjilerin yan etkilerini ele alan çok sayıda disiplini kapsamaktadır. Bu enerjilerin içerisinde UVR birçok alanda kullanımıyla günlük hayatta en çok karşılaşılan şekildir. UVR'un en yaygın ve iyi bilinen kaynağı güneştir ayrıca fototerapi ve fotokemoterapi de potansiyel kaynaklar arasındadır (Tyrrell 1996).

UVR, 200-400 nm arasında uzanan ışık dalga boyları spektrumudur. Ultraviyole C (UVC), 200-290 nm arasında olan ve UVR arasında en kuvvetli olanıdır. UVC, dünyayı saran atmosferde tamamıyla absorbe olduğu için yeryüzü yüzeyine ulaşmamaktadır. UVC radyasyonun günlük hayatta diğer başlıca kaynakları; hastane operasyon odalarında kullanılan antiseptik lambalar, doku ve hücre kültürü kabinleridir. Ultraviyole B (UVB), 290-320 nm arasında olan ve dünya yüzeyine ulaşan en kuvvetli ultraviyole ışıktır. UVA, 320-400 nm arasındadır ve UVB radyasyondan yaklaşık 1000 kat daha zayıftır. Fakat dünya yüzeyine UVB radyasyona oranla 100 kat daha fazla ulaşmaktadır (Tyrrell 1996).

Ozon tabakası, 1980'lerden beri gösterdiği incelme ile ilgileri üstüne çekmiştir. Çevre koruma acentesi (EPA), yüzyıl başına ozon tabakasındaki incelme oranını %8 olarak hesaplamaktadır. Ozon atmosferde UV ışığın başlıca absorbanıdır ve UVC ışığın tamamıyla dünya yüzeyine ulaşmasını bloke ederken, UVB ışığın %95'ini ve UVA ışığın %5 gibi çok az bir kısmını bloke etmektedir. Ozon tabakası inceldiğinde, yeryüzüne ulaşan UVB ışığın artmasıyla cilt kanseri riskinin artacağı ileri sürülmektedir (Coldiron 1992).

Solaryum gibi yapay UVR kaynaklarını bronzlaşmak amaçlı kullanan bireyler UVR toksisitesine karşı çok büyük risk altındadır. Birçoğu bronzlaşmış cildin daha sağlıklı ve genç görünüme sebep olduğunu düşünmektedir. Halbuki tam tersine, UVR cildin daha hızlı yaşlanmasını tetiklemektedir.

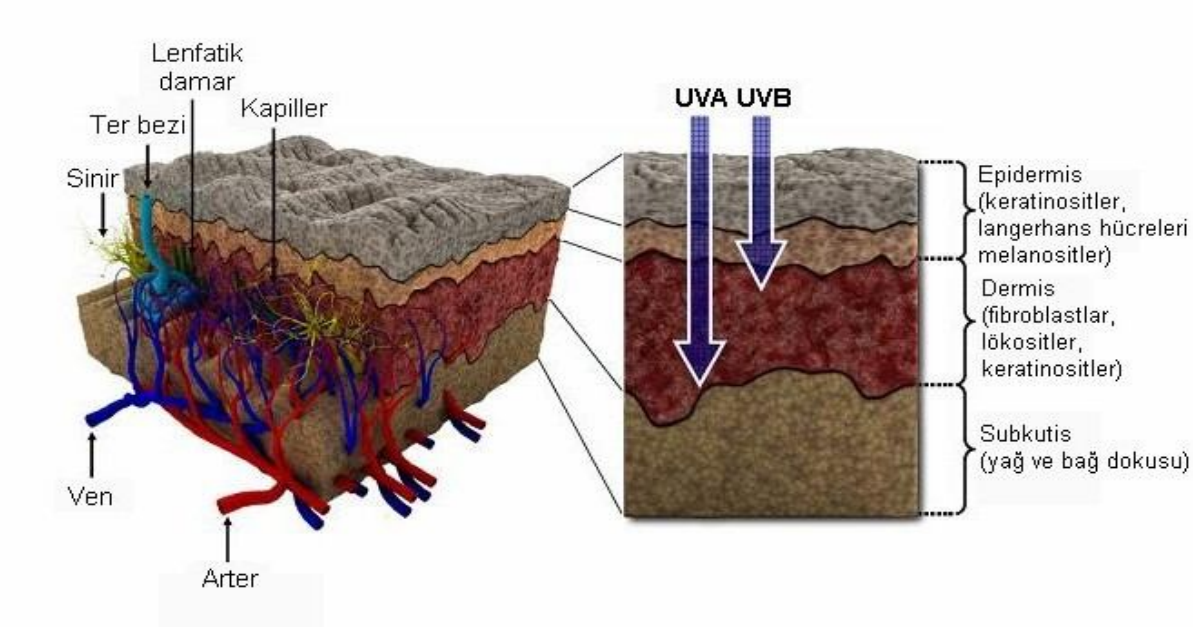
İnsanları güneşe karşı daha hassas olmalarını sağlamanın en büyük zorluğu, UVR kaynaklı etkilerin hemen farkedilir şekilde olmamasıdır. Güneşten korunma alışkanlığı çocukluktan oturtulmalıdır ve güneş koruma faktörü en az 15 olan kremlerin

18 yaşına kadar ciddi biçimde kullanılması cilt kanseri ihtimalini %78 azaltmaktadır (Truhan 1991).

Genellikle insanlar, minimal eritem dozlarının (MED) 4 katı dozda güneş ışığına maruz kaldıklarında ağrılı güneş yanıklarıyla karşılaşırlar. MED, 24 saat içerisinde tek tip eritem oluşumuna yetecek kadar minimum enerji miktarıdır. 8 kat MED maruziyeti, deride su toplanmasına neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, MED'un New Jersey'de haziran ayında gün ortasında 10-35 dk arası maruziyete denk olduğu bildirilmiştir (Taylor ve ark. 1990).

2.2. Ciltte UVA Radyasyonun Etkileri

Cilt, solar UVR gibi hasar verici çevresel faktörlere karşı vücudun ilk savunmasıdır. Cildin UVR'a cevapları olarak, D vitamini sentezi, eritem, sitokin üretimi artışı ve melanizasyon sayılabilir. Cilt epidermis, dermis ve subkutis olmak üzere üç ana tabakadan oluşmaktadır. Şekil 2.1'de görüldüğü gibi dermis epidermisin altında bulunmakta ve epidermisin koruyucu dış tabakası için mekanik destek sağlamaktadır. Cildin tabakalarına bakıldığında ışığın dalga boyu büyüdükçe ciltte daha derinlere nüfuz edebilir. UVB, UVA'ya oranla daha düşük dalgaboyunda olduğu için UVA kadar derine yani, dermis tabakasına kadar penetre olamaz (Şekil 2.1).



Şekil 2-1: Cildin tabakalarında UV penetrasyonu

UV radyasyonun ciltte oluşturduğu fotohasar, kompleks ve çok yönlü bir problemdir. Moleküler ve biyokimyasal düzeyde meydana gelen değişiklikleri, cilt yapısında gözle görülür klinik değişiklikler takip etmektedir.

Kronik UV maruziyetiyetinden kaynaklanan ciltle ilgili hasarlardan biri olarak bazal hücre karsinoma ve skuamöz hücre karsinomayı (SCC) içeren non-melanoma cilt kanseri (NMSC) gösterilmektedir. Bunlar en çok karşılaşılan kutanöz bozukluklardır ve insanda görülen en yaygın kanser tipleridir (Weinstock 1994). Bazal hücre kanseri, karşılaşılan güneş ışığıyla paralel olarak dünya çapında en sık görülen kanserdir (Chuang ve ark. 1990). Bu tipe analog olarak, SCC'da da risk faktörü uzun süreli UVR maruziyetidir. Psoralens ve UVA (PUVA) ile muamele görmüş hastalarda yapılan çalışmada, UVA ve SCC arasında direkt bağlantı olduğu ispatlanmıştır. SCC oluşma riskinin PUVA ile tedavi edilmiş hastalar için 30 kat fazla olduğu gözlenmiştir (Kwa ve ark. 1992). Yapılan bir çalışmada non-melanoma cilt kanserinin %80'inin 50 yaş üstünde ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu da bu hastalığın gelişimi için hayat boyu kümülatif güneş ışığı maruziyetinin direkt etkili olduğunu ispatlamaktadır (Vitasa ve ark. 1990). Ayrıca UVR ve habis melanoma ilişkisini destekleyen kanıtlar da mevcuttur (Austoker 1994; Garland 1992; Skolnick 1991; Mawn ve ark. 1993).

Melanoma genellikle deride bulunan pigment hücreleri olan melanositlerin kontrolsüz üremesiyle oluşan habis tümördür (Jerant ve ark. 2000; Horner ve ark. 2008). Her yıl dünya çapında genellikle erkeklerde ve beyaz tenlilerde olmak üzere 160.000 yeni melanoma vakası teşhis edilmekte (Parkin ve ark. 2005) ve güneşli iklimde yaşayan popülasyonlarda daha yoğun olarak görülmektedir. Dünya sağlık örgütü (WHO) raporuna göre her yıl 48.000 melanoma kaynaklı ölüm meydana gelmektedir (WHO 2006). Melanoma oluşumu için yapılan risk analizindeki önemli faktörler, güneş ışığına maruziyet süre ve sıklığını, güneşe maruziyetin hangi yaşlarda meydana geldiğini ve derideki pigmentasyonun derecesini kapsamaktadır.

UVR sonrası gözle görünür klinik değişiklikler, ince ve kalın kırışıklıkları, sarkma, benekli pigmentasyon, telangiektasia ve purpurayı kapsamaktadır. UVR'un, ciltte meydana gelen süreçsel yaşlanma ile oluşan değişikliklerin %90'ından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Tyrrell 1996).

Eritem, UVR'un hızla oluşan başlıca klinik belirtisidir ve vazodilatasyonun bir sonucudur. Ciltte eritem oluşumunu belirleyen faktörler, UVR dalgaboyu ve şahsın cilt

tipi ve pigmentasyonudur. Eritemojenik dalgaboyları olarak 250-290 nm aralığı en etkili bulunmuş ve dalgaboyu arttıkça etkinin azaldığı gözlenmiştir (Freeman ve ark. 1989). UVA radyasyon, UVB'ye oranla eritem oluşumunda 1000 kat daha az etkili olmasına rağmen, yeryüzüne UVB'ye oranla 10-100 kat daha fazla oranda ulaşır ve kümülatif etki ile eriteme neden olur. UVA maruziyetinden sonra oluşan eritem bifaziktir. Radyasyon sonrası hızla belirir, 4 saatte azalır ve 6-24 saat arası tekrar artış gösterir (Diffey ve ark. 1987).

UVR, epidermal melanin pigmentasyonunda artışa neden olmaktadır. Melanin foto-oksidasyonu ve melanositlerin içerisinde yer alan melanozomların dendritlere dağılımından kaynaklanan pigment koyulaşmasına UVA ve görünür ışık sebep olmaktadır.

2.3. Hücresel ve Moleküler Düzeyde UVA Radyasyonun Etkileri

Hücresel düzeyde, UV enerji absorpsiyonunun ardından, bazı kimyasal değişiklikler meydana gelir ve serbest radikaller oluşabilir. Bu radikal oluşumu ile çeşitli genlerin ekspresyonları etkilenir.

Özellikle karsinojenik etkilerde rol oynadığı düşünülen moleküler olaylar, p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyonunu (Ford ve ark. 1994; Nagano ve ark. 1993; Tornaletti ve Pfeifer 1994) ve protoonkojen indüksiyonunu (Roddey ve ark. 1994) kapsamaktadır.

UVR, vücutta kromofor olarak adlandırılan birçok hücresel bileşen ile etkileşir. Deoksiribo nükleik asid (DNA) bu bileşenlerin başlıcası olarak bilinmektedir. DNA'ya olan etki artan dalgaboyuyla azalmaktadır. DNA'nın UVR maruziyeti ile oluşan başlıca foto-ürünler; siklobütan primidin dimeri, pirimidin (6-4) primidon, adenin dihidrodimer, timin-adenin dimeri, sitozin fotohidratlarıdır (Gasparro ve Fresco 1986; Mitchell ve ark. 1991). UVA radyasyon, bahsedilen foto-ürünlerin oluşumunda çok etkili değildir ve DNA hasarını genellikle tek zincir kırılmaları (single strand break, SSB) şeklinde indükler (Peak ve ark. 1987). Bu kırılmalar, direkt olarak foton-DNA etkileşiminden ziyade, reaktif oksijen türleri gibi reaktif ara maddelerin oluşumuyla meydana gelir (Tyrrell ve Pidoux 1989). UVA sonucunda, genellikle singlet oksijen ($^1O_2$) (Klotz ve ark. 2001), süperoksid ($O_2^{\cdot}$), ve hidrojen peroksid (H_2O_2) (Peak ve Peak 1989) oluştuğu gözlenmiştir ve DNA hasarı oluşumunda hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikali ön planda tutulmaktadır.

Fotokimyasal ürünlerin çoğu, hücresel aktiviteleri farklı yönlerden bozarlar. Bu yeni kimyasal yapılar, enzimatik prosesleri indükler, tamir mekanizmalarını başlatır, yeni gen ekspresyonlarını indükler veya metabolik aktiviteyi değiştirir. Foto-ürünlerle bağlantılı olarak ortaya çıkan diğer hücresel cevaplar, yeni proteinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve melanin sentezi olarak sıralanabilir. Tablo 2.1'de memeli hücrelerde UVR maruziyeti sonrası indüklenen proteinlerin listesi sunulmaktadır.

Tablo 2-1: UVR maruziyeti ile memeli hücrelerinde indüklenen proteinler

Proteazlar	Stres kaynaklı proteinler
Kollajenazlar	Hem oksijenaz-1
Plazminojen aktivatörü	Metallotiyonein
Gen ekspresyonu regülasyon faktörleri	Büyüme faktörleri
c-fos	TGF-β
c-jun	FGF
HIV-1 promotor	Signal transdüksiyon proteinleri
Sitokinler	Fosfolipaz A_2
IL-1α ve IL-1β	Raf-1
GM-CSF	Src tirozin kinaz
IL-6	Diğerleri
IL-10	Ornitin dekarboksilaz
TNFα	ICAM-1

İndüksiyon, sentezlenen protein miktarı veya enzim aktivitelerinde artış şeklinde gözlenmiştir. Fos: FBJ mürin osteojenik sarkom, HIV-1: insan immün yetmezlik virüsü-1, IL: interlökin, GM-CSF: granülosit makrofaj-koloni stimüle eden faktör, TNF: tümör nekroz faktör, TGF: tümör büyüme faktörü, FGF: fibroblast büyüme faktörü, Raf-1: 3611 mürin sarkom, Src: Sarkoma, ICAM: hücreler arası adezyon molekülü

Proteinlerin fotokimyası da başlı başına araştırılan bir konudur. Triptofan ve tirozin 290 nm üstü dalgaboyunu absorbe eden ve birçok proteinin yapısında bulunan fotoaktif amino asidlerdir. 290 nm üzerinde, amino asidlerin çapraz bağlanması özellikle dermal proteinlerde gözlemlenir. Proteinlerle bağlantılı olan kromoforlar, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH), tetrahidropterin ve riboflavin gibi kofaktörleri de içermektedir (Cunningham ve ark. 1985a; 1985b). Proteinler, DNA'da olduğu gibi, hücredeki kromoforların fotokimyası sonucu oluşan reaktif türlerin hedefi olabilirler. Triptofan, sistein ve histidin, foto-oksidasyona en duyarlı amino asidlerdir. Oksijen varlığında, triptofanın eksite olan triplet halinden oksijene enerji transferi olur ve bu da

$^1O_2$ oluşumuna neden olur. $^1O_2$'in triptofan, sistein ve histidin ile oluşturduğu ilk ürünler, hücrede stabil olmayan hidroperoksidler ve endoperoksidlerdir. Bu ürünlerin bozunması, proteinlerde, doymamış yağlarda ve nükleik asidlerde daha ileri düzeyde kimyasal değişimlere neden olan reaktif radikallerin oluşumuna neden olur (Creed 1984a; 1984b). Yapılan bir çalışmada, membranların radyasyona maruziyeti ile oluşan doymamış membran yağlarının oksidasyonu, membran proteinlerinin biyolojik model sistemlerde lipid oksidasyonu için foto-hassasiyeti arttırdığını göstermiştir (Kochevar 1990). Canlı fibroblastlarda yürütülen diğer bir çalışma da, fizyolojik olarak anlamlı dozda UVA ile membrandaki değişiklikler kanıtlanmaktadır (Gaboriau ve ark. 1993). Keratinositler ve fibroblastların UVA ve UVB radyasyona maruziyeti sonucu membran fosfolipidlerinden araşidonik asid (AA) salınımının arttığı gözlenmiştir (Hanson ve DeLeo 1993). Bu UVR'a karşı oluşan hücresel cevapta, AA metabolizması için kullanılan siklooksijenaz yolağının ürünleri önemli sayılmaktadır. UVA kaynaklı AA salınımı, fosfolipaz A_2 ve fosfolipaz C aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Cohen ve DeLeo 1993). Protein fotokimyası ile ciltte oluşan kronik foto-hasarın direkt bağlantısını gösteren bir çalışmada, tüysüz farelerde UVA radyasyona kronik maruziyet ile çözünmeyen kollajenlerin parçalanmasında artış gözlenmiştir (Kligman ve Gebre 1991). Protein fotokimyası ile başlatılan kronik fotohasara diğer bir örnek ise insanlarda lenste görülen solar kataraktlardır. Lens proteinlerindeki triptofan, UVR kaynaklı kataraktın oluşumuna neden olan başlıca kromofor olarak düşünülmektedir (Zigman 1993). Triptofan foto-ürünlerinden olan hidrojen peroksid (H_2O_2) ve süperoksid ($O_2^{\cdot}$)'in lens proteinleri ile reaksiyon oluşturduğu ileri sürülmektedir (Sommerburg ve ark. 1998).

Urokanik asid, stratum korneumda bulunan ve histidince zengin bir protein olan filaggrinin parçalanma ürünüdür. 290 nm üzeri dalgaboylarındaki radyasyonu absorbe eder. Fotoeksitasyonla, trans yapıdan cis yapıya izomerize olur ve bu sis-urokanik asid, UV kaynaklı karsinojenezde önemli rol oynar (DeFabo ve Noonan 1983).

Cilt yapısındaki melanin, UV ve görünür ışığı absorbe etmektedir. Melaninin radyasyona tabi tutulması sonucunda elektron spin rezonans tekniğiyle tayin edilebilen serbest radikaller oluştuğu gözlenmiştir (Plonka 2009).

2.4. Oksidatif Stres ve Oluşturduğu Hasarlar

UVR sonucu birçok yapıyla fotokimyasal reaksiyon sonucu oluştuğu varsayılan serbest radikaller, UVR ve serbest radikal oluşumu arasında birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran, ortaklanmamış elektronunu bir başka moleküle vererek veya başka bir molekülden elektron alarak daha kararlı hale gelme eğiliminde olan atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller, organizmada birçok sebeple devamlı oluşabilir ve zararları antioksidan sistem tarafından indirgenmektedir. Organizmada antioksidan sistemler ile serbest radikaller arasındaki dengenin radikaller yönünde bozulması ve bunun sonucu hücre hasarı oluşması durumuna oksidatif stres denilmektedir. Oksidatif stres, hücrede belli başlı yapılar olan DNA, lipid ve proteinlere zarar verir (Sies 1997; Halliwell ve Gutteridge 1999). Bu yapılara zarar vermesiyle hücre yapısının bozulmasında ve buna bağlı rahatsızlıkların oluşmasında oksidatif stresin rolü büyük önem kazanmıştır (Fiers ve ark. 1999).

Reaktif türlerin hücresel bileşenlerle reaksiyonu sonucu belli başlı ürünler oluşmaktadır. Bu ürünler oksidatif stresin hasar derecesinin tayininde biyolojik göstergeler olarak kullanılmakta ve oksidatif stres çalışmalarına kolaylık sağlamaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu başlıca araştırılan ürün malondialdehid, DNA oksidasyonu sonucu 8-hidroksi deoksiguanozin ve protein oksidasyonu sonucu ise protein karbonillerdir (Griffith ve ark. 2002).

2.5. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin organizmada çok miktarda bulunmasından dolayı, önemli bir oksidatif modifikasyondur. Hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak veya çevresel kaynaklardan üretilen aktif reaktif türler, proteinlerdeki amino asidlerde modifikasyonlara sebep olur ve protein fonksiyonunda/enzimatik aktivitede kayba neden olurlar (Grune ve ark. 1997). Bir oksidanın neden olduğu protein oksidasyonunun derecesi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca oksidatif protein hasarı, oksidatif DNA hasarına oranla daha komplekstir, çünkü DNA'daki 4 baz yerine proteinlerde 20'den fazla farklı oksidasyon ürünlerinin oluşumuna neden olabilecek amino asid vardır (Grune 2000).

Oksidatif protein modifikasyonları farklı yollarla gerçekleşebilir. Bunlar (i) reaktif türlerin protein ile direkt etkileşimi ya da (ii) reaktif türlerin lipid, karbohidrat ve

nükleik asid gibi diğer hücresel bileşenlerle oluşturduğu ürünlerle proteinlerin etkileşimi şeklindedir (Davies 2003). Bu tarzda reaktif ve protein olmayan bileşikler proteinlerle reaksiyona girerek geniş bir dizi yapılar oluştururlar (Levine 2002; Grune ve ark. 2001). Protein oksidasyonu sürecinde reaksiyonların çoğu belli bir kısıma yöneliktir. Protein oksidasyonu reaksiyonları genellikle protein anayapısını modifiye eden ve amino asid yan zincirleri modifiye eden şeklinde ayrılmıştır (Stadtman ve Levine 2000; Dean ve ark. 1997).

Protein anayapısındaki modifikasyonlar, polipeptid zincirlerin fragmentasyonu ile karakterize edilir. Teminal amino asidden derivatize olmuş peptid fragmanları oluşur. Oksidatif polipeptid zincir fragmentasyonu, oksijenle reaksiyon veren α-karbon merkezli radikalin, ilk olarak peroksil türleri ve sonrasında da hidroperoksid oluşturmasıyla başlar. Bu α-karbon hidroperoksidlerin bozunması, karboksi- ve amino-merkezli amino asidlerin türevi olan ketoaçil ve amidlerin oluşumuyla peptid zincir ayrılmasına neden olur (Davies 1987; Davies, Delsignore ve ark. 1987; Davies ve Delsignore 1987; Davies, Lin ve ark. 1987; Stadtman 1993; Giulivi ve Davies 1993).

Protein oksidasyonunun diğer bir önemli sonucu, akümülasyonuna izin verildiğinde genellikle hücre için toksik hale gelen büyük protein agregatlarının oluşumudur. Bu akümülasyon, protein agregatlarının proteaz enzimleri için zayıf substratlar olmalarından kaynaklanmaktadır. Birçok deneysel model, agregatları protein oksidasyonun göstergesi olarak kullanmaktadır. Agregatlar inert ürünler değillerdir fakat özellikle protein devri olmak üzere hücre metabolizmasını aktif olarak etkilerler. Bu çözünmeyen agregatlar, karbon merkezli radikallerin amino asid yan zincirlerinin kovalent bağlanması ile oluşabilir. En çok incelenen kovalent yapılardan biri, iki tirozil radikalleri arasında oluşan 2,2'-bifenil kovalent bağıdır (Shringarpure ve Davies 2002; Grune ve ark. 2004). Bununla birlikte proteinlerin kısmi çözülmesini takiben oluşan non-kovalent etkileşimlerin neden olduğu protein yüzeyinde hidrofobik parçalara maruziyetin de agregat oluşumunun nedenlerinden olduğu düşünülmektedir. Bu tarz non-kovalent etkileşimler okside kalıntıların aralarındaki genelde çapraz bağ ile sonuçlanan hidrofobik ve elektrostatik reaksiyonları kapsamaktadır (Davies 1987; Davies, Lin ve ark. 1987; Shringarpure ve Davies 2002). Birçok araştırmacı, yaşlı hücrelerde proteinlerin çapraz bağlanması sonucu oluşan lipofusin, seroid ve ileri derecede glisilenmiş ürün (AGE) olarak bilinen çözünmeyen, floresans materyal

oluşumunu ileri sürmektedir (Yin 1992; 1996). Bunlardan lipofusin ile özellikle yaşlılıkla bağlantılı çalışmalar yapılmış ve akümülasyonu yaşlanmanın iyi bilinen bir biyomarkörü olarak kabul edilmiştir (Sitte, Huber ve ark. 2000).

Proteinlerde anayapının modifikasyonu yanında, amino asid yan zincirlerinin de serbest radikal hasarında hedef oldukları bilinmektedir. Yapılarında sülfür içeren amino asidler sistein ve metiyonin oldukça hassastırlar (Chao ve ark. 1997). Yan zincirlerin oksidasyonu, sisteinden sistin, metiyoninden metiyonin sülfoksid, histidinden aspartat, tirozinden 3,4-dihidroksifenilalanin, lösinden hidroksilösin, triptofandan N-formil-kinurenin gibi farklı ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır. Sistein yapısındaki sülfhidril gruplarının oksidasyonu genellikle protein veya peptidlerin agregasyonuna neden olan intra- veya interselüler disülfidlerin oluşumuna neden olur (Shringarpure ve Davies 2002). Aromatik yapılar da serbest radikal hasarına karşı başlıca hedeflerdir, bu yüzden oksidatif modifiye olan tirozin, fenilalanin ve triptofan genellikle oksidatif hasar göstergesi olarak tayin edilmektedir (Grune ve ark. 1997). Lizin, arjinin, prolin veya treonin oksidasyonu karbonil türevlerinin oluşumuyla sonuçlanabilir (Shringarpure ve Davies 2002). Protein karbonilleri okside proteinlerin tayininde en sık kullanılan ürünler arasındadır (Levine ve ark. 1994). Ayrıca protein karbonillerin oksidatif stresin göstergesi olarak kullanımı, oldukça erken oluşumlarından ve stabilitelerinden dolayı tercih edilmektedir. Karbonil grupların protein havuzuna katılmasında, protein olmayan hücresel bileşenlerin oksidasyonundan kaynaklanan ürünlerde kısmen sorumludur (Buss ve ark. 1997; Alamdari ve ark. 2005).

2.6. Protein Tamir Sistemleri

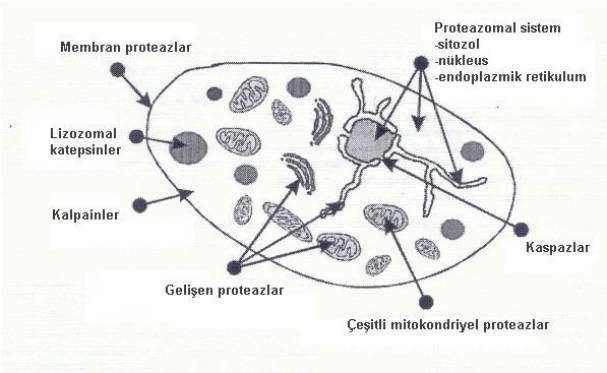
Proteinlerin oksidasyonunu takiben, canlı hücreler hasarlı polipeptidleri kurtarmaya ve fonksiyonlarını onarmaya çalışırlar. Böyle bir işlem yeni protein moleküllerinin sentezine oranla enerji açısından daha avantajlıdır. Protein modifikasyonlarının çok çeşitli olmasından dolayı, tamir mekanizmaları genelde en sık ve kolay tamir edilebilir modifikasyonlar için geçerlidir. Bu yüzden memeli hücreleri sadece sınırlı direkt tamir mekanizmaları içermektedir ve genellikle okside proteinlerin çoğu selektif proteolize uğrarlar. Disülfid bağlar ve metiyonin sülfoksidler enzimatik olarak protein disülfid izomeraz, tiyoredoksin/tiyoredoksin redüktaz sistemi ve Msr ile tamir edilebilir (Purig ve Gilbert 1994; Holmgren 1989; Levine ve ark. 1996; Levine ve ark. 1999; Vogt 1995). Bu çalışmada da incelenen Msr enzimi, metionin sülfoksidleri

metiyonine redükler (Grune ve ark. 1997). Oksidatif hasar görmüş proteinlerin aktivitelerini tekrar kazandırmanın yanında, oluşan redükte metiyoninler antioksidan etki göstererek diğer oksidanların nötrlenmesine de yardımcı olur (McDuffee ve ark. 1997; Sommerburg ve ark. 1998). Özellikle MsrA olarak bilinen enzimin yapılan çalışmalarda, fibroblastların yaşlılık sürecinde ve keratinositlerin kronik veya yüksek doz UVA maruziyetinde azaldığı gözlenmiştir (Scharffetter-Kochanek ve ark. 1993; Jung ve ark. 2007). Ayrıca Msr sisteminin oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne karşı önemli rolü farklı hücre serilerinde rapor edilmiştir (Naru ve ark. 2005; Herrmann ve ark. 1993; Hantke ve ark. 2002; Ogawa ve ark. 2006).

Hücreler ayrıca proteinleri oksidatif parçalanmadan sonra tekrar inşa etme kabiliyetine sahip, ısı şok ve stres proteinleri gibi farklı proteinler içerirler (Noonan ve ark. 2007).

2.7. Proteoliz

Oksidatif olarak modifiye olmuş proteinler yukarıda da bahsedildiği gibi genellikle tamir edilemezler ve organizmadan proteolitik degradasyonla uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Proteinlerin degradasyonu, normal hücresel fonksiyonu sağlamak için gerekli bir fizyolojik işlemdir. Bu yüzden hücreler non-fonksiyonel proteinleri agregasyona başlamadan uzaklaştırmak için iyi düzenlenmiş intraselüler proteolitik sistemler geliştirmişlerdir. Memeli hücrelerinde hücre içerisinde dağılmış halde bir seri proteazlar bulunmaktadır (Şekil 2.2). Bu proteazlara örnek olarak; katepsinler, kaspazlar, kalpainler, mitokondriyel lon proteaz verilebilir. Bunun yanında okside proteinlerin degradasyonundan sorumlu olan başlıca proteolitik sistem ise proteazomal sistemdir (Bader ve Grune 2006; Mehlhase ve Grune 2002; Bohley ve Seglen 1992; Mellgren 1987).



Şekil 2-2: Hücre İçerisinde Farklı Kompartmanlardaki Proteazlar

Mitokondri ve endoplazmik/sarkoplazmik retikulumdaki birçok protein ve endositoz, pinositoz veya fagositozla alınan yabancı proteinler lizozomlarda katepsinler denilen bir seri proteazla degrade olmaktadır (Roberg ve Ollinger 1998). Lizozomlar hücredeki proteolitik mekanizmaların başlıca bileşeni olarak bilinmesine rağmen, lizozomal proteazların oksidatif hasarlı proteinleri tanıması ve selektif olarak degrade etmesi sınırlıdır. Substratın oksidatif hasar derecesinin yanında, lizozomal kompartmandaki asidik koşullar degradasyon oranını etkileyebilir. Yapılan çalışmalardan; endosite olan düşük dansiteli lipoproteinlerden apolipoprotein B proteininin makrofaj lizozomlarında zayıf degradasyonu ve akümülasyonu (Jessup ve ark. 1992), endosite olmuş okside albuminin yarı ömrünün hasarsız proteine oranla daha uzun oluşu (Grant ve ark. 1993) örnek olarak gösterilebilir.

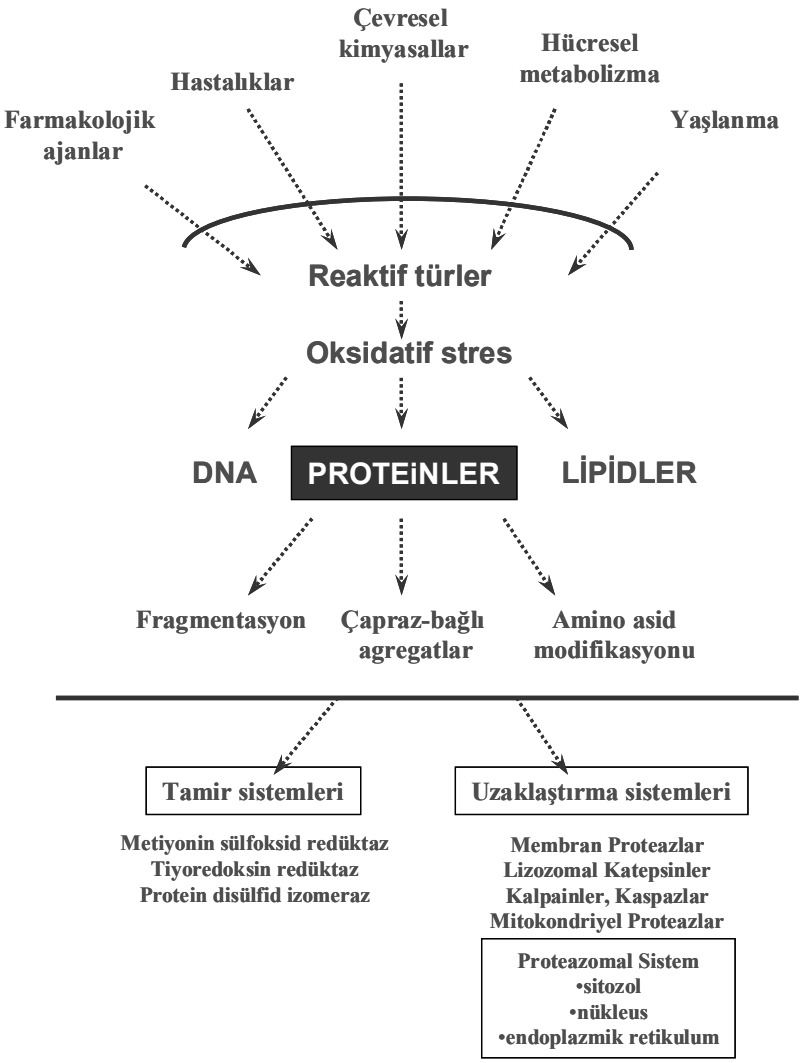
Kalpainler, sitozolik Ca^{2+}-bağımlı sistein proteazlardır ve tüm dokularda yüksek oranda mevcuttur. Kalpainler, hücre iskeletinin yakınında lokalize olur ve genelde protein-kinazlar, fosfatazlar, membran reseptörleri, transport proteinleri ve regülatör proteinleri gibi hücre iskeletindeki proteinleri degrade ederler. Oksidatif stres ile intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonu artışı ile bağlantılı kalpain aktivitesinde artış olduğunu gösteren C6 glioma hücrelerinde, hepatositlerde ve oligodendrositlerde (Ray ve ark. 1999; Miyoshi ve ark. 1996; McCracken ve ark. 2001) yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bulunan sonuçlar, oksidatif stres sonucu artan Ca^{2+} değerlerinin kalpain aktivasyonunda başlıca faktör olduğunu doğrulamaktadır.

Mitokondrinin intraselüler serbest radikal oluşumunda önemli bir hedef oluşu, mitokondriyel proteinlerin oksidasyon kaynaklı devrinin fazla oluşunu açıklamaktadır (Davies 1995). Mitokondri, mitokondriyel proteinlerin selektif degradasyonunu katalizleyen iyi gelişmiş proteolitik yolağa sahiptir (Dice ve Goldberg 1975) ve özellikle bu proteazlardan bir tanesi oksidatif modifiye proteinlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Bota ve Davies (2002), okside akonitazın lon proteaz tarafından selektif degradasyonunu rapor etmişlerdir. Lon proteaz, mitokondriyel matriks serin tip proteazdır ve mitokondriyi oksidatif stres ve yaşlanma ile akümüle olan protein hasarından korur (Bota ve ark. 2002).

Kaspazlar, hücre iskeletindeki proteinlerin degradasyonunun yanında, poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) ve lamin B gibi nükleer proteinlerin degradasyonundan

sorumludur (Chan ve Mattson 1999; Sleiman ve Stewart 2000). Bu süreç, genelde oksidatif stres sonrası meydana gelen apoptozisteki protein yıkımıyla bağlantılıdır ve hedef enzimi inaktive etmeyi amaçlar.

Şekil 2.3'de oksidatif stresin proteinler üzerindeki etkileri, tamir ve uzaklaştırma sistemleri özetlenmiştir.



Şekil 2-3: Oksidatif stres gelişimi ve protein havuzuna etkisi.

2.8. Proteazomal Degradasyon

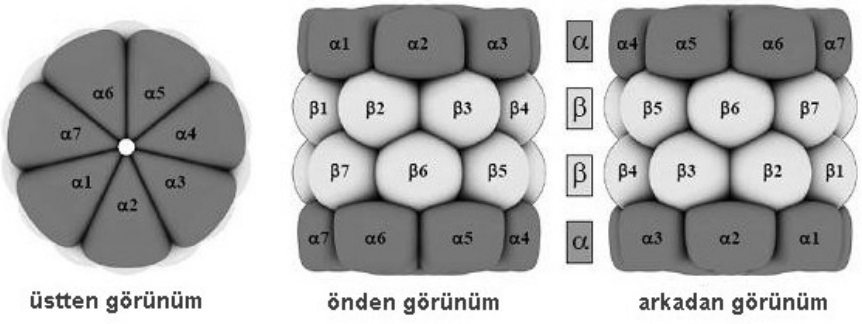
Tüm proteolitik sistemlerin yanında, okside sitozolik ve nükleer proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumlu başlıca proteolitik sistem proteazomdur (Grune ve ark.

2003). Proteazomun oksidatif hasarlı proteinlerin degradasyonunda rol oynadığını doğrulamak için bir dizi deneyler gerçekleştirilmiştir. İzole proteazomun inhibisyon profilleri, memeli hücrelerde proteazomun rolünü doğrulamıştır. En açık cevap, immunopresipitasyon çalışmalarından gelmiş, hücre lizatlarının okside proteinleri degrade kabiliyetlerinde dramatik azalma gözlenmiştir (Grune ve ark. 1996). Sonrasında, proteazom C2 esansiyel alt ünitesinin başlangıç bölgesine karşı anti-sens oligodeoksinükleotidler kullanılmış, bu yaklaşım ile proteazom içeriği büyük ölçüde azaltılmıştır. Anti-sens ile muamele edilmiş Clone 9 karaciğer epitel hücrelerinde ve K562 insan eritrolökemi hücrelerinde oksidatif stres sonrası proteazom aktivasyonunun baskılanmış olduğu gözlenmiştir (Grune ve ark. 1995; 1998). İlaveten, proteazom spesifik inhibitörü laktasistin ile okside proteinlerin degradasyonunun azalmış olduğu gözlenmiştir (Sitte ve ark. 1998). Canlı hücrelerde oksidatif proteinlerin degradasyonunda proteazomun rolünü ispatlamak için en kesin yöntem proteazomdan yoksun mutantların kullanılması olabilir. Fakat, proteazom hücre farklılaşması, hücre siklusu bağımlı siklin devri, hücre bölünmesi ve antijen üretimi gibi hayatsal hücre fonksiyonlarına sahip olduğu için bu denemeleri yapmak imkansızdır (Ciechanover 1994; Coux ve ark. 1996).

Sitozol ve çekirdekte yer alan proteazomal sistem, 20S proteazom merkezi yapısı ve çeşitli regülatör bileşenlerden oluşur. Diğerlerinin arasında, 19S (PA700) ve 11S (PA28) olarak adlandırılan yüksek molekül ağırlıklı regülatörler en çok incelenilenlerdir. 20S kompleksi, 670-700 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve zincir başına 7 homolojik monomer ile fıçı şeklinde yapı oluşturan iki set 14 alt üniteden oluşur (Şekil 2.4, Jung ve ark. 2009). Her alt ünitenin molekül ağırlığı 18-35 kDa arasındadır. İç halkalar proteazomun katalitik merkezlerini içeren β alt ünitelerden, dış halkalar ise regülatör bağlanmasından sorumlu α alt ünitelerden oluşur (Coux ve ark. 1996; Rivett 1993; 1998). 20S proteazom, proteinleri adenozin trifosfat (ATP) ve ubikutinden bağımsız bir şekilde degrade etmektedir. Genellikle 20S proteazom merkezi yapının bu şekilde okside proteinlerin degradasyonu için yeterli olduğuna inanılmaktadır.

19S kompleksinin 20S kompleksinin her iki ucuna bağlanması ile 26S denilen bir yapı oluşur. Bu büyük proteaz, hücrelerde ATP ve ubikutin (Ub) bağımlı proteolizden sorumludur. 19S regülatörünün multi-Ub-konjuge proteinlerin tanınması

ve proteazom içerisine girişi kolaylaştırmak için başlıca fonksiyonları vardır. Bu yüzden, 19S regülatörü multi-Ub-zincir bağlama proteinleri, poli-Ub-hidrolazları ve ATPazları içerir. Ub, ubikutinasyon mekanizmasıyla hücresel proteinlere kovalent bağlanan küçük peptiddir. Oluşan poliubikutin zincirleri, degrade olacak hücresel proteinlere bağlanır ve substratın 26S proteazomdaki 19S regülatör tarafından tanınmasından sorumludur. Ub konjugasyonu, E1, E2 ve E3 olarak adlandırılan bir seri enzimlerle katalizlenmektedir. Konjugasyonun başlangıç aşamasında Ub, Ub aktive edici enzim olan E1'in sisteini ile ATP-bağımlı tiyolester oluşumuyla aktive olur. Aktif Ub, Ub'i hedef proteine taşımak için E3 enzimlerinden biriyle etkileşime girmeden önce, E2 enzimlerinden bir tanesine transfer olur (Glickman ve Ciechanover 2002; Koegl ve ark. 1999; Voges ve ark. 1999; Wilkinson 2000).



Şekil 2-4: Memeli 20S proteazomun yapısı

11S regülatör de, 20S proteazomun uçlarına bağlanabilir ve bu bağlanmanın florojenik peptidlerin degradasyonunda 3-25 kat artışa neden olduğu düşünülmektedir. 20S/11S kompleksinin oluşumu, proteazom regülasyonu ve alt ünite ekspresyonu şeklinde sinerjik etki göstermektedir. Bu proteazom yapısı majör histokompatibilite kompleksinde sunulabilen peptidleri üretme yeteneğine sahiptir (Hoffmann ve Rechsteiner 1994; Ustrell ve ark. 1995; Kania ve ark. 1996).

Oksidasyon protein yapısında kısmi parçalanma ve denaturasyona neden olur ve bunları yüzey hidrofobluğunda artış takip eder. Okside proteinlerin 20S proteazom tarafından degradasyon işleminde, hidrofobik kısımlar tercih edilir (Pacifici ve ark. 1989; Pacifici ve ark. 1993; Guilivi ve ark. 1994; Davies 2001). Okside proteinlerin artan degradasyonu, oksidasyonun derecesine ve lokasyonuna bağlıdır. Normal

derecede bir oksidasyon proteinin proteazomal degradasyonun artırırken, çok şiddetli okside olmuş ve çapraz-bağlı proteinler proteazom için zayıf susbstratlardır (Sitte, Huber ve ark. 2000; Friguet ve Szweda 1997). Kısmi olarak parçalanmış ve bu yüzden hidrofobluk kazanmış olan okside proteinler, Ub ile modifikasyona gerek duymayabilir. Buna bağlı olarak birçok çalışma, okside proteinlerin 20S proteazom tarafından ATP ve ubikutinden bağımsız degradasyonunu doğrulamaktadır. Serbest 20S kompleksleri hücrelerde yüksek miktarda mevcuttur (Shringarpure ve ark. 2001; 2003). Proteoliz esnasında, parçalanmış durumda olan protein substratları dış halkaları açarak silindir yapıya girerler ve aktif merkezlerin yer aldığı iç boşlukta degrade olurlar. Bu mekanizma, proteinlerin ağır derecede okside olma durumunda oluşan agregatların proteazomal degradasyon için zayıf substratlar oluşunu açıklamaktadır. Agregatların boyutları silindirin iç kısmına penetrasyonlarına izin vermemektedir. Ayrıca bu agregatlar proteazomun dış halkasını tıkayabilir ve katalitik aktivitesini inhibe edebilirler (Coux ve ark. 1996; Giulivi ve ark. 1994).

Proteinlerin kabul edilen proteazomal parçalanmaları, bazik, hidrofobik ve asidik amino asidlerin karboksil kısımlarından gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla tripsin-tarzı, kimotripsin-tarzı, ve peptidil-glutamil-hidrolaz aktivite olarak adlandırılmaktadır (Coux ve ark. 1996).

Proteazomun sitozolik aktivitesinin yanında, kromatin bütünlüğünü sağlamak için nükleustaki rolünü açıklayan birçok çalışma mevcuttur. Nükleustaki oksidatif modifikasyonlar esnasında kromatin yapısındaki histon proteinleri başlıca hedef yapılardır ve oksidatif hasarlı histonlar proteazom ile degrade olarak kromatin yapısından uzaklaştırılır. Nükleer proteazom fonksiyonu, oksidatif strese yanıt olarak PARP-1 enzimi ve poli(ADP-riboz) ile arttırılır. PARP-1 aktivasyonu ise DNA hasarı ile indüklenir ve DNA tamirinde rol oynadığı düşünülür (Merker ve ark. 2003; Arnold ve Grune 2002; Ullrich ve ark. 1999; Mayer-Kuckuk ve ark. 1999; Ullrich ve Grune 2001).

Oksidatif stres sürecinde proteolitik sistemlerin önemi göz önüne alındığında, farklı organizmalarda proteolizi ölçmek maksatlı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. İzole proteinlerde ve hücrelerde, proteinlerin radyoaktif materyal ile işaretlenmesini takiben proteolitik aktivite ölçümü yapılabilir (Catalgol ve Grune 2009). Ayrıca, florojenik

peptid olan süksinil-lösin-lösin-valin-tirozin-metilkumarin (suc-LLVY-MCA) proteazom aktivitesi ölçümü için sıklıkla kullanılan bir substrattır (Grune ve ark. 1995).

2.9. Proteazom İnhibisyonu

Proteazom inhibitörleri son zamanlarda birçok çalışmaya konu olmuştur. Proteazom inhibisyonu, siklinler, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri ve tümör baskılayıcı genler gibi kanser gelişimini ve metastazını önleyici hücre siklusu regülatör proteinlerinin uygunsuz ve artmış şekilde olan proteazomal degradasyonunu bloke eder. Proteazomun hücre fonksiyonlarındaki rolleri, kanser ve kanser benzeri hastalıkların tedavisinde inhibitörleri önemli hale getirmekte ve klinikte yer almalarını sağlamaktadır (Wu ve ark. 2008; Adams ve ark. 1999; Stenner ve ark. 2008; Teicher ve ark. 1999; Hideshima ve ark. 2001; Adams ve Elliott 2000).

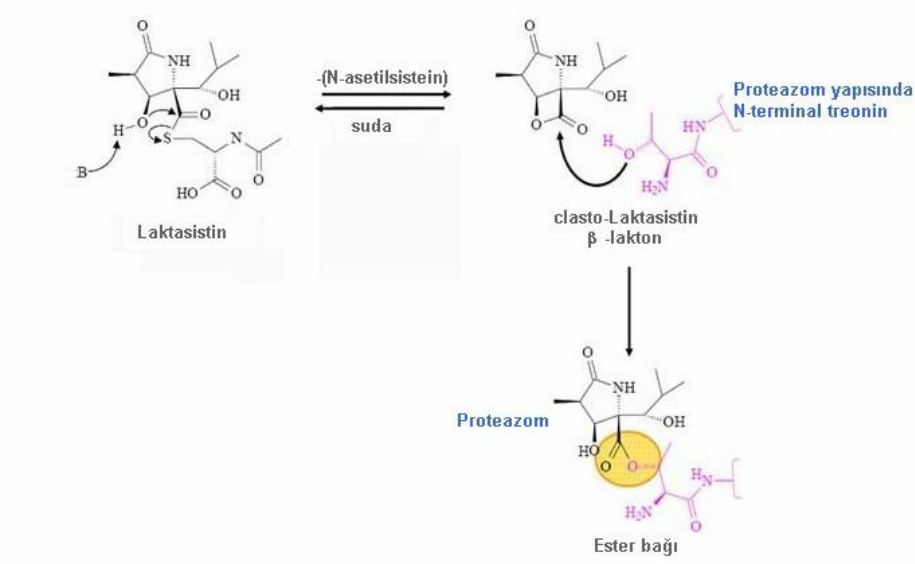
Proteazom inhibitörlerinin mekanizmasını anlamak için, proteazom yapısını ayrıntılı şekilde incelemek önemlidir. Proteazomlar, treonin proteazlar olarak ta bilinen proteolitik enzimlerdir. Nükleofilik aktif kısım olarak, β-alt ünitelerinde bulunan N-merkezli treoninleri kullanırlar (Kisselev ve Goldberg 2001).

Proteazom inhibitörleri, kimyasal yapılarına göre doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar (Tablo 2.2, Kisselev ve Goldberg 2001). Sentetik inhibitörler bir peptid ile aldehid, benzamid, vinilsülfon ve boronat gibi reaktif bir grubun birleştirilmesiyle elde edilir. Klinikte en çok kullanılan PS-341 ya da daha çok kullanılan adıyla bortezomib, boronat türevi bir inhibitördür. 20S proteazom yapısındaki N-merkezli treonin ile boron üzerindeki p-orbitali arasındaki psödo-kovalent bağ oluşumuna neden olur ve bu şekilde inhibisyon gösterir (Adams ve ark. 1998).

Tablo 2-2: Proteazom için spesifik proteaz inhibitörleri

Doğal inhibitörler	Sentetik inhibitörler
Epoksiketonlar	Peptid-aldehid
Peptid-makrosiklen	Peptid-benzamid
Tiyolester (γ-laktam)	Peptid-α-ketoaldehid
Epipolitiyoksidioksopiperazin	Peptid-vinilsülfon
Laktasistin	Peptid-boronat

Doğal inhibitörlerden olan laktasistin, deneysel işlemlerde oldukça fazla kullanılan bir inhibitördür. Hücrenin laktasistine olan geçirgenliği fazladır fakat bunun yanında laktasistini Streptomyces Lactacystinaeus bakterisinden izole etmek zordur. Laktasistin, hem kimotripsin-benzeri hem de tripsin-benzeri proteazom aktivitelerini inhibe eder. Laktasistinin proteazom ile etkileşimi Şekil 2.5'te gösterilmiştir (Fenteany ve ark. 1995; Dick ve ark. 1996). Laktasistin suda clasto-laktasistin-β-lakton yapısına bozunmaktadır. β-lakton, proteazom yapısındaki N-terminal treonine kovalent bağlanır ve ester bağı oluşturarak geri dönüşümsüz inhibisyona neden olur (Jung ve ark. 2009).



Şekil 2-5: 20S proteazom-laktasistin etkileşimi.

Proteazom inhibisyonuna farklı bir açıdan bakıldığında, tedavi amaçlı kullanılan inhibitörler yanında, fazlaca okside olmuş ve çapraz-bağ oluşturmuş substratların proteazomu inhibe etmesi istenmeyen bir durumdur. Özellikle yaşlanma ile oluşan ve lipofusin diye bilinen protein agregatlarının bu süreçte rolü büyüktür (Sitte, Huber ve ark. 2000).

2.10. Matriks Metalloproteinazlar

UV radyasyonun neden olduğu gen ekspresyonları denildiğinde ilk akla gelen MMP enzimleri olmaktadır. MMP'lar ekstraselüler matriksin dinamik olarak şekillenmesinde önemli rol oynayan Zn-bağımlı endoproteinazlardır. MMP'lar; kollajenazlar (MMP-1, -8 ve MMP-13), jelatinazlar (MMP-2, -9), matrilisin (MMP-7),

stromelisinler (MMP-3, -10, -11), makrofaj elastaz (MMP-12) gibi farklı çeşitleri içermektedir (Tablo 2.3) (Watson ve Tierney 1998). MMP-1 ise bunların içerisinde en fazla rastlanılan MMP'dir ve ciltte dermal fibroblastlar tarafından üretilmektedirler. MMP-1 ayrıca cilt hasarı ve yaşlanması çalışmalarında başlıca odaklanılan enzimdir. MMP-1 ekspresyonunda meydana gelen artış ve en çok bilinen inhibitörü olan TIMP-1 ekspresyonunda azalma ile matriks bileşenlerinden olan tip1 kollajen degradasyonunda artış gözlenir ve bu da ciltte gözle görülür değişikliklere neden olur (Kahari ve Saarialho-Kere 1997).

Tablo 2-3: Matriks metalloproteinazların çeşitleri

Enzim adı	MMP numarası	Degrade ettiği proteinler
Kollajenaz	1	Fibriler kollajenler I, II, III, VIII, X
	8	Proteoglikan
	13	Fibriler kollajen
Jelatinaz A	2	Denature kollajenler (jelatinler)
Jelatinaz B (tip IV kollajenaz)	9	Tip IV kollajenler, elastin
Stromelisin-1	3	Proteoglikan merkez protein, Tip IV kollajenin helikal olmayan bölgeleri, laminin, fibronektin
Stromelisin-2	10	Prokollajenler I, II, III, jelatinaz B, kollajenaz
Stromelisin-3	11	Stromelisin-1 ile aynı
Matrilisin	7	Stromelisin-1 ile aynı
Metalloelastaz	12	Stromelisin-1 ile aynı
MT-MMP-1	14	Projelatinaz A

2.11. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde temel mekanizmayı oluşturdukları için detaylı olarak incelenen proteinlerdir. Bu faktörler genellikle iki bölgeden oluşur: Proteinin bir bölgesi özgül olarak DNA'ya bağlanır, diğeri ise, transkripsiyon sistemindeki bileşenleri de kapsayan proteinlerle etkileşerek transkripsiyonu uyarır. Günümüzde, ökaryot hücrelerde, kompleks çok hücreli organizmalardaki dokuya özgü ve uyarılabilir gen ekspresyonunun karmaşıklığından ötürü birçok transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (Eresen 2006).

Fotokimyasal reaksiyonlar, UVR'a cevap veren genlerin aktivasyonunu kontrolde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur. Yapılan çalışmalarda, birçok transkripsiyon faktörünün bu şekilde aktive olduğu gözlenmiştir.

İnsan cilt hücrelerinde UVA radyasyonun AP-1 ve nükleer faktör kappa-B (NFκB) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Sitte, Merker ve ark. 2000; Grune ve ark. 2004; Fenteany ve Schreiber 1998).

AP-1 transkripsiyon faktörü IL-2, (interferon gamma) IFN-γ, IL-5, (CD95 ligand) CD95L, MMP-1, TGF-β gibi önemli genlerin promotor bölgelerine bağlanmaktadır (McMurray ve ark. 2001; Mori ve ark. 2000; Melino ve ark. 2000; Behren ve ark. 2005; Kuo ve ark. 2007). AP-1 jun ve fos alt ünitelerinin dimerlerinden oluşmaktadır ve bu proteinler proteazom ile degrade olmaktadır (Wu 2002; Stancovski ve ark. 1995; Jariel-Encontre ve ark. 1997). Proto-onkoprotein c-jun'un proteazom ile degradasyonu δ bölgesi tarafından kontrol edilmektedir. Bu bölge, ubikutinasyon için ve degradasyonu için gerekli olan cis-özelliğinde bir sinyaldir. C-jun N-terminal kinaz-1 gibi (JNK-1) mitojen aktif protein kinazlarla (MAPK) c-jun fosforilasyonu arttırır, ubikutinlenmeyi azaltır ve c-jun stabilitesini artırır. Ayrıca AP-1 aktivasyonu için bu fosforilasyonun gerçekleşmesi gerekmektedir (Jariel-Encontre ve ark. 1995).

Bu çalışmada özellikle AP-1 üzerinde durulmuştur çünkü hem AP-1'in yapısında bulunan c-jun proteinin proteazomal degradasyona uğradığı bilinmektedir ve ayrıca AP-1 transkripsiyon faktörü, MMP-1 gen ekspresyonunda birincil rol oynamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (Universal)	peqGOLD 35-1010
Akrilamid (%30)	Roth 3029.1
6-amino-kapronik asid	Roth 3113.1
7-Amino-4-metilkumarin (MCA)	Sigma A9891
Amonyumperoksodisülfat (APS)	Roth 9592.2
Anti-c-jun rabbit polyclonal (H-79)	Santa Cruz sc-1694
Anti-dinitrofenil	Sigma D9656
Anti-p_i-c-jun mouse monoclonal (KM-1)	Santa Cruz sc-822
Anti 20S proteazom, rabbit pAb	Biomol PW8155
Anti-tavşan-IgG-POD	Sigma A1949
Asetik asid	Fluka 13669
β-merkaptoetanol	Sigma M7522
Bio Rad Bradford	Biorad 500-0006
Bio Rad DC Protein Reaktif A	Biorad 500-0113
Bio Rad DC Protein Reaktif B	Biorad 500-0114
Bio Rad DC Protein Reaktif S	Biorad 500-0115
Borik asid	Roth 6943.1
Bromfenol mavisi	Sigma B5525
Cignal AP1 Reporter Assay Kit	Superarray CCS-011G
Dimetilsülfoksid (DMSO)	Sigma D8418
Disodyum hidrojen fosfat 12 hidrat ($Na_2HPO_4.12H2O$)	Merck 6573
Dinitrofenil (DNP)	Sigma A6661
DL-Ditiyotreitol (DTT)	Sigma 43815

Dulbecco’s modifiye eagle’s besiyeri (DMEM)	Biochrom FG0445
Esansiyel olmayan amino asidler (NEAA)	Invitrogen 11140-050
Etidyum bromür	Sigma E1510
Disodyum Etilendiamintetraasetik asid (Na_2EDTA)	Roth 8043.1
Penisillin/Streptomisin	Biochrom A2212
Fetal Sığır Serumu	Biochrom S0615
Formaldehid (%37)	Merck 1.04003
Gentamisin (G418)	Sigma G8168
Gliserin	Roth 3783.1
Glisin	Roth 3908.3
Goat Anti-Rabbit IgG, H&L Chain specific	Calbiochem 401315
Guanidin HCl	Roth 0037.2
HEPES	Sigma 3375
IQ SYBR Green Supermix	Biorad 170-8882
JNK İnhibitörü I	Calbiochem 420116
JNK Inhibitörü II (SP600125)	Calbiochem 420119
Laktasistin	Sigma L6785
20xLumiGLO ve 20x Peroksid	Cell Signaling 7003
Metanol	Sigma M3641
$MgCl_2$ x $6H_2O$	Roth 2189.1
$Mg(CH3COO)_2$ x $4H_2O$	Sigma M2545
Mouse Monoclonal anti-GAPDH	Novus NB300-221
Nonidet P40	Roche 11 332 473 001
N,*N*,*N*′,*N*′-Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma T9281
O’GeneRuler DNA Ladder Low Range	Fermentas SM1208
o-fenilendiamin	Sigma P5412

Opti-MEM Serumu Azaltılmış Besiyeri	Invitrogen 31985-062
PageRuler Protein Ladder	Fermentas SM0661
Pefablok	Biomol 50985-3
Ponceau S	Sigma P3504
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Riedel 33110
Potasyum klorür (KCl)	Sigma P9333
Primerler	Biomers.net
Rabbit Anti-Mouse IgG, H&L Chain specific	Calbiochem 402335
[S35]Met-label	Hartmannanalytic 100063
Sakkaroz	Roth 4621.1
Sığır serum albumini (BSA)	Fluka 05470
Sitrik asid	Sigma C2404
Sodyum azid	Sigma S8032
Sodyum borohidrid ($NaBH_4$)	Sigma S9125
Sodyum deoksikolat	Sigma C1254
Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Sigma S8282
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Roth 2326.2
Sodyum hidroksid (NaOH)	Merck 6462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck 1.06400
Solvable	Perkin Elmer 6NE9100
SUC-LLVY-MCA	Sigma S6510
Sülfürik asid	Aldrich 339741
SureFECT Transfeksiyon reaktifi	Superarray SA-01
Süt tozu	Roth T145.3
Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma T9281
Tiyazolil Mavisi Tetrazolyum Bromür (MTT)	Sigma M2128

Trikloroasetik asid (TCA)	Merck 1.00807
Tris baz	Roth 4855.2
Tris HCl	Sigma T3253
Tripsin / EDTA (10x)	Biochrom L2153
Tween 20	Merck 8.22184
Ultima Gold	Perkin Elmer 6013327

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Cam pipet (5, 10, 20, 25 ml)	Roth
Cam plak	Biorad
Diyaliz membranı	QuixSep
Eppendorf tüp (0,5; 1,5; 2 ml)	Sarstedt
Falkon (15, 50 ml)	Sarstedt
Film kasedi	Kodak
Flask (T75)	Sarstedt
Floresans mikroskop	Olympus BX-60
Florometri, Synergy HT Mikroplak Okuyucu	Biotek
Görüntü geliştirici	BioRad
Görüntü durdurucu	BioRad
Görüntü fikse edici	BioRad
Güç kaynağı	BioRad
Hücre kazıyıcı	Sarstedt
Hücre kültürü inkübatörü	Heraeus
Hücre sayım lamı	Neubauer
Işık mikroskobu	Olympus BX-60
Kapiler pipet ucu 1-200 µl	Biozym 728304
96 kuyulu mikroplak	Sarstedt

Jel blotlama filtre kağıdı	Roth 4926.1
Laminar kabin	NuAire
Kodak X-Omat blue (XB) Film	PerkinElmer 8941114001
Mini protean tarak (5,10)	BioRad
Multikanal pipet	Eppendorf
Nitroselüloz membran	Biorad 1620115
Nunc Maxisorb 96 kuyulu mikroplak	eBioscience
PCR tüp	Corbett Research 3423
Kantitatif PCR	RotorGene
Petri kabı (35, 60 mm)	Sarstedt
Pico prias vial	Perkin Elmer 6000192
PVDF membran	Roth T830.1
Santrifüj	Eppendorf
Sıvı Sintilasyon sayım cihazı	Perkin Elmer
Spacer plak (1; 1,5 mm)	BioRad 1653311
Spektrofotometre SmartSpec Plus	BioRad 170-2525
Semimikrovolüm Polistiren Küvet	BioRad 223-9955
Su banyosu	Memmert
Trans-Blot SD Elektroforetik Transfer	BioRad 170-3940
UV tankı	Dr. Gröbel Almanya

3.3. Deneysel İşlemler

3.3.1. Hücre Kültürü

3.3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Reaktifler ve İnkübasyon Koşulları

Besiyeri: Normal fibroblast hücrelerinin üretimi esnasında hazır olarak temin edilmiş olan (Dulbecco modifiye edilmiş Eagle besiyeri) DMEM besiyerine, %10'u hacimde fetal sığır serumu ve %5'i hacimde penisilin/streptomisin eklenerek hazırlandı. Besiyeri, 4 °C'de muhafaza edilerek besiyerindeki fenol kırmızısı belirtecinin renginde değişiklik saptanana kadar kullanıldı.

Transfeksiyon yapılmış olan fibroblast hücrelerinin üretiminde ise yukarıda tarif edilen besiyerine ilaveten 400 µg/ml şeklinde hazırlanan G418 gentamisin antibiyotikten transfeksiyonu korumak amacıyla 1 ml besiyerine 8 µl eklendi. Bu antibiyotik daha asidik karakterde olduğu için hücrelerin besiyeri daha sık kontrol edildi.

Tripsin: 10x olarak hazır temin edilen tripsin çözeltisi 1/5 olacak şekilde seyreltilerek 10'ar ml'lik parçalar halinde -20 °C'de saklandı.

Fosfat Tamponu: 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4, 8 g NaCl, 1,45 g Na_2HPO_4 bidistile suda çözülerek 1 l'e tamamlandı.

Diğer İnkübasyon Çözeltileri: Proteazom inhibisyonunu sağlamak için kullanılan laktasistinin 0,2 mg'ı 400 µl suda çözülerek 1328 µM olacak şekilde ana stok hazırlandı. Son konsantrasyon 20 µM olacak şekilde 1 ml besiyeri içerisine 15 µl ana stoktan eklendi.

JNK-1 enziminin inhibisyonu için kullanılan inhibitörler de sırasıyla 1 mM ve 0,1 M ana stokları hazırlanarak son konsantrasyonları JNKi I inhibitörü için 80 µM olacak şekilde 1 ml besiyerine 80 µl ana stoktan, JNKi II (SP600125) inhibitörü için 100 µM olacak şekilde 1 ml besiyerine 1 µl ana stoktan eklendi.

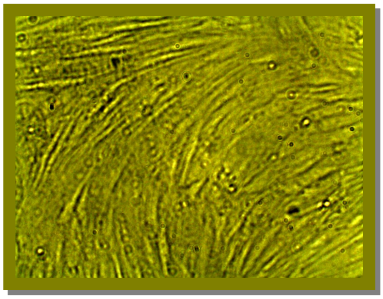
3,3'-(1,4-naftilidin) dipropiyonat (NDP)'ın H_2O_2 molibdat çözeltisi ile oksidlenerek elde edilen 3,3'-(1,4-naftilidin) dipropiyonat-1,4-endoperoksid disodyum ($NDPO_2$), Prof. Dr. Lars Oliver Klotz (Düsseldorf, Almanya) laboratuvarından sağlanmıştır.

Sodyum azid (NaN_3), 600 mM stok çözeltisi 1,95 g bidistile suda çözülüp 50 ml'e tamamlanarak hazırlandı. Bu ana stoktan son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde 100 µl alınarak 3 ml'e fosfat tamponu veya DMEM besiyeri ile tamamlandı ve hücrelerle UV radyasyon esnasında ve radyasyon sonrası 3 saat boyunca inkübe edildi.

Lipofusin, eritrositlerin lize edilmesinden sonra UV radyasyona maruziyeti sonrası oluşan ve agrege olmuş polimerlerin floresans pigmenti olarak bilinen maddedir. Fibroblast hücreleri, 0,6 mg protein içeriği olan lipofusin ile 3 günde bir yenilenerek 2 hafta boyunca inkübe edildi.

3.3.1.2. Hücre Kültürü Aşamaları

Hücre Üretimi: Cilt fibroblast hücreleri (Şekil 3.1), DMEM besiyerinde 37 °C ve %5 CO_2 içeren özel hücre kültürü inkübatörlerinde kültür edildi. Tüm deneylerde pasaj numaraları 22-26 arası hücreler kullanıldı. T75 flasklara genellikle $1x10^6$ sayıda ekilen hücreler 2 hafta sonrasında konfluent hale gelerek $3x10^6$ sayıya yükseldi. Bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere tripsinle kaldırılarak sayıldı, $3x10^5$ sayıda hücre 60 mm'lik petri kaplarına alınarak $1x10^6$ sayıya ulaşana kadar iki hafta boyunca üretildi ve deneylerde kullanıldı.



Şekil 3-1: Cilt fibroblast hücrelerinin mikroskobik görüntüsü

Proteazom β_5 altünite ve MsrA overekspresyonlanmış fibroblastlar sırasıyla Prof.Dr. Efstathios Gonos'un (Yunanistan) (Chondrogianni ve ark. 2005) ve Prof. Dr. Bertrand Friguet'in (Fransa) (Picot ve ark. 2005) laboratuvarlarından sağlanmıştır.

Tripsinleme: Hücreler ışık mikroskobu altında incelendikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı. Fosfat tamponu ile iki kez yıkandı. T75 flask için 1,5 ml 2xtripsin ilave edildi, 3-4 dakika inkübatörde tutuldu, gözle ve mikroskop altında hücrelerin kalktığından emin olmak için bakıldı. Tripsin aktivitesini inhibe etmek için 10 ml

besiyeri eklendikten sonra pipetle 3 kez karıştırıldıktan sonra falkona alındı. Hücreler hemasitometre ile sayılarak petri kaplarına paylaştırıldı.

UVA Radyasyon Uygulaması: %90 konfluent olduğu gözlenen hücreler 2 defa fosfat tamponu ile yıkandı. 60 mm'lik petriye 3 ml fosfat tamponu konularak 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 J/cm^2 UVA radyasyona maruz bırakıldı. UVA radyasyon kaynağı UVA bölgesinde (320-400 nm) enerji spektrumu yayan TL15W/05 lamba idi. Yayılan doz UV-MAT dozimetresiyle hesaplandı. Lambalar dışa radyasyon yayılmasını önleyici bir tank içerisinde (Şekil 3.2) monte halde olarak kullanıldılar. Ayrıca hücreler radyasyon esnasında 37 °C'ye ayarlanmış su banyosu üzerinde tutuldu. Tüm analizler UVA radyasyonu takiben 3 saat hücre inkübatöründe besiyeri içinde inkübasyon sonrası gerçekleştirildi. İzole proteazom fosfat tamponu içerisinde 40, 75, 120 ve 250 J/cm^2 UVA radyasyona maruz bırakıldı.



Şekil 3-2: UVA radyasyonun gerçekleştirildiği tank

3.3.2. MTT Canlılık Tayini

3.3.2.1. MTT Canlılık Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

MTT Çözeltisi: 10 mg MTT, 1 ml fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı. 4 °C'de muhafaza edildi.

Çözündürme Karışımı: 10 g SDS, 99,4 ml DMSO + 0.6 ml asetik asid içerisinde çözülerek hazırlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3.2.2. MTT Canlılık Tayininin Uygulanışı

Hücreler UVA radyasyon sonrası 20 cm^2 petri kabında 3 ml besiyerine 100 µl MTT çözeltisi konularak 2 saat boyunca 37 °C'de ve %5 CO_2 içeren hücre inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri alınarak hücrelere 1 ml çözündürme karışımı ilave edildi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 96 kuyulu mikroplağa 3'er defa 50 µl alınarak 590 nm filtre ve 660 nm referans filtre ile absorbans mikroplak okuyucuda ölçüldü. Kontrol örneklerinin verdiği absorbans değeri %100 canlı olarak kabul edilirken, diğer örnekler bu değere göre hesaplandı.

3.3.3. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

3.3.3.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Boyama Reaktifi: 1 hacim Bio-Rad ana stok ile 4 hacim bidistile su karıştırılarak hazırlandı. Oda sıcaklığında 2 hafta saklandı.

Protein Standart Çözeltileri: 14 mg sığır serum albumini (BSA), 1 ml örnek tamponu içerisinde çözüldü. Bu ana stoktan konsantrasyonları 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 mg/ml olacak şekilde BSA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler Bradford ve aynı zamanda Lowry protein tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

3.3.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini Uygulanışı

Bu yöntem liziz tamponu olarak SDS gibi deterjan yapıda bileşikleri içermeyen örneklerde kullanıldı. 96 kuyulu mikroplaklara, üçer tekrarlı olacak şekilde 4 µl standart BSA çözeltisi veya örnek çözeltisine, 200 µl 1/5 oranında seyreltilmiş Bio-Rad boyama reaktifi ilave edildi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 590 nm filtre ve 750 nm referans filtre kullanılarak absorbans mikroplak okuyucuda ölçüldü.

3.3.4. Lowry Yöntemiyle Protein Tayini

3.3.4.1. Lowry Yöntemiyle Protein Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

A' Reaktifi: Kit içeriğindeki S reaktifi, A reaktifi içerisinde 1/50 oranında dilüe edildi. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

Protein Standart Çözeltileri: Bradford yönteminde anlatıldığı şekilde hazırlandı.

3.3.4.2. Lowry Yöntemiyle Protein Tayini Uygulanışı

Bu yöntem liziz tamponu olarak SDS gibi deterjan yapıda bileşikleri içeren örneklerde kullanıldı. 96 kuyulu mikroplaklarda, üçer tekrarlı olacak şekilde, 5 µl standart BSA çözeltisi veya örnek çözeltisine, 25 µl A' reaktifi ve 200 µl B reaktifi ilave edildi. Mikroplaka okuyucu içerisinde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 750 nm filtre kullanılarak absorbans mikroplak okuyucuda ölçüldü.

3.3.5. Protein Karbonil Tayini

3.3.5.1. Protein Karbonil Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Lizis Tamponu: 200 µl 500 µM (1,19 mg / 10 ml bidistile su) HEPES, 40 µl 250 mM (0,39 g / 10 ml bidistile su) DTT ve 9,76 ml bidistile su karıştırılarak her deney günü taze hazırlandı.

Dinitrofenil (DNP) Tamponu: 57,3 g guanidinhidroklorür (6 M) ve 6,8 g KH_2PO_4 (0,5 M) 100 ml bidistile suda çözülerek hazırlandı. -20 °C' de saklandı.

DNP Çözeltisi (10 mM): 2 mg DNP, 1 ml DNP tamponunda çözülerek her deney günü taze hazırlandı.

Kaplama Tamponu: 0,71 g Na_2HPO_4, 0,6 g NaH_2PO_4 karıştırılarak ve 4,1 g NaCl 500 ml bidistile suda çözülerek pH 7,0'ye ayarlandı.

Bloklama Çözeltisi: 10 ml 11 mg/ml redükte BSA, 90 ml % 0,1 Tween 20 içeren fosfat tamponu ile karıştırılarak deney günü taze hazırlandı.

Geliştirici Çözelti: 0,71 g Na_2HPO_4 ve 0,5 g sitrik asid bidistile suda çözülerek 100 ml'e tamamlandı.

Reaksiyon Sonlandırıcı Çözelti: 13,33 ml H_2SO_4 bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Anti-DNP-Antikoru (tavşan): Bloklama çözeltisinde 1:1000 olacak şekilde dilüe edildi. Deney günü taze hazırlandı.

Anti-tavşan-IgG-POD-Antikoru : Bloklama çözeltisinde 1:10.000 olacak şekilde dilüe edildi. Deney günü taze hazırlandı.

Substrat Çözeltisi (20 mg tablet o-fenilendiamin): 20 mg'lık tablet 1 ml geliştirici çözeltide çözüldü ve üzerine 19 ml geliştirici çözelti ve 8 µl H_2O_2 eklendi. Deney günü taze hazırlandı.

% 0,1 Redükte BSA: 2,5 g BSA 150 ml fosfat tamponu ile 5 litrelik beher içerisinde çözülerek 0-4 °C'ye kadar soğutuldu. 0,5 g $NaBH_4$/ml PBS çözeltisinden her 3 dakikada bir 10 defa BSA çözeltisine eklendi ve 1 saat boyunca buz üstünde inkübe edildi. Tüm çözelti dializ membranına konuldu ve soğuk fosfat tamponuna karşı 4 °C'de diyaliz yapıldı. 2 saatte bir diyaliz tamponu değiştirildi. Gece boyu diyalizden sonra BSA çözeltisinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi. -80 °C'de saklandı.

Okside BSA: 1 g BSA, 16,86 ml fosfat tamponu ve 3,14 ml hipoklorik asid ile 2 saat boyunda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. -80 °C'de saklandı.

Karbonil Standart Eğrisi için Hazırlanan Çözeltiler: Hazırlanan stok okside BSA çözeltisi 53,48 mg protein/ml ve 24,85 nmol karbonil/mg protein şeklindeydi. Bu stok çözeltiden 74,8 µl, 925,2 µl fosfat tamponu ile karıştırılarak 1 ml'ye dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan çözeltideki karbonil miktarı 99,404 nmol karbonil/4 mg protein/ml olarak saptandı. Hazırlanan stok redükte BSA çözeltisi 14,25 mg protein/ml ve 0 nmol karbonil/mg protein şeklindeydi. Bu stok çözeltiden 421 µl, 1079 µl fosfat tamponu ile dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan çözeltideki karbonil miktarı 0 nmol karbonil/4 mg protein/ml olarak saptandı. Bu standart eğri çiziminde kullanılacak olan okside ve redükte BSA çözeltileri her deneydeki örneklerin protein miktarına göre tekrar hazırlandı. Bu ara stoklardan nmol karbonil/mg protein cinslerinden 0 için; 0 µl okside BSA ve 121 µl redükte BSA, 0,2 için; 1 µl okside BSA ve 120 µl redükte BSA, 0,4 için; 2 µl okside BSA ve 119 µl redükte BSA, 0,6 için; 3 µl okside BSA ve 118 µl redükte BSA, 0,8 için; 4 µl okside BSA ve 117 µl redükte BSA, 1,0 için; 5 µl okside BSA ve 116 µl redükte BSA, 1,2 için; 6 µl okside BSA ve 115 µl redükte BSA, 1,4 için; 7 µl okside BSA ve 114 µl redükte BSA, 1,6 için; 8 µl okside BSA ve 113 µl redükte BSA, 1,8 için; 9 µl okside BSA ve 112 µl redükte BSA, 2,0 için; 10 µl okside BSA ve 111 µl redükte BSA karıştırılarak hazırlandı ve bu çözeltiler her deney günü taze hazırlanarak standart eğri çizimi için kullanıldı.

3.3.5.2. Protein Karbonil Tayini Uygulanışı

Sitozoldeki protein karbonil miktarını tayin için ilk olarak, hücre membranları lizis tamponu ile parçalandı. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra $1x10^6$ hücre için 150 µl lizis tamponu kullanıldı. Hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldıktan sonra eppendorf tüplere alındı ve soğuk odada 1 saat boyunca vortekslendi. 13.000 rpm, 4 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve miktar tayininde kullanıldı. Protein karbonil tayininde, ilk olarak tüm örneklerin protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle tayin edildi ve tüm örnekler en az protein miktarı olan örneğe göre fosfat tamponu ile seyreltildi. En az 1 mg/ml protein miktarı ile çalışılmaya özen gösterildi. En düşük protein miktarına göre standart çözeltiler ve örnekler fosfat tamponu içerisinde hazırlandı. 1,5 ml'lik eppendorf tüplere 15 µl standart, örnek ya da kör için fosfat tamponu konuldu. Bütün tüplere, 45 µl taze hazırlanmış DNP çözeltisinden eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı. Her 10 dakikada vortekslenerek, 45 dakika karanlıkta inkübe edildi. 5 µl inkübasyon çözeltisi ile 1 ml kaplama tamponu karıştırılarak güzelce vortekslendi. Nunc Maxisorb 96 kuyulu mikroplaklara 3'er tekrarlı olacak şekilde 200 µl yüklendi ve 4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, plaktaki çözeltiler dökülerek kuyular 1 defa soğuk fosfat tamponu ile yıkandı. Bloklama için her kuyuya, multikanal pipetle 250 µl bloklama çözeltisi eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, plaktakiler döküldü, her kuyuya multikanal pipetle 200 µl Anti-DNP-antikoru eklendi ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Plaktakiler dökülerek kuyular 3'er defa % 0,1 Tween 20 içeren fosfat tamponu ile yıkandı. Her kuyuya multikanal pipetle 200 µl Anti-tavşan-IgG-POD-antikoru eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Plaktakiler dökülerek kuyular 3'er defa % 0,1 Tween 20 içeren fosfat tamponu ile yıkandı. Her kuyuya multikanal pipetle 200 µl substrat çözeltisi eklendi ve 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Plaktakileri dökmeden her kuyuya multikanal pipetle 200 µl reaksiyon sonlandırıcı çözelti eklendi. Absorbans mikroplak okuyucuda 492 nm filtre ve 750 nm referans filtre kullanılarak ölçüldü.

3.3.6. Proteazom Aktivitesi Tayini

3.3.6.1. Proteazom Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Lizis Tamponu: 8,56 g sakkaroz, 0,6 g HEPES, 0,2 g $MgCl_2$ ve 0,04 g EDTA bidistile suda çözülerek pH 7,4'e ayarlandı ve 100 ml'e tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

DTT Çözeltisi: 0,31 g DTT soğuk bidistile suda çözülerek 2 ml'ye tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

Proteoliz Tamponu: 13,63 g Tris baz, 1,68 g KCl, 0,8 g $Mg(CH_3COO)_2x4$ H_2O, 0,76 g $MgCl_2x6H_2O$ bidistile suda çözülerek pH 8,2'e ayarlandı ve 250 ml'e tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

Suc-LLVY-MCA (2 mM): 10 mg peptid 6.55 ml DMSO'da çözülerek hazırlandı. -20 °C'de saklandı.

Metilkumarin (MCA) Standartları: 88 mg MCA 5 ml DMSO'da çözülerek 100 mM konsantrasyonda birinci stok ve bu stoktan 10 µl alınıp 9,99 ml seyreltme tamponuyla (%10 DMSO içeren 1/3 dilüe edilen proteoliz tamponu) 100 µM konsantrasyonda ikinci stok hazırlandı. Bu ikinci stoktan konsantrasyonları 0,5; 1; 2; 5; 10 mg/ml olacak şekilde MCA standart çözeltileri taze olarak hazırlandı ve bu çözeltiler proteazom aktivitesi tayininde standart eğri çizimi için kullanıldı.

İzole proteazom: Hough ve ark. (1987) tarafından tarif edilen dietilaminoetil kromatografisi yöntemine göre izole edilen proteazom Peter Voss (Düsseldorf, Almanya) laboratuvarından sağlanmıştır.

3.3.6.2. Proteazom Aktivitesi Tayini Uygulanışı

Sitozoldeki proteazom aktivitesini tayin için ilk olarak, hücre membranları lizis tamponu ile parçalandı. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra $1x10^6$ hücre için 300 µl lizis tamponu ve 0,5 µl DTT karışımından oluşan çözelti kullanıldı. Hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldıktan sonra eppendorf tüplere alındı ve 10 defa 20G iğne ucu ve şırıngadan geçirilerek membranlar parçalandı. Sıvı nitrojen ve 40 °C su banyosunda dondurma ve çözme şeklinde 3 kez tekrarlanarak sitozolik enzimin daha iyi şekilde açığa çıkarılması sağlandı. 13.400 rpm, 4 °C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve aktivite tayininde kullanıldı. Proteazom aktivite tayini Tablo 3.1'de gösterildiği şekilde kuyuların hazırlanmasından sonra mikroplakta tayin edildi. Reaksiyon 37 °C'de, 30 dakika boyunca yürütüldü. Bu reaksiyon sonucu olarak 20S proteazoma ait kimotripsin benzeri aktivite ölçüldü. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan metilkumarin peptidin floresansı 365 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalgaboylarında ölçüldü. Metilkumarin standart çözeltilerinin floresanslarının direkt ölçümüyle hazırlanan standart eğriye göre proteazom aktivitesi

dakika ve mg protein başına nmol MCA açığa çıkışı olarak hesaplandı. Hesaplama için örneklerin protein miktarları Bradford yöntemi ile tayin edildi.

3.3.7. İmmunoblot Yöntemi

3.3.7.1. İmmunoblot Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Lizis Tamponu: 0,079 g Tris HCl, 11,98 g Pefablok, 0,45 ml Nonidet P-40, 0,05 g SDS bidistile suda çözülerek pH 7,5'e ayarlandı ve 50 ml'e tamamlandı. -80 °C'de saklandı.

Tablo 3-1: Proteazom aktivite tayininde 96 kuyulu mikroplakta bir kuyunun dizaynı

İçerik	Miktar
Hücre lizatı	10 µl
Proteoliz tamponu	33,3 µl
DTT	0,2 µl
H_20	66,5 µl
Laktasistin	4,5 µl
10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon	
Suc-LLVY-MCA	10 µl
Son Hacim	120 µl

Tris (1 M): 12,1 g Tris baz, 90 ml bidistile suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı HCl ile 6,8'e ayarlandı ve çözelti bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

Tris (1,5 M): 18,2 g Tris baz, 80 ml bidistile suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı HCl ile 8,8'e ayarlandı ve çözelti bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

SDS (%10): 50 g SDS, bidistile suda çözülerek 500 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

APS (%10): 0,1 g APS, bidistile suda çözülerek 1 ml'e tamamlandı. Bir hafta içinde tüketildi.

5x Elektroforez Tamponu (250 mM Tris / 1,9 M Glisin / %0,5 SDS): 30 g Tris baz, 143 g Glisin ve 5 g SDS tartılarak 900 ml bidistile suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı 8,5-8,7'e ayarlandı ve çözelti bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda

sıcaklığında saklandı. Deney için bu çözelti 1x olacak şekilde 1/5 oranında bidistile su ile seyreltildi.

4xSDS Örnek Tamponu (0,25 M Tris / %8 SDS / %40 Gliserol / % 0,03 bromfenolmavisi): 2,5 ml 1 M Tris baz (pH 6,8); 0,8 g SDS; 4 ml gliserol; 2 ml %100 β-merkaptoetanol; 3 mg bromfenolmavisi bidistile suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

Yükleme Tamponu: 3,125 ml 1 M Tris pH 6,8; 0,5 ml %10 SDS bidistile suda çözülerek 50 ml'ye tamamlandı.

Ayırma Jeli (%12): 3,3 ml bidistile su; 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 4 ml %30 akrilamid/bisakrilamid; 100 µl %10 SDS; 100 µl %10 APS; 4 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı. Hızlı bir şekilde cam plakların arasına dökülerek 45 dakika polimerizasyona bırakıldı.

Toplama Jeli (%5): 2,7 ml bidistile su; 500 µl 1 M Tris pH 6,8; 670 µl %30 akrilamid/bisakrilamid; 40 µl %10 SDS; 40 µl %10 APS; 4 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı. Hızlı bir şekilde 10 kuyulu taraklar yerleştirildikten sonra cam plakların arasına dökülerek 30 dakika polimerizasyona bırakıldı.

Katod Tamponu: 3,03 g Tris baz ve 5,25 g 6-aminokapronik asid 200 ml metanolde çözülerek bidistile su ile 1000 ml'e tamamlandı. pH 9-10'a ayarlanarak, oda sıcaklığında saklandı.

Anod Tamponu 1: 3,6 g Tris baz, 200 ml metanolde çözülerek bidistile su ile 1000 ml'e tamamlandı. pH 10-11'e ayarlanarak, oda sıcaklığında saklandı.

Anod Tamponu 2: 36,3 g Tris baz, 200 ml metanolde çözülerek bidistile su ile 1000 ml'e tamamlandı. pH 10-11'e ayarlanarak, oda sıcaklığında saklandı.

Ponceau S: 0,1 g ponceau S, 500 µl asetik asidde çözülerek bidistile su ile 50 ml'e tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

10xTBS: 48,4 g Tris baz, 160 g NaCl bidistile suda çözülerek konsantre HCl ile pH 7,6'a ayarlandı ve 2 l'e tamamlandı.

1xTBST: 100 ml 10xTBS ve 500 µl Tween 20 bidistile su ile 1 l'e seyreltildi.

Bloklama Çözeltisi: 5 g süt tozu 1xTBST çözeltisinde çözülerek 100 ml'e tamamlandı.

Antikor Seyreltme Çözeltisi: 1 g süt tozu 1xTBST çözeltisinde çözülerek 100 ml'e tamamlandı.

Kemiluminesans Substrat: 250 µl 20xLumiglo, 250 µl 20xPeroksid ve 4,5 ml bidistile su karıştırılarak karanlıkta hazırlandı.

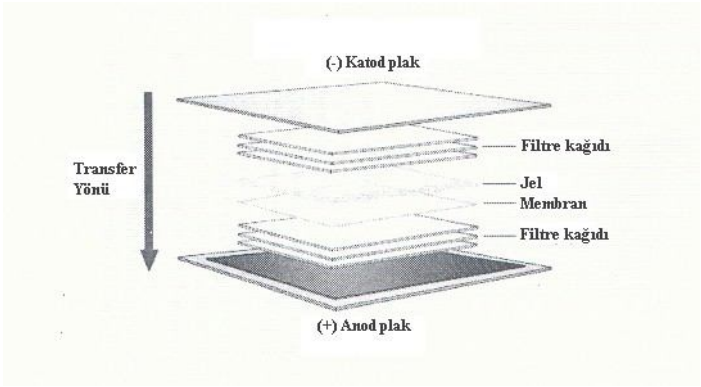
3.3.7.2. İmmunoblot Yöntemi ile Protein Ekspresyonu Tayini

Hücreler fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra $1x10^6$ hücre için 150 µl lizis tamponu kullanıldı. Hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldıktan sonra eppendorf tüplere alındı ve 10 defa 20G iğne ucu ve şırıngadan geçirilerek membranlar parçalandı. Örnekler 15 dakika buz üzerinde tutulduktan sonra 14.000 rpm, 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve immunoblot yönteminde kullanıldı. İlk olarak tüm örneklerin protein konsantrasyonları Lowry yöntemiyle tayin edildi ve tüm örnekler en az protein miktarı olan örneğe göre 4xSDS örnek tamponu ile seyreltildi. En az 30 µg protein miktarı ile çalışılmaya özen gösterildi.

Western blot aparatları arasına dökülmüş olan ayırma jeli polimerize olduktan sonra, 10'luk tarak kullanılarak toplama jeli döküldü. Bu jel de polimerize olduktan sonra tarak çıkartılarak örnekler yüklendi. Bir kuyuya protein molekül ağırlıklarını gösteren ladder yüklendi. Proteinler 75 dakika boyunca 100 Voltta yürümeye bırakıdı. Sonrasında jelden membrana transfer işlemine geçildi. 3 adet filtre kağıdı ve nitroselüloz membran katod tamponunda, jel ve 3 adet filtre kağıdı anod 1 tamponunda ve 3 adet filtre kağıdı anod 2 tamponunda ıslatıldıktan sonra aparata Şekil 3.3'de gösterildiği gibi yerleştirildi ve 60 mA'de 60 dk transfer edildi. Hazırlanan membran ponceau S çözeltisi ile 15 dk inkübe edildikten sonra proteinler görünür hale gelene kadar distile su ile yıkandı ve membran kemilunesans deteksiyon sonrasında moleküler ağırlık tayini için fotokopisi çekilerek fosfat tamponu içerisinde 4 °C'de saklandı.

Kemilüminesans deteksiyon için; membran ilk olarak 60 dakika boyunca bloklama çözeltisinde inkübe edildi. Anti-20S-proteazom antikoru için 1:200, anti c-jun antikoru için 1:200, anti p_i-c-jun antikoru için 1:200 ve anti-GAPDH antikoru için 1:5000 seyreltme antikor seyreltme çözeltisi kullanılarak yapıldı. Bu antikorlarla membranlar, 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar 1xTBST ile 3'er kez 5'er dakika yıkandı. C-jun ve 20S-proteazom antikorları için sekonder antikor olan goat anti-rabbit IgG 1:5000, p_i-c-jun ve GAPDH antikorları için sekonder

antikor olan rabbit anti-mouse IgG 1:5000 oranlarında antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltildi. Membranlar sekonder antikorlarla da 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar 1xTBST ile 3'er kez 5'er dakika yıkandı. Kemiluminesans substratla 1 dk inkübe edildikten sonra filmle görüntüleme işlemine geçildi.



Şekil 3-3: İmmunoblot yönteminde proteinlerin jelden membrana transferi için kurulan düzenek

Filmle görüntülemede, kodak film ile 1 dk film kasedinde tutulduktan sonra 2 dk geliştirici, 30 sn durdurucu ve 2 dk fikse edici çözeltilerde tutulduktan sonra filmde proteinleri gösteren bandlar elde edildi.

3.3.8. Sıvı Sintilasyon Yöntemi

3.3.8.1. Sıvı Sintilasyon Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

%20 TCA: 4 g TCA bidistile suda çözülerek 20 ml'e tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

%10 BSA: 0,2 g BSA bidistile suda çözülerek 2 ml'e tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

1 N NaOH: 2 g NaOH bidistile suda çözülerek 50 ml'e tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

Deterjan Kokteyli: 1 g Na deoksikolat, 0,2 g SDS, 2 ml Triton X-100, 315,2 mg Tris HCl, 74,44 mg EDTA bidistile su ile 200 ml'e tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

^{35}S: 50 µl (0,5 mCi) 'lik parçalara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

3.3.8.2. Sıvı Sintilasyon Yöntemi ile Proteoliz ve Protein Agregatları Tayini

6 petri kabı yani $6x10^6$ hücre iki kez fosfat tamponu ile yıkandı. 0,5 mCi olan ^{35}S, 19 ml besiyerinde seyreltildi. Her petri kabına 3 ml ^{35}S çözeltisi eklendikten sonra 16 saat boyunca hücre kültürü inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. Kalan 1 ml ^{35}S çözeltisi sayım için (A) kullanılacağından saklandı. Hücrelerin 16 saat ^{35}S çözeltisi ile inkübasyonu sonrası tüm ^{35}S çözeltileri sayım için (B) bir falkonda toplandı. Tüm petriler 2'şer defa fosfat tamponu ile yıkandı ve 1.yıkama (C) ve 2.yıkama (D) çözeltileri sayım için falkonda toplandı. UVA radyasyon için petrilere 3'er ml fosfat tamponu eklendi ve 30 J/cm^2 UVA radyasyona maruz bırakıldı. Kontrol örnekleri de aynı süre için inkübatörde tutuldu. Radyasyon sonrası fosfat tamponları kontrol ve UVA örnekleri ayrı olmak üzere sayım için (E,F) falkonlara alındı. Petrilere 3'er ml besiyeri eklenerek 3 saatliğine inkübatörde tutuldu. Bu inkübasyon başlatılmadan önce eklenen 3 ml'lik besiyerlerinden 100'er µl ayrı eppendorflara sayım için alındı. Bu aşamadaki sayım bize 0. saattaki proteolizi verdi. 3 saatlik inkübasyon sonrasında tekrar 100'er µl ayrı eppendorflara sayım için alındı. Bu aşamadaki sayım bize 3. saattaki proteolizi verdi. 0 ve 3. saattaki protelizi tayin için 100'er µl besiyerlerine 50 µl BSA ve 100 µl TCA çözeltileri eklendi. 14.000xg, 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve sayımda kullanıldı.

Protein agregatları tayini için, petri kaplarına 500'er µl soğuk fosfat tamponu eklendi ve hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırıldıktan sonra eppendorf tüplere alındı. Bu hücre süspansiyonlarının her birinden toplam protein sayımı için 100'er µl ayrı eppendorflara alındı. Bu 100 µl süspansiyonlara 100 µl Perkin Elmer doku çözücüsü (Solvable) eklenerek 60 °C'de 10 dk boyunca vortekslendi ve sayım için kullanıldı. Kalan 400'er µl hücre süspansiyonları 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve pelletlere 200 µl deterjan kokteyli eklendi. 15 dk boyunca buzda tutulduktan sonra 13.000xg, 4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve deterjanda çözünebilen proteinlerin tayini için sayımda kullanıldı. Pelletlere 150 µl 1N NaOH eklenerek 60 °C'de 10 dk boyunca vortekslendi ve deterjanda çözünmeyen proteinlerin (protein agregatlarının) tayini için sayımda kullanıldı. Sayım için her örnekten 20 µl alınarak 2 ml sintilasyon kokteyli içerisinde özel kapaklı sintilasyon tüpleri içerisinde sayım gerçekleştirildi.

Hesaplamada ilk olarak sıvı sintilasyon aletindeki % verim dikkate alınarak bu değerin %90'ın üzerinde olmasına özen gösterildi. Gösterilen değerlerden dakikadaki parçalanma (DPM) değeri hesaplamada kullanıldı. Petri başına olan proteini (C) hesaplamak için;

C = (A x seyreltme faktörü) – (B x seyreltme faktörü + C x seyreltme faktörü + D x seyreltme faktörü + E (F) x seyreltme faktörü)

Bulunan C değeri %100 olarak kabul edilerek herbir örneğin hesabı yapıldı. Ayrıca hesap, herbir örnek için kendi toplam protein miktarları gözönünde bulundurularak yapıldı.

3.3.9. Kantitatif PCR (qPCR) Yöntemi

3.3.9.1. Kantitatif PCR Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

hMMP-1 Sağ Primer (100 pmol/µl): 5'-ctg ctt acg aat ttg ccg ac-3' dizisinde olan primer 249 µl bidistile suda çözülüp -20 °C'de saklandı.

hMMP-1 Sol Primer (100 pmol/µl): 5'-gca gca tcg ata tgc ttc ac-3' dizisinde olan primer 181 µl bidistile suda çözülüp -20 °C'de saklandı.

hTIMP-1 Sağ Primer (100 pmol/µl): 5'-gat gga ctc ttg cac atc act-3' dizisinde olan primer 192 µl bidistile suda çözülüp -20 °C'de saklandı.

hTIMP-1 Sol Primer (100 pmol/µl): 5'-tgg ata aac agg gaa aca ctg-3' dizisinde olan primer 172 µl bidistile suda çözülüp -20 °C'de saklandı.

h18srRNA Sağ Primer (100 pmol/µl): 5'-gga cat cta agg gca tca ca-3' dizisinde olan primer 216 µl bidistile suda çözülüp -20 °C'de saklandı.

h18srRNA Sol Primer (100 pmol/µl): 5'-aca cgg aca gga ttg aca ga-3' dizisinde olan primer 194 µl bidistile suda çözülüp -20 °C'de saklandı.

50xTAE: 121 g Tris baz, 28,5 ml asetik asid ve 50 ml 0,5 M Na_2EDTA'da çözülerek pH 8'e ayarlandı ve bidistile su ile 500 ml'e tamamlandı.

1xTAE: 10 ml 50xTAE çözeltisi bidistile su ile 500 ml'e seyreltildi.

Etidyum Bromür: 10 mg/ml olarak hazır olarak temin edildi.

Jel Tamponu: 12,5 µl etidyum bromür 250 ml 1xTAE ile karıştırılarak hazırlandı.

Agaroz Jel: 1,25 g agaroz terazi üzerinde 50 g'a gelene kadar jel tamponu ile tamamlandı. Çözülene kadar mikrodalga fırında birkaç kez kaynatıldı.

5xDNA Yükleme Tamponu: 2,5 ml gliserin + 4 mg bromfenol mavisi 10 ml'e bidistile su ile tamamlandı. 4 °C'de saklandı.

Standart cDNA'ların Hazırlanışı: 3.3.9.2'de anlatıldığı şekilde RNA ve cDNA'lar hazırlandıktan sonra, elde edilen cDNA'lar primerlerle asıl birleşme ve ayrılma reaksiyonunun gerçekleştiği sıcaklığı doğrulamak ve cDNA'ları çoğaltmak amaçlı normal qPCR'da yürümeye bırakıldı. Bu reaksiyon için IQ Sybr green kitinde tarif edildiği üzere örnek başına 12,5 µl sybr green, 10,5 µl H_2O, 0,5 µl sağ primer ve 0,5 µl sol primer karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına 1 µl cDNA eklenerek qPCR'da yürümeye bırakıldı. PCR reaksiyonu 95 °C'de 3 dk, 40 tekrar şeklinde (95 °C'de 10 saniye, 62 (MMP-1) – 64,3 (TIMP-1) – 61 (18srRNA) °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 20 saniye) tutularak yürütüldü.

Agaroz jel polimerize olduktan sonra, 20 µl PCR'dan elde edilen ürünlere 5 µl 5xDNA yükleme tamponu eklenerek jele yüklendi. Bir kuyuya 25-700 baz çiftini gösteren DNA ladder yüklendi. 60 voltta 75 dk yürütüldü. Jeldeki bantlar UV kamera altında görüntülendi.

Bantlar, UV kamera altında bisturi ile kesildi. Kesilen bantlar 2 ml'lik eppendorf tüplere konuldu ve jelden dsDNA ekstraksiyonu qiagen kit kullanılarak yapıldı. Jel parçaları tartıldı, 3 katı hacimde QG tamponu eklendi. Jel çözülene kadar 50 °C'de 2 dk'da bir vortekslenerek inkübe edildi. 1 hacim izopropanol eklenerek karıştırıldı. Örnekler 2 ml tüp üzerindeki QIAquick spin kolona uygulandı ve 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, kolona 0,75 ml PE tamponu uygulandı ve 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Kolon yeni bir tüpe yerleştirilerek 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Kolon yeni bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpe yerleştirildi, DNA'yı elüe etmek için 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi.

Elde edilen DNA'nın konsantrasyonunu tayin için 1/50 konversiyon faktörü ile 260 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Spektrofotometrede okunan ml'deki µg DNA miktarı, µl'deki kopya şekline dönüştürüldü. Bunun için aşağıdaki formül kullanıldı:

(a g / µl DNA / [baz çiftindeki plazmid uzunluğu x 660]) x 6,022 x 10^{23} = Y molekül / µl

660 = çift halka DNA'nın ortalama molekül ağırlığı

6,022 x 10^{23} = avagadro sayısı

Yapılan hesaplamaya göre elde edilen değer ana stok olarak alındı. Buna göre 10^9, 10^8 ve 10^7 konsantrasyonlarda stoklar hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Her deney günü 10^7 stoğu kullanılarak bidistile su ile 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 standart çözeltileri hazırlandı ve diğer örneklerle birlikte PCR'da yürütüldü.

3.3.9.2. Kantitatif PCR Yöntemi ile mRNA Ekspresyonlarının Analizi

qPCR için UVA radyasyonu sonrası 3 saat besiyerinde inkübasyonu takiben hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

RNA İzolasyonu: Qiagen marka hazır kit kullanılarak üretici firmanın tarifine göre yapıldı. 2 ml RLT tamponuna 20 µl β-merkaptoetanol eklendi. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra iki defa fosfat tamponu ile yıkandı. Her petriye 350 µl RLT + β-merkaptoetanol çözeltisinden eklendi. Hücre süspansiyonları eppendorf tüplere alındı. 350 µl %70 etanol eklendi ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. 700 µl hücre süspansiyonu ve etanol karışımı 2 ml'lik tüpe takılı olan spin kolona aktarıldı. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µl RW1 tamponu eklendi. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µl RPE tamponu eklendi. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µl RPE tamponu eklendi. 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Kolon temiz bir tüpe alındı ve 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. Kolon temiz 1,5 ml'lik kapaklı eppendorf tüpe alındı, üzerine elüsyon için 50 µl Rnaz içermeyen su eklendi, 13.000 rpm 1 dk santrifüj edildi. RNA konsantrasyonunu tayin için 1/40 konversiyon faktörü ile 260 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

cDNA Sentezi: RNA'nın konsantrasyonuna göre 1 µg'a tekabül eden hacim alındı. Üzerine 15 µl'e tamamlayacak şekilde RNAz ve DNAz içermeyen su konuldu. Qiagen kit içerisinde bulunan 5xreaksiyon karışımından 4 µl ve reverse transkriptazdan 1 µl eklendi. Reaksiyon termal cycler'da 5 dk 25 °C, 30 dk 42 °C, 5 dk 85 °C olacak şekilde yürütüldü.

PCR Reaksiyonunun Yürütülmesi: IQ Sybr green kitinde tarif edildiği üzere örnek başına 12,5 µl sybr green, 10,5 µl H_2O, 0,5 µl sağ primer ve 0,5 µl sol primer karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımına 1 µl cDNA eklenerek qPCR'da yürümeye bırakıldı. PCR reaksiyonu 95 °C'de 3 dk, 40 tekrar şeklinde (95 °C'de 10 saniye, 62 (MMP-1) – 64,3 (TIMP-1) – 61 (18srRNA) °C'de 15 saniye ve 72 °C'de 20 saniye) tutularak yürütüldü. Kantitatif olarak elde edilen sonuçlar 18srRNA mRNA değerlerine oranlanarak hesaplama yapıldı.

3.3.10. Otofloresans Görüntüleme

Fibroblast hücrelerinin lipofusin ile inkübasyonu sonrası floresans mikroskobu altında floroizotiyosiyanat (FITC) filtre kullanılarak floresans görüntüleri alındı. Ayrıca otofloresansı kantifikasyon için aynı hücreler 360 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalgaboylarında florometri ile de tayin edildi.

3.3.11. Yeşil Floresans Protein ile Transfeksiyon Yöntemi

3.3.11.1. Yeşil Floresans Protein ile Transfeksiyon Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Reaktifler

Deneysel Transfeksiyon Çözeltisi: 100 µl opti-MEM besiyeri (serum oranı %3-5 oranında) ve 4 µl Cignal reporter hafifçe karıştırılarak hazırlandı.

Negatif Kontrol Transfeksiyon Çözeltisi: 100 µl opti-MEM besiyeri ve 4 µl Cignal negatif kontrol hafifçe karıştırılarak hazırlandı.

Pozitif Kontrol Transfeksiyon Çözeltisi: 25 µl opti-MEM besiyeri ve 1 µl Cignal pozitif kontrol hafifçe karıştırılarak hazırlandı.

SureFECT Çözeltisi: Her petri için 0,3 µl SureFECT 25 µl opti-MEM besiyerinde seyreltildi, hafifçe karıştırıldı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.3.11.2. Yeşil Floresans Protein ile Transfeksiyon Yöntemi ile AP-1 Aktivasyonu Tayini

Deneysel transfeksiyon çözeltisi ve pozitif kontrol transfeksiyon çözeltisine SureFECT çözeltisinden eşit hacimlerde konuldu, hafifçe karıştırıldı ve komples oluşumunu sağlamak için oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. Diğer tarafta hücreler fosfat tamponu ile yıkandı, tripsinlendi, sayıldı, opti-MEM besiyeriyle inaktive edildi, santrifüj edildi ve 300.000 hücre/ml olacak şekilde opti-MEM, %5 FBS ve %1 NEAA ile tekrar suspende edildi. 2,5 ml hücre süspansiyonu ile 500 µl kompleks çözeltisi 35

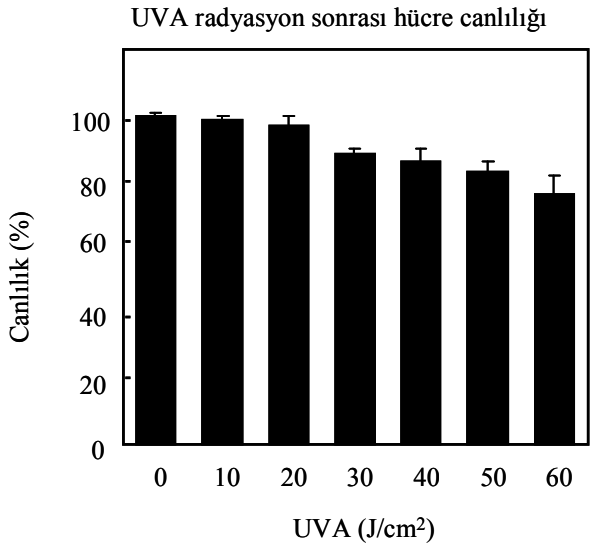
mm'lik petri kabında birleştirildi ve hafifçe karıştırıldı. 37 °C'de %5 CO_2 içeren hücre kültürü inkübatörü içinde 16 saat boyunca inkübe edildi. Hücrelerin besiyeri %5 FBS, %1 NEAA, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren opti-MEM ile değiştirildi. 24 saat sonrasında deneyler yapıldı. UVA radyasyon sonrası 3 saat inkübe edildikten sonra ve 24 saat laktasistin inkübasyonu sonrası standart floroizotiyosiyanat (FITC) filtre (470 ± 20 nm eksitasyon ve 515 nm emisyon filtreleri) kullanılarak floresans mikroskopta görüntüler incelendi.

4. BULGULAR

4.1. UVA Radyasyon Sonrası MTT Canlılık Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.2'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan MTT canlılık tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

10-60 J/cm^2 dozlarda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla %20'nin üzerinde ölüm oranına neden olmadığı gözlenmiştir.

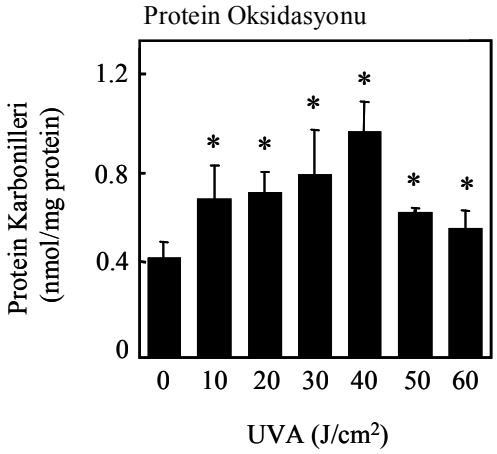


Şekil 4-1: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde canlılığa etkisi.
Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

4.2. Protein Karbonil Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.5'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan protein karbonil tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

10-60 J/cm^2 dozlarda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla protein karbonil düzeylerinde önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-2: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde protein karbonil oluşumuna etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

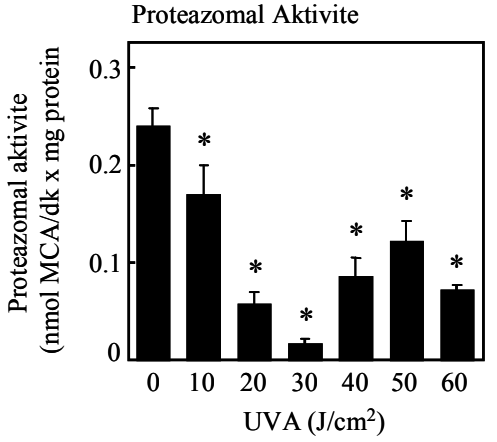
One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison testine göre:

*Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.3. Proteazom Aktivitesi Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

10-60 J/cm^2 dozlarda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla proteazom enzimi aktivitesinde önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-3: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde proteazom aktivitesine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

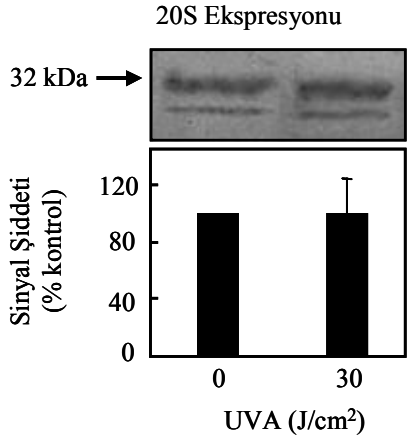
One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison testine göre:

*Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.4. Proteazom Protein Miktar Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.7'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan immunoblot yöntemi ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla proteazom enzimi miktarında önemli değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4-4: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi miktarına etkisi
Student t testine göre: p>0,05

4.5. NaN_3 İnkübasyonu ile Proteazom Aktivitesi Tayini Değerleri

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde 20 mM konsantrasyonda NaN_3 inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

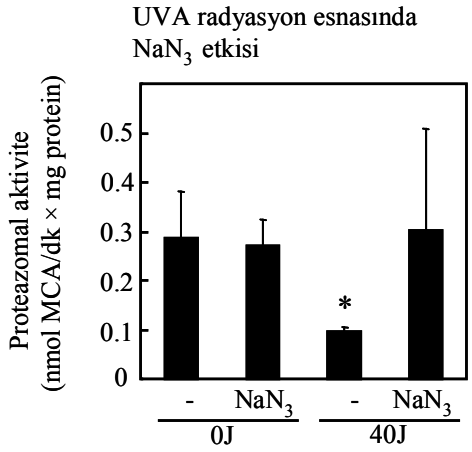
Singlet oksijen inhibitörü olarak bilinen NaN_3'in 40J/cm^2 dozda uygulanan UVA radyasyonun neden olduğu proteazom inhibisyonunu azalttığı gözlenmiştir.

4.6. $NDPO_2$ Uygulaması ile Proteazom Aktivitesi Tayini Değerleri

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde $NDPO_2$ inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Singlet oksijen kaynağı olarak bilinen $NDPO_2$'in hücrelerde kontrol grubuna (0 mM $NDPO_2$) kıyasla proteazom aktivitesinde önemli ölçüde ($p<0,05$) inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6.A). Hücrede görülen bu inhibisyon, izole

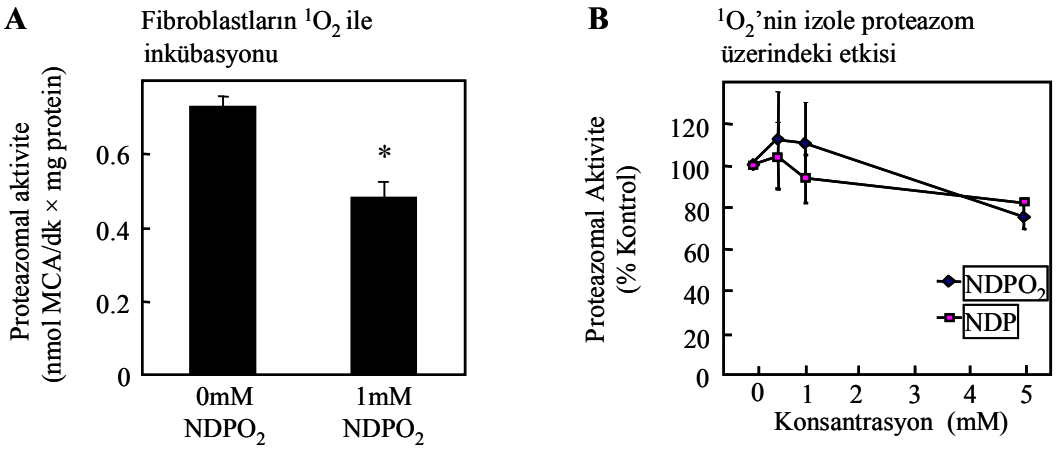
proteazomda gözlenmemiş ve kontrol olarak kullanılan NDP inkübasyonu ile aynı değerlerde seyretmiştir (Şekil 4.6.B).



Şekil 4-5: NaN_3 uygulamasının UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde neden olduğu proteazom inhibisyonuna etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



Şekil 4-6: $NDPO_2$ uygulamasının fibroblast hücrelerinde ve izole proteazomda proteazom aktivitesine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

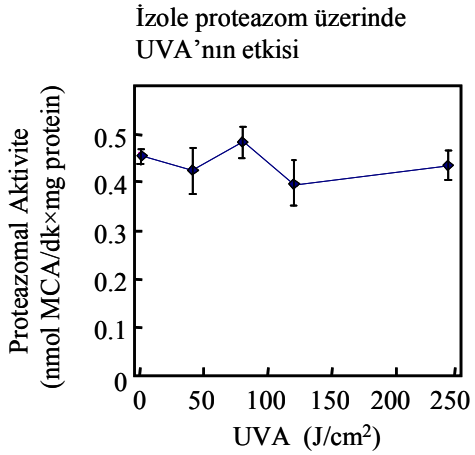
Student t ve one-way ANOVA testlerine göre:

*Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.7. İzole Proteazom ile Aktivite Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyonu yapılan izole proteazomun 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

10-60 J/cm^2 dozda uygulanan UVA radyasyonun hücrelerde neden olduğu proteazomal inhibisyon (Şekil 4.3), izole proteazoma daha yüksek dozlarda UVA uygulaması yapıldığında gözlenmemiştir.



Şekil 4-7: UVA radyasyonun izole proteazomda enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

One-way ANOVA testine göre: $p>0,05$

4.8. Proteoliz Tayini Değerleri

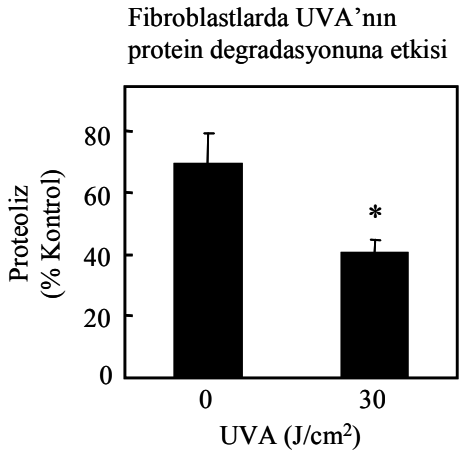
3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.8.'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan sıvı sintilasyon yöntemiyle proteoliz tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla genel proteolizde önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

4.9. Protein Agregatları Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.8.'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan sıvı sintilasyon yöntemiyle deterjanda çözünme özelliğine dayalı protein agregatları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

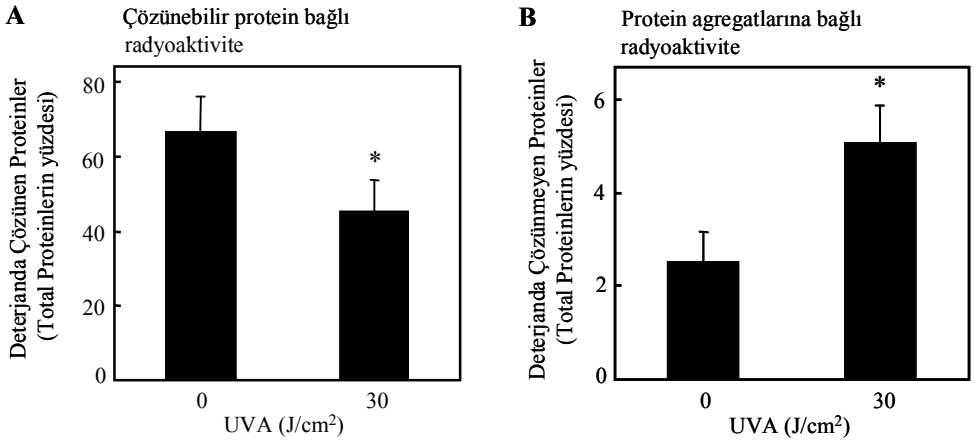
30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla proteinlerin deterjandaki çözünürlüğünde önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya (Şekil 4.9.A) ve çözünmeyen agregat oluşumunda önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa (Şekil 4.9.B) neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-8: UVA radyasyonun fibroblast hücrelerinde proteoliz üzerine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



Şekil 4-9: UVA uygulamasının fibroblast hücrelerinde proteinlerin deterjanda çözünme özelliğine ve protein agregat oluşumu üzerine etkisi.

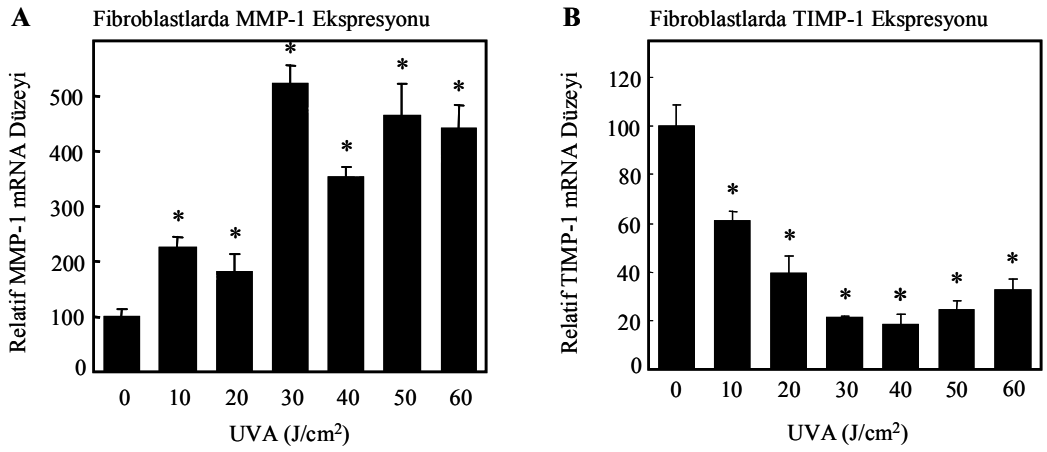
Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.10. MMP-1 ve TIMP-1 mRNA Ekspresyonları Tayini

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.9.'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan kantitatif PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

10-60 J/cm^2 dozlarda uygulanan UVA'nın hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla MMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa (Şekil 4.10.A) ve TIMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya (Şekil 4.10.B) neden olduğu gözlenmiştir.



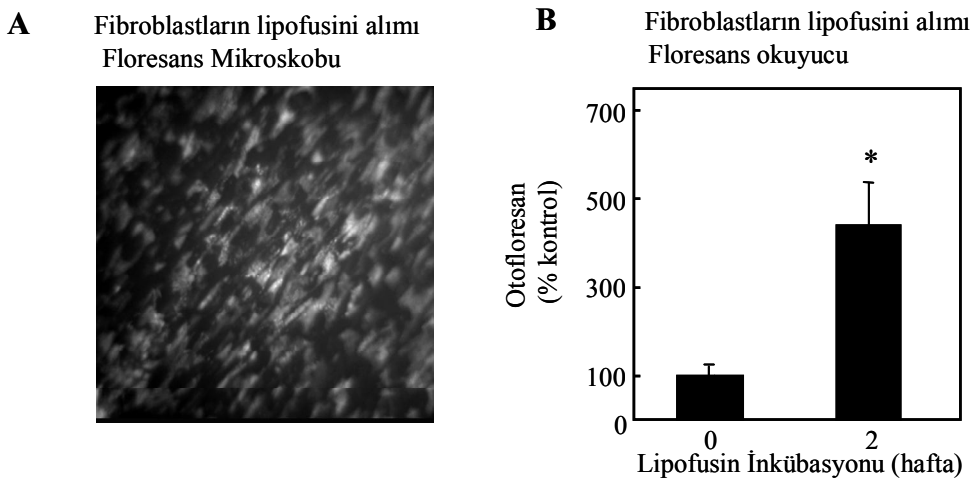
Şekil 4-10: UVA uygulamasının fibroblast hücrelerinde MMP-1 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison testine göre:
*Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.11. Lipofusinin Hücre Sitoplazmasına Alımı Tayini

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde lipofusin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.10'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan otofloresans tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Lipofusinin 2 haftalık inkübasyon sonrası sitoplazmaya alındığı ve floresansın kontrole kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-11: Lipofusinin hücre sitoplazmasına alımını gösteren floresans mikroskobi görüntüleri ve kantifikasyonu.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
Student t testine göre *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.12. Lipofusin İnkübasyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri

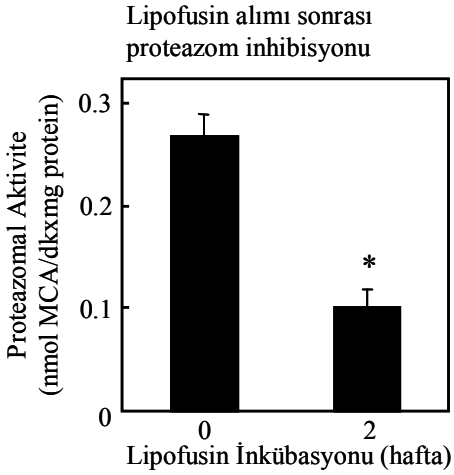
3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde lipofusin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Lipofusinin sitoplazmaya alımının ardından fibroblast hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla proteazom enzimi aktivitesinde önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

4.13. Lipofusin İnkübasyonu Sonrası MMP-1 ve TIMP-1 mRNA Ekspresyonları

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde lipofusin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan kantitatif PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

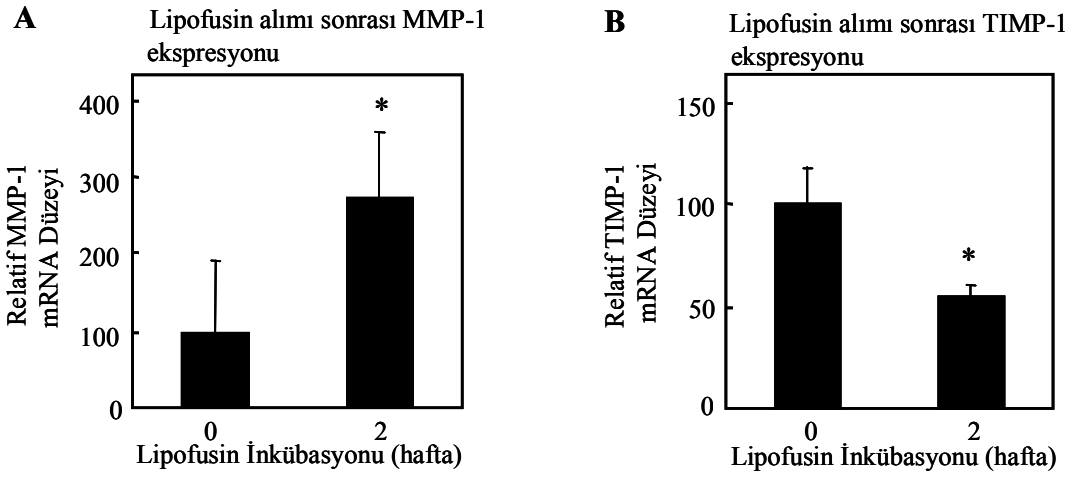
Lipofusinin sitoplazmaya alımının ardından fibroblast hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla MMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa ve TIMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-12: Lipofusinin fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



Şekil 4-13: Lipofusinin fibroblast hücrelerinde MMP-1 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.

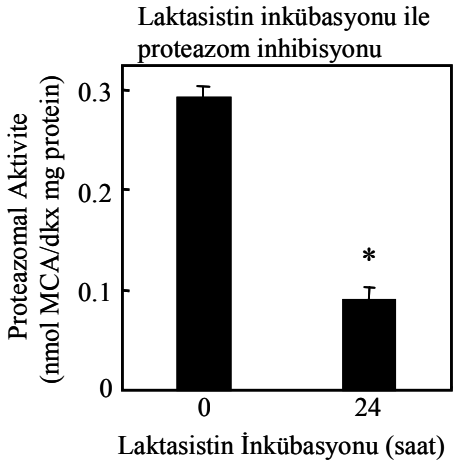
Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.14. Laktasistin İnkübasyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde laktasistin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

Geri dönüşümsüz proteazom inhibitörü olarak bilinen laktasistinin hücrelerde kontrol grubuna kıyasla proteazom aktivitesinde önemli ölçüde ($p<0,05$) inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir.



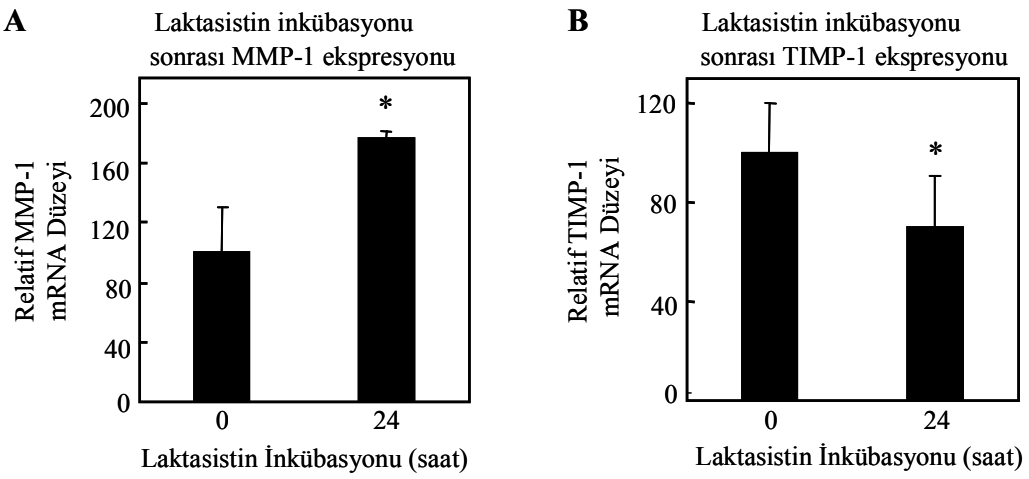
Şekil 4-14: Laktasistinin fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.15. Laktasistin inkübasyonu sonrası MMP-1 ve TIMP-1 mRNA Ekspresyonları

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde laktasistin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan kantitatif PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

Laktasistinin fibroblast hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla MMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa ve TIMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-15: Laktasistinin fibroblast hücrelerinde MMP-1 ve TIMP-1 mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.16. β_5 Transfeksiyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri

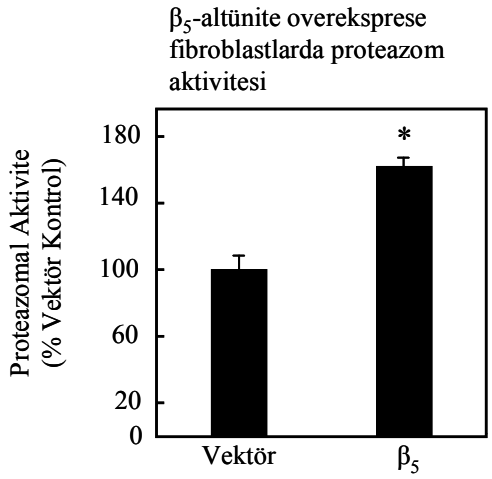
Vektör ve β_5 transfeksiyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir.

β_5 transfeksiyonu yapılan hücrelerin vektör ile transfeksiyon yapılan kontrol grubu hücrelerine kıyasla proteazom aktivitesinde önemli ölçüde ($p<0,05$) artış olduğu gözlenmiştir.

4.17. β_5 Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MTT Canlılık Tayini Değerleri

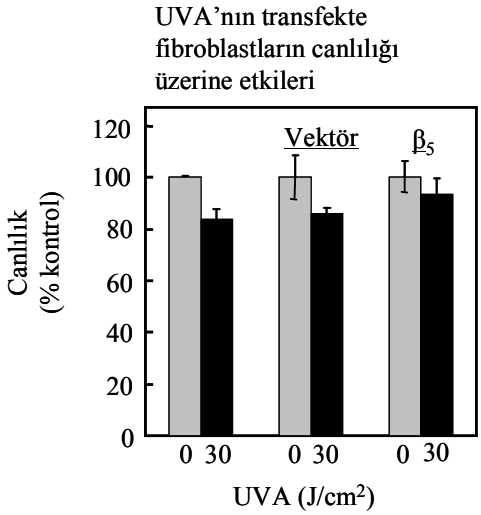
Vektör ve β_5 transfeksiyonu yapılan ve 3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.2'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan MTT canlılık tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın vektör ve β_5 transfeksiyonu yapılan hücrelerde normal fibroblast hücrelerinde olduğu gibi kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla %20'nin üzerinde ölüm oranına neden olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4-16: β_5 transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde proteazom enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
Student t testine göre: *Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)



Şekil 4-17: β_5 transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası canlılığa etkisi.

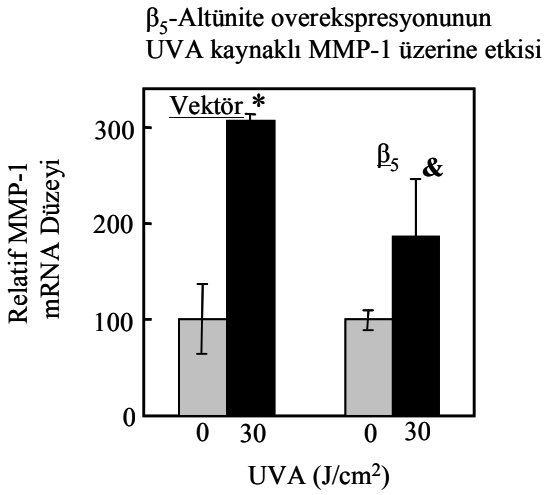
Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
One-way ANOVA testine göre: $p>0,05$

4.18. β_5 Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MMP-1 mRNA Ekspresyonu

Vektör ve β_5 transfeksiyonu yapılan ve 3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.9'da anlatılan protokole uygun

olarak yapılan kantitatif PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın vektör transfeksiyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla MMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) artışa neden olduğu ve β_5 transfeksiyonu yapılan hücrelerde bu artışın azaldığı gözlenmiştir.



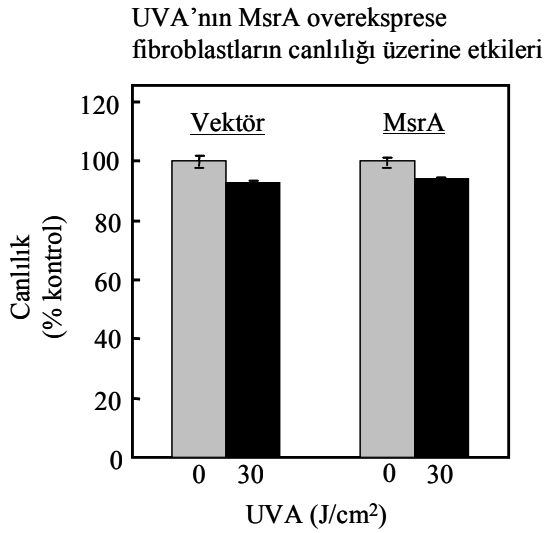
Şekil 4-18: β_5 transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası MMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
One-way ANOVA testine göre:
*Kontrol grubundan (0 J/cm^2 vektör) önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)
$^{\&}$ Kontrol grubundan (30 J/cm^2 vektör) önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.19. MsrA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MTT Canlılık Tayini Değerleri

3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde vektör ve MsrA transfeksiyonu yapılan ve UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.2'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan MTT canlılık tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın vektör ve MsrA transfeksiyonu yapılan hücrelerde normal fibroblast hücrelerinde olduğu gibi kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla %20'nin üzerinde ölüm oranına neden olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4-19: : MsrA transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası canlılığa etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
One-way ANOVA testine göre: $p>0,05$

4.20. MsrA Transfeksiyonu Sonrası Proteazom Aktivite Tayini Değerleri

Vektör ve MsrA transfeksiyonu yapılan ve 3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.6'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan proteazom aktivite tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

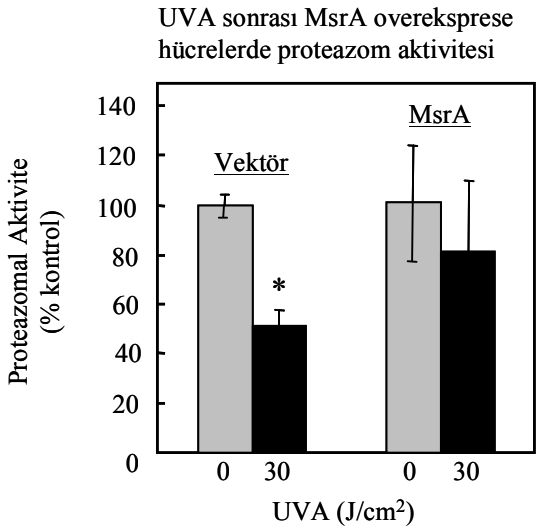
30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın vektör transfeksiyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla proteazom aktivitesinde önemli ölçüde ($p<0,05$) inhibisyona neden olduğu ve MsrA transfeksiyonu yapılan hücrelerde bu inhibisyonun azaldığı gözlenmiştir.

4.21. MsrA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelerin UVA Radyasyon Sonrası MMP-1 mRNA Ekspresyonu

Vektör ve MsrA transfeksiyonu yapılan ve 3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde UVA radyasyona maruz bırakılan fibroblast hücrelerinde 3.3.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan kantitatif PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın vektör transfeksiyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna (0 J/cm^2) kıyasla MMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde

($p<0,05$) artışa neden olduğu ve MsrA transfeksiyonu yapılan hücrelerde bu artışın azaldığı gözlenmiştir.



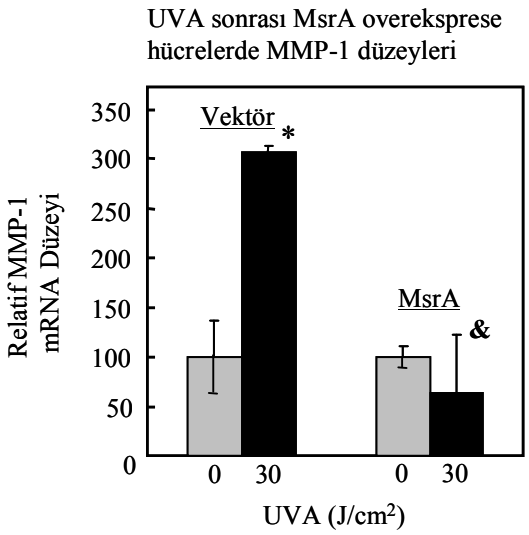
Şekil 4-20: MsrA transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası proteazom aktivitesine etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.
One-way ANOVA testine göre:
*Kontrol grubundan (0 J/cm^2 vektör) önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

4.22. UVA, Lipofusin ve Laktasistinin c-jun Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan, 3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde lipofusin ve laktasistin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.7'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan immunoblot yöntemiyle protein ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın kontrole (0 J/cm^2) kıyasla, lipofusinin sitoplazmaya alımının ardından kontrole kıyasla ve laktasistinin kontrole kıyasla fibroblast hücrelerinde c-Jun ekspresyonunda ve fosforilasyonunda (p_i-cJun) artışa neden olduğu gözlenmiştir.



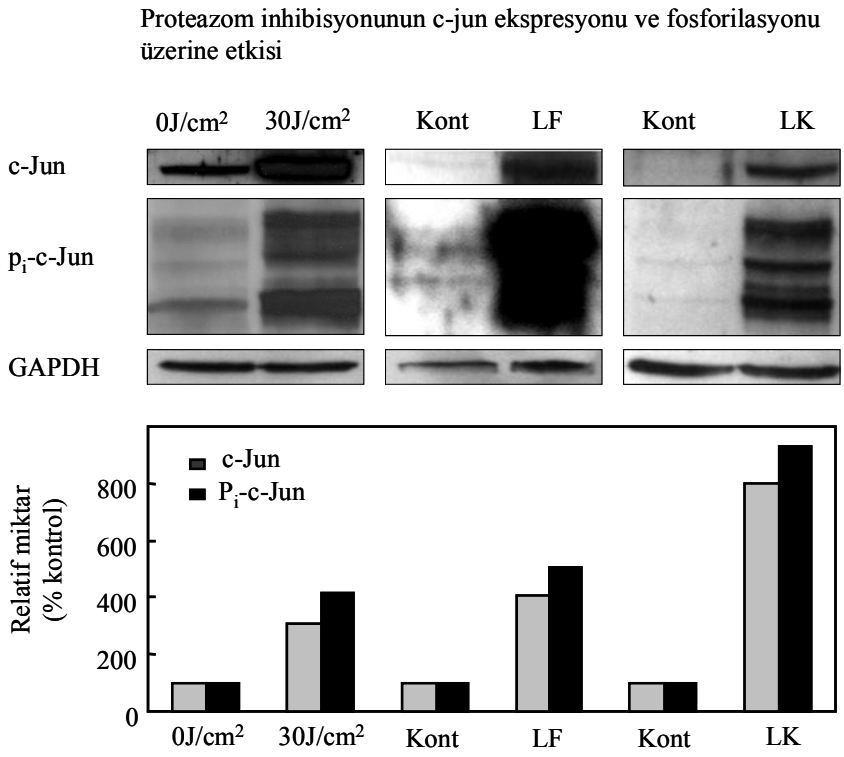
Şekil 4-21: MsrA transfeksiyonun fibroblast hücrelerinde UVA radyasyon sonrası MMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

One-way ANOVA testine göre:

*Kontrol grubundan (0 J/cm^2 vektör) önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

$^{\&}$ Kontrol grubundan (30 J/cm^2 vektör) önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

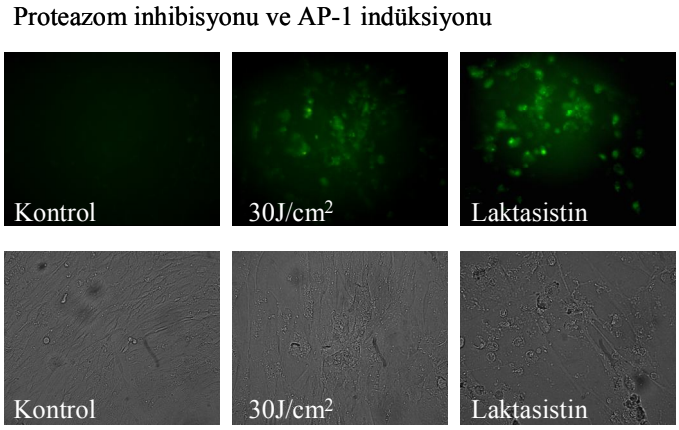


Şekil 4-22: UVA, lipofusin ve laktasistinin c-jun ekspresyonu ve fosforilasyonu üzerine etkisi.

4.23. UVA ve Laktasistinin AP-1 İndüksiyonu Üzerine Etkisi

3.3.1.2'de anlatıldığı gibi UVA radyasyona maruz bırakılan, 3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde laktasistin inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.11'de anlatılan protokole uygun olarak yapılan yeşil floresans protein ile transfeksiyon yöntemiyle AP-1 aktivasyonu tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'de gösterilmiştir.

30 J/cm^2 dozda uygulanan UVA'nın kontrole (0 J/cm^2) kıyasla ve laktasistinin kontrole kıyasla fibroblast hücrelerinde AP-1 aktivasyonunda artışa neden olduğu gözlenmiştir.

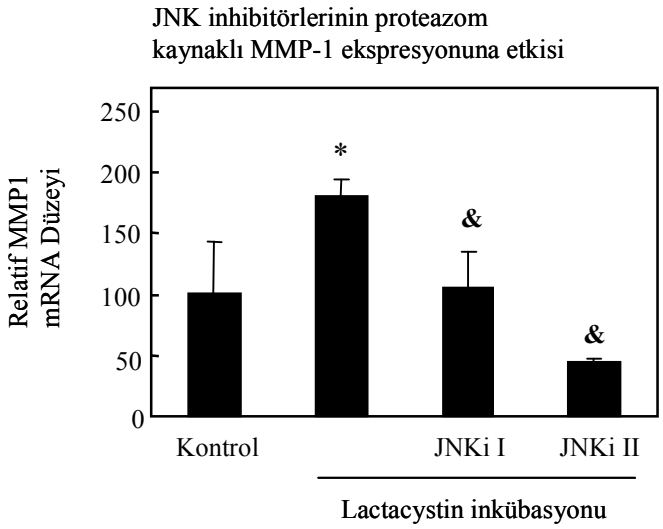


Şekil 4-23: UVA ve laktasistinin AP-1 aktivasyonu üzerine etkisi.

4.24. Laktasistin Kaynaklı MMP-1 mRNA Ekspresyonunda JNK İnhibitörlerinin Etkisi

3.3.1.1'de anlatıldığı şekilde laktasistin ve JNK inhibitörleri ile inkübasyonu yapılan fibroblast hücrelerinde 3.3.9'da anlatılan protokole uygun olarak yapılan kantitatif PCR yöntemiyle mRNA ekspresyonları tayini ardından elde edilen sonuçlar Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

Laktasistinin fibroblast hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla MMP-1 mRNA ekspresyonunda önemli ölçüde ($p<0,05$) neden olduğu artışın, JNK inhibitörleri ile birlikte laktasistin uygulanan hücrelerde önemli ölçüde ($p<0,05$) azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4-24: JNK inhibitörlerinin laktasistin kaynaklı MMP-1 mRNA ekspresyonuna etkisi.

Tüm değerler Ortalama ± Standart Sapma olarak verilmiştir.

One-way ANOVA testine göre:

*Kontrol grubundan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

[&] Sadece laktasistin uygulanan gruptan önemli ölçüde farklı ($p<0,05$)

5. TARTIŞMA

Oksidatif stres son yıllarda birçok toksikolojik olguda karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çok sayıda çalışma çeşitli hastalıklarda (Halliwell ve ark. 1992; Southorn 1988), kimyasalların toksisitesinde (Basu 2003; Pohl 1993) oksidatif stresin rolünü doğrulamaktadır.

Oksidatif stres serbest radikal ve reaktif oksijen türlerin oluşumu ile organizmada yer alan enzimatik antioksidanların değişikliğe uğraması ve nonenzimatik antioksidanların yetersiz gelmesi sonucu oluşan bir durumdur. Oksidatif stresin sonuçları arasında protein oksidasyonu, organizmada proteinlerin yüksek miktarda bulunmasından dolayı önemli bir modifikasyondur (Grune 2000).

UV radyasyon özellikle güneş ışığından kaynaklanan maruziyet dolayısıyla cilt yapısında oluşturduğu hasar açısından önemlidir. UVA radyasyon ozon tabakasını aşarak dünyaya ulaşan UV radyasyonun büyük oranını kapsar.

UV radyasyonun kollajen degradasyonu ve ekstraselüler matriks yapının bozulması ile oluşan kırışıklık, sarkma, pigmentasyon ve melanoma gibi ciltteki etkilerinin en önemli kaynaklarından birinin singlet oksijen, hidrojen peroksid gibi reaktif türler olduğu düşünülmektedir (Tyrrell 1996).

Bu çalışmada, UVA radyasyonun singlet oksijen oluşumu sonrası protein agregatlarının oluşumu ile sonuçlanan protein oksidasyonu ile proteazom aktivitesinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu proteazom inhibisyonunun da UVA kaynaklı MMP-1 ekspresyon düzeylerindeki artışta önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak proteazom inhibisyonu ve MMP-1 mRNA ekspresyonu arasındaki transkripsiyon yolağı da aydınlatılmış ve mekanizmanın rolü tam olarak doğrulanmıştır.

UVA radyasyon ve dermis tabakasındaki fibroblast hücreleriyle çalışılmaya karar verilmiştir. Bunun nedeni, UVA'nın 2.2'de bahsedildiği gibi ciltte en çok hasar oluşturan UV çeşidi olması ve UVA'nın dalga boyundan dolayı cildin daha alt tabakasına yani dermal tabakasına ulaşmasıdır. Dermal tabakada fibroblast hücrelerin çoğunluğu oluşturması ve bu hücrelerin kollajen degradasyonunda başlıca rol oynayan

matriks metalloproteinaz-1 enzimini sentezlemesi, çalışmada bu hücrelerin kullanımının doğruluğunu göstermektedir.

Hücreye uygulanan UVA dozu seçimi için ilk olarak MTT canlılık testi uygulanmıştır. 60 J/cm^2 doza kadar olan uygulamada hücrelerin ölüm oranının %20'nin üzerine çıkmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). Fakat doz artırıldığında ölüm oranının da hızlı bir şekilde arttığı gözlenmiş ve 0-60 J/cm^2 doz aralığında çalışılmaya karar verilmiştir. Yapılan bir çalışmada 50 J/cm^2 UVA dozunun 1 minimal eritemal doza tekabül ettiği bildirilmiştir (Luy ve ark. 1994).

UV uygulama esnasında besiyerinde tutulan hücrelerin, besiyerinde bulunan fenol kırmızısından dolayı hidrojen peroksid oluşumunun arttığı bir çalışmada gözlenmiştir (Luy ve ark. 1994). Bu yüzden 3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde UVA radyasyon esnasında hücreler besiyerinde değil de fosfat tamponu içerisinde tutulmuştur. Fosfat tamponunun UV uygulama süresi içerisinde hücrede hasar oluşturup oluşturmadığını saptamak için de sadece fosfat tamponuyla en fazla 60 J/cm^2 dozda uygulama için gerekli 50 dakikalık süre sonunda MTT canlılık testi uygulanmış ve hücrelerin tamamen sağlam kaldığı gözlenmiştir.

UV lambadan kaynaklanan sıcaklığı azaltmak için tankın içerisinde bulunan havalandırmadan kaynaklanabilecek soğukluk stresini engellemek için UVA uygulanması esnasında hücreler 37 °C'ye ayarlanmış olan su banyosu üzerinde tutulmuştur. Böylelikle aynı zamanda vücut şartları da mümkün olduğu kadar sağlanmaya çalışılmıştır.

Çalışılan dozlarda UVA radyasyonun protein karbonilleri miktarının artışına neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Protein oksidasyonun göstergesi olarak protein karbonillerinin kullanımı, karbonillenmiş proteinlerin oldukça erken oluşumu ve stabilitesi sayesinde geniş kabul görmektedir. Ayrıca karbonillerin tayini için ELISA yöntemi genellikle kullanılan bir yöntemdir (Levine ve ark. 1994).

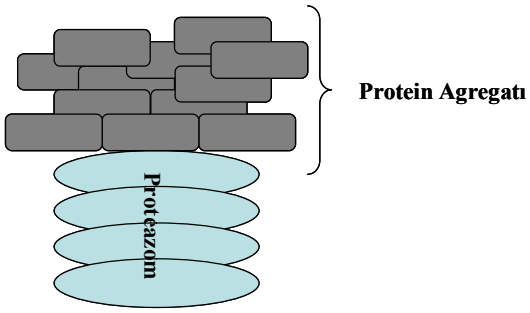
Önceki çalışmalarda proteazomun okside proteinlerin degradasyonunda önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Grune ve ark. 1995; 1996). UVA radyasyon sonrasında da proteazomun bu şekilde etkili olup olmadığını saptamak için, UVA uygulama sonrası fibroblast hücre sitoplazmasında proteazomal aktivite susbstrat olarak florojenik peptid kullanılarak ölçülmüştür. Suc-LLVY-MCA proteazom aktivitesi tayininde kullanılan spesifik bir peptiddir ve diğer proteoliz enzimleriyle reaksiyonu minimum düzeydedir

(Grune ve ark. 1995). UVA uygulaması ile proteazomal aktivitede 30 J/cm^2 dozda en az seviyeye inen, önemli ölçüde bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.3). Bu etkinin proteazom aktivitesinde ya da miktarındaki inhibisyondan kaynaklandığını anlamak için immunoblot yöntemiyle proteazom miktarı tayin edilmiş ve azalmanın miktarda değil de (Şekil 4.4) katalitik aktivitede olduğu doğrulanmıştır.

Konuyla ilgili çalışmalarda saptanan UVA radyasyon sonrası $^1O_2$ oluşumu gözönüne alınarak, singlet oksijenin UVA kaynaklı proteazom inhibisyonuna rolü singlet oksijen nötrleyici NaN_3 kullanılarak test edilmiştir. Sonuçlar singlet oksijenin fibroblastlarda UVA kaynaklı proteazom inhibisyonunda etkisini göstermektedir (Şekil 4.5). Bu sonuçlar sıcaklık etkisiyle $NDPO_2$' un bozunmasıyla $^1O_2$ oluşturulmasıyla yapılan deneylerle de doğrulanmıştır. Bu sonuçların tersine, izole proteazomda ne $NDPO_2$ ne de UVA hücreye göre daha yüksek dozlarda bile proteolitik aktivitede inhibisyona sebep olmamıştır (Şekil 4.6). İzole proteazomda elde edilen bu ilginç sonuç, singlet oksijen oluşumu sonrası proteazom aktivite inhibisyonuna arada oluşan başka bir yapının neden olabileceği hipotezini aklımıza getirmiştir. Bu noktada, singlet oksijen oluşumu ardından, UVA radyasyonun protein agregatı oluşumuna neden olabileceği ilgimizi çekmiştir ve canlı hücrelerdeki proteazom inhibisyonu protein agregatlarının oluşumuyla açıklanabilmektedir (Şekil 4.9, Grune ve ark. 1996; Powell ve ark. 2005). Protein agregatları ileri derecede protein oksidasyonu sonucu proteinlerin çapraz bağlarla bağlanarak oluşturduğu yapılardır. Bu agregatların özellikle yaşlanma sürecinde akümüle olduğu ve yaşlılıktan kaynaklanan birçok hastalığın sebebini oluşturduğu bilinmektedir. Proteazomun proteinleri halka yapısıyla degrade etme mekanizması göz önüne alındığında, protein agregatlarının büyük yapısından dolayı proteazom yapısının içine sığmaması ve ayrıca proteazomun ağız kısmını tıkayarak proteazomal inhibisyona neden olması modelimize açıklık getirmektedir (Şekil 5.1).

Farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar, UVA radyasyonun ciltte sebep olduğu gözle görülür değişikliklere kollajen polimerizasyonu ve degradasyonunun sebep olduğunu göstermektedir. Bu etkilerin UVA maruziyeti halinde in vivo koşullarda oluşan $^1O_2$ ile ortaya çıktığı ve cildin dermal tabakasında artış gösteren MMP-1 ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (Scharffetter-Kochanek ve ark. 1993). 60 J/cm^2'ye kadar dozda UVA uygulaması sonrasında MMP-1 ve TIMP-1 ekspresyonlarında gözlenen değişiklikler bu konuda yapılmış olan önceki çalışmalarla

benzerlik göstermektedir (Şekil 4.10, Naru ve ark. 2005; Herrmann ve ark. 1993; Polte ve Tyrrell 2004; Hantke ve ark. 2002).



Şekil 5-1: Protein agregat yapısının proteazom enzimini tıkayarak inhibisyonu.

Bu noktaya kadar elde edilen sonuçlar UVA radyasyonun neden olabileceği primer etkileri göstermiştir. Bu noktadan sonra, elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla birtakım deneyler yapılmış, proteazom inhibisyonu ve mRNA ekspresyonları arasındaki bağlantı ispatlanmaya çalışılmıştır.

UVA uygulama sonucu protein agregatlarının proteazom inhibisyonuna sebep olabileceğini gösteren sonuçlardan yola çıkarak, hücreler floresans pigment olarak bilinen lipofusin ile inkübe edilmiş ve hücrelerin lipofusini sitoplazmaya aldıktan sonra proteazom aktivitesinde inhibisyon (Şekil 4.12), MMP-1 mRNA ekspresyonunda artış ve TIMP-1 mRNA ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.13). Bu sonuçlar UVA uygulaması ile elde edilen sonuçlar ile uyuşmakta ve protein agregatlarının proteazom inhibisyonundaki rolünü ve kollajen degradasyonundaki etkisini de doğrulamaktadır.

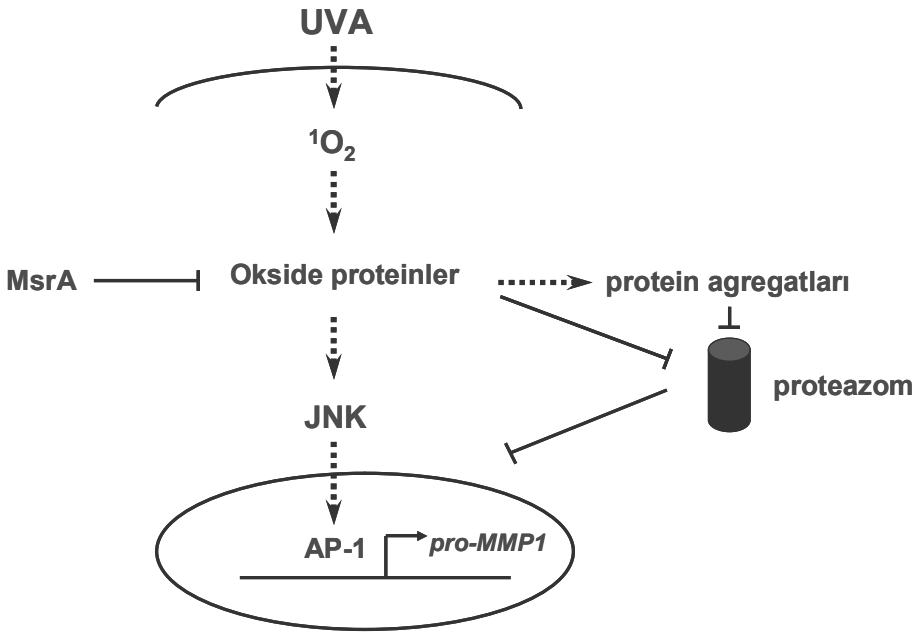
Bir basamak sonrasından yani direkt proteazom inhibisyonundan başlamak için hücreler irreversibl olarak proteazom inhibitörü olan laktasistin ile inkübe edilmiştir. Laktasistin 20S proteazomun katalitik altünitelerine bağlanarak proteaz aktivitesini inhibe etmektedir (Fenteany ve Schreiber 1998). Laktasistin ile proteazomal aktivitenin %50'yi aşan inhibisyonunun ardından (Şekil 4.14), MMP-1 mRNA ekspresyonunda artış ve TIMP-1 mRNA ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.15). Burada proteazomal aktivitenin MMP-1/TIMP-1 mRNA düzeylerinde önemli bir regülatör olduğu ispatlanmıştır. Bu yüzden, UVA'nın yüksek proteazomal aktiviteye sahip hücrelerde mRNA düzeylerini bu kadar değiştirmemesi beklenmektedir. Bu bağlamda,

UVA'nın proteazomal aktivitesi overekspresyonla artırılmış fibroblastlardaki etkisi çalışılmıştır. β_5-altünite overekspresyonunun hücresel proteazomal aktiviteyi arttırdığı daha önceki bir çalışmada da gösterilmiş olup (Chondrogianni ve ark. 2005) bizde de %60 oranında artış göstermiştir (Şekil 4.16). Vektör ile transfekte olan hücreler 30 J/cm^2 UVA ile MMP-1 mRNA düzeylerinde 3 kat artışa neden olurken β_5-altünite overekspresyonu olan hücrelerde MMP-1 mRNA düzeylerinde önemli artış gözlenmemiştir (Şekil 4.18). Bu sonuç ta proteazomun MMP-1 mRNA düzeyi regülasyonundaki rolünü doğrulamaktadır.

Protein oksidasyonu sürecinde, okside proteinleri degradasyonun yanında tamir mekanizmaları da mevcuttur. UVA uygulamada proteinlerin oksidasyonunun agregat oluşumu aşamasına gelmeden tamir edilmesinin de MMP-1 ekspresyonunda olumlu sonuç oluşturacağı düşünülmüştür. MsrA, insan cildinde tanımlanmış, oksidatif protein hasarını tamir etme yeteneğinde olan bir enzimdir (Ogawa ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda, WI-38 fibroblastlarda yaşlanma prosesinde, keratinositlerin kronik ve yüksek dozda UVA maruziyeti ardından MsrA'nın ekspresyonu ve aktivitesinde azalma gösterilmiş (Picot ve ark. 2004; 2007), bu azalmanın oksidatif protein hasarındaki artıştan kaynaklandığı saptanmıştır. Ayrıca, çeşitli hücre tipleri için Msr sisteminin oksidatif stes kaynaklı hücre ölümündeki koruyucu rolü rapor edilmiştir (Picot ve ark. 2005). Bizim çalışmamızda, MsrA enziminin aşırı ekspresyonuyla oksidatif protein hasarının tamiri de UVA kaynaklı proteazom inhibisyonunu (Şekil 4.20) ve MMP-1 mRNA ekspresyonu artışını önlemiştir (4.21).

Son aşama olarak, proteazomal inhibisyonun MMP-1 ve TIMP-1 mRNA düzeylerine hangi yolakla bağlantı oluşturduğu araştırılmıştır. UV radyasyon kaynaklı MMP-1 ekspresyonu artışının transkripsiyon faktörleri olan AP-1 ve NF-κB aktivasyonu ile arttığına dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır (Vile ve ark. 1995; Fisher ve ark. 1996; Wan ve ark. 2001). Ayrıca AP-1 ve NF-κB DNA bağlanma aktivitelerinin UVA tarafından stimüle olduğu insan fibroblastlarında ve keratinositlerinde gösterilmiştir. AP-1 transkripsiyon faktörü, Jun ve Fos proteinlerinden oluşmaktadır (Angel ve Karin 1991). C-jun proteini bir protoonkojen olarak bilinmektedir ve degradasyonunda proteazomun önemli rol oynadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada 30 J/cm^2 dozda UVA, laktasistin ve lipofusin c-jun miktarında artışa neden olmuştur (Şekil 4.22). Bu artış proteazom inhibisyonu sonucu c-jun'un degrade olamamasından

kaynaklanmaktadır. Aynı şekilde uygulama sonucu c-jun fosforilasyonundaki artış AP-1 aktivasyonunu öngörmektedir. UVA ve laktasistin uygulaması sonrası AP-1 DNA bağlanma aktivitesinde de artış gözlenmiştir (Şekil 4.23). AP-1 aktivasyonu tayininde lipofusin, GFP-floresans spektrumu ile benzerlik gösterdiğinden test edilememiştir. C-Jun proteini fosforilasyonunun laktasistin kaynaklı MMP-1 mRNA ekspresyonunda rolü JNK inhibisyonu ile doğrulanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 5-2: UVA uygulama sonrası protein agregatları ve proteazomun rolü.

Yapılan çalışmada aydınlatılan yolak özet olarak Şekil 5.2'de gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile UVA radyasyonun ciltte oluşturduğu hasar mekanizmalarından biri her yönüyle aydınlatılmaya çalışılmıştır. Fransa'da proteazom inhibisyonuna yönelik mekanizmayla etki gösteren göneş koruma kremleri üretilmeye başlanmıştır. Bu açıdan da bakıldığında bulgularımızın klinikteki katkısı gözlenmektedir.

KAYNAKLAR

Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L. ve ark., (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **8**,* 333-338.

Adams, J. ve Elliott, P.J. (2000). New agents in cancer clinical trials. *Oncogene, **19**,* 6687-6692.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D. ve ark. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research, **59**,* 2615-2622.

Alamdari, D.H., Kostidou, E., Paletas, K., Sarigianni, M., Konstas, A.G., Karapiperidou, A. ve ark. (2005). High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radicals in Biology and Medicine, **39**,* 1362-1367.

Angel, P. Ve Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta, **1072**,* 129-157.

Arnold, J. ve Grune, T. (2002). PARP-mediated proteasome activation: a co-ordination of DNA repair and protein degradation? *Bioessays, **24**,* 1060-1065.

Austoker, J. (1994). Melanoma: prevention and early diagnosis. *British Medical Journal, **308**,* 1682-1686.

Bader, N. ve Grune, T. (2006). Protein oxidation and proteolysis. *Biological Chemistry, **387**,* 1351-1355.

Basu, S. (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology, **189**,* 113-127.

Behren, A., Simon, C., Schwab, R.M., Loetzsch, E., Brodbeck, S., Huber, E. ve ark. (2005). Papillomavirus E2 protein induces expression of the matrix metalloproteinase-9 via the extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 signaling pathway. *Cancer Research, **65**,* 11613–11621.

Bohley, P. ve Seglen, P.O. (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experentia, **48**,* 151-157.

Bota, D.A. ve Davies, K.J.A. (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nature Cell Biology, **4**,* 674-680.

Bota, D.A., Remmen, H.V. ve Davies, K.J.A. (2002). Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Letter, **532**,* 103-106.

Buss, H., Chan, T.P., Sluis, K.B., Domigan, N.M., Winterbourn, C.C. (1997). Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radicals in Biology and Medicine, **23**,* 361-366.

Catalgol, B. ve Grune, T. (2009). Turnover of oxidatively modified proteins: the usage of in vitro and metabolic labeling. *Free Radicals in Biology and Medicine, **46**,* 8-13.

Chan, S.L. ve Mattson, M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *Journal of Neuroscience Research, **58**,* 167-190.

Chao, C., Ma, Y. ve Stadtman, E.R. (1997). Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **94**,* 2969-2974.

Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A.J., Nezis, I.P., Rivett, A.J. ve Gonos, E.S. (2005). Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *Journal of Biological Chemistry, **280**,* 11840-11850.

Chuang, T.Y., Popescu, A., Su, W.P. ve Chute, C.G. (1990). Basal cell carcinoma. A population-based incidence study in Rochester, Minnesota. *Journal of the American Academy of Dermatology, **22**,* 413-417.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell, **79**,* 13-21.

Cohen, D. ve DeLeo, V.A. (1993). Ultraviolet radiation-induced phospholipase A2 activation occurs in mammalian cell membrane preparations. *Photochemistry and Photobiology, **57**,* 383-390.

Coldiron, B.M. (1992). Thinning of the ozone layer: facts and consequences. *Journal of the American Academy of Dermatology, **27**,* 653-662.

Coux, O., Tanaka, K. ve Goldberg, A. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry, **65**,* 801-807.

Creed, D. (1984a). The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-I. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology, **39**,* 537-562.

Creed, D. (1984b). The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-II. Tyrosine and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology, **39**,* 563-575.

Cunningham, M.L., Johnson, J.S., Giovanazzi, S.M. ve Peak, M.J. (1985a). Photosensitized production of superoxide anion by monochromatic (290-405 nm) ultraviolet irradiation of NADH and NADPH coenzymes. *Photochemistry and Photobiology, **42**,* 125-128.

Cunningham, M.L., Krinsky, N.I., Giovanazzi, S.M. ve Peak, M.J. (1985b). Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *Free Radicals in Biology and Medicine, **1**,* 381-385.

Davies, K.J.A., Delsignore, M.E. ve Lin, S.W. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals II. Modification of amino acids. *Journal of Biological Chemistry, **262**,* 9902-9907.

Davies, K.J.A., Lin, S.W. ve Pacifici, R.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals IV. Degradation of denatured protein. *Journal of Biological Chemistry, **262**,* 9914-9920.

Davies, K.J.A. ve Delsignore, M.E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals III. Modification of secondary and tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry, **262**,* 9908-9913.

Davies, K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. *Journal of Biological Chemistry, **262**,* 9895-9901.

Davies, K.J.A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society symposium, **61**,* 1-31.

Davies, K.J.A. (2001). Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie, **83**,* 301-310.

Davies, M.J. (2003). Singlet-oxygen mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications, **305**,* 761-770.

De Fabo, E.C. ve Noonan, F.P. (1983). Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *The Journal of Experimental Medicine, **158**,* 84-98.

Dean, R.T., Shanlin, F.U., Stocker, R. ve Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical Journal, **324**,* 1-18.

Dice, J.F. ve Goldberg, A.L. (1975). Relationship between in vivo degradative rates and isoelectric points of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **72**,* 3893-3897.

Dick, L.R., Cruikshank, A.A., Grenier, L., Melandri, F.D., Nunes, S.L. ve Stein, R.L. (1996). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *Journal of Biological Chemistry, **271**,* 7273-7276.

Diffey, B.L., Farr, P.M. ve Oakley, A.M. (1987). Quantitative studies on UVA-induced erythema in human skin. *The British Journal of Dermatology, **117**,* 57-66.

Eresen, C. (2006). RNA sentezi ve işlenmesi. İçinde M.Sakızlı, N.Atabey (Ed.), Hücre:Moleküler Yaklaşım. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi; 231-279.

Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J. ve Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science, **268**,* 726-731.

Fenteany, G. ve Schreiber, S.L. (1998). Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *Journal of Biological Chemistry, **273**,* 8545-8548.

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. ve Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene, **18**,* 7719-7730.

Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S. ve ark. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature, **379**,* 335-339.

Ford, J.M., Lommel, L. ve Hanawalt, P.C. (1994). Preferential repair of ultraviolet light-induced DNA damage in the transcribed strand of the human p53 gene. *Molecular Carcinogenesis, **10**,* 105-109.

Freeman, S.E., Hacham, H., Gange, R.W., Maytum, D.J., Sutherland, J.C. ve Sutherland, B.M. (1989). Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **86**,* 5605-5609.

Friguet, B. ve Szweda, L.I. (1997). Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Letter, **405**,* 21-25.

Gaboriau, F., Morliere, P., Marquis, I., Moysan, A., Geze, M., Dubertret, L. (1993). Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochemistry and Photobiology, **58**,* 515-520.

Garland, C.F., Garland, F.C. ve Gorham, E.D. (1992). Could sunscreens increase melanoma risk? *American Journal of Public Health,* ***82,*** 614-615.

Gasparro, F.P. ve Fresco, J.R. (1986). Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydrodimers in oligo- and polynucleotides. *Nucleic Acids Research,* ***14,*** 4239-4251.

Giulivi, C. ve Davies, K.J.A. (1993). Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19S) proteasome. *Journal of Biological Chemistry,* ***268,*** 8752-8759.

Glickman, M.H. ve Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews,* ***82,*** 373-428.

Grant, A.J., Jessup, W. ve Dean, R.T. (1993). Inefficient degradation of oxidized regions of protein molecules. *Free Radical Research Communications,* ***18,*** 259-267.

Griffith, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A. ve ark. (2002). Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine,* ***23,*** 101-208.

Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M. ve Davies, K.J.A. (1995). Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry,* ***270,*** 2344-2351.

Grune, T., Reinheckel, T. ve Davies K.J.A. (1996). Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *Journal of Biological Chemistry,* ***271,*** 15504-15509.

Grune, T., Reinheckel, T. ve Davies, K.J.A. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The Faseb Journal,* ***11,*** 526-534.

Grune, T., Blasig, I.E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R. ve Davies, K.J.A. (1998). Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry,* ***273,*** 10857-10862.

Grune, T. (2000). Oxidative stress, aging and the proteasomal system. *Biogerontology,* ***1,*** 31-40.

Grune, T., Klotz, L.O., Gieche, J., Rudeck, M. ve Sies, H. (2001). Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***30,*** 1243-1253.

Grune, T., Merker, K., Sandig, G. ve Davies, K.J.A. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* ***305,*** 709-718.

Grune, T., Jung, T., Merker, K. ve Davies, K.J.A. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, **36**,* 2519-2530.

Guilivi, C., Pacifici, R.E. ve Davies, K.J.A. (1994). Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics, **311**,* 329-341.

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. ve Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, **119**,* 598-620.

Halliwell, B. ve Gutteridge J.M.C. (Ed.) (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine.* New York: Oxford.

Hanson, D. ve DeLeo, V. (1990). Long-wave ultraviolet light induces phospholipase activation in cultured human epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology, **95**,* 158-163.

Hantke, B., Lahmann, C., Venzke, K., Fischer, T., Kocourek, A., Windsor, L. J. ve ark. (2002). Influence of flavonoids and vitamins on the MMP- and TIMP-expression of human dermal fibroblasts after UVA irradiation. *Photochemical & Photobiological Sciences, **1**,* 826-833.

Herrmann, G., Wlaschek, M., Lange, T.S., Prenzel, K., Goerz, G. ve Scharffetter-Kochanek, K. (1993). UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Experimental Dermatology, **2**,* 92-97.

Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J. ve ark. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research, **61**,* 3071-3076.

Hoffmann, L. ve Rechsteiner, M. (1994). Activation of the multicatalytic protease. *Journal of Biological Chemistry, **269**,* 16890-16895.

Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry, **264**,* 13963-13966.

Horner, M.J., Ries, L.A.G., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlader, N., ve ark. (2008). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Erişim 03.07.2009, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/

Hough, R., Pratt, G. ve Rechsteiner, M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *Journal of Biological Chemistry,* ***262,*** 8303-8313.

Jariel-Encontre, I., Pariat, M., Martin, F., Carillo, S., Salvat, C., Piechaczyk, M., (1995). Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26S proteasome. *Journal of Biological Chemistry,* ***270,*** 11623–11627.

Jariel-Encontre, I., Salvat, C., Steff, A.M., Pariat, M., Acquaviva, C., Furstoss, O. ve ark. (1997). Complex mechanisms for c-fos and c-jun degradation. *Molecular Biology Reports,* ***24,*** 51–56.

Jerant, A.F., Johnson, J.T., Sheridan, C.D. ve Caffrey, T.J. (2000). Early detection and treatment of skin cancer. *American Family Physician*, ***62,*** 357-368. Erişim 03.07.2009, http://www.aafp.org/afp/20000715/357.html

Jessup, W., Mander, E.L. ve Dean, R.T. (1992). The intracellular storage and turnover of apolipoprotein B of oxidized LDL in macrophages. *Biochimica et biophysica acta,* ***1126,*** 167-177.

Jung, T., Catalgol, B. ve Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine,* ***30,*** 191-296.

Jung, T., Bader, N. ve Grune, T. (2007). Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences,* ***1119,*** 97-111.

Kahari, V.M. ve Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, 6, 199-213.

Kania, M.A., DeMartino, G.N., Baumeister, W. ve Goldberg, A.L. (1996). The proteasome subunit, C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator. *European Journal of Biochemistry,* ***236,*** 510-516.

Kisselev, A.F. ve Goldberg, A.L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology,* ***8,*** 739–758.

Kligman, L.H. ve Gebre, M. (1991). Biochemical changes in hairless mouse skin collagen after chronic exposure to ultraviolet-A radiation. *Photochemistry and Photobiology,* ***54,*** 233-237.

Klotz, L.O., Holbrook, N.J. ve Sies, H. (2001). UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Current Problems in Dermatology, **29**,* 95-113.

Kochevar, I.E. (1990). UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochemistry and Photobiology, **52**,* 795-800.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. ve Jensch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell, **96**,* 635-644.

Kuo, Y.R., Wu, W.S. ve Wang, F.S. (2007). Flashlamp pulsed-dye laser suppressed TGF-beta1 expression and proliferation in cultured keloid fibroblasts is mediated by MAPK pathway. *Lasers in surgery and medicine, **39**,* 358–364.

Kwa, R.E., Campana, K. ve Moy, R.L. (1992). Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology, **26**,* 1-26.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. ve Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology, **233**,* 346-357.

Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. ve Stadtman, E.R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **93**,* 15036-15040.

Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L. ve Stadtman, E.R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development, **107**,* 323-332.

Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radicals in Biology and Medicine, **32**,* 790-796.

Luy, H., Frenk, E. ve Applegate, L.A. (1994). Ultraviolet A-induced cellular membrane damage in the photosensitivity dermatitis/actinic reticuloid syndrome. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine, **10**,* 126-133.

Mawn, V.B. ve Fleischer, A.B. (1993). A survey of attitudes, beliefs, and behavior regarding tanning bed use, sunbathing, and sunscreen use. *Journal of the American Academy of Dermatology, **29**,* 959-962.

Mayer-Kuckuk, P., Ullrich, O., Ziegler, M., Grune, T. ve Schweiger, M. (1999). Functional interaction of poly(ADP-ribose) with the 20S proteasome in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications, **259**,* 576-581.

McCracken, E., Dewar, D. ve Hunter, A.J. (2001). White matter damage following systemic injection of the mitochondrial inhibitor 3-nitropropionic acid in rat. *Brain Research, **892**,* 329-335.

McDuffee, A.T., Senisterra, G., Huntley, S., Lepock, J.R., Sekhar, K.R., Meredith, M. J. ve ark. (1997). Proteins containing non-native disulfide bonds generated by oxidative stress can act as signals for the induction of the heat shock response. *Journal of Cellular Physiology, **171**,* 143-151.

McMurray, R.W., Ndebele, K., Hardy, K.J. ve Jenkins, J.K. (2001). 17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine, **14**,* 324–333.

Mehlhase, J. ve Grune, T. (2002). Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biological Chemistry, **383**,* 559-567.

Melino, G., Bernassola, F., Catani, M.V., Rossi, A., Corazzari, M., Sabatini, S. ve ark. (2000). Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Research, **60**,* 2377–2383.

Mellgren, R.L. (1987). Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *The FASEB Journal, **1**,* 110-115.

Merker, K., Ullrich, O., Schmidt, H., Sitte, N. ve Grune, T. (2003). Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts. *The FASEB Journal, **17**,* 1963-1965.

Mitchell, D.L., Jen, J. ve Cleaver J.E. (1991). Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. Photochemistry and Photobiology, 54, 741-746.

Miyoshi, H., Umeshita, K., Sakon, M., Imajoh-Ohmi, S., Fujitani, K., Gotoh, M. ve ark. (1996). Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl-hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology, **110**,* 1897-1904.

Mori, A., Kaminuma, O., Ogawa, K., Okudaira, H. ve Akiyama, K. (2000). Transcriptional regulation of IL-5 gene by nontransformed human T cells through the proximal promoter element. *Internal Medicine, **39**,* 618–625.

Nagano, T., Ueda, M. ve Ichihashi, M. (1993). Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light-induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Archives of Dermatology, **129**,* 1157-1161.

Naru, E., Suzuki, T., Moriyama, M., Inomata, K., Hayashi, A., Arakane, K. ve ark. (2005). Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology,* ***153****,* 6-12.

Noonan, E.J., Place, R.F., Giardina, C. ve Hightower, L.E. (2007). HSP70B regulation and function. *Cell Stress Chaperones,* ***12****,* 393-402.

Ogawa, F., Sander, C.S., Hansel, A., Oehrl, W., Kasperczyk, H., Elsner, P. ve ark. (2006). The Repair Enzyme Peptide Methionine-*S*-Sulfoxide Reductase Is Expressed in Human Epidermis and Upregulated by UVA Radiation. *Journal of Investigative Dermatology,* ***126****,* 1128-1134.

Pacifici, R.E., Salo, D.C. ve Davies, K.J.A. (1989). Maxroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***7****,* 521-536.

Pacifici, R.E., Kono, Y. ve Davies, K.J.A. (1993). Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Journal of Biological Chemistry,* ***268****,* 15405-15411.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. ve Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians,* ***55****,* 74-108.

Peak, M.J., Peak, J.G. ve Carnes, B.A. (1987). Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochemistry and Photobiology,* ***45****,* 381-387.

Peak, M.J. ve Peak, J.G. (1989). Solar-ultraviolet-induced damage to DNA. *Photodermatology,* ***6****,* 1-15.

Picot, C.R., Perichon, M., Cintrat, J.C., Friguet, B. ve Petropoulos, I. (2004). The peptide methionine sulfoxide reductases, MsrA and MsrB (hCBS-1), are downregulated during replicative senescence of human WI-38 fibroblasts. *FEBS Letters,* ***558****,* 74-78.

Picot, C.R., Petropoulos, I., Perichon, M., Moreau, M., Nizard, C. ve Friguet, B. (2005). Overexpression of MsrA protects WI-38 SV40 human fibroblasts against H_2O_2-mediated oxidative stress. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***39****,* 1332-1341.

Picot, C.R., Moreau, M., Juan, M., Noblesse, E., Nizard, C., Petropoulos, I. ve ark. (2007). Impairment of methionine sulfoxide reductase during UV irradiation and photoaging. *Experimental Gerontology,* ***42****,* 859-863.

Plonka, P.M. (2009). Electron paramagnetic resonance as a unique tool for skin and hair research. *Experimental Dermatology,* ***18****,* 472-484.

Pohl, L.R. (1993). An immunochemical approach of identifying and characterizing protein targets of toxic reactive metabolites. *Chemical Research in Toxicology,* ***6,*** 786-793.

Polte, T. ve Tyrrell, R.M. (2004). Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***36,*** 1566-1574.

Powell, S.R., Wang, P., Divald, A., Teichberg, S., Haridas, V., McCloskey, T.W. ve ark. (2005). Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***38,*** 1093-1101.

Puig, A. ve Gilbert, H.F. (1994). Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *Journal of Biological Chemistry,* ***269,*** 7764-7771.

Ray, S.K., Wilford, G.G., Crosby, C.V., Hogan, E.L. ve Banik, N.L. (1999). Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells. *Brain Research,* ***829,*** 18-27.

Rivett, A.J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *The Biochemical Journal,* ***291,*** 1-10.

Rivett, A.J. (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Current Opinion in Immunology,* ***10,*** 110-114.

Roberg, K. ve Ollinger, K. (1998). Oxidative stress cause relocation of lysosomal enzymes cathepsin D with ensuing apoptosis in neuronal rat cardiomyocytes. *The American Journal of Pathology,* ***152,*** 1151-1156.

Roddey, P.K., Garmyn, M., Park, H.Y., Bhawan, J. ve Gilchrest, B.A. (1994). Ultraviolet irradiation induces c-fos but not c-Ha-ras proto-oncogene expression in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology,* ***102,*** 296-299.

Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M. ve Sies, H. (1993). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Letters,* ***331,*** 304-306

Scharffetter, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Bolsen, K., Schothorst, A., Goerz, G. ve ark. (1991). UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Archieves of Dermatological Research,* ***283,*** 506-511.

Shringarpure, R., Grune, T. ve Davies, K.J.A. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome dependent proteolysis in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences,* ***58,*** 1442-1450.

Shringarpure, R. ve Davies, K.J.A. (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***32,*** 1084-1089.

Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J. ve Davies, K.J.A. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *Journal of Biological Chemistry,* ***278,*** 311-318.

Sies, H. (1997). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology,* ***82,*** 291-295.

Sitte, N., Merker, K. ve Grune, T. (1998). Proteasome-dependent degradation of oxidized proteins in MRC-5 fibroblasts. *FEBS Letters,* ***440,*** 399-402.

Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W.D., Von Zglinicki, T. ve ark. (2000). Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *The FASEB Journal,* ***14,*** 1490-1498.

Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T. ve Grune, T. (2000). Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***28,*** 701-708.

Skolnick, A.A. (1991). Sunscreen protection controversy heats up. *The Journal of the American Medical Association,* ***265,*** 3218-3220.

Sleiman, R.J. ve Stewart, B.W. (2000). Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitochondrial cell death. *Clinical Cancer Research,* ***6,*** 3756-3765.

Sommerburg, O., Ullrich, O., Sitte, N., Von Zglinicki, D., Siems, W. ve Grune, T. (1998). Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light--selective recognition and degradation by the 20S proteasome. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***24,*** 1369-1374.

Southorn, P.A. (1988). Free radicals in medicine. II:involvement in human disease. *Mayo Clinic Proceedings,* ***63,*** 390.

Stadtman, E.R. ve Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences,* ***899,*** 191-208.

Stadtman, E.R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry,* ***62,*** 797-821.

Stancovski, I., Gonen, H., Orian, A., Schwartz, A.L. ve Ciechanover, A., (1995). Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Molecular and Cellular Biology,* ***15,*** 7106–7116.

Stenner, F., Liewen, H., Zweifel, M., Weber, A., Tchinda, J. ve Bode, B. (2008). Targeted therapeutic approach for an anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sciences,* ***99,*** 1847-1852.

Taylor, C.R, Stern, R.S., Leyden, J.J ve Gilchrest, B.A. (1990). Photoaging/photodamage and photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, ***22,*** 1-15.

Teicher, B.A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V.J. ve Adams, J. (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clinical Cancer Research,* ***5,*** 2638-2645.

Tornaletti, S. ve Pfeifer, G.P. (1994). Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science,* ***263,*** 1436-1438.

Truhan, A.P. (1991). Sun protection in childhood. *Clinical pediatrics*, ***30,*** 676-681.

Tyrell, R.M. (1996). Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight--from models to reality. *Bioessays*, ***18,*** 139-148.

Tyrrell, R.M. ve Pidoux, M. (1989). Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations. *Photochemistry and Photobiology,* ***49,*** 407-412.

Ullrich, O. ve Grune, T. (2001). Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***31,*** 887-893.

Ullrich, O., Reinheckel, T., Sitte, N., Hass, R., Grune, T. ve Davies, K.J.A. (1999). Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* ***96,*** 6223-6228.

Ustrell, V., Realini, C., Pratt, G. ve Rechneister, M. (1995). Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic proteases: differential peptidase activities and responses to the 11S regulator. *FEBS Letters, **376**,* 155-158.

Vile, G.F., Tanew-Ilitschew, A. ve Tyrrell, R.M. (1995). Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochemistry Photobiology, **62**,* 463-468.

Vitasa, B.C., Taylor, H.R., Strickland, P.T., Rosenthal, F.S., West, S., Abbey, H. ve ark. (1990). Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer, **65**,* 2811-2817.

Voges, D., Zwickl, P. ve Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual Review of Biochemistry, **68**,* 1015-1068.

Vogt, W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radicals in Biology and Medicine, **18**,* 93-105.

Wan, Y.S., Wang, Z.Q., Voorhees, J. ve Fisher, G. (2001). EGF receptor crosstalks with cytokine receptors leading to the activation of c-Jun kinase in response to UV irradiation in human keratinocytes. *Cell Signaling, **13**,* 139-144.

Watson, S.A. ve Tierney, G. (1998). Matrix metalloproteinase inhibitors: a review. *BioDrugs, **9**,* 325-335.

Weinstock, M.A. (1994). Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: clinical issues, definitions, and classification. *Journal of Investigative Dermatology*, ***102**,* 4S-5S.

WHO (2006, Temmuz). Global Burden of Disease of Solar Ultraviolet Radiation, Environmental Burden of Disease Series. Erişim 03.07.2009, http://www.who.int/uv/health/solaruvradfull_180706.pdf

Wilkinson, K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Seminars in Cell & Developmental Biology, **11**,* 141-148.

Wu, W.K., Wu, Y.C., Yu, L., Li, Z.J., Sung, J.J. ve Cho, C.H. (2008). Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications, **374**,* 258-263.

Wu, J. (2002). On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a novel frontier in the development of immunosuppressants. *American Journal of Transplantation, **2**,* 904–912.

Yin, D. (1996). Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radicals in Biology and Medicine,* ***21****,* 871-888.

Yin, D. (1992). Lipofuscin-like fluorophores can result from reactions between oxidized ascorbic acid and glutamine. Carbonylprotein cross-linking may represent a common reaction in oxygen radical and glycosylation-related ageing processes. *Mechanisms of Ageing and Development,* ***62****,* 35-46.

Zigman, S. (1993). Ocular light damage. *Photochemistry and Photobiology,* ***57****,* 1060-1068.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Betül	**Soyadı**	Çatalgöl
Doğ.Yeri	Salihli	**Doğ.Tar.**	23.08.1981
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	47482568048
Email	betulcatalgol@gmail.com	**Tel**	0212 440 00 00 / 13567

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji ABD	2005
Lisans	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi	2003
Lise	Sekine Evren Anadolu Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırıma Görevlisi	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi, F.Toksikoloji ABD	2004-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	İyi	81,25	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı (2004)	65,211	63,605	61,999
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Word, Excel, Powerpoint	İyi
GraphPad Prism	İyi

Yayınları

1) Karademir Catalgol B, Ozden S, Alpertunga B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. Toxicol In Vitro. 2007 Dec; 21(8):1538-44.

2) Catalgol B, Grune T. Oxidized Proteins As a Biomarker of Oxidative Stress in Aging and Diseases. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2008; 28(Suppl): S141-S145.

3) Ozhan G, Catalgol B, Alpertunga B. Assessment of the genotoxic potential of surface waters using umu-assay. Fresenius Environmental Bulletin 2008; 12: 2071-2077.

4) Catalgol B, Grune T. Turnover of oxidatively modified proteins: the usage of in vitro and metabolic labeling. Free Radic Biol Med. 2009; 46(1): 8-13.

5) Jung T, Höhn A, Catalgol B, Grune T. Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys 2009; 483 (1): 127-135.

6) Jung T, Catalgol B, Grune T. The Proteasomal System. Mol Aspects Med. 2009; 30(4): 191-296.

7) Ozden S, Catalgol B, Gezginci-Oktayoglu S, Arda-Pirincci P, Bolkent S, Alpertunga B. Methiocarb Induced Oxidative Damage Following Subacute Exposure and the Protective Effects of Vitamin E and Taurine in Rats. Food Chem Toxicol. 2009; 47(7): 1676-1684.

8) Catalgol B, Ziaja I, Breusing N, Jung T, Höhn A, Alpertunga B, Schroeder P, Chondrogianni N, Gonos ES, Petropoulos I, Friguet B, Klotz LO, Krutmann J, Grune T. The proteasome is an integral part of solar ultraviolet A radiation-induced gene expression. J Biol Chem. 2009. Aug. 18.

9) Catalgol B, Grune T. Protein pool maintenance during oxidative stress. Curr. Pharm. Des. 2009; 15(26): 3043-3051.

Sözlü Tebliğleri

1. 24 Nisan 2008, The role of proteasome inhibition caused by protein aggregates during skin aging, Bratislava, Slovakya

2. 7 Temmuz 2008, Protein Oxidation and Proteasome Inhibition during UVA Irradiation, Berlin, Germany

3. 7 Kasım 2008, Critical role of proteasome inhibition and protective potential of vitamin C in UVA induced photoaging, Antalya, Turkey
4. 27 Ağustos 2009, SFRR Europe Meeting 2009, Chromatin repair after oxidative stress in HT22 hippocampal neurons: role of PARP-mediated proteasome activation, Roma, İtalya
5. 11 Eylül 2009, MÜ.Eczacılık Fakültesi ve Tıp Fakültesi Sempozyumu, Protein Oksidasyonu ve Yaşlanma, İstanbul

Sertifikaları

"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu" 11-12 Nisan 2005, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.

Ödülleri

1. TÜBİTAK, 2214 Yurt Dışı Araştırma Bursu
2. Antiaging ve Estetik Tıp Derneği Bilimsel Araştırma Ödülü