

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK B HÜCRELERİNİN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES CEVABINDA
ATF6'NİN ROLÜ**

Hasibe VERDİ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr.Asuman Sunguroğlu**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 12B3330025 proje numarası ile desteklenmiştir.

2013-Ankara

KABUL ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma Tarihi: 30 / 09 / 2013

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Asuman SUNGURUĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Fulya VEKŞEN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Aslıhan AVCI
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Berrin İmge ERGÜDER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY İÇİNDEKİLER	i
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	xi
ÇİZELGELER	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tip I Programlı Hücre Ölümü, Apoptoz	2
1.2. Tip II Programlı Hücre Ölümü, Otofaji	6
1.2.1 Otofagozom Nükleasyonu	10
1.2.2. Otofagozom Genişlemesi	11
1.2.3 Vezikülün tamamlanması ve Lizozomal Degradasyon	12
1.2.4. Otofaji ve Tor Sinyali	14
1.2.5. Otofaji ve Lipidler	16
1.3. Endoplazmik Retikulum Stresi	19
1.3.1. Çift Zincir RNA ile Aktive Edilen Protein Kinaz (PKR)-Benzeri ER Kinaz (PERK)	22
2.3.2 Inositol – requiring enzyme 1 (IRE-1)	25
2.3.3. Aktive edici transkripsiyon faktör 6 (Activating transcription factor 6), ATF6	30
2.3.4 Pankreatik β Hücre Fizyolojisinde Otofajinin Rolü	33
2.3.5. ER ve Otofaji	35
2.3.6. ER Stresi ve Diyabet	36
2.3.7. Lipotoksitite Aracılıklı ER Stres	38
2.3.8. ER Stresi ve Hücre Ölümü	42
2.4. AMAÇ	43
2. GEREÇ ve YÖNTEM	44
2.1. Çalışmada kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	44
2.1.1 Hücre Kültürü	44
2.1.3. İmmunohistokimya	45

2.1.4. Monodansyl Cadaverine (MDC) Boyama	46
2.1.5. [3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotoksite Testi	46
2.1.6. RNA İzolasyonu	46
2.1.7. cDNA sentezi	47
2.1.8. cDNA Kontrol PCR	47
2.1.9. Agaroz Jel Elektroforezi	47
2.1.10. Eş Zamanlı PZR (RT-PZR)	48
2.2. YÖNTEMLER	49
2.2.1.a. Hücrelerin Çözülmesi	49
2.2.1.b. Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesi	49
2.2.1.c. Palmitik Asit ve Rapamisinin Hazırlanması	49
2.2.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite Testi	50
2.2.2 Hücre Kültürü Materyalinden RNA İzolasyonu	51
2.2.3.RNA Saflığının ve Miktarının Tayini	52
2.2.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi -	52
2.2.5. cDNA Kontrol PZR	53
2.2.6 Gen İfadelemesinin Saptanması	54
2.2.7. Mono-Dansyl-Cadaverine (MDC) Boyama	54
2.2.8. Immunohistokimyasal İnceleme	55
2.3. İstatistiksel Analizler	55
3. BULGULAR	56
3.1. INS-1E Hücrelerinin Mikroskopik İnceleme Bulguları	56
3.2. Palmitik Asit ve Rapamisinin INS-1E Hücrelerinde Zamana Bağlı Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Değerlendirme Bulguları	56
3.3. Palmitik Asit, Rapamisin, Palmitikasit+Rapamisin Uygulanan Hücrelerden INS-1E Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Sonuçları	60
3.3. cDNA Kontrol PZR	62
3.3. qRT PZR Sonuçları	62
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	73
4. TARTIŞMA	78
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	87

ÖZET	90
SUMMARY	91
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	102

ÖNSÖZ

Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazının korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir. Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; kanser, tip 2 diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir. Bugüne kadar ER stresine bağlı olarak tetiklenen Katlanmamış Protein Cevabı'nın (KPC), PERK ve IRE1 üzerinden işleyen mekanizmalar hakkında elde edilen veriler daha fazla olmakla birlikte ATF6 yolağındaki boşluklar henüz doldurulamamıştır. Ayrıca daha çok hücre hayatta kalımını devam ettirmek ve stresi çözmek ile ilgili genlerin aktivasyonuna katıldığı gösterilen ATF6 transkripsiyon faktörünün bazı koşullarda apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Ancak bu işleyişin mekanizması henüz bilinmemektedir. Bu kapsamda serbest yağ asidi palmitat ile stres yaratılan tip2 diyabetli pankreas hücrelerinde ATF6'nın rolü araştırılacaktır.

Bu tez çalışması sırasında bana pozitif bir bilimsel çalışma ortamı sunan, bilgisini, sevgisini ve şefkatini asla esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve doktora tez danışmanım Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca, her konuda, her durumda yardımlarını asla esirgemeyen, arkadaşlarım Dr.Buket Altınok, Dr.Tülin Özkan ve Dr.Aynur Karadağ'a sevgilerimi ve teşekkürlerimi iletirim.

Doktora tez hazırlama döneminde bana her türlü desteği veren, her türlü problemimin çözümünde her zaman yanımda olan Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. F.Belgin Ataç'a teşekkürlerimi sunarım.

Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım, tüm nazımı çeken canım arkadaşlarım Uzm. Bio. Yaprak Yalçın ve Yüksel Suer'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve beni asla yarı yolda bırakmayan sevgili arkadaşım Latif İba, koşulsuz ve sonsuz desteğini, sevgisini her zaman yanımda hissettiğim canım annem Nesrin Verdi, ablam Tuğba Verdi ve kardeşim Derviş Verdi ve CAN DOSTLARIM sizleri çok seviyorum...

SİMGELER ve KISALTMALAR

AIF	Apoptosis Inducing Factor (apoptoz indükleyici faktör)
Akt	Protein kinaz B
AMBRA1	activating molecule in beclin-1-regulated autophagy
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
Apaf I	Apoptotic Protease Activating Factor 1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör)
ATF6	Activating Transcription Factor 6
Atg	Autophagy related
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist /killer 1
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-W	Bcl2-like 2
Bcl-X _L	Bcl-2 like protein
Bfl-1	Bcl2 like 5
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 like 11
CHOP	C/EBP homologous protein, proapoptotic protein
CPT1	Carnitine palmitoyltransferase I
CRE	cAMP response element
CRT	Caltericuline
DAG	Diacylglycerol
DED	Death Effector Domain (ölüm etkisi bölgesi)
DISC	Death-Inducing Signaling Complex (ölümü indükleyen sinyal kompleksi)
DR	Death Receptor (ölüm reseptörü)
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 α
EndoG	Endonükleaz G

ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation
ERSE	ER stres element
ERSR	ER stres response
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FADD	FAS associated Death Domain (FAS ilişkili ölüm bölgesi)
FasR	FAS Receptor, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 6 (Tümör nekroz faktör reseptör süper ailesi üyesi 6)
FFA	Free Fatty Acids
GRP78 (BIP)	Glucose-Regulated Protein, 78
Hrk	Harakiri (death protein 5)
IRE-1	İnositol Requiring Enzyme 1
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
JNK	c-Jun N –terminal kinaz
KFERQ dizisi	Lys-Phe-Glu-Arg-Gln, şaperon aracılıklı otofajide hedef substrat dizisi
LC3 (MAP1LCA)	Light chain of the microtubule-associated protein 1
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) indirgenmiş formu
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion
PA	Phosphatidic acid
PAP	Phosphatidate Phosphohydrolase
PARP1	Poli ADP-Riboz polimeraz 1
PAS	Per-Arnt-Sim
PAS	Preautophagosomal structure
PASK	Per-Arnt-Sim kinaz, evrimsel olarak korunmuş serin/threonin kinaz
PE	Phosfotidiletanolamine
PERK	PKR-like eukaryotik iniation factor 2 α kinaz
PI3K	Fosfotidil Inositol 3 Kinaz
PKA	Protein kinaz A

PLD1	Phospholipaz D1
RACK1	receptor for activated C kinase 1
RIP1	Receptor Interacting Protein 1 (Reseptor ile etkileşen protein 1)
Smac/Diablo	Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with a Low pI
SMER	Small molecule enhancers of the cytosolic effects of rapamycin
SPH-1	Sfingosin-1 –phosphat
ŞAO	Şaperon Aracılıklı Otofaji
T2D	Tip 2 diyabet
TAD	Transactivation Domain
TNF-R1	Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1
TNF α	Tümör Nekroz Faktör α
TORC1	Target of Rapamycin Complex 1
TRAF	TNF reseptör –associated adapter protein
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligve (TNF ile ilişkili apoptosis indükleyici ligve)
TSC	Tuberous Sclerosis
ULK	Serin/threonin protein kinaz, otofagoforların oluşumunda rol alır
KPC	Katlanmamış Protein Cevabı, Unfolded Protein Response (UPR)
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene protein,otofajiyi pozitif yönde indükler
VCP	Valosin containing protein
Vsp15	PI3K düzenleyici alt ünite 4
Vsp34	Memeli sınıf III PI3K
WFS1	Wolfram syndrom1
XBP1s	spliced XBP1
XBP1u	unspliced XBP1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hücre ölüm yolları.	3
Şekil 1.2. Apoptotik hücre ölümünde içsel ve dışsal yolak aktivasyonu	5
Şekil 1.3. Otofaji tipleri: Makrootofaji, mikrootofji, şaperon aracılıklı otofaji.	8
Şekil 1.4. Makrootofajinin evreleri.	9
Şekil 1.5. Otofagozom ve otofagolizozom oluşumu.	10
Şekil 1.6. ULK kompleksinin oluşumu ve çekirdeklenme.	11
Şekil 1.7. İzolasyon membranının uzaması ve konjugasyon reaksiyonları.	13
Şekil 1.8. Otofaji ve TOR kompleksi.	15
Şekil 1.9. Lipidler ve lipid metabolize eden enzimler ve otofaji kontrolü	17
Şekil 1.10. PI3K sınıf I, sınıf III, mTOR kompleksi ve otofajinin düzenlenmesi.	18
Şekil 1.11. ER stresi ve KPC.	20
Şekil 1.12. Katlanmamış Protein Cevabının üç efektör proteini PERK, ATF6, IRE1.	21
Şekil1.13. ER stres durumunda PERK aktivasyonu	24
Şekil 1.14. PERK geribildirim mekanizması.	25
Şekil 1.15. ER stresi durumunda IRE-1 aktivasyonu.	27
Şekil 1.16. IRE-1 geribildirim mekanizması.	29
Şekil1.17. ER stres durumunda ATF6 aktivasyonu	31
Şekil 1.18. ATF6 geribildirim mekanizması.	33
Şekil.1.19. Hücre içinde serbest yağ asidi döngüsü.	39
Şekil 1.20. ATF6-palmitat-glukoz ifadenme düzenlenmesi.	40
Şekil 3.1. INS-1E hücreleri. İverted mikroskopta pasajveiktan sonra tutunup çoğalmaya başlayan 5.gündeki INS-1E hücreleri (x20)	56
Şekil 3.2. Hücre canlılık oranları	57
Şekil 3.3. Absorbans oranlarına bağlı hücre canlılık oranları. Hata barları standart sapmaları göstermektedir (p<0,05).	58
Şekil.3.4 RNA izolasyonu sonucu % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.	61
Şekil 3. 5. cDNA PZR örnekleri.	62
Şekil 3.6. Gen ifadenme değişim oranı hesaplama formülü.	63

Şekil 3.7. ATF6 qRT-PCR çalışması zaman-florosan grafiği.	63
Şekil 3. 8. Referans gen amplifikasyon eğrileri ve etkinlik değeri.	64
Şekil 3. 9. Hedef gen amplifikasyon eğrileri ve etkinlik değeri.	64
Şekil 3. 10. ATF6 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.	65
Şekil. 3.11. GRP78 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.	66
Şekil 3.12. PERKgeni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.	67
Şekil 3.14. CHOP geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen kat artışı.	68
Şekil 3.16. Atg7 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen kat artışı.	69
Şekil 3.17. Atg5 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen kat artışı.	70
Şekil 3.18. LC3-I geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen kat artışı.	70
Şekil 3.19. Bcl-2 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen kat artışı.	71
Şekil 3.22. LC3-II proteinin konfokal mikroskopta immunohistokimyasal boyama sonrası elde edilen görüntüsü.	74

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1 Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)	53
Çizelge 2.2 Komplementer DNA (cDNA) karışımı	53
Çizelge 2.3. Kontrol PZR protokol	54
Çizelge 3. 1. MTT testi istatistiksel analiz ($p < 0,005$)	58
Çizelge 3.2. Örneklere ait RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları	60
Çizelge. 3.3. Zaman-madde istatistiksel ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri	72

1. GİRİŞ

Programlı hücre ölümü (PHÖ) normal hücrelerin ölümü ve hayata kalımı arasındaki dengeyi sağlar. Apoptoz, otofaji ve programlı nekroz PHÖ'nün önemli üç formudur ve birbirlerinden morfolojik farklılıklarından dolayı kolaylıkla ayırt edilebilirler. Apoptoz veya tip I PHÖ ilk defa Kerr ve arkadaşları tarafından ortaya koyulmuştur (Kerr, Wyllie ve ark., 1972). Ölen hücrede küçülme, çekirdek yoğunlaşması ve fragmantasyona uğraması, membranda kabarcık oluşması, komşu hücreler veya ekstrasellüler matriks ile olan bağlantının kopması gibi belli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterizedir. Kromozomal DNA'nın çekirdek içi fragmentler şeklinde kesilmesi, fosfotidil serinin eksternalizasyonu ve hücre içindeki birçok substratın belli proteolizislerce kesilmesi görülen biyokimyasal olaylardır (Martin ve Green 1995, Cohen, Sun ve ark., 1994).

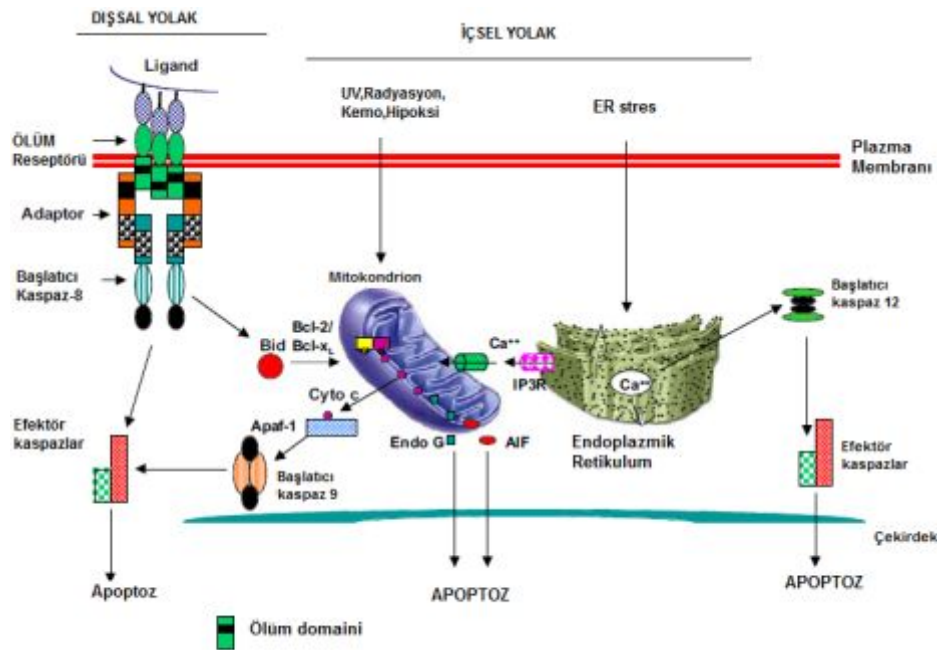
Otofaji veya tip II PHÖ, evrimsel olarak korunmuş katabolik bir işlemdir. Sitoplazmik makromolekül ve organelleri çevreleyen çift membrandan oluşan ve otofagozom denilen bu yapılar döngüye yeniden katılmalarını sağlamak amacıyla uzaklaştırılır (Huett, Goel ve ark., 2010). Normal koşullarda otofajinin hücre homeostasında, hücrenin hayatta kalmasını sağlamak adına çok önemli bir rolü vardır.

Nekroz veya tip III programlı hücre ölümü yıkıcı bir hücre ölümü olarak bilinmektedir (Choi, Rytter ve ark., 2013). Bazı tip nekrozlarda genetik inhibitörlerin olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir ki bu bulguda bazı nekrotik ölümlerin alt formlarının genetik bileşenleri olduğunu düşündürmektedir (Portt, Norman ve ark., 2011). Örneğin apoptozun aktive olmasına ek olarak tümör nekroz faktör (TNF) α reseptörlerinin stimülasyonu, nekropatozis denilen programlanmış nekrozu indüklenmesine neden olduğu gösterilmiştir (Rosenbaum, Degterev ve ark., 2010). Reseptör aracılıklı aktive olan reseptör ilişkili protein 1 kinazlar (receptor interacting protein 1, RIP1), poli (ADP- riboz) polimeraz 1 (PARP1), NADPH oksidazlar ve kalpeinlerin programlı nekrozun düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir. Hücreler

nekroz ile ölüme gittiğinde hücre membranının bütünlüğü bozulur ve hücre içindeki materyaller hücre dışı ortama bırakılır bu da bağışıklık sistemi hücrelerinin inflamatuvar cevap oluşturmaya neden olur (Ouyang, Shi ve ark., 2012).

1.1. Tip I Programlı Hücre Ölümü, Apoptoz

Major tip hücre ölümüdür ve hücre içi ve hücre dışı çeşitli uyarılar ile tetiklenir. Hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi kalsiyum (Ca) seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozukluklarıdır. Hücre dışı sinyaller ise çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, iskemi, toksinler ve radyasyon gibi hücrenin maruz kalabileceği dış etkenlerdir. Hücreye gelen bu sinyaller hücre içi proteaz sistemi olan kaspazları aktive etmektedir. Kaspazlar, temel olarak morfolojik bir olay olan apoptozun gerçekleşmesini sağlayan ana moleküllerdir. Apoptozda kaspazların aktivasyonu temel olarak iki yolak ile sağlanabilir. Bunlar mitokondriyal (intrinstik) ve hücre ölüm reseptör (ekstrinstik) yolağıdır. Son yıllarda üstünde durulan üçüncü bir yolda endoplazmik retikulum (ER) aracılı yoldur. Bu yollar birbirinden çok farklı mekanizmalar olmamakla birlikte sonunda ortak moleküllerin aktivasyonu ile hücreyi apoptoza götürürler (Eum ve Lee 2011).



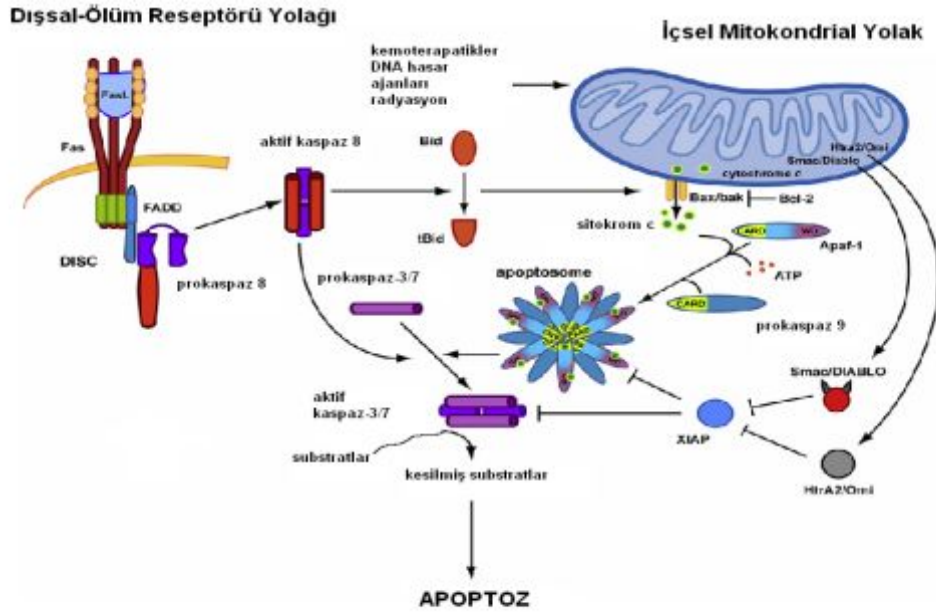
Şekil 1. 1. Hücre ölüm yolları (Gupta 2005).

Apoptozun genetik mekanizma üzerine yapılan çalışmalarda ilk olarak *Coenorhabditis elegans* isimli bir nematod kullanılmıştır. *C.elegans*da apoptozda düzenleyici moleküller olarak bulunan ced'erin, memelilerdeki analogu kaspazlardır. Kaspazlar, normalde sitoplazmada inaktif proenzimler olarak bulunan proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçen sistein proteazlar olarak bilinen bir ailedir. Adlarını da, proteinleri aspartik asit bölgelerinde kesmeleri (cleavage-C) ve yapılarında sistein taşımalarından dolayı almışlardır. Memelilerde şimdiye kadar 14 grubu tanımlanmıştır. Kaspazlar, sitokin matürasyonuna aracılık edenler (kaspaz-1,4, 5, 13), apoptotik hücre ölümü sürecinde efektör görevi üstlenenler (kaspaz-2, 3, 7) ve apoptotik hücre ölümünde aktivatörler (kaspaz-6, 8, 9, 10) olmak üzere üç ayrı grupta toplanmıştır. Aktivatör kaspazlar efektör kaspazları etkin hale getirir. Efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3 apoptotik yolların ortak buluşum noktasıdır. Kaspaz 3 etkin hale getirildiğinde apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan diğer proteolitik aktiviteye sahip yolların aktivasyonunu sağlar. Kaspaz 3 ile DNA tamirinde rol oynayan poli ADP riboz polimeraz (PARP) enziminin proteolitik yıkımı, DNA onarımını engeller. Aynı zamanda efektör kaspazlar ile DNA replikasyonu ve tamirini sağlayan DNA topoizomerazı da yıkıma uğratar. DNA

endonükleazın serbestleşmesini sağlayan kaspazlar DNA kırıkları oluşumuna neden olur. Çekirdekte bir diğer önemli değişiklik de çekirdeğin şeklini sağlayan intranükleer proteinler ve laminlerin yıkıma uğratılmasıdır. Bu moleküler değişiklikler apoptozun çekirdekte gözlenen kromatin kondensasyonu ve parçalanması gibi tipik morfolojik özelliklerinin sebebidir (Kumar 2007).

Tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNF-R1), Fas (CD95), DR3/4/5/6, TRAIL-R1/2 içeren ölüm reseptörü ailesi üyeleri apoptoza neden olan dışsal yolağı başlatırlar. Ölüm reseptörleri ekstrasellüler kısımda sisteinden zengin tekrar bölgeleri içerirken, sitoplazmik bölümlerinde ölüm alanı (death domain, DD) adı verilen bir aminoasit dizisini bulundurlar. Bu alana sitoplazmada bulunan adaptör proteinler bağlanmaktadır. Ölüm aktivatörlerinin, ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmada bulunan adaptör proteinler ölüm alanlarına bağlanarak oligomerize olurlar. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar "Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksi (DISC) " denen yapıyı oluştururlar. DISC kompleksinde prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'un aktivasyonu gerçekleşir. Prokaspaz-8 aktivasyonundan sonraki basamaklar hücrelerde farklılıklar göstermektedir. Tip 1 hücrelerde kaspaz-8 direk olarak prokaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Tip 2 hücrelerde ise kaspaz-8 orta derecede aktive edilmiştir ve prokaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlayamaz. Bu hücrelerde prokaspaz-8, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi olan Bid'i aktif hale getirir. Aktif hale gelen Bid mitokondriyal membran geçirgenliğini arttırarak, mitokondriyal yolağın aktivasyonunu sağlar ve apoptozu başlatır (Sayers 2011) .

Hücrelerdeki içsel yolak genellikle mitokondri merkezlidir ve mitokondri tarafından düzenlenir. En çok çalışılmış içsel apoptozis formu, strese bağlı mitokondriden sitokrom c salınımı ve bunun sonucunda da apoptozom oluşumudur. Apoptozom daha sonra başlatıcı kaspazı aktive eder ki bu genellikle kaspaz 9 dur. Kaspaz 9 aktivasyonu infazcı kaspaz olan kaspaz 3'ün aktive olmasını sağlar. Kaspaz 3 aktivasyonu dışsal yolakta görülen apoptotik cevabın başlamasına neden olur. Apoptotik stimülasyona cevap olarak Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri (Bax ve Bak) aktive olurlar ve mitokondriden sitokrom c salınımını başlatırlar.



Şekil 1. 2. Apoptotik hücre ölümünde içsel ve dışsal yolak aktivasyonu (Lamkanfi ve Dixit 2010).

Diğer apoptotik proteinler Smac/Diablo, bir serin proteaz olan Omi/HtrA2, endonükleaz G (EndoG) ve apoptoz indükleyici faktör (apoptosis inducing factor, AIF) de mitokondriden salınırlar. Mitokondri üzerinde çok önemli rolleri olan bu proteinler ile birlikte başka proteinlerde oldukça sıkı kontrol edilmektedirler. Bu proteinlerden bazılarının diğer programlı hücre ölüm yollarında da rolleri vardır (Brenner ve Mak 2009).

Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozun anahtar düzenleyicileridirler. Bu proteinler mitokondrion ve ER zarında bulunur. Tüm Bcl-2 ailesi üyeleri Bax, Bak, Bad, Bcl-X_s, Bid, Bik, Bim, Hrk gibi pro-apoptotik ve Bcl-2, Bcl-X_l, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi anti apoptotik proteinlerden oluşur. Ölüm sinyalini takiben pro-apoptotik proteinler defosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyondan sonra, kesime uğrayarak aktif hale gelirler ve apoptozun başlayacağı mitokondriyona geçerler (Shamas-Din, Brahmhatt ve ark., 2011). Tüm BH3 only molekülleri içsel yolaktaki pro-apoptotik aktivitelerini gösterebilmeleri için çok bölgesel BH3 proteinlerine (Bax ve Bak) ihtiyaç duyarlar. Aktif hale gelen Bax ve Bak, sitokrom c nin ve mitokondri kökenli kaspaz aktivatörünün salınmasını sağlar. Mitokondrial dış membran

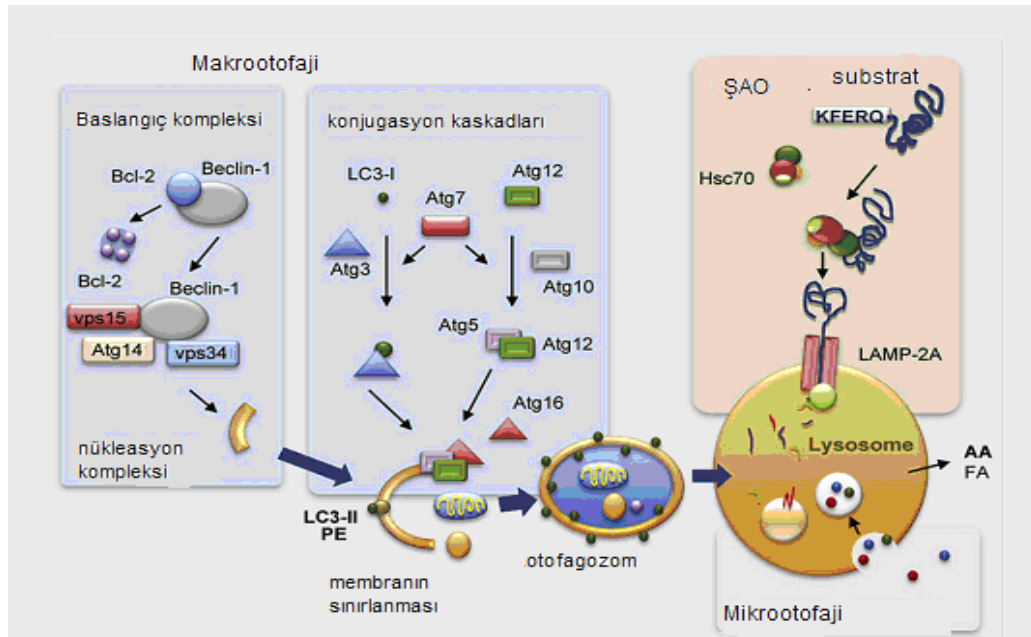
apoptotik stimülasyona cevap olarak geçirgen hale gelir. Sitokrom c bir defa sitozole salındığında apoptotik peptidaz aktive eden faktör -1 (Apaf-1) ile etkileşime girer ve kaspaz 9'un aktif hale gelmesini sağlar. Aktive olan kaspaz 9 kaspaz 3'ü aktif hale getirir bunu takiben daha sonra gelen kaspaz kaskadı aktive olur ve sonucunda da apoptoz gerçekleşir (şekil 1.2) (Ouyang, Shi ve ark., 2012).

Sitoplazmada sitokrom c, Apaf-1'e dATP veya ATP varlığında bağlanır ve Apaf-1'in kendi kendine oligomerizasyonunu sağlar. Apaf-1 ve kaspaz 9, protein etkileşim motifi CARD bölgesini taşımaktadırlar ve Apaf-1 kaspaz 9'a CARD-CARD etkileşimi ile kuvvetle bağlanmaktadır. Oluşan yapı apoptozomdur daha sonra oluşan dimerizasyon kaspaz 9'u aktive eder.

1.2. Tip II Programlı Hücre Ölümü, Otofaji

Stresin indüklediği katabolik bir işlemdir ve tüm ökaryotlarda korunmuş bir mekanizmadır. Hücre içi makro moleküller ve organeller bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilir ve lizozomla birleşerek burada parçalanır. Kısa ömürlü proteinler ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanırken, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları (Örn. aminoasitler) hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar. Taşınacak kargonun lizozoma gidiş şekline bağlı olarak otofaji 3 farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir: Şaperon aracılıklı otofaji, mikrotofaji, makrotofaji. Şaperon aracılıklı otofaji yüksek yapılı ökaryotlarda görülmekle birlikte mayalarda bulunmamaktadır. Şaperon aracılıklı otofaji de bir şaperon proteini ilkönce katlanmamış olan KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) dizisine sahip sitozolik hedef substratına ve daha sonrada lizozomal membrandaki bir reseptöre bağlanır. Katlanmamış olan sitozolik hedef protein doğrudan lizozom içine aktarılır ve orada degrade edilir. Mikrotofajide sitoplazmik materyal, lizozom veya vakuol içine lizozomal veya vakuoler membranın bir kılıf, bir çıkıntı oluşturmasıyla veya bölmeli bir yapı oluşturması ile alınır (Krick, Muehe ve ark., 2008). Makrotofaji sitozolik otofagozom adı verilen bir sitoplazmik çift membran vesikülün oluşumu ile karakterizedir. Makrotofajide sitoplazmik

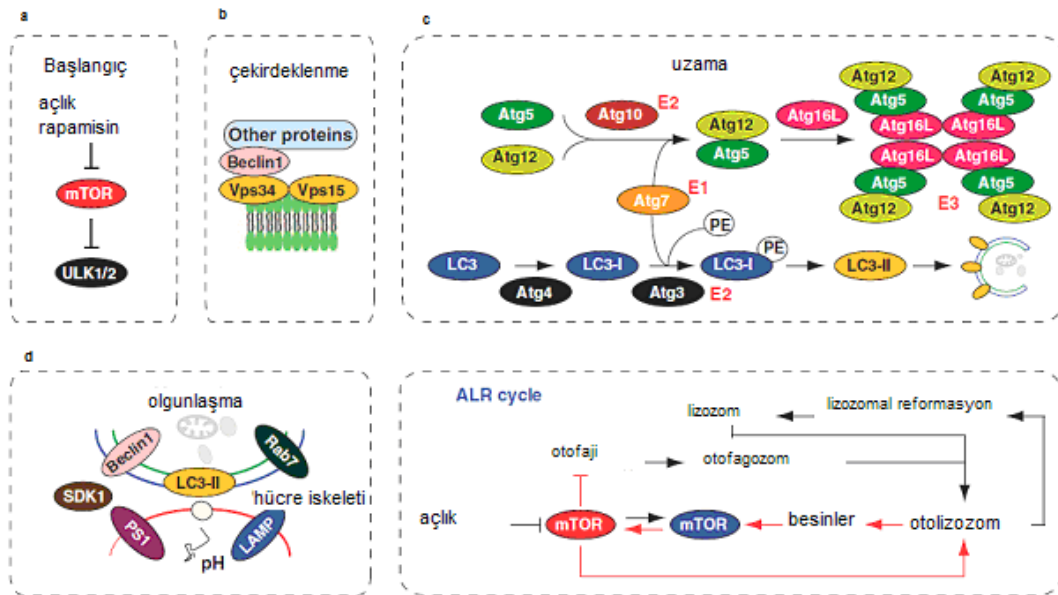
proteinler, organeller veya diğ er materyaller fagoforlar tarafından çevrelenirler bu fagoforlar genişleyip ortadan kaldırılacak materyali tamamen çevrelediğ inde otofagozomlar haline gelirler. Yapılan ç alışmalar bazı form otofajilerde otofagozomal membranın yapısında bulunan lipidin endoplazmik retikulumdam ve plazma membranından geldiğ ini göstermektedir (Youle ve Narendra 2011). Bazı otofaji formlarında otofagozomal membranlar (lipid otofagozomlar) lizozomlar ile birleşerek (veya vakuoller ile) otolizozomları oluştururlar ve sitoplazmik kargolar lizozomlarda bulunan hidrolazlar tarafından degrade edilirler. Degredasyon sonucu oluşan ürünler membran permeazların aktivitesi ile tekrar kullanılabilmeleri için sitozole gönderilirler (Klionsky 2007). Bugün 2 tip makrotofajinin olduğu bilinmektedir. Hücreler seçici olmayan makrotofaji sayesinde besin yokluğ unda dış çevreden tekrar besin elde edene kadar önemli metabolik yapıtaşları ve enerji sağ larlar. Bunun aksine kargo özgül makrotofajide, besinden zengin ortamda fazla olan veya hasara uğ ramış organellerin ve protein agregatlarının toksik bir etki yaratmamaları adına ortadan kaldırılmaları gerç ekleştirilir. (Ribofaji; ribozomun ortadan kaldırılması, mitofaji; mitokondrionun ortadan kaldırılması). Bu tip otofaji besin kaynağ ının değ işimini takiben ve gelişimsel iç lemler sırasında da görölür. Bu üç otofaji formundan üzerinde en fazla ç alışma yapılmış olan ve mekanizması en fazla aydınlatılmış olan makrotofajidir ve bundan sonra bahsedilen otofaji makrotofajidir (ř ekil 1.3).



Şekil 1.3. Otofaji tipleri: Makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılıklı otofaji.

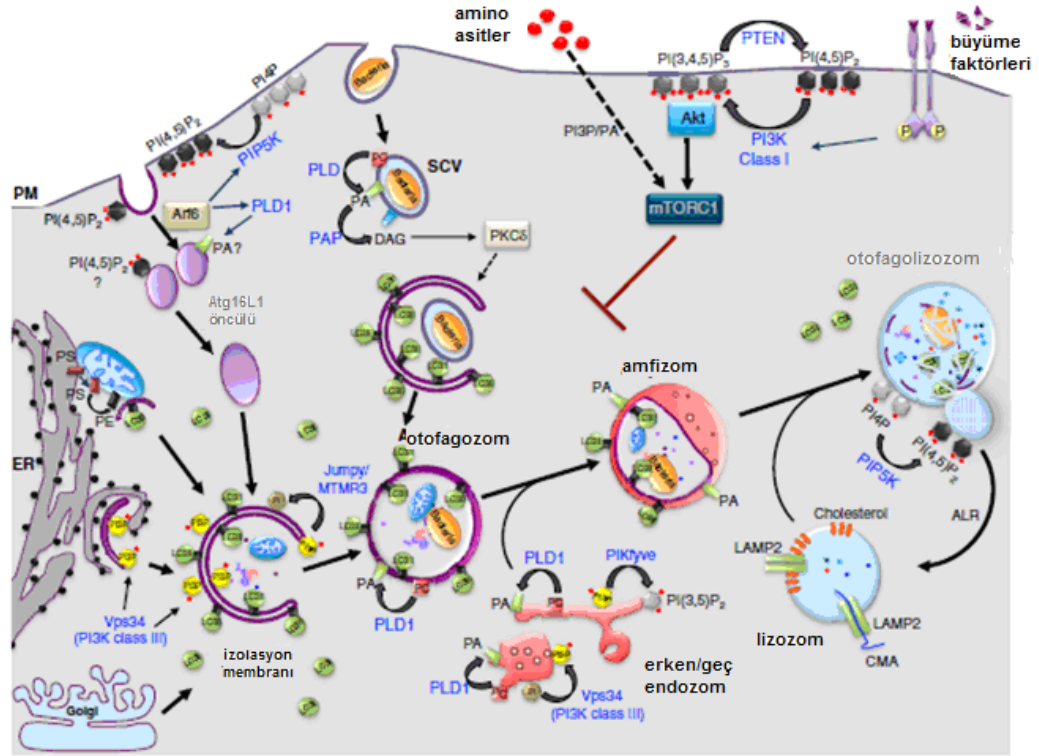
Otofaji, oldukça iyi düzenlenen bir işlemdir ve otofaji ilişkili proteinler (autophagy related proteins, Atg) tarafından düzenlenir. Günümüzde 30'dan fazla Atg proteini tanımlanmıştır. Bu otofaji genlerinin fonksiyonel karakterizasyonu yapıldığında otofagozomların oluşması için en az dört major protein kompleksine ihtiyaç olduğu görülmüştür.

1. Atg1-Unc-51-like kinaz (ULK) kompleksi: TOR'dan gelen sinyallere aracılık yapan ilk komplekstir (Şekil 1.4 a).
2. Otofaji özgül sınıf III fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) veya Vps34 kompleksi: otofagozom oluşumu ve olgunlaşmasında önemli olan fosfatidilinositol 3 fosfat havuzu oluşturur (Şekil 1.4 b).
3. Transmembran protein Atg9/mAtg9 ve onun trafik sistemi: otofagozom biyogenezini sırasında membran uzaması ve membran kısaltılmasının kontrolünü sağlar (Şekil 1.4c).
4. Ubikuitin benzeri proteinler Atg12 ve Atg8/LC3 ve onların konjugasyon sistemi: otofagozom oluşumu için gerekli olan Atg8/LC3'ün fosfatidiletanolamin (PE) ile lipidlenmesini sağlar (Şekil 1.4d) (Dall'Armi, Devereaux ve ark., 2013).



Şekil 1. 4. Makrotofajinin evreleri (Dall'Armi, Devereaux ve ark. 2013).

Atg proteinlerinin bir kısmı ve çeşitli protein kompleksleri “otofajik kesecik” veya “izolasyon membranının” ve otofagozomun oluşumunda rol almaktadır. Bu protein kompleksleri hücrede sadece “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen bölgelerde değil aynı zamanda endoplazmik retikulum ile golgi yapılarının aralarına dağılmış olan bölgelerde, mitokondri, plazma membranı ve endo-lizozomal sistemlerde fizyolojik olarak birbirini takip eden aşamalarda da fonksiyon gösterirler (Dall'Armi, Devereaux ve ark., 2013).

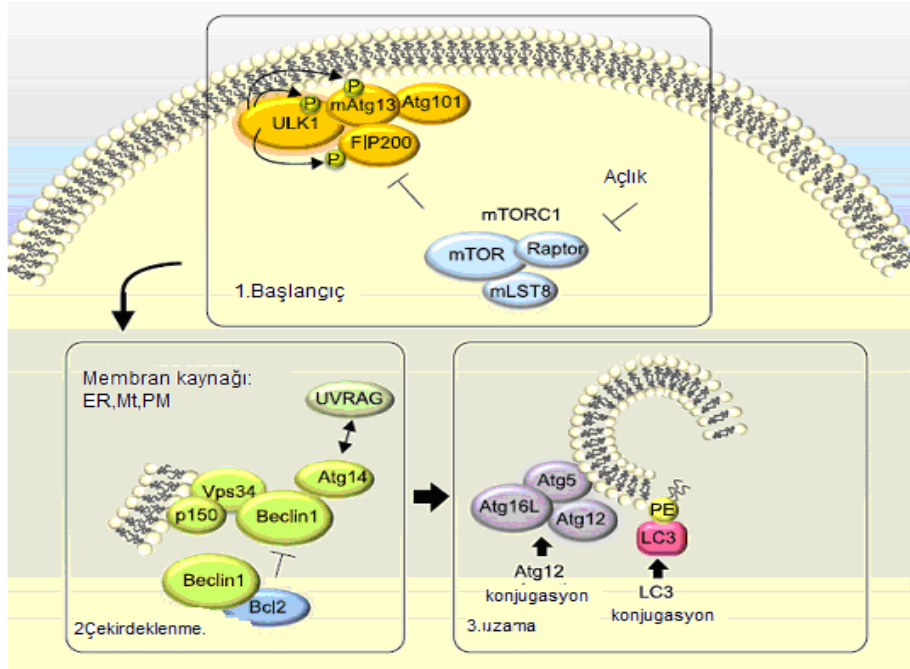


Şekil 1.5. Otofagozom ve otofagolizom oluşumu (Dall'Armi, Devereaux ve ark., 2013).

1.2.1 Otofagozom Çekirdeklenmesi

Memelilerde sınıf III PI3K (Vps34), sınıf IIIPI3K kor kompleksini oluşturmak için Beklin-1 ve p150 (Vps15 (fosfoinositid-3-kinaz düzenleyici alt ünite4)) ile bağlanır. Otofagozom nükleasyonu için Beklin-1 çok önemlidir. Sınıf III PI3K kor kompleksi ile ilişkiye girerek PI(3)P oluşumunu sağlar. Beklin-1'in Vps34 ile olan bağlantısı Vps34'ün katalitik aktivitesini arttırdığı ve PI(3)P miktarının artmasına neden olduğu bilinmektedir. Patojen infeksiyonu, kanser ve nörodejenerasyon patogenezinde rolü olduğu bilinen Beklin-1'in moleküler fonksiyonu henüz tam olarak çözülememiştir. Beklin-1 tarafından toplanan proteinlere bağlı olarak sınıf IIIPI3K kompleksleri otofagozom oluşumunu farklı şekilde düzenlemektedir (şekil 1.5). Atg14L, UVRAG, AMBRR1, Bif1 farklı durumlarda Beklin-1 ile bağlanarak otofajiyi pozitif yönde düzenlemektedirler. Rubican ve Beklin-1'e bağlanarak sınıf III PI3K kompleksi ile olan bağlantısını bozan Bcl-2 ve Bcl-XL ise otofajiyi negatif yönde

düzenlemektedirler. Ancak sınıf III PI3K kompleksinin ve bu kompleksin diğer bileşenler ile olan etkileşiminin nasıl düzenlendiği tam olarak çözülememiştir (Pyo, Nah ve ark., 2012).



Şekil 1.6. ULK kompleksinin oluşumu ve çekirdeklenme (Pyo, Nah ve ark., 2012).

1.2. 2. Otofagozom Genişlemesi

İki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi otofagozom membranlarının genişlemesine katılmaktadır. Birinci ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi, pre otofagozomların oluşumunda önemli olan Atg12-Atg5-Atg16L'dir. Atg12, 186 aa'lık bir proteindir ve Atg5 ile birleşir. Atg12'nin karboksi terminalindeki glisin rezidusu, E1 benzeri Atg7 tarafından yüksek enerjili tioester bağı şeklinde ATP bağımlı olarak aktiflenir. Daha sonra Atg12, E2 benzeri Atg10'a transfer edilir. Daha sonra da Atg5'in lizin 149'una izopeptid bağı ile eklenir. Atg12-Atg5 daha sonra Atg16L ile birleşerek yaklaşık 350 kDa'luk multimerik Atg12-Atg5-Atg16 kompleksini oluşturur. Otofagozom oluşumu

tamamlandıktan sonra Atg proteinleri bilinmeyen bir mekanizma ile tekrar sitoplazmaya dönmektedir (şekil 1.7).

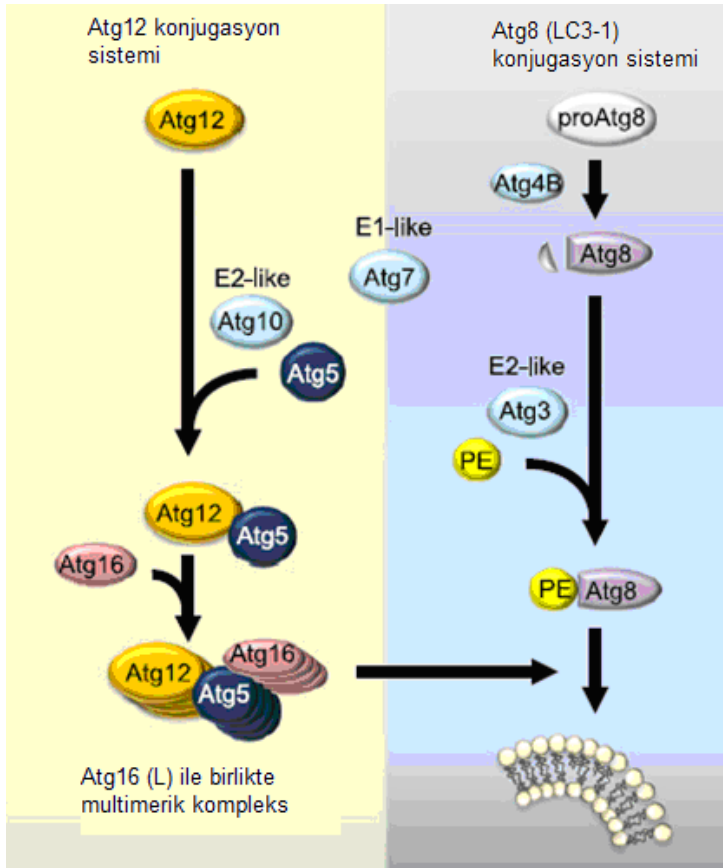
İkinci ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi ise LC3'ün fosfolipid fosfotidiletanolamin (PE) ile olan modifikasyonudur. LC3 bir sistein proteaz olan Atg4 tarafından kesilir ve daha sonra Atg7 ve ikinci bir E2 benzeri enzim olan Atg3 tarafından PE ile birleştirilir. Lipidlenmiş LC3 (LC3-II), yeni oluşturulmuş olan otofagozom membranlarına bağlanır. LC3-II, lizozom ile birleşene kadar olgun otofagozomlar üzerindedir. LC3'ün LC3-II'ye dönüşümü bilinen en iyi otofaji indüksiyon belirteçidir. Ancak sadece LC3-II artışı otofaji aktivasyonunu göstermek için yeterli değildir çünkü bozulan otofaji mekanizması ile LC3-II'nin degradasyonunun inhibisyonu LC3-II birikimine neden olabilmektedir (Gozuacik 2011).

Otofajik vakuollerin orijini hakkında henüz tam bir bilgi bulunmasa da bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Bu konudaki birinci hipotez Atg9 rezervarları tarafından otofagozomların “de novo” oluşturulduklarını söylemektedir (Mari, Griffith ve ark., 2010). İkinci hipotezde ER, mitokondri ve plazma membranı gibi çeşitli organellerin fagofor oluşumu için bir orjin olarak kullanıldığı söylenilmektedir (Pyo, Nah ve ark., 2012). En son olarak da omegazom denilen kupa şeklindeki bir yapının ER'den ayrı bir bölgede otofagozom oluşumu için bir platform oluşturduğu saptanmıştır (Tooze ve Yoshimori 2010).

1.2.3 Vezikülün Tamamlanması ve Lizozomal Degradasyon

Otofaji yolağının tamamlanmasındaki en son aşama otofagozomun lizozomlar ile birleşmesidir. Sitoplazmanın çift membranlı sitozolik bir vezikül içine alınmasını takiben vezikül bir geç endozom ile veya lizozom ile birleşerek bir otofagolizozom (otolizozom) oluşturur. Otofagozomun içteki membranı ve sitoplazmadan getirilen materyaller lizozomal hidrolazlar tarafından degrade edilirler. Otofagozomlar ile lizozomların birleşmesi için ilk adım otofagozom maturasyonudur. Rab22, Rab24

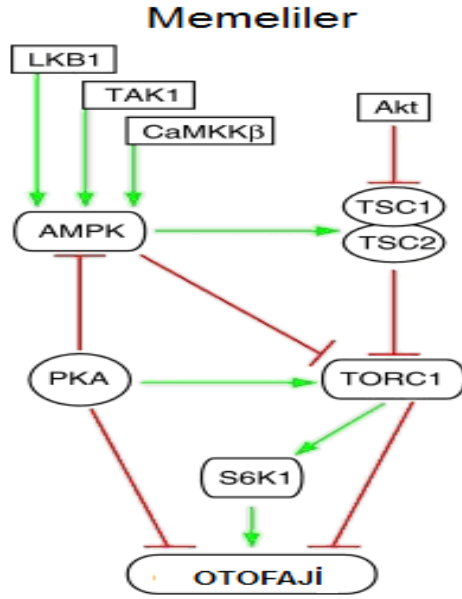
gibi monomerik GTPazların yanı sıra mayalardaki SNARE protein ailesi ortologları ve N-etilmaleimid –hassas fuzyon (NSF) proteini otofagozom maturasyonuna katılmaktadır (Pyo, Nah ve ark., 2012). Yapılan son çalışmalar UVRAG, Rubicon, presenilin-1, valosin containing protein-1 (VCP) ve syntaxin -5 SNARE kompleks proteinlerinin de otofagozom olgunlaşması ve degradasyonuna katıldığını göstermektedir (Pyo, Nah ve ark., 2012). Ayrıca ubikuitinlenmiş kargo proteinlerinin tanınmasında ve multiveziküler badilere taşınmasında rol alan ESCRT sisteminin de otofagozom lizozom füzyonunda rol aldığı saptanmıştır (Pyo, Nah ve ark., 2012).



Şekil 1.7. İzolasyon membranının uzaması ve konjugasyon reaksiyonları.

1.2.4. Otofaji ve Tor Sinyali

TOR özellikle de TORC1 (Tor kompleksi 1), Atg13 ve Atg 1 gibi Atg proteinlerini doğrudan fosforlayarak veya otofajiyi düzenleyen diğer proteinlerin sinyal iletim kaskadlarını doğrudan etkileyerek otofajiyi düzenler. Büyüme veya yüksek besin koşullarında aktif olan mTORC1, ULK1 kinaz kompleksi (ULK1, mAtg13, FIP200, Atg101) ile etkileşim halindedir. ULK1 ve mAtg13'ü fosforlayarak ULK1 kinaz kompleksinin membranı hedeflemesini engeller. Açlık koşullarında ise inaktif olan mTORC1 ULK1 kinaz kompleksinden ayrılır. Serbest kalan ULK1 kinaz kompleksi mAtg13 ve FIP200'ü fosforlayarak otofaji indüksiyonunu başlatır. TORC1'in birçok sinyal yolağı üzerinden otofajiyi düzenlediği bilinmektedir. Örneğin adenosin monofosfatın aktive ettiği protein kinaz (AMPK) molekülünün katıldığı yolak otofajiyi aktive ederken protein kinaz B (Akt) üzerinden giden yolak otofajiyi baskılamaktadır. Memeli hücrelerinde AMPK, TORC1'i ya doğrudan inhibe ederek ya da TORC1'in bir üst efektör molekülü olan tuberous sclerosis 2(TSC2)'yi aktive ederek negatif olarak düzenler. Protein kinaz A (PKA) ve TOR yolaklarının sırası ile karbon ve nitrojen kaynaklarını algılayan ve birbirine paralel seyreden iki yolak olduğu düşünülmekteydi. Ancak yapılan çalışmalar bu iki yolak arasında bir konuşma olduğunu göstermiştir. Memelilerde PKA, TORC1'in alt ünitesi olan PRAS40'ı fosforlayarak aktive olmasını sağlar. Ayrıca AMPK'yı fosforlayarak inaktif olmasına neden olur ki bu da dolaylı yoldan TORC1'in aktive olmasını sağlar. PKA ayrıca LC3'ü doğrudan fosforlayarak veya otofajiyi inhibe eden TORC1'i aktive ederek otofajiyi negatif olarak düzenler (şekil 1.8).



Şekil 1.8. Otofaji ve TOR kompleksi (Klionsky 2011).

Memelilerde bulunan TORC1'in substratı olan S6K1, otofajinin pozitif düzenleyicisidir. Akt, TOR sinyal yolağında bulunan TSC1-TSC2 kompleksinin negatif düzenleyicisidir (Klionsky 2011, Floto, Sarkar ve ark., 2007). mTOR besin koşullarının değişimine cevap olarak çeşitli hücre işlevlerini kontrol eder. Özellikle mTOR kompleks 1 (mTORC1) Rag GTPase, Rheb ve Vps 34'e ihtiyaç duyar. Hücrel enerji homeostazının anahtar düzenleyicisi AMPK'dır ve enerji seviyeleri AMPK tarafından algılanır. Düşük enerji durumlarında AMPK aktive olur ve aktive olan AMPK, TSC1/TSC2 ve Rheb proteinleri yolu ile mTORC1'i inaktive eder. mTORC1 inaktivasyonu otofaji induksiyonu için çok önemlidir ve otofajide merkezi bir rol oynar. Amino asit sinyaline ek olarak hormonlar, büyüme faktörleri ile birlikte Bcl-2, ROS, kalsiyum, BNIP3, p19ARF, DRAM, kalpein, TRAIL, FADD, IP3'ün otofajiyi düzenlediği gösterilmiştir. Ancak tüm otofaji sinyallerinin mTOR yolağı üzerinden çalışmadığı SMER'ler (small molecule enhancers of the cytostatic effects of rapamycin) denilen moleküllerin mTOR'dan bağımsız olarak otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (Floto, Sarkar ve ark., 2007).

1.2.5. Otofaji ve Lipidler

Lipidler ve lipid metabolize eden enzimler otofajiyi dört temel aşamada kontrol ederler.

1.Otofaji başlamasını negatif olarak düzenleyen mTOR yolağı ile birleşen sinyal kaskadlarını düzenlerler. Bu sinyal kaskadının merkezinde sınıf I PI3K'lar ve onların ürünü olan fosfatidilinositol 3,4,5 tri fosfat PI(3,4,5)P₃ bulunmaktadır.

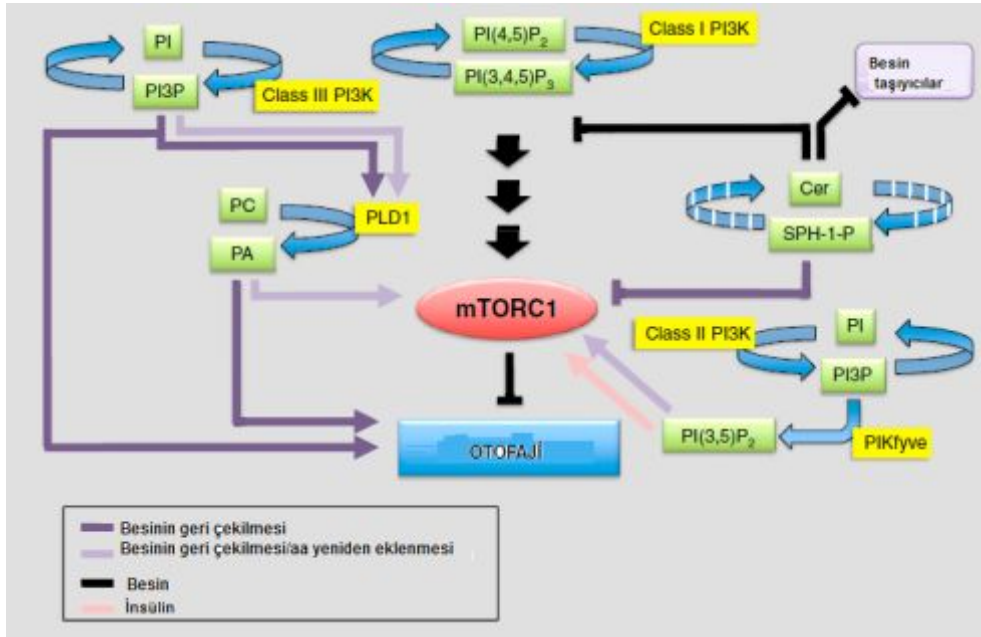
2.Lipidler membrana bağlı bulunan sinyallerdir. Membran deformasyonu, genişlemesi ve vezikül transportunu düzenleyen özel sitozolik protein efektörlerini toplayarak membran dinamiklerini kontrol ederler. Bu düzenlemeye en iyi örnek PI3P'dır. PI3P, bu mekanizma ile otofagozomların biyogenezini ve olgunlaşmasını kontrol eder.

3.Amin içeren fosfolipidlerin örneğin PE'nin Atg8/LC3'e bağlanması, fagoforların uzamasını ve kapanmasını sağlamaktadır.

4. Lipidler protein efektörlerden bağımsız olarak lipid bilayerlerin fizikokimyasal özelliklerini doğrudan etkileyerek membran dinamiklerini kontrol edebilirler (şekil 1.9) (Dall'Armi, Devereaux ve ark., 2013).

mTORC1, ortamda bulunan besine bağlı olarak hücrenin cevabını (hücre büyümesi ve proliferasyonu) düzenlemektedir ve otofajinin anahtar KPC sensörüdür. Eşit miktarda bulunan amino asitler, glukoz ve büyüme faktörleri mTORC1 aktivasyonu için gereklidir. Lipid enzimleri ise mTORC1 düzenlenmesi için major bir rol oynarlar. Besin veya mitojen varlığında sınıf I PI3K ürünü PI(3,4,5)P₃ dolaylı yoldan mTORC1'i aktiflemektedir. Besin yokluğunda ise mTORC1 sinyali kapanır ve bazı lipidler (fosfotidil inositol 3 fosfat (PI3P), fosfatidik asit (PA) , sfingosin-1-fosfat (SPH-1P)) otofajinin pozitif modülatörü olarak davranırlar. Özellikle sfingozin kinaz 1 tarafından üretilen SPH-1-P mTORC1 inhibisyonu gerçekleştirirken, sınıf III PI3K tarafından üretilen PI3P, fosfolipaz D1 (PLD1) tarafından üretilen PA ve fosfotidik asit fosfohidrolaz (PAP) tarafından üretilen diaçil gliserol (DAG), mTORC1 aktivitesini düşürürler ve otofaji aktivasyonunu modüle eden membran oluşumu sinyalizasyonunu kontrol ederler. PI3P ve PA'nın mTORC1 regülasyonunda antagonistik bir etkisi vardır: amino asit önce çekilip daha sonra ortama tekrar

aktivasyonunu sağlayan insülin yolağı üzerinden otofajiyi düzenler. Sınıf III PI3K (Vps34), Beklin-1 ve p150 ile ilişkiye girer ve sınıf III PI3K kor kompleksini oluşturur. Fosfatidilinositol -3-kinaz (PI3K) /AKT/ mTOR yolağı büyüme faktörünün stimüle ettiği glukoz alınımı ve metabolizmasının kontrolünde çok önemli bir rol oynar. PI3K, fosfatidilinositol (PI)4,5 bifosfatını (PIP2) fosforlanarak PI3,4,5 trifosfat (PIP3) olmasını katalizler. Büyüme faktörü sinyalleri alındığında PIP3 toplanır, Akt'ın birikmesini ve fosforlanmasını sağlar (şekil 1.10).



Şekil 1.10. PI3K sınıf I, sınıf III, mTOR kompleksi ve otofajinin düzenlenmesi.

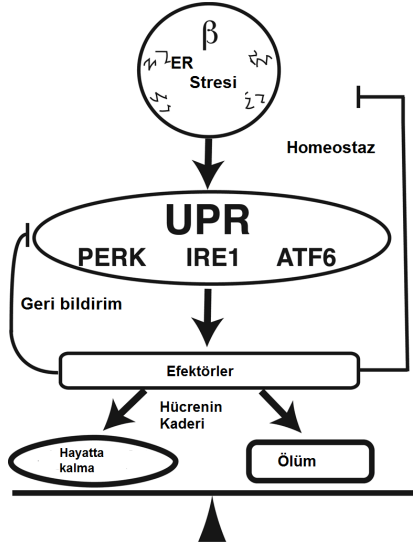
Aktive olan Akt protein translasyonunu, glukoz metabolizmasını koruyarak ve otofaji ve apoptozu inhibe ederek, metabolizmayı birçok yoldan destekler. Akt, büyüme faktörünün stimüle ettiği glukoz alınımında ve hücre yüzeyinde Glut I yerleşmesiyle gerçekleşen glikolizisde oldukça önemlidir. Hezkokinazların aktivitesinin artırılmasını ve yerleşimlerinin doğruluğunu kontrol ederek fosforilasyonlarını desteklerken glukozun katabolizmasını da kontrol eder. Akt aynı zamanda pentoz fosfat yolağı (Pentoz Fosfat yolağı, PPP) ile de glukoz metabolizmasını aktive eder. Bu yolak da üretilen NADPH ve ribonükleotidler hücrel redoksu, lipid ve nükleik asit sentezini kontrol ederler. Buna ek olarak Akt,

yağ asitleri gibi hücre içi bileşenlerin katabolizmasını baskılar (Wang, Eno ve ark., 2011, Altman ve Rathmell, 2012).

Mitokondri ve diğer organellerin, protein agregatlarının, sitoplazmanın, uzun yaşayan proteinlerin otofajik degradasyonu hücrelere oldukça büyük enerji sağlamaktadır. Lizozomlar ile birleşen otofagozomlarda meydana gelen sindirim sonucu açığa çıkan amino asitler ve serbest yağ asitleri sitozole dönerek mitokondrial oksidasyona uğrarlar (Altman ve Rathmell 2012). Bu metabolik strateji biyoenerjinin uzun dönemde korunması için oldukça etkilidir. Öyle ki membranların fosfolipid tabakasının bir bileşeni olan uzun zincir yağ asidi palmitatın tek bir molekülünün katabolizmasının tamamlanması ile 104 ATP elde edilebilirken tek bir molekül glukozdan 31 ATP elde edilir. Aynı şekilde amino asitlerin metabolizması ile büyük miktarlarda ATP elde edilmektedir.

1.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER) fosfolipidler, kolesterol, steroidlerin biyosentezi, glikojen degradasyonu, detoksifikasyon reaksiyonlarını düzenlemek ve hücre içi kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) homeostazını sağlamanın yanında protein katlanması, maturasyonu, kalitesinin kontrolü ve trafiğini kontrol eden bir organeldir (Jager, Bertrve ve ark., 2012). Gulikoz yoksunluğu, bozulan kalsiyum regülasyonu, viral enfeksiyon ve hipoksi protein katlanmasını değiştirebilir ve ER stresini tetikler. Normal koşullarda hücreler mokeküler şaperonları, katlayıcıları ve lektinleri kullanarak proteinlerin doğru katlandıklarından emin olurlar (Naido 2009). Doğru katlanma gerçekleşmediğinde yanlış katlanan proteinler ER ilişkili degradasyon (ERAD) yolğunun hedefi haline gelirler. Eğer katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinler birikmeye devam ederse ökaryotlarda **“Katlanmamış Protein Cevabı (KPC)”** devreye girer. KPC, altında bulunan efektörleri düzenleyerek adaptif cevabı, geribildirim mekanizmalarını ve hücrenin kaderinin düzenlenmesini kontrol eder (Osowski ve Urano, 2011).



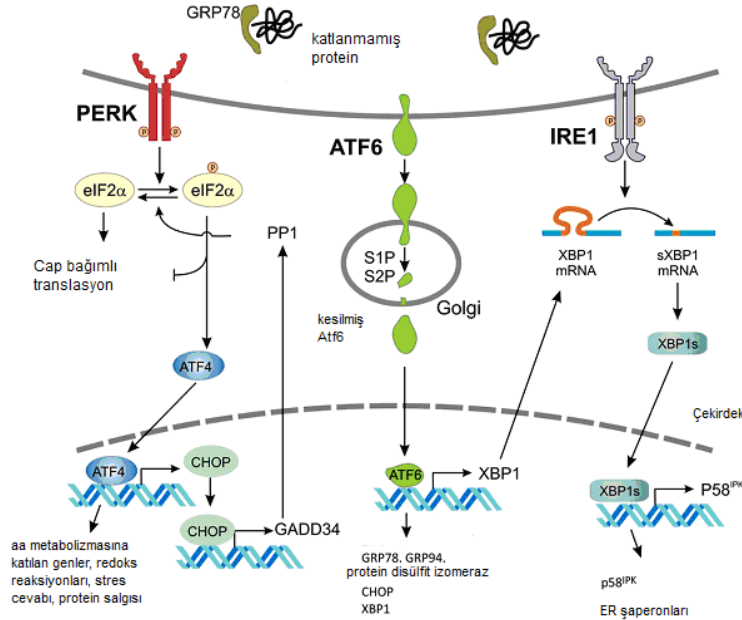
Şekil 1.11. ER stresi ve KPC (Osowski ve Urano 2011).

ER homeostazını ve ER'nin fonksiyonunu değiştiren koşullar ER stresinin oluşmasına neden olurlar. ER lümeninde toksik ve katlanmamış proteinlerin birikimine neden olan birçok faktör hücrenin bütünlüğünün korunmasında oldukça belirleyicidir. Bu neden ile ER homeostazının yeniden sağlanması hücre hayatta kalımı için çok önemlidir. ER stresine maruz kalan hücreler birçok işlemi aktif hale getirirler. Bu işlemler stresi aşamadıklarında ise hücre ölümü gerçekleşir (şekil 1.11).

ER stresine hücrenin verdiği cevap KPC olarak bilinmektedir. KPC stres durumu söz konusu olduğunda ER nin fonksiyonlarını normal hale getirecek bir dizi reaksiyonları başlatır. Örneğin ER şaperon proteinlerinin ifadenmelerindeki artış protein agregatlarının oluşumunu engeller ve proteinlerin doğru katlanmaları sağlar. Aynı zamanda ER ye gelen proteinlerin miktarı translasyonun geçici olarak durdurulması ile azaltılır. Bundan başka membran lipidlerinin sentezlenmesi arttırılarak ER hacmi arttırılır. Son olarak da katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonu ERAD işlemi aktive edilerek arttırılır (Hetz 2012).

KPC sırasında ER homeostazındaki bozulma algılanır ve sitoplazmadan çekirdeğe iletilir. Çekirdekte telafi etmeye yarayan bir cevap oluşur. ER stres algılayıcılarının büyük bir kısmı luminal, transmembran ve sitoplazmik bölgeleri

içerirler. Yanlış katlanan proteinlerin konsantrasyonundaki herhangi bir artış luminal sensor bölge tarafından saptanır ve farklı sinyaller yolu ile sitoplazmaya ve çekirdeğe aktarılır (şekil1.12) (Bravo, Parra ve ark., 2013).



Şekil 1.12. Katlanmamış Protein Cevabının üç efektör proteini PERK, ATF6, IRE1 (Gorman, Healy ve ark., 2012).

Adaptasyon süresince KPC, protein katlanmasını arttıracak şaperonların ve proteinleri işleyecek ve katlanmalarını arttıracak enzimlerin ifadenmesini indükleyerek katlanma homeostazını yeniden sağlamaya çalışır. Eş zamanlı olarak translasyon genel olarak durdurularak ve mRNA degradasyonunu düzenleyerek ER yükünün hafiflemesine çalışır. Yanlış katlanan proteinlerin daha fazla birikmesi engellenir. ER ile ilişkili protein degradasyon ve otofaji proteinlerinin ifadenmeleri artırılarak istenmeyen proteinlerin ortadan kaldırılması artırılır. Bu cevaplar β hücrelerinin ER stresini hafifletmede ve insülin gibi oldukça fazla miktarda üretilen proteinlerin doğru üretilmesi için ER homeostazını sağlamada oldukça önemlidir. ER üzerindeki stres durdurulduğunda KPC geribildirim kontrol mekanizmalarını kullanarak KPC ana düzenleyicilerini ve onların altındaki faktörleri kapatır böylece KPC'nin hücreye zarar verecek olan hiperaktivasyonu durdurulmuş olur. KPC aynı

zamanda hayatta kalma ve ölüm faktörlerinin ifadenmesini veya aktivasyonunu da düzenler (Osowski ve Urano 2010).

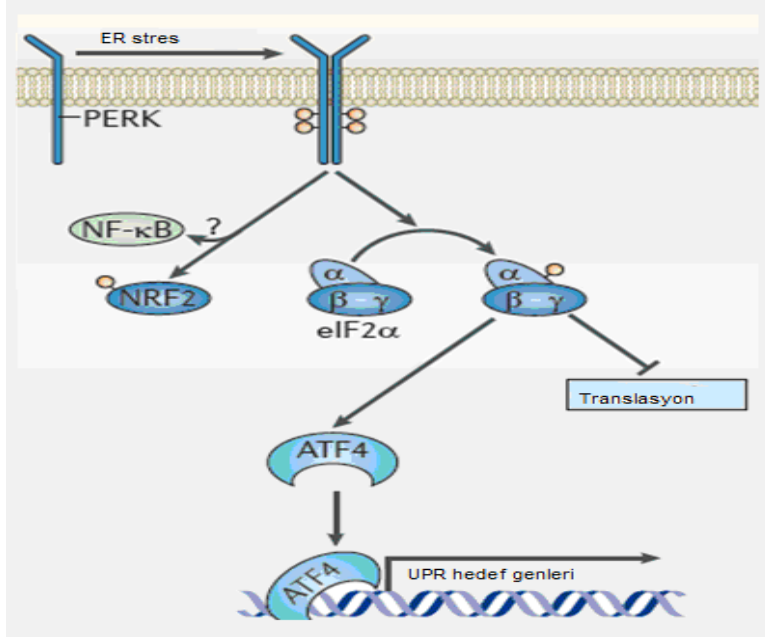
Şu ana kadar üç kolu ortaya çıkartılmış olan KPC çeşitli stres sinyal sistemleri ile birlikte çalışır. Bu sistemler arasında JNK-AP1, oksidatif stres ile aktive olan yolaklar, lipit ve glukoz metabolizmasında rol alan yolaklar sayılabilir ve tüm bu yolaklar metabolizmayı etkilemektedir. Ökaryotik hücrelerde KPC, ER membran ile ilişkili üç protein; çift zincir RNA ile aktive edilen protein kinaz (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren enzim (inositol requiring enzyme 1,(IRE-1)) ve aktive edici transkripsiyon faktör 6 (activating transcription factor 6, (ATF6)) tarafından kontrol edilmektedir. Stres olmayan durumlarda PERK, IRE1 ve ATF6 transmembran proteinleri Bip/GRP78 şaperonuna lümen içi bölgeleri ile (IRE1 ve PERK amino terminallerinden ATF6 karboksi terminalinden) bağlıdır. ER'da stres oluştuğunda PERK ve IRE1 Bip/GRP78'den ayrılır oligomerizasyona uğrar ve aktive olurlar. ATF6 ise golgiye geçer ve serin proteazlar tarafından kesime uğrar ve transkripsiyon faktör olur. PERK ve ATF6 kollarının IRE1'den daha önce aktive edildiği düşünülmektedir (Szegezdi, Logue ve ark., 2006). PERK ve ATF6 yolları genellikle yanlış katlanmaya karşı ER adaptasyonunu sağlamaya çalışırken IRE1'in iki yönlü rolü vardır; hem hayatta kalma hem de pro-apoptotik sinyalleri organize etmektedir.

1.3.1. Çift Zincir RNA ile Akive Edilen Protein Kinaz (PKR)-Benzeri ER Kinaz (PERK)

KPC'nin PERK kolu ilk defa memeli pankreatik islet hücrelerinde gösterilmiştir. ER'de yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimi olduğunda hem prosurvival hem de proapoptotik sinyalleri yönetir. PERK'in β hücresi proliferasyonu ve gelişimini düzenlediği de gösterilmiştir. Farelerde PERK'in doku özgül ve hücre özgül susturularak yapılan çalışmalar fetal ve neofetal β hücresi proliferasyonu ve farklılaşmasında ağır hasarlara, β hücre kitlesinin oldukça azalmasına, proinsülin trafiği ve insülin salgılanmasında hatalara ve diyabete neden

olmuştur (Zhang, Feng ve ark., 2006). Ancak en önemli fonksiyonu translasyonu modüle etmektir. PERK tip I transmembran proteindir bir ER luminal stres algılayıcı bölgesinden ve bir sitosolik protein kinaz bölgesinden oluşur. N terminalinde bağlı bulunduğu BİP'den ayrılması ile dimerize olur ve T981 bölgesinden otofosforilasyona uğrar. Aktive olan PERK serin 51'den eIF2 α 'yı fosforile eder böylece üçlü kompleksin oluşumunu yavaşlatarak protein translasyonunu durdurur, ERAD sistemi ile ER'de biriken proteinler temizlenir bu sırada hayatta kalmayı sağlayan genlerin ifadelenmesi gerçekleşir. Örneğin PERK aktivasyonu ile apoptoz hücrel inhibitörü (cIAP) ifadelenmesi indüklenir. Protein translasyonundaki azalma evrensel değildir. 5'UTR bölgelerinde dahili ribozom giriş bölgesi (internal ribosome entry site, IRES) içeren genlerin translasyonu devam eder. Böylelikle eIF2 α fosforilasyonu ATF4, ATF5, cat-1 gibi bazı transkriptlerin translasyonuna engel olmaz (Back, Kang ve ark., 2012). ATF4 bir transkripsiyon faktördür ve apoptoz (CHOP, C/EBP homolog protein), ER redoks kontrol (ERO1, endoplazmik retikulum oksidoreduktin), GADD34 (growth arrest ve DNA damage 34), glukoz metabolizmasında (fruktoz 1-6 bi fosfat; glikokinaz, fosfoenolpruvat karboksikinaz) rol alan bazı genlerin ifadelenmelerini kontrol eder (Hotamisligil 2010). Bu nedenle genel mRNA transkriptlerinin translasyonunu sağlarken bazı mRNA transkriptlerinin translasyonel aktivasyonunu gerçekleştirmesi ER stresine karşı gerçekleşen KPC aracılıklı adaptasyon yollarında PERK'i önemli bir bileşen yapmaktadır.

PERK bir luminal bölge bir de serine/threonin kinaz aktivitesi gösteren sitoplazmik bölge taşımaktadır. Tip I transmembran proteindir ve büyük bir C-terminal bölgesi kısmen daha küçük N-terminal bölgesi ile bağlanmıştır. C-terminal bölgesi 7 α - helikazdan ve 5- β zincirinden oluşur. Thr980 bölgesinden olan fosforilasyon aktivasyon lopunu stabilize eder ve eIF2 α bağlanma bölgesi α G heliks bölgesindedir (şekil 1.13) (Cui, Li ve ark., 2011).



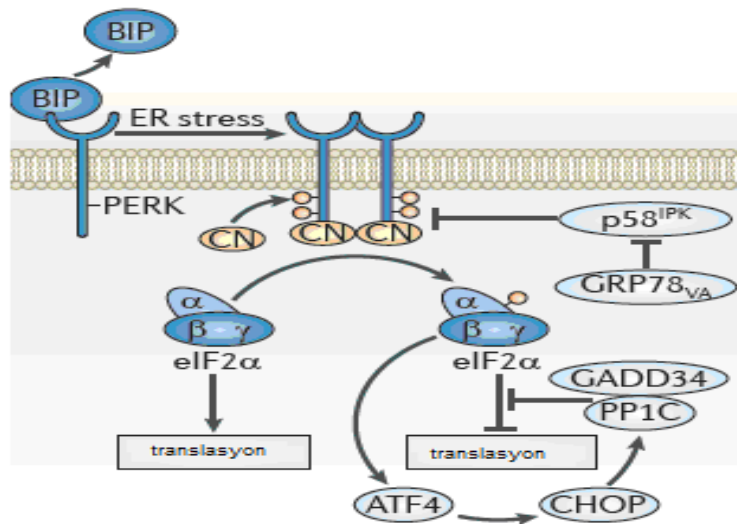
Şekil1.13. ER stres durumunda PERK aktivasyonu (Hetz 2012).

KPC'nin aktif olmadığı durumlarda BİP/GRP78 PERK luminal bölgesine bağlıdır. Katlanmamış protein birikimi olduğunda BİP/GRP78 PERK'den ayrılır ve bu bağlantının kopması ile dimerize olan PERK aktif hale gelir. BİP/GRP78 fazla ifadenmesi bu aktivasyonun azalmasına neden olur. ER stres PERK'in protein kinaz aktivitesini ve eIF2α fosforilasyonunu artırır. Bunun sonucunda da eIF2α-GDP den eIF2α-GTP değişimi inhibisyona uğrar. eIF2α-GTP aktif 43S translasyon-başlatıcı kompleksin oluşumu için anahtar bir bileşendir böylelikle PERK yoluyla genel mRNA taranslasyonunu durdurmuş olur. Genel protein sentezini durdurması ve ER'nin yükünü hafifletmek yanında PERK, KPC transkripsiyonel aktivasyonuna da katılır (Bravo, Parra ve ark., 2013).

Nrf2 transkripsiyon faktörü PERK'in substratıdır. Stres altında olmayan hücrelerde Nrf2, Keap1 ile bağlı bir şekilde sitoplazmada bulunur. PERK aracılıklı fosforilasyon Nrf/Keap1 kompleksinin ayrılmasını sağlar ve Nrf2 çekirdeğe geçer. ER stresindeki rolünden başka PERK aynı zamanda besin yoksunluğu, hipoksi ve radyasyon koşullarında bir hayatta kalma mekanizması olarak otofajide de önemli bir rol oynar. Bu iki önemli fonksiyon PERK'in büyüme ve hayatta kalmayı kontrol etmesine izin verir (Rzymiski, Milani ve ark., 2010).

Homeostaz yeniden sağlandığında henüz tam olarak aydınlatılmamış bir mekanizma ile PERK defosforile olur (Bravo, Parra ve ark., 2013).

PERK aktivitesi eIF2 α defosforilasyonu ile azaldığı sırada ATF4 üzerinden gerçekleşen CHOP aktivasyonu bir geribildirim mekanizması oluşturur. Bu mekanizmada büyümeyi durduran ve DNA hasarı ile indüklenen 34 proteini (growth arrest ve DNA damage inducible 34, GADD34) ve PP1C fosfotaz kompleksi birleşimi ile translasyon durdurulur. Bir kalsiyum bağımlı fosfataz olan kalsineurin (CN) PERK ile etkileşime girerek aktivitesini arttırırken p58^{IPK} PERK aktivitesini azaltır (şekil 1.14).

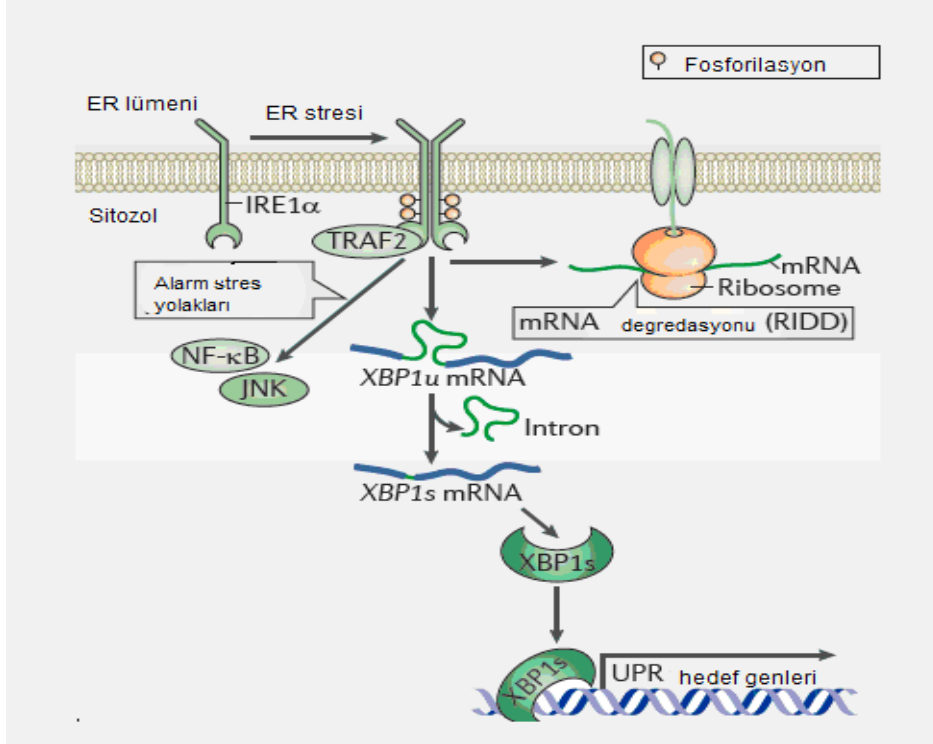


Şekil 1.14. PERK geribildirim mekanizması (Hetz 2012).

2.3.2 İnositil Gerektiren enzim-1 (İnositol – requiring enzyme 1, IRE-1)

IRE1, ER membranında lokalize tip I transmembran endonükleazdır ve iki izoformu vardır: IRE1 α ve IRE1 β . IRE1 adaptif cevapları düzenleyen şimdiye kadar en fazla korunmuş olan ER stres reseptörüdür (Connor 2001). IRE1 iki fonksiyonlu bir moleküldür. Sitoplazmik kısmında bir serin- threonin kinaz bölgesi ve C-terminal endoribonükleaz domain bulunmaktadır. IRE1 aktivasyonu ile GRP78'den ayrılır,

oligomerizasyona uğrar ve kinaz domainlerin transotofosforilasyonu gerçekleşir. RNaz domainin en önemli görevi intron bölgeleri çıkartılmamış formda bulunan ve bir lösün fermuar yapısı içeren transkripsiyon faktör olan XBP1 mRNA'sından (XBP1u,unspliced) 26 nükleotidlik intron bölgelerini çıkararak intronsuz formdaki XBP1 (XBP1s) oluşmasını sağlamasıdır. XBP1, oldukça aktif olan bir transkripsiyon faktördür. ER katlanma kapasitesini düzenleyen önemli bir düzenleyicidir (Shaffer 2004). XBP1s, ER şaperonları, ERAD da görevli proteinleri ve fosfolipid biyosentezinde görevli proteinleri sentezler. Fosfolipid biyosentezi ER membranının genişlemesine neden olur. Bu genişleme KPC'nin yapısal belirteçidir. IRE-1, ER membranında bulunan mRNA'ları degrade eder böylece ER lümenine giren proteinleri azaltır. XBPu bir transkripsiyon faktör olarak değil XBP1'in negatif kontrolünde rol almaktadır. XBP1'in çekirdekten çıkartılıp proteozom yolu ile yıkılmasını sağlamaktadır. Ayrıca XBPu peptidi üzerinde bulunan bir hidrofobik bölge ile ribozoma tutunmuş halde bulunan kendi mRNA'sını ER membranına taşıyarak IRE1 α tarafından kesilip XBP1s üretilmesini sağlamaktadır. XBP1'den intron bölgelerini çıkartmak fonksiyonunun yanı sıra kronik ER stres koşulları altında IRE1, proapoptotik c-Jun N –terminal kinaz (JNK) sinyal yolağını da aktive eder TRAF2'nin toplanmasına buna bağlı olarak da ASK1 ve kaspaz 12 aktivasyonuna ve B hücreli lenfoma -2 (Bcl-2) ailesi üyeleri ile etkileşime girerek hücrel fonksiyon bozukluğuna ve apoptoza neden olur (Back, Kang ve ark., 2012). IRE-1'in insülin biyosentezinde anahtar bir rolü olduğu da gösterilmiştir. Akut yüksek glukoz koşullarında IRE1 aktive olur ve proinsülin biyosentezini artırır. IRE1 sinaylindeki bir bozulma proinsülin biyosentezinde bir baskılanmaya neden olmaktadır (şekil 1.15) (Oslowski ve Urano 2011).



Şekil 1.15. ER stresi durumunda IRE-1 aktivasyonu (Hetz 2012).

Yapılan çalışmalar ER stresinden bağımsız, deneysel olarak IRE1 sinyalizasyonunun artırılmasının hücre hayatta kalımını arttırdığı gösterilmiştir (Lin, Li ve ark., 2007). ER stresi süresince IRE1, PERK'den daha önce kapatılır bu nedenle IRE1'in hücreyi koruyucu fonksiyonu PERK sinyalizasyonu devam ederken sonlanır. IRE1'in aktivitesi etkileşimde bulunduğu bazı proteinlerden etkilenmektedir ki bu protein kompleksine KPCozom denilmektedir (Gorman, Healy ve ark., 2012).

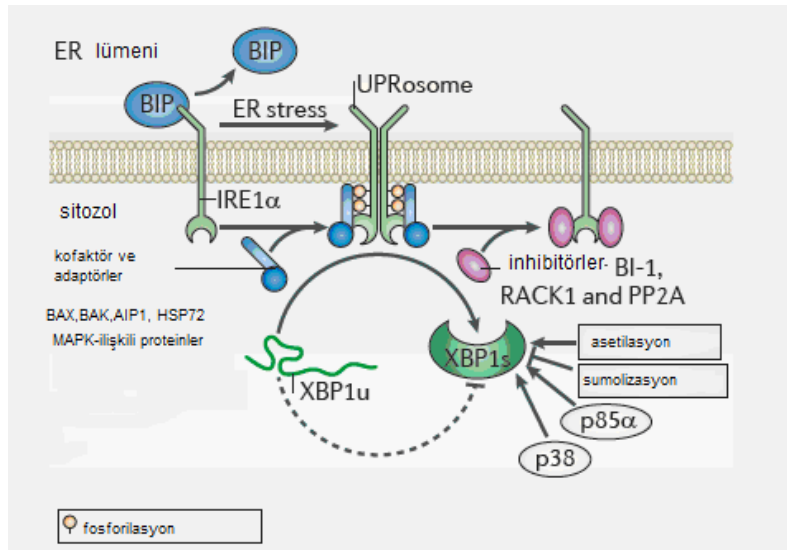
IRE1 katlanmamış proteinleri ER lümenindeyken algılar. Bu algılama ile reseptör oligomerizasyonu ve sitozolik efektör bölge transfosforilasyonu gerçekleşir. Sitozolik bölge aynı zamanda bölgeye özgü endoribonükleaz aktiviteye sahiptir. Bu fonksiyonu ile XBP1 mRNA'sı üzerinde bulunan intronların çıkartıldığı özgül bir kesim yapar. Mayalardaki ortologu Hac1 olan XBP1, basit lösün fermuar transkripsiyon faktördür KPC'yi düzenleyen genlerin promotoruna bağlanır. IRE1 aracılıklı gerçekleşen intronların çıkartılması işlemi ile C terminal bölgesi yer değiştirir ve böylece ubikuitin bağımlı degradasyona daha dirençli hale gelir. Memeli hücreleri IRE1'in yapısal benzerlik gösteren ancak fonksiyonları farklı olan iki paralog üyesini taşımaktadır: IRE1α ve IRE1β. ER stres koşullarında IRE1α, XBP1

mRNA'sından intronların çıkartılmasını katalizlerken IRE1 β , 28S rRNA'nın alana özgü kesimini ve tranlasyonel duraklamayı düzenlemektedir. IRE1 α 'nın tek hedefi XBP1 değildir. XBP1'den başka 13 farklı mRNA daha IRE1 α tarafından kesime uğramaktadır (RIDD, regulated IRE1 dependent decay) (Oikawa, Tokuda ve ark., 2010). IRE1 α kendi ifadelenmesini yine kendi mRNA'sını keserek kontrol etmektedir (Bravo, Parra ve ark., 2013).

IRE1 α 'nın ER stresini algılama kapasitesi BiP/GRP78'den ayrılmasına ve katlanmamış proteinler ile doğrudan etkileşimine bağlıdır. IRE1 α regülasyonunun iki adım modeline göre, IRE1 α 'nın BiP/GRP78'den ayrılması oligomerizasyonu, katlanmamış proteinlere bağlanması ise IRE1 α 'nın aktivasyonunu sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar IRE1 α 'nın aynı zamanda membran yapısındaki değişikliği de algıladığını göstermektedir (Promlek, Ishiwata-Kimata ve ark., 2011).

IRE1 α 'nın aktivasyonunda başka proteinler de katılmaktadır. Proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax ve Bak, IRE1 α 'nın sitozolik bölgesinde bir protein kompleksi oluşturarak aktivasyonunda rol almaktadırlar. Bax inhibitörü 1 (BI-1) ER'de bulunan bir proteindir ve IRE1 α 'ya bağlanarak endoribonükleaz aktivitesini azaltır (Madeo ve Kroemer 2009).

IRE1 α , TNF reseptör ilişkili adaptör protein (TNF reseptör –associated adapter protein, TRAF2)'yi toplayarak JNK aktivasyonunu sağlamaktadır. ER stresi ile oluşan bu aktivasyon için MAP3K, ASK1 ve ASK1-JNK sinyal yolağında bir iletici olan ASK1 ile etkileşen protein (ASK1 interacting protein 1, (AIP1))'de rol almaktadır. JNK aktivasyonu hücre ölümü ile ilişkilidir ve aynı zamanda c-Jun aktivasyonu, GRP94 ifadelenmesini arttırmak yoluyla da hücre hayatta kalımını promot etmektedir.



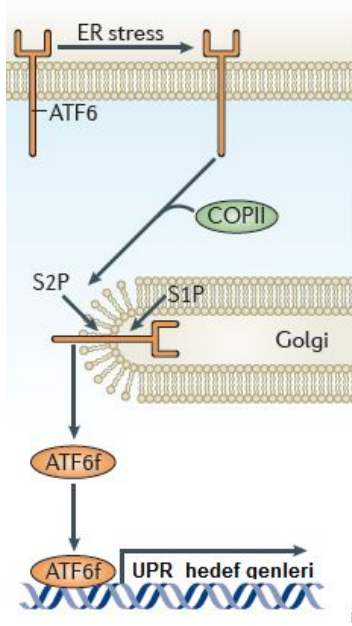
Şekil 1.16. IRE-1 geribildirim mekanizması.

Hücre metabolizmasının önemli modülatörleri IRE1 α yolağını da düzenlemektedir. Yapılan son çalışmalar hem XBP1'den intron bölgesinin çıkartılmasında hem de JNK aktivasyonunda mTORC1 yolağının kontrolü olduğunu göstermektedir (Kato, Nakajima ve ark., 2012). PKA tarafından fosforlanan IRE1 α glukagon aracılıklı ifadelenen glukoneogenik genleri kontrol eder. PI3K'in represif düzenleyici alt ünitesi olan p85, XBP1 ile ilişkiye girerek çekirdeğe geçişini ve transkripsiyonel aktivitesini artırır (şekil 1.16).

IRE1 α , (KPC)-osom denilen bir dinamik makromoleküler kompleks içinde toplanır. Bu kompleks hücre içine iletilecek sinyallerin kinetiğini kontrol eder. KPCosoma bağlanan bazı kofaktörler (BAX, BAK, AIP1, HSP72, MAP ilişkili proteinler) bu aktivitenin artmasını sağlarken bazı proteinler (BAX inhibitör 1 (BI-1), receptor for activated C kinase 1(RACK1), protein phosphatase 2A (PPA2A) bu aktivite üzerinde inhibitörük etki yaratmaktadır. XBP1s'in fonksiyonu bazı post translasyonel modifikasyonlar ile kontrol edilmektedir. XBP1s'in p85 α ile etkileşimi XBP1s'in aktivitesini artırırken XBP1s- XBP1u etkileşimi XBP1s degradasyonuna neden olmaktadır.

2.3.3. Aktive edici transkripsiyon faktör 6 (Activating transcription factor 6), ATF6

ATF6, 670 aminoasitten oluşan, endoplasmik retikulum tip II transmembran glikoproteinidir, NH₂ terminal domaini sitosoliktir. Elektroforetik mobilitesi 90kDA (p90ATF6) olan bu protein katlanmamış protein cevabının anahtar transkripsiyon faktörlerinden birisidir. ATF6, lösün fermuar protein ailesinin bir üyesidir ve endoplasmik retikulum stres cevap elementi (ERSE) olarak hareket eder. NH₂ terminal domainin 370-380 aalık kısmı transkripsiyon faktördür bu bölgeyi 21 aalık transmembran domain ve 270 aalık ER lümenine bakan ekstrasitoplazmik kısım takip eder. ATF/CREP transkripsiyon faktörleri ailesi üyesi ATF6'nın iki adet izoformu gösterilmiştir. ATF6 α (90kDa) ve ATF6 β /G13/CREB-RP (110kDa). Luminal bölgede ATF6 α isoformu iki adet (GLS1 ve GLS2), ATF6 β isoformu bir adet (GLS2) olmak üzere Golgi lokalizasyon sinyalleri taşımaktadırlar (GLS) (şekil 1.17). Bazal koşullar altında ATF6, ER membranında BİP/GRP78 ve kalretikuline bağlıdır. ER'da katlanmayan protein biriktiğinde proteolitik olarak kesime uğrar. Membran içinde gerçekleşen proteolizis işlemi ile sitoplazmik bölgeleri ayrılır. ATF6, COPII vezikülleri ile golgiye taşınır ve serin proteaz site I proteaz (SP1) ve metalloproteaz site 2 proteaz tarafından kesime uğrayarak aktif transkripsiyon faktör olarak çekirdeğe geçer (Kim, Kim ve ark., 2012). G13/CREB-RP (G13) geninin ürünü ER'de bulunan tip II transmembran glikoproteinidir. ATF6 α ile gösterdiği yüksek homoloji nedeni ile ATF6 β denmiştir. Homodimer olarak ya da ATF6 α ile heterodimer oluşturarak ER stres cevap elementlerine (ERSR) bağlanarak KPC hedef genlerini aktive eder ancak ATF6 β 'nin transkripsiyon özgülüğü ve aktivitesi çok düşüktür. Daha çok ATF6 α aracılıklı gerçekleşen ERSR gen indüksiyonunun represörü gibi davranır (Wang ve ark., 2011).



Şekil 1.17. ER stres durumunda ATF6 aktivasyonu (Hetz 2012).

ATF6, ER stresine cevap olarak aktive olduğunda çekirdeğe geçer ve ER stres elementleri (ERSE I,ERSE II), KPC elementleri (KPCE;GRP78,GRP94), cAMP cevap elementleri (CRE) promotorlarına bağlanarak genlerin ifadenmelerini kontrol eder. ERAD ve EDEM (ER degradation enhancing- α mannosidase-like protein) katlanmamış proteinlerin temizlenmesine yardımcı olur. XBP1 mRNA regülasyonuna ek olarak ATF6, XBP1 proteini ile doğrudan etkileşime girerek KPC kalite kontrol genlerini hedef alır (Kim, Kim ve ark., 2012).

Son dönem yapılan çalışmalar birden fazla ATF6 α ile benzer proteinler ortaya çıkartmıştır ki bu bilgide geleneksel 3 kollu KPC modelinin tamamının henüz ortaya konamadığını göstermektedir. Şu ana kadar 5 protein Luman (Creb3) , Oasis (CREB3L1), BBF2H7 (CREB3L2), CREBH(CREB3L3), ve Tisp40 (CREB3L4) tanımlanmıştır. Tüm bu proteinler ATF6 α ile yüksek dizi benzerliği göstermektedir: bir transmembran bölgesi ve onun yanında korunmuş bir b-zip bölgesi. ATF6 α ile benzer şekilde ER'ye çapalıdır, belli bir stimülasyonda cevap oluşturmak için golgiye geçerler ve SP1 ve SP2 tarafından proteolitik kesime uğrarlar. ATF6 α ya benzerlikleri yanında aktive eden stimülasyon, doku dağılımı ve bağlandıkları cevap element farklılığı bu faktörlerin her birinin KPC düzenlenmesine özel görevleri

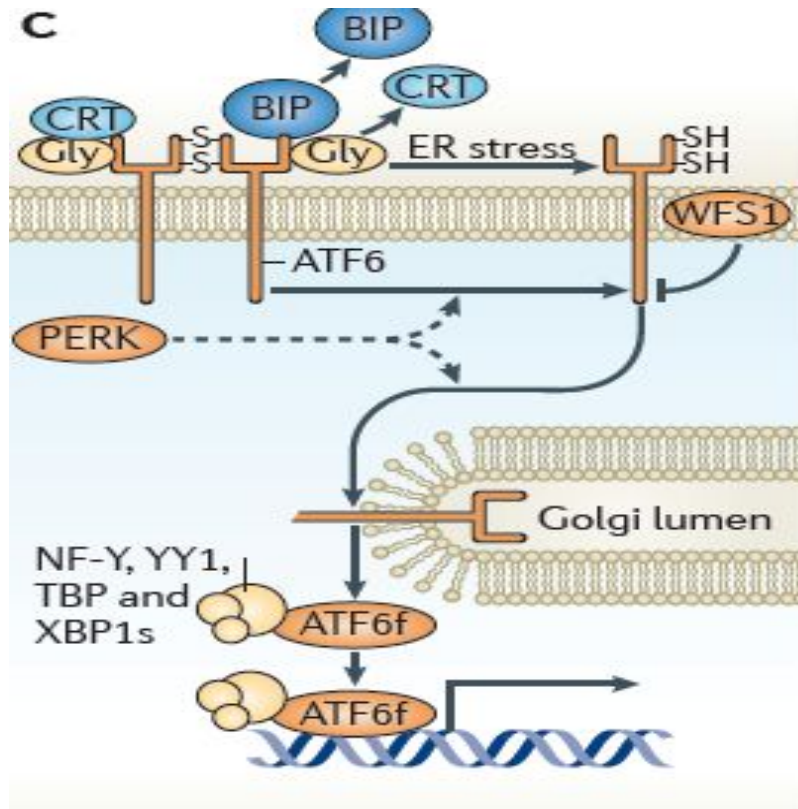
olduğunu göstermektedir. Örneğin CREBH lipopolisakkarid ve sitokinlerin indüklediği inflamatuvar stimulusa akut faz cevabı olarak serum amyloid, serum amyloid P bileşenleri, C reaktif protein üretimini stimule edebilir (Hotamisligil 2010).

ATF6'nın N-terminal fragmenti, p50ATF6, çekirdeğe geçer ve şaperonlar BiP/GRP78 ve GRP94, transkripsiyon faktörler CHOP, XBP1 ve p58IPK/DNAJC3, Herp, SERCA gibi diğer proteinlerin ifadelenmelerini kontrol eder. ATF6 aynı zamanda XBP1'den bağımsız olarak ER'nin hacminin artışı ve kronik ER stresine karşı hücrenin adaptasyonunu da düzenler (Bommiasamy 2009).

ATF6'nın iki izoformununun KPC'de birbirlerine zıt olarak çalışan rolleri vardır. ATF β , ATF6 α sinyalinin transkripsiyonel represörüdür bu neden ile KPC'nin bu kolunun negatif regülatörüdür. ATF β 'nin aksine ATF6 α N terminal bölgesinde bir transaktivasyon bölgesi (transactivation domain, TAD) taşımaktadır. Bu bölge ile ATF6 α 'nın transkripsiyon aktivitesi ve ubiquitin proteozom sistemi ile degradasyonu artmaktadır (Thuerauf 2002). *In vitro* DNA etkileşim çalışmaları ATF β 'nin Bip/GRP78 promotor bölgesindeki konsensus dizilerine bağlanarak ATF6 α 'nın bağlanmasını engellediğini göstermiştir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar ATF β 'sı susuturulmuş hücrelerin tunikamisinindüklediği ER stresine karşı daha hassas olduğunu göstermiştir. KPC süresince ATF β seviyesi ATF6 α cevabının süresini ve yoğunluğunu düzenlemektedir (Thuerauf 2007). ATF β 'nin represör etkisi glikosilasyona bağlıdır. Glikosillenmemiş ATF β kesilmez, ER membranında kalır ve bu neden ile bir represör olarak görev yapamaz (Guan 2009). ATF6 α oldukça etkili ancak belirli bir süre aktif olan transkripsiyon faktördür. Katlanmamış proteinlerin artışına cevap olarak transkripsiyonel aktivitesi artar ve sadece proteozomal olarak degrade edilir (Thuerauf 2002).

Kalretikulin (CRT), glikozilasyonlanmış bir şekilde ATF6 ile birlikte ER'de bulunmaktadır ve bu inhibitörük bağlanma ER stresi durumunda ortadan kalkar, ATF6'nın ER'den golgiye geçişi gerçekleşir. ER'nin redoks durumundaki değişim ATF6'nın ER luminal bölgesindeki sistein rezidularının azalarak başka

modifikasyonlara uğraması için hızlıca golgiye geçmesini sağlamaktadır. Bir transmembran protein olan Wolfram syndrom1 (WFS1) ATF6 ile bağlandığında ATF6'nın proteozomal degradasyonuna neden olurken PERK bilinmeyen bir mekanizma üzerinden ATF6'nın golgiye geçişini hızlandırmaktadır. ATF6'nın sitozolik fragmentinin (ATF6f) aktivitesi ve özgülüğü ve buna bağlı olarak da hedef genlerinin kontrolü nüklear faktör Y (NF-Y), YY1, TATA- bağlanan protein (TBP) ve XBP1 gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşimine bağlıdır (şekil 1.18).



Şekil 1.18. ATF6 geribildirim mekanizması.

2.3.4 Pankreatik β Hücre Fizyolojisinde Otofajinin Rolü

Pankreatik β hücrelerinde oksidatif strese bağlı gelişen hiperglisemide oluşan ubiquitinlenmiş protein agregatlarının otofaji ile uzaklaştırıldıkları gösterilmiştir

(Kaniuk, Kiraly ve ark., 2007). Ayrıca biriken protein agregatlarının hücelere hasar verdiği bilinmektedir. Bu iki bilgidan yola çıkılarak otofajinin β hücresinin hayatta kalma ve ölümünü düzenlediği sonucuna varılmaktadır. Ancak otofaji ve β hücresi arasındaki doğrudan ilişki henüz gösterilememiştir. Bu ilişkiyi ortaya koymak adına β hücelerinde otofajik aktiviteleri bozulmuş olan bir hayvan modeli ile çalışılmıştır. Atg7 floxed fare (Atg7^{F/F}) (Komatsu, Waguri ve ark., 2007) RIP-Cre fare ile çaprazlandığında β hücresine özgü Atg7 susturulmuş fare (Atg7 ^{$\Delta\beta$ -cell}) oluşturulmuştur. Atg7 E1- benzeri bir genidir ve otofagozomların oluşumu ve tamamlanması için önemlidir. Atg7 ^{$\Delta\beta$ -cell} fare önemli ölçüde hiperglisemi, glukoz intoleransı ve hypoinsülinemi göstermektedir (Jung ve Lee 2010). Morfolojik analizler β hücresi kitlesinin azaldığını, β hücelerinde ölümün arttığını ve bu hücelerde proliferasyonun azaldığı görülmüştür. β hücre kitlesi azaldığı için insülin miktarında da azalma olmaktadır.

Atg7 ^{$\Delta\beta$ -cell} farelerinden pankreatik isletler izole edildiğinde ve ex vivoda glukozun stimule ettiği insülin salınımını araştırmak için glukoz ile stimule edilip kontrol ile karşılaştırıldığında Atg7 ^{$\Delta\beta$ -cell} β hücelerinin insülin salgısının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak sitozolik ([Ca⁺²]_s) kontrollere oranla oldukça fazla bozulduğu görülmüştür (Jung ve Lee 2010).

Suda özünen, kısa ömürlü ubikuitinlenmiş proteinler proteozomal yolak ile uzaklaştırılırken suda çözünemeyen veya uzun ömürlü fazla ubikuitinlenmiş proteinler otofajik yolak ile uzaklaştırılırlar. Otofaji mekanizması çalışmayan β hücelerinde yapılan immunohistokimyasal çalışmalar hüceler içinde fazla miktarda ubikuitinlenmiş inkulizyon cisimcikleri olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak poliubikuitinlere bağlanan protein p62 ve otofajinin spesifik substratlarının bu hücelerde biriktiği gösterilmiştir. Kofokal immunoflorosan mikroskopi ubikuitin ve p62'nin aynı inkulizyon cisimciğinde birlikte lokalize olduğunu göstermiştir (Jung 2010). Bu nedenle otofajisi bozuk olan β hücelerinde oluşan büyük inkulizyon cisimciklerinde ubikuitin, p62 ve dejenere proteinler bulunur. Normal hücelerde veya β hüceleri gibi otofajisi bozuk hücelerdeki inkulizyon cisimciklerinin

patofizyolojik rolleri halen araştırılmayı beklemektedir (Komatsu, Waguri ve ark., 2007).

Elektron mikroskobu kullanılarak ortaya çıkartılan sonuçlara göre; $Atg7^{\Delta\beta\text{-cell}}$ farelerin β hücreleri normal β hücrelerine oranla belirgin ölçüde az insülin granülleri içermektedir. Elektron mikroskobu analizlerinde daha düşük büyütmede bakıldığında $Atg7^{\Delta\beta\text{-cell}}$ farelerin β hücrelerindeki mitokondrion, granüllü endoplazmik retikulum ve golginin normal görünmesine rağmen daha yüksek büyütmelelerde bu organellerin şiştiği görülmektedir (Jung ve Lee 2010).

Bu morfolojik bulgular β hücrelerinin ölümüne ve fonksiyon bozukluğuna neden olan mitokondrial fonksiyon bozukluğunun ve ER stresinin olduğuna işaret etmektedir. $Atg7^{\Delta\beta\text{-cell}}$ farelerin β hücrelerindeki fonksiyon bozukluğunun ve kitledeki azalmanın mitokondrial fonksiyon bozukluğu ile ve/veya ER stresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir çünkü mitokondrion ve ER otofaji mekanizması ile gençleştirilmektedirler ve bu organeller β hücrelerinin fonksiyonu ve hayatta kalımı için çok önemlidirler. Tüm bu bulgular otofajinin β hücrelerinin yapısının, kitlesinin ve organel fonksiyonunun korunmasının yanı sıra homeostazının korunmasında da çok önemli olduğunu göstermektedir. Diyabet de ki otofajinin rolü henüz tam olarak ortaya koyulamamıştır. ER ve otofaji birbirleri ile oldukça yakından ilişkilidir ve ER stresi diyabet patogenezinde çok önemlidir. β hücrelerindeki otofaji, ER lümeninde katlanmamış protein birikimi ile indüklenen ve ER stresine bir hücrel cevap olan katlanmamış protein cevabı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Quan, Lim ve ark., 2012).

2.3.5. ER ve Otofaji

Şu ana kadar elde edilen bulgular ER'nin otofajik işleme katıldığını göstermektedir. Bunlardan birincisi; ER, otofagozomların başlangıç yapısı olan izolasyon membranının en önemli kaynağıdır. 3D elektron tomografi ve ince kesitlerde yapılan immuno işaretleme çalışmaları ER'de bulunan protein disülfid izomerazın izolasyon

membranının her iki tarafında da bulunduğu ve izolasyon membranını bir sandeviç gibi sınırladığını göstermiştir. Bu bulgu otofagozomu oluşturan izolasyon membranının ER'nin iki membranının arasından köken aldığını göstermektedir (Matsunaga, Morita ve ark., 2010). Bu yapı omegasom olarak isimlendirilir ve ikili FYVE içeren protein-1 (double FYVE containing protein-1) omegasom belirteci olarak kullanılır. Genellikle yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler ubiquitinlenerek ve ER ilişkili protein degradasyon işlemi ile sitoplazmada proteozomal bir işlem ile yok edilmektedirler (Bernales, Schuck ve ark., 2007). Ayrıca yanlış katlanan protein ikinci bir sefer katlanamayabilir ve geri dönen translokasyon denilen mekanizma ile ER membranından tekrar sitoplazmaya geçebilir. Son hali yanlış katlanmış protein olan veya suda çözünmeyen proteinler ERAD ile kolayca işlenemezler. Bu proteinlerin oluşturduğu çökeltileri uzaklaştırmanın tek yolu otofaji olduğu düşünülmektedir. ER lümenindeki yanlış katlanmış proteinler geridönen translokasyon yapmadan veya ER membranını geçmeden iki ER membranı arasında sıkışmış olan otofagozomlara doğru hareket edebilir. İkinci olarak; ER otofajinin önemli bir hedef organelidir. Bu işleme "ER-faji" veya "retikulofaji" denilmektedir. Üçüncü olarak; otofajisi bozuk β hücrelerinde ER'nin şiştiği gözlenmiştir (Jung ve Lee 2010). Ogata ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ER stresi ile otofajinin tetiklendiğini göstermişlerdir (Ogata, Hino ve ark., 2006).

2.3.6. ER Stresi ve Diyabet

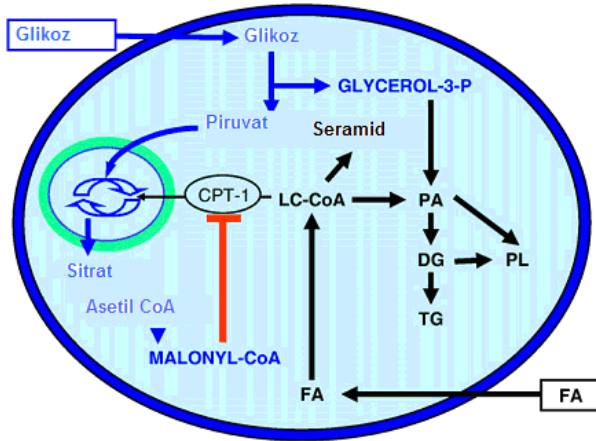
İnsülin direnci ve β hücresindeki fonksiyon bozukluğu tip 2 diyabetin en önemli patojenik mekanizmalarıdır (DeFronzo 1979). İnsülin direnci ve β hücresindeki fonksiyon bozukluğunu açıklamak adına birçok teori ortaya atılmıştır. Bununla birlikte bazı teoriler aynı patolojik mekanizmanın insülin direnci ve β hücresindeki fonksiyon bozukluğunu aynı anda çok basit ve daha etkili bir şekilde açıkladığını söylemektedir. ER stres teorisi bu teorilerden birisidir. Lipid hasarı veya sitokinler ile oluşan ER stresi ve bunu takip eden JNK aktivasyonu insülin direncinin bir nedeni olarak düşünülmektedir (Ozcan, Yilmaz ve ark., 2006, Back, Kang ve ark., 2012)

ancak doğrudan ER stresine neden olan efektör moleküller ya da lipid metabolitleri henüz saptanamamıştır. ER stresi aynı zamanda β hücresindeki fonksiyon bozukluğunda da önemlidir. Pankreatik β hücrelerinde yoğun insülin üretimi gerçekleştiğinden KPC üzerindeki yük oldukça fazladır. Bu nedenle ER stresinin veya KPC'nin kontrolü β hücrelerine çok daha önemlidir. Bunun yanında β hücrelerinde sadece yüksek yoğunluktaki glukoz olduğunda değil aynı zamanda düşük yoğunlukta glukoz olduğunda da ER stres cevabı oluşmaktadır (Back ve Kaufman 2012). Yüksek yoğunluktaki glukoz, insülin sentezinin artmasına bu da katlanmamış protein miktarında artışa PERK aktivasyonuna neden olur. Düşük yoğunluktaki glukoz az miktarda insülin sentezlenmesine neden olur. Bu nedenle pankreatik β hücreleri özellikle obeziteyle, insülin direnci ile lipitler ve diğer fizyolojik veya patolojik tetikleyiciler ile gelişen ER stresine karşı oldukça duyarlıdır (Quan, Lim ve ark., 2012). ER stres veya bunu takiben JNK aktivasyonu insülin üretiminin azalmasına, β hücresi kitlesinin azalmasına ve hatta β hücresi ölümüne neden olabilir (Kaneto 2002, Solinas 2006). Bu nedenle KPC'nin titiz ve devamlı bir şekilde kontrolü, β hücrelerinin ortamdaki glukoz seviyesine bağlı olarak uygun miktarda insülin salınımı yapması için çok önemlidir. Bu nedenle oldukça iyi kontrol edilen bu mekanizmada meydana gelecek bir hata glukoz homeostazının regülasyonundaki bozukluğa ve β hücrelerinde hata/ölüme neden olmaktadır.

ER stresi, KPC ve diyabet arasındaki yakın ilişkiden yola çıkarak Quan ve arkadaşları otofajisi bozuk olan β hücrelerinde KPC genlerinin ifadenmelerine bakmışlardır. Çalışma sonunda otofajisi bozuk olan β hücrelerinde KPC genlerinin hemen hemen tamamının ifadenmelerinde azalma saptamışlardır. ER stresi ve ER stres cevabı arasındaki ilişkinin daima doğrusal olmadığı, uygun KPC'nin, ER stresine karşı adaptif bir cevap olduğu ve ER stresi ile karşılaşıldığında yetersiz kalan KPC'nin hücreler için gerçek bir tehlike haline geldiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Merksamer, Trusina ve ark., 2008). Bugün ki bilgiler ışığında otofajinin uygun KPC cevabında çok önemli olduğu ve otofaji mekanizmasındaki bozukluğun KPC cevabının bozulmasına ve hücreleri strese karşı savunmasız hale getireceği sonucuna varılmıştır (Quan, Hur ve ark., 2012).

2.3.7. Lipotoksisite Aracılıklı ER Stres

Tip 2 diyabet (T2D) gibi prevalansı gittikçe artan bazı hastalıklar ile ilişkili olan metabolik faktörler arasında serbest yağ asitleri (Free Fatty Acids, FFA) öne çıkmaktadır. Özellikle lipidin indüklediği pankreatik beta hücresi fonksiyon bozukluğu (lipotoksitite) son dönemde en çok tartışılan kavramlardan birisidir. Yüksek seviyedeki FFA'nın insülin salgılanmasını bozarak apoptoz ile hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Martino, Masini ve ark., 2012). Ayrıca yapılan çalışmalar yüksek glukoz varlığında yağ asitlerinin insülin gen ifadenmesini bozduğunu da göstermektedir (Poitout, Amyot ve ark., 2010). Düşük doz glukoz konsantrasyonlarında yağ asitleri beta oksidasyonuna uğramaları için karnitin palmitoil transferaz-1 (Carnitine palmitoyltransferase I, CPT-1) enzimi aracılığı ile mitokondriona taşınırlar. Bu taşınmanın önemli bir fonksiyonel sonucu yoktur. Ancak yağ asidi ve glukoz konsantrasyonları aynı anda yükseldiğinde glukozun hücre içinde metabolize edilmesi sonucu sitoplazmada sitrat gibi kataplerotik sinyaller ve ona bağlı olarak da malonil-koA meydana gelir. Beta hücresinde yağ asidi sentez aktivitesi asetil-koA karboksilazdan daha az olduğunda malonil-koA'nın baskın etkisi ile karnitin palmitoil transferaz-1 aktivitesi baskılanır. Böylelikle yağ asidi oksidasyonu engellenmiş olur. Bunun sonucunda da sitoplazmada uzun zincir açil koA esterleri (LC-CoA) birikir. Bu durumda aktive olan esterifikasyon yoluyla lipidden meydana gelen seramid, digliserid (DG), fosfatidik asit (PA), fosfolipid (PL) ve trigliserid (TG) gibi sinyal molekülleri sitoplazmada birikir. Biriken bu metabolitler beta hücresi fonksiyonunu etkilemektedir (şekil 1.19).

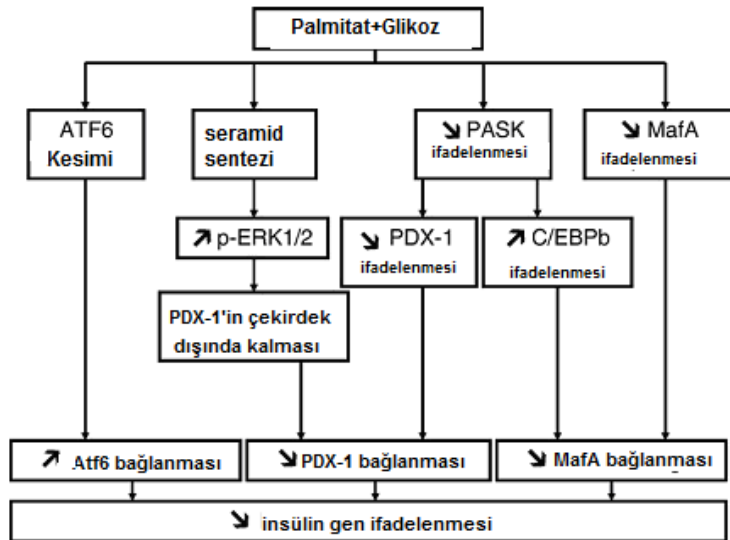


Şekil.1.19. Hücre içinde serbest yağ asidi döngüsü (Poitout, Amyot ve ark., 2010).

Yüksek glukoz varlığında uzun süre yağ asitlerine maruz kalmak insülin gen ifadenmesini bozmaktadır. Palmitat ve oleatın her ikisi de insülin salgılanmasını inhibe ederken sadece palmitat insülin gen ifadenmesini etkilemektedir. Bunun nedeni sadece palmitatın de novo seramid sentezinde substrat olarak kullanılmasıdır (Kelp, Moore ve ark., 2003). Palmitatın, insülin gen ifadenmesini inhibe ettiği transkripsiyon mekanizmaları insülin mRNA stabilitesini etkilemezken glukozun indüklediği insülin promotör aktivitesini inhibe ederler. Bu durum pankreas duodenum homeobox1 (PDX-1) ve MafA transkripsiyon faktörlerinin bağlanma aktivitelerinin azalması ile ilişkilidir. PDX-1'in çekirdeğe translokasyonu engellenirken MafA ifadenme düzeyinde etkilenmektedir. Glukotoksitide de ise MafA posttranslasyonel olarak etkilenmektedir.

Palmitat glukozla bağlı olarak indüklenen hücre dışında düzenlenen kinazlar (extracellular regulated kinazlar, ERK) 1/2 fosforilasyonunu artırır. İnsülin üreten hücreler palmitat veya seramide maruz kaldıklarında (ERK) 1/2 farmakolojik olarak inhibe edildiklerinde insülin gen ifadenmesini kısmi olarak arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca palmitat, glukoz ile indüklenen Per-Arnt-Sim kinazı (PASK) durdurur. PASK evrimsel olarak korunmuş olan serin/treonin protein kinazdır. Sahip olduğu bir PAS bölgesi ile hücre içindeki koşulları algılar ve kinaz bölgesini kontrol ederek sinyali iletmesini sağlar (Amezcuca, Harper ve ark., 2002). Memelilerde glikojen sentezini ve hücresel enerji dengesini kontrol ettiği gösterilmiştir. Pankreatik beta hücrelerinde PASK glukozun indüklediği insülin gen transkripsiyonu için gereklidir. Poitout ve

arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada PASK'ın fazla ifade lenmesinin palmitatın insülin mRNA, PDX-1 mRNA ve proteininin ifade lenmesi üzerindeki inhibitör ik etkisinin kald ır d ığı nı göstermişlerdir. PASK yolağ ının ERK 1/2 yolağ ından bağımsız olduğu ve MafA ifade lenmesi üzerinde bir etkisi olmad ığı gösterilmiştir. Bu nedenle de insülin gen ifade lenmesi üzerinde en az 3 farklı yolağ ın etkisi olduğu düşünölmektedir. CAAT enhancer-binding protein β (C/EBP β) insülin gen transkripsiyonunun negatif düzenleyicisidir ve beta hücrelerinde yağ asidine cevap olarak artar. Dominant negatif PASK mutant MIN6 hücrelerinde belirgin derecede artmaları insülin promotörü üzerindeki NFAT transkripsiyon faktörüne bağlanarak MafA 'nın bağlanma aktifşvitesini düşürdüğü tahmin edilmektedir (şekil 1.20) (Poitout, Amyot ve ark., 2010).



Şekil 1.20. ATF6-palmitat-glukoz ifade lenme düzenlenmesi.

Birçok durumda yağ asitlerine cevap olarak verilen güçlü ER stres cevabı apoptoz ile ilişkilidir. Poitout ve arkadaşlarının izole edilmiş rat islet hücreleri ile hazırladıkları kültür ortamında yapmış oldukları çalışmada glukoz ve palmitat varlığında önemli bir hücre ölümü saptamadıkları gibi IRE1 veya PERK aktivasyonu da saptamamışlardır. Bunun aksine transkripsiyon faktör ATF6'nın kesime uğradığını göstermişlerdir. ATF6 insülin gen transkripsiyonunun negatif düzenleyicisi olduğundan yağ asidi ile karşılaşıldığında bir koruyucu mekanizma olarak Atf6'nın erken aktive olduğu böylelikle insülin gen ifade lenmesi durdurularak

ER'nin yükünün artmaması sağladığı düşünülmektedir (Poitout, Amyot ve ark., 2010).

INS-1E hücrelerinde 0,5 veya 1 mM palmitata maruz kalınmasına bağlı olarak otofaji aktivasyonu gerçekleştiği gösterilmiştir (Martino, Masini ve ark., 2012). Otofaji aktivasyonunun uzun sürmesi akıllara otofajinin diyabet ile ilişkili β hücrelerinin fonksiyonunun bozulması ve ölümleri ile ilişkili olabileceği sorusunu getirmiştir. Yapılan çalışmalar ER stresinin β hücrelerinin fonksiyonlarını kaybetmesine ve ölümüne neden olan en önemli faktör olduğunu göstermektedir. Ancak β hücrelerinde görülen ER stresinin tam olarak nedeni ve KPC'nin kollarının bu süreçteki rolü henüz tam olarak ortaya konamamıştır. FFA seviyesi bazal seviyenin 2 katına çıktığında, obez olup diyabet olmayan bireyler de glukozun stimüle ettiği insülin salınımında önemli bir azalma olmaktadır. Bir doymuş uzun zincir yağ serbest yağ asidi olan palmitatın fare ve insan klonal ve primer hücrelerinde ER stresini indüklediği bununla birlikte doymamış uzun zincir serbest yağ asitlerinin ise indüklediği bildirilmiştir. Palmitatın PERK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Bunun ile birlikte palmitatın ATF6 α kolunu özellikle aktive edip etmediği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Karaskov, Scott ve ark., 2006). Çünkü hem palmitat hem de oleat XBP1 ve Grp78 mRNA miktarlarını arttırmaktadır ancak doymuş yağ asitlerinin katlanmamış protein cevabını nasıl aktive ettiği tam olarak bilinmemektedir. Yapılan bazı çalışmalar palmitatın ER'un doymuş lipid içeriğini hızlı bir şekilde arttırdığını, buna bağlı olarak ER'un morfolojisini ve bütünlüğünü bozduğunu ve sonucunda da doğrudan veya dolaylı olarak ER stresini tetiklediği görüşünü savunmaktadır (Back, Kang ve ark., 2012). Örneğin ER tarafından kontrol edilen lipid içeriğinin palmitat tarafından bozulması ER den Golgiye veziküler stomatitis virüs G protein (VSVG) ile olan transferi bozar bunun sonucunda da ER'de yanlış katlanan protein birikimine bağlı stres gelişmektedir.(Preston, Gurisik ve ark., 2009) . Min 6 β hücrelerinde ve insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK) steroyl koenzim A desaturaz 1(SCD1) tarafından gerçekleştirilen yağ asidi desaturasyonundaki artış palmitatın indüklediği hücre ölümünü azaltmaktadır. Bunun aksine INS -1 β hücrelerinde SCD susturulması ile desature palmitatın monosature yağ asidine dönüşümü azaldığından kompleks

nötr lipidlerdeki yağ asidi oranı azalır ve palmitatın indüklediği ER stres ve apoptoz indüklenir (Green ve Olson 2011).

2.3.8. ER Stresi ve Hücre Ölümü

Hücreler ER stresine bağlı olarak geri dönüşümsüz hasara uğrarlar ise apoptotik programı aktive ederler. ER stres ve hücre ölüm sistemi arasında birden fazla yolak mevcuttur. BH3- only ailesi üyeleri ER stresi ile tetiklenen apoptozu düzenlemektedirler. BH3-only proteinleri transkripsiyonel veya post transkripsiyonel olarak ER stresi ile aktive olurlar. Bu aktivasyona bağlı olarak mitokondrial permeabilizasyonu başlatan proapoptotik Bax ve Bak aktive olur. Yolaklardan bir tanesinde ER stresi Bim'i CHOP aracılıklı doğrudan transkripsiyonel indüksiyon ile veya ubiquitinasyonunu ve proteazomal degradasyonunu engelleyen protein fosfataz 2A aracılıklı defosforilasyonu ile aktive olmasına neden olur (Puthalakath, O'Reilly ve ark., 2007). Geri dönüşümsüz ER stresi koşullarında apoptoz ile ilişkili olan bir başka sinyal yolağı IRE1- Apoptoz sinyal düzenleyici kinazı aktive eden 1 (activates apoptosis signal regulating kinase-1, ASK1,) / cJun -N-terminal kinase (JNK) yolağıdır. JNK, antiapoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1'i fosforlayarak inhibe ederler. Bundan başka JNK, Bid ve Bim gibi BH-3-only proteinlerini fosforlayarak aktive eder ve apoptozu indükler (Weston ve Davis 2007).

PERK ve ATF6 tarafından ifadelenemesini düzenleyen CHOP yolağı, ER stresini takiben görülen hücre ölümünün kontrolünde çok önemlidir. CHOP'un etkisinin ortadan kalkması hücre hayatta kalımı ile ilişkilidir ve CHOP transkripsiyon faktörü olmayan hücreler apoptozdan önemli ölçüde korunurlar. Proapoptotik etkiye sahip olan CHOP'un hücre ölümü ile başka bağlantıları da vardır. CHOP, GADD34 ve bir ER oksidaz olan ERO1 α 'i pozitif yönde regüle eder. Bu nedenle CHOP, GADD34 yolu ile protein sentezini ve protein yükünü hücre ölümü lehine olacak şekilde düzenlenir. ERO1 α yolu ile de güçlü bir okside ER ortamı oluşturarak reaktif oksijen türevlerinin artmasını sağlar (Puthalakath, O'Reilly ve ark., 2007).

2.4. AMAÇ

Bugüne kadar ER stresine bağı olarak tetiklenen katlanmamış protein cevabında, PERK ve IRE1 üzerinden işleyen mekanizmalar hakkında veriler bulunmasına rağmen, ATF6 yolağındaki boşluklar henüz doldurulamamıştır. ATF6'nın aktivasyon mekanizması ve hedef genleri hakkındaki bilgiler fazla olmamak ile birlikte insülin salgılayan pankreatik β hücrelerindeki rolü de tam olarak bilinmemektedir. INS-1E hücrelerinde ATF6'nın susturulması durumunda apoptotik fenotipin geliştiğı, PERK ve IRE-1 yolaklarının etkili çalışmadığı ve hücrelerin ER stresine karşı daha hassas hale geldiğı gösterilmiştir. Bu tez çalışması, ATF6'nın otofajik genlerin aktivasyonunda etkili rol oynadığını belirlemek amacıyla planlanmıştır. Rat pankreatik hücre serisi INS-1E hücrelerinde *in vitropalomitik asit ile oluşturulan* ER stres ortamında, hücrelerin hayatta kalımı/ölümünü seçim sürecinde etkin rol oynayan otofaji / apoptozis genlerindeki ifadelenme değışikliklerine bakılarak ER stresi- otofaji arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Rat pankreas beta hücre dizisi olan INS-1E hücrelerinde palmitik asit ve palmitik asit ile birlikte rapamisin kullanılarak yaratılan stres ortamında, ATF6 ifadenmesi ve zamana bağlı olarak; ATF6, PERK, XBP-1, GRP78, CHOP, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Atg5, Atg7 ve Beklin-1, LC3-II; ER stres/otofaji/apoptoz genlerinin ifadenmelerine bakılmıştır.

2.1. Çalışmada kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

2.1.1 Hücre Kültürü

Hücre Hattı	: Çalışmada kullanılan INS-1E hücreleri İsviçre Genova Üniversitesi Prof. Dr. Pierre Maehler tarafından bağışlanmıştır. Yurt dışından soğuk zincirde gelen hücreler oda ısısında çözülerek uygun besi yerinde çoğaltıldıktan sonra çalışmanın malzemeleri tamamlanana kadar dondurularak sıvı nitrojen (-180° C) de saklanmıştır.
Besi yeri	: Sigma, RPMI Medium R0883
Fötal Dana Serum (FBS)	:Sigma, F7524
L-Glutamin	: Sigma, G6392 (200mM, 50ml)
Penisilin-Streptomisin	:Sigma, P4333
Tripsin-EDTA (%0,25)	:Sigma, T3924
Flask (25cm ²)	: Falcon, 353108
Hücre Dondurma tüpleri	:Greiner bio-one, 2ml

Dimetilsülfoksit DMSO)	:Sigma,D9170
Fosfat Tuz Tamponu	:Sigma, D1408
Sodyum Pirüvat (100mM)	: Sigma, S8636
2-Merkaptoetanol	:Merck, ES-007-E
Palmitik asit	:Sigma, P0500
Hepes	:Sigma, H3784
Deney tüpü (15ml)	:Greiner, 188261
NaOH	: Sigma, S2770
BSA	: Sigma A6003
Flask (96 kuyu)	:Starlab,CytoOne 96 well plate, CC7682-7596
Rapamisin	:Calbiochem, 553210, 1mg

2.1.3. İmmunohistokimya

6 veya 24 kuyucuklu plak	:Orange Scientific, 5530500
Metanol	: Merck, K39481808903
LC3 antikor (100µl)	:Cell Signaling, 2775S
Keçi anti-tavşan IgG	:Anaspec, INC 28176 FITC
FITC işaretli	
Triton X-100	:Sigma, T8787
Bloklama solüsyonu	: 50 µl serum, 1 µl LC3 antikor,
(6 kuyucuklu plakın her bir	: 450 µl %0,1'lik TritonX 100
kuyucuğu için)	
Sekonder antikor solüsyonu	: 5 µl sekonder antikor, 495 µl %0,1'lik TritonX 100
6 kuyucuklu plakın her bir	
kuyucuğu için)	

Floresan Mikroskop	:Olympus BX51 (FITC filtreye sahip)
Lam	:İsotherm, 24X32
Formaldehit	: Sigma, HT501128, %4'lük

2.1.4. Mono-Dansyl-Cadaverine (MDC) Boyama

6 veya 24 kuyucuklu plak :Orange Scientific, 5530500

MDC floresan boya :Santacruz, sc-214851

MDC boyası PBS içinde 500 µM olacak şekilde hazırlveı.

2.1.5. [3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium Bromid] (MTT)

Sitotokstite Testi

MTT tozu :Roche, 11465007001

MTT solüsyonu : 5 mg toz MTT 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü ve filtre edilerek (0,20 µm) kullanıldı.

2.1.6. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon kiti : Qiagen, RNeasy mini kit,74104

Dietil piro karbonat, DEPC, : Sigma, D5758

DEPC'li su :%0,1 konsantarasyonda. 100 ml steril distile su (dH₂O)'ya 0,1ml DEPC eklendi. Bu solusyon oda sıcaklığında 24 saat mayetik karıştırıcıda karıştırıldı. Otoklavıveıktan sonra (100 °C'de 15 dakika) soğutularak kullanıldı.

Etil Alkol : Sigma, E7023

2.1.7. cDNA sentezi

Transcriptor High Fidelity : Roche, 05081963001

cDNA Synthesis Kit

cDNA sentezi için bu kit dışında sarf malzemesi olarak 0,2ml'lik PZR tüpleri ve pipet uçları kullanılmıştır.

2.1.8. cDNA Kontrol PCR

Taq DNA polimeraz (5U/μl) : Roche, 11146173001

dNTP (10mM X 4) : Roche, 11581295001

Rat beta aktin primer F : 5'CGTCTTCCCCTCCATCG3'

Rat beta aktin primer R : 5' CTCGTTAATGTCACGCAC 3'

MgCl₂ (25mM) : Sigma, M8787

PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri Kodak EDAS 290 UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. PZR işlemi için Biometra T-1 cihazı kullanılmıştır.

2.1.9. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz : Applichem, A 2114

TAE çözeltisi;

Tris baz : Sigma, T7527

Borik Asit :Sigma, B6768

EDTA :Sigma, E5134

Yükleme Tamponu;

Gliserol :Sigma, G5516

Orange G :Sigma,O3756

15 ml gliserol, 100mg orange G ve 35 ml 1X TAE içinde hazırlanmıştır.

Etidyum Bromür : İnvitrogen, 15585-011

DNA markır (50bç) :Thermo scientific, SMO373

%1'lik agaroz jel :1 gr agaroz, 100ml 0,5X TAE, 2,5 μl Etidyum Bromür

2.1.10. Eş Zamanlı PZR (RT-PZR)

qRT-PZR için Roche firmasına ait Light Cycler 2.0 (LC 2.0) cihazı kullanılmıştır.

LC Kapiller	: Roche, 04929292001
LightCycler TaqMan Master:	Roche, 04 735 536 001
Hspa5 (Grp78) prob	: Roche, 100046182
Eif2ak3 (PERK) prob	: Roche, 100046207
Atf6 prob	: Roche, 100046085
Xbp1 prob	: Roche, 100046191
Becn1 (Beklin1) prob	: Roche, 100046146
Map1lc3a (LC3-I) prob	: Roche, 100046127
Atg5 prob	:Roche, 100046164
Atg7 prob	:Roche, 100046155
CHOP (Ddit3) prob	:Roche, 100046173
Bcl-Xl (Bcl2l1) prob	:Roche, 100046094
Bcl-2 prob	:Roche, 100046128
Bax prob	:Roche, 100046182
Bak1 prob	:Roche, 100046100
Aktin b prob	:Roche, 100023376

Çalışmada kullanılan tüm pipet uçları filtereli sterildir. 0,2, 1,5, 15 ve 50 ml'lik deney tüpleri hepsi steril ve greiner markadır.

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1.a. Hücrelerin Çözülmesi

Azot tankından içinde, %10 DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş olan hücreler çıkarılarak, önceden 37°C ayarlanmış su banyosu içinde 1 dakika bekletildi. Başka bir tüp içine 9 ml besiyeri konuldu ve dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı bu tüpe aktarıldı. 1000 devirde 3 dakika santrifuj sonrası tüpün üstündeki supernatan atıldı. Tüpün dibinde kalan pelet üzerine besiyeri eklendi. Eklenen besiyeri ile pipetaj sonrası, tüpte oluşan hücre+besiyeri karışımı 25ml'lik 2 flaska ekildi. İverted mikroskopta hücrelerin incelenmesi sonrasında hücreler CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

2.2.1.b. Hücrelerin Çoğaltılması ve İdamesi

INS-1E hücreleri için, 1mM sodyum piruvat, 50 µM 2-merkaptoetanol, 2mM glutamin, 10mM HEPES, 100 units/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal dana serum eklenen RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. 7 günde bir bu besiyeri değiştirilerek 37°Cde %5 CO₂'li inkübatörde büyümeleri sağlandı. Ayrıca flasklar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma ve infeksiyon açısından değerlendirildi. Hücreler ekildikleri flaskları kapladıklarında (%90 konfluensiye ulaştıktan sonra) %0.25 Tripsin-EDTA ile pasajlandı. Pasaj sonrası hücrelerin 25 cm²'lik yeni flasklara 4X10⁴ hücre / cm² olacak şekilde ekilip üremeleri sağlandı. Çalışma için yeterli sayıda hücre elde edildiğinde hücreler 96 kuyulu plaklara ve lamlara ekildi.

2.2.1.c. Palmitik Asit ve Rapamisinin Hazırlanması

Bu çalışmada endoplazmik retikulumda stres yaratan doymuş yağ asidi palmitik asit literatürdeki bilgiler ışığında (Martino, Masini ve ark., 2012) 70°C'de 0,1 M sodyum

hidroksit kullanılarak 100mM stok palmitik asit hazırlandı ve filtreden geçirildi. 10mg/ml konsantrasyonunda bovin serum albumin (BSA) serum içermeyen RPMI besi yeri ile stok olarak hazırlandı ve son konsantrasyon %5'lik BSA serum içermeyen RPMI besi yeri ile hazırlandı ve filtreden geçirildi. 5mM PA/BSA karışımı uygun miktarlarda PA ve %5'lik BSA kullanılarak 60°C su banyosunda hazırlandı. Bu karışım oda ısısına kadar soğutuldu ve serumsuz RPMI kullanılarak 2mM PA haline getirildi. 96 kuyuluk plaklarda 0,5mM ve 1mM olacak şekilde hesaplamalar yapılarak bu stoklardan kullanıldı. Rapamisin 100ng/ml DMSO'da çözülerek stok şeklinde hazırlandı. 96 kuyulu plaklarda son hacim 10ng/ml olacak şekilde hesaplama yapılarak bu stoktan kullanıldı. Kontrol gurubunda ise %5'lik BSA ve 0,1 M NaOH ve DMSO kullanıldı.

2.2.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Testi

Palmitik asitin hücreler üzerindeki sitotoksosite düzeylerini (IC50=İnhibitör doz) saptamak amacı ile MTT testi uygulandı. Bunun için ilkönce toma lamında sayım yapıldı. Daha sonra INS-1E hücreleri 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekim yapıldı. Kuyucuklara 100µl besiyeri eklenerek, tutunmaları için 48 saat 37 °C' de %5CO₂'li etüvde beklendi. Hücreler 0,5mM palmitik asit ve 10 ng/ml rapamisin varlığında 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 saat inkübe edildi. Her bir saat için ayrı bir 96 kuyuluk plak kullanıldı. İnkübasyon süresi dolan plak etüvden alındı ve üzerindeki besiyeri çekilerek daha önceden hazırlanan MTT solüsyonu toplamda 100 µl besiyeri içinde 5mg/ml olacak şekilde eklendi. İnkübasyon sonrası hücre canlılığı ve sitotoksitesisi kolorimetrik MTT kit ile belirlendi. Kararlı (dayanıklı) tetrazolium tuzu olan MTT hücrelerde gerçekleşen kompleks hücrel mekanizma ile çözülebilir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerde NAD(P)H nın glukolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. Bizde çalışmamızda farklı saatlerde uygulanan palmitik asit ve rapamisinin INS-1E hücreleri üzerine sitotoksik etkisini göstermek amacıyla MTT kullandık. Bunun için inkübasyon sonrası hücrelerin bulunduğu kuyulara 10µl MTT(4-[3-(4-iodophenyl)-2-

(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) eklendi. 1 saat 37°C' de %5 CO₂' li inkübatörde inkübe edildi. Bir saat sonra 550nm - 690 nm dalga boyunda mikro ELISA okuyucuda (EPOCH Gen 5 2.0) okundu ve sonuçlar all-in-one microplate reader programında analiz edildi.

2.2.2 Hücre Kültürü Materyalinden RNA İzolasyonu

96 kuyulu plaklara ekilmiş olan INS-1E hücreleri palmitik asit ve rapamisin ile gerekli inkübasyon süreleri sonunda (0, 3, 6, 9, 12, 24 ve 48. saat sonunda) bu kuyulardan toplandı. Toplanan bu hücrelerden aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonları yapıldı. RNA izolasyonu çok iyi sterile edilmiş labaratuvar ortamında RNaz açısından steril malzemeler ve filtreli pipet uçları kullanılmıştır.

1.Kuyulardan dikkatli bir şekilde besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl RLT tamponu koyuldu. Çok dikkatli pipetleme yapıldıktan sonra toplanan hücreler 1,5 ml'lik steril deney tüplerine alındı. 250 µl ilave RLT tamponu koyuldu.

2.Üzerine 350 µl DEPC'li su ile hazırlanmış olan %70 etil alkol eklendi ve tüm hacim kolonlara aktarıldı. 15 saniye 13000g'de santrifuj yapıldı. Toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırıldı.

3. 700 µl RW1 tamponu eklendi. 15 saniye 13000g'de santrifuj yapıldı. Toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırıldı.

4. 500 µl RPE tamponu eklendi. 15 saniye 13000g'de santrifuj yapıldı. Toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırıldı.

5. 500 µl RPE tamponu eklendi.2 dakika 13000g'de santrifuj yapıldı. Toplama tüpüne toplanan faz uzaklaştırıldı.

6. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 1 dakika 13000g'de santrifuj yapıldı.

7.Kolon yeni bir 1,5 ml'lik steril deney tüpüne yerleştirildi. 40 µl RNAaz içermeyen su eklendi. 1 dakika 13000g'de santrifuj yapıldı.

Elde edilen 40 µl hacmindeki RNA'nın 6 µl'si steril bir başka tüpe aktarıldı. Bu işlem ile ana stoğun sürekli dondurma-çözme süreçlerine maruz kalması engellendi. Ayrılan bu RNA'nın 2 µl'si agaroz jelde RNA kalitesinin değerlendirilmesi, 2 µl'si

RNA kantitasyonu için, 2 µl ise cDNA sentezinde kullanılmıştır. Stok RNA ise izolasyon sonunda -80 °C' ye kaldırılmıştır.

RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi:

İzole edilen RNA'lar hazırlanan %1'lik agaroz jel de kontrol edildi. 70 ml 0,7 X TAE (Tris Asetikasit EDTA) tamponu içinde çözülen 0,5 gram agaroz kaynatıldı. İçine 3,5 µl (10mg/ml) etidyum bromür eklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra 2 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılan 2 µl RNA örneği 90V'da 15 dakika yürütüldü. Yürütme sonrası 28S, 18S ve 5S RNA net bir biçimde gözlenmiştir.

2.2.3.RNA Saflığının ve Miktarının Tayini

İzole edilen RNA'ların saflığını kontrolü 260/280 nm de ki absorbans oranı ile saptandı. Spektrofotometre cihazı olarak Epoch Gen5 2.0 ve all-in-one Reader software programı kullanıldı. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenen 260/280nm absorbans oranı 1,8-2,1'dir. 2µl izole edilen RNA ve 2µl steril distile su ile karıştırıldı ve okuma yapıldı. Elde edilen RNA'ların 260/280 nm absorbans oranı 2,0-2,1 olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrası elde edilen veriler 2 ile çarpılarak izole edilen RNA'ların miktarları saptanmıştır.

2.2.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi .

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için ticari bir kit kullanıldı. Steril, nükleaz uzaklaştırılmış PZR tüpleri buz üzerine koyuldu ve kalıp- primer karışımı aşağıdaki miktarlara göre hazırlandı.

Çizelge 2.1 Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Toplam RNA	değişken	100 ng
Random Hexamer Primer	2 µlt	60µM
PCR için uygun su	değişken	Son hacim 11,4 µlt olacak şekilde ayarlanır
Toplam Hacim	11,4 µlt	

Kalıp-primer karışımı 65°C’de 10 dakika bekletilerek denatüre edildi. Bu işlem ile RNA sekonder yapıları uzaklaştırıldı. İşlem sonunda tüpler hemen buz üstüne alındı. Ters transkriptaz (reverse transcriptase,RT) karışımı aşağıdaki protokole göre hazırlandı ve kalıp –primer karışımına transfer edildi.

Çizelge 2.2 Komplementer DNA (cDNA) karışımı

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer , 5x	4 µlt	1x (8mM MgCl ₂)
ProtectorRNase İnhibitor 40U/ µlt	0,5 µlt	20U
Deoxynucleotide Mix, 10mM each	2 µlt	1mM each
DTT	1 µlt	5mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µlt	10U
Toplam Hacim	8,4 µlt	

29 °C’de 10 dakika, 50 °C’de 60 dakika ve enzim inaktivasyonu için 85 °C’de 5 dakika bekletildi. Tüpler buz üstüne alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Elde edilen cDNA +2 - +8 °C’de 1- 2 saat saklanabilmektedir. Daha uzun süreler için -15- 25 °C’de saklanır.

2.2.5. cDNA Kontrol PZR

Elde edilen cDNA’lardan rat aktin β primerleri kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için aşağıdaki çizelgede gösterilen protokol kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Kontrol PZR protokol

Kimyasal	Stok Konsantrasyon	Son hacim
Taq DNA Polimeraz	5U/µl	1,25 µl
Taq DNA pol.tampon	5X	5 µl
dNTP	10mM her biri	1,6 µl
Primer F	100pmol	2,5 µl
Primer R	100pmol	2,5 µl
MgCl ₂	25mM	2 µl
dH ₂ O		
Kalıp DNA(cDNA)		2 µl
toplam		25 µl

94 °C’de 5 dakika denatürasyon sonunda 94°C’ de 30 saniye, 60°C’ de 45 saniye, 72 °C’ de 30 saniye 30 döngü yapılmıştır. PZR 72 °C’ de 5 dakika ile bitirilmiştir.

2.2.6 Gen İfadelemesinin Saptanması

ATF6 α , PERK, XBP-1, GRP78, CHOP, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Atg5, Atg7 ve Beklin-1, LC3-I genlerinin ifadenmeleri saptamak amacı ile her bir rat genine ait real time ready prob ile birlikte LightCycler TaqMan Master kiti kullanıldı. LightCycler TaqMan Master karışımı kit protokolüne uygun olarak hazırlandı. Bunun için ilkönce kit içinde bulunan ve 1a ile işaretlenmiş olan enzimden 10µl alınarak 1b ile işaretli olan reaksiyon karışımına ilave edildi. Böylelikle elde edilen karışımında fast start Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımı (dTTP yerine UTP olacak şekilde) bulunması sağlandı.

2.2.7. Mono-Dansyl-Cadaverine (MDC) Boyama

INS-1E hücreleri 5×10^5 yoğunlukta olacak şekilde 8 kuyulu plakların içindeki slaytlara ekildi. 48 saat sonunda hücrelere 0,5mM palmitik asit, 0,5mM palmitik asit + 10ng/ml rapamisin eklendi. 6 saat ve 12 saat inkübasyon sağlandı. İnkübasyon sonunda hücreler PBS ile iki defa yıkandı. Daha sonra 500µM MDC içeren PBS ile 10 dakika 37°C’ de süspanse edildi. Hücreler 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra hemen bir floresan mikroskopunda analiz edildi. (355 nm uyarım, 460 emisyon dalga boyunda).

2.2.8. Immunohistokimyasal İnceleme

INS-1E hücreleri 5×10^5 hücre/kuyu olmak üzere cover slip yerleştirilmiş özel 24 kuyulu lamlara ekilip, tutunmaları için 48 saat beklendi. Palmitik asit 0,5mM, rapamisin 10ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde 6 ve 12 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlanınca üst faz alındı. %3,5 olarak hazırlanmış olan paraformaldehit (PFA) her bir kuyuya 250 μ l olacak şekilde eklendi. 25 dakika oda ısısında beklenildikten sonra üst faz çekildi 3 defa PBS ile yıkandı. Daha sonra azitli PBS eklenerek hücreler boyama yapılacak tarihe kadar +4 °C'ye kaldırıldı. Boyama aşamasına gelindiğinde; Hücreler 1:100 dilusyonda anti-rabbit LC-3 (Abcam) ile nemli kutuda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkadıktan sonra hücreler 1:100 dilusyonda FITCH ile işaretli goat-anti rabbit IgG sekonder antikoları ile yarım saat karanlık ortamda inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkadıktan sonra 7AAD ile çekirdek boyası yapıp floresan kapatma medyumu ile kapatıldıktan sonra konfokal mikroskobu altında incelenip fotoğraflandı.

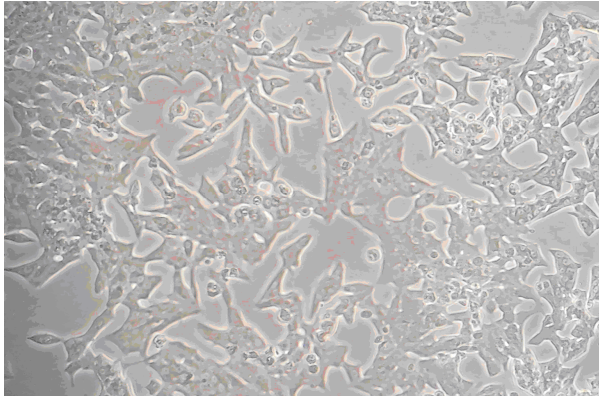
2.3. İstatistiksel Analizler

İstatistik incelemede, MTT testi iki faktörlü, faktörlerden biri tekrarlanan “Tekrarlanan Ölçümler Varyans Analizi” (Repeated Measures Analysis) testiyle değerlendirildi ($P < 0,05$). Gen ifadelerinin analizinde ise genel doğrusal model olarak tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (repeated measures analysis of variance) uygulanmıştır. Tip 1 hata (α) =0,05 alınarak önemlilik değerleri (significant-p değeri) karşılaştırılmıştır. P (significant) $\leq \alpha=0,05$ farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

3. BULGULAR

3.1. INS-1E Hücrelerinin Mikroskopik İnceleme Bulguları

İn vitro ortamda azot saklama tankından dondurulmuş olarak çıkarılan INS-1E hücreleri besi ortamlarında çözüldükten sonra kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin 48 saat sonra inverted mikroskop değerlendirilmelerinde tutunmuş oldukları saptandı. Tutunan INS-1E hücreleri proliferatif faza geçtiklerinde yaklaşık 3. günde %50, 5. günde %70, 7. günde ise %100 devamlılık ile tüm kültür kabını kaplamış olarak gözlemlendi (Şekil 3. 1).

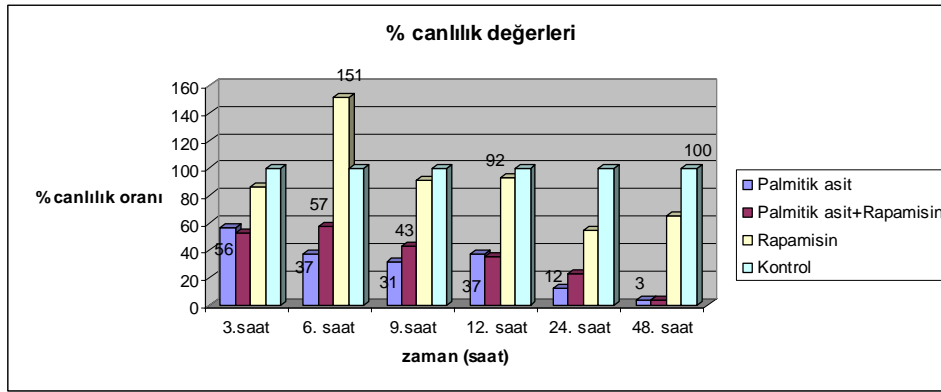


Şekil 3. 1. INS-1E hücreleri. İverted mikroskopta pasajlandıktan sonra tutunup çoğalmaya başlayan 5.gündeki INS-1E hücreleri (x20)

3.2. Palmitik Asit ve Rapamisinin INS-1E Hücrelerinde Zamana Bağlı Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Değerlendirme Bulguları

Uzun zincir doymuş yağ asitlerinin beta hücresi fonksiyon bozukluğuna neden olması lipotoksitite olarak bilinmektedir. Fazla miktardaki yağ asitlerinin ve onların metabolik ürünlerinin beta hücreleri üzerindeki zararlı etkileri insülin direnci, glukoz intoleransı ve tip 2 diyabet gelişimi şeklinde görülmektedir. Bu nedenle doymuş uzun zincirli yağ asiti palmitik asitin rat pankreatik beta hücreleri olan INS-1E üzerindeki etkisini hücre canlılığı ve otofaji aktivasyonu açısından incelendi. Bunun

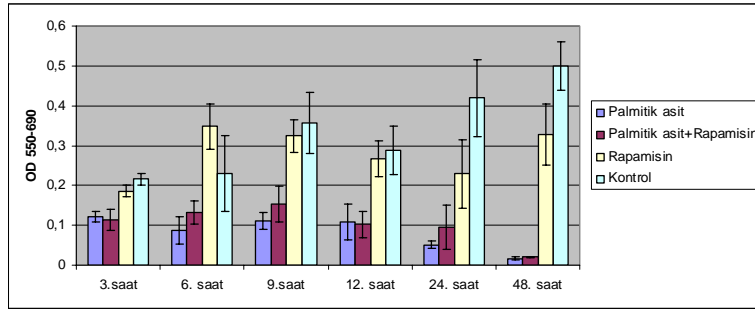
için palmitik asit ile birlikte bir farmakolojik otofaji aktivatörü olan rapamisin kullanıldı. Palmitik asit için $LC_{50}=0,5mM$ olarak tespit edildikten sonra 96 kuyuluk plaklara ekilen hücelere her bir kuyuda besi yeri ile birlikte 250 μ l toplam hacimde 0,5 mM palmitik asit ve 10 ng/ml rapamisin olacak şekilde uygulama yapıldı. 8 kuyudan toplanan hücrelerden RNA izolasyonu için ayrıldı, 4 kuyuda bulunan hücreler MTT testi için kullanıldı. INS-1E hücrelerinin palmitik asit ve rapamisin ile 3, 6, 9, 12, 24, 48 saat inkübasyonu sonrasında hücre canlılığı MTT testi ile analiz edildi. MTT test yöntemi, biyoyumluluk testleri içerisinde, hızlı sonuç alınması ve çok hassas olmasının yanı sıra materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin dahi değerlendirilebilmesine olanak sağlaması nedeniyle en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir. MTT testi sonucu elde edilen bulgular şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3. 2. Hücre canlılık oranları

MTT testi sonucunda palmitik asidin INS-1E hücrelerinde tek başına bir stres faktörü olduğu ve ER stresi oluşturduğu en etkin saatin 6. saat olduğu belirlenmiştir. Çünkü canlılık oranının en fazla düşüş gösterdiği saat 6. saat olarak saptanmıştır (şekil 3.3).

INS-1E hücrelerinin palmitik asitin, palmitik asit+rapamisinin ve rapamisinin tek başına uygulanma süresine bağlı olarak duyarlılığının farklı olduğu saptanmıştır. ER üzerinde palmitik asidin yaratmış olduğu strese karşı uzun sürede rapamisinin koruyucu bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. MTT testine ait saatler ve gruplar arasındaki istatistiksel analize ait sonuçlar çizelge 3.1 de verilmiştir



Şekil 3.3. Absorbans oranlarına bağlı hücre canlılık oranları. Hata barları standart sapmaları göstermektedir ($p < 0,05$).

Çizelge 3. 1. MTT testi istatistiksel analiz ($p < 0,005$)

saat	(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
						Upper Bound	Lower Bound
3. saat	PA	PA+Rap	0,007	0,012	1,000	-0,032	0,046
		Rap	-,065(*)	0,012	0,001	-0,104	-0,026
		Kontrol	-,095(*)	0,012	0,000	-0,134	-0,056
	PA+Rap	PA	-0,007	0,012	1,000	-0,046	0,032
		Rap	-,072(*)	0,012	0,000	-0,111	-0,033
		Kontrol	-,102(*)	0,012	0,000	-0,141	-0,063
	Rap	PA	,065(*)	0,012	0,001	0,026	0,104
		PA+Rap	,072(*)	0,012	0,000	0,033	0,111
		Kontrol	-0,030	0,012	0,197	-0,069	0,009
	Kontrol	PA	,095(*)	0,012	0,000	0,056	0,134
		PA+Rap	,102(*)	0,012	0,000	0,063	0,141
		Rapam	0,030	0,012	0,197	-0,009	0,069
6. saat	PA	PA+Rap	-0,046	0,042	1,000	-0,179	0,088
		Rap	-,261(*)	0,042	0,000	-0,395	-0,128
		Kontrol	-,143(*)	0,042	0,033	-0,277	-0,010
	PA+Rap	PA	0,046	0,042	1,000	-0,088	0,179
		RApam	-,216(*)	0,042	0,002	-0,349	-0,082
		Kontrol	-0,098	0,042	0,242	-0,231	0,036
	Rap	PA	,261(*)	0,042	0,000	0,128	0,395
		PA+Rap	,216(*)	0,042	0,002	0,082	0,349
		Kontrol	0,118	0,042	0,099	-0,016	0,252
	Kontrol	PA	,143(*)	0,042	0,033	0,010	0,277
		PA+Rap	0,098	0,042	0,242	-0,036	0,231
		Rap	-0,118	0,042	0,099	-0,252	0,016

saat	(I) grup	(J) grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)	95% Confidence Interval for Difference(a)	
						Upper Bound	Lower Bound
9. saat	PA	PA+Rap	-0,042	0,035	1,000	-0,154	0,069
		Rap	-,214(*)	0,035	0,000	-0,325	-0,102
		Kontrol	-,245(*)	0,035	0,000	-0,356	-0,134
	PA+Rap	PA	0,042	0,035	1,000	-0,069	0,154
		Rap	-,171(*)	0,035	0,002	-0,283	-0,060
		Kontrol	-,203(*)	0,035	0,001	-0,314	-0,091
	Rap	PA	,214(*)	0,035	0,000	0,102	0,325
		PA+Rap	,171(*)	0,035	0,002	0,060	0,283
		Kontrol	-0,031	0,035	1,000	-0,143	0,080
	Kontrol	PA	,245(*)	0,035	0,000	0,134	0,356
		PA+Rap	,203(*)	0,035	0,001	0,091	0,314
		Rap	0,031	0,035	1,000	-0,080	0,143
12. saat	PA	PA+Rap	0,005	0,033	1,000	-0,099	0,109
		Rap	-,159(*)	0,033	0,002	-0,263	-0,055
		Kontrol	-,181(*)	0,033	0,001	-0,285	-0,077
	PA+Rap	PA	-0,005	0,033	1,000	-0,109	0,099
		RApam	-,165(*)	0,033	0,002	-0,268	-0,061
		Kontrol	-,186(*)	0,033	0,001	-0,290	-0,082
	Rap	PA	,159(*)	0,033	0,002	0,055	0,263
		PA+Rap	,165(*)	0,033	0,002	0,061	0,268
		Kontrol	-0,021	0,033	1,000	-0,125	0,082
	Kontrol	PA	,181(*)	0,033	0,001	0,077	0,285
		PA+Rap	,186(*)	0,033	0,001	0,082	0,290
		Rap	0,021	0,033	1,000	-0,082	0,125
24. saat	PA	PA+Rap	-0,044	0,159	1,000	-0,544	0,456
		Rap	-0,178	0,159	1,000	-0,678	0,322
		Kontrol	-0,368	0,159	0,232	-0,868	0,132
	PA+Rap	PA	0,044	0,159	1,000	-0,456	0,544
		Rap	-0,134	0,159	1,000	-0,634	0,366
		Kontrol	-0,324	0,159	0,381	-0,824	0,176
	Rap	PA	0,178	0,159	1,000	-0,322	0,678
		PA+Rap	0,134	0,159	1,000	-0,366	0,634
		Kontrol	-0,190	0,159	1,000	-0,690	0,310
	Kontrol	PA	0,368	0,159	0,232	-0,132	0,868
		PA+Rap	0,324	0,159	0,381	-0,176	0,824
		Rap	0,190	0,159	1,000	-0,310	0,690
48. saat	PA	PA+Rap	-0,004	0,035	1,000	-0,113	0,105
		Rap	-,310(*)	0,035	0,000	-0,419	-0,201
		Kontrol	-,484(*)	0,035	0,000	-0,592	-0,375
	PA+Rap	PA	0,004	0,035	1,000	-0,105	0,113
		Rap	-,306(*)	0,035	0,000	-0,415	-0,197
		Kontrol	-,480(*)	0,035	0,000	-0,589	-0,371
	Rap	PA	,310(*)	0,035	0,000	0,201	0,419
		PA+Rap	,306(*)	0,035	0,000	0,197	0,415
		Kontrol	-,174(*)	0,035	0,002	-0,282	-0,065
	Kontrol	PA	,484(*)	0,035	0,000	0,375	0,592
		PA+Rap	,480(*)	0,035	0,000	0,371	0,589
		Rap	,174(*)	0,035	0,002	0,065	0,282

3. saat sonunda palmitik asit veya palmitik asit+rapamisin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,005$). 6. saatte uygulanan palmitik asit+rapamisin ile rapamisin arasında anlamlı bir fark saptanırken kontrol ile palmitik asit+rapamisin arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. 48. saat sonunda uygulama yapılan hücrelerin çok büyük bir kısmının kaybedildiği saptanmıştır.

3.3. Palmitik Asit, Rapamisin, Palmitikasit+Rapamisin Uygulanan INS-1E Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Sonuçları

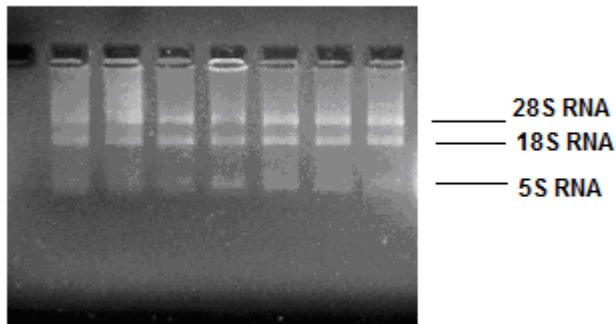
Farklı saatlerde uygulanan palmitik asit ve rapamisin sonrasında INS-1E hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan ölçümlerin sonuçları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Örneklere ait RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları

Örnek	Pozisyon	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L
3. saat PA	B2	0,067	0,053	0,039	0,024	0,011	2,126	18,952
3. saat PA	B3	0,066	0,052	0,038	0,023	0,011	2,14	18,132
3.saat PA+Rap	C2	0,061	0,05	0,038	0,019	0,009	2,114	14,874
3.saat PA+Rap	C3	0,06	0,049	0,037	0,018	0,008	2,156	14,351
3. saat Rap	D2	0,055	0,047	0,037	0,013	0,006	2,08	10,503
3. saat Rap	D3	0,055	0,046	0,037	0,012	0,006	2,18	19,738
3. saat Knt	E2	0,054	0,046	0,038	0,011	0,005	2,155	19,01
3. saat Knt	E3	0,055	0,046	0,037	0,013	0,006	2,08	10,556
6. saat PA	F2	0,06	0,049	0,037	0,018	0,008	2,121	14,3
6. saat PA	F3	0,06	0,049	0,038	0,017	0,008	2,126	13,835
6.saat PA+Rap	G2	0,061	0,05	0,038	0,019	0,009	2,129	14,927
6.saat PA+Rap	G3	0,06	0,049	0,037	0,018	0,009	2,13	14,76
6. saat Rap	H2	0,06	0,05	0,038	0,018	0,009	1,934	14,362
6. saat Rap	H3	0,061	0,05	0,039	0,017	0,008	2,126	13,872
6. saat Knt	B2	0,056	0,047	0,039	0,012	0,005	2,206	19,436
6. saat Knt	B3	0,054	0,046	0,038	0,011	0,005	2,238	18,908
9. saat PA	C2	0,066	0,052	0,037	0,024	0,011	2,124	19,216
9. saat PA	C3	0,063	0,05	0,037	0,021	0,01	2,157	16,424
9.saat PA+Rap	D2	0,059	0,051	0,041	0,013	0,007	1,969	10,261

9. saat PA+Rap	D3	0,056	0,048	0,039	0,012	0,006	2,139	19,899
9. saat Rap	E2	0,047	0,043	0,038	0,005	0,002	2,14	13,734
9. saat Rap	E3	0,049	0,044	0,038	0,005	0,002	2,255	14,304
9. saat Knt	F2	0,049	0,043	0,037	0,007	0,003	2,127	15,475
9. saat Knt	F3	0,049	0,044	0,037	0,007	0,003	2,203	15,321
12. saat PA	G2	0,048	0,043	0,038	0,005	0,002	2,17	14,183
12. saat PA	G3	0,047	0,043	0,037	0,005	0,003	2,163	14,346
12. saat PA+Rap	H2	0,055	0,048	0,038	0,012	0,007	1,725	19,274
12. saat PA+Rap	H3	0,059	0,052	0,045	0,009	0,004	2,329	17,552
12. saat Rap	B2	0,08	0,063	0,049	0,026	0,011	2,329	20,952
12. saat Rap	B3	0,069	0,053	0,038	0,026	0,012	2,131	20,575
12. saat Knt	C2	0,064	0,051	0,038	0,022	0,01	2,151	17,206
12. saat Knt	C3	0,063	0,05	0,037	0,021	0,01	2,113	16,424
24. saat PA	D2	0,048	0,044	0,039	0,004	0,002	1,872	13,555
24. saat PA	D3	0,048	0,044	0,039	0,005	0,002	2,293	13,783
24. saat PA+Rap	E2	0,053	0,048	0,042	0,007	0,003	2,237	15,357
24. saat PA+Rap	E3	0,05	0,045	0,039	0,007	0,003	2,123	15,603
24. saat Rap	F2	0,066	0,056	0,045	0,017	0,008	2,204	13,238
24. saat Rap	F3	0,059	0,049	0,037	0,017	0,008	2,166	13,917
24. saat Knt	G2	0,077	0,06	0,045	0,028	0,013	2,173	22,719
24. saat Knt	G3	0,076	0,058	0,04	0,032	0,015	2,143	25,748

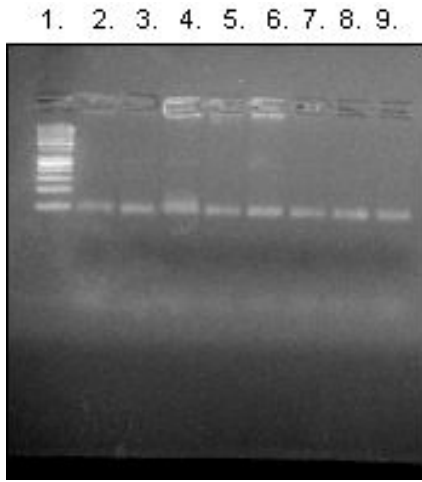
Elde edilen RNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil.3.4 RNA izolasyonu sonucu %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

3.3. cDNA Kontrol PZR

INS-1E hücrelerinden elde edilen RNA'lar ticari kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmeleri için uygun protokol uygulanmıştır. Protokol sonunda cDNA'ların elde edilip edilemediği kontrol (house-keeping) primerleri ile kontrol edilmiştir. Burada yapılan klasik PZR'de rat aktin β kontrol primerleri kullanılmıştır. 99 baz çifti uzunluğundaki bant görüntüsü şekil 3.5'de gösterilmiştir. Bir sonraki aşama olan gerçek zamanlı PZR'de elde edilen bu cDNA'lar kullanılmıştır.



Şekil 3. 5. cDNA PZR örnekleri.

3.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) Sonuçları

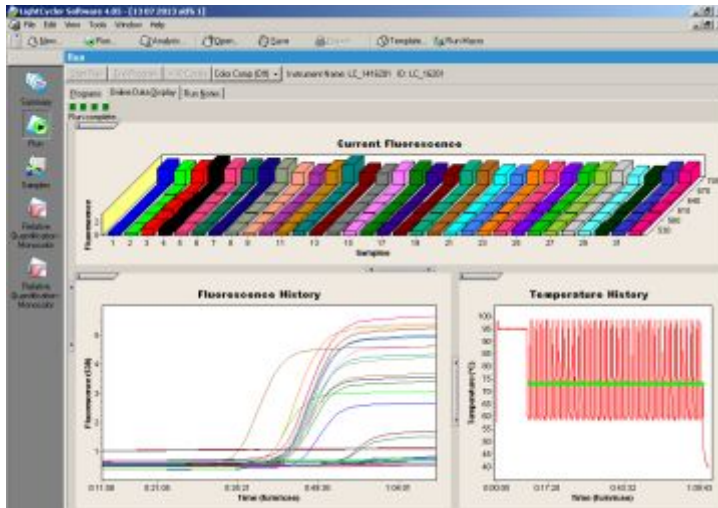
Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 100 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir hedef gen ve β aktin (housekeeping gen) genleri için ticari olarak tasarlanmış gene özgü primerlerden ve bir kilitli nükleik asit (LNA) ile kısa FAM işaretli hidroliz probu kullanılmış olsa da çalışmaya başlamadan önce optimizasyon amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Florsan işaretli olan problemlerin çalıştığı kontrol edildikten sonra elde edilen cDNA'lar ile kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PZR sonucu oluşan ürün miktarının

artmasıyla beraber floresan boya FAM daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır (şekil 3.7). Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir (şekil 3.7, şekil 3.8, şekil 3.9). Gen ifadenmesindeki değişim oranı (Relative expression ratio, R) aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır. Burada E, etkinlik (efficiency) 2'dir.

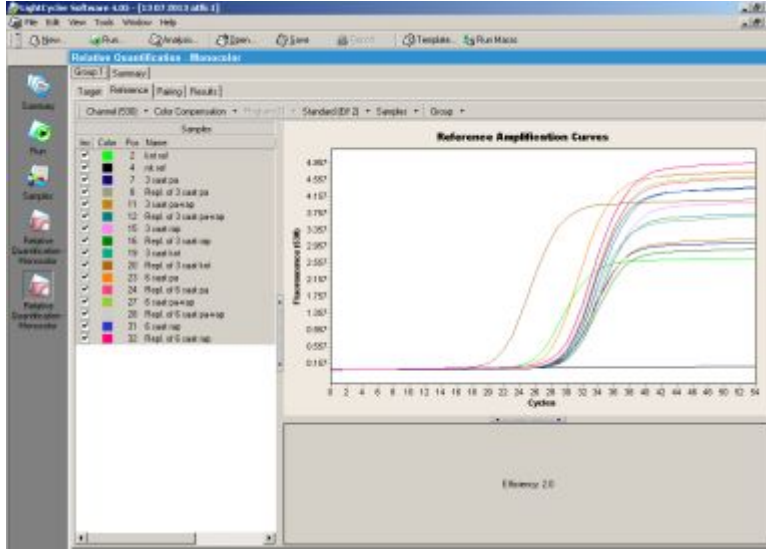
$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Şekil 3.6. Gen ifadenme değişim oranı hesaplama formülü.

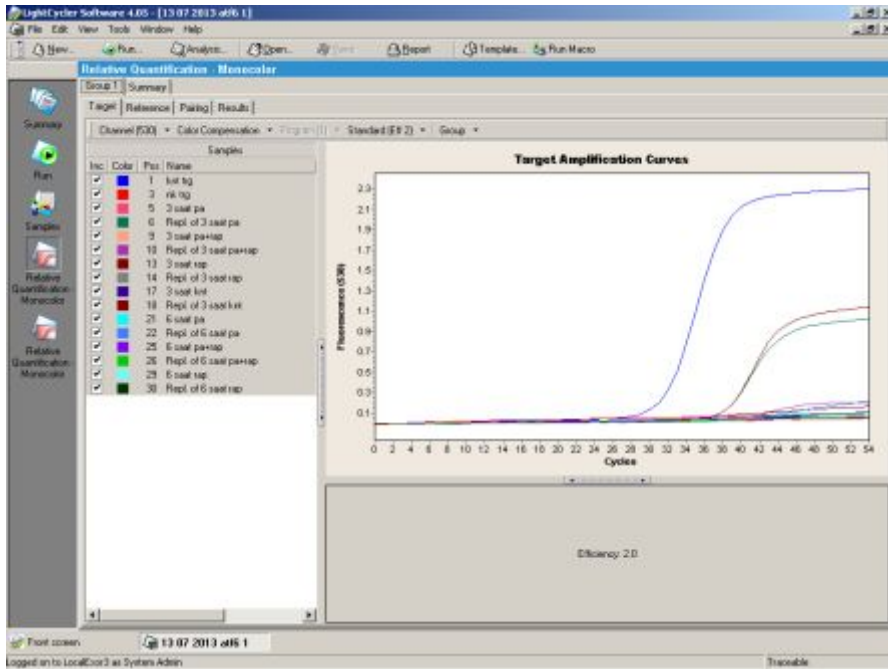
Çalışmada KPC genleri ATF6, PERK, XBP1, GRP78, CHOP, otofaji genleri Beklin1, ATG5, ATG7, LC3-1, apoptoz genleri Bcl-2, Bcl-XL ve Bax'ın 3. , 6., 9., 12. ve 24. saatlerdeki palmitik asit, palmitik asit+rapamisin ve rapamisin uygulamasına bağlı olarak kontrol (housekeeping) gen aktin β oranla ifadenmelerindeki değişikliklere bakılmıştır. Yapılan çalışmalardan ATF6'ya ait örnek referans gen (şekil 3.8) ve hedef gen (şekil 3.9) amplifikasyon eğrileri aşağıdaki gibidir. Aynı protokol diğer 12 gene için uygulanmıştır.



Şekil 3.7. ATF6 qRT-PCR çalışması zaman-florsan grafiği.



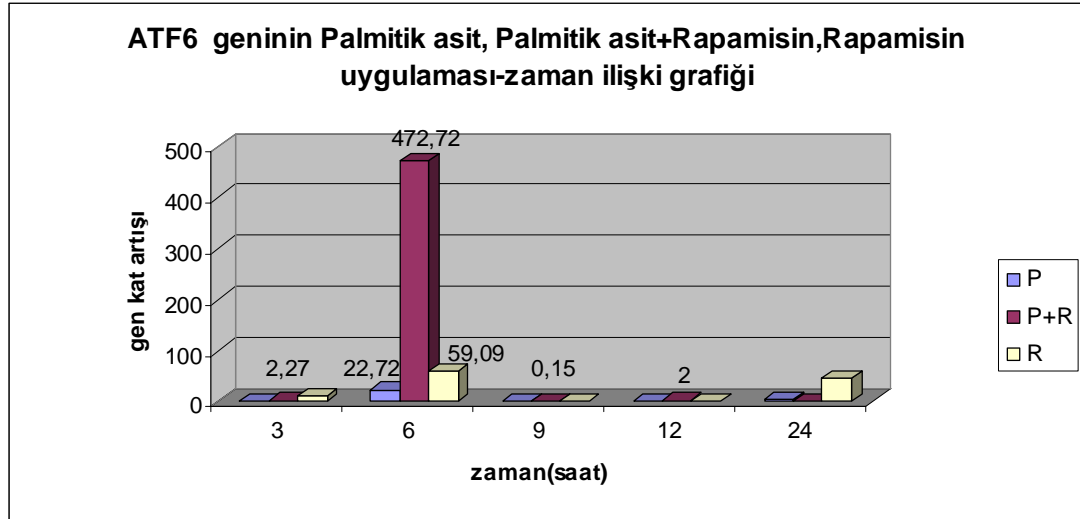
Şekil 3. 8. Referans gen amplifikasyon eğrileri ve etkinlik değeri.



Şekil 3. 9. Hedef gen amplifikasyon eğrileri ve etkinlik değeri.

Referans amplifikasyon eğrileri ile hedef gen eğrileri arasındaki farklılıklar ATF6 geninin bu zaman aralıklarında ifadelenme farklılıklarını göstermektedir. ATF6'nın 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerdeki palmitik asit, palmitik asit+rapamisin, rapamisin

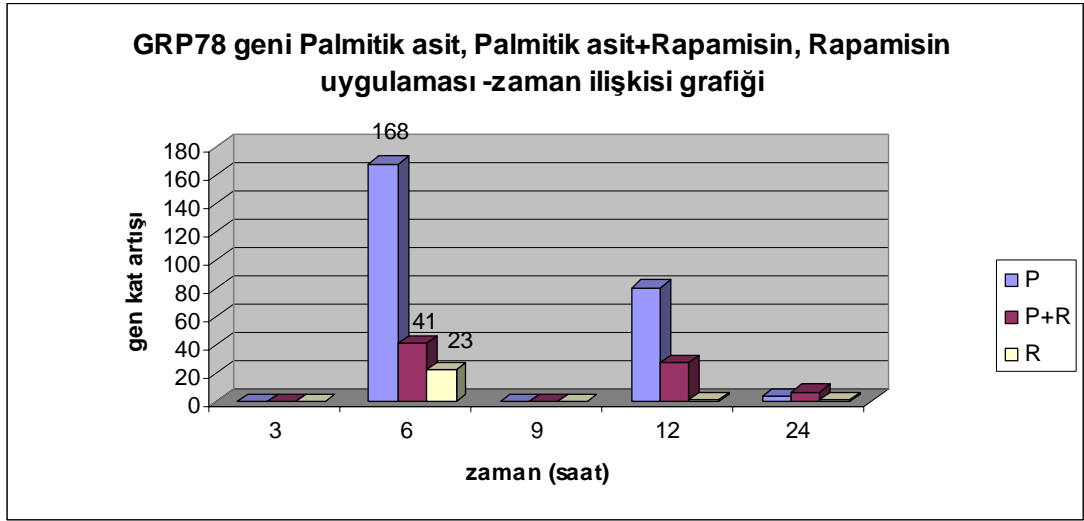
uygulanmasına bağılı olarak kontrol gene göre ifadeleneimlerindeki değişiklikler aşağıdaki şekilde verildiği gibi bulunmuştur.



şekil 3. 10. ATF6 geni zamana ve uygulanan maddeye bağılı gen ifadeleneimindeki kat artışı.

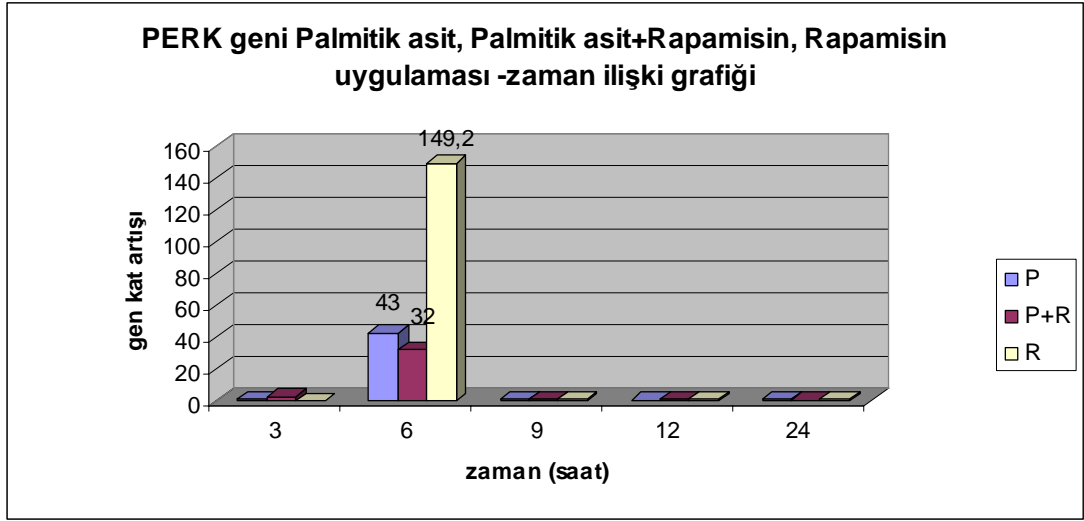
ATF6'nın kontrol gene oranla ifadeleneimindeki en büyük değişiklik 6.saat palmitik asit + rapamisin uygulanan INS-1E hücrelerinde saptanmıştır. 6. saatteki palmitik asit + rapamisin uygulamasındaki gen ifadeleneimindeki artış 472 iken, 6. saatteki sadece palmitik asit uygulamasındaki artış 22, sadece rapamisin uygulamasındaki artış 59 dur (şekil 3.10). ATF6'nın ifadeleneimindeki bu değişiklikler istatistiksel olarak da değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ($p= 0,02$, $p<0,05$).

GRP78 ifadeleneimi özellikle 6. saatte palmitik asit uygulanan hücrelerde diğer durumlara oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir. GRP78'in rapamisin uygulamasına ise aynı cevabı vermediği görülmüştür. Tek başına rapamisin uygulamasına göre palmitik asit + rapamisin uygulamasına verdiği cevap iki kat daha fazladır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (şekil. 3.11).



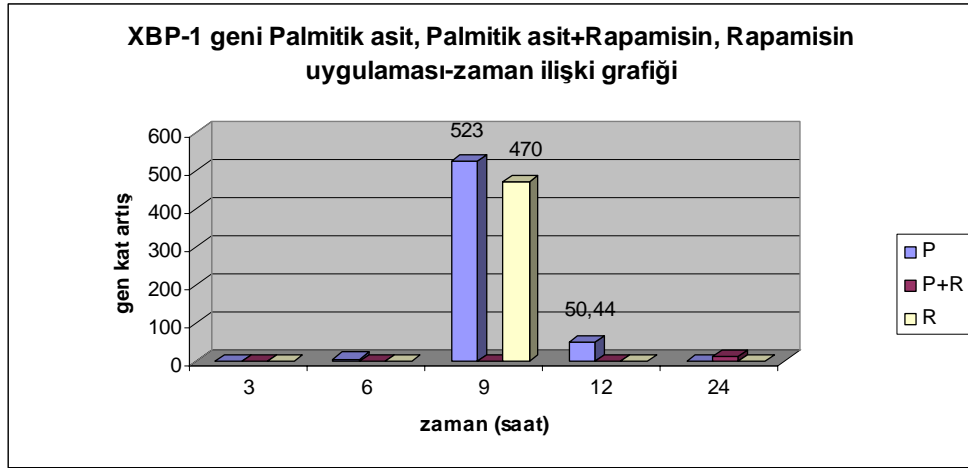
Şekil. 3.11. GRP78 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

ER stres uygulamasını takiben PERK'in verdiği cevap incelendiğinde ATF6 ve GRP78'den farklı olarak ifadenmesindeki en yüksek artışın 6. saatte rapamisin uygulamasında olduğu görülmüştür. Sadece palmitik asit uygulamasındaki artış ile palmitik asit+rapamisin uygulamasındaki artış arasında 1,43 kat fark varken otofaji aktivatörü olan rapamisin verildiğinde PERK ifadenmesindeki artışın diğer uygulamalara oranla yaklaşık 50 kat arttığı saptanmıştır. Diğer saatlerde ve uygulamalarda PERK ifadenmesinde hiçbir önemli değişiklik saptanamamıştır (şekil 3.12).



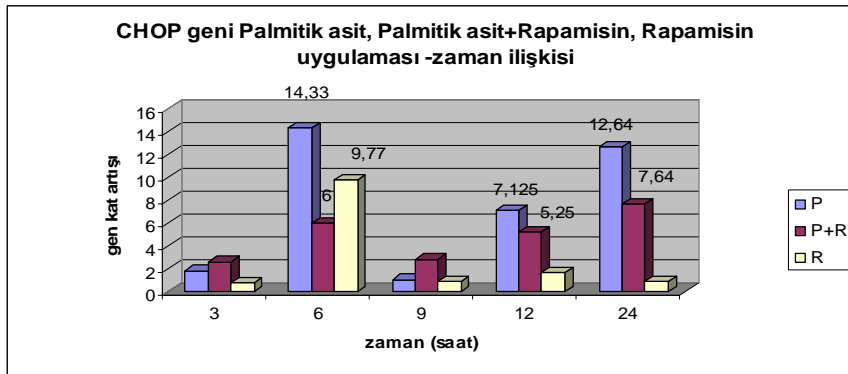
Şekil 3. 12. PERK geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

ER stresi durumunda aktive olan diğer önemli KPC genlerinden olan XBP-1'in yaratılan strese verdiği ilk cevap 9. saatte saptanmıştır. Sadece palmitik asit ve sadece rapamisin uygulamalarına cevap veren XBP-1'in palmitik asit+rapamisin uygulamasına karşılık stres cevabı oluşturmadığı görülmüştür. Bu konuda 6. saatte palmitik asit+rapamisin uygulamasına cevap olarak artan ATF6'nın XBP-1 ifadenmesini engellemiş olabileceği düşünülmektedir. XBP-1, PERK'de olduğu gibi diğer saat ve uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı ifadenme değişikliği saptanmamıştır (şekil 4.13).



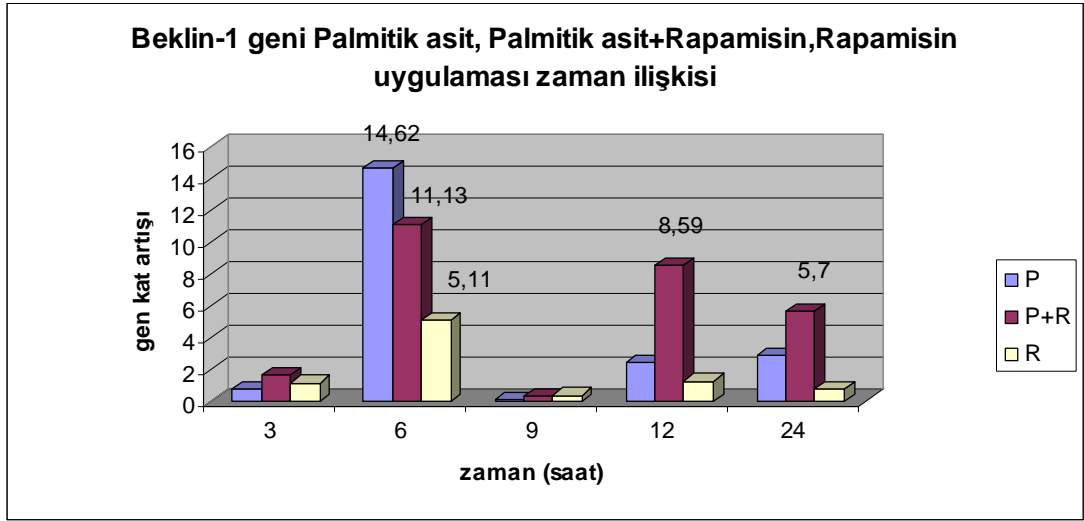
Şekil 3.13. XBP-1 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

ER stresi durumunda aktive olan bir başka gen CHOP genidir. INS-1E hücrelerinde yaratılan stres koşullarında CHOP' un en yüksek değerine 6. saat palmitik asit uygulamasında ulaştığını görülmüştür. CHOP'un sadece palmitik asit ve sadece rapamisin uygulamasındaki artışının palmitik asit + rapamisin uygulamasındaki artışından daha yüksek oluşu bir stres algılayıcısı olarak çalıştığını ve rapamisini de bir stres etkeni olarak algılamış olabilir. CHOP artışının hücrelerin apoptoza gidişleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. PERK ifadesinin PA olan ortamda 43 kat artışı ile PA + Rap ortamında 32 kat artmış olması ise CHOP ifadesinin artışına PERK'in katkıda bulunduğunu şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 3.14. CHOP geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

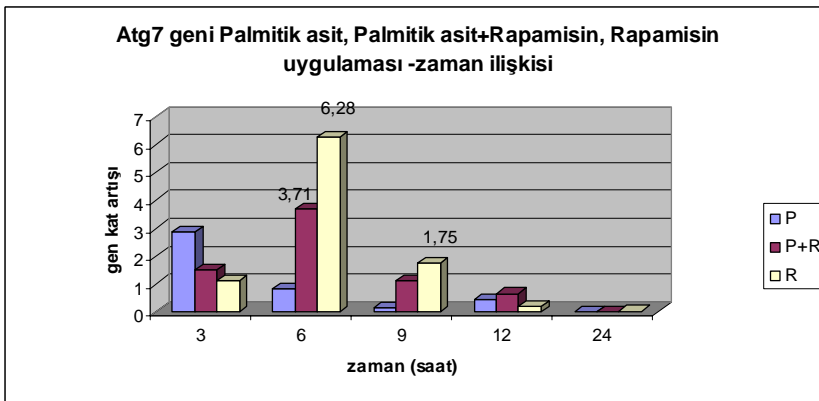
Palmitik asit ile oluşturulan ER stresinde 6. saatte Beklin-1 ifadenmesinin diğer koşullara oranla anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur.



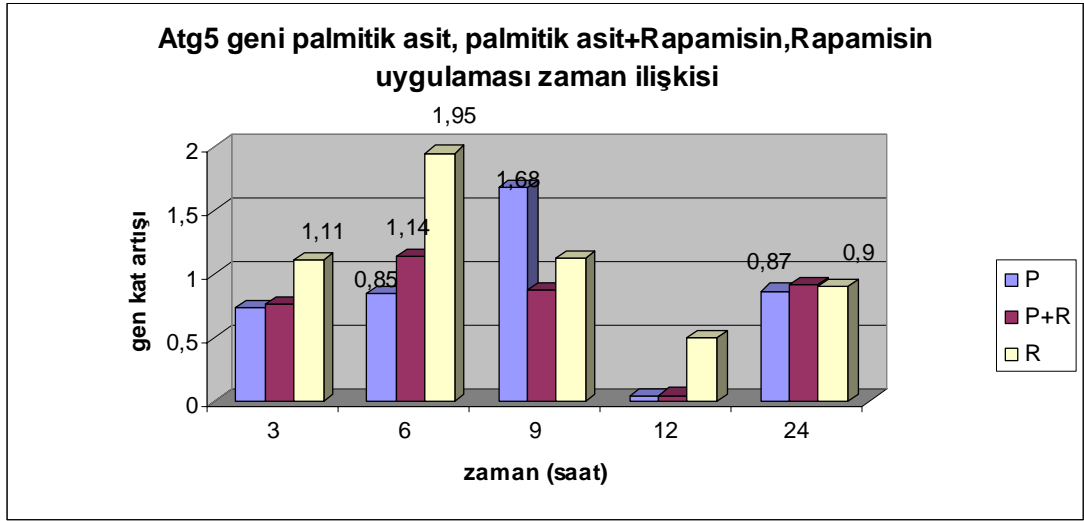
Şekil 3.15. Beklin-1 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

Otofaji aktivatörü rapamisin uygulandığı koşullarda ise Beklin-1'in ifadenmesindeki artış daha az bulunmuştur. Bu da stres durumunda hücrelerde Beklin'in daha fazla ifade edildiğini düşündürmektedir.

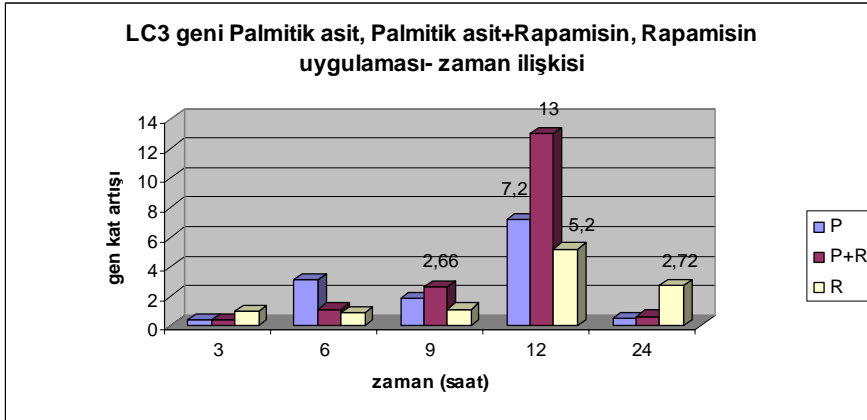
Otofaji konjugasyon sistemlerinde rol alan otofaji genleri Atg7, Atg5 ve LC3-I'in göstermiş oldukları gen ifadenme değişikliklerinin istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak posttranslasyonel modifikasyonların otofajide etkin rol oynadığı bilinmektedir bu nedenle Atg7, Atg5 ve LC3-I genlerinin ifadenmiş olması otofajinin varlığının göstergesi olarak kabul edilmiştir (şekil 3.16, 3.17, 3.18).



Şekil 3.16. Atg7 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

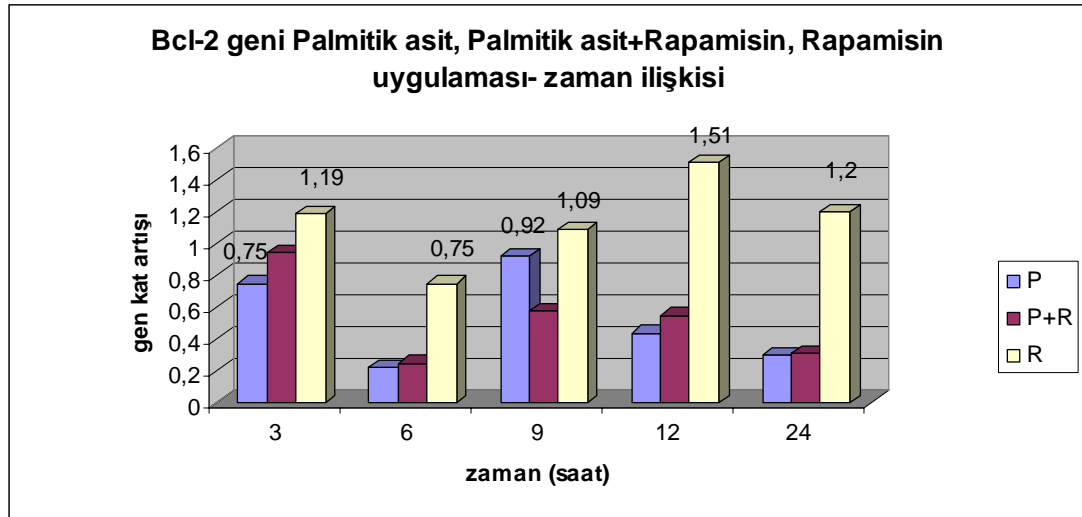


Şekil 3.17. Atg5 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.



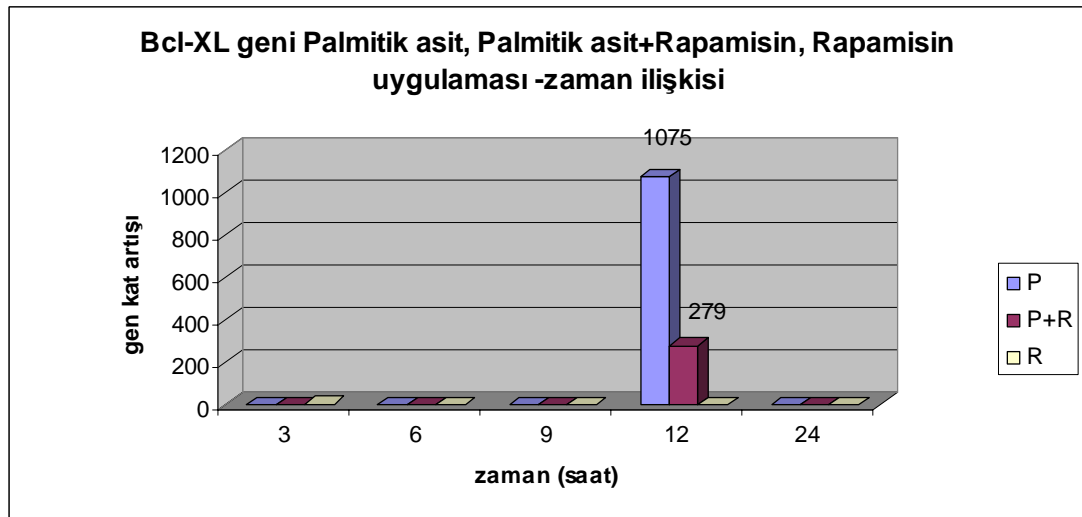
Şekil 3.18. LC3-I geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

Anti apoptotik gen Bcl-2, ER stres cevabının en etkili olduğu 6. saatte özellikle palmitik asit ve palmitik asit+rapamisin uygulanan koşullarda anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır (şekil 3.19). CHOP'un Bcl-2 üzerindeki baskılayıcı etkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 3.19. Bcl-2 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

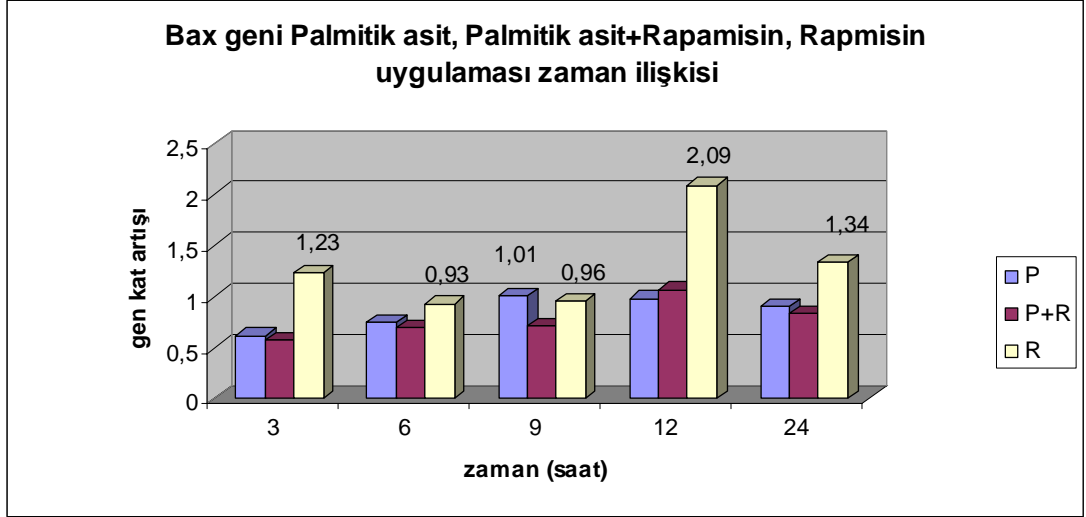
Bir diğer antiapoptotik gen Bcl-XL 12. saat palmitik asit uygulamasında palmitik asit+rapamisin uygulamasına oranla 5 kat fazla artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer saatlerde ve gruplarda başka artış göstermeyen Bcl-XL'nin Bcl-2'ye ilaveten palmitik aside karşı hücre hayatta kalımı için çalışan ikinci bir mekanizma olarak düşünülebilir sonucuna varılmıştır.



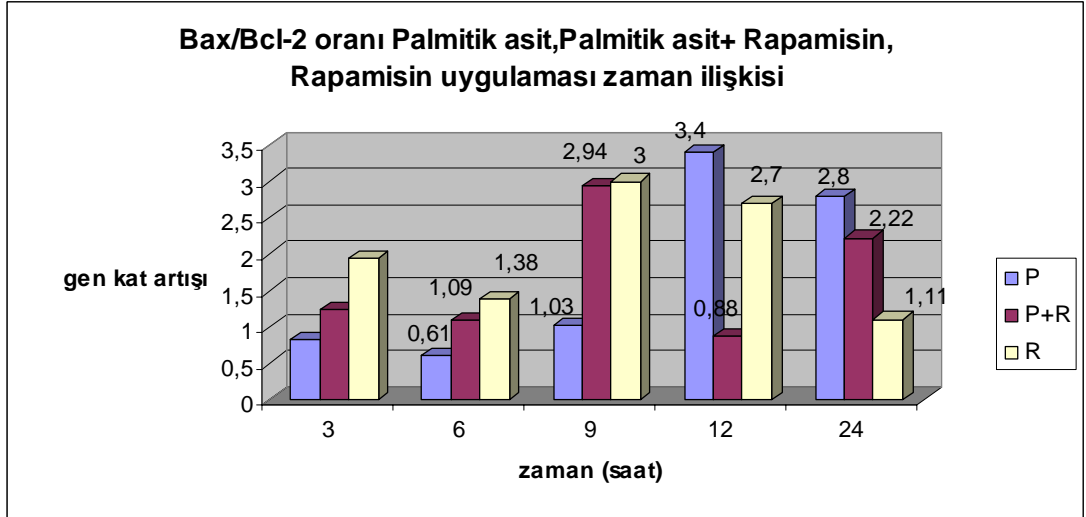
Şekil 3.20 . Bcl-XL geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.

Bax geninin palmitik asit stres faktörüne karşı zaman bağlı olarak göstermiş olduğu ifadenme değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak Bax / Bcl-2

oranı göz önüne alındığında 12. saat palmitik asit+rapamisin grubunda ölüm oranının en az oluşu hücre hayatta kalımı içi devrede olan bir sistemin olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 3. 21 . Bax geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.



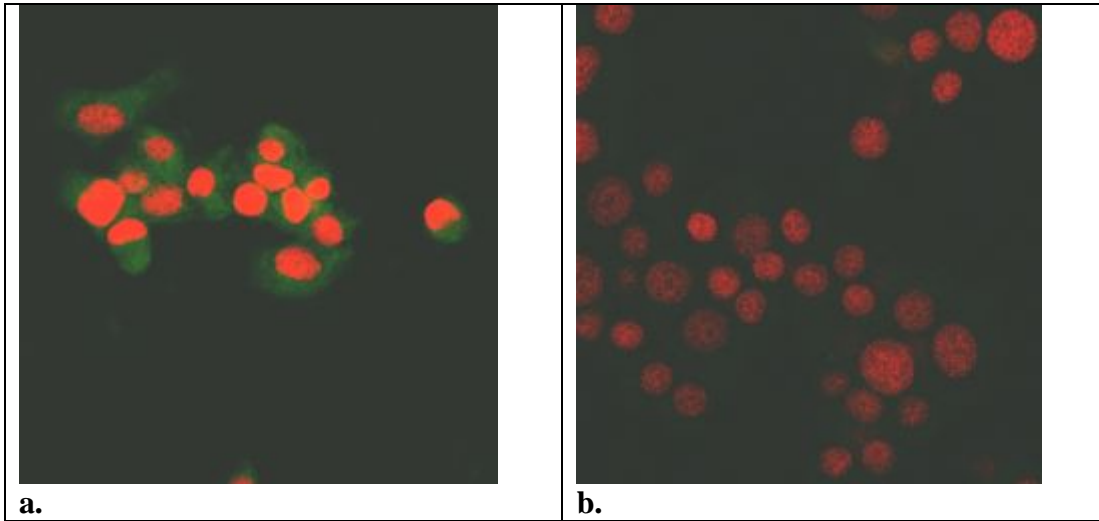
Şekil 3. 22 . Bax / Bcl-2 genlerinin zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenmelerindeki kat artışı oranları.

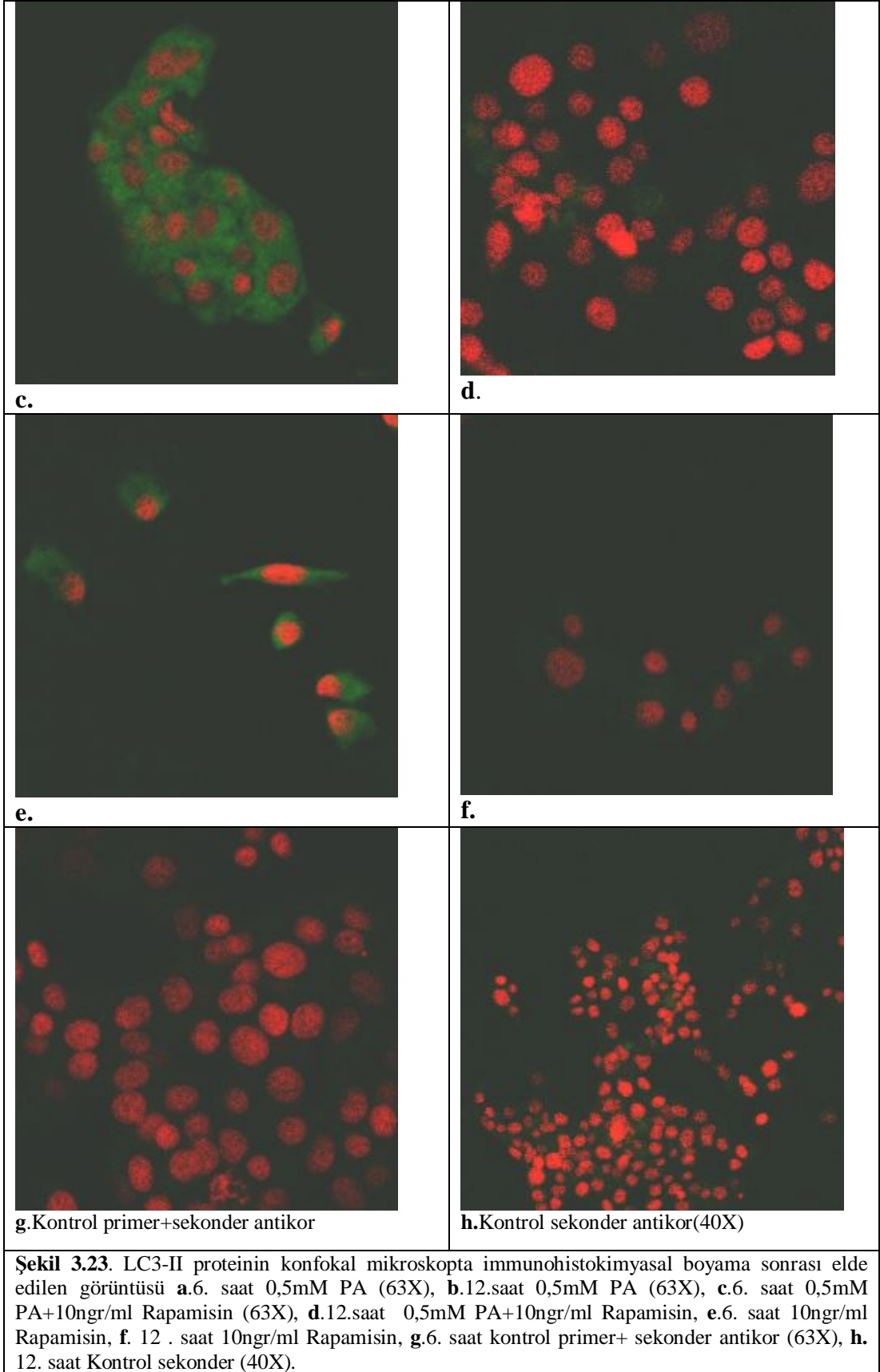
Çizelge. 3.3. Zaman-madde istatistiksel ortalamaları, standart sapmaları ve p değerleri

GEN	Grup	3.saat		6.saat		9. saat		12. saat		24. saat		F	P
		Ort.	Std Sp.	Ort.	Std Sp.	Ort.	Std Sp	Ort.	Std.Sp	Ort.	Std.Sp		
	P	0,33	0,46	0,63	0,27	0,00	0,00	0,50	0,17	58,69	18,11		
ATF6	P+R	0,37	0,48	578,44	31,17	2,45	2,98	0,00	0,00	0,82	0,35	4,57	0,02
	R	2,04	2,61	3,10	3,72	8,20	9,22	0,02	0,02	310,43	398,51		
	P	0,06	0,15	23,16	4,51	3,09	3,30	55,40	51,43	27,13	15,43		
XBP1	P+R	5,68	4,17	470,56	160,52	0,06	0,06	730,75	838,08	98,08	137,56	1,61	0,23
	R	0,50	0,06	7,22	4,60	1,09	2,15	2,46	2,16	0,32	0,27		
	P	1,03	0,28	2,62	1,45	1,42	0,29	0,88	0,32	1,43	0,77		
PERK	P+R	2,97	1,17	2,45	2,34	1,16	0,50	1,84	1,61	0,85	0,58	6,4	0,01
	R	0,42	0,28	8,67	3,07	1,49	0,82	1,59	0,87	1,81	1,15		
	P	1,03	1,32	1811,29	159,59	0,20	0,08	12,35	5,00	3,83	0,46		
Grp78	P+R	0,49	0,11	858,83	1042,12	0,45	0,14	5,40	5,00	7,19	0,59	14,99	0
	R	0,48	0,23	312,98	266,55	0,47	0,20	1,14	0,37	1,10	0,49		
	P	2,13	1,45	6,28	4,47	1,17	0,54	4,38	0,34	13,01	4,37		
CHOP	P+R	2,60	0,12	2,24	0,20	3,44	2,59	3,26	0,41	7,88	2,58	6,73	0
	R	0,97	0,88	3,70	0,34	0,95	0,11	1,73	0,08	0,47	0,66		
	P	2,13	1,45	6,28	4,47	1,17	0,54	4,38	0,34	13,01	4,37		
Beklin-1	P+R	2,60	0,12	2,24	0,20	3,44	2,59	3,26	0,40	7,88	2,58	6,73	0
	R	0,97	0,88	3,70	0,34	0,95	0,11	1,73	0,08	0,47	0,66		
	P	0,45	0,36	3,53	2,83	2,12	1,31	1,89	0,37	0,53	0,37		
LC3-I	P+R	0,41	0,08	2,94	3,88	2,74	0,22	3,73	2,39	0,69	0,72	2,75	0,07
	R	1,09	0,71	1,22	1,23	1,46	1,26	5,71	1,49	3,62	3,39		
	P	0,75	0,11	0,47	0,08	1,70	0,13	0	0	1,0	0,71		
Atg5	P+R	0,76	0,007	0,62	0,03	0,89	0,06	0	0	1,24	1,18	6,39	0,01
	R	1,12	0,20	1,07	0,16	1,13	0,11	0,49	0,09	0,95	0,43		
	P	3,02	0,64	0,41	0,58	2,01	0,56	1,51	1,07	0	0	1,44	0,28
Atg7	P+R	1,53	0,21	0,82	1,14	1,11	0,11	2,28	1,50	0,02	0,02		
	R	1,26	0,89	1,60	2,22	8,96	10,58	0,27	0,13	0,05	0,05		
	P	0,75	0,09	0,37	0,23	0,94	0,29	0,24	0,16	0,37	0,30	1,98	0,2
Bcl-2	P+R	0,95	0,02	0,38	0,05	0,63	0,36	0,27	0,07	0,32	0,05		
	R	1,19	0,08	1,22	0,52	1,04	0,36	1,51	0,12	1,21	0,19		
	P	11,73	4,96	1,00	0,79	0,56	0,26	1,15	0,23	13,29	10,63	4,25	0
Bcl-Xl	P+R	2,56	0,23	0,04	0,05	0,62	0,22	0,39	0,37	12,40	15,15		
	R	5,75	4,16	0,06	0,05	1,14	0,16	0,35	0,19	8,90	11,70		
	P	0,64	0,14	5,41	0,13	1,02	0,19	1,24	0	1,83	2,25	1,76	0,2
Bax	P+R	0,59	0,10	5,15	0,01	7,37	0,21	1,36	0	1,47	1,72		
	R	1,24	0,24	6,73	0,02	9,78	0,15	2,09	0,19	2,07	2,23		

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Yaptığımız bu çalışmada, 0,5mM PA kullanarak oluşan streste hücrelerin canlılık oranı 6. saatte %37,6, 9. saatte %31,22, 12. saatte %37,29 ve 24. saatte %12,26 olarak belirlendi. PA+Rap uygulandığında ise bu oranlar sırası ile %37,64, %43,08, %35,47 ve %22,75 olarak saptandı. Bu bulgular hücrelerin strese karşı ilk 12 saat içerisinde otofaji ile direndiklerini ancak 12. saatten sonra apoptoz ile ölümün gerçekleştiğini göstermiştir. PA ve Rap uygulanan grupların 6. ve 12. saatlerdeki hücre sitoplazmasında otofajik vakuollere karakteristik granüler görünüm veren noktasal LC3 immunreaktivitesi floresan işaretleyiciler ile izlendi (şekil 3.23). 6. saat PA+RAP hücre gruplarında en kuvvetli ve belirgin granüler LC3 ekspresyonu saptandı.

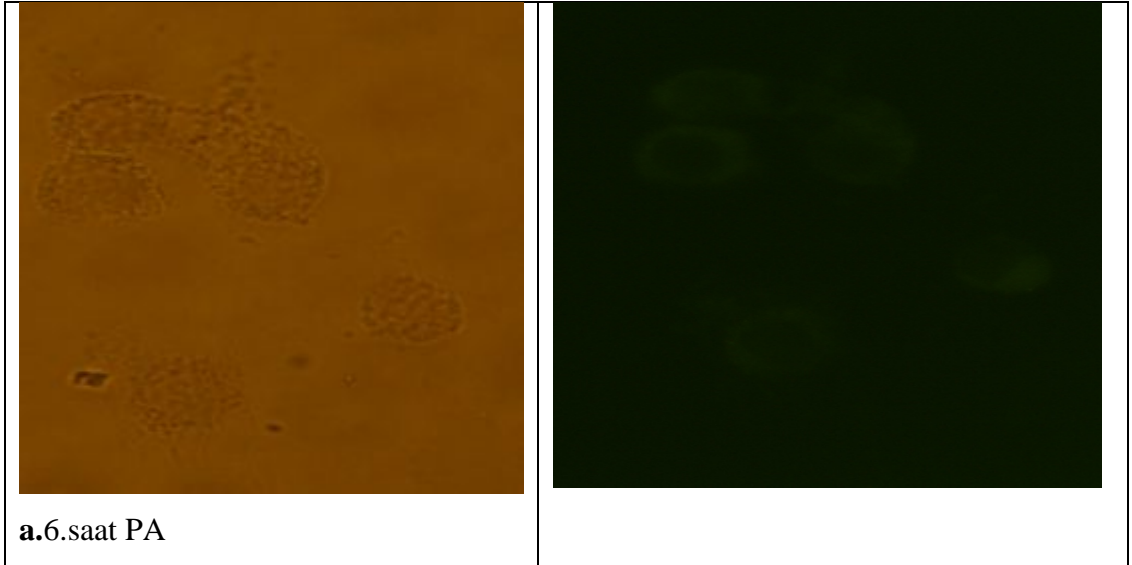


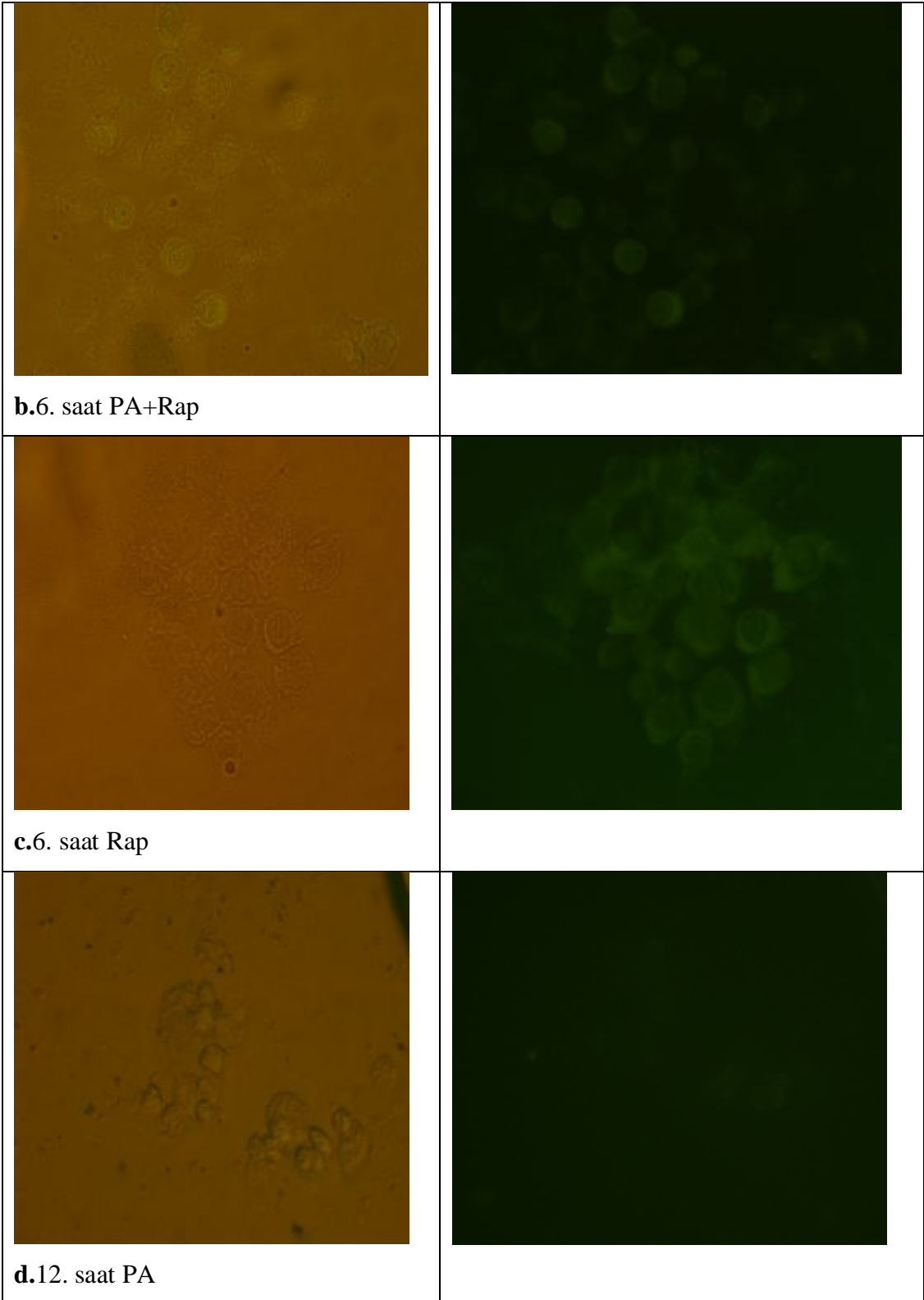


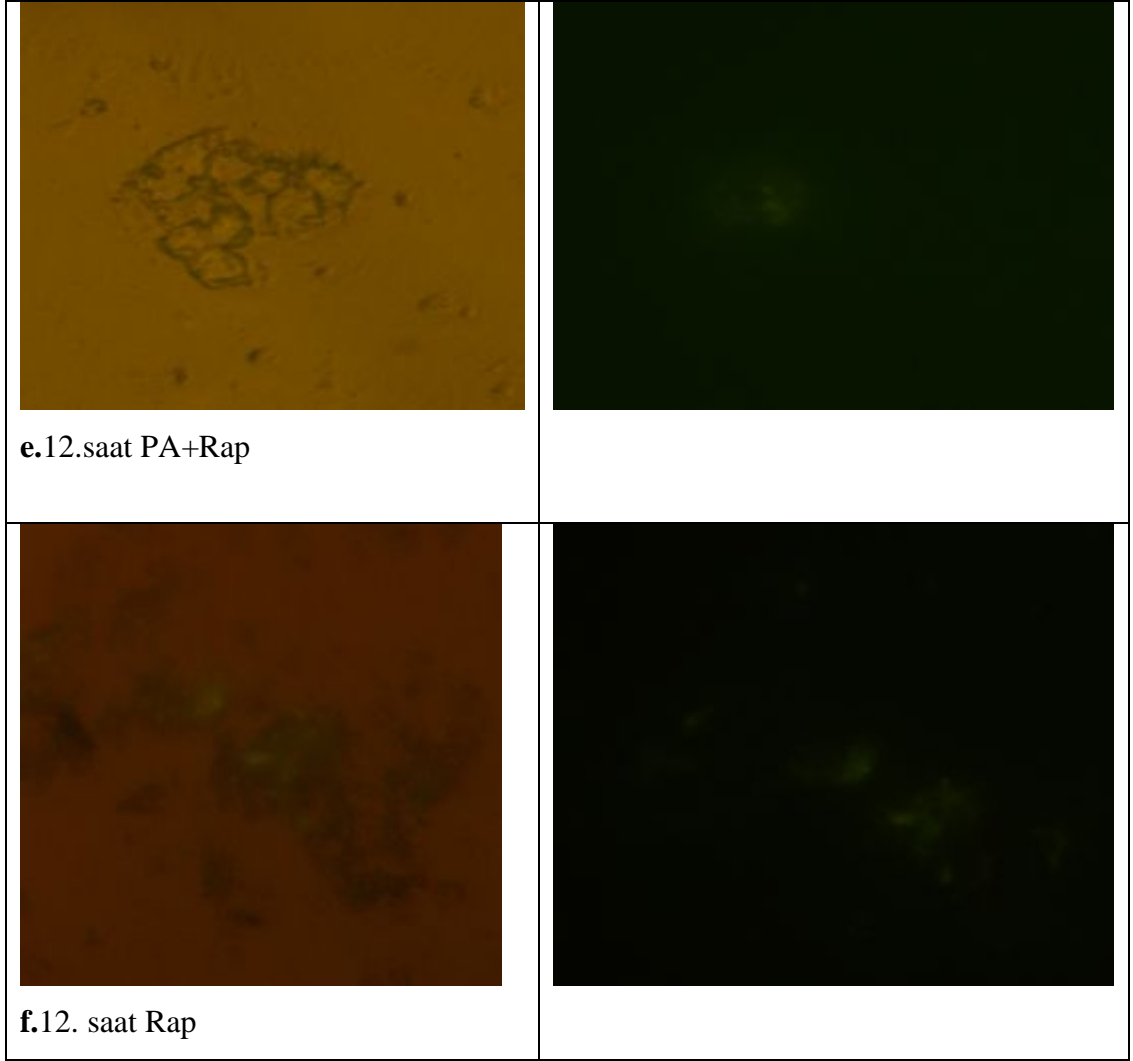
Özellikle 6. saatte etkin rol alan ATF6'nın artmasıyla otofajinin artışındaki korelasyon bizim önerdiğimiz şekilde ATF6'nın otofajinin bir belirteci olabileceğini desteklemektedir.

3.5.Mono-Densyl- Cadaverin (MDC) Boyama Bulguları

Monodensyl Cadeverin florsan bir boyadır otofajik vakuollerin membranındaki lipitlere bağlanarak bu vakuollerin faz kontrast mikroskopta görünür olmasını sağlamaktadır. 6. ve 12. saatlerde 0,5mM palmitik asit ve 10ng/ml rapamisin uygulanan guruplardaki otofajik vakuol oluşumunu göstermek için yapılan MDC boyama sonucu elde edilen bulgular şekil 3.24.'de görülmektedir.







Şekil.3.24. Palmitik asit ve rapamisin uygulanan INS-1E hücrelerinin MDC boyama sonrası elde edilen görüntüsü **a.** 6. saat 0,5mM PA, **b.**6. saat 0,5mM + 10ng/ml Rap, **c.** 6. saat 10ng/ml Rap **d.**12 saat 0,5mM PA **e.** 12. saat 0,5 mM + 10ng/ml Rap **f.** 12. saat 10ng/ml Rap.

4. TARTIŞMA

Pankreatik beta hücrelerinde serbest yağ asitlerinin neden olduğu ER stresi yapılmış çalışmalarla gösterilmiş olsa da bu olaya katılan mekanizmalar henüz tam olarak ortaya konamamıştır (Cnop, Foufelle ve ark., 2012). ER stresi sonucunda birbirinden farklı ve birbiri ile zıt sonuçlar ortaya çıkabilir ve bu konuda stres algılayıcısı olarak çalışan KPC elemanlarının oluşturdukları sinyallerin sonuçlarını hücrenin kaderini belirlemek yönünde nasıl değiştirdiklerini anlamak oldukça önemlidir.

Serbest yağ asidinin indüklediği β hücresi fonksiyon bozukluğunun moleküler mekanizmasını ortaya çıkartmak adına yapılan çalışmaların amacı primer olarak diyabetin patogenezi anlamaktır. İnsülin direncini T2D gelişimi takip eder. İnsülin direncinin en önemli nedeni plazmada bulunan yüksek miktardaki serbest yağ asididir. Buna ek olarak periferal dokulardaki insülin hassasiyetinin azalması, plazmada artan serbest yağ asidi miktarı beta hücresi fonksiyonunun bozulmasına neden olur. İnsülin salgılayan hücrelerde ve izole edilen islet hücrelerinde yapılan birçok çalışmanın amacı β hücre fonksiyon bozukluğuna neden olan lipotoksitite mekanizmalarını ortaya çıkartmaktır. İn vitroda insülin salgılayan hücrelerin veya izole edilen islet hücrelerinin uzun süre serbest yağ asidine maruz kalması apoptoza neden olmaktadır ki bu da T2D’de görülen β hücre kaybını açıklamaktadır.

Otofaji açlık ile veya başka bir formdaki besin azalmasına cevaben hücresel enerji üretimi için substrat sağlayan bir yıkım mekanizmadır. Otofaji aynı zamanda mitokondrion gibi hasarlı veya yaşlanmış hücre içi organellerin yeniden kazandırılması için çalışan katabolik bir yolaktır. Bu neden ile otofaji stres olamayan koşullarda hücre içi temizliği sağlayan bir rol oynar. Ancak stres koşullarında koruyucu bir rol taşımaktadır. Uzun süre otofajinin özellikle organel ve protein geri dönüşümünde rol aldığı düşünülmüş olsa da yapılan son çalışmalar özellikle karbohidrat ve lipid ara ürünlerinin neden olduğu metabolik stres ile otofaji arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Kaushik, Singh ve ark., 2010). Bu yeni bilgiler

otofajinin hücrel metabolik kapasitesinin düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır.

Pankreatik β hücrelerinde insülin üretimi fazla olduğundan ER'lerinde oldukça fazla yük vardır. Bu nedenle pankreatik β hücreleri ER stresine karşı oldukça hassastır. Pankreatik beta hücrelerinin fonksiyonunun ve canlılığının korunmasında otofaji önemlidir (Quan, Hur ve ark., 2012, Hur, Jung ve ark., 2010) ancak T2D'in hücre ve hayvan modellerinde otofajinin pankreatik β hücrelerinin patolojisine karıştığı da gösterilmiştir ve halen bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.

ER stresi koşullarında aktif hale gelen ATF6'nın aktivasyon mekanizması konusunda az sayıda çalışma bulunsa da insülin salgılayan pankreatik β hücrelerindeki ATF6 yolağını açıklayan net bir bilgi bulunmamaktadır. Teodoro ve ark. nın 2011 yapmış olduğu çalışmada, INS-1E (rat pankreatik beta hücre serisi) hücrelerinde ATF6'nın susturulması ile apoptotik fenotipin geliştiği, PERK ve IRE-1 yollarının etkili çalışmadığı ve ER stresine karşı daha hassas hale geldiği gösterilmiş olmasına rağmen otofajiyile ilgili herhangi bir açıklama bulunmamaktadır. ATF6 transkripsiyon faktörünün bazı koşullarda apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Ancak bu sürecin nasıl çalıştığı henüz bilinmemektedir.

Yaptığımız çalışmada, rat pankreatik β hücre serisi olan INS-1E hücrelerinde serbest yağ asidi palmitik asit (PA) ile stres yaratıldıktan sonra zamana bağlı olarak hücrelerin bu strese verdikleri otofajik cevapta ATF6'nın rolünün araştırılması planlanmıştır

Choi, Lee ve arkadaşlarının 2009 yılında INS-1E hücreleri ile yapmış oldukları çalışmada PA'in özellikle glukoz ile birlikte verildiğinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını glukozun tek başına toksik olmadığını aksine belirli bir konsantrasyonda verildiğinde hücre canlılığını arttırdığını göstermişlerdir. PA'ya maruz kalan hücrelerin canlılığındaki azalmanın zamana bağlı olduğunu saptamışlardır. PA' nın INS-1E hücrelerinin 24 saat sonunda apoptoz yolu ile öldüklerini göstermişlerdir. 12 saat PA ile karşı karşıya kalan INS-1E hücrelerinde

ise otofajinin aktive olduğunu ve bu aktivasyonda ER stresinin ve sınıf III PI3K'ın rol aldığını saptamışlardır. 0,4mM PA ve 25mM glukoz ile birlikte 20ng/ml rapamisin verildiğinde hücre canlılığının 12. saatte %40 - 65 oranında arttığını göstermişlerdir. Bu çalışma sonucunda PA ile karşılaşan INS-1 hücrelerinin mTOR yoluyla üzerinden aktive olan otofaji mekanizmasının PA'nın indüklediği apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada, 0,5mM PA kullanarak oluşan streste hücrelerin canlılık oranı 6. saatte %37,6, 9. saatte %31,22, 12. saatte %37,29 ve 24. saatte %12,26 olarak belirledik. PA+RAP uygulandığında ise bu oranlar sırası ile %37,64, %43,08, %35,47 ve %22,75 olarak saptanmıştır. Bu bulgular hücrelerin strese karşı ilk 12 saat içerisinde otofaji ile direndiklerini ancak 12. saatten sonra apoptoz ile ölümün gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte Rapamisin'in, strese karşı koruyuculuk etkisinin 9. saatten itibaren kalktığı söylenebilir.

Cunha ve arkadaşlarının INS-1E, primer rat beta hücrelerinde ve insan islet hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada PA ile birlikte glukozun ER stresi oluşturmada bir etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmalarının sonunda bu hücrelerde PA ile birlikte uygulanan yüksek glukoz konsantrasyonunun bir etkisinin olmadığını ER'de meydana gelen stresin glikolipotoksik değil lipotoksik olduğunu göstermişlerdir.

Literatür bilgileri ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda glukoz olmaksızın tek başına palmitik asidin 0,5mM konsantrasyonda ER stresi yarattığı, KPC genlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Strese karşı en etkili cevabın özellikle 6. saat içinde verildiği XBP-1'in ise diğerlerinden daha geç olarak 9. saatte aktive olduğu saptanmıştır. ATF6 ifadenme miktarı PA+RAP uygulandığında sadece palmitik asit uygulandığından 24 kat, sadece rapamisin uygulandığından 8 kat daha fazla bulunmuştur. Bu bulgu, Cunha, Ladriere ve ark., 2009, Tracy Teodoro 2012 ve ark'nın önerdiği ATF6'nın stres koşullarında hücrenin hayatta kalımı yönünde yönlendirdiği hipotezini desteklemektedir.

Cunha, Hekerman ve arkadaşlarının 2008 yılında INS-1E hücrelerinde serbest yağ asitlerinin indüklediği ER stresi ve apoptotik ölümün mekanizmasını ortaya çıkartmak adına yaptıkları çalışmada doymuş ve doymamış yağ asitlerinin farklı ER stres sinyallerini aktive ettiklerini göstermişlerdir. PERK yolağının özellikle palmitat ile aktive olurken IRE1'in hem palmitat hem de az da olsa oleat ile aktive olduğunu göstermişlerdir. ATF6 aktivasyonunun iki belirteci olan GRP78 ve XBP1t ifadelenmelerine bakılarak, palmitat ve oleatın toksik olmayan konsantrasyonlarında bile arttığı gösterilmiştir. ATF6 aktivasyonunun 48 saat süre ile toksik ve toksik olmayan serbest yağ asidi uygulamalarında arttığının gösterilmiş olması, ATF6 sinyalinin apoptoza katılmadığını ve pankreatik beta hücrelerinin canlılığının korunmasında rol alabileceğini söylemektedirler. Bizim çalışmamızda, 6.saatte PA+RAP verilen ortamda ATF6 ifadesi 476 kat artmasına rağmen XBP1 ifadelenmesi bu ortamda saate bağlı olarak hiç artış göstermezken, GRP78 sadece PA olan ortamda 6.saatte 168 kat ve takiben 9. saatte 80 kat artmıştır. XBP1 ise 9. saate 523 kat artış göstermiştir. Sonuç olarak, XBP1'in diğer ER stres faktörlerinden daha geç aktifleştiği görülmüştür.

INS-1E hücrelerinde, rat ve insan pankreatik hücrelerinde yapılan çalışmada artan PA konsantrasyonunun otofajiyi tetikleyen çok kuvvetli bir aktivatör olduğu gösterilmiştir. Bizim bulgularımız ile benzer şekilde PA uygulanan INS-1E hücrelerinin canlılığının 12.saatten itibaren azaldığı saptanmıştır. 2012 yılında yayınlanan bu çalışmada ilave olarak primer insan pankreatik beta hücreleri kullanılmış ve 48. saatte rapamisinin koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Martino, Masini ve ark., 2012).

ATF6'nın golgide kesiminden sonra oluşan ve transkripsiyon faktör olarak görev yapan kısmının (ATF6 α -p50) stres durumunda olmayan β hücre hatlarında ve primer kemirgen isletlerinde ifadelendiği ve INS-1E hücrelerinde ATF6 α susturulmasına bağlı olarak GRP78 ifadelenmesinin azaldığı ve apoptozun indüklendiğini gösterilmiştir (Tracy Teodoro 2012). Kontrol koşullarında ER stresine cevap olarak ifadelenmeleri ATF6 α tarafından kontrol edilen GRP94 ve ERAD bileşeni Herp'in ifadelenmelerinde ATF6 α susturulmasına bağlı olarak hiçbir değişikliğin olmaması

bazal koşullarda ATF6 α 'nın GRP78 ifadelenmesini korumak için gerekli olduğunu göstermektedir. Ancak ER stresi durumunda ATF6 α her üç geninde maksimum indüksiyonunu sağlamaktadır. Ayrıca bu çalışmada ATF6 α 'nın 72 saat susturulması veya uzun süre fazla ifadelenmesi apoptotik hücre ölümüne neden olduğu da gösterilmiştir. Böylelikle aktif ATF6 α 'nın korunması ve çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi pankreatik β hücresi hayatta kalımında önemli olduğu vurgulanmıştır.

Bazal koşullarda aktif ATF6 α -p50 nasıl oluşmaktadır? Stres olmayan koşullarda kesime uğramayan ATF6 proteini ER membranına bağlı bulunmaktadır ve COPII vezikülleri ile taşınıp golgide proteolizise uğraması için ER stresine ihtiyaç vardır. Her ne kadar mekanizma tam olarak bilinmese de normal koşullarda pankreatik beta hücrelerinin çok fazla miktarda ATF6 ürettiği ve bunlardan bir kısmının ER den uzaklaşıp golgiye geldiği işleme uğradığı düşünülmektedir. Buna ek olarak normal koşullarda golgide bulunan Site-1 proteazın ER ve golgi arasında bir döngüde olduğu gösterilmiştir. Site-1 proteaz ER'ye geçtiğinde bazı ATF6'ları kesiyor olabileceği düşünülmektedir (Bartz, Sun ve ark., 2008).

Çalışmamızda ATF6 ifadelenmesi 6.saatte sadece PA uygulandığında 22 kat artış gözlenirken, PA+RAP uygulanan hücrelerde 472 kat artmıştır. GRP78 ise sadece PA uygulanan hücrelerde 168 kat artmıştır. GRP78'de ki bu artışın sebebi 6. saat PA'da 22 kat artan ATF6'nın GRP78'in ifadelenmesi için yetmiş olabileceği söylenebilir. ER stres transkripsiyon faktörlerinin çok kısa bir süre ve çok kontrollü bir şekilde çalışmaları gerektiği düşünüldüğünde; bu bulgu, (Tracy Teodoro 2012) bazal koşullarda ATF6 α 'nın GRP78 ifadelenmesini korumak için gerekli olduğunu sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Wu, Ruas ve arkadaşları 2011 yılında yayınladıkları çalışmalarında, pankreatik β hücrelerinde şaperon ifadelenmesini korumak için mutlaka aktif ATF6 α olmak zorunda olduğunu ve PA uygulandığında artan GRP78 ifadelenmesinin bazal koşullarda bulunan aktif ATF6 α 'dan kaynaklandığı görüşünü önermişlerdir.

CHOP'un, KPC'nin her 3 yolağı tarafından düzenleniyor olması bu transkripsiyon faktörünün ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. CHOP transkripsiyon faktörü

olmayan hücreler apoptozdan önemli ölçüde korunurlar. CHOP apoptoza ve oksidatif strese neden olan genlerin ifadenmelerini değiştirerek ve PERK aracılıklı translasyonel inhibisyonun azalmasını sağlayarak hücre ölümünü düzenlemektedir. CHOP'un hedefleri arasında Bcl-2 ailesi üyeleri bulunmaktadır. ER stresi durumunda dengeyi proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden yana değiştirerek apoptotik sinyallerin artmasını sağlamaktadır.

Cui, Ma ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada PA'ya maruz kalan fare β TC3 hücrelerinde Grp78 ve CHOP ifadenmelerinin zamana bağlı olarak arttıklarını göstermişlerdir. Aynı şekilde PA uygulamasına bağlı olarak ATF6, PERK ve IRE1'in de arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada PA'ya bağlı olarak artan CHOP'un Bcl-2 ifadenmesini inhibe ettiği glutatyonun azalmasına neden olduğu ve proapoptotik protein BAX'ın translokasyonuna yardım ederek apoptozu indüklediği bilinmektedir.

Bizim çalışmamızdaki bulgularda, CHOP gen ifadesi 6. saatteki PA ortamında 14 kat artarken ve PA+RAP uygulanan hücrelerdeki artışı 6 kat olarak bulunmuştur. Aynı saatte her iki kültürde Bcl-2 gen ifadesi 6. saatte azalmıştır. Bu sonuçlar, CHOP'un Bcl-2 üzerindeki baskılayıcı etkisini göstermesinin yanı sıra, PERK ifadesinin PA olan ortamda 43 kat artışı ile PA+RAP ortamında 32 kat artmış olması ile CHOP ifadesinin artışına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Anti apoptotik proteinlerden Bcl-2 ve Bcl-XL apoptoz gibi otofajiyide inhibe edilebilmektedirler. Otofaji vezikülü oluşumunda görev yapan Vps34 PI3K'ın aktivitesi Beklini de içeren bir grup protein tarafından kontrol edilmektedir. Bcl-2 ya da Bcl-XL Beklinin BH3 bölgesine bağlanarak otofaji üzerinde etkisiz hale getirebilmektedirler (Levine, Sinha ve ark., 2008). Bcl-XL'nin JNK tarafından fosforillenmesi Bekline bağlanmasını zayıflatmakta ve otofajiyi aktive etmektedir. Ancak Pattingre, Tassa ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada otofaji inhibitörü olarak etki gösteren Bcl-2 veya Bcl-XL'nin hücre içindeki lokalizasyonuna bağlı olduğunu sadece ER'de bulunan Bcl-2 ve Bcl-XL'nin bu

etkiyi gösterdiğini mitokondriyel Bcl-2 ve Bcl-XL'nin böyle bir etkisinin olmadığı göstermişlerdir.

Otofajinin en önemli temel proteinlerinden olan Atg4D, Atg5 ve Beklin1'in proteolitik olarak yıkımının apoptotik hücre ölümünü arttırabileceğinin gösterilmesi bu iki ölüm mekanizması arasındaki etkileşim için güçlü bir dayanak oluşturmaktadır. Atg5, Atg12 ile bir dimer oluşturarak ATG16L ile bağlanmakta ve otofajik izolasyon zarının oluşumunda rol almaktadır. ATG5'in FADD üzerinden gerçekleşen apoptoz mekanizmasında rol alan bir protein ile etkileştiği ve hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir (Bell, Leverrier ve ark., 2008). Birçok apoptotik uyaran Atg5'in kalpein tarafından kesilerek ikiye bölünmesine yol açmıştır. Kesilen proteinin amino kısmının mitokondri zarındaki Bcl-XL ile etkileştiği, sitokrom c salınımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür. Yine apoptoz sırasında otofaji proteini Beklinin ve Atg4D'nin kaspazlarca yıkıma uğratıldığı saptanmıştır. Bunlara ek olarak yakın zamanda Atg7 ve Atg12-13 konjugasyonunda apoptozla ilişkili olduğu gözlenmiştir. Kısaca bazı otofaji proteinleri apoptoz yolları tarafından kullanabilmektedirler (Walls, Ghosh ve ark., 2010).

Bu çalışmada Beklin-1 ifadenmesinin PA uygulanan hücrelerde 6.saatte 14 kat, PA+RAP ortamında 11 kat artış göstermiştir. Bcl-2 ise 6.saatte çok düşük düzeyde bulunması nedeniyle Beklin'deki bu artış 6. saatte otofajinin tetiklendiğini gösteren önemli bir bulgudur. Sadece RAP uygulanan ortamda ise Beklin ifadesi sadece 5 kat artmıştır. Bu da stres durumunda hücrelerde Beklin'in daha fazla ifade edilebileceğini göstermektedir. Bcl-2 düzeyi stres uygulanan durumlarda düşük bulunurken, sadece RAP uygulanan hücrelerde 12. saatte 1.5 kat artış göstermiştir.

Bir serbest yağ asidi olan PA'nın β hücrelerinin apoptozuna neden olan önemli bir ER stres faktörü tetikleyicisi olduğu bilinmektedir (Martino, Masini ve ark., 2012). Cunha ve ark., 2008 PA'ya maruz kalan hücrelerin canlılığındaki azalmanın zamana bağlı olduğunu ve PA'nın INS-1E hücrelerinin 24 saat sonunda apoptoz yolu ile öldüklerini, 12 saat PA ile karşı karşıya kalan INS-1E hücrelerinde ise otofajinin

aktive olduğunu saptamışlardır. Bizim bulgularımızda hücre canlılığı 24. saatte %87 ve 48. saatte %97 olacak şekilde zamana bağlı olarak azalmıştır. Apoptoz için önemli bir belirteç olan Bax/Bcl2 oranına bakıldığında bu oran 6. saatte en düşük iken otofajinin 6.saatte en yüksek olduğu ve daha sonra ki saatlerde apoptozun 9. saatten itibaren 24. ve 48. saatlerde giderek arttığı belirlenmiştir. MTT sonuçlarına hücre canlılık oranları en yüksek 6. saat Rapamisin uygulamasında gözlemlendi (%151). Otofajinin canlılığı artırıcı etkisini gösteren bir bulgu olarak yorumlandı. Sadece PA uygulanan hücrelerde canlılık oranı 3. saatte %56 iken, 6.saatte %37, 9. saatte %31'e düşmüştür. PA ile stres oluşturulan ortama RAP eklendiğinde canlılık oranının arttığı belirlenmiştir. 24. ve 48. saatte canlılık en düşük düzeye inmiş ve bu canlılıktaki azalmanın apoptotik ölümle gerçekleştiğini gösteren bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar ve otofaji hakkında moleküler düzeyde elde edilen veriler hücre ölümünün nasıl kontrol edildiği konusundaki bakış açımızı değiştirmiştir. Bütün bu bilgi birikimi halen karmaşık bir tablo ortaya koymaktadır. Otofaji bazı koşullarda hücrenin stres direncini arttırmakta ve hayatta kalmasını sağlamaktadır. Buna karşın bazı koşullarda otofajik aktivite ölüm ile sonlanmaktadır. Ayrıca otofaji ve apoptoz arasında oldukça karmaşık ilişkiler söz konusudur. Yapılan çalışmalar bir hücre içi yıkım ve geri dönüşüm mekanizması olan otofajinin nasıl olup da hücre ölümüne yol açtığı konusunu ancak kısmen açıklığa kavuşturmuştur. Otofaji bozukluklarının başta diyabet, kanser, iskemik ve nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere pek çok hastalıkla olan bağlantısı otofaji araştırmalarının insan sağlığı açısından önemini göstermektedir.

Glembotski ve arkadaşlarının 2009'da yaptıkları çalışmada rat ventriküler myosit hücrelerinde yaptığı çalışmada reperfüzyon sonrası gelişen iskeminin KPC'nin ATF6 kolunu aktive ettiğini ve buna bağlı olarak sentezlenen proteinlerin myokardial hücreleri reperfüzyona karşı koruduğunu göstermişlerdir. INS-1E hücrelerinde palmitatın indüklediği strese karşı hücrelerin otofaji ile korunabildiği gösterilmiştir (Choi, Lee ve ark., 2009) ancak bu süreçte KPC'nin hangi kolunun /kollarının major rol aldığı halen üzerinde çok çalışılan bir konudur. ER stres ve KPC aktivasyonu ile

hastalıklar arasındaki ilişkiler kurulurken lipit metabolizmasında bu süreçte rol aldığı ortaya çıkmıştır. KPC sinyal yolları ve ATF6 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun sadece ER stresinde değil lipogenezin transkripsiyonel düzenlenmesinde de rol aldığı gösterilmiştir (Flamment, Hajdich ve ark., 2012), (Morgan ve Dhayal 2010). Birbiri ile oldukça yakından ilişkili ve iç içe geçmiş olan KPC sisteminin aynı zamanda lipit metabolizmasını da düzenliyor olabilmesi durumu daha da karmaşık hale getirmektedir. Bu nedenle özellikle T2D, Alzheimer, kanser gibi multi faktöriyel hastalıklarda lipit metabolizması- insülin biyosentezi- ER stres- hücre ölümü arasındaki ilişkileri ortaya çıkartan çalışmaların sonuçları heyecanla beklenmektedir.

ER stres yolağındaki genlerin farklı hücrelerde farklı stres uygulandığı durumlarda verdikleri cevabın farklı olduğu bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında, ilk kez INS-1E rat pankreatik β hücrelerinde PA ile ER stresi oluşturulmuş, ortama PA+fizyolojik otofaji aktivatörü olan Rapamisin eklenmiş ve ayrıca kontrol olarak sadece Rapamisin uygulanan hücrelerdeki; canlılık, ER stresi ve hücre ölüm yolları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Özellikle ATF-6'nın ER stresdeki tam açıklanamayan rolünü irdelemek üzere 12 gen ifadenmesi üç farklı ortam koşullarında 5 farklı saatte incelenmiştir. ER sensör proteinlerinden PERK'in diğer ortamlardaki artışına kıyasla, sadece Rapamisin uygulandığı koşullardaki 149 kat artış göstermiş olması Rapamisin'i bir stres faktörü olarak algıladığı şeklinde yorumlanmıştır. PA ile oluşturulan streste ATF6'nın bazal seviyesinin Grp78 için yeterli olduğu, ancak ATF6 gen ifadesinin PA uygulanan ortamda değil de strese ilaveten ortama RAP eklendiğinde diğer ER stres algılayıcılarından farklı davranarak 472 kat artması oldukça ilgi çekici bir sonuçtur. Birçok genin ifadesini kontrol eden bir transkripsiyon faktörünün bu kadar yükselmesi hücreye ne gibi kazançlar sağladığı ya da sonuçlar doğurduğu yapılacak başka çalışmalar ile irdelenmelidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, PA ile ER stres oluşturulan hücrelerde aktifleşen katlanmamış protein cevabı (KPC) mekanizmalarından, özellikle henüz literatürde tam olarak açıklanamamış ATF6 yolağının, olan hücrenin hayatta kalımı/ölümü seçim sürecinde rolü tanımlanmaya çalışılmıştır. INS-1E Rat pankreatik beta hücrelerine sırasıyla PA, PA+RAP ve RAP uygulanmış kültürde 3. saat - 48. saat aralığında ER stresi ve hücre ölüm yolundaki gen ifadeleri hücre canlılığı ve apoptoz oranlarıyla kıyaslanarak tartışılmıştır.

- Literatür bilgileri ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda glukoz olmaksızın tek başına palmitik asidin 0,5mM konsantrasyonda ER stresi yarattığı, KPC genlerini aktive ettiği gösterilmiştir.
- ATF6 ifadenme miktarı PA uygulandığında 22 kat, PA+RAP uygulandığında 472 kat, sadece Rapamisin uygulandığından 59 kat daha fazla bulunmuştur. ATF6'nın ER stresi olduğunda otofaji uyarılması ile ifadenmesinin aşırı bir şekilde yükseldiği ilk kez bu çalışma ile bulunmuştur. ATF6'nın otofajinin yüksek gözlendiği 6. saatte artmış olması, bu transkripsiyon faktörünün, stres koşullarında hücrenin hayatta kalımına katkıda bulunduğu yönündeki hipotezi desteklemektedir.
- XBP-1'in ATF6 ve PERK' den farklı olarak 9. saatte gösterdiği ifadenme artışı ER stresinde daha geç bir süre içinde aktifleştiğini ve farklı çalıştığını gösteren ilk veri olması nedeni ile önemlidir.
- Rapamisinin ER stres faktörü PA'ya karşı koruyucu etkisini otofajiyi tetikleyerek gösterdiği ancak, bu etkinin 12. saatten sonra ortadan kalktığı gösterilmiştir. Çünkü hücrelerde bu saatten itibaren canlılık oranları azalmış ve bu azalmanın otofajinin azalarak apoptozisin artması şeklinde

gerçekleştiğini göstermiştir. 24. saatteki hücre canlılık oranı %13, 48. saatteki hücre canlılık oranı %3 bulunmuştur.

- Çalışmamızda ATF6 ifadenmesi 6. saatte sadece PA uygulandığında 22 kat artış gözlenirken, PA+RAP uygulanan hücrelerde 472 kat artmıştır. GRP78 ise sadece PA uygulanan hücrelerde 168 kat artmıştır. GRP78’de ki bu artışın sebebi 6. saat PA’da 22 kat artan ATF6’nın GRP78’in ifadenmesi için yetmiş olabileceği söylenebilir. Bu bulgu, (Tracy Teodoro 2012) bazal koşullarda ATF6 α ’nın GRP78 ifadenmesini korumak için gerekli olduğunu sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.
- PERK artışı ile CHOP artışının birbirine paralel olması literatür bilgileri ile uygun olarak PA uygulanan INS-1E hücrelerinde stres durumunda PERK CHOP’un ifadenmesini etkilemektedir. Ayrıca CHOP’un antiapoptotik gen Bcl-2 üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu görüşü desteklenmiştir.
- Beklin-1 ifadenmesinin PA uygulanan hücrelerde 6. saatte 14 kat, PA+RAP ortamında 11 kat artış göstermiştir. Bcl-2 ise 6. saatte çok düşük düzeyde bulunması nedeniyle Beklin’deki bu artış 6. saatte otofajinin tetiklendiğini gösteren önemli bir bulgudur.
- PA ile ER stresi oluşan hücrelerde 6. saatte ATF6, Beklin-1 ve CHOP artarken Bcl-2 ifadenmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu ilk kez saptanmıştır. Bu azalmanın önce otofajiyi daha sonraki saatlerde apoptoz gelişimine neden olduğu belirlenmiştir.
- Gen ifadenmesinde anlamlı artış gözlenen genlerin western uygulanarak protein düzeyinde incelenmeleri planlanmaktadır.
- Özellikle PA+RAP uygulanan hücrelerde 472 kat artan ATF6’nin tam olarak hangi genlerin ifadenmesini arttırdığını bulmak amacı ile ATF6 promotör

bölgesi taşıyan bir plazmidi INS-1E hücrelerine uygulayarak ve ATF6 ifadenmesini 100-1000 kat arttırılması otofajik/apoptotik genlerin ifadenmesindeki artışı daha net gösterilmesi planlanmıştır.

- Ayrıca Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 12B3330025 proje numarası ile desteklenen projede ATF6 shRNA ile susturularak etkilenen hücre ölüm yolları ve hangi zaman aralıklarında bu susturmadan etkilendikleri gösterilecektir. 3MA gibi otofaji inhibitörü verilerek bazal seviyedeki otofaji inhibe edilerek hücrelerin ölüm süreçlerini takip etmekte önemli bulgular elde edileceği düşünülebilir.

ÖZET

Pankreatik β Hücrelerinin Endoplasmik Retikulum Stres cevabında ATF6'nın Rolü

ER stresi çeşitli tetikleyicilere karşı cevap olarak oluşur. Çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar ER' da katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine sebep olur. Bunun sonucunda Katlanmamış Protein Cevabı (KPC) tetiklenir ve hücre içi sinyal iletim yolları kullanılarak stres aşılmaya çalışılır. ER stresi aşılamaz ya da stres uzun süre devam ederse, ER stresi apoptozu aktive eder. Yapılan çalışmalar ER stresinin indüklediği otofajinin yoğun ve devam eden ER stresine karşı koruyucu bir rol oynadığı göstermektedir. Pankreatik beta hücrelerinde insülin üretimi fazla olduğundan ER'lerinde oldukça fazla yük vardır. Bu neden ile pankreatik beta hücreleri ER stresine karşı oldukça hassastır. ER stresi koşullarında aktif hale gelen ATF6'nın aktivasyon mekanizması konusunda az sayıda çalışma bulunsa da insülin salgılayan pankreatik β hücrelerindeki ATF6 yolağını açıklayan bir mekanizma tam olarak rapor edilmemiştir. Pankreatik β Hücrelerinin endoplasmik retikulum stres cevabında ATF6 yolağının aktivasyonunun, otofaji üzerinden gösterebileceği hipotezinden yola çıkarak, hücrenin hayatta kalımı/ölümünü seçim sürecinde hangi genlerin işlevsel olduğunu ve otofaji-KPY arasındaki ilişkiyi ATF6 üzerinden tanımlaması amaçlanmıştır.

Bu kapsamda rat pankreatik beta hücreleri INS-1E hücrelerine palmitik asit, palmitik asit + rapamisin ve tek başına rapamisin uygulandı. MTT testi ile hücrelerin canlılık oranları, Annexin V testi ile apoptoz oranları belirlendi. Her üç koşulda 3., 6., 9., 12., ve 24. saatlerde ER stres genleri ATF6, PERK, GRP78, XBP1, CHOP otofaji genleri Beklin-1, Atg5, Atg7, LC3-1 ve apoptoz genleri Bcl-2, Bcl-XL, Bax genlerinin ifadenme oranlarına bakıldı. Otofajik vakuollerin oluşumu MDC boyama ve LC3-II immunohistokimyasal analiz ile gösterildi. Palmitik asit ile yaratılan strese karşı en etkili cevap 6. saatte oluşmuştur. Palmitik asit ve palmitik asit ile birlikte rapamisin uygulanan ortamlarda 6. saatten itibaren otofaji başlamış 12. saatte ise apoptotik yolağın aktif hale geldiği belirlenmiştir. ER stresinde otofaji tetiklendiğinde ATF6 ifadenmesindeki artış hücrenin hayatta kalmasına katkı sağlamıştır. Bazal ATF6 düzeyinin, GRP78 ifadenmesi için yeterli olabileceği söylenebilir. ER stres koşullarında PERK ile ATF6'nın CHOP'un ifadenmesine katkıda bulunduğu gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: ATF6, ER stres, pankreatik β hücresi, otofaji

SUMMARY

The Role of ATF6 in Endoplasmic Reticulum Stress response in pancreatic β cell

ER stress is a response to several triggering factors. Several physiological ve pathological conditions may lead to the accumulation of unfolded or misfolded proteins in ER. Finally Unfolded Protein Response (KPC ,Unfolded Protein Response) is triggered ve by using the intracellular signal pathways the effcet of the stress is reduced. In case of prolonged ER stress apoptosis is induced ER stress-induced autophagy has been reported as a protective player against intense ve prolonged ER stress. Due to the high insulin production there is a heavy load in the ER of the pancreatic cells. Therefore these cells are so sensitive to the ER stress. Although there are few studies about activation mechanisms of ATF6 in insulin-secreting pancreatic β cells, there is no clear information explanation of Atf6 pathway in ER stress conditions is stil remained to be elucidative.

We hypothesized that ATF 6 pathway may induce autophagy as a response to Endoplasmic Reticulum Stress in pancreatic β cells. So in order to explain the autophagy –KPC relationship the expression of the genes in the cell survival/death has been investigated in this study.

In this context Palmitic acid, palmitic acid+rapamycine ve rapamycin were applied to INS-1E cells of rat pancreatic beta-cells. MTT assay was used for cell viability analysis ve apoptosis rates were measured with a Annexin V test. At 3th, 6th, 9th, 12th, 24th hours ER stress genes ATF6, PERK, GRP78, XBP1, CHOP , autophagy genes Beclin-1, Atg5,Atg7, LC3-1 ve apoptosis genes Bcl-2, Bcl-XL, Bax expression rates were analysis in all three experimental conditions. MDC staining ve immunohistochemical staining of LC3-II were used for the detection of the autophagic vacuole formation. The most effective response to palmitic acid induced stress was in the 6th hour. Palmitic acid, palmitic acid+rapamycine conditions autophagy starts at 6th hour and apoptosis starts at 12th hour. An increase ATF 6 expression has been observed as a result of the autophagy induced by ER stress ve thus may contribute to the cell survival. Basal ATF6 level, can be sufficient for the GRP78 expression. Under ER stress condition PERK and ATF6 contribute to CHOP expression.

Key Words: ATF6, ER stress, pancreatic β cells, autophagy

KAYNAKLAR

- ALTMAN, B. J. AND J. C. RATHMELL (2012). "Metabolic stress in autophagy and cell death pathways." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9): a008763.
- AMEZCUA, C. A., S. M. HARPER, J. RUTTER AND K. H. GARDNER (2002). "Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation." *Structure* 10(10): 1349-1361.
- BACK, S. H. AND R. J. KAUFMAN (2012). "Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes." *Annu Rev Biochem* 81: 767-793.
- BACK, S. H., S. W. KANG, J. HAN AND H. T. CHUNG (2012). "Endoplasmic reticulum stress in the beta-cell pathogenesis of type 2 diabetes." *Exp Diabetes Res* 2012: 618396.
- BARTZ, R., L. P. SUN, B. BISEL, J. H. WEI AND J. SEEMANN (2008). "Spatial separation of Golgi and ER during mitosis protects SREBP from unregulated activation." *EMBO J* 27(7): 948-955.
- BELL, B. D., S. LEVERRIER, B. M. WEIST, R. H. NEWTON, A. F. ARECHIGA, K. A. LUHRS, N. S. MORRISSETTE AND C. M. WALSH (2008). "FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(43): 16677-16682.
- BELMONT, P. J., W. J. CHEN, D. J. THUERAUF AND C. C. GLEMBOTSKI (2012). "Regulation of microRNA expression in the heart by the ATF6 branch of the ER stress response." *J Mol Cell Cardiol* 52(5): 1176-1182.
- BERNALES, S., S. SCHUCK AND P. WALTER (2007). "ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum." *Autophagy* 3(3): 285-287.
- BIALIK, S., ET AL. (2010). "Systems biology analysis of programmed cell death." *Trends in Biochemical Sciences* 35(10): 556-564.
- BRAVO, R., V. PARRA, D. GATICA, A. E. RODRIGUEZ, N. TORREALBA, F. PAREDES, Z. V. WANG, A. ZORZANO, J. A. HILL, E. JAÍMOVICH, A. F. QUEST AND S. LAVANDERO (2013). "Endoplasmic reticulum and the

- unfolded protein response: dynamics and metabolic integration." *Int Rev Cell Mol Biol* 301: 215-290.
- BRENNER, D. AND T. W. MAK (2009). "Mitochondrial cell death effectors." *Curr Opin Cell Biol* 21(6): 871-877.
- CHENG, Y. AND J. M. YANG (2011). "Survival and death of endoplasmic-reticulum-stressed cells: Role of autophagy." *World J Biol Chem* 2(10): 226-231.
- CHOI, A. M. K., S. W. RYTER AND B. LEVINE (2013). "Autophagy in Human Health and Disease." *New England Journal of Medicine* 368(7): 651-662.
- CHOI, S. E., S. M. LEE, Y. J. LEE, L. J. LI, S. J. LEE, J. H. LEE, Y. KIM, H. S. JUN, K. W. LEE AND Y. KANG (2009). "Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death." *Endocrinology* 150(1): 126-134.
- CNOP, M., F. FOUFELLE AND L. A. VELLOSO (2012). "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes." *Trends Mol Med* 18(1): 59-68.
- CNOP, M., N. WELSH, J. C. JONAS, A. JORNS, S. LENZEN AND D. L. EIZIRIK (2005). "Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities." *Diabetes* 54 Suppl 2: S97-107.
- COHEN, G. M., X. M. SUN, H. FEARNHEAD, M. MACFARLANE, D. G. BROWN, R. T. SNOWDEN AND D. DINSDALE (1994). "Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes." *J Immunol* 153(2): 507-516.
- CUI, W., J. LI, D. RON AND B. SHA (2011). "The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67(Pt 5): 423-428.
- CUI, W., J. MA, X. WANG, W. YANG, J. ZHANG AND Q. JI (2013). "Free fatty acid induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis of beta-cells by Ca²⁺/calpain-2 pathways." *PLoS One* 8(3): e59921.
- CUNHA, D. A., L. LADRIERE, F. ORTIS, M. IGOILLO-ESTEVE, E. N. GURZOV, R. LUPI, P. MARCHETTI, D. L. EIZIRIK AND M. CNOP

- (2009). "Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB." *Diabetes* 58(12): 2851-2862.
- CUNHA, D. A., P. HEKERMAN, L. LADRIÈRE, A. BAZARRA-CASTRO, F. ORTÍS, M. C. WAKEHAM, F. MOORE, J. RASSCHAERT, A. K. CARDOZO, E. BELLOMO, L. OVERBERGH, C. MATHIEU, R. LUPI, T. HAÏ, A. HERCHUELZ, P. MARCHETTI, G. A. RUTTER, D. L. EİZİRİK AND M. CNOP (2008). "Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells." *J Cell Sci* 121(Pt 14): 2308-2318.
- DALL'ARMÍ, C., K. A. DEVEREAUX AND G. DÍ PAOLO (2013). "The role of lipids in the control of autophagy." *Curr Biol* 23(1): R33-45.
- EUM, K. H. AND M. LEE (2011). "Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts." *Mol Cell Biochem* 348(1-2): 61-68.
- FLAMMENT, M., E. HAJDUCH, P. FERRE AND F. FOUFELLE (2012). "New insights into ER stress-induced insulin resistance." *Trends Endocrinol Metab* 23(8): 381-390.
- FLOTO, R. A., S. SARKAR, E. O. PERLSTEIN, B. KAMPMANN, S. L. SCHREIBER AND D. C. RUBINSZTEIN (2007). "Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages." *Autophagy* 3(6): 620-622.
- GORMAN, A. M., S. J. HEALY, R. JAGER AND A. SAMALÍ (2012). "Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis." *Pharmacol Ther* 134(3): 306-316.
- GOZUACIK, D. (2011). "Otofaji Bir Hücresel Stres Yanıtı ve ölüm mekanizması." *acıbadem ü sağlık bilimleri dergisi* 2(4): 184-194.
- GREEN, C. D. AND L. K. OLSON (2011). "Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic beta-cells by

- stearoyl-CoA desaturase and Elovl6." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(4): E640-649.
- GUPTA, S. (2005). "Death of lymphocytes: A clue to immune deficiency in human aging." *Discov Med* 5(27): 298-302.
- HETZ, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2): 89-102.
- HOTAMİSLİGİL, G. S. (2010). "Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease." *Cell* 140(6): 900-917.
- HUETT, A., G. GOEL AND R. J. XAVIER (2010). "A systems biology viewpoint on autophagy in health and disease." *Curr Opin Gastroenterol* 26(4): 302-309.
- HUR, K. Y., H. S. JUNG AND M. S. LEE (2010). "Role of autophagy in beta-cell function and mass." *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 20-26.
- JAGER, R., M. J. BERTRAND, A. M. GORMAN, P. VANDENABEELE AND A. SAMALÍ (2012). "The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress." *Biol Cell* 104(5): 259-270.
- JUNG, H. S. AND M. S. LEE (2010). "Role of autophagy in diabetes and mitochondria." *Ann N Y Acad Sci* 1201: 79-83.
- KANIUK, N. A., M. KIRALY, H. BATES, M. VRANIC, A. VOLCHUK AND J. H. BRUMELL (2007). "Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy." *Diabetes* 56(4): 930-939.
- KARASKOV, E., C. SCOTT, L. ZHANG, T. TEODORO, M. RAVAZZOLA AND A. VOLCHUK (2006). "Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis." *Endocrinology* 147(7): 3398-3407.
- KARASKOV, E., C. SCOTT, L. ZHANG, T. TEODORO, M. RAVAZZOLA AND A. VOLCHUK (2006). "Chronic palmitate but not oleate exposure induces

endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis." *Endocrinology* 147(7): 3398-3407.

KATO, H., S. NAKAJIMA, Y. SAITO, S. TAKAHASHI, R. KATOH AND M. KITAMURA (2012). "mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway." *Cell Death Differ* 19(2): 310-320.

KAUSHIK, S., R. SINGH AND A. M. CUERVO (2010). "Autophagic pathways and metabolic stress." *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 4-14.

KELPE, C. L., P. C. MOORE, S. D. PARAZZOLI, B. WICKSTEED, C. J. RHODES AND V. POITOUT (2003). "Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis." *J Biol Chem* 278(32): 30015-30021.

KERR, J. F., A. H. WYLLIE AND A. R. CURRIE (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-257.

KIM, M. K., H. S. KIM, I. K. LEE AND K. G. PARK (2012). "Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review." *Exp Diabetes Res* 2012: 509437.

KLIONSKY, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 931-937.

KLIONSKY, D. J. (2011). "The regulation of autophagy – unanswered questions." *Journal of Cell Science* 124: 161-170.

KOMATSU, M., S. WAGURI, M. KOIKE, Y. S. SOU, T. UENO, T. HARA, N. MIZUSHIMA, J. IWATA, J. EZAKI, S. MURATA, J. HAMAZAKI, Y. NISHITO, S. IEMURA, T. NATSUME, T. YANAGAWA, J. UWAYAMA, E. WARABI, H. YOSHIDA, T. ISHII, A. KOBAYASHI, M. YAMAMOTO, Z. YUE, Y. UCHIYAMA, E. KOMINAMI AND K. TANAKA (2007). "Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice." *Cell* 131(6): 1149-1163.

- KRICK, R., Y. MUEHE, T. PRICK, S. BREMER, P. SCHLOTTERHOSE, E. L. ESKELINEN, J. MILLEN, D. S. GOLDFARB AND M. THUMM (2008). "Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes." *Mol Biol Cell* 19(10): 4492-4505.
- KUMAR, S. (2007). "Caspase function in programmed cell death." *Cell Death Differ* 14(1): 32-43.
- LAMKANFI, M. AND V. M. DIXIT (2010). "Manipulation of host cell death pathways during microbial infections." *Cell Host Microbe* 8(1): 44-54.
- LEVINE, B., S. SINHA AND G. KROEMER (2008). "Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy." *Autophagy* 4(5): 600-606.
- LIN, J. H., H. LI, D. YASUMURA, H. R. COHEN, C. ZHANG, B. PANNING, K. M. SHOKAT, M. M. LAVAÏL AND P. WALTER (2007). "IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response." *Science* 318(5852): 944-949.
- LIU, K. AND M. J. CZAJA (2013). "Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy." *Cell Death Differ* 20(1): 3-11.
- MADEO, F. AND G. KROEMER (2009). "Intricate links between ER stress and apoptosis." *Mol Cell* 33(6): 669-670.
- MADEO, F. AND G. KROEMER (2009). "Intricate links between ER stress and apoptosis." *Mol Cell* 33(6): 669-670.
- MARI, M., J. GRIFFITH, E. RIETER, L. KRISHNAPPA, D. J. KLIONSKY AND F. REGGIORI (2010). "An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis." *J Cell Biol* 190(6): 1005-1022.
- MARTIN, S. J. AND D. R. GREEN (1995). "Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?" *Cell* 82(3): 349-352.
- MARTINO, L., M. MASINI, M. NOVELLI, P. BEFFY, M. BUGLIANI, L. MARSELLI, P. MASIELLO, P. MARCHETTI AND V. DE TATA (2012). "Palmitate activates autophagy in INS-1E beta-cells and in isolated rat and human pancreatic islets." *PLoS One* 7(5): e36188.

- MATSUNAGA, K., E. MORITA, T. SAÏTOH, S. AKIRA, N. T. KTISTAKIS, T. IZUMI, T. NODA AND T. YOSHIMORI (2010). "Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L." *J Cell Biol* 190(4): 511-521.
- MERKSAMER, P. I., A. TRUSINA AND F. R. PAPA (2008). "Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions." *Cell* 135(5): 933-947.
- MORGAN, N. G. AND S. DHAYAL (2010). "Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic beta-cell." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6): 231-236.
- OGATA, M., S. HINO, A. SAÏTO, K. MORIKAWA, S. KONDO, S. KANEMOTO, T. MURAKAMI, M. TANIGUCHI, I. TANI, K. YOSHINAGA, S. SHIOSAKA, J. A. HAMMARBACK, F. URANO AND K. IMAIZUMI (2006). "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell Biol* 26(24): 9220-9231.
- OIKAWA, D., M. TOKUDA, A. HOSODA AND T. IWAWAKI (2010). "Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha." *Nucleic Acids Res* 38(18): 6265-6273.
- OSLOWSKI, C. M. AND F. URANO (2010). "A switch from life to death in endoplasmic reticulum stressed beta-cells." *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 58-65.
- OSLOWSKI, C. M. AND F. URANO (2011). "The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed beta cells." *Curr Opin Cell Biol* 23(2): 207-215.

- OUYANG, L., Z. SHI, S. ZHAO, F. T. WANG, T. T. ZHOU, B. LIU AND J. K. BAO (2012). "Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis." *Cell Prolif* 45(6): 487-498.
- OZCAN, U., E. YILMAZ, L. OZCAN, M. FURUHASHI, E. VAILLANCOURT, R. O. SMITH, C. Z. GORGUN AND G. S. HOTAMISLIGIL (2006). "Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes." *Science* 313(5790): 1137-1140.
- PATTINGRE, S., A. TASSA, X. QU, R. GARUTI, X. H. LIANG, N. MIZUSHIMA, M. PACKER, M. D. SCHNEIDER AND B. LEVINE (2005). "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy." *Cell* 122(6): 927-939.
- POITOUT, V., J. AMYOT, M. SEMACHE, B. ZARROUKI, D. HAGMAN AND G. FONTES (2010). "Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell." *Biochim Biophys Acta* 1801(3): 289-298.
- PORTT, L., G. NORMAN, C. CLAPP, M. GREENWOOD AND M. T. GREENWOOD (2011). "Anti-apoptosis and cell survival: a review." *Biochim Biophys Acta* 1813(1): 238-259.
- PRESTON, A. M., E. GURISIK, C. BARTLEY, D. R. LAYBUTT AND T. J. BIDEN (2009). "Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload." *Diabetologia* 52(11): 2369-2373.
- PROMLEK, T., Y. ISHIWATA-KIMATA, M. SHIDO, M. SAKURAMOTO, K. KOHNO AND Y. KIMATA (2011). "Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways." *Mol Biol Cell* 22(18): 3520-3532.
- PUTHALAKATH, H., L. A. O'REILLY, P. GUNN, L. LEE, P. N. KELLY, N. D. HUNTINGTON, P. D. HUGHES, E. M. MICHALAK, J. MCKIMM-BRESCHKIN, N. MOTOYAMA, T. GOTOH, S. AKIRA, P. BOUILLET AND A. STRASSER (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." *Cell* 129(7): 1337-1349.

- PYO, J. O., J. NAH AND Y. K. JUNG (2012). "Molecules and their functions in autophagy." *Exp Mol Med* 44(2): 73-80.
- QUAN, W., K. Y. HUR, Y. LIM, S. H. OH, J. C. LEE, K. H. KIM, G. H. KIM, S. W. KIM, H. L. KIM, M. K. LEE, K. W. KIM, J. KIM, M. KOMATSU AND M. S. LEE (2012). "Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice." *Diabetologia* 55(2): 392-403.
- QUAN, W., Y. M. LIM AND M. S. LEE (2012). "Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic beta-cells." *Exp Mol Med* 44(2): 81-88.
- ROSENBAUM, D. M., A. DEGTEREV, J. DAVID, P. S. ROSENBAUM, S. ROTH, J. C. GROTTA, G. D. CUNY, J. YUAN AND S. I. SAVITZ (2010). "Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model." *Journal of Neuroscience Research* 88(7): 1569-1576.
- RZYMSKI, T., M. MILANI, L. PIKE, F. BUFFA, H. R. MELLOR, L. WINCHESTER, I. PIRES, E. HAMMOND, I. RAGOUSIS AND A. L. HARRIS (2010). "Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia." *Oncogene* 29(31): 4424-4435.
- SAYERS, T. J. (2011). "Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy." *Cancer Immunol Immunother* 60(8): 1173-1180.
- SHAMAS-DIN, A., H. BRAHMBHATT, B. LEBER AND D. W. ANDREWS (2011). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1813(4): 508-520.
- SZEGEZDI, E., S. E. LOGUE, A. M. GORMAN AND A. SAMALI (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." *EMBO Rep* 7(9): 880-885.
- TOOZE, S. A. AND T. YOSHIMORI (2010). "The origin of the autophagosomal membrane." *Nat Cell Biol* 12(9): 831-835.

- TRACY TEODORO, T. O., ELENA SÍDOROVA, AND ALLEN VOLCHUK (2012). "Pancreatic Beta cells depend on basal expression of active ATF6 p50 for cell survival even under nonstress conditions." *Am J cell physiol* 302(7).
- TREGLIA AS., T. S. (2012). "Cell fate following ER stress." *Histol Histopatol* 27: 1-12.
- WALLS, K. C., A. P. GHOSH, A. V. FRANKLIN, B. J. KLOCKE, M. BALLESTAS, J. J. SHACKA, J. ZHANG AND K. A. ROTH (2010). "Lysosome dysfunction triggers Atg7-dependent neural apoptosis." *J Biol Chem* 285(14): 10497-10507.
- WALTER, P. AND D. RON (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." *Science* 334(6059): 1081-1086.
- WANG, X., C. O. ENO, B. J. ALTMAN, Y. ZHU, G. ZHAO, K. E. OLBERDING, J. C. RATHMELL AND C. LI (2011). "ER stress modulates cellular metabolism." *Biochem J* 435(1): 285-296.
- WESTON, C. R. AND R. J. DAVIS (2007). "The JNK signal transduction pathway." *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 142-149.
- WU, J., J. L. RUAS, J. L. ESTALL, K. A. RASBACH, J. H. CHOI, L. YE, P. BOSTROM, H. M. TYRA, R. W. CRAWFORD, K. P. CAMPBELL, D. T. RUTKOWSKI, R. J. KAUFMAN AND B. M. SPIEGELMAN (2011). "The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1alpha/ATF6alpha complex." *Cell Metab* 13(2): 160-169.
- YOULE, R. J. AND D. P. NARENDRA (2011). "Mechanisms of mitophagy." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 9-14.
- ZHANG, W., D. FENG, Y. LI, K. IIDA, B. MCGRATH AND D. R. CAVENER (2006). "PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis." *Cell Metab* 4(6): 491-497.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: HASİBE

Soyadı: VERDİ

Doğum yeri ve tarihi: 10.09.1975

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Kuleli sokak, 49/1 GOP, Çankaya, ANKARA

II-Eğitimi

2008- 2013 Doktora öğrencisi, Ankara Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji AD

1997- 2000 Yüksek Lisans Öğrencisi, Ankara Üniversitesi Disiplinler Arası Hepatoloji Enstitüsü

1993- 1997 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

III-Ünvanları

IV-Mesleki Deneyimi: 2001- Başkent Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji AD, Uzman
Biyolog

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI-Bilimsel İlgilene Alanları:

SCI kapsamındaki uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Saygi S, Alehan F, Atac FB, Erol I, **Verdi H**, Erdem R. Multidrug resistance 1(MDR1) 3435C/T genotyping in childhood drug-resistant epilepsy. Brain Dev. 2013 Mar [Epub ahead of print]
2. Ulasli SS, Eyuboglu FO, **Verdi H**, Atac FB. Associations between endothelial nitric oxide synthase A/B, angiotensin converting enzyme I/D and

serotonin transporter L/S gene polymorphisms with pulmonary hypertension in COPD patients. Mol Biol Rep. 2013 Sep 21. [Epub ahead of print]

3. Unsal Y., Yuksel D., Atac FB., Yılmaz D., **Verdi H.**, Şenbil N. Atypical phenotypes of DYT1 dystonia in three children. Brain and Development, 2013, 35 (4); 356-359
4. Yılmaz Y., **Verdi H.**, Taneri, A., Yazici, AC; Ecevit, AN; Karakas, NM Tarcan, A Haberal, A; Ozbek, N; Atac, FB. Maternal-Fetal Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphism and Preterm Birth. DNA and Cell Biol. 2012, 31 (1); 92-97.
5. Kanra, AR., Tulgar-Kinik, S., **Verdi, H.**, Atac, FB., Yazici, AC., Ozbek, N. Transforming growth factor-beta1 (509 C/T, 915 G/C, 869 T/C) polymorphisms are not related to obesity in Turkish children. Turkish J Ped. 2011, 53 (6); 645-650.
6. Kupeli E, **Verdi H.**, Simsek A, Atac FB, Eyuboglu FO. Genetic Mutations in Turkish Population With Pulmonary Embolism and Deep Venous Thrombosis. Clin Appl Thromb Hemost. 2010, 17(6); 87-94.
7. Yagmurduur MC., Atac FB., **Verdi H.**, Tutar NU., Ekici Y., Ozdemir BH., Haberal M. "Clinical Importance of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism In Invasive Ductal Carcinoma. Int Surg 2009, 94(4); 304-309.
8. Atac FB., İnce D., **Verdi H.**, Gökmen Z., Yazici AC., Gülcan H., Tarcan A., Taneri A., Sezgin E., Ozbek N. "Lack of association between FXIII-Val34Leu, FVII-323 del/ins and TGF-β1 (915G/T) gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia (A Single Center Study)", DNA and Cell Biology, 2009, 29(1); 13-18.
9. Yazici AC., Atac FB., **Verdi H.**, Ozbek N. "Comparison of IL10 and IL2 genotypes of Turkish population with other populations", Int J Immunogenet, 2009 Apr, 36(2), 97-101
10. Ozkan, S., Atac, FB., ; Ozcobanoglu, S., Uguz, E., Sezgin, A., **Verdi, H.**, Ozbek, N., Aslamaci, S. Cardiac Transplant in a Child with Recurrent Thrombosis Due to Congenital Thrombophilic Mutations. Expr. Clin. Trans 2009, 7(3), 188-191.
11. Koytak, ES., Mizrak, D., Bektas, M., **Verdi, H.**, Ergul, AA., Idilman, R., Cinar, K., Yurdaydin, C., Ersoz, S., Karayalcin, K., Uzunlimoglu, O., Bozkaya, H. PPAR-alpha L162V polymorphism in human hepatocellular carcinoma. Turkish J Gast 2008, 19 (4), 245-249
12. Yagmurduur MC., Atac FB., Tutar NU., **Verdi H.**, Isiklar I., Ozdemir BH., Ozbek N., Karakayali H., Haberal M. "Prognostic value of the PAI-1 4G/5G polymorphism in invasive ductal carcinoma of the breast", Int Surg, 2008, 93(3), 163-168

13. Ozbek N., Ataç FB., **Verdi H.**, Cetintaş S., Gürakan B., Haberal A. “Relationship between small-for-gestational age births and maternal thrombophilic mutations”, *Thromb Res* 2008, 122(2):175-178
14. Celiker G., Can U., **Verdi H.**, Yazici AC., Ozbek N., Atac FB. “Prevalence of Thrombophilic Mutations and ACE ID Polymorphism in Turkish Ischemic Stroke Patients”, *Clin Appl Thromb Hemost*, 2008 Apr,15 (4); 415-420
15. Kinik ST., Ozbek N., Yuce M., Yazici AC., **Verdi H.**, Ataç FB. “PAI-1 gene 4G/5G polymorphism, cytokine levels and their relations with metabolic parameters in obese children”, *Thromb Haemost*, 2008 Feb, 99(2), 352-356
16. Serin E., Güçlü M., Ataç FB., **Verdi H.**, Kayaselçuk F., Ozer B., Bilezikçi B., Yilmaz U. “Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and nonalcoholic fatty liver disease”, *Dig Dis Sci*, 2007 May 52(5), 1183-1186.
17. Peskircioglu L., Atac FB., Erdem SR., Deveci S., **Verdi H.**, Ozkardes H. “The association between intron 4 VNTR, E298A and IVF 23+10 G/T polymorphisms of ecNOS gene and sildenafil responsiveness in patients with erectile dysfunction”, *Int J Impot Res*, 2006, 19(2), 149-153.
18. Yilmaz I, Atac FB., Nabi Erkan A., **Verdi H.**, Cagici CA., Aslan S., Sahin FI., Ozluoglu LN. “No difference in polymorphism frequency in a Turkish population with allergic rhinitis”, *Acta Otolaryngol*, 2006, 126(10), 1110-1111
19. **Verdi, H.**, Koytak, ES .,Onder, O .,Cinar, K .,Idilman, R ., Erden, E .,Bozdayi, AM ., Yurdaydin, M .,Uzunalimoglu, D .,Bozkaya, H .Peroxisome proliferator-activated receptor alpha L162V polymorphism in nonalcoholic steatohepatitis and genotype 1 hepatitis C virus-related liver steatosis.*J Inv Med* 2005 53 (7), 353-359
20. Kinik, ST .,Atac, FB ., **Verdi, H.**, Cetintas, S .,Sahin, FI ., Ozbek, N . The effect of plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism on glucose and lipid metabolisms in Turkish obese children.*Clin Endocrin* 2005, 62(5); 607-610
21. Ozdemir FN., Sezer S., Atac B., Tural E., **Verdi H.**, Sahin F., Haberal M. “Vitamin D receptor BsmI and TagI gene polymorphisms in a Turkish ESRD population: influences on parathyroid hormone response”, *Transplant Proc*, 2005 Sep,37(7), 2922-2924
22. Akcay A., Özdemir FN., Ataç FB., Sezer S., **Verdi H.**, Haberal M “ACE Genotype is a Predictive Factor in The Peak Panel Reactive Response” ,*Transplantation Proceedings*, 2004 Jan-Feb;36(1):35-7.
23. Micozkadıoğlu H., Çolak T., Akcay A., Sezer S., Ataç FB., **Verdi H.**, Arat Z., Özdemir FN., Haberal M., “ACE Gene Polymorphism Significantly

Affects Renal Posttransplantation Erythrocytosis”, Transplantation Proceedings, Jan-Feb; 2004 36(1):161-3.

24. Ozdemir FN, Micozkadioglu H, Atac FB, **Verdi H.** Colak T, Ozdemir BH, Arat Z, Sezer S, Haberal M. “The Renin – Angiotensin System and Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cyclosporine Toxicity In Renal Transplant Patients,” Transplantation proceedings, Jan-Feb; 2004 36(1):128-30
25. Akcay A, Sezer S, Ozdemir FN, Arat Z, Atac FB, **Verdi H.** Colak T, Haberal M. Association of the Genetic Polymorphisms of the Renin-Angiotensin System and Endothelial Nitric Oxide Synthase With Chronic Renal Transplant Dysfunction., Transplantation. Sep 2004 27;78(6):892-898
26. Özbek N., Ataç FB, **Verdi H.**, Kayıran SM., “Purpura Fulminans In A Child With Combined Heterozygous Prothrombin G20210A and Factor V Leiden Mutations,” *Annals of Hematology* 2003, **82**, 118-120
27. Bozdayi, AM., Bozkaya, H., Turkyilmaz, A., Aslan, N., **Verdi, H.** , Kence, A ., Uzunalimoglu, O. 1999 Infection 27(6) 357-360

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Melek K, Ulubay G, Sarınc Ulaşlı S, **Verdi H.** Ataç B, Öner Eyüboğlu F. Associations between TGF- β 1 G/A and TNF- α 308 G/A gene polymorphisms with airway resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberk Toraks*. 2013;61(1):1-11.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. YAZICI AC., **Verdi H.**, Atac FB. “Correspondence Analysis Approach for a Population Genetics Study”, Fifth Conference of the Eastern Mediterranean Region of the International Biometric Society, İstanbul, Turkey, Book of Abstracts, pp: 139 (2009 May 10-14).
2. **Verdi H.**, Yazıcı AC., Ataç FB. “Frequency of TGF-B1 (509 C/T) in Turkish Population”, Fifth Conference of the Eastern Mediterranean Region of the International Biometric Society, İstanbul, Turkey, Book of Abstracts, pp: 275 (2009 May 10-14).
3. Ataç FB., Yazıcı AC., **Verdi H.** “Single Nucleotide Polymorphism of Factor XIII Gene in Turkey and a Comparison with Other Ethnic Populations”, Fifth Conference of the Eastern Mediterranean Region of the International Biometric Society, İstanbul, Turkey, Book of Abstracts, pp: 276 (2009 May 10-14).

4. Atac FB., **Verdi H.**, Yazici AC., Simsek A., Eyupoglu F., Ozbek N. "Relationship Between the Thrombophilic Mutations or Single Nucleotide Polymorphisms and Pulmonary Thromboembolism", 58. Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2008 Nov 11-15).
5. Ozkan S., Atac FB., **Verdi H.**, Ozcobanoglu H., Uguz A., Sezgin A., Ozbek N., "Cardiac transplantation in a child with recurrent thrombosis due to congenital thrombophilic mutations" 58. Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2008 Nov 11-15).
6. Yılmaz U., Atac FB., Yüksel D., **Verdi H.**, Yılmaz D., Senbil N., "Primary torsion dystonia due to TOR1A GAG deletion in three Turkish patients" 58. Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2008 Nov 11-15).
7. **Verdi H.**, Atac FB., Ince D., Taneri A., Sezgin E., Yazici AC., Tarcan A., Ozbek N. "Effect of Fibrinolysis on Bronchopulmonary Dysplasia in Newborns", 58. Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2008 Nov 11-15).
8. Ocal R., Can U., **Verdi H.**, Atac FB., Benli S., Toprak MK., Kaya Y. "Prevalence of thrombophilic mutations and ACE I/D polymorphism in Turkish migraine patients with subclinical hyperintense lesions on brain MRI", European Journal of Neurology, 15, 180-180 Suppl. 3 (2008 Aug 23-26).
9. Atac FB., Can U., **Verdi H.**, Yazıcı AC., Aydın IO., Kılınç M. Kaya Y. No association of the 1286G/A polymorphism in the norepinephrine transporter gene and susceptibility to migraine European Journal of Neurology, 15, 180-180 Suppl. 3 (2008 Aug 23-26).
10. Can U., **Verdi H.**, Yazici AC., Beksac K., Celiker G., Derle E., Benli US., Özbek N., Atac FB. "NOS3 Gene Polymorphisms in Turkish Stroke Patients", The American Society of Human Genetics, 57th Annual Meeting, San Diego, USA (2007 Oct 23-27).
11. Atac FB., Can U., **Verdi H.**, Yazici AC., Celiker G., Ocal R., Benli US. "Dopamine Transporter 3'-UTR VNTR Genotype and Migraine", The American Society of Human Genetics, 57th Annual Meeting, San Diego, USA (2007 Oct 23-27).
12. Ozbek N., Kinik ST., Atac FB., Yuce M., Yazici AC., **Verdi H.** "Role of the PAI-1 gene 4G/5G polymorphism on PAI-1 level and relations among PAI-1, TNF alpha and TGF beta levels in obese children", Haematologica - The Hematology Journal, 92, 124-124 Suppl. 1 (2007 Jun).

13. Ozbek N., Alioglu B., **Atac B.**, Avci Z., Malbora B., Tokel K. "Intracardiac thrombosis in children", *Haematologica - The Hematology Journal*, 92, 123-123 Suppl. 1 (2007 Jun).
14. Peşkirçioğlu L., Atac B., Deveci S., **Verdi H.**, Erdem R., turunc T., Özkardeş H., "The Effect Of ec-NOS intron 4 VNTR, nE298A and 23G/T Polymorphisms To The Sildenafil Response In The Treatment Of Erectile Dysfunction", 20. Congress of the European Association Of Urology, *European Urology Supplements*, Vol.4, No:3, 517 (2005).
15. Gören MR, Atac FB., Tekin MI., Dirim A., Egilmez T., **Verdi H.**, Özkardeş H. "VDR Gene BsmI and TaqI Polymorphisms In Turkish Patients With Urinary Tract Stones", 20. Congress of the European Association Of Urology, *European Urology Supplements*, Vol.4, No:3, 101 (2005)
16. Özdemir FN., Sezer S., Atac FB., Tural E., **Verdi H.**, Sahin FI., Haberal M. "VDR BsmI and Taq I Gene Polymorphisms In Turkish ESRD Population and Influence On Parathyroid Hormone Response", *MESOT, Experimental and Clinical Transplantation* 2(2), 72, Ankara (Aralık 2004).
17. Yılmaz I., Atac FB., Erkan A., **Verdi H.**, Çağıcı C., Aslan S., Şahin FI., Özlüoğlu L. "No Evidence For TAP1 (333 I/V) and TAP2 (565 A/T, 651 R/C) Gene Polymorphisms In Turkish Population With Allergic Rhinitis", 20th. Congress of The European Rhinologic Society and 23rd International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, İstanbul-Türkiye (18-25 Haziran 2004).
18. Ataç FB., Özbek N., **Verdi H.**, Çetintaş S., Özyürek E., Şahin FI., Gürakan B., Haberal A., "Maternal Thrombotic Risk Factors For Small Gestational Age", ASHG 54. Annual Meeting, Toronto –Kanada (2004).
19. Özbek N., Ataç FB., Özyürek E., Tarcan A., **Verdi H.**, Şahin FI., Gürakan B. "A Newborn baby presented With Short Extremity, Thrombus and MTHFR C677T Mutation", ASHG 54. Annual Meeting, Toronto –Kanada (2004).
20. Kımık ST., Atac B., **Verdi H.**, Cetintas S., Sahin FI., Ozbek N. "The Effect Of PAI-1 4G/5G Gene Polymorphism on Carbohydrate and Lipid Meyabolism in The Obesity Of Childhood, 43. Annual Meeting of ESPE, *Hormone Research*, 62, S2, 73 (2004).
21. Akcay A., Micozkadıoğlu H., Ozdemir FN., Atac FB., **Verdi H.**, Arat Z., Sahin FI., Haberal M. "Association of VDR Gene Polymorphism with Hypercalcemia in CAPD Patients", 1. Joint ISPD/EUROPD Congress, *Peritoneal Dialysis International*, 24(2), S70 (2004).
22. Sezer S., Tural E., Atac FB., **Verdi H.**, Akcay A., Ozdemir FN., Haberal M. "RAS and ecNOS Gene Polymorphism in Turkish Dialysis Pateints and

- Their Possible Influence On Survival”, 1. Joint ISPD/EUROPD Congress, Peritoneal Dialysis International, 24(2), S46 (2004).
23. Akcay A., Micozkadioğlu H., Atac FB., **Verdi H.**, Arat Z., Ozdemir N., Haberal M. “ec-NOS Gene Polymorphism is Associated With Initial Peritoneal Transport Type in Peritoneal Dialysis Patients”, 1. Joint ISPD/EUROPD Congress, Peritoneal Dialysis International, 24(2), S11 (2004).
 24. **Verdi, H.**, Koytak, ES .,Ergul, AA., Idilman, R ., Uzunalimoglu, O .,Yurdaydin, C.,Bozkaya,H.PPAR-alpha L162V polymorphism in nonalcoholic steatohepatitis.Hepatology 2004 (4)1, 588A
 25. Özbek N., Ataç FB., **Verdi H.**, Şahin FI. “Factor XIII Val34Leu Polymorphism In Turkish Population”, XIX International Congress of The International Society on Thrombosis and Haematostasis, 1, Birmingham, İngiltere (2003).
 26. Ataç FB., Özbek N., **Verdi H.**, Önerci Ö., Doğan Ö., Şahinoğlu M., Şahin Fİ. “Alpha – fibrinogen Thr 312 Ala Polymorphism In Turkish Population”, XIX International Congress of The International Society on Thrombosis and Haematostasis, 1, Birmingham, İngiltere (2003).
 27. Ataç B., Özbek N., Can U., **Verdi H.**, Benli S, Kılınç M., Çeliker G. “Thrombotic Risk Factors in Stroke Patients”, XIX International Congress of The International Society on Thrombosis and Haematostasis, 1, Birmingham, İngiltere (2003).
 28. Atac FB., Özbek N., Özdemir FN., **Verdi H.**, Haberal M., “Role of Genetic Factors In Vascular Access Thrombosis In Hemodialysis Patients” World Congress of Nephrology, Nephrology Dialysis Transplantation, 18, S4, 733, Berlin, Almanya (2003)
 29. Çolak T, Micozkadioğlu H., Ataç FB., **Verdi H.**, Arat Z., Sezer S., Özdemir N., Haberal M. “The Renin-Angiotensin System (RAS) and Endothelial Nitric Oxide Synthase (ec-NOS) Gene Polymorphisms and Cyclosporine Toxicity in Renal Transplant Patients”, World Congress of Nephrology, Nephrology Dialysis Transplantation, 18, S4, 514, Berlin, Almanya (2003).
 30. Akcay A, Özdemir FN., Ataç FB., Sezer S., **Verdi H.**, Arat Z., Haberal M. “Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Genotype Is A Predictive Factor In The Peak Panel – Reactive Antibody (PRA) Response”, World Congress of Nephrology, Nephrology Dialysis Transplantation, 18 S4, 513, Berlin, Almanya (2003).
 31. Ataç FB., Yılmaz B., Yıldırım S., **Verdi H.**, Yılmaz Z., Sahin FI., Tokel, K., Özbek N. “Role of Prothrombotic Mutations / Polymorphisms In Children With Thrombosis During Congenital Heart Surgery”, European Human

Genetics Conference, European Journal Of Human Genetics, 11, 250, Birmingham, İngiltere (2003).

32. Bozkaya, H., Yurdaydin, C., Bozdayi, AM., Aslan, N., **Verdi, H.**, Cinar, K., Cetinkaya, H., Uzunalimoglu, O. J Hepatology.2001 34(1) 162
33. **Verdi, H.**, Uzunalimoglu, O., Cagsin, S., Bozkaya, H., Yurdaydin, C., Bozdayi, AM. J Hepatology 2001 34(1) 163

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Taneri A, **Verdi H.**, Karataş M., Yazıcı AC., Tarcan A., Özbek N, Haberal A., Ataç FB. “Maternal ve fetal MBL2 genotiplerinin term ve preterm doğumlarla ilişkisi”, XI.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Bodrum (28-30 Ekim 2009).
2. Derle E., Ataç FB., Bayraktar N., Kibaroglu S., **Verdi H.**, Can U. “Vasküler risk faktörü olan hastalarda aspirin direnci ile glikoprotein IIaPLa1/2 polimorfizmi arasındaki ilişki”, 44. Ulusal Nöroloji Kongresi, Antalya (11-16 Kasım 2008).
3. Öcal R., Can U., Ataç FB., **Verdi H.**, Özbek N., Çoksun B., Kaya Y., Benli S. “Migren olgularında tromboza eğilim yaratan genetik faktörlerin sıklığı”, 43. Ulusal Nöroloji Kongresi, Antalya (10-15 Kasım 2007).
4. Ataç FB., **Verdi H.**, Yazıcı AC., Özbek N. “Genotyping For Cytokine Gene Polymorphisms in Turkish Population”, 9th Meeting of the Turkish Transplantation Society, Ankara, Turkey (2007 July 4-6)
5. Ataç FB., Başaran Ö., **Verdi H.**, Yazıcı A., Beksaç K., Karakayalı F., Yagmurdur M., Özbek N., Özdemir F, Haberal M. “Does Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) 4G/5G Polymorphism Have A Role in Vascular Access Graft Thrombosis?”, 9th Meeting of the Turkish Transplantation Society, Ankara, Turkey (2007 Jul 4-6).
6. Şahin Y, Ataç FB., Tekin M. **Verdi H.**, Güvel S., Şahin FI., Özkardeş H. “Benign Prostat Hiperplazisi ve Prostat Kanserlerinde Vitamin D Reseptör Gen Polimorfizminin Etkisi”, 18. Üroloji Kongresi, Antalya (2-7 Ekim 2004).
7. Kınık ST., Ataç FB., **Verdi H.**, Çetintaş S., Özbek N. “Çocukluk çağı obesitesinde PAI-1 4G/5G polimorfizminin karbonhidrat ve lipid metabolizması ile ilişkisi”, IX. Ulusal Pediatrik Endokrinoloji ve Diyabet Kongresi, Malatya (27 Eylül- 1 Ekim 2004).
8. Güçlü M., Serin E., Ataç FB., **Verdi H.**, Kul K., Çoşar A., Özer B., Yalçıntaş D., Gür G., Şahin FI., Boyacıoğlu S. “NASH ACE geni I/D polimorfizminin

- Klinik ve Histopatolojik Bulgularla İlişkisi”, 21. Ulusal Gastroeneteroloji Haftası, Antalya (31 Ağustos-5 Eylül 2004).
9. Ataç FB., Kınık S., **Verdi H.**, Çetintaş S., Şahin Fİ., Özbek N. “PAI- 4G75G polimorfizminin çocukluk çağı obezitesine etkisi”, 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 134, Adana (2003).
 10. Ataç FB., Özdemir B., **Verdi H.**, Özdemir FN., Micozkadıoğlu H., Şahin Fİ., Haberal M. “Renal Allograftlarda Görülen Erken İnterstisyel Fibrozis Riskinde ACE I/D Gen Polimorfizminin Etkisi”, 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 134, Adana (2003).
 11. Ataç FB., Akcay A., Özdemir FN., **Verdi H.**, Terzioğlu M., Çolak T., Emiroğlu R., Haberal M. “Polymorphisms Of ACE, AT1, AT2, AGT and ec-NOS in Turkish Renal Transplant Patients – A Preliminary Study”, Tissue Typing and Immunosuppression Symposium, Tissue Antigens, 60, 558, Ankara, Türkiye (2002).
 12. Akcay A., Sezer S., Özdemir FN, Ataç FB., **Verdi H.**, Terzioğlu M., Arat Z., Çolak, T., Haberal M. “Relationship Between ACE Gene Polymorphism and Chronic Renal Transplant Dysfunction”, Tissue Typing and Immunosuppression Symposium, Tissue Antigens, 60, 554, Ankara, Türkiye (2002).
 13. Ataç FB, Micozkadıoğlu H., **Verdi H.**, Çolak T., Akçay A., Sezer .S, Arat Z., Özdemir FN., Şahin Fİ., Haberal M., “Renal Transplantasyon Sonrasında Gelişen Eritrositozda Renin Anjiyotensin Sistemi ve Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Gen Polimorfizmleri” , 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 63,Adana 2003
 14. Ataç FB, Kınık S., **Verdi H.**, Çetintaş S., Şahin Fİ., Özbek N., “PAI-1 4G/5G Polimorfizminin Çocukluk Çağı Obesitesine Etkisi” , 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 73, Adana 2003.
 15. Ataç FB, Özdemir B., **Verdi H.**, Özdemir FN., Micozkadıoğlu H., Şahin Fİ., Haberal M., “Renal Allograftlarda Görülen Erken İnterstisyel Fibrozis Riskinde ACE I/D Gen Polimorfizminin Etkisi”, 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 134, Adana , 2003.
 16. Çeliker G, Can U., Ataç FB., Benli S., Kılınç M., **Verdi H.**, Özbek N., “İskemik İnme ve Alt Gruplarında Anjiyotensin Konverting EnzimGeni (ACE) I/D Polimorfizmi” , 39. Ulusal Nöroloji Kongresi, 324, Antalya, 2003.
 17. Sezer S., Uyar M, Ataç FB., **Verdi H.**, Arat Z., Özdemir FN., Haberal M. Endotelyal nitrik oksit sentaz gen polimorfizminin transplant böbrek sağ kalımına etkisi. VI. Ulusal Hipertansiyon&Böbrek Hastalıkları Kongresi, Antalya, 2004.

18. Sezer S, Tatal E, Ataç FB, **Verdi H.** Akçay A, Özdemir FN, Haberal M. Türk diyaliz hastalarında RAS ve ENOS gen polimorfizimleri ve sağ kalım üzerine olası etkileri. 21. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi, Antalya, 2004.
19. Şahin Y., Ataç FB., Tekin M., **Verdi H.**, Güvel S., Şahin Fİ., Özkardeş H., Beningn Prostat Hiperplazisi ve Prostat Kanserinde Vitamin D Reseptör Gen Polimorfizminin Etkisi, 18. Ulusal Üroloji Kongresi, 44, 2004.
20. Gören MR., Ataç FB., Tekin M., Dirim A., Eğilmez T., **Verdi H.**, Şahin Fİ., Özkardeş H., Üriner Sistem taşların VDR Gen Polimorfizminin Etkisi, Ulusal Üroloji Kongresi, 44, 2004
21. Peşkircioğlu L., Ataç FB., Deveci S., Erdem ŞR., Turunç T., **Verdi H.**, Şahin Fİ., Özkareş H., EC-NOS Geni Intron 4 VNTR Polimorfizminin Erektile Disfonksiyon Tedavisinde Sildenafil Verilen Yanıtta Etkisi, Ulusal Üroloji Kongresi, 2004.
22. Güçlü M, Serin E., Ataç FB., **Verdi H.**, Kul K., Coşar A., Özer B., Şahin Fİ., Boyacıoğlu S., NASH Hastalarında ACE I/D Polimorfizminin Klinik ve Histopatolojik Bulgularla İlişkisi, 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, Antalya 2004.
23. Çeliker G, Can U., Ataç FB., Benli S., Kılınç M., **Verdi H.**, Özbek N., “İskemik İnme ve Alt Gruplarında Anjiyotensin Konverting Enzim Geni (ACE) I/D Polimorfizmi” , 39. Ulusal Nöroloji Kongresi, 324, Antalya 2003.
24. Ataç FB, Micozkadıoğlu H., **Verdi H.**, Çolak T., Akçay A., Sezer .S, Arat Z., Özdemir FN., Şahin Fİ., Haberal M., “Renal Transplantasyon Sonrasında Gelişen Eritrositlerde Renin Anjiyotensin Sistemi ve Endotelial Nitrik Oksit Sintaz Gen Polimorfizimleri” , 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 63, Adana 2003.
25. Ataç FB, Kınık S., **Verdi H.**, Çetintaş S., Şahin Fİ., Özbek N., “PAI-1 4G/5G Polimorfizminin Çocukluk Çağı Obesitesine Etkisi” , 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 73, Adana 2003
26. Ataç FB, Özdemir B., **Verdi H.**, Özdemir FN., Micozkadıoğlu H., Şahin Fİ., Haberal M., “Renal Allograftlarda Görülen Erken İnterstisyel Fibrozis Riskinde ACE I/D Gen Polimorfizminin Etkisi”, 8.Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 134, Adana 2003 .
27. Ataç FB, Can U., **Verdi H.**, Çeliker G., Benli S., Kılınç M., Özbek N., “Factor VII R353Q Polymorphism In Turkish Stroke Patients,” 2. *Ulusal Nörobilim Kongresi*, Neuroanatomy,2, 3, Bursa 2003.
28. Ataç FB, Can U., Çeliker G., **Verdi H.**, Benli S., Kılınç M., Özbek N., “ec-NOS Gene Polymorphism In Stroke Patients”, 2. *Ulusal Nörobilim Kongresi*, Neuroanatomy,2, 7, Bursa 2003.

29. Çelik GB., Kayıran M., Ataç FB., **Verdi H.**, Özbek N., “Faktör V Leiden ve Protrombin 20120 Mutasyonlarını Birlikte Taşıyan Bir Hastada Ağır Purpura Fulminans”, *46. Milli Pediatri Kongresi*, 237, Mersin 2002.

VII.Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

1. Dünya Nefroloji Kongresinde “ Angiotensin Converting Enzyme Genotype Is A Predictive Factor In The Peak Panel-Reactive Antibody Response” başlıklı çalışma ile en iyi presantasyon ödülü, 8-12 Haziran 2003 Berlin-Almanya.
2. IV. Ulusal Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Kongresinde “Böbrek Nakli Yapılmış Hastalarda RAS ve ec-NOS Gen Polimorfizmlerinin Kronik Allograft Nefropatisi İle Olan İlişkisi” başlıklı çalışma ile Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği Proje Yarışmasında birincilik ödülü, 22.05.2002 Antalya.