

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



SIÇAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (*in vitro*)
PROLAKTİN/PROLAKTİN RESEPTÖRÜNÜN OKRATOKSİN A
TOKSİSİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut Cihan AYDEMİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ŞUBAT 2024

ANTALYA

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



SIÇAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (*in vitro*)
PROLAKTİN/PROLAKTİN RESEPTÖRÜNÜN OKRATOKSİN A
TOKSİSİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut Cihan AYDEMİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ŞUBAT 2024

ANTALYA

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (*in vitro*)
PROLAKTİN/PROLAKTİN RESEPTÖRÜNÜN OKRATOKSİN A
TOKSİSİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut Cihan AYDEMİR

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından “Sıçan Karaciğer Hücre Hattında (*in vitro*) Okratoksin A ile Prolaktin Reseptörünün İlişkisinin Araştırılması” FDK-2020-5249 nolu proje ile desteklenmiştir.

ŞUBAT 2024

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (*in vitro*)
PROLAKTİN/PROLAKTİN RESEPTÖRÜNÜN OKRATOKSİN A
TOKSİSİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut Cihan AYDEMİR

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 16/02/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ (Danışman)

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Doç. Dr. İbrahim YAMAN

ÖZET

SIÇAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (*in vitro*) PROLAKTİN/PROLAKTİN RESEPTÖRÜNÜN OKRATOKSİN A TOKSİSİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut Cihan AYDEMİR

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Şubat 2024; 82 Sayfa

Okratoksin A (OTA) fungal bir toksin olup birçok besin maddesi OTA tarafından kontamine edilmektedir. OTA başta böbrek ve karaciğer olmak üzere birçok dokuya hasar vermekte olup olası insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır. OTA'nın hasar verme mekanizmalarından biri hücrel sinyal yollarının regülasyonunu bozması olup bu çalışmada prolaktin reseptör formlarının bu mekanizma ile ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

WB-F344 sıçan karaciğer hücre hattının canlılık aktivitesini 24 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüren en düşük OTA dozunun 10 μ M olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı WB-F344 hücre hattı 24 saate kadar 10 μ M OTA'ya maruz bırakılmış ve prolaktin reseptör sinyalizasyonu ilişkili proteinlerin düzeyi Western blot yöntemi ile incelenmiştir. WB-F344 hücrelerinin 24 saat OTA'ya maruz kalması bu hücre hattında kısa form prolaktin reseptör protein seviyesini düşürmüştür. Ayrıca prolaktin reseptör sinyalizasyonunun akış aşağı hedeflerinden olan ERK ve AKT fosforilasyon düzeyinin 10 μ M OTA maruziyeti ile zamana bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

Kısa form prolaktin reseptör ifadesinde değişim gözlenmesinin sebebi OTA'ya bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'lar olabileceği düşünülmektedir. Literatürde kısa form prolaktin reseptörünün aktivasyonu sonucunda ERK defosforilasyonunu gerçekleştiren bir fosfataz (DUPD1) tanımlanmıştır. Kısa form prolaktin reseptör ifadesinin OTA maruziyetine bağlı azalması, bu fosfatazın aktivitesinin kaybı ile sonuçlanıp ERK fosforilasyonunun devamlılığına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

ANAHTAR KELİMELELER: AKT, ERK, Okratoksin A, prolaktin reseptörü

JÜRİ:

Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Doç. Dr. İbrahim YAMAN

ABSTRACT

***IN VITRO* INVESTIGATION INTO THE RELATIONSHIP OF PROLACTIN/PROLACTIN RECEPTOR WITH OCHRATOXIN A TOXICITY IN RAT LIVER CELL LINE**

Mesut Cihan AYDEMİR

PhD Thesis in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

February 2024; 82 Pages

Ochratoxin A (OTA) is a fungal toxin and many foods are contaminated by OTA. OTA damages multiple tissues, especially the kidney and liver, and is classified as a possible human carcinogen. One of the damaging mechanisms of OTA is its disruption of the regulation of cellular signaling pathways, and this study aimed to investigate the relationship of prolactin receptor forms with this mechanism.

It was found that the lowest dose of OTA that significantly reduced the viability of the WB-F344 rat liver cell line at 24 hours was 10 μ M. Therefore, the WB-F344 cell line was exposed to 10 μ M OTA for up to 24 hours and the levels of prolactin receptor signaling-related proteins were examined by Western blot method. Exposure to OTA for 24 hours reduced short form prolactin receptor protein level in WB-F344 cell line. Additionally, it was observed that the phosphorylation level of ERK and AKT, which are also downstream targets of prolactin receptor signaling, increased in a time-dependent manner with 10 μ M OTA exposure.

It is thought that the reason for the change in short form prolactin receptor expression may be miRNAs whose expression changes depending on OTA. A phosphatase (DUPD1) that carries out ERK dephosphorylation as a result of activation of the short form prolactin receptor has been described in the literature. The decrease in short-form prolactin receptor expression due to OTA exposure may result in the loss of activity of this phosphatase and contribute to the sustained phosphorylation of ERK.

KEYWORDS: AKT, ERK, Ochratoxin A, prolactin receptor

COMMITTEE:

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Assoc. Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK

Assoc. Prof. Dr. İbrahim YAMAN

ÖNSÖZ

Okratoksin A (OTA), gelişmiş ya da gelişmekte olan ülke fark etmeksizin birçok gıdada rastlanabilen, hatta bu gıdaları tüketen hayvanların etinde sütünde yumurtasında bulunmasının yanında tüketen insanların kan, idrar ve sütünde de rastlanan bir fungal toksindir. Olası insan karsinogeni olarak tanımlanmış olan okratoksin A başta böbrek ve karaciğere zarar vermekle beraber birçok organ/dokuya hasar verip halk sağlığını tehdit etmektedir. Okratoksin A'nın halk sağlığını tehdit etmesinin yanında, çiftlik hayvanlarının yemleri de bu toksin ile kontamine olur ve bu yemleri yiyen hayvanlarda da doku hasarı ve büyüme kaybı oluşmasına sebep olur. Dolayısı ile halk sağlığını tehdit eden ve ekonomik kayıplara sebep olan okratoksin A üzerinde birçok çalışma yapılmış olup özellikle zararlı etki mekanizmasına olan ilgi artmaktadır. Bu toksin hücre homeostazını bozarak patolojik etkilerini gösterir. OTA'nın patolojik mekanizmalarından biri hücre içi sinyal iletimi dengesini değiştirmesi aracılığı ile gerçekleşmektedir. Hücre içi sinyal iletiminin bozulması ile hücre ölümü, fibrozis ya da kanser gibi süreçler tetiklenir. Özellikle son yıllarda okratoksin A çalışmalarının odak noktası bu sinyalizasyon yollarını kontrol ederek hücrenin ölümüne sebep olacak veya kanserleşme sürecine götürecek hücre membran reseptörlerine kaymaktadır. Bu reseptörlerden transforme edici büyüme faktörü β reseptörü (TGFR), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR) ve prolaktin reseptörü okratoksin A'nın zararlı etkilerini kontrol edebilecekleri için ilgi çeken reseptörlerdendir. Prolaktin reseptörü ve OTA ilişkisinin araştırılmasının tez konusu olarak değerlendirilmesine; ilk transkriptomik çalışmalarında prolaktin reseptörünün OTA maruziyetine bağlı olarak ifadesinin değiştiğinin görülmesi, OTA ile aktivasyonu değişen sinyal yollarının prolaktin reseptörü ile de düzenlenebiliyor olması, prolaktin reseptörü sinyalizasyonunun kanser süreçleri ile ilişkilendirilmesi ve son olarak prolaktin reseptör ifadesinin cinsiyete bağlı değişiyor olması (OTA'nın da toksisitesinin cinsiyete bağlı olarak değişmesi nedeni ile) etkili olmuştur.

Prolaktin reseptörü omurgalılarda tuz-su dengesi, immünoregülasyon ve davranış gibi birçok süreç ile ilişkili olmasının yanında çeşitli kanserlerin oluşumuna katkı sağlamasından şüphelenilen bir sitokin reseptörüdür. Prolaktin reseptörü çalışırken, gen yapısı, çoklu promotör kullanımı, 5'-UTR ve 3'-UTR bölgelerinin önemi, aynı proteini kodlayan 3'-UTR izoformları ve bunların miRNA'lar gibi regülatör moleküller aracılığı ile farklı regülasyona tabi tutulmaları, reseptörün üzerindeki fonksiyonel motifler ve bu motiflerin hangi canlılardaki hangi prolaktin reseptörlerinde bulunduğu, prolaktin reseptörünün aktivasyonu ile tetiklenen STAT, ERK ve AKT yolları (ve bu yolların kesişebileceği diğer reseptörler), reseptör sinyalizasyonunun SOCS gibi proteinler ile inhibe edilmesi ya da reseptörün internalize edilip degradasyonunun gerçekleşmesine kadar bütün süreçleri değerlendirmek gerekmiştir. Prolaktin reseptörü üzerinde araştırma yaparken derslerde öğrendiğimiz 'yeni bilgi' olarak nitelendirilen bütün konuların tek tek çalışıldığını görmek özellikle literatür taraması yaparken beni oldukça mutlu etmiştir. Okuduğum çalışmalardan birçoğunu detaylı olarak açmak istesem de konu bütünlüğünü dağıtmamak ve akışı yavaşlatmamak adına bazı çalışmaların ana fikir ve sonuçları bağlamında verilmiştir. Özellikle Türkçe olarak hazırlanmış prolaktin reseptörünün gen yapısı, mRNA ve protein izoformları, sinyal başlatması ve ilişkili yolları ve reseptörün hücre içine alınarak sinyalin durdurulması gibi konuları tartışan bir derleme eksikliği olduğundan bu kısımların kapsayıcı olması tercih edilmiştir. Bu kısımların özellikle henüz sadece Türkçe araştırma yapabilen genç arkadaşlarımızın literatüre hızla uyum

sağlayıp yeterli yabancı dil düzeyine ulaşp aktif araştırma yapabilecekleri seviyeye geldiklerinde literatüre ve yapılan araştırmalara yabancı olmamaları hedeflenmiştir. Böylece tezimin hem ülkemdeki genç araştırmacılara hem de tüm bilim dünyasına katkı sağlamasını umut ederim.

Bu tez çalışması pandemi ve ekonomik krizlerin olduğu oldukça zorlayıcı bir dönemde gerçekleşmiştir. Maddi, manevi ve bilimsel olarak birçok kişinin beni desteklemesi sayesinde tezi tamamlayabildim. Bu destekleri sağlayan hocalarım, arkadaşlarım ve aileme teşekkür etmek istiyorum. Membran reseptör çalışmamı sağlayan danışmanım Mehmet Akif KILIÇ'a, Boğaziçi Üniversitesi'nden İbrahim YAMAN hocama, Elif DARBUKA, Kardelen UZUNKAYA, Semanur KARAYILAN'a, Akdeniz Üniversitesinden Aysun ÖZKAN, Esra AYDEMİR ve Burcu E. TEFON ve Mesut YILMAZ hocalarıma, Zeynep DEMİR, Eda DELİK, Berfin EROĞLU, Serap ÖZKAYA, Buse Su TEK'e ve son olarak aileme; Fatma AYDEMİR, Celal AYDEMİR, Aslıhan AYDEMİR ve vefat etmiş ananem Keziban DEMİRDEN'e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmayı 2020-2023 yılları arasına FDK-2020-5249 nolu proje ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi BAP Birimi'ne ve beni misafir eden Boğaziçi Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Okratoksin A (OTA).....	4
2.1.1. OTA'nın vücutta emilimi ve dağılımı.....	4
2.1.2. OTA maruziyeti oksidatif stresi artırır	5
2.1.3. OTA maruziyeti fibrozise sebep olur	6
2.1.4. OTA DNA eklentisi oluşturarak genotoksik etki gösterebilir	7
2.1.5. OTA hücrenin ölüm ve hayatta kalma yollarını aktive eder.....	8
2.2. Prolaktin Reseptörü.....	10
2.2.1. Prolaktin reseptör gen yapısı ve prolaktin reseptör izoformları.....	10
2.2.2. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu	15
2.2.3. Prolaktin reseptör sinyalizasyonunun inhibisyonu	17
2.2.4. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu ilişkili patolojiler.....	19
2.3. Prolaktin Reseptörü ve Okratoksin A.....	21
2.4. Genomik ve Transkriptomik Veri Bankaları	23
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Tez Kapsamında Uygulanan Yöntemin Özeti	24
3.2. <i>İn Siliko</i> /Biyoinformatik Analizler.....	26

3.2.1. Genomik dizilerin elde edilmesi	26
3.2.2. Yeni splayzing varyantı tanımlamak amacı ile transkriptomik dizilerin analizi	27
3.2.3. OTA maruziyetinin PRLR üzerindeki etkisinin veri madenciliği ile araştırılması	28
3.3. Çalışmada Kullanılan OTA ve Hormonlar	29
3.4. WB-F344 Hücrelerinin Çoğalma ve Deney Koşullarının Belirlenmesi	29
3.4.1. Hücre çoğalma eğrisinin oluşturulması ve hücre için uygun besiyerinin belirlenmesi	30
3.4.2. Hücre canlılık testleri	30
3.4.3. WB-F344 hücrelerinin çoğalabildiği minimum FBS konsantrasyonunun belirlenmesi	32
3.4.4. WB-F344 hücrelerine uygulanacak OTA konsantrasyonunun belirlenmesi	32
3.4.5. WB-F344 hücrelerinin tabi tutulduğu deney koşulları	33
3.5. Nükleik Asit Çalışmaları	35
3.5.1. RNA izolasyonu	35
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)	36
3.6. Protein Çalışmaları	40
3.6.1. Hücre lizatının hazırlanması	41
3.6.2. Bikinkoninik asit yöntemi (BCA)	41
3.6.3. Western blot	41
3.7. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. <i>In Siliko</i> /Biyoinformatik Analizler	43
4.1.1. PRLR uzun form E10Δ50 varyantları tanımlanmıştır	43
4.1.2. E10Δ50 formları evrensel değildir	46
4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	49

4.2.1. WB-F344 hücre hattının DMEM/F12 besiyeri kullanılarak çoğaltılmasına karar verilmiştir	49
4.2.2. Hücrelere OTA uygulaması için optimum FBS konsantrasyonu %5 olarak belirlenmiştir	50
4.2.3. WB-F344 hücre hattının 10 µM OTA'ya maruz bırakılmasına karar verilmiştir	51
4.3. Nükleik Asit Çalışmaları	52
4.3.1. WB-F344 hücre hattında PRLR uzun, kısa ve E10Δ50-E11 formuna ait fragmentler saptanmıştır.....	53
4.3.2. qPCR optimizasyonu.....	58
4.4. Protein Düzeyinde Gerçekleştirilen Çalışmalar	61
4.4.1. OTA maruziyeti WB-F344 hücre hattında p-ERK1/2 ve p-AKT düzeyini arttırmaktadır.....	61
4.4.2. OTA maruziyeti WB-F344 hücre hattında kısa form prolaktin reseptör miktarını azaltmaktadır	62
5. TARTIŞMA	64
5.1. miR-141 OTA Maruziyetinde Prolaktin Reseptör mRNA İfadesini Değiştiren Faktörlerden Biri Olabilir.....	65
5.2. OTA Sinyal İletim Homeostazını Bozmaktadır	67
5.3. İleri Çalışmalarda Kullanılacak Model Sistemler Üzerine Çıkarımlar	69
6. SONUÇLAR	70
7. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Sıçan Karaciğer Hücre Hattında (*in vitro*) Prolaktin/Prolaktin Reseptörünün Okratoksin A Toksisitesi ile İlişkisinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

16/02/2024

Mesut Cihan AYDEMİR

İmzası

(Faint, stylized signature watermark visible in the background)

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

A	: adenin
α	: alfa
b	: baz
β	: beta
Δ	: delta
G	: guanin
kb	: kilobaz
kDa	: kilodalton
kg	: kilogram
μg	: mikrogram
μl	: mikrolitre
μM	: mikromolar
mg	: miligram
ml	: mililitre
ng	: nanogram
nM	: nanomolar
.	: nokta (ondalık ayracı olarak)
$^{\circ}\text{C}$	: derece Celsius
C	: sitozin
T	: timin
V	: volt
%	: yüzde

Kısaltmalar

ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
Asn	: Asparajin
AST	: Aspartat amino transferaz
BCA	: Bikinkoninik asit
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer DNA
Cys	: Sistein
DMEM/ F-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/nutrient mixture F-12
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ERE	: Östrojen yanıt elemanı
ERK	: Hücre dışı sinyallerle düzenlenen serin/treonin kinaz
EtOH	: Etil alkol
FBS	: Fetal bovin serum
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GAS	: Gama interferonla aktive edilen sekans
GBR2	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
GPx1	: Glutatyon peroksidaz 1
GSH	: Glutatyon
HepG2	: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HGFR	: Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
HK-2	: İnsan proksimal tübül epitel hücre hattı
HRP	: Yaban turpu peroksidazı

IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları
IRS1	: İnsulin reseptör substrat 1
JAK	: Janus kinaz
KF	: Kısa form
miRDB	: mikroRNA hedef tahmin veri bankası
miRNA	: mikroRNA
mRNA	: mesajcı RNA
MTT	: Tiazolil Mavi Tetrazolyum Bromür
NCBI	: Amerikan Biyoteknoloji Bilgi Merkezi/National Center For Biotechnology Information
NIH	: ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı Ulusal Sağlık Enstitüleri
NLM	: Amerikan Tıp Kütüphanesi/ The National Library of Medicine
nt	: nükleotit
NTC	: Negatif kalıp kontrolü
OAT	: Organik Anyon Taşıyıcıları
OD	: Optik yoğunluk
OTA	: Okratoksin A
P/S	: Penisilin/streptomisin
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDK1	: Fosfoinositid Bağımlı Kinaz 1
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-OH kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat
PRL	: Prolaktin hormonu
PRLR	: Prolaktin reseptör

<i>prlr</i>	: prolaktin reseptör geni
PTEN	: Fosfataz ve TENsin homolog
qPCR	: Kantitatif PCR
RIPA	: Radyo immünopresipitasyon testi
RNaz	: Ribonükleaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon PCR
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH	: Src homoloji
SMAD	: Suppressor of mothers against decapentaplegic
SMO	: Splayz modüle edici oligomer
SOCS	: Sitokin sinyalizasyon baskılayıcı (supressors of cytokine signaling)
SOD	: Süperoksit dismutaz
SP1	: Özgüllük proteini 1/Specificity protein 1
STAT	: Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktivatörü
TBS-T	:Tris tamponlu salin ve tween-20
TGFR	: Transforme edici büyüme faktörü β reseptörü
TrxR	: Tiyoredoksin redüktaz
UF	: Uzun form
UTR	: Protein kodlamayan bölge
v. a./g.	: vücut ağırlığı/gün
WST-8	: [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu]

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. OTA'nın moleküler yapısı.....	2
Şekil 2.1. Prolaktin reseptör geni (<i>prlr</i>) ve genin alternatif splayzing ürünü olan uzun ve kısa form prolaktin reseptörü	12
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan <i>in siliko</i> /biyoinformatik analizlerin özeti.....	24
Şekil 3.2. Çalışmanın <i>in vitro</i> basamağında gerçekleştirilen çalışmaların özeti.....	25
Şekil 3.3. WB-F344 hücre hattı ile kurulan OTA zamana bağlı deney.....	33
Şekil 3.4. WB-F344 hücreleri ile kurulan 24 saatlik OTA ve PRL maruziyeti deneyi ...	34
Şekil 4.1. SRA veri bankasından elde edilen transkriptomik dizileri kullanılarak prolaktin reseptörüne ait yeni splayzing varyantları tespit edilmiştir.	44
Şekil 4.2. Ekzon 10 dizisi türler arasında korunmuş olmakla beraber canlı gruplarında farklılaşabilmektedir.....	47
Şekil 4.3. Farklı besiyerlerinde WB-F344 hücrelerinin çoğalma eğrisini gösteren grafik	49
Şekil 4.4. MTT testi 10.000'e kadar WB-F344 hücre sayısında doğrusal ölçüm verebilmektedir	50
Şekil 4.5. Besiyerindeki FBS konsantrasyonunun WB-F344 hücrelerinin canlılık aktivitesi üzerindeki etkisi	51
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda OTA uygulamasının WB-F344 hücrelerinin canlılık aktivitesi üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.7. İzole edilen RNA'ların nanodrop ile elde edilen absorpsiyon grafiği	53
Şekil 4.8. WB-F344 hücre hattında kısa, uzun ve E10Δ50-E11 formuna ait dizilerin varlığı gösterilmiştir.....	54
Şekil 4.9. WB-F344 hücre hattında prolaktin reseptör hücre dışı domaini bütün halinde bulunmaktadır.....	58
Şekil 4.10. qPCR'da primer dimeri oluşumu 35. döngüden itibaren gerçekleşmektedir.....	59
Şekil 4.11. Zaman bağımlı OTA maruziyeti (10 µM) ERK1/2 ve AKT fosforilasyonunu arttırmaktadır.	62
Şekil 4.12. OTA maruziyeti ve PRL uygulamasının prolaktin reseptör ilişkili sinyalizasyon yolu elemanları üzerine etkisi.....	63
Şekil 5.1. OTA maruziyetinin prolaktin reseptör sinyalizasyonu üzerindeki olası etki mekanizması.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

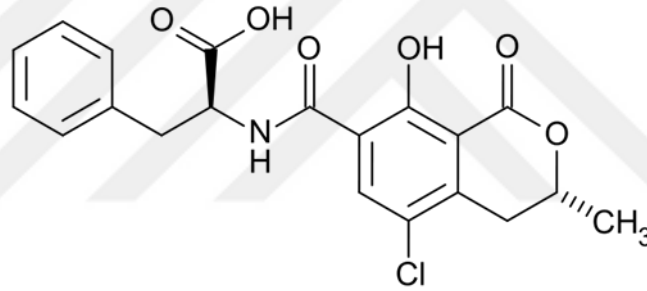
Çizelge 2.1. Prolaktin reseptör protein yapısı.	14
Çizelge 3.1. Prolaktin reseptör genleri kullanılan organizmalar ve genomik dizilerin erişim numaraları	26
Çizelge 3.2. Yeni splayzing varyantlarını tanımlamak amacı ile kullanılan FASTQ dizileme dosyalarının SRA erişim numaraları.	27
Çizelge 3.3. Transkriptomik çalışmalarında PRLR ve GAPDH'nin miktarlarının belirlenmesinde referans olarak kullanılan diziler.	28
Çizelge 3.4. cDNA sentez reaksiyon karışımı içeriği	36
Çizelge 3.5. PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin nükleotit dizileri.	37
Çizelge 3.6. Agaroze jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltilerin içeriği.	38
Çizelge 3.7. Western blot çalışmasında kullanılan çözeltiler.	40
Çizelge 3.8. Western blot çalışmasında kullanılan antikorlar.	42
Çizelge 4.1. E10Δ50 varyantları bilinen uzun form PRLR'den farklıdır	46
Çizelge 4.2. E10Δ50 formuna ait splayzing bölgesinin diğer organizmalardaki nükleotit dizisi.	48
Çizelge 4.3. WB-F344 hücre hattının ifade ettiği prolaktin reseptör formlarının dizilemeleri yapılmıştır.....	55
Çizelge 5.1. miR-141-3p miRDB'ye göre kısa form prolaktin reseptörünü hedef alan miRNA'lardan biri olabilir.	66

1. GİRİŞ

Sanayi çağının başlaması ile beraber genel refah seviyesinin artması insan nüfusunun artması ile sonuçlanmıştır. Artan insan nüfusunun beslenmesi için daha fazla yiyeceğe ihtiyaç duyulmuştur. Günümüzde daha fazla üretim yapılabilir hale gelmiş ve hatta üretime uygun olmayan yerlere dünyanın başka bir yerinden farklı iklimlerin ürünleri yüksek miktarlarda taşınabilir hale gelmiş ve gerektiğinde onların uzun süreli depolanmaları mümkün olmuştur. Daha yerel ve düşük ölçekli üretimlerde uygunsuz şekilde üretilen ya da sağlık için güvenilir olmayan ürünler sadece sınırlı bir kesimdeki insanı etkilerken günümüzde büyük ölçekte yapılan ve tüketime sunulan ürünler ‘sağlık için sakıncalı’ olma durumlarında çok daha büyük kitleleri etkileyebilmektedir. Dolayısı ile artan nüfusun sağlığını korumak için çok daha fazla tedbir almak ve fazla yatırım yapmak gerekmiştir. Gıdalarda bulunabilecek pestisit, koruyucular ve fungal toksinler gibi maddelerin sınırlarının belirlenmesi ve bunların miktarının düşük olması için gereken üretim koşullarının belirlenmesi alınan tedbirlerdendir. Ayrıca ‘sağlık için sakıncalı’ bulunan maddelerin insan ve doğa üzerindeki etkilerini araştırmak ve belki de olumsuz etkileri ortadan yok etmek amacı ile yapılan araştırmalara uzun zamandır yatırım yapılmaktadır. Gıdaları ‘sağlık için sakıncalı’ hale getiren bir fungal toksin olan okratoksin A (OTA) üzerine kimyasal olarak karakterize edildiği 1965 yılından bu yana araştırmalara devam edilmektedir (Van der Merwe vd. 1965). OTA’nın başta böbrek ve karaciğer olmak üzere birçok dokuya hasar vermesi, olası insan karsinojeni olarak sınıflandırılmış olması ve toplumun sıklıkla bu toksine maruz kalması, OTA’nın halk sağlığı için tehdit olarak görülmeye devam etmesine ve birçok yönü ile araştırılmasına sebep olmuştur.

OTA *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *Neopetromyces muricatus*, *Penicillium verrucosum* gibi (özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi) fungus türleri tarafından üretilir ve bu fungusların üzerinde çoğaldığı yiyecekleri kontamine eder (Malir vd. 2016; Wang vd. 2016). OTA, gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde küçük çaplı (hatta evde üretim) ya da büyük ölçekte üretim fark etmeksizin birçok gıdayı kontamine edebilmektedir. Çay, kahve, özellikle kurutulmuş üzüm ve incir, buğday gibi tahıllar ve kuruyemişlerde OTA’ya sıklıkla rastlanır. Yüksek ısı ve fermantasyon gibi süreçlerin gıdadaki OTA miktarını düşürebildiği bilinmekle beraber bu süreçlerin farklı OTA metabolitlerinin oluşmasına yol açabileceği bildirilmiştir (Valle-Algarra vd. 2009; Var vd. 2018). Ayrıca üzüm gibi gıdaların kaynatılarak pekmez yapılma süreçleri, üretilen pekmezde OTA konsantrasyonunu azaltmadığı gibi yoğunlaşan üzüm suyu ile OTA konsantrasyonunun yükseldiği görülmüştür (Arici vd. 2004). OTA, OTA içeren gıda ham maddelerinden üretilen besin maddelerinde görülebildiği gibi, OTA ile kontamine olmuş yemleri yiyen hayvanların etinde, sütünde ve yumurtalarında da bu toksine rastlanabilmektedir. Dolayısı ile insanlar bu toksine birçok kaynaktan maruz kalmaktadır. Bu geniş çaplı maruziyet birçok farklı ülkeden insanlardan alınan kan, idrar ve anne sütü örneklerinde OTA’ya rastlanması ile doğrulanmaktadır (Gürbay vd. 2010; Hassan vd. 2006; Ibrahim vd. 2013; Soto vd. 2016). Bu durum tedbir alınmaz ise OTA maruziyetinin kaçınılmaz olduğunu göstermektedir. Bu maruziyet farkındalığının yönetmeliklere ve topluma aktarılması ile mikro ya da küresel ölçekte temel gıda maddelerinin üretimi ve saklanması sırasında alınacak tedbirler ile toplumun OTA’ya maruziyet düzeyi dolayısı ile toplum sağlığını tehdit eden ve ekonomik zararlar doğuran etkileri azaltılabilir.

OTA, L-fenilalanin ve dihidroizokumarinin amid bağı ile bağlanmış olduğu bir molekül yapısına sahiptir (Şekil 1.1). OTA'ya maruz kalmış deney hayvanlarında başta böbrek ve karaciğer olmak üzere birçok dokuda hasar, fibrozis ve böbrek/karaciğer kanserleri görülmektedir. OTA'nın zararlı etkileri cinsiyet, doku/organ ve tür bazında değişebilmektedir. Deney hayvanlarından elde edilen verilerin ışığında OTA Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından olası insan karsinogeni (2B) olarak sınıflandırılmıştır (IARC 1993). Kanser hastalarından alınan serum örneklerinde, kanser olmayan insanların örneklerine göre, daha yüksek konsantrasyonda OTA bulunabilmekle beraber, OTA maruziyetinin kesin bir şekilde insanda kansere sebep olduğunu söylemek için daha fazla veriye ihtiyaç vardır (İbrahim vd. 2013). OTA oksidatif strese, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına, apoptozdan kaçışa, makromolekül sentezinin inhibisyonuna ve sinyalizasyon yollarının yeniden düzenlemesine sebep olarak hücre/organizmaya zarar vermektedir. Ayrıca fikir ayrılıkları bulunmakla beraber, OTA'nın DNA eklentisi (adduct) oluşturması da bu toksinin üzerinde durulan diğer bir zararlı etki mekanizması olarak görülmektedir (Mantle vd. 2010).



Şekil 1.1. OTA'nın moleküler yapısı.

OTA hücre sinyalizasyonunu değiştirerek hücre homeostazını bozar. Bunun neticesinde hücrenin ölümüne ya da hasarlı olup da ölmesi gereken hücrelerin ölümden kaçarak organizma için tehdit teşkil etmesine sebep olabilir. OTA başlıca MAPK/ERK, SMAD, PI3K/AKT gibi sinyalizasyon yollarının aktivitesini değiştirerek hücre homeostazını bozar. Son yıllarda OTA çalışmalarının odak noktaları bu sinyalizasyon yollarının sinyallerini tetikleyen reseptörlere kaymaktadır. TGFR (Transforme edici büyüme faktörü β reseptörü), HGFR (Hepatosit büyüme faktörü reseptörü) ve PRLR'nin (prolaktin reseptörü) OTA maruziyetine bağlı olarak ifadesi değişmektedir ve bu reseptörlerin aktivitesi ya da miktarının OTA'ya bağlı değişmesi engellendiğinde, OTA'nın zararlı etkisinin azaldığı gözlemlenmektedir (Chae vd. 2022; Özcan vd. 2015; Wu vd. 2016).

Prolaktin reseptörü kemikli balıklardan itibaren omurgalılarda görülmektedir. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu laktasyon, immüno-regülasyon, tuz-su dengesi, büyüme ve gelişme, metabolizma, davranış ve üreme gibi birçok süreç ile ilişkilendirilmiştir (Bole-Feysot vd. 1998). Bu süreçlerin yanında başta meme ve prostat kanseri olmakla beraber çeşitli kanserler ile ilişkisi gösterilmektedir. Prolaktin reseptörü

ile JAK/STAT, PI3K/AKT ve MAPK/ERK gibi sinyalizasyon yollarını regüle ederek hücre yanıtını belirleyebilmektedir. Prolaktin reseptörü genel olarak uzun ve kısa form olarak kategorize edilmektedir. Uzun form prolaktin reseptörü omurgalılarda korunmuş olmakla beraber kısa formlar, birbirlerine yakın cinsler arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca prolaktin reseptörünün ifadesi cinsiyet hormonlarına bağlı olarak değişebilmektedir. Son zamanlarda gerçekleştirilen transkriptomik çalışmalarında OTA maruziyetinde prolaktin reseptör gen ifadesinin değiştiğinin görülmüştür. Bunun yanında OTA'nın toksik etkilerinin de prolaktin reseptör ifadesi gibi cinsiyet hormonlarına bağlı olarak değişmesi, prolaktin reseptör sinyalizasyonunun da OTA'nın aktivasyonunu değiştirdiği sinyal yolları ile örtüşmesi ve prolaktin reseptörü sinyalizasyonunun da kanser gibi süreçleri tetiklemesi prolaktin reseptörünün OTA maruziyetinde hücrede gerçekleşen değişimlerle bir şekilde ilişkili olabileceği hipotezini güçlendirmiştir.

Son 20 yıl içerisinde OTA maruziyetinde ifadesi değişen genleri tespit etmek amacı ile sıçanlarda gerçekleştirilen transkriptomik çalışmalarında prolaktin reseptör gen ifadesinin OTA maruziyetine bağlı olarak değiştiği görülmüştür (Marin-Kuan vd. 2006; Pastor vd. 2021; Qi vd. 2014; Stemmer vd. 2007). Bu transkriptomik çalışmaları bu genden kodlanan hangi prolaktin reseptör izoformunun ifadesinin değiştiğini gösterememektedir. Ancak bu bilgi prolaktin reseptör sinyalizasyonunun OTA toksik etki mekanizmasındaki rolünün aydınlatılmasında kritik rol üstlenmektedir. Çünkü prolaktin reseptör izoformlarının akış aşağı sinyal yolları üzerindeki etkileri farklı olmaktadır. Bundan dolayı çalışmanın ilk amacı, OTA maruziyetinde sıçan karaciğerinde hangi prolaktin reseptör formunun ifadesinin nasıl değiştiğinin belirlenmesi olmuştur. Bu amacı gerçekleştirmek için WB-F344 sıçan karaciğer hücre hattına OTA uygulanmış ve prolaktin reseptör protein ifadesi ve prolaktin reseptör akış aşağı sinyalinin iletilmesinde görev alan ERK ve AKT fosforilasyonu düzeylerine Western blot yöntemi ile bakılmıştır. OTA uygulamasının sıçanda kısa form prolaktin reseptör ifadesini değiştirdiği belirlenmiştir. WB-F344 hücre hattında 24 saatlik OTA maruziyetinin prolaktin reseptör ifadesini düşürdüğü ve ERK ile AKT fosforilasyonunu zamana bağlı olarak arttırdığı gözlemlenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Okratoksin A (OTA)

OTA birçok gıdayı kontamine eden fungal bir toksindir. Toksinin moleküler yapısı bir fenil alanin ve dihidroizokumarinin amid bağı ile birbirine bağlanması ile oluşmuştur. OTA polar organik çözücülerde oldukça çözünür (suda oldukça az çözünür) beyaz, kristal yapıda bir bileşiktir. OTA stabil bir molekül olup geleneksel yöntemlerle tamamen gıdalardan elimine edilemese de çeşitli gıda işleme teknikleri ile konsantrasyonu azaltılabilmektedir (Bullerman ve Bianchini 2007). Ancak pekmez üretimi gibi ham maddenin yoğunlaştığı durumlarda son ürünlerdeki OTA konsantrasyonu yaklaşık beş kat artabilmektedir (Arici vd. 2004). Bazı gıda işleme süreçleri OTA konsantrasyonunda azalmaya sebep olsa da gıdaların yüksek ısıya maruz kaldığı süreçlerde OTA'nın çeşitli analogları da oluşabilmektedir.

OTA maruziyeti başlıca böbrek ve karaciğer olmak üzere birçok dokuya hasar vermektedir. Uzun süreli (2 yıla kadar) OTA maruziyeti sonucunda erkek sıçanlarda böbrek tümörlerinin arttığı gözlemlenirken, farelerde, böbrek ve karaciğer tümörlerinin arttığı gözlemlenmiştir (IARC 1993; NTP 1989). Bu hayvan deneylerinden elde edilen veriler ışığında OTA olası insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır (IARC 1993). Ayrıca bir epidemiyolojik çalışmada hepatoselüler karsinom hastalarının kanında, sağlıklı insanlara göre daha yüksek oranda OTA'ya rastlandığı belirtilmiş olmakla beraber, bu kanser durumunun OTA maruziyetinden dolayı mı oluştuğu ya da kanser nedeni ile kişilerin kanından OTA'nın eliminasyonunda azalma olduğu için mi böyle bir durumla karşılaşıldığı bilinmemektedir (İbrahim vd. 2013).

2.1.1. OTA'nın vücutta emilimi ve dağılımı

Doğal koşullarda hayvanlar OTA'ya, OTA ile kontamine olmuş gıdaların ağız yolu ile alınması ile maruz kalmaktadır. Bu toksinin temel emilim yeri bağırsakta duodenum ve jejunumdur. OTA'nın kontamine ettiği gıdanın yapısı ve OTA'yı alan hayvanın bağırsak florasına bağlı olarak emilim düzeyi değişkenlik gösterebilir. Emilimle kana geçen OTA buradan birçok organa geçiş yapabilir. Sıçanlara (Erkek SD) OTA uygulamasını (tek doz; 0.2 mg/kg vücut ağırlığı) takiben OTA emilerek 5 saatte plazmada maksimum düzeye (yaklaşık 2 µg/ml konsantrasyonuna) ulaşabilmektedir (plazma yarı ömrü 75.6 ± 29.0 saat) (Han vd. 2013). Ayrıca OTA ilk 5 saat içerisinde organlarda maksimum düzeye ulaşabilmekte ve 5 saatte böbrekte en yüksek miktara ulaşmaktadır (Han vd. 2013; Suzuki vd. 1977). Maruziyet üzerinden daha fazla zaman geçtikçe karaciğer ve böbrekteki OTA düzeyleri benzer olmaktadır (Vettorazzi vd. 2011). Ayrıca OTA'nın dolaşımdan plasenta bariyerini aşabildiği gösterilmiştir (Hallén vd. 1998; Minervini vd. 2013).

Emilen OTA karaciğere portal ven aracılığı ile ulaşır. OTA'nın karaciğere alımı OATP1 (organik anyon transport polipeptit) aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Buradan da safra yolu ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır. OTA uygulamasından yaklaşık 6 saat sonra (Suzuki vd. 1977) safra yolu ile atılım gerçekleşmeye başlamaktadır. OTA kanda albümine yüksek afinitede bağlanarak uzun süre dolaşımda kalabilmektedir. OTA'nın

plazmadan yarılanma ömrü türler arasında farklılık göstermektedir: Oral yolla OTA'ya maruz kalan balıklarda ~40 dk, maymunlarda 21.5 gün, insanlarda ise ~35.5 gün kadarken intravenöz olarak OTA'ya maruz kalan insanlarda plazmadan eliminasyon yarı ömrü 58 günü bulabilmektedir (Hagelberg vd. 1989; Studer-Rohr vd. 2000). Dolaşıma alındığında kan proteinlerine bağlı halde bulunan OTA'nın tamamı böbrekler tarafından atılamaz. OTA böbrek tübülerinden organik anyon taşıyıcılar (OAT) aracılığı ile atılır. Daha sonrasında nefron segmentleri tarafından OAT ve H⁺/dipeptit taşıyıcıları aracılığı ile geri emilimi gerçekleştir böylece böbrekte OTA birikimi oluşur.

OTA idrar, safra ve dışkı yolu ile vücuttan atılmaktadır. Ayrıca OTA'nın anne sütüne geçtiği ve böylece yavrulara da aktarıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Hassan vd. 2006; Memiş ve Yalçın 2021). Bundan dolayı idrar, dışkı ve sütte OTA ve/veya metabolitlerinin bulunması kişilerin/toplulun OTA maruziyetini göstermek için belirteç olarak da kullanılmıştır (Kosicki vd. 2021; Soto vd. 2016).

2.1.2. OTA maruziyeti oksidatif stresi artırır

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu biyolojik sistemin bunları nötralize etmesi ve/veya oluşturdukları hasarı tamir etmesindeki dengesizliği ifade etmektedir. Reaktif oksijen türevleri normal canlılık faaliyetleri sırasında oluşmakta ve canlılar tarafından elimine edilebilmektedir. Farklı çevresel etkenler canlının üretilen serbest radikalleri verimli bir şekilde elimine etmesini engelleyerek hücresel hasarlara yol açabilmektedir. Çeşitli fiziksel ya da kimyasal ajanlar tarafından artırılan ve bertaraf edilemeyen oksidatif stres protein aktivitelerinin inhibisyonu, lipid ve DNA hasarı ile sonuçlanabilmektedir. Okratoksin A'nın etki gösterme mekanizmalarından biri de OTA'nın oksidatif stresi arttırması aracılığı ile gerçekleştirilir. OTA maruziyetinin serbest radikal üretimini arttırdığı ve/veya serbest radikalleri nötralize eden sistemlerin etkinliğini azalttığı bilinmektedir (Zhang vd. 2021). Ayrıca OTA ile indüklenen hücresel hasarın bir kısmının antioksidanlar ile azaltılması da OTA'nın serbest radikal miktarını arttırarak hasar verdiği görüşünü desteklemektedir. OTA maruziyetine bağlı ROS oluşumu ve artan oksidatif stres aracılığı ile sitotoksisite, inflamasyon ve genotoksisite oluşmaktadır (Manderville 2005).

OTA oksidatif hasarı engelleyen enzimlerin ifadesini değiştirmektedir. Literatür incelendiğinde OTA maruziyeti GSH (glutasyon) gibi antioksidan moleküllerin ya da CAT (katalaz) ve/veya SOD (süperoksit dismutaz) gibi radikal süpürücü enzimlerin ifadesini azaltmaktadır. Sprague-Dawley sıçanlara 14 gün gavaj yolu ile 500 µg /kg v. a./g. OTA uygulamasının plazma AST (aspartat aminotransferaz) seviyesini yükselttiği ve karaciğer ağırlığını azalttığı görülmüştür (Palabiyik vd. 2012). Karaciğer ağırlığının azalması ve artan AST seviyesi karaciğer hasarını işaret etmektedir. OTA uygulanmış grupta fokal nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonu görülmektedir. OTA uygulaması ile GPx1 (glutasyon peroksidaz 1), TrxR (tiyoredoksin redüktaz), CAT ve SOD aktivitesinde bir değişiklik olmazken glutasyon s transferaz aktivitesi OTA uygulanmış grupta düşüktür. Farelerde ise 21 günlük OTA maruziyetinin (250 µg/kg v. a. /g.) karaciğerde CAT, GPx1 ve SOD2 ifadesini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca erkek F344 sıçanlara 4 haftalık gavaj yolu ile OTA (30, 100 ve 300 µg/kg v. a./g. dozlarında) uygulamasının böbrek ve karaciğerde oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına yol açtığı

görülmüştür (Kamp vd. 2005). Bu çalışmalarda OTA'ya bağlı gözlemlenen patolojik bulguların yanında serbest radikal süpürücü moleküllerin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

OTA ile beraber çeşitli antioksidanların uygulanması, OTA'ya bağlı olan oksidatif stresi ve hasarı azaltmaktadır. Bu durum OTA'nın temel hasar verme yollarından birinin oksidatif stres aracılığı ile olduğunu göstermektedir. HepG2 (insan hepatosellüler kanser) hücrelerinde OTA maruziyetinin hücre içi çinko konsantrasyonunun düşüşü, ROS üretiminin artışı SOD aktivitesi ve mitokondriyal membran potansiyeli azalması, DNA iplik kırıklıkları, DNA oksidasyonu, DNA hiper metilasyonu, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumu ve hücre çoğalmasında azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zheng vd. 2013). Potansiyel bir antioksidan olarak kullanılan çinko uygulamasının, OTA kaynaklı ROS üretimini ve SOD aktivitesinde düşüşü önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Erkek farelere haftada 2 gün OTA (1.8 mg/kg v. a./g) uygulaması karaciğerde apoptotik cisimciklerin oluşumunu arttırmaktadır. OTA uygulamasından önce antioksidan uygulaması yapılmasının ise sadece OTA uygulanan gruba göre apoptotik cisimcik oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Atroschi vd. 2000).

OTA maruziyetine bağlı artan oksidatif stresin nedenlerinden biri OTA maruziyetinde aktivasyonu değişen TGFR sinyalizasyonu olabilir. Literatür çalışmaları tarafımızca değerlendirilmiş olup TGFR sinyalizasyonun OTA'ya bağlı fibrozisin yanında (Kısım 2.4'de tartışılmıştır), miRNA aracılığı ile SOD2 aktivitesini kontrol ederek OTA'ya bağlı oksidatif stres artışına sebep olabileceği düşünülmüştür. SOD2 mitokondri matriksinde bulunan, oksidasyon-indirgeme ve elektron taşıma reaksiyonları tarafından üretilen oksijen radikallerini temizleyen bir enzimdir (Nojima vd. 2015). TGF- β ile HK-2 (insan böbrek epitel hücresi) hücrelerinin uyarımı miR-382 üretimini arttırmaktadır ve artan miR-382 SOD2 ifadesini baskılamaktadır (Kriegel vd. 2010). Böylece TGFR sinyalizasyon yolu aktivasyonunun hücrenin serbest radikal süpürme yollarının aktivesini azalttığı görülmektedir. OTA'ya maruz kalan farklı deney sistemlerinde miR-382'nin ya da TGFR sinyalizasyonunun arttığı veya SOD2 düzeyinin düştüğü gözlemlenmiş olup bu durumun tesadüf olamayacağı düşünülmüştür. OTA maruziyeti erkek fare böbreğinde miR-382 ifadesini arttırmakla (Loboda vd. 2017b) beraber fare böbrek ve karaciğerine ek olarak LX-2 (insan hepatik stellat) ve HK-2 (insan proksimal tübül) hücrelerinde TGFR sinyalizasyonunu arttırmaktadır (Chae vd. 2022; Pyo vd. 2020). Ayrıca LLC-PK1 (domuz böbrek korteksi) hücrelerinde OTA maruziyetinin çeşitli radikal süpürücü enzimlerle beraber SOD2 ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Loboda vd. 2017a). Bu dört makale birlikte ele alındığında, OTA maruziyetinin TGFR sinyalizasyon aktivasyonunun miR-382 aracılığı ile SOD2'yi baskılayıp serbest radikal süpürme sistemin fonksiyonunu bozarak oksidatif stresi arttırabilen bir faktör olabileceğini işaret etmektedir.

2.1.3. OTA maruziyeti fibrozise sebep olur

Fibrozis doku iyileşmesi sürecinin bir parçası olmakla beraber uzun süreli fibrozis dokulara ciddi hasar verip, siroz ve kronik karaciğer yetmezliği için önemli bir risk faktörüdür (Feili vd. 2018). Farelerde gerçekleştirilen güncel çalışmalarda OTA'nın böbrek, karaciğerde ve kalın bağırsakta fibrozise sebep olduğu rapor edilmiştir (Chae vd.

2022; Damiano vd. 2021; Pyo vd. 2020; Rhee vd. 2023). Fareler 12 hafta (düşük doz 200 ya da yüksek doz 1000 µg/kg v. a./g) OTA'ya maruz bırakılmış, maruziyet sonrasında kandaki böbrek ve karaciğer hasar belirteçlerinin düzeyi incelenmiş ve böbrek ile karaciğerin histolojik analizi yapılmıştır (Chae vd. 2022; Pyo vd. 2020). Yüksek doz OTA uygulaması ALP (alkalen fosfataz), ALT (alanin aminotransferaz), AST, serum üre azot ve kreatin seviyelerini yükselterek karaciğer ve böbrek hasarını işaret etmiştir. Histolojik analizler böbrek ve karaciğer dokusunda fibröz oluşumunu göstermiş olup, iki dokuda da α -SMA (α -düz kas aktin/ α -smooth muscle actin) ve fibronektin ifadesinde artış, E-kadherin ifadesinde azalma gözlemlenmiştir. Bu iki dokuda TGFR I ve SMAD 2/3 miktar ve aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir. Gruplar çalışmalarına böbrek (HK-2) ve karaciğer (LX-2) hücrelerini dahil ederek *in vitro* olarak devam etmiştir. Bu hücre hatlarında SMAD, β -katenin ya da TGFR inhibisyonunun OTA maruziyetine bağlı artan fibrozis markerlerin ifadesini azalttığı görülmüştür. TGFR inhibisyonunun SMAD 2/3 aktivitesinde kayba, SMAD 2/3 aktivitesinde düşüşün ise fibrozis markerlarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca böbrekte β -katenin baskılanmasının da fibrozis markerlarında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Dolayısı ile OTA maruziyetinde artan TGFR sinyalizasyonu ve WNT/ β -katenin sinyalizasyonunun fibrozis ile ilişkili olabileceği önerilmiştir (Pyo vd. 2020).

OTA maruziyetinde oluşan hasarlar TGFR sinyalizasyonu aktivitesini arttırabilir ya da OTA maruziyetinde bazı miRNA'ların ifadesinin değişmesi bu yolların aktivitesini etkileyebilmektedir. OTA maruziyeti miR-21 (böbrekte) ve miR-155-5p (böbrek ve kalın bağırsakta) ifadesinin artmasına sebep olmaktadır (Loboda vd. 2016; Loboda vd. 2017a; Loboda vd. 2017b; Rhee vd. 2023). Okratoksin A maruziyetinde fare böbreğinde miR-21'in arttığı gözlemlenmiştir (Loboda vd. 2016; Loboda vd. 2017a; Loboda vd. 2017b). miR-21 TGFR sinyalizasyon yolunun uyarılması sonucunda ifadesi artan ve SMAD 7'in (SMAD 7 TGFR sinyalizasyonunu baskılayan bir proteindir) inhibisyonu ile ilişkili bir miRNA'dır. Bu durum OTA maruziyetine bağlı TGFR sinyalizasyonunun arttığı ve artan miR-21 ile TGFR sinyalizasyonun pozitif geri-besleme yolu ile daha fazla artırıyor olabileceğini düşündürmektedir. Böylece bu miR-21 OTA ilişkili fibrozisi arttırıyor olabilir. OTA maruziyetinde artan miR-155-5p ifadesinin baskılanması OTA'ya bağlı fibroziste azalmaya sebep olmaktadır (Rhee vd. 2023; Yang vd. 2023). miR-155-5p inhibisyonu SMAD 2/3'ün nükleusta birikimini azaltmaktadır (Rhee vd. 2023). Dolayısı ile TGFR sinyalizasyonu etkisini azaltması da miR-155-5p inhibisyonunun fibrozisi azaltmasına katkı sağlamış olabilir. OTA maruziyetinde miR-155-5p artarak SMAD 2/3'ün nükleusta birikmesini sağlayan bir mekanizmada görev yapıyor olabilir. OTA maruziyeti sonucu artan fibrozisteki miR-155-5p görevinin aydınlatılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

2.1.4. OTA DNA eklentisi oluşturarak genotoksik etki gösterebilir

OTA'nın DNA eklentisi oluşturarak genotoksik etki gösterip göstermediği konusunda tartışmalar devam etmektedir. OTA maruziyeti sonrasında, DNA eklentisi oluşumunu gösteren çalışmalar, bu eklentilerin OTA toksisitesi ile oluştuğunu söyleyen veya DNA eklentisi saptanmayan çalışmalar literatürde mevcuttur. Potansiyel bir karsinojenin, genotoksik olup olmadığının kesin bir şekilde gösterilmesi maruziyette oluşacak riskin hesaplanmasında önemlidir. Tanımlanmış DNA eklentisi oluşturma

özelliğine sahip bir kanserojene kıyasla, genotoksik olmayan bir kanserojenin insan sağlığı için 10 kat daha az riskli olduğu düşünülmektedir (Mantle vd. 2010). Dolayısı ile OTA'nın genotoksik olduğunun kesin bir şekilde kanıtlanması durumunda bugün gıdalarda izin verilen OTA limitleri daha fazla geçerli olmayacak ve gıdalarda OTA'nın bulunmaması istenecektir. Ancak OTA'nın genotoksik olduğu varsayıp katı kurallar uygulanırsa, eğer OTA genotoksik bir etkiye sahip değilse gıdalarda bulunan OTA'yı tamamen elimine etmek amacı ile alınacak önlemler hem toplum için maliyetli olacak hem de gereksiz bir şekilde birçok gıdanın tüketime uygun olmayan gıda olarak sınıflandırılmasına sebep olarak ciddi ekonomik kayıplara yol açacaktır.

OTA'nın fotoirradiyasyona maruz kalması ile fenolik radikalleri oluşmakta ve bu radikaller de deoksi guanozinine (C8'e) kovalent olarak bağlanmaktadır (Dai vd. 2003; Faucet vd. 2004). Faucet vd. (2004) fotoooksidasyon ile OTA'nın karbon ve oksijen bağlı dGMP eklentileri ürettiğini bildirmiştir. OTA'ya maruz kalmış sıçan ve domuz böbrek dokuları bu fotoirradiasyon ile elde edilmiş DNA eklentileri standart olarak kullanılarak 32P-postlabeling çalışmaları yapılmış ve standartlarla uyumlu sonuçların elde edildiği görülmüştür. Mantle vd. (2010) 10 sıçanda DNA eklenti aralığını 1 milyar nükleotitte 20-70 eklenti olarak bulmuştur. OTA tarafından oluşturulacak eklentiler çift iplik kırıklarına sebep olur. DNA eklentileri aracılığı ile replikasyon çatalının oluşmasını engellenmesinden dolayı çift iplik kırıkları oluşabilmektedir (Sproviero vd. 2015).

OTA'nın DNA eklentisi oluşturduğunu savunan araştırmacılar, DNA eklentisi oluşumu görülmeyen çalışmalarda, metodolojik standart oluşturulmamış olmasından dolayı DNA eklentilerinin saptanmasının mümkün olmadığını, yeterli OTA dozu uygulanmasının yapılmadığını ya da optimizasyon yetersizliğinden DNA eklentilerinin deneysel süreçlerde kaybedildiğini veya bu eklentilerin saptanmasının mümkün olmadığını öne sürmüştür (Mantle vd. 2010). OTA'nın DNA eklentisi oluşturmadığını savunan gruplar literatürdeki DNA eklentisi ile ilgili çalışmaların tutarlı olmadığını, DNA eklentisi oluşumunu gösteren çalışmaların diğer çalışmalarda desteklenmediğini, DNA eklentilerinin (eklenti saptanan çalışmalarda) OTA toksisitesi ya da kanserojenik etki görülmeyen dokularda da saptandığını, eklentinin görüldüğü 32P-postlabeling deneylerinde özgüllüğün ve çözünürlüğün düşük olduğunu öne sürmüş kendi çalışmalarında da DNA eklentisi saptanmadığını bildirmiştir (Delatour vd. 2008). Ayrıca laboratuvarında deney hayvanlarına uygulanan dozların insanların günlük maruziyetinden bir milyon kat daha yüksek olduğu bildirilmiş olup insanın maruz kalabileceği durumu yansıtmadığı vurgusu yapılmıştır (Turesky 2005). OTA'nın genotoksik olma durumu yiyeceklerde bulunabilecek OTA sınırının belirlenmesinde önemli olacağından, uzun vadede sonuca ulaşılmamış bir fikir ayrılığı olarak kalmayacağı düşünülmektedir.

2.1.5. OTA hücrenin ölüm ve hayatta kalma yollarını aktive eder

Çeşitli hücre hatlarında ya da hayvan modellerinde okratoksin A'nın ERK (Darbuka vd. 2021; Gan vd. 2017; Kumar vd. 2012; Lee vd. 2019) ve/veya AKT (Akpınar vd. 2019; Park vd. 2019) fosforilasyonunu etkilediği görülmektedir. Bu yolların aktivasyonu ve hücrenin vereceği yanıt; canlı türüne, hücre hattına veya kültür koşullarına

bağlı olmakla birlikte OTA'ya bağlı ERK ve AKT aktivasyonu hücre için ölüm ve hayatta kalma durumunu belirlemektedir (Özcan vd. 2015).

Özcan vd. (2015) OTA maruziyetinde ERK ve AKT aktivasyona sebep olan reseptör ve bu sinyalizasyon yollarının hücrenin OTA'ya vereceği yanıt üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmiştir. İnsan proksimal böbrek tübül hücre hattına OTA uygulaması (10 μ M) nekrotik ve apoptotik ölümü arttırarak hücre canlılığını azaltmaktadır. OTA uygulamasının pAKT (S473 ve T308) ve pERK miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Özcan vd. (2015) pAKT (S473 ve T308), PI3K'nın katalitik alt ünitesi p110 α , GKS 3 β , mTOR ve ribozomal protein S6 ifadesinin arttığını, PDK1 Ser241 fosforilasyonunun total PDK1'e göre arttığını ayrıca PI3K/AKT'nin negatif regülatörü fosforillenmiş PTEN α Ser380'in miktarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu hücre hattında MEK/ERK sinyalizasyon yolunun da zamana ya da doza bağlı olarak OTA varlığında aktivasyonunu gözlemlemiş olup, JNK/SAPJ ve p38 MAPK fosforilasyonunun azaldığı tespit edilmiştir.

Özcan vd. (2015) çalışmanın devamında OTA ile beraber PI3K/AKT inhibitörü ya da MEK/ERK1-2 inhibitörü uygulaması yapmış ve bu yolların okratoksin A maruziyetinde hücre canlılık durumu üzerindeki etkisi incelemiştir. PI3K/AKT inhibisyonunun OTA maruziyetinde hücre canlılığını daha fazla azalttığı ve MEK/ERK 1-2 inhibisyonunun ise canlılığı daha arttırdığı görülmüştür. Ayrıca OTA maruziyetine bağlı HGFR fosforilasyonunun arttığı, OTA ile beraber HGFR inhibitörü uygulaması yapıldığında HGFR fosforilasyonu ile birlikte AKT aktivasyonunun da inhibe edildiği ve hücre canlılığında azalmanın olduğu bildirilmiştir. Bu durum, OTA maruziyetinde HGFR aracılığı ile aktive olan PI3K/AKT yolağı üzerinden hücrelerin hayatta kalmasının desteklendiğini ve HGFR sinyalizasyonunun hasar alan hücrelerin çoğalmasına ve dolayısı ile kanser gibi patolojilere sebep olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte OTA maruziyetinde artan ERK fosforilasyonunun hangi reseptör ile tetiklendiği henüz belirlenememiştir. Ancak OTA maruziyetinde AKT ve ERK fosforilasyonunun devamlılığının sebeplerinden bir diğeri OTA maruziyeti ile fosfatazların [VHR (Vaccinia H1-Related)/DUSP3, DUSP4 ve PHLPP (PH domain lösin-zengin tekrar protein fosfataz) gibi] artan ubiquitin proteozom sistem (UPS) ve otofaji aktivitesi sonucu yıkımının gerçekleşmesidir (Akpınar vd. 2019).

2.2. Prolaktin Reseptörü

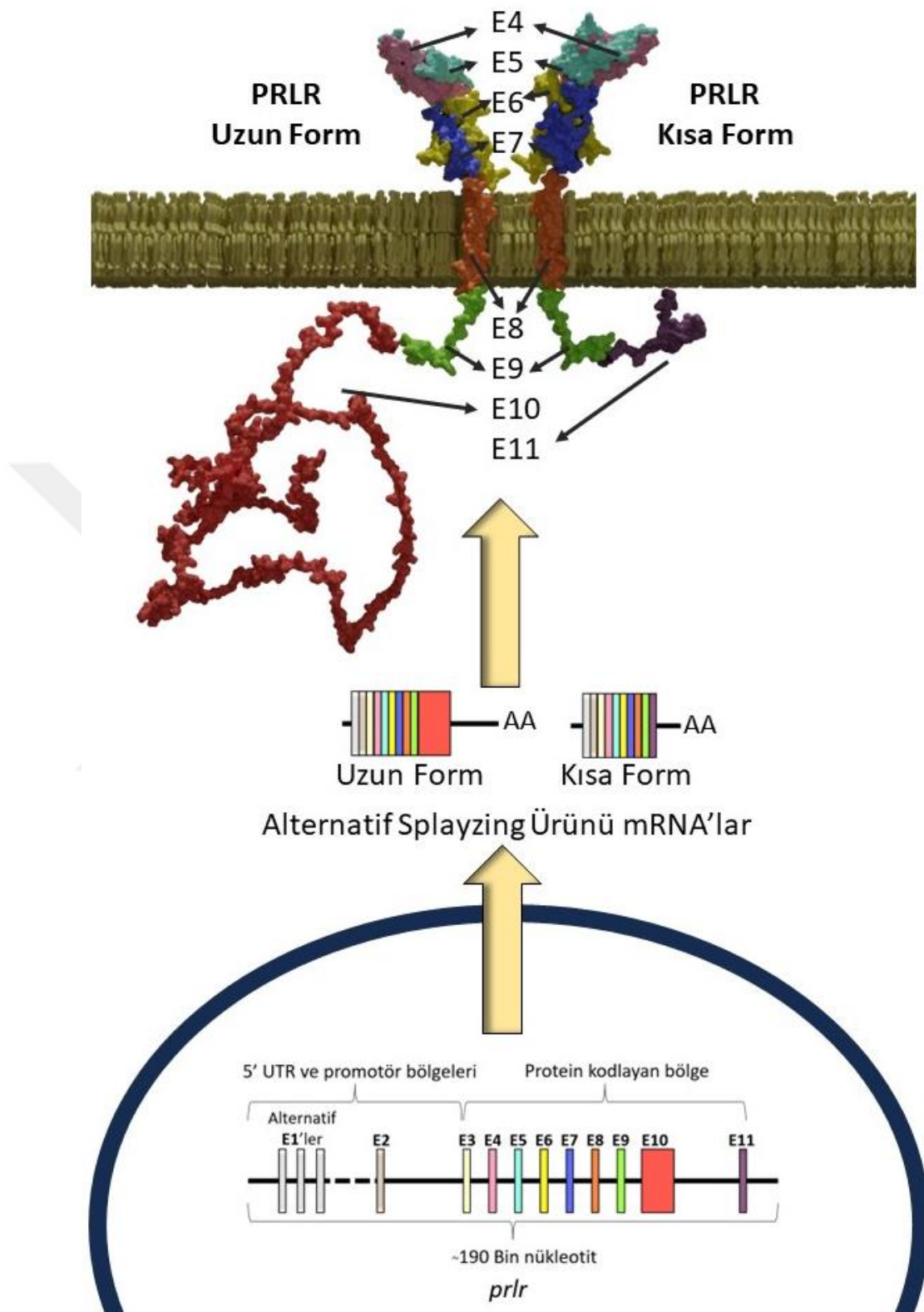
Prolaktin reseptör geni kemikli balıklardan itibaren omurgalılarda görülmektedir. Bu canlı gruplarında süt oluşumu, tuz-su dengesi, proliferasyon ve immün-regülasyon da dahil farklı fizyolojik süreçler ile ilişkilendirilmiştir (Smirnova vd. 2007). Prolaktin reseptör geninden alternatif splayzing yolu ile farklı protein izoformları üretilmektedir. Prolaktin reseptör gen ürünlerinden uzun form prolaktin reseptörü türler arasında korunmuş olmakla beraber bu genin diğer alternatif splayzing ürünleri (kısa formlar) canlı grupları arasında korunmuşluk göstermemektedir.

2.2.1. Prolaktin reseptör gen yapısı ve prolaktin reseptör izoformları

Prolaktin reseptör geni memelilerde 190 kbç uzunluğunda olup çoklu promotörlerce kontrol edilir ve protein kodlamasına katılan 8-11 ekzona sahiptir (Şekil 2.1). Bu genden alternatif splayzing yolu ile farklı PRLR izoformları üretilmektedir. Sıçan ve fare prolaktin reseptör izoformlarında prolaktin reseptör izoformlarının hücre dışı domaini ve transmembran domaini korunmuş olup hücre içi domainlerinde farklılık göstermektedir (Şekil 2.1). Sıçanda önce kısa form prolaktin reseptörü tanımlanmış daha sonra uzun form prolaktin reseptörü tanımlanmıştır (Boutin vd. 1988; Shirota vd. 1990). Uzun ve kısa formu kodlayan mRNA'da ortak olarak ekzon 3 ile 9 arasındaki ekzonlar sırası bulunur. Prolaktin reseptör geninden üretilen mRNA'ya ekzon 9'u takiben, ekzon 10 eklenirse protein kodlamasına katılan 1833 nükleotit taşıyan uzun form, ekzon 10 yerine ekzon 11 eklenir ise protein kodlamasına katılan 933 nükleotit taşıyan kısa form prolaktin reseptörü üretilir.

Prolaktin reseptör geninin transkripsiyonel aktivitesi birden fazla promotör ile kontrol edilmektedir: Prolaktin reseptör geni birden fazla promotör bölge ile kontrol ediliyor olup farklı türlerde 6'ya kadar promotörü olduğu bildirilmiştir (Hu vd. 1999; Hu vd. 1996; Ormandy 1998; Tsai-Morris ve Dufau 2004). Birden fazla promotör farklı dokularda farklı koşullarda prolaktin reseptör gen ifadesi düzeyinin farklı olmasından sorumlu olabilir. Prolaktin reseptör geni promotörlerinden generik olarak bilinen promotör III (insan, fare ve sıçanda promotör III) ile transkripsiyon mekanizması detaylı çalışılmıştır (Dong vd. 2006). Promotör III'de ERE (östrojen yanıt elemanı) bulunmamakla birlikte SP1 (özgüllük proteini/specificity protein 1) ve C/EBP β (CCAAT/enhancer bağlayıcı protein β) element bölgeleri bulunmaktadır. Sp1 ve C/EBP β promotörün bazal aktivitesinden sorumludur. Promotör III'de ERE bulunmamakla beraber E2 (17 β -estradiol) maruziyetinde ER α aracılığı ile bu promotörün aktivitesi artar. E2 maruziyeti kromatinde C/EBP β , ER α , SRC1, p300, pCAF, TFIIB (transkripsiyon faktör II B) ve Pol II'nin kümelenmesine sebep olur. ER α E2 ile indüklendiğinde, C/EBP β ve SP1 etkileşerek bu iki protein arasında bir köprü oluşturur. C/EBP β -SP1-ER α kompleksinin oluşumu, koaktivatörlerin alımını ve histon 3 ile histon 4 asetilasyonunun artmasına sebep olur. Bu durum TFIIB'nin ve RNA polimeraz kompleksinin promotöre alınmasını desteklemektedir.

Prolaktin reseptör ifadesinin regülasyonunda 3'-UTR bölgeleri önemli rol üstleniyor olabilir: Uzun form prolaktin reseptörü mRNA'sının protein kodlayan bölgesi (CDS) 1833 nükleotit uzunluğunda iken kısa form prolaktin reseptörü mRNA'sının CDS'si 933 nükleotit uzunluğundadır. Bununla birlikte prolaktin reseptör mRNA'larının toplam uzunluğunun değişkenlik gösterdiği 1990'lı yıllarda gerçekleştirilen öncü Northern blot çalışmalarında gösterilmiştir. Bu çalışmalarda kısa form prolaktin reseptör mRNA uzunluğunun 1.8 ile 5.5 kb arasında, uzun form prolaktin reseptörünün ise uzunluğunun 2.5 ile 9.7 kb arasında değiştiği görülmüştür (Hu ve Dufau 1991; Shiota vd. 1990). Prolaktin reseptör mRNA'sı 5'-UTR bölgesine sahip olmakla beraber aynı form prolaktin reseptör mRNA'larındaki farkın ancak 400 nt kadarı 5'-UTR üzerinden açıklanabilmektedir. Dolayısı ile 1990'lı yıllardaki çalışmalar prolaktin reseptör mRNA'larının oldukça değişken 3'-UTR'lere sahip olduğuna işaret etmektedir. Prolaktin reseptör mRNA'larının farklı 3'-UTR'leri birçok miRNA ya da protein için hedef bölgesi oluşturup, bu mRNA'ların degradasyonuna sebep olan bir kontrol basamağı olarak fonksiyon görüyor olabilir.



Şekil 2.1. Prolaktin reseptör geni (*prlr*) ve genin alternatif splayzing ürünü olan uzun ve kısa form prolaktin reseptörü. Sıçan prolaktin reseptörü yaklaşık 190 bin nükleotit çifti uzunluğunda bir gendir. Çoklu promotör aracılığı ile kontrol edilir ve bu genden alternatif splayzing yolu ile uzun ya da kısa form prolaktin

reseptörünü kodlayan mRNA'lar üretilir. Uzun form ve kısa form prolaktin reseptöründe hücre dışı domaini ve sinyal peptidini kodlayan E3-E7 arası ekzonlar, transmembran kısmı kodlayan E8 ve Box-1 bölgesini kodlayan E9 ortaktır. Üretilen form uzun form ise ekzon 9'dan sonra ekzon 10 eklenir. Kısa form üretilen mRNA'da ekzon 10 bulunmayıp bunun yerine ekzon 11 (farklı türlerde ekzon 10 dışında farklı bir gen bölgesi de olabilmektedir) eklenmektedir. Not: Bu ana formlar dışında hücre hatlarında ya da farklı kanser hücrelerinde bu ekzonların tamamının olmadığı ya da ekzonların bir kısmı bulunmayan formlar gösterilmiştir. Membranda gösterilen proteinin 3 boyutlu yapısı AlphaFold (Jumper vd. 2021; Varadi vd. 2022) veri bankasından temin edilen verilerin, görsel oluşturmak amacı ile tekrar tasarlanıp modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur. Veri bankası kodları uzun form için AF-A0A0G2K488 ve kısa form için AF-A0A0G2K813'dir. E: Ekzon, AA: Poli (A) kuyruğu

Prolaktin reseptörünün yapısal özellikleri: Prolaktin reseptör uzun formu sinyal peptidi dahil 610 aminoasit ve kısa formu sinyal peptidi dahil 310 aminoasitten oluşmaktadır. Uzun form ve kısa form prolaktin reseptöründe 280 aminoasit ortak olup hücre içi domaininde farklılık bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Prolaktin reseptör hücre dışı sitokin reseptör homoloji domain karakteristiğine sahip olup iki alt-domaine (D1 ve D2) ayrılmaktadır. Prolaktin reseptör hücre dışı domaininde bulunan sistein rezidüleri (D1) ve WS motifi (D2) ligand bağlanmasında kritik öneme sahiptir. Hücre dışı domainde bulunan ilk dört korunmuş sistein rezidüsü iki çift disülfid bağı oluşturur. Bu rezidüler (Cys12, Cys22, Cys51 ve Cys62) ligand bağlanması için hayati öneme sahiptir (Rozakis-Adcock ve Kelly 1991). Ayrıca WS motifinin kaldırılması reseptöre prolaktin bağlanmasını 23 kata kadar azaltabilmektedir (Rozakis-Adcock ve Kelly 1992). Reseptörlerin hücre dışı domainlerindeki karbonhidrat gruplarının ligand-reseptör etkileşimlerine ve hücre içi yer değiştirmesine katkıda bulunması yaygındır. Buteau ve meslektaşları (1997) prolaktin reseptörü hücre dışı Asn rezidülerinin (Asn35, Asn80 ve Asn108) ligand bağlanması ve reseptörün membrana taşınmasındaki önemini çeşitli hücre hatlarında çalışmıştır. PRLR glikozilasyonunun hücre dışı domaindeki glikozilasyonun ligand bağlanması için gerekli konformasyonu sağlamaktan ziyade, hücre tipine bağlı olarak reseptörün hücre membranına translokasyonunda önemli olduğunu ve PRLR sinyalizasyonunda hücre dışı glikozillenmenin önemli olmadığı gösterilmiştir (Buteau vd. 1998). Ancak PRLR'nin membrana taşınmasında Asn rezidülerinin öneminin hücre tipine bağımlı olduğu görülmüştür. Prolaktin reseptörlerinin hücre içi domaininde ise Box 1 motifi bulunmakta olup türler arasında prolaktin reseptörünün en korunmuş bölgesidir. Box 1 JAK (Janus kinaz) bağlanması ve JAK/STAT sinyalizasyonu için gerekli olup, bu motifin ve özellikle son prolinin korunması JAK aktivasyonu için kritik öneme sahiptir (Pezet vd. 1997). Ayrıca uzun form prolaktin reseptörünün hücre içi domaininde bulunan 580. tirozinde JAK'ın aşağı akışında bulunan STAT'ların aktivasyonunun maksimum seviyede gerçekleştirebilmesi için gereklidir. Ayrıca her iki formda bulunan Box-1'ne komşu LL, uzun formda bulunan S349 ve kısa

form prolaktin reseptöründe bulunan LPGG reseptörün internalizasyonunda rol almaktadır.

Çizelge 2.1. Prolaktin reseptör protein yapısı. Uzun ve kısa form prolaktin reseptöründe hücre dışı domain, transmembran domain ile beraber transmembran domainin membrana yakın kısmı aynıdır ve formlar hücre içi domainlerinde (C-terminal uçta) farklılık göstermektedir. Çizelgede aminoasit dizilerinin hangi ekzon tarafından kodlandığı belirtilmiştir. Çizelgede reseptörün hücre dışı domaininde ligandı bağlamasında önemli olan disülfid bağları ve WS motifi ile glikozillenerek reseptörün membrana lokalize olmasına katkı sağlayan N rezidüleri belirtilmiştir. Hücre içi domaininde ise reseptör aktivitesi için gerekli Box-1 ve Y580 ile beraber reseptör internalizasyonunda önemli olan LL, S349 ve LPGG vurgulanmıştır. Ayrıca Y515'in reseptör sinyalizasyonun baskılanmasında rolü vardır.

Sinyal Peptiti

E3

MPSALAFVLLVLNISLLKG

Hücre Dışı Domain

E4

1 12 22 35
QSPPGKPEIHKCRSPDKETFTCWWNPBGTDGGLPTNYSLTYSKE

E5

51 62 80
GEKTTYECPDYKTSGPNSCFFSKQYTSIWKIYIITVNNATNQMGSSSSDPLYVDVTYIV

E6

108
EPEPPRNLTLEVQQLKDKKTYLWVKWSPPTITDVKTGWFTMEYEIRLKPEEAEEW

E7

WS motif
EIHFTGHQTQFKVFDLYPGQKYLQVTRCKPDHGYWSRWSQESSVEMP

Transmembran Domain

E8

DFTLKDDTVWIIIVAILSAVICLIMVWVAVALKGYS

Hücre İçi Domain

E9

Box-1
MMTCIFPPVPGPKIKGFDTHLLE

E10

(Uzun Forma Özgü Hücre İçi Kısım) 349
KGKSEELLSALGCQDFPPTSDCEDLLVEFLEVDDNEDERLMPSHSKEYPGQGVKPTHLPDSDSGHGS
YDSHLLSEKCEEPQAYPPTLHIPEITEKPENPEANIPPTVDPQSTNPNFHVDAKPSSTWPLLPGQHM
PRSPYHSVADVCKLAGSPVNTLDSFLDKAEENVLKLKALETGEEVAKQKGAKSFPSPDKQNTPWPLL

515
QEKSPTVYVKPPDYVEIHKVNKDGVLSLFPKQRENNQTEKPGVPETSKEVAKVSGIMDNNILVLVPDS
580

RAQNTALLEESAKKAPPSFEADQSEKDLASFTATSSNRRLQLGRLDYLDPTCFMHSFH

E11

(Kısa Forma Özgü Hücre İçi Kısım)
TGSPSKYKVDLYLALPGGFQKLDNAGELDY

2.2.2. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu

Prolaktin reseptör sinyalizasyonu, prolaktin hormonu aracılığı ile başlatılır. Reseptör hormon bağımlı bir şekilde dimerize olabildiği gibi hormon bağımsız bir şekilde de dimerize (homo- ya da hetero-dimerize) olabilmektedir. Prolaktin reseptörü içsel kinaz aktivitesinden yoksundur. Reseptörün ve ilişkili yolların fosforilasyonu JAK, SRC ve TEC gibi kinazlara bağlıdır (Kline vd. 2001; Rui vd. 1994; Vara vd. 2000). Bu kinazlar aktivasyon sonrasında önce reseptörü ve sonra diğer akış-aşağı proteinleri fosforilleyerek prolaktin reseptör sinyalizasyonunu gerçekleştirir. Sinyalizasyon sonucunda proliferasyon, apoptozis, iyon dengesi gibi birçok sürecin regülasyonu gerçekleştirilir. Sinyalizasyonun sonlandırılması ise çeşitli proteinler ve/veya reseptör endositozu ile gerçekleştirilmektedir (Kısım 2.2.3).

2.2.2.1. Prolaktin reseptör JAK/STAT aktivasyonunu gerçekleştirir

Prolaktin indüklü olarak gerçekleşen uzun form prolaktin reseptör homodimerizasyonu sonrasında Box-1 bölgesine tutunan JAK'lar aktive olur. Tespit edilebilir düzeyde JAK aktivasyonu 1 dakika içerisinde gözlemlenir (Clevenger ve Kline 2001). Box-1 bölgesi türler arasında oldukça korunmuş olup, bu bölgenin kaybında sinyalizasyon gerçekleşmez. Reseptör aktivasyonu ile JAK'lar ilk olarak birbirlerini karşılıklı olarak fosforilleyerek aktive eder. p-JAK'lar daha sonrasında reseptörün hücre içi domaininde bulunan tirozinleri fosforiller. Prolaktin reseptörü türler arasında korunmuş tirozin rezidülerine sahip olmakla beraber bu tirozinlerin her birinin fosforillenmesi eşit derecede JAK/STAT yolunu etkilememektedir. Y580 fosforilasyonunu diğer tirozinlere göre (Y479 ve Y473) çok daha yüksek JAK/STAT aktivasyonu sağlamaktadır (Pezet vd. 1997).

Prolaktin reseptörünün hücre içi domainindeki fosforillenen tirozin rezidülerine STAT'lar (1,3 ve 5) SH2 domainleri (Src homoloji domain 2) aracılığı ile tutunur ve reseptöre tutunan STAT'lar JAK tarafından fosforillenir. Fosforillenen STAT'lar homo- ya da heterodimer oluşturarak nükleusa transloke olur (Darnell Jr vd. 1994). STAT'lar promotorlerde bulunan GAS (Gama interferonla aktive edilen sekans) motiflerini taşıyan genlerin ifadesini düzenler. Hücre döngüsü, erkek üremesi, kromatin yeniden yapılanması ve hücre iskeleti organizasyonu kapsayan genler prolaktin sinyalizasyonun hedeflerindendir (Raut vd. 2023). Prolaktin uyarımı meme ve prostat kanser hücrelerinde proliferasyonu teşvik edebildiği gibi (Brockman vd. 2002; Van Coppenolle vd. 2004), hipofiz tümörü hücrelerinde apoptozu da teşvik edebilir (de Dios vd. 2019). Ayrıca STAT'lar sadece STAT'larla etkileşmeyip daha farklı proteinlerle de etkileşerek promotöründe GAS motifi taşımayan gen ifadelerini düzenleyebilmektedir. *p21* geninin promotöründe STAT bağlanma bölgesi yoktur, ancak STAT BRACA1 ile kompleks oluşturarak bu genin ifadesini etkiler. BRACA1 *p21* ifadesini arttırırken, p-STAT-BRACA1 kompleksi *p21* ifadesini indüklemeyebilir (Chen ve Walker 2016). Böylece prolaktin

uygulaması BRACA1'in tümör baskılayıcı etkisini, hücre döngüsü inhibitörü *p21*'in ifadesinin artmasını engelleyerek, inhibe eder.

2.2.2.2. Prolaktin reseptör MAPK/ERK aktivasyonunu gerçekleştirir

Prolaktin uygulaması Ras aktivasyonunu indükler. Bu aktivasyon SHC, GBR2 ve SOS proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir (Erwin vd. 1995). SHC adaptör proteini SH2 domaini aracılığı ile fosfotirozin rezidülerine bağlanır. Prolaktin uyarımı SHC'nin fosforilasyonunu arttırmaktadır (Jos' Berlanga vd. 1997). SHC maksimum fosforilasyonu 10-15 dk içerisinde gerçekleşir ancak SHC'nin fosforilasyonun hangi protein aracılığı ile gerçekleştiği kesin olarak bilinmemektedir (Yu ve Rillema 2000). SHC (SH2 domainleri aracılığı ile) diğer sinyalizasyon proteinleri özellikle de GRB2 için bir adaptör görevi görür. Fosforillenen SHC'nin GBR2 (büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2) ve SOS ile bağlanması indüklenir (Erwin vd. 1995). SOS ile Ras'ın aktivasyonu sağlanır. Sonrasında Ras-aracılı olarak serin/treonin kinaz Raf-1 aktive edilir. Ras/Raf-1 aktivasyonunun akış-aşağı hedefi MAPK ve transkripsiyon faktörleridir.

MAPK aracılığı ile ERK fosforilasyonu gerçekleşmektedir. ERK'nin nükleus ve sitozolde bulunabilen substratlarına FOXO, SMAD, STAT ve BCL6 örnek verilebilir (Maik-Rachline vd. 2019). ERK monomerlerinin çoğunlukla nükleer substratlarla etkileştiği, ERK dimerlerinin ise sitoplazmik substratlarla etkileşime girdiği bildirilmiştir (Lavoie vd. 2020). Aktif olmayan ERK sitoplazmada bağlayıcı (anchoring) proteinlerle etkileşim halinde bulunmaktadır. Fosforillenerek aktif hale getirilen ERK ankor proteinlerinden salınır ve importin7 ile nükleusa gider. ERK dimerizasyonu inhibitör aracılığı ile bloklandığında, stoplazmik ERK sinyalizasyonunun bloklandığı, nükleer sinyalizasyonun etkilenmediği görülmektedir (Lavoie vd. 2020). Ayrıca ERK doğrudan DNA ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonu üzerinde rolde olabilir (Lavoie vd. 2020).

Prolaktin aracılı MAPK aktivasyonu, insan karaciğeri, rodent Nb2 T hücre hattı, insan meme hücresi ve doğal öldürücü CD56⁺ hücreler de dahil olmak üzere birçok hücrede gösterilmiştir (Gubbay vd. 2002). Prolaktin reseptör MAPK ilişkisi hücre tipine göre farklılık gösteriyor gibi görünmektedir. Fare kısa form prolaktin reseptörünün, NIH-3T3 fibroblastlarında, MAPK aktivitesini indüklediği gösterilmiştir ve hücre proliferasyonuna katıldığı önerilmiştir (Das ve Vonderhaar 1995; Devi vd. 2011). İnsan kısa form prolaktin reseptörü de hücre kültüründe MAPK aktivasyonunu gerçekleştirebilmektedir, ancak bu aktivasyon gecikmeli ve uzatılmıştır bundan dolayı rolünün proliferasyondan çok farklılaşma olduğu düşünülmektedir (Huang vd. 2008). Kısa form prolaktin reseptör aracılı MAPK/ERK sinyalizasyonunun inhibisyonu da tanımlanmış olup Kısım 2.2.3'de verilmiştir.

2.2.2.3. Prolaktin reseptörü PI3K/AKT sinyalizasyonunu başlatır

Prolaktin uygulaması SRC kinaz ailesi üyelerini aktive edebilmektedir. Tavuk embriyo fibroblast hücrelerinde gerçekleştirilen çalışma uzun form prolaktin reseptörüne

c-Src bağlanıp aktive olduğunu ve bu aktivasyonun JAK aktivasyonuna ya da reseptör fosforilasyonuna bağlı olmadığını göstermiştir (Vara vd. 2000). PI3K, RAS ya da Src tarafından aktive edilebilir. PI3K regülatör alt ünitesi ile reseptörle ya da IRS1 (insulin reseptör substrat 1) ve GAB2 gibi proteinlerle etkileşip aktive olabilir (Ali ve Ali 2000; Jos' Berlanga vd. 1997). Fare meme hücrelerinin prolaktin ile uyarılmasının SHP2 fosforilasyonuna, SHP2-GAB2 ve GAP2-PI3K komplekslerinin oluşumuna sebep olduğu görülmüştür (Ali ve Ali 2000). SHP2'nin aktivasyonu Y580A mutantlarında azalmakla beraber, hücre içi domainin büyük kısmını kaybetmiş mutantlarda tamamen kaybolmaktadır.

PI3K membranda bulunan PIP2'i [Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat] fosforilleyerek PIP3 [Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat] oluşumunu sağlar. Membranda bulunan PIP3 AKT ve PDK1 ile etkileşime girebilir bu sayede PDK1 AKT'nin aktivasyon ilmeğindeki T308'e erişebilir ve kısmi AKT aktivasyonuna sebep olur. Ardından AKT'nin S473'den mTORC2 gibi proteinler tarafından fosforillenmesi ile AKT'nin tam aktivasyonu gerçekleştirilir.

Sperm hücrelerinde prolaktin uygulaması PI3K/AKT üzerinden dölleme kapasitesini ve sperm hayatta kalmasını artırır (Pujianto vd. 2010). Duodenum ve insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinde prolaktin hormon uyarımı ile PI3K üzerinden (MEK ya da JAK2 değil) kalsiyum akışının arttığı gösterilmiştir (Jantarajit vd. 2007). Bu şekilde laktasyon dönemlerinde olduğu gibi artan prolaktin uyarımı sayesinde duodenumdan kalsiyum absorpsiyonu artırılarak artan ihtiyacın karşılanmasını sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca W53 hücrelerine (lenfoid hücreleri) prolaktin uygulaması SRC kinazları, PI3K/AKT yolu ve transkripsiyon faktörü olan c-Myc (proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz kontrolüne katılan bir onkogenik transkripsiyon faktörü) ifadesi de indüklenmektedir (Dominguez-Caceres vd. 2004; Vara vd. 2001). Prolaktin sinyalizasyonu ile aktive olan AKT nükleusa transloke olur ve buradaki transkripsiyon faktörlerini fosforiller. Nükleusta AKT FOXO3a'yı fosforilleyip nükleustan dışlanmasına neden olur ve FOXO3a'nın baskıladığı c-Myc'yi indükler (Dominguez-Caceres vd. 2004). Ayrıca aktifleşen AKT c-Myc'nin degradasyonunu GSK3 fosforilasyonunu gerçekleştirerek inhibe eder.

2.2.3. Prolaktin reseptör sinyalizasyonunun inhibisyonu

Hormon sinyalizasyonun başlatılmasının olduğu kadar baskılanması ve durdurulması da hücre homeostazının korunması için kritik önem taşımaktadır. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu, uzun form kısa form hetero dimerizasyonu ile baskılanabilir, sitokin-indüklü (ya da indüklenabilir) sitokin sinyalizasyonu baskılayıcıları (SOCS; suppressors of cytokine signaling) aracılığı ile sinyalizasyon durdurulabilir, reseptör aktivasyonunun ardından reseptörün ubiquitasyon ve internatizasyonu ile sinyalizasyon durdurulabilir ya da kısa form prolaktin reseptörü aracılığı ile indüklenen dual spesifik fosfataz ile akış aşağı sinyalizasyon baskılanabilir.

CIS1 (Cytokine-Inducible SH2 domain-containing protein-1) ve SSI (STAT indüklü STAT inhibitör) olarak da bilinen SOCS birçok sitokinin inhibisyonunda rol alır. SOCS gen promotörü STAT bağlayıcı motive sahiptir. Prolaktin indüklü STAT

aktivasyonunun SOCS ifadesinde artışa sebep olduğu bilinmekle beraber STAT5 baskılanmış fare ovaryumlarında SOCS ifadesi olmadığı gösterilmiştir (Endo vd. 2003). SOCS'nin SH2 domaini ile prolaktin reseptör Y532 (fare) rezidüsünün (Çizelge 2.1'de Y515'e karşılık gelmektedir) bulunduğu bölge etkileşir. Bu Y532 bölgesinin mutasyonu durumunda STAT aktivasyonu devam etmekle beraber, SOCS STAT aktivasyonunu inhibe edememektedir (Endo vd. 2003). SOCS'nin yapısal bir engel oluşturarak ya da prolaktin reseptörü konformasyonel değişikliğe uğratarak STAT aktivasyonunu engellediği öne sürülmüştür.

Kısa form prolaktin reseptörünün uzun form prolaktin reseptörüne dominant negatif etki ederek JAK2 aktivasyonunu ve hücre proliferasyonunu engelleyen inaktif reseptör olarak düşünülmüştür (Berlenga vd. 1997; Chang vd. 1998; Devi vd. 2011). Ancak kendisine özgü sinyalizasyon yolu ile ERK1/2 ve p38 MAPK yollarını inhibe edebilmektedir. Devi ve arkadaşları (2011) ise Çin Hamsteri ovaryum hücrelerinde kısa form prolaktin reseptörü aracılığı ile MAPK'nin (akış yukarı sinyalizasyonuna etki etmeden) inhibe edildiğini göstermiştir. Devi ve arkadaşları (2011) sadece kısa form prolaktin reseptörü ifadesi olan ovaryum hücreleri (GG-CL hücreleri) kullanarak, prolaktin reseptörünün MAPK aktivasyonunu düzenleme mekanizmasını incelenmiştir. Devi vd. (2011) çalışmasında, önceki çalışmaların (Huang vd. 2008) aksine kısa form prolaktin reseptörü aracılığı ile prolaktin sinyalizasyonunun ERK1/2 ve p38 MAPK yollarını inaktive ettiğini göstermiştir. Devi ve arkadaşları (2011) kısa form prolaktin reseptörünün sitoplazmik domainine bağlanan 27-kDa'lık çift (dual) spesifik fosfataz (çalışmada DUPD1 olarak adlandırılmıştır ve insan DUSP27'ye karşılık gelmektedir) tanımlamışlardır. Prolaktinin DUPD1'nin ifadesini arttırmadığını ancak defosforile olmasından sorulu olduğu bildirilmiştir. DUPD1 ile ERK1/2 ve p38 MAPK arasında fiziksel bir etkileşim oluşmaktadır. Bu etkileşimin sonucunda ERK1/2 ve p38 MAPK defosforile olup inaktif olmaktadır. Uzun form prolaktin reseptörü olmaz ise bu durum farklılaşmanın ve foliküler büyümenin baskılanmasına sebep olmaktadır.

Reseptör sinyalizasyonun durdurulmasında reseptör internalizasyonu ve yıkımı yaygındır. Prolaktin reseptörü lizozomal veya proteozom bağımlı olarak degrade edilebilmektedir (Lu vd. 2005; Varghese vd. 2008). Prolaktin hormonu ile prolaktin reseptörünün uyarılması sonrasında klatriin kaplı veziküller aracılığıyla reseptör kompleksinin endositozu gerçekleştirilir. Reseptörün internalize olması için hücre içi domainin bütünlüğü önemlidir, hücre içi kısmın olmaması durumunda membranda prolaktin reseptörü birikimi olur (Vincent vd. 1997). Uzun ve kısa formlarda internalizasyon için farklı motiflerin bulunması söz konusudur. Reseptör üzerinde bulunan LL (di-lösin), LPGG (Sıçan kısa form) ve DS349GRGS (uzun form) rezidüleri reseptör internalizasyonu için önemli bölgeleri oluşturmaktadır (Li vd. 2004; Lu vd. 2002; Vincent vd. 1997). Farklı hücre tiplerinde reseptörün internalizasyonu için gerekli olan kinaz aktivasyonu farklılık gösterebilmektedir. JAK'ın aktivasyonu insan embriyonik böbrek hücrelerinde prolaktin reseptörü internalizasyonu için ilk basamaktır, JAK aktivasyonu gerçekleşmezse reseptörün internalizasyonu ya da ubiquitinlenerek yıkımı gerçekleşmez (Swaminathan vd. 2008). JAK2 aktivasyonu sonrasında S349 fosforilasyonu artar. β -TrCP2 tarafından uzun form prolaktin reseptöründeki DSGRGS fosfodegrom motifi tanınır, Skp1-Cull1-Roc1/Rbx1 ligaz burada kümelenmesi sağlanır ve böylece SCF β -TrCP E3 ligaz ile prolaktin reseptör ubiquitinasyonu sağlanır. PRLR mono-ve poli-ubikitinasyona (K48 ve K63 bağlı zincirler) uğrar (Varghese vd. 2008). K63 bağlı

zincirle ubikitinasyon, PRLR'nin AP2 (assembly polypeptide 2) ve klatrin kaplı veziküller ile internalize olup lizozomal kompartmana aktarılmasında önemlidir (Varghese vd. 2008). İnsan meme kanseri hücre hattında (MCF-7) ise JAK2'in bu prolaktin reseptörü internalizasyonu için gerekli olmadığı gösterilmiştir (Piazza vd. 2009). Prolaktin reseptör internalizasyonu için JAK yerine lipit raftlarında bulunan SRC kinaz ailesi üyeleri ve MAPK/ERK 1/2 aktivitesinin gerekli olduğu görülmüştür (Ancak PI3K bu süreç ile ilişkili bulunmamıştır).

2.2.4. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu ilişkili patolojiler

Prolaktin reseptör sinyalizasyonu özellikle meme ve prostat kanserleri ile ilişkilendirilmekle beraber, farklı dokularda da kanserle ilişkili olabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır. Prolaktin reseptörünün tümörojenik potansiyeli ilk kez yaklaşık 60 yıl önce vurgulanmıştır. Kemirgen meme kanseri modellerinde, kan dolaşımında yüksek prolaktin hormonu varlığının tümör (meme) büyümesini arttırdığı ve dopamin antagonisti ile serum prolaktin seviyesi düşürüldüğünde meme tümörü oluşumu ve gelişiminde azalma olduğu görülmüştür (Boot vd. 1962; Welsch ve Nagasawa 1977). Sıçanlarda serumdaki prolaktin seviyesi ile meme kanseri arasında doğrudan bir ilişki görülmekle beraber, insanlarda otokrin ve parakrin prolaktin sinyalizasyonu da söz konusu olduğundan insanlarda serum prolaktin seviyesi ile tümör oluşumu her zaman ilişkili olmamaktadır. Dolayısı ile meme kanseri hastalarına dopamin antogonisti (bromokriptin) uygulaması tamamen PRL sinyalizasyonunu elimine edemediğinden meme kanseri hastalarında faydalı bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Clevenger vd. 2003). Çoğunlukla meme ve prostat kanseri ile olan ilişkisi araştırılmakla beraber farklı dokularda da prolaktin/prolaktin reseptör sinyalizasyonunun patolojiler ile ilişkisi olabildiği görülmüştür. Artan serum prolaktin seviyesi ve prolaktin reseptörü aracılı artan JAK2 aktivitesinin hepatosellüler karsinom hastalarında düşük hayatta kalma ile ilişkilidir (Yeh vd. 2012). Prolaktin/Prolaktin reseptör sinyalizasyonunun pankreatik karsinom ve fibrozis üzerindeki etkisi hasta örneklerinde, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır (Tandon vd. 2019). PANC-1 (insan pankreas kanseri) hücrelerine prolaktin uygulaması, JAK2 ve STAT3 fosforilasyonunu ve hücre proliferasyonunu artırırken, PRLR'nin inhibe edilmesinin bu durumu tersine çevirdiği gözlemlenmiş olup farelerde (*prl^{-/-}*) ise prolaktin uyarımının olmamasının fibrozisi azalttığı gözlemlenmiştir. Prolaktinin kanserojenik olmamakla birlikte hastalığın normal ilerleyişinde gerekli olduğunu önerilmiştir.

PRLR formlarının sinyalizasyon üzerinde farklı etkileri olduğundan kanser ve farklı formların ilişkisi de araştırılmaktadır. Farelere, insan ve fare meme kanseri hücreleri transplantasyonu yapılmış ve uzun form prolaktin reseptörünün SMO (splayz modile edici oligomer) ile inhibisyonu yapılarak kanserin metastatik özelliği üzerindeki etkisi incelenmiştir (Yonezawa vd. 2015). Dişi farelere (8-9 haftalık) tümör implantasyonu yapılmış uzun form prolaktin reseptör inhibe edildiği ve edilmediği durumlara bu hayvanlar arasındaki farklar incelenmiştir. İmplantasyondan 40 gün sonra

akciğerde uzun form prolaktin reseptör inhibisyonunun metastatik tümörlerin, koloni boyutu ve yoğunluğunu azalttığı görülmüştür.

Wen ve çalışma grubu (2020) GTEx (The Cancer Genome Atlas and Genotype-Tissue Expression/Kanser Genom Atlası ve Genotip-Doku İfadesi) veri bankası analizleri sonucunda insan rahim kanserlerinde (kansere olmayan rahim örneklerine göre) daha fazla kısa form prolaktin reseptör ifadesi olduğunu bildirmişlerdir. Kısa form prolaktin reseptörü baskın olan rahim kanseri hücreleri üzerinde PRLR sinyal inhibisyonunun etkisi araştırılmıştır. Prolaktin antagonisti (G129R) uygulaması PI3K/mTOR yolağı ifadesini azaltmış olup farelere implantasyonu gerçekleştirilen rahim kanserinin büyüme ve ilerleyişini azalttığı görülmüştür. *In vitro* çalışmalarda ise G129R uygulaması, PI3K/AKT sinyal yollarıyla ilişkili faktörlerin ekspresyonunu azalttı, ancak hem toplam hem de fosforile edilmiş FOXO3a ve bir transkripsiyonel baskılayıcı olan EIF-4EBP1'in miktarını arttırdı (Wen vd. 2020). Bununla birlikte G129R uygulaması, rahim kanseri hücre hattında önemli derecede yüksek nükleer FOXO3a seviyeleriyle sonuçlandığı gösterilmiştir. G129R, PRL ile rekabete girdiğinde ve kısa form prolaktin reseptörüne bağlandığında, PI3K/AKT aktivitesi azalır, hücre çoğalmasını ve hücre döngüsünün ilerlemesini bloke eder. Ek olarak G129R uygulaması, translasyonel baskılamayı başlatacak olan FOXO3a'nın nükleusa translokasyonunu hızlandırır.

2.3. Prolaktin Reseptörü ve Okratoksin A

Kanser gibi çeşitli patolojileri destekleyebildiği gösterilen, büyüme hormonu reseptör ailesinin bir üyesi olan prolaktin reseptörünün, okratoksin A ile ilişkili patolojilerde yer alabileceğini işaret eden çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Bu çalışmaların çoğu sıçanlarda gerçekleştirilen transkriptomik çalışması olup, hangi form prolaktin reseptörünün ifadesinin okratoksin A ile ilişkili olduğu belirlenememiş ve bu transkriptomik çalışmalarda okratoksin A ilişkili patoloji mekanizmasındaki rolü ile ilgili bir bilgi verilememiştir. PRLR mRNA'sının sıçan böbrek ve karaciğerinde değiştiği görülmekle beraber (Marin-Kuan vd. 2006; Pastor vd. 2021; Qi vd. 2014; Stemmer vd. 2007) zebra balığı üzerinde OTA'nın zararlı etkisi daha derin şekilde çalışılmıştır (Wu vd. 2020; Wu vd. 2016).

Martin-Kuan ve meslektaşları (2006) Fischer cinsi erkek sıçanları iki yıla kadar OTA ile beslemiştir. OTA uygulaması 300 µg/kg v. a./g. olarak yapılmış ve uygulama ile beraber 7. günden itibaren birinci yıla kadar gen ekspresyon profillemesi yapmıştır. OTA uygulamasına başlanmasını takiben ilk böbrek tümörü 75. Haftada (yaklaşık 18.75 ay) görülmüş ve çalışma sonunda tümör görülme sıklığı %25'e ulaşmıştır. 470 genin böbrekte, 233 genin karaciğerde ve 45 genin ise böbrek ve karaciğerde RNA düzeyinde ifadesinin değiştiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada böbrekteki prolaktin reseptör geni ifadesinin (karaciğere göre) azaldığı görülmüştür (Marin-Kuan vd. 2006). Diğer bir gen ifadesi profillemesi çalışmasında 70 ve 210 µg/kg v. a./g. konsantrasyonunda 13 haftalık OTA uygulaması yapılmıştır. OTA maruziyetinin 9. ve 10. haftalarında sıçanlarda vücut ağırlığında azalış gözlemlenmiş olup 13. haftada 210 µg/kg konsantrasyonunda OTA uygulamasının 70 µg/kg v. a./g. uygulamasına göre daha ciddi karaciğer hasarına neden olduğu gözlemlenmiştir (Qi vd. 2014). Karaciğer prolaktin reseptör (çalışmada D3ZYL1_RAT olarak yazılmıştır) gen ifadesinin her iki konsantrasyonda da yaklaşık üç kat arttığı gözlemlenmiştir (Qi vd. 2014). Bu uzun süreli çalışmaların yanında 210 µg/kg 1-14 gün OTA uygulamasının da böbrekte prolaktin reseptör gen ifadesini arttığı gözlemlenmiştir (Stemmer vd. 2007). Prolaktin reseptöründen söz edilen son çalışmada ise erkek ve dişi F344 sıçanlar yüksek seviyede (günlük 0.50 mg/kg v. a./g.) OTA'ya 7 ya da 21 gün maruz bırakılmış (deney sonlandırıldığında hayvanlar 13 haftalık ya da 15 haftalık olmuştur) ve iki cinsiyette de gen ifadesi farklarına bakılmıştır (Pastor vd. 2021). Bu çalışmada 7 ya da 21 gün OTA'ya maruz kalan erkek sıçanlarda dişilere göre yaklaşık 2 kat daha yüksek seviyede prolaktin reseptör gen ifadesi saptanmıştır. Bu çalışmalardan bazılarında prolaktin reseptör mRNA'sının artması diğerinde azalması bir çelişki oluşturmamaktadır. İlk olarak organlar farklı olduğu için etkilerin farklı olması beklenebilir. İkinci olarak prolaktin reseptörünün sıçanda en az iki farklı izoformu bulunmaktadır (uzun ve kısa). Bu transkriptomik çalışmalarında çalışmanın amacı prolaktin reseptör OTA ilişkisini araştırmak olmadığından, uzun ve kısa formun ayrımı yapılmamıştır. Dolayısı ile hangi form prolaktin reseptörünün ifadesi arttığı (ikisi mi arttı ya da biri artıp diğeri azaldı mı) tahmin edilememektedir. Sadece prolaktin reseptör gen ifadesinin değiştiğini gözlemleyebiliyoruz. Prolaktin reseptörü sinyalizasyonunu incelemek istiyorsak hangi reseptörün ifadesinin arttığını bilmek önemlidir. Örneğin sadece uzun formun ifadesi artıyorsa JAK/STAT yolağının artması, kısa form artıyorsa bu sinyalizasyonun azalması beklenebilir.

Prolaktin reseptörünün OTA'nın patolojik mekanizmasındaki rolü sadece zebra balığı embriyolarında irdelenmiştir. Zebra balığı embriyolarına (döllenen 6 saat

sonra) 72 saate kadar 0.5 μ M OTA uygulaması yapılmıştır. OTA'ya maruz kalan zebra balığı embriyolarında kalp anomalileri, pronefroz anomalileri ve glomerular filtrasyon oranında azalma saptanmıştır (Wu vd. 2016). Zebra balıklarına OTA uygulaması yapıldığında *prlr*-a mRNA ifadesinin (uzun forma karşılık gelmektedir) doza bağlı olarak azaldığı görülmüştür. OTA maruziyetinde prolaktin reseptör sinyalizasyonunda rolü olan p-STAT5 ve p-AKT ifadesi azalırken pERK1/2'nin ise miktarı değişmemiştir. Ayrıca grup tarafından prolaktin reseptörünü hedeflediği tespit edilen miR-731'in ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Grup ayrıca miR-731'i antagomiR-731 ile inhibe edip, OTA maruziyetinde zebra balığı embriyolarında gerçekleşen değişiklikleri incelemiştir. AntagomiR-731 prolaktin reseptör mRNA seviyesinin azalmasını engellediği ve OTA maruziyetine bağlı oluşan pronefrik defektleri azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca zebra balığında embriyolarında OTA maruziyetine bağlı oluşan intraserebral kanamanın, miR-731'in inhibe edilmesi ile azaldığı gözlemlenmiştir (Wu vd. 2020). Bu durum zebra balığında PRLR sinyalizasyonun OTA aracılığı ile inhibe edildiği ve buna bağlı olarak patolojinin arttığını göstermektedir.

Bir memeli sistemde hangi form prolaktin reseptör sinyalizasyonun OTA'nın patolojik mekanizmasında rol alabileceğini işaret eden bir çalışmaya rastlanmamıştır. Memeli deney sistemleri OTA'nın insan üzerindeki etki mekanizmalarını aydınlatmak için en etkili araçlardır. Prolaktin reseptör formları çeşitli patolojilerde akış aşağı sinyalizasyon yolları üzerinde farklı etkilere sahip olarak hücre yanıtını değiştirebilmektedir. Bundan dolayı bu çalışmada prolaktin reseptör formları ve OTA'nın patolojik mekanizması arasındaki ilişkiyi irdelemek amacı ile *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2.4. Genomik ve Transkriptomik Veri Bankaları

İnsan genom projesi ile başlayan genomik çağında, deneyler sonucunda elde edilen genomik ve transkriptomik verilerin artan boyutu nedeni ile bu verilerin depolanması, paylaşılması, organize edilmesi ve anlaşılır hale getirilmesinin önemi açığa çıkmıştır. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin de yaygınlaşması ile beraber birçok canlı türü ya da deney sisteminden elde edilen genomik ve transkriptomik verileri her geçen gün artmaya devam etmektedir. Günümüzde bu artan verilerin organizasyonu, depolanması ve paylaşılmasında Amerikan Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI: National Center For Biotechnology Information) önemli rol üstlenmektedir. NCBI, ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin (NIH) bir uzantısı olan Amerikan Tıp Kütüphanesi (NLM: The National Library of Medicine) bünyesinde 1988 yılında kurulmuştur (Anonymous 1). Kurulduğu günden bu yana kamuya açık biyomedikal veri tabanları, moleküler ve genomik verileri analiz etmeye yönelik yazılım araçları ve hesaplamalı biyoloji araştırmaları için önemli bir kaynak niteliği taşımaktadır. NCBI 2020 yılı itibari ile PubMed, Nucleotide, SRA, Assembly, Genome ve Protein veri bankalarının da dahil olduğu 34 farklı veri bankasından veri almaktadır (Sayers vd. 2021).

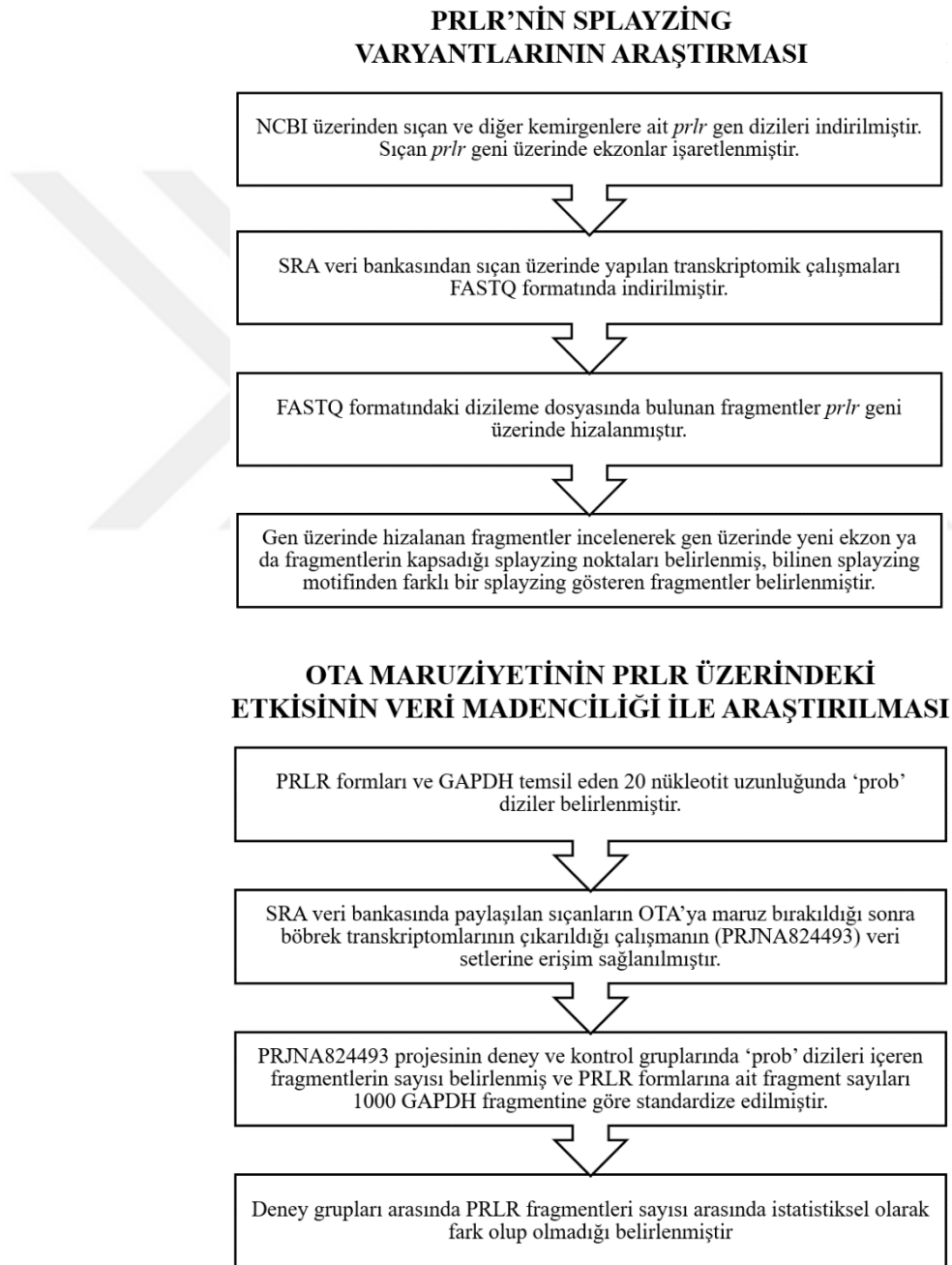
NCBI EMBL-EBI Avrupa Nükleotid Arşivi (ENA), Japonya DNA Veri Bankası (DDBJ) ve Uluslararası Nükleotid Dizisi Veri Tabanı İşbirliği (INSDC) ile beraber Genbank ve Dizi Okuma Arşivini (SRA) yönetmektedir. NCBI'deki yeni nesil dizileme (NGS) verileri için SRA, 2009 yılında INSDC'nin bir parçası olarak kurulmuştur (Katz vd. 2021).

GenBank® ve SRA, halka açık DNA dizilerinin kapsamlı veri tabanlarıdır. GenBank 480.000 adlandırılmış organizmaya ait veri bünyesinde barındırırken, SRA 110.000'den fazla türün yeni nesil dizileme çalışmalarından elde edilen verileri içermektedir (Sayers vd. 2022). GenBank® ve SRA verilerine, bu verileri NCBI'deki genomlar, taksonomi ve biyomedikal literatür gibi diğer verilerle birleştiren NCBI Entrez erişim sistemi aracılığıyla erişilebilir. BLAST, GenBank ve diğer dizi veri tabanlarının dizi benzerliği araştırmalarını sağlar. Böylece NCBI'nın sağladığı veriler aracılığı ile biyoinformatik araştırmacıları kolaylıkla istenen canlının genomik ve transkriptomik dizilerine erişim sağlayıp analizlerini gerçekleştirip bilim dünyasına katkı sağlamak amacı ile kullanılmaktadır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Tez Kapsamında Uygulanan Yöntemin Özeti

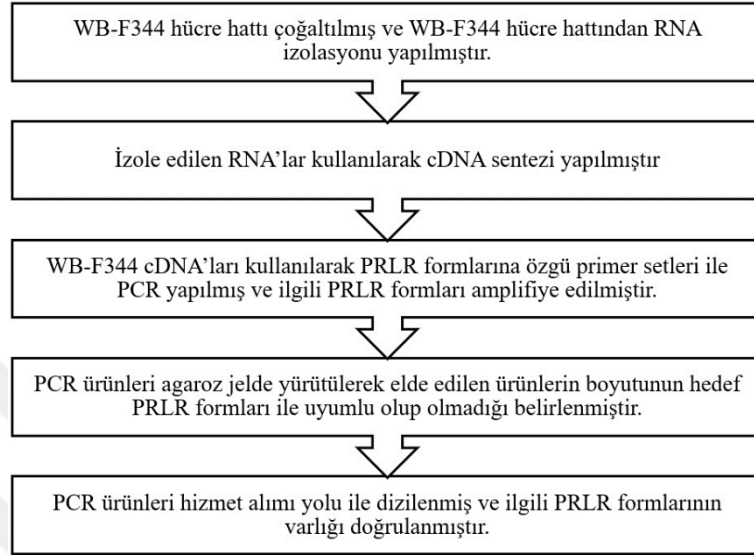
Tez kapsamında biyoinformatik analizler ve WB-F344 hücre hattı kullanılarak *in vitro* çalışmalar yapılmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2’de tezin işlenişinde öne çıkan ana hatlar özetlenmiştir). Yapılan biyoinformatik analizlerin tamamı Kısım 3.2’ içerisinde verilmiş olmakla beraber Kısım 3.3 ile 3.6 arasında *in vitro* çalışmalar için kullanılan yöntem verilmiştir. Kısım 3.7’de verilen istatistiksel analiz ise hem *in vitro* hem de biyoinformatik çalışmalarda kullanılmıştır.



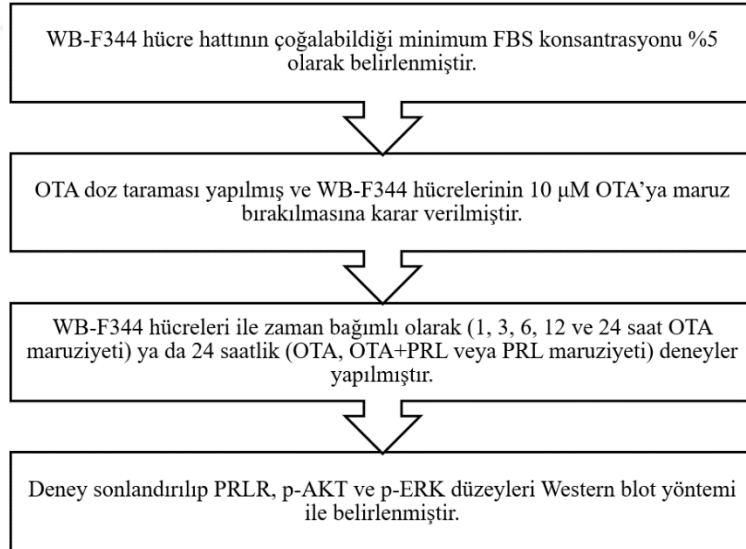
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan *in siliko*/biyoinformatik analizlerin özeti

Yapılan biyoinformatik çalışmalar Şekil 3.1’de özetlenmiştir. Bu çalışmalar yeni PRLR’in splayzing varyantlarının araştırması (Kısım 3.2.2) ve OTA’nın PRLR üzerindeki etkisi üzerine veri madenciliği yapılması amacı (Kısım 3.2.3) ile gerçekleştirilmiştir.

NÜKLEİK ASİT ÇALIŞMALARI



OTA’NIN PRLR SİNYALİZASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI



Şekil 3.2. Çalışmanın *in vitro* basamağında gerçekleştirilen çalışmaların özeti

Çalışmanın *in vitro* basamakları Şekil 3.2’de özetlenmiştir. Yapılan nükleik asit çalışmaları PRLR formlarının WB-F344 hücrelerinde ifade edildiğini ve tarafımızca tespit edilen yeni PRLR splayzing varyantının (4.1.1 ve 4.1.2) bu hücre hattında da ifade edildiğini göstermek amacı ile yapılmıştır. OTA’nın WB-F344 hücreleri üzerinde PRLR sinyalizasyon yolu elemanları ile ilişkisini araştırmak amacı ile WB-F344 hücrelerini

çoğaltma koşulları (Özellikle besiyerindeki FBS oranı), WB-F344 hücrelerinin maruz bırakılacağı OTA konsantrasyonu belirlenmiş ve WB-F344 hücreleri 24 saate kadar OTA'ya maruz bırakılmış ya da 24 saat OTA'ya PRL hormonu ile beraber maruz bırakılmıştır (Kısım 3.4.5). OTA maruziyeti sonrasında hücre lizatları hazırlanarak PRLR, p-AKT ve p-AKT düzeyleri Western blot yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2. *İn Siliko*/Biyoinformatik Analizler

3.2.1. Genomik dizilerin elde edilmesi

Çalışmada kullanılan prolaktin reseptör genine ait diziler NCBI üzerinden indirilmiştir. Prolaktin reseptör genine ait diziler ya Genbank üzerindeki tamamlanmış genom projelerinden ya da “shotgun genomic scaffold” dizileri içerisinde indirilmiştir. Çizelge 3.1’de kullanılan genomik dizilerin erişim numaraları verilmiştir. Bu gen dizilerinde prolaktin reseptör ekzon 10 dizisine karşılık gelen yerler Phylogeny.fr/Drawtree uygulaması kullanılarak karşılaştırılmış ve aynı uygulama ile filogenetik ağaç elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Prolaktin reseptör genleri kullanılan organizmalar ve genomik dizilerin erişim numaraları

Kemirgenler		
Tür adı	Kısaltma	Erişim No
<i>Acomys cahirinus</i>	Acah	GCA_004027535
<i>Allactaga bullata</i>	Abul	PVKW010004894
<i>Apodemus speciosus</i>	Aspe	GCA_002335545
<i>Cavia porcellus</i>	Cpor	NT_176390
<i>Chinchilla lanigera</i>	Clan	NW_004955426
<i>Cricetulus griseus</i>	Cgri	NW_003614037
<i>Dipodomys ordii</i>	Dord	NW_012267257
<i>Dipodomys stephensi</i>	Dste	PVHN010008479
<i>Fukomys damarensis</i>	Fdam	NW_011046431
<i>Heterocephalus glaber</i>	Hgla	NW_004624759
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	Itri	NW_004624759
<i>Jaculus jaculus</i>	Jjac	NW_004504320
<i>Marmota marmota marmota</i>	Mmar	NW_015351254
<i>Meriones unguiculatus</i>	Mung	NW_018661692
<i>Mesocricetus auratus</i>	Maur	NW_004801682
<i>Microtus ochrogaster</i>	Moch	NW_004949028
<i>Mus caroli</i>	Mcar	NC_034584.1
<i>Mus musculus</i>	Mmus	NC_000081.5
<i>Mus pahari</i>	Mpah	NC_034600.1
<i>Mus spretus</i>	Mspr	GCA_001624865
<i>Nannospalax galili</i>	Ngal	NW_008329320
<i>Octodon degus</i>	Odeg	NW_004524869
<i>Pedetes capensis</i>	Pcap	VMDO01004569
<i>Perognathus longimembris pacificus</i>	Plon	RJWR010005169
<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	Pman	NW_006501556
<i>Psammomys obesus</i>	Pobe	GCA_002215935
<i>Rattus norvegicus</i> (Sıçan)	Rnor	NC_005101, NC_005101, AC_000070
<i>Rhizomys pruinosus</i>	Rpru	PVIM010351992, PVIM010018318, PVIM010065190
<i>Urocitellus parryii</i>	Upar	NW_020539962
<i>Zapus hudsonius</i>	Zhud	GCA_004024765

Çizelge 3.1. (Devamı)

Diğer Türler		
Tür adı	Kısaltma	Erişim No
<i>Homo sapiens</i>	Hsap	NC_000005.10
<i>Catagonus wagneri</i>	Cwag	PVHT010029669.1, PVHT010017570.1
<i>Sus scrofa</i>	Sscr	NC_010458.4

Ayrıca sıçanda tespit edilen E10Δ50 splayzing varyantlarının (Kısım 4.1.1 ve 4.1.2) diğer kemirgen türlerinde bulunma ihtimalini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Çizelge 3.1’de verilen organizmaların *prlr* genlerinde E10Δ50 splayzing noktasına karşılık gelen nükleotit dizileri “Clustal Omega” uygulaması ile hizalanmış ve bu türler arasındaki benzerlik durumu değerlendirilmiştir.

3.2.2. Yeni splayzing varyantı tanımlamak amacı ile transkriptomik dizilerin analizi

Analiz edilmek istenen sıçan çalışmalarına ait transkriptomik dizileri SRA veri bankasından indirilmiştir. İndirilen dosyalarda, uzunluğu 101-150 nükleotit arasında değişen 18-57 milyon spot (fragment) olup, dizileme dosyalarının SRA numaraları Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Dosya ya doğrudan FASTQ formatında ya da SRA formatında indirilmiştir. SRA formatında indirilen dosyalar da “Sratoolkit” uygulaması ile FASTQ formatına çevrilmiştir. FASTQ formatındaki transkriptomik dosyası CLC Genomics Workbench (v3.6.5) uygulamasına aktarılmış ve bu dosya içindeki fragmentler sıçan referans prolaktin reseptör geni üzerinde hizalanmıştır ve bu fragmentlerin karşılık geldiği noktalar bilinen ekzon dizileri ile aynı olup olmadığı incelenmiştir. Referans genom ile bulunduğu konumda birebir örtüşmeyen RNA fragmentleri saptanmıştır. Bu fragmentlerin gen üzerinde bulunduğu konum ile örtüşmeyen kısımları kesilmiş ve bu kısımlar referans gen üzerinde tekrar hizalanmıştır. Bu hizalama işlemi sonunda kesilmiş fragmentlerin sonunda gen üzerinde nerelerde kümelandikleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Yeni splayzing varyantlarını tanımlamak amacı ile kullanılan FASTQ dizileme dosyalarının SRA erişim numaraları.

Karaciğer	Böbrek
ERR2592648	SRR2960198
ERR2592665	SRR2960199
ERR2592670	SRR2960200
ERR2592674	SRR5767266
ERR2592686	SRR5767268
ERR2592690	SRR5767270

3.2.3. OTA maruziyetinin PRLR üzerindeki etkisinin veri madenciliği ile araştırılması

OTA'nın prolaktin reseptörü ile ilişkisini araştırmak amacı ile SRA veri bankasında halka açık şekilde paylaşılmış PRJNA824493 (188 örnek ve 469 dizileme dosyası içermektedir) projesine ait dizileme dosyaları kullanılarak veri madenciliği yapılmıştır. PRJNA824493 veri setindeki dizileme dosyaları OTA'ya maruz bırakılan sıçanların böbreklerinde gerçekleştirilen RNA dizilemesi sonucu elde edilmiştir: Fisher (F344) sıçanlar 0, 0.026, 0.064, 0.16, 0.4 ve 1.0 mg/kg konsantrasyonunda OTA ile kontamine edilmiş yemlerle 90 güne kadar beslenmiş (Çalışmaya F0 ebeveyn ve F1 yavru nesli de dahil edilmiştir) ve sonrasında bu hayvanların böbrekleri alınmış OTA maruziyetine bağlı ifadesi değişen genlerin tespit edilmesi için transkriptomik çalışması (Illumina HiSeq 4000 ile dizilenmiştir) yapılmıştır (Bondy vd. 2021; Carter vd. 2022). Bu çalışmalara ait makalelerde prolaktin reseptörü ile ilgili bir bilgiye yer verilmediğinden ve ham verileri halka açık bir şekilde paylaşıldığından tarafımızca kullanılmıştır.

GAPDH, PRLR-KF, PRLR-UF ve PRLR-Δ50-E11'ye (Kısım 4.1.1'de tartışılmıştır) karşılık gelen 20 nükleotit uzunluğundaki diziler seçilmiş (Çizelge 3.3'de verilmiştir), bu dizileri taşıyan fragmentlerin dizileme dosyalarındaki sayısının tarafımızca belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Çalışma kapsamında 6 deney grubunda (her bir grup 7 ya da 8 hayvan içermekte olup her hayvan için iki ya da üç dizileme dosyası bulunmaktadır) Çizelge 3.3'de verilen dizileri içeren fragmentler sayılarak GAPDH ve prolaktin reseptörünü temsil eden dizilerin sayısı belirlenmiştir. Dizileme dosyasında GAPDH birim sayısını belirlemek için Çizelge 3.3'de belirtilmiş olan iki farklı diziye karşılık gelen fragment sayısının ortalaması alınmıştır. Farklı dizileme dosyalarından prolaktin reseptör formları için elde edilen sayılar, o dizileme dosyasındaki 1000 GAPDH birim sayısına göre standardize edilmiş ve sonrasında prolaktin reseptör ifadesinin gruplar arasındaki fark olup olmadığı istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Çizelge 3.3. Transkriptomik çalışmalarında PRLR ve GAPDH'nin miktarlarının belirlenmesinde referans olarak kullanılan diziler.

Hedef	Dizi
GAPDH (1)	GTGTGAACGGATTTGGCCGT
GAPDH (2)	AGGGCTCATGACCACAGTCC
Bütün PRLR formları (E9)*	TTGATACCCATCTGCTGGAG
PRLR Uzun Form (E9-E10)	TCTGCTGGAGAAGGGCAAGT
PRLR Kısa Form (E9-E11)	TCTGCTGGAGACTGGTTCTC
PRLR E10Δ50-E11**	CTCCAAGTGGACTGGTTCTC

*Bu dizi haricindeki bütün diziler iki ekzon birleşim noktasını kapsamaktadır.

**Bu formun varlığı tarafımızca keşfedilmiş olup Kısım 4.1 ve 4.3'de verilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan OTA ve Hormonlar

Çalışma kapsamında kullanılan okratoksin A (N-[(3R)-(5-kloro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-7-izokromanil)karbonil]-l-fenilalanin) (Sigma), etil alkol içerisinde çözülerek 10 mM'lık stok OTA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hazırlanan stok çözelti 2 ml'lik cryovial tüplere alınıp kullanılacağı ana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Hücreler deney koşullarında 10 µM OTA'ya maruz bırakılmış olup, besiyerindeki son etil alkol oranı %0.1'in altında tutulmuştur.

'Estrofem' künyeli ticari olarak satılan tabletler 17β-estradiol kaynağı olarak kullanılmıştır. Estrofem tabletleri havanda ezilmiş ve 15 ml kapaklı santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tablet başına tüpe 500 µl DMSO + 1500 µl etanol eklenmiş ve yaklaşık 5 dk kadar pipetleyerek çözelti karıştırılmıştır. Pipetleme işlemi sonrasında çözünmeyen tablet kaplama partiküllerini uzaklaştırmak amacı ile santrifüj işlemi (12.000 rpm 10 dk) yapılmıştır. Süpernatant yeni bir tüpe alınıp 1 gün boyunca 4 °C bekletilmiştir. Bir günün ardından santrifüj işlemi 4 °C'de 12.000 rpm 10 dk olarak tekrarlanmış ve süpernatant yeni bir tüpe alınarak elde edilen 17β-Estradiol miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ekstrakte edilen 17β-Estradiol miktarını belirlemek amacı ile örnekten 2 µl alınarak nanodrop spektrofotometrede 281 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak 17β-Estradiol konsantrasyonunun (ug/ml) belirlenmesinde literatürde verilmiş olan absorbans x konsantrasyon grafiğindeki doğru denklemi ($y=0.0184x-0.0059$) kullanılmıştır (Yılmaz ve Kadioglu 2017). Ayrıca ekstraktın absorpsiyon spektrumu incelenmiş olup Yılmaz ve Kadioglu (2017) çalışması ile uyumlu olduğu görülüp ve 17β-Estradiol'ün ekstraktının elde edildiği anlaşılmıştır. Ekstrakttaki 17β-Estradiol konsantrasyonu belirlendikten sonra, 0.2 µm porlu filtre kullanılarak sterilize edilmiş ve ekstrakt DMSO:Etanol (1:3) karışımı ile seyreltilerek 300 µg/ml (1.1 mM) konsantrasyonuna sahip 17β-Estradiol stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok alkol ile seyreltilerek 100 µM kullanım stoğu hazırlanmıştır.

Çalışmada insan rekombinant prolaktin hormonu (~23 kDa) (Elabscience Kat: PKSH033553) kullanılmıştır. Prolaktin hormonu aseptik koşullarda steril distile su içerisinde çözülerek 100 µg/ml konsantrasyonunda stok hazırlanmıştır.

3.4. WB-F344 Hücrelerinin Çoğalma ve Deney Koşullarının Belirlenmesi

WB-F344 hücre hattı yetişkin erkek Fisher-344 sıçan karaciğerinden izole edilmiştir (Tsao vd. 1984). WB-F344 spontan olarak ölümsüz hale getirilmiş, tek tabaka haline çoğalan, progenitör bir hücre hattıdır. Çalışmada kullanılan WB-F344 sıçan karaciğer hücre hattı (ayrıca CVCL_9806 ve JCRB0193 olarak da bilinmektedir) Elabscience'den (kat. no: EP-CL-0080) temin edilmiştir. Hücreler 6. pasaj olarak teslim alınmıştır. Çeşitli makalelerde WB-F344 hücre hattı farklı besiyerlerinde çoğaltılmış olmakla beraber Elabscience WB-F344 hücre hattı DMEM (yüksek glikoz) [%10 FBS (fetal bovin serum) + %1 P/S (penisilin/streptomisin)] içerisinde 37 °C'de %5 CO₂ koşullarında çoğaltmıştır. Bu çalışmada ise kullanılacak çoğaltma ortamının DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) +%10 FBS+ %1 P/S olmasına karar verilmiştir.

WB-F344 hücreleri tümörojenik olmamakla beraber kanserojenik maddelere maruz kalma durumunda ya da post-konfluent durumda tutulduğunda spontan bir şekilde neoplastik transformasyona uğrayabilir. Bundan dolayı pasajlama işlemi hücreler petrinin %85'inden daha az bir kısmını kapladığında gerçekleştirilmiş olup standart pasajlama işlemi 2 ya da 3 günde bir gerçekleştirilmiştir. Pasajlama işlemi için petride çoğaltılmış hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış, petri 3 ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanmış ve petriye 2 ml tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (%0.05'lik) uygulanmıştır. Hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile birlikte 7 dk 37 °C etüvde inkübe edilmiş, inkübasyon süresi sonunda WB-F344 hücrelerinin petri yüzeyinden ayrılmaları için petri birkaç kere çalışma yüzeyine vurulmuştur. Petrideki tripsin-EDTA çözeltisine 5 ml besi ortamı eklenmiş ve hücreler 15 ml'lik kapaklı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu tüp 2 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Tüpte kalan hücre peletinin üzerine 10 ml besi ortamı eklenmiş ve hücreler bu besiyerinde süspanse edilmiştir. Sayım için bu besiyeri-hücre süspansiyonundan 50 µl alınmış ve 50 µl tripan mavisi (%0.5'lik çözelti) ile karıştırılmıştır. Tripan mavisi-hücre karışımından 10 µl alınarak Thoma lamına konulmuş olup sayım işlemi ya mikroskopta doğrudan yapılmış ya da Countess otomatik hücre sayım cihazında gerçekleştirilmiştir. Sayım işlemi en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 1 ml (yaklaşık 500.000 hücre olmaktadır) alınıp (besiyeri ile 12 ml'ye tamamlanıp) 10 cm çaplı hücre kültürü petrilere ekim yapılmıştır.

3.4.1. Hücre çoğalma eğrisinin oluşturulması ve hücre için uygun besiyerinin belirlenmesi

En az iki gündür çoğaltılan WB-F344 hücreleri tripsin çözeltisi kaldırılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. WB-F344 hücreleri en az 5 farklı flaska (75 cm² alana sahip kapaklı hücre kültürü flasks) 200.000 adet olacak şekilde ekilmiştir. Her gün bir flaskadaki hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılmış ve sonrasında sayım yapılmıştır. Yapılan sayım sonunda hücrelerin ekimden kaç gün sonra ne kadar hücre sayısına ulaşabildiği belirlenmiş ve çoğalma eğrisini gösteren (sayı, gün) grafiği hazırlanmıştır. Bu işlem %10 FBS+%1 PS ile desteklenmiş MEM, DMEM ve DMEM/F12 besi ortamlarında tekrarlanmış ve WB-F344 hücrelerini çoğaltmak için hangi besi ortamının kullanılacağına karar verilmiştir.

3.4.2. Hücre canlılık testleri

Hücre canlılık aktivitesini belirlemek amacı ile MTT (tiazolil mavi tetrazolyum bromür) ve WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu] testleri yapılmıştır. Bu iki testi yapmak için iki gün boyunca çoğalmaya bırakılmış WB-F344 hücreleri (petrinin %80'inden daha azını kaplamış) için tripsinizasyon işlemi yapılarak kaldırılmış ve hücrelerin sayımı yapıp, belirlenen (alt başlıklarda verilmiştir) sayıda hücrenin 100 µl DMEM/F12 (Fenol kırmızısı içermeyen) içinde 96 kuyucuklu plaklara ekim gerçekleştirilmiştir. Ekimden 48 saat sonra MTT veya WST-8 testleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.2.1. MTT

WB-F344 hücrelerinin 96 kuyucuklu plaklarda inkübasyon süresi tamamlandığında (toplamda 2 gün), mevcut besiyeri uzaklaştırılmış ve %10 MTT çözeltisi içeren (MTT çözeltisi PBS içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmıştır) 100 µl besiyeri kuyucuklara eklenmiştir. Sonrasında 96 kuyucuklu plak 3 saat 37 °C CO₂ etüvünde inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen formazan kristallerinin 490 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometrede ölçülmüştür.

MTT testi için uygun hücre sayısının belirlenmesi: İki gün boyunca çoğaltılan WB-F344 hücreleri tripsinlenerek kaldırılmış ve 96 kuyucuklu plağın kuyucuklarına 500-20000 arasında (500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12500, 15000 ve 20000) hücre ekimi yapılmıştır (3 tekrarlı). Hücreler 2 gün boyunca 37 °C, %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırılıp, MTT testi gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 490 nm’de ölçülen absorbansları ve başlangıçta ekilen hücre sayılarını içeren dağılım grafiği oluşturulmuş, grafikte 490 nm dalga boyunda doğrusal okumanın yapıldığı alanlar belirlenmiştir. Doğrusal okumanın yapıldığı alanlardaki hücre sayılarının MTT testi yaparken kullanılması uygun görülmüş ve MTT testinde 96 kuyucuklu plağa ekilecek hücre sayısının 3 000 olmasına karar verilmiştir.

3.4.2.2. WST-8

Hücrelerin canlılık aktivitesi sonucunda mitokondride üretilen NADH aracılığı ile WST-8 redükte olur ve suda çözünen formazan kristalleri oluşturur. Bu oluşan formazan kristallerinin spektrofotometrik ölçümü hücrenin canlılık aktivitesi ile ilişkili olup, hücre canlılığını ve canlılık aktivitesini azaltan ajanlar ile azalır. Bu çalışmada WST-8 testi CVDK-8 kiti (Eco-Tech) ile yapılmıştır.

Petride 2 gün boyunca çoğaltılan WB-F344 hücreleri tripsinlenerek kaldırılmış ve sayımı yapıldıktan sonra, sonra 96 kuyucuklu plağın her kuyucuğuna 20.000 hücre olacak şekilde [100 µl %5 FBS DMEM/F12 (Fenol kırmızısı içermeyen) içinde] ekim yapılmıştır. Bu hücreler toplamda 2 gün etüvde inkübe edildikten sonra WST-8 testi gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa 10 µl CVDK-8 çözeltisi eklenmiş ve hücreler 2 saat 37 °C %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda oluşan formazanın absorbansı ölçülmüştür.

3.4.3. WB-F344 hücrelerinin çoğalabildiği minimum FBS konsantrasyonunun belirlenmesi

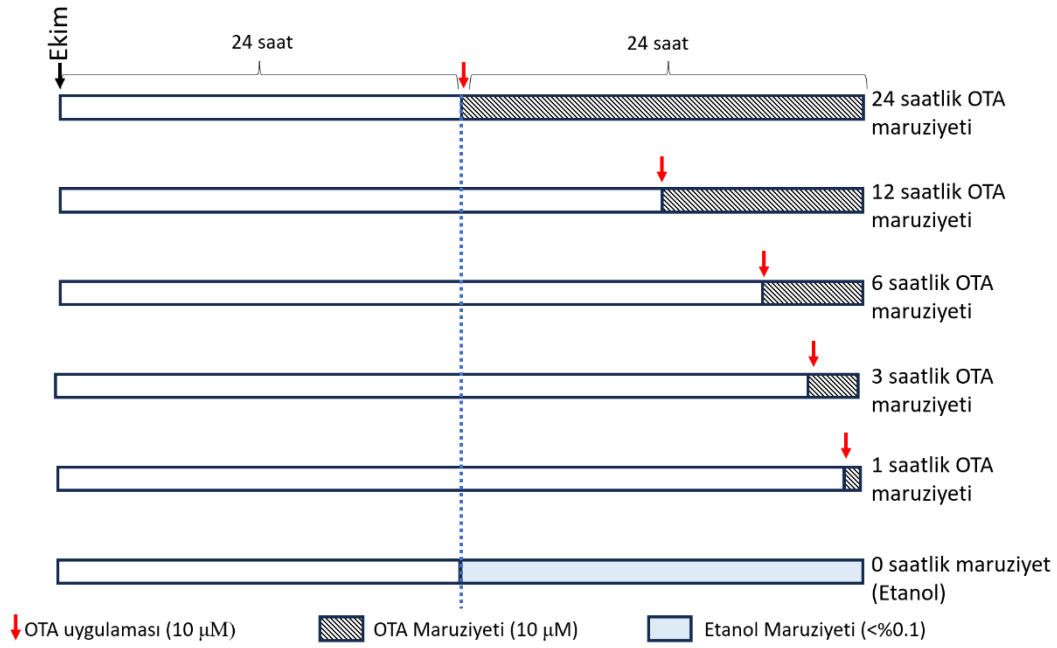
WB-F344 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara %10 FBS içeren besi ortamı içinde 3000 hücre/kuyucuk oranında ekilmiş ve bir gece 37 °C %5 CO₂ koşullarında inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri değiştirilmiştir. Kuyucuklardaki besiyerleri %10, %5, %2.5, %1.25 ve %0 FBS içeren besi ortamları ile değiştirilmiştir. Besiyeri değişiminden sonra hücreler bir gün daha 37 °C %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiş ardından MTT testi yapılmıştır. MTT testi sonunda %5, %2.5, %1.25 ve %0 FBS içeren besiyerlerinde çoğaltılan hücrelerin oluşturduğu formazanın absorbansı %10 FBS içeren besiyerinde çoğaltılan hücreler ile karşılaştırılıp istatistiksel bir fark olup olmadığı belirlenmiştir.

3.4.4. WB-F344 hücrelerine uygulanacak OTA konsantrasyonunun belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak OTA konsantrasyonu için doz taraması yapılmıştır. WB-F344 hücreleri 20.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 µl %5 FBS DMEM/F12 içinde ekilmiş 24 saat 37 °C %5 CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda farklı konsantrasyonlarda OTA uygulaması [0 µM (vehicle), 1.25 µM, 2.50 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM] yapılmış ve 24 saat OTA maruziyetinden sonra WST-8 testi yapılmıştır. Deney gruplarında ölçülen absorbanslar 0 µM OTA grubu ile karşılaştırmış, istatistiksel olarak farklılık yaratan OTA konsantrasyonları belirlenmiştir.

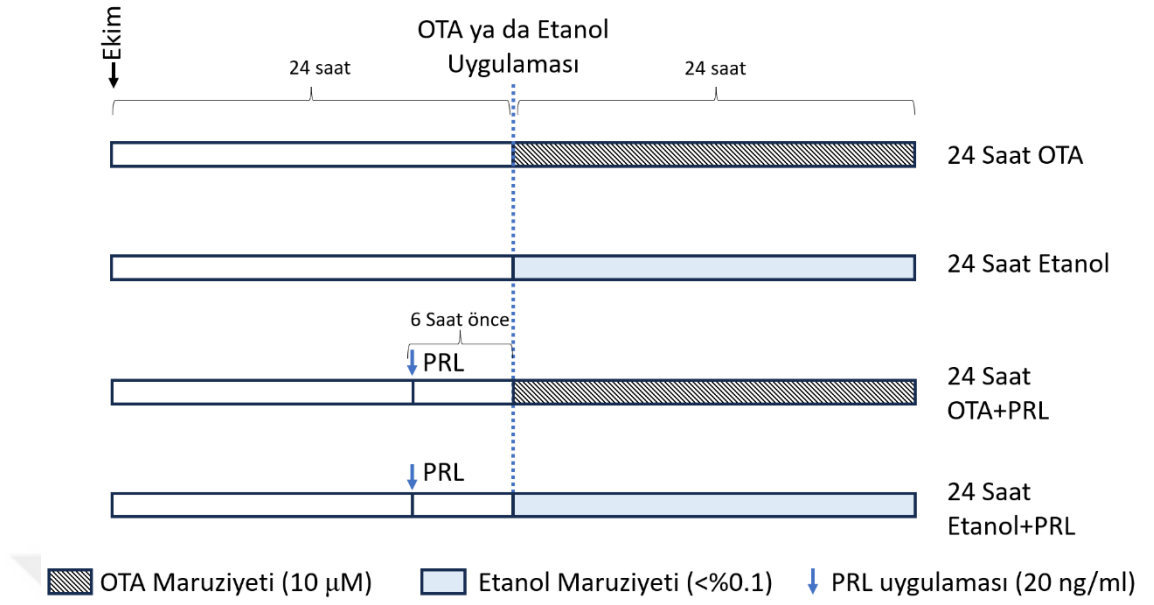
3.4.5. WB-F344 hücrelerinin tabi tutulduğu deney koşulları

WB-F344 hücreleri ile zamana bağlı OTA deneyleri ve 24 saatlik OTA ve PRL uygulamasını içeren deneylere tabi tutulmuştur. WB-F344 hücreleri 700.000 hücre/petri olacak şekilde 5 ml DMEM/F12 (%5 FBS) içinde petrilere (6 cm çap) ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra deney uygulamalarına başlanmıştır. Zamana bağlı deneylerde ekimden 24 saat sonra WB-F344 hücreleri 0 (Vehicle/Etanol), 1, 3, 6, 12 ve 24 saat 10 μ M OTA'ya maruz bırakılmıştır (Şekil 3.3). Hücreler maksimum 24 saat OTA'ya maruz bırakıldıktan sonra deney sistemi sonlandırılıp protein çalışmaları (Kısım 3.6) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. WB-F344 hücre hattı ile kurulan OTA zamana bağlı deney

WB-F344 hücrelerinin tabi tutulduğu diğer deney koşulunda ise 24 saat süren OTA ve etanol maruziyetinden 6 saat önce 20 ng/ml konsantrasyonunda PRL uygulaması deneye dahil edilmiştir (Şekil 3.4). Deney grupları OTA, etanol, OTA+PRL ve etanol+PRL olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.4. WB-F344 hücreleri ile kurulan 24 saatlik OTA ve PRL maruziyeti deneyi

3.5. Nükleik Asit Çalışmaları

Nükleik asit çalışmaları RNA izolasyonu ile başlatılmıştır. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılmış ve bu cDNA'lar polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılmıştır.

3.5.1. RNA izolasyonu

WB-F344 hücrelerinden RNA izolasyonu için Hybrid-R toplam RNA izolasyon kiti (GeneAll, Cat: 305-101) kullanılmıştır. WB-F344 hücreleri 1 milyon hücre olacak şekilde 10 cm petriye ekilmiş, 2 gün sonra RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Aksi belirtilmediği sürece RNA izolasyonunun bütün basamakları buz içerisinde gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu için petrideki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 300 µl RiboEx lizis çözeltisi (RNA izolasyon kiti ile birlikte gelmekte olup guanidyum tiyosiyant ve fenol karışımı içermektedir) petriye eklenmiştir. RiboEx hızla hücreleri tutundukları petri yüzeyinden ayrılmasına sebep olmuş ve RiboEx içerisinde süspanse olmuş hücreler hızla 1.5 ml kapaklı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu hücre süspansiyonu 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek hücrelerin lizis olması sağlanmıştır. Lizis süreci tamamlandıktan sonra tüpe 60 µl fenol kloroform çözeltisi eklenip sertçe çalkalanmış ve sonrasında 2 dk daha oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu tüp 12 000 rpm'de (4 °C) 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında içinde RNA'nın bulunduğu saydam üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır ve üzerine 1:1 oranında saf alkol (ya da kit içerisinde sunulan RB1 çözeltisi) eklenmiştir. Tüp yavaşça ters-düz yapılarak alkol ve RNA fazının karışması sağlanmıştır. Alkol RNA fazı kit ile sağlanan mini-spin kolona aktarılmış ve 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece RNA'nın mini-spin kolona bağlanması sağlanmıştır. RNA'nın mini-spin kolona bağlanmasının ardından iki yıkama basamağı (tuzların uzaklaştırılması) yapılmıştır. Kit içeriğinde bulunan SW1 çözeltisinden 500 µl mini-spin kolona eklenip 12 000 rpm'de 30 sn santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş, sonrasında 500 µl RNW çözeltisi mini-spin kolona eklenmiş ve aynı koşullarda santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. RNW çözeltisi ile kolonun yıkanma işleminden sonra kolonda etanol kalıntısı olabilmektedir, bu etanolün uzaklaşması amacı ile mini-spin kolon 12 000 rpm'de 1 dk daha santrifüj edilmiştir. Spin-kolonun altındaki santrifüj tüpü temiz 2 ml kapaklı santrifüj tüpü ile değiştirilip spin kolondan RNA'nın elde edilmesi basamağına geçilmiştir. Mini-spin kolona 100 µl RNaz-DNaz içermeyen su eklenmiş ve mini-spin kolon 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12 000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilerek RNA'nın temiz tüpe geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen RNA hemen kullanılmayacaksa -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

İzole edilen RNA'nın miktarının ve kalitesinin belirlenmesi: İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop aracılığı ile belirlenmiştir. RNaz-DNaz içermeyen sudan 1 µl alınarak nanodrop cihazında RNA 40 modunda blank ölçüm yapıldıktan sonra izole edilen RNA'dan 1 µl alınarak ölçüm yapılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup, cihaz tarafından hesaplanan RNA konsantrasyonu (ng/µl), A260/280 ve A260/230 oranları belirlenmiştir. RNA konsantrasyonu en az 250 ng/µl olan ve A260/280 oranının 2.0- 2.1 arasında (protein kontaminasyonun olmadığını gösterir) ve A260/230 oranının 2.0-2.4 arasında (organik bileşik kontaminasyonunun olmadığını gösterir) olan RNA örnekleri sonraki basamaklarda kullanılmıştır. Elde edilen

RNA'ların degradasyon düzeyini belirlemek amacı RNA'lar %0.8 agaroz jelde yürütülmüş ve 28S ve 18S rRNA bantlarının bütünlüğü değerlendirilmiştir.

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)

RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen RNA'lardan reverse (ters) transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar içerisinde prolaktin reseptör ve GAPDH cDNA'ları PCR ile çoğaltılmış ve ihtiyaç halinde çoğaltılan cDNA'ların hizmet alımı yolu ile dizileme işlemi yapılmıştır.

3.5.2.1. cDNA sentezi

Saflığı ve konsantrasyonu yeterli bulunan RNA'lar ilk iplik cDNA sentezinde kullanılmıştır. cDNA sentezi için A.B.T.TM cDNA sentez kiti (kat. no: C03-01-05) kullanılmıştır. cDNA sentezi için RNA 2-5 µg kadar alınmış ve toplam hacmi 20 µl olan cDNA reaksiyon karışımı oluşturulmuştur (Çizelge 3.4). Hazırlanan reaksiyon karışımı Thermo Px2 Thermal Cycler cihazında sırası ile 25 °C 10 dk, 37 °C 120 dk ve 85 °C'de 5 dk tutularak cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar geleneksel PCR ya da qPCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. cDNA sentez reaksiyon karışımı içeriği

İçerik	Miktar (µl)
cDNA reaksiyon tamponu (10X)	2
dNTP karışımı (2.5 mM)	1
Kalıp RNA (2-5 µg)	X
Primer (hekzamer karışımı)	2
Reverse transkriptaz (200 U/ µl)	1
RNaz içermeyen su	13.5-X
RNaz inhibitör 50 U/ µl	0.5

3.5.2.2. Geleneksel PCR

Geleneksel PCR çalışmaları için GeneAll AmpMasterTM Taq (Cat. No: 541-050) reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Bu reaksiyon karışımından 15 µl alınmış ve bu karışıma cDNA'dan 2 µl, Çizelge 3.5'te verilen F ve R primerlerin kullanım stoğundan 1'er µl eklenmiş ve hacim 30 µl'ye kadar su ile tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımlarında eklenen F ve R primer çiftleri GAPDH'yi (sF_GAPDH1-sR_GAPDH, sF_GAPDH1-sR_GAPDH), bütün prolaktin reseptör formlarını (sF7-sR9, sF3.1-sR9, sF3.2-sR9), kısa

form prolaktin reseptörünü (sF7-SR11.1, sF7-sR11.2, sF9-sR11.2), uzun form prolaktin reseptörünü (sF10-sR10.1, sF9-sR10.2) ya da E10Δ50 formlarını (sF10.1-sR11.1, sF10.2-sR11.1) hedeflemiştir. Toplam 30 µl hacmindeki reaksiyon karışımı 200 µl hacimli PCR tüplerine alınmış ve Thermo Px2 Thermal Cycler cihazında PCR başlatılmıştır. Reaksiyon protokolü ilk denatürasyon, döngü ve son uzama basamaklarından oluşturulmuştur. İlk denatürasyon basamağı 95 °C'de 5dk'de gerçekleştirilmiştir. Döngü basamağı 35-40 kez tekrarlanmış olup bu basamaktaki denatürasyon 95 °C'de 40 sn, bağlanma basamağı 58 °C'de 25 sn ve uzama basamağı 72 °C'de 1 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Döngü basamağından sonra gerçekleştirilen son uzama basamağı 72 °C'de 5 dk süre ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve oluşan bantların beklenen bantlarla uyumlu olup olmadığı incelenmiştir. Hedeflenen PRLR formları ile uyumlu boyutlara sahip bant oluşturan PCR ürünleri hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir.

Çizelge 3.5. PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin nükleotit dizileri. Verilen primerler RNaz/DNaz free su içerisinde çözülerek 100 pmol/µl konsantrasyonunda stok primer çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonrasında bu stok primer çözeltileri su ile seyreltilerek 10 pmol/µl kullanım stoğu hazırlanmıştır. GAPDH primerleri dışındaki primerlerin tamamı PRLR formlarını hedef almaktadır. Primerin yönünü belirten harften (F ya da R) gelen sayı primerin hangi ekzon üzerinde olduğunu, noktadan (.) sonra gelen sayı ise o ekzon üzerindeki kaçınıcı primer olduğunu belirtmektedir. s: Sıçan, F: Forward (İleri), R: Reverse (geri).

Primer	Dizi (5'→3')	Uzunluk (nt)	T _m °C	%GC
sF_GAPDH1	CCGCTAACATCAAATGGGGTG	21	61	52
sF_GAPDH2	ATCCTGCACCACCAACTGC	19	58	58
sR_GAPDH	CACAGTCTTCTGAGTGGCAG	20	60	55
sF3.1	ATGCCATCTGCACTTGCTTTTCG	22	63	50
sF3.2	CCTACTTGTTCTCAACATCAGCC	23	63	48
sF7	GTATCTTGTCAGACTCGCTGC	62	55	22
sF9	CATGATGACCTGCATCTTTCCACC	24	63	50
sF10.1	AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCC	24	58	46
sF10.2	CAACCTCAAGCAACCGCAGACTCC	24	63	58
sR9	CCAGCAGATGGGTATCAAATCC	22	60	50
sR10.1	TCAGTGAAAGGAGTGCATGAAGC	23	62	48
sR10.2	GGCACTCAGCAGCTCTTCAGAC	22	66	59
sR11.1	GTCAAGTTCCCCTGCATTGTCCAG	24	60	54
sR11.2	GCCAGGTACAGATCCACC	18	54	64

3.5.2.3. qPCR (Kantitatif PCR)

qPCR, 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (PC5919) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımına; 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (4 µl), F ve R primer, cDNA kalıbı (2 µl) eklenmiş, son hacim su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımında Çizelge 3.5'de verilen primerler kullanılmış olup, karışımındaki son primer konsantrasyonları 125-500 nM arasında değiştirilmiştir. Reaksiyon StepOnePlus™ Real-Time PCR sistem (Applied Biosystems™) cihazında gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonu 12 dk 95 °C'de başlangıç denatürasyonu sonrasında, 15 sn 95 °C'de denatürasyon, 10 sn 60 °C'de bağlanma ve 15 sn 72 °C'de uzama basamaklarından oluşan 40 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Bu döngülerden sonra protokole bir erime eğrisi basamağı (95-60 °C arasında 15 sn'lik 0.3 sıcaklık değişimi ile) eklenmiştir.

3.5.2.4. PCR ürünlerinin ya da RNA örneklerinin agaroz jelde yürütülmesi

PCR ürünleri ve izole edilen RNA'lar kalitelerinin incelenmesi amacı ile agaroz jelde yürütülmüştür. Jelin agaroz konsantrasyonu %3 ile %0.8 arasında tutulmuştur. RNA'lar için %0.8'lik, PCR ürünleri için ise %0.8 veya %3'lük (primer dimeri kontrolü yapmak amacı ile) agaroz konsantrasyonuna sahip jeller (yürütme tamponu ile) hazırlanmıştır. Jeller jel yürütme tankı (Gibco BRL Horizon ® 58 Casting System) içerisinde hazırlanmış (5.7 x 8.3 x 0.5 cm ölçülere sahip jeller), tanka yaklaşık 160 ml yürütme tamponu (Çizelge 3.6) eklendikten sonra, örnekler yükleme tamponu ile 1:5 karıştırılarak kuyucuklara (20 µl) yüklenmiştir. Örnekler yüklendikten sonra jel 25-40 dk 110 volt elektrik akımına maruz bırakılmış ve bu sürenin ardından agaroz jel etidyum bromür ile boyanıp jeldeki bantlar görüntülenmiştir. Yükleme tamponu ve yürütme tamponunun içeriği aşağıdaki tabloda (Çizelge 3.6) verilmiştir. Görüntüleme sonrasında jelden örnek alımı yapıp enzimatik bir işlem gerçekleştirilmeyeceği için yürütme tamponu olarak TBE tamponu seçilmiştir.

Çizelge 3.6. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltilerin içeriği.

5X TBE Tamponu	
Tris	108 g
Borik asit	27.5 g
Na ₂ EDTA 0.5 M (pH: 8.0)	40 ml
Su	1 L'ye tamamlanır
Yükleme Tamponu	
Gliserol	3 ml
Bromfenol mavisi	25 mg
1X TBE Tamponu	7 ml

Agaroz jelin boyanması ve görüntülenmesi: Boyama işleminde kullanmak amacı ile 10 mg/ml konsantrasyonunda stok etidyum bromür çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok etidyum bromür çözeltisinden 100 µl alınıp 100 ml su ile karıştırılarak (10 µg/ml’lik) boyama çözeltisi elde edilmiştir. Jeller 10 µg/ml konsantrasyonundaki etidyum bromür çözeltisinde 8-10 dk bekletildikten sonra jel görüntüleyiciye (DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro) alınmış ve UV ışık altında görüntülenmiştir. Agaroz jelin kalın olmasının ya da fazla boyanmasının elde edilen görüntünün kalitesini olumsuz etkilediği tespit edildiğinden agaroz jel kalınlığı en fazla 0.5 cm olarak ayarlanmış ve jelin daha konsantre etidyum bromür çözeltisine maruz kalmasından ya da daha uzun süre etidyum bromür çözeltisi içerisinde bekletilmesinden kaçınılmıştır.

3.6. Protein Çalışmaları

WB-F344 hücreleri 700 000 hücre/petri olacak şekilde 5 ml DMEM/F12 (%5 FBS, %1P/S) içerisinde hücre kültürü petrilere (6 cm çaplı) ekilmiştir. Bir gün sonra deney grupları belirlenmiş ve uygulamalara başlanmıştır. Zamana bağlı deneylerde ekimden bir gün sonra OTA (10 μ M) ya da vehicle uygulaması yapılmış olup hücreler 0, 1, 3, 6, 12 veya 24 saat OTA'ya maruz bırakılıp deney sistemi sonlandırılmıştır. Zamana bağlı deneylerin yanı sıra hücrelere sıra 24 saatlik EtOH, OTA, EtOH+prolaktin hormonu (Elabscience Kat. PKSH033553, 20 ng/ml) ve OTA+prolaktin hormonu (20 ng/ml) uygulaması yapılmıştır.

Deney sistemini sonlandırmak için petrilere besiyeri uzaklaştırılıp, petrilere soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, petriye 200-300 μ l soğuk lizis tamponu (RIPA) çözeltisi eklenmiş ve lizat hazırlama aşamasına geçilmiştir. Hazırlanan lizatlar kullanılarak Western blot çalışması yapılmıştır. Western blot çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve içerikleri Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Western blot çalışmasında kullanılan çözeltiler.

Çözelti	İçerik
Ayrıştırma Jeli (%10)	Tris-HCl 375 mM pH 8.8, %0.1 SDS, %10 akrilamid-bisakrilamid, %0.05 amonyum persülfat, %0.005 TEMED
Protein yükleme tamponu (4X)	Tris-HCl 200 mM pH 6.8, %8 SDS, %40 gliserol, %4 β -merkaptoetanol, 50 mM EDTA, 0.08% bromofenol mavisi
RIPA (radyo immünopresipitasyon testi) tamponu	NaCl 150 mM, %1 NP40, %0.5 Sodyum deoksikolat, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 7.4, %1 proteaz inhibitör kokteyli (Medchem Kat. HY-K0010), %2 fosfataz inhibitör karışımı (Sodyum florür 250 mM, sodyumpirofosfat 100 mM, β -gliserofosfat 100 mM, sodyum ortovanadat 700 mM)
SDS yürütme tamponu (10X)	%1 SDS, %1 Tris Base, %14.4 Glisin
TBS-T (Tris Buffered Saline ve Tween-20)	Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, %0.05 Tween-20
Yükleme Jeli (%4)	Tris-HCl 0.125 mM pH 6.8, %0.1 SDS, %4 akrilamid-bisakrilamid, %0.05 amonyum persülfat, %0.0075 TEMED

3.6.1. Hücre lizatının hazırlanması

Deneyleri sonlandırmak ve hücre lizatı hazırlamak için petri önce soğuk PBS ile yıkanmış ve hücrelerin yoğunluğuna göre 200-300 µl soğuk RIPA tamponu eklenmiştir. Petriler buz içerisine alınmış ve petrideki hücreler hücre kazıyıcı (cell scraper) ile kaldırılmıştır. Hücreler kazındıktan sonra RIPA tamponundaki hücreler 2 ml kapaklı santrifüj tüpüne aktarılmış ve buz içerisinde 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda lizat 4 °C, 14 000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş, santrifüj işlemi sonunda süpernatant yeni 1.5 ml kapaklı santrifüj tüpüne aktarılmış ve kullanılacakları ana kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2. Bikinkoninik asit yöntemi (BCA)

Elde edilen lizatların toplam protein miktarı BCA ile belirlenmiştir. Pierce™ BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır. Kit ile beraber sağlanan A çözeltisi ile B çözeltisi 50:1 oranında karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. BSA standartları (25-2000 µg/ml konsantrasyonunda) ve lizatlardan 12.5 µl alınmış alınış 100 µl hazırlanan çalışma çözeltisi ile karıştırılmıştır. Örneklerin eklendiği 96 kuyucuklu plak 37 °C 30 dk tutulmuş ve bu sürenin sonunda 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm (VersaMax Microplate okuyucu kullanılmıştır) gerçekleştirilmiştir. Lizatlardaki toplam protein konsantrasyonu oluşturulan standart eğri üzerinden belirlenmiştir.

3.6.3. Western blot

Proteinleri boyutlarına göre ayırmak için SDS (%12 ayrıştırma ve %5 yükleme) jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel, jel yürütme sistemine (Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra System) alınıp 1X SDS jel yürütme tamponu (10X seyreltilerek hazırlanmıştır) jel yürütme sistemine eklenmiştir. Protein konsantrasyonu belirlenen hücre lizatları 1:4 oranında 4X protein yükleme tamponu ile 1.5 ml kapaklı santrifüj tüpü içerisinde karıştırılmış ve 95°C 5 dk tutulmuştur. Daha sonrasında bu karışımlardan maksimum 25 µl hacim (15- 20 µg protein) alınmış ve jele yüklenmiştir. Jele 1.8 µl Prime-Step™ Prestained Broad Range Protein Ladder (6.5-270 kDa) yüklenmesinin ardından jel elektrik akımına maruz bırakılmıştır. Örnekler yükleme jelinden ayrıştırma jeline ulaşana kadar 80 V'de, ayrıştırma jelinde ise 120 V'de yürütülmüştür. Brom fenol mavisi jelin dip kısmına geldiğinde jele uygulanan elektrik akımı durdurulmuş ve ayrışan proteinlerin membrana aktarılması işlemine geçilmiştir.

Jelde boyutlarına göre ayrıştırılan proteinler yarı-kuru transfer yöntemi ile PVDF (Poliviniliden diflorid) membranlara aktarılmıştır. Jel boyutlarında kesilmiş membranlar metanol içerisine 5 dk çalkalayıcı üzerinde (100 rpm) bekletilerek aktive edilmiştir. Whatman filtre kağıtlarına 5 dk boyunca soğuk transfer tamponu emdirilip, membran ve jel whatman filtre kağıtları arasında 'sandviç' yapılmıştır. Jelden membrana proteinlerin transferi Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistem kullanılarak (2.5 A, 25 V, 15 dk) gerçekleştirilmiştir. Transfer sonunda membranlar %5 yağsız süt tozu (TBS-T içinde) ile oda sıcaklığında 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalanarak (120 rpm) bloklanmıştır.

Bloklama işleminin ardından membranlar TBS-T içinde 3 kere (5 dk boyunca) yıkanmıştır. Çizelge 3.8’de verilen primer antikörler %5 BSA TBS-T ile seyreltilip 10 ml olacak şekilde 50 ml kapaklı santrifüj tüplere konulmuştur. Membranlar bu tüplere alınıp, bir gece boyunca 4 °C’de (tüp çalkalayıcı üzerinde) primer antikörlere maruz bırakılmıştır. Primer antikör uygulamasından sonra membranlar tekrar TBS-T ile yıkanmış ve sonrasında %5’lik yağsız süt tozu (TBS-T içinde) çözeltisinde hazırlanan sekonder antikörler (anti-fare IgG ya da anti-tavşan IgG) ile bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda membranlar tekrar TBS-T ile üç kere 5 dk boyunca yıkanıp ve görüntü alma aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 3.8. Western blot çalışmasında kullanılan antikörler.

Antikör	Kaynak	Dilüsyon	Firma
Prolaktin reseptör U5	Fare	1:1000	Invitrogen
Aktin	Tavşan	1:2000	Cell Signaling Technology
fosfo-ERK1-2 (Thr202/Tyr204)	Tavşan	1:1000	Cell Signaling Technology
fosfo-AKT (Ser473)	Tavşan	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-fare IgG HPR-bağlı	At	1:10 000	Cell Signaling Technology
Anti-tavşan IgG HPR-bağlı	Keçi	1:10 000	Cell Signaling Technology

Membranlar görüntüleme çözeltisine (Clarity Western ECL Substrate) maruz bırakılmış ve sonrasında jel görüntüleme sistemi (GBox Chemi, Syngene) ile görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme işlemi sonrasında membranlarda görülen protein bantlarının intensitesi ImageJ programı ile ölçülmüştür.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler kontrol grupları ile diğer gruplara ait verilerin (iki gruba ait verilerin) karşılaştırılması ile yapılmıştır. Örnek sayısının 30’dan az olması ve normal dağılım göstermemesinden dolayı Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen p değerinin 0.05’den küçük olması iki grup arasındaki farkın anlamlı olduğunu göstermiştir. Analiz için “PASW Statistics 18” (SPSS Statistics) uygulaması kullanılmıştır.

4. BULGULAR

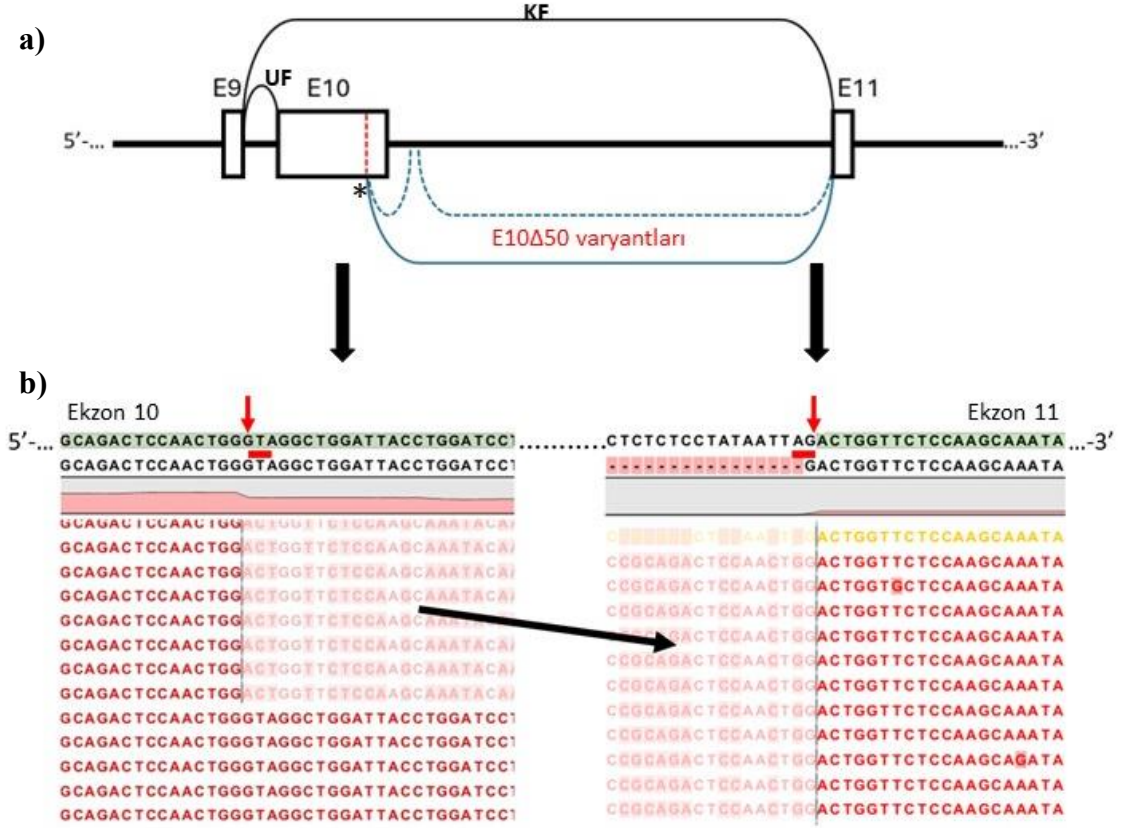
4.1. *İn Siliko*/Biyoinformatik Analizler

Tarafımızca gerçekleştirilen *in siliko* /Biyoinformatik analizler sonucunda prolaktin reseptör geninin yeni alternatif splayzing ürünleri (E10Δ50 varyantları) belirlenmiş (Kısım 4.1.1) ve bu ürünün diğer kemirgen ve insan ile domuzda bulunma ihtimali araştırılmıştır (Kısım 4.1.2).

4.1.1. PRLR uzun form E10Δ50 varyantları tanımlanmıştır

Transkriptomik projelerine ait yeni nesil dizileme sonucu elde edilen ham RNA dizileme verileri, milyonlarca 75-450 nükleotit uzunluğunda fragmentler (bunlara spot da denilecektir) halinde dosyalanıp SRA veri bankasında halka açık bir şekilde yayınlanmaktadır. Çalışmamızda olası yeni prolaktin reseptör formlarını tespit etmek amacı ile bu RNA dizileme dosyalarından faydalanılmıştır. SRA veribankasından sıçan karaciğer transkriptomik dosyaları (Çizelge 3.2’de veri bankası erişim numaraları verilmiştir) FASTQ formatında indirilmiştir. İndirilen FASTQ dosyaları CLC Genomics Workbench 3.6.5 programına, programın yüksek verimli dizileme araç kutusu (High-Throughput Sequencing Toolbox) kısmından aktarılmıştır. Sonrasında bu dizileme dosyasındaki fragmentler referans prolaktin reseptör geni üzerinde hizalanmıştır. CLC Genomics Workbench 3.6.5 programı dizileme dosyasındaki RNA fragmentlerini gen üzerinde en benzer olduğu yere koyup, genin başka kısmına ait olan kısımlarını soluk renkli göstermektedir (Şekil 4.1). Programda bu tip gösterilen RNA fragmentlerine aynı anda iki ekzondan parça taşıyan fragmentlerde rastlanmaktadır (Şekil 4.1). Bu fragmentler takip edilerek ekzon başlarındaki ya da sonlarındaki splayzing motifleri saptanmıştır. Bu fragmentler incelendiğinde bilinen splayzing motiflerinin yanında yeni splayzing motifleri de tespit edilmiştir (Şekil 4.1)

CLC Genomics Workbench 3.6.5 ile transkriptomik dosyalarındaki birden fazla ekzonu taşıyan fragmentler takip edildiğinde yeni bir splayzing noktası tespit edilmiştir. Ekzon 10’da bulunan dur kodonundan 50 nükleotit akış yukarısında (5’ uca doğru) yeni bir splayzing noktasından (Çizelge 4.1) ekzon 11’e splayzing gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca bu noktadan, önce 96 nükleotit akış aşağısındaki (dur kodonundan itibaren 47 nükleotit akış aşağıya gelmekte) bir bölgeye Splayzing gerçekleşip (53 nükleotitlik bir kısmı kapsayıp) daha sonra ekzon 11’e splayzing yapıldığı tespit edilmiştir. Tarafımızca ekzon 10 üzerinde tanımlanan yeni splayzing noktasını kullanan varyantlar uzun form E10Δ50 varyantları olarak isimlendirilmiştir. Bu splayzing noktasından eğer splayzing doğrudan ekzon 11’e gerçekleşiyorsa E10Δ50-E11 (en sık gördüğümüz form) eğer ilk olarak ekzon 10’nun stop kodunun 47 nükleotit akış aşağısındaki 53 nükleotitlik bölgeye splayzing gerçekleşip sonra ekzon 10 ekleniyorsa E10Δ50-D47-E11 ismi verilmiştir.



*Uzun formu kodlayan ekzon 10'un dur kodonundan 50 nükleotit önceki nükleotid kırmızı işaret ile belirtilmiştir. Bu noktadan E10Δ50 noktası olarak söz edilecektir.

-Fragmentlerin hizalandığı referans dizi ile uyumlu kısımları kırmızı renk ile gösterilirken, uyumsuz kısımları daha soluk gösterilmiştir.

Şekil 4.1. SRA veri bankasından elde edilen transkriptomik dizileri kullanılarak prolaktin reseptörüne ait yeni splayzing varyantları tespit edilmiştir. **a)** Sıçan prolaktin reseptör formları arasında fark oluşturan splayzing motifleri: mRNA'da E3-E9 iki prolaktin reseptör formunda da bulunur (şekilde E9'dan öncesi verilmemiştir), E9'dan sonra E10'a splayzing gerçekleşirse uzun form prolaktin reseptörü, E9 Ekzon 11 ile birleştirilirse kısa form prolaktin reseptörü oluşmaktadır. Tarafımızca gerçekleştirilen çalışmada yeni splayzing motifleri belirlenmiştir. Ekzon 10'nun dur kodonundan 50 nükleotit önceki nükleotitin doğrudan ekzon 11'e ya da önce E10 ile E11 arasında bulundan bir bölgeye sonra tekrar E11'e splayzing gerçekleştirildiği tespit edilmiştir; **b)** Transkriptomik dizileme dosyalarının CLC Genomics Workbench kullanılarak yapılan analizi yeni splayzing motiflerini ortaya çıkarmıştır. Belirgin kırmızı olarak gösterilen diziler gen üzerinde birebir karşılık bulmakta olup soluk

yerlerin karşılığı genin başka noktalarıdır. Şekilde ekzon 10 üzerindeki ‘dur’ kodonundan 50 nükleotit akış yukarısındaki bir noktada hizalanmış olan fragmentlerin aniden ekzon 11’in başı ile eşleşme gösterdiği görülmüştür. Transkriptomik fragmentleri incelenmeye devam edildiğinde E10Δ50 noktasından doğrudan E11’e olduğu gibi, E10Δ50’den önce *prlr* geninin farklı bir kısmının (bu noktanın 96 nükleotit akış aşağısına) daha sonrasında ise tekrar E11’e splayzing yapıldığı görülmüştür.

Tarafımızca tespit edilen *prlr* geninin yeni splayzing ürünlerinin fonksiyonel öneme sahip olabileceği öngörülmektedir. Transkriptomik çalışmalarda tespit edilen splayzing ürünleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu splayzing motifi ile üretilecek olan mRNA varyantları da uzun form ile aynı okuma çerçevesinde protein dizisine çevrilmiş (Çizelge 4.1.b) ve bilinen uzun form ile benzerliği incelenmiştir. Bu yeni varyantlardan uzun form prolaktin reseptörü ile aynı okuma çerçevesinde üretilecek olan proteinler sinyal peptidinden L575 rezidüsüne kadar aynı aminoasit dizisine sahip olacaktır (bundan dolayı bu kısım çizelgede verilmemiştir). Üretilen uzun form varyantlarının L575’den itibaren göstereceği farklılığın reseptör fonksiyonu için kritik öneme sahip olabileceği görülmüştür. Uzun form prolaktin reseptöründe bulunan Y580 yeni varyantlarda bulunmamaktadır. Bu tirozin rezidüsü maksimum STAT aktivasyonu için gerekli olduğundan (Pezet vd. 1997) bu formun ifadesinin artması STAT aktivasyonunu bazal seviyeye indirerek fonksiyonel fark yaratacağı görülmüştür. Ayrıca uzun formun C-terminalindeki son 141 aminoasit rezidüsünün prolaktin bağımlı kalsiyum girişini engellediği gösterilmiş olup (Sorin vd. 1998) yeni formların da prolaktin bağımlı kalsiyum girişini de olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.1. E10Δ50 varyantları bilinen uzun form PRLR'den farklıdır. **a)** PRLR UF ile yeni tespit edilen varyantların mRNA'larında fark yaratan kısımlar sunulmuştur; **b)** Yeni uzun form prolaktin reseptör varyantları hücre içi domain C-terminalde farklılık gösterir.

Bilinen uzun form ve tespit ettiğimiz varyantların birbiri ile aynı olan kısımları çizelgede verilmemiştir.
Varyant 2: E10Δ50-D47-E11

a)

		E10 ortak kısım	↓ Yeni splayzing noktası	
Uzun Form	5'-...	CAACCGCAGA CTCCAACCTGG	GTAGGCTGGA TTACCTGGAT CCTACGTGCT	
E10Δ50-E11	5'-...	CAACCGCAGA CTCCAACCTGG	-----	-----
Varyant 2	5'-...	CAACCGCAGA CTCCAACCTGG	GTAACACTAC AGAGTCATGA	AGTAATGTGG
		*****	*****	
			↓ Uzun form dur kodonu	
Uzun Form		TCATGCACTC CTTTCAC	TGA	-----
E10Δ50-E11		-----	---ACTGGTT CTCCAAGCAA ATACAAGGTG	
Varyant 2		TCTGCTAGCA AATGTTACAG	GATACTGGTT CTCCAAGCAA ATACAAGGTG	
			↑ E11 başlangıcı	
Uzun Form		-----	-----	-----
E10Δ50-E11		GATCTGTACC TGGCCCTTCC	TGGAGGATTC CAGAAACTGG ACAATGCAGG	
Varyant 2		GATCTGTACC TGGCCCTTCC	TGGAGGATTC CAGAAACTGG ACAATGCAGG	
Uzun Form		-----	-----	-3'
E10Δ50-E11		GGAACCTGAC TACTGA...		-3'
Varyant 2		GGAACCTGAC TACTGA...		-3'

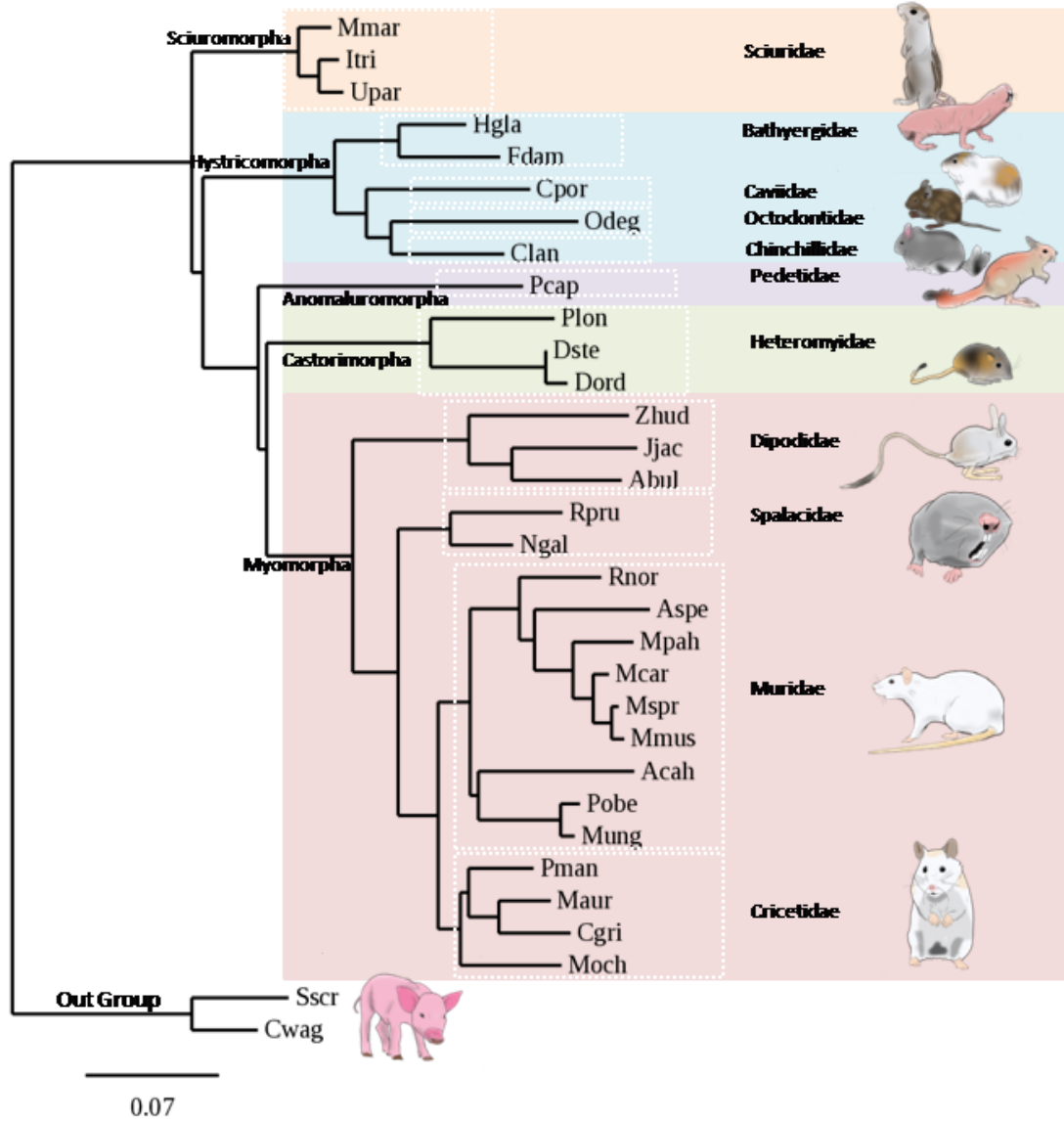
b)

		↓ Y580	
Uzun Form	...SNRRLQL	GRLDYLDPTCFMHSFH	591 aa
E10Δ50-E11	...SNRRLQL	DWFSKQIQGGSVPGPSWRIPETGQCRGT	603 aa
Varyant 2	...SNRRLQL	GNTTES	581 aa
	*****	↑ farklılığın başladığı kısım	

4.1.2. E10Δ50 formları evrensel değildir

Tarafımızca tanımlanan E10Δ50 formlarının oluşmasını sağlayacak splayzing motifinin diğer organizmalarda ifade edilip edilemeyeceği araştırılmıştır. Bunun için Çizelge 3.1'de isimleri verilmiş 30 kemirgen türüne ait genom ya da "shotgun genomik scaffold" dosyalarından prolaktin reseptörüne ait gen bölgesine ait diziler indirilmiştir. Bu memelilerin prolaktin reseptör ekzon 10 bölgesine karşılık gelen dizileri alınmış ve

Phylogeny.fr/Drawtree (Dereeper vd. 2008) uygulaması aracılığı ile Şekil 4.2'deki ağaç oluşturulmuştur. Bu ağaç birbirlerine yakın kemirgen gruplarını tespit etmek amacı ile kullanılmıştır. Bu ağacın mevcut filogenetik sınıflandırmadaki gruplarda olan kemirgenleri beraber gruplandığı görülmüştür.



Şekil 4.2. Ekzon 10 dizisi türler arasında korunmuş olmakla beraber canlı gruplarında farklılaşabilmektedir.

İndirilen ekzon 10 nükleotit dizilerinin E10Δ50 splayzing motifini kapsayan 60 nükleotit uzunluğundaki kısımları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2). Sıçana yakın olan muridae ailesinin üyelerinde bu splayzing bölgesinde yüksek korunmuşluk olmakla beraber intronun 5' ucunda bulunan 'GT' (donör) di-nükleotidinin bu aile içinde korunmuş olmadığı görülmüştür. Ayrıca diğer kemirgen grubu ailelerinde de bu bölgenin

korunmuşluğu düşüktür. Ancak bu bölge domuz ve insan ile karşılaştırıldığında muridae kadar bir korunmuşluk gözlenmemiş olmakla beraber, insan ve domuzda ‘GT’ korunmuştur. Bu durum bu E10Δ50 splayzing noktası kullanılarak üretilen prolaktin reseptör formlarının memeliler ya da kemirgenler arasında evrensel bir şekilde ifade edilemeyeceğini, sonradan kaybedilen ya da kazanılan bir özellik olup türler arasında prolaktin reseptör fonksiyonu açısından fark yaratabilecek bir nokta olduğunu işaret etmektedir.

Çizelge 4.2. E10Δ50 formuna ait splayzing bölgesinin diğer organizmalardaki nükleotit dizisi. Şekil 4.2. oluşturulan ağacın dallarından seçilen temsilcilerin ekzon 10 üzerindeki E10Δ50 splayzing noktası karşılaştırılmıştır: a) muridae, b) kemirgenler, c) memeliler. E10Δ50 noktasının evrensel korunmuş bir bölge olmadığı görülmektedir.

a)

Rnor	CAACCGCAGACTCCAACCTGG	<u>GT</u> AGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Aspe	CAACCGCAGACTCCACCTGG	GCAGGCTGGATTACCTGGATCCCACTTGCTTCACACACTC	60
Mspr	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	GCAGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Mmus	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	GCAGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Mung	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	<u>GT</u> AGGCTGGATTACCTGGATCCCACTTGCTTCATGCACTC	60
	**** *	*****	

b)

Rnor	CAACCGCAGACTCCAACCTGG	<u>GT</u> AGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Mmus	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	GCAGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Pman	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	GCAGGCTGGATTATCTGGATCCTACATGCTTCATGCACTC	60
Maur	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	GCAGGCTGGATTACCTGGATCCTACATGCTTCACGCACTC	60
Jjac	CAACTGCAGAGGCCCTCTGG	GAGTATTGGATTACCTGGATCCTACAGGCTTTGTTCACTC	60
Ngal	CAACTGCAGGCTCCAACCTGG	GCAGGCTAGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Itri	CAACTGCACACACCCCGAGG	GGGGCTGGATTACCTGGATCCTGCATGCTTCACGCACTC	60
Hgla	CAACTTCAGACTCCAACAGG	ACAGGTTGGATTACCTGGATCCTGCAAGCTTCATGCATTC	60
Clan	CAACTGCAGACTCCAGCGGG	<u>GT</u> GGTTTGGAGTACATGGACCCTGCAAGCTTCATGTGCTC	60
Cpor	CAACTGCAGACTCCATCTGG	GCGGCTCGGATTACCTGGATCCTGCAAGCCTCACGCACTC	60
	**** **	*****	

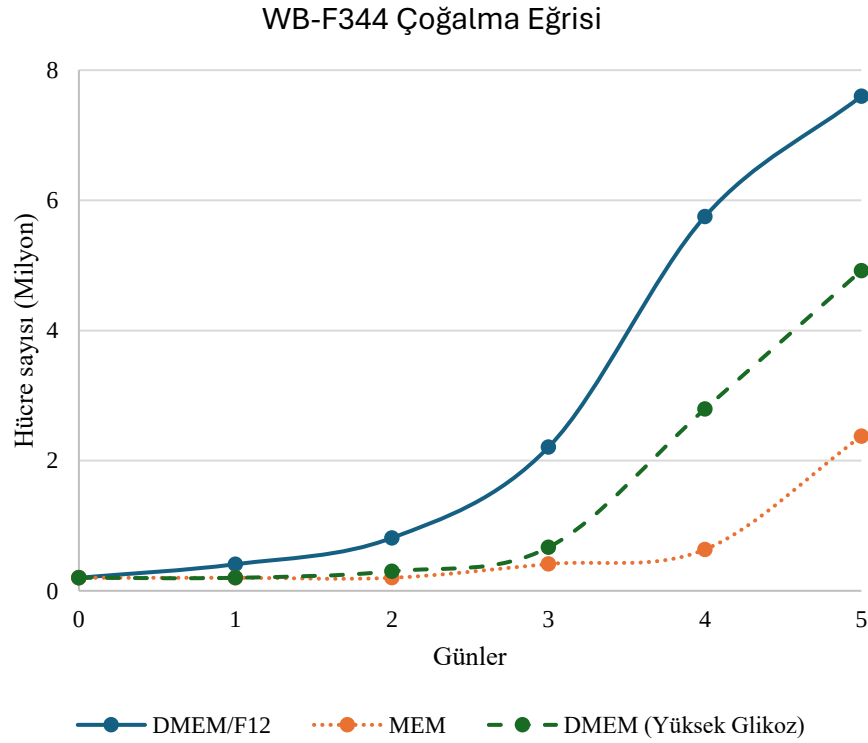
c)

Rnor	CAACCGCAGACTCCAACCTGG	<u>GT</u> AGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Mmus	CAACTGCAGACTCCAACCTGG	GCAGGCTGGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTC	60
Domuz	CCACTGCAGACACCCGCTGG	<u>GT</u> GGGCTGGATTACCTCGATCCCGCAGGCTTTATGCACTC	60
Hsap	CAAGTGCAGGCTCCAGCTGG	<u>GT</u> GGTTTGGATTACCTGGATCCCGCATGTTTACACACTC	60
	* * *	*****	

4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.2.1. WB-F344 hücre hattının DMEM/F12 besiyeri kullanılarak çoğaltılmasına karar verilmiştir

WB-F344 hücrelerini kullanılan çalışmalarda besiyeri olarak MEM (Golubovskaya vd. 1997), DMEM (Pierucci vd. 2017; Shi vd. 2018), DMEM/F12 (Hwang vd. 2020; Luo vd. 2019) ya da D-medium (formül no. 785470EF, GIBCO) (Horvath vd. 2002) tercih edildiği görülmüştür. Literatürde tek bir besiyeri kullanılmadığı için WB-F344 hücre hattını çoğaltmak için uygun besiyerini seçmek amacı ile farklı besi ortamlarında inkübe edilen WB-F344 hücrelerinin çoğalma eğrisi çıkarılmıştır. WB-F344 hücreleri (200.000 hücre) %10 FBS içeren farklı besi ortamları (MEM, DMEM ve DMEM/F12) içerisinde farklı petrilere ekilmiş ve günlük olarak hücrelerin sayımı yapılmıştır. Petride çoğalan hücre sayıları kullanılarak Şekil 4.3’de sunulan çoğalma grafikleri oluşturulmuştur. Çoğalma eğrisi incelendiğinde DMEM/F12’de hücrelerin diğer besiyerlerine göre daha erken çoğalma fazına girdiği ve daha yüksek hücre sayısına ulaşabildiği görülmüş olup çalışmada besi ortamı olarak DMEM/F12’nin kullanılmasına karar verilmiştir. WB-F344 hücrelerinin DMEM/F12 besi ortamında ikiye katlanma süreleri yaklaşık 18 saat olarak hesaplanmıştır.

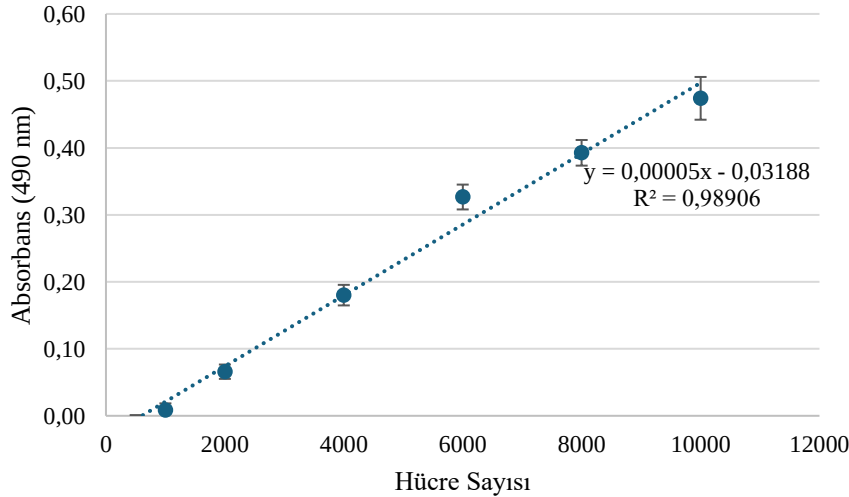


Şekil 4.3. Farklı besiyerlerinde WB-F344 hücrelerinin çoğalma eğrisini gösteren grafik

4.2.2. Hücrelere OTA uygulaması için optimum FBS konsantrasyonu %5 olarak belirlenmiştir

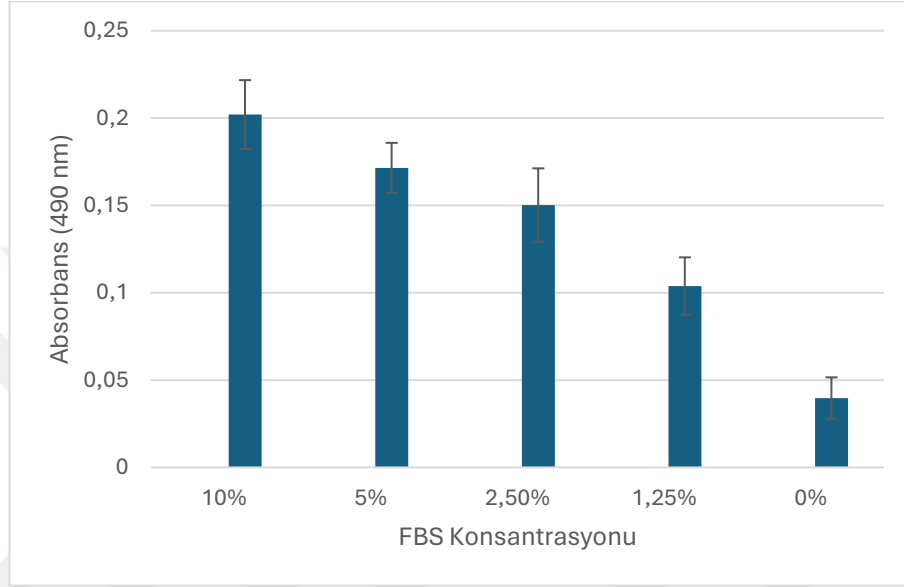
OTA besi ortamında eklenen FBS içinde bulunan albümine [11-27 mg/ml (Honn vd. 1975)] yüksek afinitede bağlandığı bilinmektedir. Bu durum hücrelerin serbest OTA'ya maruziyetini azaltacağı için besi ortamındaki FBS miktarını hücrelerin çoğalabileceği minimum konsantrasyona düşürmek gerekmiştir. Optimum FBS konsantrasyonunu belirlemek amacı ile MTT testi kullanılmasına karar verilmiş ve öncelikli olarak MTT testinde kullanılacak ideal hücre sayısı belirlenmiştir.

MTT testlerinde kullanılacak hücre sayısı 3 000 olarak belirlenmiştir: WB-F344 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 500-20.000 arasında DMEM/F12 (Fenol kırmızısı içermeyen) ekilmiştir (en az 3 tekrar) ve 48 saat sonra MTT testi yapılmıştır. MTT içeren besi yeri 96 kuyucuklu plaklardan uzaklaştırılıp plaklardaki formazan kristalleri DMSO içerisinde çözünür hale getirilip spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri ile Şekil 4.4'de verilen absorpsiyon grafiği oluşturulmuştur. WB-F344 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 10.000 hücreden daha fazla ekildiğinde 48 saatin sonunda MTT testi ile doğrusal bir okuma yapamadığı görülmüştür (Şekil 4.4). Grafik incelendiğinde 96 kuyucuklu plaklara 3.000-8.000 hücre sayısının toplamda 48 saat süren bir deney düzeneğinin MTT ile canlılık testi yapılmaya uygun olduğu görülmüştür. Spektrofotometrik ölçüm yapılan cihazın üst ölçüm sınırına yaklaşmamak adına MTT testleri için başlangıç hücre ekiminin 3000 hücre/kuyucuk olmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.4. MTT testi 10.000'e kadar WB-F344 hücre sayısında doğrusal ölçüm verebilmektedir. Grafik incelendiğinde 3.000-8.000 hücre/kuyucuk arasındaki WB-F344 hücrelerinin 48 saatte MTT ile canlılık aktivitesinin araştırılabileceğini göstermektedir.

WB-F344 hücrelerini kullanan çeşitli çalışmalarda FBS konsantrasyonu %5-%10 arasında tutulmuştur (Horvath vd. 2002; Hwang vd. 2020; Luo vd. 2019). Besiyerindeki FBS'nin hücrelerin çoğalabileceği minimum düzeyini bulmak amacıyla, WB-F344 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş bir gün sonra mevcut besiyerleri %10, %5, %2.5, %1.25 ve %0 FBS oranına sahip besiyerleri ile değiştirilerek 1 gün daha inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda canlılık testi (MTT) yapılmıştır (3 tekrar). Canlılık testi sonunda ölçülen absorbanlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve besiyerinde %10 FBS ve %5 FBS bulunması arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

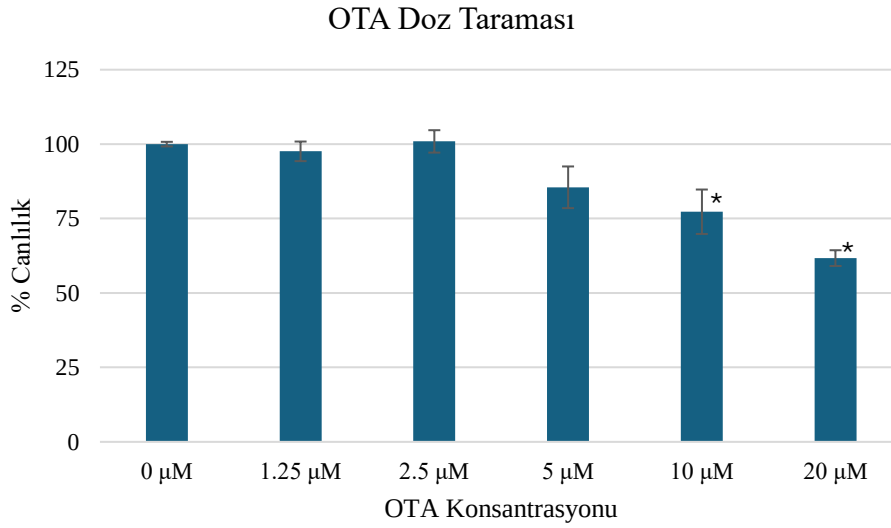


Şekil 4.5. Besiyerindeki FBS konsantrasyonunun WB-F344 hücrelerinin canlılık aktivitesi üzerindeki etkisi. Besiyeri içerisinde bulunan FBS oranı azaldıkça hücrenin canlılık aktivitesinde azalma olduğu tespit edilmiş olup, %5 FBS ile %10 FBS arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlenmiştir.

4.2.3. WB-F344 hücre hattının 10 μ M OTA'ya maruz bırakılmasına karar verilmiştir

WB-F344 hücrelerine uygulanacak OTA konsantrasyonunun belirlenmesi için bir doz taraması yapılmıştır. Uygulanacak OTA dozunun hücrenin canlılık aktivitesini etkileyen minimum konsantrasyon olması amaçlanmıştır. WB-F344 hücreleri DMEM/F12 (%5 FBS, %1 P/S) içerisinde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve bir gün sonra değişken konsantrasyonlarda (0-20 μ M) OTA'ya 24 saat maruz bırakılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda OTA'ya 24 saatlik maruziyet sonunda canlılık testi yapılmış (WST-8) ve hücrelerin canlılık aktivite durumu (0 μ M yani sadece etanol uygulanan grubun canlılığı %100 kabul edilerek) hesaplanmıştır (Şekil 4.6). WB-F344 hücre hattının canlılık aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak etkisi olan minimum OTA

konsantrasyonunun 10 μ M olduğu görülmüştür. Bu konsantrasyon hücre canlılığını yaklaşık olarak %20 azaltmaktadır.



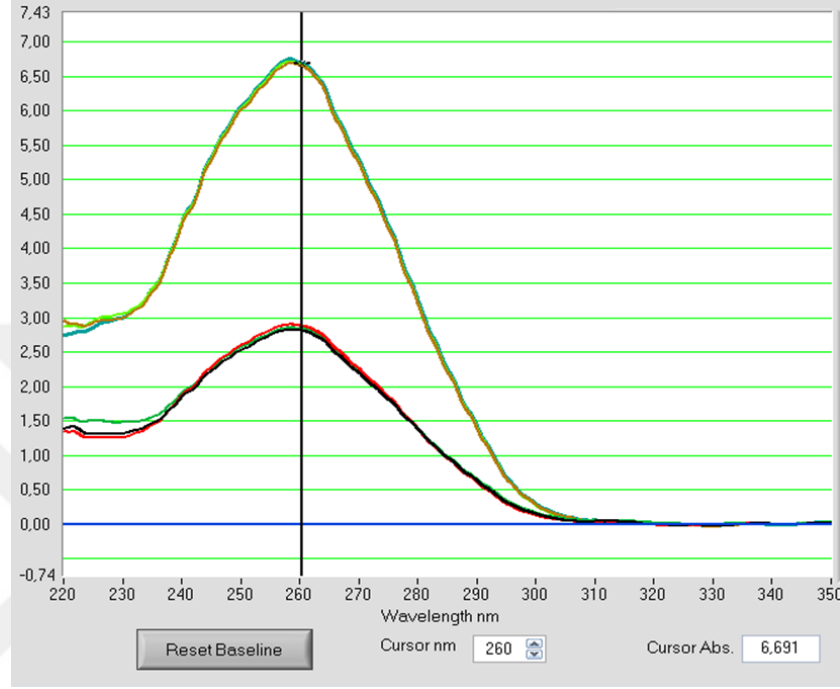
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda OTA uygulamasının WB-F344 hücrelerinin canlılık aktivitesi üzerine etkisi. WB-F344 hücreleri 0-20 μ M arasında OTA'ya 24 saat maruz bırakılmış, maruziyet sonrasında hücrelerin canlılık aktivitesi WST-8 testi ile belirlenmiştir. Hücrelere sadece etanol/vehicle (0 μ M) uygulanması ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark yaratan en düşük OTA konsantrasyonunun 10 μ M olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Nükleik Asit Çalışmaları

Çalışma kapsamında WB-F344 hücrelerindeki prolaktin reseptörlerini tespit amacı ile RNA izolasyonu ve PCR reaksiyonlarını kapsayan nükleik asit çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nükleik asit çalışmalarına RNA izolasyonunu takiben izole edilen RNA'nın kalitesinin belirlenmesi ile başlanmıştır.

WB-F344 hücreleri (1 milyon hücre) en az 2 gün çoğaltılmış ve inkübasyon süresinin ardından Hybrid-R toplam RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların nanodrop ile miktar ve saflık ölçümü (3 tekrarlı olarak) yapılmıştır. Nanodrop ölçümleri sonunda 100 μ l RNA'nın konsantrasyonun 200-600 ng/ μ l arasında olduğu (Toplamda 2-6 μ g RNA) görülmüştür. İzole edilen RNA'lar cDNA sentezi için kullanılmadan önce saflığının yeterli olduğu ve RNA degradasyonunun olmadığı onaylanmıştır. RNA'ların saflığını değerlendirmek amacı ile nanodrop kullanılarak RNA örneğine ait absorpsiyon grafiği oluşturulmuş ve örneğe ait A260/280 ve A260/230 oranları belirlenmiştir. Nanodrop tarafından oluşturulan absorpsiyon grafiği Şekil 4.7'deki gibi olan (maksimum absorbansın ölçüldüğü 260 nm dalga boyu dışında bir pik yapmayan) ve A260/280 oranının 2.0- 2.1 (protein kontaminasyonunun olmadığı) ve A260/230 oranının 2.0-2.4 arasında olan örneklerin saflığı sonraki süreçler için yeterli

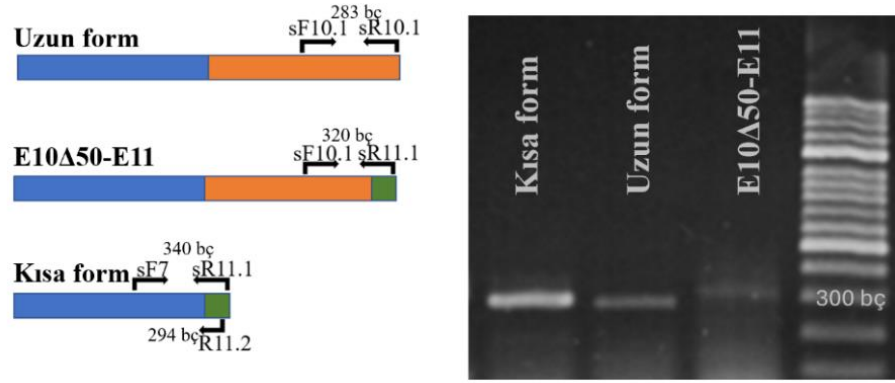
görülmüştür. Yeterli saflığa sahip olan RNA örnekleri agaroz jelde yürütülmüş ve bu RNA örneklerinin degradasyon durumu değerlendirilmiştir. Bu RNA örneklerinde 28S (~4.8 kb) ve 18S (~1.9 kb) rRNA bantlarının (28S ve 18S bant intensitesinin 2:1 oranına yakın) görülmesi durumunda RNA'nın cDNA sentezi için kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.7. İzole edilen RNA'ların nanodrop ile elde edilen absorpsiyon grafiği. İzole edilen RNA'ların 260 nm'de maksimum absorbans vermesi ve farklı dalga boylarında bir yüksek absorbans göstermemesi RNA dışındaki moleküllerin (Protein vb.) kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.

4.3.1. WB-F344 hücre hattında PRLR uzun, kısa ve E10Δ50-E11 formuna ait fragmentler saptanmıştır

WB-F344 hücre hattından izole edilen RNA'lardan 1-5 µg alınarak A.B.T.TM cDNA Sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA'dan 1-4 µl arasında alınarak geleneksel PCR ya da qPCR çalışmalarında kullanılmıştır. GAPDH, kısa form uzun form ve E10Δ50 formlarına özgü primerler kullanılarak 40 döngüden oluşan polimeraz zincir reaksiyonları kurulmuş ve bu reaksiyonlar sonrasında PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp jellerin görüntüsü alınmıştır. Jel görüntüleri incelenmiş ve kullanılan primer setlerinin hedeflediği bölgelerin uzunluğu ile (F10.1-R10.1: 283 bp, sF10.1-sR11.1: 320 bp, sF7-R11.1: 340 bp ve sF7-sR11.2: 294 bp) jelde gözlemlenen bantların uzunluğunun uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. WB-F344 hücre hattında kısa, uzun ve E10Δ50-E11 formuna ait dizilerin varlığı gösterilmiştir

Gerçekleştirilen PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri hizmet alımı yolu ile dizilenmiş olup (Çizelge 4.3) dizileme sonucunda, elde edilen bantların prolaktin reseptörüne ait olduğu görülmüştür. Böylece ilk kez WB-F344 hücre hattında E10Δ50-E11'i oluşturan splayzing motifini taşıyan fragment gösterilmiştir (Çizelge 4.3-e). Dizileme dosyası incelendiğinde E10Δ50-E11 oluşmasını sağlayan ekzon 10'un son kısmından ekzon 11'e gerçekleşen splayzing WB-F344 hücre hattında gözlemlenmektedir.

Çizelge 4.3. WB-F344 hücre hattının ifade ettiği prolaktin reseptör formlarının dizilemeleri yapılmıştır. WB-F344 hücrelerinden elde edilen RNA’lardan cDNA sentezlenmiş. Uzun kısa ve E10Δ50-E11 formu prolaktin reseptörleri PCR ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri hizmet alımı yolu ile dizilenmiştir. Dizileme yönü “←” ya da “→” ile gösterilmiştir. Primer hedef bölgeleri gri ile vurgulanmıştır. Ekzon 11’e ait nükleotit dizileri altı çizili olarak verilmiştir.

a) Kısa form; sR11.2 primeri kullanılarak yapılan dizileme

sR11.2	GTATCTTGTCAGACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGA	60
referans	<u>GTATCTTGTCAGACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGA</u>	60

sR11.2	GAGTTCGGTTGAAATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTTGT	120
referans	<u>GAGTTCGGTTGAAATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTTGT</u>	120

sR11.2	GGCCATTCTCTGCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTA	180
referans	<u>GGCCATTCTCTGCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTA</u>	180

sR11.2	TAGCATGATGACCTGCATCTTTCCACAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAGGATTTGATAC	240
referans	<u>TAGCATGATGACCTGCATCTTTCCACAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAGGATTTGATAC</u>	240

sR11.2	CCATCTGCTGGAG-----	253
referans	<u>CCATCTGCTGGAGACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCC</u>	300

sR11.2	-----	253
referans	<u>TGGAGGATTCCAGAACTGGACAATGCAGGGGAACCTGAC</u>	340
	← sR11.2	

b) Kısa form; sF7 primeri kullanılarak yapılan dizileme

sF7	-----ATGGAGCCAGGA	12
referans	<u>GTATCTTGTCAGACTCGCTGCAAGCCAGACCATGGATACTGGAGTAGATGGAGCCAGGA</u>	60
	sF10.1→ *****	
sF7	GAGTTCGGTTGAAATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTTGT	72
referans	<u>GAGTTCGGTTGAAATGCCAAATGACTTCACCTTGAAGGACACAACCGTGTGGATCATTTGT</u>	120

sF7	GGCCATTCTCTGCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTA	132
referans	<u>GGCCATTCTCTGCTGTCATCTGTTTGATTATGGTCTGGGCAGTGGCTTTGAAGGGCTA</u>	180

sF7	TAGCATGATGACCTGCATCTTTCCACAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAGGATTTGATTC	192
referans	<u>TAGCATGATGACCTGCATCTTTCCACAGTTCCTGGGCCAAAAATAAAGGATTTGATAC</u>	240

sF7	CCATCTGCTGGAACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGC	246
referans	<u>CCATCTGCTGGAGACTGGTTCTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGC</u>	294

Çizelge 4.3. (Devamı)

c) Uzun form; sR10.1 primeri kullanılarak yapılan dizileme

sR10.1	AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAATAAGGAGTAGGGCAAGGG	60
Referans	AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAAGTAAGGAGTATGCCAAGGT	60

sR10.1	GTTTGGCATTAGGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACAC	120
Referans	GTCTGGCATTATGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACAC	120
	** *****	
sR10.1	AGCGTTGCTCGAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTAGAAGCTGACCAATCTGA	180
Referans	AGCGTTGCTCGAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTGAAGCTGACCAATCTGA	180

sR10.1	GAAAGATCTGGCCAGCTTCACTGCAACCTCAAGCAACC-----	218
Referans	GAAAGATCTGGCCAGCTTCACTGCAACCTCAAGCAACCGCAGACTCCAACCTGGGTAGGCT	240

sR10.1	----- 218	
Referans	GGATTACCTGGATCCTACGTGCTTCATGCACTCCTTCACTGA 283	
	←sR10.1	

d) E10Δ50-E11; sR11.1 primeri kullanılarak yapılan dizileme

sR11.1	AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAAGTAAGGAGTATGCCAAGGT	60
Referans	AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAAGTAAGGAGTATGCCAAGGT	60

sR11.1	GTCTGGCATTACGGATAACAATATCCTTGTATTAGTGCCAGACTCCTGAGCCCCGAACCC	120
Referans	GTCTGGCATTACGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACAC	120

sR11.1	ATCGTTGCTGGCGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCGCCATCGTTCGCTTTTGAGCAATTGA	180
Referans	AGCGTTGCTCGAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTTGAAGCTGACCAATCTGA	180
	* ***** * ***** * ***** * ***** *	
sR11.1	GAAGGATCTGGCCAGGATCACCGCAACCCCTAGCAA-----	216
Referans	GAAAGATCTGGCCAGCTTCACTGCAACCTCAAGCAACCGCAGACTCCAACCTGGACTGGTT	240
	*** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *	
	↑E11	
sR11.1	----- 216	
Referans	CTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGGAGGATTCCAGAACTGG	300
sR11.1	----- 216	
Referans	ACAATGCAGGGGAACCTTGAC	320
	← sR11.1	

Çizelge 4.3. (Devamı)

e) E10Δ50-E11; sF10.1 primeri kullanılarak yapılan dizileme

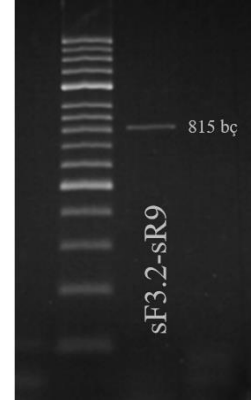
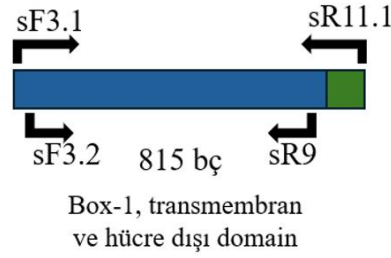
sF10.1	-----	0
Referans	AGAAAACAACCAGACAGAGAAGCCTGGGGTTCCTGAAACCAGTAAGGAGTATGCCAAGGT	60
	sF10.1→	
sF10.1	-----CCCATAACAC	10
Referans	GTCTGGCATTACGGATAACAATATCCTCGTATTAGTGCCAGACTCACGAGCCCAGAACAC	120

sF10.1	ATGGTTGCTCGAGGAAACAGCCAAAAAGGCTCCAACATCGTTTGAAGCTGACCAGTCTGA	70
Referans	AGCGTTGCTCGAGGAATCAGCCAAGAAGGCTCCACCATCGTTTGAAGCTGACCAATCTGA	180
	* *****	
sF10.1	GAAAGATCTGGCCAGCTTCTCTGCATCCTCAAGCAACCGCAGACTCCAACCTGGACTGGTT	130
Referans	GAAAGATCTGGCCAGCTTCACTGCAACCTCAAGCAACCGCAGACTCCAACCTGGACTGGTT	240

	↑E11	
sF10.1	CTCCAAGCAAATATAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGGAGGATTCAGAAACTGA	190
Referans	CTCCAAGCAAATACAAGGTGGATCTGTACCTGGCCCTTCCTGGAGGATTCAGAAACTGG	300

sF10.1	ACAATGCAGGGGAACCTTGAC	210
Referans	ACAATGCAGGGGAACCTTGAC	320

Çeşitli hücre hatlarında prolaktin reseptörleri mRNA'larında ekzon 3 ile 9 arasındaki ekzonlarda delesyona rastlanabilmektedir. Bundan dolayı uzun kısa ve delta formuna ait fragmentlerin varlığı doğrulandıktan sonra prolaktin reseptörünün hücre dışı kısmını kodlayan ekzon 3 ve ekzon 9 arası bölgenin bütünlüğü incelenmiştir. sF3 ve sR9 primer seti ile PCR reaksiyonu yapıldığında ilgili bölgeyi (~840 bç) temsil eden bir bant gözlemlenememiş olup yeni primer seti ile ikinci bir PCR yapıldığında ilgili bir bölgenin bir bütün olarak WB-F344 hücre hattında bulunduğunu gösteren bant tespit edilmiştir (Şekil 4.9). İlk olarak önce sF3-sR11.1 primer seti ile 30 döngü PCR yapılmış ve bu reaksiyonun sonunda elde edilen PCR ürünleri sF3.2-sR9 primer setleri ile tekrar PCR'a tabi tutulmuştur (primer setlerinin hedef bölgeleri Şekil 4.9 üzerinde belirtilmiştir). sF3.2-sR9 primer seti (hedef bölge uzunluğu 815 bç) ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda yaklaşık 800 bç uzunluğunda bir bant tespit edilmiş olup bu durum bu hücre hattının hücre dışı domaini, transmembran domaini ve fonksiyon için kritik Box-1 bölgesini taşıyan prolaktin reseptörü kodlayabildiğini göstermiştir.



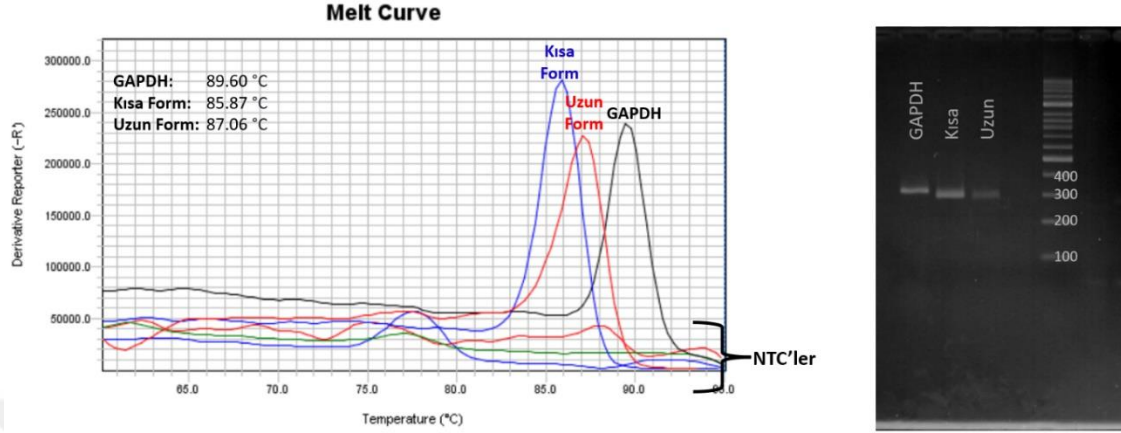
Şekil 4.9. WB-F344 hücre hattında prolaktin reseptör hücre dışı domaini bütün halinde bulunmaktadır. WB-F344 hücresi cDNA'sı kullanılarak sF3.1-sR11.1 primer seti ile PCR gerçekleştirilmiş ve sonrasında bu PCR ürünleri kullanılarak sF3.2-sR9 primerleri ile tekrar PCR yapılmıştır. sF3.2-sR9 primer seti prolaktin reseptörünün Box-1, transmembran domain ve hücre dışı domainine karşılık gelen yerleri hedeflemekte olup 815 bç'lik bir bölgeyi kapsamaktadır. Bu PCR ürünü agaroz jelde yürütüldüğünde hedef ile uyumlu uzunlukta bant elde edildiği görülmüştür.

4.3.2. qPCR optimizasyonu

GAPDH, uzun ve kısa form prolaktin reseptörlerini hedefleyen primer setleri ile 40 döngüden oluşan qPCR çalışması yapılmış ve reaksiyon sonunda melting curve oluşturulup incelenmiştir. Melting curve primer dimeri oluşumunu göstermiştir. Primer dimerleri, qPCR'da ifadesi belirlenmek istenen hedef bölgeden daha önce amplifiye edilip çoğaltılabilir ve bu çoğalan primer dimerlerinden kaynaklanan sinyal ve hedef bölgeden alınan sinyal ayırt edilememektedir. Ayrıca hedeflenen cDNA'ların erime eğrilerinde görülecek *T_m* sıcaklığını etkilemektedir. Dolayısı ile özellikle qPCR çalışmalarında primer dimerleri çalışmanın değerlendirilmesini engellemektedir.

Primer dimeri oluşum koşullarını belirlemek amacı ile Hedeflenen mRNA'ları amplifiye edecek primer setleri kullanılarak (sF10.1-sR10.1, sF7-sR11.1, sF_GAPDH1-sR_GAPDH) cDNA kalıbı içeren ve cDNA kalıbı içermeyen NTC (Negative template control) qPCR kurulmuştur. Bu reaksiyonlardaki primer konsantrasyonu 500-125 nM arasında değiştirilmiş, reaksiyon sonunda elde edilen erime eğrilerindeki pikler ve PCR ürünlerinin jelde yürütülmesinden sonra elde edilen jel görüntüleri incelenmiştir. Yüksek primer konsantrasyonlarda primer dimeri oluşumu 20. döngüden itibaren başlarken, primer dimeri oluşumunu azaltacak ideal primer konsantrasyonunun 200 nM olduğu ve bu konsantrasyonda primer dimeri oluşumunun 35. döngü sonrasına ötelendiği görülmüştür. Prolaktin reseptör mRNA'sı qPCR'da 35 döngü öncesinde gözlemlenmemiş olup F3-SR11.1 ve F3.2-R10.1 primerleri kullanılarak 33 döngülik geleneksel PCR yapıp bu PCR ürünleri kullanılarak uzun ve kısa form için (sF10.1-sR10.1, sF7-sR11.1 primer setleri ile) qPCR yapıldığında bu hedef bölgelere özgü erime eğrilerinde pikler

tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Erime eğrileri incelendiğinde T_m sıcaklığının GAPDH için 89.60 °C, kısa form için 85.87 °C ve uzun form için 87.06 °C olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. qPCR'da primer dimeri oluşumu 35. döngüden itibaren gerçekleşmektedir. Kısa ve uzun form için sırası ile F3-SR11.1 ve F3.2-R10.1 primerleri kullanılarak 33 döngüden oluşan standart PCR yapılmış ve bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünlerden 1 µl alınarak uzun form (sF10.1-sR10.1) ve kısa form (sF7-sR11.1) primer setleri ile qPCR kurulmuştur. Solda 35 döngü qPCR sonunda edilen erime eğrisi, sağda aynı PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu elde edilen bantlar verilmiş olup, erime eğrisinde tespit edilen piklerin GAPDH, uzun form ve kısa form prolaktin reseptörüne ait olduğu görülmüştür.

WB-F344 hücre hattından elde edilen cDNA'lar ile kurulan qPCR çalışmalarında prolaktin reseptörüne ait fragmentlerin 38. Döngüden sonra gözlemlenebilmesi yani primer dimerleri oluşumundan sonra gözlemlenmesi qPCR yöntemini prolaktin reseptörü ifadesini mRNA düzeyinde belirlemek için elverişsiz olmasına sebep olmuştur. Bundan dolayı aşağıda verilen yöntemler ile WB-F344 hücre hattının daha fazla prolaktin reseptör ifade etmesi ve dolayısı ile prolaktin reseptörlerinin qPCR'da 33 döngüden önce eşik değerini aşar hale gelmesi sağlanmaya çalışılmış olmakla birlikte serum konsantrasyonu, besiyeri çeşidi veya 17β-estradiol uygulamasının bu konuda etkili olmadığı görülmüştür.

4.3.2.1. Prolaktin reseptör mRNA'sını 33 döngü öncesine gözlemleyebilmek için yapılan çalışmalar

Prolaktin reseptörüne ait mRNA çeşitleri 38. döngüden sonra tespit edilebilir hale gelmekte (içsel standart olarak kullanılan GAPDH ise 20. döngüden sonra) ve yine 36. döngü sonrası özgül olmayan PCR ürünlerinin (primer dimer oluşumu gibi) miktarında da ciddi artışlar olup, prolaktin reseptör mRNA'sına ait ürünlerin analizinde (miktarının doğru tespitinde) problem yaratmıştır. Bu sözünü ettiğimiz sorunları elimine etmek WB-

F344 hücrelerindeki prolaktin reseptör ifadesinin yükseltilmesi amaçlanmış olup, bu amaç doğrultusunda kullanılan besiyeri çeşidinin değiştirilmiş, besiyerindeki FBS oranı değiştirilmiş ve ortamdaki 17 β -estradiol (E2) miktarının artırılmış olmakla beraber yapılan uygulamaların prolaktin reseptör formlarının 33 döngüden oluşan bir PCR’da görülmesini sağlamamıştır.

Besiyeri çeşidi: Hücreleri çoğaltmak için kullanılan besiyerinin prolaktin reseptör formlarının üzerine etkisini görmek amacı ile hücreler MEM, DMEM ve DMEM/F12 besiyerlerinde (3-6 gün boyunca) çoğaltılmıştır. Hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezlendikten sonra prolaktin reseptör formları ve GAPDH’yı amplifiye etmek amacı ile standart PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %3 agaroz jelde yürütülmüş ve farklı besiyeri koşullarında hücrelerin çoğaltılmasının prolaktin reseptör ifadesini 33 döngüden oluşan PCR sonunda agaroz jelde görüntülenebilecek düzeye çıkarmadığı görülmüştür.

Besiyerindeki FBS oranı: Prolaktin reseptör ifadesi serumda bulunan hormonlardan (özellikle prolaktin hormonu, östrojen ve testosteron) etkilenmektedir. Bu hormonların konsantrasyonunun azalması ile prolaktin reseptör ifadesinin değişmesi beklenen bir durumdur. Çalışmanın başında hücrelerin çoğaltıldığı besiyerindeki FBS konsantrasyonu, serumdaki albümin proteinine OTA bağlandığından, %10’dan %5’e düşürülme kararı alınmıştı. Bu şekilde FBS konsantrasyonunun düşürülmesinin, besiyerindeki prolaktin reseptörü ifadesini arttıran ajanların (özellikle östrojen ve prolaktin hormonu) miktarının düşmesinden dolayı prolaktin reseptör ifadesinin azalmasına neden olabileceği düşünülmüştür. Serum konsantrasyonu yükselince prolaktin reseptör ifadesinin tekrardan artıp artmayacağını görmek amacı ile besiyerindeki FBS konsantrasyonu tekrar %10, %20 çıkarılarak PCR çalışmaları tekrarlanmıştır. Başlangıç hücre sayısı olarak yaklaşık 1 milyon hücre kullanılmış, 4 güne kadar hücreler 37 °C’de inkübe edilip hücreler tripsinlenerek kaldırılmıştır. RNA izolasyonu ve cDNA sentezini takiben GAPDH ve prolaktin reseptör formlarına özgü primerler ile PCR kurulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri incelendiğinde GAPDH’ye ait ürünler gözlemlenmiş ancak 35 döngünün altında prolaktin reseptör formlarının ait PCR ürünleri görülmemiştir. Dolayısı ile prolaktin reseptör ifadesindeki düşüşün nedeninin FBS konsantrasyonunun %5’e düşürülmesi olmadığı sonucuna varılmıştır.

E2 uygulaması: Prolaktin reseptör ifadesi ve aktivitesinin E2 uygulamasından etkilendiği bilinmektedir. Prolaktin reseptör mRNA seviyesinin artırıp daha düşük döngü sayısında ölçülebilir düzeye getirebilmek amacı ile WB-F344 hücrelerine E2 uygulaması yapılmasına karar verilmiştir. Çalışmada kullanılacak E2 ticari olarak satın alınabilen Estrofem adlı tabletten ekstrakt edilip miktarı nanodrop ile belirlenmiştir. E2 seyreltilerek 100 μ M kullanım stoğu hazırlanmıştır. WB-F344 hücrelerine E2 (100 nM ve 10 nM) uygulaması yapılmış sonrasında bu hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıp, 33 döngülük geleneksel PCR yapılmıştır. Bu PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek prolaktin reseptörüne ait bant elde edilip edilmediğine incelenmiştir. WB-F344 hücrelerine E2 uygulamasının prolaktin reseptör mRNA düzeyini 33 döngüden daha düşük döngü sayısında gözlemlenebilir seviyeye getiremediği görülmüştür.

4.4. Protein Düzeyinde Gerçekleştirilen Çalışmalar

Hücrenin kanserleşme süreçlerinde hücre sağ kalım yeteneğinin artması ve doku hasarı oluşumunda hücre ölüm süreçlerinin teşvik edilmesi gerçekleşmektedir. Hücrelerin OTA'ya maruz kalması bu iki süreci kontrol eden moleküler mekanizmaların aktivasyonunu etkilemektedir. OTA maruziyet birçok hücre hattında PI3K/AKT ve MEK/ERK1-2 sinyal yolağını elemanlarının fosforilasyon durumunu değiştirerek hücre hayatta kalma ya da ölüm süreçlerini etkilemektedir. PI3K/AKT ve MEK/ERK1-2 sinyalizasyon yolları prolaktin reseptör sinyalizasyonunun bir elemanı olduğu için bu çalışma kapsamında WB-F344 hücre hattının OTA maruziyetine bağlı olarak değişen AKT ve ERK1-2 proteinlerinin fosforillenmiş formlarının düzeyi Western blot ile belirlenmiştir. Ayrıca p-JAK2, p-STAT3 ve p-STAT5 düzeyleri belirlenmek istenmiş olmakla beraber, WB-F344 hücre hattında p-JAK2, p-STAT3 ve p-STAT5 saptanamamıştır.

4.4.1. OTA maruziyeti WB-F344 hücre hattında p-ERK1/2 ve p-AKT düzeyini arttırmaktadır

PI3K/AKT ve MEK/ERK1-2 sinyalizasyon yolları elemanlarının OTA maruziyetinde zamana bağlı aktivasyonun değişimini incelemek amacı ile WB-F344 hücreleri (yaklaşık 700.000 hücre) DMEM (%5 FBS %1 P/S) içerisinde 6 cm çaplı plaklara ekilmiştir. Ekimden bir gün sonra hücrelere 10 µM OTA (24 saatte istatistiksel olacak canlılık düzeyinde fark yaratan en düşük konsantrasyon) ya da etanol (besiyerindeki son etanol oranı %0.1) uygulamasına başlanılmıştır. WB-F344 hücreleri 24, 12, 6, 3 ve 1 saat OTA'ya maruz bırakılmıştır. Deney sistemini sonlandırma işlemi petrillerdeki besiyerini uzaklaştırıp hücrelerin lizis tamponu ile kaldırılması ile yapılmıştır. Hücre lizatları hazırlandıktan sonra lizatlardaki toplam protein miktarı belirlenmiş, SDS jelde bu lizatlar yürütülmüş ve proteinler boyutlarına göre ayrıldıktan sonra PVDF membrana aktarılmıştır. Membranlar bloklanma işleminden sonra önce ilgili proteinlere özgü antikorlara sonrasında, sekonder antikorlara maruz bırakılmıştır. Sekonder antikor uygulamasından sonra membranlar görüntüleme solüsyonuna maruz bırakılmış ve Syngene cihazında ilgili protein bantlarının görüntüleri alınmıştır. Membran görüntüleri alındıktan ilgili bantların intensitesi ImageJ ile belirlenmiş ve ölçülen intensiteler beta aktin bantlarının intensitesine göre normalize edilerek değerlendirilmiştir. Bu uygulama en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

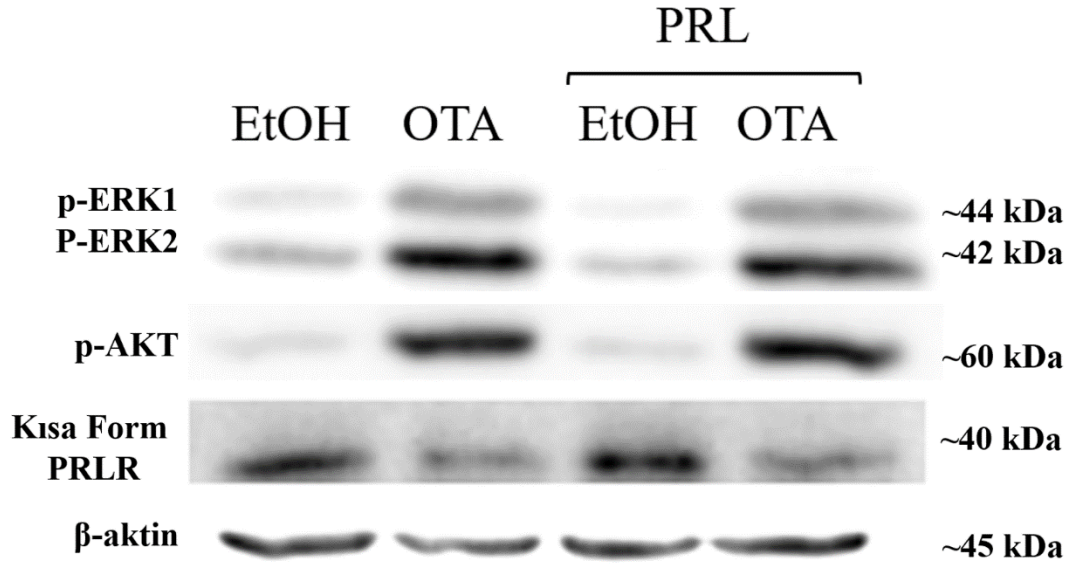
Western blot çalışması sonrasında p-AKT ve p-ERK1/2 düzeylerinin OTA maruziyetine bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre istatistiksel (Mann-Whitney Test) olarak anlamlı fark 3. saatten itibaren görülmektedir (Şekil 4.11). En yüksek AKT ve ERK1/2 aktivasyonu 6 ve 12. Saatlerde olmaktadır. Daha sonra aktivasyon düzeyi düşmekle beraber, kontrol grubundan hala yüksektir. WB-F344 hücre hattında p-JAK2, p-STAT3 ve p-STAT5 saptanamamıştır.



Şekil 4.11. Zaman bağımlı OTA maruziyeti (10 μ M) ERK1/2 ve AKT fosforilasyonunu arttırmaktadır.

4.4.2. OTA maruziyeti WB-F344 hücre hattında kısa form prolaktin reseptör miktarını azaltmaktadır

Kurulan diğer bir deney sistemi hücrelerin kültür ortamına 20 ng/ml konsantrasyonunda PRL eklenmesini içermektedir. Hücreler 4 petriye (~700.000 hücre/petri) ekilmiş OTA ve etanol uygulamasından 6 saat önce 2 petriye PRL (20 ng/ml) uygulaması yapılmıştır. Ekimden sonraki 24. saatte PRL takviyesi yapılan ve yapılmayan petrilerin yarısına etanol diğer yarısına OTA uygulaması yapılmıştır. Hücreler 24 saat OTA'ya maruz kaldığında deney sonlandırılmış, hücre lizatları hazırlanmış ve bu lizatlar kullanılarak western blot yapılmıştır (Şekil 3.4). Kısa form prolaktin reseptör (~40 kDa) ifadesinin 24 saat OTA maruziyeti ile azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.12). Prolaktin uygulaması bu azalma üzerinde etkiye sahip değildir (Şekil 4.12). OTA maruziyeti (24 saat) p-ERK1/2 ve p-AKT miktarını arttırmaktadır (Şekil 4.12). OTA maruziyeti öncesi PRL uygulaması p-ERK1/2 miktarını bir miktar azaltmak ile beraber bu azalış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır



Şekil 4.12. OTA maruziyeti ve PRL uygulamasının prolaktin reseptör ilişkili sinyalizasyon yolu elemanları üzerine etkisi. OTA maruziyeti (10 μ M 24 saat) p-ERK1/2 ve p-AKT miktarın arttırmış ve kısa form PRLR (~40 kDa) miktarını azaltmıştır. OTA maruziyetinden 6 saat önce, petriye 20 ng/ml PRL takviyesinin yapılması hücrenin 24 saatlik OTA maruziyetine verdiği yanıt üzerinde anlamlı bir farklılık yaratmamıştır

5. TARTIŞMA

OTA başta böbrek ve karaciğer olmak üzere birçok dokuya hasar vermekte olup, sıçan ve farelerde böbrek ve karaciğer tümörlerine neden olabildiği gösterilmiştir (NTP 1989). OTA'nın patolojik etki mekanizmalarını aydınlatmak üzere birçok çalışma gerçekleştirilmiş olup günümüzde, bu patolojileri destekleyen sinyalizasyon yolları ve özellikle sinyalizasyonun başladığı reseptörlere odaklanılmıştır. Böbrek veya karaciğerde membran reseptörlerinden HGFR, TGFR ve PRLR'nin OTA'nın patolojik mekanizmasında öne çıktığı görülmektedir.

HGFR sinyalizasyonu STAT3, AKT ve ERK fosforilasyonu aracılığı ile hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasını düzenleyebilmektedir. HGFR sinyalizasyon regülasyonunun bozulması çeşitli kanserlerde gözlenmektedir (Maulik vd. 2002). OTA maruziyetinde (10 μ M 48 saate kadar uygulamalar) insan böbrek hücrelerinde HGFR aktivasyonu ve buna bağlı olarak AKT fosforilasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Özcan vd. 2015). OTA maruziyetinde HGFR sinyalizasyonunun AKT üzerinden hücrenin hayatta kalmasını destekleyen bir süreç olduğu ortaya konmuştur (Özcan vd. 2015). Grup ayrıca OTA maruziyeti nedeni ile gerçekleşen ERK aktivasyonunun hücrenin ölüm süreci ile ilişkisini ortaya koymuş olup, OTA maruziyetinde ERK aktive eden reseptörün hangi reseptör olduğu henüz ortaya konmamıştır.

TGFR hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz, hücre plastisitesi ve göçü dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenler. Kanserleşme sürecinde TGFR sinyalizasyonu tümör baskılayıcı ya da pro-tümörojenik roller üstlenebilmektedir (Pardali ve Moustakas 2007). Ayrıca fibrozis gelişimi ile de ilişkilidir. OTA maruziyetine (100 ve 200 nM, 48 saat) bağlı olarak böbrek ve karaciğerde gözlenen fibrozis sürecinde TGFR sinyalizasyonunun rolü gösterilmiştir (Chae vd. 2022; Pyo vd. 2020). OTA maruziyeti ile böbrek ve karaciğerde TGFR reseptör aktivasyonunda ve SMAD 2/3 aktivasyonunda artış gerçekleşmektedir. TGFR sinyalizasyonu kimyasal inhibitörler ile baskılandığında ise OTA maruziyeti sonrasında fibrozisin azaldığı görülmektedir.

PRLR sinyalizasyonu tuz-su düzenlemesi ve çoğalma gibi fizyolojik süreçlerin yanında çeşitli kanserler ile de ilişkilendirilmiştir. Zebra balığı embriyolarında OTA maruziyetine (0.5 μ M, 72 saat) bağlı olarak PRLR (uzun forma karşılık gelmekte olan) seviyesinde bir düşüş olduğu ve bu azalmanın doku hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak memeli sistemlerde buna benzer bir çalışma yapılmamış olup, memeli sistemlerde OTA'nın PRLR ifadesini mRNA seviyesinde değiştirdiğini gösteren 4 transkriptomik çalışması (Kısım 2.3) bulunmaktadır. Bu transkriptomik çalışmaları tek başına OTA maruziyetindeki patolojilerde PRLR sinyalizasyonunun rolünü tartışmak için yeterli bilgi sunmamaktadır. Prolaktin reseptörünün sıçanda en az 2 adet tanımlanmış izoformu bulunmaktadır: Uzun ve kısa. Ayrıca tarafımızca E10Δ50-E11 formu tanımlanmıştır. Literatüre eklenen son 4 sıçan-OTA-transkriptomik çalışması (Bakınız Kısım 2.3) prolaktin reseptör geni ifadesinin OTA maruziyetine bağlı değiştiğini göstermekle beraber hangi prolaktin reseptörünün ifadesinin OTA'dan nasıl etkilendiğini ortaya koyamamıştır. Farklı form prolaktin reseptörleri sinyalizasyonu farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bundan dolayı çalışmanın ilk amacı hangi prolaktin reseptörünün ifadesinin OTA maruziyetinde değiştiğinin belirlenmesi olmuştur. Bu amaç doğrultusunda çalışmalar gerçekleştirilmiş olup WB-F344 hücre hattında kısa form prolaktin reseptörü seviyesinin

OTA maruziyeti ile azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca OTA maruziyetinde zamana bağlı olarak AKT ve ERK fosforilasyonunun arttığı belirlenmiştir.

Kısım 2.3’de söz edildiği gibi çeşitli transkriptomik çalışmaları OTA maruziyeti ile *prlr* geni ifadesinin değiştiğini bildirmekle beraber hangi formun ifadesinin OTA’dan etkilendiğini söyleyememektedir. Kısım 2.3’de verilen transkriptomik çalışmalarına ek olarak 2021-2022 yıllarında yeni bir OTA transkriptomik çalışması gerçekleştirilmiş olup ilgili makalelerde prolaktin reseptör geni ile ilgili bir veri sunulmamış ve çıkarım yapmamışlardır (Bondy vd. 2021, Carter vd. 2022). Ancak bu grupların çalışmasının ham dizileme verileri halka açık bir şekilde PRJNA824493 numarası ile SRA veri bankasına yüklenmiştir. Böylece dizileme dosyası üzerinden OTA’ya bağlı PRLR formlarının ifadelerinin değişimini Kısım 3.2.3’de verildiği şekilde değerlendirme şansı doğmuştur. Bondy ve grubu (2021) tarafından, Fisher (F344) sıçanların yemleri OTA ile kontamine edilerek (0, 0.026, 0.064, 0.16, 0.4, ve 1.0 mg/kg), bu hayvanların (F0 nesli) ve yavrularının (F1 nesli) OTA’ya 90 güne kadar maruziyeti sağlanmıştır. Hayvanların maruz kaldığı en yüksek OTA dozunu (1.0 mg/kg OTA ile kontamine yeni yiyen hayvanlarda) 52.0-79.6 µg/kg v. a./g olarak hesaplamıştır. Sıçanların yemleri tüketmesi ile aldıkları hesaplanan OTA dozlarının çoğu daha önceki OTA transkriptomik çalışmalarında gavaj yolu ile sıçanlara uygulanan dozlardan (210-70 µg/kg v. a./g.) çok daha düşüktür (Qi vd. 2014; Stemmer vd. 2007). Body vd. (2021) tarafından başlatılan deney sonlandırıldıktan sonra Carter vd. (2022) tarafından böbrek transkriptomik çalışması yapıp ham dizileme verileri SRA veri bankasına yüklenmiştir. Ham dizileme dosyaları incelendiğinde erkek ve dişi sıçan böbreğinde kısa form prolaktin reseptörünün baskın olduğu, uzun form ve E10Δ50-E11 formunun çok düşük düzeyde olduğu görülmüştür. OTA’ya maruz kalmayan erkek sıçanların OTA’ya maruz kalmayan dişi sıçanlardan 40 kata kadar daha fazla prolaktin reseptör fragmentine sahip olduğu belirlenmiştir. F1 erkek sıçanların 0.4 mg/kg konsantrasyonunda OTA içeren yem ile beslenmesi durumunda kısa form PRLR ifadesi kontrole göre anlamlı bir şekilde artıyorken, F1 dişi sıçanda istatistiksel artış 1.0 mg/kg OTA gruplarında gözlemlenmektedir. Ancak yavru erkek sıçan 1.0 mg/kg OTA uygulaması kısa form PRLR temsil eden fragment sayısını kontrol grubunun altına düşürmekle beraber bu düşüş istatistiksel olarak önemli değildir. PRJNA824493 veri setinin kaynağı olan sıçanlar, Pastor vd. (2021) çalışmasında kullanılandan daha düşük dozda OTA’ya maruz kalmış olup, prolaktin reseptör ifadesi iki çalışmada da erkek sıçanlarda dişi sıçanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Erkek sıçanlarda OTA’nın patolojik etkilerinin dişilere göre daha şiddetli olduğu bilinmektedir (NTP 1989). Erkek sıçanların, dişi sıçanlara göre OTA’ya maruziyetine karşı daha hassas olmalarına sebep olan faktörlerden biri kısa form prolaktin reseptör ifadelerinin dişi ile kıyaslandığında çok yüksek düzeyde olması olabilir. Bu *in vivo* transkriptomik çalışmasındaki değişim düşük dozlarda gözlenen değişimdir yüksek doz OTA maruziyetinde ne olacağına dair ip ucu vermemektedir. Karaciğer hücre hattı ve böbrek OTA maruziyetine farklı yanıt verebilir.

5.1. miR-141 OTA Maruziyetinde Prolaktin Reseptör mRNA İfadesini Değiştiren Faktörlerden Biri Olabilir

WB-F344 hücre hattına OTA uygulamasının kısa form prolaktin reseptör protein düzeyini düşürdüğü görülmüştür. OTA maruziyetine bağlı kısa form prolaktin reseptör

ifadesindeki değişimin sebeplerinden biri bu formu regüle eden moleküllerin miktarındaki değişim olabilir. OTA birçok miRNA'nın ifadesini değiştirmektedir ve bazı miRNA'lar OTA'nın zararlı etkilerini belirleyebilmektedir (Kısım 2.1.2, 2.1.3 ve 2.3'te örnekleri sunulmuştur). OTA maruziyetinin miR-141 ifadesinin de azalmasına neden olabildiği gösterilmiştir (Dai vd. 2014). miR-141'in (rno-miR-141-3p) ise miRDB [mikroRNA hedef tahmin veri bankası; (Chen ve Wang 2020)] tarafından kısa form prolaktin reseptörün 3'-UTR bölgesini hedef alması muhtemel miRNA'lardan biri olarak değerlendirildiği görülmüştür. Bu miRNA'nın hedef noktası kısa form prolaktin reseptör 3'-UTR'sinin dur kodondan sonraki 153-160. nükleotitleri arasında olan CAGTGTTA dizisi olarak görülmektedir (Şekil 5.1).

Çizelge 5.1. miR-141-3p miRDB'ye göre kısa form prolaktin reseptörünü hedef alan miRNA'lardan biri olabilir.

Olgun	rno-miR-141-3p	79-	GGTA-GAAATGGTCT-GTCACAAT	-58
KF-	3'-UTR	138. Nt	5'-...ATGACAAACGAGAT	CAGTGTTAAT... -3'

Dai vd. (2014) sıçanlara değişken doz ve sürelerde OTA uygulaması yapmış ve ifadesi değişen miRNA'ları belirlemiş ve OTA maruziyeti ile ifadesi değişen miRNA'lar arasında miR-141'in olduğunu saptamıştır. Erkek F344 sıçanlara (6-7 haftalık) gavaj yolu ile 0, 70 ya da 210 µg/kg v. a./g. konsantrasyonlarında OTA 2, 4, 13 ya da 26 hafta (haftada 5 gün) boyunca verilmiştir. Böbrek ağırlığı, 210 µg/kg v. a./g. OTA uygulaması ile 4-26 haftalarda önemli ölçüde azalmış, karaciğer ağırlığı ise 70 µg/kg v. a./g OTA uygulaması ile artıyorken 26. haftada 210 µg/kg v. a./g OTA uygulaması azalmıştır. Histopatolojik analiz sonucunda 26. haftaya göre şiddetli olmayan böbrek hasarı gözlemledikleri için, 13. hafta OTA'ya bağlı hasarın oluşmaya başladığı dönüm noktası olarak kabul edilmiş ve bundan dolayı 13 hafta OTA'ya maruz kalmış hayvanların böbrekleri miRNA profillemeye çalışması için kullanılmıştır. Bu çalışmada 70 µg/kg OTA uygulamasında miR-141'in ifadesini yaklaşık 5.6 kat azalttığı görülmüştür. Çalışmanın devamında 210 ve 70 µg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonda 4. 13 ve 26 haftaya ait böbrek dokusunda qPCR ile miR-141 ifadesi düzeyine bakılmıştır. Ancak qRT-PCR 13. haftada azalan miR-141 ifadesini anlamlı bulmamıştır. Sıçanlara 210 µg/kg v. a./g OTA uygulamasında 4 hafta ve 26 hafta maruziyette miR-141 ifadesini arttırdığı görülmüştür. Bu miRNA'nın azalması kısa form prolaktin reseptör ifadesinin artmasına, bu miRNA'nın artması ise kısa form prolaktin reseptör ifadesinin azalmasının sebeplerinden olabilir.

rno-miR-141-3p'nin prolaktin reseptörünü kesin bir şekilde inhibe ettiğini gösteren bir deneysel çalışmaya rastlanamamış olmakla beraber, WB-F344 hücre hattında OTA maruziyeti ile kısa form PRLR ifadesinin azaldığını görmüş olmamız birlikte değerlendirildiğinde; miR-141 ve prolaktin reseptörünün birlikte bulunduğu bir mekanizma önerilmesinin önünü açmıştır. miR-141 ifadesinin artmasına sebep olan

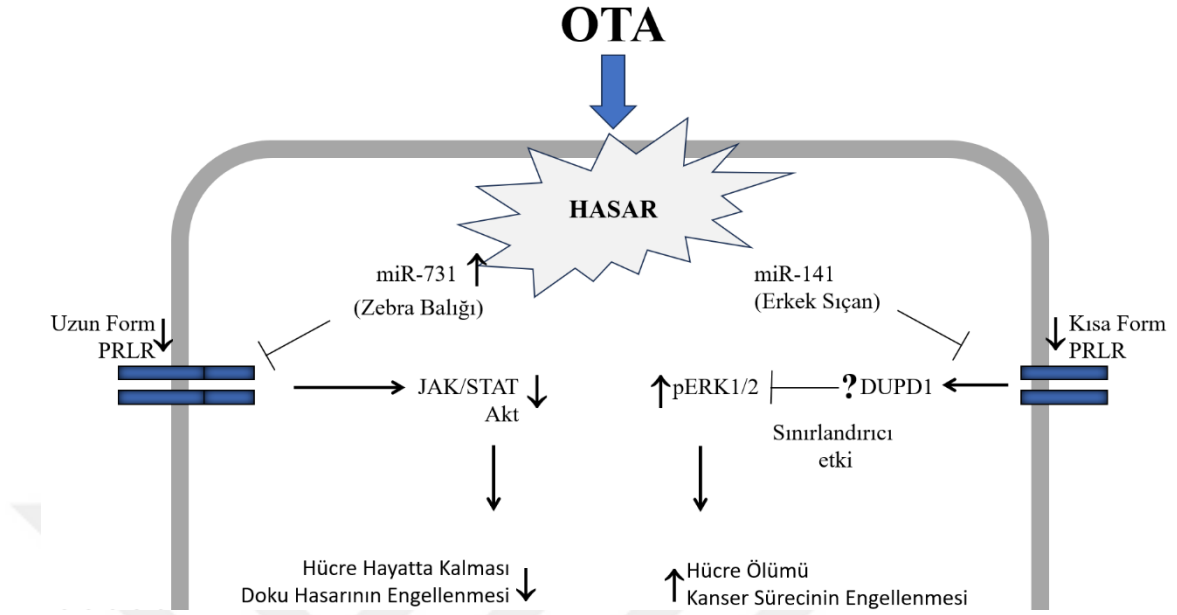
dozda OTA maruziyeti, OTA'ya bağlı kısa form PRLR miktarındaki düşüşe neden oluyor olabilir (Şekil 5.1). Kısa form PRLR miktarındaki düşüş ile de DUPD1 gibi kısa form PRLR aktivasyonu gerçekleşen fosfatazların aktivitesi düşüp ERK fosforilasyonu üzerindeki sınırlandırıcı faktörlerden birini ortadan kaldırıyor olabilir.

5.2. OTA Sinyal İletim Homeostazını Bozmaktadır

WB-F344 hücre hattında OTA uygulamasının ERK fosforilasyonunu arttırmakta olduğu ve GJIC (Gap junctional intercellular communication) inhibisyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Horvath vd. 2002). Tarafımızca gerçekleştirilen çalışmada ise ERK fosforilasyonu yanında AKT fosforilasyonunun da OTA maruziyetine bağlı olarak arttığı ve 24 saatlik OTA maruziyetinin ~40 kDa kısa form prolaktin reseptör düzeyini azalttığı görülmüştür.

Zebra balığı embriyo böbreğinde (pronefröz) OTA maruziyetinin miR-731 aracılığı ile uzun form prolaktin reseptör ifadesinin düşmesi ve bununla ilişkili olarak kontrol gruplarında var olan JAK/STAT ve AKT aktivasyon kaybına sebep olarak doku hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (Wu vd. 2016). Bu çalışma uzun form prolaktin reseptörü ve bir patolojik durumun ilişkilendirildiği ilk çalışma olmuştur. Zebra balığı çalışmasında uzun form prolaktin reseptör ilişkili yolağın aktivasyonunun hasarı engellemek için önemli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte diğer bir çalışmada böbrek hücrelerinde OTA maruziyeti ile artan AKT aktivasyonunun HGFR aracılığı ile olduğu ve bu durumun hücre hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir (Özcan vd. 2015).

WB-F344 hücrelerinde yapılan deneylerimiz ise 24 saat OTA maruziyetinin kısa form prolaktin reseptör ifadesini azalttığını göstermiştir. OTA maruziyetine bağlı olarak ifadesi değişen miR-141'in (Dai vd. 2014) kısa form prolaktin reseptörünün OTA'ya bağlı değişmesinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Kısım 5.2). Kısa form prolaktin reseptörü ERK1/2 aktivasyonunu değiştirebilmektedir. Kısa form prolaktin reseptörü ERK1/2'yi DUPD1 aracılığı ile defosforile edebilmektedir (Devi vd. 2011). OTA maruziyetinde ERK1/2 aktivasyonundaki artışın böbrek hücrelerinin ölümüne sebep olduğu (Özcan vd. 2015) gösterilmiş olup bu yolağı hasar alan hücrelerin çoğalmasına engel olup kanserleşmenin önüne geçen bir yol olarak görmek mümkündür. OTA maruziyetinde prolaktin reseptör kısa formu ifadesi ERK1/2 aktivasyonunu sınırlandıran bir faktör olarak görev alıyor ve dolayısı ile hücre ölümünü bir noktaya kadar sınırlandırıyor olabilir. Bununla birlikte OTA maruziyetinde gözlemlediğimiz kısa form prolaktin reseptör ifadesindeki düşüş, ERK fosforilasyonu üzerindeki bir sınırlandırıcıyı kaldırıp hücre ölümünü artırarak doku hasarının artmasına katkı sağlıyor olabilir.



Şekil 5.1. OTA maruziyetinin prolaktin reseptör sinyalizasyonu üzerindeki olası etki mekanizması. Prolaktin reseptör formları OTA'nın patolojik mekanizmasında farklı roller üstlenmektedir. Uzun form sinyalizasyonu hücre hayatta kalmasını destekleyecek bir rol üstleniyor ancak OTA maruziyetine bağlı ifadesi artan miR-731 aracılığı ile baskılanıyor dolayısı ile doku hasarı oluşuyor gibi görünmektedir. Kısa form prolaktin reseptörünün ise aktivasyonu hücrenin ölümüne sebep olarak olası bir kanser sürecini engelleyen p-ERK aktivitesi üzerinde sınırlandırıcı bir rol üstleniyor olabilir. WB-F344 hücre hattında OTA maruziyeti ile kısa form PRLR protein düzeyi azalmaktadır. OTA maruziyetinde miR-141 kısa form prolaktin reseptörünün ifadesini düzenleyen faktörlerden biri olabilir. miR-141 ifadesinin yükselmesine sebep olan OTA konsantrasyonları, kısa form PRLR ifadesini düşürerek hücre ölümünü arttıran faktörlerden biri olabilir.

5.3. İleri Çalışmalarda Kullanılacak Model Sistemler Üzerine Çıkarımlar

Hücre hatları, kaynaktan izole edildikten sonra kültür koşullarında farklı özellikler gösterebilmektedir. Özellikle bu hatlarda bir hormon reseptörü üzerine araştırma yapılırken dikkat edilmesi gereken özel çalışma koşulları olabilmektedir. Çalışma koşulları elde edilen sonuçları değiştirebileceğinden deney sistemi kurulurken bu koşullar net bir şekilde belirlenmelidir.

Prolaktin reseptör ifadesi yüksek olan [T47D, BT-483 ve HCT116 hücre hattı gibi (Neradugomma vd. 2013; Rasmussen vd. 2010)] hücre hatları ya da uzun form prolaktin reseptör (S349A mutanti ya da yabanıl tip) ve/veya kısa form prolaktin reseptör ile transfekte edilmiş hücreler model olarak tercih edilmelidir. İçsel olarak PRLR ifadesi yüksek bir hücre hattı seçildi ise Yonezawa vd. (2015) çalışmasında yapıldığı gibi PRLR'nin SMO (splayz modüle edici oligomer) aracılığı ile inhibisyonu çalışmaya dahil edilmelidir. Böbrek, karaciğer, immün sistem hücreleri ya da meme hücreleri prolaktin reseptörünün OTA maruziyetindeki fonksiyonunu tartışmak için uygun olacaktır.

Besiyeri seçimi gelecek çalışmalarda dikkate alınması gereken bir faktördür. Besiyeri FBS içeriği farklı firmalarda hatta farklı lot numarasına sahip ürünlerinde bile farklılık gösterebilmektedir. Albümin (10.1-27.5 mg/ml), testosteron (0.32-0.80 ng/ml), östrojen (~0.02-0.38 ng/ml) ve prolaktin hormonu (1.5-136 ng/ml) konsantrasyonu değişkenlerin başında gelmektedir (Cao vd. 2009; Honn vd. 1975; Milo vd. 1976). Serumlarda farklılık gösteren değişkenler (özellikle hormonlar) prolaktin reseptör ifade düzeyini, sinyalizasyon yolağının aktivasyon düzeyini, aktivasyon süresini (Rasmussen vd. 2010) ve internalizasyonunu değiştirebilmekte olduğundan prolaktin reseptör OTA ilişkisi çalışmasında önemli bir husus oluşturmaktadır. Düşük prolaktin seviyesi, sinyalizasyon için yeterli olmamakla beraber, fazla olması da prolaktin sinyalizasyonunu sekteye uğratmaktadır (Djiane vd. 1982). Hormonlardan arındırılmış FBS kullanımı ya da tamamen FBS'den arındırılmış besi ortamında çoğalma özelliği olan hücre hatlarının kullanımı değişkenleri azaltma yolu olarak kullanılabilir. Ancak bu durumda dışarıdan besi ortamına prolaktin hormonu (literatürde 100-300 ng/ml arasında PRL uygulamalara rastlanmaktadır) ile beraber testosteron ya da östrojen eklenmesi gerekecektir.

Uzun form prolaktin reseptör sinyalizasyonu ve kısa prolaktin reseptör protein düzeyi OTA maruziyetinde azalmaktadır (WB-F344 hücre hattında). OTA maruziyetinde JAK/STAT aktivasyonunun azalmasının doku hasarına yol açtığı gösterilmiş olup (Wu vd. 2016), kısa formun ifadesinin artmasının fizyolojik önemi aydınlatan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tarafımızca kısa form prolaktin reseptörünün belirli bir noktaya kadar ERK aktivasyonunu sınırlandırdığı düşünülmektedir. Dolayısı ile gelecek çalışmalarda PRLR ifadesi olmayan hücre hattı kısa form PRLR ile transfekte edilmeli ve OTA maruziyetine bağlı, hücre ölümü, fibrozis ve oksidatif stres gibi süreçlerin belirteçleri PRLR içermeyen hücrelerle kıyaslanmalı ve ayrıca ilgili sinyalizasyon yolu elemanlarının (ERK, AKT gibi) aktivasyonu araştırılmalıdır.

6. SONUÇLAR

Tez çalışması öncesi bildirilen transkriptomik çalışmaları OTA maruziyeti ile *prlr* geni ifadesinde değişim olduğunu bildirmiş ancak en az iki formu bulunan prolaktin reseptörünün hangi formunun ifadesinde değişim olduğunu söyleyememiştir. Prolaktin reseptörü geniş çapta fonksiyon ve çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmiş olup bu fizyolojik görevler ya da patolojik süreçlerde prolaktin reseptör formlarının önemi bulunmaktadır. Prolaktin reseptör sinyalizasyonu geniş çapta süreç ve çeşitli patolojiler ile ilişkilendirildiğinden OTA maruziyeti ile prolaktin reseptör geninin ifadesinin değişmesi prolaktin reseptörünü çalışmaya değer kılmıştır. Bu nedenle çalışmada OTA maruziyeti ile prolaktin reseptör ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

WB-F344 hücre hattı canlılığı üzerinde OTA'nın istatistiksel olarak anlamlı fark yaratan en düşük konsantrasyonunun 10 μ M olduğu tespit edilmiş ve WB-F344 hücreleri 24 saate kadar OTA'ya maruz bırakılmıştır. WB-F344 hücre hattında OTA uygulamasının AKT ve ERK fosforilasyon düzeyini zamana bağlı arttırdığı tespit edilmiş olup 24 saatlik 10 μ M OTA maruziyetinin ~40 kDa kısa form prolaktin reseptör ifadesini düşürdüğü görülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda AKT'nin OTA maruziyetinde hücre hayatta kalması ve ERK'nın hücre ölümü ile ilişkili olduğu görülmüş olup tarafımızca kısa form prolaktin reseptörünün ERK aktivitesini sınırlayıcı bir rolü olabileceği düşünülmüştür. Kısa form ifadesindeki düşüş hücrenin OTA'ya bağlı ölümünü, kısa form ifadesindeki artış hücrenin OTA maruziyetinde hayatta kalmasını destekleyen faktörlerden biri olabilir.

Kısa form prolaktin reseptör mRNA ifadesinin değişmesi OTA'nın neden olduğu hasar ile tetiklenen bir dizi regülatör elementin (miRNA ve transkripsiyon faktörleri) daha yüksek veya daha az aktivite göstermesi ile oluşuyor olabilir. Prolaktin reseptörleri ifadesinin değişmesi transkripsiyon ve translasyon aşamalarında olabileceği gibi, prolaktin reseptör internalizasyon ve ubiquitinasyon süreçleri ile ilişkili süreçlerin OTA aracılığı ile oluşan hasarla sekteye uğramasından kaynaklanıyor olabilir. İleri çalışmalar, farklı hücre hatlarını farklı prolaktin reseptör formları transfekte edip, ilişkili sinyal yolları için inhibitör sistemler kullanılarak gerçekleştirilmeli ve bu yolların hücre hayatta kalma-ölüm durumuna etkisini araştırmalıdır. Çalışmaların devamında prolaktin reseptör yıkım süreçlerindeki moleküllerin ve prolaktin reseptör ifadesini değiştiren miRNA'ların OTA maruziyeti ile değişen aktiviteleri araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Akpınar, H. A., Kahraman, H., & Yaman, I. 2019. Ochratoxin A sequentially activates autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Toxins*, 11 (11): 615.
- Ali, S., & Ali, S. 2000. Recruitment of the protein-tyrosine phosphatase SHP-2 to the C-terminal tyrosine of the prolactin receptor and to the adaptor protein Gab2. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (50): 39073-39080.
- Anonymous 1: The National Library of Medicine (NIH) Almanac. <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-library-medicine-nlm> [Son Erişim Tarihi 10.01.2024].
- Arici, M., Gümüş, T., & Kara, F. 2004. The fate of ochratoxin A during the Pekmez production from mouldy grapes. *Food control*, 15 (8): 597-600.
- Atroshi, F., Biese, I., Saloniemi, H., Ali-Vehmas, T., Saari, S., Rizzo, A., & Veijalainen, P. 2000. Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J. Pharm. Pharm. Sci*, 3 (281): e291.
- Berlanga, J. J., Garcia-Ruiz, J. P., Perrot-Applanat, M., Kelly, P. A., & Edery, M. 1997. The short form of the prolactin (PRL) receptor silences PRL induction of the β -casein gene promoter. *Molecular Endocrinology*, 11 (10): 1449-1457.
- Bondy, G., Curran, I., Coady, L., Armstrong, C., Bourque, C., Bugiel, S., . . . Maurice, C. 2021. A one-generation reproductive toxicity study of the mycotoxin ochratoxin A in Fischer rats. *Food and Chemical Toxicology*, 153: 112247.
- Boot, L., Muhlbock, O., & Ropcke, G. (1962). *Prolactin and the induction of mammary tumors in mice*. Paper presented at the General and Comparative Endocrinology.
- Boutin, J.-M., Jolicoeur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shirota, M., . . . Kelly, P. A. 1988. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*, 53 (1): 69-77.
- Brockman, J. L., Schroeder, M. D., & Schuler, L. A. 2002. PRL activates the cyclin D1 promoter via the Jak2/Stat pathway. *Molecular Endocrinology*, 16 (4): 774-784.
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International journal of food microbiology*, 119 (1-2): 140-146.
- Buteau, H. I. n., Pezet, A., Ferrag, F., Perrot-Applanat, M., Kelly, P. A., & Edery, M. 1998. N-glycosylation of the prolactin receptor is not required for activation of gene transcription but is crucial for its cell surface targeting. *Molecular Endocrinology*, 12 (4): 544-555.
- Cao, Z., West, C., Norton-Wenzel, C. S., Rej, R., Davis, F. B., Davis, P. J., & Rej, R. 2009. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocrine research*, 34 (4): 101-108.

- Carter, L., Bugiel, S., Nunnikhoven, A., Verster, A., Bondy, G., & Curran, I. 2022. Genomic analysis of Fisher F344 rat kidneys from a reproductive study following dietary ochratoxin A exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 167: 113302.
- Chae, S. A., Pyo, M. C., Yoo, H. J., & Lee, K. W. 2022. Ochratoxin a induces hepatic fibrosis through TGF- β receptor I/Smad2/3 signaling pathway. *Environmental toxicology*, 37 (8): 2084-2095.
- Chang, W.-P., Ye, Y., & Clevenger, C. V. 1998. Stoichiometric structure-function analysis of the prolactin receptor signaling domain by receptor chimeras. *Molecular and cellular biology*, 18 (2): 896-905.
- Chen, K.-H. E., & Walker, A. M. 2016. Prolactin inhibits a major tumor-suppressive function of wild type BRCA1. *Cancer Letters*, 375 (2): 293-302.
- Chen, Y., & Wang, X. 2020. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research*, 48 (D1): D127-D131.
- Clevenger, C. V., Furth, P. A., Hankinson, S. E., & Schuler, L. A. 2003. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine reviews*, 24 (1): 1-27.
- Clevenger, C. V., & Kline, J. B. 2001. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus*, 10 (10): 706-718. doi:doi:10.1191/096120301717164949
- Dai, J., Wright, M. W., & Manderville, R. A. 2003. Ochratoxin A forms a carbon-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct: implications for C8 reactivity by a phenolic radical. *Journal of the American Chemical Society*, 125 (13): 3716-3717.
- Damiano, S., Longobardi, C., Andretta, E., Prisco, F., Piegari, G., Squillacioti, C., . . . Florio, S. 2021. Antioxidative effects of curcumin on the hepatotoxicity induced by ochratoxin a in rats. *Antioxidants*, 10 (1): 125.
- Darbuka, E., Gürkaşlar, C., & Yaman, I. 2021. Ochratoxin A induces ERK1/2 phosphorylation-dependent apoptosis through NF- κ B/ERK axis in human proximal tubule HK-2 cell line. *Toxicon*, 199: 79-86.
- Darnell Jr, J. E., Kerr, I. M., & Stark, G. R. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264 (5164): 1415-1421.
- Das, R., & Vonderhaar, B. K. 1995. Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Molecular Endocrinology*, 9 (12): 1750-1759.
- de Dios, N., Orrillo, S., Irizarri, M., Theas, M. S., Boutillon, F., Candolfi, M., . . . Ferraris, J. 2019. JAK2/STAT5 pathway mediates prolactin-induced apoptosis of lactotropes. *Neuroendocrinology*, 108 (2): 84-97.
- Delatour, T., Mally, A., Richoz, J., Özden, S., Dekant, W., Ihmels, H., . . . Schilter, B. 2008. Absence of 2'-deoxyguanosine-carbon 8-bound ochratoxin A adduct in rat

- kidney DNA monitored by isotope dilution LC-MS/MS. *Molecular nutrition & food research*, 52 (4): 472-482.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., . . . Lescot, M. 2008. Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36 (suppl_2): W465-W469.
- Devi, Y. S., Seibold, A. M., Shehu, A., Maizels, E., Halperin, J., Le, J., . . . Gibori, G. 2011. Inhibition of MAPK by prolactin signaling through the short form of its receptor in the ovary and decidua: involvement of a novel phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (9): 7609-7618.
- Djiane, J., Houdebine, L.-M., & Kelly, P. A. 1982. Correlation between prolactin-receptor interaction, down-regulation of receptors, and stimulation of casein and deoxyribonucleic acid biosynthesis in rabbit mammary gland explants. *Endocrinology*, 110 (3): 791-795.
- Dominguez-Caceres, M. A., Garcia-Martinez, J. M., Calcabrini, A., Gonzalez, L., Porque, P. G., Leon, J., & Martin-Perez, J. 2004. Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene*, 23 (44): 7378-7390.
- Dong, J., Tsai-Morris, C.-H., & Dufau, M. L. 2006. A novel estradiol/estrogen receptor α -dependent transcriptional mechanism controls expression of the human prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (27): 18825-18836.
- Endo, T., Sasaki, A., Minoguchi, M., Joo, A., & Yoshimura, A. 2003. CIS1 interacts with the Y532 of the prolactin receptor and suppresses prolactin-dependent STAT5 activation. *The Journal of Biochemistry*, 133 (1): 109-113.
- Erwin, R. A., Kirken, R. A., Malabarba, M. G., Farrar, W., & Rui, H. 1995. Prolactin activates Ras via signaling proteins SHC, growth factor receptor bound 2, and son of sevenless. *Endocrinology*, 136 (8): 3512-3518.
- Faucet, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Dai, J., Castegnaro, M., & Manderville, R. A. 2004. Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chemical Research in Toxicology*, 17 (9): 1289-1296.
- Feili, X., Wu, S., Ye, W., Tu, J., & Lou, L. 2018. MicroRNA-34a-5p inhibits liver fibrosis by regulating TGF- β 1/Smad3 pathway in hepatic stellate cells. *Cell biology international*, 42 (10): 1370-1376.
- Gan, F., Hou, L., Zhou, Y., Liu, Y., Huang, D., Chen, X., & Huang, K. 2017. Effects of ochratoxin A on ER stress, MAPK signaling pathway and autophagy of kidney and spleen in pigs. *Environmental toxicology*, 32 (10): 2277-2286.
- Golubovskaya, V. M., Presnell, S. C., Hooth, M. J., Smith, G. J., & Kaufmann, W. K. 1997. Expression of telomerase in normal and malignant rat hepatic epithelia. *Oncogene*, 15 (10): 1233-1240.

- Gubbay, O., Critchley, H., Bowen, J., King, A., & Jabbour, H. 2002. Prolactin induces ERK phosphorylation in epithelial and CD56+ natural killer cells of the human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87 (5): 2329-2335.
- Gürbay, A., Girgin, G., Sabuncuoğlu, S. A., Şahin, G., Yurdakök, M., Yiğit, Ş., & Tekinalp, G. 2010. Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey? *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 30 (4): 329-333.
- Hagelberg, S., Hult, K., & Fuchs, R. 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, 9 (2): 91-96.
- Hallén, I. P., Breitholtz-Emanuelsson, A., Hult, K., Olsen, M., & Oskarsson, A. 1998. Placental and lactational transfer of ochratoxin A in rats. *Natural toxins*, 6 (1): 43-49.
- Han, Z., Zhao, Z., Shi, J., Liao, Y., Zhao, Z., Zhang, D., . . . Wu, A. 2013. Combinatorial approach of LC-MS/MS and LC-TOF-MS for uncovering in vivo kinetics and biotransformation of ochratoxin A in rat. *Journal of Chromatography B*, 925: 46-53.
- Hassan, A. M., Sheashaa, H. A., Fattah, M. F. A., Ibrahim, A. Z., Gaber, O. A., & Sobh, M. A. 2006. Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. *Pediatric nephrology*, 21: 102-105.
- Honn, K. V., Singley, J. A., & Chavin, W. 1975. Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 149 (2): 344-347.
- Horvath, A., Upham, B. L., Ganey, V., & Trosko, J. E. 2002. Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicol*, 40 (3): 273-282.
- Hu, Z.-Z., & Dufau, M. L. 1991. Multiple and differential regulation of ovarian prolactin receptor messenger RNAs and their expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 181 (1): 219-225.
- Hu, Z.-Z., Zhuang, L., Meng, J., Leondires, M., & Dufau, M. L. 1999. The Human Prolactin Receptor Gene Structure and Alternative Promoter Utilization: The Generic Promoter hPII and a Novel Human Promoter hPN. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (3): 1153-1156.
- Hu, Z., Zhuang, L., & Dufau, M. L. 1996. Multiple and Tissue-specific Promoter Control of Gonadal and Non-gonadal Prolactin Receptor Gene Expression (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271 (17): 10242-10246.

- Huang, K., Ueda, E., Chen, Y., & Walker, A. M. 2008. Paradigm-shifters: phosphorylated prolactin and short prolactin receptors. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 13: 69-79.
- Hwang, D.-B., Won, D.-H., Shin, Y.-S., Kim, S.-Y., Kang, B.-C., Lim, K.-M., . . . Yun, J.-W. 2020. Ccrn4l as a pre-dose marker for prediction of cisplatin-induced hepatotoxicity susceptibility. *Free Radical Biology and Medicine*, 148: 128-139.
- IARC. 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 56.
- Ibrahim, A. S., Zaghloul, H., & Badria, F. A. 2013. Case report evidence of relationships between hepatocellular carcinoma and ochratoxicosis. *Plos one*, 8 (8): e71423.
- Jantarajit, W., Thongon, N., Pandaranandaka, J., Teerapornpuntakit, J., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. 2007. Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293 (1): E372-E384.
- Jos' Berlanga, J., Gualillo, O., Applanat, M., Kelly, P. A., & Edery, M. 1997. Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (4): 2050-2052.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., . . . Potapenko, A. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596 (7873): 583-589.
- Kamp, H. G., Eisenbrand, G., Janzowski, C., Kiossev, J., Latendresse, J. R., Schlatter, J., & Turesky, R. J. 2005. Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Molecular nutrition & food research*, 49 (12): 1160-1167.
- Kline, J. B., Moore, D. J., & Clevenger, C. V. 2001. Activation and association of the Tec tyrosine kinase with the human prolactin receptor: mapping of a Tec/Vav1-receptor binding site. *Molecular Endocrinology*, 15 (5): 832-841.
- Kosicki, R., Buharowska-Donten, J., & Twarużek, M. 2021. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. *Toxicon*, 200: 183-188.
- Kriegel, A. J., Fang, Y., Liu, Y., Tian, Z., Mladinov, D., Matus, I. R., . . . Liang, M. 2010. MicroRNA-target pairs in human renal epithelial cells treated with transforming growth factor β 1: a novel role of miR-382. *Nucleic acids research*, 38 (22): 8338-8347.
- Kumar, R., Ansari, K. M., Chaudhari, B. P., Dhawan, A., Dwivedi, P. D., Jain, S. K., & Das, M. 2012. Topical application of ochratoxin A causes DNA damage and tumor initiation in mouse skin.

- Lavoie, H., Gagnon, J., & Therrien, M. 2020. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21 (10): 607-632.
- Lee, J.-Y., Lim, W., Ryu, S., Kim, J., & Song, G. 2019. Ochratoxin A mediates cytotoxicity through the MAPK signaling pathway and alters intracellular homeostasis in bovine mammary epithelial cells. *Environmental Pollution*, 246: 366-373.
- Li, Y., Kumar, K. S., Tang, W., Spiegelman, V. S., & Fuchs, S. Y. 2004. Negative regulation of prolactin receptor stability and signaling mediated by SCF β -TrCP E3 ubiquitin ligase. *Molecular and cellular biology*.
- Loboda, A., Sobczak, M., Jozkowicz, A., & Dulak, J. 2016. TGF- β 1/Smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation. *Mediators of inflammation*, 2016.
- Loboda, A., Stachurska, A., Podkalicka, P., Sobczak, M., Mucha, O., Witalisz-Siepracka, A., . . . Dulak, J. 2017a. Effect of heme oxygenase-1 on ochratoxin A-induced nephrotoxicity in mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 84: 46-57.
- Loboda, A., Stachurska, A., Sobczak, M., Podkalicka, P., Mucha, O., Jozkowicz, A., & Dulak, J. 2017b. Nrf2 deficiency exacerbates ochratoxin A-induced toxicity in vitro and in vivo. *Toxicology*, 389: 42-52.
- Lu, J.-C., Piazza, T. M., & Schuler, L. A. 2005. Proteasomes mediate prolactin-induced receptor down-regulation and fragment generation in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (40): 33909-33916.
- Lu, J.-C., Scott, P., Strous, G. J., & Schuler, L. A. 2002. Multiple internalization motifs differentially used by prolactin receptor isoforms mediate similar endocytic pathways. *Molecular Endocrinology*, 16 (11): 2515-2527.
- Luo, J., Peng, S., Bai, W., Wu, Z., Shan, Z., Wu, Z., . . . Peng, J. 2019. Matrilin-2 prevents the TNF α -induced apoptosis of WB-F344 cells via suppressing JNK pathway. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66 (3): 309-315.
- Maik-Rachline, G., Hacohen-Lev-Ran, A., & Seger, R. 2019. Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (5): 1194.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. 2016. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8 (7): 191.
- Manderville, R. A. 2005. A case for the genotoxicity of ochratoxin A by bioactivation and covalent DNA adduction. *Chemical Research in Toxicology*, 18 (7): 1091-1097.
- Mantle, P. G., Faucet-Marquis, V., Manderville, R. A., Squillaci, B., & Pfohl-Leszkowicz, A. 2010. Structures of covalent adducts between DNA and ochratoxin A: a new factor in debate about genotoxicity and human risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*, 23 (1): 89-98.

- Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., Bezencon, C., Piguet, D., Mansourian, R., . . . Mantle, P. 2006. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. *Toxicological Sciences*, 89 (1): 120-134.
- Maulik, G., Kijima, T., Ma, P. C., Ghosh, S. K., Lin, J., Shapiro, G. I., . . . Salgia, R. 2002. Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clinical cancer research*, 8 (2): 620-627.
- Memiş, E. Y., & Yalçın, S. S. 2021. Human milk mycotoxin contamination: smoking exposure and breastfeeding problems. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 34 (1): 31-40.
- Milo, G. E., Malarkey, W. B., Powell, J. E., Blakeslee, J. R., & Yohn, D. S. 1976. Effects of steroid hormones in fetal bovine serum on plating and cloning of human cells in vitro. *In vitro*, 12: 23-30.
- Minervini, F., Giannoccaro, A., Nicassio, M., Panzarini, G., & Lacalandra, G. M. 2013. First evidence of placental transfer of ochratoxin A in horses. *Toxins*, 5 (1): 84-92.
- Neradugomma, N., Subramaniam, D., & Tawfik, O. 2013. Prolactin induces Notch signaling in a Jak2-STAT and Jak2-ERK pathways in colon cancer stem and progenitor cells. *Carcinogenesis*, 35: 795-806.
- Nojima, Y., Ito, K., Ono, H., Nakazato, T., Bono, H., Yokoyama, T., . . . Yamamoto, K. 2015. Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. *Plos one*, 10 (2): e0116007.
- NTP. 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N rats (gavage studies). *National Toxicology Program technical report series*, 358: 1-142.
- Ormandy, C. J. B., Nadine Hellico, Christine Kelly, Paul A. 1998. Mouse prolactin receptor gene: genomic organization reveals alternative promoter usage and generation of isoforms via alternative 3'-exon splicing. *DNA and cell biology*, 17 (9): 761-770.
- Özcan, Z., Gül, G., & Yaman, I. 2015. Ochratoxin A activates opposing c-MET/PI3K/Akt and MAPK/ERK 1-2 pathways in human proximal tubule HK-2 cells. *Archives of toxicology*, 89: 1313-1327.
- Palabiyik, S., Erkekoglu, P., Zeybek, N., Kızılgün, M., Sahin, G., & Giray, B. K. 2012. Ochratoxin A causes oxidative stress and cell death in rat liver. *World Mycotoxin Journal*, 5 (4): 377-384.
- Pardali, K., & Moustakas, A. 2007. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1775 (1): 21-62.

- Park, S., Lim, W., You, S., & Song, G. 2019. Ochratoxin A exerts neurotoxicity in human astrocytes through mitochondria-dependent apoptosis and intracellular calcium overload. *Toxicology Letters*, 313: 42-49.
- Pastor, L., Vettorazzi, A., Guruceaga, E., & López de Cerain, A. 2021. Time course of renal transcriptomics after subchronic exposure to Ochratoxin A in fisher rats. *Toxins*, 13 (3): 177.
- Pezet, A., Buteau, H., Kelly, P. A., & Edery, M. 1997. The last proline of Box 1 is essential for association with JAK2 and functional activation of the prolactin receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 129 (2): 199-208.
- Piazza, T. M., Lu, J.-C., Carver, K. C., & Schuler, L. A. 2009. SRC family kinases accelerate prolactin receptor internalization, modulating trafficking and signaling in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 23 (2): 202-212.
- Pierucci, F., Frati, A., Squecco, R., Lenci, E., Vicenti, C., Slavik, J., . . . Meacci, E. 2017. Non-dioxin-like organic toxicant PCB153 modulates sphingolipid metabolism in liver progenitor cells: its role in Cx43-formed gap junction impairment. *Archives of toxicology*, 91: 749-760.
- Pujianto, D. A., Curry, B. J., & Aitken, R. J. 2010. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation. *Endocrinology*, 151 (3): 1269-1279.
- Pyo, M. C., Chae, S. A., Yoo, H. J., & Lee, K.-W. 2020. Ochratoxin A induces epithelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis through TGF- β /Smad2/3 and Wnt1/ β -catenin signaling pathways in vitro and in vivo. *Archives of toxicology*, 94: 3329-3342.
- Qi, X., Yang, X., Chen, S., He, X., Dweep, H., Guo, M., . . . Gretz, N. 2014. Ochratoxin A induced early hepatotoxicity: new mechanistic insights from microRNA, mRNA and proteomic profiling studies. *Scientific Reports*, 4 (1): 5163.
- Rasmussen, L. M., Frederiksen, K. S., Din, N., Galsgaard, E., Christensen, L., Berchtold, M. W., & Panina, S. 2010. Prolactin and oestrogen synergistically regulate gene expression and proliferation of breast cancer cells. *Endocrine-related cancer*, 17 (3): 809-822.
- Raut, S., Khambata, K., Goffin, V., & Balasinor, N. 2023. Prolactin Regulates Testicular Gene Expression and Cell Cycle Processes Predominantly via JAK2/STAT5 Pathway in the Male Rat. *Endocrinology*, 164 (7): bqad072.
- Rhee, K. H., Yang, S. A., Pyo, M. C., Lim, J.-M., & Lee, K.-W. 2023. MiR-155-5p Elevated by Ochratoxin A Induces Intestinal Fibrosis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition through TGF- β Regulated Signaling Pathway In Vitro and In Vivo. *Toxins*, 15 (7): 473.

- Rozakis-Adcock, M., & Kelly, P. A. 1991. Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (25): 16472-16477.
- Rozakis-Adcock, M., & Kelly, P. A. 1992. Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (11): 7428-7433.
- Rui, H., Kirken, R. A., & Farrar, W. L. 1994. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (7): 5364-5368.
- Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Bourexis, D., Brister, J. R., Canese, K., . . . Klimke, W. 2021. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 49 (D1): D10.
- Sayers, E. W., O'Sullivan, C., & Karsch-Mizrachi, I. (2022). Using GenBank and SRA. In *Plant Bioinformatics: Methods and Protocols* (pp. 1-25): Springer.
- Shi, F., Steuer, A., Zhuang, J., & Kolb, J. F. 2018. Bioimpedance analysis of epithelial monolayers after exposure to nanosecond pulsed electric fields. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66 (7): 2010-2021.
- Shirota, M., Banville, D., Ali, S., Jolicoeur, C., Boutin, J.-M., Edery, M., . . . Kelly, P. A. 1990. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology*, 4 (8): 1136-1143.
- Smirnova, O. V., Ostroukhova, T. Y., & Bogorad, R. L. 2007. JAK-STAT pathway in carcinogenesis: is it relevant to cholangiocarcinoma progression. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13 (48): 6478.
- Sorin, B., Goupille, O., Vacher, A. M., Paly, J., Djiane, J., & Vacher, P. 1998. Distinct cytoplasmic regions of the prolactin receptor are required for prolactin-induced calcium entry. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (43): 28461-28469.
- Soto, J. B., Ruiz, M.-J., Manyes, L., & Juan-García, A. 2016. Blood, breast milk and urine: potential biomarkers of exposure and estimated daily intake of ochratoxin A: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33 (2): 313-328.
- Sproviero, M., Verwey, A. M., Witham, A. A., Manderville, R. A., Sharma, P., & Wetmore, S. D. 2015. Enhancing bulge stabilization through linear extension of C8-aryl-guanine adducts to promote polymerase blockage or strand realignment to produce a C: C mismatch. *Chemical Research in Toxicology*, 28 (8): 1647-1658.
- Stemmer, K., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ahr, H.-J., & Dietrich, D. R. 2007. Carcinogen-specific gene expression profiles in short-term treated Eker and wild-type rats indicative of pathways involved in renal tumorigenesis. *Cancer Research*, 67 (9): 4052-4068.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., & Dietrich, D. R. 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of toxicology*, 74: 499-510.

- Suzuki, S., Satoh, T., & Yamazaki, M. 1977. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 27 (5): 735-744.
- Swaminathan, G., Varghese, B., Thangavel, C., Carbone, C. J., Plotnikov, A., Kumar, K. S., . . . Deng, L. 2008. RAPID COMMUNICATION: Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. *Journal of Endocrinology*, 196 (2): R1.
- Tandon, M., Coudriet, G. M., Criscimanna, A., Socorro, M., Eliliwi, M., Singhi, A. D., . . . Zeh, H. 2019. Prolactin promotes fibrosis and pancreatic cancer progression. *Cancer Research*, 79 (20): 5316-5327.
- Tsai-Morris, C.-H., & Dufau, M. L. 2004. PRLR (prolactin receptor). *Atlas Genet cytogenet oncol haematol*, 8: 321-324.
- Tsao, M.-S., Smith, J. D., Nelson, K. G., & Grisham, J. W. 1984. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Experimental Cell Research*, 154 (1): 38-52.
- Turesky, R. J. 2005. Perspective: Ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*, 18 (7): 1082-1090.
- Valle-Algarra, F. M., Mateo, E. M., Medina, A., Mateo, F., Gimeno-Adelantado, J. V., & Jiménez, M. 2009. Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. *Food Additives and Contaminants*, 26 (6): 896-906.
- Van Coppenolle, F., Skryma, R., Ouadid-Ahidouch, H., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Delcourt, P., . . . Gourdou, I. 2004. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochemical Journal*, 377 (3): 569-578.
- Van der Merwe, K., Steyn, P., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205 (4976): 1112-1113.
- Var, I., Savaş, Ö. A., Sağlam, S., & Uçkun, O. 2018. Okratoksin A'nın Ekmekte Bulunma Miktarında Fermantasyon ve Pişirmenin Etkisi. *Gıda*, 43 (6): 1053-1060.
- Vara, J. A. F., Cáceres, M. A. D., Silva, A., & Martín-Pérez, J. 2001. Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, 12 (7): 2171-2183.
- Vara, J. Á. F., Carretero, M. V., Gerónimo, H., Ballmer-Hofer, K., & Martín-Pérez, J. 2000. Stimulation of c-Src by prolactin is independent of Jak2. *Biochemical Journal*, 345 (1): 17-24.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., . . . Laydon, A. 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the

- structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50 (D1): D439-D444.
- Varghese, B., Barriere, H., Carbone, C. J., Banerjee, A., Swaminathan, G., Plotnikov, A., . . . Lukacs, G. L. 2008. Polyubiquitination of prolactin receptor stimulates its internalization, postinternalization sorting, and degradation via the lysosomal pathway. *Molecular and cellular biology*, 28 (17): 5275-5287.
- Vettorazzi, A., de Trocóniz, I. F., González-Peñas, E., Arbillaga, L., Corcuera, L.-A., Gil, A. G., & de Cerain, A. L. 2011. Kidney and liver distribution of ochratoxin A in male and female F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (9): 1935-1942.
- Vincent, V., Goffin, V., Rozakis-Adcock, M., Mornon, J.-P., & Kelly, P. A. 1997. Identification of cytoplasmic motifs required for short prolactin receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (11): 7062-7068.
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., . . . Liu, Y. 2016. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*, 8 (3): 83.
- Welsch, C. W., & Nagasawa, H. 1977. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer Research*, 37 (4): 951-963.
- Wen, Y., Wang, Y., Chelariu-Raicu, A., Stur, E., Liu, Y., Corvigno, S., . . . Kang, Y. 2020. Blockade of the short Form of prolactin receptor induces FOXO3a/EIF-4EBP1-mediated cell death in uterine cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 19 (9): 1943-1954.
- Wu, T.-S., Lin, Y.-T., Huang, Y.-T., Yu, F.-Y., & Liu, B.-H. 2020. Ochratoxin A triggered intracerebral hemorrhage in embryonic zebrafish: Involvement of microRNA-731 and prolactin receptor. *Chemosphere*, 242: 125143.
- Wu, T.-S., Yang, J.-J., Wang, Y.-W., Yu, F.-Y., & Liu, B.-H. 2016. Mycotoxin ochratoxin A disrupts renal development via a miR-731/prolactin receptor axis in zebrafish. *Toxicology Research*, 5 (2): 519-529.
- Yang, S. A., Rhee, K. H., Yoo, H. J., Pyo, M. C., & Lee, K.-W. 2023. Ochratoxin A induces endoplasmic reticulum stress and fibrosis in the kidney via the HIF-1 α /miR-155-5p link. *Toxicology Reports*, 10: 133-145.
- Yeh, Y.-T., Lee, K.-T., Tsai, C.-J., Chen, Y.-J., & Wang, S.-N. 2012. Prolactin promotes hepatocellular carcinoma through Janus kinase 2. *World journal of surgery*, 36: 1128-1135.
- Yilmaz, B., & Kadioglu, Y. 2017. Determination of 17 β -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. *Arabian Journal of Chemistry*, 10: S1422-S1428.

- Yonezawa, T., Chen, K.-H. E., Ghosh, M. K., Rivera, L., Dill, R., Ma, L., . . . Walker, A. M. 2015. Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer. *Cancer Letters*, 366 (1): 84-92.
- Yu, T., & Rillema, J. 2000. Prolactin stimulation of tyrosyl phosphorylation of Shc proteins in Nb2 lymphoma cells, but not mammary tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1497 (1): 89-93.
- Zhang, H., Yan, A., Liu, X., Ma, Y., Zhao, F., Wang, M., . . . Wang, H. 2021. Melatonin ameliorates ochratoxin A induced liver inflammation, oxidative stress and mitophagy in mice involving in intestinal microbiota and restoring the intestinal barrier function. *Journal of Hazardous Materials*, 407: 124489.
- Zheng, J., Zhang, Y., Xu, W., Luo, Y., Hao, J., Shen, X. L., . . . Huang, K. 2013. Zinc protects HepG2 cells against the oxidative damage and DNA damage induced by ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268 (2): 123-131.

ÖZGEÇMİŞ

Mesut Cihan Aydemir

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2017-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2017	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2014	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Aydemir, M. C., Yılmaz, M., Kilic, M. A. 2024. Food safety risk: Ochratoxin A in Türkiye. *Food Bulletin*, 3(1): 1-8.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Aydemir, M. C. & Kılıç, M. A. 2019. New Long Form Prolactin Receptor Isoforms: E10Δ50 And Its Variants. 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul.

M. C. Aydemir & M. A. Kılıç, Sıçan Prolaktin Reseptör mRNA Çeşitliliğinin Belirlenmesi, Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017/ 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2017, Erzurum.

Aydemir, M. C., Özkaya, S., Kılıç, M. A. 2017. Novel Rat Prolactin Receptor Short Form 3'-UTR: Two 3' End Variants With A 6 Nucleotide Difference, 5th International Congress Of Molecular Biology Association Of Turkey, İstanbul.

Kılıç, M. A., & Aydemir, M. C., 2017. Expression Of Short Form Prolactin Receptor mRNA In Rat Organs And Identification Of Its 3' UTR, EMBO Conference: Protein Synthesis And Translational Control, Heidelberg, Almanya

Aydemir M. C., & Kılıç, M. A., 2016. Comparative Analysis Of Mammalian Prolactin Receptor Genes, 41st FEBS Congress, 2016, Aydın.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Esti, M., Aydemir, M. C. & Kılıç, M. A. 2017. Enzim Katkılı Bir Ürün Özelinde Mikrobiyal Kontaminasyon ve Sonuçları, Uluslararası Katılımlı 19. Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir.

Aydemir M. C. & Kılıç, M. A. 2015. Fungal Toksinler ve Gıda Güvenliği: Okratoksin A, I. Ulusal Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi, Antalya.