

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

THAPSİGARGİN ve COMPOUND C’NİN 3T3-L1
ÖNCÜL ADİPOZİT FARKLILAŞMASININ
ERKEN MİTOTİK KLONAL GENİŞLEME
SAFHASINA ETKİSİ

FEHİME ŞEYMA ÖZEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

THAPSİGARGİN ve COMPOUND C’NİN 3T3-L1
ÖNCÜL ADİPOSİT FARKLILAŞMASININ
ERKEN MİTOTİK KLONAL GENİŞLEME
SAFHASINA ETKİSİ

FEHİME ŞEYMA ÖZEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. FERRUH ÖZCAN

GEBZE

2013



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/01/2013 tarih ve 2013/103... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13.05.2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fehime Şeyma ÖZEN'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Asuman D. ZERGEROĞLU

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Teknolojik ilerlemelerin bir sonucu olarak ortaya çıkan hareketsiz yaşam tarzı yüksek kalorili yeme alışkanlıkları obezite ve ilişkili birçok metabolik hastalığa neden olur. Bu hastalıkların önlenmesi için yağ hücresi çoğalması ve farklılaşma gibi özelliklerin moleküler düzeyde incelenmesi gerekmektedir. 3T3-L1 öncü adiposit hücreleri farklılaşma uyarısını takiben bulundukları G₀ dinlenme fazından çıkarak “Mitotik Klonal Genişleme” olarak adlandırılan bir iki hücre bölünmesine uğramaları farklılaşma için zorunludur. Bu aşamada 3T3-L1 öncü adipositlerinin olgun adipositlere farklılaşması için gerekli olan CEBP ailesine ait genlerin anlatımı gerçekleşir. AMP ile uyarılan protein kinaz (AMPK) ailesinin üyesi olan SIK2 (Tuz ile uyarılabilen kinaz-2); lipid, glukoz ve enerji dengesinde rol oynayan bir serin/threonin kinazdır. Bununla birlikte adipoz gibi salgı kapasitesi yüksek olan hücrelerde ER stresi ve inflamasyon; bu hastalıkların oluşumunda önemli yer tuttuğu düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada; ER stres ajanı Thapsigargin ve SIK2 inhibitörü Compound c varlığında Mitotik Klonal Genişleme (MCE) üzerindeki etkileri protein ve gen seviyesinde araştırılmıştır. ER stresin MCE evresinde fonksiyonel olan genleri baskıladığı görülmektedir. SIK2’nin ise bu evrede pozitif bir düzenleyici mitotik çoğalmayı desteklediği ve bunu, IRS1 veya ERK gibi genlerin ifadelerini, aktivitelerini veya kararlılıklarını değiştirerek ya da cNAP1 gibi sentromerik proteinler üzerinden yapabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir. Bunun dışında ER stresin 3T3-L1 hücrelerinin de MCE’i tamamen bloke ettiğini ve farklılaşma için kritik CEBP ve PPAR γ düzeylerini aşağı çektiği gibi anti adipojenik CHOP u artırarakta farklılaşmayı önleyebileceğini gösteren verilere ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: MCE, Thapsigargin, Compound c, SIK2, Adiposit Farklılaşma

SUMMARY

Sedentary life style and high caloric diets, which have ensued as a consequence of technological creep, have been the major threat to the life span and the life quality of human being via inducing many metabolic diseases such as obesity. In order to prevent those morbidities it is obligatory to analyse the features of fat cells such as proliferation and differentiation in the molecular level. When induced to differentiate, 3T3-L1 preadipocytes, which are found in growth-arrested G₀ phase, synchronously re-enter the cell cycle and undergo a cell division process, which is called as mitotic clonal expansion. This process is required for differentiation of preadipocytes. SIK2 (salt-inducible kinase 2), a family member of AMPK, which is induced by AMP, is a serine/threonine kinase, which plays a vital role in balance of lipid, glucose and energy. At the same time, it's assumed that ER stress and inflammation, that come up in high secretion capacity adipose cells, play a major role in pathogenesis of obesity and related diseases.

In this study, the effects of ER stress and SIK2 inhibition on mitotic clonal expansion (MCE) were analysed in presence of ER stress reagent Thapsigargin and SIK2 inhibitor Compound C in protein and gene levels. It has shown that ER stress suppress the genes that are functional in MCE phase. On the other hand, it has found that SIK2 can promote mitotic expansion as a positive regulator in this stage directly by changing the expression, stability and activity of genes such as IRS1 and ERK or indirectly through the centromeric proteins such as cNAP1. Furthermore, it has shown that ER stress has the ability to cease differentiation in 3T3-L1 cells via enhancing anti adipogenic CHOP as it does via repressing levels of CEBP and PPAR γ which are critical for differentiation.

Key words: MCE, Thapsigargin, Compound c, SIK2, Adipocyte Differentiation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince beni yönlendiren GYTE, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Yardımları ve desteği için Bölüm Başkanımız Sn. Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, tez aşamam süresince yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Asuman Demiroğlu Zergeroğlu ve Yrd. Doç. Dr. Tunahan Çakır ve tüm MBG öğretim üyelerine, aynı binayı paylaştığımız yüksek lisans/doktora öğrencilerine teşekkür ederim.

Aynı laboratuvarı paylaştığım her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen teşekkürden çok daha fazlasını hak eden arkadaşım Z.Onur ÇALIŞKANER'e, her koşulda desteklerini dostluklarını en derinde hissettiğim, iyi kötü günlerimde hep yanımda olan, iyiki hayatımdalar dediğim dostlarım Meryem TOPÇU ve Fatma SAĞIR'a çok teşekkür ederim.

Fedakarlıkta sınır tanımayan dostları için yapamayacağı şey olmayan, dostluğu ve yaptıkları karşısında hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim teşekkürlerin az kalacağı dostum Mehmet SARIHAN'a çok teşekkür ederim.

Destekleri, yardımları ve güleryüzleriyle yanımda olan Tuğçe KESKİNER, Furkan ALKAN, Özge ARSLAN, Gülşife CANDEMİR, Türkan ÇAKAR, Veysel SÜZERER, Ebru TURHANLAR, Nurettin AYVALI, aynı katı paylaştığımız diğer arkadaşlarıma, her zaman her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen M. Can AKKİRİŞ'e teşekkür ederim.

Hayatta en değer verdiğim, hayatta ki en büyük destekçilerim, her türlü koşulda ne olursa olsun yanımda olduklarını, desteklerini sonuna kadar hissettiğim, fedakarlıkları ve yaptıkları herşey için haklarını, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım babam Ö.Vehbi ÖZEN'e canım annem Mualla ÖZEN'e ve hayatımı renklendiren canım kardeşim Mustafa ÖZEN'e her şey için çok teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve her koşulda bana destek olan, dostlukları ve bana kattıkları bütün güzellikler için dostlarım Damla KABİL ve Gizem TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. ADİPOZ DOKU	2
2.1. Adiposit Farklılaşmasında Kullanılan <i>In Vitro</i> Modeller	3
2.1.1. Preadipoz Hücre Hattı	4
2.2. Adipoz Farklılaşmasının Süreci	5
2.3. Mitotik Klonal Genişleme	7
2.4. PREF-1 Ailesi	8
2.5. C/EBP Ailesi	9
2.6. PPAR γ Ailesi	10
2.7. SREBP Ailesi	12
2.8. WNT Sinyali	13
2.9. Krüppel-Benzeri Faktörler(KLF)	15
2.10. TGF- β Süper Aile Sinyali	15
2.11. Mitogenle Etkileşen Protein Kinaz (MAPK)	16
2.12. Adipoz Dokuda AMP ile Aktive Kinazın (AMPK) Fonksiyonu	16
2.13. AMPK Ailesi ve Adiposit Farklılaşmasına Etkisi	17
3. SIK PROTEİN AİLESİ	18
3.1. SIK2 (Salt Inducible Kinase-2)	19
3.2. SIK2 ve İnsülin Sinyal İlişkisi	20
3.3. Compound c	22
4. ENDOPLAZMİK RETİKULUM	23
4.1. ER Stres	24
4.1.1. ER Stresin Adipoz Dokuya Etkileri	29

4.1.2. Thapsigargin	29
5. MATERYAL ve YÖNTEM	30
5.1. Materyal	30
5.1.1 Kimyasal Maddeler	30
5.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	30
5.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	31
5.2. YÖNTEM	34
5.2.1. Alt Kültürleme	34
5.2.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	35
5.2.3. Adiposit Farklılaşma Deneyi	36
5.2.4. Proliferasyon Assay	37
5.2.5. Total RNA İzolasyonu	37
5.2.6. cDNA Sentezi	38
5.2.7. Kantitatif RT-PCR	39
5.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama	40
6. BULGULAR	45
6.1. SIK2 İnhibitörü Compound C ve Thapsigargin'in Mitotik Klonal Genişlemeye Etkisi	45
6.2. Total RNA İzolasyonu	46
6.3. Compound C ve ER Stresin <i>C/EBPβ</i> Geni Üzerindeki Etkisi	47
6.4. Compound C ve Thapsigargin <i>C/EBPα</i> ve <i>PPARγ</i> Genleri Üzerindeki Etkisi	48
6.5. Compound c ve Tha'nın <i>PREF1</i> ve <i>SREBP1-C</i> Genleri Üzerindeki Etkisi	50
6.6. Compound C ve Tha'nın SIK2 Proteinleri Üzerindeki Etkisi	52
6.7. Compound c ve Tha'nın CNAP Proteinleri Üzerindeki Etkisi	54
6.8. ER Stres ve Compound C Varlığında <i>C/EBPβ</i> ve <i>C/EBPα</i> Protein Düzeyleri	55
6.9. Thapsigargin ve Compound C'nin Mitotik <i>C/EBPβ</i> ve Antimitotik <i>C/EBPα</i> Farklılaşma Proteinlerine Etkisi	55
6.10. Compound c ve Tha'nın p-ERK Proteinleri Üzerindeki Etkisi	58
6.11. Compound c ve Tha'nın PKB Düzeyi ve Aktivitesine Etkisi:	60

6.12. Compound c ve Tha'nın SREBP1-c Proteinleri Üzerindeki Etkisi	62
6.13. Compound c ve Tha'nın PPAR γ Proteinleri Üzerindeki Etkisi	63
6.14. Compound c ve Tha'nın CHOP Proteinleri Üzerindeki Etkisi	64
6.15. Compound c ve Tha'nın IRS-1 Proteinleri Üzerindeki Etkisi	65
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
8. KAYNAKLAR	71
9. ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler/ Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
Ca	: Kalsiyum
CO ₂	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
dH ₂ O	: Damıtılmış (destile)
kDa	: Kilodalton
M	: Molarite
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
v	: Hacim
V	: Volt
Acr/Bis	: Akrilamid: Bisakrilamid
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenine monophosphate-activated protein kinase
APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Bovine Serum Albumin
cAMP	: Siklik AMP
CT	: Cycle of threshold (eşik değerin döngü sayısı)
DEPC	: Dietilpirokarbonat (Diethylpyrocarbonate)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
FBS	: Fetal Bovine Serum
GTP	: Guanozin trifosfat
IGF1	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1
IGF2	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü 2
IGF-1R	: İnsülin-benzeri büyüme faktör reseptörü 1
IGF-2R	: İnsülin-benzeri büyüme faktör reseptörü 2

IP	:	İmmün çöktürme (immünoprecipitation)
IRS	:	Insulin receptor substrat
JNK	:	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	:	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	:	Haberci RNA (Messenger RNA)
NF-K β	:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	:	Nükleer lokalizasyon sinyali
PBS	:	Phosphate buffered saline
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
Pen/Str	:	Penicillin/Streptomycin
PI3K	:	Phosphoinositol 3 kinase
PVDF	:	Polivinilidin diflorür
Q-PCR	:	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR:		Revers Transkripsiyon Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik asit
rpm	:	Revolutions per minute
SDS	:	Sodium dodecyl sulphate
TBS	:	Tris buffered saline
TNF- α	:	Tumor necrosis factor α
tRNA	:	Taşıyıcı RNA
UTR	:	Untranslated region (Translasyonu yapılmayan bölge)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Adipoz dokudan salınan moleküller	3
2.2: Memelilerde öncül adipositten olgun adiposite dönüşüm sürecine özgül genler ve transkripsiyon faktörleri	4
2.3: Adiposit farklılaşmasında kullanılan modeller	5
2.4: Adiposit farklılaşmasının süreçleri	7
2.5: Terminal farklılaşma süresince C/EBPs ve PPAR γ 'nın epigenik düzenlenmesi	11
2.6: Öncül SREBP-1c'nin golgi aygıtında kırılarak transkripsiyonel olarak aktif SREBP-1c'ye dönüştürülme mekanizması	13
3.1: SIK2 ve SIK1 izoformları	19
3.2: IRS-1'de serin fosforilasyon bölgeleri ve insülin sinyal yolağı	21
4.1: Endoplazmik Retikulum	23
4.2: Katlanmayan proteinlerin ER lümeni içerisinde kümeler halinde birikmesi ve ER stresini tetiklemesi	25
4.3: PERK Yolağı	26
4.4: ER Stres sonucu aktive olan ATF6	27
4.5: ER stres yolağı	28
6.1: 3T3-L1 hücrelerinde SIK2 inhibitörü (Compound C) ve ER stres (THA) ajanlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri (a)	45
6.1: 3T3-L1 hücrelerinde SIK2 inhibitörü (Compound C) ve ER stres (THA) ajanlarının hücre sayımı üzerindeki etkileri (b)	46
6.2: RNA izolasyonlarına ait formaldehit jel görüntüsü	47
6.3: RNA izolasyonlarına ait formaldehit jel görüntüsü	47
6.4: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının <i>CEBPβ</i> mRNA düzeyi üzerindeki etkisi	48
6.5: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının <i>CEBPα</i> mRNA düzeyi üzerindeki etkisi	49
6.6: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının <i>PPARγ</i> mRNA düzeyi üzerindeki etkisi	50

6.7: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound C ve Tha ajanlarının <i>PREF-1</i> mRNA düzeyi üzerindeki etkisi	51
6.8: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound C ve Tha ajanlarının <i>SREBP1-C</i> mRNA düzeyi üzerindeki etkisi	52
6.9: SIK2 proteinine ait Western Blot görüntüleri.	53
6.10: CNAP proteinine ait Western Blot görüntüleri.	54
6.11: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının C/EBP α protein düzeyi üzerindeki etkisi	55
6.12: C/EBP α proteinine ait Western Blot görüntüleri.	57
6.13: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve C/EBP β protein düzeyi üzerindeki etkisi	57
6.14: C/EBP β proteinine ait Western Blot görüntüleri.	58
6.15: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound C ve Tha ajanlarının A) p-ERK 1, B) p-ERK 2 protein düzeyleri üzerindeki etkisi.	59
6.16: ERK ve p-ERK proteinine ait Western Blot görüntüleri.	59
6.17: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının p-AKT protein düzeyi üzerine etkisi	62
6.18: p-AKT proteinine ait Western Blot görüntüleri.	61
6.19: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının SREB1C protein düzeyi üzerindeki etkisi.	62
6.20: SREBP1-C proteinine ait Western Blot görüntüleri.	62
6.21: PPAR γ proteinine ait Western Blot görüntüleri.	63
6.22: CHOP proteinine ait Western Blot görüntüleri.	64
6.23: IRS-1 proteinine ait Western Blot görüntüleri.	65

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: qRT-PCR’da kullanılan genel PCR programı	41
5.2: %10’luk ayırma jeli ve %4’lük paketleme jeli hazırlamak için kullanılacak maddeler ve miktarları	43
5.3: Westen Blotting’de ilgili proteinlerin saptanması amacıyla kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile kullanılan seyreltme oranları	45

1.GİRİŞ

Obezite günümüzün en önemli sorunlarından bir tanesidir. Olgun yağ hücrelerinin sayısal ve fiziksel büyüklükleri, obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklar için önemlidir. Bu yüzden oluşan yağ hücrelerinin fazlalığı ve adipoz dokuların salgı profilinin bozulması bu hastalığın sebeplerinden olabilir. Ayrıca adiposit gibi salgı kapasitesi yüksek olan hücrelerde meydana gelen inflamasyon ve ER üzerinde artan sentez yüküyle birlikte ER stresi kaçınılmaz bir hale gelir. Bu sebeple ER stresi ve adiposit farklılaşması arasında bir ilişki olabileceğine dair çalışmalar yapılmış ve halen bu konuda pek çok çalışma devam etmektedir.

İlk olarak Horike ve arkadaşları tarafından daha sonra da 2003 yılında yapılmış olan Hale HEBİP'e ait yüksek lisans tezinde yapılan çalışmalarda da gösterildiği üzere 3T3-L1 öncül hücre hatlarında, SIK2'nin farklılaşmasının erken fazlarında C/EBP ailesine ait genlerle beraber ifade edildiği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında SIK2'nin farklılaşma için gerekli olan Mitotik Klonal Genişlemede (MCE) fonksiyonu olabileceği öne sürülmüştür. Horike ve arkadaşları, diyabetik fare adipoz dokusunda yüksek SIK2 aktivitesi ve miktarının insülin reseptör substrat-1'i (IRS-1) fosforlayarak baskılaması sonucu, insülin direnci ve diyabetle ilişkili olabileceğini önermiştir. Bununla bağlantılı olarak SIK2'nin IRS1 üzerinden AKT aktivasyonunu engelleyerek bir negatif feedback'e neden olabileceğini göstermişlerdir [Gamze *et al.*, 2013]. Dolayısıyla SIK'nin farklılaşma uyarısına karşı ani miktar ve aktivite artışının erken mitotik klonal genişleme ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

Yaptığımız ilk çalışmalarda SIK2 inhibitörü varlığında hücre çoğalmasında görülen azalma bizi SIK'nin farklılaşmanın erken safhasında önemli rol oynayabileceğine yönelik hipotezi dahada güçlendirmiştir.

Bu çalışmalar, literatürde yer alan; obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklarda artan SIK2 ve bu hastalıklarda kronik olarak artan protein sentez yükü sonucu oluşan ER stresi ile beraber ele alınmaya çalışılmış ve adiposit farklılaşmasında oluşan ER stresin, adiposit farklılaşmasına etkisinde SIK2 ile ilgili protein ve genlerin rollerini araştırılması yüksek lisans tez konusu olarak belirlenmiştir.

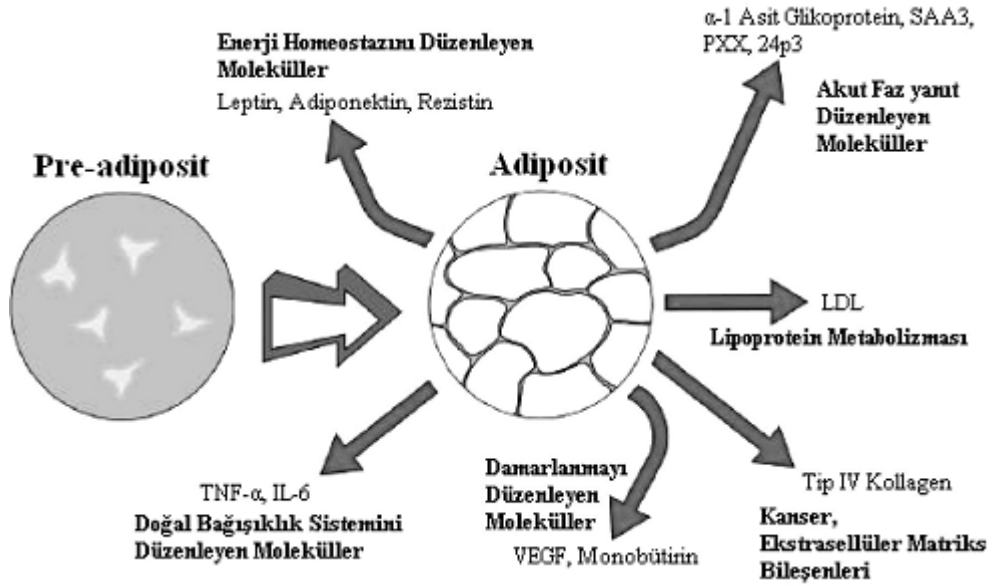
2. ADİPOZ DOKU

Adipoz doku enerji dengesini düzenleyen ve koordine eden bir dokudur. Esas olarak adiposit fibroblast, fibroplastik preadiposit hücrelerin; endotel, sinir ve immün hücreler tarafından çevrilmesiyle oluşmuştur. Adipoz dokunun, sadece enerji depolayan bir organ olduğu düşünülmesi son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda endokrin fonksiyona sahip dinamik bir doku şeklinde değişmesine neden olmuştur. Adipoz dokunun fonksiyonunun bozulması; obezite, tip 2 diabet, kanser, cachexia ve lipodystrophis gibi birçok metabolik hastalıkla ilişkilidir. Adipoz dokunun beyaz ve kahverengi olmak üzere 2 çeşiti vardır [Erin *et al.*, 2004].

Beyaz adipoz doku; besin alımı sonrası oluşan fazla enerjinin depolandığı yerdir [Erin *et al.*, 2004]. Enerji ihtiyacı durumunda yağ dokuda bulunan trigliseritlerin (TG) lipazlar tarafından hızlıca hidrolize edilmesiyle (lipoliziz) oluşan yağ asitleri diğer dokularda enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere dolaşıma katılmaktadır. Beyaz yağ dokusu aktif endokrin organ olarak insülin duyarlılığı, lipid metabolizması ve tokluk hissi gibi çeşitli aktiviteleri düzenlerler. Beyaz adipoz doku yetişkin insanda başlıca derinin altında (subkuten), iç organların çevresinde (visseral) ve yüzde bulunur. Deri altında bulunan ve iç organları çevreleyen adipoz dokular histolojik olarak benzerlik gösterebilir, özel depo metabolik fonksiyonları yönünden farklılıklara sahip oldukları düşünülmektedir. Bu farklılıklar, farklı parakrin ve endokrin sinyalleriyle ya da farklı gelişim süreçleriyle ilişkilidir. Obezitenin gelişimi boyunca iç organlarda yağ birikmesi, patolojik enflamasyon ve insülin direnciyle ilişkilidir. Deri altındaki adipoz dokunun ise glukoz toleransını düzenleyici rolü vardır (Şekil 2.1) [Erin *et al.*, 2004].

Kahverengi yağ dokusu özellikle vücut ısıyla ilgilidir. Sıcakkanlı hayvanlarda soğuk iklime adaptasyonunu gerçekleştirecek sabit ısıda kalım (termogenez) için özelleşmiştir. Kahverengi yağ doku, yağ asitlerinin hızlı yıkılabilmesi için küçük trigliserit damlaları içermektedir. Kahverengi adipoz dokusu termogenezi ayarlamak için yüksek miktarda mitokondri içermesi ve yağ asitlerinin metabolizmasını yalnızca kahverengi yağ dokusunda bulunan mitokondriyal protein olan (UCP1) ısı üretmek amacıyla kullanmaktadır. Bu yağ hücreleri beyaz yağ hücrelerine göre daha

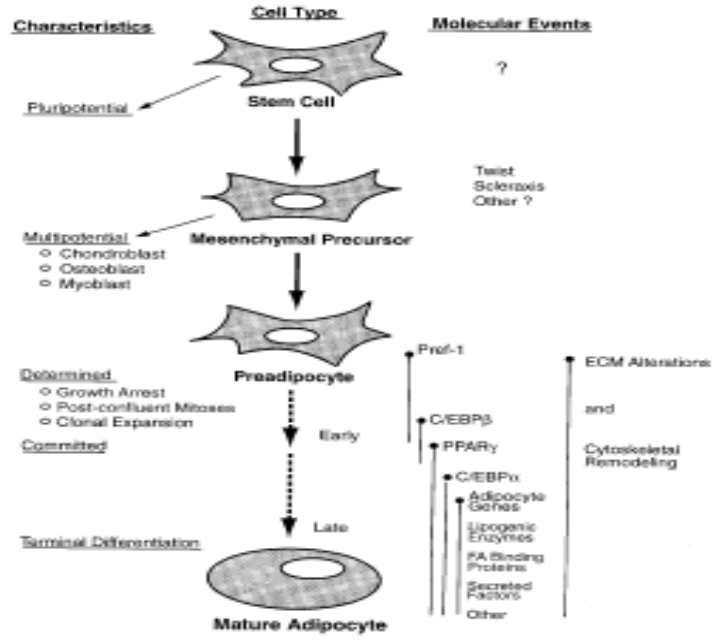
az miktarda triaçilgliserol ve daha çok sayıda mitokondri içerdiklerinden dolayı renkleri kahverengidir [Guilherme *et al.*, 2008].



Şekil 2.1: Adipoz dokudan salınan moleküller.

2.1. Adiposit Farklılaşmasında Kullanılan *In Vitro* Modeller

Kapsamlı olarak 20 yıldan fazla zamandır adiposit farklılaşması çalışılmaktadır. *In vitro* olarak kullanılan fibroblast benzeri öncü adipositlerin, olgun yuvarlak yağ hücresine dönüşmesi hücrel metabolik olayların sonucunda meydana gelir (Şekil 2.2) [Gregoire *et al.*, 1992]. *In vitro* olarak gerçekleşen adiposit farklılaşma çalışmaları için 2 farklı hücre hattı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücre hatlarından bir tanesi adiposit olmaya karar vermiş preadipoz, diğeri ise multipotent kök hücre hattıdır (MSC). Bu multipotent hücre hattı gelen sinyal doğrultusunda adipos, kıkırdak ve kas gibi hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir. Bu çalışmaların yapılabilmesi için çeşitli öncü adiposit hücre hatları kullanılır (3T3-L1, Ob17, 3T3-F442A) [Green *et al.*, 1981].



Şekil 2.2: Memelilerde öncül adipositten olgun adiposite dönüşüm sürecine özgü genler ve transkripsiyon faktörleri.

2.1.1. Preadipoz Hücre Hattı

Adiposit farklılaşması için *in vitro* çalışmalarda en fazla kullanılan kullanılan 3T3-L1 ve 3T3-F442A hücre hatları, Swiss 3T3 fare embriyolarından izole edilmiştir. Farklılaşmanın farklı safhalarında elde edildiklerinden MCE açısından da farklılık göstermektedir [Green *et al.*, 1974].

Tek bir döllenmiş yumurtadan 200 farklı hücre tipi oluşabilir. Pluripotent fibroblastların (kök hücreler) mezenkimal orijinli oldukları bilinmektedir. Multipotent kök hücreler, farklılaşmış hücrelerin kaynağını teşkil eder. Yapılan son çalışmalar göstermiştir ki; adipoz doku multipotent kök hücre kaynağıdır. Bir multipotent hücre kendini yenileme yeteneğine sahiptir. Diğer taraftan verilen sinyallere göre multipotent kök hücre, farklı hücrelere dönüşebilir. Bunlar; preadipositler, kıkırdak, kemik ve kas dokularına dönüşebilme yeteneğine sahiptirler [Ntambi *et al.*, 2000].

In vivo olarak preadipositlerin farklılaşmasını çalışmak zordur. Hayvan yağ dokusu 1:3 oranında adipositlerden geri kalan bölümü ise kan damarları, sinir dokusu, fibroblast ve preadipositlerden oluşur. Benzer gelişim evreleri olduğundan dolayı preadiposit ve fibroblast ayrımı yapmak zordur. Ancak primer kültür

kullanımında birtakım zorlukları beraberinde getirir. İlk olarak yağ dokusunun sadece >1% oluşturan preadipositleri izole etmek için büyük miktarlarda yağ dokusuna ihtiyaç duyulur. Bu nedenlerden ötürü adiposit farklılaşması in vitro olarak bu kültür modelleriyle çalışılmıştır. Bu hücre hatlarının avantajları ve dezavantajları vardır. Bu klonal hücre hatları, hücresel popülasyonla homoji gösterir. Bu nedenlerden dolayı biyolojik araştırmalarda klonal hücre modelleri, hayvan modellerinin yanında tamamlayıcı görevi görürler [Ntmabi *et al.*, 2000].

Adiposit öncül hücre hatları ikiye ayrılmışlardır. Bunlar pluripotent fibroblast (10t1/2, rcj3 ve chef/18 fibroblast), diğeri ise unipotent preadipositlerden (3T3-L1, 3T3-F22A TAİ, ob1771 gibi) oluşur (Şekil 2.3) [Gregoire *et al.*, 1992]. Pluripotent fibroblast çeşitli farklı hücre tiplerine dönüşme yeteneğine sahiptirler. Unipotent preadipositler ise kararlı bir şekilde, preadiposit şeklinde kalabilir ya da olgun adipositlere dönüşebilirler [Ntambi *et al.*, 1973].

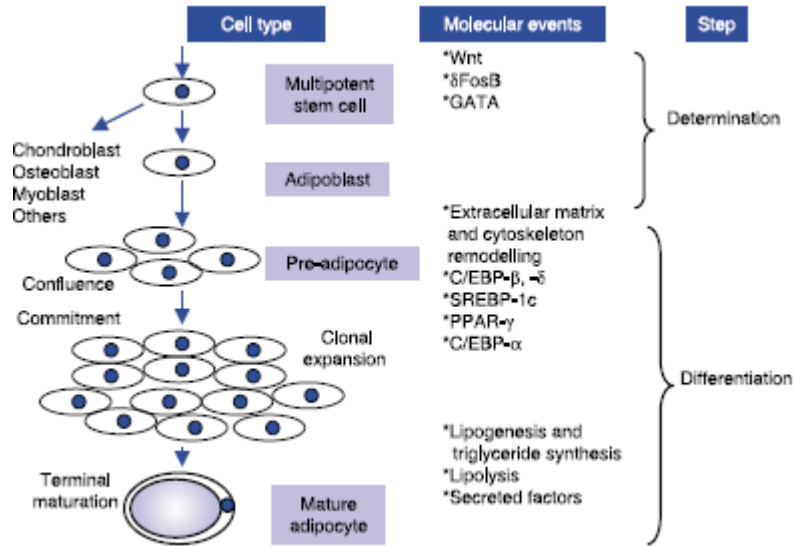
Cell Lines	Origin/Stage of Development	Inducing Agents Used for Differentiation
ES cells	Mouse blastocyst*	Retinoic acid
CH3 10T1/2	Mouse embryo†	Demethylating agent 5'-azacytidine
TA1	Derived from 5-azacytidine-treated 10 T1/2‡	10% FBS, insulin, and Dex
3T3-L1	17- to 19-day disaggregated mouse embryo‡	10% FBS, Dex and MIX, insulin (high concentration)
3T3-F442A	Same as above	10% FBS, insulin
Ob17	Epididymal fat pads of adult ob/ob 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 2.3: Adiposit farklılaşmasında kullanılan modeller.

2.2. Adipoz Farklılaşmasının Süreci

Adipoz farklılaşması fibroblast benzeri öncü adiposit hücrelerinde hücresel ve moleküler düzeyde bir seri olayın meydana gelmesiyle gerçekleşir. Adiposit farklılaşması, karar verme fazı ve terminal farklılaşma şeklinde iki basamakta

gerçekleşir. Karar verme sürecinde öncü kök hücre farklılaşarak preadiposit dönüşür. Bu preadiposit hücreleri öncü hücrelerden morfolojik olarak ayırt edilemezler ve başka hücrelere dönüşme potansiyellerini de kaybetmişlerdir. Terminal farklılaşma fazında ise öncü adipositler olgun adipositlere benzerler. Olgun adiposit olması için bu hücrelerin lipit taşıması ve sentezi, insülin faaliyeti ve adiposit için gerekli spesifik proteinlerin salınması gibi fonksiyonları kazanması gerekir [Gregoire *et al.*, 1992]. Bu aşamalar karar verme fazından sonra gerçekleşir çünkü terminal farklılaşmaya girmeden önce, kontak inhibisyonundan sonra büyümenin tutuklanması gerçekleşir ve 3T3-L1 gibi bazı preadiposit hücreler farklılaşmadan önce bir ya da iki hücre bölünmesi geçirirler. Bu aşamaya “Mitotik Klonal Genişleme (MCE)” denir. Bu aşamada hücreler tekrar hücre döngüsüne girerler ve hücre bölünmesi geçirirler [Ntambi *et al.*, 2000]. Bu olay hücre döngüsü proteinlerinin hiyerarşik koordinasyonuna dayanır. Adiposit farklılaşmasında morfolojik ve moleküler olarak farklılaşmasının düzenlenmesi için koordineli çalışan baskılayıcı veya teşvik edici 2000’den fazla transkripsiyon faktörü gereklidir. Hücreler %100 hücre yoğunluğunda olduklarında adiposit farklılaşması için gerekli olan erken farklılaşma genlerinin ifadesi gerçekleşir. Daha sonra hücrelerin kollojenlerin birbirlerine değmesiyle birlikte lipoprotein lipaz’ın ekspresyonu teşvik eder [Cornelius *et al.*, 1994]. Farklılaşmayı uyarmak için MDI’nın ilavesinden sonra bir saat içinde c-fos ve c-Jun’un ekspresyonu gerçekleşir. Fos ve jun’un spesifik adiposit farklılaşması olayına direkt etkisi tam olarak bilinmemektedir. Diğer sistemlerde hücrelerde mitojenik aktivitelere sahip olduğu düşünülmektedir. C-myc’nin öncü adipositin farklılaşmasında mitogenezi başlattığı gösterilmiştir [Cornelius *et al.*, 1994]. Hücre siklusuna tekrar girmesine katkı sağlamasından dolayı büyümesi tutuklanan hücrelerde c-myc ekspresyonunun düğüm noktası olabileceği düşünülmüştür [Gregoire *et al.*, 1992].



Şekil 2.4: Adiposit farklılaşmasının süreçleri.

Terminal adiposit farklılaşması bir dizi transkripsiyonal süreçle ilişkilidir. *In vitro* ortamda hormonal farklılaşma kokteyinin eklenmesinden sonra adiposit farklılaşmasının ilk ve erken basamağı, C/EBPβ ve -γ anlatımının geçici olarak gerçekleşmesiyle meydana gelir. Farklılaşmanın ilk 24 saati süresince hücrelerde C/EBPβ ve -γ birikmeye başlar ve hücreler tekrar hücre döngüsüne girerler ve MCE'yi yerine getirir [Tang *et al.*, 2003]. Bu dönüşüm hücreleri G₀ fazından G1 fazına sokar. C/EBP-β ve -γ aşırı fosforlanır ve sırasıyla glikojen sentez kinaz-3β (GSK3β) ve Mitogen-Activated Protein Kinaz (MAPK) aktive olur. Sonrasında ise; C/EBPβ ve -γ direkt olarak adiposit farklılaşmasının anahtar düzenleyici transkripsiyon faktörleri olan PPARγ ve C/EBPα'nın ekspresyonu uyarırlar (Şekil 2.4) [Tang *et al.*, 2003].

2.3. Mitotik Klonal Genişleme

Büyümesi durdurulmuş 3T3-L1 öncü adipositleri farklılaşmanın teşvikinden sonra, tekrar hücre döngüsüne girerler ve bir ya da iki kere daha hücre bölünmesi geçirirler [Bernlohr *et al.*, 1985]. Bu safhaya "Mitotik Klonal Genişleme" denir. Bu olay hücre döngüsü proteinlerinin hiyerarşik düzenlenmesine dayanır. Siklin bağımlı protein kinazlar (Cdk) hücre döngüsü sürecinin düzenlenmesinde kritik rol oynarlar

[Nigg *et al.*, 1995]. Çoğalan hücrelerde; mitoz ve S'nin başlangıcında fosforilasyon olayları Cdks tarafından tetiklenir [Morgon *et al.*, 1997]. Birçok hücre tiplerinde hücre döngüsünün G1 fazı boyunca Cdk2 ifade olurken; 3T3-L1 öncü adipositlerinde, MCE'nin G1 fazında Cdk2 ifadesi gerçekleşmez. Hücrelerin S fazına girmesiyle eş zamanlı olarak Cdk2'nin ekspresyonu meydana gelir [Tang *et al.*, 2005].

Hormonal farklılaşma kokteyinin eklenmesinden sonra adiposit farklılaşmasının erken genlerinden olan C/EBP β 'nin anlatımı gerçekleşir bu aşamada C/EBP β 'nin DNA bağlanma yeteneği yoktur bu sebeple DNA'ya bağlanamaz ve transkripsiyonel aktivatör olarak fonksiyonunu yapamaz [Tang *et al.*, 2005]. Daha sonrasında ise, *in vivo* ve *in vitro*da C/EBP β sırasıyla, MAPK ve GSK3 β Thr-188 Ser184 üzerinden fosforlanır. Bu aşamada eş zamanlı olarak Cdk2'nin de ekspresyonu olur. C/EBP β 'nin MAPK ve GSK3 β tarafından fosforlanması; DNA bağlanma fonksiyonunun kazanmasını sağlar. DNA bağlanma özelliği ve transkripsiyonel aktivasyonunu kazanan C/EBP β , adiposit farklılaşmasının ikincil genlerinden olan C/EBP α ve PPAR γ genlerinin ifadesini gerçekleştirir. Bu iki gen antimitotik etki gösterirler ve mitotik klonal genişleme safhasını sonlandırırlar. C/EBP β ve PPAR γ , birçok adiposit genin ifadesini gerçekleştirerek olgun adipoz fenotipini oluşturmakta fonksiyoneldir [Tang *et al.*, 2005].

2.4. PREF-1 Ailesi

Preadiposit Faktör 1(PREF-1) transmembran proteindir ve hücre dışı domainde Epidermal Büyüme Faktör(EGF) benzeri tekrarlara, juxtamembran bölgesi, tek transmembran domain ve kısa sitoplazmik kuyruğa sahiptir. PREF-1; 3T3-L1 öncü adipositlerde bulunurken, olgun adipositlerde bulunmaz bu yüzden öncü adiposit markörü olarak kullanılır [Smas *et al.*, 1998]. 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşması sırasında, adipoz dönüşümü PREF-1'in adiposit farklılaşması sırasında PREF-1'in normal baskılanması şeklinde ya da çözünür PREF-1 ektodomanin ilavesiyle dönüşebilir [Smas *et al.*, 1993]. Aksine; antisense RNA'nın ekspresyonu aracılığıyla PREF-1'in baskılanması, adiposit farklılaşması geçiren hücrelerin yeteneğini artırır [Smas *et al.*, 1999]. PREF-1'in önemini göstermek için; PREF-1'i knockout yapılmış fare ve PREF-1'i overekspresyon yapılmış transgenik fare kullanılmıştır. PREF-1'i knockout yapılmış farelerde büyümenin durdurulması, iskelet

şekil bozukluğu ve şişmanlığı arttırdığı gösterilmiştir [Moon *et al.*, 2002] ancak PREF-1'in bütün ektodomaininin overekspresyonu yapılmış farelerde ise adipoz dokuda; yağ kütlesinde azalma, adiposit markerların ekspresyonunda azalma ve leptin, adiponektin gibi adipositlerden salınan faktörleri düşürdüğü gösterilmiştir [Lee *et al.*, 2003]. *In vivo* ve *in vitro* da adipogenezde, PREF-1 'in baskılayıcı fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. Farklılaşma ajanının bir bileşeni olan glukokortikoid, PREF-1 ekspresyonunun aşağı yolaklarında ki düzenlenmesi tarafından adiposit farklılaşmasını artırır [Smas *et al.*, 1999]. Diğer bir çalışmada; PREF-1'den yoksun Fare Embriyo Fibroblastları(MEF) kullanılarak, PREF-1'in MAPK sinyal yolağı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda PREF-1'in doğrudan MEK1/2 ve ERK1/2 fosforilasyonu arttırdığı ve PREF-1 anti adipojenik etkisini ERK yolağını aktifleştirerek yaptığı gösterilmiştir [Kim., 2007], [Wang *et al.*, 2010]. ERK yolağının aktivitesi ise farklılaşma sürecinin başlatılması için gerekli iken ileri olgunlaşma safhasında bu etki anti adipojeniktir.

Embriyonez süresince, birçok farklı dokuda PREF-1 eksprese olur [Floridon *et al.*, 2000] ancak doğumdan sonra birçok dokuda hızlı bir şekilde PREF-1'in ekspresyonu ortadan kalkar ve öncü adipositlerde ve birkaç hücrelerin nöro endokrin tiplerinde sınırlı oluşurlar [Carlsson *et al.*, 1997], [Halder *et al.*, 1998].

2.5. C/EBP Ailesi

CCAAT/enhancer binding protein ailesinin üyeleri adiposit farklılaşmasında önemli rol oynayan proteinlerdir. Bu transkripsiyon faktörleri bazik transkripsiyonal aktivasyon alt birimi ve yanında homodimer ve heterodimer yapma özelliği gösteren lörin zipper motife sahiptir [Lane *et al.*, 1996].

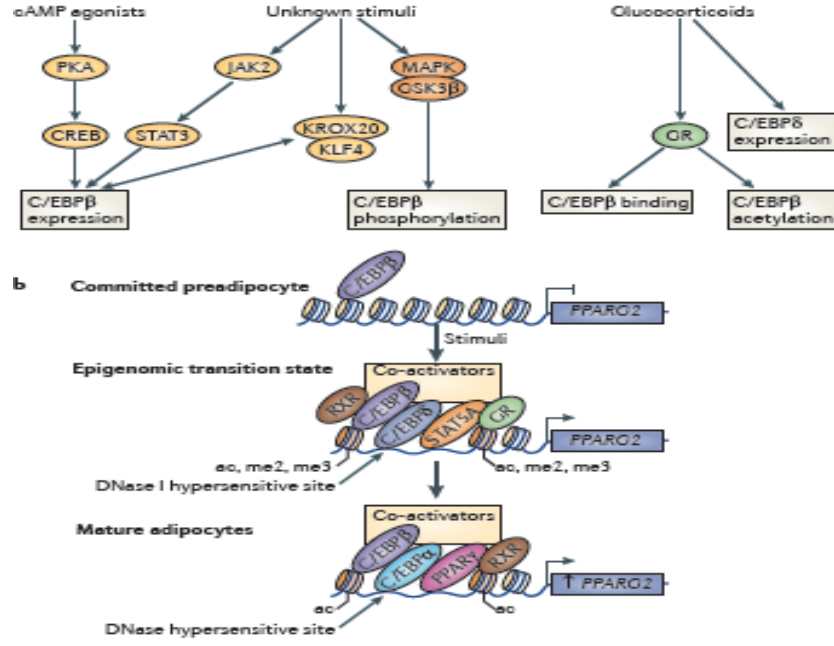
C/EBP α bir transkripsiyon faktörüdür ve adiposit farklılaşmasında rol oynayan birçok genin (ap2, scd1, glut-4, pepck, leptin ve insülin reseptör gibi) aktivasyonunu gerçekleştirmek için hedef promotorlara bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir. C/EBP- α 'da mutasyonların meydana gelmesi, hedef genlerin transaktivasyonun bozulmasına ya da durmasına neden olur [Kaestner *et al.*, 1990]. Bazı örneklerde C/EBP α ifadesinin 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasını engellediği belirlenmiştir [Lin., 1990]. C/EBP α antimitotik aktivitesinden dolayı, mitotik klonal ekspansiyon sonucunda fonksiyon gösterir ve adiposit fenotipi oluşması boyunca

anlatımı devam eder [Christy *et al.*, 1991]. Adiposit gen ekspresyonunun kontrolü C/EBP α , C/EBP β ve γ 'nın homo ve heterodimerizasyonu gerçekleştirmesiyle ilgilidir. C/EBP α ekspresyonu adiposit farklılaşmasının geç evrelerinde gerçekleşirken β ve γ izoformları öncü adipositlerde ve farklılaşmanın erken aşamalarında geçici olarak artar. PPAR γ 'nın ekspresyonu C/EBP β ve C/EBP γ 'nın ekspresyon işbirliği tarafından uyarılır. Bu iki C/EBP izoformunun heterodimerleşmesi PPAR γ 'nın anlatımını doğrudan regüle eder [Wu *et al.*, 1996]. 3T3-L1'lerle yapılan farklılaşma deneylerinde C/EBP β ve C/EBP δ 'nın seviyeleri adiposit farklılaşmasının teşviki için kullanılan MIX ve DEX tarafından uyarılır. MIX ve DEX'in bu özellikleri erken adiposit farklılaşmasındaki adipogenik etkilerini, C/EBP β ve C/EBP γ 'nın üzerinden gerçekleştirdiği düşündürmektedir.

C/EBP ailesinin bir diğer üyesi de homolog protein-10'dur (CHOP). CHOP proteinlerinin DNA bağlanma ve dimerizasyon bölgeleri diğer C/EBP proteinleriyle benzerlik gösterir. Ancak CHOP'un basic bölgesi diğer C/EBP protein dizilerinden epeyce farklıdır. Bu sebeple CHOP-C/EBP heterodimerleşmesi C/EBP bölgesine bağlanmayı imkansız kılar. Bu nedenle CHOP, C/EBP transkripsiyonunun aktivitesini negatif olarak regüle eder. CHOP normal koşullarda hücrelerde bulunmaz. Ancak hücresel stresle birlikte artar [Wang, 2010].

2.6. PPAR γ Ailesi

Peroxisome proliferator-activated receptor alfa (PPAR γ) proteinleri, tip 2 nuklear hormon reseptör ailesine ait proteinlerdir ve RXR ile heterodimerleşen transkripsiyon faktörleridir [Juge-Aubry *et al.*, 1995]. Peroxisome proliferator-activated receptor α daha çok adipoz dokuya özgü proteinlerdir. PPAR γ anlatımı birçok adiposit genin transkripsiyonal aktivasyondan önce uyarılır. Düşük seviyede karaciğer ve hematopoetik hücrelerde de PPAR γ 'nın ekspresyonu olur.



Şekil 2.5: Terminal farklılaşma süresince C/EBPs ve PPAR γ 'nın epigenetik düzenlenmesi.

PPAR γ , ligand-aktivated transkripsiyon faktörünün nuklear reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Kahverengi ve beyaz yağ dokusunun farklılaşması için gerekli ön koşuldur [Kajimura *et al.*, 2008]. Yağ dönüşümü için PPAR γ gerekli ve yeterlidir [Farmer, 2006]. Fare embriyonik fibroblastlarında PPAR γ 'nın ekspresyonu, C/EBP α 'nın yokluğunda ektopik olarak adipogenezi teşvik ettiği fakat PPAR γ 'nın ifadesi olmadığı zaman C/EBP α 'nın adipogenez sürecini ilerletemediği görülmüştür (Şekil 2.5) [Cristancho and Lazar, 2011]. Bu durumda göstermiştir ki, PPAR γ adipogenezin primer düzenleyicisidir [Rosen *et al.*, 2002]

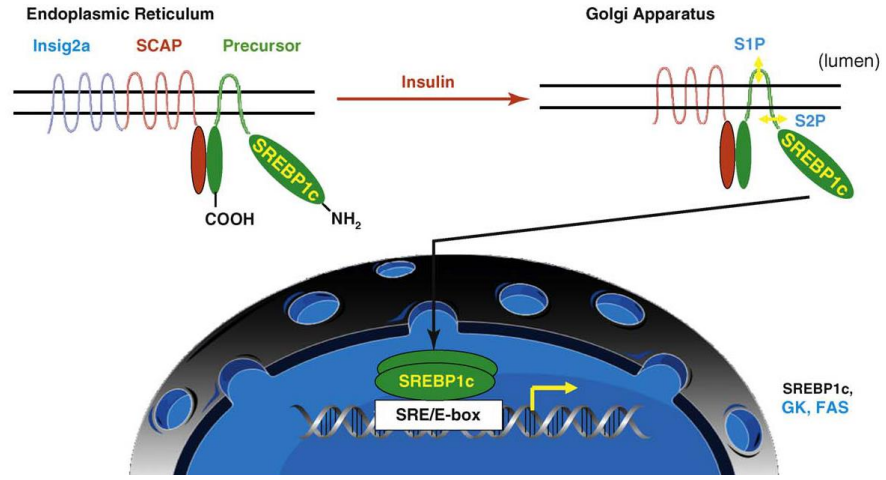
PPAR γ , yağ asit estrifikasyonu ile trigliseritlerin sentezi ve paketlenmesi için gerekli olan genleri [fatty asit sentaz (fas), lipoprotein lipaz (lpl) gibi.] de kontrol etmektedir. Bundan dolayı PPAR γ 'nın işlevinin bozulması adipositlerde trigliserit birikimnini azaltmakta, insülin direncini artırmakta ve tip 2 diyabet(TD2) ye öncülük eden iskelet kası ile karaciğerde yağ asidi birikimini arttırmaktadır [Guilherm *et al.*, 2008].

Fibroblastlarda PPAR γ 'nın fazla ifadesinin adiposit farklılaşmasının uyarılması için yeterli olduğu gösterilmiştir. PPAR γ 'nın PPAR γ -1 ve PPAR γ -2 şeklinde farklı 2 tipi vardır. PPAR γ -1'in anlatımı genel olarak tüm dokularda olurken, PPAR γ -2 özellikle yağ dokuda ifade edilir ve PPAR γ -1'den farkı ise amino ucunda 30

aminosit fazla bir bölge içermesidir. PPAR γ 'nın bu izoformları alternatif RNA işlenmesi ve alternatif promotorların kullanılması ile oluşmaktadır. Her iki izofomda adipogenezi uyarabilmektedir. Bu bilgiler PPAR γ 'ını adipogenez için gerekli olduğunu göstermektedir [Martina et al., 2009]. Thiazolidinedione PPAR γ 'nın aktivitesini uyarak insülin duyarlılığını arttıran farmakolojik bir ajandır. Bu nedenle thiazolidinedione, insülin direnci ile ilişkili semptomların düzeltilmesinde kullanılır.

2.7. SREBP Ailesi

Lipit sentezi yeni organellerin membranların şekillerinin oluşturulması ve hücre proliferasyonu ve büyümesi için gereklidir. Kolesterol ve yağ asidinin sentezi sterol düzenleyici element bağlayıcı protein transkripsiyon faktör ailesi tarafından düzenlenir [Horton et al., 2002]. SREBPs bazik heliks-loop-heliks lözin zipper transkripsiyon ailesine aittir [Brown et al., 1999]. SREBPs ailesinin; SREBP1a, SREBP1c ve SREBP2 olmak üzere tanımlanmış 3 üyesi vardır [Edward et al., 2000]. Izoform SREBP1a ve 1c genlerinin anlatımı; tek bir genden alternatif promotorlar kullanılarak gerçekleşir. SREBP2 farklı gen tarafından kodlanır. SREBP-2 formu genellikle sterol sentezinde görevli genlerin anlatımını sağlarken, SREBP1-c ve 1a ise lipogenik genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir. SREBPs, inaktif öncü transmembran protein şeklinde ER sentezine gömülü olarak sentezlenir ve transkripsiyonel olarak inaktiftir [Rawson et al., 1997]. SREBPs, SREBP kesen-aktifleştiren protein (SCAP) ile etkileşir ve SREB/SCAP kompleks oluşturur. SREBP/SCAP kompleksi INSIG protein tarafından ER'de tutulur. SNAP/SREBP/INSİNG kompleks kolesterol tarafından stabilize halde tutulur. Kolesterol seviyesi düştüğü zaman, SREBP, SCAP eşliğinde golgi aygıtına taşınır ve S1P ve S2P proteazları ile kesilerek proteinin N-ucunda bulunan transkripsiyon domainin serbest kalmasını sağlar. SREBPs'nin transkripsiyonel aktivasyon domaini nukleusa taşınır kolesterol, yağ asidi ve trigliserit için gerekli olan genlerin promotor bölgesinde bulunan ve SRE (sterol ile düzenlenen element) adı verilen özel DNA dizilerine bağlanarak anlatımını gerçekleştirirler [Gong et al., 2006]. (Şekil 2.6) [Naimi et al., 2009].



Şekil 2.6: Öncül SREBP-1c'nin golgi aygıtında kırılarak transkripsiyonel olarak aktif SREBP-1c'ye dönüştürülme mekanizması.

Mitotik hücrelerde; SREBP1a ve SREBP1c'nin olgun formları, yüksek düzeyde fosforlanmış halde bulunur. Hücreler G2/M fazında tutulduğunda olgun SREBP1'in transkripsiyonel aktivitesi artmıştır [Alonso *et al.*, 2005]. Mitoz boyunca SREBP1c stabilize şeklinde bulunur. SREBP1'in bu hiperfosforilasyon ve transkripsiyonel aktivasyon Ser/Thr'nince zengin ve mitotik protein monoklonal-2(MPM-2) epitop içeren karboksi ucuna aittir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; olgun SREBP1a'nın C terminal ucunda bulunan MPM-2'a serin 439 bakiyesinden fosforlanır [Maria *et al.*, 2005]. İn vivo ve in vitro da SREBP1a; hücre döngüsünde fonksiyonel olan Cdk1/cyclinB için substrat olduğu bulunmuştur ve serin439 'un Cdk1 aracılığıyla fosforilasyonu mitoz boyunca SREBP1'in stabilitesi için önemli olduğu gösterilmiştir [Maira *et al.*, 2005]. Bu çalışmaların doğrultusunda SREBP1; yağ sentezi, proliferasyon ve hücre büyümesi arasında bir bağ sağlayabilmektedir [Alonso *et al.*, 2005].

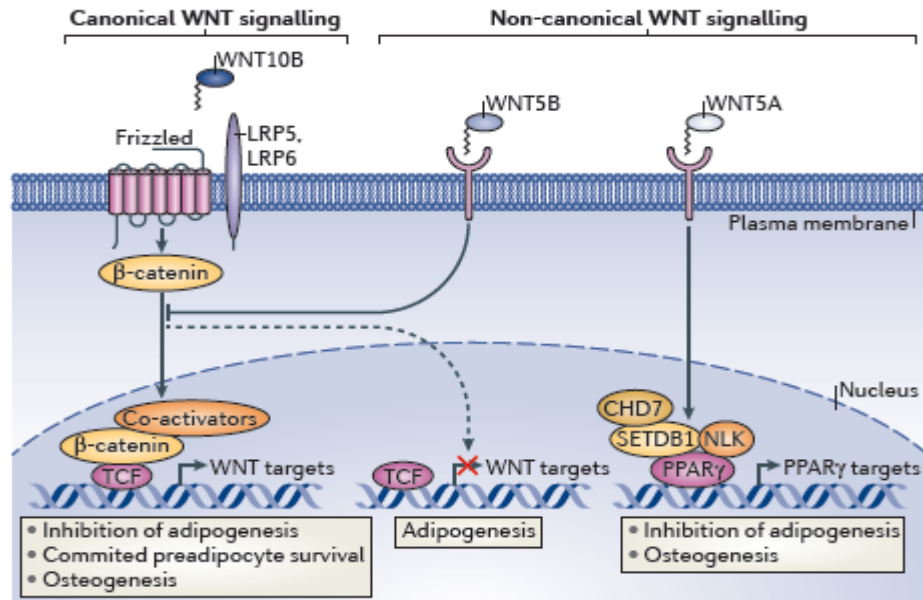
2.8. WNT Sinyali

Wnt aile üyeleri glikoproteinlerden sentezlenirler, birçok hücre tipinin gelişimini otokrin ve parakrin mekanizmalar üzerinden etkilerler ve bu süreçlerde anahtar roller üstlenirler. Doğal Wnt sinyali, Wnt ligandının düşük yoğunlukta lipoprotein reseptör ile ilişkili-5 (LPRP5), LPRP6 ve frizzled heterodimerik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olur. Bunun sonrasında β katenin Wnt efektörü olarak görev yapar. Androjen reseptörüne bağlanarak nükleusa geç eder ve

nükleusta TCF/LEF transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek adipogenezin inhibe eder. Wnt/ β -Katenin yolağı adipogenezin ve mezenkimal hücrelerin düzenlenmesinde önemli bir düzenleyici yoldur.

Doğal WNT ligandı olan Wnt10b preadipositlerden sentezlenir ve β katenini stabilitesi eder ve 3T3-L1 farklılaşmasını engeller. Preadiposit olmaya karar vermiş hücrelerde adipogenezin engeller. LRP6 adiposit farklılaşmasını artırır. Ancak farelerde eksprese olmuş Wnt10b ligandı preadipositler tarafından ifade edilir. Histon metil transferaz enhancer of zeste homolog 2 tarafından Wnt10b ve diğer doğal ligantlar baskılanır. Doğal wnt sinyali adiposit prekürsürün hayatta kalması için gereklidir [Cristancho and Lazar, 2011].

Wnt sinyalinin β -Katenin'den bağımsız yolağı da bulunmaktadır. Bu süreç doğal olmayan sinyal yolağı olarak bilinir. Bu yollar farklı hücre reseptörlerinden ve farklı intercellular yollardan aktif olurlar. Doğal olmayan wnt ligandı Wnt5a Setb1 ile aktive olur. Setb1, chd7 ve nlk ile kompleks oluşturularak 3T3-L1 hücrelerinde PPAR γ 'nın transkripsiyon aktivitesini engeller. Wnt ligandı olan Wnt5 tip 2 diabetesle ilişkilidir. Wnt5, β katenin'in nükleusa translokasyonu engelleyerek aktivitesini inhibe eder (Şekil 2.7) [Cristancho and Lazar, 2011]. Öncül preadipositlerin üzerinde doğal olmayan Wnt sinyal yolağını inhibe eder [Stephen *et al.*, 2006].



Şekil 2.7: Adipogenezde WNT sinyali.

2.9. Krüppel-Benzeri Faktörler

Krüppel-Benzeri Faktörler(KLF) apoptoz, proliferasyon ve farklılaşmayı düzenleyen CACC- ve GC-‘ce zengin DNA sekanslarına bağlanan çinko parmağı proteinlerinin geniş bir ailesidir.(H30) KLF’lerin birçoğu adipoz dokuda eksprese olur. Adiposit farklılaşması üzerinde etkileri vardır. KLF15 adipositlerde olduğu belirlenen ilk KLF aile üyesidir ve insüline duyarlı glukoz transport-4 (GLUT-4) ifadesini teşvik eder [Gray *et al.*, 2002]. KLF5, C/EBP β ve C/EBP δ tarafından erken adiposit farklılaşması boyunca uyarılmaktadır. Ayrıca KLF5, PPAR γ ’nın promotoruna bağlanarak C/EBP’ler ile birlikte transkripsiyonel aktivasyonda yer almaktadır. KLF6 ise 3T3-L1 hücrelerinde ve fibroblastlarda preadiposit faktör-1’in ekspresyonunu baskılamaktadır. KLF’lerin hepsi adiposit farklılaşmasını teşvik etmez. KLF2 ve 7 anti adipojenik etkiye sahiptir. KLF2 PPAR γ ’nın promotorunu inhibe eder [Wu *et al.*, 2005].

2.10. TGF- β Süper Aile Sinyali

Transforming Growth Faktor β (TGF- β) süper aile ligantı morfojenler tarafından salınır. Bu sinyal çeşitli hücrelerin farklılaşmasını düzenler. TGF- β öncü adiposit çoğalmasında teşvik ederken adipogenezde inhibe eden bir sitokindir. TGF- β ’nın transgenik overekspresyonu adipoz dokunun gelişimini engeller [Clouthier *et al.*, 1997]. Endojenik TGF β sinyalinin engellenmesi, adipoz dokuda artan Smad3’ün inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşir. Smad3 C/EBP’lere bağlanır ve transkripsiyonel aktivitelerini engeller. Adipogenezde kapsayan BMP2, p38 yolağı aracılığıyla çeşitli smad proteinlerinin aktivitelerini uyayarak adipogenezini teşvik eder [Choy *et al.*, 2003]. BMP2 Smad1’i aktive eder ve nuklear translokasyonunu artırarak direkt olarak PPAR γ ’yı stimüle eder.

2.1.1. Mitogenle Etkileşen Protein Kinaz

Büyüme faktörleri ve sitokinler ekstra hücrel sinyal molekülleridir ve hücre büyümesi ve farklılaşmayı kontrol eder. Trompositten türemiş büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörleri (EGF), fibroblast büyüme faktör, tümör nekrosis faktör α , transforming büyüme faktörü gib büyüme faktörlerinin in vivo ve in vitroda adipogenezi baskıladığı gösterilmiştir [Gregoire *et al.*, 1992]. Aksine, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ya da insülinin farmakolojik konsantrasyonu adiposit farklılaşmasını teşvik eder [Smith *et al.*, 1988]. Bu büyüme faktörleri ve sitokinler öncü hücre yüzey reseptörlerine bağlanır ve hücre içi sinyal yolağını aktifleştirerek hedef hücrelerini etkilerler. Bu faktörler adiposit farklılaşması üzerinde ters etkiye sahiptir fakat bu faktörler Mitogenle Etkileşen Protein Kinaz (MAPK) bağımlı yolağı aktifleştirirler [Hu *et al.*, 1996]. Birçok çalışma sonucunda; adiposit farklılaşmasında MAPK yolağının rolü çelişkilidir. Bazı raporlar; mitotik klonal genişleme ya da adiposit farklılaşması [Park *et al.*, 2004], [Prusty *et al.*, 2002] için ekstra hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz (ERK)'ın hızlı geçici aktivasyonunun gerekli olduğunu göstermişlerdir. Başka bir raporda ise; ERK aktivasyonu tarafından farklılaşmanın baskılandığı rapor edilmiştir [Camp *et al.*, 1997].

2.12. Adipoz Dokuda AMP ile Aktive Kinazın (AMPK) Fonksiyonu

AMP ile Aktive Kinazın(AMPK), hücrenin enerji homeostasiyle ilişkilidir. AMPK; glukoz transport, protein sentezi, glukogenez gibi artan enerji olayların gerçekleştiği yolakları teşvik eder. Lipogenez, protein sentezi, glukogenez gibi enerjinin tükendiği durumlarda da görev alır. AMPK1 adipoz doku enerji dengesinin/düzenleyisinin major bir bileşenidir ve bu dokudan hormon salgılanmasına, yağ asit salınımı boyunca insülin duyarlılığının düzenlenmesinde anahtar rol oynar. AMPK hücrede bir katalitik alt ünite ve 2 düzenleyici (β ve γ) alt ünitelerden oluşmak üzere heterodimerik kompleks oluşturur [Woods *et al.*, 1996]. AMPK'ların farklı izoformları keşfedilmiştir. Bu farklı izoformlar 12 farklı

kompleksin oluşturmasını ve AMPK'ların farklı özellikler kazanmasını sağlar. Adipoz dokuda $\alpha 1$ katalitik alt ünite predominant izoformudur.

Rejim ve egzersiz adipoz dokuda AMPK'yı aktive eder. Bu iki durum adrenerjik etkiyi meydana getirir. Harcanan enerji beta-adrenerjik agonisti ve ikincil mesajcı cAMP teşvik ederek AMPK aktivitesini gerçekleştirir.

Leptin ve adiponektin adipoz dokuda AMPK'yı aktifleştiren hormonlardır. Biguaniddines gibi hiperglisemik ilaçlar adipoz dokularda AMPK'nın aktivitesini artırır. Başka bir hiperglisemik ajan olan triazolidinediones transkripsiyon faktörü olan PPAR γ 'nın ligantıdır ve adipoz dokuda AMPK'nın aktivitesini artırır [Daval *et al.*, 2005].

Adipoz dokuda AMPK'nın aktifleşmesine neden olan egzersiz ve rejim gibi durumlarda AMPK'nın aktifleimesine paralel olarak AMP/ATP oranında artış gösterir. AMPK'nın aktivasyonunda sorumlu 2 farklı kinaz bulunmaktadır. Bunlardan ilki tümör baskılayıcı LKB1 kinazdır. Hücrede AMP konsantrasyonu arttığında, AMP, AMPK'nın α alt ünitesine bağlanarak AMPK'da konformasyonel değişikliğe neden olur. Böylece AMPK LKB1'i fosforlanması için uygun hale gelir [Hawley *et al.*, 2005]. Diğer kinaz ise; kalmodulin kinaz kinaz β 'dır. Bu kinaz hücrelerde Ca^{2+} konsantrasyonunda ki artışa bağlı olarak fosforlanıp ve aktive olduğu belirlenmiştir [Blerina *et al.*, 2008].

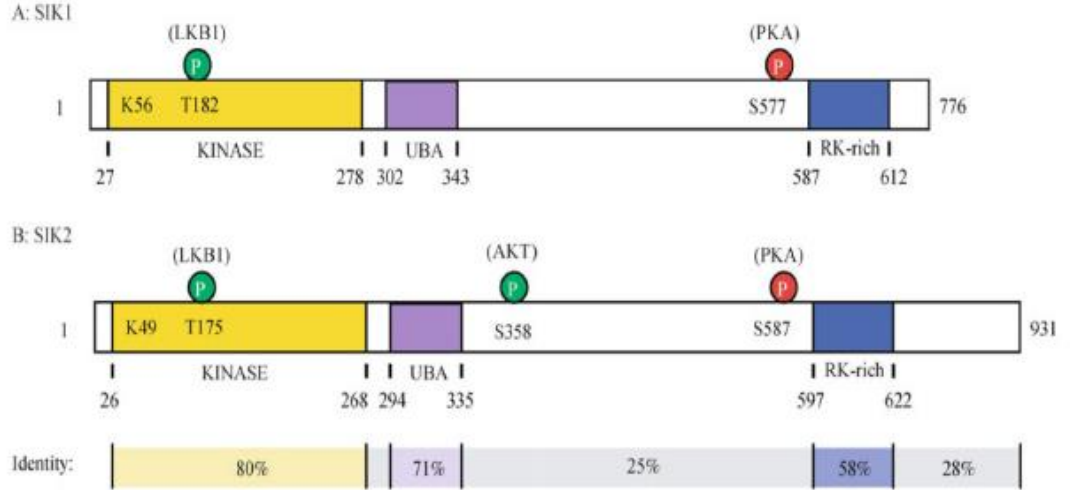
2.13. AMPK Ailesi ve Adiposit Farklılaşmasına Etkisi

AMPK aktivasyonu adiposit farklılaşmasını inhibe eder. AMP analoğu olan ve AMPK'yı aktifleştiren bir ajan olan AICAR ile muamele edilen 3T3-L1 ve F442A öncü adiposit hücrelerinde adiposit farklılaşmasının inhibe olduğu, bununla birlikte farklılaşmanın geç markırlarından olan C/EBP α ve PPAR γ transkripsiyon faktörlerini bloklayarak adiposit farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir [Habinowski *et al.*, 2001].

3. SIK PROTEİN AİLESİ

İlk olarak yüksek tuz diyeti almış farelerin adrenal bezinden klonlanmış bir serin/treonin kinazdır. SIK, AMP ile aktive olan protein kinaz ailesinin bir üyesidir. SIK1 ile olan homolojisi baz alınarak karşılaştırmalı dizi analizleri sonucunda SIK2 ve SIK3 olarak üzere 2 farklı izoformu daha bulunmuştur.(Şekil 3.1) [Berdeaux et al., 2011]. Bütün bu kinaz izoformları evrim boyunca korunmuştur. Memelilerde SIK1 mRNA'sı adrenal bezlerde, testislerde ve iskelet kasında bol miktarda bulunurken adipoz doku, karaciğer ve kalpte az miktarda bulunur [Horike *et al.*, 2003]. SIK2 ise karaciğer, adipoz doku ve beyin gibi dokularda bol miktarda bulunur. SIK3'nin ise bütün dokularda anlatımının yapıldığı belirlenmiştir [Okamoto *et al.*, 2004].

Diğer AMPK ile ilgili protein kinazlar gibi SIK proteinleri oldukça korunmuş homolog N-terminal kinaz alt birimi ve hemen bitişiğinde ubikütün bağlanan (UBA) alt birimi içerirler. SIK'nin her 3 izoformunda arginin/lizince zengin bölgenin yanında bulunan korunmuş C-ucunda PKA (protein kinaz A) fosforilasyon bölgesi bulundurulur. Bu PKA fosforilasyon bölgesinin nukleus yerleşim sinyali (NLS) olarak yer aldığı düşünülmektedir [Katoh *et al.*, 2004]. Bu serin bakiyesinin PKA tarafından fosforlanmasıyla SIK'nin nukleustan sitoplazmaya göç ettiği ve fonksiyonunun baskılandığı gösterilmiştir [Katoh *et al.*, 2004]. Bir diğer fosforilasyon bölgesi kinaz domeni içerisinde bulunmaktadır ve SIK'nin kinaz aktivitesini etkilemektedir. Fosforilasyondan önce SIK'in kinaz alt birimi katalitik olarak aktif değildir fakat diğer AMPK ailesi proteinlerinde de olduğu gibi LKB1 (tümör baskılayıcı kinaz 1)'in ilgili treonin bakiyesini fosforlamasıyla bu bölgede yapısal bir değişim meydana gelmektedir. Böylece SIK'in, substratlarını fosforlayabilmesi için gerekli olan kinaz aktivitesi ortaya çıkarılmaktadır [Katoh *et al.*, 2006]. Bir diğer fosforilasyon bölgesi ise AKT tarafından fosforlanan serin bakiyesidir. İnsülin sinyal yollarında görev alan AKT'nin ilgili bölgeyi fosforlaması sonucunda, SIK aktive olarak görev aldığı yollarındaki işlevini yerine getirmektedir. Başka bir deyişle, insülin sinyaline cevaben SIK aktivasyonu Akt (PKB) fosforilasyonu ile sağlanmaktadır [Berdeaux *et al.*, 2011].



Şekil 3.1: SIK2 ve SIK1 izoformları.

3.1. SIK2 (Salt Inducible Kinase-2)

Farelerde bulunan SIK2 103 kDa ve 931 amino asit bakiyesi içeren bir proteindir. SIK2 mRNA'sı beyaz ve kahverengi yağ dokuda bol miktarda bulunur [Horike *et al.*, 2003]. Öncül adiposit hücrelerinde ve primer adipositlerde SIK2 mRNA'sı adipogenez boyunca ifadesini sürdürür.

CREB (cAMP-duyarlı elemente bağımlı protein) hücre canlılığı, hücre bölünmesi ve glukoz metabolizması gibi birçok fizyolojik olayda rol oynayan ve CRE (cAMP duyarlı element) adı verilen özel DNA dizilerine bağlanan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. CREB'in koaktivatörü olan CRT3, adipoz dokuda bol miktarda bulunur [Song *et al.*, 2010]. Yüksek yağ diyetiyle beslenmiş CRT3 "knockout" farelerde daha fazla insülin duyarlılığı olduğu ve daha az lipid depolandığı görülmüştür. Bu durumda, CRT3 yokluğunda beyaz yağ hücrelerinde CREB/CRT3 kompleksinin hedef geni olan RGS2'nin (regulator of g-protein signaling 2) ekspresyonunun azalmasından dolayı cAMP sinyalinin aktivitesi artmıştır. RGS2 heterodimerik G proteinler üzerinde inhibitör etki gösterir. CRT3'nin hücrelerdeki yokluğu RGS2 ekspresyonunu azaltır ve cAMP'nin artmasına neden olur. cAMP artışı ise adipoz dokuda lipolizi teşvik eder. Bu sebepten dolayı CRT3 ^{-/-} yağ hücrelerinde cAMP'nin artması lipolizin artmasına ve yağsız bir fenotipin oluşmasına neden olur. SIK kinaz normalde CRT3'ü

baskılamaktadır [Song *et al.*, 2010]. Bu sebeple yağ hücrelerinde SIK ekspresyonu lipolizi teşvik ederken, SIK2'den yoksun hayvanlarda; yüksek yağ diyetiyle beslenmiş beyaz yağ dokularında, daha fazla trigliserit depo edilebileceği öngörülmektedir.

SIK2 insülin direnci, hiperglisemi, karaciğer yağlanması (hepatik steatozis) ve tip II diyabet gibi metabolik sendromlardaki bilinen ve olası rollerinden dolayı bu patolojik durumların tedavileri için oldukça önemli bir hedef olarak ortaya çıkmaktadır [Horike *et al.*, 2003], [Bricambert *et al.*, 2009]. Hücre içerisindeki cAMP miktarına duyarlı olan SIK2 tarafından düzenlenen en iyi tanımlanmış hedef protein bir transkripsiyon faktörü olan CREB'in (CRE-Binding Protein) eş aktivatörü TORC2'dir (Transducer of regulated CREB activity 2) [Takemori *et al.*, 2009]. Hücre içi cAMP uyarısı yokken SIK2, TORC2'yi ser171 bakiyesinden fosforlayarak bu transkripsiyonel koaktivatörün 14-3-3 proteinleriyle sitoplazmada tutulmasına neden olur. Hücre tipine göre farklılık gösteren sinyallerin örneğin karaciğer hücrelerinde glukogonun hücre yüzeyine ulaşması için cAMP miktarını arttırmakta, buna cevaben aktive olan PKA SIK2'yı fosforlayarak aktivitesini baskılayabilmektedir. Fosforile olan SIK2 inaktif olduğundan dolayı TORC2'yi fosforile edemez bu nedenle nukleusa göç eden TORC2 transkripsiyon faktörü olan CREB'e bağlanarak CRE bağımlı genlerin transkripsiyonunu başlatır [Dentin *et al.*, 2007] ve bu yolda bulunan diğer moleküllerin aktivasyonu ise fosforilasyon-defosforilasyon SIK2 ile düzenlenen bu mekanizma glukogenezini düzenleyen genlerin anlatımında görev alır [Wang *et al.*, 2009]. Bunun yanı sıra SIK2, SREBP-1c ve p300 gibi proteinlerin fosforilasyonunu gerçekleştirerek lipogenik genlerin anlatımını düzenlemektedir [Bricambert *et al.*, 2010]

3.2. SIK2 ve İnsülin Sinyal İlişkisi

İnsülin özelleşmiş beta hücrelerinden oluşan pankreastan salınan bir hormondur. İnsülin normal vücut enerjisi dengesinin düzenlenmesini kontrol eden anabolik hormonlardan biridir. Kanda glukoz seviyesine cevaben insülin, karaciğer yağ gibi dokuları uyarak glikozun hücre içine alınmasını ve dokularda lipid ya da glikojen olarak depolanarak kandaki şeker düzeyinin düşürülmesini uyarmaktadır [Naimi *et al.*, 2009]

Kanda konsantrasyonu artan İnsülin, hücre yüzeyinde bulunan insülin reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu reseptörler tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesidir. İnsülinin reseptöre bağlanması sonucu otofosforilasyonla aktive olur. IRS1/2'nin (insülin response substrate 1-2) adaptör moleküllerinin tirozin bakiyelerinden fosforlanması sonucunda aktive olan PIK3 Akt'nin (PKB) aktivasyonunu sağlar ve anabolik insülin yolağını ve diğer metabolik yolları aktivasyonunu uyarır [Tanti *et al.*, 2009]. İnsülin teşviki olduğu normal fizyolojik durumlarda, insülin reseptörüne bağlı IRS1/2 üzerinde zamana kontrolüne bağlı olarak bir dizi bölgenin fosforlanmasına olanak sağlar. Pozitif ve negatif düzenleyici bölgelerin arasında hassas bir denge vardır. Bu sebeple ilk önce pozitif düzenleyici bölgenin fosforlanması gerçekleşir ve IRS1'in tirozin bakiyesinden fosforlanmasına olanak sağlarlar. İnsülin direnci gibi patolojik durumlarda ise mTOR, JNK gibi farklı serin kinaz proteinin aktiviteleri sonucu insulin sinyalinin bozulmasına ve insülin direncinin meydana gelmesine neden olur (Şekil 3.2) [Tanti *et al.*, 2009].

Şekil 3.2: IRS-1’de serin fosforilasyon bölgeleri ve insülin sinyal yolağı.

3.3. Compound C

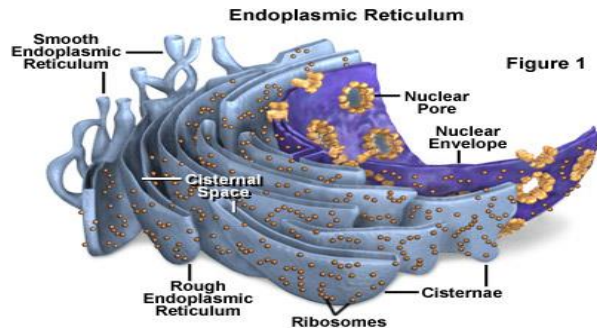
Compound C (6-[4-(2-piperidin-1-yl-etoxy)-fenil]-3-pyridin-4-yl-pyrrazolo [1,5- α]pyrimidin), son derece seçici AMPK inhibitörüdür. Ayrıca AMPK ile ilişkili proteinleride inhibe eder. Genellikle; AMPK aktivatörünün etkilerini azaltmak için deneysel araç olarak kullanılmaktadır [Zhou *et al.*, 2001].

4. ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Bütün ökaryot hücrelerde bulunan endoplazmik retikulum (ER) tüm hücre zarının yarısını oluşturur. Endoplazmik retikulum dallanmış tübüller ve sitozole yayılmış keselerden oluşmaktadır. Tübüller ve keseler birbirleriyle bağlantılıdır. ER'yi tek bir boşluğu çevreleyen devamlılığı sağlayan bir örtü şeklinde düşünürler. Bu dolambaçlı boşluğa “ER Lümeni” ya da “ER Sisterna Boşluğu” adı verilir. ER zarı; ER lümeninin sitozolden ayrılmasını sağlar ve moleküllerin bu iki zar arasında seçici taşınmasında fonksiyoneldir.

ER lipid ve protein biyosentezinde çok önemli role sahiptir. Proteini sentezlemekte olan ribozom doğrudan ER zarına tutunur. Bu zara bağlı ribozomlar ER yüzeyini kaplar ve pürüzlü ER'yi oluştururlar. Üzerinde bağlı ribozom olmayan ER bölgelerine “düz endoplazmik retikulum” denir ve başlıca yağ sentezinin yapıldığı kısımdır. Bu ER bölgelerinde golgi aygıtına taşınmak üzere yeni sentezlenen proteinleri ve lipidleri taşıyan, taşıma keseciklerinin koptuğu ER çıkışı bulunur bu bölgelerde “translasyonel ER” denir (Şekil 4.1) [Lodish *et al.*, 2004].

ER'nin ökaryotik hücrelerdeki diğer bir işlevide sitozolden Ca^{2+} 'nın alınmasıdır. Ca^{2+} bağlayan proteinlerin yüksek derişimleri sayesinde Ca^{2+} ER lümeninde depolanır. Çoğu hücre tiplerinde ER'nin belirli bölgeleri Ca^{2+} depolanması için özelleşmiştir. Örneğin, kas hücrelerinde bol miktarda Ca^{2+} depolayan özelleşmiş sarkoplazmik retikulum adı verilen yapılar bulunmaktadır. Bu yapılar Ca^{2+} 'yi, lümenine Ca^{2+} pompolayan bir Ca^{2+} ATPaz proteini aracılığı ile sitozolden alır [Lodish *et al.*, 2004].



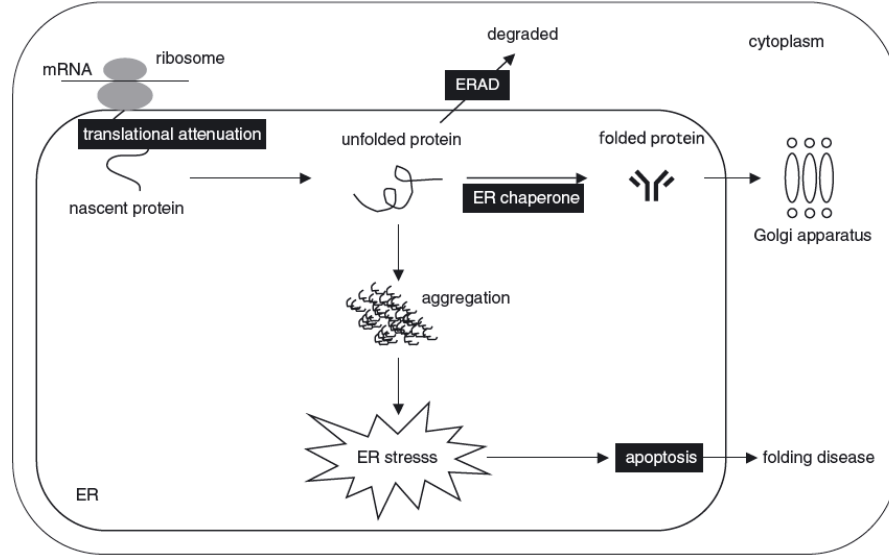
Şekil 4.1: Endoplazmik Retikulum.

4.1. ER Stres

Ökaryotik hücrelerde; ER primer olarak salgı yolağı gibi davranır. ER protein sentezi, modifikasyonu, proteinlerin taşınması ve çeşitli salgısal ve sinyal yollarına cevap vermek gibi süreçlerde rol oynamaktadır. ER boyunca bütün salgılanan proteinler salgı yollarına girerek hedef bölgelerine taşınırlar. Bu süreçte ER içerisinde proteinler işlevleri doğrultusunda, çeşitli katlanmalar, kırılmalar ve post-transkripsiyonel modifikasyonlar geçirirler. Bu aşamaları doğru katlanmış proteinlerin golgi kompleksine taşınması süreci izler. Doğru katlanmamış proteinler ise endoplazmik retikulumda tutulurlar ve bu yanlış katlanmalar ve katlanmayan proteinlerin etkileşimi sonucu oluşan protein birikiminin oluşturduğu patolojik durumu, ya da protein taşımındaki kusurlar gibi çeşitli olgular ER için stres oluşturular. Bu durum hücre tarafından ER zarında yer alan üçlü sinyal mekanizması tarafından düzeltilmeye çalışılır. ER’de oluşan bu strese protein katlanmasının bozulmasının yanında lipid metabolizması hücre duvarı biyogeneğinde veya Ca^{+} depolanmasında meydana gelen bozulmalarada neden olabilir. Bu durumu ortadan kaldırmaya yönelik ER zarında yer alan üçlü sinyal mekanizmasının oluşturduğu adaptif cevaba katlanmamış protein cevabı [unfolded protein response (UPR)] denir (Şekil 4.2) [Yoshida, 2007].

ER’de katlanmamış proteinlerin aşırı birikmesinin önlenmesinde hücrelerde iki basit mekanizma kullanılır. Bunlardan ilki ER’de bulunan ve katlanmada görevli olan şaperon adı verilen özel proteinler aracılığı ile gerçekleştirilir. Şaperonlar; farklı moleküller aracılığıyla gerçekleşen posttranslasyonel ve kotranslasyonel modifikasyonlarda disülfid bağlarının oluşması, sinyaller ile ilgili peptitlerin kesilmesi, N-glikozilasyon ve glikofatidilinositol (gpi) gruplarının eklenmesi gibi kovalent değişimler ile proteinlerin doğru bir şekilde katlanması ve olgunlaşmasında fonksiyoneldir [Zhang *et al.*, 2004], [Ron *et al.*, 2007]. Şaperonlar ayrıca diğer moleküller ile birlikte ER’nin katlanma kapasitesini düzenler ve ER’nin boyutunu arttırırlar. ER stresi durumlarında hücreler şaperon proteinlerin regülasyonunu ve aktivasyonun düzenleyerek bu durumdan kurtulmaya çalışır. İkinci mekanizma ise; transkripsiyonel ve translokasyon seviyesi üzerinde protein sentezini durdurarak ER’de fazla biriken katlanmamış protein yükünü azaltmaktır. Eğer bu durum gereğinden fazla olur ve ER bu durumla baş edemezse; yalnızca doğru katlanan

proteinler ilgili hedeflerine ulaştırılmak üzere golgiye gönderilirken, hatalı katlanan ya da katlanamayan proteinler ise 26S-proteozomlarda yıkılmak üzere “ER-aracılı degradasyon” (ERAD) adı verilen özel bir mekanizma ile yeniden sitoplâzmaya taşınır [Yoshida, 2007], [Ron *et al.*, 2007].



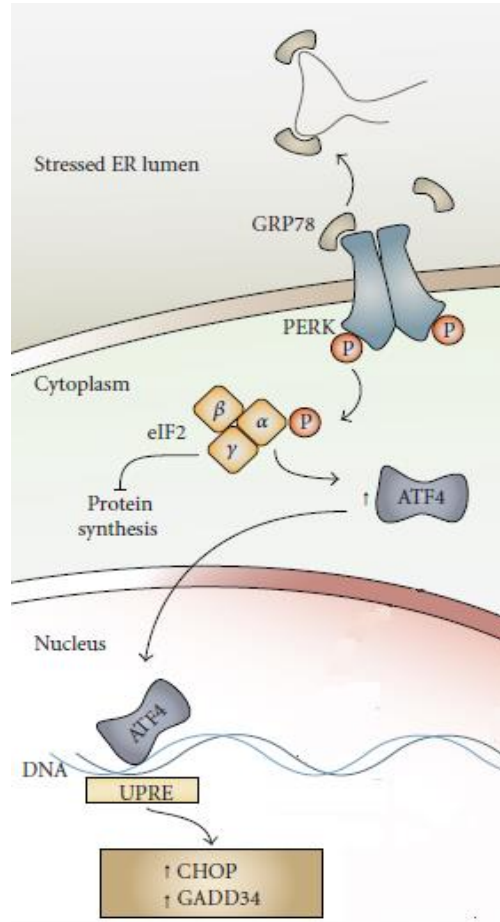
Şekil 4.2: Katlanmayan proteinlerin ER lümeni içerisinde kümeler halinde birikmesi ve ER stresini tetiklemesi.

UPR, IRE1 α (inositol-requiring1 α), PERK [double stranded RNA dependent protein kinase (pkr) like ER kinase] ve ATF6 (aktif edici transkripsiyon faktörü 6) olmak üzere üç farklı transmembran proteinlerinden oluşur. Bu transmembran proteinleri, katlanmamış proteinleri algılayan ER-luminal alt birimine sahiptirler. Transmembran alt birimi ER membranını hedef alırken, sitozolik alt birim transkripsiyon ya da translokasyon bileşen sinyalinin geçişini sağlar [Yoshida, 2007].

BİP (Grp78), amino ucunda bir ATPaz alt birimine sahip, karboksil ucunda ise substrat bağlanma alt birimi taşıyan HSP70 protein ailesinin bir üyesidir. UPR yolları için; ER şaperonu olan BİP (GRP78) ana düzenleyicidir. BİP; katlanmamış proteinlere bu protein zincirlerinde bulunan hidrofobik bölgelerden bağlanır ve N-ucundaki ATPaz alt birimi aracılığıyla ATP'in hidrolizi gerçekleşir ve böylece proteinlerde yapısal değişiklikler meydana getirerek katlanmalarını sağlar [Schroder *et al.*, 2004].

ER stres olmayan durumlarda BİP; IRE1, PERK ve ATF6'nın ER lümenine bakan alt birimine bağlı olarak bulunmaktadır. Katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucunda, bu proteinlerden ayrılarak, homodimerizasyon ile bunların aktivasyonuna olanak verir [Yoshida, 2007].

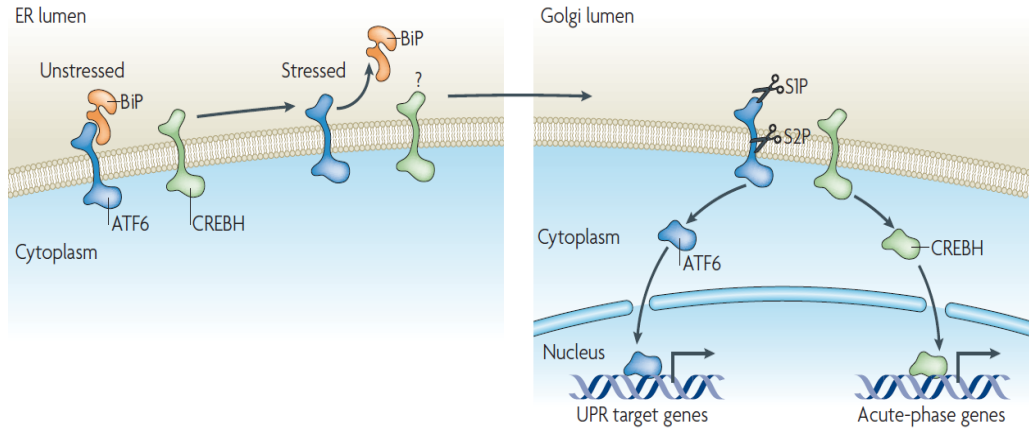
PERK; ER'de lokalize olan tip 1 transmembran proteindir. PERK'in lüminal bölgesi sitoplazmik alt birimi içerir. PERK'in bu luminal bölgesi katlanmamış proteinler ile ilişkilidir. Bununla birlikte PERK'in sitoplazmik bölgesi kinaz alt birimi içerir. ER stres olmadığı durumlarda, BİP PERK'in lüminal alt birimine bağlanarak PERK'in aktivasyonunu engeller. ER stres olduğunda ise, BİP PERK'ten ayrılır ve PERK aktifleşir (Şekil 4.3) [Basseri *et al.*, 2012]. Oligomerizasyon ve trans-fosforilasyon aracılığıyla aktive olan PERK sitoplazmik yüzeyde kinaz alt biriminin (Pperk) ökaryotik translokasyon başlama faktör 2'nin (eIF2) alfa alt ünitesinin aktivitesini engelleyerek protein sentezinin azaltılmasına sebep olur [Basseri *et al.*, 2012].



Şekil 4.3: PERK Yolağı.

PERK; apoptozla ilişkili olan birçok genin (CHOP, GADD34 gibi) anlatımında da fonksiyoneldir. PERK; bunlardan birtanesi olan CHOP'un transkripsiyonunda görev alan ATF4'un anlatımını gerçekleştirir. Bir transkripsiyon faktörü olan CHOP stres durumunda ki hücreyi kaspas-3 aktivasyonu ile apoptoza götürürken biryandan da oksidatif strese direnç gösteren mekanizmalarda fonksiyoneldir.

ER membranı üzerinde bulunan diğer bir sensör molekül. ATF6, tip 2 transmembran proteindir ve lüminal alt birimi katlanmamış proteinin cevabına duyarlıdır. ATF6'nın sitoplazmik bölümü DNA bağlama alt birimine sahiptir ve bu alt biriminde bazik lözin zipper motifi (bZIP) transkripsiyonel aktivasyon alt birimi içerir. ER stresin olmadığı durumlarda BİP ATF6'nın lüminal alt birimine bağlıdır ve golgi lokalizasyon sinyalini engeller.

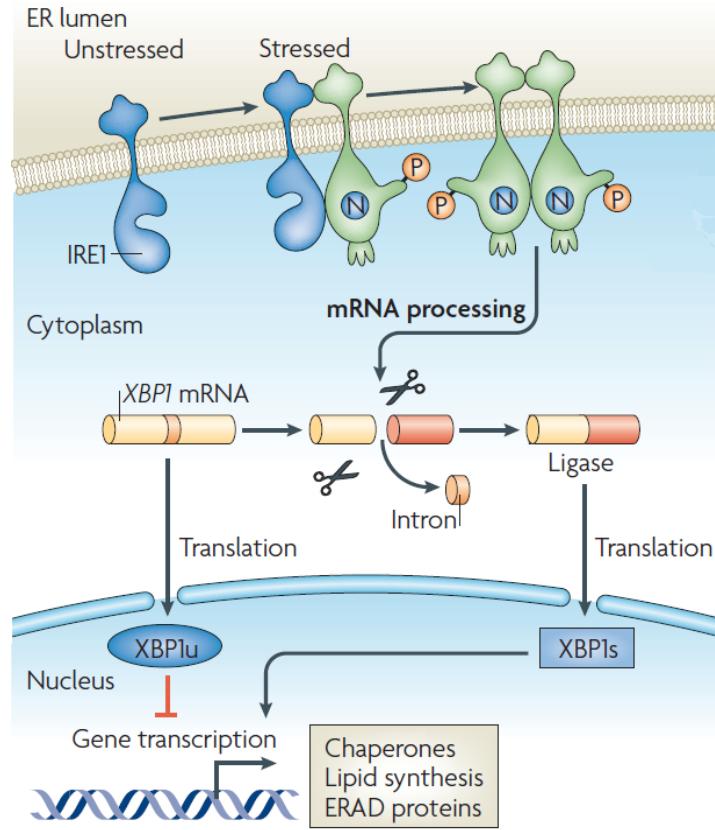


Şekil 4.4: ER Stres sonucu aktive olan ATF6.

Katlanmamış proteinlerin cevabında, BİP ATF6'dan uzaklaşır. ATF6 vasiküler taşıyıcı tarafından golgi aygıtına taşınır. Golgi aygıtında sırasıyla ATF6 önce lüminde yüzeye bakan SIP1 (side protease 1), sonrada golgi içerisinde bulunan SIP2 tarafından kesilir. ATF6'nın sitoplazmik bölümü nukleusa göç eder. Nukleusta cis-aktıng elemente bağlanır (Şekil 4.4) [Ron *et al.*, 2007]. Bu sayede ER stres response element taşıyan ER şapheron genlerinin (BİP, grp94 gibi) transkripsiyonlarını uyarır [Ron *et al.*, 2007].

ER membranında bulunan 3. sensör molekül IRE1'dir (inositol requirement). IRE1'in lüminal alt birimi PERK ile benzerlik gösterir ve katlanmamış proteinleri algılamayla ilişkilidir. Bunun yanında IRE1'nin sitoplazmik alt birimi kinaz ve RNAaz alt biriminleride içerir. IRE1'in iki farklı geni vardır. Bunlar; IRE1- α ve

IRE1- β 'dir. ER stresi durumu olduğunda, IRE1'den BIP'in ayrılmasıyla IRE1 aktifleşir ve dimerizasyon yaparak transfosforilasyona uğrar. Aktive olan IRE1- α , xbp1 pre-mRNA'sını kırılma mekanizmaları ile olgun mRNA ya çevirir. Pre-mRNA'da DNA bağlanma bölgesi ve aktivasyon alt birimleri vardır. Fakat transkripsiyonu gerçekleştiremez. Buna karşın olgun Xbp1 transkripsiyonu gerçekleştirir (Şekil 4.5) [Ron *et al.*, 2007]. Ayrıca lipid sentezi, ER biyogeneziyle ilgili proteinlerin ekspresyonlarını teşvik eder. Bu nedenle, pankreatik beta hücreleri, hepatositler, antibody üreten plazma hücreleri gibi salgı proteinlerinin büyük ölçeklerde üretildiği hücre gruplarının bir çoğunluğunda XBPI önemli roller oynamaktadır [Yoshida, 2007].



Şekil 4.5: ER stres yolağı.

4.1.1. ER Stresin Adipoz Dokuya Etkileri

Obezitenin ER strese neden olduğu bilinmektedir. ER stresle adipoz doku arasındaki olası moleküler mekanizmalar ve etkileşimler tam olarak aydınlatılamamıştır. ER stresi olduğu durumlarda aktiveleşen PERK yolu sayesinde; ifadesi olan eIF2 α , tarafından anlatımı olan ATF4'e dolayısıyla; CHOP'un sentezini gerçekleştirir. Oluşan CHOP, C/EBP benzeri proteindir ve adiposit farklılaşmasında fonksiyonel C/EBP geninin fonksiyonunu bozarak PPAR γ 'yı baskıladığı görülmüştür [Basseri *et al.*, 2012].

4.1.2. Thapsigargin

Thapsigargin; siskiterpen lakton olan bir bitki türevidir[Thastrup *et al.*, 1990]. Thapsigargin, endoplazmik retikulumda bulunan Ca⁺²-ATPase pompalarının çalışmasını engelleyen bir inhibitördür. Ca⁺² kanallarının inhibe edilmesi ile ER lümeninde Ca⁺² iyonlarının birikmesi sonucu fonksiyonu bozulan ER'de stres meydana gelir [Lytton *et al.*, 1991].

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Materyal

5.1.1. Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Gibco, 12800-116), Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Lonza, BE12-604F), Fetal Bovine Serum (Lonza, DE14-802F), Opti-MEM I (Gibco,), 10X Tyrpsin-EDTA (Pan Bio, P10-024100), Penicillin-Streptomycin (Pan Bio, P06-07100), Thapsigargin (MP Bio, 0215899901), Yağsız süt tozu (AppliChem, A0830), Agarose (OmniLab, 2701120), Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (Intron, 21141), 20X LumiGLO ECL (CellSignaling, 7003), qRT-PCR Primerleri (BioBasic Inc), DEPC (AppliChem, A0881), DMSO (Sigma-Aldrich, D5879), SIK2 Antikoru (Abcam, ab53423), ERK Antikoru (CellSignaling, 3826), p-ERK Antikoru (CellSignaling, 9197), AKT Antikoru (CellSignaling,), SREBP-1c Antikoru (Pierce, MA5-11685), α -Tubulin Antikoru (GenScript, A01410), p-AKT (CellSignaling), Anti-Rabbit Secondary IgG-HRP Antibody (SantaCruz Biotechnology, sc-2004), Anti-Mouse Secondary IgG-HRP Antibody (SantaCruz Biotechnology, sc-2005).

RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104), QuantiTech Reverse Transcription Kit (Qiagen, 205311), BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, K0251), X-tremeGENE 9 DNA Transfeksiyon Ajanı (Roche, 06365779001), QIAprep Spin Miniprep Plasmid Kit (Qiagen, 27104), QIAfilter Plazmid Midi Kit (Qiagen, 12243).

5.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO₂ inkübatörü (ThermoForma), Laminar Akım Kabini (Clean Air), Su banyosu (Memmert), Plate Reader (Thermo, Varioskan Flash), Işık Mikroskobu (Nikon TMS), Floresans Mikroskobu (Nikon, Eclipse Ti-S), Dikey Elektrophoretik Transfer Sistemi (BioRad Mini Protean), PVDF Western Blotting Membrane (Roche,

03010040001), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter 22R), Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Microfuge), Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-22), Sıcaklık İnkübatörlü Çalkalayıcı (BioSan, ES-20), Termal Döngü Cihazı (BioRad), Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Roche, LC480II), Hassas terazi (Precisa), 0,2 ml, 15 ml ve 50 ml santrifüj tüpleri (Isolab), 1,5 ml santrifüj tüpü (Axygen), 0.2 µm şırınga ucu filtre (TPP), 0.2 µm vakum filtresi (TPP), -80°C Dondurucu (Sanyo, MDF-192), Hücre kültürü kapları ve dondurma tüpleri (TPP), Cam malzemeler (Isolab), pH Metre (Mettler Toledo), Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), Vortex (IKA), Sıvı Azot Tankı (Arpege 140), Otoklav (Hirayama, HVE-50), Pipet tabancası (Thermo), Mikro Pipetörler (Gilson), Mikro Pipetörler (Thermo), Filtreli mikropipetör uçları (Thermo), Serolojik cam pipet (Isolab), Pasteur Pipet (Isolab), Orbital Shaker (IKA, Yellow line), Isıtıcı Blok (VWR), Manyetik karıştırıcı (Heidolph).

5.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

10X PBS(Phosphate Buffered Saline): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 son hacim 1 L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra (pH değerinin 7.5 civarında olduğu kontrol edilerek), 121°C’de 20 dk. otoklavlanarak steril edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

1X Tripsin-EDTA: Ticari olarak elde edilen 10X Tripsin-EDTA, steril 1X PBS ile 1:10 oranında seyreltilerek hücre pasajlamada kullanılmıştır.

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

Hücre Dondurma Medyumu: 3T3-L1 hücrelerini sıvı nitrojende saklamak için, kullanılan normal hücre büyüme besiyerine % 10 (v/v) olacak şekilde DMSO eklenerek alüminyum folyo ile sarılmış tüpte steril olarak +4°C’de muhafaza edilmiştir.

IBMX(Isobutylmethylxanthine): 0,00115 gr IBMX,100µl 0,5 KOH içinde çözülmüş,10ml mediuma 100 µl ekleyerek final konsantrasyon 0,5 Mm olacak şekilde kullanılmıştır. IBMX solüsyonu her deney için taze olarak hazırlanmıştır.

DEX(Dexamethasone):10mM stok hazırlanırken,0,04 gr DEX,10µl %100 EtOH'de çözülmüş ve -20'de saklanmıştır. Çalışma solüsyonu için ise ana stok,1X PBS ile 1 mM olacak şekilde dilue edilmiştir. Final konsantrasyonu 1µM olacak şekilde besi yerine eklenerek kullanılmıştır.

İnsülin: 0,01gr insülin 0,02 M HCl'de çözülmüş (0,02 M HCl hazırlamak için 16,6 µl %37 HCl(12M)+983,4 µl dH₂O kullanılmıştır),uyarıcı besi yerinde 1:1000 oranında, final konsantrasyonu 1µg/ml olacak şekilde kullanılmıştır.

MDI: Farklılaşma için kullanılan karışım, hazırlamış 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 besi ortamının hazırlanmasında kullanılmıştır.

10X SDS-Yürütme Tamponu: 30,3 g Tris Base, 144.1 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak toplam hacim 1 L olacak şekilde distile su (dH₂O) içerisinde çözülmüştür. SDS-PAGE için kullanılacağı zaman ise distile su ile 1:10 seyreltilerek (1X) kullanılmıştır.

10X Transfer Tamponu: 28,1 g Tris Base, 131 g Glisin tartılarak distile su ile 1 L total hacim içerisinde çözülmüştür.

1X Transfer Tamponu: Hazırlanacak toplam hacmin %10'u 10X Transfer tamponu, %20'si metanol içerecek şekilde solüsyonlar mezür ile ölçülmüş ve hacmin geri kalanı dH₂O ile tamamlanmıştır. (1 L 1X Transfer Tamponu için; 100 ml 10X Transfer Tamponu + 200 ml metanol + 700 ml dH₂O)

4X SDS Yükleme (Laemmli) Boyası: 2.4 ml Tris-HCl (1M pH 6.8), 0.8 g SDS, 4 ml Gliserol (% 100), %0.01 (w/v) Bromophenol Blue (BPB), 1 ml β-Mercaptoethanol, 2.8 ml dH₂O eklenerek falkon tüpte birbirlerine iyice karışması sağlanmıştır. Karışım homojen hale getirildikten sonra alüminyum folyo ile sarılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

10X TBS: 1 L için 24,23 g Tris (final 0.2 M), 88 g NaCl (final 1.5 M), tartılarak yaklaşık 800-900 ml dH₂O içerisinde çözülmüş ve HCl ile pH aralığı 7.4-7.6'ya ayarlanarak final hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

1X TBS-T: 10X TBS tamponu distile su ile 1:10 oranında sulandırılarak 1X TBS hazırlanmıştır. Elde edilen 1X TBS içerisine ise % 0.1 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenmiştir.

Membran Bloklama Solüsyonu: %5 (w/v) olacak şekilde yağsız süt tozu veya BSA tartılarak 1X TBS-T içerisinde çözölmüştür.

Tris-HCl Çözeltileri: SDS-Poliakrilamid jel için iki ayrı Tris-HCl çözeltisi (1,5 M pH 8,8 ve 1 M pH 6,8) kullanılmaktadır. İstenilen hacim için 1,5 M olacak şekilde Tris tartılmış ve bir miktar dH₂O içerisinde çözölmüştür. Derişik (12,2 M) HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlanarak dH₂O ile son hacime tamamlanır. 1 M'lık çözelti için de hesaplanan miktarda Tris, dH₂O içerisinde çözölür. Bu çözeltinin pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra dH₂O ile son hacime tamamlanır.

50X TAE: Öncelikle distile su içerisinde 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlanarak NaOH ile pH'sı yaklaşık 8'e ayarlanmıştır. Diğer taraftan 242 g Tris yaklaşık 700 ml distile su içersinde çözölmüştür. Ardından 57,1 ml glasiyel asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA eklenmiş ve çözeltinin pH'sının yaklaşık 8,5 olması sağlanarak toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Gerek agaroz jel hazırlanırken gerekse yürütme tamponu olarak kullanılacağı zaman 1:50 oranında dH₂O ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Rnaz'sız Su: Ticari olarak alınan 1ml DEPC, koyu şişe içerisinde 1 litre distile suya eklenerek gece boyu karıştırılmış ve 121°C'de 20 dk otoklav edilmiştir.

10X MOPS Tamponu:200 Nm MOPS,50 nM Na acetate,10 mM NAOH son hacim 500ml olcaka şekilde steril edilmiş DEPC'li suda çözölerek tekrar 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

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

Formaldehit RNA Jel (%1,2):0,6 gr agaroz 5 ml 10X MOPS tamponu içine eklenip son hacim 50 ml olacak şekilde DEPC'li su ekledikten 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.

Liziz Tamponu: Hazırlanmak istenilen hacim için 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, % 10 (v/v) Gliserol, % 1 (v/v) Triton-X-100, 25 mM NaF, 10 µM ZnCl₂ olacak şekilde miktarlar hesaplanarak tartılmış ve bir beherde üstüne bir miktar distile su eklenmiştir. Tampon içeriği iyice çözöndükten

sonra solüsyonun pH değeri 7,5 olacak şekilde 12.2M HCl ile ayarlanmış ve hacim belirlenen miktara tamamlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilen tampona, kullanılacağı zaman taze olarak 10µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM PMSF inhibitörleri eklenmiştir.

1mM Thapsigargin (THA): 1 mg Thapsigargin (THA), 1.54 ml DMSO içerisinde çözülmüştür. Solüsyon 20 µl olarak ependorflara bölünmüş ve sıvı nitrojene daldırılarak dondurulmuş ve -20 °C’de saklanmıştır.

12,5 mM Compound c (CC): Compound c (CC), DMSO içerisinde çözülmüştür. Stock 12,5 mM şeklinde olacak şekilde -20 °C de saklanmış. Final konsantrasyonu 15 mM olacak şekilde kullanılmıştır.

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Alt Kültürleme

Pek çok hayvan hücre hatı plastik ya da cam yüzeye yapışarak, tek bir hücre tabakası oluşturacak şekilde büyümektedir. Yüzey hücrelerle tam olarak kaplandığında (confluent) büyüme önce yavaşlar sonra durur. Hücrelerin büyümeye devam etmesi için düzenli aralıklarla alt kültürleme yapılması gerekmektedir. Alt kültürleme, hücre hücre etkileşim hücre-substrat arasındaki bağların tripsin, dispaz ya da kollagenaz gibi proteolitik enzimlerle kırılmasını gerektirir. Birbirlerinde ve tutunduklarından gerektirir. Birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmış hücreler sayılır, istenilen 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 süreyi 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 mikroskopik olarak ayırt edilir [Ntambi et al., 2000]. 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 1x10⁵ 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.

5.2.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

% 60-70 konfluent durumdaki hücreler, tripsin muamelesi ve pelet oluşumunu takiben, 1x10⁵ 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.

5.2.3. Adiposit 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 uyarıcı 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/EBP α ve PPAR γ 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.

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.

5.2.4. Proliferasyon Assay

3T3-L1 hücre hatlarında yukarıda belirlenen grublara ait her reaksiyon iki kere tekrarlanmıştır. Hücreler, 0,1 ml'de $\times 10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekilerek adipoz farklılaşma sürecine uygun olarak inkübe edilmiştir.

Hücre çoğalmasının belirlenmesinde WST-1 Proliferasyon Assay kiti (Roche Germany) kullanılmıştır. Hücrelere 10µl well başına cell proliferation reagent verilir ve 4 saat inkübatörde bekletilir. 37°C'de 4 saat inkübasyonu bırakılmış bu sürenin sonunda plaka 25°C'de 5 dakika bekletilerek reaksiyon içeriğinin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Plate Reader (Thermo, Varioskan Flash) kullanılarak 490 nm dalga boyunda fotometrik ölçüm yapılmıştır. Ortalamalar ve standart sapmalar Graphpad Prisma programı kullanılarak hesaplanmış ve Microsoft Excel programı kullanılarak grafikler çizilmiştir.

Proliferasyon assayın sonucunu doğrulamak amacıyla; 96 well platelerde büyütülen hücrelerin, toma lamel aracılığıyla mikroskop kullanılarak sayımı gerçekleştirilmiştir.

5.2.5. Total RNA İzolasyonu

Hücrelerde bulunan rRNA, tRNA ve mRNA'lar hücrenin total RNA içeriğini oluşturmaktadır. Total RNA'nın az bir kısmını tRNA ve mRNA'lar oluştururken %80 gibi büyük bir oranını ise rRNA'lar oluşturmaktadır. Bu nedenle total RNA izolasyonu agaroz jelde dolaylı olarak miktarı daha fazla olan rRNA içeriği ile kontrol edilir. Ökaryotik rRNA'lar ise agaroz jelde iki band ile izlenmektedir. Bunlar 28S rRNA ve 18S rRNA bandlarıdır. İzole edilen total RNA'nın kalitesi ise 28S ve 18S rRNA arasındaki yaklaşık 2:1 (teorik olarak 2.7:1) oranıyla belirlenir. Jelde yürütülen rRNA bandlarının bu oranda olmaması ve jelde sürüklenme görüntüsü (smear) oluşması ise izole edilen rRNA'nın dolayısıyla total RNA'nın degradasyonunu göstermektedir.

3T3-L1 hücrelerinde ER stres oluşturarak ve SIK2 inhibitörü kullanılarak oluşan etkilerin adiposit farklılaşma süresince; adiposit farklılaşması için gerekli olan genler üzerindeki etkileri qRT-PCR ile analiz edilebilmesi için total RNA izolasyonu

yapılmıştır. 3T3-L1 hücreleri birbirinden bağımsız iki set olarak kontrol grubu, MDI, 15 µM CC içeren MDI+CC ve 1 µM thapsigargin MDI+THA içeren besiyerinde belirtilen günler boyunca inkübe edilmiş ve bu süreler sonunda hücrelerden total RNA izolasyonları yapılmıştır.

Öncelikle RNA izolasyonu yapılacak yüzey ve kullanılacak malzemeler (pipetörler, pens vb.) RNaz'sız su ile hazırlanmış %70'lik (v/v) etanol ve RNAPrep ile silinmiştir. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve 1X Tripsin-EDTA ile petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üst sıvı çekildikten sonra pelletin üstüne kit içerisinde bulunan liziz tamponu (400 µl) eklenerek, pipetleme ve vorteks ile hücrelerin iyice parçalanması sağlanmıştır. Homojenize edilmiş bu solüsyonun üstüne eşit miktarda RNaz'sız su ile hazırlanmış %70'lik (v/v) etanol eklenerek iyice pipetlenmiştir. Elde edilen karışım özel RNA bağlama kolonuna aktararak oda sıcaklığında 8000 x g'den büyük olacak şekilde 15 sn santrifüj edilir. Kolonun altındaki toplama tüpünde biriken sıvı döküldükten sonra kolonda kalan diğer biyomolekülleri (karbonhidrat, protein, yağ) uzaklaştırmak için kolona 700 µl yıkama tamponu eklenerek aynı şartlarda santrifüj edilir. Altta toplanan sıvı döküldükten sonra kolonda kalan tuzları uzaklaştırmak için diğer bir yıkama tamponu (500 µl) kolona yüklenir. Santrifüj sonrasında temiz bir 1.5 ml'lik ependorfa oturtulan kolonun ortasına RNaz içermeyen su damlatılarak 1 dk bekletilir. Ardından santrifüjlenerek elde edilen total RNA'lar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

İzole edilen RNA'ların kalitesi %1.2'lik formaldehit jelde yürütülerek test edilirken, saflıkları ve miktarları ise spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. OD_{260} absorbans değerleri ölçülerek RNA miktarı ($\mu\text{l/ml}$) = $A_{260} \times 40 \times \text{sulandırma faktörü}$ formülü ile hesaplanmıştır. Diğer taraftan elde edilen RNA'nın saflığını tayin etmek için kullanılan OD_{260}/OD_{280} oranı da hesaplanmıştır.

5.2.6. cDNA Sentezi

Gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için yapılan Q-PCR deneylerinde, hücre içerisindeki bu genlere ait mRNA miktarları önemlidir. Bu yüzden total RNA içerisindeki mRNA'lardan RT-PCR ile daha stabil cDNA'lar sentezlenmektedir.

Ters transkripsiyon reaksiyonunun ilk basamağı olan genomik DNA eliminasyonu için; her bir PCR tüpüne 2 µl DNA Wipeout Buffer (7X) ve 500 ng total RNA eklenerek dH₂O ile toplam hacim 14 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 42°C'de 2 dk inkübe edildikten sonra hemen buza alınır. İkinci basamak olan; mRNA'lardan cDNA sentezi için ise 1 µl ters transkriptaz enzimi, 4 µl ters transkripsiyon tamponu (5X) ve 1 µl ters transkripsiyon primer bileşimi ile ikinci bir karışım hazırlanarak ilk basamaktaki karışım ile birleştirilmiştir. Son hacmi 20 µl olan bu karışım ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için 42°C'de 15 dk ve enzimi inaktive etmek için ise 95°C'de 3 dk inkübe edildikten sonra buz üstüne alınmıştır. Q-PCR deneylerinde kullanılmak üzere bir miktar cDNA 1:10 oranında sulandırılarak -20°C'de, kalan cDNA'lar ise stok olarak -80°C'de saklanmıştır.

5.2.7. Kantitatif RT-PCR

3T3-L1 hücrelerinde THA ile oluşturulan ER stresine cevaben SIK2 ve ilgili olduğu diğer proteinlerin gen ifadelerindeki zamana bağlı olarak meydana gelen değişimleri karşılaştırmak için kantitatif RT PCR (qRT-PCR) yapılmıştır.

3T3-L1 hücrelerine kontrol, MDI 15µM Compound C ve 1 µl THA uygulamasının ardından sırasıyla 0.gün,1,2 ve 3.gün izole edilen RNA'lardan (2 set) cDNA sentezlenmiş ve ilgili genlere özgün primer çiftleri kullanılarak gen ifadeleri ölçülmüştür. 2 farklı setten 2'şer tekrarlı olacak şekilde, her bir kuyucuk için 5 µl SYBR Green çözeltisi (2X), 0.3 µM ileri primer, 0.3 µM geri primer ve 1.5 µl kalıp cDNA (1:10) buz üstünde karıştırılarak dH₂O ile son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Q-PCR'ın ardından, ER stresine cevaben gen ifadelerindeki zamana bağlı olarak meydana gelen değişim $\Delta\Delta C_T$ metodu ile analiz edilmiştir.

Yapılan Q-PCR'da referans gen olarak 18S kullanılırken, deney gruplarının normalizasyonu kontrol grubuna göre yapılmıştır. $\Delta\Delta C_T$ değerleri kullanılarak gen ifadelerindeki zamana bağlı göreceli değişim kat artış veya kat azalış şeklinde hesaplanarak grafikleri çizilmiştir. Diğer taraftan, bu değerlerin standart sapmaları (SD) hesaplanmış ve Graphped Prism programı sayesinde ANNOVA yöntemi ile istatistikleri yapılarak verilerin güvenilirliği değerlendirilmiştir. . Farklı 2 setin benzer olduğu STUDENT T-TEST kullanılarak gösterilmiştir. Grupları kendi

içerisinde ise, 0. günün kontrolüne göre kıyasladığımızda $p<0,001$ sonucu doğrultusunda grupların farklı olduğu ANNOVA yöntemiyle gösterilmiştir.

Tablo 5.1: qRT-PCR’da kullanılan genel PCR programı.

<i>Basamak</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Süre</i>	<i>Döngü Sayısı</i>
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	7 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	45
Primer Bağlanması	55°C	30 sn	
Uzama	72°C	30 sn	
Erime Eğrisi	95°C	20 sn	1
	55°C	20 sn	
	95°C	20 sn	

Her bir gen için, PCR reaksiyonlarında kontaminasyon kaynaklı hata olup olmadığını test etmek amacı ile kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol grupları da kuyucuklara eklenmiştir. Bununla birlikte, PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünün özgün olup olmadığı hakkında fikir edinebilmek için erime eğrileri de analiz edilmiştir.

5.2.8. SDS-PAGE ve Western Blotlama

RNA izolasyonuna paralel şekilde, SIK2, C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , SREBP-1c, AKT, p-AKT ERK, p-ERK, CHOP, CNAP1 gibi protein seviyelerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişimleri karşılaştırmak için, 1 μ M THA ve 15 μ M uygulanan hücrelerden belirtilen zaman aralıklarında protein izolasyonu yapılmıştır. Petride büyütülen hücreler inkübatörden buz üstüne alınmış ve üzerlerindeki besiyeri çekildikten sonra 3-4 ml 1X PBS ile petri yüzeyi yıkanmıştır. 1X PBS’in de vakumla çekilmesinin ardından her bir petriye (10 cm) taze olarak hazırlanan liziz tamponu (400 μ l) eklenmiştir. Petri yüzeyi iyice kazındıktan sonra yüzeyden kaldırılan ve liziz tamponu içerisinde bulunan hücreler pipetlenerek ve petri yüzeyi yıkanarak temiz 1.5 ml ependorfa alınır. 10-15 dk buz üstünde bekletilen hücreler ara ara vortekslendikten sonra bir kaç kez enjektörden geçirilerek hücrelerin tamamen

parçalanması sağlanmıştır. Hücre parçalarını çöktürmek için ependorflar, 4°C’de 13000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üstte kalan sıvı (protein), dipteki pellet dağıtılmayacak şekilde dikkatlice çekilerek etiketlenmiş yeni bir ependorfa aktarılır. BCA Assay ile miktarları tayin edilen proteinler tüplere bölünerek kısa süreli saklama ve sonrasında Western Blotting deneylerinde kullanılmak üzere -20°C’de, diğer stoklar ise uzun süreli saklama için -80°C’de muhafaza edilmiştir.

İzole edilen protein konsantrasyonu Thermo BCA Protein Assay ile belirlenmiştir. Yöntem; BCA (bicinchoninic acid) içeriğinde bulunan Cu^{2+} iyonlarının, alkali ortamda protein ile tepkimeye girmesiyle Cu^{+} ’ya indirgenmesi (Biuret tepkimesi) sonucu oluşan mor-menekşe renkli ürünün kolorimetrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan ürün ise 562 nm’de maksimum absorbans vermektedir. BCA’nın iki solüsyonu (Reagent A ve B) 50:1 oranında karıştırılarak 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µl eklenmiştir. Elde edilen protein lizatlarından ve konsantrasyonları bilinen protein standartlarından her bir kuyucuğa iki tekrarlı olacak şekilde 25’er µl eklenerek BCA kimyasalı ile iyice karışması sağlanmıştır. Ayrıca kuyucuklara liziz tamponu da kör kuyucuk (blank) olarak eklenmiştir. Oluşan ürünün ışıktan etkilenmemesi için 96-kuyucuklu plaka alüminyum folyo ile sarılarak tepkimenin oluşması için 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. 96-kuyucuklu plakanın oda sıcaklığına soğuması beklendikten sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. İki tekrarlı olarak girilen örnek ve protein standartlarının absorbans değerlerinin ortalaması alınarak kör kuyucuğun absorbans değeri bu ortalamalardan çıkarılmıştır. Protein standartlarının konsantrasyonları ve absorbans değerleri kullanılarak standart grafik çizilmiş ve doğrusal grafiğin formülü ile R^2 değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan formülde ilgili yere absorbans değerleri yazılarak protein lizatlarının konsantrasyonları µg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

ER stresine cevaben protein seviyelerinde meydana gelen değişimleri karşılaştırmak amacıyla 2 ayrı protein setinden denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve ardından Western Blotting yapılmıştır. Sonrasında SIK2, ERK, p-ERK, AKT, p-AKT, CHOP, CNAP, SREB1C ve α -Tubulin proteinlerine özgün antikorlar kullanılarak membranda saptama yapılmıştır. Protein bandlarının yoğunluğu BioRad ImageLab programı ile analiz edilerek protein seviyelerindeki zamana bağlı olarak meydana gelen göreceli değişimler

karşılaştırılmıştır. Program yardımıyla iki ayrı set için ölçülen her bir proteine ait band yoğunluklarının aritmetik ortalamaları alınmıştır. Referans olarak α -Tubulin kullanılmış ve deney gruplarını birbirlerine göre normalize etmek amacıyla; ölçülen band yoğunlukları her bir deney grubuna ait α -Tubulin band yoğunluğuna bölünmüştür. Tubulin ile normalize edilen örnekler (0, 1, 2 ve 3. gün) daha sonra, kontrole ait band yoğunluklarına oranlanarak meydana gelen değişim, kat artış/azalış şeklinde hesaplanmıştır.

Tablo 5.2: % 10'luk ayırma jeli ve %4'lük paketlenme jeli hazırlamak için kullanılacak maddeler ve miktarları.

	Running Gel (%10)	Stacking Gel (%4)
dH₂O	4.7 ml	4.55 ml
Tris-HCl	2.6 ml (1.5M pH 8.8)	750 μ l (1M pH 6.8)
%10 SDS	100 μ l	60 μ l
%40 Acr:Bis	2.5 ml	601 μ l
%10 APS	100 μ l	30 μ l
TEMED	10 μ l	6 μ l

Jel dökülecek olan camlar (1,5 mm aralıklı) alkol ve distile su ile iyice temizlenerek BioRad Mini Protean jel dökme aparatları ile sıvı sızdırmayacak şekilde sabitlenmiştir. İlk basamakta, tabloda verilen değerlere göre %10'luk yürütme (running) jeli hazırlanarak camların arasına dökülmüştür. Alt jel, kullanılacak tarağın sığabileceği kadar bir boşluk kalacak şekilde, camların yaklaşık 3'te 2'si bir seviyeye kadar doldurulmuştur. Dökülen jelin düz bir hat oluşturacak şekilde donması ve polimerizasyonun oksijen ile inhibe olmaması için yürütme jelinin üstü bir miktar %100 izopropanol ile kapatılmıştır. Jelin donmasının ardından üst kısımdaki izopropanol dökülerek dH₂O ile yüzeyde kalan alkol yıkanmıştır. Suyun fazlası kurutma kağıtları ile emdirilerek hazırlanan %4'lük paketlenme (stacking) jeli camların arasında kalan boşluğa dökülmüştür. Proteinlerin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için uygun ebattaki tarak dikkatlice dökülen jelin içerisine oturtularak jelin polimerizasyonu (donması) beklenmiştir. Bu sırada, jelde yürütülecek örneklerden eşit miktarlarda (μ g) protein yüklenebilmesi için her bir gruptan kaçar μ l çekilmesi gerektiği hesaplanarak ependorf tüpünün içerisinde 4X

SDS-yükleme (Laemmli) boyası ile karıştırılmıştır. [Protein-boya karışımlarının toplam hacmi 4X (3X protein + 1X boya) olacak şekilde boya miktarları hesaplanmıştır]. Örnek ve boyanın homojen olarak karışması sağlandıktan sonra, proteinleri denatüre etmek amacıyla 95°C'de 5 dk ısıtıcı blokta inkübe edilerek bu sürenin sonunda örnekler hızlıca buz üstüne alınmıştır. Arasındaki jel donmuş olan camlar 1X SDS-yürütme tamponuyla dolu tankın içerisine oturtulmuş ve boya ile karıştırılıp denatüre edilen örnekler sırasıyla kuyulara yüklenmiştir. Elektrotların çakışmasına dikkat edilerek tankın kapağı kapatılmış ve örnekler paketleme jelini geçene kadar 90-100 V'ta, bu sınırı geçtikten sonra ise 110-120 V'ta yükleme boyasının jelden çıkması sağlanana kadar yürütülmüştür. Sonrasında Western Blotting aşamasında kullanılmak üzere jel, camlar dikkatlice açılarak alınmıştır.

SDS-PAGE aşamasının ardından proteinlerin jelden PVDF membrana aktarılması için transfer kaseti hazırlanmıştır. Katottan anoda doğru sırasıyla; sünger, kurutma kağıdı (6-8 adet), jel, PVDF membran, kurutma kağıdı (6-8 adet), sünger dizilerek ve arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kaset kısaç yardımıyla sıkıştırılmıştır. Buz kalıbı ve hazırlanan transfer kaseti elektrot yönlerine dikkat edilerek tanka yerleştirdikten sonra 1X transfer tamponu doldurulmuştur. Jelden membrana transfer, ısının yükselmemesi için +4°C'de 1.5 saat 120 V elektrik akımı ile gerçekleştirilmiştir. Transferin başarılı olup olmadığı renkli markör kullanılarak ve jel Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak kontrol edilmiştir.

Jeldeki proteinlerin PVDF membran yüzeyine aktarılmasının ardından membranlar düz bir kaba alınarak 2-3 dk 1X TBS-T içerisinde bekletilmiştir. PVDF membran, proteinlere oldukça afinite göstermektedir. Bu yüzden aktarılan proteinler membran yüzeyinde kolaylıkla tutulurken; membran üzerinde aktarılan proteinlerden kalan boşlukların kapatılarak, uygulanacak olan antikorların bu bölgelere afinite göstermemesi için ise membranlar bloklanmıştır. Bloklama işlemi; membran yüzeyini tamamen kapatacak miktarda, 1X TBS-T içerisinde hazırlanan % 5'lik (w/v) yağsız süt tozu kullanılarak ve oda sıcaklığında 80-100 rpm'de 1-1,5 saat çalkalanarak yapılmıştır. Bloklamanın ardından süt tozu dökülerek membran 1X TBS-T ile üç defa (5 dk-10 dk-5 dk süreyle) 100-130 rpm'de çalkalanarak yıkanmıştır. Bu sırada uygulanacak olan primer antikorlar % 5'lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanmıştır. Membran üzerindeki miktarı karşılaştırılmak istenen proteinin saptanması amacıyla, hazırlanan bu

proteine özgün birincil (primer) antikorlar, membranın üstüne yeterli miktarda dökülerek, +4°C’de gece boyu (yaklaşık 16 saat) 80-100 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir.

Birincil antikor, inkübasyonun ardından bir falkon tüpüne alınarak tekrar kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Diğer taraftan, membran aynı şekilde 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Birincil antikorun uzaklaştırılmasının ardından 1:5000 oranında % 5’lik yağsız süt tozu içerisinde hazırlanan ve birincil antikoru tanıyacak olan ikincil (sekonder) antikor membrana uygulanmıştır. Sekonder antikor, antijen bağlanma bölgeleriyle birincil antikorun ağır zincirini (IgG, IgM, IgA vb.) tanımaktadır. Diğer taraftan kullanılan sekonder antikorun ağır zincirine ise yaban turpu peroksidazı (HRP) bağlanmıştır. Yaban turpu peroksidazı, hidrojen peroksit varlığında luminolü uyarılmış bir dianyona çevirir. Bu dianyon temel enerji seviyesine dönmek için ışık yayar ve böylece sekonder antikorun dolayısıyla birincil antikor ve hedef proteinin olduğu bölgede ışımaya meydana gelir. Bu sayede ilgili protein saptanmış olur. Membran, sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1-1.5 saat inkübe edildikten sonra 1X TBS-T ile 3 kez yıkanır. 1 ml luminol ve 1 ml hidrojen peroksit membran üzerine eklenerek BioRad ChemiDoc görüntüleme cihazı ile ilgili proteinler membran üzerinde saptanarak görüntülenmiştir.

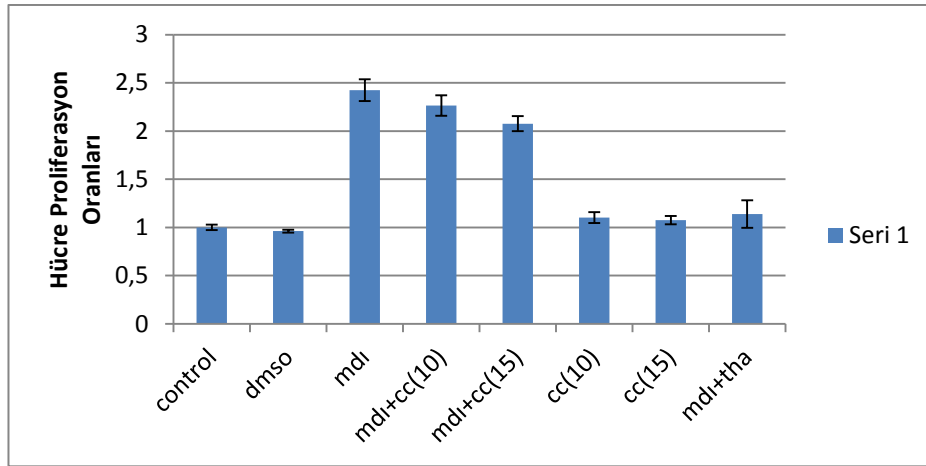
Tablo 5.3: Westen Blotting’de ilgili proteinlerin saptanması amacıyla kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile kullanılan seyreltme oranları.

<i>Birincil (1°) Antikor</i>	<i>1° Antikor Seyreltme Oranı</i>	<i>Sekonder (2°)Antikor</i>	<i>2° Antikor Seyreltme Oranı</i>
SIK2	1:1000	Anti-Rabbit IgG	1:5000
ERK	1:1000	Anti-Mouse IgG	1:5000
p-ERK	1:1000	Anti-Mouse IgG	1:5000
AKT	1:1000	Anti-Mouse IgG	1:5000
p-AKT	1:1000	Anti-Mouse IgG	1:5000
SREB1-C	1:200	Anti-Rabbit IgG	1:5000
C/EBPβ	1:1000	Anti-Rabbit IgG	1:5000
C/EBPα	1:500	Anti-Rabbit IgG	1:5000
PPARγ	1:500	Anti-Rabbit IgG	1:5000
CHOP	1:200	Anti-Rabbit IgG	1:5000
IRS-1	1:1000	Anti-Rabbit IgG	1:5000
CNAP-1	1:500	Anti-Rabbit IgG	1:5000
α-Tubulin	1:3000	Anti-Mouse IgG	1:5000

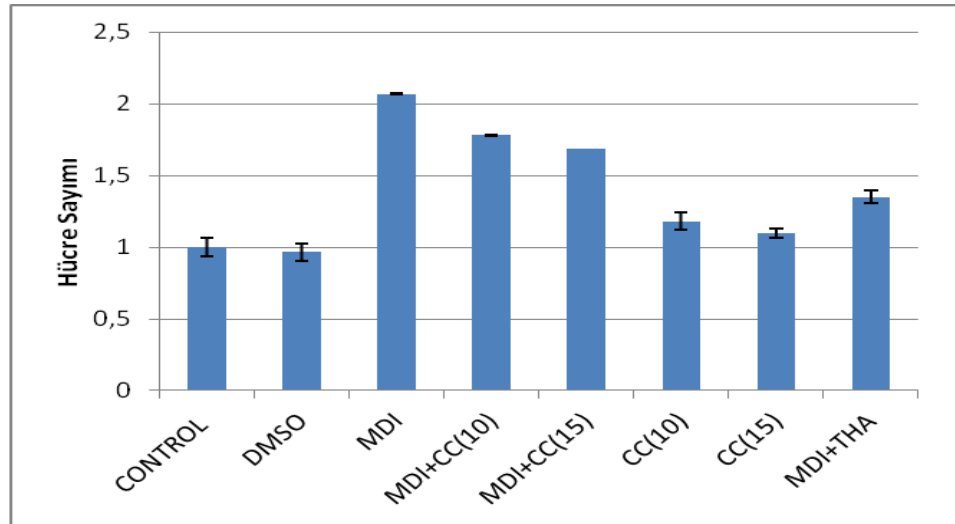
6. BULGULAR

6.1. SIK2 İnhibitörü Compound C ve Thapsigargin'in Mitotik Klonal Genişlemeye Etkisi

Yapılan çalışmada 3T3-L1 öncül adipositler ile yapılan SIK2'nin MCE'de ki rolüne yönelik deneylerde kullanılacak ajanların ve çözgen olarak kullanılan DMSO'nun hücre çoğalması üzerine etkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için 3T3-L1 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Ajanların etkilerinin hücre proliferasyon düzeyine etkilerinin belirlenmesi için % 0.1 DMSO içeren besi yeri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Kullanılacak ajanlar ise sırasıyla MDI+CC (10 μ M), MDI+CC (15 μ M), CC (10 μ M), CC (15 μ M) ve MDI+Tha (1 μ M) olacak şekilde besi yerlerine uygulanmış ve 48h sonra hücre proliferasyon oranları WST-1 (Roche, Almanya) proliferasyon kiti kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 6.1: 3T3-L1 hücrelerinde SIK2 inhibitörü (Compound C) ve ER stres (THA) ajanlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri (a).

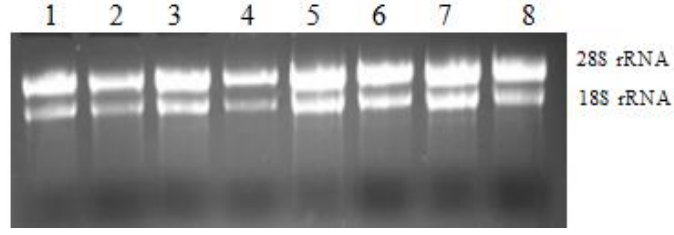


Şekil 6.1 : 3T3-L1 hücrelerinde SIK2 inhibitörü (Compound C) ve ER stres (THA) ajanlarının hücre sayımı üzerindeki etkileri (b).

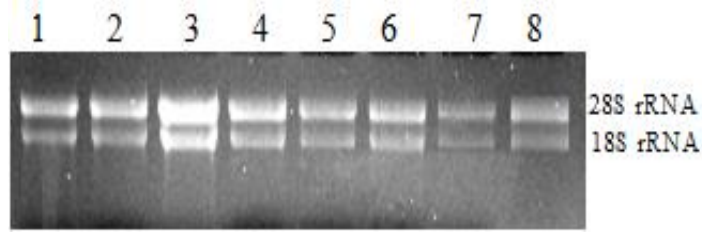
Yapılan çalışma sonucu sadece MDI ile muamele edilen gruplarda hücre proliferasyonu yaklaşık 2,5 kat artmışken, 10 μ M ve 15 μ M MDI+CC uygulanmış hücrelerde ise bu artışın yaklaşık olarak 2 kat olduğu görülmüştür. Sadece 10 μ M ve 15 μ M Compound C uygulanmış hücrelerde ve MDI+THA (1 μ M) ile muamele edilen hücrelerde hücre çoğalmasının bazal seviyeye yakın olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlarda CC'nin MCE'yi yaklaşık %20 geriletirken THA'nın MCE'yi tamamen önlediği görülmüştür. Bu durumda ER stresin muhtemel adipogenik etkisini yağ sentezini artırarak başardığı düşünülmektedir (Şekil 6.1) (A) Bu proliferasyon assayın sonucunu doğrulamak için tomalamel kullanarak mikroskopla saydığım hücre sayıları oranları sonucunda; hücre proliferasyon oranları ile benzer sonuc olduğu gözlemlenmiştir(Şekil 6.1) (B)

6.2. Total RNA İzolasyonu

3T3-L1 öncül adiposit hücreleri kullanılarak kontrol, MDI (farklılaşma besi yeri verilmiş hücre grubu), 15 μ M Compound c eklenmesiyle oluşan MDI+CC ve 1 μ M Tha eklenmesiyle oluşturulan MDI+Tha grubularından sırasıyla; 0. 1. 2. ve 3. günlerde total RNA izolasyonları yapılarak elde edilen RNA'lar % 1,2'lik formaldehit jelde yürütölüp görüntüleri alınmıştır (Şekil 6.2, Şekil 6.3).



Şekil 6.2: RNA izolasyonlarına ait formaldehit jel görüntüsü 1) Kontrol 0.gün, 2) MDI 0.gün, 3) MDI+CC 0.gün, 4) MDI+THA 0.gün 5) Kontrol 1.gün 6) MDI 1.gün, 7) MDI+CC 1.gün ve 8) MDI+THA 1. günlere ait RNA izolasyonların görüntüleri.



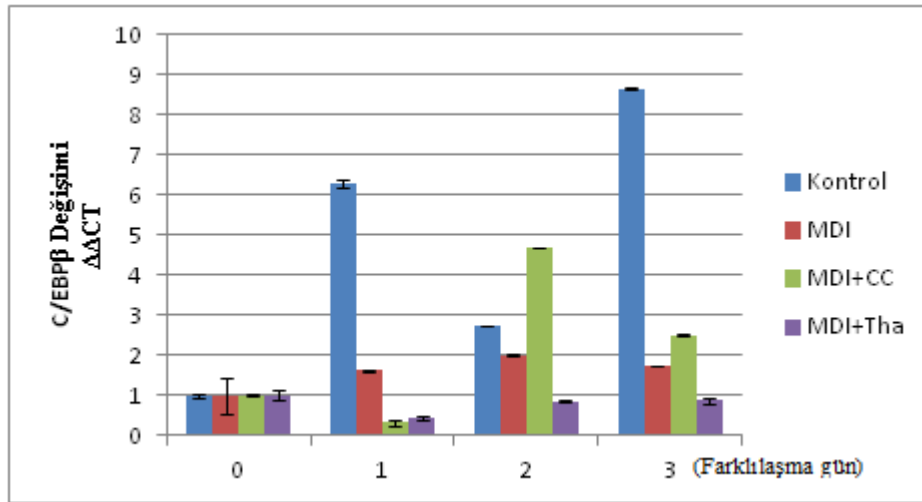
Şekil 6.3: RNA izolasyonlarına ait formaldehit jel görüntüsü 1) Kontrol 2.gün, 2) MDI 2.gün, 3) MDI+CC 2.gün, 4) MDI+Tha 2.gün, 5) Kontrol 3.gün, 6) MDI 3.gün, 7) MDI+CC 3.gün, 8) MDI+Tha 3.günlere ait RNA izolasyonların görüntüleridir.

Yürütülen total RNA' ların izolasyon ürünlerinin sağlam ve cDNA sentezi için kullanılabilir olduğu görülmüştür. cDNA için RNA örneklerinin spektrofotometrik olarak miktarı ve saflıkları ölçülmüştür.

6.3. Compound C ve ER Stresin *C/EBPβ* Geni Üzerindeki Etkisi

Compound c ve ER stres ajanı thapsigargin (Tha) varlığının, farklılaşma uyarısına erken cevap veren genlerden olan *C/EBPβ* geninin ifadesi üzerindeki etkilerini analiz etmek amacıyla qRT-PCR kullanılmış ve bu gendeki ifade değişiklikleri göreceli olarak $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

Petrilere yaklaşık % 40-50 yoğunlukta ekilen 3T3-L1 öncül adiposit hücreleri yüzeyi tamamen kaplamalarına izin verildikten 48 saat sonra (0.gün) DMEM ve FBS içeren normal kontrol besiyeri ve farklılaşma besiyeri içeren; MDI, MDI+CC (15 μ M) ve MDI+THA (1 μ M) şeklinde deney grupları oluşturulmuştur.



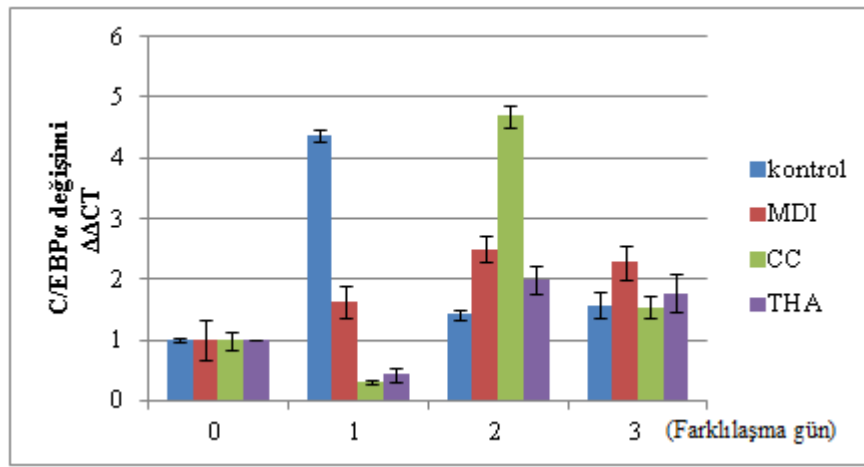
Şekil 6.4: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0, 1, 2 ve 3. günlerdeki *CEBPβ* mRNA düzeyi üzerindeki etkisi. $p < 0,001$ Annova değeri.

Kantitatif RT-PCR deneyi sonucunda MDI uygulanmış hücrelerde *C/EBPβ* mRNA sında 0. günden 3. güne kadar bir artış gözlenirken, MDI+CC uygulanmış hücrelerde 2.günde maksimum düzeye ulaşmış olan *C/EBPβ* mRNA düzeyi bu günden sonra azalma göstermektedir. MDI+THA uygulanmış hücre gruplarında ise *C/EBPβ* mRNA'sı farklılaşma süresi boyunca önce azaldığı 2. günde arttığı, 3. günde ise 2.güne göre azaldığı görülmektedir (Şekil 6.4). Compound c varlığında 2. günde yaklaşık 5 katlık artış farklılaşma için yeterli gözükse de ilk günde görülen azalma *CEBPβ* gen ifadesinde bir çeşit gecikmeyi ifade etmektedir. Burada ER stresin farklılaşma için gerekli *C/EBPβ* ifadesini önlediği görülmektedir. Dolayısı ile farklılaşmanın MCE safhasını önleyebileceği görülmektedir.

6.4. Compound C ve Thapsigargin *C/EBPα* ve *PPARγ* Genleri Üzerindeki Etkisi

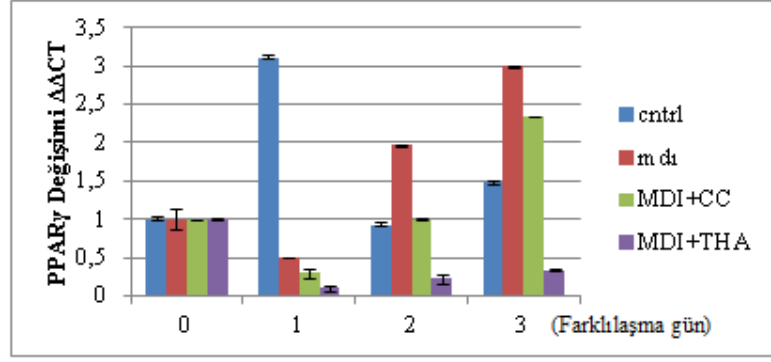
Farklılaşmanın olgunlaşma dönemine ait olan ikincil cevap genlerinden *C/EBPα* ve *PPARγ*'nin gen ifadeleri ile SIK2 inhibitörü Compound c ve ER stres ajanı olan Tha varlığındaki mRNA seviyesindeki değişimleri kantitatif qRT-PCR analizi yapılarak belirlendi ve sonuçlar $\Delta\Delta Ct$ metodu kullanılarak yorumlandı. Deney sonuçları 18S rRNA mRNA düzeyine göre normalize edilmiştir.

Adiposit farklılaşmasında birincil genlerden olan *C/EBP β* ve δ aktivitelerinin *PPAR γ* 'nın ifadelenmesi için gerekli olduğu bilinmektedir [Ntambi *et al.*, 2000]. Adiposit farklılaşmasında master rolü olan *PPAR γ* ve *C/EBP α* genleri adiposit fenotipini oluşturmak için gerekli protein ve enzimleri kodlayan birçok adiposit genin transkripsiyonunu teşvik etmektedir [Farmer, 2006]. Bunun için adipoz dokunun fenotipini oluşturmakla farklılaşmanın erken ve geçiş dönemlerini kapsayan birinci ve üçüncü günlerdeki bu genlerin SIK2 inhibitörü ve ER stres ajanı varlığındaki ifade değişikliklerini belirlemek amacıyla qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 6.5: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0,1, 2 ve 3. günlerdeki *CEBP α* mRNA düzeyi üzerindeki etkisi. Günlere göre $p < 0,001$ Annova değeri.

Elde edilen RT qPCR sonuçları incelendiğinde *C/EBP α* gen ifadesi farklılaşmanın erken safhasını içeren ilk iki günde tüm uygulamalarda kontrole göre farklılıklar barındırmaktadır. En önemli değişikliklerden biri SIK2 inhibitörü varlığında (CC) *C/EBP α* gen ifadesinin MDI' a oranla önemli ölçüde azalarak birinci gün sonunda bazal düzeyde seyir ettiği görülmüştür. Benzer şekilde ER stres de *C/EBP α* ifadesinde % 50' lik bir azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte ikinci günde kontrole göre Tha artmıştır hem de CC kontrole göre yaklaşık 3-4 katlık bir artışa sebebiyet vermiştir (Şekil 6.5). Üçüncü gün sonunda *C/EBP α* 'nın tüm gruplarda kontrole yakın bir düzeyde temsil edildiği görülmektedir.

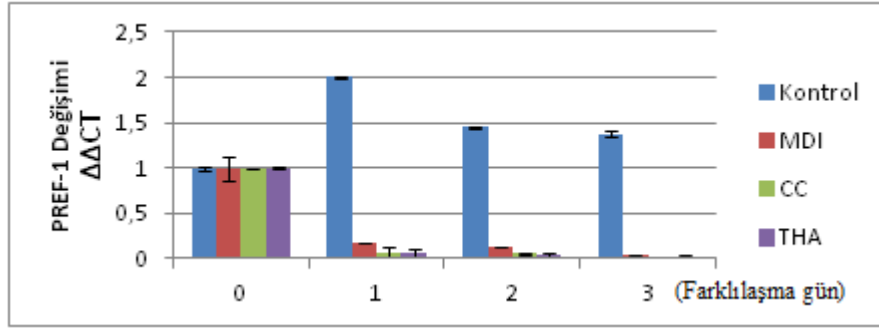


Şekil 6.6: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0,1,2 ve 3. günlerdeki *PPARγ* mRNA düzeyi üzerindeki etkisi. $p < 0,001$ Annova değeri.

Kantitatif qRT-PCR analizi sonucunda; MDI uygulanmış 3T3- L1 hücrelerinde *PPARγ* gen ifadesi, adipojenik uyarıyı takiben 1.gündeki kritik azalma 2. günden itibaren farklılaşmayı destekler yönde bir artış göstermiştir. THA içeren farklılaşma uyarısında ise *PPARγ*'nın bazal düzeyinin altında bir seviyede kalması literatürde dikkat çekilecek sadece THA ile farklılaşmanın tersine farklılaşmayı önleyici bir *PPARγ* düzeyini işaret etmektedir (Şekil 6.6).

6.5. Compound C ve Tha'nın *PREF1* ve *SREBP1-C* Genleri Üzerindeki Etkisi

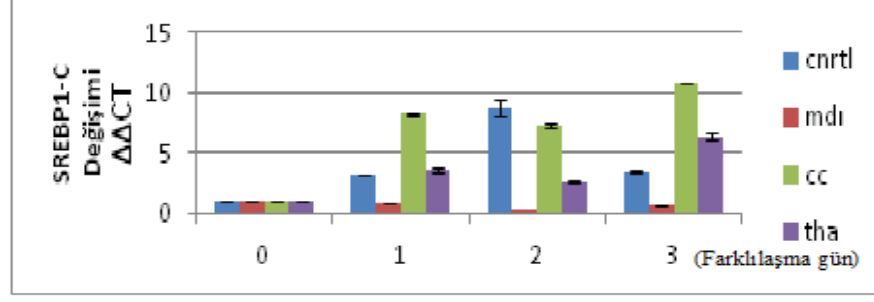
PREF-1; 3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilirken, farklılaşma uyarısından sonra hızlı bir şekilde azalır ve ortadan kalkar, geç safhada yeniden ortaya çıkar. Bu yüzden *PREF-1* mükemmel bir öncül adiposit markörü olarak kullanılır. Adiposit farklılaşmasının erken fazlarında fonksiyonel olduğunu bildiğimiz *PREF-1* gen ifadesinin Compound C ve ER stresinden etkilenip etkilenmediğini araştırmak için q-RT PCR ile göreceli mRNA seviyesi tespit edilmiştir.



Şekil 6.7: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound C ve Tha ajanlarının 0,1, 2 ve 3. günlerdeki *PREF-1* mRNA düzeyi üzerindeki etkisi. $p < 0,001$ Annova değeri

Yapılan RT-qPCR sonuçlarında beklenildiği gibi MDI uygulanmış hücrelerde *PREF-1* mRNA'sının azaldığı görülmüştür. *PREF-1* mRNA düzeyinin Compound c varlığında da benzer şekilde baskılandığı belirlenmiştir. MDI+THA uygulanan hücre grubunda da benzer bir pattern görmektedir (Şekil 6.7). Sonuç olarak *PREF-1* esas alındığında hem CC hem de THA farklılaşma potansiyelleri MDI ile karşılaştırılabilecek seviyededir.

Farklılaşmanın erken safhalarında *C/EBPβ* ve γ transkripsiyon faktörleri *SREBP1-C* gen ifadesini transkripsiyonel düzeyde kontrol ederken olgunlaşma safhasında bu süreç *C/EBPα* tarafından yürütülür. SIK2 tarafından fosforlanarak *SREBP1-C*'nin DNA bağlanma bölgesinin fonksiyonunu engellenmektedir. Bu durum sonucunda dolaylı olarak *SREBP1-c'nin* kontrol ettiği ve yağ sentezinden sorumlu olan genlerin ifadelerinde baskılanma gerçekleşmektedir. *SREBP1-C*'nin ayrıca lipid sentezi ve hücre döngüsü arasında bir bağ kurduğu da düşünülmektedir [Maria *et al.*, 2005]. Bu durum göz önüne alınarak, SIK2 inhibitörü varlığında ve SIK2'nin negatif modülatörü olarak ER stres durumunda *SREBP1-C*'nin mRNA düzeyindeki değişiklikler RT-qPCR ile analiz yapılarak belirlenmiştir.

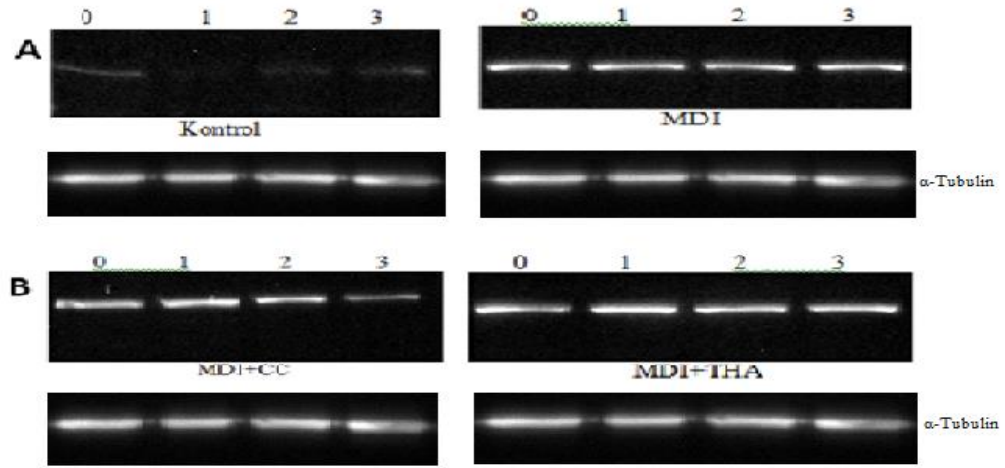


Şekil 6.8: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound C ve Tha ajanlarının 0,1,2 ve 3. günlerdeki *SREBP1-C* mRNA düzeyi üzerindeki etkisi. $p < 0,001$ Annova değeri.

Farklılaşmanın erken safhasında(MCE) Compound c varlığında *SREBP1-c* mRNA'sının MDI grubuna oranla yaklaşık 8 kat artarak maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir(Şekil 6.8). ER stres ajanı varlığında MDI ile uyarılan hücrelerde *SREBP1-C* mRNA düzeyi MDI grubuna oranla 1.gün yaklaşık olarak 4 katlık bir artış göstermiş 2.gün azalmış 3.gün ise yaklaşık olarak 6 katlık bir artışla maksimum düzeye ulaştığı görülmüştür. Bununla birlikte *SREBP1-C* mRNA'nın her iki durumda 3. günde artma eğilimi göstermesi *SREBP1-C*'nin lipogenik rolü ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Şekil 6.8).

6.6. Compound C ve Tha'nın SIK2 Proteinleri Üzerindeki Etkisi

Adiposit farklılaşmasının erken fazlarında eksprese olan markör genlerle eş zamanlı ifade edildiği bilinen SIK2'nin ER stres ajanı ve SIK2 inhibitörü varlığında protein miktarındaki değişimleri belirlemek amacı ile Western Blot analizleri yapılmıştır.



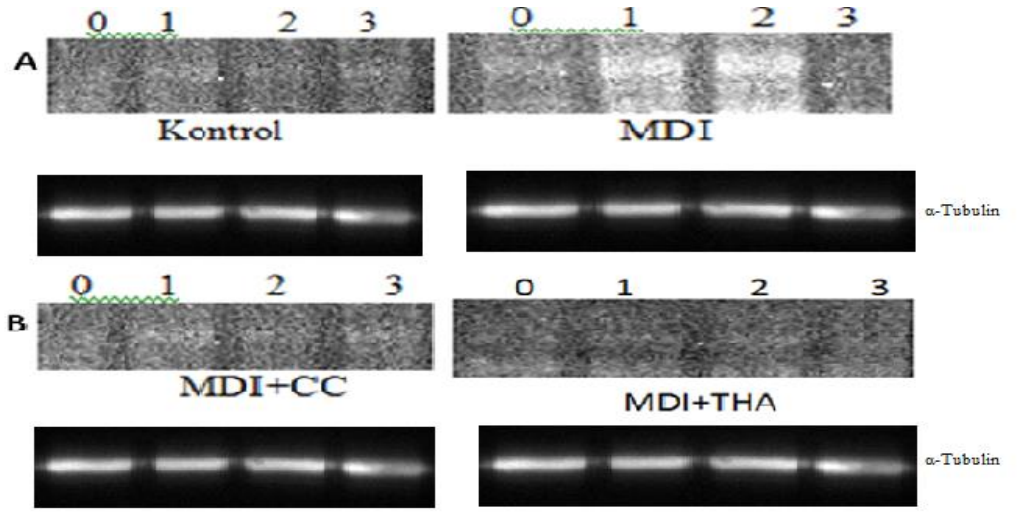
Şekil 6.9: SIK2 proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI grublarının 0,1, 2 ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0,1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

Kontrole göre farklılaşma gözlemlenen tüm şartlarda (MDI, MDI+CC, MDI+THA) SIK2'nin özellikle 1. günde belirgin bir şekilde artması ve bunun MCE boyunca azalmasına rağmen yüksek düzeyde temsil edilmesi onun MCE'deki rolünü güçlendirmektedir.

Ölçülen band yoğunlukları karşılaştırıldıklarında 3T3-L1 hücrelerindeki SIK2 protein miktarının 0.günden itibaren 2.güne kadar arttığı hatta 2.günde yaklaşık 1,5 katlık bir artışla maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Üçüncü günde ise SIK2 protein düzeyinin azaldığı görülmüştür ancak buna karşı protein miktarı başlangıça göre yüksek düzeyde seyretmiştir. Compound C varlığında MDI bağımlı SIK2 protein düzeyinde 2. güne kadar, kontrole göre yaklaşık 2 katlık bir artış olamakla birlikte 3.gün protein miktarında azalmanın olduğu belirlenmiştir. MDI+THA uygulanmış gruplarda da 0.günden 2.güne kadar yaklaşık olarak 2,5 katlık bir artış göstererek 3.günde azaldığı görülmüştür (Şekil 6.20). Daha önce yaptığımız çalışmalarda ER stresin SIK2'nin yıkımına neden olduğu bilinmekteydi. [Çalışkaner, 2013]. Fakat burada MDI bileşeni olan insülinin muhtemelen buna karşı SIK2 ifade ve stabilitesini sağladığı öngörülmektedir. Sonuç olarak THA ve CC'nin SIK2 ifadesine benzer şekilde etkilediği ve MDI'ya oranla her iki durumda özellikle MCE süresince (2.gün) SIK2 düzeyinin yüksek olduğu görülmektedir.

6.7. Compound C ve Tha'nın CNAP Proteinleri Üzerindeki Etkisi

CNAP sentromerik bir proteindir. SIK2'nin CNAP1'i S2392'den fosforlaşmasından dolayı mitozun başlatılmasında rol aldığı yapılan çalışmalarda bulunmuştur [AHMED *et al.*, 1999]. Bu veriler doğrultunda SIK2 inhibitörü Compound C ve SIK2'nin negatif düzenlenmesine neden olan ER stres ajanı THA varlığında farklılaşma süresince CNAP protein miktarında meydana gelen değişimler Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir.



Şekil 6.10: CNAP proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI grublarının 0,1, 2 ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0,1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

MDI ile uyarılan hücrelerde CNAP-1 düzeyinde yaklaşık 2,5 katlık bir artış gözlemlenirken, bu artış MDI+CC'de yaklaşık 2 kat ve MDI+THA'da ise 1 katlık artışla sınırlı kalmıştır. MDI uygulamasında CNAP-1 proteini 1.gün de maksimum düzeye ulaşılmış 2.günde ise azalmış MCE'nin sonlandığı 3.günde ise bazal seviyeye gelmiştir (Şekil 6.21). Mitotik safhanın ilerleyebilmesi için gerekli olan SIK2 ile aktive olan CNAP1'in MCE'nin baskılandığı CC ve THA uygulamalarında baskılanarak kontrol düzeyine gerilemesi her iki kimyasal ajanın da antimitotik etkisi ile ilişkilendirilebilmektedir. Bu doğrultuda SIK2'nin CNAP-1'in kararlılığını arttırıp arttırmadığı yeni bir sonuç olarak önümüze çıkmaktadır. Bununla birlikte CNAP1'in

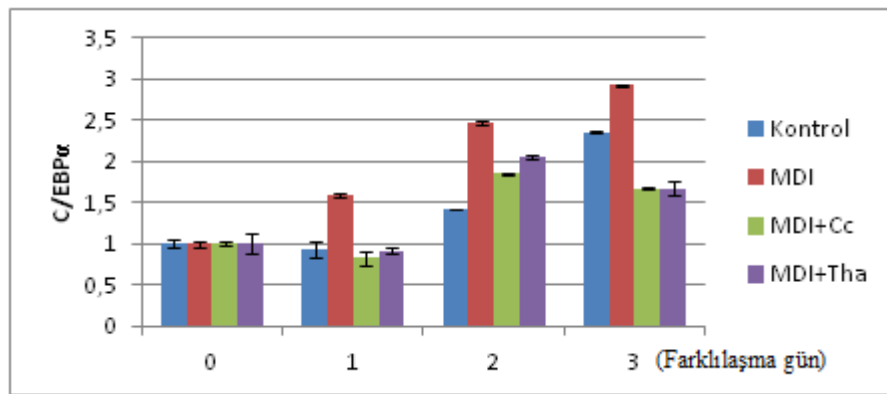
fosforlanmasının belirlenmesi onun fonksiyonel varlığının belirlenmesi için gereklidir.

6.8. ER Stres ve Compound C Varlığında C/EBP β ve C/EBP α Protein Düzeyleri

Gen ekspresyon seviyeleri her zaman protein seviyeleri ile benzerlik göstermeyebilir. Bu genellikle transkripsiyonel kontrol, mRNA stabilitesi, translasyonel düzenleme posttranslasyonel modifikasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkar. Burada gösterilen gen ifadelerine paralel olarak farklılaşmanın MCE ile sınırlı erken safhasında SIK2 ve ER stres kaynaklı değişiklikler Western-blot ile yöntemi ile protein düzeyinde irdelenmiştir.

6.9. Thapsigargin ve Compound C'nin Mitotik C/EBP β ve Antimitotik C/EBP α Farklılaşma Proteinlerine Etkisi

Adiposit farklılaşmasının ikincil genlerinden olan C/EBP α 'nın protein miktarlarının ER stres ve SIK2 inhibitörü varlığındaki değişimi western analizi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

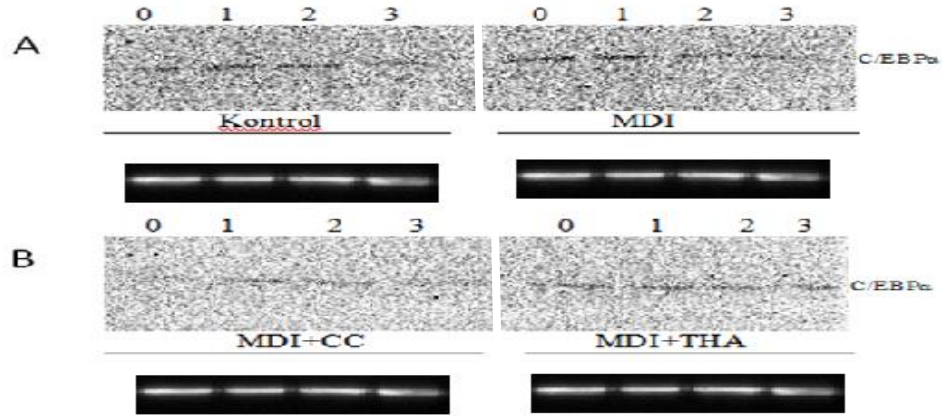


Şekil 6.11: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0, 1, 2 ve 3. günlerdeki C/EBP α protein düzeyi üzerindeki etkisi.

Elde edilen Western Blotting sonuçlarında; MDI uygulanan hücrelerde C/EBP α düzeyi 3. gün sonunda 3 katlık bir artış göstermiştir. CC ve THA uygulanan gruplarda C/EBP α düzeyinde 1.güne kadar belirgin bir değişiklik gözlenmezken, 2.günde 2 katlık bir artış meydana gelirken 3.günde C/EBP α protein düzeyinde azalma olduğu görülmüştür (Şekil 6.9, Şekil 6.10).

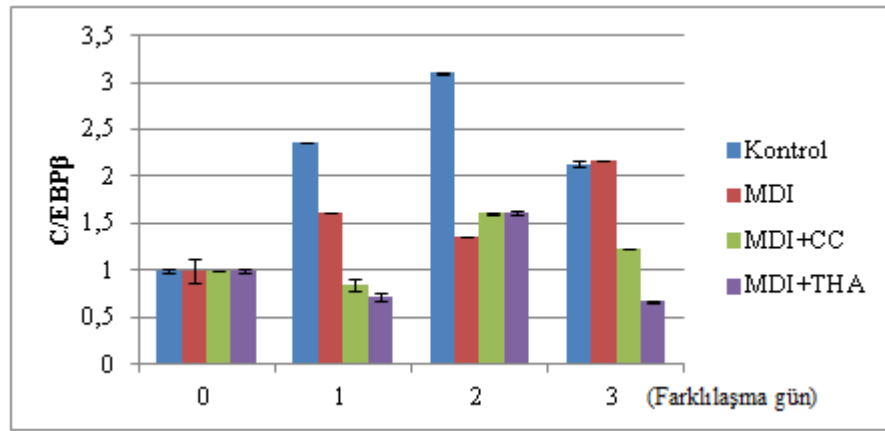
CEBP α antimitotik etkiye sahip olduğundan MDI ile uyarılan hücrelerde MCE'nin sonu olan 2. ve 3.gün yüksek olması beklenir ve bizde de bu şekilde gerçekleşmiştir. Diğer yandan MCE üzerinde ciddi bir negatif etki yaratan CC ve THA uygulamalarında erken aktive olmasını beklediğimiz C/EBP α tam tersine MDI'ya göre daha geç ve düşük düzeyde bir artışla sınırlı kalmıştır.

Ye Gao ve arkadaşlarının yapmış olduğu adiposit farklılaşması çalışmaları başta olmak üzere konuyla ilgili literatür incelendiğinde; MDI uygulanmış hücrelerde farklılaşma ile birlikte C/EBP β , α ; PPAR γ gibi genlerin kontrole oranla daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Bu sebepten dolayı kontrolde herhangi bir C/EBP α aktivitesi beklenmemektedir. Kontrol grubumuzda upstream aktivatörler olan C/EBP β ve C/EBP δ 'nin düzeyinde bir artış beklenmemesine rağmen, yaptığımız iki farklı deney tekrarında; farklılaşmanın olmaması beklenen kontrol hücrelerinde bu genlerin ifadesindeki artışın MDI uygulanan hücrelere göre daha fazla olması, literatürde karşılığı olmayan bu verileri yorumlamamızı zorlaştırmaktadır. Bu durum, deney yapılan hücre hatlarında klonal bir seçim olmuş olması olasılığını akla getirmektedir. Bununla birlikte 1.günde THA ve CC'nin CEBP α ifadesini tamamen baskılayarak MCE'yi negatif yönde etkileyebileceğini işaret etmektedir. Bu etkinin CEBP β üzerinden gerçekleştirebilmesi muhtemeldir. SIK2'nin CREB ve P300 üzerindeki baskısını kaldırarak CEBP β 'nin ifadesine olanak vermesi ve dolayısıyla CEBP α ifadesini desteklediği CC varlığında düşünülebilir. Benzer şekilde SIK2'nin bu etkiyi IRS-1 fosforlanması ile de yapabileceği olanaklıdır [Horike *et al.*, 2003].



Şekil 6.12: C/EBP α proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI grublarının 0, 1, 2, ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0, 1, 2, ve 3. günlerine ait western görüntüleri.

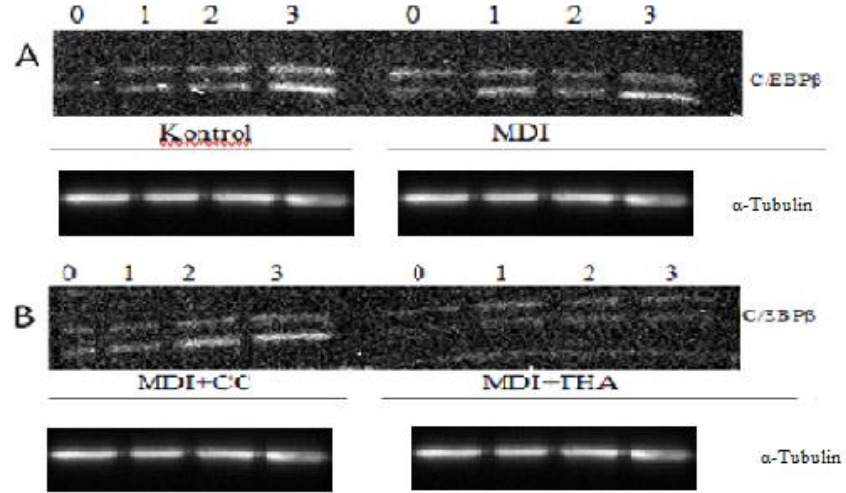
MCE için gerekli C/EBP β ve δ adiposit farklılaşmasında; farklılaşma kokteylinin eklenmesiyle ifadesi yapılan ilk genlerdendir. C/EBP β 'nin protein anlatımının Tha ve Compound c varlığındaki etkileri aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi Western Blotting yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 6.13: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0, 1, 2, ve 3. günlerdeki C/EBP β protein düzeyi üzerindeki etkisi.

Elde edilen Western Blotting sonuçlarında; MDI uygulanmış hücrelerde 1.günde 1,5 katlık bir artış görülmüş 2.günde azalma meydana gelmiş 3.günde tekrar arttığı görülmüştür. Eğer kontroldeki beklenmedik artışı göz önüne almazsak SIK2 ve ER stresin C/EBP β üzerinden MCE'yi azaltmadığı mümkün gözükmemektedir; fakat bilindiği gibi C/EBP β 'nin düzeyinden çok DNA bağlanma özelliğinin ölçülmesi gerekmektedir. Bu C/EBP β bağlanma bölgesi içeren bir lusiferaz reportör

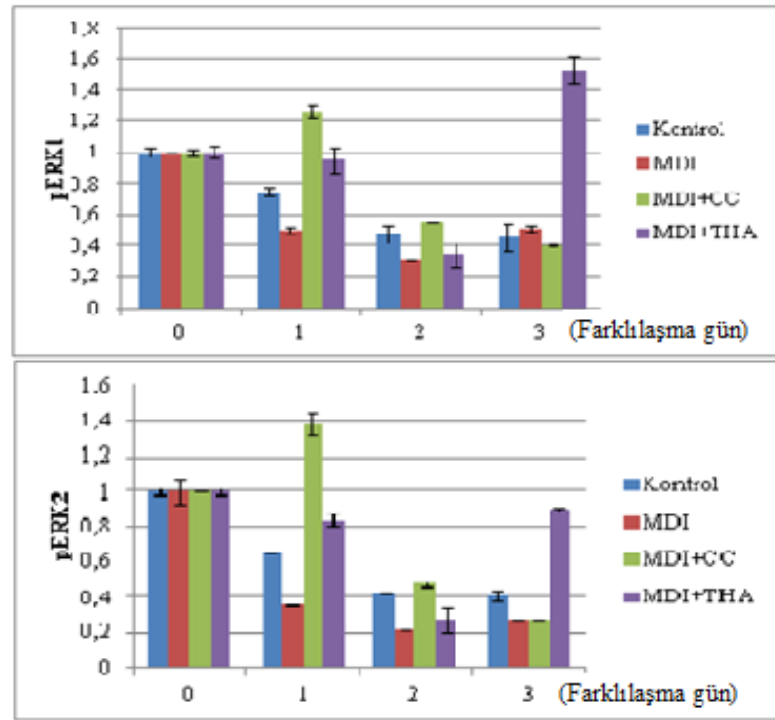
sistemi ile test edilebilir. Kontrol grubunda 2. günde görülen beklemedik artış bu verilerin doğru yorumlanabilmesi için aktif durumlarını gösteren fosfo formlarının özgün antibodylerle belirlenmesini zorunlu kılmaktadır.(Şekil 6.11, Şekil 6.12).



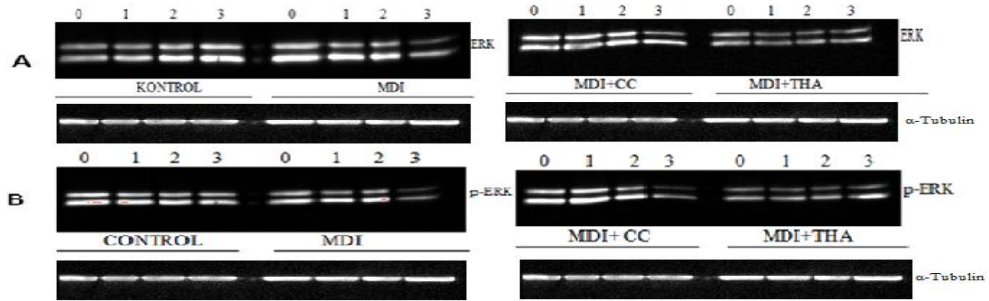
Şekil 6.14: C/EBPβ proteinine ait Western Blot görüntüleri.A) Kontrol ve MDI gruplarının 0, 1, 2. ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha gruplarının 0, 1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

6.10. Compound C ve Tha'nın p-ERK Proteinleri Üzerindeki Etkisi

ERK yolağının aktivitesi farklılaşma sürecinin başlatılması için gerekliken, ileri olgunlaşma safhasında bu etki anti-adipojeniktir. Adiposit farklılaşma boyunca özellikle MCE safhasını içeren ilk 2-3 günler süresince fosforlanmış aktif olan, p-ERK düzeylerindeki değişimler Western Blotting yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 6.15: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound C ve Tha ajanlarının 0., 1., 2. ve 3.günlerdeki; A) p-ERK 1, B) p-ERK 2 protein düzeyleri üzerindeki etkisi.



Şekil 6.16: ERK ve p-ERK proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) ERK proteinine ait kontrol, MDI, MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0., 1., 2. ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) p-ERK proteinine ait kontrol, MDI, MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0, 1, 2. ve 3. günlerine ait western görüntüleri.

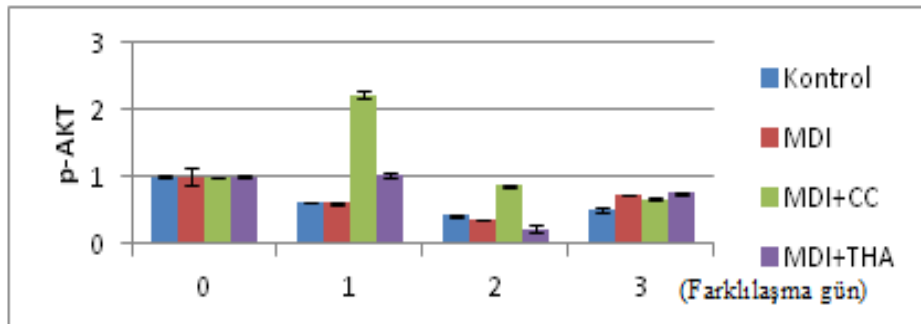
Western Blot analizleri sonucu elde edilen sonuçlar incelendiğinde Compound c varlığında farklılaşma süresince SIK2 en aktif olduğu 1.günde ERK düzeyi MDI'ya göre yaklaşık 3 kat daha fazladır. Bu durumda SIK2'nin ERK fosforilasyonunu baskıladığı rahatca söylenebilir. SIK2 bunu IRS1(794) üzerinden veya diğer bir IR adaptörü olan Gab1 üzerinden yapıyor olabilir. Gerek Compound c gerek THA uygulamalarında MCE %20-25 düzeyinde baskılanmasının, pERK'deki değişimden

kaynaklandığının anlaşılması MAPK inhibitörü veya ERK1/2 aşırı ifadesi ile anlaşılabilir.

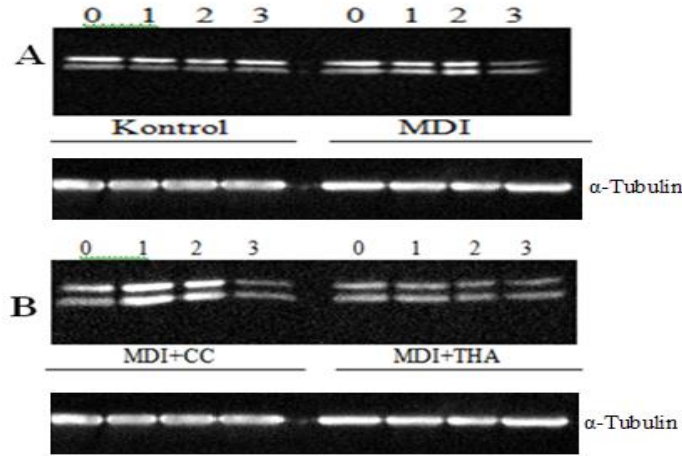
MCE için gerekli olan pERK1-2'nin benzer bir aktivasyon profili çizerek 1.günde farklılaşmanın maksimum olduğu MDI uygulanmasına oranla CC'nin ortalama 2 kat arttığı, THA'nın ise 3.günde daha etkin olduğu ve Kontrol'e göre pERK1 aktivitesini 4 kat arttırdığı belirlenmiştir. Kontrolde beklenildiği gibi pERK düzeyi 3.günde de azalmayarak anti proliferasyon etkisini korumuştur.

6.11. Compound C ve Tha'nın PKB Düzeyi ve Aktivitesine Etkisi

Akt proteinin adiposit farklılaşmasının erken safhasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. pAkt'ın CREB ve CEBP β üzerinden MCE'yi pozitif yönde etkilemesi ve FOXO1'i baskılayarak da adipogenezi artırdığı bilinmektedir. pAkt'ın ayrıca insülinle uyarısına karşı SIK2 aktivitesini yükselttiği bilinmektedir. Yapılan western çalışmaları sonucunda p-AKT; MDI varlığında farklılaşmanın 2.gününde minimum düzeye inmiştir. Buna karşın SIK2 inhibitörü olan Compound c varlığında bu azalma baskılanarak kontrole göre farklılaşmanın ilk gününde yaklaşık 4 katlık bir pAKT düzeyine ulaşılmıştır (Şekil 6.15, Şekil 6.16).



Şekil 6.17: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0, 1, 2. ve 3. günlerdeki p-AKT protein düzeyi üzerindeki etkisi.



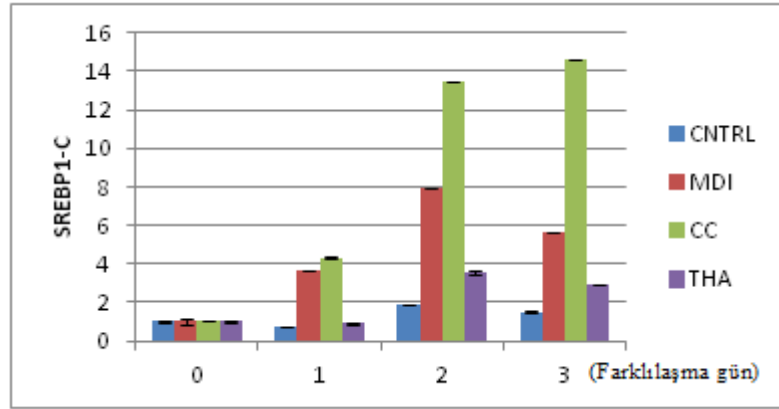
Şekil 6.18: p-AKT proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI grublarının 0,1, 2 ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0,1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

ER stresi pAkt düzeyinde 1.günde gerçekleşen %50'lik azalmayı önlerken CC varlığında bu aktivitenin kontrole göre yaklaşık 4 kat artmasına neden olmuştur. SIK2 aktivitesinin baskılanması Akt aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır, bu da SIK2'nin PI3K-Akt yolağını negatif olarak regule edebildiğini göstermektedir. Aslında SIK2'nin Akt aktivasyonunun IRS1 düzeyinde negatif regülasyonu glia hücrelerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bunun MCE üzerindeki olumsuz etkisini görebilmek için siRNA aracılı gen ifadesinin azaltılması veya IRS1-SIK2 etkileşimini hedef alan mutasyonel çalışmalar yapılabilir. Maksimum farklılaşmanın gözlemlendiği MDI'nın 1 günündeki aktivitesi bunu desteklerken [Hebip, 2010], CC'nin neden olduğu aşırı pAkt düzeyi muhtemelen MCE üzerinde pozitif bir etkiye sahip değildir.

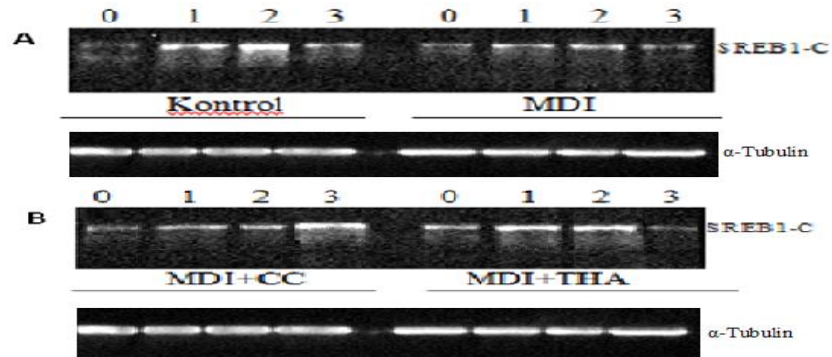
pAKT düzeyindeki bu artış SIK2'nin insülin sinyal yolağını IRS1 (Ser794) baskıladığı göz önüne alındığında oldukça ilgi çekici görülmektedir. CC ile SIK2 baskılandığından IRS1-PI3-K-Akt aktivasyonu gerçekleşerek bu artışın yaşandığı düşünülmektedir. SIK2'nin Akt-1 aktivasyonunu IRS-1 düzeyinde baskılayabileceği yeni yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [Küser-Abali *et al.*, 2013] CC varlığında farklılaşma için uyarılan 3T3-L1 hücrelerinde MCE gerilediği bilindiğinden gözlemlediğimiz bu yüksek pAkt düzeyinin farklılaşma üzerinde ne tür bir etki yapacağı merak konusudur.

6.12. Compound C ve Tha'nın SREBP1-c Proteinleri Üzerindeki Etkisi

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Western Blot sonuçlarında; MDI uygulanmış hücrelerde protein miktarları MCE süresince artarak 2.günde maksimum düzeye ulaşmıştır. SIK2 inhibitörü olan Compound c uygulanmış hücrelerde ise bu artışın daha da belirgin bir şekilde 3. günde maksimum düzeye ulaştığı görülmektedir. MDI+THA uygulanmış hücrelerde de SREBP1-C'nin protein seviyesi 2.günde yaklaşık olarak 3 katlık bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar insülin aracılı SREBP-1c aktivasyonunun, SIK2 tarafından IRS-1 üzerinden negatif olarak düzenlenebileceğini akla getirmektedir (Şekil 6.17, Şekil 6.18).



Şekil 6.19: 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşma süresince Compound c ve Tha ajanlarının 0, 1, 2. ve 3. günlerdeki, farklılaşmasının geç markörü olan SREBP1C protein düzeyi üzerindeki etkisi.

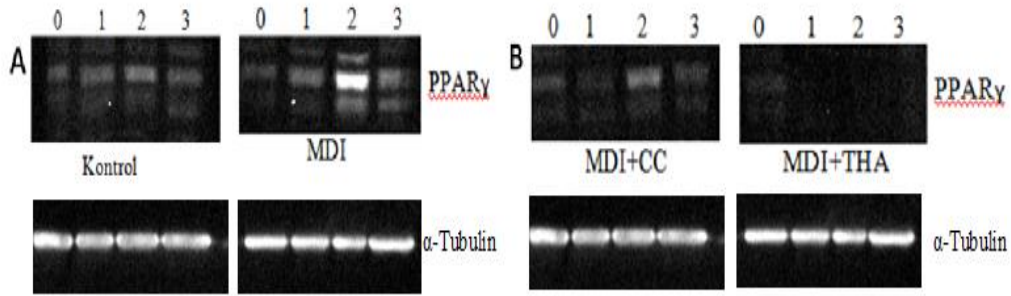


Şekil 6.20: SREBP1-C proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI gruplarının 0, 1, 2. ve 3. günlerine ait Western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha gruplarının 0, 1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

Kontrol grubunda mRNA düzeyinde yaklaşık 8 katlık bir artışa sahip olan SREBP1C'nin protein düzeyinde uyarı öncesi düzeyde kalması SREBP1C'nin yüksek bir yapılıp/yıkılma hızından kaynaklanabileceği gibi mRNA stabilitesi veya translasyonel kontrolü ile de gerçekleşebileceğini işaret etmektedir. Bu durumda CC'nin SREBP1C'nin ifadesini ve de stabilitesini sağladığı düşünülebilir. Benzer şekilde insülin içeren MDI kokteylinde SREBP1C'nin ifadesini ve stabilitesini artırdığı görülmektedir. Bunun tam tersine ER stresin mRNA düzeyinde SREBP1c'nin miktarını artırmasına rağmen, protein düzeyinde aşağı çektiği düşünülebilir. ER stresin SREBP1c'nin aktif formunu artırarak lipogenezi desteklediği daha önce hepatosit hücrelerinde gösterilmiştir [Çalışkaner, 2013].

6.13. Compound C ve Tha'nın PPAR γ Proteinleri Üzerindeki Etkisi

ER stres ajanı Tha ve SIK2 inhibitörü CC varlığında farklılaşmanın ikincil genlerinden olan PPAR γ 'nın protein düzeyindeki değişimi gösteren çalışmalar western blot yöntemiyle analiz edilmiştir.



Şekil 6.21: PPAR γ proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI grublarının 0,1, 2 ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0,1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

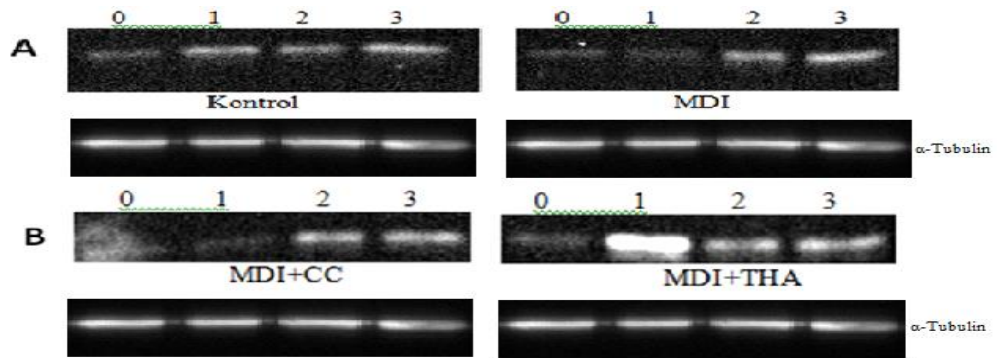
PPAR γ 'ya ait band yoğunlukları referans olarak kullanılan α -Tubulin band yoğunluğuna normalize edilmiştir ve daha sonra elde edilen değerler her bir uygulama için 0.güne oranlanarak artma ve azalmalar saptanmıştır. MDI uygulanmış hücrelerde PPAR γ protein miktarları 2.günde yaklaşık 2 katlık bir artışla en yüksek düzeyine ulaşmıştır. Compound C ile muamele edilmiş hücrelerde ise protein

miktarlarında 2.günde artış olduğu görülmüştür. MDI'ya göre CC uygulanmış hücrelerde PPAR γ 'nın ifadenmesinde azalma olduğu görülmüştür. Bu da CC'nin adiposit farklılaşması için major markörlerden olan PPAR γ 'nın protein ifadesini baskıladığını göstermektedir (Şekil 6.19). Bu PPAR γ aktivatörü olan SREBP-1c protein düzeyleri ile de uyumlu gözükmemektedir. Bununla birlikte gerek SREBP-1c gerek PPAR γ 'nın aktif fosfo durumlarının belirlenmesi gerekmektedir. Daha önce yapılan bir tez çalışmasında strausporuin ile PPAR γ ifadesinde 2 günlük bir gecikme olduğu gösterilmiştir [Hebip, 2010].

ER stres ajanı olarak kullanılan MDI+THA uygulanmış hücrelerde ise PPAR γ protein ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğu görülmektedir. Bu durum ER stres varlığında artan CHOP protein düzeyinin, PPAR γ ifadesini baskılamasıyla uyumludur (Şekil 6.19).

6.14. Compound C ve Tha'nın CHOP Proteinleri Üzerindeki Etkisi

ER stres durumunda artan CHOP bir ER stres markörüdür. 3T3-L1 hücreleri kullanılarak oluşturulan Kontrol, MDI, MDI+CC ve MDI+THA gruplarında farklı günler boyunca, Compound c ve Tha ajanını varlığında CHOP'un protein miktarındaki değişimler Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir.

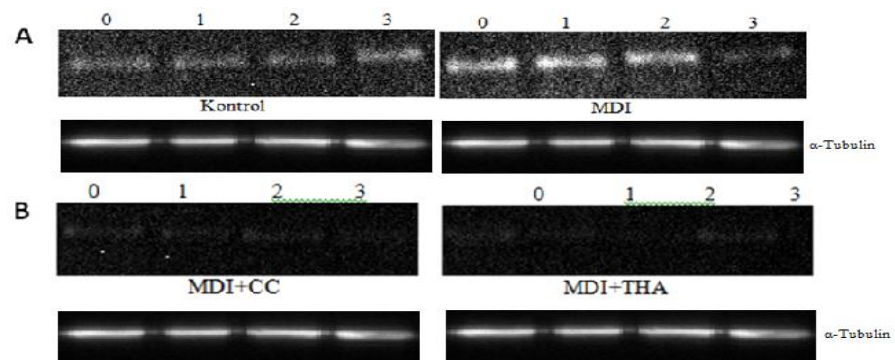


Şekil 6.22: CHOP proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI gruplarının 0,1, 2 ve 3. günlerine ait western görüntüleri. Tubulin (altta) B) MDI+CC ve MDI+Tha gruplarının 0,1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri. Tubulin (altta).

Western Blot sonucu elde edilen band yoğunlukları ölçüldüğünde, kontrol, MDI (farklılaşma mediumu içen grup) ve MDI+CC grublarında CHOP'un protein ifadesi bazal düzeyde iken; MDI+THA uygulanmış hücrelerde 1.günde 10 katlık bir artışla maksimum düzeye ulaşmış, takip eden 2.ve 3.günde ise protein miktarının 1.güne göre azalmış olduğu fakat 0. güne göre halen yüksek düzeyde devam etmiştir. Bu durumda ER stres ajanı uygulanmış hücrelerde ER stres oluşturulduğu doğrulanmıştır (Şekil 6.22). Apoptotik protein olan CHOP'un MDI ile uyarılan hücrelerde kontrole yakın bir düzeyde olması farklılaşan hücrelerin herhangi bir apoptoz yönelimi olmadığını göstermektedir. Buna karşın THA uygulanmış hücrelerde 1.günde CHOP düzeyinin, apoptozun belirlenmesini gerektirecek düzeyde artırdığını görüyoruz.

Burada dikkat edilirse kontrol grubunda dikkate değer bir CHOP düzeyi görülmektedir. Bunun muhtemelen kullandığımız yüksek glikoz (25 mM) DMEM'den kaynaklandığı düşünülmektedir; zira insülin içeren MDI uygulanmasında yüksek CHOP düzeyi nispeten baskılanmıştır. CC'nin MDI'a yakın bir etki göstermesi stres üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını işaret etmektedir. Bununla birlikte beklendiği gibi ER stres 1.günden itibaren CHOP düzeyini güçlü bir şekilde artırmaktadır. Bunun PPAR γ üzerindeki etkisine daha önce değinilmiştir.

6.15. Compound C ve Tha'nın IRS-1 Proteinleri Üzerindeki Etkisi



Şekil 6.23: IRS-1 proteinine ait Western Blot görüntüleri. A) Kontrol ve MDI grublarının 0,1, 2 ve 3. günlerine ait western görüntüleri. B) MDI+CC ve MDI+Tha grublarının 0,1, 2. ve 3. günlerine ait Western Blot görüntüleri.

Western blot sonucu elde edilen IRS-1 özgün band yoğunlukları değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDI, MDI+CC ve MDI+THA uygulamalarında IRS1 düzeyinde ciddi bir azalma görülmektedir. Hem Compound c hem de ER stresi SIK2'nin aktivitesi kararlılığı üzerinde olumsuz rol oynadığı bilinmesine rağmen her iki durumda IRS-1 düzeyindeki azalmayı açıklayacak çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bunun için SIK2'nin; IRS-1 gen ifadesi ve protein kararlılığına yönelik deneysel yaklaşımların kullanılmasını gerekli kılmaktadır. Bununla birlikte IRS-1 düzeyindeki bu azalma ERK ve Akt düzeylerini azaltacağından MCE olumsuz yönde etkilenecektir.

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Obezite ve ilişkili metabolik hastalıklar çağımızın en önemli epidemik boyuttaki sağlık sorunlarından biridir. Obezite yağ hücrelerinin sayısal ve hacimsel artışı ile karakterize olan patolojik bir durumu ifade etmektedir. Ayrıca obez birey ve hayvanların yağ dokularında ER stres ve inflamasyon sıklıkla görülmektedir. Son on yılda yapılan çalışmalarla glikoz ve yağ sentezindeki düzenleyici rolü ortaya çıkarılan SIK2'nin obez hayvan ve bireylerin yağ dokularında yüksek düzeyde aktiviteye sahip olması ve adiposit farklılaşmasında erken safhaya ait olan genlerle birlikte ifade edilmesi onun yağ doku gelişiminde de önemli rolü olabileceğini göstermektedir. Bu da bizi ER stres ve adiposit farklılaşması arasında bir ilişki olabileceği hipotezine yöneltmiştir. Bu tür bir çalışmadan elde edilecek verilerin obezitede artan yağ hücre sayısını ve kütlesini kontrol altına alabilecek SIK2 odaklı yeni farmakolojik hedeflerin tanımlanmasına ve dolayısı ile epidemik boyutlara ulaşan obezite ve ilişkili metabolik hastalıklarla mücadele edilmesine olanak vermesi beklenmektedir.

Obezite insülin direnci başta olmak üzere kalp damar hastalıkları, karaciğer yağlanması, hipertansiyon gibi hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür. Horike ve arkadaşlarının 3T3-L1 hücrelerinde SIK2'nin adiposit farklılaşmasının erken genlerinden olan C/EBPs ailesine ait genlerle eş zamanlı artışı göstermesi obez hayvan ve bireylerin yağ dokusunda yüksek miktar ve aktiviteye sahip olması SIK2'nin MCE'deki rolünün daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmasını gerekli kılmıştır. Yine laboratuvarımızda karaciğer hücreleri ile yapılan çalışmalarda SIK2 düzeyinin ER stres tarafından önemli ölçüde azaltıldığının gösterilmesi, ER stres ile SIK2 ve dolayısı ile MCE arasında muhtemel bir ilişkinin varlığına işaret etmektedir. Bu bulgular birlikte ele alındığında temel hedefin ER stresi ve SIK2'nin MCE deki rolünün araştırılması oluşturmaktadır.

Bu çalışmada SIK2'nin ve onun negatif düzenleyicisi ER stresin SIK2'nin farklılaşmayı takiben artan miktar ve aktivitesi göz önüne alınarak MCE düzeyinde araştırılmıştır. 3T3-L1 hücrelerinde ER stres oluşturularak ve SIK2 inhibitörü varlığında adiposit farklılaşması için gerekli olan genlerin ve yine farklılaşmada fonksiyonel yollar üzerindeki etkileri farklılaşmanın erken sürecindeki

değişimlerine ve SIK2'nin kontrol ettiği yollar üzerinde nasıl etki yapacağı gerek kantitatif PCR gerek Western yöntemleriyle gen ve protein düzeyinde çalışılmıştır.

İlk olarak Compound c varlığında mitotik klonal genişlemenin nasıl etkilendiğini öğrenmek için hücre proliferasyonu ve sayısındaki değişimler belirlenmiştir. MDI ile uyarılan hücrelere oranla SIK2 aktivitesinin baskılandığı durumda mitotik klonal genişlemenin (MCE'nin) %25-30 azaldığını göstermiştir. Bu etkinin IRS-1 üzerinden veya SIK2'nin direk substratı olan sentrozom proteini C-NAP1 vasıtası ile gerçekleşebileceği gösterilmiştir. Yaptığımız çalışma doğrultusunda SIK2 inhibitörü varlığında CNAP-1'in anlatımında MDI uygulanmış hücreler ile karşılaştırıldığında azalma olduğu görülmektedir. Bu da bize SIK2 tarafından fosforlanan (S2392) C-NAP1'in hem mitozu tetiklediği hem de yıkımını önlediğini işaret etmektedir. SIK2 olmadığı durumlarda CNAP-1'in kararlılığını yitirerek yıkıma uğradığı ve mitozda sentrozomların ayrılmasını engelleyerek hücrelerin G2/M fazında tutuklandığı düşünülebilir diğer yandan bu hipotezin doğruluğu SIK2'nin C-NAP1 ile olan etkileşiminin IP ve ICH gibi yöntemlerle doğrulanmasını ve C-NAP1 S2392A mutantının aşırı ifadesi ile test edilmelidir.

ER stres ve ilişkili SIK2 aktivitesinin farklılaşmanın MCE fazına etkilerini araştırmak için; farklılaşma, MCE ve geçiş fazlarına özgün fonksiyonel olan *C/EBPβ,α* ve *PPARγ* genlerinin Compound c ve ER stres varlığındaki etkileri mRNA ve protein düzeyinde araştırılmıştır. Compound c uygulanmış hücrelerde *C/EBPβ* geninin mRNA ve protein düzeyinde farklılaşmanın erken evrelerinde MDI ya göre baskılandığını göstermektedir. Yaptığımız çalışmamızda Compound c'nin *C/EBPα* ve *PPARγ*'nin da gen ve protein seviyeleri MDI uygulanmış hücrelere göre baskılandığı görülmektedir. Compound c bu inhibisyonu IRS-1 düzeyinde veya *C/EBPβ* ve *PPARγ*'nin upstreamında bulunan SREBP1, CREB gibi transkripsiyon faktörleri vasıtası ile gerçekleştirebileceği düşünülebilir. MDI+THA uygulanmış hücrelerde *C/EBPα* ve *β* genleri mRNA ve protein düzeyindeki değişimler incelenmiştir. MDI ile muamele edilmiş hücrelerle kıyaslandığında ER stres olduğu durumlarda bu gen ifadelerinin baskılandığı gözlemlenmiştir. ER stres yollarından PERK ve ATF4 tarafından aktive edilen CHOP'un; *C/EBPs* genlerinin transkripsiyonunu engellediği bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada farklılaşma için uyarılan hücrelerdeki ER stresin *PPARγ* ifadesini baskıladığı görülmektedir.

PPAR γ 'nın transkripsiyonu *C/EBP β* 'ya bağılı olduğundan dolayı *PPAR γ* 'daki bu baskılanma *C/EBP β* 'daki azalma sayesinde gerçekleşmiş olabilir.

SIK2 inhibitörü kullanılarak AKT ve ERK sinyal yollarının aktivasyon durumları ve farklılaşması üzerine etkisi araştırılmıştır. PREF-1'in 3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde artan ERK aktivitesine paralel olarak yüksek düzeyde ifade edilir. Farklılaşma uyarısının ardından pERK ve PREF1 hızlı bir şekilde azalarak ortadan kalkar ve geç safhada yeniden ortaya çıkar. PREF1'in anti adipojenik etkisini ERK yolağını aktive ederek gerçekleştirir [Kim *et al.*, 2007], [Wang *et al.*, 2010]. ERK yolağının aktivitesi; farklılaşma sürecinin başlatılması için gerekli fakat olgunlaşma safhası için gereksiz ve farklılaşmayı önleyicidir. Bu verilerle uyumlu olarak MDI uyguladığımız hücrelerden etki ettiğimiz ERK1/2 aktivasyon düzeylerinin PREF-1'in en düşük olduğu 2.günde ERK1/2'nin aktivasyon düzeylerinin de aynı günde düşük olduğu görülmüştür. Buna karşın SIK2 inhibitor varlığında 2.günde ERK1/2'nin yaklaşık olarak %30 civarında daha fazla gerçekleştiği görülmektedir. Bu durumda SIK2'nin farklılaşmanın erken safhasında ERK ifadesinin zamanında baskılanmasında rol aldığı bu sebeple MCE için gerekli olan ERK1/2 düzenlenmesinde fonksiyonel olduğu düşünülebilir. SIK2'nin bunu IRS-1 fosforilasyonu (794) ve devam eden kararsızlığını tetikleyerek başarabileceği veya direkt olarak ERK'i hedef alabileceği düşünülmektedir. ER stres durumunda; ERK yolağı ER stres tarafından aktifleştiği ve sürekli aktivasyonu sonucu adiposit farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir [Liang, 1996] ER stres ajanı uygulanmış hücrelerde farklılaşma süresince ERK1/2 aktivasyon seviyesi 2.günde bir düşüş yaşamış 2.günden sonra artmaya devam etmiştir. Adiposit farklılaşmasının baskılanması alt yollarında bulunan etkiler sayesinde gösterir.

SREB1-c'nin gen ifadesi transkripsiyonel düzeyde; *C/EBP β* ve γ tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca SREB1-c, *PPAR γ* ligandını aktive ederek veya doğrudan *PPAR γ* promotorune bağlanarak adipogenezde görev aldığı düşünülmektedir [Payne *et al.*, 2009]. SIK2 tarafından fosforlanarak DNA bağlanma özelliği engellenen SREB1-C dolaylı olarak kontrol ettiği yağ sentezinden sorumlu genlerde azalma meydana gelir. Bu veriler baz alınarak yaptığımız çalışmamızda gen ve protein düzeyinde benzer sonuçlar elde ettik MDI uyarısına karşı MCE süresince CC uygulanmış hücrelerde SREBP1c miktarı yaklaşık 8 kat artarken, bu artış neredeyse MDI ın 2 katı gerçekleşmiştir. Sonuç olarak Compound c varlığında gerek

SIK2'nın IRS-1 ve SREBP1-c üzerindeki negatif etkisinin ortadan kalkmasının bu sonucu doğurduğu düşünülür bunun hem IRS-1 hem de SREBP1-c düzeyinde doğrulanması gerekmektedir. Bu SREBP1-c ve IRS-1 mutant formların aşırı ifadesiyle gerçekleştirilebilir.

3T3-L1 öncül yağ hücrelerinde AKT1'in adiposit farklılaşmasının erken safhalarında rol oynadığı bilinmektedir. AKT1'den yoksun 3T3-L1 hücrelerinin adiposit farklılaşması için gerekli olan PPAR γ nın aktivasyonunu gerçekleştiremezler benzer şekilde AKT knockout Mouse embriyonik fibroblastlarda (MEF) PPAR γ 'nın transkripsiyonun baskıladığı bulunmuştur [XU *et al.*, 2004]. İnsülin bağımlı AKT1 yolağı farklılaşma üzerine iki farklı yoldan etki ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Birincisi MTORC1 in negatif düzenleyisi olan Tuberous Sclerosis Kompleksi (TSC1/2) kompleksini baskılayarak farklılaşma için majör gen olan PPAR γ düzeyini arttırdığı bulunmuştur diğeri ise adiposit farklılaşmasının negatif düzenleyicisi olan FOXO1 transkripsiyon faktörünün fosforlanması ile inhibisyonu üzerinden gerçekleştirilir. Bu veriler doğrultusunda yaptığımız çalışmada MDI ile uyarılmasını hücrelerde AKT; farklılaşmanın erken safhasında çok değişmemesine karşın p-AKT1 aktivasyonu varlığında 2.günde minimum düzeye indiği görülmektedir. SIK2 inhibitörü varlığında ise bu baskılanma daha az gerçekleşerek %50 civarında olması SIK2'nın insülin sinyal yolağında önemli bir düzenleyicisi olabileceğini düşündürmektedir bu durumu SIK2'nın IRS1'i serin 794 dizisinden fosforlayarak PI3-K-AKT yolağını etkisizleştirmesi ya da bir AKT kinazı olan TORC2 yı fosforlayarak baskılanması sonucu gerçekleştirebildiğini söyleyebiliriz. Bununla birlikte MCE açısından bakıldığında SIK2'nin AKT/PKB aktivasyonunu engelleyerek CREB veya p300 vasıtası ile CEBP β ifadesini engelleyebileceği dolayısıyla MCE'yi negatif yönde etkileyebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Sakae Saito ve arkadaşlarının yapmış çalışmada bir çalışmada ER stres durumunda glukoz yokluğunda Compuond c kanser hücrelerinde GP78 promotor aktivitesinin inhibisyonunu sağlayarak katlanmamış protein cevabını (UPR) baskıladığı gösterilmiştir. MDI+THA uygulanmış hücrelerde p-AKT1 aktivasyonu MCE süresi boyunca azaldığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

Ahmed A. A., Z. Lu., Jeming N. B., (2010), “SIK2 is a centrosome kinase required for bipolar mitotic spindle formation that provides a potential target for therapy in ovarian cancer”, *Cancer Cell*, 18 (2), 109-121.

Alonso T. M., Ericsson J., (2006), “Cdk1/Cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis”, *Cell Cycle*, 5 (15), 1708-1718.

Basseri S., Austin R. C., (2012), “Endoplasmic Reticulum Stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential”, *Biochemistry Research International*, 1-13.

Berdeaux R., (2011) “Metabolic regulation by salt inducible kinases”, *Frontiers. Biology*, 6 (3), 231-241.

Bernlohr D. A., Bolanowski M. A., Kelly T. J., Lane M. D., (1985), “Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes”, *Journal Biology Chemistry*, 260 (9), 5563–5567.

Blerina K., Ashley B., Grossman, Korbonits M., (2008), “The Role of AMP activated protein kinase in obesity”, *Obesity and Metabolism.*, 36, 198–211

Boney C. M., Smith R. M., Gruppuso P. A., (1998), “Modulation of insulin-like growth factor I mitogenic signaling in 3T3-L1 preadipocyte differentiation”, *Endocrinology*, 139, 1638-1644.

Bricambert J., Miranda J., Benhamed F., Girard J., Postic C., Dentin R., (2010), “Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice”, *Journal of Clinical Investigation*, 120 (12), 4316–4331.

Brown M. S., Goldstein J. L., (1999), “A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood”, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 96 (8), 11041-11053.

Camp H. S., Tafuri S. R., (1997), "Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase", *Journal of Biological Chemistry*, 272, 10811-10816.

Carlsson C., Tornehave D., Lindberg K., Galante P., Billestrup N., Michelsen B., Larsson L. I., Nielsen J. H., (1997), "Growth hormone and prolactin stimulate the expression of rat preadipocyte factor-1/delta-like protein in pancreatic islets: molecular cloning and expression pattern during development and growth of the endocrine pancreas", *Endocrinology*, 138, 3940-3948.

Choy L., Derynck R., (2003), "Transforming growth factor-b inhibits adipocyte differentiation by smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function", *Journal of Biological Chemistry*, 278, 9609-9619.

Christy R. J., Kaestner K. H., Geiman D. E., Lane M. D., (1991), "CCAAT/enhancer binding protein gene promoter, binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 2593-2597.

Clouthier D. E., Comerford S. A., Hammer R. E., (1997), "Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-b transgenic mice", *Journal of Clinical Investigation*, 100, 2697-2713.

Cornelius P., MacDougald O. A., Lane M. D., (1994), "Regulation of adipocyte development", *Annual Review of Nutrition*, 14, 99-129.

Cristancho A. G., Lazar A. L., (2011), "Forming Functional fat; a growing understanding of adipocyte differentiation", *Natura Reviews*, 12.

Çalışkaner O., (2013), "Endoplazmik retikulum Stresin SIK2 yolağı üzerindeki etkisi", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Dagon Y., Avraham Y., Berry E. M., (2006), "AMPK activation regulates apoptosis, adipogenesis, and lipolysis by eIF2 α in adipocytes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 43-47.

Daval M., Diot F., Bazin R., Hainault I., Viollet B., Vaulont S., Hajdouch E., Fere P., Foufelle F., (2005), "Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes", *Journal of Biological Chemistry*, 280, 25250-25257.

Dentin R., Liu Y., Koo S. H., Hedric S., Vargas T., Heredia J., Yates J., Montminy M., (2007), "Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2", *Nature*, 449, 366-370.

Edward P. A., Tabor D., Kast H. R., Venkateswaran A., (2000), "Regulation of gene expression by SREBP and SCAP", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1529, 103-113.

Erin E., Kershaw J., Flier S., (2004), "Adipose tissue as an endocrine organ", *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 89 (6), 2548-2556.

Fain, J. N., Madan A. K., Hiler M. L., Cheema P., Bahouth S. W., (2004), "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans", *Endocrinology*, 145, 2273-2282.

Farmer S. R., (2006), "Transcriptional control of adipocyte formation", *Cell Metabolism*, 4 (4), 263-273.

Fernandez J., Real M., Ricart W., (2003), "Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome", *Endocrine Review*, 24, 278-301.

Floridon C., Jensen C. H., Thorsen P., Nielsen O., Sunde L., Westergaard J. G., Thomsen S. G., Teisner B., (2000), "Fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials a study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation", *Differentiation*, 66, 49-59.

Gaidhu M. P., Fediuc S., Ceddia R. B., (2006), "5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside-induced AMP-activated protein kinase phosphorylation inhibits basal and insulin-stimulated glucose uptake, lipid synthesis and fatty acid oxidation in isolated rat adipocytes", *Journal of Biological Chemistry*, 281, 25956-25964.

Gong Y., Lee J. N., Lee P. C., Goldstein J. L., Brown M. S., Ye J., (2006), “Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake”, *Cell Metabolism*, 3, 15-24.

Gray S, Feinberg M. W., Hull S., (2002), “The kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4”, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 34322–34328.

Gray S., Frenberg M. W., Hull S., (2002), “The kruppel like factor KLF15 regulates the insulin sensitive glucose transporter GLUT4”, *Journal Biology Chemistry*, 277, 34322-34328.

Green H., Kehinde O., (1981), “An established preadipose cell line and its differentiation in culture II Factors affecting the adipose”, *Proceeding of the National Academy of Sciens*, 78, 3969-3972.

Gregoire F. N., Broux D., Hauser N., Heremans H., Van J., Lowell B. B., (1992), “Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and beta inhibit adipoconversion in cultured rodent preadipocytes receptor-gamma on the leptin promoter”, *Journal of Biological Chemistry*, 300-309.

Gual P., Marchand B. L., Tanti J. F., (2005), “Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation”, *Biochimie*, 87 (1), 99-109.

Guilherme A., Virbasius J. V., Puri V., Czech M. P., (2008), “Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes”, *Nature Reviews*, 9, 367-377.

Habinowski S. A., Witters L. A., (2001), “The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 852-856.

Halder S. K., Takemori H., Hatano O., Nonaka Y., Wada A., Okmoto M., (1998), “Cloning of membran spannigprotein with epidermal growth factor like repeat motifs from adrenal glomerulosa cells”, *Endocrinology*, 139, 3316-3328.

Hauner H., Rohrig K., Petruschke T., (1995), “Effects of epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) on

human adipocyte development and function”, *European Journal Clinical Investigation*, 25, 90-96.

Hawley S. A., Pan D. A., Mustard K. J., Ross L., Bain J., Edelman A. M., Frenguelli B. G., Hardie D. G., (2005), “Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase”, *Cell Metabolism*, 2, 9-19.

Hawley S. A., Boudeau J., Reid J. L., Mustard K. J., Udd L., Makela T. P., Alessi D. R., Hardie D. G., (2003), “Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade”, *Journal Biology*, 2, 28.

Hebip H., (2010), “SIK2’nin Adiposit Farklılaşmasındaki Rolünün İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.

Horike N., Takemori H., Katoh Y., Doi J., Min L., Asano T., Sun X. J., Yamamoto H., Kasayama S., Muraoka M., Nonaka Y., Okamoto M., (2003), “Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of saltinducible kinase-2”, *Journal of Biological of Chemistry*, 278 (20), 18440-18447.

Horton J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., (2002), “Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver”, *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1125-31.

Hu E., Kim J. B., Sarraf P., Spiegelman B. M., (1996), “Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ ”, *Science* 274, 2100-2103.

Hu E., Liang P., Spiegelman B. M., (1996), “AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity”, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10697–10703.

Jensen C. H., Krogh T. N., Hojrup P., Clausen P. P., Skjodt K., Larsson L. I., Enghild J. J., Teisner B., (1994), ”Protein structure of fetal antigen 1 (FA1) a novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2”, *European Journal of Biochemistry*, 225, 83-92.

Juge-Aubry C. E., Gorla Bajszczak A., Pernin A., Lemberger T., Wahli W., Burger A. G., Meier C. A., (1995), "Peroxisome proliferator activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid x receptor", *Journal Biology Chemistry*, 270, 18117-18122.

Kaestner K. H., Christy R. J., Lane M. D., (1990), "Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein", *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 87, 251-255.

Kajimura S, Seale P, Tomaru T., (2008), "Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex", *Genes Development*, 22, 1397–1409.

Katoh Y., Takemori H., Min L., Muraoka M., Doi J., Horike N., Okamoto M., (2004), "Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response elementbinding protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm", *European Journal Biochemistry*, 271 (21), 4307-4319.

Katoh, Y., Takemori H., Lin X. Z., Tamura M., Muraoka M., Satoh T., Tsuchiya Y., Min L., Doi J., Miyauchi A., Witters L. A., Nakamura H. Okamoto M., (2006), "Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade", *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 273, 2730–2748.

Kim K. A., (2007), "Pref-1 Activates the MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinase Patway to Inhibit Adipocyte differentiation", *Molecular Cell Biology*, 2294-2308

Kissebah A. H., Krakower G. R., (1994), "Regional adiposity and ide accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes morbidity", *Physiology Reviews.*, 74, 761-811.

Kola B., Grossman A. B., Korbonits M., (2008), "The Role of AMP Activated Protein Kinase in Obesity", *Obesity and Metabolism*, 36, 198-211.

Küser-Abalı G., Özcan F., Uğurlu A., Uysal A., Fuss S. H., Buğra-Bilge K., (2013), “SIK2 is involved in the negative modulation of insulin-dependent müller cell survival and implicated in hyperglycemia-induced cell death”, *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 54 (5), 3526-37.

Lane M. D., Lin F. T., Macdougald O. A., Cognet M., (1996), “Control of adipocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding alpha”, *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 20, 591-596.

Lee K., Villena J. A., Moon Y. S., Kim K. H., Lee S., Kang C., (2003), “Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1)”, *Journal Clinical Investigation*, 111, 453-461.

Lin F. T., Lane, M. D., (1990), “Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglycer”, *Genes Development*, 6, 533-544.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnel J., (2004), “Endoplasmic Retikulum”, *Molecular Cell Biology*, 978, 168-170.

Lytton J., Westlin M., Hanley M. R., (1991), “Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of Calcium Pumps”, *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (26), 17067-17071.

Maeda K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K.,(1996)“cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).” *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 221 (2), 286-9.

Margetic S., Gazzola C., Pegg G. G., Hill R. A., (2002), “Leptin: a review of its peripheral actions and interactions.” *International Journal Obesity and Related Metabolic Disorders*, 26, 1407-1433.

Maria T., Punga B. A., Ericsson T., (2005), “Hyberphosphorylation regulates regulates the activity of SREBP1 during mitosis”, *PNAS*, 102 (33), 11681-11686.

Moon Y. S., Smas C. M., Lee K., Villena J. A., Kim K. H., Yun E. J., Su H. S., (2002), "Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity", *Molecular. Cell Biology*, 22, 5585-5592.

Morgon D. O., (1997), "Cyclin dependent protein kinases: Engines, clocks, and microprocessors", *Annual Review Cell Development Biology*, 13, 261-91.

Naimi M., Arous C., Obberghen E., (2009), "Energetic cell sensors: a key to metabolic homeostasis", *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21 (2), 75-82.

Nigg E. A., (1995), "Cell –dependent protein kinaz; key regulators of the eukaryotic cell cycle", *Bioessays*, 17, 471-80.

Ntambi J. M., Young Cheul K., (2000), "Adipocyte Differentiation and Gene Expression", *Journal of Nutrition*, 130, 3122-3126.

Okamoto M., (2004) "Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response element bindingprotein activity both in the nucleus and in the cytoplasm", *European Journal Biochemistry*, 271, 4307-4319.

Okamoto M., Takemori H., Katoh Y., (2004), "Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis", *Trends Endocrinol Metabolism*, 15(1), 21-26.

Park B. H., Qiang L., Farmer S. R., (2004), "Phosphorylation of C/EBP β at a consensus extracellular signal-regulated kinase glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes", *Molecular Cell Biology*, 235, 234-47

Payne V.A., (2009), "C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis", *Biochemical Journal*, 425 (1), 215-23.

Prusty D., Park B. H., Davis K. H., Farmer S. R., (2002), "Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes", *Journal Biological Chemistry*, 277, 46226-46232.

Rawson R. B., Zelenski N. G., Nijhawan D., Ye J., Sakai J., Hasan M. T., Chang T. Y., Brown M. S., Goldstein J. L., (1997), "Complementation cloning of S2P, a gene

encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs”, *Molecular Cell Biology*, 1, 47-57.

Rawson S. J., Espenshade R. B., Cheng P. J., Seegmiller A. C., Goldstein J. L., Brown M. S., (1998), “Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells”, *Molecular Cell Biology*, 2, 505-14.

Ron D., Walter P., (2007), “Signal Integration In The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response”, *Nature*, 8, 519-529.

Rosen E. D., Hsu C. H., Wang X., (2002), “C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ unified pathway”, *Genes Development*, 16, 22-26.

Ruan H., Lodish H. F., (2003), “Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor”, *Cytokine Growth Factor Review*, 14, 447-455.

Schrodera M, Randal J. Kaufmanb, (2004), “ER stress and the unfolded protein response”, *Elsevier*, 569, 26,63.

Smas C. M., Chen L., Zhao M., Latasa J., Sul H. S., (1999), “Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation”, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 12632-12641.

Smas C. M., Kachinskas D., Liu C. M., Xie X., Dircks L. K., Sul H. S., (1998), “Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. sequence requirement for differentiation-dependent suppression”, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 31751-31758.

Smas C., Chen M. L., Sul H. S., (1997) “Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation”, *Molecular Cell Biology*, 17, 977-988.

Smith P. J., Wise L. S., Berkowitz R., (1988), “Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes”, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 9402–9408.

Song Y., Altarejos J., Goodarzi M. O., Inoue H., Guo X., Berdeaux R., Kim J. H., Goode J., Igata M., Paz J. C., Hogan M. F., Singh P. K., Goebel N., Vera L., Miller N., Cui J., Jones M. R., Chen Y. D., Taylor K. D., Hsueh W. A., Rotter J. I., Montminy., (2010), "CRTC3 links catecholamine signalling to energy balance", *Nature*, 468, 933-939.

Takemori H, Katoh H. Y., Nakae J., Olson E. N., Okamoto M., (2009), "Inactivation of HDAC5 by SIK1 in AICAR-treated C2C12 myoblasts", *Journal of Endocrine*, 56 (1), 121–130.

Takemori H., Halder S. K., Hatano O., Nonaka Y., Wada A., Okamoto M., (1998), "Cloning of a membrane-spanning protein with epidermal growth factor-like repeat motifs from adrenal glomerulosa cells", *Endocrinology*, 139, 3316-3328.

Takemori H., Okamoto M., (2008), "Regulation of CREB-mediated gene expression by salt inducible kinase", *Journal of steroid biochemistry*, 108, 287-291.

Tang Q. Q. ,Grnborg M., Huang H., Kim J. W., Tamara C. O., Pandey A., Lane D. M., (2005), "Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer binding protein β by MAPK and glycogen synthase kinase 3β is required for adipogenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (28), 9766-977.

Tang Q. Q., Otto T. C., Lane M. D., (2003), "CCAAT/enhancerbinding protein β is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 850–855.

Tanti J. F., Jager J., (2009), "Cellular mechanisms of insulin resistance, role of stress regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation", *Current Opinion in Pharmacology*, 9, 753-762.

Thastrup O., Cullen P. T., Probak B. K., Hanley M. R., Dawson A. P., (1990), "Thapsigargin a tumor promotor discharges intracellular Ca^{+2} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{+} -ATPase", *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 29, 8-15

Wang H., Johnson G. L., Liu X., Malbon C. C., (2010), "Repression of adipogenesis by adenylyl cyclase stimulatory G-protein alpha subunit is expressed within region", *Journal of Biology Chemistry*, 271, 22022-22029.

Wang Y., Inoue H., Ravnskjaer K., Viste K., Miller N., Liu Y., Hedrick S., Vera L., Montminy M., (2009), "Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity", *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 107 (7), 3087-3092.

Woods A., Salt I., Scott J., Hardie D. G., Carling D., (1996), "The $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro", *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 397, 347-351.

Wu J., Srinivasan S. V., Neumann J. C., (2005), "The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes", *Biochemistry*, 44, 11098 - 11105.

Xu J., Liao K., (2004), "Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation", *Journal of Biological Chemistry*, 279, 35914-35922.

Yang T., Espenshade P. J., Wright M. E., Yabe D., Gong Y., Aebersold R., Goldstein J. L., Brown M. S., (2002), "Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER", *Cell*, 110, 489-500.

Yoshida H., (2007), "ER Stress and Diseases", *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 274, 630-658.

Zhang K., Kaufman R. J., (2004), "Signaling The Unfolded Protein Response From the endoplasmic reticulum", *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 25935-25938.

Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk M. J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., Musi N., Hirshman M. F., Goodyear L. J., Moller D. E., (2001),

“Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action”, *Journal of Clinical Investigation.*, 108, 1167—1174.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Tokat'ın Zile ilçesinde doğan Fehime Şeyma Özen 2005 yılında Özel Eyüboğlu Fen Lisesi'nden mezun oldu. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2009 yılında mezun oldu. Aynı sene içerisinde GYTE, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde başladığı yüksek lisans eğitimini 2013 yılında tamamlayarak mezun oldu.