

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIK2'NİN ER STRESİNE BAĞLI MUHTEMEL ER YERLEŞİK**  
**SUBSTRATLARININ ARAŞTIRILMASI**

**BETSİ KÖSE**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2016**

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIK2'NİN ER STRESİNE BAĞLI**  
**MUHTEMEL ER YERLEŞİK**  
**SUBSTRATLARININ ARAŞTIRILMASI**

**BETSİ KÖSE**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. FERRUH ÖZCAN**

**GEBZE**  
**2016**

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**INVESTIGATION OF ER-STRESS-  
DEPENDENT POSSIBLE SIK2 SUBSTRATES  
LOCALIZED ON ENDOPLASMIC  
RETICULUM**

**BETSİ KÖSE**  
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**THESIS SUPERVISOR**  
**ASSOC. PROF. DR. FERRUH ÖZCAN**

**GEBZE**  
**2016**



## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22/06/2016 tarih ve 2016/41 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 29/06/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Betsi KÖSE'nin tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

: Prof. Dr. Işıl KURNAZ

ÜYE

: Doç. Dr. İbrahim YAMAN

### ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Endoplazmik retikulum (ER) salgı ve membran proteinlerinin sentezi için özelleşmiştir, ayrıca lipid ve kolesterol sentezi ile kalsiyum homeostazında da kritik bir rol oynamaktadır. ER'nin sentez, katlanma ve salgı gibi temel fonksiyonlarında bir aksama meydana geldiğinde ER stres tetiklenmektedir. ER homeostazisinin bozulması uyarlanabilir bir hücre cevabı olan Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)'ni tetiklemektedir. UPR 3 farklı transmembran protein olan IRE1, PERK ve ATF6 yardımıyla ER homeostazisini yeniden düzenleyebilmektedir. Normal fizyolojik durumlarda, 3 sensör protein de lümenal kısımda BiP ile bağlı bir şekilde inaktif halde bulunmaktadır. ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimi ile hidrofobik rezidülerin konsantrasyonu artmaktadır ve UPR sensörleri ile bu rezidüler arasında BiP'e bağlanmak için yarış başlamaktadır. Böylece IRE1 ve PERK oligomerizasyon yolu ile ATF6 ise golgiye taşınarak aktif hale geçmektedir. ER stresine cevap olarak PERK ve IRE1 katlanma kapasitesini arttırıp, ER şaperon ve foldazlarını upregüle etmekte ve ER ribozomuna düşük sentez yükü sağlamaktadır. Stres durumunda UPR'nin başarısız olması sonucu mitokondriyel apoptotik yolak aktive olmaktadır. Bir AMPK benzeri kinaz olan SIK2; hücrel metabolizma, kanser, nöronal hayatta kalma, inflamasyon, adipogenez ve mitozun başlaması gibi biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Son çalışmalarda; SIK2'nin ERAD (ER ilişkili protein yıkımı) ve otofajinin kontrolüyle de ilişkili olduğu, bunu p97/ VCP'nin ve henüz tespit edilememiş efektör moleküllerin aktivitelerinin upregülasyonu ile sağladığı gösterilmiştir. Bu yeni sonuçları temel alarak, ER stres altında SIK2'nin özgün veya tahmin edilebilir fonksiyonları ile bağlantılı muhtemel ER yerleşik substratların ve ER subproteomunda meydana gelen geçici değişimlerin incelenmesi için 2D SDS PAGE temelli bir tarama prosedürü başlatılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Endoplazmik Retikulum (ER), SIK2, pAMPK, UPR, ERAD, ER Stresi.

## SUMMARY

Endoplasmic Reticulum, a specialized compartment for the synthesis of secretory and membrane proteins, play critical roles in lipid and cholesterol synthesis and calcium homeostasis. ER stress is induced when its major biological functions including synthesis, folding and secretory functions are impeded. Abrogation of ER homeostatis triggers an adaptive cellular response so called unfolded protein response (UPR) through the three transmembran sensor proteins IRE-1, PERK, and ATF-6 to restore ER homeostasis. At normal physiologic conditions all three sensor proteins stay in their dormant inactive state by having BiP bound to their luminal domains. Accumulation of unfolded proteins in ER lumen increases local concentration of hydrophobic residues competing out the UPR sensors for BiP binding which in turn leads to activation of IRE1 and Protein kinase RNA-like ER kinase PERK by assuming their oligomerization states and ATF-6 by its deployment to Golgi. In response ER stress PERK and IRE1 ensures marginally low synthetic load on ER ribosome while increasing the folding capacity and accuracy by upregulating ER chaperons and foldases, respectively. The failure of the UPR system to adapt stress conditions inherently activates mitochondrial apoptotic pathway. An AMPK like kinase SIK2 is involved in the regulation of various biological processes including cellular metabolism, cancer, neuronal survival, inflammation, adipogenesis, and initiation of mitosis. In addition SIK2 has been recently implicated in the control of ER associated protein degradation ERAD and autophagy by upregulating the activitiy of VCP/p97 and an unknown effector molecule which is yet to be identified respectively. Based on these new findings we initiated a 2-D SDS-PAGE based screening procedure for unrevealing the possible ER localized substrates and probing the transient alteration in ER subproteom related to novel and the predicted functions of SIK2 under ER stress conditions.

**Key Words: Endoplasmic Reticulum (ER), SIK2, pAMPK, UPR, ERAD, ER Stress.**

# TEŞEKKÜR

Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yapmış olduğum bu tezin her aşamasında yardım ve tecrübelerini esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN başta olmak üzere,

Tezimin değerlendirilmesinde katkı sağlayan Prof. Dr. Işıl KURNAZ ve Doç. Dr. İbrahim YAMAN hocalarıma,

Gebze Teknik Üniversitesi'nin bana en büyük armağanları, her daim sevgilerini ve desteklerini hissettiğim, iyi ki hayatımdalar dediğim çok kıymetli dostlarım İlkyay Göksu POLAT, Nazlı ERCIYAS ve Mehmet Soner TÜRKÜNER başta olmak üzere, Tuncay ŞEKER, Burcu TEFON, Tuğçe KESKİNER, Zeynep ÖZCAN ve bu çalışmada emeği olan bütün OBEDIA LAB mensuplarına,

Hem bilimsel açıdan, hem de dostluklarıyla yanımda olduklarını hissettirdikleri için AXAN LAB'daki sevgili arkadaşlarım Melis SAVAŞAN SÖĞÜT, Oya ARI UYAR, Başak KANDEMİR, Merve ÜSTÜN, Eray ŞAHİN, Zeynep Tansu ATASAVUM, Nil TÜRKÖLMEZ ve Ekin SÖNMEZ'e,

Espiritüel yaklaşımıyla, teknik desteğiyle ve dostluğuyla yanımda olan Metin ÇETİN'e,

GTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Dost olmanın ne demek olduğunu bana öğreten, her anımda yanımda olup desteklerini hissettiren, hayatıma anlam katan Fulya AKÇAY, Gizem ALKURT, Arlin DONİKOĞLU, Yunus AKKOÇ ve Mert Burak ÖZTÜRK'e,

Bütün bu süreçte maddi manevi desteğini esirgemeyen çok sevgili Kevork UÇAR ve ailesine,

Yeri geldiğinde küçük kardeşim, bazen en büyük sırdaşım, bazen ise en yakın arkadaşım olan ama hepsinden önemlisi canımın parçası bir tanecik ablam Melisa KÖSE'ye,

Bugünlere gelebilmem için sonsuz sabır gösteren, her zaman bana güvenen, desteğini ve koşulsuz sevgisini yüreğinden hissettiren, hayata karşı dik durabilmeyi öğreten, en kıymetlim, annem Hermine ARZUMAN KÖSE'ye ve bana güvenip inanan bütün sevdiklerime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM	2
3. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ	5
4. KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI (UPR)	7
4.1. IRE1 Yolağı	8
4.2. PERK Yolağı	9
4.3. ATF6 Yolağı	10
5. ER İLİŞKİLİ PROTEİN YIKIMI (ERAD)	12
5.1. Substrat Seçimi	12
5.2. Dislokasyon	14
5.3. Übikitinasyon ve Degredasyon	14
6. TUZLA İNDÜKLENEBİLEN KİNAZ (SIK) AİLESİ	17
6.1. SIK2	18
6.1.1. SIK2-TORC2-CREB ve Hepatik Glukoneogenez	18
6.1.2. SIK2 VE Hepatik Lipogenez	21
6.1.3. SIK2 ve İnsülin Hassasiyeti	23
7. MATERYALLER	24
7.1. Hücre Hatları ve Plazmidler	24
7.2. Kimyasallar	24
7.3. Cihazlar ve Diğer Malzemeler	25
7.4. Kullanılan Solüsyonlar	25

8. YÖNTEMLER	27
8.1. Hücre Kültürü ve Pasajlama	27
8.2. Hücrelerin Dondurulması	27
8.3. Hücrelerin Çözülmesi	27
8.4. 293T Hücrelerinin Transfeksiyonu	28
8.5. THA uygulanması	28
8.6. SDS- PAGE Jel Elektrofrezisi ve Western Blot	28
8.7. ER (Mikrozom) İzolasyonu	28
8.8. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	29
8.9. Metanol- Kloroform Çöktürmesi	29
8.10. 2D SDS- PAGE	29
9. SONUÇLAR	31
9.1. HEK293T Hücrelerinin WT-SIK2 ve KI-SIK2 ile Transfeksiyonu, ER Stres Oluşturulması ve ER İzolasyonu	31
9.2. ER örneklerinin 2D için hazırlanması	31
9.3. Proteinlerin Fosfo-AMPK Substrat Antikoru ile Kontrolü	32
9.4. ER Proteomunun (Retikülom) 2D SDS PAGE ile analizleri	32
9.5. ER Lizatları ile Elde Edilen Jel Görüntülerinin Fosfo-AMPK Substrat Antikoru İle Kontrolü	37
9.6. 2D Jellerinin Imagemaster 2D Platinum ile analizi	38
10. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	52
EKLER	53

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b><u>Simgeler ve</u></b>	<b><u>Açıklamalar</u></b>
<b><u>Kısaltmalar</u></b>	
Ca <sup>2+</sup>	: Kalsiyum
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Mili Molar
nm	: Nanometre
v	: Hacim
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Acc1α	: Acetyl-CoA carboxylase 1α
Acr:Bis	: Akrilamid:Bisakrilamid
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenine monophosphate-activated protein kinase
AP1	: Activator protein 1
APS	: Amonyum persülfat
ATF4	: Activating transcription factor 4
ATF6	: Activation transcription factor 6
ATP	: Adenozin trifosfat
BCA	: Bicinchoninic acid
BSA	: Bovine Serum Albumin
bZIP	: Basic Leucine Zipper Domain
C/EBP	: CCAAT-enhancer-binding proteins
cAMP	: Siklik AMP
CHOP	: C/EBP homologus protein
ChREBP	: Carbohydrate-responsive-element-binding protein
CRE	: cAMP-responsive element
CREB	: CRE-binding protein

CRTC2	: CREB regulated transcription coactivator 2
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
eIF2	: Eukaryotic translation initiation factor 2
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplasmic Reticulum Associated Degredation
FBS	: Fetal Bovine Serume
G6Pase	: Glucose-6-Phosphatase
GPI	: Glikofosfatidilinositol
GRP78	: 78 kDa Glucose-regulated protein
GTP	: Guanozin trifosfat
HRP	: Horseradish Peroxidase
HSP70	: Heat shock 70 kDa protein
IRE1	: Inositol-requiring enzyme 1
IRS	: Insulin receptor substrat
KID	: Kinase-inducible domain
mRNA	: Haberci RNA
NLS	: Nuclear localization signal
PBS	: Phosphate buffered saline
Pen/Str	: Penicillin/Streptomycin
PERK	: PKRK-like ER kinase
PI3K	: Phosphoinositol 3 Kinase
PVDF	: Polivinilidin diflorür
rpm	: Revolutions per minute
S1P	: Site-1-Protease
S2P	: Site-2-Protease
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
SIK2	: Salt-inducible kinase 2
WT- SIK2	: Yabani tip SIK2
KI- SIK2	: SIK2 kinaz aktivitesi inaktif formu
SREBP	: SRE-binding proteins
TBS	: Tris buffered saline
THA	: Thapsigargin

TORC2 : Transducer of regulated CREB protein 2  
UBA : Ubiquitin-associated domain  
UPR : Unfolded Protein Response  
XBP-1 : X-box Binding Protein-1

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: ER'nin genel yapısı.	2
3.1: Olgunlaşan proteinlerin golgiye gönderilmesi ve katlanamayan peptidlerin ERAD ile sitoplazmaya taşınması.	5
3.2: ER'de sentezlenen proteinlerin normal koşullarda ve ER stres durumunda izlediği yollar.	6
4.1: ER membranında yer alan sensörlerin genel yapısı.	7
4.2: ER stres sinyal yolağı.	8
4.3: IRE1'in ER stresi sonucu UPR sinyali oluşturması.	9
4.4: UPR'nin PERK ile başlatılması.	10
4.5: ER stresi sonucu ATF6 ve CREBH'in aktive olması.	11
5.1: ER lümeninde yeni sentezlenen proteinlerin kaderi.	13
5.2: Memeli ER'sinde N-glikan işlenmesi.	13
5.3: SIK2'nin p97/ VCP aracılı ERAD regülasyonu ve çalışmada belirlenmesi hedeflenen muhtemel diğer membran bağlı substratları ile birlikte dolaylı olarak etkilenebilecek lümen proteinleri.	15
6.1: SIK ailesi.	17
6.2: CREB a), CBP/p300 b) ve TORC2'nin c) işlevsel altbirimleri ve fosforilasyon dizileri.	19
6.3: SIK2'nin CREB bağımlı gen transkripsiyonu.	20
6.4: Açlık ve besin alımına bağlı olarak SIK2 aktivitesinin düzenlenerek glukoneogenezin kontrol edilmesi.	21
6.5: Artan glukoz seviyesine bağlı olarak lipogenezin SIK proteinleri aracılığıyla düzenlenmesi.	22
6.6: SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.	23
9.1: HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	31
9.2: Artan glukoz seviyesine bağlı olarak lipogenezin SIK proteinleri aracılığıyla düzenlenmesi.	31
9.3: SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.	32

9.4:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	33
9.5:	Artan glukoz seviyesine bağlı olarak lipogenezin SIK proteinleri aracılığıyla düzenlenmesi.	33
9.6:	SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.	34
9.7:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	34
9.8:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	35
9.9:	Artan glukoz seviyesine bağlı olarak lipogenezin SIK proteinleri aracılığıyla düzenlenmesi.	35
9.10:	SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.	36
9.11:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	36
9.12:	SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.	37
9.13:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	37
9.14:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	38
9.15:	Artan glukoz seviyesine bağlı olarak lipogenezin SIK proteinleri aracılığıyla düzenlenmesi.	39
9.16:	SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.	40
9.17:	HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.	41
10.1:	WT- SIK2 Tha (-)/ WT- SIK2 Tha (+), KI- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (+), WT- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (-), WT- SIK2 Tha (+)/ KI- SIK2 Tha (+) olacak şekilde kıyaslanan jellerin birbiriyle eşleşen ve eşleşmeyen spotlarının gösterilmesi.	44

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
9.1: WT- SIK2 Tha (-) ve WT- SIK2 Tha (+) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.	39
9.2: KI- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.	40
9.3: WT- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (-) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.	41
9.4 WT- SIK2 Tha (+) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.	42

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

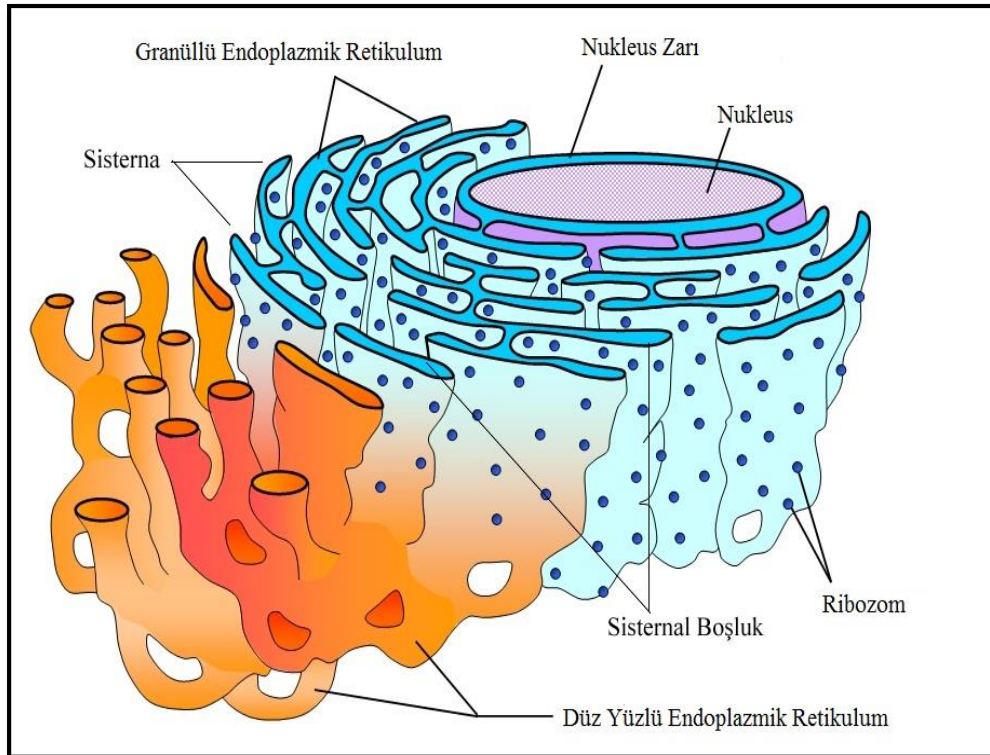
ER stresi birçok metabolik, nörolojik hastalıkla ve kanser ile ilişkili olmakla beraber özellikle adipoz dokuda yer alan yağ hücrelerini, pankreasın insülin salgılayan beta hücrelerini ve de yüksek miktarda yağ ve glikoz sentezi yapan karaciğer hücrelerini hedef almaktadır. ER stresi ve eşlik eden metainflamasyon insülin direnci ve tip2 diyabetin altında yatan en önemli faktörler olarak global ölçekte yoğun araştırmalara neden olmaktadır. Bu çalışmada amacımız akut ER stresi koşullarında SIK2'nin p97/ VCP dışında ER yerleşik muhtemel farklı substratları ile birlikte ER protein içeriği (retikulum) üzerinde ki etkilerini 2D SDS-PAGE yöntemi ile belirlemesi oluşturmaktadır. Bu çalışmalar sonucu elde edilecek muhtemel substratlar ve efektör moleküllerin karaciğer hücrelerinde yağ ve glikoz sentezleri üzerindeki rollerinin araştırılması ise bir sonraki hedef olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucu elde edilecek bilgilerin obezite, tip2 diyabet, ateroskleroz gibi ER stresi ile ilişkili hastalıkların tedavisine yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine neden olabilecek moleküler hedeflerin dışında bu süreçlere ilişkin moleküler düzeyde mekanistik bilgilerimizi de ileriye taşıyacağı düşünülmektedir.

## 2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM

“Endoplazmik Retikulum (ER)” terimi ilk olarak Porter ve arkadaşları tarafından nukleus çevresinde birbirine bağlı bir ağ oluşturan membran vesiküllerini tanımlamak için kullanılmıştır [1].

Ökaryotik hücreler için çok büyük bir öneme sahip olan ER, hücre hacminin neredeyse yarısını kaplamaktadır. Genel olarak; sisterna adı verilen kese benzeri bir ağ yapısından oluşmaktadır ve büyük ölçüde hücre iskeleti boyunca yayılmaktadır [2]. Ortasında bir lümen oluşturacak şekilde kapalı (sisternal boşluk), fosfolipid membran yapısı bulunmaktadır ve bu membran kesintisiz bir şekilde devam etmekte ve nukleus zarına bağlanmaktadır (Şekil 2.1).

ER yapısal ve işlevsel olarak kompleks bir organeldir. Hücrede  $Ca^{2+}$  depolanması ve kontrollü salınımı; proteinlerin sentezi, katlanması, post translasyonel modifikasyonları ve taşınması; lipid ve steroidlerin biyosentezi gibi birçok önemli olayda rol oynamaktadır [3].



Şekil 2.1: ER'nin genel yapısı.

Yapısal olarak sınıflandırıldığında ER; granüllü ER ve düz yüzlü ER olarak 2 alt sınıfa ayrılmaktadır. Granüllü ER ribozomlarca zenginken, düz yüzlü ER’de çok az miktarda ribozom bulunmaktadır [4].

Granüllü ER’den daha kompleks olan düz yüzlü ER daha çok steroid sentezinin fazla olduğu hücrelerde bulunurken, granüllü ER daha çok yüksek miktarda protein sentezleyen hücrelerde bulunmaktadır. Kas hücrelerinde bir düz yüzlü ER türü olan sarkoplazmik retikulum oldukça fazla miktarda bulunmaktadır ve kas kasılması esnasında kontrollü kalsiyum salınımından sorumludur [5].

Dış membranında protein üreten ribozomlar bulunduran granüllü ER, hücrede genelde nukleus ve golgi aygıtının çevresinde bulunmaktadır. Granüllü ER salgı yolunda bulunan proteinler ve membran proteinleri de dahil olmak üzere birçok proteinin birleştirilmesi ve translasyonunda görev almaktadır [6].

Yeni oluşan polipeptitlerde sinyal dizileri bulunmaktadır ve bu diziler N-terminallerinde bulunan sinyal tanıma partikülleri (SRP) tarafından tespit edilmektedir. Bu sinyal dizilerinin SRP yardımıyla tanınması, ribozomların granüllü ER’ye bağlanmasını ve yeni oluşan polipeptitin granüllü ER lümenine translokasyonunu sağlamaktadır. Sinyal dizisi granüllü ER lümeninde peptidazlar tarafından kesilmektedir, böylelikle protein sentezinin temel zorlukları olan yeni oluşan proteinlerin katlanması ve düzgün bir şekilde birleştirilmesinin başlaması gerçekleşmektedir [7].

Granüllü ER özellikle salgı yolundaki proteinler ve membran proteinlerinin dahil olduğu ökaryotik proteomunun 1/3’ünün sentezlenmesinden sorumludur ve bu nedenle salgı yoluna giriş kapısı olarak görülebilmektedir. ER lümenine ait oksidatif ortam, şaperonlar ve katlanma katalizörleri yeni oluşan polipeptitlerin doğru katlanması ve doğal yapılarında birleştirilmesi için küme şeklinde ve uyumlu bir şekilde çalışmaktadır [8].

Protein sentezinin hataya yatkın doğası sebebiyle ER, protein olgunlaşması süresince meydana gelebilecek hasar ve karışıklıkları gidermek için bazı mekanizmalar geliştirmiştir. ER yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimini önlemek için kendi protein kalite kontrol mekanizmasını (ERQC) kullanmaktadır. ER katlama kapasitesi aşıldığında ER lümenindeki anormal protein birikimi ER stresini tetikler ve UPR adı verilen sinyal yolları uyarılır, stresin ortadan kaldırılıp kaldırılamamasına bağlı olarak hücre uyum ve ölüm arasında bir karar vermek zorunda kalır. Hücre adapte olabilmek için, UPR vasıtasıyla bir takım

adaptif önlemleri hayata geçirir, bunlar arasında protein sentezinin seçici duraksatılması, ER hacminin arttırılması, ERAD ve şaperon sentezinin arttırılması verilebilir. Fakat adaptasyon ER kapasitesinin üzerinde ise ve ER mevcut stresi azaltamıyor ve homeostazisi sağlayamıyorsa, durum kronik bir hal alır ve otofaji gerçekleşir. Eğer ER homeostazı hala sağlanamıyorsa hücreler ER stres bağımlı apoptotik hücre ölümü yolunu seçer [9].

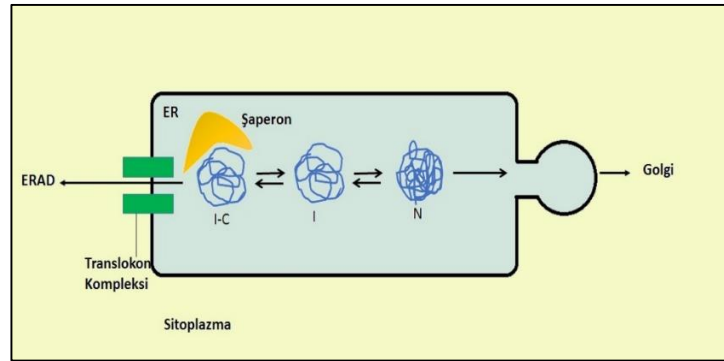
Obezite gibi kronik ER strese yol açan patolojik durumlarda özellikle adipositlerde ve hepatositlerde apoptozdan nasıl kaçtıkları halen bilinmemektedir. Bununla birlikte kronik ER stresin bu hücrelerde insülin duyarsızlığı ve inflamasyona neden olarak, metabolik prosesleri aksattığı bilinmektedir. Bu kapsamda kronik ve akut ER stresin ve bunları düzenleyen mekanizmaların daha iyi bilinmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bir stres kinazı olan SIK2'nin ER stresi ve inflamasyonla ilgili düzenleyici rolleri daha önce gösterildiğinden bu çalışmada ER'deki bilinmeyen muhtemel substratlar hedef alınmıştır. AMPK benzeri kinaz altgurubuna ait bir stres kinazı olan SIK2'nin ER stresi ve inflamasyonla ilgili olarak sırası ile VCP/p97 translokaz aktivitesini artırarak ve CRT3 aracılı anti enflmatuar genlerin transkripsiyonunu baskılayarak başardığını biliyoruz. Bununla birlikte daha önce Gepasi 3.0 programı kullanılarak ER membran proteinleri özelinde yaptığımız anti fosfo SIK2 özgün motif tarama çalışmaları VCP/p97 ve SREBP1c dışında ER yerleşik bir çok SIK2 substratının varlığını işaret etmiştir [10]. Bu tez çalışmasında ER stres varlığında SIK2 nin ER membranında var olabilecek muhtemel substratlarının belirlenmesinin yanı sıra bu tür bir etkileşimin ER proteomu üzerindeki muhtemel etkilerini de kantitatif olarak analiz etmemize olanak sağlayan 2-D SDS-PAGE bazlı proteomik yaklaşımı ile öğrenilmesi hedeflenmiştir.

### 3. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik retikulum polipeptitlerin katlanması ve olgunlaşması için uygun bir ortam sağlamaktadır. ER’de meydana gelen post-translasyonel modifikasyonların başında sinyalle ilgili peptitlerin kesimi, N-glikozilasyon ve disülfid bağlarının oluşumu gelmektedir. ER’de bulunan ve katlanmaya yardımcı olan şaperonlar, metal iyonları, lektinler aracılığıyla gerçekleştirilen kovalent modifikasyonlar yardımıyla polipeptitlerin doğru bir şekilde katlanması ve olgunlaşması sağlanmaktadır [11, 12].

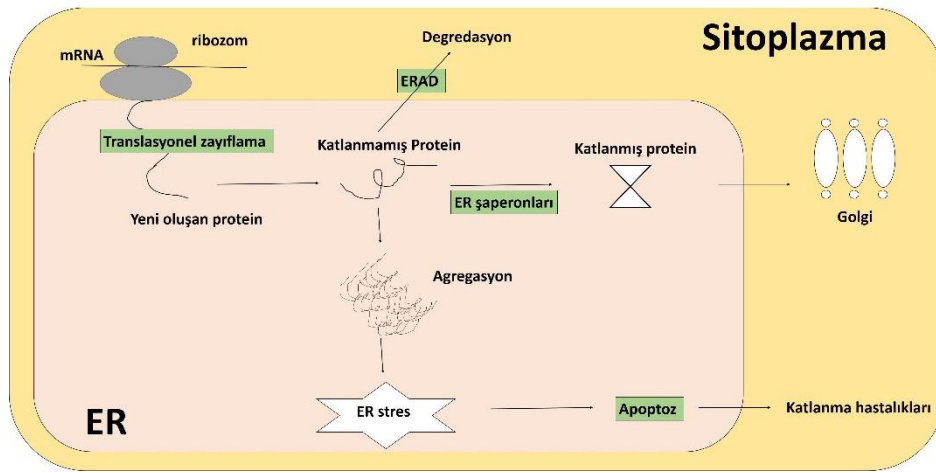
Granüllü ER’de bulunan ribozomlarda gerçekleşen translasyondan sonra, sentezlenen proteinler katlanmamış polipeptitler olarak ER lümenine girerler. ER lümenine doğru gerçekleşen bu akış hücrenin çevresel, fizyolojik ve farklılaşma koşullarına göre değişiklik göstermektedir [13]. Aynı zamanda ER, lümeni içerisindeki iyon dengesi, sentez yükü gibi fizyolojik ve biyokimyasal seviyede meydana gelen değişimlere de oldukça hassastır. Kalsiyum dengesi ve redoks durumundaki değişiklikler, artan protein sentez yükü, glukoz yetersizliği, glikozilasyonun bozulması ve aşırı kolesterol yükü gibi bir takım hücresel stres koşulları protein katlanmasında aksaklıklara ve sonucunda katlanmamış veya hatalı katlanan proteinlerin ER lümeni içerisinde birikmesine neden olabilmektedir [12, 14].

ER’de doğru katlanmış proteinler hedeflerine ulaştırılmak için golgiye gönderilirken, yanlış katlanmış ve katlanmamış proteinler ERAD adı verilen bir mekanizma ile proteozomlar tarafından degrade edilmek için sitoplazmaya taşınmaktadır [14] (Şekil 3.1) [11].



Şekil 3.1: Olgunlaşan proteinlerin golgiye gönderilmesi ve katlanamayan peptidlerin ERAD ile sitoplazmaya taşınması (I: katlanmamış protein, N: Olgun protein, I-C: Katlanmamış protein-şaperon kompleksi).

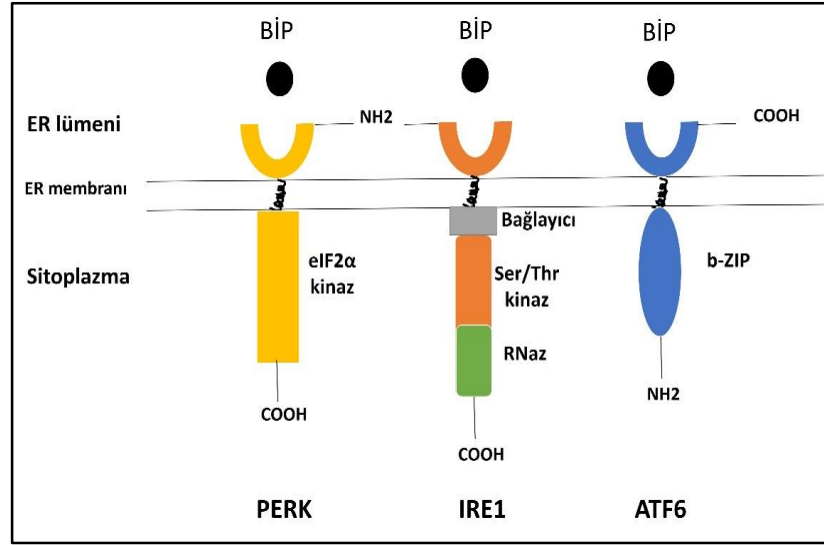
Hücre içerisinde sentezlenen protein miktarı, endoplazmik retikulumun protein katlama ve ERAD'ın taşıma kapasitesini aştığında katlanmamış proteinler, içerdikleri hidrofobik aminoasitler nedeniyle ER lümeni içerisinde kümelenerek birikirler. Bunun sonucunda oldukça toksik olan bu protein kümeleri ER stresine neden olur. ER stresine cevaben, ökaryotik hücrelerde UPR adı verilen sinyal yolları aktive olmakta ve bu hücrel stres kontrol altında tutulmaya çalışılmaktadır. Kısaca protein sentez yükü ve ER protein katlama kapasitesi arasındaki dengenin bozulması ER stresine neden olmakta ve buna cevaben hücre içerisinde UPR devreye girmektedir (Şekil 3.2) [15].



Şekil 3.2: ER'de sentezlenen proteinlerin normal koşullarda ve ER stres durumunda izlediği yollar.

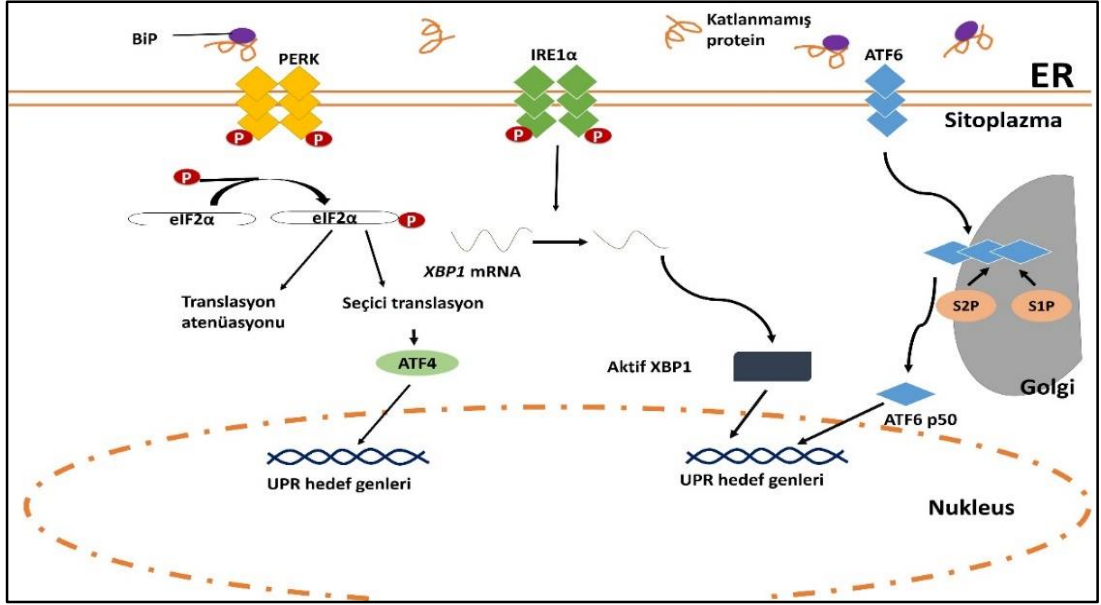
## 4. KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI (UPR)

ER stres sonucunda 3 farklı yolak aktifleşmektedir. Bunlar PERK, IRE1 ve ATF6 dır ve her biri farklı sensörler olmalarına rağmen, aktivasyonları BiP (binding immunoglobulin protein) adı verilen bir protein tarafından sağlanmaktadır (Şekil 4.1) [14].



Şekil 4.1: ER membranında yer alan sensörlerin genel yapısı.

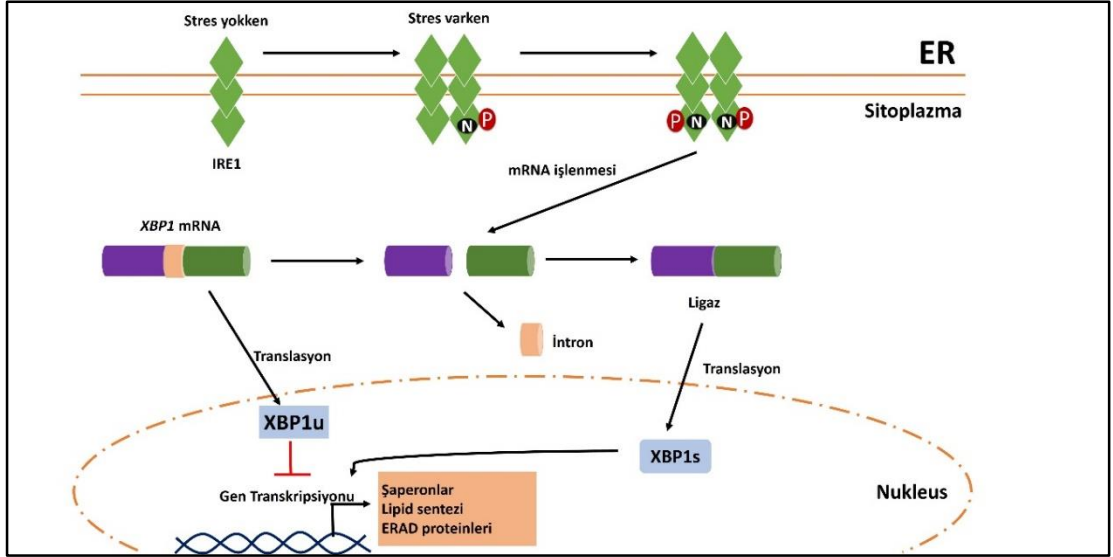
Yapılan çalışmalarla, bir ER şaperonu olan BiP (GRP78)'in UPR yolları için çok önemli bir düzenleyici olduğu bulunmuştur. Amino ucunda bir ATPaz domeinine, karboksil ucunda ise substrat bağlanma domeinine sahip olan BiP yeni sentezlenen proteinlere geçici olarak bağlanırken, glikozilasyon basamağındaki veya katlanmamış proteinlere daha kalıcı bir şekilde bağlanabilmektedir. BiP, zincirde bulunan hidrofobik bölgelerden katlanmamış proteinlere C-ucundaki substrat bağlanma domeini sayesinde bağlanmakta ve N-ucundaki ATPaz domeini sayesinde proteinde yapısal değişim meydana getirerek katlanmasını sağlamaktadır. ER stresi olmayan durumlarda BiP, UPR sensörlerinin ER lümenine bakan domeinlerine de bağlanmaktadır. Lümen içerisinde katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu BiP, IRE1, PERK ve ATF6 proteinlerinden ayrılarak aktive olmalarına izin vermekte ve ilgili stres düzenleyici yolların devreye girmesini sağlamaktadır [15, 16] (Şekil 4.2) [14].



Şekil 4.2: ER stres sinyal yolağı.

#### 4.1. IRE1 Yolağı

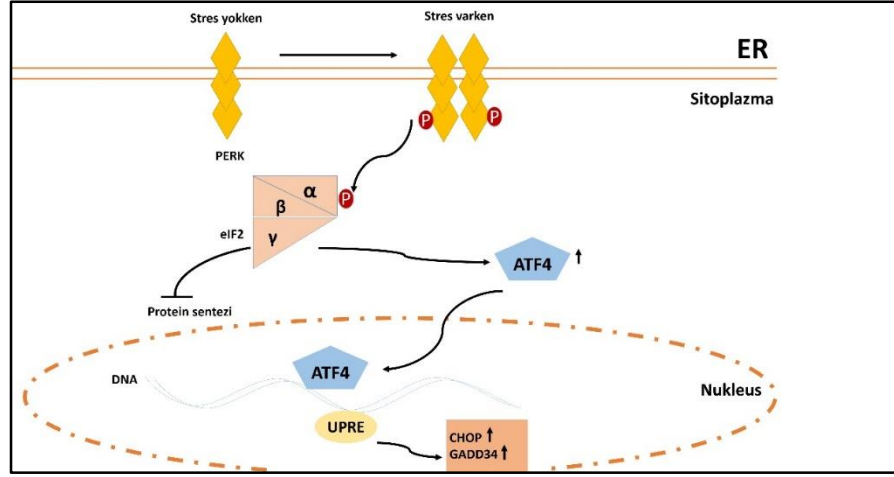
IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1) ökaryotlarda oldukça fazla korunmuş olarak bulunmaktadır. ER lümenine bakan N-ucunda ER stres-sensör domeini, transmembran alt birimi ve sitozole bakan C-ucunda ise bir Serin/Treonin kinaz ile endoribonükleaz domeinleri bulundurmaktadır. ER stres durumunda, IRE1'in N-ucundaki BiP'in ayrılması ile IRE1 proteinleri homodimer oluşturur ve dimerleşen bu proteinler trans-otofosforilasyon ile aktive olmaktadır [11, 14]. Aktive olan IRE1 sitoplazmadaki endoribonükleaz domeini ile X-box bağlanma proteini 1 (XBP-1) adı verilen bir transkripsiyon faktörünün mRNA'sını kırparak yaklaşık 26 nükleotidlik bir intron parçasını çıkarmaktadır. Bu kırılma sonucu üretilen XBP-1 ise katlanmada görev alan ER şaperonlarının ve ERAD ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırarak ER stresini engelleyici bir rol oynamaktadır [12, 17] (Şekil 4.3) [13].



Şekil 4.3: IRE1'in ER stresi sonucu UPR sinyali oluşturması.

## 4.2. PERK Yolağı

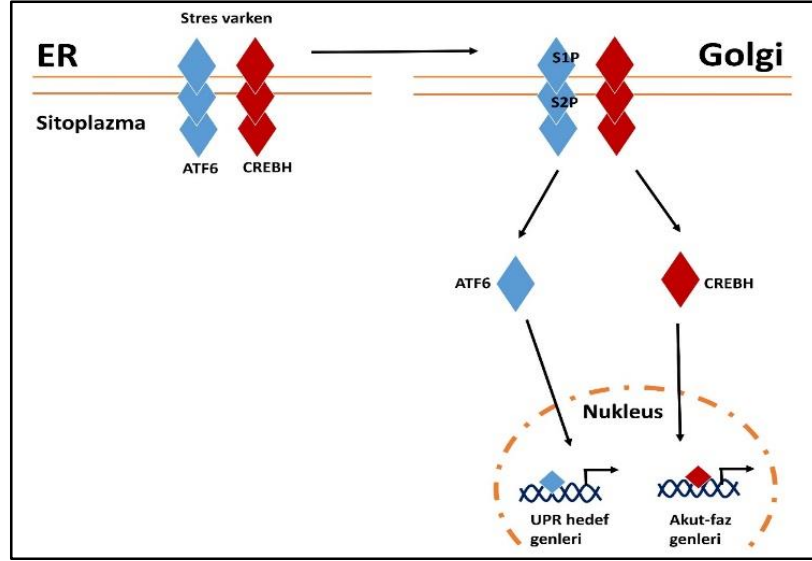
ER lümeninde katlanmamış protein miktarının artması ile BiP, PERK'ten ayrılır, bunun sonucunda dimerizasyon ve otofosforilasyon gerçekleşir. PERK yolağının diğer yollardan en büyük farkı translasyon seviyesinde bir cevap oluşturuyor oluşudur. Aktive olan PERK, kinaz domeni ile ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eIF2)'nin  $\alpha$ -alt birimini Ser51 bakiyesinden fosforlar ve böylece inaktif olmasına sebep olur [13]. Bu durum protein anlatımı için önemli olan eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> kompleksinin oluşmasını engeller, protein sentezinde bir azalma meydana gelir ve ER'nin iş yükünde bir hafifleme oluşur [14, 15]. Başka bir tarftan, eIF2 fosforlanması sonucu bir transkripsiyon faktörü olan ATF4'ün anlatımını gerçekleştirmektedir. ATF4 CHOP'un transkripsiyonunda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. CHOP (C/EBP homolog proteini) ise bir diğer transkripsiyon faktörüdür ve stres altındaki hücreyi apoptoza yönlendirmektedir [13]-[15] (Şekil 4.4) [17].



Şekil 4.4: UPR'nin PERK ile başlatılması.

### 4.3. ATF6 Yolağı

ATF6 diğer sensörlerden farklı bir aktivasyon mekanizmasına sahiptir fakat ER zarındaki SREBP protein ailesi ile aynı aktivasyon mekanizmasını paylaşmaktadır [12, 17]. ER stresi sonucu BiP'in ayrılması ATF6'nın ER'den golgiye taşınmasını sağlamaktadır. ATF6 (90 kDa) golgi aygıtında iki farklı kesime uğramaktadır. İlk olarak lümeneye bakan yüzeyde S1P (bölge-1 proteaz) ile sonra ise golgi zarı içerisinde (intra-membran) S2P aracılığıyla kesilmektedir. Bu iki proteolitik işlem sonrasında ATF6'nın amino ucunda bulunan bZIP domeni açığa çıkmakta ve 50 kDa olarak sitoplazmaya salınmaktadır. Sitoplazma sonrasında nukleusa göç eden ATF6 UPR hedef genlerinin anlatımını sağlamaktadır [13, 14, 19] (Şekil 4.5) [11].



Şekil 4.5: ER stresi sonucu ATF6 ve CREBH'in aktive olması.

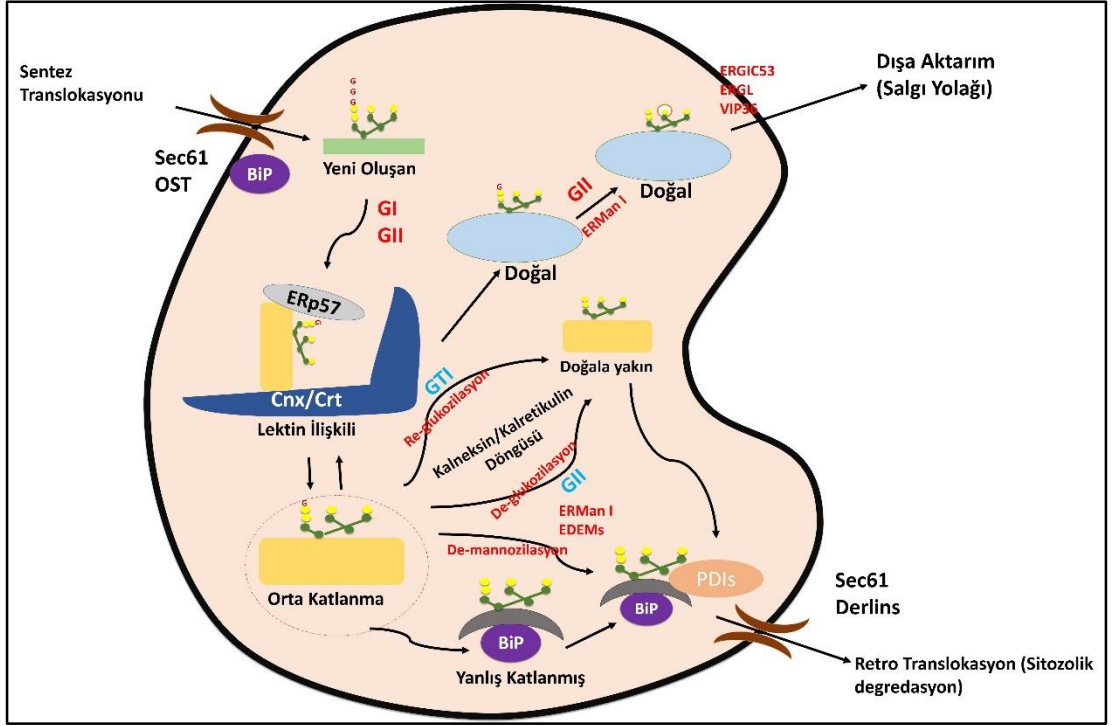
Ayrıca bir diğer ATF6 izoformu olan CREBH (ATF6 $\beta$ , 110 kDa) aynı proteolitik mekanizmayla aktive olmaktadır. Nukleusa göç eden CREBH ise homodimer veya ATF6 ile heterodimerler oluşturarak inflamasyonla ilgili genlerin transkripsiyonunda etkili olmaktadır. [13, 18].

## 5. ER İLİŞKİLİ PROTEİN YIKIMI (ERAD)

ERAD, ER lümeni, çift katmanlı lipid ve sitoplazma üzerinde gerçekleşen vektörel bir süreçtir ve hücrenin kontrollü bir şekilde denetlenmesini sağlamaktadır. Genel olarak yanlış katlanmış proteinlerin seçimini ve ortadan kaldırılmasını sağlar. ERAD hakkındaki bilgilerin çoğu maya kökenli çalışmalardan temel almaktadır [20]. ERAD birbirine bağlı 4 farklı basamaktan oluşmaktadır; substrat seçimi, dislokasyon, poliübikütinasyon ve 26S proteozomlar ile yıkım [21].

### 5.1. Substrat Seçimi

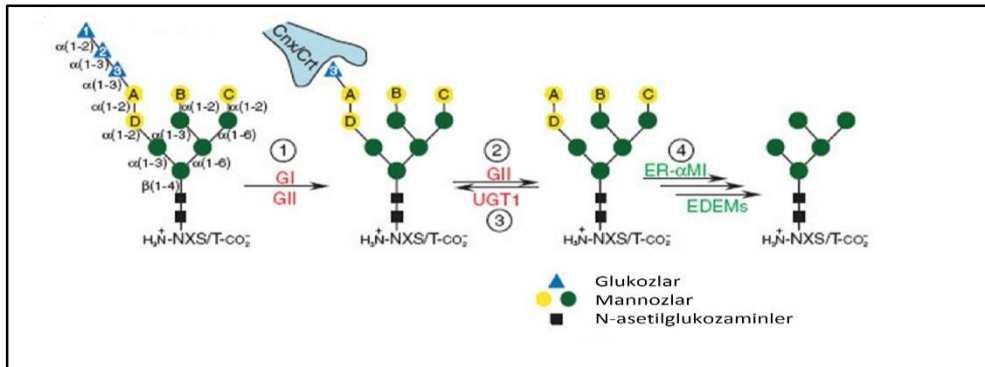
Mutasyonlar nedeniyle doğal yapısına ulaşamamış, translasyon esnasında yanlış birleştirilmiş ve verimsiz katlanmış proteinler potansiyel ERAD substratlarıdır. Yeni oluşan proteinler ER'ye girdikten sonra kotranslasyonel olarak N-glikanlar ile birleşmektedir ( $\text{Glc3Man9GlcNAc2}$ ) [22]. N-glikanlar protein katlanması sensörü olarak fonksiyon gösterirler ve sürecin olgunlaşmasını kontrol etmektedirler. Yeni oluşan polipeptitlerin eklenmesinden sonra, yüksek mannozlu çekirdek glikan GlukozidazI (GI) ve GlukozidazII (GII) ile sıralı deglikozilasyona uğramaktadır. Bu durum yeni oluşan polipeptit ile katlanma yardımcıları Calnexin (CNX) ve Calreticulin (CRT)'nin birleşmesine olanak sağlar. Eğer katlanma düzgün gerçekleşirse GII ile yapılan son deglikozilasyon CNX ve CRT'nin proteinden ayrılmasını ve olgun proteinin ER'den çıkmasını sağlamaktadır. Eğer protein doğal yapısına ulaşamazsa UGGT (UDP-glucose: glycoprotein glucosyl transferase) tarafından tekrar glikozilasyon gerçekleşmektedir ve tekrar CNX/CRT döngüsüne girmektedir [22]. Sonraki döngüler ile yanlış katlanan proteinler kurtarılabilir. Proteinin CNX/CRT döngüsüne girmesi GII ve UGGT tarafından glikozun eklenmesi ve çıkarılması sayesinde gerçekleşmektedir [24] (Şekil 5.1) [22].



Şekil 5.1: ER lümeninde yeni sentezlenen proteinlerin kaderi.

Ancak bazı proteinler katlanma döngüsünden sonra da anormal yapılarını korumaktadır. Bu proteinler tamamen yanlış katlanmış olarak kabul edilmektedir ve ERAD adı verilen işlem doğrultusunda retro translokasyon ile ER'den sitoplazmaya gönderilmektedir [25, 26].

Tamamen yanlış katlanmış olan proteinler henüz tam olarak anlaşılmiş değildir, terminal mannozun uzaklaştırılması bir ERAD sinyali olarak kabul edilmektedir [27]. ERManI [28], EDEM1 [29], EDEM3 [30] ve Man1C1 [31] terminal mannozların düzenlenmesinden sorumlu mannozidazlardır (Şekil 5.2) [24].



Şekil 5.2: Memeli ER'sinde N-glikan işlenmesi.

## 5.2. Dislokasyon

ERAD dislokasyon işlemi normal protein dislokasyonu ile farklılık göstermektedir. Normal protein dislokasyonu esnasında substrat bir sinyal sekansı içermektedir, ERAD'da ise hidrofobiklik ve glikan durumu gibi farklı özellikler ile tanıma gerçekleşebilir. Ek olarak, normal durumda transloke olacak substratlar katlanmamış durumda olmalı iken, ERAD'da katlanmanın herhangi bir basamağında olabilirler, buna sıkıca katlanmış olanlar da dahildir [32, 33].

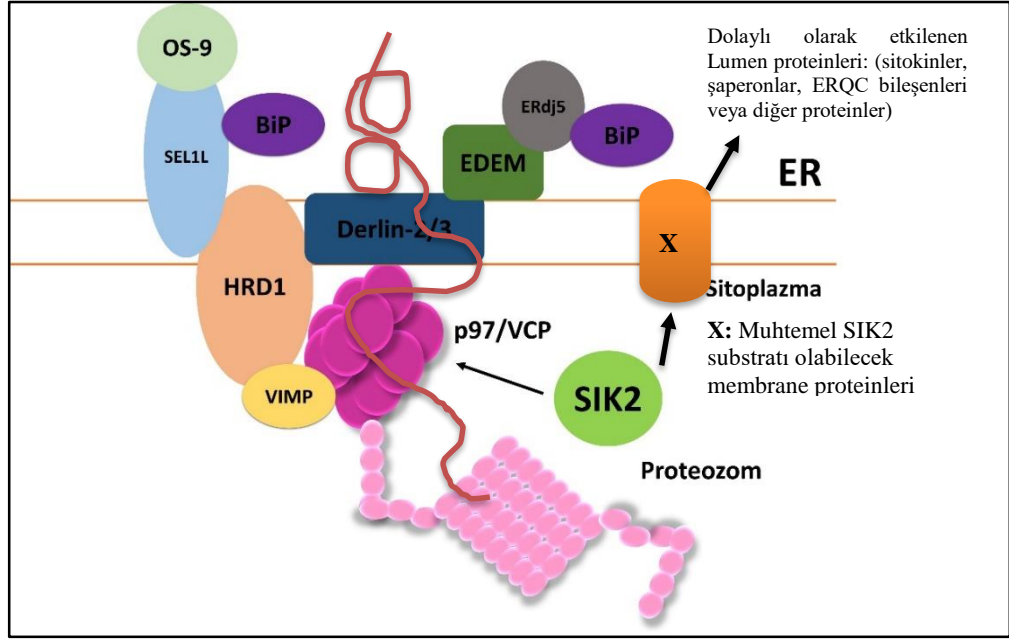
Birçok ER substratı oldukça hidrofobiktir, OS9 ve XTP3-B gibi lektinler ile ilişkide olmak stabilize olmalarını sağlamaktadır. Sulu ortamda yığılarak çöken bu hidrofobik substratlar sebebi ile ERAD basamakları bir zincir gibi birbirlerine sıkıca bağlıdır. Substratların seçimi adaptörlerin çeşitliliği vasıtasıyla dislokasyonla birleşmiştir. Adaptörler yıkıma gönderilecek olan substratların seçilimi için özelleşmiştir. SEL1L, Erlin, İnsigs ve F-box proteinleri temel adaptörler olarak sayılmaktadır [20].

Adaptörler tanıma faktörleri ve dislokun bileşenleri arasında iskele görevi görmektedir. SEL1L ağırlıklı olarak çözülebilir glikoproteinleri seçer ve onları dislokunun yapısal bir bileşeni olan Hrd1 (ERAD-associated E3 ubiquitin ligase)'e bağlar [34]. SEL1L Derlin1-2, AVP1, UBXD8, VIMP, Herp'i içeren bir kompleks çekirdeklendirir ve bu kompleks bir ATPaz olan, ATP bağımlı VCP/p97 translokazına yardımcı olur [35] (Şekil 5.3). Erlinler membran içi substratlar için seçerken, insigler ise istemci özgüdür ve F-box proteinleri ise yüksek mannoz N-bağlı oligosakkaritler için özelleşmiştir. ERdj5, ERAD için gerekli bir disülfid redüktazdır, EDEM ve BiP ile etkileşim kurar ve lümendeki yanlış katlanmış proteinlerin yanlış disülfid bağlarını kırarak ve agregasyonlarını engelleyerek, dislokasyonunu teşvik etmektedir.

## 5.3. Übikütinasyon ve Degradasyon

ERAD, ER lümeni, çift katmanlı lipid ve sitoplazma üzerinde gerçekleşen vektörel bir süreçtir. Anormal proteinlerin verimli bir şekilde temizlenmesi için bütün ERAD basamakları birbirine sıkıca bağlıdır. Örneğin; HRD1/SEL1L kompleksi ER membranında oluşmaktadır, iskele görevi görmektedir ve lümenal kısımdaki tanıma faktörleri ile sitoplazmik kısımdaki degradasyon elemanları ile

bağlantılıdır. N-glikanları tarafından tanınan yanlış katlanmış proteinler SEL1L'ye yönlendirilmektedir. Daha sonra ise ER'den sitoplazmaya VCP/p97 (AAA+ ATPase) yardımı ile retransloke olmaktadır. Sonuç olarak ise E3 ligaz HRD1 tarafından poliübikütine olup, 26S proteozom tarafından degrade olmaktadır.



Şekil 5.3: SIK2'nin p97/ VCP aracılı ERAD regülasyonu ve çalışmada belirlenmesi hedeflenen muhtemel diğer membran bağlı substratları ile birlikte dolaylı olarak etkilenebilecek lümen proteinleri.

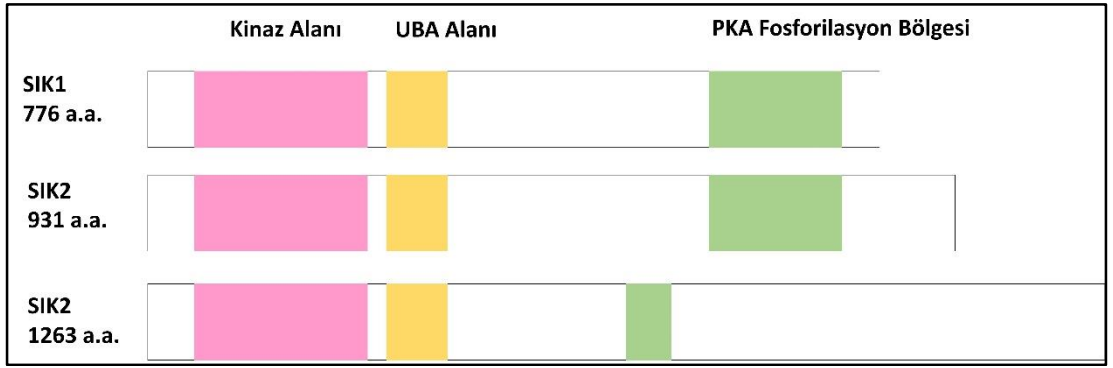
Proteosomal degradasyon 3 önemli yapı içermektedir. İlk olarak E1 (ubiquitin activating enzyme) ATP hidrolizini sağlar ve übikütin molekülünü adenile eder. Adenile edilmiş übikütin ikinci yapı olan E2 (ubiquitin conjugating enzyme)'ye transfer olur. Son olarak ise üçüncü yapı olan E3 (ubiquitin ligase) degradasyona gidecek proteinleri seçer ve adenile übikütinin E3'den hedef proteine transferini indükler. Übikütin E3 ligaz ERAD'da önemli bir rol oynamaktadır. Übikütin konjuge enzimlere (E2) yardımcı olur, bu enzimler ile degrade olacak protein arasında köprü görevi görür. ERAD'da rol alan temel übikütin ligazlar Hrd1 ve gp78'dir. Memeli ERAD sisteminin bu iki E3'ün birbiri ile etkileşimi yardımıyla, potansiyel substratlarla uyum sağlıyor olabileceği düşünülmektedir [36, 37].

SIK2 birçok hücrede cAMP duyarlı elemente bağlanan protein aracılı gen ifadesinin önemli bir düzenleyicisidir ve p97/VCP (valosin içeren protein) ATPaz ile etkileşimde olan tek AMPK (AMP ile aktive olan protein kinaz) olarak

bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda proteozomal fonksiyonlar tehlikeye girdiğinde SIK2'nin otofajiyi düzenlediği gösterilmiştir. SIK2 ve p97/ VCP arasındaki fiziksel ve fonksiyonel etkileşimler ERAD düzenlenmesinin de temelini oluşturmaktadır. SIK2 p97/VCP ile ER membranında kolokalize halde bulunmakta ve doğrudan fosforilasyon ile ATPaz aktivitesini uyarmaktadır. Yabani tip rekombinant SIK2'nin ekspresyonu bozulmayı hızlandırıp, ERAD substratlarının uzaklaştırılmasını sağlarken aynı etki kinaz inaktif formunda görülmemektedir. Ayrıca gösterilmiştir ki; endojen SIK2'nin down regülasyonu veya p97/ VCP zerinde SIK2'nin hedef bölgesine yapılan mutasyonlar, ERAD substratlarının bozulmuş yıkımına ve ER homeostazının bozulmasına neden olmaktadır [38].

## 6. TUZLA İNDÜKLENEBİLEN KİNAZ (SIK) AİLESİ

AMPK protein ailesinin üyesi olan SIK, bir Serin/Treonin kinazdır [39, 40]. İlk olarak, SIK1 olarak adlandırılan bu proteinin daha sonra SIK2 ve SIK3 şeklinde iki farklı izoformunun daha olduğu bulunmuştur [41] (Şekil 6.1) [40]. Memelilerde SIK1 mRNA seviyesi testislerde, adrenal bezlerde, beyinde ve iskelet kasında daha yüksek olmasına rağmen yağ (adipoz), karaciğer ve kalp dokularında ise düşüktür. SIK2 seviyesi ise adipoz ve karaciğer gibi metabolik dokularda daha yüksektir. SIK3'ün bütün dokularda diğer izoformlarıyla birlikte mevcut olduğu tespit edilmiştir [41, 42].



Şekil 6.1: SIK ailesi.

SIK proteinleri fazlaca korunmuş bir kinaz alanı içermektedir ve bu kısım N-ucunda bulunmaktadır. Bu alanın hemen yanında UBA (ubikülin bağlanan) alanı bulunmaktadır [41]. Bütün SIK izoformlarında C-ucunda ise PKA (protein kinaz A) fosforilasyon bölgesi mevcuttur ve proteinlerin aktivasyonları bu bölgeden kontrol edilmektedir. Bu bölgelerin NLS (nukleus yerleşim sinyali) olarak işlev gördüğü düşünülmekte ve PKA ile fosforlanması sonucu SIK'nin nukleustan sitoplazmaya göç ettiği ve fonksiyonunun baskılandığı bilinmektedir [43, 44]. Kinaz aktivitesi üzerinde etkisi olan bir diğer fosforilasyon bölgesi ise kinaz alanı içinde bulunmaktadır. Bu fosforilasyonlar öncesi SIK'nin kinaz alanı katalitik olarak inaktif halde iken, diğer AMPK ailesi proteinlerindeki gibi LKB1 (tümör baskılayıcı kinaz 1) ilgili bakiyeyi fosforlamakta ve konformasyonel değişimler ile aktive olmasına neden olmaktadır [39, 45].

## 6.1. SIK2

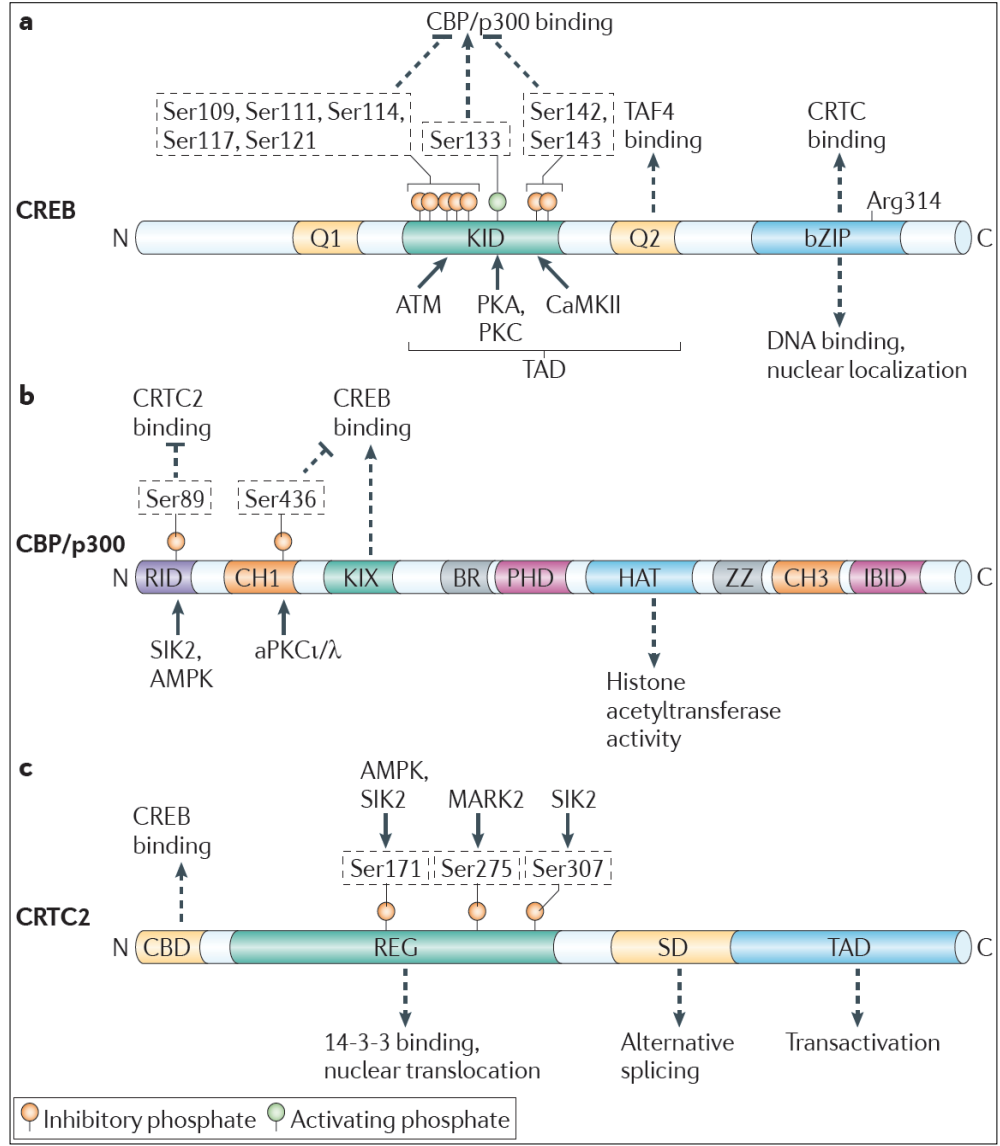
SIK ailesinin bir üyesi olan SIK2 izoformunun karaciğer ve adipoz dokuda anlatımının daha fazla olduğu görülmüştür [42, 47]. SIK2; bu dokularda meydana gelen sentez, salgılama, depolama gibi birçok önemli işlevi gerçekleştirmenin yanı sıra glukoneogenez ve lipogenez gibi metabolik olaylarda da rol almaktadır. Adipositlerde lipogenez ve insülin hassasiyeti gibi olaylarda görev alan SIK2, hepatositlerde ise lipogenez ve glukoneogenez üzerinde etkilidir [42, 47, 48].

SIK2 hepatositlerde önemli moleküllerin aktivasyon- inaktivasyonunu sağlayarak lipogenez ve glukoneogenezin baskılanmasını sağlamaktadır. Glukoneogenez TORC2 üzerinden, lipogenez ise ChREBP ve SREBP-1c üzerinden düzenlenmektedir [41, 49, 50].

### 6.1.1. SIK2-TORC2-CREB ve Hepatik Glukoneogenez

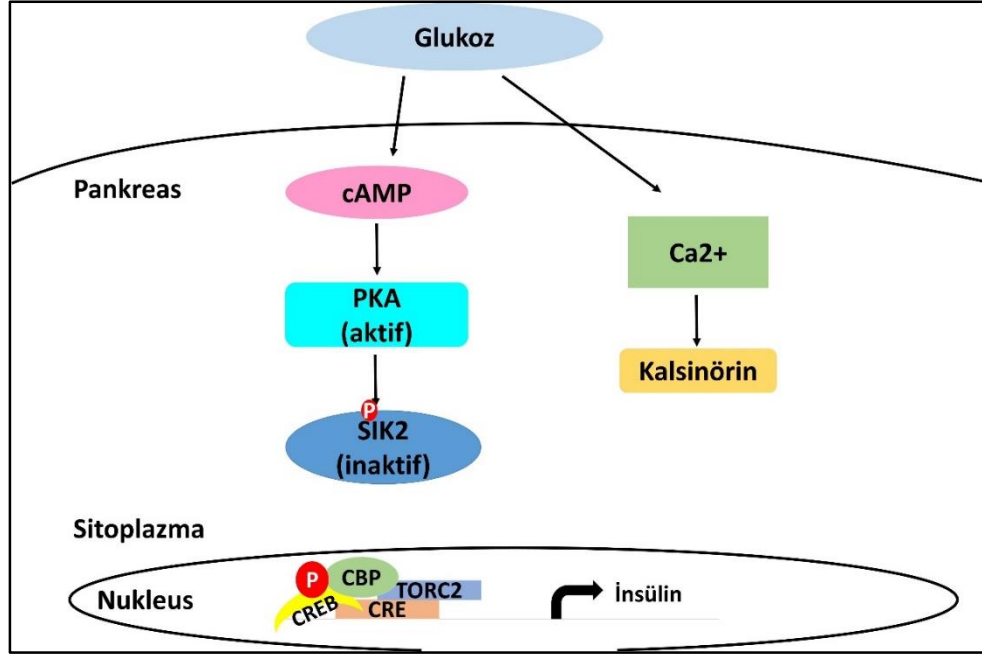
Glukoneogenez, özellikle karaciğerde gerçekleşen ve gliserol, piruvat, laktat ve bazı aminoasitler gibi karbonhidrat olmayan karbonlu moleküllerden glukoz üretimini sağlayan bir süreçtir. Kan şekerinin düzenlenmesinde glikoliz ile birlikte rol alan glukoneogenez, tokluk, besin alımı, hiperglisemi gibi sebeplerden azalırken, açlık, fazla enerji harcanması, hipoglisemi gibi nedenlerden de artmaktadır [50, 51]. Normal durumda glukoz seviyesini dengede tutan bu süreç, obezite ve diyabet gibi durumlarda insülin direncine, hiperglisemiye ve lipogenezde artışa sebep olmaktadır [50, 52].

SIK2-CRTC2 (TORC2)- CREB yolu, glukoneogenezin düzenlenmesinde çok büyük öneme sahiptir. CREB (cAMP- duyarlı elemente bağlanan protein); önemli birçok fizyolojik olayda rol oynayan ve CRE (cAMP- duyarlı element) adındaki özel DNA dizilerine bağlanan önemli bir transkripsiyon faktörüdür, fosforilasyon ile kontrol edilen bir aktivasyon mekanizmasına sahiptir [28, 48] (Şekil 6.2) [50].



Şekil 6.2: CREB a), CBP/p300 b) ve TORC2'nin c) işlevsel altbirimleri ve fosforilasyon dizileri.

Hücre içindeki ilgili hormonların hücre zarındaki G protein bağlı reseptörlere bağlanması sonucu hücre içinde adenil siklaz aktive olmakta ve cAMP üretimini sağlamaktadır. cAMP PKA'nın düzenleyici alt birimine bağlanmakta bu sayede de katalik domeinler nukleusa göç etmektedir. PKA aktive olduktan sonra ise CREB'i Ser133 bakiyesinden fosforlamakta ve bu sayede hedef genlerin transkripsiyonu artmaktadır [52].



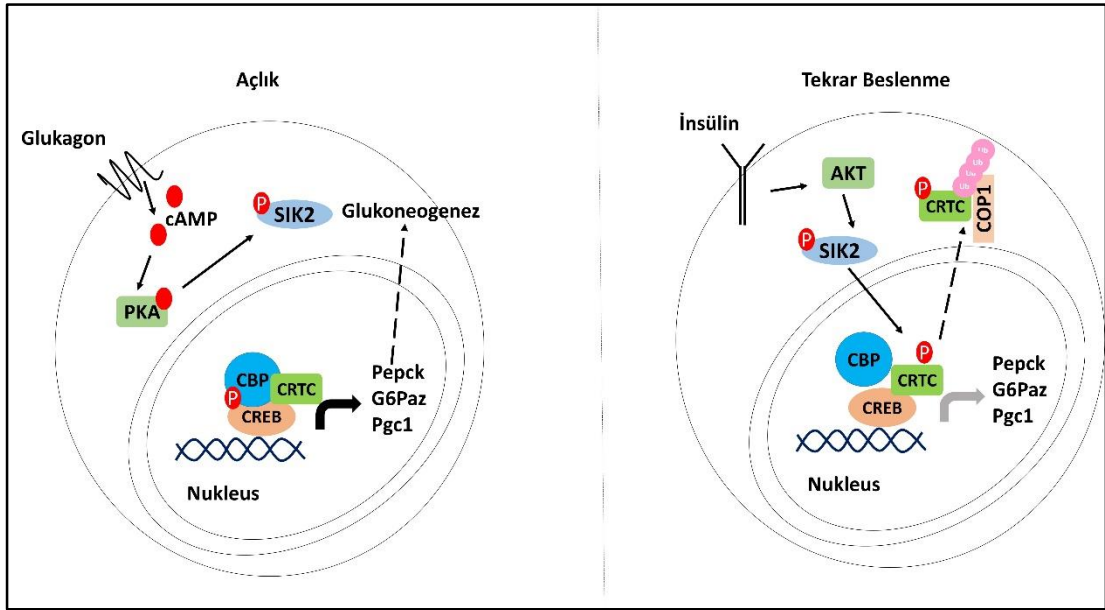
Şekil 6.3: SIK2'nin CREB bağımlı gen transkripsiyonu.

CREB fosforilasyonu ile artan hedef genlerin transkripsiyonunun kayda değer olmadığı ve CRTC yardımcı transkripsiyonel aktivatörü ile asıl artışın meydana geldiği tespit edilmiştir [42, 50, 51]. CRTC ailesinin üç üyesi bulunmaktadır fakat hepatik glukoneogenezde miktarı artan izoform TORC2'dir [47, 52]. TORC2 promotör üzerinde bulunan fosforlanmış CREB'e bağlanmakta ve REG (düzenleyici domein) sayesinde aktivasyonu kontrol etmektedir [38, 42]. TORC2 CREB üzerinde bZIP domeinine bağlanmaktadır ve bu durum CRE üzerindeki CREB'in DNA'ya bağlanma afinitesini olumlu olarak etkilemektedir [47, 51].

Açlık halinde kana salınan glukagon, hepatosit yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak cAMP sentezlenmesine ve artışına neden olmaktadır (Şekil 6.3) [40]. Artan cAMP, PKA'yı aktive etmektedir ve bir yandan CREB'i fosforile ederken diğer taraftan SIK2'yi fosforlamaktadır. SIK2'nin fosforilasyonu CRTC2 fosforilasyonunu önlemekte ve TORC2 nuklusa geçerek CREB'e bağlanmaktadır. Sonuç olarak bu transkripsiyon kompleksi Pepck (Pck1), G6Pase ve Pgc-1 gibi glukoneogenezde öneme sahip enzimlerin anlatımını arttırmaktadır [50, 53] (Şekil 6.4) [40].

Tokluk durumunda ise SIK2 aktive olmaktadır, fakat bu aktivasyon Akt tarafından yapılmamaktadır. SIK2 TORC2'yi Ser171 bakiyesinden fosforlamakta ve 14-3-3

proteinleri ile demirlemektedir [52, 53]. Ayrıca SIK2'nin TORC2'yi fosforlaması sonucu, sitoplazmada COP1, E3 ubiquitin ligaz tarafından yıkılmaktadır [54, 55].



Şekil 6.4: Açlık ve besin alımına bağlı olarak SIK2 aktivitesinin düzenlenerek glukoneogenezin kontrol edilmesi.

CREB fosforilasyon sonrasında, CBP ile bir histon asetiltransferaz olan p300 kompleksi ve TAF4 (TBP- bağımlı faktör 4) proteininin etkileşimini etkilemekte ve aktivitesi daha da artmaktadır [56, 57]. Açlık halinde aktive olan p-CREB, CBP/ p300 kompleksinin promotöründeki histonları asetillemekte ve DNA'nın gevşeyerek anlatımının kolaylaşmasını sağlamaktadır, ayrıca CRTC2'yi asetilleyerek ubiquitinasyonu engellemektedir. İnsülin sinyaline cevaben aktif olan SIK2 ise CRTC2'yi asetilleyerek degradasyondan koruyan CBP/ p300 kompleksini fosforlayarak inhibe etmektedir [48, 49, 55]. Sonuç olarak ya SIK2 ya da diğer etkenler, transkripsiyon kompleksinin üyelerini inhibe ederek glukoneogenik genlerin anlatımını engellemektedir.

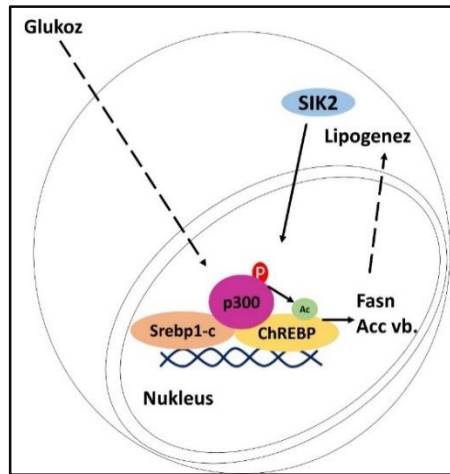
### 6.1.2. SIK2 VE Hepatik Lipogenez

Lipogenez, beslenme sırasında alınan glukozun fazlasını depolamak amacıyla glikozdan yağ asidi sentezi ve esterifikasyonu ile triaçilgliserol oluşturulmasıdır [40, 58]. İnsülin ve glukagon glukoz alımı ve üretimi arasındaki dengenin yanı sıra lipid

depolanması ve yıkılması arasındaki dengeyi de düzenlemektedir. Besin alımını ile artan insülin, hem karaciğerde hem de adipoz dokuda SREBP (SRE'ye bağlanan protein) protein ailesi tarafından gerçekleştirilen lipogenik gen ifadesi ile lipogenezde artışa neden olmaktadır [58].

SREBP ailesi SREBP-1 ve SREBP-2 şeklinde iki izoformdan oluşmaktadır. Hücrede sterol miktarı azaldığında, insülin vb. sinyaller ER zarında inaktif olarak bulunan SREBP'in golgiye gönderilmesini ve proteazlar ile kesilerek, transkripsiyon domeininin serbest kalmasını sağlamaktadır [58, 59]. Serbest kalan SREBP sitoplazmaya geçmekte ve oradan nukleusa göç etmektedir, nukleusta Fasn, Acc gibi lipogenik genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır [59, 60, 61] (Şekil 6.5) [40]. SREBP2 genellikle streol sentezinde görevli genlerin anlatımını sağlamaktadır, SREBP-1a ve SREBP-1c ise lipogenik genlerin transkripsiyonunda rol almaktadır. Hepatik lipogenezde ise SREBP-1c'nin rol oynadığı bilinmektedir [60, 61].

SIK2 adipositlerde lipogenezi indirgemektedir [46] bunun yanı sıra, SIK ailesi proteinlerinin de hepatositlerde SREBP-1c'yi fosforlayarak lipogenezi azalttığı gösterilmiştir [62]. Ayrıca bir transkripsiyonel koaktivatör olan ChREBP (Karbonhidrat-duyarlı elementlere bağlanan protein) de SREBP-1c'ye paralel bir şekilde görev yapmakta ve hepatic lipogenezde önemli rol oynamaktadır[48, 63]. Bir histon asetiltransferaz olan p300, ChREBP'nin transkripsiyonel aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve SIK2 tarafından fosforlanarak lipogenezin azalmasını sağlamaktadır [40, 48].

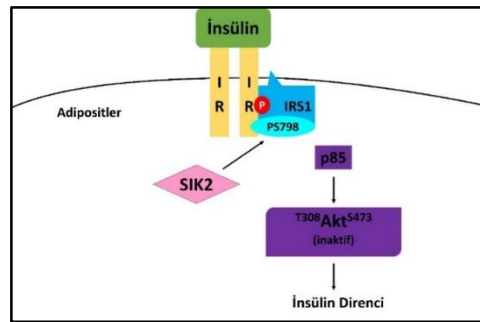


Şekil 6.5: Artan glukoz seviyesine bağlı olarak lipogenezin SIK proteinleri aracılığıyla düzenlenmesi.

### 6.1.3. SIK2 ve İnsülin Hassasiyeti

İnsülin hormonu tokluk, hiperglisemi gibi durumlarda pankreatik  $\beta$ - hücrelerinden kana salınan metabolik bir düzenleyicidir. Kanda glukoz seviyesi yükseldiğinde, insülin glukozun hücre içine alınması ve enerji üretimi, lipid ve glikojen olarak depolanma yollarıyla kandaki seviyenin düşürülmesini sağlamaktadır. İnsülin lipogenezi arttırmakta ve hepatik glukoneogenezi durdurmaktadır. Obezite ile ortaya çıkan tip 2 diyabette glukoz ve yağ sentezinin devam ettiği insülin direnci ortaya çıkmaktadır. İnsüline yanıt verebilen karaciğer adipoz kas ve hatta nöronlarda seçici insülin direncine neden olan mekanizma henüz aydınlatılmamış olmakla birlikte obez ve diyabetli bireylerin bu doku larında mevcut ER stresin bu seçicilikte rol aldığı düşünülmektedir [62, 63, 64].

İnsülinin kandaki konsantrasyonu arttığında, hücre yüzeyindeki insülin reseptörlerine (IR) bağlanmaktadır. IR, bir tirozin kinaz reseptörüdür ve insülin bağlanması ile otofosforile olarak aktive olmaktadır. Aktivasyon sonrası IR hücre içindeki adaptör molekül olan IRS (insülin reseptör substrat) proteinlerini fosforlar ve IRS1, PI3K gibi hücre içi sinyalinde görevli proteinlere bağlanır. PI3K ise Akt (PKB) aktivasyonu ile metabolik yolları kontrol etmektedir [65, 66, 67]. Yapılan çalışmalar SIK2 tarafından aktive olan CRTC2'nin, diaçilgliserol (DAG) sentezinde rol alan LIPIN1 transkripsiyonunu arttırarak, hepatositlerde insülin hassasiyetini azalttığını tespit etmiştir [68]. Ayrıca adipositlerde SIK2'nin direk olarak IRS1'i fosforlayarak (insanda Ser794, farede Ser789) inhibe ettiği ve insülin sinyalindeki bozukluklara (PI3K, Akt) paralel olarak lipogenezi azalttığı gösterilmiştir [40, 41] (Şekil 6.6) [42].



Şekil 6.6: SIK ve insülin hassasiyeti arasındaki moleküler mekanizma.

## 7. MATERYALLER

### 7.1. Hücre Hatları ve Plazmidler

Hek 293T hücre hattı abm'den temin edilmiştir. pcDNA4-HIS-SIK2<sup>WT</sup> ve pcDNA4-HIS-SIK2<sup>KI</sup> plazmidleri Boğaziçi Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

### 7.2. Kimyasallar

Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Lonza, BE12-604F), Fetal Bovine Serum (BIOWEST, S181G-500), 10X Tripsin- EDTA (Pan Bio, P10-024100), Penisilin-Streptomisin (P/S) (Pan Bio, P06-07100), 10X PBS (LONZA, BE17-517Q), Thapsigargin (Santa Cruz, sc-24017A), Yağsız süt tozu (AppliChem, A0830), Genopure Plasmid Midi Kit (Roche, 03143414001), 20X LumiGLO ECL (Cell Signaling, 7003), DMSO (Sigma-Aldrich, D5879), SIK2 Antikoru (Cell Signaling, 6919), Calnexin Antikoru (Cell Signaling, 2679), BiP Antikoru (Cell Signaling, 3177), Fosfo-AMPK Substrat" Motif Antikoru (Cell Signaling, 5759),  $\beta$ -Aktin Antikoru (Santa Cruz, sc-47778), Turbofect Transfeksiyon Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, R0531), HEPES (AppliChem, A1069), 660 nm Protein Assay Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, 22660), EGTA (AppliChem, A0878), Sükroz (Duchefa Biochemie, S0809), Üre (Merck Millipore, 108487), Tioüre (Merck Millipore, 107979), Chaps (Thermo Fisher Scientific, 28300), Amfolit Solüsyonu (Sigma- Aldrich, 10043), DTT (AppliChem, A1101), İyot Asetamid (Sigma-Aldrich, I1149), Metanol (Sigma- Aldrich, 34885), Kloroform (Merck Millipore, 102444), Likrosolv Su (Merck Millipore, 115333), Overlay Agaroz (Bio-Rad, 1632111), ReadyStrip IPG Strips (Bio-Rad, 1632002), APS (AppliChem, A1142), Temed (AppliChem, A1148), Akrilamid Solüsyonu (% 30) (AppliChem, A4983), Sypro Ruby (Thermo Fisher Scientific, S12000), PVDF Membran (0,45 $\mu$ M) (Merck Millipore, IPVH00010), Anti- Rabbit İkincil Antikor (Cell Signaling, 7074), Anti-Mouse İkincil Antikor (Cell Signaling, 7076).

### 7.3. Cihazlar ve Diğer Malzemeler

CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Binder), Laminar Akım Kabini (Clean Air), Su Banyosu (Memmert), Plate Okuyucu (Thermo, Varioskan Flash), Işık Mikroskobu (Nikon TMS), Dikey Elektroforez ve Transfer Sistemi (BioRad Mini Protean), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, 22R), Santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-22), Ultrasantrifüj (Beckman Coulter, Optima MAX- XP), Potter- Elvehjem PTFE tokmak ve cam tüp (Sigma- Aldrich, P7734), Hassas Terazi (Precisa), 15 ml ve 50 ml Santrifüj Tüpleri (CAPP), 1,5 ml ve 2 ml Santrifüj Tüpleri (Axygen), 0,2 µm ve 0,45 µm Şırınga ucu Filtre (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), Mikro Pipetörler (Thermo ve Gilson), Filtreli ve Filtresiz Mikropipetör Uçları (CAPP), Serolojik Pipetler (CAPP), Çalkalayıcı (IKA, Yellow line), Isıtıcı Blok (VWR), Manyetik Karıştırıcı (Heidolph), İzoelektrik Fokaslama Cihazı (Bio-Rad, Protean IEF Cell).

### 7.4. Kullanılan Solüsyonlar

10X SDS- Yürütme Tamponu: 30,3 g Tris baz, 144,1 g Glisin ve 10 g SDS 1L distile su içerisinde çözülmüştür. Kullanılacağı zaman ise 1X olacak şekilde seyreltilmiştir.

10X Transfer Tamponu: 30,3 g Tris baz ve 144,1 g Glisin 1L distile su içerisinde çözülmüştür. Kullanılacağı zaman ise %10 10X Transfer Tamponu, %20 Metanol ve %70 distile su olacak şekilde 1X haline getirilmiştir.

1X PBS: 10X PBS steril distile su ile 1:10 oranında seyreltilmiştir.

1X Tripsin- EDTA: 10X Tripsin- EDTA steril distile su ile 1:10 oranında seyreltilmiştir.

10X TBS: 24,2 g Tris baz ve 88 g NaCl 1L distile su içerisinde çözülmüştür.

1X TBS-T: 10X TBS distile su ile 1:10 oranında seyreltilmiştir ve içerisine %0,1 olacak şekilde Tween 20 eklenmiştir.

4X SDS Yükleme Boyası: 0,2 M Tris-HCl (pH 6,8), %8 SDS, %40 Gliserol, %4 β-merkaptöetanol, 50 mM EDTA ve %0,08 Bromofenol mavisi (BPB) su içerisinde iyice çözülmüştür ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

LB Broth: 5 g Tripton, 2,5 g Yeast Ekstraktı ve 5 g NaCl 1L su içerisinde çözülmüştür ve otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

%5 Membran Bloklama Solüsyonu (Süt): Yağsız süt tozu %5 olacak şekilde tartılmıştır ve 1X TBS-T içerisinde çözülmüştür.

1 mM Thapsigargin (THA): 1 mg THA, 1,54 ml DMSO içerisinde çözülmüştür ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Hücre Dondurma Besiyeri: %5 DMSO, %10 FBS ve %85 DMEM'den oluşan besiyeri 4°C'de muhafaza edilmiştir.

ER İzolasyon Solüsyonu: 10 mM HEPES (pH: 7.8), 250 mM Sükroz, 25 mM Potasyum Klorür, 1 mM EGTA ve proteaz /fosfataz inhibitörleri distile su içerisinde çözülmüştür.

2D Lizis Solüsyonu: 7 M Üre, 2 M Tioüre, %4 CHAPS, 50 mM DTT ve proteaz /fosfataz inhibitörleri likrosolv su içerisinde çözülmüştür.

Ekilibrasyon Solüsyonları: 50 mM 1,5 M Tris- HCl (pH 8,8), 6 M Üre, %20 Gliserol ve %2 SDS likrosolv su içerisinde çözülmüştür ve -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kullanmadan önce birinci solüsyona 0,02g/ml olacak şekilde DTT, ikinci solüsyona ise 0,025g/ml olacak şekilde İyot Asetamid eklenmiştir.

Fiksasyon Solüsyonu: %50 Metanol, %7 Asetik Asid ve %43 Likrosolv su olacak şekilde hazırlanmıştır.

Yıkama Solüsyonu: %5 Metanol, %7 Asetik Asid ve %88 Likrosolv su olacak şekilde hazırlanmıştır.

## 8. YÖNTEMLER

### 8.1. Hücre Kültürü ve Pasajlama

HEK293T hücreleri %10 FBS, %1 P/S ve 4.5 g/l glukoz (yüksek- glukoz) içeren DMEM'de büyütülmüştür. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren ve 37°C olan bir inkübatörde muhafaza edilmiştir. DMEM 4°C'de saklanmış ve kullanmadan önce 37°C olan steril su banyosunda ısıtılmıştır. HEK293T hücreleri %90 yoğunluğa ulaşmadan pasajlanmıştır. Petrideki besiyeri vakum yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra önceden ısıtılmış 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücreleri yüzeyden uzaklaştırabilmek için 1X Tripsin uygulaması yapılmış ve petri kabı 2-3 dk 37 °C'de inkübe edilmiştir. Tripsini inaktive edebilmek için 2 katı kadar besiyeri petriye eklenmiş ve karışım pipet yardımı ile santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 500 g 3 dk santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılmış, hücre pelleti taze besiyeri içinde çözülmüş ve seyreltilmiş olarak yeni petrilere ekim yapılmıştır.

### 8.2. Hücrelerin Dondurulması

Tripsin muamelesi sonucu kaldırılıp, besiyeri yardımı ile nötralize edilen hücreler hemositometre yardımıyla sayılmıştır ve 500 g 3 dk santrifüj yapılmıştır. Pellet hücre dondurma besiyeri içinde çözülmüştür ve dondurma tüpüne aktarılmıştır. Bu tüp 2 saat -20°C'de muhafaza edildikten sonra -80°C'ye transfer edilmiştir. Ertesi gün stoklar sıvı azot tankına aktarılmıştır.

### 8.3. Hücrelerin Çözülmesi

1 adet dondurma tüpü sıvı azot veya -80°C'den alınmıştır ve hızlıca 37°C'deki su banyosunda çözülmüştür. Çözülen hücreler, içinde taze besiyeri bulunan santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 500 g 3 dk santrifüj yapılmıştır, pellet ise besiyerinde çözülmüş ve bir petriye aktarılmıştır.

## 8.4. 293T Hücresinin Transfeksiyonu

Transfeksiyon 150 mm petrilerde Turbofect transfeksiyon solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Plazmid ve transfeksiyon solüsyonu miktarları üreticinin protokolüne göre düzenlenmiştir. Hücreler transfeksiyondan bir gün önce, transfeksiyon gününde %70-80 yoğunlukta olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin besiyeri transfeksiyondan 7-8 saat sonra antibiyotikli büyütme besiyeri ile değiştirilmiştir. Transfeksiyon süresi 36 saat olarak ayarlanmıştır.

## 8.5. THA uygulanması

Transfeksiyonu yapılmış olan hücrelere ertesi gün (yaklaşık 30 saat sonra) son konsantrasyonu 1  $\mu$ M olacak şekilde THA veya DMSO uygulaması yapılmıştır. Hücreler 6 saat sonra bir sonraki basamak için toplanmıştır.

## 8.6. SDS- PAGE Jel Elektrofrez ve Western Blot

%10 alt jel (29:1, akrilamid:bis-akrilamid oranı) donduktan sonra, üst jel %5 olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler 4X SDS yükleme boyası yardımıyla hazırlanıp, 95°C'de 5 dk ısıtılmıştır ve kuyulara yükleme yapılmıştır. Jel proteinler alt jele geçene kadar 80V'da, daha sonra ise 120 V'da yürütülmüştür. Yürütme BPB alt jelden çıkana kadar devam etmiştir ve daha sonra proteinler PVDF membrana 100V'da 2 saat süreyle soğuk odada transfer edilmiştir. Transferden sonra %5 membran bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı yardımıyla inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra membran TBS-T ile 3 defa yıkanmış ve 4°C'de gece boyunca primer antikor ile çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Ertesi gün TBS-T ile 3 defa yıkama yapıldıktan sonra HRP- bağlı ikincil antikor ile oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemden sonra membranlar 3 kere TBS-T ile yıkanmış ve ECL yardımı ile görüntülenmiştir.

## 8.7. ER (Mikrozom) İzolasyonu

4 adet 150 mm petrilerdeki hücreler tripsin yardımıyla kaldırılmış ve santrifüj sonrası pellet 1X PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra pelletin üzerine

2,4 ml taze ER izolasyon solüsyonu eklenmiştir ve pellet solüsyon içinde çözülmüştür. Her seferinde 1,2 ml hücre süspansiyonu dounce homojenizatör yardımıyla 300rpm'de 20 vuruş ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler 2500 rpm 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir ve bu sayede nükleer ve hücrel pelletler elde edilmiştir. Bir sonraki basamakta süpernatant yeni bir ependorfa alınmıştır ve 14000 rpm 15 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir ve mitokondriyel pellet elde edilmiştir. Süpernatant ultrasantrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 43000 rpm 1 saat 15 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Mikrozoal pellet 2D lizis solüsyonu yardımı ile çözülmüştür ve proteinlerin konsantrasyonları 660 nm protein assay yardımı ile ölçülmüştür.

## **8.8. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi**

Konsantrasyonların tespiti 660 nm protein assay yardımı ile ölçülmüştür. Protein örnekleri ve 0,05- 2 mg/ml aralığındaki sığır serum albümini (BSA) dilüsyonları 150 µl 660 nm assay solüsyonu ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında gerçekleşen 5 dakikalık inkübasyon sonrası absorbanlar 660 nm'de tespit edilmiştir. Örneklerin konsantrasyonları standart eğri yardımı ile tespit edilmiştir.

## **8.9. Metanol- Kloroform Çöktürmesi**

150 µg ER protein ekstraktı 600 µl metanol, 150 µl kloroform ve 450 µl su ile karıştırılmıştır. Örnekler vortekslenmiş ve 14000 g 1 dk santrifüj yapılmıştır. Üst kısımda kalan metanol/ su karışımı ara katmandaki protein rahatsız edilmeden uzaklaştırılmıştır. 600 µl metanol örnekleri yıkamak için eklenmiştir, tüpler vortekslenmiş ve 20000 g 5 dk santrifüj yapılmıştır. Daha sonra ise 2 kez soğuk metanol ile yıkama yapılmıştır. Son santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılmış, pelletler kurutulmuş ve 2D lizis solüsyonu içinde çözülmüştür.

## **8.10. 2D SDS- PAGE**

2D SDS PAGE ile protein ayrımı iki basamakta gerçekleşmektedir, ilk ayırım izoelektrik fokuslama (IEF) iken ikinci ayırım SDS-PAGE'dir. İlk ayırımda proteinler

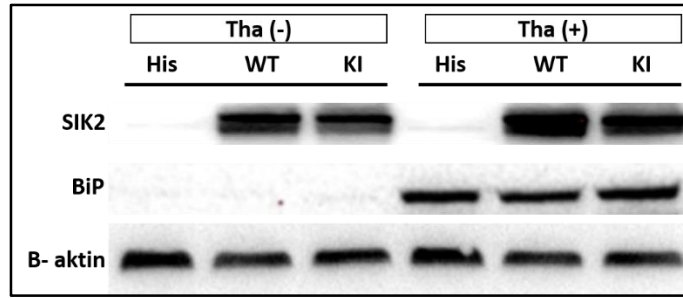
izoelektrik noktalarına göre ayrılırken, ikinci ayırım moleküler ağırlıklara göre gerçekleşmektedir.

İlk olarak çözünmüş proteinler oda sıcaklığına getirilmiştir ve proteinler konsantrasyonları 25 µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Proteinler 50 mM DTT, %0,2 Amfolit, 2D lizis solüsyonu ve renk vermesi için birkaç damla eklenen BPB ile toplam hacim 125 µl olacak şekilde birleştirilmiştir. Karışım 2D kabına eklenmiştir ve üzeri strip ile kapatılmıştır. Strip'in proteinleri emmesi için yaklaşık 1 saat beklenmiştir ve daha sonra 1-2 ml mineral yağı buharlaşmayı önlemek için stripin üzerine eklenmiştir. Gece boyunca rehidrasyon işlemi gerçekleşmiştir. Stripler, telleri üzerine yüksek akım sebebiyle meydana gelebilecek yanmayı önlemesi için, su ile ıslatılmış whatmann kağıtları yerleştirilmiş 2D kaplarına aktarılmıştır. Üzerine ise mineral yağı eklemesi yapılmıştır. IEF (20°C, hızlı, 10000 V/saat, 4000 V) yaklaşık olarak 4 saat süren bir programda yürütülmüştür. Stripler oda sıcaklığında 15 dk Ekilibrasyon I ve 15 dk Ekilibrasyon II solüsyonlarında çalkalayıcı yardımı ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 1X SDS- Yürütme tamponunda kısa bir süre bekletilmiş ve ikinci boyu için jel üzerine yerleştirilmiştir. Jel ile strip arasında boşluk kalmasını önlemek için strip üzerine overlay agaroz eklenmiştir ve donması için bekletilmiştir. Daha sonra jel soğuk odada 200 V'da yürütülmüş ve boyutlarına göre bir ayırım yapılmıştır. Jel 1 saat çalkalayıcıda fiksasyon solüsyonu ile muamele edilmiş ve 3 kere 10 dk likrosolv su ile yıkanmıştır. 1:1 oranında su ile dilüe edilmiş Sypro Ruby ile gece boyunca çalkalayıcıda bırakılmıştır. Ertesi gün jeller yıkama solüsyonu ile 30 dkka yıkanmış, ardından ise 3 kere 5 dk su ile yıkama yapılmıştır. Jellerin görüntüleri UV altında gri tonlama ile ChemiDoc XRS+ yardımı ile yapılmıştır. Analizler ise Imagemaster 2D Platinum programı ile yapılmıştır.

## 9. SONUÇLAR

### 9.1. HEK293T Hücrelerinin WT-SIK2 ve KI-SIK2 ile Transfeksiyonu, ER Stres Oluşturulması ve ER İzolasyonu

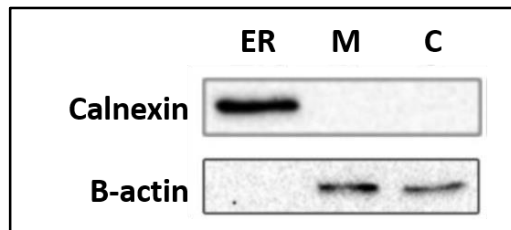
THA ER'de  $Ca^{+2}$  birikmesine neden olmaktadır, bu nedenle de ER stres ajanı olarak kullanılmaktadır. Hücrelere WT-SIK2 ve KI-SIK2 plazmidleri ile transfeksiyon yapılmış, yaklaşık 30 saat sonra ise 6 saatlik bir THA uygulaması ile stres oluşturulmuştur. Transfeksiyon ve stres oluşumu Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir.



Şekil 9.1: HEK293T hücrelerinde transfeksiyonun ve stres oluşumunun gösterilmesi.

### 9.2. ER örneklerinin 2D için hazırlanması

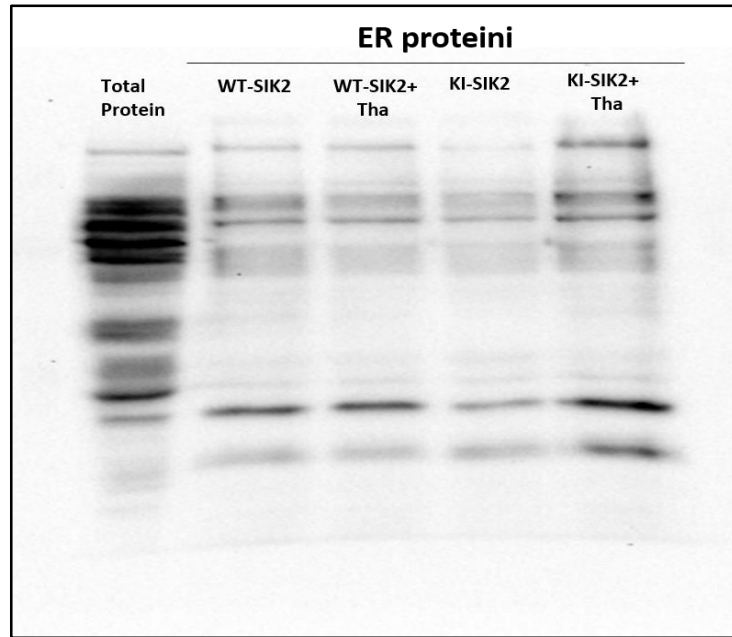
Hücreler tripsin muamelesi ile kaldırıldıktan sonra, homojenizasyon ve santrifüj basamakları yardımıyla ER fraksiyonları (mikrozomlar) elde edilmiştir. Mikrozomlarının ER özgünlükleri, spesifik ER markırı olan Calnexin ile Western Blot yardımıyla doğrulanmıştır.



Şekil 9.2: ER fraksiyonlarının izolasyonlarının gösterilmesi (Calnexin ER markırı olarak kullanılmıştır. M: Mitokondriyel fraksiyon C: Sitolol).

### 9.3. Proteinlerin Fosfo-AMPK Substrat Antikoru ile Kontrolü

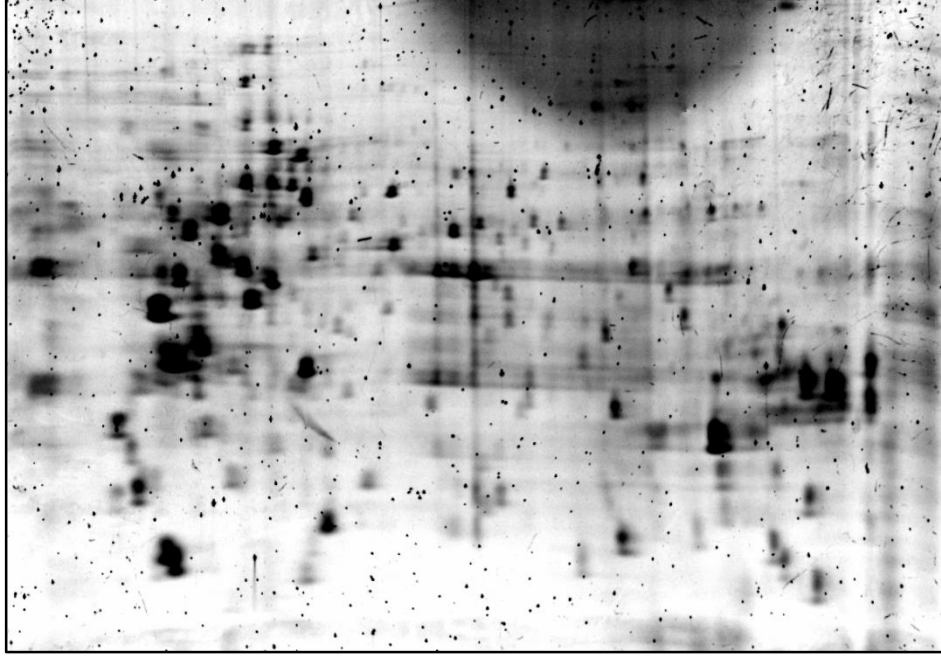
293T hücrelerinden elde edilen total ve ER proteinleri SDS-PAGE jelde, Western Blot ile SIK2 ile aynı fosforilasyon motifini paylaşan anti fosfo AMPK substrat antikoru (IRS1/pS794) yardımıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Total hücresel lizat ve ER lizatlarında benzer bantların varlığı, antikorum özgün olmayan bir bağlanma karakteri sergilediğini işaret etmektedir.



Şekil 9.3: 293T hücrelerinden elde edilen total ve ER protein lizatlarında AMPK fosfo özellikli substrat antikoru etkinliğinin test edilmesi.

### 9.4. ER Proteomunun (Retikülom) 2D SDS PAGE ile analizleri

ER izolasyonundan elde edilen lizatlar pH 3- 10 nonlinear IPG striplere yüklendi. IPG stripler birinci boyuttaki ayırmadan sonra, ikinci boyut için %10 SDS-PAGE'de yürütüldü. Daha sonra ise Sypro Ruby ile muamele edilip UV altında ChemiDoc-XRS+ ile görüntüsü alındı. Analizler ise Imagemaster 2D Platinum programı yardımı ile yapıldı.

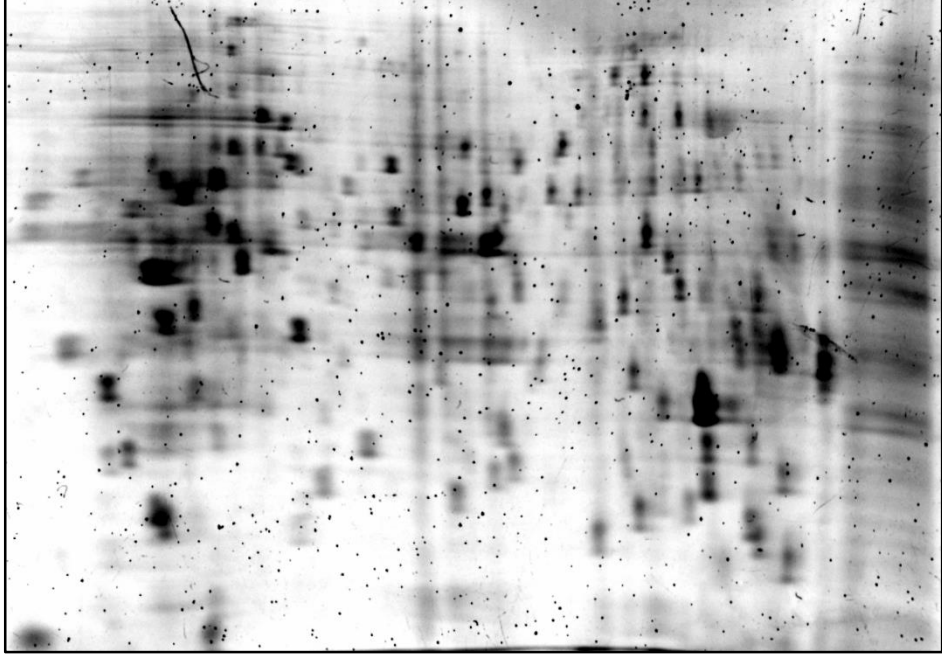


Şekil 9.4: WT-SIK2 transfeksiyonu sonucu elde edilen lizatların gösterimi (Jel 1).

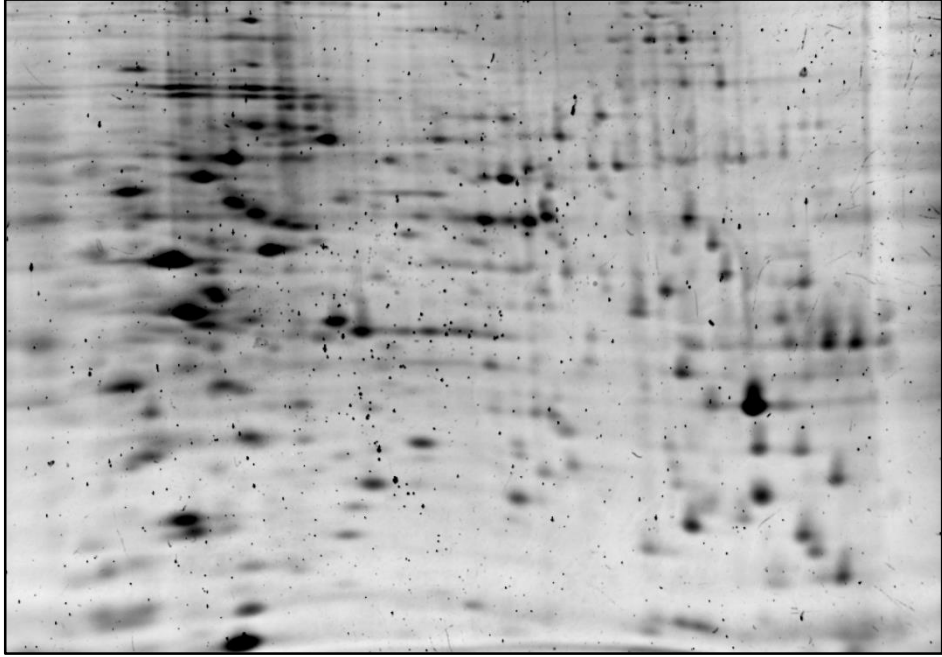


Şekil 9.5: Jel 1'in replikası (Jel2).

WT- SIK2 Tha (-) jellerinde toplam 412 adet spot tespit edilmiştir.

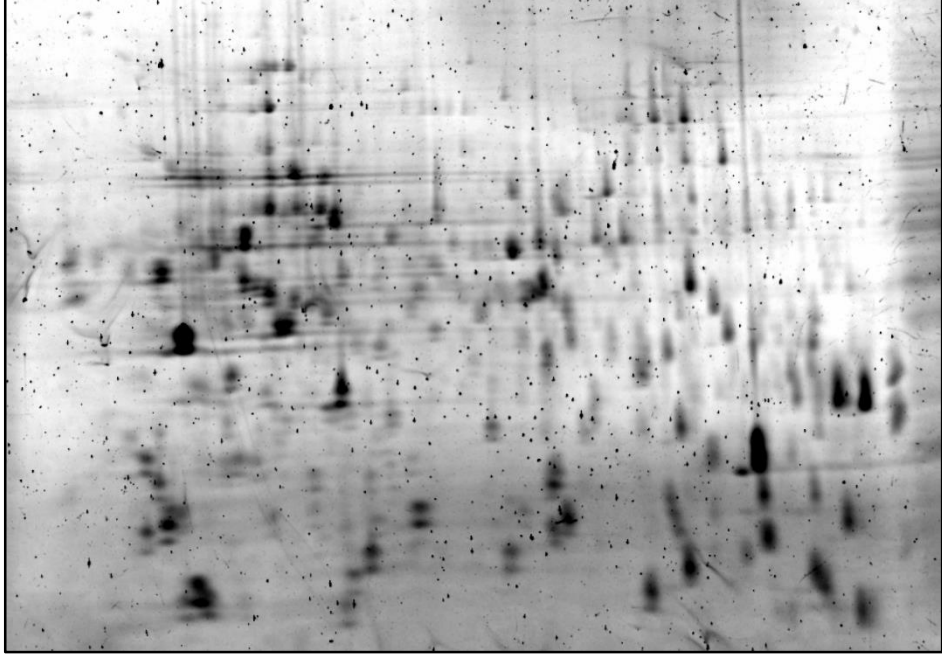


Şekil 9.6: Tha uygulaması yapılmış, WT-SIK2 transfeksiyonu sonucu elde edilen lizatların gösterimi (Jel 3).

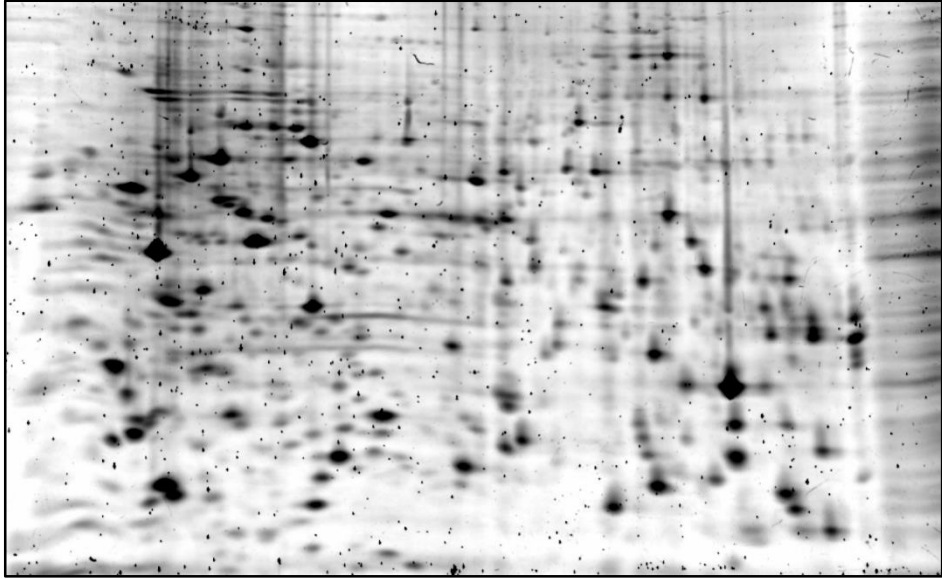


Şekil 9.7: Jel 3'ün replikası (Jel4).

WT- SIK2 Tha (+) jellerinde toplam 373 adet spot tespit edilmiştir.

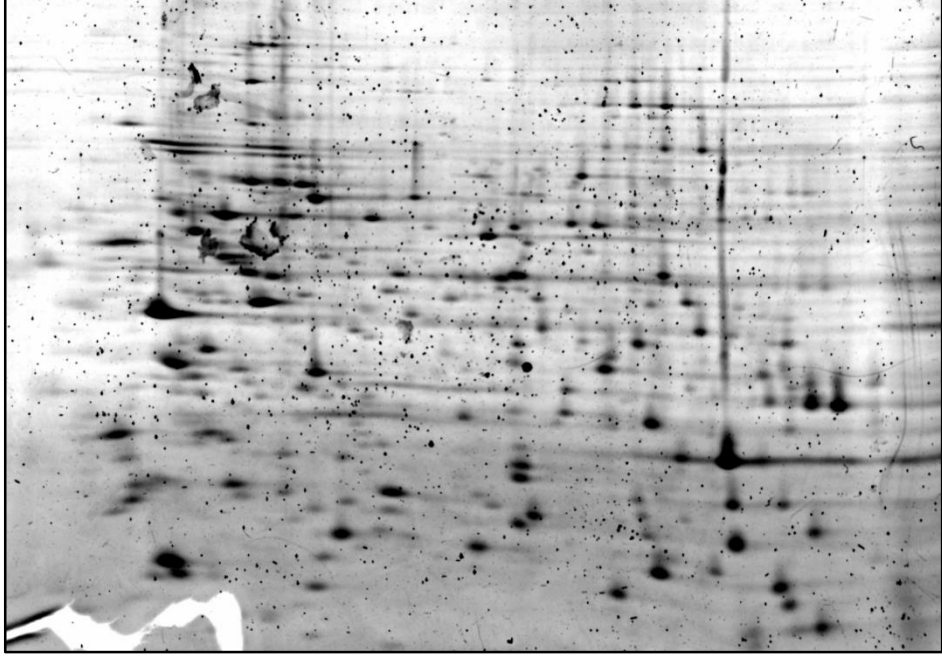


Şekil 9.8: KI-SIK2 transfeksiyonu sonucu elde edilen lizatların gösterimi (Jel 5).

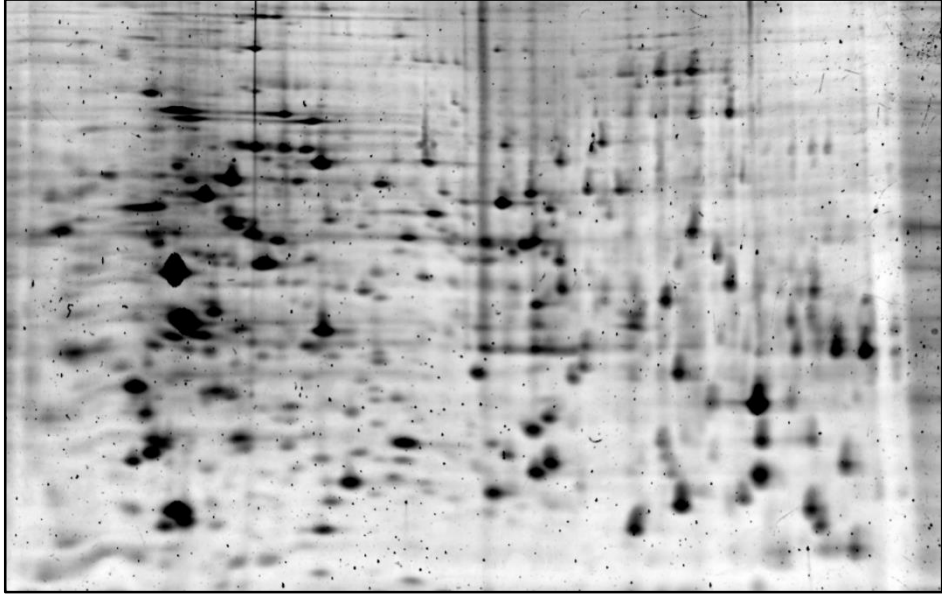


Şekil 9.9: Jel 5'in replikası (Jel 6).

KI- SIK2 Tha (-) jellerinde toplam 603 adet spot tespit edilmiştir.



Şekil 9.10: Tha uygulaması yapılmış, KI-SIK2 transfeksiyonu sonucu elde edilen lizatların gösterimi (Jel 7).

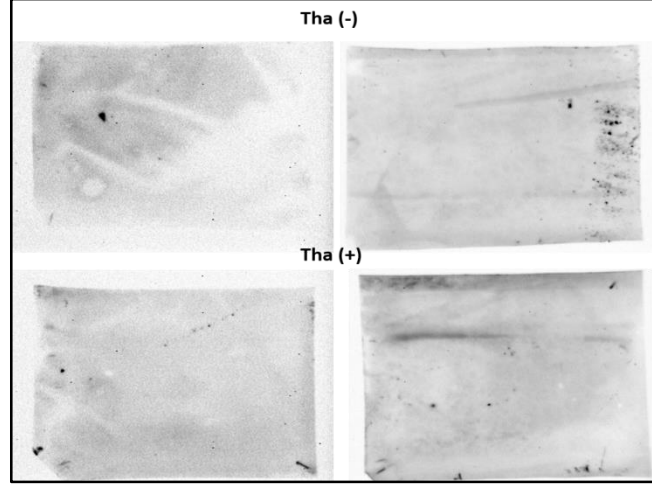


Şekil 9.11: Jel 7'nin replikası (Jel8).

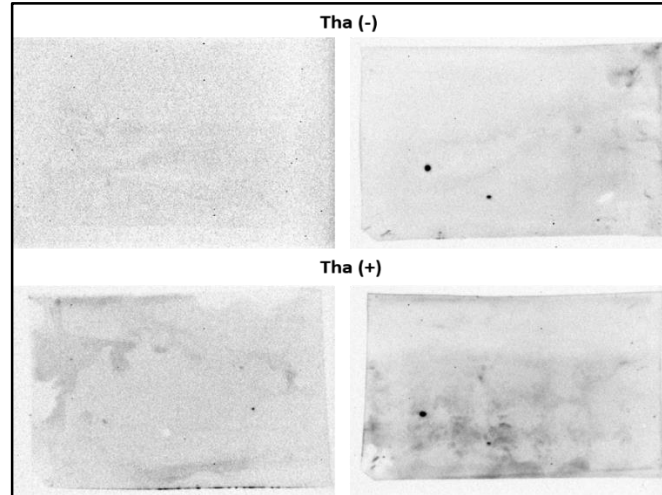
KI- SIK2 Tha (+) jellerinde toplam 798 adet spot tespit edilmiştir.

## 9.5. ER Lizatları ile Elde Edilen Jel Görüntülerinin Fosfo-AMPK Substrat Antikoru İle Kontrolü

ER izolasyonu sonucunda yapılan 2D yöntemiyle elde edilen jeller PVDF membrana aktarılmış ve antikor muamelesi ile Fosfo-AMPK motifi belirlenmiştir.



Şekil 9.12: ER stresine bağlı olarak geçici WT-SIK2 ifadesi sağlanan hücrelerden elde edilen ER lizatlarının, 2-D SDS-PAGE sonrası transfer edildiği yüksek protein bağlama kapasitesine sahip membranlarda AMPK'a özgün anti pS motif antikoru kullanılarak ER özgün substratlarının belirlenmesi.

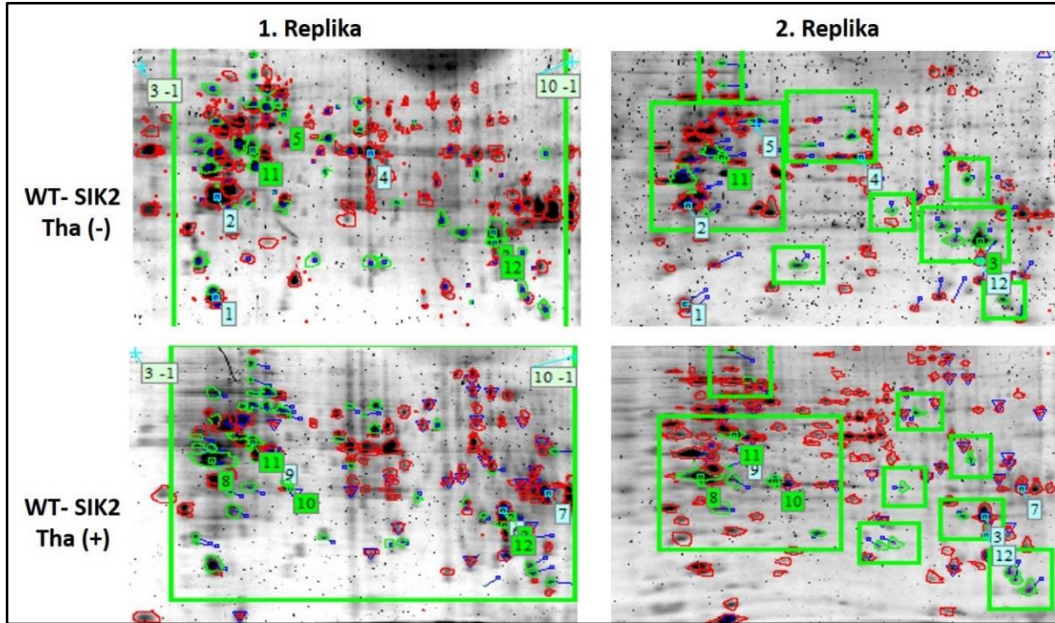


Şekil 9.13: ER stresine bağlı olarak, kinaz inaktif KI-SIK2 ifadesi sağlanan hücrelerden elde edilen ER lizatlarının, 2-D SDS-PAGE sonrası transfer edildiği yüksek protein bağlama kapasitesine sahip membranlarda AMPK'a özgün anti pS motif antikoru kullanılarak ER özgün substratlarının belirlenmesi.

Membranlar üzerinde LXRXX(pS/pT) motifine sahip proteinlerin tespiti için yapılan bu Western Blot sonucunda, beklediğimiz şekilde bir tespit gerçekleştiremedik. Bunun sebeplerinden biri antikorun çalışması için yeterli protein miktarının membranlarda bulunmayışı olabilir, bir çözüm olarak fosfo protein zenginleştirilmesi yapılabilir. Ayrıca total hücresel lizat ve ER lizatları ile yapılan Western Blotda da görüldüğü üzere antikor özgün olmayan bir bağlanma karakteri sergilemektedir ve bu sebeple istenilen sonuçlar elde edilemiyor olabilir.

## 9.6. 2D Jellerinin Imagemaster 2D Platinum ile analizi

Jeller UV altında görüntüledikten sonra analizleri Imagemaster 2D Platinum kullanılarak yapılmıştır. Programda görüntüler WT- SIK2 Tha (-)/ WT- SIK2 Tha (+), KI- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (+), WT- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (-), WT- SIK2 Tha (+)/ KI- SIK2 Tha (+) olacak şekilde gruplanmış ve birbirleriyle kıyaslanmıştır.



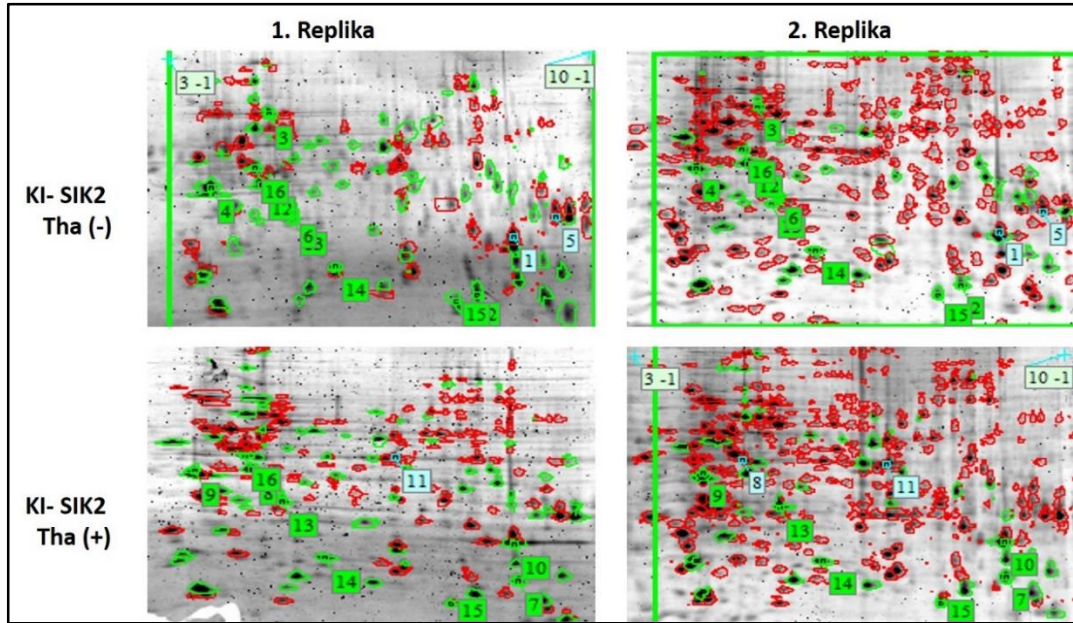
Şekil 9.14: WT-SIK2 Tha (-) ve (+) jellerinin kıyaslanması (Kırmızı: Tespit edilenler, Yeşil: Eşleşenler).

Görüntüde yeşil ile gösterilen protein lekeleri (spotlar) jellerde tespit edilmiş bütün spotları göstermektedir, kırmızılar ise WT- SIK2 Tha (-) ve WT- SIK2 Tha (+)

jellerinde birbiri ile çakışan, eşleşmiş spotları göstermektedir. Bu iki grup arasında toplam 45 adet eşleşmiş spot bulunmaktadır.

Tablo 9.1: WT- SIK2 Tha (-) ve WT- SIK2 Tha (+) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değeri farklılıklar gösterenler.

Match ID	Range Ratio	WT-SIK2 Tha (-)	WT-SIK2 Tha (+)
5	6,58668	1,28817	0,195571
16	45,572	0,0232386	1,05903
28	4,49898	1,6085	7,23662
31	29,815	0,52976	0,0181695

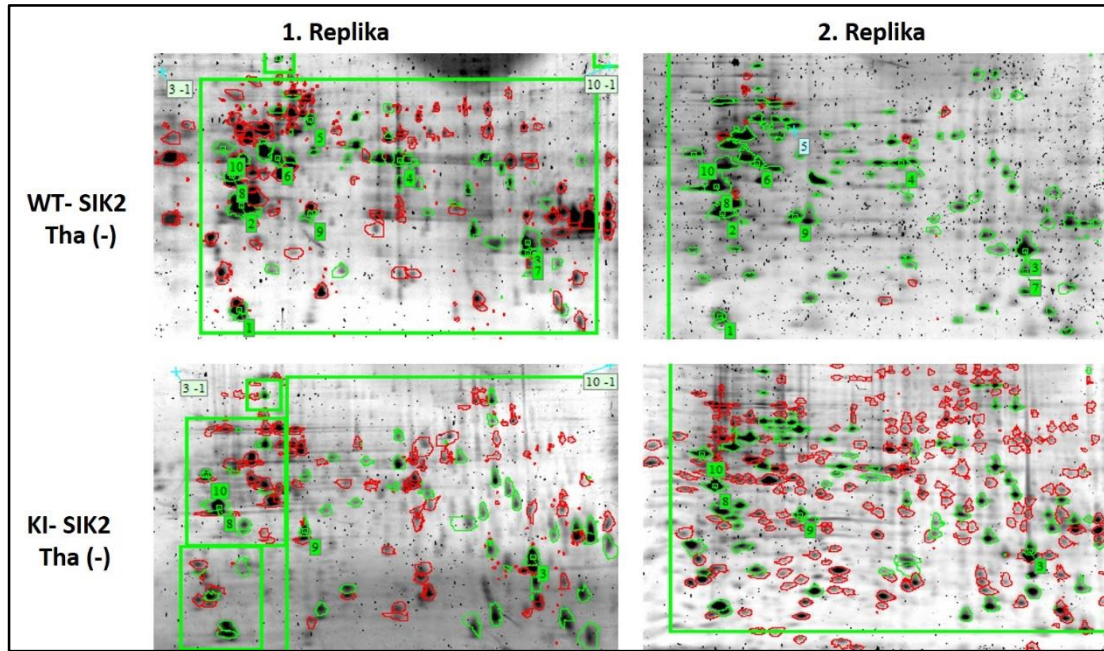


Şekil 9.15: KI-SIK2 Tha (-) ve (+) jellerinin kıyaslanması (Kırmızı: Tespit edilenler, Yeşil: Eşleşenler).

Görüntüde yeşil ile gösterilen spotlar jellerde tespit edilmiş bütün spotları göstermektedir, kırmızılar ise KI- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde birbiri ile çakışan, eşleşmiş spotları göstermektedir. Bu iki grup arasında toplam 75 adet eşleşmiş spot bulunmaktadır.

Tablo 9.2: KI- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.

Match ID	Range Ratio	KI-SIK2 Tha (-)	KI-SIK2 Tha (+)
1	100,86	2,31943	0,0982336
28	31,8762	0,277131	0,012962
29	18,5481	0,0131519	0,243943
30	9,03872	1,57652	0,174419
35	7,97172	0,0930945	0,742124
59	13,8875	0,200035	0,0144039
69	53,2042	0,0260041	1,38352
73	22,4726	0,828992	0,036889
75	7,45303	0,0393939	0,13418

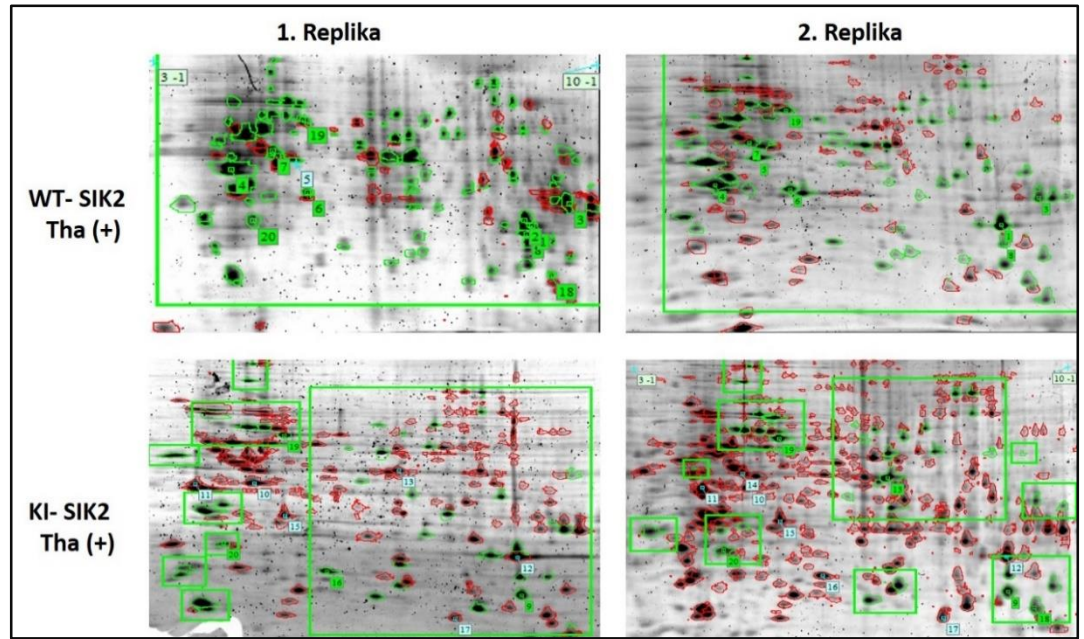


Şekil 9.16: WT- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (-) jellerinin kıyaslanması (Kırmızı: Tespit edilenler, Yeşil: Eşleşenler).

Görüntüde yeşil ile gösterilen spotlar jellerde tespit edilmiş bütün spotları göstermektedir, kırmızılar ise WT- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (-) jellerinde birbirini ile çakışan, eşleşmiş spotları göstermektedir. Bu iki grup arasında toplam 105 adet eşleşmiş spot bulunmaktadır.

Tablo 9.3: WT- SIK2 Tha (-) ve KI- SIK2 Tha (-) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.

Match ID	Range Ratio	WT-SIK2	KI-SIK2
0	4,25302	2,40026	0,564367
9	12,6757	0,174512	2,21206
16	78,8903	1,18596	0,0164575
17	78,3562	0,549709	0,0152307
18	223,435	0,794557	0,0134796
41	149,765	1,28817	0,0086013
60	10,2737	1,13131	0,110116
70	9,85455	0,574366	0,0582843



Şekil 9.17: WT- SIK2 Tha (+) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinin kıyaslanması (Kırmızı: Tespit edilenler, Yeşil: Eşleşenler).

Görüntüde yeşil ile gösterilen spotlar jellerde tespit edilmiş bütün spotları göstermektedir, kırmızılar ise WT- SIK2 Tha (+) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde birbiri ile çakışan, eşleşmiş spotları göstermektedir. Bu iki grup arasında toplam 68 adet eşleşmiş spot bulunmaktadır.

Tablo 9.4: WT- SIK2 Tha (+) ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde tespit edilen spotlardan kayda değer farklılıklar gösterenler.

Match ID	Range Ratio	WT-SIK2+Tha	KI-SIK2+Tha
2	53,29	0,39465	0,0110721
24	3,73658	0,237286	0,886637
36	7,01681	0,689287	0,0982336

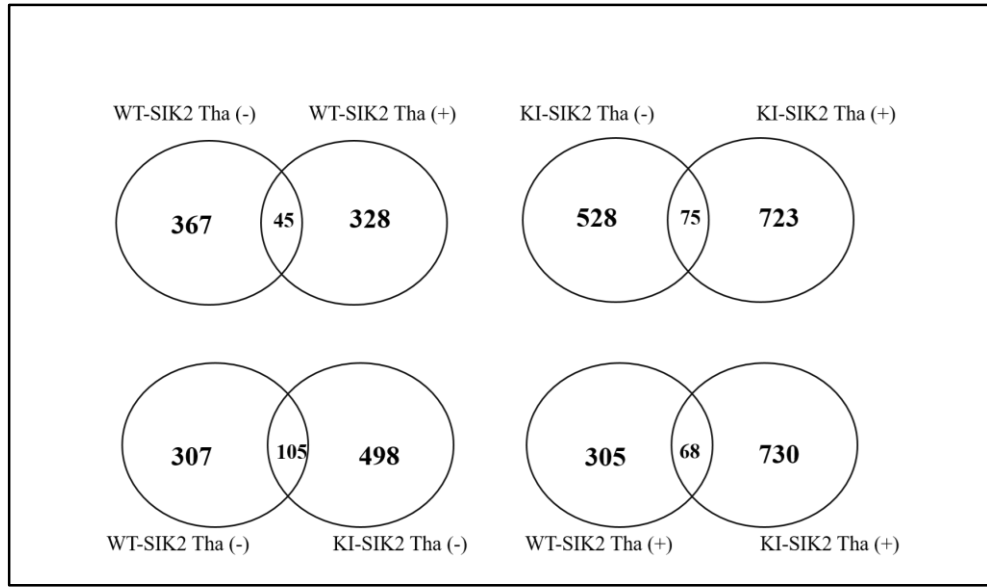
## 10. TARTIŞMA

Yüksek kalorili diyetle birlikte, azalan fiziksel aktiviteye bağlı olarak küresel ölçekte epidemik boyutlara ulaşan obezite hiper glisemi, hiperinsülinem, dislipidemi, inme, kalp damar hastalıkları ve tip 2 diyabet gibi hastalıklara zemin hazırlayarak insan yaşam kalitesini ciddi bir şekilde olumsuz etkilemektedir. ER stres durumunda katlanmayan veya yanlış katlanan proteinler ER lümeninde birikerek ER dengesini bozar ve sonuçta ER membranında yer alan UPR, ERAD, RIDD ve otofaji gibi uyum mekanizmalarının aktivasyonu ile ER protein dengesi yeniden sağlanmaya çalışılır. Bu adaptasyona yönelik sistemin protein dengesini sağlamada başarılı olamaması durumunda yolakların uzun süreli aktivasyonu apoptoza yol açarak hücrenin yok olmasını sağlar. ER da yer alan bu uyum mekanizmalarının özellikle farklı stres koşullarda nasıl düzenlendiği konusundaki bilgilerimiz halen kısıtlıdır. Dolayısı ile bu mekanizmaları obezite, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojik durumlarda kontrol altına almak bu hastalıkların tedavisi açısından oldukça önemli görülmektedir.

SIK2 hayati metabolik süreçler üzerinde rol oynayan önemli bir kinazdır. Araştırmalar göstermektedir ki obez bireylerde düşük dereceli inflamasyon ve kronik ER stres ile birlikte enerji metabolizmasını kontrol eden glukneogenez ve lipogenez gibi yolaklarda hasarlar meydana gelmektedir. Obez hayvan modellerinde ve insanlarda SIK2 düzey ve aktivitesinin özellikle yağ dokuda artarken karaciğerde azaldığı rapor edilmiştir. SIK2 knockout fare modelleri ile yapılan son çalışmalar SIK2'nin yağ hücrelerinin farklılaşması için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun dışında SIK2 nin aksojen ifadesi obez fare modellerinde karaciğer yağlanmasını önelemektedir. Sık2 nin daha önce bahis edilen metabolik ağırlıklı rolüne ek olarak özellikle protein dengesinde (proteostatis) ERAD ve otofajiyi düzenleyerek önemli rol oynadığını gösteren önemli çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan ilki için bir AAATPase olan translokaz olan p97/ VCP aktivitesini artırarak ERAD'ı artırdığı bilinirken otofagozom oluşumundaki rolü hakkında bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalar bir bütün olarak ele alındığında SIK2 nin ER özgün bu bilinen substratları dışında diğer fonksiyonları için farklı ER yerleşik substratları kullanabileceğini akla gelmektedir.

Bu çalışmada iki ana hedefi akut ER stresi varlığında SIK2'nin p97/VCP dışındaki muhtemel substratlarının belirlenmesi ve SIK2'nin total retikülom üzerine etkilerinin 2-D SDS-PAGE ile analiz edilmesidir (Şekil 5.3). Bu tez çalışmasında SIK2 'nin ER stres, UPR, ve hücre hemostazı açılarından ER özelinde yeni rollerinin ve dolayısı ile substratlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda hepatokarsinoma hücreleri olan Huh7 lar düşük ER kapasiteleri ve dolayısıyla protein içeriği nedeni ile ER kapasitesi yüksek 293T hücreleri kullanılmıştır.



Şekil 10.1: WT- SIK2 Tha (-)/ WT- SIK2 Tha (+), KI- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (+), WT- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (-), WT- SIK2 Tha (+)/ KI- SIK2 Tha (+) olacak şekilde kıyaslanan jellerin birbiriyle eşleşen ve eşleşmeyen spotlarının gösterilmesi.

2D SDS PAGE; WT ve KI SIK2 transfeksiyonlarının yapıldığı durumlarda Tha uygulanmış ve uygulanmamış şekilde değişiklikleri gözlemlemek için yapılmıştır. Imagemaster 2D Platinum yardımıyla WT- SIK2 Tha (-)/ WT- SIK2 Tha (+), KI- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (+), WT- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (-), WT- SIK2 Tha (+)/ KI- SIK2 Tha (+) olacak şekilde jeller birbirleriyle kıyaslanmıştır. WT- SIK2 Tha (-) jellerinde toplam 412 spot, WT- SIK2 Tha (+) jellerinde toplam 373 spot , KI- SIK2 Tha (-) jellerinde toplam 603 spot ve KI- SIK2 Tha (+) jellerinde toplam 798 spot tespit edilmiştir. WT- SIK2 Tha (-)/ WT- SIK2 Tha (+) kıyaslamasında elde edilen toplam 45 adet eşleşmiş spot bulunmakta ve bunlardan 4 tanesi kayda değer farklılıklar göstermektedir, 16 numaralı spotta yaklaşık 45 kat ve

31 numaralı spotta yaklaşık 30 kat fark gözlenmiştir. KI- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (+) kıyaslamasında elde edilen toplam 75 adet eşleşmiş spot bulunmakta ve bunlardan 9 tanesi kayda değer farklılıklar göstermektedir, 1 numaralı spotta yaklaşık 100 kat ve 69 numaralı spotta yaklaşık 53 kat fark gözlenmiştir. WT- SIK2 Tha (-)/ KI- SIK2 Tha (-) kıyaslamasında elde edilen toplam 105 adet eşleşmiş spot bulunmakta ve bunlardan 8 tanesi kayda değer farklılıklar göstermektedir, 18 numaralı spotta yaklaşık 225 kat ve 41 numaralı spotta yaklaşık 150 kat fark gözlenmiştir. WT- SIK2 Tha (+)/ KI- SIK2 Tha (+) kıyaslamasında ise elde edilen toplam 68 adet eşleşmiş spot bulunmakta ve bunlardan 3 tanesi kayda değer farklılıklar göstermektedir, 2 numaralı spotta yaklaşık 53 kat ve 36 numaralı spotta yaklaşık 7 kat fark gözlenmiştir

Temel olarak WT- SIK2 ile transfekte edilen jellerde, KI- SIK2 ile transfekte edilen jellere oranla daha az spot tespit edilmiştir. Ayrıca bu kıyaslamalar ile birbiri ile eşleşen çok sayıda protein olduğu, bunların bir kısmının da kayda değer miktarda artıp, azaldığı gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar SIK2'nin özellikle VCP üzerinden veya başka substratlarını kullanarak ERAD vasıtası ile proteinlerin selektif yıkımına neden olabileceğini işaret etmektedir. Bu durumda aynı tür proteinlerde ER stresi ve SIK2 e bağlı olarak ortaya çıkan kantatif değişiklikler ise yine SIK2 kaynaklı özellikli olmayan bir ERAD aktivasyonunu veya tam tersini akla getirmektedir. Bu eksende SIK2 ve stres bağımlı ER lümen protein miktar ve çeşitliliğindeki bu değişiklikler sitokinler, şaperonlar veya ERQC bileşenleri vb farklı ER lümeninde gerçekleşen farklı biyolojik süreçlere ait proteinleri içerebilir. Bu içerik farklı spotların (nitel veya nicel) LC- MS/ MS temelli protein kimliklerinin belirlenmesine dayalı tekniklerle ileride tespit edilecektir. SIK2 ile düzenlenen protein hedefler belirlendiğinde bunların doğrudan substrat veya dolaylı olarak etkilenen proteinler olup olmadığına bakılarak genetik ve biyokimyasal temelli bu moleküllerin mekanistik mekanizmalarını hedef alan deneyler yapılması öncelikli hedeflerimiz arasında olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Palade G.E., (1956), "The Endoplasmic Reticulum", *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2 (4), 85-98.
- [2] Zang K., Kaufman R.J., (2009), "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response", *Nature*, 454 (7203), 455-462.
- [3] Schröder M., (2007), "Endoplasmic reticulum stress responses", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (2008), 862-894.
- [4] Smirle J., Au C. E., Jain M., Dejgaard K., Nilsson T., Bergeron J., (2013), "Cell Biology of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Apparatus through Proteomics", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5:a015073.
- [5] Bravo R., Parra V., Gatica D., Rodriguez A.E., Torrealba N., Paredes F., Wang Z.V., Zorzano A., Hill J.A., Jaimovich E., Quest A.F.G, Lavandero S., (2013), "Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration", *International Review of Cell and Molecular Biology*, 301, 215-290.
- [6] Gorlich D., Prehn S., Hartmann E., Kalies K.U., Rapoport T.A., (1992), "A Mammalian Homolog of SEC61p and SECYp Is Associated with Ribosomes and Nascent Polypeptides during Translocation", *Cell Press*, 71, 499-503.
- [7] Seiser, R. M., (2000), "The Fate of Membrane-bound Ribosomes Following the Termination of Protein Synthesis", *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (43), 33820-33827.
- [8] Helenius A., Aebiz M., (2004), "Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum", *Annual Review of Biochemistry*, 73, 1019-1049.
- [9] Vembar S.S., Brodsky J.L., (2008), "One step at a time: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 944-957.
- [10] Topçu M., (2013). "The Role of SIK2 in Endoplasmic Reticulum Associated Degradation" Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [11] Ellgaard L., Helenius A., (2003), "Quality Control in The Endoplasmic Reticulum", *Molecular and Cellular Biology*, 4, 181-191.
- [12] Schröder M., Kaufman R. J., (2005), "ER stress and unfolded protein response", *Mutation Research*, 569, 29-63.

- [13] Ron D., Walter P., (2007), "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519-529.
- [14] Zhang K., Kaufman R.J., (2004), "Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum", *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25935-25938.
- [15] Yoshida H., (2007), "ER Stress and Diseases", *The Febs Journal*, 274, 630-658.
- [16] Xu, C., Maitre, B.B., Reed, J.C., (2005), "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions", *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 2656-2664.
- [17] Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., (2003), "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response", *Molecular and Cellular Biology*, 23, 7448-7459.
- [18] Basseri, S., Austin, R.C., (2011), "Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential", *Biochemistry Research International*, 2012, 1-13.
- [19] Zhang, K., Kaufman, R.J., (2008), "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response", *Nature Cell Biology*, 10, 455-462.
- [20] Vembar S.S., Brodsky J.L., (2008), "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 944-957.
- [21] Christianson J.C., Olzmann J.A., Shaler T.A., Sowa M.E., Bennett E.J., Richter C.M., Tyler R.E., Greenblatt E.J., Harper J.W., Kopito R.R., (2012), "Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy", *Nature Cell Biology*, 14 (1), 93-105.
- [22] Helenius A., Aebi M., (2004), "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum", *Annual Review of Biochemistry*, 73, 1019-1049.
- [23] Aebi M., Bernasconi R., Clerc S., Molinari M., (2010). "N-glycan structures: recognition and processing in the ER", *Cell Press*, 35 (2), 74- 82.
- [24] Olivari S., Molinari M., (2007), "Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins", *FEBS Letters*, 581 (19), 3658- 3664.
- [25] Meusser B., Hirsch C., Jarosch E., Sommer T., (2005), "ERAD: the long road to destruction", *Nature Cell Biology*, 7 (8), 766- 772.

- [26] Nakatsukasa K., Brodsky J.L., (2008), "The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum", *Traffic*, 9 (6), 861-870.
- [27] Lederkremer G.Z., (2009), "Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation", *Current Opinion in Structural Biology*, 19 (5), 515-523.
- [28] Groisman B., Shenkman M., Ron E., Lederkremer G.Z., (2014), "Mannose Trimming Is Required for Delivery of a Glycoprotein from EDEM1 to XTP3-B and to Late Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Steps", *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (2), 1292-1300.
- [29] Olivari S., Galli C., Alanen H., Ruddock L., Molinari M., (2005), "A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation", *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 2424-2428.
- [30] Hirao K., Natsuka Y., Tamura T., Wada I., Morito D., Natsuka S., Romero P., Sleno, B., Tremblay L.O., Herscovics A., Nagata K., Hosokawa, N., (2006), "EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming", *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 9650- 9658.
- [31] Hosokawa N., Wada I., Hasegawa K., Yorihuzi T., Tremblay L.O., Herscovics A., Nagata K., (2001), "A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation", *EMBO Reports*, 2, 415- 422.
- [32] Fiebigler E., Story C., Ploegh H.L., Tortorella D., (2002), "Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein", *The EMBO Journal*, 21, 1041–1053.
- [33] Ruggiano A., Foresti O., Carvalho P., (2014), "ER-associated degradation: Protein quality control and beyond", *The Journal of Cell Biology*, 204, 6869-6879.
- [34] Christianson, J.C., Olzmann J.A., Shaler T.A., Sowa M.E., Bennett E.J., Richter C.M., "Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy", *Nature Cell Biology*, 14, 93–105.
- [35] Nadav E., Shmueli A., Barr H., Gonen H., Ciechanover A., Reiss Y., (2003), "A novel mammalian endoplasmic reticulum ubiquitin ligase homologous to the yeast Hrd1", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303 (1), 91-97.
- [36] Finley D., Ulrich H.D., Sommer T., Kaiser P., (2012), "The Ubiquitin–Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, 192 (2), 319-360.

- [37] 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", *The FEBS Journal*, 273, 2730-2748.
- [38] Yang F.C., Lin Y.H., Chen W.H., (2013) "Interaction between Salt-inducible Kinase 2 (SIK2) and p97/Valosin-containing Protein (VCP) Regulates Endoplasmic Reticulum (ER)-associated Protein Degradation in Mammalian Cells", *The Journal of Biological Chemistry*, 228 (47), 33861- 33872.
- [39] Takemori H., Okamoto M., (2008), "Regulation of CREB-mediated gene expression by salt inducible kinase", *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 287 -291.
- [40] Berdeaux R., (2011), "Metabolic regulation by salt inducible kinases", *Frontiers in Biology*, 6, 231-241.
- [41] Okamoto M., Takemori H., Katoh Y., (2004), "Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis", *Trends in Endocrinology & Metabolism-Cell*, 15, 21- 26.
- [42] Katoh Y., Takemori H., Min L., Muraoka M., Doi J., Horike N., Okamoto M., (2004), "Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response element-binding protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm", *European Journal of Biochemistry*, 271, 4307- 4319.
- [42] Katoh Y., Takemori H., Doi J., Okamoto M., (2002), "Identification of the nuclear localization domain of salt-inducible kinase", *Endocrine Research*, 28, 315- 318.
- [43] Takemori H., Kajimura J., Okamoto M., (2007), "TORC-SIK cascade regulates CREB activity through the basic leucine zipper domain", *The FEBS Journal*, 274, 3202- 3209.
- [44] Sasaki T., Takemori H., Yagita Y., Terasaki Y., Uebi T., Horike N., Takagi H., Susumu T., Teraoka H., Kusano K., Hatano O., Oyama N., Sugiyama Y., Sakoda S., Kitagawa K., (2011), "SIK2 is a key regulator for neuronal survival after ischemia via TORC1-CREB", *Neuron*, 69, 106- 119.
- [45] Du J., Chen Q., Takemori H., Xu H., (2008), "SIK2 can be activated by deprivation of nutrition and it inhibits expression of lipogenic genes in adipocytes", *Obesity*, 16, 531- 538.
- [46] 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 salt-inducible kinase-2", *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 18440- 18447.

- [47] 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", *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 4316- 4331.
- [48] Altarejos, J.Y., Montminy M., (2011), "CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 141- 151.
- [49] Newsholm,E.A., Leech T.R., (2010), "Carbohydrate Metabolism, Functional Biochemistry in Health and Disease", Wiley, 113- 115.
- [50] Magnusson I., Rothman D.L., Katz L.D., Shulman R.G., Shulman G.I., (1992), "Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus", *The Journal of Clinical Investigation*, 90, 1323- 1327.
- [51] Sreaton R.A., Conkright M.D., Katoh Y., Best J.L., Canettieri G., Jeffries S., Guzman E., Niessen S., Yates J.R., Takemori H., Okamoto M., Montminy M., (2004), "The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP- sensitive coincidence detector", *Cell Press*, 119, 61- 74.
- [52] Bittinger M.A., McWhinnie E., Meltzer J., Iourgenko V., Latario B., Liu X., Chen C.H., Song C., Garza D., Labow M., (2004), "Activation of cAMP response element mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins", *Current Biology*, 14, 2156- 2161.
- [53] Dentin R., Liu Y., Koo SH., (2007), "Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2", *Nature*, 449, 366- 370.
- [54] Liu Y., Dentin R., Chen D., (2008), "A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator Exchange", *Nature*, 456, 269- 273.
- [55] Conkright M.D., Canettieri G., Sreaton R.A., (2003), "TORCs: transducers of regulated CREB activity", *Molecular Cell*, 12, 413- 423.
- [56] Ravnskjaer K., Kester H., Liu Y., (2007), "Cooperative interactions between CBP and TORC2 confer selectivity to CREB target gene expression", *The EMBO Journal*, 26, 2880- 2889.
- [57] Ferre P., Foufelle F., (2007), "SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective", *Hormone Research*, 68, 72-82.
- [58] Espenshade P.J., (2006), "SREBPs: sterol-regulated transcription factors", *Journal of Cell Science*, 119, 973- 976.
- [59] Stoeckman A.K., Towle H.C., (2002), "The Role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression", *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 27029- 27035.

- [60] Amemiya-Kudo M., Shimano H., Hasty A.H., (2002), "Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes", *The Journal of Lipid Research*, 43, 1220- 1235.
- [61] Yoon Y.S., Seo W.Y., Lee M.W., Kim S.T., Koo S.H., (2009), "Salt-inducible kinase regulates hepatic lipogenesis by controlling SREBP-1c phosphorylation *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 10446- 10452.
- [62] Uyeda K., Yamashita H., Kawaguchi T. (2002), "Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage", *Biochemical Pharmacology*, 63, 2075- 2080.
- [63] Naimi M., Arous C., Obberghen E., (2009), "Energetic cell sensors: a key to metabolic homeostasis", *Trends in Endocrinology & Metabolism - Cell*, 21, 75- 82.
- [64] Muoio D.M., Newgard C.B., (2008), "Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 193- 205.
- [65] Pirola L., Johnston A.M., Obberghen E., (2004), "Modulation of insulin action", *Diabetologia*, 47, 170- 184.
- [66] Boura-Halfon S., Zick, Y., (2009), "Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance", *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 296, 581- 591.
- [67] Ryu D., Oh K.J., Jo H.Y., Hedrick S., Kim Y.N., Hwang Y.J., Park T.S., Han J.S., Choi C.S., Montminy M, Koo S.H., (2009), "TORC2 regulates hepatic insulin signaling via a mammalian phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1", *Cell Metabolism*, 9, 240- 251.
- [68] Wang Y., Inoue H., Ravnskjaer K., Viste K., Miller N., Liu Y., Hedrick S., Vera L., Montminy M., (2010), "Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 3087- 3092.

## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İstanbul'da doğan Betsi KÖSE, 2009 yılında Fatih Gelenbevi Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 2013 yılında mezun oldu. Aynı sene içinde Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2016 yılında tamamlayarak mezun oldu.

## EKLER

### EK A: Imagemaster 2D Platinum ile Yapılan Diğer Analizler

Tablo A1.1: WT- SIK2 Tha(-) ve WT-SIK2 Tha (+) jellerinin kıyaslanması.

Match ID	Central Tendency	Dispersion	Coef. Variation	Range Ratio	WT-SIK2 Tha(-)-1	WT-SIK2 Tha(-)-2	WT-SIK2 Tha(+)-1	WT-SIK2 Tha(+)-2
0	0,147	0,151	1,022		0,338		0,251	
1	0,609	0,447	0,734		0,973		0,366	1,097
2	0,308	0,190	0,615		0,516		0,374	0,342
3	0,110	0,173	1,583		0,409		0,029	
4	0,488	0,313	0,642		0,870		0,574	0,507
5	0,746	0,432	0,579	6,587	1,288	1,022	0,196	0,477
6	0,327	0,200	0,612		0,365	0,400	0,544	
7	0,286	0,095	0,334	2,168	0,198	0,425	0,324	0,196
8	0,409	0,327	0,798		0,912		0,395	0,331
9	0,879	0,442	0,503	3,493	0,766	1,621	0,464	0,664
10	0,486	0,334	0,687		0,365		0,719	0,862
11	0,337	0,382	1,134		0,928		0,418	
12	0,093	0,094	1,002		0,195		0,179	
13	0,460	0,483	1,051		0,710		1,129	
14	0,012	0,012	1,058		0,029		0,017	
15	0,961	1,250	1,300		0,794		3,052	
16	0,538	0,366	0,681	45,572	0,023	0,550	0,521	1,059
17	0,051	0,074	1,455		0,026		0,177	
18	0,321	0,470	1,462		1,128		0,158	
19	0,801	0,800	0,999		1,406		1,776	0,023
20	0,754	0,801	1,061		0,021		1,078	1,917
21	2,369	2,404	1,015		2,611	6,189	0,677	
22	0,647	0,526	0,813		0,636	1,461	0,491	
23	0,227	0,158	0,696		0,436	0,188	0,284	
24	0,364	0,452	1,241		1,107		0,350	
25	0,564	0,561	0,995		0,024		0,974	1,259
26	0,046	0,031	0,679		0,074	0,076	0,035	
27	0,453	0,185	0,409	2,787	0,382	0,764	0,274	0,392
29	0,626	0,748	1,195		1,858		0,594	0,052
30	0,077	0,118	1,536		0,027		0,280	
31	0,289	0,247	0,853	29,815	0,530	0,068	0,542	0,018
32	1,305	0,443	0,339	2,459	1,999	0,813	1,345	1,062
33	1,018	0,640	0,628		1,581	1,546	0,946	
34	0,413	0,292	0,707		0,795	0,319	0,539	
35	0,501	0,380	0,757		0,270	0,908	0,827	
36	0,181	0,174	0,961		0,018		0,318	0,387
37	0,275	0,283	1,029		0,456		0,645	
38	0,557	0,540	0,970		0,961	1,218	0,050	
39	0,041	0,047	1,140		0,050		0,113	
40	0,071	0,104	1,463		0,035		0,250	
41	0,248	0,334	1,348		0,179		0,812	
42	0,353	0,357	1,009		0,774		0,640	
43	0,320	0,323	1,010		0,574		0,704	
44	0,042	0,063	1,513		0,151		0,016	
45	0,094	0,131	1,387		0,061		0,317	
46	0,614	0,493	0,803		0,514		1,377	0,565
47	0,102	0,169	1,656		0,014		0,396	
48	0,189	0,124	0,657		0,304	0,296	0,155	
49	0,436	0,152	0,349	2,813	0,235	0,456	0,660	0,395

Tablo A1.2: KI- SIK2 Tha(-) ve KI-SIK2 Tha (+) jellerinin kıyaslanması.

Match ID	Central Tendency	Dispersion	Coef. Variation	Range Ratio	KI-SIK2 Tha(-)-1	KI-SIK2 Tha(-)-2	KI-SIK2 Tha(+)-1	KI-SIK2 Tha(+)-2
0	0,593	0,307	0,517	3,540	1,111	0,314	0,498	0,449
1	0,661	0,960	1,453	100,860	2,319	0,202	0,098	0,023
2	0,602	0,863	1,434		2,092		0,150	0,165
3	0,741	0,332	0,448	2,977	1,289	0,529	0,433	0,714
4	0,250	0,285	1,142		0,694		0,305	
5	1,233	1,038	0,841	7,568	3,012	0,398	0,735	0,789
6	1,008	0,456	0,452	3,203	1,756	0,768	0,548	0,960
7	0,731	0,168	0,230	1,779	0,538	0,957	0,604	0,823
8	0,269	0,168	0,622		0,343	0,454	0,281	
9	1,646	0,376	0,229	1,914	1,526	1,853	2,105	1,100
10	0,811	0,478	0,590		1,193		0,929	1,120
11	1,301	0,134	0,103	1,309	1,396	1,244	1,111	1,455
12	0,926	0,190	0,205	1,840	0,632	1,163	0,943	0,966
13	0,445	0,377	0,847		0,291		0,455	1,034
14	0,758	0,504	0,666		0,602		1,243	1,186
15	0,388	0,263	0,679		0,737		0,450	0,363
16	0,644	0,095	0,148	1,471	0,794	0,651	0,540	0,589
17	0,036	0,036	1,000		0,072		0,073	
18	0,968	0,244	0,252	2,080	0,606	1,260	0,905	1,103
19	0,478	0,050	0,105	1,319	0,462	0,403	0,532	0,515
20	0,681	0,397	0,583		0,953		0,955	0,814
21	0,702	0,550	0,783		0,655	1,542	0,612	
22	1,780	0,356	0,200	1,791	1,235	1,744	2,212	1,927
23	0,305	0,319	1,044		0,481		0,741	
24	0,186	0,033	0,179	1,482	0,164	0,172	0,165	0,244
25	0,709	0,220	0,310	2,471	0,879	0,378	0,934	0,643
26	0,338	0,216	0,641		0,509	0,299	0,544	
27	1,163	0,788	0,678		1,904	0,877	1,872	
28	0,224	0,145	0,649	31,876	0,191	0,277	0,413	0,013
29	0,170	0,093	0,546	18,548	0,013	0,189	0,244	0,235
30	0,812	0,538	0,663	9,039	1,577	1,032	0,174	0,466
31	0,549	0,328	0,597		0,815	0,596	0,786	
32	0,155	0,171	1,103		0,024	0,430	0,167	
33	0,035	0,047	1,346		0,026		0,115	
34	0,228	0,174	0,763		0,490		0,229	0,195
35	0,304	0,259	0,851	7,972	0,093	0,136	0,742	0,245
36	0,646	0,066	0,101	1,239	0,720	0,581	0,581	0,703
37	0,654	0,586	0,896		1,132		1,335	0,150
38	0,285	0,024	0,082	1,242	0,320	0,257	0,271	0,294
39	0,416	0,323	0,777		0,907	0,365	0,391	
40	0,572	0,370	0,648	102,813	1,051	0,614	0,611	0,010
41	0,203	0,118	0,585		0,254	0,256	0,300	
42	2,145	1,144	0,533	3,609	4,067	1,911	1,127	1,477
43	1,945	0,317	0,163	1,565	2,169	1,928	2,247	1,435
44	0,169	0,127	0,751		0,144	0,357	0,176	
45	0,285	0,191	0,670		0,484		0,224	0,431
46	0,052	0,077	1,479		0,024		0,184	
47	0,331	0,271	0,816		0,143		0,671	0,511
48	0,572	0,233	0,407	2,266	0,976	0,431	0,438	0,444
49	0,310	0,307	0,989		0,110		0,330	0,799
50	0,088	0,129	1,452		0,045		0,309	
51	0,798	0,476	0,597		1,252	0,914	1,024	
52	0,180	0,196	1,088		0,251		0,469	
53	0,023	0,028	1,193		0,025		0,068	
54	0,931	0,339	0,364	2,431	0,642	1,158	1,363	0,561
55	0,153	0,110	0,714		0,309	0,164	0,140	
56	0,505	0,375	0,744		0,296		0,790	0,933

Tablo A1.2: Devam.

57	0,036	0,052	1,466		0,017		0,126	
58	1,155	0,339	0,293	2,173	1,503	0,691	1,455	0,973
59	0,110	0,078	0,715	13,888	0,200	0,052	0,172	0,014
60	0,034	0,052	1,514		0,014		0,124	
61	0,159	0,054	0,342	2,516	0,222	0,201	0,088	0,126
62	0,325	0,219	0,674		0,308		0,612	0,379
63	0,063	0,097	1,535		0,022		0,230	
64	0,025	0,030	1,225		0,074		0,025	
65	0,671	0,453	0,675		0,936		1,204	0,544
66	0,212	0,166	0,782		0,463		0,166	0,219
67	0,133	0,102	0,764		0,281		0,156	0,096
68	0,425	0,399	0,940		1,054	0,465	0,180	
69	0,397	0,571	1,439	53,204	0,026	0,108	1,384	0,068
70	0,166	0,113	0,678		0,309		0,215	0,142
71	0,043	0,045	1,049		0,067		0,106	
72	0,066	0,066	1,002		0,126		0,138	
73	0,310	0,321	1,036	22,473	0,829	0,327	0,037	0,048
74	0,381	0,233	0,612		0,615		0,512	0,398
75	0,060	0,044	0,736	7,453	0,039	0,049	0,018	0,134
76	0,176	0,130	0,736		0,157		0,365	0,182

Tablo A1.3: WT- SIK2 Tha(-) ve KI-SIK2 Tha (-) jellerinin kıyaslanması.

Match ID	Central Tendency	Dispersion	Coef. Variation	Range Ratio	WT-SIK2 Tha(-)-1	WT-SIK2 Tha(-)-2	KI-SIK2 Tha(-)-1	KI-SIK2 Tha(-)-2
0	1,263	0,690	0,547	4,253	0,928	2,400	0,564	1,158
1	0,190	0,190	1,000			0,387		0,374
2	0,163	0,163	1,001			0,338		0,315
3	0,289	0,207	0,717			0,504	0,464	0,185
4	0,293	0,310	1,060			0,730		0,440
5	0,249	0,304	1,222			0,745		0,250
6	0,409	0,298	0,729			0,480	0,829	0,327
7	0,379	0,433	1,142		0,025	1,071		0,420
8	0,571	0,138	0,242	2,067	0,348	0,637	0,720	0,581
9	1,280	0,841	0,657	12,676	0,175	1,969	2,212	0,764
10	0,534	0,375	0,701			1,058	0,509	0,570
11	0,715	0,698	0,976			1,139	1,639	0,081
12	0,948	0,308	0,325	2,297	0,636	1,461	0,844	0,853
13	0,211	0,216	1,023			0,486		0,358
14	0,255	0,171	0,671		0,198	0,425		0,398
15	0,860	0,440	0,512	3,871	0,409	1,584	0,794	0,651
16	0,711	0,545	0,767	78,890	0,342	1,186	0,016	1,298
17	0,445	0,483	1,085	78,356	0,023	0,550	1,193	0,015
18	1,107	1,137	1,027	223,435	0,610	0,795	3,012	0,013
19	0,702	0,668	0,951			0,284	1,756	0,768
20	0,994	0,576	0,580			1,336	1,396	1,244
21	0,556	0,634	1,140			0,682		1,542
22	0,090	0,116	1,294			0,284		0,075
23	0,188	0,195	1,034			0,447		0,306
24	0,317	0,210	0,665		0,277	0,572		0,417
25	0,291	0,303	1,040			0,700		0,465
26	0,403	0,449	1,115			1,086		0,525
27	0,198	0,088	0,442	5,441	0,047	0,253	0,254	0,237
28	0,294	0,178	0,606			0,456	0,308	0,414
29	0,750	0,488	0,651			1,204	0,632	1,163
30	1,068	0,341	0,319	2,102	0,914	1,651	0,923	0,785
31	1,816	0,213	0,117	1,390	2,121	1,765	1,526	1,853
32	0,438	0,270	0,617			0,530	0,737	0,485

Tablo A1.3: Devam.

33	0,442	0,286	0,647		0,686	0,379		0,702
34	0,583	0,460	0,788			0,516	1,289	0,529
35	0,664	0,628	0,947			0,746	0,260	1,648
36	0,105	0,121	1,156			0,296		0,124
37	0,008	0,009	1,173			0,023		0,009
38	1,094	0,695	0,635	32,430	1,406	1,958	0,953	0,060
39	0,057	0,078	1,368			0,039		0,189
40	0,544	0,754	1,386			0,350		1,827
41	0,601	0,562	0,935	149,765	1,288	1,022	0,087	0,009
42	3,254	1,880	0,578	6,235	2,611	6,189	3,224	0,993
43	0,585	0,824	1,410			0,033	1,998	0,308
44	0,616	0,576	0,936			1,540	0,617	0,307
45	0,215	0,155	0,722		0,436	0,188		0,235
46	0,636	0,920	1,445			2,211		0,333
47	0,015	0,020	1,293			0,049		0,013
48	1,305	0,239	0,183	1,528	1,107	1,505	1,577	1,032
49	0,198	0,172	0,869			0,077	0,274	0,440
50	0,232	0,170	0,735		0,463	0,165		0,299
51	2,423	1,832	0,756		3,826	4,525		1,341
52	0,794	0,636	0,800			1,767	0,815	0,596
53	0,703	0,243	0,346	2,754	0,382	0,764	1,051	0,614
54	3,587	2,064	0,575	4,204	1,609	6,763	4,067	1,911
55	0,107	0,147	1,381			0,070		0,357
56	0,592	0,244	0,412	2,866	0,340	0,620	0,976	0,431
57	0,967	1,602	1,657			3,740		0,128
58	0,013	0,009	0,684			0,025	0,013	0,013
59	0,301	0,246	0,817		0,278	0,241		0,684
60	0,590	0,462	0,784	10,274	0,965	1,131	0,110	0,153
61	1,045	0,576	0,551	4,377	1,999	0,813	0,457	0,914
62	0,957	0,277	0,289	1,970	0,733	0,710	1,399	0,987
63	0,377	0,247	0,654	4,597	0,795	0,319	0,222	0,173
64	0,167	0,171	1,023			0,283		0,386
65	0,724	0,690	0,953			1,816	0,296	0,785
66	0,407	0,238	0,584			0,536	0,599	0,495
67	0,919	0,966	1,052			2,261		1,413
68	0,031	0,031	1,001			0,064		0,061
69	0,077	0,077	1,002			0,148		0,161
70	0,359	0,217	0,603	9,855	0,556	0,574	0,058	0,248
71	0,785	0,465	0,593		0,961	1,218		0,961
72	0,052	0,053	1,015			0,117		0,091
73	0,701	0,168	0,240	1,827	0,574	0,780	0,936	0,512
74	0,039	0,054	1,381			0,025		0,130
75	0,406	0,144	0,355	2,622	0,235	0,456	0,615	0,318
76	0,035	0,024	0,677		0,027	0,051		0,061
77	0,332	0,196	0,591		0,471	0,373	0,484	
78	0,245	0,390	1,593			0,919	0,060	
79	0,216	0,359	1,665			0,838	0,026	
80	0,748	0,579	0,774		0,766	1,621	0,606	
81	0,102	0,131	1,281			0,089	0,320	
82	0,307	0,181	0,589		0,365	0,400	0,463	
83	0,236	0,149	0,631		0,232	0,402	0,309	
84	0,021	0,021	1,002			0,044	0,041	
85	0,487	0,818	1,679			0,045	1,904	
86	0,670	0,583	0,870		0,270	0,908	1,503	
87	0,015	0,018	1,147			0,043	0,019	
88	0,056	0,063	1,127			0,153	0,071	
89	0,244	0,244	1,000		0,499	0,478		
90	0,086	0,102	1,179		0,096	0,248		
91	0,444	0,502	1,132		0,554	1,221		

Tablo A1.3: Devam.

92	0,054	0,071	1,324		0,042	0,174		
93	0,150	0,253	1,680		0,014	0,588		
94	0,348	0,575	1,654		0,047			
95	0,025	0,029	1,171		0,028			
96	0,010	0,011	1,022		0,017			
97	0,244	0,413	1,695		0,016			
98	0,095	0,141	1,486		0,338			
99	0,774	0,956	1,235		0,755			
100	0,915	0,916	1,000		1,863			
101	0,782	0,782	1,000		1,581			
102	0,034	0,041	1,203		0,100			
103	0,044	0,064	1,443		0,024			
104	0,292	0,296	1,015		0,514			

Tablo A1.4: WT- SIK2 Tha(+) ve KI-SIK2 Tha (+) jellerinin kıyaslanması.

Match ID	Central Tendency	Dispersion	Coef. Variation	Range Ratio	WT-SIK2 Tha(+)-1	WT-SIK2 Tha(+)-2	KI-SIK2 Tha(+)-1	KI-SIK2 Tha(+)-2
0	0,556	0,394	0,709		1,078		0,714	0,433
1	0,221	0,142	0,643		0,324	0,196		0,366
2	0,332	0,208	0,628	53,290	0,395	0,331	0,011	0,590
3	0,631	0,122	0,193	1,700	0,484	0,614	0,823	0,604
4	0,483	0,314	0,650		0,861	0,458		0,612
5	0,375	0,440	1,173		0,366	1,097		0,038
6	1,365	0,262	0,192	1,533	1,819	1,213	1,186	1,243
7	0,470	0,417	0,887		0,541	0,228		1,111
8	0,367	0,300	0,817		0,196	0,477		0,795
9	0,141	0,164	1,156		0,399			0,167
10	1,252	0,837	0,669		2,351	1,231		1,425
11	0,180	0,196	1,088		0,251			0,469
12	0,186	0,179	0,962		0,440	0,266		0,037
13	0,294	0,284	0,964		0,648	0,032		0,498
14	0,509	0,333	0,654		0,464	0,664		0,905
15	0,208	0,121	0,581		0,255	0,290		0,285
16	0,302	0,262	0,868		0,510	0,608		0,088
17	0,158	0,186	1,177		0,177			0,455
18	0,152	0,184	1,209		0,158			0,450
19	0,301	0,332	1,100		0,408			0,798
20	0,167	0,114	0,678		0,197		0,155	0,318
21	0,491	0,108	0,221	1,673	0,660	0,395	0,398	0,512
22	1,265	0,819	0,648		1,129	1,762		2,171
23	0,453	0,551	1,215		0,418		0,031	1,363
24	0,579	0,232	0,401	3,737	0,640	0,237	0,554	0,887
25	1,289	1,332	1,033		3,052			2,105
26	0,160	0,219	1,367		0,109			0,532
27	0,457	0,458	1,002		0,875			0,955
28	0,185	0,284	1,534		0,677	0,044		0,020
29	1,853	1,445	0,780		2,913	3,567		0,930
30	0,579	0,469	0,809		0,398	0,629		1,292
31	0,941	0,979	1,040		1,500			2,265
32	0,816	0,533	0,653		1,006	1,473		0,786
33	0,290	0,291	1,003		0,549			0,611
34	0,571	0,612	1,073		0,827			1,455
35	0,274	0,175	0,637		0,399	0,249		0,450
36	0,376	0,211	0,560	7,017	0,689	0,386	0,331	0,098
37	1,000	0,129	0,129	1,438	0,812	1,167	1,049	0,971
38	0,232	0,197	0,849		0,544		0,219	0,166
39	0,404	0,112	0,278	2,055	0,590	0,363	0,287	0,378
40	0,787	0,249	0,316	2,211	0,704	0,697	0,544	1,204

Tablo A1.4: Devam.

41	0,252	0,041	0,165	1,549	0,319	0,236	0,206	0,247
42	1,314	0,944	0,718		2,515	1,810	0,932	
43	0,147	0,148	1,001		0,284		0,306	
44	0,456	0,349	0,765		0,719	0,862	0,244	
45	0,462	0,413	0,894		0,374	0,342	1,130	
46	0,675	0,454	0,673		0,521	1,059	1,120	
47	0,284	0,288	1,014		0,690	0,024	0,422	
48	0,049	0,076	1,529		0,180		0,018	
49	0,076	0,077	1,016		0,171		0,132	
50	0,091	0,091	1,000		0,179		0,184	
51	0,075	0,103	1,385		0,250		0,048	
52	0,103	0,169	1,649		0,396		0,015	
53	0,216	0,201	0,931		0,317	0,052	0,496	
54	0,366	0,294	0,802		0,163	0,713	0,589	
55	0,011	0,012	1,115		0,029		0,014	
56	0,216	0,346	1,598		0,051		0,814	
57	0,330	0,565	1,713		1,308		0,011	
58	0,282	0,254	0,901		0,284	0,158	0,685	
59	0,089	0,133	1,494		0,038		0,318	
60	0,099	0,106	1,074		0,143		0,253	
61	1,106	0,776	0,701		2,157	0,936	1,331	
62	0,103	0,105	1,017		0,232		0,179	
63	0,264	0,154	0,585		0,318	0,387	0,349	
64	0,282	0,286	1,014		0,631		0,496	
65	0,058	0,086	1,488		0,206		0,026	
66	0,080	0,086	1,080		0,113		0,206	
67	0,043	0,066	1,520		0,016		0,156	
68	0,129	0,166	1,284		0,405		0,111	
69	0,293	0,310	1,059		0,441		0,730	
70	0,455	0,562	1,236		1,377		0,442	
71	0,185	0,186	1,002		0,354		0,387	
72	0,230	0,232	1,010		0,506		0,414	