

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN
SİFİNGOLİPİD DÜZEYLERİ VE APOPTOTİK YOLAK
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Ebru AFŞAR

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

DOKTORA TEZİ

Ebru AFŞAR

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RETİNAL PİGMENT EPİTEL HÜCRELERİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN
SİFİNGOLİPİD DÜZEYLERİ VE APOPTOTİK YOLAK
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Ebru AFŞAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3040 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

ÖZET

Amaç: Endoplazmik retikulum (ER) stresi oluşturulan insan retinal pigment epitel hücrelerinde (ARPE 19) sfingolipid düzeylerini belirlemeyi ve apoptotik yolları incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Hücreler, ER stresi oluşturmak için tunikamisin (TM) ile muamele edildi ve sitotoksiteyi azaltmak için bir ER stres inhibitörü olan tauroursodeoksikolik asit (TUDCA) uygulandı. Hücre canlılığı MTT analizi ile ölçüldü. C16 – C24 sfingomyelin (SM) ve C16 – C24 seramid (CER) seviyeleri LC-MS / MS ile belirlendi. Glikozla düzenlenen protein 78-kd (GRP78) ve nükleer faktör kappa-b alt birim 1 (NFκB1) mRNA düzeyleri kantitatif PCR analizi ile GRP-78, NF-κB p65, cleaved kaspaz-3 ve kaspaz-12 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri immünfloresans mikroskopi yöntemiyle değerlendirildi. Seramid-1-fosfat (C1P) seviyeleri immunoassay ile belirlendi. Hücre lizatlarındaki kaspaz –3 ve –12 aktivitesi ise florometrik bir yöntemle ölçüldü.

Bulgular: Tunikamisin uygulanan hücrelerde ER stresinin varlığı, GRP78'in mRNA ve protein seviyelerinin önemli ölçüde artmış olması ile doğrulandı. Tunikamisin, kontrollere göre hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı. Tunikamisin ile birlikte TUDCA uygulaması, TM grubuna göre hücre canlılığını önemli ölçüde artırdı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında TM uygulanan hücrelerde C22 – C24 CER'ler, C1P, kaspaz-3, kaspaz-12, NFκB1 mRNA ve NF-κB p65 protein seviyelerinde önemli bir artış gözlemlendi. TUDCA'nın uygulanması, kaspaz-3 ve -12 aktivitesinde bir azalma ile birlikte GRP78 mRNA, NFκB1 mRNA, NF-κB p65 proteini, C22 – C24 CER'ler ve C1P seviyelerinde kısmi bir azalmaya yol açtı.

Sonuç: Çalışmanın sonuçları ER stresine maruz kalan retina hücrelerinde uzun zincirli CER ile C1P'nin arttığını ve apoptotik belirteçlerin varlığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sfingolipid, tunikamisin, retinal pigment epitel hücreleri

ABSTRACT

Objective: We aimed to determine sphingolipid levels and examine apoptotic pathways in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) undergoing endoplasmic reticulum (ER) stress.

Method: Cells were treated with tunicamycin (TM) to induce ER stress and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), an ER stress inhibitor, was administered to decrease cytotoxicity. Cell viability was measured by MTT assay. Levels of C16–C24 sphingomyelins (SM) and C16–C24 ceramides (CERs) were determined by LC-MS/MS. Glucose- regulated protein 78-kd (GRP78) and nuclear factor kappa-b subunit 1 (NFκB1) gene expressions were evaluated by quantitative PCR analysis, while GRP 78, NF-κB p65, cleaved caspase-3 and caspase-12 protein levels were assessed by immunofluorescence. Ceramide-1-phosphate (C1P) levels were determined by immunoassay, while caspase –3 and –12 activity in cell lysates were measured via a fluorometric method.

Results: Induction of ER stress in TM treated groups were confirmed by significantly increased mRNA and protein levels of GRP78. TM significantly decreased cell viability compared to controls. Treatment with TUDCA along with TM significantly increased cell viability compared to the TM group. A significant increase was observed in C22–C24 CERs, C1P, caspase-3, caspase-12, NFκB1 mRNA and NF-κB p65 protein levels in cells treated with TM compared to controls. Administration of TUDCA lead to a partial decrease in GRP78 expression, NFκB1 mRNA, NF-κB p65 protein, C22–C24 CERs and C1P levels along with a decrease in caspase-3 and -12 activity.

Conclusion: The results of this study reveal the presence of increased long chain CERs, C1P and apoptotic markers in retinal cells undergoing ER stress.

Key words: Sphingolipid, tunicamycin, retinal pigment epithelial cells

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Göz Küresinin Anatomisi	3
2.2. Retina Pigment Epitel Hücre Tabakasının Temel Görevleri	7
2.2.1. Görsel Siklüs ve A Vitamini Metabolizması	7
2.2.2. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport	8
2.2.3. Fotoreseptör Dış Segmentlerinin Fagositozu	9
2.2.4. Işığın Emilimi ve Fotooksidasyona Karşı Korunma	9
2.2.5. İmmün Fonksiyon, Büyüme Faktörleri ve Sitokinler	10
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi	11
2.4. Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptozis Yolakları	14
2.4.1. CHOP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein) İndüksiyonu	15
2.4.2. BCL2 Protein Ailesi	16
2.4.3. JNK Aktivasyonu	16
2.4.4. Kaspaz Aktivasyonu	16
2.5. Sfingolipidler	17
2.5.1. Sfingolipid Metabolizması	18
2.5.2. Sfingolipidlerin Apoptotik Fonksiyonu	22
3. MATERYAL METOD	25

4. BULGULAR.....	38
5. SONUÇ	47
6. TARTIŞMA.....	48
7. KAYNAKLAR	53
8. ÖZGEÇMİŞ	60



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3-1 Analiz Edilen Sfingolipidlerin Ana ve Ürün m/z Değerleri	32
Tablo 3-2 Real-time PCR analizi için kullanılan primerler ve probalar..	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Göz Küresinin Horizontal Kesiti	3
Şekil 2.2 Omurgalı Retinasının Şeması	5
Şekil 2.3 Gözün Anatomik Şeması	6
Şekil 2.4 Retinal Pigment Epitelinin Fizyolojik Görevlerinin Şematik Olarak Gösterimi.....	7
Şekil 2.5 Katlanmamış Protein Yanıtı	13
Şekil 2.6 Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apototik Mekanizmalar	15
Şekil 2.7 Sfingolipdlerin Yapısı.....	18
Şekil 2.8 Sfingolipidlerin Metabolizması.	20
Şekil 4.1 Hücre Canlılığının Analizi.....	39
Şekil 4.2 Nötral Sfingomyelinaz Aktivitesi ve Seramid 1-P Düzeyleri.....	42
Şekil 4.3 GRP78 ve NFkB Düzeyleri.	44
Şekil 4.4 ARPE 19 Hücrelerinde Kaspaz 3 ve Kaspaz 12 Aktivitesi..	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

All-trans-RE	All-trans-retinal ester
All-trans-RDH	Retinol dehidrojenaz enzimleri
AMD	Yaşa Bağımlı Maküler Dejenerasyon
A-SMaz	Asid SMaz
ATF4	Transkripsiyon aktifleştirici faktör 4
ATF6	Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BDGF	Beyin-kaynaklı büyüme faktörü
BRB	Kan-retina bariyeri
CER	Seramid
C1P	Seramid-1-fosfat
CNTF	Siliyer nörotrofik faktör
CHOP	CCAAT/ enhancer binding protein homologues protein
CSF	Koloni stimüle edici faktör
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER ilişkili protein yıkımını
ESI	Pozitif elektro-sprey-iyonizasyon
eIF2α	Ökaryotik başlama faktörü 2 alfa
FBS	Fetal bovine serum
GalCer	Galaktosilseramid
GlcCer	Glukozil seramid
GLUT	Kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcısı
GRP78	Glikozla düzenlenen protein 78-kd
GSL	Glikosfingolipid
HL-60	İnsan lösemi hücreleri
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü-I

IL-1α	İnterlökin 1-alfa
IL-1β	İnterlökin 1-beta
IRE1	Inositol gerektiren kinaz
JNK	c-jun NH2- terminal kinaz
LDL	Okside düşük dansiteli lipoprotein
LRAT	Lesitin-retinol açıl transferaz
LEDGF	Lens epitel türevi büyüme faktörü
LEDGF	Lens epiteli-kaynaklı büyüme faktörü
MII	Metarhodopsin II
NFκB1	Nükleer faktör kappa-b alt birim 1
N-SMaz	Nötral sfingomyelinaz
NT-3	Nörotropin-3
NGF	Sinir büyüme faktörü
11-cis-RAL	11-cis-retinal
PDGF	Trombosit türevli büyüme faktörü
PEDF	Pigment epitel türevi faktör
PERK	Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
PDGF	Platelet-kaynaklı büyüme faktörü
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPE	Retinal Pigment Epitel
SM	Sfingomyelin
SMaz	Sfingomyelinaz
S1P	Sfingozin 1 fosfat
SK	Sfingozin kinaz
TUDCA	Tauroursodeoksikolik asit
TGF-β	Transforming büyüme faktörü- β
TIMP	Matriks metalloproteaz doku inhibitörleri

TM	Tunikamisin
TNF	Tümör nekroz faktör
UDCA	Ursodeoksikolik asid
UPR	Katlanmamış protein cevabı
UFLC	Ultra hızlı sıvı kromatografisi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XBP	mRNA X-box bağlayıcı protein 1



1.GİRİŞ

Retinal pigment epitel (RPE) hücreleri nöral retinanın en dışında yer alan tek katlı hücre tabakasıdır ve retinal fonksiyonların sağlanması için önemlidir (Strauss 2005). İskemik ve hipoksik hasarın yanı sıra pek çok retinal hastalık RPE hücrelerini etkiler. Endoplazmik retikulum (ER) stresi ise RPE hücrelerinde çalışılan pro-apoptotik faktörler arasında yer alır (Kucuksayan, ve ark., 2014; Shimazawa, ve ark., 2007).

Endoplazmik retikulumun anahtar fonksiyonları arasında protein katlanması, olgunlaştırılması, taşınması, lipid sentezi ve intraselüler kalsiyum homeostasisinin sağlanması gelir (Fan ve Simmen 2019). Katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikerek kararsız protein homeostasisine yol açması ER stresi olarak tarif edilir. Hücreler ER stresini azaltmak ve protein homeostazisini yeniden sağlamak için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen adaptif bir sistemi başlatır. Fakat ER stres periyodunun uzaması UPR cevabının başarısız olarak apoptotik kaskadın aktifleşmesine yol açar (Lee ve ark., 2015). Katlanmamış protein cevabını pro-survival süreçten pro-apoptotik sürece yönlendiren temel mekanizma ise henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar ER stresi ve apoptotik hücre ölümünün retinal dejeneratif hastalıkların patogenezinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (Lenox ve ark., 2015). Apoptozis mekanizmasının altında yatan muhtemel mekanizmanın anlaşılması, retinal dejeneratif hastalıkların tedavisine ve önlenmesine yönelik yeni yaklaşımlar sunması açısından oldukça önemlidir (Fan ve Simmen 2019).

Edinilen bilgiler doğrultusunda ER stresi varlığında sifingomyelin metabolizmasında değişim olduğu ve seramid birikimi sonucunda apoptozisin meydana geldiği bilinmektedir (Burton ve ark., 1976; Lei ve ark., 2007). Seramid, serin ve palmitoil-CoA'nın birleşmesiyle de novo sentez ile veya sifingomyelinin sifingomyelinaz (SMaz) enzimiyle hidrolizi sonucunda oluşur (Sawai ve Hannun 1999). Hücresel stres cevabında sfingomyelinaz enzimleri arasında en çok asid ve nötral sifingomyelinaz (N-SMaz) enzimleri incelenmiştir. 2007 yılında yapılan bir çalışmada, ER stresi varlığında N-SMaz enziminin hem mRNA hem de protein seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Lei ve ark., 2007). Başka bir çalışmada ise N-SMaz enziminin ekspresyonunun artışının apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2010). Ancak henüz RPE hücrelerinde ER stresi varlığında

sfingomyelin/seramid metabolit düzeylerindeki değişimler ve apoptozise etkileri araştırılmamıştır.

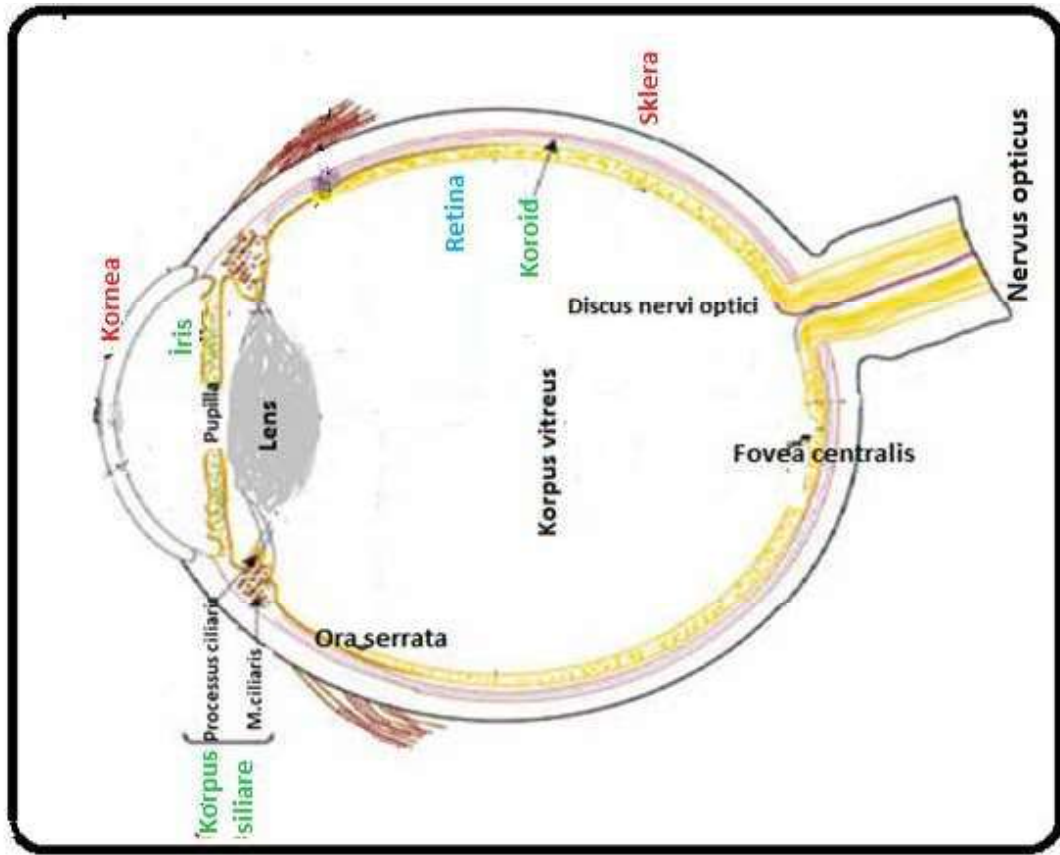
Çalışmamızda RPE hücre kültüründe oluşturulan ER stres modelinde sfingomyelin/seramid metabolitlerinin ölçülmesi ve apoptozisin değerlendirilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda 1) RPE hücrelerinde, ER stresi oluşturmak 2) Oluşturulan ER stresi sonrasında RPE hücrelerinde ve kontrol gruplarında sfingomyelin/seramid metabolitlerini ölçmek ve apoptozisi değerlendirmek 3) ER stresi inhibisyonunun RPE hücre kültürlerinde sfingomyelin/seramid metabolitlerine ve apoptotik yollara etkisini değerlendirmek hedeflendi.

Çalışmamızdan çıkan sonuçlar değerlendirilerek insan RPE hücrelerinde ER stresinin SMaz/seramid yolağına etkileri incelendi. Bu anlamda çalışmamız insan RPE hücrelerinde ER stresinin SMaz/seramid yolağına etkilerini ve TUDCA'nın bu yolak üzerindeki tedavi edici etkisini inceleyen ilk araştırmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz Küresinin Anatomisi

Göz, kafatasında orbitalar içine yerleşmiş, küre şeklinde ve ışığa duyarlı (fotosensitif) bir organdır. Göz küresinin (Bulbus oculi) erişkinlerde ön-arka çap uzunluğu 21-26 mm, ortalama ağırlığı 7-9 gram, ortalama hacmi ise 7 cc kadardır. Göz küresinin sadece ön yüzü dış ortam ile temas halindedir (Toprak, 1998). Göz küresi dıştan içe doğru Tunica fibrosa bulbi, Tunica vasculosa bulbi ve Tunica interna bulbi olmak üzere üç tabakadan oluşur (Malkoç, 2006; Toprak, 1998).



Şekil 2.1 Göz Küresinin Horizontal Kesiti (Malkoç, 2006).

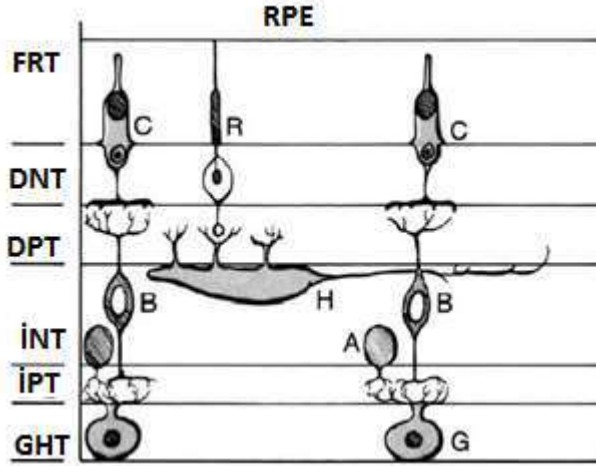
Tunica Fibrosa Bulbi (Korneo-Skleral Tabaka): Korneo-skleral tabaka göz küresinin kornea ve sklera'dan oluşan tabakasıdır. Sklera, omurgalı gözünün en dışta bulunan koruyucu tabakasıdır. Kollajen liflerden zengin, beyaz renkli, kalın ve oldukça dayanıklı bir tabakadır. Sklera, içte arka tarafta koroid, önde korpüs siliare ile komşuluk yapar önünde bulunan açıklığa ise kornea yerleşmiştir. Korneanın saydam ve çıkıntılı bir yapısı vardır. Göze gelen ışığın ilk ve en çok kırıldığı bölge burasıdır.

Tunica Vasculosa Bulbi (Vasküler Tabaka): Retina ile sklera arasına yerleşmiş damarsal tabakadır. Arkadan öne doğru sırasıyla koroid, korpus siliare ve iris'ten oluşan kesintisiz bir yapı gösterir. Koroid, büyük ölçüde yoğun kapiller pleksuslardan oluşmuş kan damarı içeren pigmentli bir tabakadır ve göz küresinin arka yüzünü tamamen kaplar. Korpus siliare, koroid ile iris arasında yer alır. Aköz humor üretimini ve akomodasyonu sağlar. İris ise kornea'nın arkasında, lens ve korpus siliare'nin önünde yer alır. İris, gözün dıştan renkli olarak görülen kısmı olmakla birlikte göze giren ışık miktarını kontrol eden pupilla'nın çevresindeki ayarlanabilir diyaframdır.

Tunica Interna Bulbi (Nöral Tabaka): Nöral tabaka ya da diğer adıyla retina, göz küresinin en içte bulunan nöral, duyuşal ve ışığa en duyarlı tabakasıdır. Bu tabakanın dış tarafında koroid, iç tarafında ise korpus vitreum membranı bulunur. Retina, stratum pigmentosum ve stratum nervosum olmak üzere iki tabakadan oluşur. Stratum pigmentosum retinanın dış tabakasıdır. Retinanın iç yüzünde korpus siliare'nin arka kenarını çevreleyen girintili çıkıntılı çizgiye ora serrata denir. Stratum nervosum, stratum pigmentosum'un iç yüzünde discus nervi optici'den ora serrata'ya kadar uzanır. Duyusal retina olarak da adlandırılan retinanın bu bölümünde ışığı algılayan çubuk ve koni hücreleri bulunur. Retinaya düşen ışık, bu fotoreseptör hücrelerde sinir sinyaline çevrilir. Oluşan impuls nöron zinciri ile nervus opticus vasıtasıyla beyne iletilir (Malkoç, 2006).

Retinanın histolojik olarak enine kesitinde içten dışa doğru on tabaka vardır (**şekil 2.2**).

1. İç sınırlayıcı membran
2. Sinir lifi tabakası
3. Ganglion hücre tabakası
4. İç pleksiform tabaka
5. İç nükleer tabaka
6. Dış pleksiform tabaka
7. Dış nükleer tabaka
8. Dış sınırlayıcı membran
9. Fotoreseptör tabaka
10. Pigment epitel tabakası (Douglas, 1984; Ganong, 1995; Gartner, 2001; Guyton, 2000; Murphy, 1993; Schaeffer, 1953).



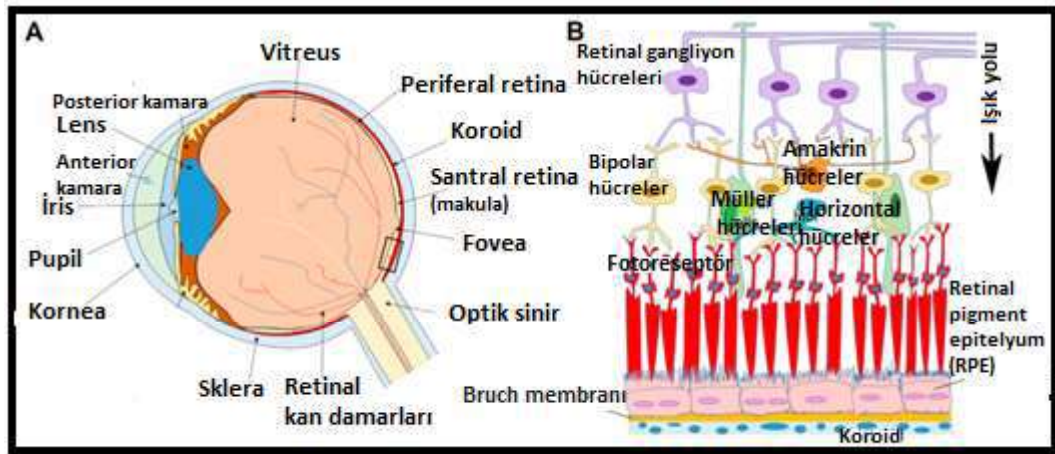
Şekil 2.2 Omurgalı Retinasının Şeması (Hejtmancik ve Nickerson 2015). **RPE**: Retinal pigment epiteli tabakası; **FRT**: Fotoreseptör tabaka; **DNT**: Dış nükleer tabaka; **DPT**: Dış pleksiform tabaka; **İNT**: İç nükleer tabaka; **İPT**: İç pleksiform tabaka; **GHT**: Ganglion hücre tabakası; **K**: Koni hücreleri; **Ç**: Çubuk hücreleri; **B**: Bipolar hücreler; **H**: Horizontal Hücreler; **A**: Amakrin hücreler; **G**: Ganglion hücreler

1. **İç Sınırlayıcı Membran:** İç sınırlayıcı membran, müller hücrelerinin uzantılarından meydana gelir. Retina ile korpus vitreus'u birbirinden ayırır.
2. **Sinir Lifi Tabakası:** Multipolar ganglion hücrelerinin aksonları tarafından meydana gelir. Ganglion hücrelerinin aksonları sklera'yı delerek retina'nın iç yüzünde nervus opticus'u oluşturur.
3. **Ganglion Hücre Tabakası:** Tek katlı büyük multipolar ganglion hücre nükleuslarından oluşur.
4. **İç Pleksiform Tabaka:** İç pleksiform tabaka, sinaptik bir tabakadır. Bipolar hücrelerin aksonları, ganglion hücrelerinin dendritleri ve amakrin hücrelerinin uzantıları bulunur.
5. **İç Nükleer Tabaka:** Bu tabakada bipolar, amakrin ve horizontal hücrelerin çekirdekleri ile destek hücreleri olan müller hücreleri bulunur. En dış kısımda horizontal hücreler, ortada bipolar hücreler, en iç kısımda amakrin hücreler vardır. Merkezinde ise Müller hücre nükleusları bulunur.
6. **Dış Pleksiform Tabaka:** Bu tabakada koni ve çubuk hücrelerinin aksonları ile bipolar hücre nöronların dendritleri arasında oluşan sinapslar vardır. Bu nedenle retinanın 1. sinaptik tabakasıdır. Ayrıca içinde amakrin ve horizontal hücrelerin uzantıları da bulunur.
7. **Dış Nükleer Tabaka:** Koni ve çubuk hücrelerinin hücre çekirdekleri ve hücre gövdeleri tarafından meydana gelmiştir.

8. Dış Sınırlayıcı Membran: Gerçek bir membran değildir. Müller hücrelerinin dış uzantıları ile koni ve çubuk hücrelerinin iç segmentleri arasındaki zonula adherens'lerin meydana getirdikleri bir tabakadır.

9. Fotoreseptör Tabaka: Bu tabaka koni ve çubuk hücrelerinin periferik uzantılarından oluşur. Bu hücreler görme yollarının 1. nöronudur (Malkoç).

10. Pigment Epiteli Tabakası: Retinal pigment epitel (RPE) hücre tabakası, nöral retinanın en dış tabakasını oluşturur (Strauss, 2005) (**şekil 2.3**). Koryokapillaris ile retinanın fotoreseptörleri arasına tek bir tabaka oluşturacak şekilde (Song ve ark., 2012) Discus nervi optici'den ora serrata'ya kadar uzanır. Ora serrata'da korpus siliare'nin epitel ile devam eder (Malkoç, 2006). Retinal pigment epitel hücreleri 4-8 kenarlı poligonal hücreler şeklinde bulunur ancak bulundukları yere göre şekilleri değişiklik gösterebilir. Maküla bölgesinde bulunan RPE hücreleri daha uzun ve inceyken periferde bulunan RPE hücreleri nispeten daha kısa ve geniştir (Bron, 1997).



Şekil 2.3 A) Gözün Anatomik Şeması B) Retinal Hücreler (Keeling ve ark., 2018)

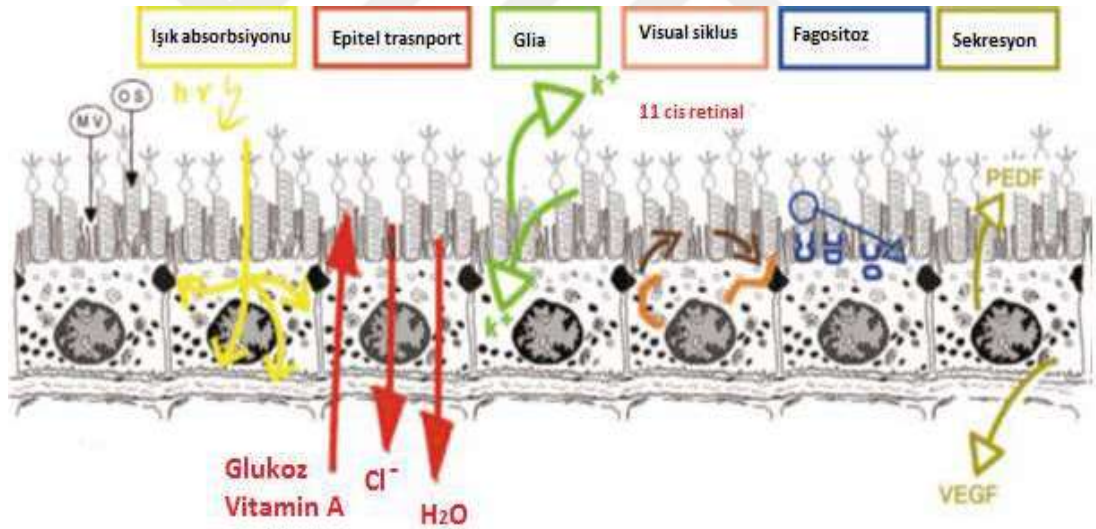
Retinal pigment epitel hücreleri ve retinal kapillere ait vasküler endotelial hücreleri birlikte kan-retina bariyerini (BRB) oluşturur (Nowak-Sliwinska ve ark., 2013). Retinal pigment epitel hücrelerinin bazal membranı, koroidin Bruch membranına sıkı bir şekilde yapışık olarak bulunur (Bron, 1997.; Panda-Jonas ve ark., 1996; Thumann G, 2006). Apeksi ise fotoreseptör hücreler arasına 5-7 µm uzunluğunda mikrovillus şeklinde uzantılar verir (Malkoç, 2006). Bu villüsler fotoreseptörlerin dış segmentleri iç içe geçme şeklindeki bağlantılar oluşturur. Bu yapılanma duysal nöronlar için fiziksel bir koruma oluşturduğu gibi retina ve RPE arasındaki yapışıklığın

sürdürülmesinde önemli etkindir (Bron 1997.; Panda-Jonas ve ark., 1996; Schmidt ve Peisch, 1986; Thumann G, 2006).

2.2. Retina Pigment Epitel Hücresi Tabakasının Temel Görevleri

RPE hücreleri görme sisteminin bütünlüğünün korunmasında çok sayıda önemli göreve sahiptir (**şekil 2.4**). Retina pigment epitel hücre tabakasının temel görevleri ise şunlardır :

- 1- Vizüel siklus için gerekli olan A vitamininin metabolizması,
- 2- Işığın emilimi ve ışığın oluşturduğu oksidasyona karşı korunma,
- 3- Su, iyon ve besinlerin transportu,
- 4- Fotoresptör dış segmentlerinin fagositozu,
- 5- Sitokin ve büyüme faktörlerinin salınması,
- 6- Retinanın pigment epitel hücrelerine yapışık kalmasının sağlanması,
- 7- Lokal immün cevabın düzenlenmesi (Strauss, 2005).



Şekil 2.4 Retinal Pigment Epitelinin Fizyolojik Görevlerinin Şematik Olarak Gösterilmesi. VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, PEDF: Pigment Epitel Kaynaklı Büyüme Faktörü (Strauss, 2005).

2.2.1. Görsel Siklus ve A Vitamini Metabolizması

Retinada görsel siklus fotoreseptörler ve RPE hücreleri arasında retinoidlerin yer değiştirmesiyle sağlanır. Fotoresptör hücrelerde bulunan opsin proteini 11-cis-retinal (11-cis-RAL) ile bağlanarak rodopsini oluşturur. 11-cis-retinal, vitamin A'nın ışığa oldukça duyarlı bir analogudur ve ışık ile aktive olduğunda all-trans-RAL'e izomerize olur. Rodopsin molekülü ise konformasyonel değişiklikler geçirerek metarhodopsin II'e (MII) dönüşür. Böylece görsel transdüksiyon kaskadına yol açan

reaksiyonlar tetiklenmiş olur. Ardından metarhodopsin II deaktive olarak apo-opsin ve all-trans-RAL molekülüne ayrılır. All-trans-RAL, all-trans retinol dehidrojenaz enzimi (all-trans-RDH) ile alkole (all-trans-ROL) indirgenir ve çubuk hücre dışına çıkar. Retinal pigment epitel hücresi tarafından endositoz ile hücre içine alınan all-trans-ROL, burada lesitin-retinol açıl transferaz (LRAT) ile esterlenerek all-trans-retinal ester (all-trans-RE) formuna dönüşür. Rpe65 enzimi, all-trans-retinal esterlerin hem trans-cis transizomerizasyonunu hem de hidrolizini gerçekleştirir ve all-trans-RE'den 11-cis-ROL elde edilmesini sağlar. Bu molekül ise, 11-cis-retinol dehidrojenaz (RDH) enzimi ile 11-cis-RAL'ye oksitlenerek RPE'den ayrılarak çubuk hücreye tekrar girer ve döngüyü tamamlamak için apo-opsin ile birleşir (İnan, 2011; Nowak-Sliwinska ve ark., 2013).

2.2.2. Kan-Retina Bariyeri ve Transepitelial Transport

Retinal pigment epitel hücreleri ve retinal kapillere ait vasküler endotelyal hücreleri birlikte kan-retina bariyerini (BRB) oluşturur (Nowak-Sliwinska ve ark., 2013). RPE hücreleri arasındaki sıkı kavşak bağlantılarının (zonula adherens, gap junctions ve zonula okludens) oluşturduğu paraselüler direnç, transselüler dirençten 10 kat daha yüksektir. Bu nedenle hücreler arası sıvı difüzyonu engellenir ve molekülerin yer değişimi bizzat RPE hücrelerinin içinden geçerek sağlanır. Bu sayede RPE hücreleri, koroidal kapiller ve dış retina katları arasındaki sıvı ve molekül alışverişini kontrol eder (Strauss, 2005). Nöron ve fotoreseptörlerde metabolik turnover sonucu fazla miktarda su oluşur. Su, müller hücreleri ile retinadan subretinal aralığa transfer edilir. Retinal pigment epitel hücreleri ise suyu ve iyonları subretinal boşluktan kana taşır. Retinal pigment epitel hücreleri içinden Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , ve HCO_3^- gibi birçok iyonun aktif tansport ile taşındığı bilinmektedir. Suyun subretinal alandan sürekli olarak uzaklaştırılması, retina ve RPE arasında, bir yapışma kuvveti meydana getirir. Göz içi basıncının sürdürülmesi ve retinanın RPE hücrelerine yapışık kalması için retina ve koryopakularis arasındaki su ve katabolit hareketi çok önemlidir. Metabolik son ürünlerin fotoreseptörlerden uzaklaştırılmasından RPE hücreleri sorumludur. Fotoreseptör dış segmentlerinde üretilen laktik asitin en önemli metabolik son ürün olduğu düşünülmektedir. Fotoreseptör hücrelerden subretinal boşluğa salınan laktik asit RPE hücreleri tarafından alınarak koroidin içine salınır. Retinal pigment epitel hücreleri bir yönde, elektrolitleri ve suyu subretinal boşluktan koroid içine taşırken diğer yönde, kan şekeri ve diğer besin maddelerini kandan fotoreseptörlere taşır.

Glikozun taşınması için, RPE hem apikal hem de bazolateral membranlarda yüksek miktarda glikoz taşıyıcıları içerir. Hem kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcısı (GLUT) 1 hem de GLUT3 RPE'de yüksek oranda bulunduğu bilinmektedir (Strauss, 2005).

2.2.3. Fotoreseptör Dış Segmentlerinin Fagositozu

Retinal pigment epitel hücrelerinin fotoreseptör dış segmentlerini fagosit etmesi belki de RPE'nin en önemli fonksiyonudur. Fotoreseptörlerin sürekli olarak yenilenmesi gerekir. Bu nedenle dış segmentler distal uçtan dökülerek RPE hücresi içine alınır ve fagolizozom içinde hapsedilirler. Dış segmentler fagolizozom içinde hidrolize edilerek küçük moleküllere ayrılırlar. Bu küçük moleküller daha sonra hücre içine dağılarak tekrar kullanılırlar. Sindirilemeyen materyaller ise hücre içinde birikerek lipofuksin granüllerini oluşturur (Bibb ve Young 1974; Bosch ve ark., 1993; Hargrave, 2001). Bir fotoreseptörün dış segmentinin her gün %10'unu fagosit edilmektedir. RPE hücreleri her gün en az 100 fotoreseptörden dökülen dış segment parçasını fagosit eder. Bu da bir RPE hücresinin bir günde yaklaşık 10 adet fotoreseptörün tüm dış segmentlerine karşılık gelen miktarı sindirdiği anlamına gelir (Bosch ve ark., 1993; Liversidge ve ark., 1996; Streilein ve ark., 2002).

2.2.4. Işığın Emilimi ve Fotooksidasyona Karşı Korunma

Retinal pigment epitel hücreleri göz küresinin iç yüzeyini kaplar ve pigmentli yapısı sayesinde koyu renkli bir duvar oluşturur. Böylece dağılmış ışığın soğurulmasına yardımcı olarak optik kaliteyi artırır. Işık göze pupilla yoluyla girer ve mercek tarafından makula lutea üzerinde odaklanması sağlanır. Bu da ışık enerjisinin retina üzerinde yoğunlaşmasını sağlar. Dış retina oksijen bakımından zengin bir ortama maruz kalır. Koriokapillerin kan perfüzyonu 1.400 ml dak⁻¹ x 100 g doku⁻¹ 'dir. Bu oran böbrek perfüzyonundan bile daha yüksektir. Koriokapiller kaynaklı venöz kanın O₂ saturasyonu % 90'dır. Retinanın, kan dolu bir damar yatağı gibi işlev gören koriokapiller üzerinde yerleştiği düşünülürse foto-oksidasyon ve oksidatif hasar için ideal olduğu görülmektedir. Ayrıca retinada oksijen tüketimi fazla olduğundan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu da oldukça fazladır. RPE hücreleri üç ayrı savunma mekanizması ile oluşan bu oksidatif stresin dengelenmesinde önemli rol oynar. Bunlardan birincisi ışığın emilmesi ve filtrelenmesidir. Bu amaç için RPE, farklı dalga boylarına ve bazı dalga boyuna bağlı risklere özelleşmiş melanin ve lipofuscin gibi değişik pigmentleri barındırır. Genel ışık Emilimi, melanozomlardaki melanin ile sağlanır (Strauss, 2005). Fotoreseptörlerde bulunan mavi ışığı emen

pigmentler bir çeşit biyolojik güneş gözlüğü oluşturur ve melaninin ışık Emilimini destekler. Mavi ışık yetişkin gözündeki RPE hücreleri için en tehlikeli olan dalga boyu gibi görünmektedir. Bununla birlikte, melanozomlar ve mavi ışık emici pigmentler sadece ışık enerjisinin % 60'ının Emilmesinden sorumludur. Bu diğer pigmentlerin olduğunu ima eder. Bu pigmentlerden biri lipofuscin olabilir. Lipofuscin, ışık emici pigment olarak öncelikle görsel işlev için faydalı olabilir. Ancak yaşlı gözde, konsantrasyonunun RPE için toksik bir konsantrasyona ulaştığı görülmektedir.

Savunma sistemlerinden ikincisi antioksidasyon işlemidir. RPE hücrelerinde enzimatik antioksidasyonu sağlayan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri olarak yüksek oranda bulunur. Enzimatik olmayan antioksidan olarak ise RPE hücrelerinde lutein ve zeksantin, askorbat, α -tokoferol, β -karoten gibi karotenoidler bulunur. İlâveten, glutatyon ve melaninde antioksidan savunma sistemine önemli katkıda bulunur. Üçüncü savunma hattı, hücrenin hasarlı DNA, lipid ve proteinleri tamir etmedeki fizyolojik yeteneğidir (Strauss, 2005).

2.2.5. İmmün Fonksiyon, Büyüme Faktörleri ve Sitokinler

Retinal pigment epitel hücrelerinin sistemik dolaşım ile nöral retina arasında kritik bir ara yüzeye yerleşmiş olması lokal immün cevabın düzenlenmesinde kısmen bir rolü olabileceğini düşündürmüştür. Retinal pigment epitel hücrelerinin immünoşüpresif fonksiyonuna işaret eden birkaç kanıt vardır. Buna göre RPE hücreleri, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu baskılayabilir ve Jurkat T-hücre hattında apoptozisi indükleyebilir. Fiziksel olarak RPE, Bruch membranı ile kan dolaşımından ayrıldığından, bu immünoşüpresif etkilerin, kan hücreleriyle doğrudan etkileşime girmekten ziyade çözünebilir faktörlerin salgılanmasıyla olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, kan hücreleri ve RPE arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır (Strauss, 2005). RPE hücrelerinin fizyolojik ve patolojik koşullar altında pek çok büyüme faktörü ve sitokin salgıladığı bilinmektedir. RPE hücreleri tarafından salgılandığı bilinen faktörlerden bazıları şunlardır: Pigment epiteli kaynaklı faktör (PEDF), endotelial büyüme faktörü (VEGF) insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-kaynaklı büyüme faktörü (BDGF), nörotropin-3 (NT-3), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), lens epiteli-kaynaklı büyüme faktörü (LEDGF), koloni stimüle edici faktör (CSF), matriks metalloproteaz doku inhibitörleri (TIMP). Bu

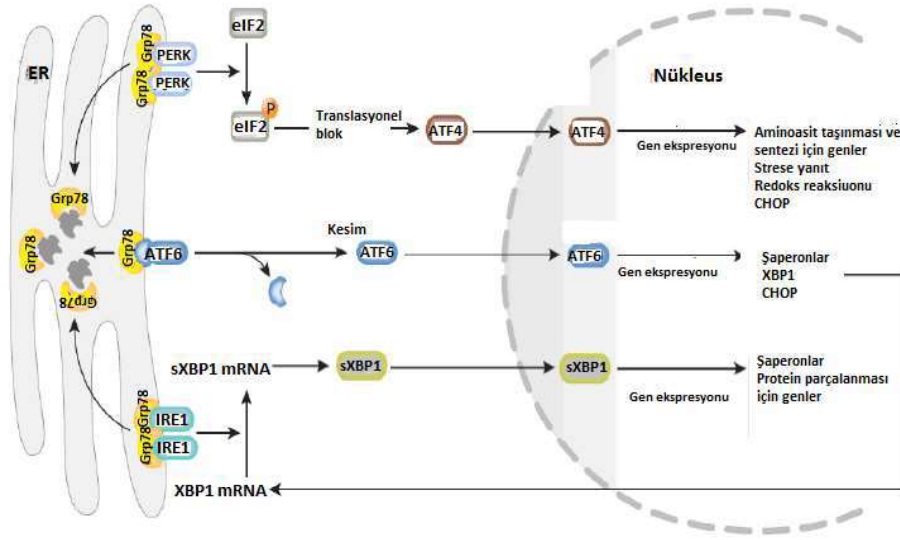
faktörler arasında PEDF ve vasküler endotelial büyüme faktörü en önemlileri olarak kabul edilmektedir. Pigment epitel kaynaklı faktörün glutamat veya hipoksi aracılı apoptozise karşı nöronları korumasından dolayı nöroprotektif olarak; endotelial hücre proliferasyonunu inhibe ettiği için anti-anjiyogenik faktör olarak görev yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca retina ve koryokapillarisin yapısal bütünlüğünün sürdürülmesine katkı sağlar. Vasküler endotelial büyüme faktörü, endotelial hücre apoptozisini önleyerek koryokapillarisin sağlam bir endotele sahip olmasını sağlar. Sağlıklı bir gözde PEDF ve VEGF pigment epitelinin zıt yönlerinden sekrete edilir. Pigment epitel kaynaklı faktör, RPE hücrelerinin apikal yüzeyinden sekrete edilerek nöronlar ve fotoreseptörler üzerinde etki eder. Vasküler endotelial büyüme faktörü ise büyük oranda RPE hücresinin bazal yüzeyinden sekrete edilir ve koroidal endotel üzerinde etkisini gösterir. Bu faktörler arasındaki denge anjiyogenik göz hastalıklarının gelişimi açısından çok önemlidir (Strauss, 2005).

Pek çok retinal hastalığın RPE hücrelerini etkileyerek hasar verdiği bilinmektedir (Mettu ve ark., 2012). Apoptozis, RPE hücrelerinde sıklıkla görülen bir ölüm tipidir. (Jing ve ark., 2012). Endoplazmik Retikulum stresi, RPE hücrelerinde çalışılan pro-apoptotik faktörler arasında yer alır (Kucuksayan ve ark., 2014).

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum, ökaryotlarda lipid sentezi, hücre içi kalsiyum homeostazisi ve protein katlanması düzenlendiği (Schroder ve Kaufman 2005a) membranöz ağ yapısında bir organeldir. Membran yapısına katılan proteinler ile hücre dışına gönderilecek proteinlerin sentezi ER’de gerçekleştirilir (Szegezdi ve ark., 2006). Yeni sentezlenmiş proteinler ER’ye gelerek burada N-glikozilasyon, disülfid oluşumu, hidroksilasyon, oligomerizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarına uğradıktan sonra katlanırlar (Tu ve ark., 2000). Eğer proteinlerin katlanmasında bir yanlışlık oldu ise yanlış katlanan proteinler ER tarafından düzeltilmeye çalışılır ancak düzeltilemezse bu proteinler yıkıma gönderilir (Schroder ve Kaufman 2005b). Bununla birlikte, Endoplazmik retikulum fonksiyon kapasitesinin fizyolojik veya patolojik durumlarda aşılması halinde ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi olur. Bu durum Endoplazmik retikulum stresi (ER Stresi) olarak tanımlanır (Rutkowski ve Kaufman 2004). Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi hücreler için toksik etkiye sahiptir. Bu nedenle, hücrenin stresi hissederek stresi azaltması gerekir. Bu nedenle hücreler ER stresinin

etkileriyle mücadele etmek için Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR, Unfolded protein response) olarak adlandırılan bir kaskadı kullanır (Kaufman 2002; Szegezdi ve ark., 2006). Öncelikle UPR kaskad tarafından hücrede proteinlerin birikimi azaltılarak ER işlevlerinin düzenlenmesi ve hücre yaşamının devam ettirilmesi sağlanmaya çalışılır (Kaufman, 2002; Lee, 2007). Ancak adaptasyon sağlanamazsa ve protein birikimi devam ederse UPR yanıtı tarafından hücre apoptozise yönlendirilir (Kaufman 2002; Szegezdi ve ark., 2006). Katlanmamış protein yanıtı, üç temel stratejiyle ER stresini azaltarak protein homeostazını düzenler. Bunlardan birincisi, protein translasyonunu baskılayarak daha fazla katlanmamış protein oluşumunu durdurmak; ikincisi, katlanmamış proteinleri tekrar katlayan ER ile ilişkili moleküler şaperonları uyarmak; üçüncüsü katlanmamış proteinleri ortadan kaldırmaya yarayan ER ilişkili protein yıkımını (ER associated protein degradation ERAD system) aktif hale getirmektir (Jing ve ark., 2012). Katlanmamış protein yanıtının aktivasyonu, Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve Inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) olarak adlandırılan 3 farklı integral membran proteini tarafından düzenlenir (şekil 2.5). Endoplazmik retikulum stresi oluşmamış hücrelerde, PERK, IRE1 ve ATF6, Glukozla düzenlenen protein 78 (Grp78) ile bağlı olarak ve inaktif halde bulunur (Bertolotti ve ark., 2000; Liu ve ark., 2000; Naidoo 2009; Ng, ve ark., 1992). Stresle karşılaştığı zaman Grp78 lümene protein katlanmasına yardımcı olması için gönderilir (Kaufman, 2002; Naidoo, 2009; Yoshida ve ark., 2001; Zhang ve Kaufman 2008).



Şekil 2.5 Katlanmamış Protein Yanıtı (Seydel, 2012). **PERK**, Protein Kinaz RNA Benzeri ER Kinaz; **IRE1**, Inositol gerektiren kinaz 1; **ATF6**, Aktive edici transkripsiyon faktörü 6; **Grp78**, Glukozla düzenlenen protein 78; **(eIF)2α**, ökaryotik başlama faktörü 2; **XBP1**, X-box bağlayıcı protein 1.

Glukozla düzenlenen protein 78 (Grp78), 78 kDa ağırlığında monomerik veya dimerik formda bulunan bir proteindir. Oligomerik formu depo şeklidir. Monomerik formu ise şaperon görevi görür (Little ve ark., 1994). Endoplazmik retikulum membranında bulunan PERK, GRP-78 ve CCAAT/ enhancer binding protein homologues protein (CHOP) hücrede UPR cevabının oluştuğunu gösteren belirteçlerdir (Harding ve ark., 1999).

2.3.1. Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz (PERK) Sinyal Yolu

Protein kinaz RNA benzeri ER kinaz, ER membranında yerleşmiş Tip I transmembran serin treonin kinazdır. Normal şartlar altında Grp78 ile birlikte, inaktif ve monomerik halde bulunur (Schroder ve Kaufman 2005b; Zhang ve Kaufman 2008). Endoplazmik retikulum kapasitesini aşan bir yükü veya stresle karşılaştığı zaman, PERK ile birlikte bulunan Grp78 ayrılır ve protein katlanmasına yardımcı olması için lümene gönderilir, PERK ise homodimerize olarak fosforillenir. Fosforile PERK, PERK'in aktif formudur ve ökaryotik başlama faktörü (eIF)2α'yı fosforilleyerek genel translasyonun durdurulmasını sağlar (Kaufman, 2002). Translasyonun inhibe olması sonucu kısa ömürlü proteinler hücreden temizlenir (Harding ve ark., 1999; Kaufman 1999; Scheuner ve ark., 2001). Böylece PERK aktivasyonu ile hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış proteinlerin düzeltilmesi sağlanmış olur (Rasheva ve Domingos 2009; Szegezdi ve ark., 2006).

Ancak transkripsiyon aktifleştirici faktör 4 (ATF4) gibi mRNA'ların translasyonu devam ederek miktarları artar (Rasheva and Domingos 2009; Szegezdi, et al. 2006). Transkripsiyonu süren ATF4, bZIP ailesinine ait bir transkripsiyon faktörüdür (Xu ve ark., 2005) ve nükleusa girdikten sonra aminoasitlerin taşınması, glutatyon sentezi, oksidatif stres direncinde rol alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Rasheva ve Domingos 2009). Ayrıca ATF4 tarafından transkripsiyonel olarak aktive olan C/EBP homolog protein (CHOP), hücre ölümünü teşvik eden bir apoptozis sinyalidir (Szegezdi ve ark., 2006).

2.3.2. Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) Sinyal Yolu

Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), hücrede ER stresi olmadığında, ER membranında Grp78 ile birlikte inaktif halde bulunur. Stres durumunda Grp78'in ayrılmasından sonra, ATF6 golgiye taşınarak site 1 ve site 2 proteazlar ile sırasıyla kesilir ve aktifleştirilir. Aktive edici transkripsiyon faktörü 6, aktifleştikten sonra nükleusa taşınır ve burada hedef genlerin aktivasyonunu sağlayarak Grp78, Grp94 gibi ER şaperonlarının ekspresyonunu artırılmasını sağlar. Böylece, ER katlama kapasitesi yükselir ve strese karşı korunma sağlanmaya çalışılır (Naidoo, 2009; Yoshida ve ark., 2001; Zhang ve Kaufman, 2008).

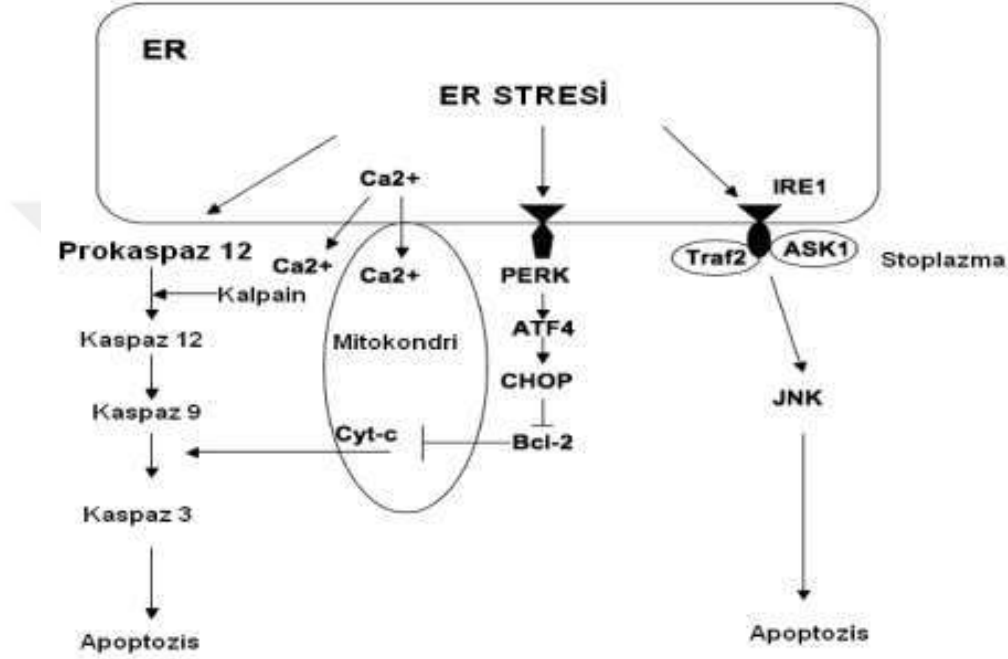
2.3.3. İnositol Gerektiren Kinaz 1 (IRE1) Sinyal Yolu

İnositol gerektiren kinaz 1 (IRE1), çift aktiviteli bir enzim ve tip I transmembran proteinidir (Szegezdi ve ark., 2006). Sitoplazmik bölümü endoribonükleaz ve kinaz aktivitesine sahiptir. Lümen bakan bölümü ise PERK ile benzer şekilde dimerizasyon gösterir (Ron, 2002). Diğer UPR yollarında olduğu gibi Grp 78 ile beraber inaktif halde bulunur. Endoplazmik retikulum stresi sırasında Grp78'in ayrılmasıyla dimerize olur ve otofosforillenir. Aktifşelen IRE1, RNAaz aktivitesi kazanır. Aktif IRE1 mRNA X-box bağlayıcı protein 1 (XBP) den 26 nükleotid uzaklaştırır. Kırılmış XBP1 mRNA translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşür. Böylece ER şaperonlarının ve katlanmaya yardımcı olan enzimlerin ekspresyonunu artırır (Liu ve ark., 2000).

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptozis Yolları

Endoplazmik retikulum stresinin uzun sürdüğü durumlarda, UPR'nin aktivasyonu ER stresine baş etmek için yetersiz kalır. Böyle bir durumda ER stresi apoptozise (programlı hücre ölümü) yol açar (Rasheva ve Domingos, 2009). Protein kinaz RNA

benzeri ER kinaz, ATF6 ve IRE1 sinyal yolları sadece hücre yaşamını destekleyen yolları başlattıkları gibi aynı zamanda apoptozis yollarını da uyarırlar (Rasheva ve Domingos, 2009) ancak direk olarak hücre ölümüne yol açmazlar. Apoptotik etkilerini çeşitli downstream moleküllerinin, transkripsiyon faktörlerinin, BCL2 ailesinin üyelerinin, kinazların (JNK) ve kaspazların aracılık ettiği hücre ölüm yollarını aktive ederek gösterirler (Xu ve ark., 2005) (şekil 2.6).



Şekil 2.6 Endoplazmik Retikulum Stresiyle İndüklenen Apoptotik Mekanizmalar (Seydel, 2012)

2.4.1. CHOP (CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) Homolog Protein) İndüksiyonu

Transkripsiyon faktörü CHOP, hücrede dinlenme durumunda çok düşük seviyelerde eksprese edilir. Endoplazmik retikulum stresi durumunda ise ekspresyonu artar. Endoplazmik retikulum membranında yer alan PERK, ATF6 ve IRE-1, CHOP transkripsiyonunu aktifleştirebilir. Ancak PERK-eIF2a- ATF4 yolunun aktivasyonunda CHOP için gereklidir. Endoplazmik retikulum stresinin erken döneminde PERK sinyal yolunun aktivasyonu protein sentezinin inhibe ederek hücre yaşamını düzenlemeye çalışır ancak ER stresinin daha ileri aşamasında, PERK-eIF2a- ATF4 yolu CHOP'un ekspresyonunu indükler ve apoptozisi düzenler.

2.4.2. BCL2 Protein Ailesi

BCL2 protein ailesinin üyeleri (BCL2, BAX, BAK, BIK), mitokondriyal aracılı apoptoziste olduğu gibi ER stresıyla uyarılan apoptozistede hücre ölümünün düzenlenleyicisi olarak önemlidir. Endoplazmik retikulum stresıyla indüklenen apoptoziste BCL2 ailesinin üyeleri olan BAX ve BAK iki yolla etki eder. Birinci yol; ER stresı sırasında BAX ve BAK, ER membranında konformasyonel değişiklikler geçirir ve oligomerize olur ve ER'den stoplazmaya Ca^{+2} 'un salınmasına yol açar. Sitozolde Ca^{+2} konsantrasyonunun artması kalpaini aktive eder. Aktif kalpain prokaspaz 12'yi keserek aktive eder. Aktif kaspaz 12'de prokaspaz 9'u keser ve aktive eder böylece kaspaz kaskadı aktiflenmiş olur. İkinci yolda ise mitokondrinin sitozolik Ca^{+2} 'u alması mitokondriyal iç membran depolarizasyonuna ve sitokrom C salınımına yol açar. Bu da kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur.

2.4.3. JNK Aktivasyonu

Endoplazmik retikulum stresinde başka bir apoptotik yol c-jun NH2- terminal kinaz (JNK) yoludur. Etkisini gen ekspresyonu düzenleyerek gösterir ve strese karşı yaşam ve hücre ölümü arasındaki tespiti sağlar. Endoplazmik retikulum stresı yolunda JNK aktivasyonunun işlevsel önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak UPR'nin IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksi ile aktive olduğu bilinmektedir. IRE-1- TRAF2 etkileşimi ATF3'ü aktive ederek apoptozisi tetikler. Ayrıca JNK'nın, fosforilasyonla BCL2 proteinini düzenlediği de bilinmektedir (Seydel, 2012).

2.4.4. Kaspaz Aktivasyonu

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, gelişim ve doku homeostazında kritik bir rol oynayan önemli bir fizyolojik süreçtir. Apoptozun ilerlemesi, belirli koşullar altında bir dizi sinyal kaskadıyla düzenlenir. Kaspaz-kaskad sistemi, hücre içi apoptotik sinyallerin indüksiyonunda, transdüksiyonunda ve amplifikasyonunda hayati roller oynar. Apoptoz ile yakından ilişkili kaspazlar, aspartat-spesifik sistein proteazları ve interlökin-1 beta dönüştürücü enzim ailesinin üyeleridir. Kaspazların aktivasyonu ve işlevi, apoptoz proteini inhibitörü, Bcl-2 ailesi proteinleri, kalpain ve Ca^{2+} gibi çeşitli molekül türleri tarafından düzenlenir (Fan ve ark., 2005). Kaspazlar, hücrelerin içinde inaktif olarak bulunurlar ve apoptozisin uyarılmasından sonra aktif enzim formuna dönüşmek için işlem görürler. ER stresıyla ilgili çalışmalarda kaspaz 12, 3, 6, 7, 8 ve 9 işlevleri gösterilmiştir. Kaspaz 12, ER stresıyla indüklenen

apoptozisin anahtar mediyatorüdür ve çeşitli yollardan aktive olabilir. Birinci yol; sitoplazmik proteaz olan kalpainler kalsiyum tarafından aktive olur ve kaspaz 12'yi aktive eder. Aktif kaspaz 12, prokaspaz 9'u keser ve kaspaz 9'da kaspaz 3'ü keserek aktifleştirir. Sonuçta apoptozis gerçekleşir. İkinci yol; kaspaz 12, IREI ve adaptor protein TRAF2 ile bağlantılı olarak oto-aktive olabilir. Üçüncü yol; bazı apoptotik uyarılara cevap olarak Kaspaz 7 direk olarak kaspaz 12'yi aktive edebilir (Seydel, 2012).

Apoptozis ER stresinde hücre ölümünü uyaran önemli bir mekanizmadır. Ancak ER stresıyla indüklenen apoptozisi düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır (Rasheva ve Domingos, 2009). Bununla birlikte ER stresi varlığında sifingomyelin metabolizmasında değişim olduğu ve seramid birikimi sonucunda apoptozisin meydana geldiği rapor edilmiştir (Lei ve ark., 2007).

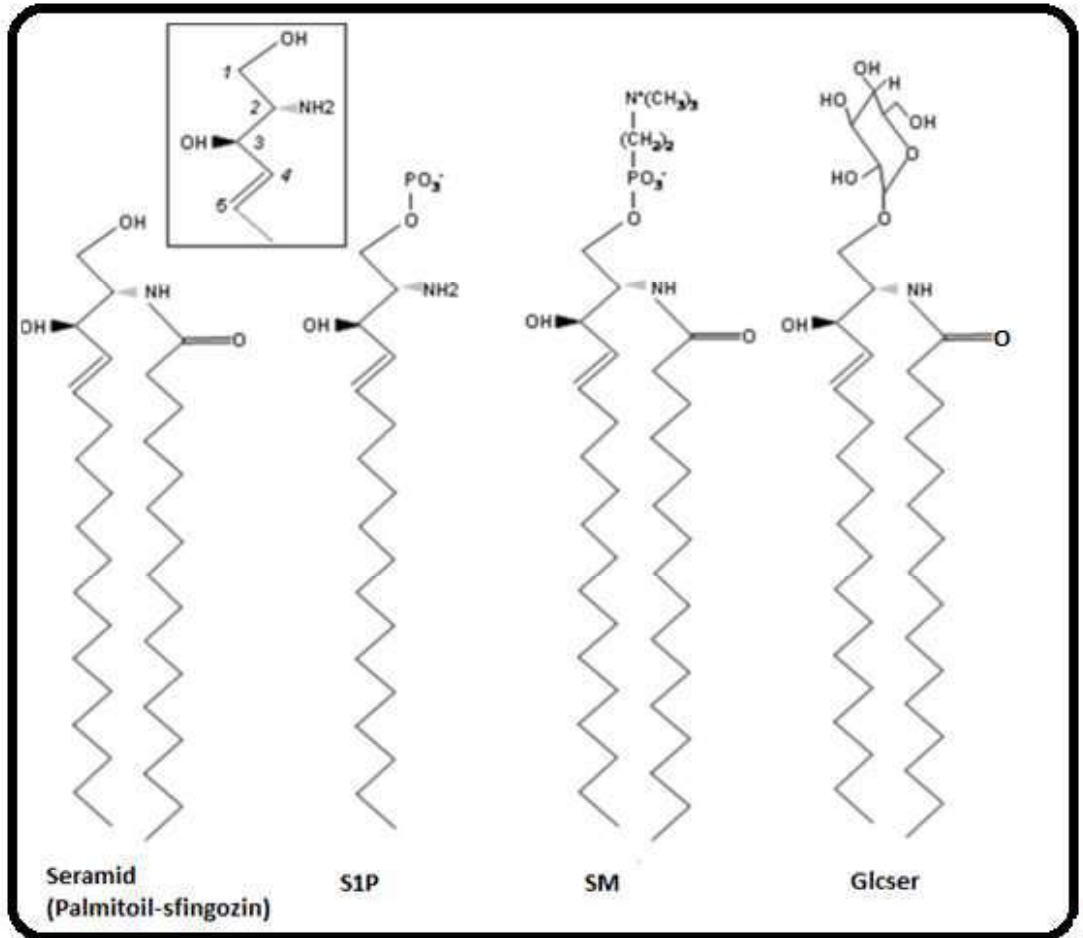
2.5. Sfingolipidler

Yaklaşık yüz yıl önce tüm ökaryotik hücrelerin iki katlı lipid membranla çevrili olduğu ve bu membran hücre geçirgenliğinde önemli rolleri olduğu önerilmiştir. Son geçtiğimiz 20 ya da 30 yılda, lipid çift tabakanın bileşenlerini ve sinyalizasyondaki rolünü araştıran çalışmalar ile son zamanlarda yapılan lipidomik çalışmalar, lipid tabakanın yapısı ve fonksiyonel karmaşıklığı hakkında tekrar düşünmeye yol açmıştır. Bugün ökaryotik hücre membranında gliserolipidler, sfingolipidler (SL) ve steroller olarak adlandırılan üç büyük lipid sınıfının bulunduğu bilinmektedir (Lahiri ve Futerman, 2007).

Sfingolipidler, ilk kez 1884 yılında J. L. W. Thudichum tarafından sinir dokusundan izole edilmiştir (Rotstein, et al. 2010). Tüm sfingolipidlerin omurgasını, sfinganin ve sfingozin (sph) denilen uzun zincirli sfingoid baz oluşturur. Sfingozin, sfinganinden farklı olarak trans 4-5 çift bağı içerir. Bu çift bağ yapısı sfingozin temelli sfingolipidlerde bazı biyoaktif roller içermesi bakımından önemlidir (Lahiri ve Futerman, 2007). Altmıştan fazla sayıda farklı sfingoid baz türü rapor edilmesine rağmen, memeli sfingolipidlerinde en fazla bulunan sfingozin, 18-20 karbon atomundan oluşan ve C 4-5 pozisyonunda trans çift bağ bulunan bir amino alkoldür.

Sfingozinin C-2 pozisyonuna N-açilasyon ile bir yağ asidi bağlanmasıyla seramid oluşur. Sfingozine bağlanan yağ asidinin zincir uzunluğu 2-28 karbon arasında

değişir ve genellikle doymuştur. Ancak sperm gibi bazı özel hücreler çok uzun zincirli (C24-C34) çoklu doymamış yağ asitlerine sahiptir. Seramid, birçok karmaşık sfingolipidin omurgasını oluşturan en basit sfingolipiddir. Seramidin C-1 pozisyonuna fosforilkolin bağlanması ile sfingomyelin (SM) oluşur. Aynı pozisyona glukoz veya galaktozun bağlanması ise glikosfingolipidlerin (GSL) oluşumunun ilk basamağını oluşturur (**şekil 2.7**) (Rotstein ve ark., 2010).



Şekil 2.7 Sfingolipidlerin Yapısı. S1P, sfingozin1-fosfat; SM, sfingomyelin; Glcser, glukozil seramid (Lahiri ve Futerman 2007).

2.5.1. Sfingolipid Metabolizması

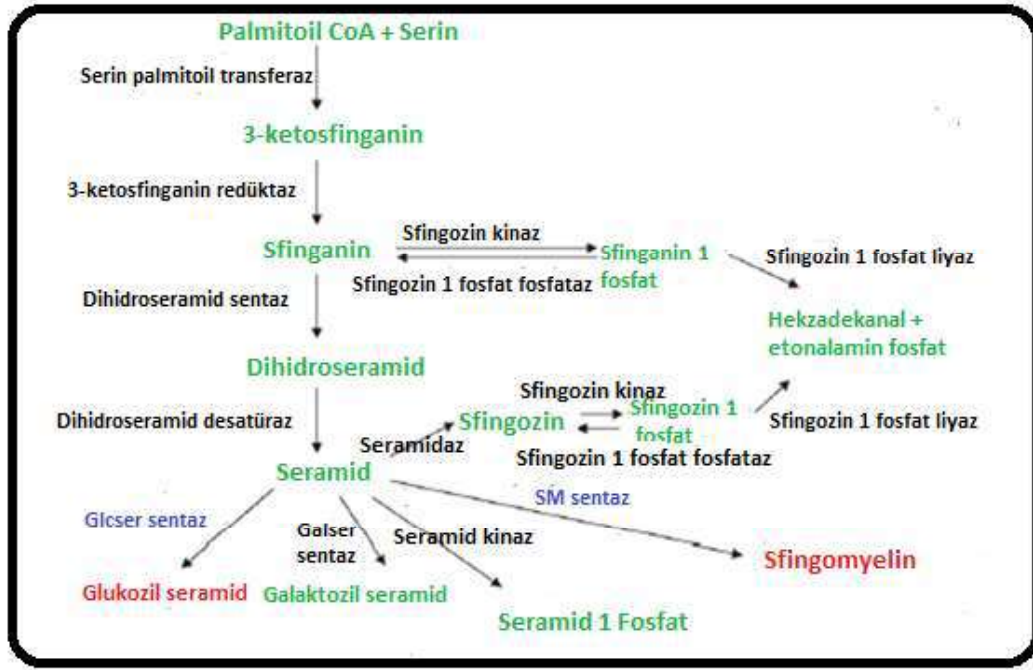
Sfingolipid metabolizmasının biyokimyasal yolları iyi tanımlanmış olup, endoplazmik retikulum (ER) / Golgi aparatı ve lizozomlardaki hücre içi sentez ve bozunma bölgeleri geniş bir şekilde karakterize edilmiştir (Lahiri ve Futerman, 2007). Sfingolipid metabolizmasının merkezi molekülü seramiddir. Seramid, iki ana enzimatik mekanizma tarafından üretilir. Bunlardan birincisi, endoplazmik

retikulumda gerçekleşen de novo sentez yoludur. İkincisi, farklı sfingomiyelinazlar (SMaz'ler) tarafından gerçekleşen SM'nin hidrolizidir (Andrieu-Abadie ve Levade, 2002). Her iki yol da benzer bir biyolojik amaca ulaşmak için farklı veya eş zamanlı olarak indüklenebilir. Bu yollardan hangisinin hakim olacağı ise uyaranlara ve hücre türüne bağlıdır (Rotstein ve ark., 2010).

De Novo Sentez Yolu: De novo sentez yolunda sfingolipid sentezi, serin ve palmitoil CoA'nın serin palmitoil transferaz ile kondanse edilerek 3-ketosfinganin oluşturulmasıyla başlar. 3-ketosfinganin, 3-ketosinganin redüktaz ile indirgenerek sfinganin oluşur. Sfinganine dihidroseramid sentaz (sfinganin N-açiltransferaz) tarafından açil grubunun eklenmesiyle dihidroseramid oluşur. Dihidroseramid ise dihidroseramid desaturaz/redüktaz enzimi ile trans 4-5 çift bağı eklenmesiyle seramide dönüştürülür. Bu reaksiyonların hepsi ER'nin lümeninde gerçekleşir.

Seramid en az beş farklı ürünün öncüsüdür (**şekil 2.8**) (Lahiri ve Futerman, 2007).

- a)** Seramid, ER'nin lümenal yaprağında bir UDP-galaktoz vericisinden galaktoz aktarılmasıyla galaktosilseramide (GalCer) glikosile edilebilir.
- b)** Seramid, seramid kinaz ile fosforile edilerek seramid 1-fosfat oluşturulabilir.
- c)** Seramid, seramidaz enzimi ile deaçilasyona uğrayarak sfingozin ve serbest yağ asidine ayrılabilir.
- d)** Seramide fosfotidil kolinden fosforil kolin transferi ile sfingomyelin sentezlenebilir.
- e)** Seramidin son kaderi glukozil seramide (GlcCer) glikasyonudur. (Lahiri ve Futerman 2007).



Şekil 2.8 Sfingolipidlerin Metabolizması (Lahiri ve Futerman 2007).

Seramid-1-fosfat ve SM haricindeki metabolitler daha da metabolize edilebilir. Seramidin N-açıl zinciri seramidaz enzimi ile hidroliz edilerek sfingozin oluşabilir. Önemli bir sinyal molekülü olan sfingozin (Ma ve ark., 2005), sfingozin kinaz (SK) ile fosforile edilerek sfingozin 1 fosfat (S1P) oluşturulabilir. Sfingozin 1 fosfat önemli bir birinci ve ikinci haberci olduğundan, seviyelerinin regülasyonu kritiktir ve bir mikrozomal S1P fosfataz aktivitesi ile tekrar sfingozine dönüştürülebilir.

Alternatif olarak S1P, S1P liyaz ile SL olmayan iki ürün, hekzadekanal ve etanolamin fosfata bozunabilir. Bu iki bileşiğin üretimi SL metabolizması yolağının bilinen tek çıkış yoludur çünkü sfingolipidlerin lizozomal degradasyonu SL yolağına geri dönen SL metabolitlerini üretir. Bunların bir kısmı daha sonra SL sentezinin kurtarma yolunda yeniden kullanılabilir hale getirilebilir (Lahiri ve Futerman 2007).

Sfingomyelin-Seramid Yolu: Memeli hücrelerinde en yaygın bulunan sfingolipid türü olan sfingomyelin (SM), çoğunlukla plazma zarlarında ve lipoproteinlerde bulunur. Her bir SM molekülü, bir fosfokolin polar baş grubu, bir yağ asidi ve bir sfingoid uzun zincirli bazdan oluşur. Sfingomyelin, fosfodiester bağının SMaz enzimleri ile hidroliz edilmesiyle seramid ve fosfokoline ayrılabilir. Memelilerde, farklı genler tarafından kodlanan ve optimum pH'ları, katyon gereksinimleri, hücre

içi lokalizasyonları farklı olan birkaç farklı SMaz tanımlanmıştır (Andrieu-Abadie ve Levade 2002).

Asid SMaz: Asid SMaz (A-SMaz), endosomal/lizozomal hidrolaz olarak tanımlanan ilk SMaz enzimidir (Barenholz,1966) ve aktivasyon için çinko'ya (Zn^{2+}) ihtiyaç duyar. Lizozomal asit SMaz enzimleri, esas olarak lipoprotein türevli SM'nin bozulmasında rol oynar. Ayrıca hücreden hücre dışına salınabileceği gösterilmiştir (Slotte, 2013).

Nötral SMaz: Schneider ve Kennedy tarafından karaciğer ve dalakta yapılan çalışmalarda, optimum pH'ı nötr olan bir SMaz tespit edilmiştir (Schneider ve Kennedy, 1967). O zamandan beri, çeşitli nötr SMaz biçimleri tanımlanmış ancak henüz moleküler düzeyde net bir şekilde karakterize edilmemişlerdir. Bu Nötral SMaz izoformlarından biri plazma membranına bağlı olarak bulunur ve magnezyum (Mg^{2+}) bağımlı olarak görülmektedir (genellikle nötr sfingomyelinaz (N-SMaz) olarak adlandırılır); bir diğeri sitozoliktir ve katyondan bağımsızdır; üçüncüsünün ise nükleer olduğu rapor edilmiştir.

Alkalın SMaz: Asit ve nötr SMaz aktivitelerinin yanı sıra, intestinal mukoza ve safrada sindirim ve mukozal hücre proliferasyonunda rol oynayan bir alkalın SMaz aktivitesi tespit edilmiştir (Andrieu-Abadie ve Levade, 2002). Diyetel SM'nin hidrolizi bağırsak sistemindeki hücreler tarafından sentezlenen alkalın SMaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Diyetel SM, gastrointestinal sistemde önemli etkileri olan birçok biyoaktif sfingolipid için öncü olarak rol oynamaktadır (Slotte, 2013).

Sfingomyelinlerin hidrolizi bu sfingomyelinazların birçok hücre dışı uyarıya yanıt olarak aktive edilmesiyle gerçekleşir. Sonuç olarak, sfingomyelin seramid ve fosforilkoline hidroliz olur (Rotstein ve ark., 2010). Kapsamlı çalışmalara rağmen, belirtilen SMaz'ların her birinin SM hidrolizinde ve özellikle apoptozisdeki kesin hücrel rolü hala belirsiz ve tartışmalıdır (Andrieu-Abadie ve Levade, 2002). 1989 yılında Okazaki ve arkadaşları tarafından yapılan gözlemde, SM hidrolizi ve seramid oluşumunun çeşitli hücre tiplerinde çeşitli uyaranlarla tetiklenebileceği vurgulanmıştır (Okazaki ve ark., 1989). Bununla birlikte, SM hidrolizinin

enzimolojik ve düzenleyici yönleriyle ilgili bazı önemli sorular hala çözülememiştir (Andrieu-Abadie ve Levade, 2002).

2.5.2. Sfingolipidlerin Apoptotik Fonksiyonu

Son yıllarda sfingolipidlerin ve diğer membran lipidlerinin sadece biyolojik membranların yapısal komponenti olmadığı, sinyalizasyon mekanizmalarında da hayati rol oynadığı kanıtlanmıştır (Lahiri ve Futerman 2007). Seramidler, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis veya inflamatuvar cevap, radyasyon ve kemoterapinin tümörler üzerindeki etkileri, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, ısı veya UVA yaralanması, iskemi-reperfüzyon hasarının etkilerinin düzenlenmesinde rol oynar. Isı şoku, iyonize radyasyon, oksidatif stres, progesteron, vitamin D3, tümör nekroz faktör (TNF), interlökin (IL)-1 α , IL-1 β , interferon- γ , Fas ligand, okside düşük dansiteli lipoprotein (LDL), nitrit oksit gibi bir çok ekstraselüler sinyal ya da uyarının hücre içi seramid düzeyini hem de novo sentez ile hem de asid ya da nötral SMaz tarafından SM hidroliziyle artırdığı gösterilmiştir (Lahiri ve Futerman 2007). Sfingolipidlerin sinyal iletimindeki rolü üzerine yapılan çalışmaların çoğu apoptozisteki rolü üzerine odaklanmıştır.

Seramidin apoptozisi nasıl uyardığına dair bazı görüşler öne sürülmüştür. Bunlardan birincisi, seramidin plazma membranından (PM) üretildikten sonra tipik olarak ikincil mesajcı olarak hareket etmesi ve regüle ettiği proteinlere bağlanmasıdır. (Lahiri ve Futerman 2007). Önerilen ikinci ihtimalde, yukarıdaki çoğu uyarıcı asid SMaz'ı aktive eder ve PM'de seramid zengin membran platformu oluşumuna sebep olur. Bu platform sinyal proteinlerini yakalar ve kümeleştirir. Böylece apoptozis ilişkili proteinlerin oligomerizasyonu sağlanarak apoptozis sinyalizasyon mekanizması başlatılmış ve çoğaltılmış olur. Seramidin apoptozu indükleyebileceğini öneren bir diğer mekanizma ise, seramidin mitokondri ile doğrudan etkileşimi yoluyla mitokondri özelliklerini modüle edebileceği bir modeldir. Seramid mitokondride sitokrom c ve küçük proteinlerin salınımı için yeterli büyüklükte membran kanalı oluşturarak kaspaz bağımlı apoptotik yolak aktivasyonuna sebep olabilir. Endoplazmik retikulumda sentezlenen seramidin ise mitokondriye taşınıp taşınmadığı bilinmemektedir. Ancak son zamanlarda bazı lipidlerinin ER ve mitokondri arasında taşındığı ve iki membran arasında ilişki kurduğu önerilmiştir (Lahiri ve Futerman, 2007).

Sfingozin 1-P, hem birinci hem de ikinci haberci olarak davrandığı için en ilgi çekici SL'dir. Birinci mesajcı olarak (parakrin etki) sitoskeletal yeniden düzenlenmeyi, hücre migrasyonunu, anjiogenezisi, vasküler maturasyonu, embriyonik kalp gelişimini, immünite ve lenfatik trafiği regüle eder. Hücre içi ikinci haberci olarak kalsiyum homeostazisi, hücre büyümesi, tümörögenesis ve apoptozis baskılanmasına aracılık eder. Sfingozin 1-P, hücre büyümesi ve survival ile ilişkili dahil edildiği bütün yollarlarda seramid ile ters bir etki göstermektedir. Seramid hücre büyüme inhibitörü ve pro-apoptotik etki ile ilişkilendirilirken S1P hücre büyümesi ve seramid aracılı apoptozisin inhibe edilmesi ile ilişkilendirilmektedir (Lahiri and Futerman 2007).

Seramidin ana metaboliti olan seramid-1-fosfat (C1P) varlığı ilk kez Dressler ve Kolesnick tarafından insan lösemi (HL-60) hücrelerinde saptanmıştır (Dressler ve Kolesnick, 1990). Seramid-1-fosfat'ın ilk önce sıçan fibroblastlarında DNA sentezini ve hücre bölünmesini uyardığı gözlemlenerek biyoaktif olduğu rapor edilmiştir. 1995 yılında sentetik kısa zincirli C1P'lerin (C2-C1P ve C8-C1P) apoptotik koşullara maruz bırakılan sıçan fibroblast hücrelerindeki morfolojik değişiklikleri tersine çevirdiği gözlenmiştir (Gomez-Munoz ve ark., 1995). Yine C1P'in apoptozisi uyaran koşullar altındaki kemik iliği kaynaklı makrofaj hücrelerinde hücre ölümünü bloke ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada C1P'in DNA fragmentasyonunu durduğu ve kaspaz-9/kaspaz-3 yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Böylece C1P'in pro-survival etkisinin apoptozisi inhibe ederek gerçekleştirdiği önerilmiştir. Bununla birlikte C1P'in, a-SMaz (Gómez-Muñoz, 2004) ve protein 1 fosfatı (seramid uyarılı apoptozise atfedilir) inhibe ederek apoptotik hücrelerde artan seramid düzeyini baskıladığı ve anti-apoptotik etki gösterdiği kabul edilmiştir (Lahiri ve Futerman 2007).

Sonuç olarak basit sfingolipidlerden seramid, seramid 1P, sfingozin ve sfingozin 1P'in proliferasyon, farklılaşma, büyüme, yaşlanma, apoptozis gibi bir çok hücreyel olaya dahil olduğu ve seramid'in bu süreçlerde S1P ile ters etki gösterdiği, seramid 1 fosfatın ise S1P ile benzer fonksiyonlar paylaştığı önerilmiştir. Bu durum, yaşam ve ölüm arasındaki dengenin, bu her biri birbirine dönüşebilen sfingolipidlerin intraselüler düzeyleri arasındaki hassas kırılabilen dengeye bağlı olduğunu düşündürmektedir. Denge ise spesifik SL'i üreten yada degrade eden enzimler ile kontrol edilmektedir. (Lahiri ve Futerman 2007). Bununla birlikte ER stresi ve

sflngolipid metabolitleri arasındaki ilişki henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Seramid üretiminin artmasının ER stresine yol açtığı (Contreras ve ark., 2014; Szpigel ve ark., 2018) ve bu yolla apoptotik etki gösterdiği bilinmektedir (Liu ve ark., 2014). Nitekim, kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada seramid birikimi ve ER stresinin kanser hücresi ölümünü teşvik ettiği; S1P, C1P düzeylerinin azalmasının ise hücre sağ kalımını azalttığı gösterilmiştir (Aslan ve ark., 2020).

Ancak henüz RPE hücrelerinde ER stresi varlığında sfingomyelin/seramid metabolit düzeylerindeki değişimler ve apoptozise etkileri araştırılmamıştır. Bu çalışma kapsamında RPE hücre kültüründe oluşturulan ER stres modelinde sfingomyelin/seramid metabolitlerinin düzeyleri ölçölmüş ve apoptoz değerlendirilmiştir. Ayrıca TUDCA'nın teropotik etkinliği incelenmiştir.

Tauroursodeoksikolik asit (TUDCA), ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı ve bazı kolestatik karaciğer hastalıklarının tedavisi için kullanılan hidrofilik safra asidi olan ursodeoksikolik asidin (UDCA) taurin konjugatıdır. Tauroursodeoksikolik asitin, karaciğer dışı çeşitli hastalıklar üzerindeki potansiyel terapötik etkisini araştıran araştırmalar her geçen gün artmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, TUDCA'nın kısmen protein katlama kapasitesinin arttırılmasını sağladığı ve PERK tarafından aktive edilen eIF2 α fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. (Vang ve ark., 2014). Bununla birlikte 2017 yapılan bir çalışmada TUDCA'nın ER stresini azaltmakla birlikte seramid kaynaklı vasküler hiperaktiviteyi azalttığı gösterilmiş ve TUDCA tedavisinin vasküler komplikasyonlarda tedavi stratejisi olabileceği düşünölmüştür (Zhang ve ark., 2017). Başka bir çalışmada ise insan adenoid kistik karsinomunda seramid kaynaklı ER stresi ve hücre ölümünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Liu, 2014). Ancak hala TUDCA'nın teröpötik etkisinin yeni çalışmalarla desteklenmeye ihtiyaçı vardır.

Çalışmamızdan çıkan sonuçların RPE hücrelerinde oluşan apoptozis mekanizmasına ışık tutacağı ve potansiyel tedavi yollarının geliştirilmesine olanak sağlayabileceği düşünölmektedir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Hücre Kültürü

Hücre Medyumunun Hazırlanması: Projemizde kullanılan hücre hattı ARPE-19 hücre dizisi American Type Culture Collection'dan (ATCC, Manassas, VA, USA) alındı. Hücrelerin çoğalması için ATCC tarafından formüle edilen medyum Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM): Ham's Nutrient Mixture (F-12), 1:1 (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) kullanıldı. 500 ml'lik şişe içerisinde gelen medyum içerisine son konsantrasyonlar %10 (v/v) olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş fetal bovin serum (heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), %1 olacak şekilde penisilin-streptomisin (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO² ve %95 nemlendirilmiş hava içeren CO² inkübatöründe çoğaltıldı. Hücreler 80% yoğunluğa ulaştığında tripsin-EDTA enzimi (0.05% Trypsin- EDTA; Gibco, Life Technologies, Paisley, United Kingdom) ile kaldırılarak pasaj yapıldı.

Hücrelerin Pasajlanması: ARPE 19 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında tripsin-EDTA kullanılarak tutundukaları flasklardan kaldırıldı ve yeni flasklara pasajlandı. Tripsin-EDTA enzimi ile kaldırma yapılırken öncelikle mevcut medyum flaskdan uzaklaştırılır. Tripsin-EDTA'nın daha iyi etki gösterebilmesi için flaska birkaç ml PBS eklendi. Hücre içi artıkların PBS ortamına geçebilmesi için flask birkaç dakika inkübatörde bekletildi. Bu işlemin ardından PBS atılarak 25 cm²'lik flask yüzeyi için 1 mL tripsin-EDTA, 75 cm² için ise 3 mL tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA eklenmesi sonrasında hücreler 5-15 dakika inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yapıştıkları flasktan ayrıldıkları mikroskop ile gözlenir gözlenmez 6-8 mL taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı. Flasklardan toplanan hücreler 15 mL'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı ve 125 x g'de 5-7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Pelletde kalan hücrelerin üzerine 6-8 mL taze medyum eklenerek yeni flasklara paylaştırıldı. 25 cm²'lik flaska son hacim 5-7.5 mL olacak şekilde, 75 cm²'lik flaska son hacim 15-22.5 mL olacak şekilde taze medyum eklendi. Hücreler, 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava içeren CO₂ inkübatöründe üretildi. Alt kültürleme işlemi 1 flasktan 3 veya 6 flask elde edilecek şekilde gerçekleştirildi. Bu şekilde pasajlanan hücrelerin tam anlamıyla yoğunlaşması 2-5 gün arasında gerçekleşti. Çalışmamız boyunca 10 ile 15'inci pasaj hücreleri kullanıldı.

Hücrelerin Dondurulması: Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler flasktan uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellette kalan hücreler % 95 tam hücre medyumu ve % 5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO; Calbiochem, EMD Bioscience Inc. La Jolla, CA, USA) içeren dondurma medyumu içerisinde tekrar süspanse edildi. Hücre süspanسیونları, cryo tüplere dağıtılarak kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80°C'de tutuldu. Daha sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

Hücrelerin Çözülmesi: Dondurulan hücreler ihtiyaç halinde deneylerde kullanılmak üzere çözüldü. Hücre içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırılarak dış yüzeyi %70'lik alkolle temizlendi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. 1mL'lik vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla 9 mL medyum eklendi. 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet uygun medyumla tekrar süspanse edildi ve kültür flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe üretildi (Kucuksayan ve ark., 2014).

RPE Hücrelerinde ER Stresi Oluşturulması: Çalışmamızda, ER stresi Tunikamisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile oluşturuldu. Tunikamisin'in DMSO'daki çözünürlüğü 10 mg/mL'dir. 10 mg Tunikamisin 1 mL DMSO'da çözüldü. Böylece hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 10 mg/mL olmuştur. Buda 10 µg/µL'dir. Seyreltme işlemleri bu hazırlanan stok çözeltiden yapıldı. Literatürde Tunikamisin'in ER stresi oluşturmak için rapor edilen dozu 10 µg/mL'dir (Kucuksayan ve ark., 2014). Çalışmamızda kullanılan tunikamisin dozu da 10 µg/mL'dir.

Deney Gruplarının Oluşturulması: Deneyler için 5 farklı grup oluşturuldu. Kontrol grubu (normal retinal pigment epitel hücreleri); ER stresi grubu (10 µg/mL tunikamisin ile inkübe edilen retinal pigment epitel hücreleri); TUDCA grubu (TUDCA ile inkübe edilen retinal pigment epitel hücreleri); ER stresi + TUDCA grubu (10 µg/mL tunikamisin ve TUDCA ile inkübe edilen retinal pigment epitel

hücreleri); DMSO grubu (Tunikamisin'in çözündüğü kadar DMSO ile inkübe edilen retinal pigment epitel hücreleri).

TUDCA Doz Çalışması: Literatürde ER stresi oluşturulmuş ARPE hücre hattında TUDCA uygulaması yoktur. Bu nedenle doz çalışması yapılarak MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testi ile TUDCA'nın canlılığa etkisi değerlendirildi. TUDCA'nın moleküler ağırlığı 521 gram, suda çözünürlüğü ise 100 mg/mL'dir. 52 mg TUDCA (EMD Millipore Corp. Billerica, MA USA) salin içerisinde çözülerek 100 mM stok çözelti hazırlandı. TUDCA'nın farklı dozları bu stok çözeltiden hazırlandı. Çalışmamızda TUDCA, ER stres inhibitörü olarak uygulandı.

3.2. Hücre Canlılığı Deneyleri: Hücre canlılığı, kolorimetrik MTT test kiti (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) kullanılarak ölçüldü.

MTT Deney Protokolü: Hücre canlılığının analizi için hücreler tripsin ile flasklardan kaldırıldı. Tripsini inhibe etmek için medyum eklenerek hücreler toplandı ve 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılır, kalan pellet ise 1 mL PBS ile resüspanse edildi. Ardından hücre süspansiyonu 75cm²'lik flaskta son hacim 10 mL olacak şekilde medyum ile seyreltilerek mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Elde edilen değer mL'de bulunan hücre sayısını gösterdi. Hücreler her kuyuya 100 µL hücre süspansiyonu içinde 1000-50000 hücre olacak şekilde ayarlanarak ekildi. Hücrelerin yapışması için flask bir gece inkübe edildi. Daha sonra medyum uzaklaştırılarak kuyucuklara deney grupları için belirlenen dozlar belirli sürelerde uygulandı.

MTT Analizi için Deney Gruplarına Uygulanan Dozlar

Kontrol Grubu: Hücre medyum,

DMSO Grubu: 1 µL / mL DMSO,

Tunikamisin Grubu: 1-10 µg / mL TM,

TUDCA Grubu: 0.1–5 mM TUDCA,

Tunikamisin+TUDCA Grubu: 10 µg / mL TM + 0.1–5 mM TUDCA.

Belirlenen dozların uygulanmasının ardından hücreler 18-24-48 h boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süreleri bittiğinde her kuyucuğa 100 µL taze medyum ve 10 µL A+B solüsyonundan (MTT+PBS) eklenerek 4 saat boyunca 37°C’de, % 5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda her kuyuya 100 µL solüsyon C eklenerek pipetaj yapıldı. Solüsyon C’deki izopropanol, canlı hücre içeren kuyularda MTT’den oluşan ve kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görünen formazanı çözerek absorbans ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağladı. Solüsyon C eklendikten sonra 1 saat içinde ELISA plate okuyucusunda (MicroQuant Plate Reader, Bio-Tek Instruments Inc. Vermont, USA) 570 nm dalga boyu ve 630 nm referans dalga boyunda plağın okuması yapıldı. Deney gruplarının formazan üretimi, kontrol hücrelerinden elde edilen değerlerin yüzdesi olarak ifade edildi.

3.3. İmmünofloresan Boyama

ER Stresinin Belirlenmesi: Endoplazmik retikulum stresine bağlı bozuk katlanma gösteren proteinlerin birikimi UPR yanıtının gelişmesine neden olur. GRP78, hücrede UPR cevabının oluştuğunu gösteren protein belirteçleri arasındadır. Çalışmamızda, RPE hücrelerinde GRP78 proteinin ekspresyon tayini immünofloresans mikroskopi yöntemiyle belirlendi.

NF-κB p65, Cleaved Kaspaz-3 ve Kaspaz 12: İnflamasyon belirteci NF-κB p65, apoptozis belirteci cleaved kaspaz-3 ve kaspaz 12 proteinlerinin ekspresyon tayini immünofloresans mikroskopi yöntemiyle yapıldı. GRP78, NF-κB p65, cleaved kaspaz-3 ve kaspaz 12 immünofloresans mikroskopi yöntemiyle protein ekspresyon tayini için aynı prosedür uygulandı.

Çözeltilerin Hazırlanması:

Bloklama Çözeltisi

- 1,5 g BSA (Bovine Serum Albumin)
- 0,134 g NH₄Cl
- 0,0375 g Glisin
- 50 mL PBS

Permeabilizasyon Çözeltisi

- 100 µL Triton X-100
- 100 mL PBS

Antibody Dilüent

- 10 µL Tween-20
- 5000 µL PBS

Yıkama Çözeltisi

- 80 µL Tween-20
- 40 mL PBS

Tüm çözeltiler deney yapılacağı gün taze hazırlandı ve kullanana kadar +4°C’de bekletildi (PBS olarak da tablet şeklindeki PBS kullanılır.

Protokolün Uygulanması:

- 1) Chamber Slide’in (Merck Millipore,Cork, Ireland) her kuyucuğuna yaklaşık 100000 hücre inkübasyondan bir gün önce yapışmaları için ekilir.
- 2) Kuyucuklardaki hücreler en az %70 konfluent olduğunda deney gruplarının uygulamaları ve inkübasyonu yapılır.
- 3) İnkübasyon bitiminde medyum aspirasyon cihazı ile çekilir.
- 4) Hücrelerin kurumaması için her kuyucuğa soğuk PBS eklenir (ortalama 2 mL). Bu işlem iki kere tekrar edilir.
- 5) Taze hazırlanmış %4’lük formaldehit ile 5 dakika boyunca fikse edilir.
- 6) Formaldehit uzaklaştırılarak soğuk PBS ile 2 kere kısa süreli yıkama yapılır.
- 7) Permeabilizasyon çözeltisi ile (PBS içinde %0.1 Triton X-100) 5 dakika oda ısısında inkübe edilir.
- 8) Permeabilizasyon çözeltisi atılır ve yıkama yapılmaz.
- 9) Bloklama çözeltisi ile 1 saat inkübe edilir.
- 10) İnkübasyon sonunda bloklama çözeltisi atılır ve ilgili kuyucuğa seyreltilen antikor damlatılır. Anti-GRP 78 (1:100, #ab21685 Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-NF-κB p65 (1:100, #ab16502, Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-cleaved kaspaz-3 (1:100, #9664, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-kaspaz 12 (1:100, #ab62463 Abcam, Cambridge, MA, USA) antikorları üretici firmanın prosedürüne göre seyreltilerek her kuyucuk için 100 µl olacak şekilde hesaplama yapılarak uygulanır.

- 11) Oda sıcaklığında hafif ıslak gazlı bir bezle nemli ortam oluşturulur ve Slide'lar bir kap içerisinde bir gece boyunca inkübasyona bırakılır.
- 12) İnkubasyon sonunda her kuyucukta farklı antikorlar olduğu için pipet ucu değiştirilerek antikorlar uzaklaştırılır.
- 13) Yıkama çözeltisi ile çok fazla beklemeden 2 kere yıkama yapılır.

Protokole Karanlık Odada Devam Edilmesi:

- 1) Floresans işaretli antikor (Alexa Fluor-488 conjugated goat anti-rabbit; A11008 life Technologies, USA), antibody diluent ile 1:300 oranında dilüe edilir.
- 2) Yıkama çözeltisi uzaklaştırılarak hazırlanan floresans işaretli antikor her kuyucuğa 100 µl damlatılır.
- 3) Oda sıcaklığında hafif ıslak gazlı bir bezle nemli ortam oluşturularak Slide'lar bir kap içerisinde 1 saat boyunca inkübasyona bırakılır.
- 4) Sürenin sonunda sekonder antikor Slide'ın kenarından hafifçe çekilerek uzaklaştırılır.
- 5) Yıkama solüsyonuyla kısa süreli 2 kere yıkama yapılır.
- 6) Chamber Slide'ın kuyucukların oluşmasını sağlayan duvar kısmı kendi aparatı yardımıyla tabanından yavaşça ayrılır bu kısım fazla kuvvet uygulamadan ve antikorlu yüzeye geçmeden dikkatlice yapılmalıdır.
- 7) Chamber Slide'ın tabanı olan lam kısmı üzerine 1 damla DAPI'li (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) kapatma medyumunu damlatılır.
- 8) Lam üzerine DAPI damlatıldıktan sonra hava kabarcığı kalmadan temiz bir lamel ile kapatma yapılır.
- 9) Slaytlar floresans mikroskobu (Olympus BX61 fully automated, Tokyo, Japan) altında incelenir ve floresans yoğunluğu NIH ImageJ 1.44p software kullanılarak ölçülür.

3.4. Sfingomiyelin ve Seramidlerin LC-MS/MS ile Ölçümü

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Kütle Laboratuvarında, ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC/MSMS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı vardır. Bu sistemde grubumuz tarafından seramid ve sfingomiyelin ölçümleri yapılmaktadır (Ozer ve ark., 2018).

Standartların Hazırlanması: N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C16 SM), N-stearoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C18 SM), N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C24 SM), N-palmitoil-D-eritro-sfingozin (C16 CER), N-stearoil-D-eritro-sfingozin (C18 CER), N-araşidoil-D-eritro-sfingozin (C20 CER), N-behenoil-D-eritro-sfingozin (C22 CER) ve N-lignoseroil-D-eritro-sfingozin (C24 CER) standartları Avanti Polar Lipids'ten (Alabaster, AL, USA), işaretli C16 CER d18:1/16:0 (Palmitoil-U-13C16) internal standard ise Cambridge Isotope Laboratories'ten (Andover, MA, USA) temin edildi. Her bir sfingolipid standart çözeltisi metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile çözüldü ve 40°C'de sonikasyon yapılarak hazırlandı.

Ölçüm Metodu: Daha önce tanımlandığı gibi, ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) sistemine bağlı MS/MS kullanılarak optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM) metodu geliştirilmiştir (Ozer, et al. 2018). Kromatografik ayrımlar HPLC kolon (XTerra C18, 2.1 mm × 50 mm, Waters, MA, USA)) kullanılarak 60°C'de yapıldı. Akış hızı 0.450 ml/dk ve injeksiyon hacmi 10 µL olarak uygulandı. Mobil faz A, Su/Asetonitril/ İsopropanol (80:10:10 v/v/v içinde 10 mM amonyum format); Mobil faz B Asetonitril/isopropanol (90:10 v/v içinde 10 mM amonyum format) hazırlandı Gradient, 0 dk %65 Mobil Faz B; 0-2 dk %65 Mobil Faz B; 2.01-13 dk %90 Mobil Faz B; 13.01-20 dk %100 Mobil Faz B; 20.1-23 dk %65 Mobil Faz B olarak uygulandı. Sfingomyelin ve seramidler için kalibrasyon aralığı 39-625 ng/mL linear kalibrasyon aralığında optimize edildi. Örnek ölçüm süresi 30 dakika olarak ayarlandı. Pozitif elektro-sprey-iyonizasyon (ESI) modunda ölçüm yapıldı. Her bileşiğin MRM geçişleri ve yanıtları otomatik olarak optimize edildi. Tüm analiz edilen sfingolipidlerin pozitif ESI-MS mod ana ve ürün m/z değerleri şu şekildedir:

Tablo 3-1 Analiz Edilen Sfingolipidlerin Ana ve Ürün m/z Değerleri

Sfingolipidler	Ana iyon m/z	Ürün İyon m/z
16:0 SM (d18:1/16:0)	703.30	184.20
18:0 SM (d18:1/18:0)	731.40	184.20
24:0 SM (d18:1/24:0)	815.50	184.20
C16 Seramid (d18:1/16:0)	538.50	264.40
C16Seramid (d18:1/16:0)*IS	554.30	264.30
C18 Seramid (d18:1/18:0)	566.30	264.40
C20 Seramid (d18:1/20:0)	594.60	264.50
C22 Seramid (d18:1/22:0)	622.60	264.40
C24 Seramid (d18:1/24:0)	650.40	264.30

16:0 SM (d18:1/16:0), N-palmitoyl-D erythro-sphingosylphosphorylcholine

18:0 SM (d18:1/18:0), N-stearoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine

24:0 SM (d18:1/24:0), N-lignoceroyl-D-erythro sphingosylphosphorylcholine

C16 Ceramide (d18:1/16:0), N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine

C18 Ceramide (d18:1/18:0), N-stearoyl-D-erythro-sphingosine

C20 Ceramide (d18:1/20:0), N-arachidoyl-D-erythro-sphingosine

C22 Ceramide (d18:1/22:0), N-behenoyl-D-erythro-sphingosine

C24 Ceramide (d18:1/24:0); N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine

Hücreler İçin Örnek Hazırlanması

1. İnkübasyon medyumunu atıldı.
2. Kalan medyum PBS ile temizlendi.
3. 75 cm² flask için 3 mL tripsin-EDTA eklenir. 5-15 dakika beklendi.
4. Tripsini inhibe etmek için 3 ml medyum eklendi ve hücreler toplanarak satrifüj edildi.
5. 1ml PBS içinde hücre sayımı yapıldı.
7. Kalan pellete 3-5 x 10⁶ hücreye 1 mL olacak şekilde PBS eklendi.
8. Hücre çözeltisi 20 kere 1 saniye aralıklarla sonike edildi.
9. Hücre süspansiyonu 20000 x g'de +4°C'de 10 dakika satrifüj edildi. Süpernatant çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı.

LC-MS/MS İçin Örnek Hazırlanması: Sfingolipid ekstraksiyonu daha önce tarif edildiği şekilde yapıldı (Aslan ve ark, 2018).

1. 500 µL hücre lizatına, 5 µg/mL internal standart çözeltisinden 2 µl konuldu.
2. Üzerine 375 uL kloroform/metanol (1:2 v/v) ilave edildi.
3. Örnekler 30 sn sonike edildi.
4. 100 µL distile su ilave edildi.
5. Örnekler 5 dk vortekslendi.
6. Oda ısısında 30 dk bekletildi.
7. 2000 g'de 5 dk santrifüj edildi.
8. Süpernatant alındı.
9. 125 µL kloroform ve 125 µL distile su ilave edildi.
10. Vortekslendi ve 30 dk oda ısısında bekletildi.
11. Yaklaşık 500 µL üst-organik tabaka temiz tübe aktarıldı ve yüksekliği ayarlanabilir gaz dağıtım ünitesi ile sabit bir azot akışı altında oda sıcaklığında buharlaştırıldı (VLM, Bielefeld, Germany).
12. Örnek 100 µL metanol:formik asit (99.9:0.1) içinde çözöldü ve viallere kondu. Daha sonra HPLC örnek şişelerine konularak LC/MSMS analizi yapıldı.

3.5. GRP78 ve NFkB mRNA Düzeylerinin Belirlenmesi

Primer - Prob Tasarımı ve Optimizasyonu: Tüm mRNA dizileri için kaynak olarak Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) veritabanı kullanıldı. Primerler ve proplar daha önce olduğu gibi Oligoware 1.0 yazılımı kullanılarak tasarlandı (Yapar, et al. 2005) ve Metabion International AG tarafından sentezlendi (Steinkirchen, Germany). Çalışmamızda kullanılan primerler ve proplar **Tablo 3.2'**de gösterildiği gibidir. Real time PCR analizi One-run RT PCR kiti kullanılarak gerçekleştirildi (SNP Biyoteknoloji, Ankara, Turkey). Primer konsantrasyonları, maksimum ΔR_n 'yi (numunenin minimum ve maksimum floresansı arasındaki fark) oluşturacak minimum primer konsantrasyonunu belirlemek için, hem forward hem de reverse primerlerin değişen konsantrasyonları ile optimize edildi. Optimum prob konsantrasyonu, optimum primer konsantrasyonlarında farklı prob konsantrasyonlarının kullanılmasıyla belirlendi. En düşük Ct değerini (çoğaltılan hedef mRNA'nın sabit bir eşik değere ulaşması için gereken döngü sayısı) üreten prob konsantrasyonu, optimum prob konsantrasyonu olarak kullanıldı.

Tablo 3-2 Real-time PCR analizi için kullanılan primerler ve proplar. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man; ACTB, actin beta; GRP78, glucose-regulated protein 78-kd; NFκB1, nuclear factor kappa-b subunit 1.

Gen		Accession
ACTB	Forward Primer 5'-CCC AGC ACA ATG AAG ATC AAG ATC-3' Reverse Primer 5'-GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAGTC-3' Probe 5'-AGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAG-3'	OMIM-102630
GRP78	Forward Primer 5'-ACAATCAAGGTCTATGAAGGTGAAAGAC-3' Reverse Primer 5'-CTCGAAGAATACCATTACATCTATCTC-3' Probe 5'-ACTTCAATC TGTGGGACCCACGAG -3'	OMIM-138120
NFκB1	Forward Primer 5'-CCTCCACAAGGCAGCAAATAGACG -3' Reverse Primer 5'-AGAGTTAGCAGTGAGGCACCACT -3' Probe 5'-AGACAGTGA CAGTGTCTGCGACAGC-3'	OMIM-164011

RNA Ekstraksiyonu: Total RNA ekstraksiyonu, ticari bir kit olan AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, CA, USA) kullanılarak üretici talimatlarına göre yapıldı. İzole edilen RNA 70 µL TE tamponu [10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7.5)] ile çözüldü. 490 µL distile suya (1:50 seyreltme) 10 µL çözünmüş RNA eklenerek seyreltilti. Seyreltilen RNA örneğinin 260 ve 280 nm absorbansta spektrofotometrik ölçümü yapıldı. Örneklerin RNA saflığını 260 nm ve 280 nm'de yapılan ölçüm sonuçlarının oranı ile belirlenir. Buna göre, ölçüm sonucu 260nm/280nm < 2 olan örnekler analiz için uygun bulundu. Örneklerin RNA konsantrasyonu ise 260 nm'de yapılan ölçüm ile belirlendi. 260 nm'de bir absorbans ünitesi 40 µg/mL RNA'ya eşittir. Kantitatif real-time PCR (Q-RT-PCR) analizi için her bir örnek 66 ng/µL RNA içerecek şekilde RNaz içermeyen suyla seyreltilti.

Numune Hazırlanması: Her bir örnek için 5 µL (330 ng) Total RNA, 18.3 µL one run miks, 1.1 µL primer mix (10 pmol), 1.1 µL prob (5 pmol) ve 0.3 µL RT/hotstart Taq mix içerecek şekilde toplam 25,8 µL örnek karışımı hazırlandı.

Kantitatif PCR Analizi: RT-PCR analizi Mx3000p Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Kantitatif PCR analizi için PCR koşulları 1. Basamak 30 dakika 50 °C; 2. basamak 10 dakika 95 °C ve 3. Basamak 15 saniye 95 °C ardından 1 dakika 60 °C olmak üzere toplam 40 siklus olacak şekilde oluşturuldu. Her RNA örneği için Ct değerleri elde etmek üzere amplifikasyonun log-lineer fazı izlendi. Tüm reaksiyonlar üç kez tekrarlanarak beta aktine normalize edildi. Her genin mRNA seviyeleri daha önce belirtildiği gibi kat değişimi olarak $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ifade edildi (Tuzcu ve ark., 2017). İncelenen genlerin mRNA seviyelerinde gerçekleşen kontrol grubuna göreceli değişiklik, aşağıdaki denklemle hesaplandı:

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ hedef} - Ct \text{ aktin beta})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ uygulama grubu} - \Delta Ct \text{ kontrol}$$

3.6. Kaspaz-3 ve Kaspaz-12 Aktivitesinin Ölçümü

Hücre lizatlarındaki kaspaz-3 (Catalog #K102-100; BioVision Milpitas, CA, USA) ve kaspaz-12 aktivitesi (Catalog #K139-100; BioVision Milpitas, CA, USA) ticari fluorometrik kitler ile ölçüldü. Deney, substrat olan Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-7-amino-4-triflorometil kumarin (AFC)'nin ayrılmasının tespit edilmesine dayanmaktadır. Mavi ışık yayan ($\lambda_{\text{maks}} = 400 \text{ nm}$) DEVD-AFC'nin ilgili kaspazlarla ayrılması üzerine serbest AFC'nin yaydığı sarı-yeşil floresans ($\lambda_{\text{maks}} = 505 \text{ nm}$) florometre kullanılarak ölçülebilir. Kontrol grubunun AFC floresansı ile uygulama yapılan deney gruplarındaki AFC floresansının karşılaştırılması, kaspaz aktivitesindeki değişiminin belirlenmesini sağlar. Bunun için yaklaşık $1-5 \times 10^6$ hücre içeren hücre lizatı kullanıldı. Kaspaz-3 için 50 μg ve kaspaz-12 için 100 μg hücre lizat proteini içeren örnek miktarı belirlendi. Hücre lizatı kit ile sağlanan liziz tamponu içinde yeniden süspanse edilerek buz üzerinde 10 dakika bekletilerek kit prosedürü uygulandı.

3.7. Sfingomyelinaz Aktivitesinin Ölçümü

Nötral-SMAz aktivitesi ticari test kiti (Abcam, Catalog # ab138876, Cambridge, UK) ile ölçülmüştür. Deney, sfingomiyelinin hidrolizi sonucu oluşan fosfokolinin kolorimetrik bir prob ile dolaylı olarak ölçülmesi ile SMAz aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanır. Örneklerin SMAaz düzeylerinin ölçülebilmesi için öncelikle bilinen miktarlarda sfingomiyelinaz standartlarına ait absorbans değerlerinin standart eğrisi

oluşturuldu. Örneklerin SMaz aktivitesi (mU/mL) standart eğride karşılık gelen absorbans değerlerinden hesaplandı.

3.8. Seramid-1-Fosfat Düzeylerinin Ölçümü

Seramid-1-fosfat düzeyleri ELISA kit (Shanghai YL Biotech Co., Ltd. Catalog # YLA3764HU Shanghai, China) ile ölçüldü. Bu test kiti sandviç ELISA yöntemi ile çalışır. Kit prensibine göre hücresel C1P monoklonal antikör tarafından yakalanır ve biyotin etiketli poliklonal bir antikör ile tespit edilir. Daha sonra biyotinile antikora streptavidin-peroksidaz konjugatı bağlanır. TMB substrat, enzim konjugatı tarafından 450 nm'de ölçülebilen sarı renkli bir ürüne dönüştürülür. Bilinen C1P standartlarının absorbans değerlerinin standart eğrisi, GraphPad Prism Software program for windows version 5.03. (Graph- Pad Software Inc.) kullanılarak C1P standart konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak çizildi. Numunelerdeki C1P miktarı, standart eğri kullanılarak karşılık gelen absorbans değerlerinden hesaplandı.

3.9. Protein Tayini

ARPE-19 Hücre lizatlarında protein tayini modifiye Bredford yöntemine dayanan ticari bir kit (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210) ile yapıldı (Bradford, 1976).

İşlemler: 1 µL hücre lizatı 999 µL distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 mL CPPA (Coomassie Plus Protein Assay) reaktifi eklendi ve 595 nm'de absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okutuldu. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip 2 µg/µL bovin serum albümin (BSA; Albümin Bovina, Pierce-23209) kullanılarak yapıldı.

Protein Miktarının Hesaplanması: Hücre lizatlarındaki protein miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SigmaStat istatistiksel yazılım versiyonu 3.5 (Sigma, St. Louis, MO, USA) kullanılarak yapıldı. Her ölçüm için istatistiksel analiz, şekil ve tablo açıklamalarında açıklanmıştır. Grupları SigmaStat istatistik yazılımı ile karşılaştırmak için önce normallik testi yapıldı. Başarılı bir test, verilerin normal dağılıma sahip bir popülasyondan alınması durumunda verilerin beklenen modelle eşleştiğini gösterdi. Örnek veriler normal olarak dağıtılmamışsa, normallik testi

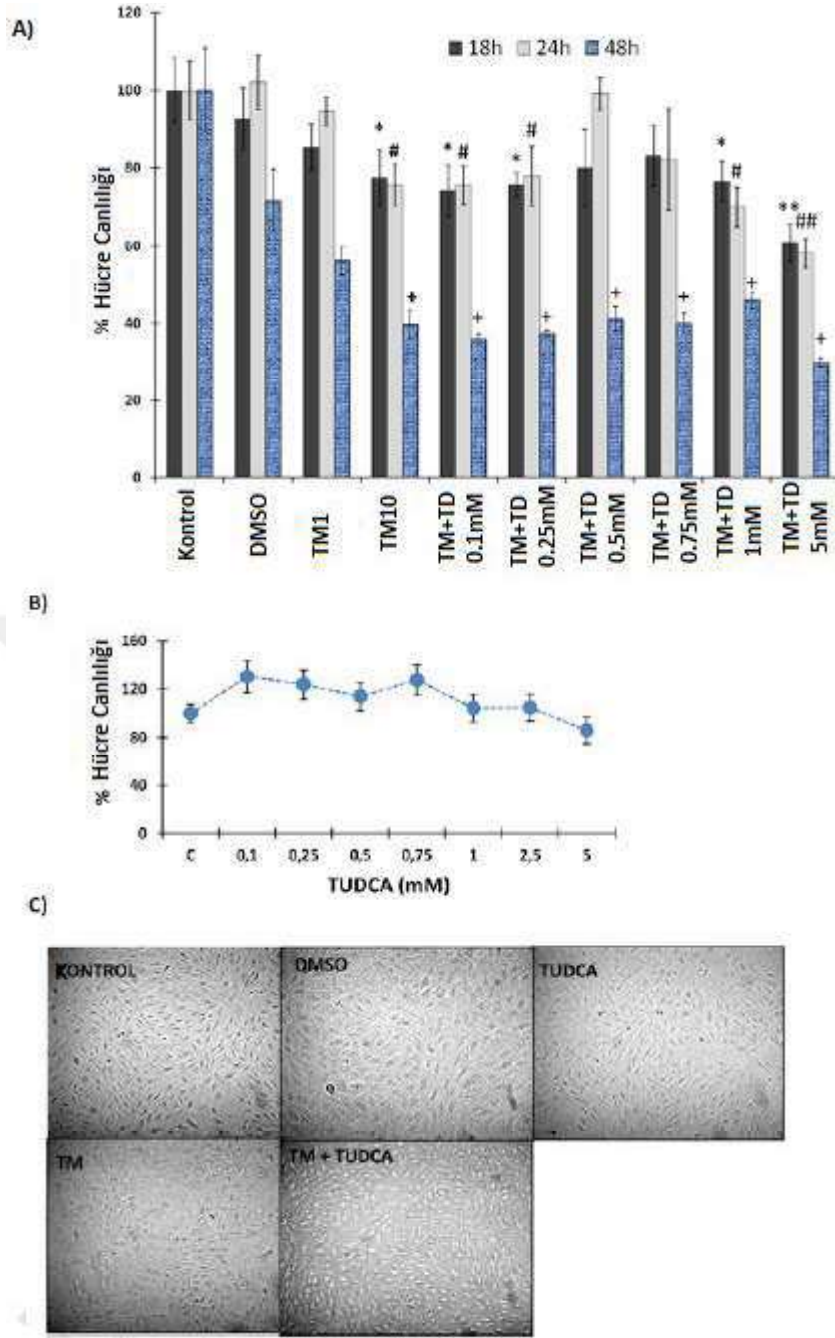
başarısız oldu. Böyle bir durumda yazılım parametrik olmayan bir test yaptı. Deney grupları ya Tek Yönlü ANOVA (varyans analizi) ya da Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunda, tam olarak hangi grupların farklı olduğunu belirlemek için post-hoc testler olarak da bilinen çoklu karşılaştırma prosedürleri kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığının Analizi

Şekil 1A, RPE hücrelerinin zaman ve doz bağımlı canlılık analizini göstermektedir. ARPE-19 hücrelerinin 18-48 saat boyunca 1 μ L/mL DMSO ve 1 μ g/mL TM ile inkübasyonu sonucu sitotoksosite gözlenmedi. Aynı sürelerde 10 μ g/mL TM uygulamasının ise anlamlı derecede sitotoksik olduğu görüldü. 10 μ g/mL TM ile 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelerin canlılığı, kontrol grupları ile kıyaslandığında, TM uygulamasının hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı görüldü. Hücrelere 0,1–0,25 mM veya 1–5 mM TUDCA ile 10 μ g/mL TM'nin birlikte uygulanması hücre canlılığını arttırmadı. 24 saat boyunca 0.5 mM TUDCA ve 10 μ g/mL TM birlikte uygulanan deney grubunda hücre canlılığı belirgin bir artış gösterdi (şekil 1A). Şekil 1B, 24 saat boyunca uygulanan 0.1-5 mM TUDCA'nın hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkisini göstermektedir. TUDCA uygulaması yapılan hücreler ile uygulama yapılmayan kontroller karşılaştırıldığında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Şekil 1C, 24 saat boyunca 1 μ L/mL DMSO; 0.5 mM TUDCA; 10 μ g /mL TM ve 10 μ g/mL TM + 0.5 mM TUDCA uygulanan ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikleri göstermektedir. 10 μ g/mL TM ile muamele edilen hücrelerde, hücre büzülmesi, ayrılması ve yuvarlanması gibi morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Ayrıca TM grubunda hücre popülasyonunda bir azalma kaydedildi.



Şekil 4.1 Hücre Canlılığının Analizi. **A)** Hücre canlılık analizi: **DMSO**, 1 µg/mL dimetilsülfoksit uygulanan hücreler; **TM1**, 1 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; **TM10**, 10 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; **TM + TD**, 10 µg/mL tunikamisin ve belirtilen dozlarda TUDCA uygulanan hücreler. Gösterilen veriler 6 ayrı deneyi temsil etmektedir. Değerler ortalama ± SD olarak verildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapıldı ve gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirildi. *, $p < 0.001$ 18h kontrol ile karşılaştırıldığında. **, $p < 0.001$ 18h kontrol, 18h DMSO, 18 h TM1, 18 h TM + TD 0.5 mM ve 18 h TM + TD 0.75 mM ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0.001$ 24h kontrol, 24 h DMSO ve 24 h TM + TD 0.5 mM ile karşılaştırıldığında. ##, $p < 0.001$ 24h kontrol, 24h DMSO, 24 h TM1, 24 h TM + TD 0.5 mM ve 24 h TM + TD 0.75 mM ile karşılaştırıldığında. +, $p < 0.001$ 48h kontrol ile karşılaştırıldığında. **B)** TUDCA'nın 24 saatlik zaman diliminde hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkisi: Gösterilen veriler 3 ayrı deneyi temsil etmektedir. Değerler ortalama ± SD olarak verildi. **C)** ARPE-19 hücrelerinin ters ışık mikroskobu altında gözlenen morfolojik değişiklikleri (20X büyütme). **DMSO**, 24 saat boyunca 1 µg/mL dimetilsülfoksit uygulanan hücreler; **TUDCA**, 24 saat boyunca 0.5 mM taurodeoksikolik asit

uygulanan hücreler; **TM**; 24 saat boyunca 10 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; **TM+TD**, 24 saat boyunca 10 µg/mL tunikamisin ve 0.5 mM taurodeoksikolik asit uygulanan hücreler.

Elde edilen verilere göre diğer deneylerde her gruba uygulanacak dozlar belirlendi. Belirlenen dozlar deney gruplarına 24 saat süre ile uygulandı.

Deney Gruplarına Uygulanan Dozlar

Kontrol Grubu: Hücre medyumunu

DMSO Grubu: 1 µL / mL DMSO,

Tunikamisin Grubu: 10 µg / mL TM,

TUDCA Grubu: 0.5 mM TUDCA,

Tunikamisin+TUDCA Grubu: 10 µg / mL TM + 0.5 mM TUDCA.

4.2. Sfingomiyelin ve Seramid Düzeyleri

ARPE-19 hücrelerinde ölçülen endojen sfingolipid düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir. Deney gruplarında ölçülen sfingomiyelin ve C16–C20 CER'lerde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. 10 µg/mL TM uygulanan ARPE-19 hücrelerinin C22 ve C24 CER seviyelerinde diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulundu. Sadece TM uygulanan grup ile 0.5 mM TUDCA +10 µg/mL TM uygulanan grup karşılaştırıldığında, TUDCA uygulamasının uzun zincirli CER seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olduğu görüldü. Bununla birlikte, 10 µg/mL TM + 0.5 mM TUDCA uygulanan hücrelerin C22 ve C24 CER seviyeleri, kontrol, DMSO ve TUDCA gruplarına göre hala anlamlı derecede yüksek bulundu.

Tablo 4.1: ARPE-19 Hücrelerinde Sfingolipid Düzeyleri. SM, sfingomyelin; DMSO, 1 µg/mL dimetilsülfoksit uygulanan hücreler; TM10, 10 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; TUDCA, 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler; TM + TD, 10 µg/mL tunikamisin ve 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler.

Sfingolipidler (ng/mg protein)	Kontrol	DMSO	TUDCA	TM	TM+TU DCA
16:0 SM (d18:1/16:0)	847,63 ± 66,99	751,87 ± 24,19	733,76 ± 39,49	739,98 ± 56,56	768,16 ± 40,94
18:0 SM (d18:1/18:0)	299,77 ± 29,59	327,45 ± 29,32	297,56 ± 35,94	302,22 ± 28,29	334,33 ± 55,17
24:0 SM (d18:1/24:0)	130,63 ± 12,41	133,58 ± 8,52	121,65 ± 14,00	137,61 ± 8,80	127,46 ± 9,00
C16 Seramid (d18:1/16:0)	116,86 ± 8,22	101,35 ± 2,90	103,90 ± 14,12	117,10 ± 5,20	93,64 ± 8,41
C18 Seramid (d18:1/18:0)	37,72 ± 4,06	34,69 ± 1,74	36,83 ± 5,22	33,43 ± 2,87	33,12 ± 4,70
C20 Seramid (d18:1/20:0)	24,74 ± 4,21	27,16 ± 3,45	21,40 ± 2,63	23,79 ± 1,56	20,68 ± 2,45
C22 Seramid (d18:1/22:0)	47,06 ± 4,70	50,92 ± 3,52	38,39 ± 2,91	130,21 ± 6,61*	97,88 ± 1,54**
C24 Seramid (d18:1/24:0)	267,55 ± 5,82	241,14 ± 10,30	257,30 ± 7,63	402,06 ± 9,01*	302,03 ± 9,23**

*, p < 0,001, Kontrol, DMSO, TUDCA ve TM + TUDCA grubu ile karşılaştırılması; **, p < 0,001 vs. Kontrol, DMSO ve TUDCA grubu ile karşılaştırılması.

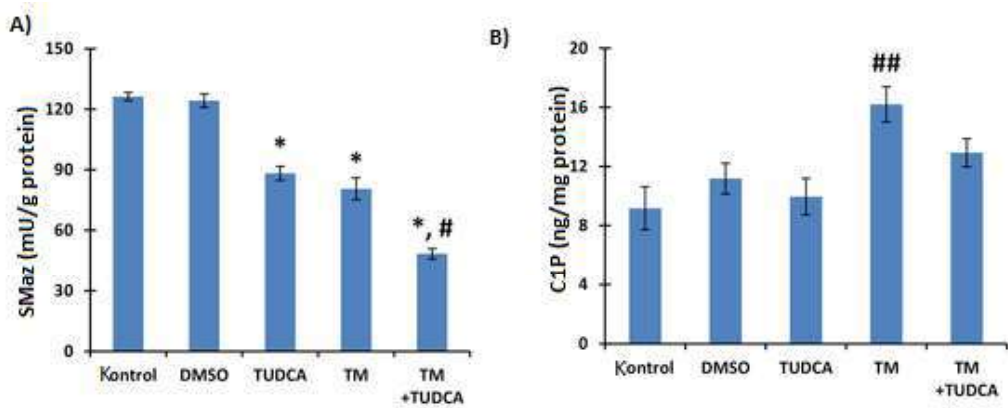
Tüm değerler ortalama ± SD olarak verildi. Her deney grubunda n = 3'tür. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirildi.

4.3. Nötral Sfingomiyelinaz Aktivitesi

Tunikamisin uygulamasıyla uyarılan ER stresinin SMaz aktivitesinde azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. 24 saat boyunca 10 µg/mL TM uygulanan hücrelerin SMaz aktivitesinin (80,52 ± 5,39 mU /g protein), kontrol grubu hücrelerinin SMaz aktivitesi ile (126,21 ± 2,06 mU/g protein) veya DMSO ile muamele edilmiş hücrelerin SMaz aktivitesi ile (124,25 ± 3,36 mU/g protein) karşılaştırıldığında önemli oranda azalmış olduğu görüldü. 0.5 mM TUDCA uygulanan hücrelerde de benzer şekilde SMaz aktivitesinin azaldığı (88,22 ± 3,48 mU / g protein) görüldü. 10 µg /ml TM + 0.5 mM TUDCA uygulanan hücrelerin SMaz aktivitesinin ise (48,33 ± 2,60 mU / g protein), sadece TM veya sadece TUDCA uygulanan hücrelere göre daha fazla azaldığı görüldü (şekil 4.2A).

4.4. Seramid-1-Fosfat Düzeyleri

ARPE-19 hücrelerine 24 saat boyunca 10 µg/mL TM uygulanmasının, kontrol, DMSO ve TUDCA uygulanan gruplara göre C1P seviyelerinde önemli bir artışa (ortalama ± SD) neden olduğu görüldü. Kontrol, DMSO, TUDCA, TM ve TM + TUDCA gruplarının C1P seviyeleri sırasıyla $9,17 \pm 1,45$; $11,18 \pm 1,03$; $9,96 \pm 1,24$; $16,20 \pm 1,19$ ve $12,93 \pm 0,95$ ng/mg protein ölçüldü (**şekil 4.2B**). Tunikamisin ile muamele edilen hücrelere 0.5 mM TUDCA uygulanmasının, C1P seviyelerini hafifçe artırdığı görüldü. Kontrol, DMSO ve TUDCA uygulanan grupların C1P seviyeleri arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı.



Şekil 4.2 A) Nötral Sfingomyelinaz Aktivitesi B) Seramid 1-P Düzeyleri. DMSO, 1 µg/mL dimetilsülfoksit uygulanan hücreler; TM10, 10 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; TUDCA, 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler; TM + TD, 10 µg/mL tunikamisin ve 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler. Tüm değerler ortalama ± SD olarak verildi. Gösterilen veriler 8 ayrı deneyi temsil etmektedir. SMaz ölçümleri için istatistiksel analiz Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapıldı. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirildi. *, p < 0,001 kontrol ve DMSO ile karşılaştırılması #, p < 0,001 TUDCA ve TM ile karşılaştırılması. Seramid-1-P ölçümleri için istatistiksel analiz Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapıldı. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirildi. ##, p < 0,05 vs. kontrol, DMSO ve TUDCA ile karşılaştırılması.

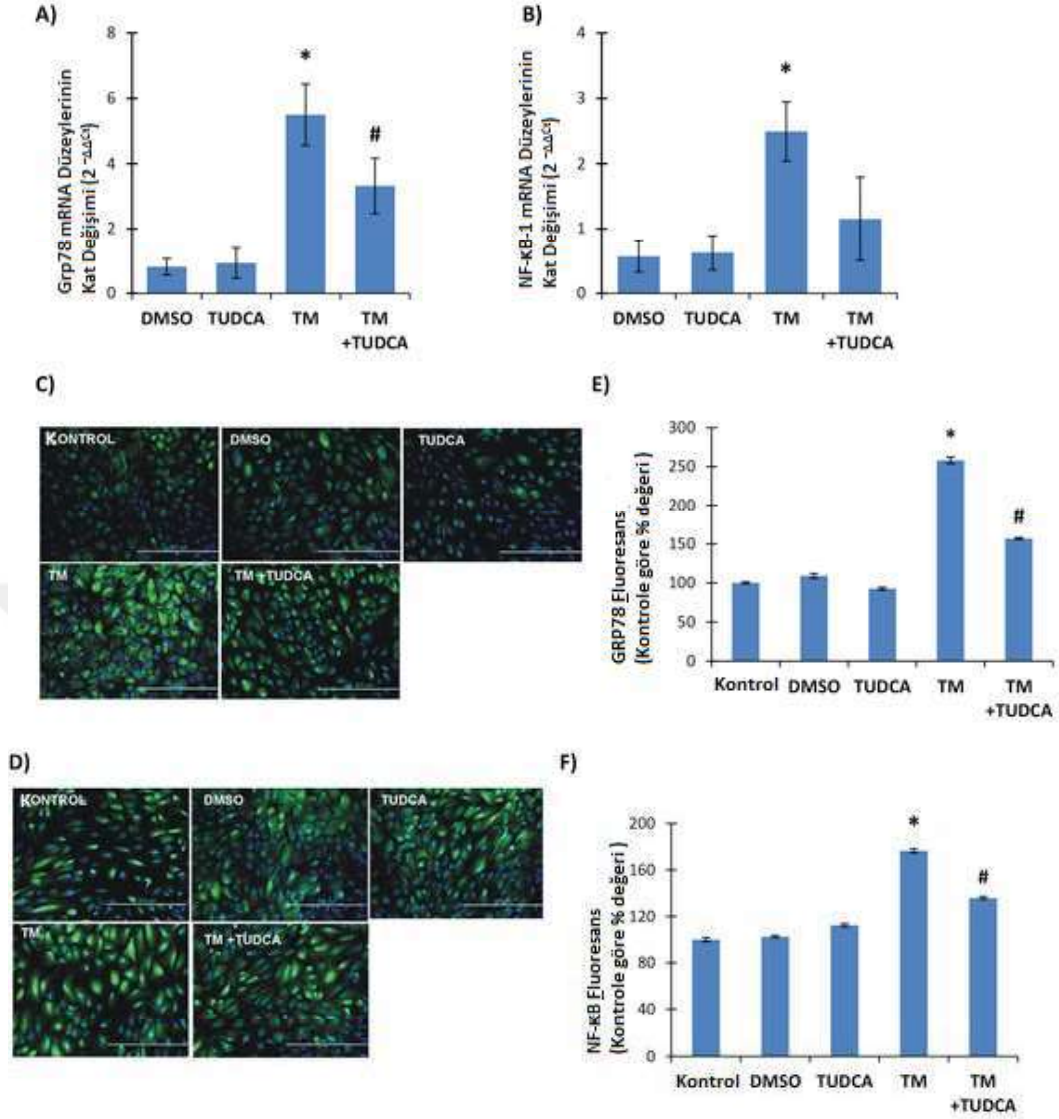
4.5. GRP78 mRNA ve GRP78 Protein Seviyeleri

24 saat boyunca 10 µg / mL TM uygulanmış olan TM ve TM + TUDCA grubundaki ARPE-19 hücrelerinin, GRP78 mRNA düzeylerinin DMSO ve TUDCA gruplarına göre arttığı görüldü. GRP78 mRNA düzeylerinin artışının da gösterdiği gibi TM ve TM + TUDCA grubunda ER stresinin artmış olduğu gözlemlendi. TM ve TM + TUDCA gruplarının GRP78 mRNA seviyeleri arasında ise anlamlı bir fark olduğu bulundu. Buna göre, TM uygulanan hücrelere 0.5 mM TUDCA uygulamasının GRP78 mRNA seviyelerini düşürdüğü görüldü (**şekil. 4.3A**). Ayrıca TM grubu hücrelerinde GRP78'in immün boyanmasının arttığı gözlemlendi (**şekil. 4.3C**). Pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesine ve yoğunluğuna göre elde edilen immüno boyama skorların,

TM ile muamele edilmiş ARPE-19 hücrelerinde istatistiksel olarak arttığı görüldü (**şekil. 4.3E**).

4.6. NF-κB1 mRNA and NF-κB p65 Protein Düzeyleri

ARPE-19 hücrelerine 24 saat boyunca 10 µg/mL TM uygulanmasının, NF-κB1 mRNA düzeylerini DMSO, TUDCA ve TM + TUDCA gruplarına göre önemli miktarda artırdığı görüldü (**şekil. 4.3B**). Tunikamisin uygulanan hücrelere 0.5 mM TUDCA uygulanmasının ise NF-κB1 mRNA seviyelerini hafifçe artırdığı gözlemlendi. Bununla birlikte DMSO ve TUDCA uygulanan gruplar arasında NF-κB1 mRNA seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı. Tunikamisin uygulanan hücrelerde NF-κB p65 proteininin immüno boyanmasının arttığı gözlemlendi (**şekil. 4.3 D**). Pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesine ve yoğunluğuna göre elde edilen immüno boyama skorları, TM ile muamele edilmiş ARPE-19 hücrelerinde istatistiksel olarak arttığı kaydedildi (**şekil. 4.3F**).



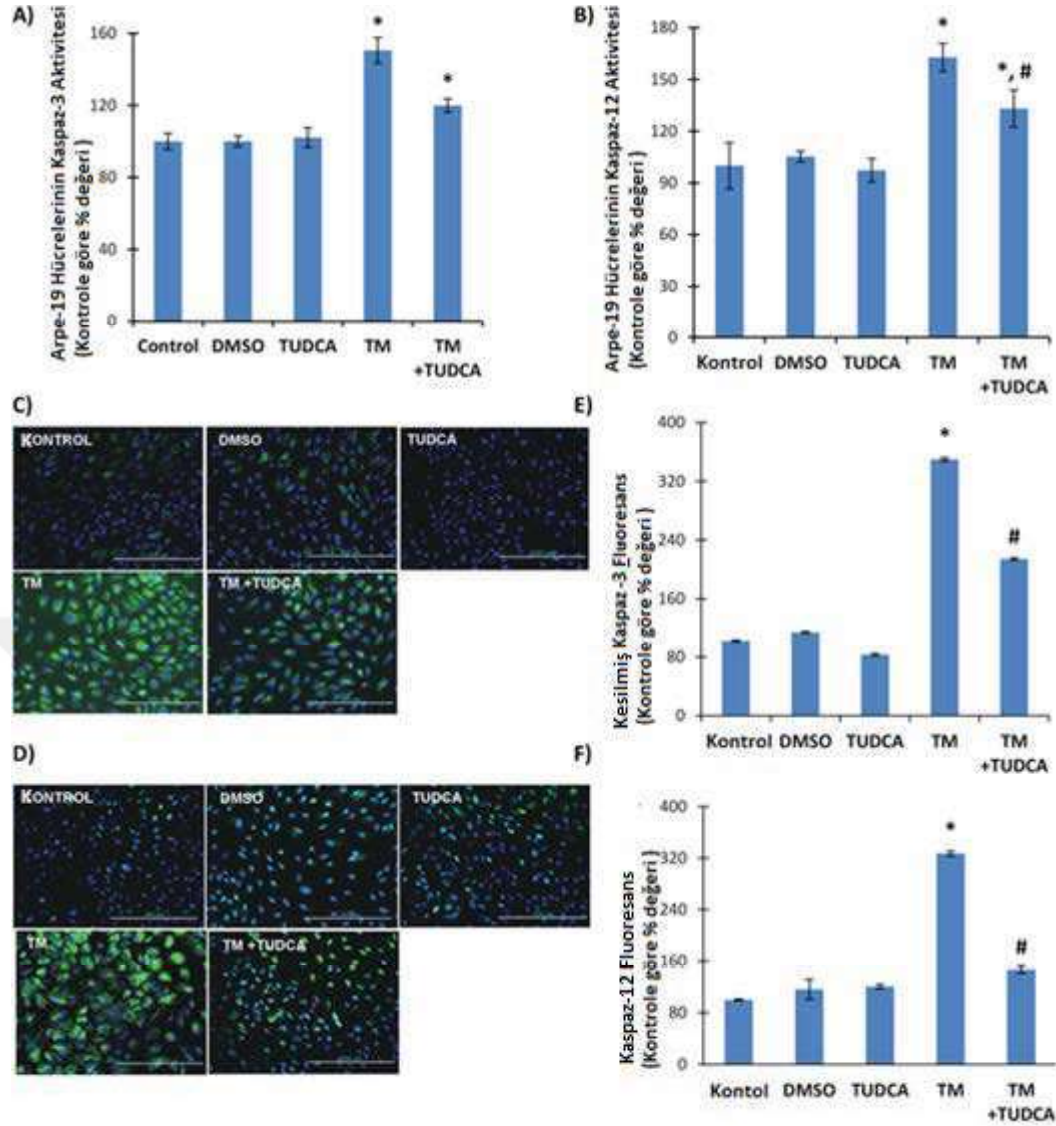
Şekil 4.3 GRP78 ve NFkB Düzeyleri. A-B) GRP78 ve NF-kB mRNA düzeyleri C-D) ARPE-19 hücrelerinde GRP78 ve NF-kB immüno Floresans boyaması E-F) Floresans boyamanın ImageJ yazılımı ile hesaplanması DMSO, 1 µg/mL dimetilsülfoksit uygulanan hücreler; TM10, 10 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; TUDCA, 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler; TM + TD, 10 µg/ml tunikamisin ve 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler. NFkB1 ve GRP78 mRNA düzeylerinin kat değişimi (2^{-ΔΔCt}). Tüm değerler ortalama ± SD olarak verildi. Her deney grubunda n = 3'tür. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar Holm-Sidak method ile değerlendirilmiştir. *, p < 0.05 DMSO, TUDCA ve TM + TUDCA ile karşılaştırıldığında. #, p < 0.05 DMSO ve TUDCA ile karşılaştırıldığında. C-D) ARPE-19 hücrelerinde sırasıyla GRP78 ve NFkB'nin temsili immüno Floresans boyaması. E-F) Floresans boyamanın ImageJ yazılımı ile hesaplanması. Gösterilen veriler 3 ayrı deneyi temsil etmektedir. Değerler ortalama ± SD olarak verildi. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirildi. *, p < 0,001 Kontrol, DMSO, TUDCA ve TM + TUDCA karşılaştırıldığında. #, p < 0,001 Kontrol, DMSO, TUDCA ile karşılaştırıldığında.

4.7. Kaspaz Aktivitesinin Tayini

ARPE-19 hücrelerine 24 saat boyunca 10 µg/mL TM uygulanmasının, kaspaz-3 ve kaspaz-12 aktivitesinde DMSO ve TUDCA uygulanan gruplara göre önemli bir artışa neden olduğu görüldü (şekil 4.4 A-B). 0.5 mM TUDCA uygulamasının TM

uygulanan hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesi üzerinde hiçbir etkisi görülmedi (**şekil 4.4 A**) Bununla birlikte TM ve TM + TUDCA grupları arasında kaspaz-12 aktivitesi açısından anlamlı bir fark bulundu. Tunikamisin uygulanan hücelere 0.5 mM TUDCA uygulamasının kaspaz-12 aktivitesinde azalmaya neden olduğu görüldü. (**şekil 4.4 B**). Tunikamisin uygulanan hüclerde kesilmiş kaspaz-3 ve kaspaz 12 proteininin immun boyanmasının arttığı gözlendi (**şekil 4.4 C-D**). Pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesine ve yoğunluğuna göre elde edilen immüno boyama skorları, TM ile muamele edilmiş ARPE-19 hücrelerinde istatistiksel olarak arttığı görüldü (**şekil 4.4 E-F**).





Şekil 4.4 ARPE 19 Hücrelerinde Kaspaz 3 ve Kaspaz 12 Aktivitesi. A) ARPE-19 hücrelerinde Kaspaz-3 aktivitesi B) Kaspaz-12 aktivitesi. DMSO, 1 µg/mL dimetilsülfoksit uygulanan hücreler; TM10, 10 µg/mL tunikamisin uygulanan hücreler; TUDCA, 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler; TM + TD, 10 µg/mL tunikamisin ve 0.5 mM TUDCA uygulanan hücreler. Gösterilen veriler 7-8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir. *, $p < 0,001$ kontrol, DMSO ve TUDCA ile karşılaştırıldığında. # $p < 0,001$ TM ile karşılaştırıldığında. C-D) ARPE-19 hücrelerinde sırasıyla ayrılmış kaspaz -3 ve kaspaz -12'nin immünofloresan boyaması. E-F) Floresans boyamanın ImageJ yazılımı ile hesaplanması. Gösterilen veriler 3 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile değerlendirilmiştir. *, $p < 0,001$ kontrol, DMSO, TUDCA ve TM + TUDCA ile karşılaştırıldığında. #, $p < 0,001$ kontrol, DMSO ve TUDCA ile karşılaştırıldığında.

5. SONUÇ

Sonuç olarak RPE hücrelerinde TM uygulaması, seramid, C1P, GRP78 ve NFkB seviyelerini artırmış ve kaspaz-3 ve -12'nin aktivasyonuna yol açmıştır. ER stresinin TUDCA tarafından inhibisyonu, seramid/C1P seviyelerini düşürmüş, kaspaz-12 aktivitesini azaltmış, GRP 78 ve NF-kB1 ekspresyonunda önemli bir azalmaya neden olmuştur.



6. TARTIŞMA

Endoplazmik retikulum hücresel homeostazisin sağlanması için gerekli bir çok fonksiyonun gerçekleştirildiği bir organeldir. Endoplazmik retikulumun anahtar fonksiyonları arasında protein katlanması, olgunlaştırılması, taşınması, lipid sentezi ve intraselüler kalsiyum homeostazinin sağlanması gelir (Fan ve Simmen 2019). Katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikerek kararsız protein homeostasına yol açması, ER stresi olarak tarif edilir. Hücreler ER stresini azaltmak ve protein homeostazisini yeniden sağlamak için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak bilinen adaptif bir sistemi başlatır. Fakat ER stres periyodunun uzaması UPR cevabının başarısız olarak apoptotik kaskadın aktifleşmesine yol açar (Lee ve ark., 2015). ARPE-19 hücrelerinin TM ile inkübasyonun ER stresini uyardığı ve hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı daha önce bildirilmiştir (Kucuksayan, et al. 2014). Ayrıca ER stresi varlığında sifingomyelin metabolizmasında değişim olduğu ve seramid birikimi sonucunda apoptozisin meydana geldiği daha önce rapor edilmiştir (Lei ve ark., 2007). Tunikamisin protein glikosilasyonunu inhibe ettiği için etkisini ER stresini tetikleyerek gösterir (Price ve Tsvetanova 2007). Çalışmamızda RPE hücrelerinde ER stresini tetikleyecek doz önceki çalışmalar referans alınarak belirlenmiştir (Kucuksayan ve ark., 2014). Buna göre RPE hücrelerinin 10 µg/mL TM ile inkübasyonu ER stresine yol açmış ve TM'nin hücrelere doğrudan zarar verdiği gösterilmiştir. Bu bulgular, TM'nin in vivo ve in vitro olarak retina toksisitesine yol açtığını gösteren önceki raporlarla uyumludur (Anderson ve ark., 1988; Boriushkin ve ark., 2015).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, ER stresinin uyarılması seramid artışına neden olmuştur. Bununla birlikte çalışmamız, RPE hücrelerine TM uygulaması sonucu gerçekleşen seramid artışının bir ER stres inhibitörü olan TUDCA tarafından düzenlenebildiğine dair yeni gözlemler sunmuştur. Kaspaz-12 aktivitesinin de dahil olduğu apoptotik yanıtların inhibisyonunun, TUDCA yoluyla düzenlenebildiği görülmüştür. Deneysel hücre modelimizde oluşan sitotoksiste, ER stres cevabı ile uyarılan hücre ölüm sinyali ile ilişkili olabilir. Çünkü TM uygulanan hücrelere bir ER stres inhibitörü olan TUDCA (0.5 mM TUDCA) uygulandığında hücre canlılığında belirgin bir artış görülmüştür (**şekil 4.1**). TUDCA, UPR'nin üç dalında erken sinyalizasyon adımlarının başlatılmasını kısıtlar, aktif transkripsiyon faktörlerinin oluşumunu ve GRP78'in promotörüne bağlanmasını önler. TUDCA'nın

UPR'yi inhibe etme yeteneği, ER stresıyla ilgili hastalıkların tedavisinde etkili bir kimyasal şaperon görevi görmesini sağlar (Berger ve Haller 2011).

ER stresinin RPE hücrelerinde apoptozis ve sitotoksisiteyi uyarma yeteneği yapılan çalışmalarla belgelenmiştir (Pesonen ve ark., 2012; Wengve ark., 2017; Zhang ve ark., 2019). Çalışmamızda TM uygulanan RPE hücrelerinde C22 – C24 CER düzeylerinin kontrol hücrelerine göre önemli oranda arttığı gözlenmiştir (**tablo 4.1**). Sonuçlarımız, ultraviyole ve oksidatif stres sonucu tetiklenen ER stres ve seramid birikiminin retinal pigment epitel hücrelerinde apoptozise neden olduğunu gösteren daha önceki bir çalışmayı desteklemektedir (Yao ve ark., 2013). Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, TM uygulanan ARPE-19 hücrelerinde uzun zincirli yağ asidi içeren seramid düzeylerinin arttığını bildiren ilk çalışmadır. Daha önce eksojen seramidin sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz (SERCA) inhibisyonuna yol açarak ER'de $[Ca^{2+}]$ tükenmesini tetiklediği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2014). Seramidin bu etkisi, ER stresinin klasik bir indükleyicisi olan thapsigargin'e benzemektedir (Abdullahi ve ark., 2017). Thapsigargin, SERCA'yı seçici olarak inhibe ederek ER lümeninden Ca^{2+} tükenmesine ve ER stresinin aktivasyonuna neden olur. Sitozol ve mitokondriyal matristeki Ca^{2+} konsantrasyonu artışı, eksojen seramid kaynaklı apoptozisde önemli bir rol oynar (Pinton ve ark., 2001).

Tunikamisin ile birlikte TUDCA uygulanması uzun zincirli CER seviyelerini yalnızca TM uygulanan hücrelere göre önemli dercede azaltmıştır. TUDCA tedavisini takiben C22–C24 CER'lerde azalma olması nedeniyle TUDCA'nın ER stresini hafiflettiği yönünde yeni bir mekanizma sunabileceği düşünülmektedir.

Seramid-1-fosfat, seramidin kendisi gibi, muhtemelen hem yapısal hem de hücre sinyal molekölü olarak performans gösterebilir. Retinal pigment epitel hücreleri, hücre proliferasyonunu desteklemek ve hücreleri çeşitli yaralanmalardan korumak için bir seramidin antagonisti olarak işlev gören C1P üretebilir (Simon ve ark., 2019). Seramid-1-fosfat, fotoreseptör sağ kalımını ve farklılaşmasını destekler (Miranda ve ark., 2011a). Bu sfingolipidin retina hücre tiplerindeki hayati süreçlerin değiştirilmesinde artan rolü ve retina dejenerasyonlarındaki işlevi onları bu hastalıkların tedavisinde potansiyel hedefler haline getirir. Bir çalışmada, keratinositlerde thapsigargin ile ER'nin uyarılması sonucu C1P üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da RPE hücrelerinin 24 saat

boyunca TM ile inkübasyonun C1P seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca TUDCA tedavisi ile ER stresinin inhibisyonunun C1P seviyelerini düşürebileceğini göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, TM uygulanan RPE hücrelerinde C1P seviyelerinde artış olduğunu bildiren ilk çalışmadır. Son zamanlarda biyolojik olarak aktif sfingolipid sentezi hakkındaki edinilen bilgiler, özellikle seramid ve C1P gibi moleküllerin hücre sağ kalımında merkezi rollerini belirlemiştir. Sfingolipid metabolizmasında ana molekül olan seramid, operasyonel olarak antiproliferatif ve apoptotik reaksiyonları tetiklerken, C1P bu molekülü hücre çoğaltan bir lipid yapan yanıtları indükler (Miranda ve ark., 2011b). Hücre modelimizde C22 – C24 CER ve C1P'nin artmış olması, her iki lipid türünün sentezinin ER stresinde aktive olduğunu göstermektedir.

Sfingomyelinaz enzimi sfingomiyelini fosfokolin ve seramide dönüştürür. Seramid üretimi hemen hemen her memeli hücresinde apoptotik uyaranları güçlendirmektedir (Mullen ve Obeid, 2012). Bu nedenle tunikamisin uygulaması ile SMaz aktivitesinin azalmasının hücresel strese bir adaptasyon mekanizması olduğu düşünülmüştür. Şekil 4.2A'da görüldüğü gibi çalışmamızda tunikamisin uygulaması, SMaz aktivitesini kontrole göre azaltmıştır, ancak kaspaz aktivasyonunu engellememiştir. Bunun nedeni, seramidin sfingomiyelin sentaz için bir substrat olarak hizmet vermesi ve azalmış seramid üretiminin azalmış sfingomiyelin sentaz aktivitesine yol açması, ortamda hala apoptotik hücre sinyallemede hizmet etmek için yeterli miktarda seramid bulunmasına yol açması olabilir (Luberto ve Hannun 1998). Bununla birlikte, TM + TUDCA uygulanan hücrelerde gözlemlendiği gibi SMaz aktivitesinin %50'den fazla inhibisyonunda, sfingomiyelin sentezini sürdürmek için hücrede bulunan seramid kullanılır ve bu nedenle apoptotik sinyal oluşturmaz. ARPE-19 hücrelerine tunikamisin + TUDCA uygulamasında, sfingomiyelin:seramid oranı, sfingomiyelin lehine ve kaspaz-12 indüksiyonunu önemli ölçüde azaltmak için yeterli görünmektedir.

ER stres ajanı TM'nin 24 saat boyunca RPE hücrelerine uygulanması, GRP78'in mRNA ve protein seviyelerinde önemli bir artışa neden olmuştur (şekil 4.3A). GRP78'in mRNA seviyesinin artmış olması, ER stresinin varlığı için yerleşik bir gösterge haline gelmiştir (Zhu ve Lee, 2015). Endoplazmik retikulum stresi oluşmamış hücrelerde GRP78, ER içinde bir şaperon olarak çalışır ve bazıları PERK ile bağlı bulunabilir. Katlanmamış proteinler üretildiğinde, GRP-78 PERK'den

uzaklaştırılır ve katlanmamış proteinlere bağlanır, böylece ER'de homeostazı sürdürmeye zorlanır. GRP78'in PERK'den ayrılması, PERK'in fosforilasyonuna izin verir (Zhu ve Lee 2015)

Çalışmamızda, TM + TUDCA uygulanan hücrelerde gerçekleşen ER stresinin inhibisyonunun GRP78 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu sonuç, ER stres tepkisinin RPE hücrelerinde TUDCA tedavisi ile değiştirildiğini ortaya koymuştur.

Sadece TM uygulaması, RPE hücresindeki NF-kB1 mRNA ve protein seviyelerini de arttırmıştır (**şekil 4.3B**). Çalışmamızda elde edilen veriler, TM kaynaklı ER stresinin transkripsiyon faktörü NF-kB'nin aktivasyonunu tetiklediğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (Hun. ve ark., 2004; Lin ve ark., 2012; Pahl ve Baeuerle, 1995). Ikb/NF-kB transkripsiyon yolunun aktivasyonunun, hücre proliferasyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir (Oeckinghaus ve Ghosh, 2009). Uzun süreli ER stresini üç aşamadan geçmektedir; adaptasyon, alarm ve apoptozdur (Xu ve ark., 2005). Adaptasyon başarısız olduğunda, ER stresini NF-kB'nin aktivasyonunu tetikler (Lin ve ark., 2012). Uzun süreli ER stresini sırasında önce PERK fosforile olur. Ardından fosforile PERK tarafından fosforile edilen eIF2a, NF-kB'yi aktive eder (Lin ve ark., 2012). Çalışmamızda TM + TUDCA ile muamele edilmiş RPE hücrelerinde NFkB1 gen transkripsiyonunun aşağı yönlü regülasyonu gözlenmiştir. Bu sonuç, Ikb / NF-kB transkripsiyon yolunun ER stres aracılı aktivasyonunu destekler niteliktedir.

Kaspazlar, ökaryotik hücrelerde homeostazı korumak için gerekli olan apoptozin anahtar enzimlerdir. Apoptotik hücre ölümünü indükleyen iki ana yol vardır. Birincisi, tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) ve Fas ligandın, membran reseptörlerine bağlanarak kaspaz-8 veya kaspaz-10 aktivasyonuna yol açtığı ekstrinsik yoldur. Diğeri, stres kaynaklı mitokondriyal sitokrom c salınımının olduğu intrinsik yoldur. Serbest bırakılan sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile bir kompleks yaparak kaspaz-9'u aktive eder. Her iki yol da kaspaz-3 aktivasyonunda birleşerek, kabarcıklaşma ve nükleer bozulma gibi hücre morfolojik değişikliklere yol açar (Elmore, 2007). C/EBP homolog proteini (CHOP), ER stresini altında uyarılan bir transkripsiyon faktörüdür. Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak ve sitokrom c'nin salınmasına yol açarak ER stresini indüklenen apoptozisde rol oynadığı bildirilmiştir (McCullough ve ark., 2001). Aslında, CHOP eksikliği hem in vitro hem de in vivo ER stresini indüklenen hücre ölümüne karşı

direnç oluşturur (Zinszner ve ark., 1998). Daha önce tartışıldığı gibi, ER stresi, sitozolik kalsiyum seviyelerinin artmasına yol açarak m-kalpainin aktivasyonuna neden olur (Muruganandan ve Cribb, 2006). Aktif m-kalpain, ER'de lokalize pro-kaspaz olan prokaspaz- 12'yi keser ve aktif kaspaz-12 üretir. (Nakagawa ve Yuan, 2000). İşlenmiş-kaspaz-12'nin, Apaf-1'den bağımsız olarak kaspaz-9'u aktive ettiği, ardından kaspaz-3'n aktive olduğu bildirilmiştir (Morishima ve ark., 2002). Çalışmamızda ER stresi oluşturulan RPE hücrelerinde hem kaspaz-3 hem de -12 enzim aktivitesi artmıştır. TUDCA uygulaması, kaspaz-12 aktivasyonunda ER stresinin rol oynadığını destekleyerek, kaspaz-12 aktivitesinde önemli bir düşüşe neden olmuştur.

Sonuç olarak RPE hücrelerinde TM uygulaması, seramid, C1P, GRP78 ve NFkB seviyelerini artırmış ve kaspaz-3 ve -12'nin aktivasyonuna yol açmıştır. ER stresinin TUDCA tarafından inhibisyonu, seramid/C1P seviyelerini düşürmüş, kaspaz-12 aktivitesini azaltmış, GRP 78 ve NF-kB1 ekspresyonunda önemli bir azalmaya neden olmuştur. Verilerimiz, ER stresi ve seramid oluşumunun inhibisyonunun, apoptoz ile ilişkili retinal dejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel bir farmasötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

- A. Gómez-Muñoz
2006 Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim Biophys Acta*:1758(12):2049-56.
- Abdullahi, A., et al.
2017 Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro. *Shock* 47(4):506-513.
- Anderson, D. H., et al.
1988 Tunicamycin-Induced Degeneration in Cone Photoreceptors. *Visual Neuroscience* 1(2):153-158.
- Andrieu-Abadie, N., and T. Levade
2002 Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585(2-3):126-34.
- Aslan, M., et al.
2020 Antiproliferative Effects of Thymoquinone in MCF-7 Breast and HepG2 Liver Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and ER Stress. *Nutr Cancer*:1-13.
- Aslan, M., et al.
2018 Decreased Serum Levels of Sphingomyelins and Ceramides in Sickle Cell Disease Patients. *Lipids* 53(3):313-322.
- Barenholz, Y., Roitman, A., Gatt, S.
1966 *J. Biol. Chem.* :241
- Berger, E., and D. Haller
2011 Structure-function analysis of the tertiary bile acid TUDCA for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409(4):610-615.
- Bertolotti, A., et al.
2000 Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2(6):326-32.
- Bibb, C., and R. W. Young
1974 Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *J Cell Biol* 61(2):327-43.
- Boriushkin, E., et al.
2015 Identification of p58(IPK) as a Novel Neuroprotective Factor for Retinal Neurons. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(2):1374-1386.
- Bosch, E., J. Horwitz, and D. Bok
1993 Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem* 41(2):253-63.
- Bradford, M. M.
1976 Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Bron, A.J, Tripathi, R., Tripathi, B.
1997 *Wilff's Anatomy of the Eye and Orbit*. London: Chapman & Hall medical.
- Bron, A.J., Tripathi, R., Tripathi, B.
1997: *Wilff's Anatomy of the Eye and Orbit*. . London: Chapman and Hall. The Retina. In Bron. .
- Burton, L. E., et al.
1976 myo-Inositol metabolism in the neonatal and developing rat fed a myo-inositol-free diet. *J Nutr* 106(11):1610-6.
- Contreras, C., et al.
2014 Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep* 9(1):366-77.

- Douglas, E.K., Richard, L.W., Allen, C.E.
1984 Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy. Baltimore Williams&Wilkins.
- Dressler, K. A., and R. N. Kolesnick
1990 Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin. J Biol Chem 265(25):14917-21.
- Elmore, S.
2007 Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicologic Pathology 35(4):495-516.
- Fan, T. J., et al.
2005 Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 37(11):719-27.
- Fan, Y., and T. Simmen
2019 Mechanistic Connections between Endoplasmic Reticulum (ER) Redox Control and Mitochondrial Metabolism. Cells 8(9).
- Ganong, W.F.
1995 Review of Medical Physiology. USA A Simon&Schuster Company.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L.
2001 Color Textbook of Histology. Philadelphia W.B.Saunders Company.
- Gomez-Munoz, A., et al.
1995 Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. Mol Pharmacol 47(5):833-9.
- Gómez-Muñoz, A., Kong, J.Y., Salh, B., Steinbrecher, U.P.
2004 Ceramide-1- phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. J. Lipid Res. 45 45: 99–105.
- Guyton, A.C., Hall, J.E.
2000 Textbook of Medical Physiology. . Philadelphia W.B. Saunders Company.
- Harding, H. P., Y. Zhang, and D. Ron
1999 Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature 397(6716):271-4.
- Hargrave, P. A.
2001 Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci 42(1):3-9.
- Hejtmancik, J. F., and J. M. Nickerson
2015 Overview of the Visual System. Prog Mol Biol Transl Sci 134:1-4.
- Hung, J. H., et al.
2004 Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-kappaB and pp38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 279(45):46384-92.
- İnan, Ü.Ü., ÖZTAŞAN, N.
2011 Physiology of Retinal Pigment Ret-Vit 19:6-15.
- Jing, G., J. J. Wang, and S. X. Zhang
2012 ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. Exp Diabetes Res 2012:589589.
- Kaufman, R. J.
1999 Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev 13(10):1211-33.
- 2002 Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. J Clin Invest 110(10):1389-98.
- Keeling, E., et al.

- 2018 Impaired Cargo Clearance in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) Underlies Irreversible Blinding Diseases. *Cells* 7(2).
- Kim, Y. I., et al.
2014 An endoplasmic reticulum stress-initiated sphingolipid metabolite, ceramide-1-phosphate, regulates epithelial innate immunity by stimulating beta-defensin production. *Mol Cell Biol* 34(24):4368-78.
- Kucuksayan, E., et al.
2014 Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 72:113-23.
- Lahiri, S., and A. H. Futerman
2007 The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 64(17):2270-84.
- Lee, A. S.
2007 GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 67(8):3496-9.
- Lee, W. S., W. H. Yoo, and H. J. Chae
2015 ER Stress and Autophagy. *Curr Mol Med* 15(8):735-45.
- Lei, X., et al.
2007 The group VIA calcium-independent phospholipase A2 participates in ER stress-induced INS-1 insulinoma cell apoptosis by promoting ceramide generation via hydrolysis of sphingomyelins by neutral sphingomyelinase. *Biochemistry* 46(35):10170-85.
- Lenox, A. R., et al.
2015 Unfolded protein response is activated in aged retinas. *Neurosci Lett* 609:30-5.
- Lin, W. C., et al.
2012 Endoplasmic Reticulum Stress Stimulates p53 Expression through NF-kappa B Activation. *Plos One* 7(7).
- Little, E., et al.
1994 The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 4(1):1-18.
- Liu, C. Y., M. Schroder, and R. J. Kaufman
2000 Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275(32):24881-5.
- Liu, Z., et al.
2014 Induction of ER stress-mediated apoptosis by ceramide via disruption of ER Ca(2+) homeostasis in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Biosci* 4:71.
- Liversidge, J., et al.
1996 CD59 and CD48 expressed by rat retinal pigment epithelial cells are major ligands for the CD2-mediated alternative pathway of T cell activation. *J Immunol* 156(10):3696-703.
- Luberto, C., and Y. A. Hannun
1998 Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation - Does sphingomyelin synthase account for the putative, phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *Journal of Biological Chemistry* 273(23):14550-14559.
- Ma, Y., et al.
2005 Sphingosine activates protein kinase A type II by a novel cAMP-independent mechanism. *J Biol Chem* 280(28):26011-7.
- Malkoç, İ.

Göz Küresinin Tabakaları: Anatomik ve Histolojik Bir Derleme Summary
Layers of the Bulbus Oculi: An Anatomic and Histological Review Atatürk
Universitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Erzurum The Eurasian Journal of
Medicine EAJM: 38, Aralık 2006.

- McCullough, K. D., et al.
2001 Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and Cellular Biology* 21(4):1249-1259.
- Mettu, P. S., et al.
2012 Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 33(4):376-98.
- Miranda, G. E., et al.
2011a Ceramide-1-Phosphate, a New Mediator of Development and Survival in Retina Photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(9):6580-6588.
- 2011b Ceramide-1-phosphate, a new mediator of development and survival in retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(9):6580-8.
- Morishima, N., et al.
2002 An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis - Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry* 277(37):34287-34294.
- Mullen, T. D., and L. M. Obeid
2012 Ceramide and Apoptosis: Exploring the Enigmatic Connections between Sphingolipid Metabolism and Programmed Cell Death. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 12(4):340-363.
- Murphy, C.J., Pollock, RVS.
1993 The Eye. In: *Anatomy of the dog*. Philadelphia WB Sanders Co.
- Muruganandan, S., and A. E. Cribb
2006 Calpain-induced endoplasmic reticulum stress and cell death following cytotoxic damage to renal cells. *Toxicological Sciences* 94(1):118-128.
- Naidoo, N.
2009 ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev* 8(3):150-9.
- Nakagawa, T., and J. Y. Yuan
2000 Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *Journal of Cell Biology* 150(4):887-894.
- Ng, D. T., S. S. Watowich, and R. A. Lamb
1992 Analysis in vivo of GRP78-BiP/substrate interactions and their role in induction of the GRP78-BiP gene. *Mol Biol Cell* 3(2):143-55.
- Nowak-Sliwinska, P., et al.
2013 Photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy. *Prog Retin Eye Res* 37:182-99.
- Oeckinghaus, A., and S. Ghosh
2009 The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(4):a000034.
- Okazaki, T., R. M. Bell, and Y. A. Hannun
1989 Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J Biol Chem* 264(32):19076-80.
- Ozer, H., et al.
2018 Early postoperative changes of sphingomyelins and ceramides after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids in Health and Disease* 17.

- Pahl, H. L., and P. A. Baeuerle
1995 A Novel Signal-Transduction Pathway from the Endoplasmic-Reticulum to the Nucleus Is Mediated by Transcription Factor Nf-Kappa-B. *Embo Journal* 14(11):2580-2588.
- Panda-Jonas, S., J. B. Jonas, and M. Jakobczyk-Zmija
1996 Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. *Am J Ophthalmol* 121(2):181-9.
- Pesonen, M., et al.
2012 Chloropicrin induces endoplasmic reticulum stress in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicology Letters* 211(3):239-245.
- Pinton, P., et al.
2001 The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* 20(11):2690-701.
- Price, N. P. J., and B. Tsvetanova
2007 Biosynthesis of the tunicamycins: A review. *Journal of Antibiotics* 60(8):485-491.
- Rasheva, V. I., and P. M. Domingos
2009 Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14(8):996-1007.
- Ron, D.
2002 Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 110(10):1383-8.
- Rotstein, N. P., et al.
2010 Regulating survival and development in the retina: key roles for simple sphingolipids. *J Lipid Res* 51(6):1247-62.
- Rutkowski, D. T., and R. J. Kaufman
2004 A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14(1):20-8.
- Sawai, H., and Y. A. Hannun
1999 Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem Phys Lipids* 102(1-2):141-7.
- Schaeffer, J.P.
1953 *Morris Human Anatomy*. New York McGraw-Hill Book Company. .
- Scheuner, D., et al.
2001 Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7(6):1165-76.
- Schmidt, S. Y., and R. D. Peisch
1986 Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(7):1063-7.
- Schneider, P. B., and E. P. Kennedy
1967 Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. *J Lipid Res* 8(3):202-9.
- Schroder, M., and R. J. Kaufman
2005a ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569(1-2):29-63.
- 2005b The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739-89.
- Seydel, G. S.; Aksoy, K.
2012 Reticulum Stress and Apoptosis Mechanisms *Archives Medical Review Journal* 21(4):221-235.
- Shimazawa, M., et al.

- 2007 Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase in ER stress-induced retinal neuron damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(8):3729-36.
- Simon, M. V., et al.
- 2019 Sphingolipids as Emerging Mediators in Retina Degeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13.
- Slotte, J. P.
- 2013 Biological functions of sphingomyelins. *Prog Lipid Res* 52(4):424-37.
- Song, M. K., B. D. Roufogalis, and T. H. Huang
- 2012 Reversal of the Caspase-Dependent Apoptotic Cytotoxicity Pathway by Taurine from *Lycium barbarum* (Goji Berry) in Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Potential Benefit in Diabetic Retinopathy. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:323784.
- Strauss, O.
- 2005 The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85(3):845-81.
- Streilein, J. W., et al.
- 2002 Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* 42(4):487-95.
- Szegezdi, E., et al.
- 2006 Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7(9):880-5.
- Szpigel, A., et al.
- 2018 Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* 61(2):399-412.
- Thumann G, Hoffman S, Hinton DR
- 2006 *Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium*. Fourth edition. Pp. 137-152.: Elsevier&Mosby.
- Toprak, M., Akın, S.M.
- 1998 *Anatomi Ders Kitabı*. İstanbul İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi.
- Tu, B. P., et al.
- 2000 Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290(5496):1571-4.
- Tuzcu, H., et al.
- 2017 Neutral sphingomyelinase inhibition alleviates apoptosis, but not ER stress, in liver ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Research* 51(3):253-268.
- Vang, S., et al.
- 2014 The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Glob Adv Health Med* 3(3):58-69.
- Weng, S. S., et al.
- 2017 Role of quercetin in protecting ARPE-19 cells against H₂O₂-induced injury via nuclear factor erythroid 2 like 2 pathway activation and endoplasmic reticulum stress inhibition. *Molecular Medicine Reports* 16(3):3461-3468.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J. C. Reed
- 2005 Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115(10):2656-64.
- Yao, J., et al.
- 2013 Ultraviolet (UV) and Hydrogen Peroxide Activate Ceramide-ER Stress-AMPK Signaling Axis to Promote Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cell Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 14(5):10355-10368.
- Yapar, M., et al.
- 2005 Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 58(6):358-362.

- Yoshida, H., et al.
2001 Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 21(4):1239-48.
- Zhang, H., et al.
2017 Ceramide enhances COX-2 expression and VSMC contractile hyperreactivity via ER stress signal activation. *Vascul Pharmacol* 96-98:26-32.
- Zhang, K., and R. J. Kaufman
2008 From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454(7203):455-62.
- Zhang, L. M., et al.
2019 Endoplasmic reticulum stress and autophagy contribute to cadmium-induced cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells. *Toxicology Letters* 311:105-113.
- Zhu, D., et al.
2010 Expression and regulation of enzymes in the ceramide metabolic pathway in human retinal pigment epithelial cells and their relevance to retinal degeneration. *Vision Res* 50(7):643-51.
- Zhu, G. Y., and A. S. Lee
2015 Role of the Unfolded Protein Response, GRP78 and GRP94 in Organ Homeostasis. *Journal of Cellular Physiology* 230(7):1413-1420.
- Zinszner, H., et al.
1998 CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 12(7):982-995.