

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIK2 ‘NİN ADİPOSİT
FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

Hale HEBİP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2010

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIK2 ‘NİN ADİPOSİT
FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

Hale HEBİP

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

GEBZE

2010

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: SIK2’NİN ADIPOSIT FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜ.

YAZAR ADI : HALE HEBİP

Yağ ve karaciğer dokularında yağ ve glukoz sentezindeki negatif düzenleyici rolü dışında Tuz ile Uyarılabilen Kinaz 2 (SIK2) son zamanlarda tümör oluşumu, hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi farklı biyolojik olaylarla ilişkilendirilmiştir. 3T3-L1 öncül yağ hücreleri adiposit oluşumunun transkripsiyonel kontrolü açısından iyi karakterize edilmiş bir hücre hattını temsil eder. Farklılaşmanın başlangıcında 3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde SIK2 ifadesinin farklılaşmaya özgün erken cevap veren genler ile eş zamanlı indüklendiği ve *db/db* diyabetik farelerin beyaz yağ dokusunda miktar ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Adipojenik faktör yokluğunda yüzeyi tamamen kaplamış öncül yağ hücrelerinin bir SIK2 inhibitörü olan Staurosporin ile sadece birkaç saatlik muamelesi bile adipojenik karışıma (MDI) kıyasla çok daha hızlı ve etkin bir biçimde farklılaşmaya neden olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte SIK2’nin farklılaşmaya özgün birincil genlerle eşzamanlı ifadesinin hücresel farklılaşma ile fonksiyonel bir bağlantısının olup olmadığı halen bilinmemektedir.

İlk kez bu çalışmada SIK2 aktivitesinin Staurosporin ile baskılanması SIK2 mRNA düzeyinde farklılaşma uyarısını takiple oluşan 3 katlık artışı engellediği dolaylı olarak farklılaşmada %25’lik bir gerilemeye neden olduğu gösterilmiştir. Adipojenik olmayan, sadece Staurosporin içeren besi yerinde elde edilen 3T3-L1 öncül yağ hücrelerindeki farklılaşma oranlarındaki yaklaşık %50’lik azalma, farklılaşmaya negatif etki edebilen muhtemel bir kinaz tarafından veya PPAR γ bağımsız fakat Staurosporinin dolaylı olarak desteklediği bir CEBP β veya CEBP α artışı tarafından da sağlanabileceğini işaret etmektedir.

SUMMARY

THESIS TITLE: THE ROLE OF SIK2 IN ADIPOCYTE DIFFERENTIATION.

AUTHOR: HALE HEBIP

In addition to its anti lipogenic and gluconeogenic roles in the adipose and liver tissues respectively Salt inducible kinase (SIK2) has been recently implicated in various biological events including tumorigenesis, cellular proliferation and differentiation. 3T3-L1 preadipocytes represent a well characterized cell line for the transcriptional control of adipogenesis. It was shown that at the onset of 3T3-L1 preadipocyte differentiation SIK2 transcription was induced simultaneously with the early response genes of differentiation and its level and activity increased in the white adipose tissue of *db/db* diabetic mice.

It was demonstrated that in the absence of adipogenic factors confluent preadipocytes treated only a few hours with staurosporin a known SIK inhibitor is capable of potentiating faster and more robust differentiation compared to cells induced with adipogenic mix (MDI). However it is yet to be known if there is a functional relevance of SIK2's co-expression with early response genes and ensuing cellular differentiation. Results obtained from this study indicated that SIK2 may take part in the clonal expansion stage of early differentiation.

We showed for the first time that staurosporin mediated inhibition of SIK2 activity suppresses the three fold increase in SIK2 mRNA level observed immediately after adipogenic induction which is associated with %25 reduction in resulting differentiation. The %50 reduced differentiation rate of preadipocytes treated with none adipogenic medium with staurosporin only may suggest an involvement of a putative inhibitory kinase or a novel pathway independent of PPAR γ but dependent on enhanced CEBP β or CEBP α expression presumably supported by staurosporin in potentiating adipogenesis.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN'a,

Yüksek lisans eğitim sürecinin her aşamasında yanımda olan, bilgisi ile beni aydınlatan GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Fusun GÜMÜŞEL'e,

Tez çalışmam sırasında dostluk ve bilgilerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Sinem TUNÇER, Zeynep ÖZCAN, Pelin BALÇIK, Çiğdem ACIOĞLU, Tuğrul DORUK, Safa AYDIN, Serda KAYMAN, Irmak ŞAH, Özlem ASKER, Zeynep GİRGIN, Veysel SÜZERER'e,

İyi kötü her anımda yanımda olan kadim dostlarım Aynur CAN, Gülmüne DÜNDAR, Öznur TÜMER, Ayşe GÜNEŞ, Selçuk SABRİ, Taşkın BUDAK'a,

Beni dünyaya getiren biricik anne ve babam Emine KIRILMAZ ve Orhan HEBİP, büyük annem Esmâ KESKİN, babam Bilal KIRILMAZ, kardeşim Çağrı KIRILMAZ, teyzem Hülya NEMLİ, amcam Ayhan HEBİP'e,

Ve tez yazarken ayakta durmamı sağlayıp beni her dakika neşelendiren Kızım HEBİP'e teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
GİRİŞ	1
1.1 Adipoz Doku	1
1.1.1. Adipoz Dokudan Salınan Sitokinler	2
1.1.2. Adipoz Dokunun İnsülin direnci, Obezite ve Tip II Diyabet ile ilişkisi	3
1.2. Adipoz Dokudaki İnflamatuvar Durumun Oluşum Süreci	4
1.2.1 TNF α (Tümör-nekroz faktör- α)	4
1.2.2 İnsülin Reseptör Substrat (IRS) proteinler	5
1.3 Protein Kinazlar	6
1.3.1 AMP ile aktive olan protein kinazlar (AMPK)	7
1.3.2 SIK Ailesi	8
1.3.3 SIK2	8
1.4 Adiposit Farklılaşması	10
1.4.1 Adiposit Farklılaşmasında Kullanılan <i>in vitro</i> Modeller	11
1.4.2 3T3-L1 Hücre Hattı	12

1.4.3 3T3-L1 Öncül Adipositlerin Olgun Adipositlere Farklılaşma Süresi	13
1.4.4 Adiposit Farklılaşmasındaki Transkripsiyon Faktörleri	13
1.4.4.1 PPAR γ	15
1.4.4.2 C/EBP (CCAAT-enhansır'a bağlanan protein) aile üyeleri	16
1.4.4.3 Krüppel-like faktörler (KLF'ler)	17
1.4.4.4 Wnt sinyali ve β -catenin	17
1.4.5 Staurosporin Etkisi	18
1.5 Konu ile İlgili Çalışmalar	19
2. MATERYAL ve YÖNTEM	21
2.1. Materyal	
2.1.1. Kimyasal Maddeler	21
2.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	21
2.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	22
2.2. Yöntem	25
2.2.1. Hücre Kültürleri	25
2.2.1.1. Alt Kültürleme	25
2.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	26
2.2.1.3. Hücre Sayımı	27
2.2.2. Adiposite Farklılaşma deneyi	27
2.2.3. Staurosporin etkin konsantrasyon ve süre tayini	28
2.2.4. MDI, St. (20nM) ve MDI+St. (20nM) uygulanmış 3T3-L1 hücrelerinde adipoz farklılaşmasının karşılaştırılması	28
2.2.5. Oil Red O boyama	29
2.2.6. Total RNA izolasyonu	30
2.2.7. cDNA sentezi	33
2.2.8. Kantitatif RT-PCR	34
2.2.9 C/EBP β ve C/EBP α 'nın yarı kantitatif RT-PCR analizleri	36

3. BULGULAR	37
3.1. Staurosporin Optimal Konsantrasyon ve Süre Tayini	37
3.2. Staurosporin'in 3T3-L1 Öncül Adiposit Hücrelerinden Adiposit Hücrelerine Farklılaşma Sürecine Etkisi	40
3.3. Total RNA izolasyonu	42
3.4. cDNA kontrolü	42
3.5. Staurosporin'in Farklılaşma Süresince SIK2 ve PPAR γ gen ifadelerine etkisi	43
3.6. Staurosporin'in C/EBP β ve C/EBP α gen ifadeleri üzerine etkisi	44
4. TARTIŞMA	49
5. KAYNAKLAR	52
6. ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AICAR	: Aminoimidazol karboksamid ribonükleotid; AMPK'nın seçici aktivatörü
AMPK	: AMP ile uyarılan protein kinazlar
AMP	: Adenozin 5'-monofosfat
ATP	: Adenozin 5'-trifosfat
BAD	: Beyaz adipoz doku
Bkz.	: Bakınız
BSA	: Bovin serum albumin
cAMP	: Siklik adenozin 5'-monofosfat
cDNA	: Complementary (komplementer) deoksiribonükleik asit
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CO ₂	: Karbondioksit
cm	: Santimetre
cm ²	: Santimetre kare
cytc	: sitokromc
CRE	: cAMP-yanıt element
CREB	: cAMP-yanıt elemente bağlanan
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DEX	: Dekzametazon
dH ₂ O	: Distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FFA	: Serbest yağ asidi (free fatty asid)
g	: Gram
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
IKKβ	: Nüklear faktör kapa-B kinaz altünite betanın inhibitörü
IR	: İnsülin reseptör
IRS	: İnsülin reseptör substrat
JNK	: C-Jun N-terminal kinaz

KAD	: Kahverengi adipoz doku
KDa	: Kilo Dalton
MAPK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
MDI	: Adipojenik karışım (MIX, Dex, İnsülin)
MIX	: Metilisobütilksantin
MOPS	: Morfolinopropan sülfonik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
mTOR	: Mammalian target of rapamycin
ml	: Mili litre
nm	: Nanometre
O ₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
RT-PZR	: Revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
TG	: Trigliserit
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TORC2	: CREB'in koaktivatörü
ml	: Mikro litre
μM	: Mikro Molar
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İnsülin sinyal yolağında IRS proteinlerin Tirozin ve Ser/Thr fosforilasyonu.	5
1.2. IRS-1 Serin fosforilasyonundan sorumlu kinazlar.	6
1.3. SIK adipoz özgül izoformu.	8
1.4 İnsülin sinyalinde SIK2.	9
1.5. Adiposit farklılaşmasında kullanılan <i>in vitro</i> modeller.	11
1.6. Memelilerde öncül adipositte olgun adiposite dönüşüm sürecine özgül genler ve transkripsiyon faktörleri.	12
1.7. Öncül adiposit-adiposit farklılaşmasında MDI muamelesi sonrası oluşan erken, orta ve geç basamaklar.	14
1.8. Wnt yolağın adiposit farklılaşmasını engelleme basamakları.	17
3.1. Adiposit Farklılaşması için Etkin Staurosporin Konsantrasyon Tayini.	37
3.2. Adiposit Farklılaşması için Etkin Staurosporin Konsantrasyon Tayininin 16. gününde Oil Red O ile boyama sonrası görüntülenmesi.	38
3.3. Staurosporin ile muamele süresinin farklılaşma üzerine etkisi.	39
3.4. Staurosporin ile muamele süresinin farklılaşma üzerine etkisinin 8. gününde Oil Red O ile boyama sonrası görüntülenmesi.	39
3.5. Farklılaşma süresince artan TG miktarının Oil Red O kullanılarak spektroskopik olarak tayin edilmesi.	40

3.6. 3T3-L1 Öncül Adiposit Hücrelerinden, Adiposit Hücrelerine Farklılaşma Sürecinde Oil Red O ile boyama sonrası fotoğraflanması.	41
3.7. RNA izolasyonu sonrası %1,2'lik formaldehit jel görüntüsü.	42
3.8. cDNA'ların test edilmesine yönelik 3T3-L1 hücrelerinde ifade edilen SIK2 geninin özgül primerleri ile çoğaltılıp %1,5'lik agaroz jel görüntüsü.	42
3.9. Adiposit farklılaşma sürecinde, Staurosporin inhibisyonunun SIK2 gen ifadesi üzerine etkisinin kantitatif RT-PCR yöntemi ile analizi.	43
3.10. Adiposit farklılaşma sürecinde, Staurosporin inhibisyonunun PPAR γ gen ifadesi üzerine etkisinin kantitatif RT-PCR yöntemi ile analizi.	44
3.11. C/EBP β ve β -aktin 14., 16., 18., 20., 22. ve 24. RT-PCR döngüleri.	45
3.12. C/EBP β ve β -aktin yarı-kantitatif RT-PCR agaroz jel görüntüsü.	46
3.13. Adiposit farklılaşma sürecinde, C/EBP β gen ifadesinin Staurosporin etkisinde değişimi.	46
3.14. C/EBP α ve β -aktin 12, 14., 16., 18., 20., 22. ve 24. RT-PCR döngüleri.	47
3.15. Adiposit farklılaşma sürecinde, C/EBP alfa gen ifadesinin yarı-kantitatif RT-PCR analizi.	47
3.16 Adiposit farklılaşma sürecinde, C/EBP α gen ifadesinin Staurosporin etkisinde değişimi.	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Staurosporin etkin konsantrasyon ve süre tayini.	28
2.2. Adiposit farklılaşmasında madde uygulama zaman dilimleri.	29
2.3. Oil Red O boyamada kullanılan kimyasal miktarları.	30
2.4. Total RNA İzolasyonu zaman dilimleri.	31
2.5. Kantitatif RT-PCR yapılan SIK2, PPAR γ ve β -aktin genlerin özgün primerleri.	34
2.6. Kantitatif RT-PCR’da kullanılan döngü programı.	35
2.7. Yarı kantitatif RT-PCR yapılan C/EBP β , C/EBP α ve β -aktin genlerin özgül primerleri.	36

GİRİŞ

1.1 Adipoz Doku

Yüksek organizmalarda karşılaştığımız ortak problemlerden biri hücrelerin sürekli olarak enerji kaynağına ihtiyaç duymalarıdır. İki özelleşmiş doku, kahverengi ve beyaz yağ dokusu, devamlı gereken enerji ihtiyacını karşılamaktadır. Beyaz yağ dokusu triağılglicerol formunda aşırı kaloriyi depolamaktadır. Açlık döneminde hücrelere gereken enerji, depolanan triağılglicerollerin lipolizisinden oluşan yağ asidi ve glicerol tarafından karşılanmaktadır. Kahverengi yağ dokusu ise depolanan triağılglicerolleri vücut sıcaklığını sabit tutmak için kullanmaktadır. İnsan ve sıçanda kahverengi yağ dokuları doğumdan önce gelişmektedir ve bu depolar çocukluk çağının sonuna kadar büyük ölçüde kaybolmasına rağmen erişkinlik dönemi boyunca bazı kahverengi yağ hücreleri beyaz yağ dokusu arasına serpiştirilmiş olarak kalmaktadır (1).

Beyaz yağ dokusu besin alımı sonrası oluşan fazla enerjinin depolandığı ana bölge olarak tanımlanmıştır. Beyaz adipositler (beyaz adipoz dokudaki (BAD) predominant hücre tipi) alınan enerjinin trigliserit olarak depolandığı tek bir geniş yağ damlası oluşturmaktadır. Kalorik ihtiyaç zamanı, bu trigliseritler (TG) lipazlar tarafından hızlıca hidrolize edilmekte (lipolizis) ve oluşan yağ asitleri diğer dokularda enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere taşınmaktadır. Bunun aksine kahverengi adipoz doku (KAD) öncelikli olarak sıcakkanlı hayvanlarda soğuk iklime adaptasyonu sağlayan sabit ısıda kalım (termogenez) için özelleşmiştir. Kahverengi adipositler yağ asitlerinin hızlı yıkılabilmesi için kolay ulaşılabilir küçük trigliserit damlaları içermektedir. Bu hücreler özellikle termogenezi ayarlama yüksek miktarda mitokondri içermesi ve yağ asit metabolizmasını sadece kahverengi yağ dokusunda bulunan mitokondriyal protein olan uncoupling protein 1 (UCP1) ile ısı üretmek amacıyla kullanmaktadır. Kahverengi yağ hücreleri beyaz yağ hücrelerine

nazaran daha az triaçilgliserol ve daha çok mitokondri içermektedir ve bu sebepten dolayı karakteristik renklerini almaktadırlar (2).

Yağ dokusu lipid metabolizması iki hormonal sinyal yolunun kontrolü altındadır. İnsülin, hücre içine glukoz alımı ve lipogenezi teşvik ederken, adrenalin ve glukagon gibi dış uyarıcılar ile oluşan cAMP, lipolizisi teşvik etmektedir. Eğer bu iki sinyal yolunun arasında kayıp meydana gelir ve yağ dokuları uzun süre yüksek miktarda insüline maruz kalırsa, derece derece insülin uyarısına karşı direnç gelişir. İnsülin direnci, biyolojik yakıt metabolizması için gereken yağ dokusu, karaciğer ve kas gibi dokularda meydana gelmektedir. Ve sonuçta tüm vücudun enerji metabolizmasında hasara ve buna bağlı obezite ve Tip II Diyabet (T2D) gibi birçok hastalığa sebep olacaktır (3).

1.1.1 Adipoz Dokudan Salınan Sitokinler

Adipositler tarafından üretilen leptinin keşfi adipoz dokunun endokrin bir organ olarak da işlev gösterdiğini ortaya koymuştur. Adipoz doku adipokinler olarak bilinen, sitokin ve peptid hormonların büyük çoğunluğunu salgılamaktadır. Bu moleküller karaciğer ve kas gibi dokularda enerji metabolizmasını düzenlemektedir. Adipoz doku ve beyin arasında direkt nöral bağlantı bütün vücut enerji kontrolünü birleştirmeyi sağlamaktadır.

Adipoz dokunun normal insülin duyarlılığı ve glukoz homeostazisinin sağlanmasında iki önemli rolü olduğu gözükmemektedir. Yeme ile ilgili davranışların bütün vücut metabolizması ve nöroendokrin kontrolü etkileyen adipokinlerin uygun seviyelerde sekresyonu ve dolaşımdaki serbest yağ asit (free fatty asit-FFA)'lerinin ve ektopik trigliserit depolarının zararlı etkilerini hafifletmek için adipoz trigliserit depolarının mevcut olmasıdır (2).

1.1.2. Adipoz Dokunun İnsülin Direnci, Obezite ve Tip II Diyabet ile İlişkisi

Kan dolaşımında bulunan serbest yağ asitleri insülin direncine aracılık etmektedir. İskelet kasında insülin direncine aracılık eden hangi faktör veya faktörler sorusunu çözümlmek zordur, fakat en azından serbest yağ asitleri tanımlanan önemli araçlardan biridir. FFA aracılı insülin direnci hipotezi, dolaşımda bulunan yüksek orandaki FFA ile obezite ve insülin direncinin güçlü ilişkisini gösteren verilerle tutarlı olduğu görülmektedir. Bu hipotez insan ve hayvanda periferik insülin direncine sebep oluşturan kan dolaşımındaki FFA'ların yüksek seviyelerde olduğunun kanıtlanması ile oldukça desteklenmiştir. Bunun aksine, antilipolitik ilaç *acipimox* ile FFA miktarındaki düşüş insülin etkisini arttırarak periferde glukoz alımını sağlamaktadır. Dolaşımdaki FFA etkilerine ilave olarak, kas gibi adipoz olmayan dokularda yağ asidi birikimi de obezitede insülin direncine katkıda bulunabilmektedir (44).

Adipositler açlık süresince FFA'lar ve gliserol gibi trigliseritleri hidroliz edip serbest bırakması kadar, beslenme sonrası trigliseritleri sentezleyip depolayabilme özelliğine sahiptir. Yağ asitleri deterjan özellikleri ve toksisitelerini azaltmak için hücre içinde koenzim A ile esterlenmektedir. Zayıf bireylerin iskelet kasında insülin duyarlılığı ve glukoz alımı normaldir. Obezitede ise adipositler artan trigliserit depolarından dolayı genişlemektedir. Yüksek kalori girişinin erken devrelerinde, adipositler aktif olarak trigliseritleri depolamaya devam etmektedir ve açlık boyunca normal lipolitik oranlarına yakın oranda sürekliliğini devam ettirmektedir. Bu durumda olan insan ve fare adipositlerindeki trigliserit sentezinde gerekli olan enzimlerin ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Yağ asit seviyeleri hafifçe yükselebilmekte, fakat yüksek kalori girişinin bu erken safhasında iskelet kası insülin duyarlılığını korumaktadır.

Yüksek kalori girişinin devamında dolaşımdaki FFA fazlalığı iskelet kası, karaciğer ve pankreatik β -hücrelerinde uzun zincirli fatty açıl-CoA esterleri formunda birirmektedir. Uzun zincirli fatty açıl-CoA esterleri ve diğer yağ asidi derivatları bu dokuların normal metabolik ve salgı fonksiyonlarını hasara

uğratmaktadır. Hiperfaji (aşırı miktarda besin tüketimi) yağ asidi sentezinin artmasına, karaciğerde düşük yoğunlukta lipoprotein sentezi ve iskelet kasında lipoprotein aktivitesini arttırmaya da öncülük etmektedir. Obezitede adipoz fonksiyon bozukluğu insülin direnci, trigliserit depolarında bozulma ve lipoliziste artmaya bağlı sitokinlerin aşırı seviyede sekresyonu ile gerçekleşmektedir. Bu durum artan obezite için metabolik bir adaptasyon olarak görülse bile insülin direncine öncülük etmektedir (4).

Tüm veya kısmi adipoz doku yokluğu oluşturulmuş pek çok fare modeli, örneğin adipoz dokusu olmayan A-ZIP/F-1 fare diyabetik ve insülin dirençlidir ve karaciğer ve iskelet kasında biriken trigliserit (TG) miktarının iki kat arttığı belirtilmiştir. Bu hayvanlara cerrahi olarak uygulanan cilt altı adipoz doku nakli, adipoz doku depolarını tekrar oluşturmakta ve burayı damarlandırmaktadır. Adipoz doku nakli iskelet kası ve karaciğerde bulunan TG miktarını da azaltmaktadır ve insülin direnci ve diyabeti iyileştirmektedir (5).

İskelet kasına glukoz taşınımını sağlamak için gereken insülin etkisine karşı direnç kazanmak obezite ile ilgilidir ve Tip II Diyabet (T2D) gelişimine öncülük etmektedir. Obezite oranı (30kg/m^2 'den daha büyük vücut kütle indeksine sahip olarak tanımlanmaktadır.) dünyada hemen hemen tüm toplumlarda çarpıcı bir şekilde artmaktadır ve obezite ile beraber T2D ve kardiyovasküler hastalıklar gibi önemli patolojik sonuçları meydana getirmektedir. T2D tek başına U.S.A.'da 132 milyar dolara varan sağlık harcamalarına sebep olmaktadır. Açık bir şekilde, obezite ve onunla ilişkili T2D'de efektif önlem ve tedaviler için yapılacak araştırmalar başarılı olursa toplumlar için çok büyük faydaları olacaktır (2).

1.2 Adipoz Dokudaki İnflamatuvar Durumun Oluşum Süreci

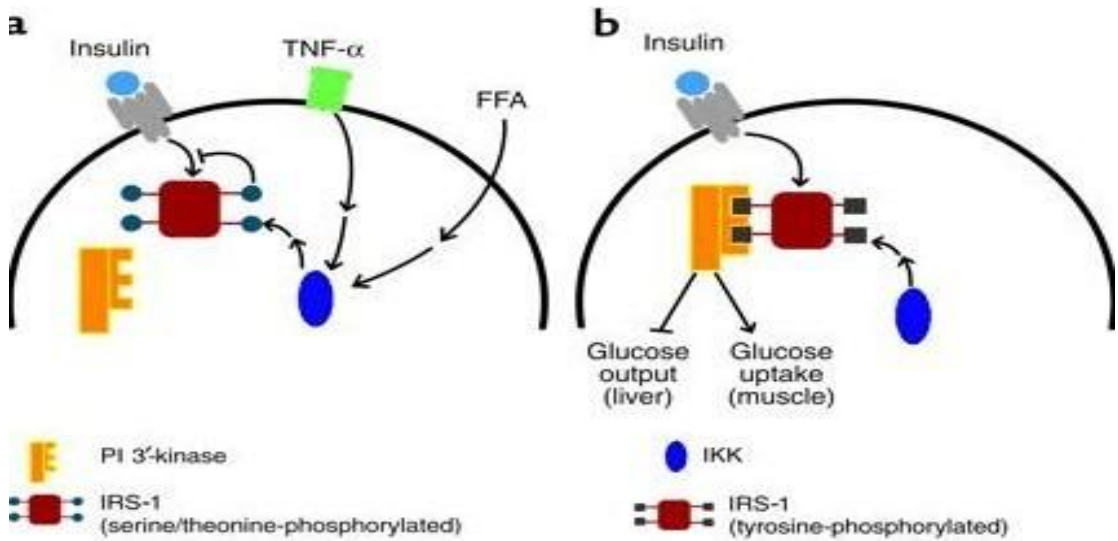
1.2.1 TNF α

Obez kişilerin adipoz dokudaki inflamatuvar durumu, çoğunlukla adipositler etrafında yer alan makrofajlar az da olsa adipositler tarafından salgılanan tümör-nekrozis faktör- α (TNF α) gibi sitokinlerin aşırı üretimi ile birlikte olmaktadır (2).

In vivo adipoz doku çalışmaları obezite adipoz dokusunda TNF α 'nın yüksek seviyelerde ifade edilmesine rağmen, kan dolaşımına serbest bırakılmadığını ortaya koymuştur ve obez bireyler hariç adipoz doku TNF α ekspresyonu insülin direnci ile ilişki göstermemektedir. İnsülin direnci durumunda iskelet kasında da TNF α 'nın aşırı ifade edildiği vurgulanmaktadır. Fakat adipoz doku ve glukoz metabolizmasına katılan diğer periferdeki dokular arasında TNF α sinyal görevi görmemektedir. Bu gözlemler TNF α 'nın parakrin etki gösterdiğini vurgulamaktadır (4, 6, 7, 38).

1.2.2 İnsülin Reseptör Substrat (IRS) Proteinler

TNF α , insülin metabolik etkisinin anahtar aracısı olan insülin reseptör substrat (IRS) proteinlerin Ser/Thr fosforilasyonunu tetiklemesi ile insülin sinyali ve glukoz girişini azaltmaktadır. Serbest yağ asitleri insülin sinyal adımlarında bulunan insülin reseptör ve IRS proteinlerin Treonin fosforilasyonunu engellemektedir (2).

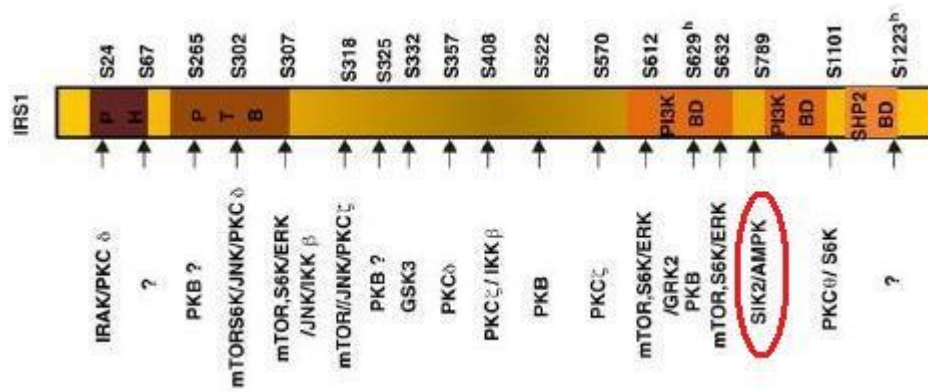


Şekil 1.1 İnsülin sinyal yolağında IRS proteinlerin Tirozin ve Ser/Thr fosforilasyonu (Birnbaum *et al.*, 2001).

IRS proteinler, hücre profilasyon ve survival' da görev almanın yanında insülin sinyal akışının anahtar molekülleridir. İnsülin bağımlı etki gösteren insülin reseptör kinaz etkisi ile IRS-1 Tirozin rezidüleri fosforilasyona uğramaktadır. Tirozin'i fosforile olmuş IRS proteinler hücre içi glukoz akışını başlatabilmektedir.

IRS proteinlerin Serin fosforilasyonu ise insülin sinyal akışının etkisini değiştirmekte ve sonuç olarak insülin uyarılmasına karşı hayvan dokularının direnç göstermesini sağlamaktadır. IRS proteinlerin serin fosforilasyonundan sorumlu pek çok protein kinazın moleküler tanımlaması yapılmıştır (3,10).

Sıçan adipositlerinde PKC β 'nın IRS1 Serin fosforilasyonu ile glukoz alımını negatif olarak düzenlediği (7, 8), insülin dirençli durumda IKK β kompleksin IRS1 Serin fosforilasyonunun (S312) inflamatuvar yolağın aktivasyonu ile insülin direncine aracılık ettiği ortaya çıkarılmıştır (8, 9, 10). 3T3-L1 adipositlerde IRS1 proteinin Serin fosforilasyonunda mTOR ve JNK'nın önemli rolleri olduğu da belirlenmiştir (11). Ayrıca GSK-3 β tarafından IRS1'in Ser332 fosforilasyonu insülin direncine öncülük etmektedir (13).



Şekil 1.2. IRS-1 Serin fosforilasyonundan sorumlu kinazlar (Tanti *et al.*, 2009).

IRS Serin fosforilasyonundan sorumlu protein kinazlardan biri de tuzla uyarılan kinaz (Salt-inducible Kinaz-SIK) 'dır. IRS1 S789'u fosforile ederek insülin direncine neden olabileceği düşünülmektedir (3).

1.3 Protein Kinazlar

İnsan genomunda 500 den fazla protein kinaz olduğu tahmin edilmektedir (12). Bu protein kinazlar metabolizma, membran transport gibi hücresel süreçlerin yanında, proliferasyon, farklılaşma ve hayatta kalımı kontrol eden büyüme faktörü

sinyal basamaklarının bir kısmıdır (14). Bu sebeple, yanlış yer ve zamanda kinaz aktivitesi hücre transformasyonu, kanser, metabolik hastalıklar ve gelişimsel anormalliklere öncülük eden yıkıcı sonuçlara neden olabilmektedir. Bütün bu fosforilasyonların %95'i Tirozin, %5'i Serin ve %1'i Treonin rezidüleri üzerindedir. Büyüme faktörü sinyalinde, Serin/Treonin ve Tirozin kinazların ikisi birden önemli düzenleyiciler olarak rol oynamaktadır. Fosforilasyona bağlı olarak yolağı oluşturan elementler uyarılabilmekte ya da sinyal iletimi önlenebilmektedir (23).

1.3.1 AMP ile Uyarılan Protein Kinazlar (AMPK)

AMPK tüm vücut metabolizmasında rol oynayan Ser/Treonin kinaz ailesi üyesidir ve hücre enerji homeostazisi için gereklidir. AMPK fonksiyonu karaciğer ve kasta geniş ölçüde çalışılmıştır. AMPK, enerji üretimine yönelik glukoz alımı ve yağ asidi oksidasyonunu arttıran yolları uyarırken lipogenez, protein sentezi ve glukoneogenez gibi anabolik yolları (enerji depolama yollarını) bloke eder (15). Yağ dokusunda AMPK'nın aktivasyonu açlık ve egzersiz gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır. Hipoglisemik ilaçlar gibi leptin ve adiponektin yağ dokusunda bulunan AMPK aktivatörleridir. AMPK aktivasyonu adipositlerdeki sitokin sekresyonunu da azaltmaktadır (15). AMPK, iki regülatör altünite (β ve γ) ve bir katalitik altüniteden (α) oluşan heterotrimerik bir komplekstir. Pek çok izoformunda $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ ve $\gamma 3$ gibi altüniteler tanımlanmıştır (15,16).

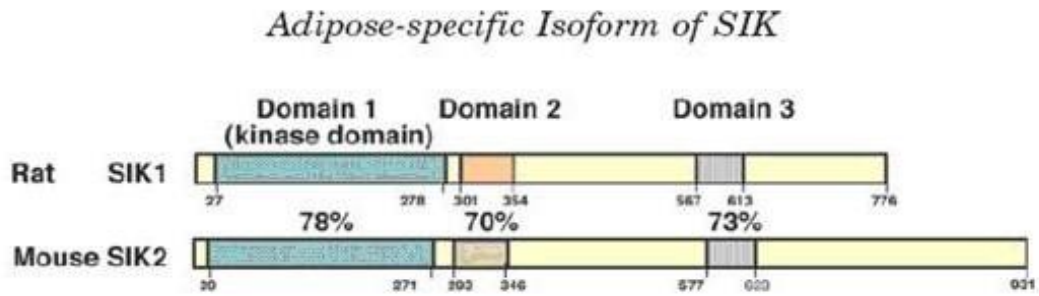
Yağ dokusunda AMPK'yı aktive eden pek çok durum AMP/ATP oranının artışı ile aynı zamandadır ve aktivasyondan sorumlu iki kinaz tanımlanmıştır. AMP/ATP'deki artışa bağlı olarak AMPK'nın γ altünitesi AMP bağlar ve konformasyonel değişiklik sonucu aktivasyon bölgesindeki T172, LKB1 tarafından fosforlanarak enzim aktif hale geçirilir. AMPK'nın aktif hale geçmesi kalmodulin kinaz kinaz B tarafından hücredeki Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak da gerçekleştirilebilmektedir (16).

AMPK aktivasyonunun öncül adiposit farklılaşmasını engellediği belirtilmektedir. AICAR (aminoimidazol karboksamid ribonükleotid; AMPK'nın seçici aktivatörü) ile muamele edilmiş 3T3-L1 veya 3T3-F442A öncül adipositlerinde, c/EBP α ve PPAR γ transkripsiyon faktörleri ve yağ asidi sentezi gibi

geç adipogenik belirteçlerin ifadesi önlenerek yağ hücrelerine dönüşüm geriletilmiş ve hücre ölümünde artış gözlenmiştir (15). İnsülin direncinde AMPK ilgi çekici farmakolojik potansiyele sahiptir ve insülin duyarlılığını sağlayan hormon ve ilaçların hedefi haline gelmiştir.

1.3.2 SIK Ailesi

Serin/Treonin kinaz SIK ailesi üç üye içermektedir. SIK1 yüksek tuz diyeti alan farenin adrenal bezlerinden klonlanmıştır (17). SIK1 olarak adlandırılan bu izoformun iki farklı homologu olarak SIK2 ve SIK3 izoformları karşılaştırmalı analizler sonucu dizi bankalarından ayırt edilerek tanımlanmıştır (18).



Şekil 1.3. SIK'in adipoz özgül izoformu (Horike *et al.*, 2003).

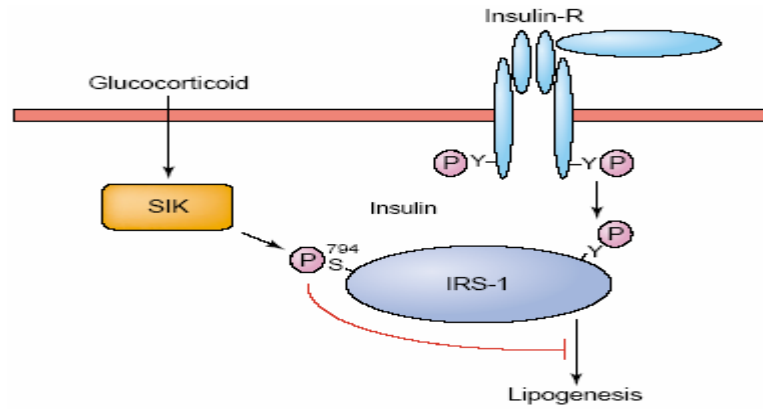
1.3.3 SIK2

SIK2 ilk kez fare adipoz dokusunda belirlenmiştir (3). Fare SIK2 103 kDa ve 931 amino asit rezidü içeren proteindir. SIK2'nin kinaz domaini (20-271 rezidüler arası) %78, UBA domaini (293-346 rezidüler arası) %70 ve fosforlanabilir domaini (577-623 rezidüler arası) %73 oranında SIK1 ile benzerlik göstermektedir (25).

SIK2'nin tanımlanmış ilk substratı sıçan insülin reseptör substrat 1 (IRS1)'dir. İnsülin bağımlı insülin reseptörü (reseptör tirozin kinaz aile üyesi) tarafından IRS1/2 Tirozin fosforilasyonu insülin yolağının aktivasyonunu sağlamaktadır. IRS-S789 fosforilasyonunun plazma membranında insülin reseptör ile IRS etkileşimini bozarak

alt kısmında bulunan efektörler ile etkileşimini engellemesi veya IRS yıkımını arttırarak sinyal iletimini engellediği düşünülmektedir (19). Diyabetik insülin dirençli sıçanların beyaz yağ dokusunda IRS-S789 fosforilasyonunun artmış olduğu durumda SIK2 ifade ve aktivitesinin önemli derecede arttığı bilinmektedir, dolayısıyla bu veri SIK2'nin T2D gelişiminde gerekli olabileceğini vurgulamaktadır (3, 20).

Farklılaşmanın başlangıcında 3T3-L1 öncül adipositlerinde SIK2 ifadesinin adiposit özgül transkripsiyon faktörleri ile beraber artması ve olgun adipositte en yüksek seviyede bulunması, bu proteinin adiposit farklılaşmasının erken safhalarında önemli olduğunu göstermektedir (21, 45).



Şekil 1.4. İnsülin sinyalinde SIK2 (Okamoto *et al.*, 2004).

Diğer bilinen SIK2 substratı, kontrol altındaki CREB aktivitesini ileten TORC2'dir. SIK2'nin TORC2-S171'i fosforile etmesi molekülün 14-3-3 proteinleri ile etkileşimi sonucu sitoplazmada tutuklu kaldığı ve CREB bağımlı gen transkripsiyonunun engellendiği bilinmektedir (22, 25).

Bir diğer SIK2 *in vitro* substratı p97/VCP (valosin containing protein)'dir. SIK2 tarafından fosforillendiğinde p97/VCP ATPaz aktivitesi artmaktadır. ER membranda bulunan SIK2 ve p97/VCP etkileşiminin ER'deki moleküler olaylar ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (36).

Adiposit ve pankreatik hücrelerin yanında testislerde de SIK2 ekspresyonu belirlenmiştir. SIK2 fosforilasyon konsensüs motifi, IRS ve TORC2 substratlarına

benzer sekanslar içermektedir (Hy)[(B)X veya X(B)]XX(S/T)XXX(Hy), burada Hy hidrofobik aminoasitleri ve B ise bazik aminoasit dizisini temsil etmektedir (3).

SIK2 49. dizisindeki Lizin aminoasiti katalitik aktivite için gerekli ATP-bağlanma halkasında bulunmaktadır. Lizinin Metioninle yer değişimi (K49M) SIK2'nin aktivitesini yok ettiği bilinmektedir. Protein kinaz A'nın (PKA) SIK2'yi Serin 587 aminoasit dizisinden fosforlaması, SIK2'nin nükleustan sitoplazmaya göçü için gerekli olduğu belirtilmiştir (3). Sıçan retinal dokudan klonlanmış SIK2 yapısı üç izoformun varlığını işaret etmektedir (23, 24, 25).

1.4 Adiposit Farklılaşması

Fertilize olmuş tek bir yumurta hemen hemen 200 farklı hücre tipine dönüşebilmektedir. Fertilize olmuş yumurtadan öncül adiposit dokunun gelişimsel programı tam olarak bilinmemektedir (26, 27). Fakat çok potensiyelli fibroblastların (stem hücreler) mezodermal orijinli oldukları ve yönlendirmeye bağlı olarak öncül adiposit, kıkırdak, kemik veya kas dokuya farklılaşabildikleri bilinmektedir (27, 28, 29). İnsanda bulunan öncül adipositler geç embriyonik gelişim sırasında adipoz doku içinde farklılaşmaya başlamaktadır, bu farklılaşma yeni doğanlarda besin alımı ile biriken enerjinin üstesinden gelmeye olanak sağlamaktadır. Tüm organizmaların öncül adipositleri hayatları boyunca farklılaşma yeteneğine sahiptir. Hayvan yağ dokusunun yaklaşık olarak 3'te 1'ini adipositler oluşturmaktadır. Geriye kalan 3'te 2'si ise küçük kan damarları, sinir doku, fibroblastlar ve gelişimin çeşitli basamaklarında olan öncül adipositleri içermektedir. Diğer fibroblast benzeri hücrelerden öncül adipositleri izole etmek oldukça güçtür ve öncül adipositler total yağ dokunun küçük bir yüzdesine sahip olduğu için büyük miktarda yağ dokusu gerekmektedir. Ayrıca primer hücreler kültürde sınırlı hayata sahip olduğundan farklılaşması için klonal öncül adipositlerin kullanıldığı *in vitro* adipogenez tercih edilmektedir (27).

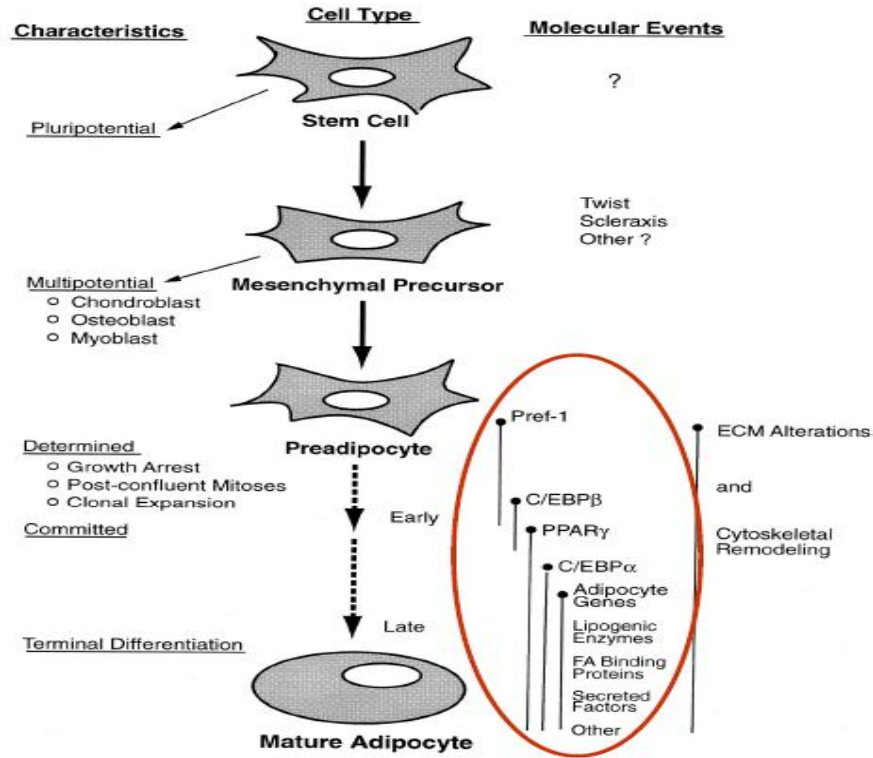
1.4.1 Adiposit Farklılaşmasında Kullanılan *in vitro* Modeller

Adiposit öncül hücre hatları çok potansiyelli fibroblastlar ve tek potansiyelli öncül adipositler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan 10T1/2, Balb/c 3T3, 1246, RCJ3.1 ve CHEF/18 fibroblastlar birinci gruba, 3T3-L1, 3T3-F442A, 1246, Ob1771, TA1 ve 30A5'ler ise ikinci gruba örnek verilebilir (26, 27).

Cell Lines	Origin/Stage of Development	Inducing Agents Used for Differentiation
ES cells	Mouse blastocyst [*]	Retinoic acid
CH3 10T1/2	Mouse embryo [†]	Demethylating agent 5'-azacytidine
TA1	Derived from 5-azacytidine-treated 10 T1/2 [‡]	10% FBS, insulin, and Dex
3T3-L1	17- to 19-day disaggregated mouse embryo [‡]	10% FBS, Dex and MIX, insulin (high concentration)
3T3-F442A	Same as above	10% FBS, insulin
Ob17	Epididymal fat pads of adult <i>ob/ob</i> mouse [‡]	8% FBS, insulin, and T ₃
Primary Cultures [§]	Source/Age	Inducing Agents Used for Differentiation
Rat	Subcutaneous, epididymal, retroperitoneal/newborn (48 h), 4 wk old, or adult	Insulin (low concentration in 10% FBS, high concentration in serum free, accelerated)
Mouse	Subcutaneous/8-12 day old	Serum free; insulin, HDL, Dex
Rabbit	Perirenal/4 wk old	Serum free; insulin, Dex
Pig	Perirenal, subcutaneous/fetal, newborn (1-7 day old)	Serum free; insulin with or without glucocorticoids
Human	Subcutaneous (abdominal)/variable age	Serum free; insulin (high concentration) and glucocorticoids

Şekil 1.5. Adiposit farklılaşmasında kullanılan *in vitro* modeller (Gregoire *et al.*, 1998).

Memelilerde adipositler, tek potansiyelli mezenkimal hücrelerden oluşmaktadır. Öncül adipositler, öncül hücrelerinden morfolojik olarak ayırt edilemezler. Fakat diğer hücre tiplerine dönüşme potansiyellerini kaybetmişlerdir. Terminal farklılaşma sonucu öncül adipositler olgun adiposit karakteristik yapısını alır. Olgun bir adiposit, yağ sentezi ve taşınması, insülin duyarlılığı ve yağ hücrelerine özgün proteinlerin sekresyonu için gerekli mekanizmaya sahiptir (30).



Şekil 1.6. Memelilerde öncül adipositten olgun adiposite dönüşüm sürecine özgü genler ve transkripsiyon faktörleri (Gregoire *et al.*, 1998).

1.4.2 3T3-L1 Hücre Hattı

3T3-L1 ve 3T3-F422A hücre hatları, Swiss 3T3 fare embriyolarından elde edilmiştir ve kültür modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Her bir hücre hattının farklılaşma gereksinimlerinde bazı farklılıklar vardır. Bu farklılıkların hücrelerin elde edildiği zamanki tutuklu kaldığı gelişimsel basamaklardaki temsil edilen varyasyonlar olduğuna inanılmaktadır (31).

3T3-L1 ve 3T3-F442A hücreleri, hücre içi trigliserit depolar ve olgun adipositlere ait morfolojik karakteristikleri geliştirebilirler. Her iki hücre hattı benzer transkripsiyonel aktivasyon profili ve fenotipik özellikler gösterirler. 3T3-L1 hücre hattı karakterizasyonu iyi yapılmış hücre hatlarından biridir. Kültürdeki farklılaşmış 3T3-L1 öncül adipositler, hayvan dokudaki ultrayapısal karakteristiklerinin çoğuna sahiptir (30, 32, 33).

1.4.3 3T3-L1 Öncül Adipositlerin Olgun Adipositlere Farklılaşma Süresi

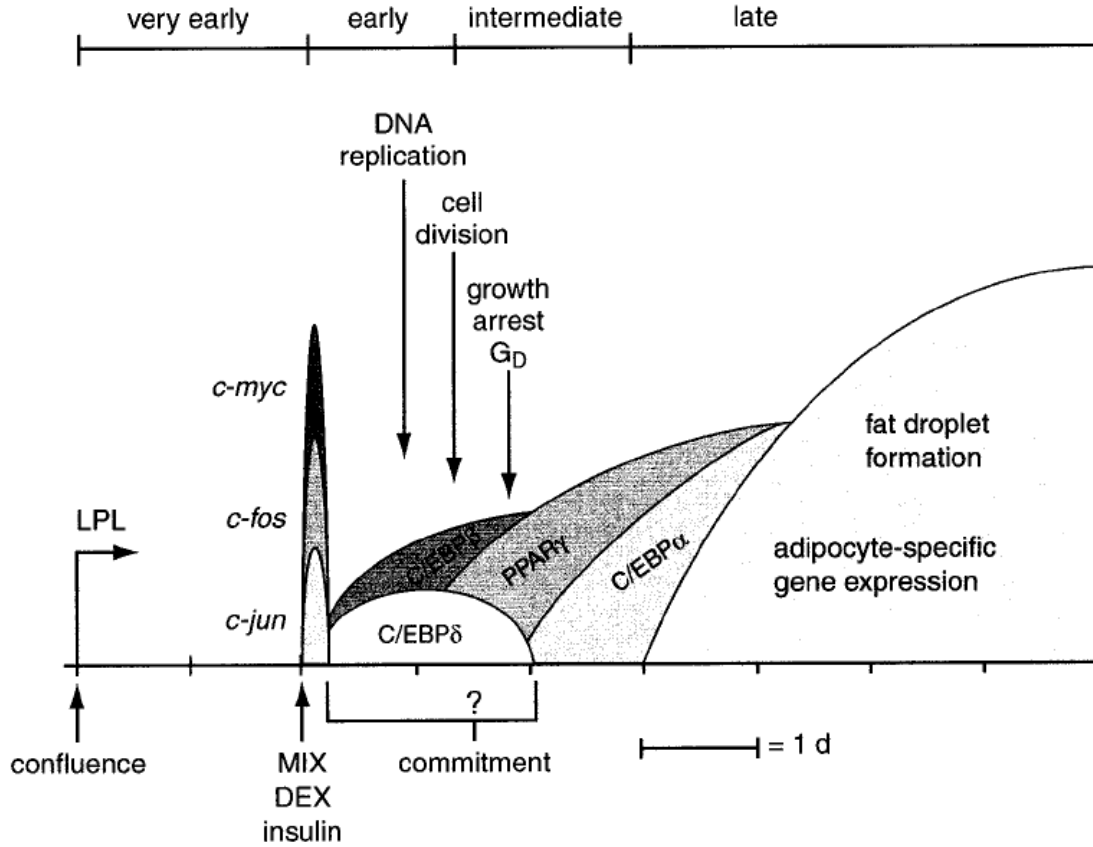
Adipojenik karışım ile muamele edilen konfluent 3T3-L1 öncül adipositler eş zamanlı olarak farklılaşabilmektedir. En yüksek farklılaşma, hücre içi cAMP seviyesini arttıran insülin (glukokortikoid) ajanının muamelesi ve fetal bovin serum (FBS) ile elde edilmiştir. Sentetik glukokortikoid uyararı Dekzametazon (DEX), glukokortikoid reseptör yolağını stimüle etmek için kullanılmaktadır. cAMP-fosfodiesteraz inhibitörü olan Metilisobütillsantin (MIX), cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA) yolağını stimüle etmek için kullanılmaktadır. MIX, DEX ve insülin (MDI) uyarımından yaklaşık olarak 24 saat içinde farklılaşan öncül adipositler kontak inhibisyonu takiben gerçekleşen birkaç bölünmeye uğradıktan sonra hücre döngüsünde tutuklanır. Adiposit hücresi olmaya yönelmiş ve büyümesi durdurulan bu hücreler 3. günden itibaren farklılaşmaya ait geç belirteç genlerini ifade etmeye başlarlar. Bu süreyi takiben hücreler 5-7 gün içerisinde yağ damlacıkları biriktirir ve olgun yağ hücrelerini oluşturmak üzere terminal farklılaşma geçirmeye başlarlar (27, 33, 43). Adipositler morfolojik olarak küre şeklinde bir görüntüye sahiptir ve fibroblastik öncül hücrelerin değişimi ile oluşmaktadır (33).

1.4.4 Adiposit Farklılaşmasındaki Transkripsiyon Faktörleri

3T3-L1 öncül adipositlerin büyüme yüzeyi tamamen kaplandığında, adiposit farklılaşmasının en erken belirteç genlerini ifade ederler. Hücre-hücre etkileşim lipoprotein lipaz ve type VI kollajen genlerin ifadesini uyarmaktadır. MDI ilavesinden sonraki 1 saat içerisinde *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *c-myc* ve (CCAAT/enhancer binding protein) *c/ebpβ* ve *c/ebpδ* gen ifadeleri gözlemlenmiştir (27, 34, 35,)

Farklılaşma kokteyline maruz kalan öncül adipositlerde *c/ebpβ* ve *c/ebpδ* transkripsiyonu uyarılan ilk genlerdir. Bu sebeple farklılaşma sürecinde onların direkt olarak gerekli olduğu kabul edilmektedir. Bu uyarılma, C/EBPβ veya C/EBPδ kontrolü altında bulunan ekzogenous promotorların uyarılmasına ve hormonal uyarıcılara yanıt oluşturarak adipogenezin hızlanmasına neden olmaktadır. C/EBPβ

öncelikli olarak DEX'e karşı duyarlı iken, C/EBP δ MIX'e karşı duyarlıdır. Kültür besisi ortamından MIX ve DEX çıkarıldıktan sonra *c/ebp δ* ifadesi sonraki 48 saatte azalırken *c/ebp β* 'daki düşüş kademeli olarak 8 gün sürmektedir. C/EBP β ve δ aktivitelerinin *ppary* ifadesi için gerekli olduğu bilinmektedir (27).



Şekil 1.7. Öncül adiposit-adiposit farklılaşmasında MDI muamelesi sonrası oluşan erken, orta ve geç basamaklar (Ntambi *et al.*, 2000).

C/EBP β ve δ aynı zamanda *c/ebp α* ifadesine de aracılık etmektedir. *ppary* ve *c/ebp α* bir kez aktive edildiğinde *c/ebp β* ve *c/ebp δ* ifadelerinde azalma olsa bile, geri besleme ile birbirlerini düzenleyebildikleri için gen ifadeleri artmaktadır. PPAR γ ve C/EBP α tek tek veya beraberce adiposit fenotipini oluşturmak için gerekli enzim ve proteinleri kodlayan birçok adiposit genin transkripsiyonunu indükleyebilmektedir (27, 37, 40).

1.4.4.1 PPAR γ

Nüklear reseptör peroksisom proliferatör ile aktive olan reseptör gama (nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-PPAR γ) adipogenezde gerekli transkripsiyonel düzenleyicidir. PPAR γ , yağ asit esterifikasyonu, trigliserit sentezi ve paketlenmesi için gerekli olan enzimleri kodlayan genleri de kontrol etmektedir (perilipin, fatty asit sentaz (FAS), lipoprotein lipaz (LPL) vs). Bu sebeple PPAR γ 'nın bozunumu adipositlerde trigliserit birikimini azaltmakta ve insülin direnci ve T2D'e öncülük eden iskelet kası ve karaciğerde yağ asiti birikimini arttırmaktadır (2, 42).

PPAR γ bir nüklear-reseptör süper aile üyesidir ve adipogenez için gerekli ve yeterlidir. Artmış *ppary* ifadesi fibroblastlardaki adiposit farklılaşmasını indüklemek için yeterli olduğu gösterilmiştir. PPAR γ 'nın farklı iki tipi vardır. PPAR γ 2, PPAR γ 1'den farklı olarak amino ucunda 30 aminoasit içermekte ve özellikle yağ dokuda ifade edilmektedir. PPAR γ protein izoformları, tercihi RNA prosesi ve alternatif promotor kullanımı tarafından oluşmaktadır ve her ikisi de adipogenez indükleyebilmektedir. Fakat PPAR γ 1, adipositler yanında kolonik epitelium ve makrofajlar gibi diğer hücre tiplerinde de bulunmuştur (41). PPAR γ eksik embriyonik stem hücrelerinin yağ oluşumu için katkıda bulunmadığını ortaya koymuşlardır. İlave olarak tüm vücudunda fonksiyonel PPAR γ 2 geni bulunmayan farelerde sadece beyaz adipoz dokuda PPAR γ 1 hasara uğratıldığında beyaz adipoz doku gelişemez ve çok az kahverengi adipoz doku oluşur. Bu bulgular PPAR γ 'nın *in vivo* adipogenez için gerekli olduğunu belirtmektedir (37, 41). *Thiazolidinedione (TZD)* sınıfı farmakolojik ajanlar insülin direnci ile ters ilişkilidir ve bununla alakalı semptomların iyileşmesini sağlamaktadır. Bu bileşikler PPAR γ 'nın aktivitesini artırarak insülin duyarlılığını artırması ile etki gösterdiği görülmektedir (39). Pro-adipojenik C/EBP'ler ve Krüppel-like faktörler (KLF'ler) iki *Ppary* promotordan en az birini indüklediği gösterilmiştir (41). Bunun aksine, anti-adipojenik GATA faktörler PPAR γ ekspresyonunu baskılamaktadır (42).

Adipoz dokudaki inflamatuvar durum, çoğunlukla makrofajlar azda olsa adipositler tarafından TNF α gibi sitokinlerin aşırı üretimi ile birlikte olmaktadır. İnflamatuvar sitokinlerin bu dolaylı etkileri anahtar element olan PPAR γ 'nın negatif

düzenlenmesi ile olmaktadır. $TNF\alpha$, $PPAR\gamma$ 'yı transkripsiyon, mRNA, protein sentezi ve yıkımı gibi çeşitli seviyelerde etkileyebilmektedir (2). $TNF\alpha$ tarafından etkilenen mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz kinaz kinaz 4 (MAP4K4; Ser/Treonin protein kinaz aile üyesi) 'ün RNAi-aracılığı ile susturulması, 3T3-L1 adipositlerde $PPAR\gamma$ mRNA seviyelerini etkilemeksizin, $PPAR\gamma$ 1 ve 2 miktarlarının iki üç kat artmasına neden olmaktadır. Bu sonuçlar MAP4K4'ün $PPAR\gamma$ 'yı translasyon sonrasında düzenlediğine işaret etmektedir (2).

1.4.4.2 C/EBP (CCAAT-enhensır'a bağlanan protein) Aile Üyeleri

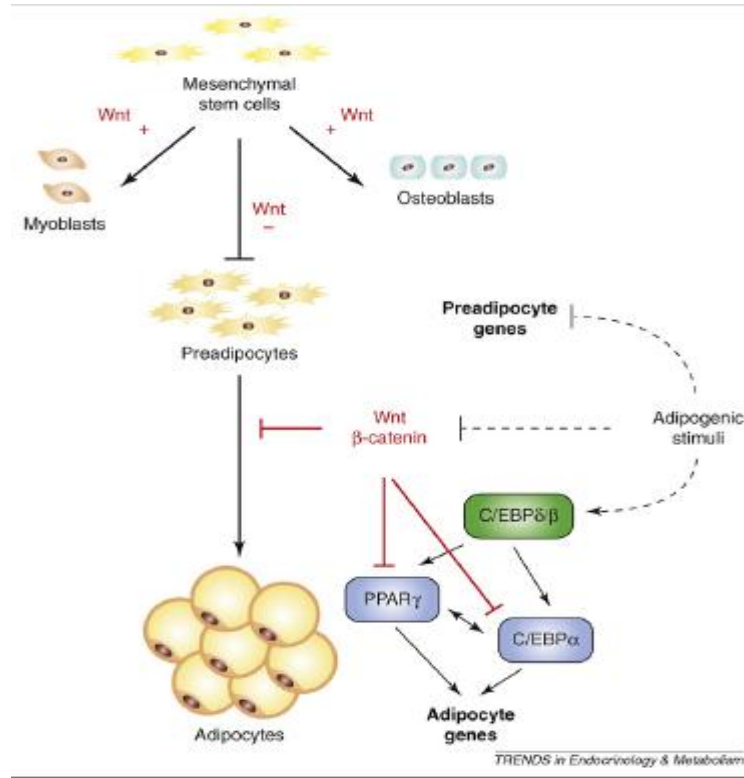
Pek çok C/EBP aile üyeleri, C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ ve CHOP (transcription factor homologous to CCAAT-enhancer binding protein) adipositlerde ifade edilmektedir. Adiposit farklılaşması boyunca bu transkripsiyon faktörlerin geçici ifadesi ilk olarak C/EBP β ve C/EBP δ 'nın erken uyarılması ve akabinde C/EBP α uyarımının sağlanması ile devam etmektedir. *c/ebpb*^{-/-} MEF'lerde adipogenez etkinliğinin azaldığı bilinmektedir. C/EBP δ 'nın C/EBP β yokluğunu karşılayabilmesi olasıdır, hem *c/ebpb* hem de *c/ebp δ* genlerinin etkisizleştirildiği farede adipoz doku kütlesinde oldukça azalma gözlenmiştir. C/EBP β ve C/EBP δ , en azından C/EBP α ve $PPAR\gamma$ 'yı uyararak adipogenez tetiklediği bilinmektedir (37, 43, 49, 50). C/EBP α pek çok adiposit genini direk olarak indüklemektedir ve *in vivo* çalışmalar adipoz doku oluşumunda bu faktörün önemli rol oynadığını belirtmektedir.

Adipogenezde C/EBP'lerin önemi olmasına rağmen, açıkca bu transkripsiyon faktörlerinin $PPAR\gamma$ yokluğunda fonksiyonu yoktur. Örneğin, C/EBP β , $PPAR\gamma$ yokluğunda *c/ebp α* 'nın ifadesini uyaramamaktadır. *c/ebp α* 'nın ektopik olarak ifade edildiği *pparg*^{-/-} fibroblastlarda adipogenez başlatamaması karmaşık bir transkripsiyonel düzenlemenin varlığını işaret etmektedir (51, 52, 53).

1.4.4.3 Krüppel-like Faktörler (KLF'ler)

KLF'ler de adipogenezde önemli role sahiptir. Bu proteinler CACCC- ve GC-zengin DNA sekanslarına bağlanan çinko parmağı proteinlerinin geniş bir ailesidir. Apoptoz, proliferasyon ve farklılaşmayı düzenlerler. Çeşitli KLF genleri adipoz dokuda ifade edilmektedir, KLF15 adipositlerde ortaya çıkarılan ilk aile üyesidir ve adiposit farklılaşmasını uyarabildiği gibi insülin duyarlı glukoz transport-4 (GLUT4) ifadesini de uyarmaktadır. Bunun dışında KLF5, C/EBP β ve C/EBP δ tarafından erken adiposit farklılaşması boyunca uyarılmaktadır. C/EBP β ve C/EBP δ birlikte *Klf5* promotoruna, KLF5 ise *Pparg2*'nin promotoruna bağlanarak C/EBP'ler ile birlikte aktivasyonda yer almaktadır. KLF'lerin hepsi adiposit farklılaşmasını promote etmez, KLF2 ve KLF7'nin ikisi de anti-adipojenik faktördür. Örneğin, KLF2'nin *Pparg2* promotorunu baskıladığı bilinmektedir (30).

1.4.4.4 Wnt Sinyali ve β -catenin



Şekil 1.8. Wnt yolağın adiposit farklılaşmasını engelleme basamakları (Christodoulides *et al.*, 2008).

Son çalışmalar öncül adiposit farklılaşma yeteneklerinin dış çevredeki çeşitli faktörler tarafından etkilendiklerini belirtmektedir. Wnt ve β -catenin'in kemik, barsak ve hematopoietik sistem gibi diğer organların morfogenezinde olan rolleri iyi araştırılmıştır. Wnt'ler hücre-yüzey reseptörlerine bağlanarak parakrin veya otokrin şekilde etki göstermektedir. Adipogenezde ilk rapor edilen 3T3-L1 öncül adipositlerinde Wnt yolağın aktivasyonunun farklılaşmayı bozduğunu kanıtlamışlardır. Daha da ötesi, β -catenin aktivitesinin inhibisyonu öncül adipositlerde adipogenez indükleyebilmektedir ve myoblastlarda adiposit-benzeri karakteristiklere liderlik etmektedir. Bir Wnt aile üyesi olan Wnt10b adipogenezde yaygın bir şekilde araştırılmıştır. Wnt10b, öncül adipositler tarafından salgılanmakta, β -catenin'i stabilize etmekte, 3T3-L1 farklılaşmasını engellemektedir ve iki yöne de dönüşebilecek stromal öncüllerin adipogenezden osteoblastogeneze gelişimini sağlamaktadır. Wnt10b tarafından bu mekanizma adipogenez için gerekli *ppary* ve *c/ebpa* ifadesini baskılayarak meydana gelmektedir (37, 41).

Adipojenik uyarıcılar ile hücre etkileşiminin erken evrelerinde adipoz özgül genlerin uyarılması ve/veya baskılanması farklılaşma yolağında olan hücrelerin farklılaşma kararı için gereklidir. 3T3-F442A öncül adipositlerin osteoblastlara farklılaşma kabiliyeti de vardır. BMP (Bone Morfogenetik Proteinler) sinyal ve retinoik asit adiposit dönüşümünü baskılamak için birlikte çalışmaktadır. BMP sinyali proliferasyonu arttırmakta ve hücre dışı matriks'te kalsifikasyonu başlatarak tamamen osteoblastlara dönüşümü tetiklemektedir (54). 3T3-F442A hücreler özgün uyarıcılara maruz bırakıldıklarında adiposit veya osteoblastlara dönüşebilmektedir. Örneğin 3T3-L1 öncül adipositler, farede peritoneal enjeksiyon sonrası makrofaja dönüşebilmektedir (55).

1.4.5 Staurosporin (St) Etkisi

Staurosporin (St) 1977 yılında Omura ve arkadaşları tarafından *Streptomyces staurosporeus* bakterisinden izole edilmiştir. Anti-fungal'dan anti-hipertansif etkiye kadar geniş çapta biyolojik aktiviteye sahiptir. Staurosporin'in ana biyolojik aktivitesi Ser/Treonin protein kinazları inhibe etmesidir. Staurosporin, protein kinaz gibi biyolojik hedefleri ile etkileşerek veya bağlanarak etki göstermektedir.

Kinazların ATP bağlanma bölgesine güçlü afinite gösterdiği için ATP'nin bağlanmasını engellemektedir.

HEK293 hücrelerine Staurosporin muamelesi, LKB1'in SIK üzerindeki fosforlama bölgesinde oluşan fosforilasyon seviyesinde herhangi belirgin bir değişiklik olmaksızın, SIK kinaz aktivitesini engellediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmada kültür hücrelerine St. muamelesi sonucu SIK2 ve SIK3 aktivitesinin engellendiği bulunmuştur. Yine aynı çalışmada St.'in SIK'in üst basamaklarında bulunan elementleri bloke etmeksizin direkt olarak SIK kinaz aktivitesini engellediği gösterilmiştir (46, 47).

1.5 Konu ile İlgili Çalışmalar

Öncül yağ hücrelerinin olgun yağ hücrelerine farklılaşmasında bir kinaz inhibitörü olan St.'nin rolüne yönelik çalışmalar sadece birkaç yayınla sınırlıdır. Bu çalışmalardan birinde Clara ve arkadaşları adipojenik faktör yokluğunda 4–6 saat gibi kısa bir süre St ile muamele edilen 3T3-F442A hücrelerinde elde edilen farklılaşma oranının MDI etkisinden çok daha hızlı ve etkin olarak gerçekleştiğini gösterdiler. Bu etkinin St. kaynaklı GSK3 β aktivasyonu ve T-tip kalsiyum kanalları aracılığıyla artan hücre içi Ca⁺² konsantrasyonu ile bağlantılı olduğu gösterildi (48).

In vitro adipogenez deneylerinde kullanılan öncül adipositler farklılaşma kararını verebilmek için klonal genişlemeyi takiben hücre döngüsünü terk ederek dinlenme evresine geçmeleri gerekmektedir. 3T3-F442A hücrelerinde adipoz farklılaşmasına yönelmede fetal bovin serum (FBS) veya büyüme hormonu ile adipojenik uyarımın 24-36 saat gerektirdiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, 3T3-L1 hücreleri istirahat durumunu takiben insülin içeren adipojenik serum ve Mix/Dex karışımı ile 48 saat içerisinde farklılaşma için kesin kararlılık durumuna geçmektedirler. 3T3-F442A hücrelerinin olgun adipositlere farklılaşmaları adipojenik serum veya büyüme hormonlarının varlığında yaygın bir şekilde çalışılmıştır (56, 57, 58, 59, 60). Bu çalışmalar farklılaşmanın iki basamakta ele alındığını ilk olarak adipojenik uyarımın ikinci basamak ise kararlılığın yerleştiği basamaklardır. İlk basamakta retinoik asit veya diğer inhibitörlerin varlığı ile

farklılaşma sürecinde geriye dönüşün mümkün olduğu bir kararlılık durumu söz konusu iken uyarıyı takip eden 48 saat içinde yerleşmeye başlayan ikinci basamakta farklılaşma bu inhibitörler ile geriye çevrilemeyen bir kesin kararlılık safhasını ifade eder.

3T3-F442A öncül yağ hücrelerinin farklılaşmasında hücre farklılaşmaya yönelimin sağlamasında Wnt sinyal yolağının aktif olmaması gerekmektedir. Bunun dışında St. tarafından uyarılabilen farklılaşma sürecinde Wnt yolağı ve GSK-3 β inhibisyonu ile birlikte diğer baskılayıcı etkenlerden retinoik asit veya TNF α yolaklarının da etkinsizleştirilmesi gerekmektedir (61). GSK-3 β inhibisyonu, farklılaşmamış durumdaki 3T3-F442A hücrelerinin C/EBP α ve PPAR γ adipojenik transkripsiyon faktörlerinin uyarımını bloke eden Wnt10 sinyal yolağını aktive ederek etkisini göstermektedir (62, 63). St.'nin GSK-3 β aktivasyonunu Ser21/9 dizilerindeki fosforlanmayı azaltarak neden olduğu düşünülmektedir (64). GSK-3 β 'nin aktivitesini C/EBP β 'yı Thr179 ve Ser184 dizilerinden fosforlayarak klonal genişleme sırasında C/EBP β 'nin DNA'ya bağlanmasını ve dolayısı ile C/EBP α ve PPAR γ gibi farklılaşma için ihtiyaç duyulan genlerin transkripsiyonuna sağlayarak göstermektedir (65, 66, 67, 68).

3T3-F442A hücrelerinin St. muamelesini takiben 40-48 saat sonra farklılaşma için kararlılık durumlarını geriye dönüşümsüz olarak tamamlanmaya başladıkları görülmektedir. *ppary2* geninin uyarım safhasından sonraki erken dönemde fakat yönelimin kararlı olmasından önce ifade edildiği bilinmektedir. Buna karşın *cebpa* kararlılık safhasının bitiminde dahi hala yüksek oranda ifade edilmektedir. Ayrıca *ppary2* gen ifadesinin St-Dex ile muameleyi takiben 4 saatte azaldığı ve daha sonrasında St-Dex inkübasyonu başlangıcından sonra sadece 8 saat içinde yaklaşık 300 kat keskin bir artış gösterdiği belirlenmiştir. *cebpa* ifadesinin ise St-Dex uyarısını takiben ilk 24 saatte bazal seviyede seyrettiği fakat 24-48. saatlerde yani kararlılığın geriye dönüşümsüz kılındığı safhada arttığı görülmüştür (32).

Bu çalışmalar Horike ve arkadaşlarını SIK2 aktivitesi ve miktarındaki artışı tespit ettikleri obez tip 2 diyabet farelerin yağ hücrelerinde ve 3T3-L1 hücreleri ile gerçekleştirdikleri *in vitro* farklılaşma modellerindeki bulguları ile birlikte ele alındığında SIK2'nin adipogenez için önemli bir gen olabileceğini işaret etmektedir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1.1 Kimyasal Maddeler

DMEM (ATCC, 30-2002), Fetal Bovin Serum (Hyclone, SV30160.03), 10X PBS Dulbecco's (Gibco, 14190-094), Penisilin/Streptomisin (Gibco, 15140-122), 10X Trypsin-EDTA (Sigma, T4049), Dimetil sülfoksit (Sigma, D5879), Sodyum bikarbonat (Sigma, S8875), Sodyum klorür (Sigma, S3014), Sodyum asetat (Sigma, S2889), D-glikoz (Merck, 108337), Potasyum klorür (Sigma, P5405), Lipid RNeasy Mini İzolasyon Kiti (Qiagen, 74804), High pure RNA izolasyon kit (Roche, 11 828 665 001), Oil Red O (Sigma, O0625), IBMX (Applchem, A0695), DEX (Sigma, A2153), İnsülin (Sigma, I2643), Staurosporine (Invitrogen, PHZ1271), Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kit (Roche, 05 081 955 001), FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche).

2.1.2 Cihaz ve Diger Malzemeler

CO₂ inkübatörü (Thermo Fisher), Isık mikroskobu (Optech Inverted Microscope), Sıcak su banyosu (Memmert), 2-200µl Mikro pipetör ve uçları (Gilson), 200µl Multipipetör (Gilson), Elisa Reader (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK Ins.), Santrifüj (Beckman coulter microfuge 18, Nüve NF 800), Laminar kabin (Herasafe), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50), Buzdolabı (+4°C , -20°C ve -80°C derin dondurucu), Sıvı azot tankı (Union Carbide), Manyetik karıştırıcı (Isolab), Vorteks (VWR), Pipet tabancası, Kültür kapları (Orange, Iwaiki), 15 ml ve 50 ml Santrifüj tüpleri (Orange), Dondurma tüpleri, Petri kapları (Orange), Thoma lamı (Burker-Turk), Enjektör (5-20cc) (Set), Cam pipet ve pastör pipetleri (Iso-Lab), 0.22 µm'lik sırınga filtresi (Schleicher&Schuell), 0.22 µm'lik, 150 ml hacimli vakum filtresi (Milipore), 1.5ml'lik ependorf tüpleri (VWR), 2ml'lik ependorf tüpleri, Termal döngü cihazı (BioRAD), Gerçek zamanlı termal döngü cihazı IQ5 (BioRAD), Floresans mikroskobu (Nikon Eclipse Ti), Vilber Lourmat görüntüleme sistemi (Darkroom-CN-3000).

2.1.3 Kullanılan Solüsyonlar

1X Tripsin-EDTA Solüsyonu: 5 ml, 10X Tripsin-EDTA solüsyonuna 45 ml Puck'ın Salin A solüsyonun ile seyreltilmiş, ardından 1 M NaOH ve 1M HCl kullanılarak pH'sı 7.4'e dengelenmiş ve rutin kullanım için depolanmıştır.

1 M NaOH: 4.0 g NaHCO₃ steril distile suda çözülerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

2N HCl : %37'lik stok solüsyonu halinde bulunan HCl'den 16,6 ml alınarak distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Solüsyon 0.22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

1X Stok Medyum: Hücrelerin sıvı nitrojen de uzun süre saklanması için, 5 ml DMSO, 45 ml FBS'ye eklenerek % 10'luk stok medyum yapılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

10X PBS (Phosphate Buffered Saline): 1,37 M NaCl, 15 mM KH₂PO₄, 81 mM NaH₂PO₄ ve 27 mM KCl son hacim 500 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır. 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilmiştir. 1:10 oranında seyreltilerek (1X PBS) şeklinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

RNaz'sız su: 1 litre dH₂O içine 1ml DEPC eklenerek koyu renkli şişede oda sıcaklığında gece boyu karıştırıldıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

10X MOPS tamponu: 200 mM MOPS, 50 mM Na acetate, 10 mM NaOH son hacim 500 ml olacak şekilde steril edilmiş DEPC'li suda çözülerek tekrar 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

1X RNA yürütme tamponu: 100 ml 10X MOPS tamponu, 20 ml %37 formaldehit (12,3 M), 880 ml DEPC'li su eklenerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

Formaldehit Jel (% 1,2) : 0,6 gr agaroz 5 ml 10X MOPS tamponu içine eklenip son hacim 50 ml olacak şekilde DEPC'li su eklendikten sonra ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Sıcaklık 65°C'ye düştüğünde 900 µl %37 formaldehit eklenmiş ve en son olarak 7,5 µl (1mg/ml) EtBr eklenip dondurulmuştur.

IBMX: 0.00115 gr IBMX, 100 µl 0.5 N KOH içinde çözülmüş, 10 ml mediyuma 100 µl eklenerek final konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde kullanılmıştır. IBMX solüsyonu her deney için taze olarak hazırlanmıştır.

DEX: 10 mM stok hazırlanırken, 0.04 gr DEX, 10 µl %100 EtOH'de çözülmüş ve -20'de saklanmıştır. Çalışma solüsyonu için ise ana stok, 1X PBS ile 1 mM olacak şekilde seyreltilmiştir. Final konsantrasyonu 1 µM olacak şekilde besiyeri yerine eklenerek kullanılmıştır.

İnsülin: 0,01 gr insülin 0.02 M HCl'de çözülmüş (0.02 M HCl hazırlamak için 16.6 µl %37 HCl (12 M) + 983.4 µl dH₂O kullanılmıştır), uyarıcı besiyeri içinde 1:1000 oranında, final konsantrasyonu 5 µg/ml olacak şekilde kullanılmıştır.

MDI: Farklılaşma için kullanılan karışım, hazırlanmış olduğumuz IBMX, Dex ve İnsülin stok solüsyonlarının ilk olarak bir miktar besiyeri ile birlikte 0.22 mikron filtre ile sterilizasyonu takiben final konsantrasyon dikkate alınarak 3T3-L1 besiyerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Staurosporine: Bir Tirozin ve Ser/Treonin protein kinaz inhibitörü olan Staurosporin konsantrasyonu 215 µM olacak şekilde DMSO (25 mg/mL)'da çözülmüş, hazırlanmış stok solüsyon 10-20 µl alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Daha sonra çalışma solüsyonu olarak, besiyeri içinde 1:100 seyreltilerek, final konsantrasyon 20 nM olacak şekilde kullanılmıştır.

Oil Red O stok solüsyon: 0,7g. Oil Red O 200 ml isopropanol içinde gece boyu karıştırılarak çözünmesi sağlanır, daha sonra 0,2 µM filtreden geçirilerek +4°C'de ışıktan korunarak saklanır.

Oil Red O çalışma solüsyonu: Oil Red O 3:2 oranında dH₂O ile karıştırılıp oda sıcaklığında 20 dk. bekletildikten sonra ve 0,2 µM filtreden geçirilerek kullanılır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürleri

2.2.1.1. Alt Kültürleme

Pek çok hayvan hücre hattı plastik ya da cam yüzeye yapışarak, tek bir hücre tabakası oluşturacak şekilde büyümektedir. Yüzey hücrelerle tam olarak kaplandığında (confluent culture) büyüme önce yavaşlar, sonra durur. Hücrelerin büyümeye devam etmesi için düzenli aralıklarla alt kültürleme (subculturing) yapılması gerekmektedir. Alt kültürleme, hücre-hücre ve hücre-substrat arasındaki bağların tripsin, dispaz ya da kollagenaz gibi proteolitik enzimlerle kırılmasını gerektirir. Birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmış hücreler sayılır, istenilen dilüsyon yapılarak taze besi yeri içeren yeni kültür ortamına (flask, petri kabı vs.) alınır. Yeni kültür kabında hücreler önce yüzeye tutunur, daha sonra büyümeye ve bölünmeye başlar. Başlangıçta eklenen hücre sayısına, kültür koşullarına ve hücre hattına bağlı olan inkübasyon zamanının sonunda kültür, yeniden konfluent hale gelir ve alt kültürleme (pasajlama) tekrarlanır.

3T3-L1 (CL-173TM ATCC) öncül yağ hücrelerinin olgun yağ hücrelerine farklılaşma deneylerinde kullanılabilmesi dikkatli alt kültürleme gerektirmektedir. Hücrelerin karakteristik özelliklerini koruyabilmesi için birçok hücreden farklı olarak 3T3-L1 hücrelerinde alt kültürleme, %60-70 konfluent durumunda yapılmalıdır, aksi takdirde kontak haline geçmesi (hücrelerin fiziksel teması) kendiliğinden farklılaşmayı tetikleyebilmektedir.

Adipojenik karışım ile muamele edilen konfluent 3T3-L1 öncül adipositler son olarak ilk 96 saatte 2 kez daha bölünürler. Bu safha klonal genişleme olarak adlandırılır ve farklılaşma için gereklidir. Adiposit hücresi olmaya karar vermiş ve büyümesi durdurulan bu hücreler 3. günden itibaren farklılaşmaya ait geç belirteç genlerini (örneğin C/EBP α ve PPAR γ) ifade etmeye başlarlar. Bu süreci takiben hücreler 5-7 gün içerisinde yağ damlacıkları biriktirir ve olgun yağ hücrelerini oluşturmak üzere terminal farklılaşma safhasına geçerek yaklaşık iki hafta içinde

büyük yağ damlacıkları mikroskobik olarak ayırt edilir (27, 33, 43). Besi yeri değiştirilerek olgun adipositler bir ay süresince kültürde tutulabilir.

Çalışmada % 60-70 konfluent haldeki kültürler için rutin olarak yapılan alt kültürlemede izlenen protokol şu şekildedir; Kültürdeki besi yeri uzaklaştırılır, 1X PBS ile yıkama yapılır, 1X tripsin-EDTA ile muamele edilen hücreler 37°C, % 5 CO₂ inkübatöründe hücreler yüzeyden ayrılana kadar, 1-2 dakika inkübe edilir, taze besi yeri kullanılarak enzimatik reaksiyon durdurulur ve hücre süspansiyonu falkon tüplere alınır, 1000 rpm'de, 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülür, oluşan hücre peleti taze besi yerinde çözüldükten sonra bir miktar örnek alınarak hücre sayımı yapılır. 3T3-L1 hücre hattı için DMEM besi yerinde 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapılır ve hücreler % 5 CO₂, nemli CO₂ inkübatöründe, 37°C'de büyütülür. Hücreler büyüme yüzeyini %70 kapladığında 1:10 alt pasajlama yapılarak deney protokolüne uygun olarak farklılaşma için kullanılır.

2.2.1.2 Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

%60-70 konfluent durumdaki hücreler, tripsin muamelesi ve pelet oluşumunu takiben, 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde % 10 DMSO (Dimetil Sülfoksit) içeren besi yerinde süspanse edilir ve süspansiyon 2.0 ml'lik kriyo tüplere alındıktan sonra ATCC'nin bu hücreler için önerdiği sıvı azot tankının buhar fazında uzun süre depolanabilir.

Dondurulmuş hücreleri çözme işlemi ise 37°C su banyosunda yapılmıştır. Yaklaşık 90 saniyede yarı çözünmüş haldeki hücre süspansiyonu %10 DMSO'yu uzaklaştırmak amacı ile içinde 9 ml DMEM besi yeri bulunan falkon tüpe aktararak 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant vakum ile uzaklaştırıldıktan sonra taze besi yeri ile yeniden süspanse edilir. Hücreler yeni petri kabına aktarıldıktan sonra yaklaşık 10 ml. taze besi yeri eklenerek % 5 CO₂, % 95 hava içeren, 37°C'de inkübe edilir. Her iki günde bir besi ortam taze olanı ile değiştirilir.

2.2.1.3 Hücre Sayımı

Hücreler alt kültürleme için tripsin ile kaldırıldığında hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak 20 µl tripan mavisi ile karıştırılmış ve thoma lamı kullanılarak hücre miktarı tayin edilmiştir.

2.2.2 Adiposite Farklılaşma Deneyi

Adipojenik karışım (MDI) ile muamele edilen konfluent 3T3-L1 öncül adipositler eş zamanlı olarak farklılaşabilmektedir. En yüksek farklılaşma, hücre içi cAMP seviyesini arttıran insülin (glukokortikoid) ajanının muamelesi ve fetal bovin serum (FBS) ile elde edilmiştir. Sentetik glukokortikoid uyararı Dekzametazon (DEX), glukokortikoid reseptör yolağını stimüle etmek için kullanılmaktadır. cAMP-fosfodiesteraz inhibitörü olan Metilisobütillsantin (MIX), cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA) yolağını stimüle etmek için kullanılmaktadır. Adipojenik uyarıyı takip eden 3 gün içinde hücreler son olarak klonal genişleme olarak adlandırılan son iki mitotik bölünmeye uğradıktan sonra hücre döngüsünden ayrılarak farklılaşma için uygun hale gelirler. Adiposit hücresi olma kararlılığındaki bu hücreler 3. günden itibaren farklılaşmaya ait geç belirteç genleri olan C/EBPα ve PPARγ genlerini ifade etmeye başlarlar. Bu süreyi takiben hücreler 5-7 gün içerisinde yağ damlacıkları biriktirir ve olgun yağ hücrelerini oluşturmak üzere terminal farklılaşma geçirmeye başlarlar. Bu safhada olgun adiposit genlerini (perilipin, HSL) ifade ederler (27, 33, 43).

3T3-L1 öncül adipositlerin farklılaşması için yoğun şekilde kullanılan protokol şu şekildedir; bir kaç gün önceden uygun hücre yoğunluğunda başlatılan 3T3-L1 öncül adipositlerin %100 konfluent olduktan 48 saat sonra besi yeri, farklılaşmayı uyarmak için MDI içeren besi yeri ile değiştirilir (0. gün), iki gün farklılaşma besi yerinde bekletilen 3T3-L1 hücreleri 5 µg/ml insülin içeren koruyucu besiyeri ile yer değiştirilir. Bu her iki günde bir tekrarlanarak 16. güne kadar tekrar edilir.

2.2.3. Staurosporin Etkin Konsantrasyon ve Süre Tayini

3T3-L1 öncül adiposit hücreleri, kardeş hücre hattı olan 3T3-F442A hücrelerinde daha önce rapor edilen etkin 11 nM St. konsantrasyonunu tatbik edilebilirliğini belirlemek için farklı St. konsantrasyonlarında farklılaşmanın maksimum toksik etkinin ise minimum olduğu noktalar saptanmıştır. Bu amaçla 3T3-L1 hücreleri farklı St. konsantrasyon ve sürelerde olmak üzere 96 kuyucuklu yüzeye 1×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Tablo 2.1. Staurosporin etkin konsantrasyon (A) ve süre (B) tayini.

A)

5nM St.	10nM St.	20nM St.	30nM St.	40nM St.	Kontrol
6 saat	6 saat	6 saat	6 saat	6 saat	1.Kontrol
6 saat	6 saat	6 saat	6 saat	6 saat	2.Kontrol
12 saat	12 saat	12 saat	12 saat	12 saat	3.Kontrol
12 saat	12 saat	12 saat	12 saat	12 saat	4.Kontrol

B)

20nM St.	20nM St.	20nM St.	20nM St.	Kontrol
24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	1. kontrol
24 saat	48 saat	72 saat	96 saat	2. kontrol

96 kuyucuk formatında hücelere Tablo 2.1’de gösterilen süre ve konsantrasyonlarda St. eklenmiştir. Hücreler 8. gün sonunda Oil Red O ile boyanarak ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Buna paralel olarak Oil Red O’nun maksimum absorbans gösterdiği 490 nm’de absorbans değerleri belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon ve süre aralığı iki kez tekrarlanmış olup büyüme eğrileri, Microsoft Excel programı kullanılarak, veriler arasındaki ilişki analiz edilmiştir.

2.2.4. MDI, St. (20nM) ve MDI+St. (20nM) Uygulanmış 3T3-L1 Hücrelerinde Adipoz Farklılaşmasının Karşılaştırılması

24 kuyucuklu formatta 3T3-L1 hücrelerinde oluşan farklılaşma oranını belirlemek amacı ile ilk olarak yağ birikimini nicel olarak analiz edebilmek için hücelere 0. günde MDI, St. (20nM) ve MDI+St. (20nM) maddeleri eklenmiştir. Sırası ile %100, %100 + 2.gün (0. gün), 2.gün, 4. gün, 8. gün ve 16. günlerde

hücreler sayılmış, Oil Red O boyama yapıp 490 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş, veriler Excel çalışma programı ile analiz edilmiştir.

Tablo 2.2. Adiposit farklılaşmasında madde uygulama zaman dilimleri.

-2.gün (%100 konfluent)	0.gün (%100+2.gün)	2. gün	4. gün	8. gün	16. gün
Adipojenik olmayan besiyeri	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol	Kontrol
Adipojenik olmayan besiyeri	MDI	İnsülin (5µg/ml)	İnsülin (5µg/ml)	İnsülin (5µg/ml)	İnsülin (5µg/ml)
Adipojenik olmayan besiyeri	St. 20 nM	Adipojenik olmayan besiyeri	Adipojenik olmayan besiyeri	Adipojenik olmayan besiyeri	Adipojenik olmayan besiyeri
Adipojenik olmayan besiyeri	MDI+St.20nM	İnsülin (5µg/ml)	İnsülin (5µg/ml)	İnsülin (5µg/ml)	İnsülin (5µg/ml)

2.2.5. Oil Red O Boyama

Farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde oluşmuş yağ damlalarını belirlemek amacı ile diğer boyalara göre yağ içinde daha çabuk çözünebilen ve trigliseritlere bağlanma özelliği bulunan Oil Red O boyama tekniği kullanılmıştır. Boyama işlemi için, farklılaşmanın tamamlandığı 16. günde ortamdaki besi yeri çekilir ve %10 formaldehit içeren PBS eklenerek oda sıcaklığında 5 dak. beklenir, %10 formaldehit içeren PBS çekilir. Bu işlem yeniden tekrar edilir fakat bekletme süresi en az 1 saat sürdürülür. Her bir kuyucuk %60 isopropanol ile yıkanır, hücreler oda sıcaklığında veya 50°C'de tamamen kuruyuncaya kadar beklenir. Taze olarak hazırlanmış olan Oil Red O boyası eklenir ve oda sıcaklığında 10 dak. beklenir, her bir kuyucuk 4 kez dH₂O ile yıkanır. Hücrelerin bulunduğu yüzeyin tamamen kuruması beklendikten sonra oluşan yağ damlacıkları floresan veya ışık mikroskobu ile görüntülenebilir.

Yağ damlacıklarına bağlanan Oil Red O miktarı yağın miktarı ile doğru orantılı olduğundan 490 nm’de ölçülen Oil Red O miktarı doğrudan farklılaşma hakkında bilgi verir. Absorbans değeri ölçümü için %100 isopropanol eklenir ve en az 10 dak. beklendikten sonra ELİSA okuyucu’da 490 nm’de absorbans değerleri belirlenir.

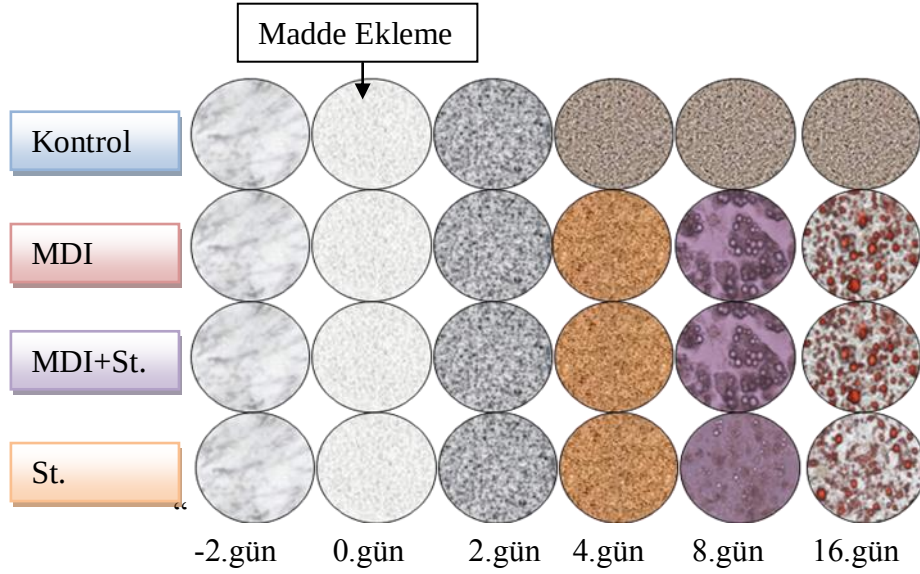
Tablo 2.3. Oil Red O boyamada kullanılan kimyasal miktarları.

Plate	Formalin	%60 izopropanol	Oil Red O	%100 izopropanol
24 well	500 µl	500 µl	200 µl	750 µl
12 well	1 ml	1 ml	400 µl	1,5 µl
6 well	2,4 ml	2,4 ml	1 ml	3,6 ml

2.2.6. Total RNA İzolasyonu

SIK2 ifadesine ek olarak adiposit farklılaşma markörü olarak bilinen özgün birincil (C/EBP β) ve ikincil (C/EBP α , PPAR γ) genlerin ifade düzeylerinin RT-PCR yöntemi ile nicelik olarak analiz edilebilmesi için öncelikli olarak, 3T3-L1 preadipositler farklılaşma deneyleri için her bir 10 cm petride 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve Tablo 2.2.’deki protokole uygun olarak hücrelere 0. günde MDI, St. (20nM), MDI+St. (20nM) veya hiçbir madde içermeyen kontrol grubu 48 saat muamele edildikten sonra sadece MDI ve MDI+St. uygulanan gruplar insülin içeren besi ortamı ile her iki günde bir tazalenerak 16 gün boyunca farklılaşmaya tabi tutulmuşlardır. Kontrol ve St. grubu ise insülin içermeyen normal besi yerinde aynı şekilde tutulmuştur. Besi yeri her iki günde bir 16. güne kadar değiştirilmiştir. Tablo 2.4.’de gösterilen zaman dilimlerinde total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Tablo 2.4. Total RNA izolasyonu yapılan zaman dilimleri. Farklılaşma deneyi içinde dört grup yer almaktadır. Sırası ile 0. Gün olarak tabir edilen safhada kontrol grubuna sadece normal besi yeri, 2. 3. ve 4. guruba ise MDI, MDI+St. veya St. eklenerek 48 saat, 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır ve ardından sadece MDI ve MDI+St. uygulanan gruplar insülin içeren besi ortamı ile her iki günde bir tazalenecek 16 gün boyunca farklılaşmaya tabi tutulmuşlardır. Kontrol ve St. grubu ise insülin içermeyen normal besi yerinde aynı şekilde tutulmuştur. Belirtilen tüm zaman aralıkları için total RNA izolasyonları cDNA sentezlerinde kullanılmak üzere yapılmıştır.



Çoğu hücre tipinde total RNA'nın yaklaşık % 80'ini rRNA'lar oluşturur, kalan RNA'nın çoğunu tRNA'lar ve minör kısmını da mRNA'lar oluşturur. Bu yüzden total RNA içeriği aslında her bir hücrenin ribozom sayısının bir göstergesidir ve hücrenin potansiyel translasyonunu yansıtır. Yıkılmamış sağlam total RNA'da 28S ve 18S rRNA oranı 2:1 gibidir ve agaroz jelde parlak ve net bir görüntü ile ayırt edilirler. Ayrıca bu iki net bant dışında smear oluşmaması da RNA kalitesi açısından önemlidir.

RNA izolasyonunda ilk olarak hücreler lizis tamponu ile parçalanır ve eş zamanlı olarak RNA yıkımına neden olan nükleazlar inhibitör varlığı ile yok edilir. Nükleik asitler kolona bağlanır ve geride kalmış olabilecek DNA, DNaz I ile kesilir. RT-PCR için inhibitör olabilecek kontaminantlardan kurtulmak için kolona bağlı durumda olan nükleik asitler, özel inhibitör çıkarıcı tamponları ile yıkanır. Ortamda bulunan tuz, protein ve diğer hücre kirliliklerinden, kolona bağlı olan RNA'yı

ayırmak için tekrar yıkama yapılır. Son olarak RNA kolondan ddH₂O kullanılarak ayrıştırılır ve kullanılmak üzere -80°C’de saklanır.

Farklılaşmayı müteakip hücrelerde yağ içeriğine bağlı olarak, deney gruplarında iki farklı RNA izolasyon kitinin kullanımı tercih edilmiştir. Yağ sentezinin henüz mikroskobik olarak saptanmadığı MDI, St ve MDI+St. deney setleri için -2, 0 ve 2. gün ve kontrol grubunun tamamında high pure RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. İzlenen protokol şu şekildedir; -2. gün, 0. gün ve 2. güne ait daha çok morfolojik olarak fibroblast özelliği gösteren ve yağ damlacığı içermeyen adiposit olma kararında 3T3-L1 hücreleri 1X Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılmış, 1200 rpm’de 4 dak. santrifüj edildikten sonra üst sıvı uzaklaştırılarak oluşan pelet üzerine 200 µl RNAaz içermeyen 1XPBS eklenerek süspanse edilmiştir. Daha sonra hücreleri parçalamak amacı ile 400 µl lizis tamponu eklenerek 15 sn. süre ile vortekslenmiştir. Oluşturulan hücre sitoplazmik eriyiği RNA bağlanma kolonuna aktararak 8000xg’de 15 sn. santrifüj edilmiştir. DNA kontaminasyonunu yok etmek için 90 µl DNaz inkübasyon tamponu + 10 µl DNaz I = 100 µl kolona eklenerek 15 dak. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak kolonlar etanol ile bir kaç kez yıkandıktan sonra, 1,5 ml. ‘lik yeni bir ependorfa alınıp kolon üzerine 60 µl ddH₂O eklenip 1-2 dak. beklendikten sonra 8000xg’de 1 dak. santrifüj edilmiştir (Tüm santrifüjler oda sıcaklığında yapılmıştır.). RNA’lar kantitatif miktar tayinleri OD₂₆₀ saptandıktan sonra niteliksel özellikleri için agaroz jel ile analiz edilmiştir. RNA örnekleri cDNA sentezi için kullanımlarına kadar -80°C’de saklanmıştır.

3T3-L1 hücrelerinde farklılaşmanın ve yağ damlalarının oluşumu, High Pure RNA İzolasyon Kitinin yağları uzaklaştırmaya yönelik fenol saflaştırması içermemesi nedeni ile yağ damlalarının yoğun olarak gözleendiği 4. gün/ 8. gün/ 16. gün RNA izolasyonları için sorun oluşturduğu için Qiagen Lipid RNeasy Mini İzolasyon Kiti kullanılmıştır. Bu amaçla high pure RNA izolasyonunda olduğu gibi ilk olarak hücrelerin çökeltilmesi ile elde edilen pellet üzerine fenol içeren 1 ml Qiazol eklenerek hücreler 15 saniye vortekslenmiştir. Fenollü hücre içeriği 2ml’lik ependorf tüpe alınıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiş daha sonra üzerine 200 µl kloroform eklenip 15 saniye vortekslenmiş ve yeniden oda sıcaklığında 2-3 dakika beklenmiştir. +4°C’de 12000 xg 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz çekilip yeni 2 ml’lik tüpe aktarılmıştır. Eşit miktarda RNAaz free %70 EtOH eklenip birkaç

kez çalkalanarak süspanse olması sağlanmıştır. Oluşan süspansiyon RNA kolonuna yüklenerek 8000xg 15 sn santrifüj edilmiştir. Kolona, guanidin tiosiyanat içeren 700 µl RW1 eklenmiş 8000 xg'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Kolon 2 kez etanol içeren 500 µl RPE ile yıkandıktan sonra yeni bir tüpe aktarılarak 14.000rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. RNA'lar son olarak 1,5 ml'lik tüpe aktarılarak 60 µl ddH₂O ile kolondan geri kazanılmıştır. Bir önceki RNA izolasyonu protokolünde olduğu gibi, elde edilen RNA örneklerinin OD₂₆₀ ve FA agaroz jel analizleri yapıldıktan sonra -80°C'de saklanmıştır.

Elde edilen RNA örneklerinin ölçümleri A₂₆₀ ve A₂₈₀ absorbans değerlerinde yapılmıştır ve blank olarak RNA'ları çözmek için kullanılan DPEC ile muamele edilmiş su kullanılmıştır. Elde edilen total RNA'ların ortalama A_{260/280}= 1,8-2,1 değerleri arasında olması nitelik olarak kaliteli ve saf olarak elde edilmiş RNA'yı işaret etmektedir.

OD₂₆₀ değerleri kullanılarak RNA miktarları (ng/µl)= 40 X A₂₆₀ X 90 (dilüsyon faktörü) formülüne göre hesaplanarak bir sonraki cDNA sentezi için kullanılacak RNA miktarları belirlenmiştir.

2.2.7. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılmıştır. cDNA sentezinde her bir reaksiyon için PCR tüpüne 1 µl oligo (dT) ve ilgili örnekten 500ng total RNA eklenmiş ve final volüm 11,4 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır. Bu öncül karışım 65°C'de 10 dakika inkübasyon sonrası hemen buza alınmıştır ve daha sonra 5X ters transkriptaz tamponu, RNaz inhibitörü, DTT ve son olarak Ters Transkriptaz enzimi eklenerek 50°C'de 30 dakika ve ardından 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Hemen buza alınan cDNA örnekleri daha sonra kantitatif RT-PCR deneylerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

2.2.8. Kantitatif RT-PCR

3T3-L1 öncül adiposit hücrelerinde farklılaşmanın uyarılmasını takiben SIK2 mRNA seviyesinin ilk bir saat içerisinde artmaya başladığı ve sonra bir miktar azalarak devam ettiği bilinmektedir. *Horike et. al.*, SIK2'nin özellikle *db/db* farelerin yağ dokusunda yüksek miktarda bulunduğunu ve aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. SIK2'nin 3T3-L1 farklılaşmasının erken cevap genlerinden C/EBP β ve C/EBP δ ile benzer biçimde ilk 24 saatte artış gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca yine bu hücrelerde ikincil cevap genleri olarak bilinen C/EBP α ve PPAR γ mRNA seviyelerinin ise 2.-4.gün arası yükselmeye başladığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde, SIK2'nin bu genlerin ifadeleri ve dolayısı ile farklılaşma üzerine etkisini gösteren bilgilerimiz eksik ve yetersizdir.

Bu amaç doğrultusunda SIK2 aktivitesinin özgün inhibitörü olan Staurosporin kullanılarak bu aktivite eksikliğinin farklılaşmaya özgü yukarıda bahis edilen gen ifadeleri üzerine etkisi kantitatif RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir.

Bunun dışında farklılaşma morfolojik olarak Oil Red O boyama ile görsel açıdan ve spektroskopik olarak biyokimyasal açıdan nicel olarak analiz edilmiştir. Farklılaşmanın farklı safhalarında elde edilen total RNA'lerden sentezlenen cDNA'ların test edilmesine yönelik olarak 3T3-L1 hücrelerinde ifade edilen SIK2 geninin özgül primerleri ile çoğaltılması yoluna gidilmiştir.

Tablo 2.5. Kantitatif RT-PCR yapılan SIK2, PPAR γ ve β -aktin genlerinin özgül primerleri.

	İleri Primerler	Geri Primerler
SIK2	5'- TCCAAGACCTTTCGAGCAGT	5'-GGAAGAGTCGCTTCTGTTGG
PPARγ	5'-ATGGAAGACCACTCGCATTC	5'-AACCATTGGGTCAGCTCTTG
β -aktin	5'-TGATCCACATCTGCTGGAAG	5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG

SIK2 aktivitesinin kimyasal inhibitörünün varlığında farklılaşma için uyarılan 3T3-L1 hücrelerinde SIK2 ve PPAR γ gen ifadeleri üzerine etkisini analiz etmek amacı ile kantitatif RT-PCR kullanılarak farklılaşmaya özgün genlerdeki ifade değişiklikleri göreceli olarak $\Delta\Delta C_T$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Kısaca, cDNA'lar 1:10 oranında seyreltildikten sonra total volüm 25 μ l olacak şekilde, SYBR green 12,5 μ l, İleri primer 1 μ l (0,5 μ M), Geri primer 1 μ l (0,5 μ M), dH₂O 9,5 μ l, reaksiyonu kullanılarak, kuyucuk sayısı ile çarpılacak karışım olarak hazırlanmıştır. En son olarak cDNA 1 μ l eklenerek iQ5 (BioRad) gerçek zamanlı termal döngü cihazı kullanılarak oluşan veri analizleri BioRad iQ5 optik sistem yazılımı 2.0 ve Microsoft Excel'de analiz edilmiştir.

Referans gen olarak β -aktin kullanılmıştır. PCR verimliliğinin belirlenmesi için standart olarak β -aktin bir seri seyreltme yapılarak (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) belirlenmiştir. β -aktin için E= %95 (1,95) korelasyon katsayısı (R²) ise 0,96 olarak elde edilmiştir. Analizlerde hiçbir madde içermeyen kontrol grubu kalibratör olarak kullanılarak SIK2 ve PPAR γ gen ifadelerindeki göreceli değişiklikler bulgular bölümünde gösterilmiştir.

Kantitatif RT-PCR'da kullanılan içeriklerde olabilecek istenmeyen kontaminasyonları test etmek amacı ile cDNA içermeyen kontrol her plate için ayrıca hazırlanmıştır. Son olarak bütün değişimler -2 veya 0. güne normalize edilerek artma veya azalma şeklinde grafiklerde yer almıştır.

Tablo 2.6. Kantitatif RT-PCR'da kullanılan döngü programı.

95°C	3 dakika	} 40 döngü
94°C	10 saniye	
57°C	20 saniye	
72°C	1 dakika	
95°C	1 dakika	
55°C	1 dakika	} 77 döngü
55°C	10 saniye 0,5°C (sıcaklık artma sekmesi) 93°C	

2.2.9 C/EBP β ve C/EBP α 'nın Yarı Kantitatif RT-PCR Analizleri

Hem incelenmek istenen C/EBP β ve C/EBP α hem de normalize etmek için β -aktin genleri kantitatif RT-PCR deneyinde kullanılan cDNA örneklerine özgün primerler (Tablo 2.7.) kullanılarak farklı döngü sayılarında çoğaltılarak agaroz jelde görüntülenmiştir. C/EBP β ve C/EBP α PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında Vilber Lourmat Dijital Jel Görüntüleme Sistemi ile dansitometrik olarak ölçümleri yapılmış ve referans gen olarak β -aktin geni kullanılmıştır. EtBr ile boyanmış jel görüntüsünün yoğunluk ölçümleri önce kendi pozitif kontrolü olan β -aktin ile oranlanmış daha sonra her bir deney grubu (MDI, St ve MDI+St.) kontrol grubuna göreceli değişim olarak grafik analizleri Microsoft Excel programı ile yapılmıştır. Her bir deney en az iki kez tekrar edilmiştir.

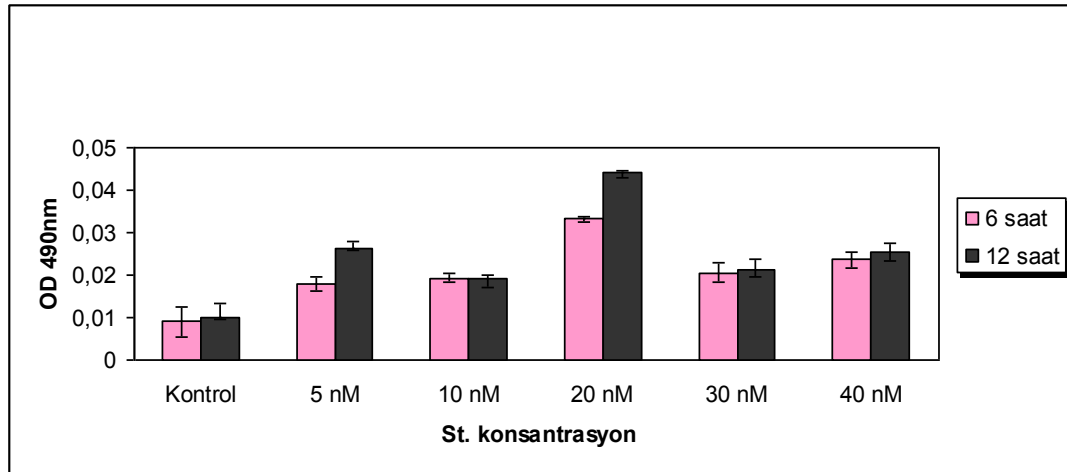
Tablo 2.7. Yarı kantitatif RT-PCR yapılan C/EBP β , C/EBP α ve β -aktin genlerin özgül primerleri.

	İleri Primerler	Geri Primerler
C/EBPβ	5'-GGTTTCGGGACTTGATGC	5'-TTACACGTGTGTTGCGTCAG
C/EBPα	5'-TAGGTTTCTGGGCTTTGTGG	5'-GGATGGATCGATTGTGCTTC
β - aktin	5'-TGATCCACATCTGCTGGAAG	5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG

3. BULGULAR

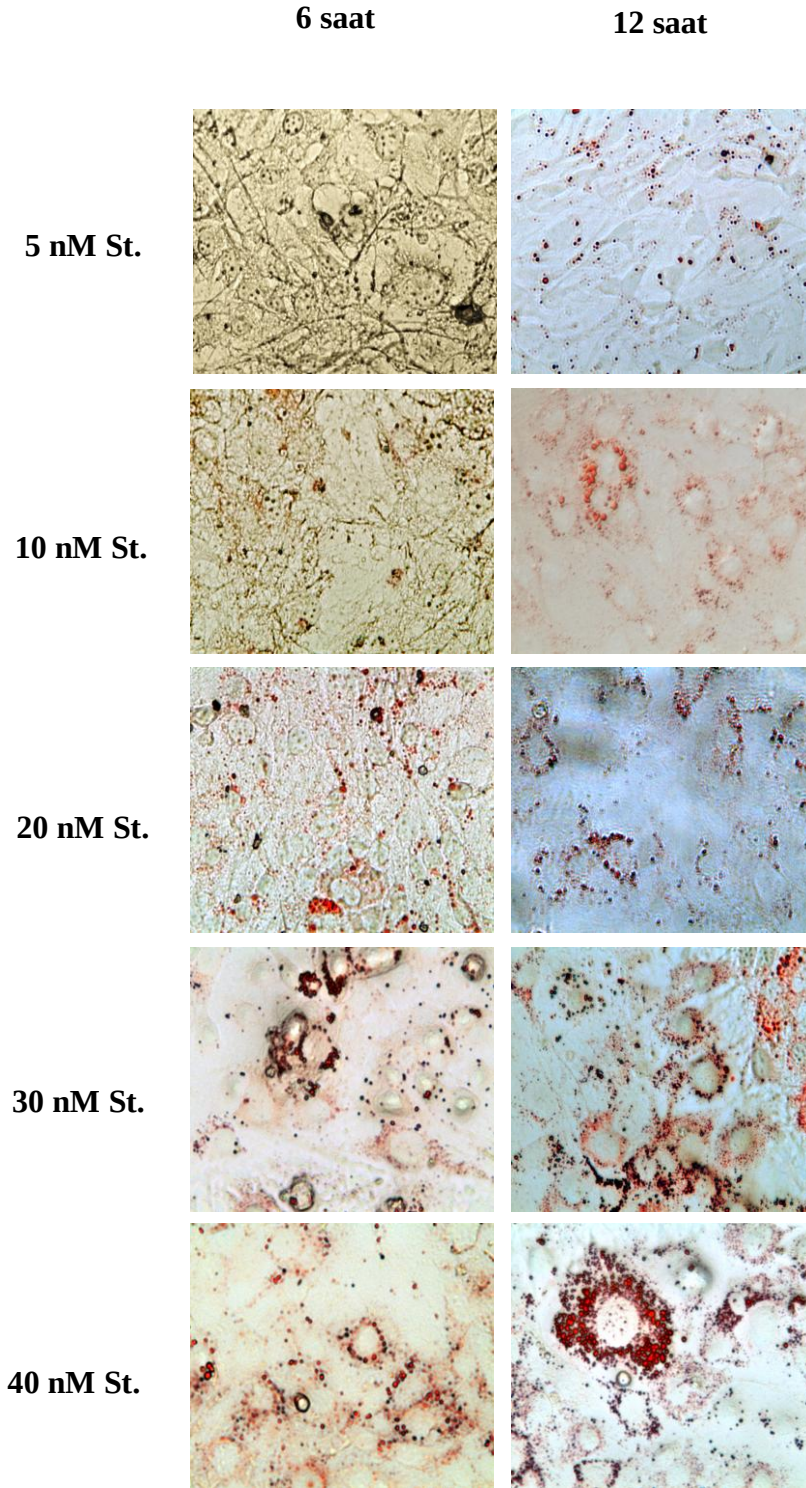
3.1. Staurosporin Optimal Konsantrasyon ve Süre Tayini

3T3-L1 öncül adiposit hücreleri birkaç gün yüzeyi tamamen kaplamalarına izin verildikten 48 saat sonra normal besi yeri, belli konsantrasyon ve sürelerde Staurosporin içeren uyarıcı besi yeri ile değiştirilmiştir (Tablo 2.1). Staurosporinin farklılaşma üzerine etkisi en kısa yoldan farklılaşma ile orantılı artan hücresel yağ içeriğinin spektroskopik ölçümü ile analiz edilmiştir. Oil Red O 490-520nm maksimum absorbands göstermektedir ve Elisa okuyucuda 96 kuyucuk formatında her bir St. konsantrasyonu için üç kuyucuktan elde edilen absorbands değerleri kuyucuk sayısına bölünerek hücrelerin ortalama trigliserit içerikleri bulunmuştur.



Şekil 3.1. Adiposit Farklılaşması için Optimal Staurosporin Konsantrasyon Tayini.

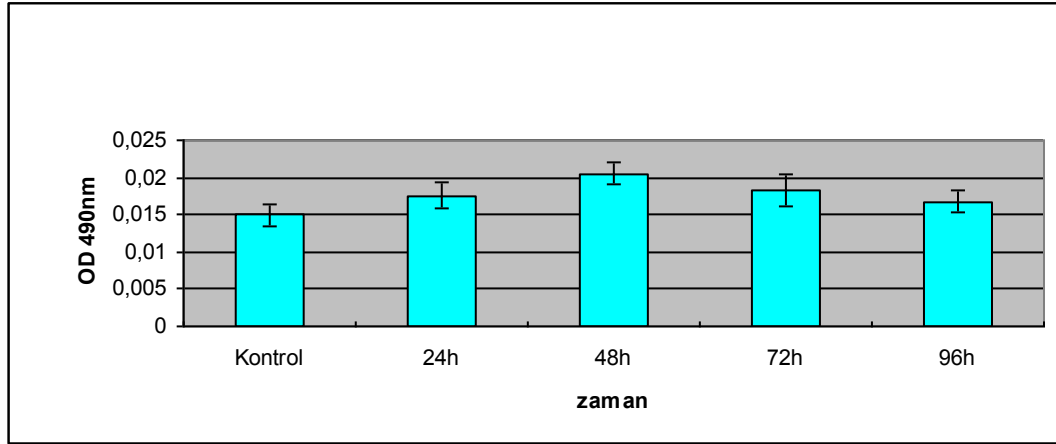
20 nM St. konsantrasyonu uygulanmış hücrelerdeki farklılaşmanın, 5 ve 10 nM St. konsantrasyonu uygulanmış hücrelere oranla nispeten daha fazla olduğu belirlenmiştir ve inhibitörün toksik etkisinden dolayı 30 ve 40 nM St. konsantrasyonu uygulanmış hücrelerde ise istenmeyen hücre ölümleri ve buna bağlı yağ içeriğinde azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.1). Bu sonuçlara dayanarak farklılaşma deneylerinde etkin konsantrasyon olarak 20 nM St. kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.2. Adiposit Farklılaşması için Etkin Staurosporin Konsantrasyon Tayininin 16. gününde Oil Red O ile boyama sonrası görüntülenmesi (Floresan mikroskobu, 40X büyütme).

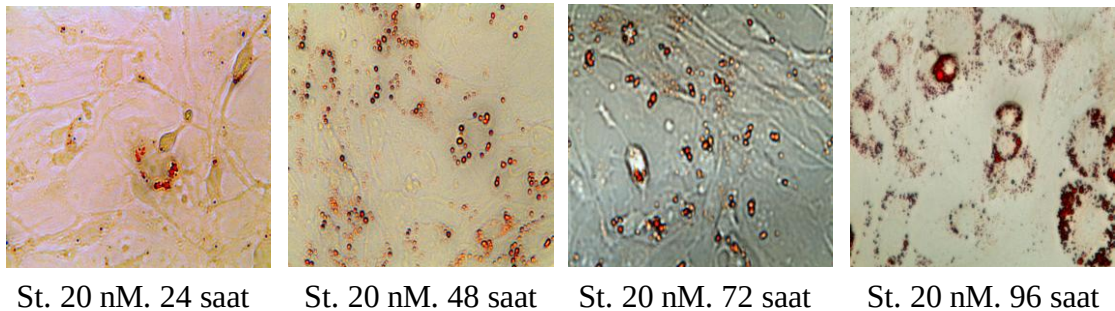
Belli konsantrasyon değerlerinde St. ile muamele edilip 16. gününde Oil Red O ile boyanmış 3T3-L1 adiposit hücreleri gösterilmiştir (Şekil 3.2). Şekil 3.1’de elde edilen bulgular sonucunda, 30 ve 40 nM St. konsantrasyonunun hücelere toksik

etkisi ve dolayısı ile hücre ölümleri olması nedeni ile 20 nM St. konsantrasyonu kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.3. Staurosporin ile muamele süresinin farklılaşma üzerine etkisi.

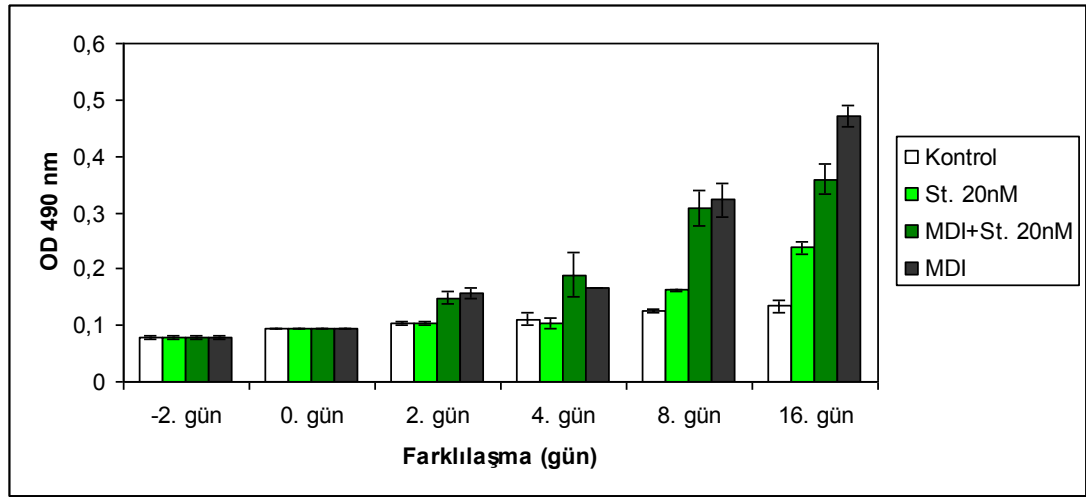
Farklılaşma üzerine etkin muamele süresinin belirlenmesi amacı ile 20 nM Staurosporin konsantrasyonunda Şekil 3.3’de gösterilen zaman sürelerince (24/48/72 ve 96 saat) 3T3-L1 öncül adiposit hücrelerine 20 nM St. uygulanmış ve farklılaşmanın 8. gününde hücresel yağ içeriğini belirlemek amacı ile Oil Red O boyama, hücre sayımı ve 490 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Deney sonucunda 48 saat boyunca 20 nM St. ile muamele edilmiş hücreler 24 saat muamele edilene oranla daha fazla farklılaşmıştır. Yüksek St. konsantrasyon ve süresinin hücrelere toksik etkisinden dolayı 72/96 saat St. ile muamele edilmiş hücrelerde ise 48 saate oranla hücre sayısında azalma olduğu için 3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde farklılaşmaya yönelik deneylerde 20 nM St. 48 saat süre ile kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Staurosporin ile muamele süresinin farklılaşma üzerine etkisinin 8. gününde Oil Red O ile boyama sonrası görüntülenmesi (Floresans mikroskobu, 40X büyütme).

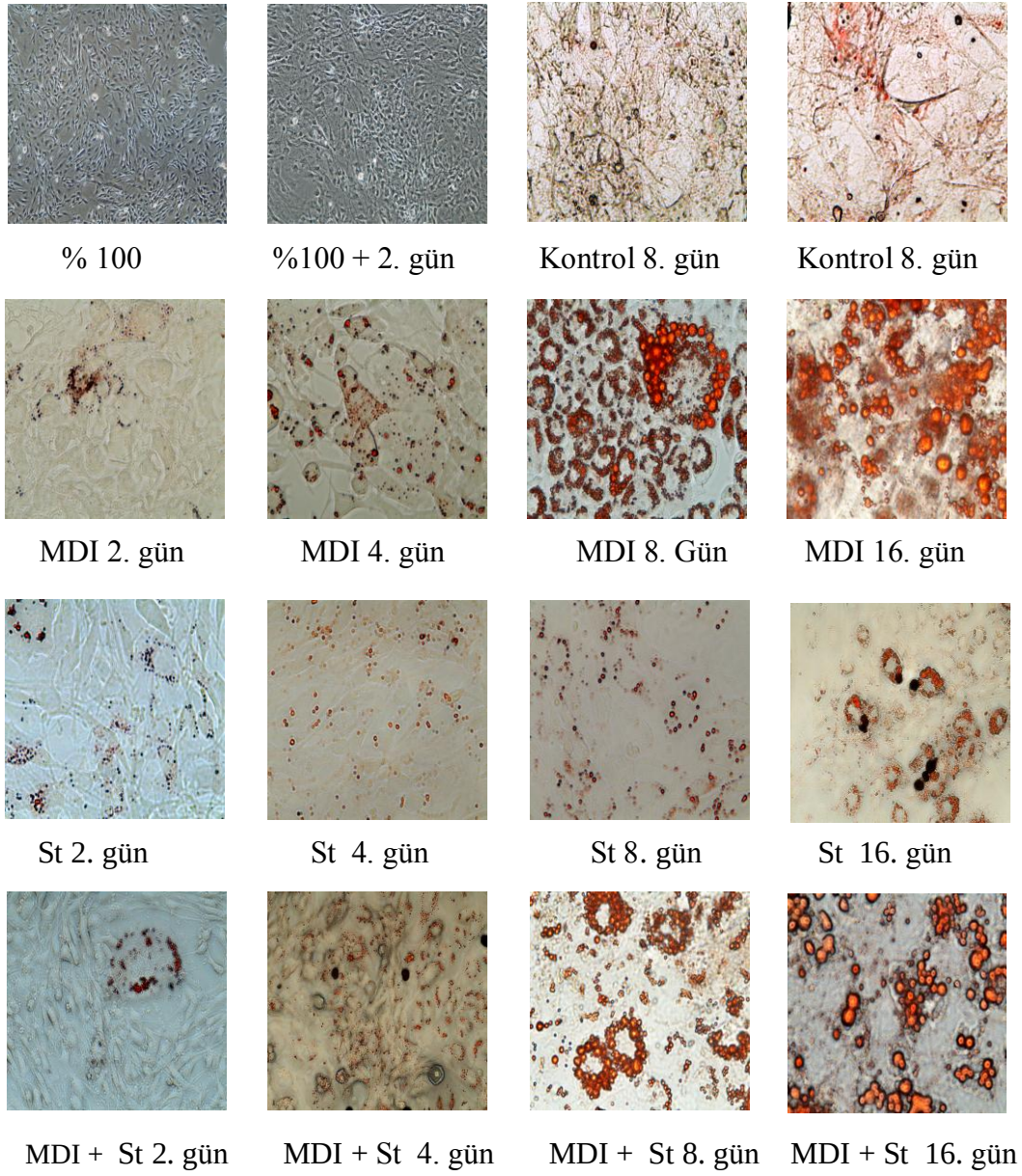
3.2. Staurosporin'in 3T3-L1 Öncül Adiposit Hücrelerinden Adiposit Hücrelerine Farklılaşma Sürecine Etkisi

24 kuyucuklu formatta MDI, St. (20nM) ve bunun dışında MDI+St. (20nM) uyarıcı besiyeri eklenecek şekilde deney düzeneği kurulmuştur. Hücrelerin yüzeyi tamamen kapladığı an -2. gün olarak adlandırılmış ve 48 saat sonraki zaman dolayısı ile 0. gün olarak isimlendirilmiştir. Bu şekilde -2. gün, 0. gün, 2. gün, 4. gün, 8. gün ve 16. günlerde hücre sayımı, Oil Red O boyama ve 490 nm'de absorbanans değerleri ölçülmüş ve elde edilen veriler Şekil 3.5'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Farklılaşma süresince artan TG miktarının Oil Red O kullanılarak spektroskopik olarak tayin edilmesi.

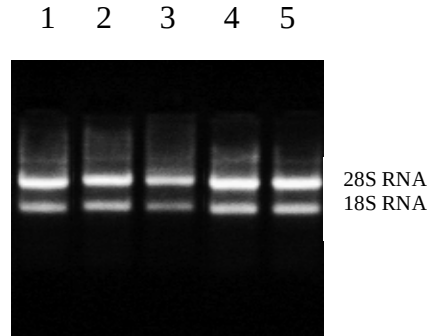
Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'da görüldüğü gibi MDI, St. ve MDI+St. uygulanmış 3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde en yüksek farklılaşma MDI uygulanmış hücrelerde gözlenmiştir. MDI+St. uygulanmış hücreler sadece St. uygulanmış hücelere oranla yaklaşık %40 daha fazla farklılaşmış fakat yalnızca MDI uygulanmış hücelere oranla %30 daha düşük oranda farklılaşma göstermiştir. 3T3-L1 hücrelerinde Staurosporin muamelesi ile oluşturulan adiposit farklılaşması, MDI ve MDI+St. uygulanmış hücelere oranla çok daha azdır.



Şekil 3.6. 3T3-L1 Öncül Adiposit Hücrelerinden, Adiposit Hücrelerine Farklılaşma Sürecinde Oil Red O ile boyama sonrası görüntülenmesi (Floresan mikroskobu, 40X büyütme).

3.3. Total RNA İzolasyonu

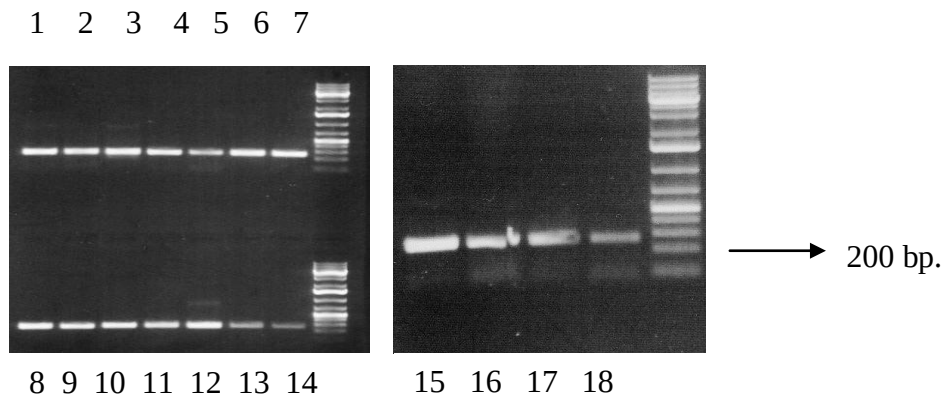
3T3-L1 hücrelerinde, -2. gün, 0. gün, MDI, St. 20 nM ve MDI+St. 20 nM uyarıcı besiyeri ekleme sonrası 2. gün, 4. gün, 8. gün ve 16. gün Total RNA izolasyonu yapılarak %1,2'lik formaldehit jele yüklendikten sonra EtBr ile boyanarak U.V. altında görüntüsü alınmıştır.



Şekil 3.7. RNA izolasyonu sonrası %1,2'lik formaldehit jel görüntüsü. **1)** Kontrol 4. gün **2)** MDI 4. gün **3)** St. 4. gün **4)** MDI+St. 4. gün **5)** MDI 8. gün.

3.4. cDNA Kontrolü

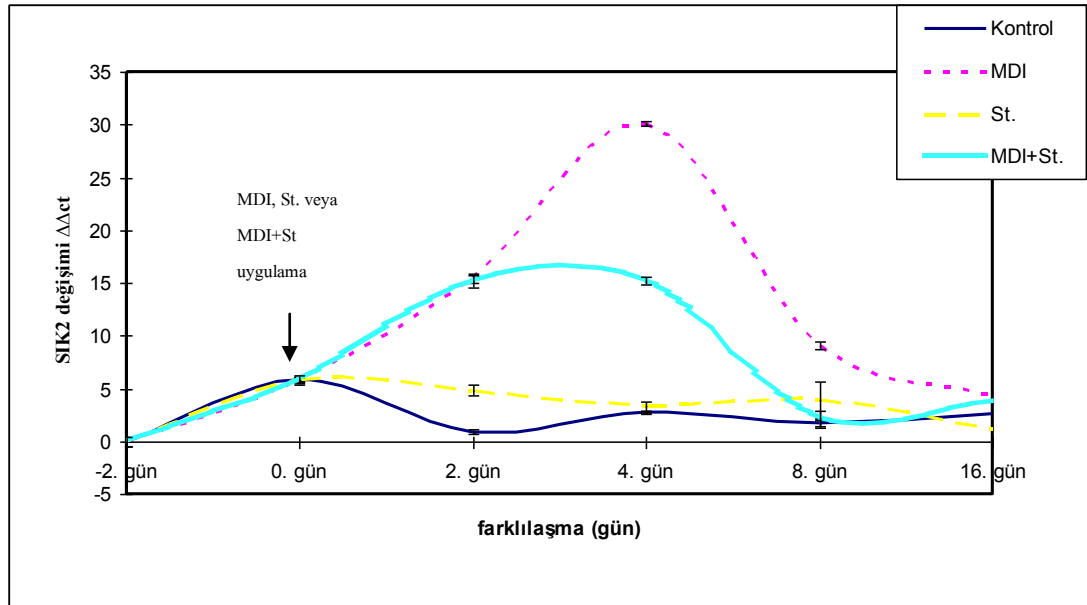
Sentezlenen cDNA'ların test edilmesine yönelik olarak 3T3-L1 hücrelerinde ifade edilen SIK2 geninin özgül primerleri ile çoğaltılarak %1,5'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. cDNA'ların test edilmesine yönelik 3T3-L1 hücrelerinde ifade edilen SIK2 geninin özgül primerleri ile çoğaltılıp %1,5'lik agaroz jel görüntüsü. **1)** Kontrol 2.gün **2)** Kontrol 4.gün **3)** Kontrol 8.gün **4)** Kontrol 16.gün **5)** MDI 2.gün **6)** MDI 4.gün **7)** MDI 8.gün **8)** MDI 16.gün **9)** St. 20nM 2.gün **10)** St. 20nM 4.gün **11)** St. 20nM 8.gün **12)** St. 20nM 16.gün **13)**MDI+St.20nM 2.gün **14)**MDI+St.20nM 4.gün **15)**MDI+St.20nM 8.gün **16)**MDI+St.20nM 16.gün **17)** -2.gün (%100) **18)** 0. gün (%100+2.gün).

3.5. Staurosporin'in Farklılaşma Süresince SIK2 ve PPAR γ Gen İfadelerine Etkisi

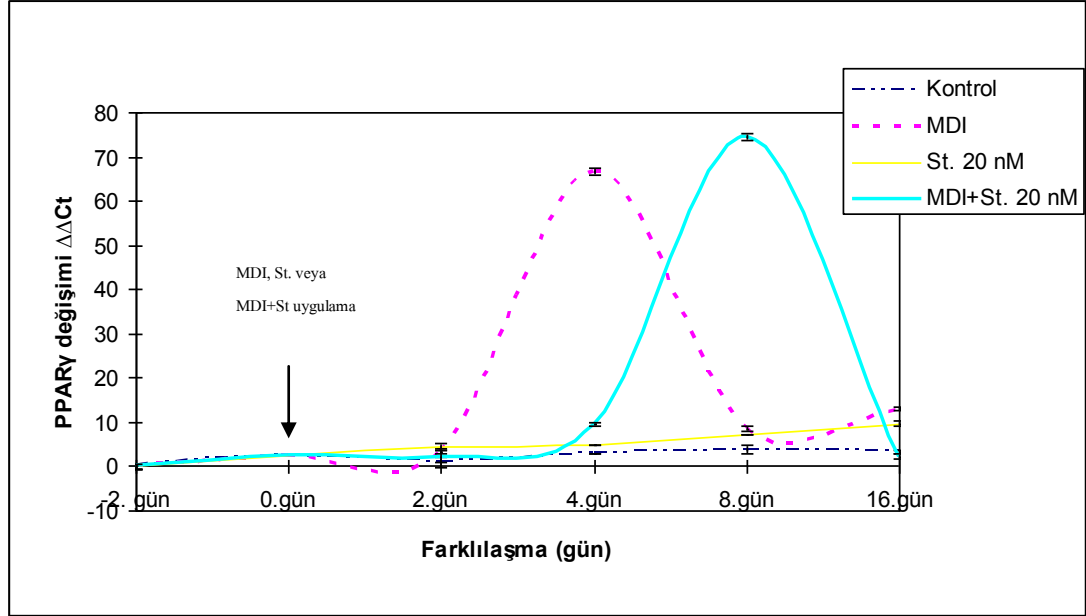
SIK2'nin 3T3-L1 öncül adiposit hücre hatlarında MDI muamelesini takiben farklılaşmaya özgün erken cevap genleri ile birlikte artış gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada SIK2 aktivitesinin Staurosporin ile baskılanmasının bu genin farklılaşmaya özgü ifadesinin açıklanabilmesi açısından önemli bilgi vereceği düşünülerek, SIK2'nin kimyasal inhibisyonunun SIK2 ve PPAR γ gen ifadeleri üzerine etkisini analiz etmek amacı ile kantitatif RT-PCR kullanılarak farklılaşmaya özgün genlerdeki ifade değişiklikleri göreceli olarak $\Delta\Delta C_T$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. Adiposit farklılaşma sürecinde, Staurosporin inhibisyonunun SIK2 gen ifadesi üzerine etkisinin kantitatif RT-PCR yöntemi ile analizi.

Kantitatif RT-PCR analizi sonucunda MDI uygulanmış 3T3-L1 öncül adiposit hücrelerinde SIK2 gen ifadesi, adipojenik uyarıcıyı takiben 4. güne kadar yaklaşık 6 kat artış göstermiş ve 4. günden 8. gün sonuna kadar azalmasına karşın yüksek düzeyde seyretmiştir. 16. günde uyarı düzeyindeki bazal seviyeye geri dönmüştür. SIK2 gen ifadesi sadece St. uygulanmış hücrelerde ise kontrol grubuna (adipojenik

besi yeri uygulanmamış) benzer bir sonuç göstermiştir. St. varlığında MDI bağımlı SIK2 mRNA düzeyindeki artış kontrole oranla 3 kat artış göstermekte ve 16. günde uyarı düzeyindeki bazal seviyeye geri dönmektedir (Şekil 3.9).

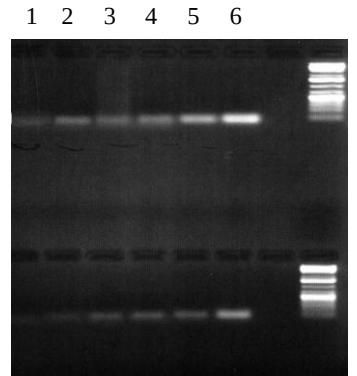


Şekil 3.10. Adiposit farklılaşma sürecinde, Staurosporin inhibisyonunun PPAR γ gen ifadesi üzerine etkisinin kantitatif RT-PCR yöntemi ile analizi.

Kantitatif RT-PCR analizi sonucunda MDI uygulanmış 3T3-L1 hücrelerinde PPAR γ gen ifadesi adipojenik besi yeri ilavesi sonrası 2. günden 4. güne kadar yükselmiş ve 8. gün itibari ile bazal düzeye geri dönmüştür. MDI+St. uygulanmış hücrelerde St. varlığı PPAR γ gen ifadesinde 2 günlük bir gecikme ile gerçekleşmektedir. Bunun erken SIK2 transkripsiyonu ile bağlantılı olup olmadığını bu deneyden anlamamız mümkün değildir. Sadece St. uygulanmış hücrelerde kontrol grubuna oranla yalnızca 4 katlık bir artış görülmüştür. St'ın tek başına MDI ile elde edilen farklılaşmanın yarısına yakın bir oranda farklılaşmayı gerçekleştirebilmesi PPAR γ ifadesinin yokluğu ile ters düşmektedir (Şekil 3.10). PPAR γ 'nın altındaki bir etkilenim artışı ile bu giderilebilir. Çalışmamızda C/EBP β 'nın sergilediği artış bu düşünce ile uyumlu gözükmektedir.

3.6. Staurosporin'in C/EBP β ve C/EBP α Gen İfadeleri Üzerine Etkisi

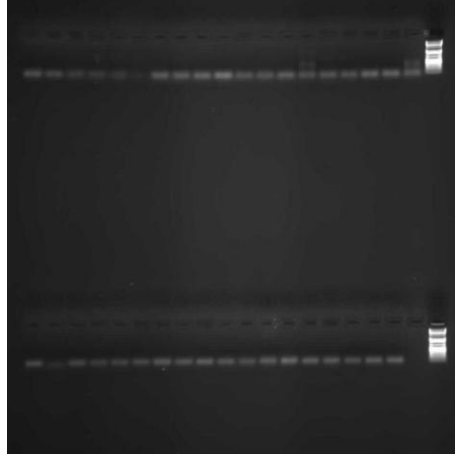
Adiposit farklılaşmasında ilk 24 saat içinde ekspresyonu artan birincil özgül genlerden C/EBP β ve olgunlaşma dönemine ait ikincil cevap genlerinden C/EBP α 'nın ve ayrıca referans (içsel kontrol) olarak kullandığımız β -aktin genlerinin yarı kantitatif analizleri için eksoponsiyel faza ait PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra dansitometrik analizleri yapılmıştır (Şekil 3.11 ve 3.14). C/EBP β ve C/EBP α PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında Vilber Lourmat görüntüleme sistemi ile dansitometrik olarak ölçümleri BIO-1D-++ analiz yazılımı ile yapılmış ve referans gen olarak β -aktin geni kullanılmıştır (Şekil 3.12 ve 3.15). Jel görüntüsünün yoğunluk ölçümleri önce kendi pozitif kontrolü olan β – aktine göre normalize edilmiş daha sonra her çalışma grubundaki örnek, kendi grubuna ait kontrole oranlanmıştır. Microsoft Excel programı ile dansite karşılığı atanan rastlantısal sayıları oluşturmada kullanılmıştır (Şekil 3.13 ve 3.16).



14. 16. 18. 20. 22. 24. Döngüler

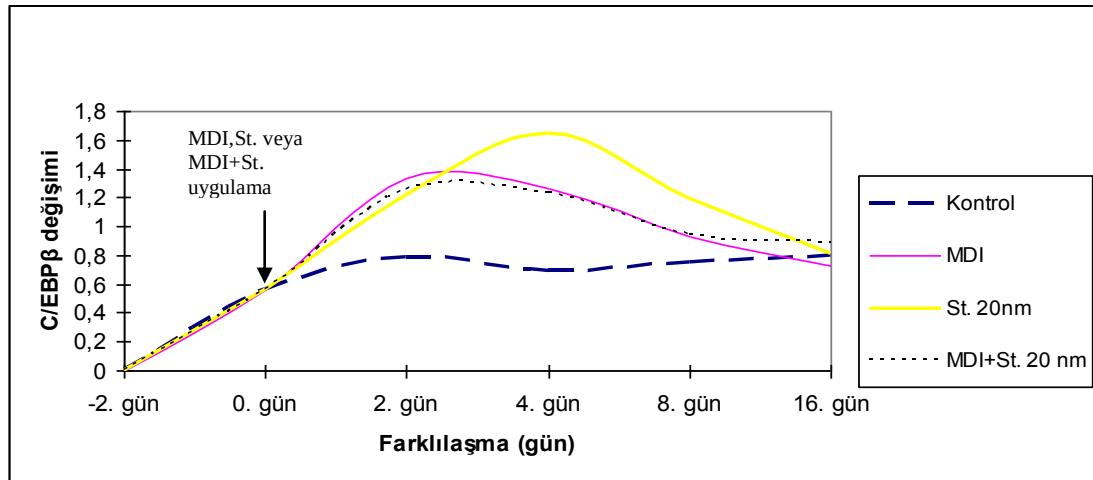
Şekil 3.11. C/EBP β (üstte) ve β -aktin (altta) 14., 16., 18., 20., 22. ve 24. RT-PCR döngüleri. 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 MDI (2. gün) cDNA'sıdır. 20. döngüde PCR ürün oluşumunun satürasyona geldiği görülmektedir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



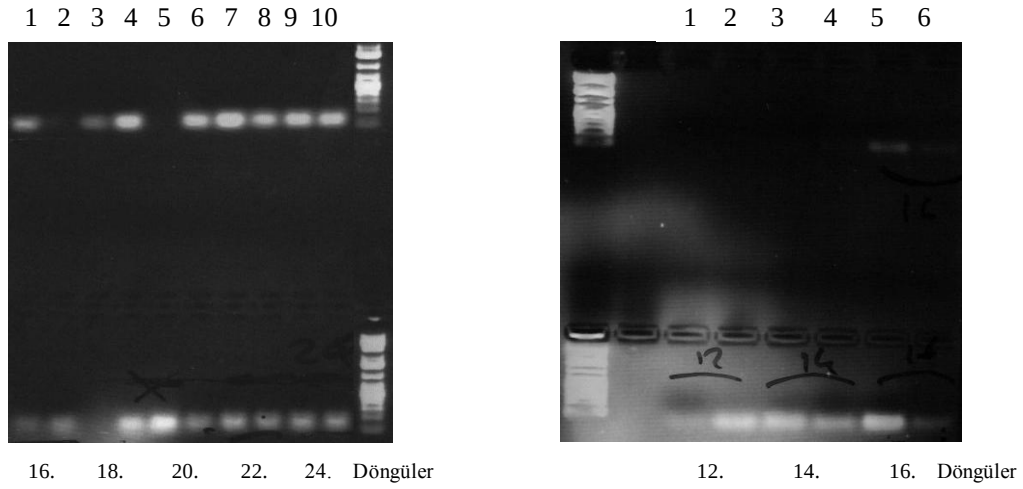
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Şekil 3.12. C/EBP β (üstte) ve β -aktin (altta) yarı-kantitatif RT-PCR agaroz jel görüntüsü. **1)** Kontrol 2.gün **2)** Kontrol 4.gün **3)** Kontrol 8.gün **4)** Kontrol 16.gün **5)** MDI 2.gün **6)** MDI 4.gün **7)** MDI 8.gün **8)** MDI 16.gün **9)** St. 2.gün **10)** St. 4.gün **11)** St. 8.gün **12)** St. 16.gün **13)** MDI+St. 2.gün **14)** MDI+St. 4.gün **15)** MDI+St. 8.gün **16)** MDI+St. 16.gün **17)** -2. gün **18)** 0. gün.

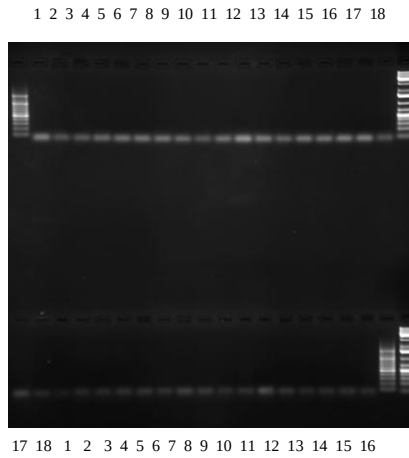


Şekil 3.13. Adiposit farklılaşma sürecinde, C/EBP β gen ifadesinin Staurosporin etkisinde değışımi.

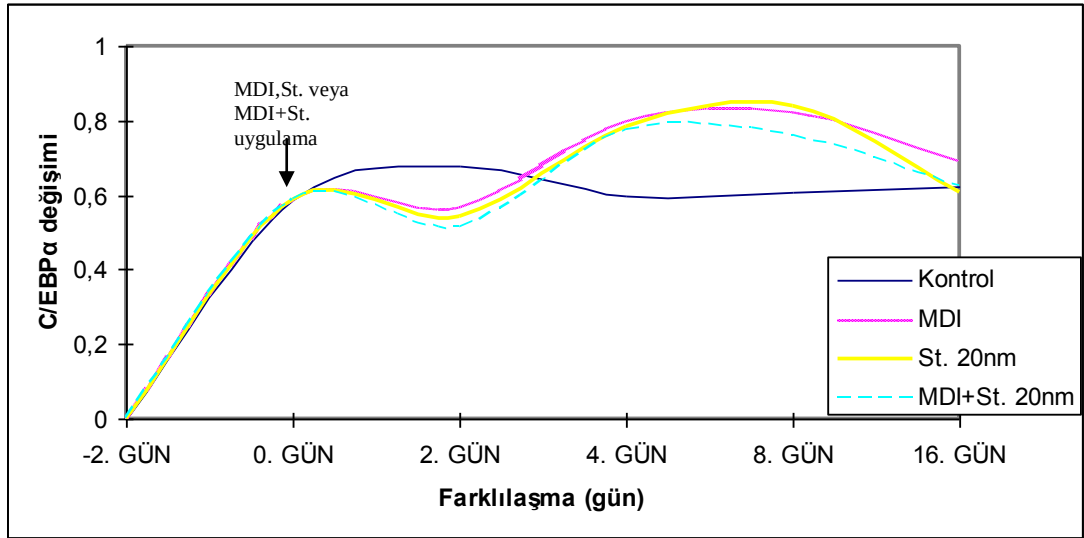
C/EBP β PCR ürünlerinin EtBr agaroz jel elektroforezi sonrasında Vilber Lourmat görüntüleme sistemi ile dansimetrik olarak ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.12). C/EBP β gen ifadesi, MDI ve MDI+St. uygulanmış 3T3-L1 hücrelerinde adipojenik uyarıyı takiben kontrole göre iki kat artış göstermektedir (Şekil 3.13). Bununla birlikte PPAR γ transkripsiyonunun beklenenin aksine çok az artış gösterdiği St.'ın tek başına kullanıldığı düzenekte (Şekil 3.10) sadece bu gen ile birlikte artması beklenen C/EBP β 'nın artış göstermesi %50 civarında farklılaşmaya neden olan St. etkisini açıklayabilir.



Şekil 3.14. C/EBP α (üstte) ve β -aktin (altta) 12, 14., 16., 18., 20., 22. ve 24. RT-PCR döngüleri. 1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı bandlar 0. gün cDNA'sı ve 2, 4, 6, 8 ve 10 numaralı bandlar MDI 16. gün cDNA'sıdır.



Şekil 3.15. C/EBP α (üstte) ve β -aktin (altta) yarı-kantitatif RT-PCR agaroz jel görüntüsü. **1)** Kontrol 2.gün **2)** Kontrol 4.gün **3)** Kontrol 8.gün **4)** Kontrol 16.gün **5)** MDI 2.gün **6)** MDI 4.gün **7)** MDI 8.gün **8)** MDI 16.gün **9)** St. 2.gün **10)** St. 4.gün **11)** St. 8.gün **12)** St. 16.gün **13)** MDI+St. 2.gün **14)** MDI+St. 4.gün **15)** MDI+St. 8.gün **16)** MDI+St. 16.gün **17)** -2. gün **18)** 0. gün.



Şekil 3.16 Adiposit farklılaşma sürecinde, C/EBP α gen ifadesinin Staurosporin etkisinde değişimi.

C/EBP α PCR ürünlerinin EtBr agaroz jel elektroforezi sonrasında Vilber Lourmat görüntüleme sistemi ile dansitometrik olarak ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.15). Adiposit farklılaşma sürecinde, C/EBP α gen ifadesinin yarı-kantitatif RT-PCR analizi sonucunda, MDI, St., MDI+St. uygulanmış 3T3-L1 öncül adiposit hücrelerinde kontrol grubuna oranla C/EBP α gen ifadesi adipojenik besi yeri uygulama sonrası beklendiği gibi 2. günden 8. güne kadar yükselmiş 16. günden sonra bazal seviyeye döndüğü görülmüştür (Şekil 3.16).

4. TARTIŞMA

3T3-L1 ve 3T3-F422A öncül adiposit hücre hatları, Swiss 3T3 fare embriyolarından elde edilmiştir ve adipogenezin transkripsiyonel düzenlenmesine yönelik çalışmalarda *in vitro* model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Her bir hücre hattının farklılaşma gereksinimlerinde bazı farklılıklar vardır. Bu farklılıkların hücrelerin elde edildiği zamanki tutuklu kaldığı gelişimsel basamaklarda temsil edilen çeşitliliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte bu iki kardeş hücre hattı benzer transkripsiyonel aktivasyon ve fenotipik özelliklere sahiptirler (31). 3T3-L1 öncül yağ hücreleri adipojenik şartlar altında olgun yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir. Öncül yağ hücrelerinin farklılaşması kabaca iki basamakta incelenir; birinci basamakta büyüme yüzeyinin tamamını kaplayan hücreler besi ortamında bulunan büyüme faktörleri (%10 FBS) sayesinde adipojenik uyarıyı takiben toplu halde yeniden hücresel döngüye geri dönerler (G_0 'dan G_1). Eşzamanlı olarak bu fazda hücrelerin son olarak en az iki kere daha bölündüğü ve buna paralel olarak farklılaşmaya özgün ilkin transkripsiyon faktörlerinden CEBP β ve CEBP δ ifadelerinin 4-5 kat arttığı gözlenir. Farklılaşmanın ikinci safhasında ise bu transkripsiyon faktörlerinin koordinasyonu sonucu farklılaşmanın tamamlanması için gerekli olan ikincil genlerin CEBP α ve PPAR γ ifadelerindeki artış gerçekleştirilir. Sonuç olarak bu faktörler diğer aktive edici veya baskılayıcı faktörlerle işbirliği içinde olgun adipositlerin sürekliliği için gerekli genlerin ifadelerini mümkün kılar. Mezenkimal kök hücreleri ve öncül adiposit hücre hatları ile yapılan farklılaşmanın moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar son derece detaylı bilgiler sunmakla birlikte, klonal genişlemenin gerçekleştiği ve hücre döngüsü ile farklılaşmanın koordinasyonunu gerektiren birinci safhasına ilişkin bilgilerimiz halen yetersiz bir düzeydedir.

Bu çalışma SIK2'nin 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecine etkisini, onun bir inhibitörü olan staurosporin varlığında, farklılaşma uyarısını takiben birincil ve ikincil safha gen ifadelerinde meydana gelen değişikliklerin yarı ve tam kantitatif RT-PCR yöntemleri ile belirlenmesini içermektedir. Buna paralel olarak farklılaşma sonucu oluşan olgun yağ hücrelerinde hücresel farklılaşmanın biyokimyasal belirteci

olan yağ birikimi histolojik olarak Oil Red O boyama ve nicel olarak OD ölçümleri ile analiz edilmiştir.

İlk olarak Horike ve arkadaşları 3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde adipojenik uyarıyı takiben SIK2 transkripsiyonun CEBP β ile eşzamanlı olarak arttığını ve bu nedenle farklılaşmada rolü olabileceğini önerdi. İki yıl kadar önce Clara ve arkadaşları bu hücrelerin farklı bir kardeş klonu olan 3T3-F442A hücrelerini kullanarak bir SIK inhibitörü olan staurosporinin farklılaşma üzerine etkilerine baktıklarında sürpriz bir şekilde SIK2 mRNA'sının en yüksek olduğu uyarıyı takip eden ilk 48 saatte yani klonal genişleme safhasında birkaç saatlik staurosporin muamelesinin bile MDI (MIX, Dex, İnsülin) karışımından daha etkin ve hızlı bir şekilde farklılaşmaya neden olduğunu gösterdiler. Fakat bu çalışmada, staurosporinin SIK2 aktivitesini doğrudan engellediği bilinmesine rağmen aktivitesinin veya varlığının incelenmemesi Horike ve arkadaşlarının bulguları ile bir karşılaştırma yapılmasına olanak sağlamamaktadır. Diğer yandan MDI ile uyarılan 3T3-L1 hücrelerinde SIK2 mRNA'sının staurosporinin etkin olduğu ifade edilen bu safhada yaklaşık üç katlık bir artışla yüksek miktarda temsil edilmesi ve bu artışın St. varlığında kontroldeki bazal düzeye gerilemesi SIK2'nin adipojenik rolünü desteklemektedir. 3T3-L1 hücreleri ile yaptığımız *in vitro* farklılaşma deneylerinde sürpriz bir şekilde, SIK2'nin yüksek miktarda bulunduğu klonal genişleme süresince miktar ve aktivasyonunun staurosporin tarafından engellenmesinin SIK2 mRNA seviyesinde farklılaşma uyarısını takiple oluşan 3 katlık artışı engellediği ve dolaylı olarak adipojenik etkide %25'lik bir düşüşe yol açtığını gösterdik. Sadece St. ile muamele edilen hücrelerde, farklılaşmanın maksimum olduğu MDI'a oranla %40-50'den daha az farklılaşmanın gerçekleşmesi SIK2'den bağımsız St. ile baskılanan farklı kinazların da farklılaşmada rol alabileceğine işaret etmektedir.

Yukarıda verilen farklılaşmaya özgün genlerin aktivasyon profilleri dikkate alındığında deneysel farklılıklara rağmen farklılaşma süresince Horike ve arkadaşlarının Northern blot yöntemi ile gösterdikleri farklılaşma genlerine ait ifade profillerinin bizim çalışmamızda elde edilen kantitatif RT-PCR analizleri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Staurosporinin tek başına farklılaşmanın birinci ve ikinci safhalarında ihtiyaç duyulan SIK2 ve belli oranda PPAR γ 'nın transkripsiyonel aktivasyonları için yeterli olmadığı bu genlere ait mRNA düzeylerinin kontrole

grubuna yakın bir düzeyde olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.9 ve 3.10). Olgunlaşma dönemine ait PPAR γ mRNA düzeyi sadece St. varlığında kontrol düzeyine yakın seviyede kalırken (~ 4 kat artış) MDI ile birlikte yaklaşık 40 katlık bir artışı sadece MDI ile oluşan artışa yakın bir düzeyde iki günlük bir gecikme ile gerçekleştirmektedir. Staurosporinin farklılaşma potansiyeli SIK2 ve PPAR γ 'dan bağımsız ise bunu diğer iki önemli faktörün CEBP β ve CEBP α 'nın farklılaşma için gerekli mRNA düzeylerini sağlayarak giderilebileceği düşünülebilir (Şekil 3.13 ve 3.16). Sonuç olarak SIK2'nin farklılaşmanın klonal genişleme safhasında CEBP β ile birlikte sahip olduğu yüksek mRNA düzeyi ve bu safha için gereklilikleri göz önüne alındığında staurosporinin bir SIK inhibitörü olarak bu aşamadaki rolü muhtemel birkaç senaryoyu akla getirmektedir. Birincisi SIK2 aktivitesinin staurosporin tarafından tamamen yok edilememesidir ki bu MDI+St ve sadece St. uygulamalarında MDI'ya göre elde edilen % 25-50 düşük farklılaşma oranları ile desteklenmektedir. İkincisi ise SIK2'nin sahip olduğu farklılaşmayı pozitif yönde etkileme potansiyelinin St. tarafından baskılanabilen farklı bir kinaz tarafından da yapılabilme olasılığıdır. Bu fikrin test edilmesi ise SIK2 aktivitesinin gene özgü inhibitör RNA veya dominant negatif mutant formunun bu hücrelerde istikrarlı ifadelerinin sağlanması ile gerçekleştirilebilir. Horike ve arkadaşları tarafından 3T3-L1 farklılaşmasının erken safhası ve *db/db* diyabetik hayvan modelinde rapor edilen SIK2 aktivite ve miktarlarındaki artış farklılaşmadan ziyade kronolojik olarak daha önce gerçekleşen klonal genişleme yani hücre çoğalması için gerekli bir artışı işaret ediyor olabilir. Sadece birkaç ay önce yayınlanan bir makalede Ahmed ve arkadaşları SIK2'nin C-NAP1 adlı bir sentromerik proteini S2392 dizisinden fosforlayarak mitozun erken evresinde rol aldığını SIK2'nin bu etkisinden bağımsız olarak yine aktivitesinin baskılandığı hücrelerde G1-S geçişinin azaldığı gösterilmiştir (69). Bu bulgular SIK2'nin farklılaşmanın klonal genişleme safhasında fonksiyonel olma hipotezini daha da destekler niteliktedir. Bu kapsamda C-NAP1 proteinin 3T3-L1 hücrelerinde dominant negatif veya sürekli aktif formlarının istikrarlı ifadeleri farklılaşma üzerine etkilerinin incelenmesi açısından oldukça ilginç olacaktır.

Sonuç olarak yağ hücrelerinin sayısal ve fiziksel büyüklükleri obezite ve ilişkili metabolik hastalıklar için önemli patolojik bulguları oluşturduğundan farklılaşmanın moleküler detaylarının ileri düzeyde algılanması adipoz doku kaynaklı zararların önlenmesi için yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gretchen J. Darlington, Sarah E. Ross, and Ormond A. MacDougald (1998) The role of c/ebp genes in adipocyte differentiation. The Journal Of Biological Chemistry. Vol. 273, No. 46, Issue of November 13, pp. 30057–30060.
2. Adilson Guilherme, Joseph V. Virbasius, Vishwajeet Puri and Michael P. Czech (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 367-377.
3. Nanao Horike, Hiroshi Takemori, Yoshiko Katoh, Junko Doi, Li Min, Tomoichiro Asano, Xiao Jian Sun, Hiroyasu Yamamoto, Soji Kasayama, Masaaki Muraoka, Yasuki Nonaka, and Mitsuhiro Okamoto (2003) Adipose-specific Expression, Phosphorylation of Ser794 in Insulin Receptor Substrate-1, and Activation in Diabetic Animals of Salt-inducible Kinase-2. The Journal Of Biological Chemistry Vol. 278, No. 20, Issue of May 16, pp. 18440–18447
4. Keith N. Frayn (2001) Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. Proceedings of the Nutrition Society, 60, 375.380.
5. Jason K. Kim, Oksana Gavrilova, Yan Chen, Marc L. Reitman, and Gerald I. Shulman (2000) Mechanism of Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice. The Journal Of Biological Chemistry Vol. 275, No. 12, Issue of March 24, pp. 8456–8460.
6. Takayoshi Suganami, Junko Nishida, Yoshihiro Ogawa (2005) A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes Role of Free Fatty Acids and Tumor Necrosis Factor α . Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25: 2062-2068.

7. Tatsuo Ishizuka, M.D., Kazuo Kajita, Yoshiyuki Natsume, Yasunori Kawai, Yoshinori Kanoh, Atsushi Miura, Masayoshi Ishizawa, Yoshihiro Uno, Hiroyuki Morita and Keigo Yasuda (2004) Protein Kinase C (PKC) β Modulates Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)—Effect of Overexpression of PKC β on Insulin Signal Transduction. *Endocrine Research* Vol. 30, No. 2, Pages 287-299.

8. Boris Draznin (2006) Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 α . The Two Sides of a Coin. *Diabetes* 55: 2392–2397.

9. Zhanguo Gao, Daniel Hwang, Fredly Bataille, Michael Lefevre, David York, Michael J. Quon, and Jianping Ye (2002) Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Inhibitor κ B Kinase Complex Vol. 277, No. 50, Issue of December 13, pp. 48115–48121.

10. Jean-François Tanti, and Jennifer Jager (2009) Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stressregulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 753–762.

11. Hiratani K, Haruta T, Tani A, Kawahara J, Usui I, Kobayashi M (2005) Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 335(3): 836-42.

12. Rubin *et al.*, (2000) Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* 287(5461): 2204–2215.

13. Ziva Liberman and Hagit Eldar-Finkelman (2005) Serine 332 Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 by Glycogen Synthase Kinase-3 Attenuates Insulin Signaling Vol. 280, No. 6, Issue of February 11, pp. 4422–4428.

14. Hunter, T., (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell*, Vol. 100, pp. 113-127

15. Marie Daval, Fabienne Foufelle, and Pascal Ferré (2006) Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 574.1 pp 55–62

16. Blerina Kola, Ashley B., Grossman, Márta Korbonits (2008) The Role of AMP-Activated Protein Kinase in Obesity. Korbonits M (ed): *Obesity and Metabolism*. Front Horm Res. Basel, Karger, vol 36, pp 198–211

17. Wang Z., Takemori H., Halder SK., Nonaka Y., Okamoto M. (1999) Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS Lett.* 453(1-2):135-9.

18. Okamoto, M., H. Takemori and Y. Katoh (2004) Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 15, pp. 21-26.

19. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87(1):99-109.

20. Qiao LY, Zhande R, Jetton TL, Zhou G, Sun XJ. (2002) In vivo phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents. *J Biol Chem.* 19;277(29):26530-9.

21. Yeh, W. C., and S. L. Mcknight.(1995) Regulation of adipose maturation and energy homeostasis. *Lipid Res.* 28: 649–658, 1987. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 885–890, 1995

22. Sreaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates JR 3rd, Takemori H, Okamoto M, Montminy M. (2004) The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell.* 119(1):61-74.

23. Küser, G., (2006) Identification of candidate substrates of SIK2 in vitro. M.S. Dissertation, Boğaziçi Üniversitesi.
24. Demet Candaş (2004) Sık2 Is A Potential Mediator Of Cross-Talk Between Fgf And Pka Pathways. B.S., in Molecular Biology and Genetics, Boğaziçi Üniversitesi.
25. Yesim Özmen (2006) Sık2 Expression In Retinal Cells And Its Possible Involvement Along With Pka In Fgf9 Signal Transduction. B.S. in Molecular Biology and Genetics, Bogaziçi Üniversitesi.
26. Francine M. Gregoire, Cynthia M. Smas, And Hei Sook Sul (1998) Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* Vol. 78, No. 3.
27. James M. Ntambi and Young-Cheul Kim (2000) Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J. Nutr.* 130: 3122S-3126S.
28. Bruce A. Bunnell, Mette Flaatt, Christine Gagliardi, Bindiya Patel, Cynthia Ripoll (2008) Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45 115–120.
29. G. J. Hausman, M. V. Dodson, K. Ajuwon, M. Azain, K. M. Barnes, L. L. Guan, Z. Jiang S. P. Poulos, R. D. Sainz, S. Smith, M. Spurlock, J. Novakofski, M. E. Fernyhough and W (2009) Board-Invited Review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci.*87:1218-1246.
30. Evan D. Rosen and Ormond A. MacDougald (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Publishing Group* 7(12):885-96.
31. Clara E. Diaz-Velasquez, Federico Castro-Mun˜ ozledo, and Walid Kuri-Harcuch (2008) Staurosporine Rapidly Commits 3T3-F442A Cells to the Formation of Adipocytes by Activation of GSK-3b and Mobilization of Calcium. *Journal of Cellular Biochemistry* 105:147–157.

32. Jorge-Tonatiuh Ayala-Sumuano, Cristina Velez-Del Valle, Alicia Beltrán-Langarica, José Manuel Hernández, Walid Kuri-Harcuch (2008) Adipogenic genes on induction and stabilization of commitment to adipose conversion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374 720–724.
33. Bart A. Jessen, Greg J. Stevens (2002) Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* 299 95–100.
34. G Ailhaud (1997) Obesity And The Adipocyte Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. *Journal of Endocrinology* 155, 201–202
35. Tong Q, Hotamisligil GS (2001) Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. *Rev Endocr Metab Disord.*; 2(4):349-55
36. Wei-Hao Chen (2007) Functional interaction between Salt-inducible kinase 2 and p97/VCP regulates ER-associated degradation and application of nanodiamond in proteomic research. <http://www.cetd.com.tw/ec/thesisDetail.aspx?etdun=U0001-2507200703511100>
37. Stephen R. Farmer (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* ; 4(4): 263–273.
38. Takayoshi Suganami, Junko Nishida, Yoshihiro Ogawa (2005) A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes, Role of Free Fatty Acids and Tumor Necrosis Factor α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 25:2062-2068.
39. Jerrold M. Olefsky and Alan R. Saltiel (2000) PPAR γ and the Treatment of InsulinResistance. *TEM Vol. 11, No. 9.*
40. Hamm JK, el Jack AK, Pilch PF, Farmer SR (1999) Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Ann N Y Acad Sci.* Nov 18;892:134-45.

41. Martina I. Lefterova and Mitchell A. Lazar (2009) New developments in adipogenesis. Trends in Endocrinology and Metabolism Vol.20 No.3.
42. Tsai J, Tong Q, Tan G, Chang AN, Orkin SH, Hotamisligil GS. (2005) The transcription factor GATA2 regulates differentiation of brown adipocytes. EMBO Rep. (9):879-84.
43. Mingui Fu, Tingwan Sun, Angie L. Bookout, Michael Downes, Ruth T. Yu, Ronald M. Evans, and David J. Mangelsdorf (2005) A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 Adipogenesis. Molecular Endocrinology 19: 2437–2450.
44. Gideon R. Hajer¹, Timon W. van Haften, and Frank L.J. Visseren (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. European Heart Journal 29, 2959–2971.
45. Mitsuhiro Okamoto, Hiroshi Takemori and Yoshiko Katoh (2004) Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis. Trends in Endocrinology and Metabolism Vol.15 No.1
46. Katoh Y, Takemori H, Lin XZ, Tamura M, Muraoka M, Satoh T, Tsuchiya Y, Min L, Doi J, Miyauchi A, Witters LA, Nakamura H, Okamoto M (2006) Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade. FEBS J. 273(12):2730-48.
47. Kim Ravnskjaer, Henri Kester, Yi Liu, Xinmin Zhang, Dong Lee, John R Yates, III and Marc Montminy (2007) Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression EMBO J. 26(12): 2880–2889.
48. Clara E. Diaz-Velasquez, Federico Castro-Mun˜ozledo, and Walid Kuri-Harcuch (2008) Staurosporine Rapidly Commits 3T3-F442A Cells to the Formation of Adipocytes by Activation of GSK-3b and Mobilization of Calcium. Journal of Cellular Biochemistry 105:147–157.

49. Masaaki Muraoka, Aiko Fukushima, Say Viengchareun, Marc Lombès, Fukuko Kishi, Akira Miyauchi, Mariko Kanematsu, Junko Doi, Junko Kajimura, Ryo Nakai, Tatsuya Uebi, Mitsuhiro Okamoto, Hiroshi Takemori (2009) Involvement of SIK2/TORC2 signaling cascade in the regulation of insulin-induced *PGC-1* and *UCP-1* gene expression in brown adipocytes. Articles in Press. Am J Physiol Endocrinol Metab doi:10.1152/ajpendo.00024.

50. Wieland Kiess, Stephanie Petzold, Madlen Töpfer, Antje Garten, Susann Blüher, Thomas Kapellen, Antje Korner (2008) Adipocytes and adipose tissue. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 22, No. 1, pp. 135–153, .

51. Yong-Xu Wang (2010) PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. Cell Research 20:124-137.

52. Jonathan K. Hamm, Amr K. El Jack, Paul F. Pilch, And Stephen R. Farmer (1999) Role of PPAR γ in Regulating Adipocyte Differentiation and Insulin-Responsive glucose uptake. Ann N Y Acad Sci. 18;892:134-45..

53. Gokhan S. Hotamisligil, Reed A. Graves, and Peter Tontonoz. (1993) Glucose Uptake Regulation Expression Syndromes of Adipocyte Gene in Differentiation and of Obesity/Diabetes. The Journal Of Biological Chemistry Vol. 268, No. 10, 6823-6826,

54. Skillington J, Choy L, Derynck R. (2002) Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. J Cell Biol. 159(1):135-46.

55. Guillaume Charrière, Béatrice Cousin, Emmanuelle Arnaud, Mireille André, Francis Bacou, Luc Pénicaud and Louis Casteilla. (2003) Preadipocyte Conversion to Macrophage. The Journal Of Biological Chemistry Vol. 278, No. 11.

- 56.** Kuri-Harcuch W, Green H. (1978) Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(12):6107-9.
- 57.** Morikawa M, Nixon T, Green H. (1982) Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell.*;29(3):783-9.
- 58.** Foster CM, Hale PM, Jing HW, Schwartz J. (1988) Effects of human growth hormone on insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-F442A adipocytes. *Endocrinology.*;123(2):1082-8.
- 59.** Campbell GS, Pang L, Miyasaka T, Saltiel AR, Carter-Su C. (1992) Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *J Biol Chem.*;267(9):6074-80.
- 60.** Piwien-Pilipuk G, Van Mater D, Ross SE, MacDougald OA, Schwartz J. (2001) Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.*;276(22):19664-71.
- 61.** Kuri-Harcuch W. (1982) Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation.*;23(2):164-9.
- 62.** Ding VW, Chen RH, McCormick F. (2000) Differential regulation of glycogen synthase kinase 3-beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem.* ;275(42):32475-81.
- 63.** Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA (2002) Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* ;277(34):30998-1004.

- 64.** Koivisto L, Alavian K, Hakkinen L, Pelech S, McCulloch CA, Larjava H. (2003) Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *J Cell Sci.* Sep 15;116(Pt 18):3749-60. Epub 2003 Jul 30.
- 65.** Tang QQ, Otto TC, Lane MD. (2003) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 4;100(3):850-5.
- 66.** Tang QQ, Zhang JW, Daniel Lane M. (2004) Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 18;319(1):235-9.
- 67.** Christy RJ, Kaestner KH, Geiman DE, Lane MD. (1991) CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 15;88(6):2593-7.
- 68.** Lane MD, Tang QQ, Jiang MS. (1999) Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 29;266(3):677-83.
- 69.** Ahmed et. al. (2010) SIK2 Is a Centrosome Kinase Required for Bipolar Mitotic Spindle Formation that Provides a Potential Target for Therapy in Ovarian Cancer. *Cancer Cell*, Volume 18, Issue 2, 109-121.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İstanbul’da doğdu. 2002 yılında Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladı. 2006 yılında GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitime başladı. 2010 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu.