



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**İNSÜLİN DİRENCİ GELİŞTİRİLMİŞ H9C2 HÜCRE
HATLARINDA EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN ÇİNKO
TRANSPORTERLARI ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

İrem AKTAY

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Erkan TUNCAY**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSÜLİN DİRENCİ GELİŞTİRİLMİŞ H9C2 HÜCRE
HATLARINDA EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN ÇİNKO
TRANSPORTERLARI ÜZERİNDEKİ ROLÜ**

İrem AKTAY

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Erkan TUNCAY
Prof. Dr. Belma TURAN**

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İnsülin Direnci Geliştirilmiş H9c2 Hücre Hatlarında Epigenetik Değişimlerin Çinko Transporterları Üzerindeki Rolü” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İrem Aktay

Tarih: 01.07.2022

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalı'nda
İrem AKTAY tarafından hazırlanan
“İnsülin Direnci Geliştirilmiş H9c2 Hücre Hatlarında Epigenetik Değişimlerin Çinko
Transporterları Üzerindeki Rolü” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/07/2022

İmza
Prof. Dr. Cüneyt GÖKSOY
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr. Erkan TUNCAY
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kalbin yapısı	1
1.2. İnsülin ve İnsülin Direnci	2
1.3. Kardiyovasküler Hastalıklar ve İnsülin Direnci	4
1.4. Çinko ve Çinko Taşıyıcı Proteinler	5
1.5. Zn ²⁺ -taşıyıcı Proteinlerin Metabolik Bozulmalar ile İlişkisi	8
1.6. Epigenetik ve Metabolizma	11
1.7. Çalışmanın Amacı	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1. Hücre Kültürü ve İnsülin Direnci Oluşturulması	15
2.2. ZnT6 (Slc30a6) Gen İfadesinin H9c2 hücre Hatlarında Artırılması	15
2.3. ZnT7(Slc30a7) Gen İfadesinin H9c2 hücre Hatlarında Artırılması	16
2.3.1. Bakterilerin büyütülmesi (plasmid çoğaltma)	16
2.3.2. Plasmid izolasyonu	17
2.3.3. ZnT7(Slc30a7) Transfeksiyonu ile Gen İfadesinin Artırılması	18
2.4. Glikoz Taşınım Deneyi	18
2.5. Toplam RNA İzolasyonu	20
2.6. cDNA Sentezi	21
2.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kantitatif PZR)	21
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi	24
2.9. Elektrofizyolojik İncelemeler	24
2.9.1. Hücre İçi Serbest [Zn ²⁺] _i Miktarının Ölçümü	24
2.9.2. Hücrelerde ROS Miktarının Ölçümü	25
2.9.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü	25
2.10. Epigenetik İncelemeler	27
2.10.1. Histon Modifikasyonlarının Ölçümü	27
2.11. Western Blot Protein analizleri ve Moleküler Biyolojik İncelemeler	28
2.11.1. Toplam Protein İzolasyonu	28
2.11.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	29

2.11.3. PVDF Membrana Protein Transferi	29
2.12. İmmüno Floresan Yöntemi	29
2.13. İstatiksel Analizler	30
3. BULGULAR	31
3.1. Hücrelerde İnsülin direncinin oluşturulması	31
3.2. İnsülin Direncinin ZnT6 ve ZnT7 İfadesi Üzerindeki Etkilerinin Gösterilmesi	33
3.2.1.İnsülin Direnci Oluşturulmuş H9c2 Hücre Hatlarında ZnT6 ve ZnT7 mRNA Seviyesi	33
3.2.2.ZnT6 ve ZnT7 Gen ifadelerinin H9c2 hücrelerinde arttırılmasının doğrulanması	34
3.2.3.ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadeleri Arttırılmış İnsülin Dirençli Hücrelerdeki mRNA ve Protein Seviyeleri	35
3.3. Elektrofizyolojik Deneyler	38
3.3.1.İnsülin Dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadesi Arttırılmış Hücrelerdeki $[Zn^{+2}]_i$ Değişimlerinin Gösterilmesi	38
3.3.2.İnsülin Dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadesi Arttırılmış Hücrelerde Mitokondri Membran Potansiyeli Değişimleri	42
3.3.3.İnsülin Dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadesi Arttırılmış Hücrelerde ROS Değerleri	45
3.4. ZnT6 ve ZnT7 Proteinlerinin Mitokondride Lokalizasyonunun Gösterilmesi	48
3.5. İnsülin Direnci Durumunda ve Gen ifadesi Arttırılmış Hücrelerde Epigenetik Proteinlerin Değişimi	50
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
ÖZET	63
SUMMARY	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	

Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖNSÖZ

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmaların, tüm toplumlarda görülme oranı hızla artan ve insülin direnci ile karakterize metabolik bozuklukların moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yoğunlaştığı görülmektedir. Memelilerde metabolik bozuklukların kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisi olduğu da bildirilmektedir. Çinko iyonu $[Zn^{+2}]$ canlılar için esansiyeldir ve hücrelerin tüm yapısal ve düzenleme mekanizmalarında aktif rol oynamaktadır. Hücre içi serbest çinko ($[Zn^{+2}]_i$) miktarının metabolik bozukluklara bağlı olarak arttığı ve bu artışlarda çeşitli Zn^{+2} -taşıyıcılarının rol oynayabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, bu grup taşıyıcılardan ZnT6(Slc30a6) ve ZnT7(Slc30a7) taşıyıcılarının proteinlerinin sıçan kardiyomiyosit hücre hatlarında (H9c2) insülin direncine bağlı olarak transkripsiyon ve translasyon ifadelerinin değişimi ile bu genlerin histon proteinleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu tez çalışmamda danışmanlığımı üstlenen, tez çalışmamın gerçekleşmesi için her türlü olanağı sağlayan, bilgisi ve tecrübesi ile beni akademik hayata hazırlayan değerli tez danışmanlarım Doç. Dr. Erkan TUNCAY ve Prof. Dr. Belma TURAN ile Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. K. Can AKÇALI'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında emekleri ve mesaieleri geçen her zaman yanımda olan Dr. Yusuf OLGAR'a, Dr. Ayşegül DURAK'a, Ar. Gör. Gül ŞİMŞEK'e, Süleyman TUŞTAŞ'a Mehmet Ali ÖZKUL'a, Hilal HARAR'a teşekkür ederim.

Yine yüksek lisans tez çalışmalarım süresince tanıştığım ve ailem olarak gördüğüm, her zaman yanımda olduklarını hissettiren ve manevi desteklerini esirgemeyen canım arkadaşlarım Bengisu Kevser BULDUK ve Kardelen GENÇ'e teşekkür ederim.

Sevgisini ve merhametini asla esirgemedен tüm duygusal yüklerimi benimle yüklenen ve beni asla yalnız bırakmayan birtanecik annem Rukiye KOÇAK'a ve bana her zaman sevgisi ile destek veren ve yalnız bırakmayan hayat arkadaşım sevgili Kubilay ALKAYA'ya teşekkür ederim.

Uykusuz kaldığım gecelerde bana horlamaları ile eşlik eden kedim Bulut'a sevimliliği için teşekkür ederim. Yüksek lisans süresince geçirdiğim üç senede kendime acımasız davrandığım için kendimden özür dilerim ve kendime olan inancımı hiç kaybetmediğim için kendime teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde işareti
2-DG	2-deoksiglikoz
2-DG6P	2-deoksiglikoz- 6-fosfat
ADP	Adenozin difosfat
Akt	Alfa serin/treonin-protein kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Bisinkonik asit
BSA	Bovine serum albümin
Ca ⁺²	Kalsiyum İyonu
cDNA	Komplementer DNA
CD36	Trombosit glikoprotein 4
CO ₂	Karbondioksit
CpG	Sitozin-fosfat-guanin bölgeleri
DAF-AM	4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluorescein Diasetat
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DCDFA	Diklorofluorescein diasetat
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECL	Kemilüminesans substrat
EtBr	Etidyum bromür
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FCCP	Karbonilsiyamid-p-trifluorometoksifenilhidrazon
FBS	Fatal bovine serum
FluoZin3-AM	Tetrapotasyum tuz
GLUT4	Glikoz taşıyıcı tip 4
H1,H2A,H2B,H3,H4	Histon proteinleri
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H9c2	Sıçan kardiyomyoblast hücre hattı
HCl	Hidrojen klorür
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
Irs2	İnsülin reseptör substratı 2
JC-1	5,5,6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazoilkarbosiyanın iyodür

Kd	Denge sabiti
kDa	Kilo dalton
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
LB	Lysogeny broth
LSD1/KDM1	Lisine özgü histon demetilaz
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikromolar
mL	Mililitre
MMP	Mitokondri membran potansiyeli
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
OptiMEM	Azaltılmış serum ortamı
PA	Palmitik asit
PBS	Fosfat salin tamponu
pH	Potansiyel hidrojen
PMSF	Fenilmetilsülfonil florid
PVDF	Polivinilidin Florür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RCF	Gravity (yer çekimi)
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif nitrjen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPM	Dakika dönüş sayısı
SAM	S-Adenozil metiyonin
SNP	Sodyum nitroprusside
TAE	Tris asetat EDTA
TBS	Tris-tamponlu salin
TEB	Triton ekstraksiyon tamponu
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine
Zip	Slc39a gen ailesi
Zn ⁺²	Çinko iyonu
[Zn ⁺²]	Çinko iyonu konsantrasyonu
ZnPT	1-Hydroxypyridine-2-thione zinc salt
ZnT	Slc30a gen ailesi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Kalbin yapısı	1
Şekil 1.2: İnsülinin insülin reseptörüne bağlanarak hücre içine glikoz alımın sağlamanın şematik gösterimi.	3
Şekil 1.3: Çinko taşıyıcı proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının gösterimi.	7
Şekil 2.1: Slc30a6 Geni Eklenmiş pLenti-C-mGFP-P2A-Puro Vektörü haritası.	16
Şekil 2.2: Slc30a7 Geni Eklenmiş pEkspress-1 Vektörünün Haritası. (MRN1768-202722484)	17
Şekil 2.3: Glikoz alım deneyinin şematik gösterimi.	19
Şekil 2.4: Mitokondriye giren JC-1 boyasının organel içerisinde oluşturduğu J-agregatlarının gösterimi.	26
Şekil 3.1: Glikoz Alım Deneyi Standart Eğrisi.	31
Şekil 3.2: Glikoz Alım Deneyi Sonuçları.	32
Şekil 3.3: H9c2 ve Palmitik Asit ile İnsülin Direnci Oluşturulmuş Hücrelerde Slc30a6 ve Slc30a7 mRNA seviyeleri gösterimi.	33
Şekil 3.4: Kontrol ve ZnT6 ve ZnT7 gen ifadeleri artırılmış gruplarda ZnT6 ve ZnT7 mRNA seviyesi sonucu	34
Şekil 3.5: Tüm gruplarda ZnT6 ve ZnT7 mRNA seviyesi sonucu A:	36
Şekil 3.6: ZnT6 Proteini Western Blot Ölçüm Sonucu.	37
Şekil 3.7: ZnT7 Proteini Western Blot Ölçüm Sonucu.	38
Şekil 3.8: Kontrol ve insülin direnci oluşturulmuş H9c2 hücre hatlarında	39
Şekil 3.9: ZnT7 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücre hatlarında	40
Şekil 3.10: ZnT6 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücre hatlarında	41
Şekil 3. 11: Hücre İçi Bazal Çinko Ölçüm Sonuçları	42
Şekil 3. 12: Mitokondri Membran Potansiyeli Konfokal Mikroskobu Görüntüsü	43
Şekil 3. 13: Mitokondri Membran Potansiyeli Konfokal Mikroskobu Görüntüsü	44
Şekil 3. 14: Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü Sonuçları	56
Şekil 3. 15: H9c2 hücre hatlarında reaktif oksijen miktarı (ROS) ölçümü.	46

Şekil 3. 16: H9c2 hücre hatlarında reaktif oksijen miktarı (ROS) ölçümü.	47
Şekil 3. 17: Reaktif Oksijen Miktarı (ROS) Ölçümü Sonuçları	59
Şekil 3. 18: ZnT6'nın mitokondri üzerindeki lokalizasyonu.	49
Şekil 3. 19: ZnT7'nin mitokondri üzerindeki lokalizasyonu.	49
Şekil 3. 20: LSD1 Proteininin Western Blot Sonucu	51
Şekil 3. 21: K-Asetilasyon Proteininin Western Blot Sonucu	52
Şekil 3. 22: H3K27me2 Proteininin Western Blot Sonucu	53
Şekil 3. 23: H3K36me2 Proteininin Western Blot Sonucu	65



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1: ZnT6(Slc30a6) ve ZnT7(Slc30a7) Genleri için Tasarlanan Primerler

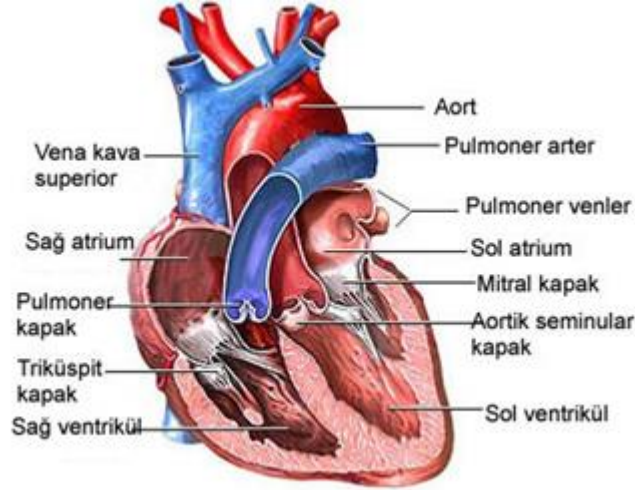
22



1. GİRİŞ

1.1. Kalbin yapısı

Kalp vücutta toplardamarlar ile gelen kanı alıp, atardamarlar ile tüm doku ve organlara kan pompalayan, kas yapıda bulunan güçlü bir pompadır.(Kent, 1893) Epikard, miyokard ve endokard katmanlarından oluşan kalp metabolik süreçlerde ortaya çıkan atıkların, zararlı maddelerin temizlenmesini, organizmanın sıcaklığının ve pH seviyesinin korunmasını sağlamaktadır (Boldt, 2001; Kent, 1893). Şekil 1.1’de de görüldüğü üzere kalp; sağ kulakçık (atrium), sol kulakçık (atrium), sağ karıncık (ventrikül) ve sol karıncıktan oluşan dört odacıktan, iki atriyoventriküler kapak, iki büyük damar kapağından, temiz kanı taşıyan koroner arter ve kirli kanı getiren toplar damarlardan oluşmaktadır(Boldt, 2001; Granger ve Emambokus, 2015).



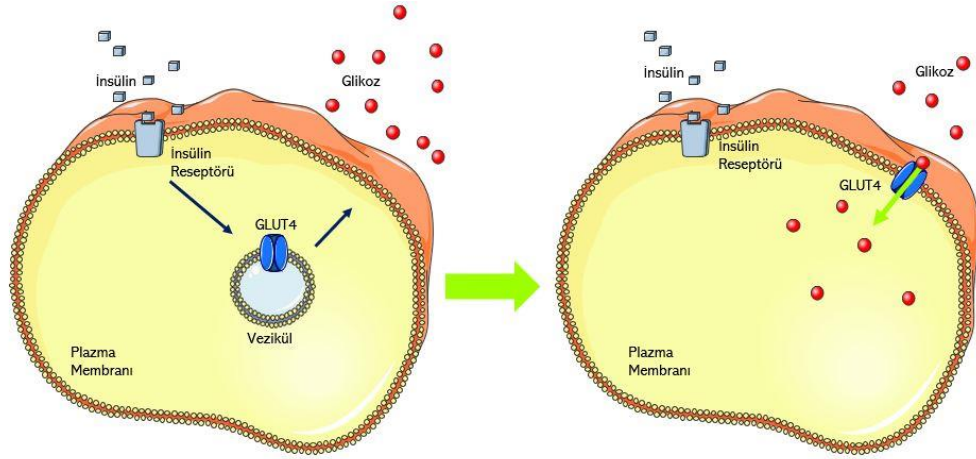
Şekil 1.1: Kalbin yapısı. Kalbin iç yapısı ve damarları, temiz kan ve kirli kanın taşınımı gösterilmektedir.

Kalbin beslenmesini sağlayan koroner damarlar, uyarı ve ileti sistemine ait hücreler ve nöronlar miyokardiyum tabakada bulunur. Kalbin kasılmasını sağlayan

sistemde; sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler demet, atriyoventriküler düğüm ve purkinje lifleri bulunmaktadır ve bu dört yapı uyarı ve iletim sistemini oluşturmaktadır (Boldt, 2001). Kalpte her iki kısım da aynı düzeyde kan pompalamasına karşın sol ventriküldeki kasların daha kalın olduğu bilinmektedir ve sol ventrikül yapının diyabetik hastalarda anormallikler gösterdiği bilinmektedir (Boldt, 2001; Hinton ve Yutzey, 2011).

1.2. İnsülin ve İnsülin Direnci

İnsülin, pankreas organındaki beta hücrelerinden salgılanan moleküler ağırlığı yaklaşık 6kDa olan bir hormondur. İnsülin, hücrelerde insülin reseptörlerine bağlanarak glikoz taşıyıcı proteinleri (GLUT) içeren veziküllerin hücre zarına doğru hareketini sağlar ve enerji kaynağı olan glikozun hücre içine taşınmasına katkıda bulunur.(Leto ve Saltiel, 2012). Şekil 1.2.'de insülin reseptörü ve hücre içine glikoz alımını gösteren şema verilmiştir. Bir organizmada insüline karşı; karbonhidrat, protein, lipid mekanizmalarının yani metabolik mekanizmaların etkilerinde ve hücrelerin büyüme ve farklılaşma, gen ifadesinin düzenlenmesi gibi etkilerini de kapsayan birçok organ sistemini etkileyen biyolojik bir bozulma görülmesi durumu, insülin direncini tanımlayabilir (Altunoğlu, 2012; Olgar ve ark., 2018).



Şekil 1.2: İnsülinin insülin reseptörüne bağlanarak hücre içine glikoz alımının şematik gösterimi. İnsülinin reseptörüne bağlanması ile reseptörün tirozin-kinaz bölgesinin aktifleşmesini sağlar. Bu aktivasyon hücre içinde birçok protein kaskadını da aktifleşmesine neden olur ve glikoz taşıyıcı proteinlerini (GLUT) içeren veziküllerin hücre zarına taşınmasını hızlandırarak glikozun hücre içine alınmasını sağlar.

Lipit metabolizmasının ortamda bulunan serbest yağ asitlerine bağlı olduğu söylenebilmektedir. Hücrelerdeki yağ asidi arzının artması ile trigliserit ve yağ asidi döngüsü değişmekte, mitokondriyal bozulmalar görülebilmektedir. Mitokondriyal bölümlerin aktivitesinin, diyabetli hastaların ve insülin direnci modeli oluşturulmuş hayvanların kalp hücrelerinde düşük olduğu gözlemlenmiştir(Ormazabal ve ark., 2018). İnsülin direnci durumunda hücrelerin metabolik süreçleri yönetememesi söz konusudur. Aynı zamanda insülin direnci durumunda organizma glikozdan alınacak olan enerjiden mahrum kalarak ondan faydalanamamaktadır. İnsülin direnci organ düzeyinde yapı, metabolizma ve fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır. Uzun süreli görülen insülin direncinin tip 2 diyabete, kardiyovasküler hastalıklara, hipertansiyona ve hatta, kontrolsüz bölünebilen hücelere neden olduğu bildirilmektedir(Ormazabal ve ark., 2018; Patel ve ark., 2016). İnsülin direnci patogenezi neden olabileceği hastalıklardan daha önce oluşmaktadır ve bu yıkıcı hastalıkların ilerlemesine de katkıda bulunabilecektir. İnsülin direnci hakkında uzun zamandır araştırmalar yürütülmektedir ve hakkında hala açıklanamamış durumlar bulunmaktadır. Bu yıkıcı hastalıkların tedavisi amacıyla insülin direnci durumuna yol

açan mekanizmaların anlaşılması önem arz etmektedir(Altunoğlu, 2012; Morisco ve ark., 2007; Patel ve ark., 2016; Smidt ve ark., 2016).

1.3.Kardiyovasküler Hastalıklar ve İnsülin Direnci

Dünyada morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biri olan kardiyovasküler hastalığa neden olan en önemli faktörlerden biri insülin direncidir. İnsülin direnci gözlenen organizmada hücre içi sinyalizasyondaki bozulmalar, hücrenin enerji üretmek için kullandığı substratların değişimi, bozulmuş regülasyonu ve miyokardlara farklı iletim göstermesi ile kardiyovasküler hastalıklar tetiklenebilmektedir(Granger ve Emambokus, 2015; Ormazabal ve ark., 2018). İnsülin direnci gibi metabolik bozukluklara sahip organizmaların, plazma membranlarında esterlenmemiş yağ asitleri yüksek düzeyde görülmüştür. Artan yağ asidi miktarına rağmen, diyabetik kardiyomyopatiye yağ asidi arzı da artış gösterir. Yağ asidi ile yüksek enerji üretimi yapabilmek amacıyla artan arzla beraber kalp hücreleri; trigliserit, serbest yağ asitleri, karbonhidratlar, keton cisimcikleri, aminoasitler gibi maddeleri kullanma eğilimi gösterirler(Olgar ve ark., 2018).

Hücrelerin ATP üretimi; substratın ortamda bulunma haline, hormonal etkilere ve enerji harcama ihtiyacına göre değişen bir faktördür. Kalbin ATP üretimi için enerji substratlarını kullanabilme tercihi “metabolik esneklik” olarak isimlendirilmektedir. İnsülin direnci geliştiğinde kalpteki enerji metabolizmasının değiştiği, metabolik esnekliğin bozulduğu, azalmış ATP üretimi gözlenmiştir ve reaktif oksijen türlerinde artış görülmüştür(Okatan ve ark., 2019). Yağ asitlerinin artışının, miyokardiyal yağ alımını artıran bir etkiye neden olmasının yanında ayrıca insülin aracılı glikoz alımını azaltmaktadır. Bu bağlamda miyokardiyal enerji üretimine yönelik kullanılan substratın değiştiği ve neredeyse tamamen yağ asidi oksidasyonuna bağlı olduğu gözlemlenir(Makrecka-Kuka ve ark., 2020). Ancak artan yağ asidi oksidasyonu isteği mitokondrinin kapasitesini aşmasına neden olur ve kardiyomyositlerde ara ürün

birikimi başlar. Biriken ara ürünler ortada bir lipotoksisite oluştururlar. Lipotoksisite oluşumu; hücrede reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin birikimine, sitozol ve mitokondride kalsiyum ve çinko homeostazının bozulmasına, endoplazmik retikulum stresine neden olmaktadır(Makrecka-Kuka ve ark., 2020; Ormazabal ve ark., 2018). Serbest yağ asitlerinin plazmadaki artışı ile kardiyovasküler hastalıklar ilişkilendirilmiştir(Kim ve ark., 2017; Makrecka-Kuka ve ark., 2020).

Yine metabolik rahatsızlıklar yaşayan organizmaların dolaşımında bulunan çinko iyonu (Zn^{+2}) seviyelerinde azalma görülürken hücre içi serbest çinko ($[Zn^{+2}]_i$) seviyelerinde artış görülmüştür. Bu bağlamda hücre içinde gerçekleşebilecek süreçlerde çinko homeostazının bozulmasının çeşitli sinyal yollarının etkilenmesine neden olacağı gözlenmiştir. Çinko homeostazının bozulması durumunda kalp dokularında hasarlar olduğu da gözlemlenmiştir. (Makrecka-Kuka ve ark., 2020; Norouzi ve ark., 2017).

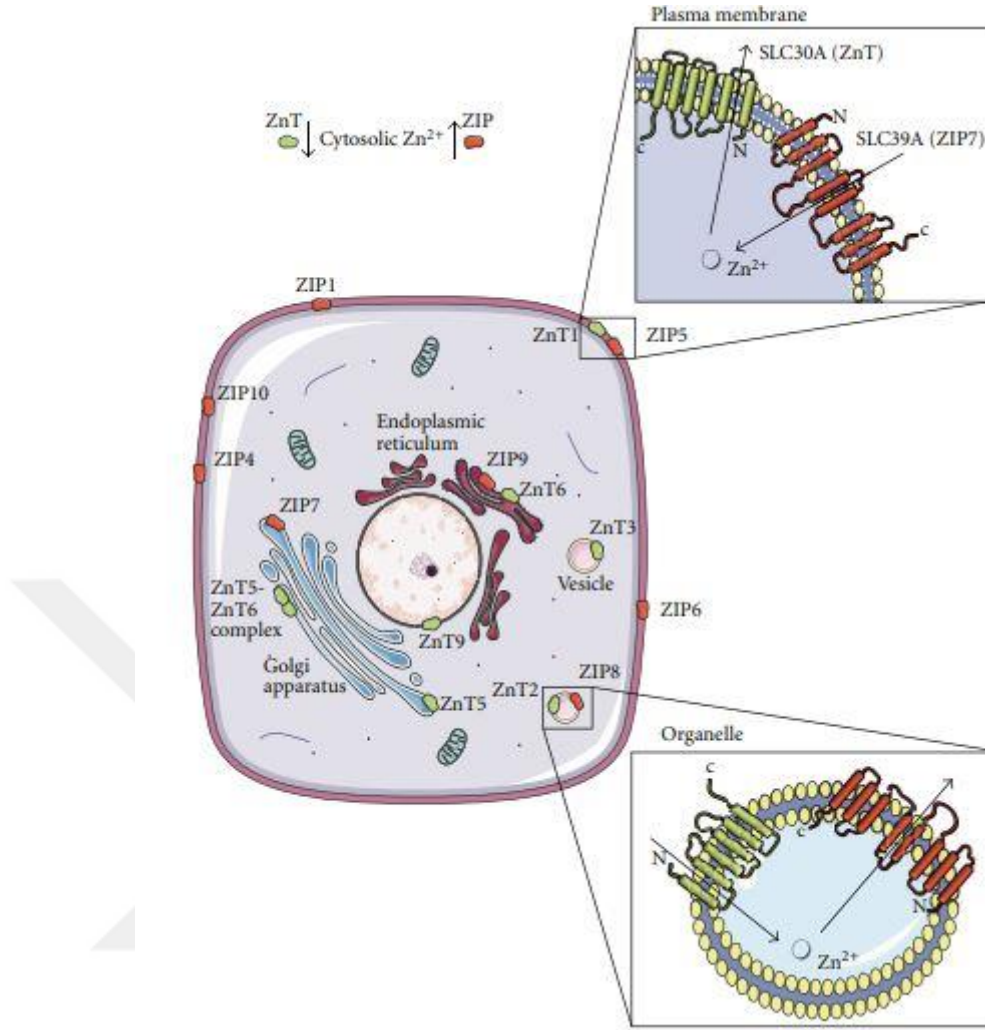
Bu çalışmada kullanılan H9c2 hücre hatlarının, enerji metabolizması özellikleri bakımından normal birincil kardiyomiyositler ile çok benzer olduğu daha önce gözlemlenmiştir. H9c2 hücre hatlarında insülin direnci modelinde oksidatif stresin arttığı, mitokondriyal disfonksiyon olduğu ve hücre içi Ca^{+2} homeostazının bozukluğu daha önce görülmüştür. (Baidyuk ve ark., 2012; Kuznetsov ve ark., 2015; Watkins ve ark., 2011).

1.4. Çinko ve Çinko Taşıyıcı Proteinler

Çinko; vücut sıvılarında, dokularda, organlarda bulunan yapısal ve düzenleyici bir eser elementtir. Bu mineralin birçok hücre sel sinyal yolağında kritik bir kofaktör olarak görev aldığı bilinmektedir. Çinko, genetik stabilizasyon ve fonksiyonunda çok önemli rol oynar. Büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar gibi hücre

metabolizmasını koruyan maddelerin etkisine benzer etkiler gösterdiği bildirilmiştir(Norouzi ve ark., 2017; Turan ve Tuncay, 2021).

Zn^{+2} , membran yapılarından kolaylıkla geçememesi nedeniyle hücre ve organellerin zarlarında çinkoyu içeriye ve dışarıya taşımak amacıyla özelleşmiş çinko taşıyıcı proteinlere ihtiyaç vardır. Zn^{+2} 'nin organellere dağılımı ve hücrel konsantrasyonu fizyolojik aralıklar ile korunmak zorundadır. Bu Zn^{+2} homeostatik mekanizması hücre zarındaki ve organellerdeki Zn^{+2} -taşıyıcılar sayesinde sıkı şekilde korunmaktadır (Myers ve ark., 2012). Memelilerde iki temel Zn^{+2} -taşıyıcı protein ailesi bulunmaktadır ve bunlar Slc30(ZnT) ve Slc39(Zip) proteinleridir. Bu proteinler sayesinde hücrel Zn^{+2} 'nin depolanması ve salınması düzenlenmektedir. Slc30(ZnT) proteinleri sitoplazmik $[Zn^{+2}]$ arttığında organellere ve hücre dışına Zn^{+2} taşınmasını, Slc39(Zip) proteinleri ise sitoplazmadaki $[Zn^{+2}]$ azaldığında organellerden sitoplazmaya veya hücre dışından hücre içine Zn^{+2} alımında görev alırlar. Slc30 ve Slc39 ailelerinin hücreye ve dokuya özgü ifade edildikleri bilinmektedir (Kirschke ve Huang, 2003; Myers ve ark., 2012; Norouzi ve ark., 2017). Zn^{+2} -taşıyıcıların endoplazmik retikulumda, mitokondride, insülin granüllerinde, golgi cisimciği zarında, endozomda, lizozomda ve sinaptik veziküllerde lokalize olduğu ve çinko taşıyıcıların gen ifadelerindeki değişiklikleri ile organellerde değişikliklere neden olduğu daha önce gözlenmiştir (Myers ve ark., 2017; Tuncay ve ark., 2019; Tuncay ve ark., 2017; Turan ve Tuncay, 2021). Hücrelerde fizyolojik ağır metalleri tiyol aracılığı ile tutma görevi olan ve bir Zn^{+2} deposu olarak bilinen metallothioneinler, sistein açısından zengin protein ailesidir. Hücrelerde bulunan fazla Zn^{+2} 'yi tutabilmekte ve hücrenin ihtiyaç duyduğunda sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır. Metallothioneinlerin reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan hasarları azalttığı ve hücrelerde Zn^{+2} toksisitesine karşı koruyucu işlevleri ile bağlantılı rolleri olduğu bildirilmiştir (Ayaz ve Turan, 2006).



Şekil 1.3: Çinko taşıyıcı proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının gösterimi. Sitoplazmik çinko iyonunu [Zn⁺²] azaltıcı olarak ZnT ve sitoplazmadaki çinkoyu artırıcı olarak ZIP proteinleri gösterilmiştir (Myers ve ark., 2012).

Kardiyomiyositlerde sitoplazmadaki [Zn⁺²] seviyesinin 1 nM'den daha az olduğu ölçülmüştür, ancak metabolizmaya bağlı sorunlar oluştuğunda sitoplazmadaki serbest çinkonun arttığı görülmüştür. Sitoplazmadaki [Zn⁺²]'nin düzensiz bir şekilde artışı, hücrenin zararlı ROS ve RNS daha fazla üretmesine neden olmaktadır (Turan ve ark., 1997; Turan ve Tuncay, 2017) Sıçan kardiyomiyositlerinde yapılan araştırmaya göre, [Zn⁺²]i artırıldığında hücrelerde [Ca⁺²] dinamiklerinin bozulduğu ve aksiyon potansiyeli repolarizasyon süresinin uzadığı ve hatta aritmilere neden olduğu gözlemlenmiştir (Degirmenci ve ark., 2018).

1.5. Zn⁺²-taşıyıcı Proteinlerin Metabolik Bozulmalar ile İlişkisi

Literatürler tarandığında, kalpte hangi tip çinko taşıyıcı proteinlerin [Zn⁺²]_i değişimi ile düzenlendiği, yapılan çalışmalarla sınırlıdır ve net bir şekilde açıklanmamıştır. Elde edilen bulgularda, hücre içi kalsiyum deposu olarak gösterilen sarkoplazmik retikulumun aynı zamanda Zn⁺² deposu da olduğu ve bunun hücre içi [Zn⁺²]_i değişimlerine önemli bir katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Tuncay ve ark., 2019; Turan ve Tuncay, 2021). Bu nedenle [Zn⁺²]_i düzenlenmesinde depolardan veya bağlı proteinlerden salınan Zn⁺² ile hücre dışından sitoplazmaya taşınan Zn⁺²'nin büyük önemi vardır. Son verilere göre, Zn⁺²'nin insülin sinyal yolları ve glisemik kontrol yolları ile bağlantılı olduğunun görülmesi [Zn⁺²]_i 'nın metabolik rahatsızlıklar ile de ilişkili olabileceği düşüncesini doğurmuştur (Makrecka-Kuka ve ark., 2020). Diyabetik hastalarda, idrar ile Zn⁺² kaybı durumuna bağlı olarak dolaşımda ciddi bir Zn⁺² eksikliği görülmektedir (Jansen ve ark., 2009). Aynı zamanda diyabetik sıçan kalp hücrelerinde metallothioneinlerde azalma ve [Zn⁺²]_i 'de artma gözlemlenmiştir (Ayaz ve Turan, 2006)

Zn⁺²'nin hücre içerisine alımını, dağılımı ve depolanması araştırılmış ve bazı Zn⁺²-taşıyıcılarının metabolik süreçlerde etkili olabileceği fark edilmiştir. [Zn⁺²]_i ve Zn⁺²-taşıyıcı proteinlerin insüline yanıt veren dokulardaki metabolizmanın homeostazında rol oynadığı görülmüştür. Klinik olarak Zn⁺² takviyesi yapılmış tip2 diyabetik hastalarda yağ asidi oksidasyonunun azaldığı ve bu bağlamda koroner kalp hastalarındaki ölüm oranını düşürdüğü gözlenmiştir (Jansen ve ark., 2009; Soinio ve ark., 2007). Araştırmalarda, Zn⁺²-taşıyıcısı ZnT8'nin pankreatik beta hücrelerinde insülin metabolizmasında kritik olduğu bulunmuştur. ZnT8'in susturulduğu durumlarda Zn⁺² homeostazının bozulması, insülin salınımında artma ve ardından glikoz toleransının bozulduğu görülmüştür. Bu nedenle ZnT8'in insülin direnci adına gerekli olduğu düşünülmüş ve diğer Zn⁺²-taşıyıcılarının da insülin metabolizmasında

olası etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Norouzi ve ark., 2017; Smidt ve ark., 2016).

Yine literatür taramalarında, kalp organında ZnT6 (SLC30A6) ve ZnT7 (SLC30A7) genlerinin ifade edildiği görülmüştür. ZnT6'nın hücredeki sitoplazmik $[Zn^{+2}]$ seviyelerini düzenlemekteki en önemli işlevi, Zn^{+2} 'nin trans golgi ağından sitoplazmik veziküllere aktarılması ve plazma membranı üzerindeki ZnT6'lar ile hücre dışına çıkarılması olarak düşünülmektedir. Böbrek ile nöronlarda ZnT6'nın daha çok perinükleer bölgede ve hücre zarında lokalize olurken prostat epitel hücreleri gibi diğer hücre tiplerinde golgide lokalize olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark., 2002; Olesen ve ark., 2016). ZnT6'nın Zn^{+2} taşıma aktivitesinin vahşi ve mutant tip maya hücrelerindeki analizi yapıldığında sitoplazmadaki Zn^{+2} 'nu hücre dışına taşıyarak azaltma isteği olduğu görülmüştür (Huang ve ark., 2002). Aynı zamanda sitoplazmadaki Zn^{+2} 'nu azaltmak amacıyla golgiye taşıdığı da anlaşılmıştır. ZnT6 geninin mRNA düzeyindeki ifadesi ve protein üretiminin miktarı dokulara göre farklılık göstermektedir. ZnT6 mRNA'sının en çok beyin, karaciğer ve ince bağırsakta üretildiği görülmüştür ancak ZnT6 proteini karaciğerde saptanamamıştır. Akciğerde ZnT6 mRNA'sının oldukça az ifade edilmesinin yanında fazla miktarda ZnT6 proteini ile karşı karşıya gelmektedir. Böylece ZnT6'nın dokuya göre protein üretimi kontrolü sağlandığı gösterilmiştir (Kambe ve ark., 2004). Yakınlarda yapılan çalışmalarda, ZnT7'nin endoplazmik retikulumda, golgide ve mitokondride lokalize olduğu ve metabolik sendromda hücre içi $[Zn^{+2}]_i$ düzenlenmesi ile mitokondri fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (Kirschke ve Huang, 2003; Tuncay ve ark., 2017; Turan ve Tuncay, 2021). Yaşlılık durumunda Zn^{+2} -taşıyıcısı ZnT7'nin yeniden lokalizasyonu ile mitokondride arttığı, endoplazmik retikulumda azaldığı görülmüştür (Olgar ve ark., 2019)

Yapılan çalışmalarda, tip2 diyabetli post menopozlu kadınlarda, bir metabolik sendrom belirtisi olan vücut kitle indeksi yüksek olan hastalarda ve Alzheimer belirtisi

olan yaşlılarda ZnT6 seviyesi ile birlikte dolaşımında çinko seviyesinin azaldığı gözlemlenmiştir(Beyer ve ark., 2012). Olesen ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada, insan beyinde artan vücut kitle indeksine bağlı olarak, ZnT6 mRNA seviyelerinde kayda değer bir azalma olduğunu görülmüştür (Olesen ve ark., 2016). Bu durum; metabolik rahatsızlıkların Zn^{+2} -homeostazını etkileyebilir potansiyelde olduğunu düşündürmektedir.

Foster ve ark., Zn^{+2} -homeostazının bozulması ve artan oksidatif stresin tip2 diyabet, insülin direnci gibi metabolik rahatsızlıklarda önemli rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir (Foster ve ark., 2014). Huang ve ark. ZnT7 geninin susturulduğu farelerde oral glikoz tolerans testi yapıp insülin direnci ölçtüklerinde şiddetli glikoz toleransı sonucunu almışlardır. Yine aynı çalışmada; bir sıçan iskelet kası L6 hücre hattında ZnT7'nin aşırı ekspresyonunun Irs2 gen ifadesini artırdığı, Irs2 ve Akt genlerinin fosforile ederek glikoz alımını artırdığı ifade edilmiştir(Huang ve ark., 2002; Huang ve ark., 2012).

İnsülin direnci durumunda Zn^{+2} -taşıyıcı proteinlerinin metabolik süreçteki mekanizmalarının nasıl değiştiğini bilmek önemlidir. Hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$; glikoz taşınımı, glikojen sentezi, lipogenezi düzenlemesi gibi metabolik yollar ile ilişkilidir ve hücre Zn^{+2} homeostazının kontrolünü sağlayan Zn^{+2} -taşıyıcı proteinlerinin insülin ile ilgili olumsuz süreçlerde, Zn^{+2} 'nun anormal depolanması veya salınması gibi durumları, metabolik süreçlerdeki işlevlerini gözlemlemek gerekmektedir. Hücrelerde Zn^{+2} 'nun epigenetik enzimler için bir kofaktör görevi gördüğü, bir modülatör olduğu bilinmektedir. Böylece, Zn^{+2} bu fonksiyonel görevi ile aktif veya allosterik bölgelere bağlandığı için çinko taşıyıcı proteinlerin de epigenetik regülasyonlarda rolü olduğu düşünülmektedir fakat çinko taşıyıcı proteinler ve epigenetik hakkında çok çalışılmamıştır (Brito ve ark., 2020; Cousins ve ark., 2003; G, 2004; Norouzi ve ark., 2017).

1.6. Epigenetik ve Metabolizma

Epigenetik, DNA sekansındaki değişikliklerden kaynaklanmayan, kalımsal aktarılabilen gen ifade değişikliklerini araştıran bilim dalıdır. DNA paketlenmesi, hücreler için çok önemlidir. DNA hücrenin çapının yüz bin katı uzunluktadır ve katlanarak hücrenin diğer yaşam fonksiyonlarını yerine getirebilecek bir alan yaratılması gerekmektedir. Ayrıca, hücre bölünmesinde kardeş kromatitlerin kusursuz ayrılmalarını sağlayabilmek amacıyla, DNA'nın bölünme esnasında yaşanabilecek sorunlardan kurtulabilmesi amacıyla bazı proteinler ile katlanması gerçekteşmelidir(Rosen ve ark., 2018)Kromozomal DNA'nın paketlenmesinde histon adı verilen proteinler görev almaktadır. Makaraya sarılı bir iplik gibi, bir protein merkez ve etrafına sarılı DNA'dan oluşan yapıya nükleozom denmektedir. Bir nükleozom H2A, H2B, H3 ve H4' den oluşan bazik protein ailesinin her üyesinden birer çift olmak üzere sekiz histon molekülünden oluşan bir oktomer ve bunların etrafına sarılmış DNA baz çiftlerinden meydana gelmektedir. H1 histon proteini DNA'ya nükleozomun merkezine giriş ve çıkışlarından bağlanmaktadır(Berk ve ark., 2007). Gen ifadesi ve kromatin yapısı, kromatin modifikasyonlarından histon modifikasyonları histon lizin asetilasyon ve metilasyonu şeklinde olmaktadır. Kromatinin yeniden şekillenmesi ve DNA'nın histon proteinleri tarafından nükleozomal katlanmasındaki değişiklikler, hücre fonksiyonunu, farklılaşmasını ve proliferasyonunu etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesine neden olur(Ünal ve ark., 2017). Genelde nükleozomda pozitif yüke sahip, düşük asetilasyon seviyesinde olan histon proteinleri, fosfat grupları nedeniyle negatif yüke sahip olan DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanmışlardır. Bu bağlanma ile transkripsiyonel olarak aktif olmayan bir kromatin oluşur. Bu aşamalarda kullanılan enzimler histon asetiltransferazlar, histon metiltransferazlar, histon deasetilazlar ve histon demetilazlardır. Epigenetik modifikasyonlarla çalışma yöntemlerinden DNA metilasyonunun tespiti ile ilgili olarak genel olarak bisüfit muamelesi, histon modifikasyonları için kromatin immünopresipitasyonu uygulanan yöntemlerdendir. DNA metilasyonu ile histon

modifikasyonları arasındaki ilişkinin geri dönüşümlü ve/veya birbirine bağımlı olduğu düşünülmektedir (Berk ve ark., 2007; Ünal ve ark., 2017).

Gen ekspresyonunda rol oynayan bazı transkripsiyon faktörlerinin, genomda ifade edilecek bölgelere bağlanabilmesi için çinkoya ihtiyaç duyduğu bildirilmektedir. Histon asetiltransferazlar, histon demetilazlar, DNA metiltransferazlar, histon deasetilazlar gibi bazı epigenetik enzimlerin aktivasyonu için Zn^{+2} -parmak bölgelerine Zn^{+2} bağlanması gerekir. Ortamdaki Zn^{+2} fazla olması bu enzimlerin aktivitesini etkilemektedir (Berthelet ve ark., 2021; Hook ve ark., 2002).

Histon modifikasyonlarında; histon lizin veya arginin rezidülerinde görülen enzimatik değişimler metabolik rahatsızlıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir. Tip2 diyabet gelişiminde, histon proteinlerinin modifikasyonları ve kromatin yeniden şekillenmesi gibi epigenetik değişimlerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Navik ve ark., 2019). Histon proteinleri üzerinde lizin ve arginin rezidüleri fazlasıyla bulunmaktadır ve translasyon aşamasından sonra katlanarak modifiye edilmektedir (Berk ve ark., 2007). Çoğunlukla histon lizin proteininde görülen asetilasyon gen ifadesinin gerçekleşmesine; histon lizin proteininde görülen deasetilasyon ise gen ifadesinin baskılanmasına neden olmaktadır ancak histon lizin proteininde gerçekleşecek metilasyon sonucunda gen ifadesi baskılanma veya aktivasyon gibi iki duruma neden olabilmektedir. Aynı zamanda görülecek olan histon lizin metilasyon durumu histonun yerine, metilasyonun miktarına göre de değişecektir. Histonların aminoasitlerinde gerçekleşen metilasyonu anlamak amacıyla beraber çalıştıkları enzimler araştırılmıştır. İlk histon demetilazın bulunması, karakterizasyonu ve izolasyonu uzun yıllar almıştır. LSD1/KDM1 aminoksidaz süperailisine ait olan bir histon demetilasyon enzimidir. FAD'ye bağlanarak lizin rezidülerinde demetilasyona neden olmaktadır. LSD1'in gelişimsel süreçleri düzenleyen bir enzim olarak transkripsiyon faktörlerini etkilediği ve hücrenin gelişim süreçlerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Ancak LSD1'in gen ifadesinin stabilizasyonunun bozulması organizmalar için patolojik süreçlerin zeminini hazırladığı literatürde görülmüştür. Son çalışmalarda LSD1 miktarının düzensiz artışının, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olduğu bildirilmiştir(Ancelin ve ark., 2016; Lim ve ark., 2010; Pilotto ve ark., 2016). Bir lizin rezidüsünün mono-, di-, veya trimetile olabildiği bilinmektedir ve her üç form da farklı fonksiyonel sonuçlara neden olabilmektedir. Karakterizasyonu yapılmış ve en iyi bilinen histon bölgeleri nükleozomda çıkıntı yapmış olan histon H3'ün lizin rezidüleri (Lys-4, Lys-9, Lys-27, Lys-36) ve histon H4'ün arginin rezidüsü Arg-3 de de görüldüğü üzere histonların N terminal uçlarında bulunmaktadır(Smith ve Denu, 2009). H3K36 metilasyonu, H3 histonunda lizin aminoasitinin 36. rezidüsünde gerçekleşen metilasyondur. Ökaryotik hücrelerde H3K36me yüksek oranda korunmakta olan bir histon metilasyonudur ve stabilitesi kromatin organizasyonu için önemlidir(Lam ve ark., 2022; Suzuki ve ark., 2017). İnsülin sinyali ile glukoneogenezin düzenlenmesinde görevli transkripsiyon faktörü olan FOXO1 geninin H3K36me2 arafından epigenetik olarak kontrol edildiği bilinmektedir ve diyabetik sıçan karaciğer hücrelerinde FOXO1 genini promotor bölgesinde H3K36me2'nin kalıcı olarak arttığı gözlemlenmiştir(Kumar ve ark., 2016; Navik ve ark., 2019). Son çalışmalara göre; H3K36me2 seviyesinin prediyabet gelişim ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(Nie ve ark., 2017). H3K27 metilasyonu H3 histonunda lizin aminoasitinin 27. rezidüsünde gerçekleşen metilasyondur. Erken gelişim sürecinde genler üzerindeki transkripsiyonel baskıyı korumaktadır. Hastalık ve sağlık durumunda genomdaki yerleşiminin etkilendiği ve genomun heterokromatin özellikleri bozulduğunda genom üzerinde yeniden dağılımı gözlenmiştir(Wiles ve Selker, 2017).

Son zamanlarda yapılan incelemelere göre; birtakım enzimler ile kromatinde görülen değişikliklerden insülin direnci ve diyabete neden olan veya düzelten metabolik tepkiler alınmıştır. Lizin asetilasyonu konusunda yapılan araştırmalar ile histon ve histon olmayan proteinlerde görülen asetilasyon reaksiyonlarının sıkı şekilde korunduğu görülmüştür. Bu reaksiyonlardaki düzensizlikler birçok hastalık ile

ilişkilendirilmiştir çünkü lizin asetilasyonu reaksiyonu DNA ile kendine bağlanan protein arasındaki afiniteyi etkilemektedir. Epigenetik değişimler, uzun süreli yaşanan metabolik rahatsızlıkların etkisini biyolojik olarak açıklamayı sağlayacaktır. Metabolik rahatsızlıklar sonucunda epigenom etkilenebilmektedir ve böyle değişimler hücre bölünmesi sırasında kalıtılmaktadır. Bu nedenle uzun süreli metabolik değişikliklerin ilerlemesinde rol oynayabilecek durumları ortaya çıkarabilmek amacıyla epigenetik mekanizmaların durumu araştırılmalıdır(Rosen ve ark., 2018).

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, metabolik bozukluklarla ilişkili gelişebilen kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkili olan insülin direncinin, hücre içi serbest Zn^{+2} seviyesi ($[Zn^{+2}]_i$) ve Zn^{+2} -taşıyıcı proteinlerdeki değişimlerle olası ilişkinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, daha önceki çalışmalarla mitokondride lokalize olduğu gösterilmiş olan ZnT6 ve ZnT7 gibi Zn^{+2} -taşıyıcılarının insülin direnci altında $[Zn^{+2}]_i$ düzenlenmesindeki rolü, hücre fonksiyonlarına olan etkisi elektrofizyolojik ve epigenetik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda bu taşıyıcılardan, ZnT6 ve ZnT7 ifadeleri H9c2 hücrelerinde arttırılarak, bu değişimlere bağlı olarak gelişebileceği hipotezlenen, $[Zn^{+2}]_i$ 'nin mekanizması yanında, mitokondri membran potansiyelinde ve ROS seviyelerindeki değişimlerin gözlenmesi planlanmıştır. Bu plan doğrultusunda, söz konusu taşıyıcıların ifadesi arttırılmış ve arttırılmamış hücrelerde bu parametreler insülin direnci mimik edilen hücrelerde karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilecek veriler ile metabolik sendrom (MetS) gibi insülin direnci ile karakterize durumlarda gelişebilen kalp bozukluklarında $[Zn^{+2}]_i$ düzenlenmesinin ve bu düzenlemede rol oynayabilecek olan Zn^{+2} -taşıyıcılarının rollerinin aydınlığa kavuşturulması hedeflenmiştir.

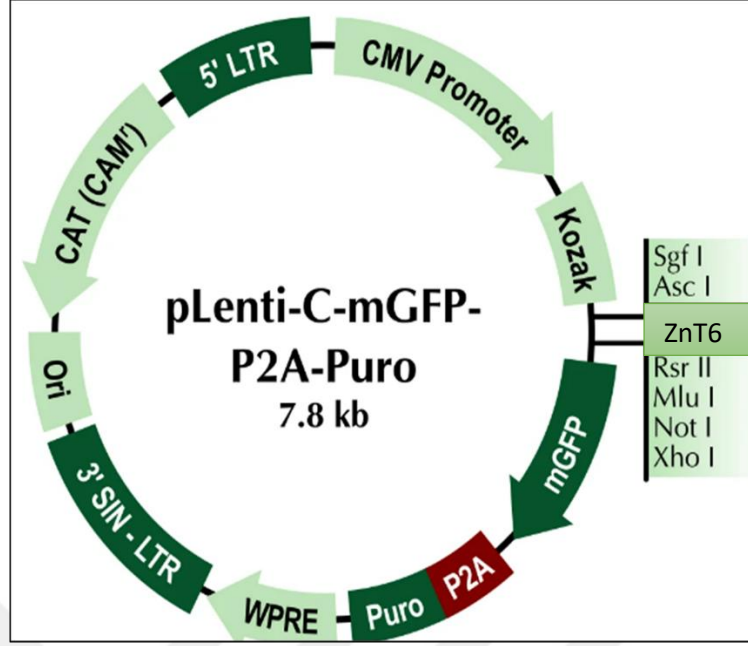
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Hücre Kültürü ve İnsülin Direnci Oluşturulması

H9c2 embriyonik sıçan kalp ventrikül hücreleri (myoblastlar) %10 FBS(Capricorn) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Capricorn) ile tamamlanan Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) düşük glikozlu besiyerinde 37°C ve %5 CO₂ ortamında kültüre edilmiştir(Kuznetsov ve ark., 2015). %70 hücre yoğunluğuna sahip olduklarında hücreler insülin direnci modeli oluşturmak amacıyla 24 saat boyunca 50 µM palmitik asit (Sigma Aldrich) ile desteklenen hücre kültürü ortamında alt kültür edilmişlerdir(Okatan ve ark., 2019). İnsülin direnci modeli oluşumu Glikoz Taşınım Kiti (Glucose Uptake-Glo™ Assay-Promega J1341) ile gözlemlenmiş ve sonuca bağlı olarak deneylere devam edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan gruplar; kontrol grubu, palmitik asit ile insülin direnci oluşturulmuş hücre grubu, ZnT6 ve ZnT7 gen ifadeleri artırılmış hücre grubu ve insülin direnci oluşturulmuş ZnT6 ve ZnT7 gen ifadeleri artırılmış hücre grubudur.

2.2. ZnT6 (Slc30a6) Gen İfadesinin H9c2 hücre Hatlarında Artırılması

Daha önce lentiviral partiküller kullanılarak ZnT6(Slc30a6) gen ifadesi artırılmış H9c2 hücre hatları alınmış ve kullanılmıştır.



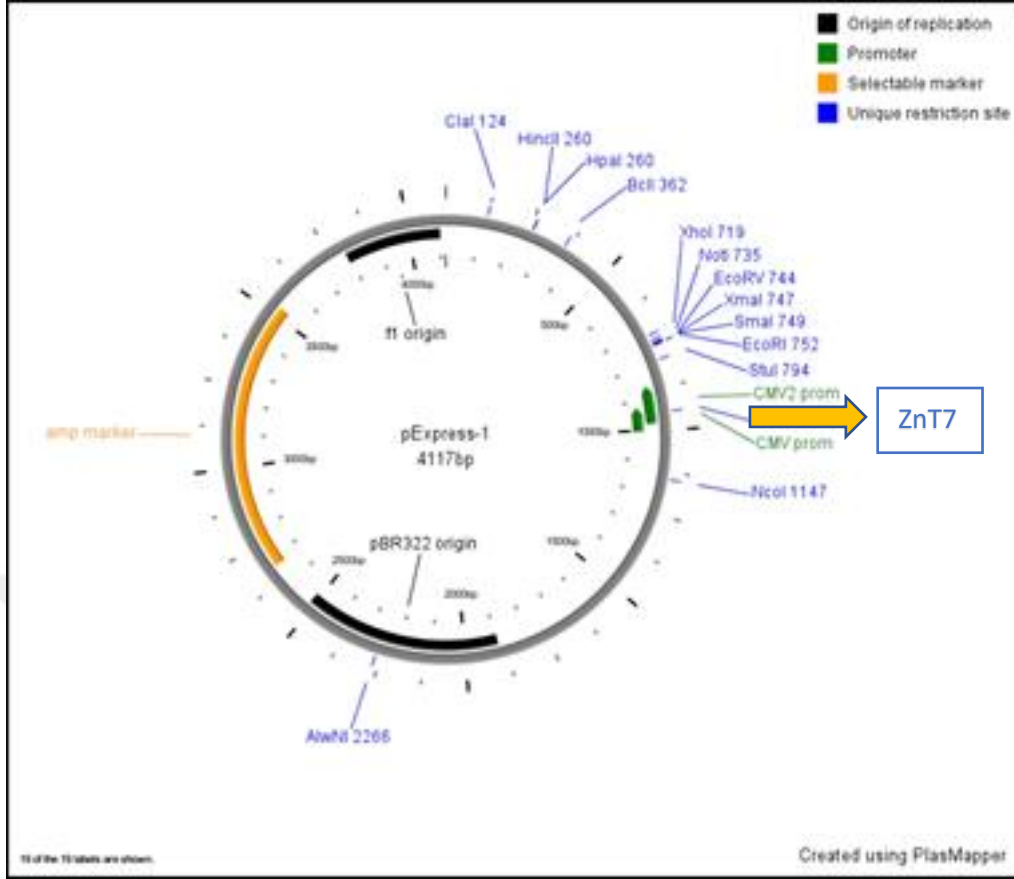
Şekil 2.1: Slc30a6 Geni Eklenmiş pLenti-C-mGFP-P2A-Puro Vektörü haritası.

Hazır olarak kullanılan ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler, kit protokollerine uygun olarak (Slc30a6; RR204423L4 (GFP tag) ve RR204423L3 (myc tag), kontrol; (PS100092 Rat Clones, Origene) lentiviral partiküller kullanılarak hazırlanmıştır.

2.3. ZnT7(Slc30a7) Gen İfadesinin H9c2 hücre Hatlarında Artırılması

2.3.1. Bakterilerin büyütülmesi (plasmid çoğaltma)

ZnT7 plasmidleri kompetan bakteriler olan *E. coli* DH10 β içerisine antibiyotik seçilimi yapılarak gönderilmiştir. Bakteriler 37°C'de 3ml antibiyotiksiz LB Broth medyada 3 saat sallanarak inkübe edilmiştir. İnkübe edilen bakteriler 37°C'de 100ml 1X Ampicillin (Roche) eklenmiş LB broth içinde sallanarak bir gece inkübe edilmiştir.



Şekil 2.2: Slc30a7 Geni Eklenmiş pEkspress-1 Vektörünün Haritası. (MRN1768-202722484)

Şekil 2.1.'de Slc30a7 geni eklenmiş pEkspress-1 vektör haritası gösterilmektedir. Kompetan hücrelerden elde edilen bu plazmid DNA hücrelere verilmiştir ve ZnT7 geninin ifadesinin artması beklenmiştir.

2.3.2. Plasmid izolasyonu

Plasmid izolasyonu QIAGEN The EndoFree® Plasmid Maxi Kit ile sağlanmıştır. Bakterileri içeren LB Broth 6000g 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında kalan tüm protokol uygulanarak sonunda plasmid DNA toplanmıştır.

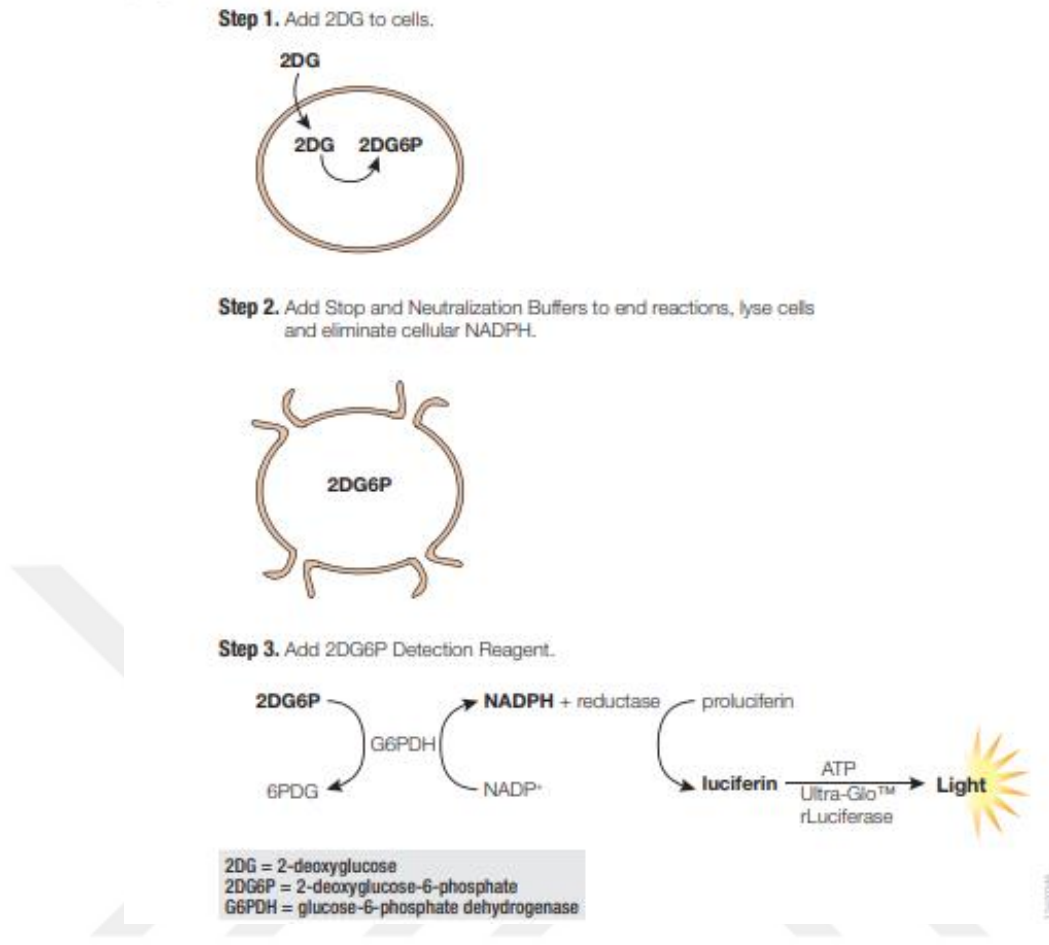
2.3.3. ZnT7(Slc30a7) Transfeksiyonu ile Gen İfadesininin Artırılması

Bir eppendorf tüpüne 1  g ZnT7 plasmid DNA'sı eklenmiş ve 100 uL OptiMEM (Gibco)'e tamamlanmıştır. Ayrı bir eppendorf tüpüne 96 ul OptiMEM içerisine 4  l Lipofektamin (ABP Biosciences) eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler inkübasyondan sonra birleştirilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

OptiMEM ile transfeksiyon solüsyonu 1 mL'ye tamamlandı ve 24 saat boyunca antibiyotiksiz 37C'de bekletilmiş hücelere verildi. 6 saat sonra transfeksiyon medyası alınarak hücelere %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ile tamamlanmış DMEM verildi.

2.4. Glikoz Taşınım Deneyi

H9c2 h cellerinde Palmitik asit inkübasyonunun insülin direnci oluşturduğunu test edebilmek için glikoz taşınım deneyi yapılmıştır. Glikoz taşınımı deneyi Glucose Uptake Assay kiti (Glucose Uptake-Glo™ Assay-Promega J1341) kullanılarak yapılmıştır. Kit içeriğinde bulunan 2-DG ile standart bir eğri çizilip denklem alınmış ve bu eğri denklemine göre deney gruplarının glikoz alımı  l lm şt r. Böylece H9c2 hücre hatlarında insülin direnci oluşup oluşmadığı ve glikoz taşınım mekanizmasında değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.



Şekil 2.3: Glikoz alım deneyinin şematik gösterimi. Hücre içerisine verilen 2-deoksiglikoz hücre içerisinde fosfatlanarak 2-deoksiglikoz-6-fosfata dönüşmekte ve hücrede birikmektedir. Hücre parçalanarak 2-deoksiglikoz-6-fosfat'ın 6-fosfodeoksiglikonata, NADP+'nın NADPH'a dönüştüğü ve bunun lusiferin oluşmasına sebep olduğu bir dizi reaksiyon gerçekleşmektedir. Lusiferaz enzimi ile parçalanmış lusiferin ışımaya yaparak sinyal üretmektedir.

Glikoz alım deneyinde (Promega-J1341) hücrelere 2-deoksiglikoz verilmiştir. Bu madde hücreler tarafından glikoz ile aynı hızda fosforile edilmektedir. Glikoz-6-fosfatı enzimatik olarak daha fazla modifiye edemeyen hücreler, zardan dışarı çıkamayan 2-deoksiglikoz-6-fosfat (2DG6P) maddelerini içerisinde biriktirir. Kısa bir süre inkübasyon sağlandıktan sonra hücreleri parçalamak ve içerisinde bulunan 2DG6P maddesini dışarıya çıkarmak ve hücre içerisindeki tüm NADPH'ı yok etmek amacıyla bir asit deterjan solüsyon ve ardından bu asidik karışımı nötralize etmek için bir nötralizasyon solüsyonu kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında elde edilen glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz, NADP+, redüktaz, rekombinant lusiferaz enzimi ve pürolusiferin

substratları içeren bir solüsyon ilave edilmiştir. Burada glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz 2DG6P'yi 6-fosfodeoksiglukonata oksitler ve ortaya çıkan hidrojen iyonları NADP+'a bağlanarak NADPH'ye indirgemektedir. İndirgeniş olan NADPH ve redüktaz enzimi prolusiferini lusiferine dönüştürmektedir. Lusiferin, rekombinant lusiferaz tarafından parçalanarak bir sinyal üretmektedir. Elde edilen bu sinyal bir floremetre yardımıyla tüm deney gruplarında ölçülerek glikoz taşınım oranları tespit edilmiştir(Okatan ve ark., 2019).

2.5. Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu için hücreler 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekilmiş ve yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra 1X PBS (PBS; 10mM Fosfat, 137mM Sodyum Klorür ve 2.7 mM Potasyum Klorür içermektedir. pH 7.3-7.5' e ayarlanmalıdır.) ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra üzerine +4°C'de 0.25 sıvı örnek için 0.75 ml RiboEX (GeneAll) eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. 12000 RCF'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant temiz bir eppendorfa alınarak üzerine 200 µL choloroform (ISOLAB) eklenmiş ve 2 dk boyunca ters düz edilmiştir. 12000 RCF'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Oluşan üç fazdan en üstteki şeffaf faz dikkatle, bir altında bulunan beyaz faz alınmadan alındı ve yeni bir eppendorfa aktarıldı. Üzerine 250 µL izopropil alkol (Merck) eklendi, 5-6 kez ters düz edilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, 30 dakika -20°C'de inkübe edildi ve yeniden 12000 RCF'de 10 dk +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet içeren tüpe 1 ml %75'lik ethanol (Merck) eklendi. 7500 RCF'de 5 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Tüpteki ethanol pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve geriye kalan kısım buharlaştırıldı. Nükleazsız su eklenerek çözülen RNA 10-15 dakika 56°C'de inkübe edildi. Elde edilen RNA örneklerinin yoğunlukları ve OD260 ile OD280 değerleri ölçüldü.

2.6. cDNA Sentezi

Hücrelerden izole edilen RNA örnekleri, cDNA sentezi Transkriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak cDNA yapıldı. Her örnek için 500 ng RNA kullanıldı, toplam reaksiyon 20µL içerisinde tamamlandı. Sentez kitinin protokolü uygulanarak cDNA elde edildi.

2.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kantitatif PZR)

Çalışılacak ZnT çinko taşıyıcı proteinlerinin primerleri Primer 3, NCBI Primer BLAST kullanılarak tasarlanmıştır. Kantitatif eş zamanlı PZR deneylerinde kullanılacak olan primerlerin optimizasyon deneylerinden sonra gerçekleştirilmiş ve analizi yapılmıştır. Q-PZR reaksiyonunda Light Cycler 480 SYBR Green (Roche) master mixi (2x) kullanılmıştır.

Çizelge 2.1: ZnT6(Slc30a6) ve ZnT7(Slc30a7) Genleri için Tasarlanan Primerler

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Tm (° C)
ZnT6(Slc30a6)	GCCTGAGATACACACGGGAA	GCGACTAAGGTCTGCCACAT	59
ZnT7(Slc30a7)	ATGTTGCCCTGTCCATCAAGG	TCGGAGATCAAGCCTAGGCAGT	58



2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

1X TAE tampon(Tris Base, EDTA, Glacial asetik asit ve etidyum bromür (Biotium; 30 ng/mL) ile hazırlanan %1 agaroz jel kullanılmıştır.

2.9. Elektrofizyolojik İncelemeler

2.9.1. Hücre İçi Serbest $[Zn^{+2}]_i$ Miktarının Ölçümü

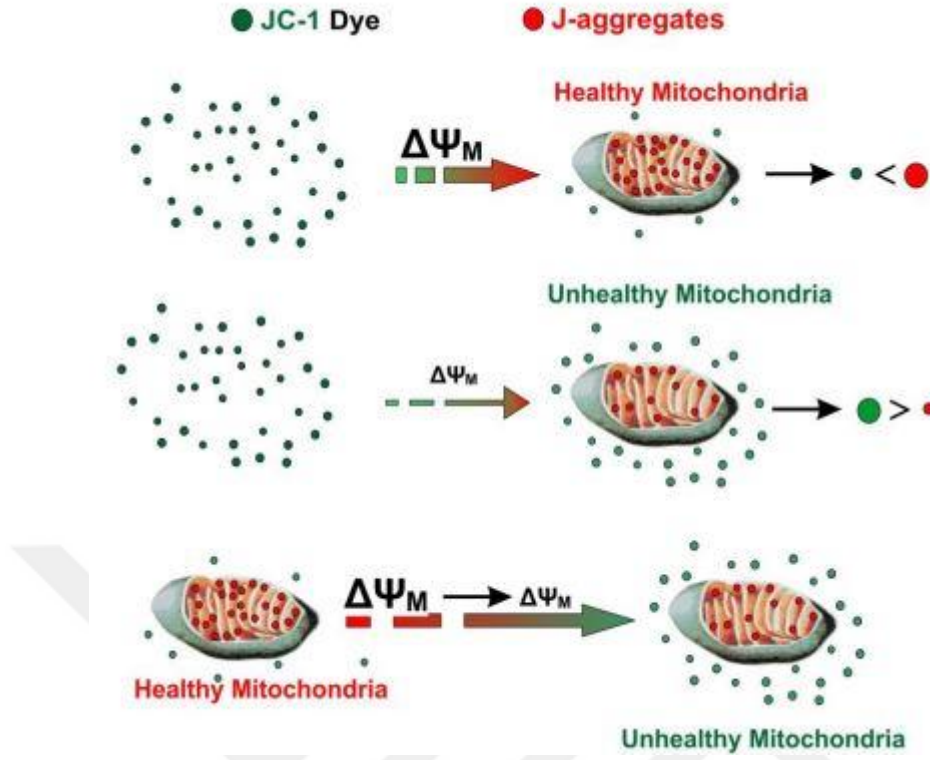
Hücre içi serbest çinko $[Zn^{+2}]_i$ seviyesini ölçmek için çinkoya afinitesi yüksek ($K_d=15nM$) bir boya olan ve 490nm dalga boyunda uyarılıp, 520nm dalga boyunda emisyon veren FluoZin-3AM (Thermo Scientific, ABD) boyası kullanılmıştır. Hücreler FluoZin-3AM (1 μ M; 1saat) ile karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücreler deseterifikasyon işlemi için 3 defa HEPES solüsyonu(HEPES; NaCl 117 mM, Hepes 10 mM, Glikoz 10 mM, KCl 5.4 mM, MgCl₂ 3.6 mM, CaCl₂ 1.8 mM) ile yıkanarak $[Zn^{+2}]_i$ seviyesini ölçmek için hazır hale getirilmiştir. $[Zn^{+2}]_i$ seviyesi konfokal mikroskobu kullanılarak ölçülmüştür (Leica, SP5). Görüntü analizi için Leica'nın LasX yazılımı kullanılmıştır. Hücrelerden 4 dakika boyunca bazal kayıt aldıktan sonra (F), sırasıyla bir Zn^{+2} iyonoforu olan 1-Hydroxypyridine-2-thione zinc salt (ZnPT; 10 μ M, Sigma Aldrich) verilerek maksimum sinyal (F_{max}), en son olarak ise bir Zn^{+2} tutucusu olan Tetrakis-(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN; 50 μ M, Adooq Biosciences) verilerek minimum sinyal elde edilecektir (F_{min}). FluoZin-3'ün bilinen K_d değerinden yararlanılarak bazal çinko $[Zn^{+2}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmıştır (Tuncay vd., 2013).

2.9.2. Hücrelerde ROS Miktarının Ölçümü

H9c2 hücre hatlarında toplam reaktif oksijen türleri (ROS) hücre içerisine girebilen 488nm dalga boyunda uyarılan ve 530nm dalga boyunda emisyon veren 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H2DCDFA; 10µM, Molecular Probes, ABD) boyası ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek ölçülmüştür. İnkübasyon sonrası hücreler desterifikasyon işlemi için 3 defa HEPES solüsyonu ile yıkanarak ROS miktarı ölçümü için hazır hale getirilmiştir. Floresan miktarlarının ölçümü için konfokal mikroskobu kullanılmıştır. Hücrelerden bazal floresan (F) değerleri alındıktan sonra H₂O₂ (1mM; Merck, Almanya) ilave edilerek maksimum floresan (F_{max}) seviyesi ölçülmüştür. Tüm gruplarda ROS miktarının tayini için $\Delta F = (F_{max}-F)/F \times 100$ formülü kullanılmıştır. (Tuncay ve Turan, 2016).

2.9.3. Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü

Mitokondri membran potansiyeli ölçümleri için JC-1 boyası kullanılmıştır. Hücreler 1 µM JC-1 boyası ile 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücreler konfokal mikroskobu kullanılarak (Leica TCS SP5) MMP ölçümleri yapılmıştır. Hücrelerden bazal kayıt alındıktan sonra FCCP (Tocris Biosciences; 1 µM) ilave edilip boyanın mitokondri dışına çıkarılması sağlanmış ve toplam floresan şiddetindeki değişim kaydedilmiştir. Ölçülen floresans sinyali $\Delta F = (F-F_0)/F_0 \times 100$ (F₀= ölçülen bazal sinyal, F= maksimum floresans değeri) formülü kullanılarak floresans değişimleri yüzde olarak hesaplanmıştır (Tuncay ve ark., 2019; Zorova ve ark., 2018).



Şekil 2.4: Mitokondriye giren JC-1 boyasının organel içerisinde oluşturduğu J-agregatlarının gösterimi. (Sivandzade ve ark., 2019) Mitokondri membran potansiyelinin ölçümünü açıklayan bu şemada sağlıklı bir mitokondride JC-1 boyasının mitokondri içerisine rahatça alınarak mitokondri içerisinde J-agregatları oluşturduğu, ancak sağlıklı mitokondride JC-1 boyasının içeriye alınma oranının düştüğü ve boyanın daha çok dış kısımda kaldığı içeriye rahatça alınmadığı böylece mitokondri içinde oluşacak J-agregat miktarının azalacağı görülmektedir. Dışarıda kalan boyanın yeşil, mitokondri içerisine girenlerin ise kırmızı dalga boylarında görüldüğü bu deneyde ikisinin birbirine oranı alınarak hücre içerisindeki mitokondrinin membran potansiyeli ölçülmüştür.

Mitokondri membran potansiyelinin doğru bir ölçümle incelenmesi gerektiğinde genellikle floresan probalar kullanılır ve Nerst potansiyeli kullanılarak bir ölçüme gidilmektedir. Bu problemlerin mitokondri zarına özel olarak bağlanmasında; kullanılan problemlerin amfifilik yapılardan daha hidrofobik olması etkili olur. 5,5,6,6'-tetrakloro-1,1'3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1) boyasının kullanılması ile ölçülen mitokondri membran potansiyeli çoklu hücre tiplerinin sağlık durumunun incelenmesi için geliştirilmiştir. Aynı zamanda bu boya, mitokondri içerisine girmesi için özelleştirilmiş, mitokondride J-agregatları üreterek kırmızı spektrumda (maksimum 590 nm'de) uyarma ve emisyon sağlayan, lipofilik yapıda kationik bir boyadır. Böylece sağlıklı bir mitokondriye giren JC-1 boyası

kendiliğinden kırmızı floresan verecek J-agregatları fazla miktarda, sağlıklı mitokondriye giren JC-1 boyası ise daha az miktarda J-agregatları oluşturacaktır. Sağlıklı bir mitokondride birikecek J-agregatları yeterli konsantrasyona ulaşamadığından yeşil floresanı gösterecektir. Bu durumun mitokondri sağlığı hakkında bize yeşil ve kırmızı floresan sayesinde bilgi vereceği açıktır. Mitokondri membran potansiyeli ne kadar yüksek olursa J-agregatlarının daha çok birikeceği ve floresanın kırmızı görülmesi durumları gözlenecektir. Mitokondri membran potansiyellerinin düşük olması ise J-agregatlarının birikmemesi sonucunda hücrelerin yeşil floresanı koruduğunu gösterecektir. Agregatların kırmızı ve yeşil floresan halinde absorpsiyon ve emisyonlarının kırmızı formda 585/950 nm, yeşil formda se 510/527 nm olduğu bilinmektedir. Bu iki durumun birbirine oranının tamamen mitokondri membran potansiyeline bağlı olduğu da bir gerçektir(Makrecka-Kuka ve ark., 2020; Sivandzade ve ark., 2019; Zorova ve ark., 2018).

2.10. Epigenetik İncelemeler

2.10.1. Histon Modifikasyonlarının Ölçümü

Histon proteinlerinin bazik olduğu bilinmektedir, bu bağlamda izolasyon protokolleri tipik olarak asit bazlı ekstraksiyon şeklinde olmaktadır ve bu sayede histonlar, DNA'dan ve diğer nükleer proteinlerin çoğundan pH'a bağlı çözünürlüklerindeki farklılıklara göre ayrılmaktadır(Berk ve ark., 2007; Ünal ve ark., 2017).

Histon proteinlerinin izolasyonu için kullanılacak H9c2 hücreleri liziz edildi ve protein izolasyonu sağlandı. Hücreler toplandı ve 0°C PBS ile iki kez yıkandı. Triton Ekstraksiyon Tamponu (TEB: %0.5 Triton X 100 (h / h; Sigma Chemical), 2mM fenilmetilsülfonil florür (PMSF), %0.02 (w / v) NaN₃ (Sigma Aldrich) içeren PBS)

içinde 10^7 hücre / ml hücre yoğunluğunda hücreleri yeniden süspansede edildi. Hücreler hafifçe karıştırılarak 10 dakika buz üzerinde parçalandı. 2000rpm'de 10 dakika $4^{\circ}C$ 'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Hücreler TEB hacminin yarısında yıkandı ve 2000rpm'de 10 dakika $4^{\circ}C$ 'de yeniden santrifüjlendi. Pellet 0.2N HCl (Merck) içinde 4×10^7 hücre/ ml hücre yoğunluğunda yeniden süspansede edildi. Histonlar gece boyunca $4^{\circ}C$ 'de ekstrakte edildi. Örnekler 2000rpm'de 10 dakika $4^{\circ}C$ 'de santrifüjlendi. Süpernatant toplanmasının ardından protein miktar tayini BCA (Bisikoninik asit) protein analizi ile yapılmıştır (Pierce Thermo, ABD). Sonrasında proteinlerin toplam miktarlarını belirlemek için proteinlere özgü spesifik antikolar (H3K27me2 Cell Signaling #9728 1:1000, H3K36me2 Cell Signaling #9758 1:1000, H3 Cell Signaling #4499 1:750) kullanılmıştır. Western blotting yapıldı.

2.11. Western Blot Protein analizleri ve Moleküler Biyolojik İncelemeler

2.11.1. Toplam Protein İzolasyonu

Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra, Liziz Tamponu (Liziz Tamponu : RIPA Buffer; 0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10mM EDTA; Proteaz İnhibitör Karışımı, PMSF) içerisinde kazanılmıştır. Bu aşamada ekstrasellüler proteinleri korumak için tripsinizasyon uygulanmamıştır. Kazınan hücre lizatları, sonikasyon aleti ile %20 güç ile 5'er saniye aralıklar ile 15 saniye iyice parçalanmıştır. 5 saniye vortekslendikten sonra 10 000 RPM'de $+4^{\circ}C$ 'de 20 dk santrifüj edildi. Tüplerden toplanan, toplam proteinin bulunduğu süpernatantlar toplandı. Süpernatant toplanmasının ardından protein miktar tayini BCA (Bisikoninik asit) protein analizi ile yapılmıştır (Pierce Thermo, ABD). Western jeline yükleme yapılan proteinlerin boyutları Prime-Step Prestained Broad Range Protein Ladder(BioLegend®) ile anlaşılmıştır. İlgilendiğimiz Zn^{+2} salınımında rol alan proteinlerin toplam miktarlarını belirlemek için proteinlere özgü spesifik antikolar (ZnT6 abcam ab220737 1:750, ZnT7 Santa Cruz sc160946 1:1000, Lysine acetylation

abcam ab21623, Rabbit R05072-500 1:2000, Goat Santa Cruz sc 2033 1:500, B actin Santa Cruz sc47778, Gapdh STJ96417, Mouse R05071-500 1:2000, LSD1 Cell Signaling #2184 1:1000) kullanılmıştır.

2.11.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofzezi

Protein 6rnekleri jele y6klenmeden 6nce %10 β -merkaptoethanol (AppliChem) i6eren 4X ayırma tamponu i6erisinde, 95°C'de 5 dk denat6re edildi. Protein 6rneklerinin %10 ayırıcı jel, histon proteinleri i6in %15 ayırıcı jel ve %5 paketleyici jelde y6r6t6ld6 ve ayrılmaları sağlandı.

2.11.3. PVDF Membrana Protein Transferi

Jeldeki proteinlerin PVDF membrana aktarımı i6in BioRad Turbo Transfer cihazı kullanıldı. Daha sonrasında PVDF membrana immobilize edilmiş proteinlerin imm6nolojik saptaması amacıyla 6nce membranın bloklama 66zeltisi i6inde 1 saat 6alkalanması sağlandı. Imm6noblotlama i6in daha sonrasında ilgili primer antikorlarla bir gece +4°C'de 6alkalanarak ink6be edilmesi sağlandı. Ertesi g6n 1X TBS-(0.3%) tween(Tris-Base, Glisin, SDS) i6erisinde her biri 10 dk olan 3 yıkama sağlandı ve ilgili primer antikora uygun sekonder antikor uygun dil6syonda membrana uygulandı. Kemilim6nesans olarak Pierce ECL Western Blotting substratı(advansta) kullanılmıştır.

2.12. Imm6nofloresan Y6ntemi

H9c2 ve ins6lin direnci oluşturulmuş H9c2'lerde imm6nofloresan deneyi yapabilmek i6in 6 wellere ekili h6creler DMEM'in uzaklaştırılması i6in iki kez 1X

PBS ile yıkandı. Sonrasında %4'lük hazırlanan Paraformaldehit (Sigma Aldrich) ile 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Bu aşamadan sonra tüm aşamalar karanlıkta gerçekleşti. 1X PBS ile 3 kez 10'ar dakikalık aralıklar ile hücreler tekrar yıkandı. %1 BSA-PBS'e 1: 400 Triton X kondu ve karıştırıldı. Bu karışım hücrelere verildi ve hücreler 25 dakika oda sıcaklığında inkübe oldu. Ardından 3 kez 10'ar dakika aralıklar ile 1X PBS ile hücreler yıkandı. Hücrelerin üzerine %1BSA-PBS karışımı konarak 1 saat oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı ve 1:50 oranında ZnT6 ve ZnT7 antikoları ve mitokondriyi gözlemleyeceğimiz VDAC antikoru ile bir gece +4°C'de inkübe oldu. Ertesi gün hücreler 3'er kez 10'ar dakika aralıklar ile 1X PBS ile yıkandı. Ardından 1:1000 oranında sekonderler ile 1 saat karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe olan hücreler 1 saat sonunda 1X PBS ile 3 kez 10'ar dakika aralıklarla yıkandı ve DAPI (invitrogen) boyası ile birlikte lameller lamlara kapatıldı. Oje yardımı ile lameller tamamen yapıştırıldı ve konfokal mikroskopunda sonuçlar incelendi.

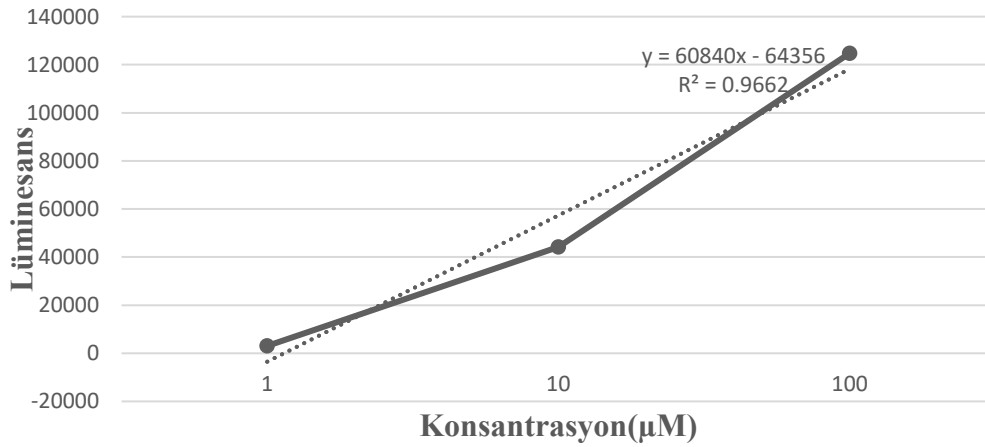
2.13. İstatiksel Analizler

Araştırmada elde edilecek sonuçların analizi, GraphPad Prism, Image J programlarıyla uygun istatistiksel testler kullanılarak yapılmıştır (student-t test, ANOVA v.s. gibi). İstatiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Hücrelerde İnsülin direncinin oluşturulması

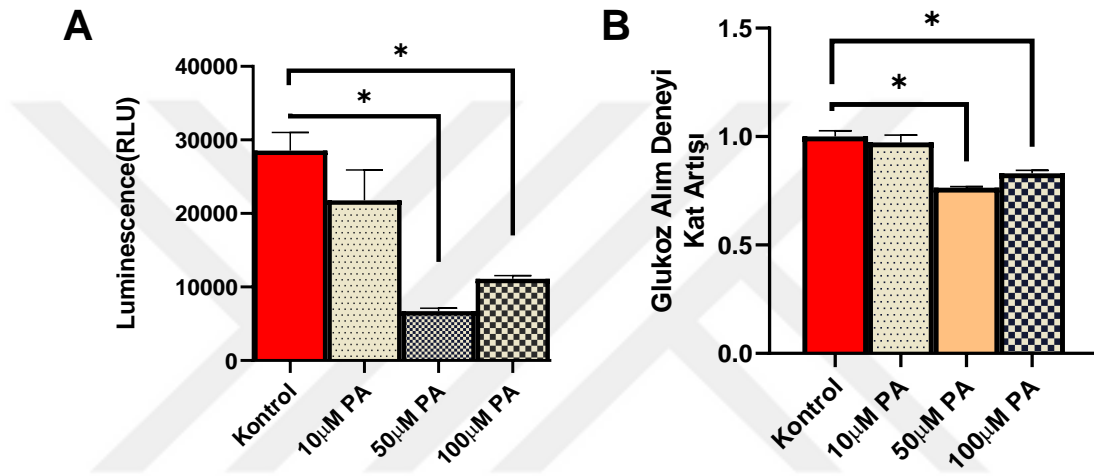
Literatür verileri kullanılarak insülin direncini en uygun şekilde gerçekleştirebilmek için, H9c2 hücrelerin farklı konsantrasyonlarda 2-DG ile (1 µM, 10 µM ve 100 µM) inkübe edilmişler (24 saat ve 37°C de; Okatan ve Turan, 2019) ve bu hücreler glikoz alım deneyleri uygulanarak en uygun PA konsantrasyonuna karar verilmiştir. Glikoz Alım Kiti'nde bulunan standart eğriyi elde edebilmek için lüminesans verecek olan 2-DG maddesini söz konusu kullanılan konsantrasyonlarda verdiği lüminesans ışımaya göre grafik çizilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Glikoz Alım Deneyi Standart Eğrisi. Glikoz alımını ölçmek için Glucose Uptake-Glo™ Assay-Promega J1341 içerisinde bulunan standart 2-DG'den çeşitli konsantrasyonlar kullanılarak hazırlanan standart eğri kuruldu ve buna bağlı olarak glikoz alım deneyi sonuçları çıkan denklem ile sonuçlandırıldı.

Bu çalışmada Glikoz Alım Deneyi kapsamında öncelikle bir standart eğri çizilerek denklem alınmış ve elde ettiğimiz luminesans (RLU) sonuçlarının bu

denklem ile uyarlanması sağlanmıştır. Şekil 3.2.'de farklı konsantrasyonlarda PA karışımı verilen hücrelerde glikoz alımının standart eğriye göre ölçüm sonuçları gösterilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen sonuçta, 50 μ M PA kullanımının glikoz alımını azaltma etkisinin en iyi sonucu verdiği görülmektedir($p<0.005$). Bu nedenle, çalışmamızın bundan sonraki bölümlerinde bu konsantrasyonda hücreler PA ile inkübe edilerek insülin direnci gelişmiş hücreler olarak kullanılmıştır.

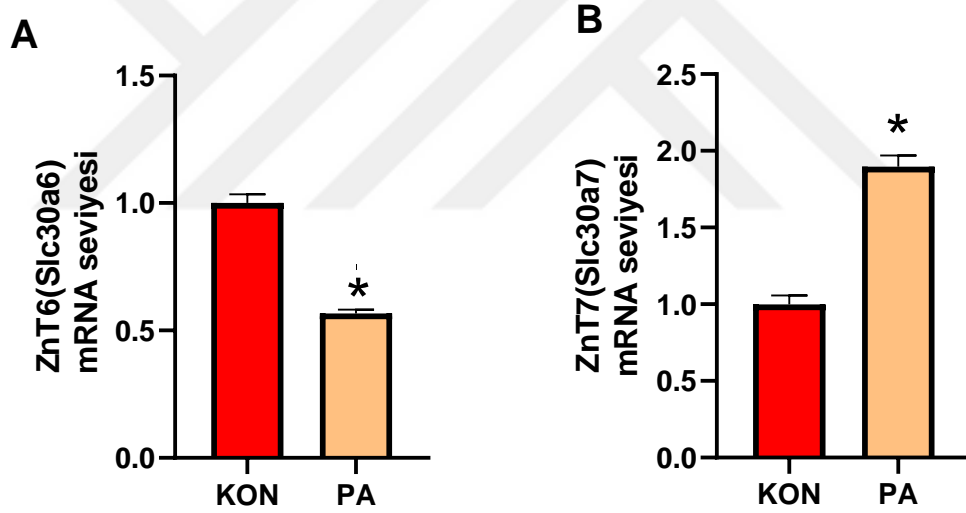


Şekil 3.2: Glikoz Alım Deneyi Sonuçları. A;Glikoz Alım Deneyi Lüminesans Sonuçları. Farklı konsantrasyonlarda palmitik asit verilen hücrelerde glikoz alımı alınan lüminesans sonuçları ile incelendi. Hücrelerdeki glikoz alımını 50 μ M PA'nın en etkili şekilde düşürdüğü görülmüş ve gösterilmiştir. (*= $p<0.05$) B; Glikoz Alım Oranları. Farklı konsantrasyonlarda PA verilen hücrelerde glikoz alımı Şekil 3.1.'deki standart eğri denkleminde hesaplanarak incelendi. Hücrelerdeki glikoz alımını 50 μ M PA en etkili şekilde düşürdüğü görülmüş ve gösterilmiştir. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. İstatistiksel karşılaştırmalar ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır, * $p<0.001$ Kontrolle göre. *= $p<0.005$)

3.2.İnsülin Direncinin ZnT6 ve ZnT7 İfadesi Üzerindeki Etkilerinin Gösterilmesi

3.2.1. İnsülin Direnci Oluşturulmuş H9c2 Hücre Hatlarında ZnT6 ve ZnT7 mRNA Seviyesi

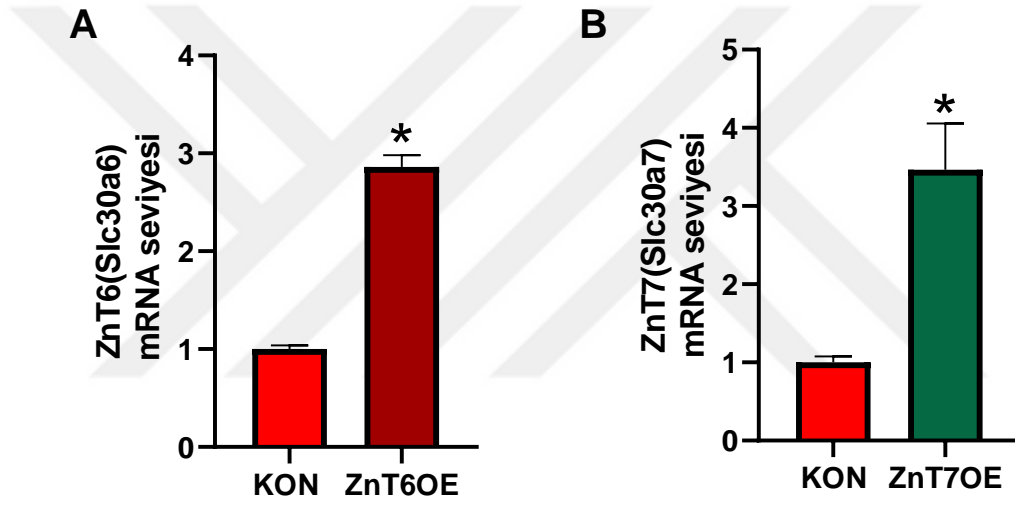
Normal kardiyomiyositlerde $[Zn^{+2}]_i$ seviyesi yaklaşık 1nM olarak bulunmuştur (Turan ve Tuncay, 2017). Şekil 3.3.'e göre 50 μ M PA inkübasyonu ile insülin direnci oluşturulmuş H9c2 hücre hatlarında ZnT6 geninin mRNA seviyesinin normal hücrelerle karşılaştırıldığında azaldığı gözlenmiştir ($p<0.001$). Buna karşın, insülin dirençli hücrelerde ZnT7 geninin mRNA seviyesinin ise arttığı gözlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 3.3: H9c2 ve Palmitik Asit ile İnsülin Direnci Oluşturulmuş Hücrelerde Slc30a6 ve Slc30a7 mRNA seviyeleri gösterimi. A; Kontrol ve insülin direnci modelinde ZnT6 geninin transkripsiyonel olarak seviyesinin belirlenmesi B; Kontrol ve insülin direnci modelinde ZnT7 geninin transkripsiyonel olarak seviyesinin belirlenmesi. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. İstatistiksel karşılaştırmalar student-t testi kullanılarak yapılmıştır, * $p<0.001$ Kontrolle göre.

3.2.2. ZnT6 ve ZnT7 Gen ifadelerinin H9c2 hücrelerinde arttırılmasının doğrulanması

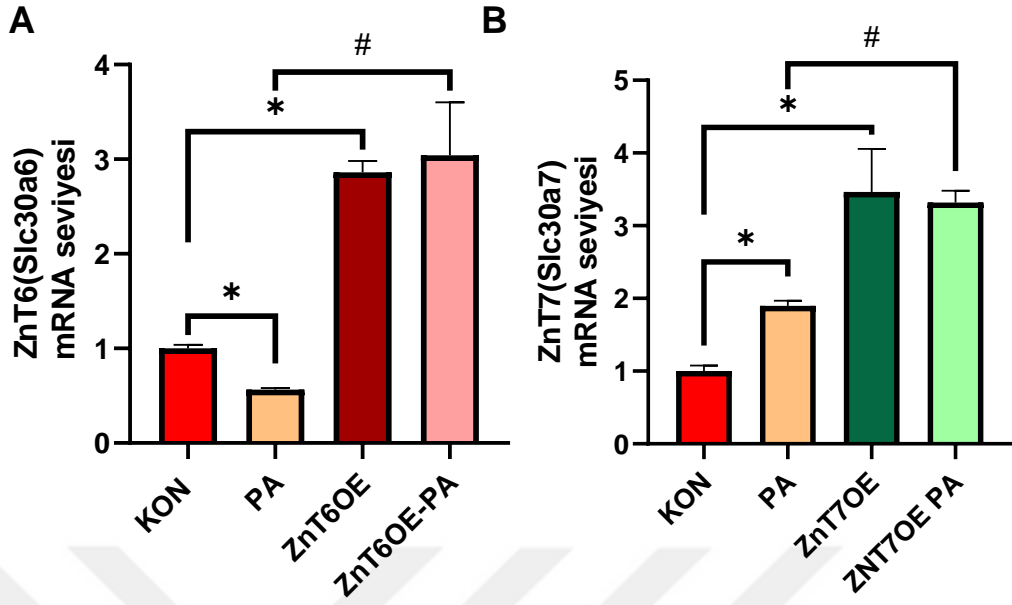
ZnT6 çinko taşıyıcı protein geni (Slc30a6 geninin) hücre içerisinde artırılışı, kalıcı gen aktarımı ile sağlanmıştır. Şekil 3.4A’da ZnT6 (Slc30a6) geninin mRNA seviyesinde artırıldığı görülmüştür. ZnT7 çinko taşıyıcı protein geni (Slc30a7 geninin) hücre içerisinde artırılışı geçici gen aktarımı ile sağlanmıştır. Şekil 3.4B’de ZnT7(Slc30a7) geninin mRNA seviyesinde artırıldığı görülmüştür.



Şekil 3.4: Kontrol ve ZnT6 ve ZnT7 gen ifadeleri artırılmış gruplarda ZnT6 ve ZnT7 mRNA seviyesi sonucu A; Kontrol hücreleri ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT6 geninin mRNA düzeyinde artışının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçümü sonucu. (* $p < 0.0005$ H9c2’ye göre.) B; Kontrol hücreleri ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT7 geninin mRNA düzeyinde artışının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçümü. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. İstatistiksel karşılaştırmalar student-t testi kullanılarak yapılmıştır (* $P < 0.05$ Kontrole göre.)

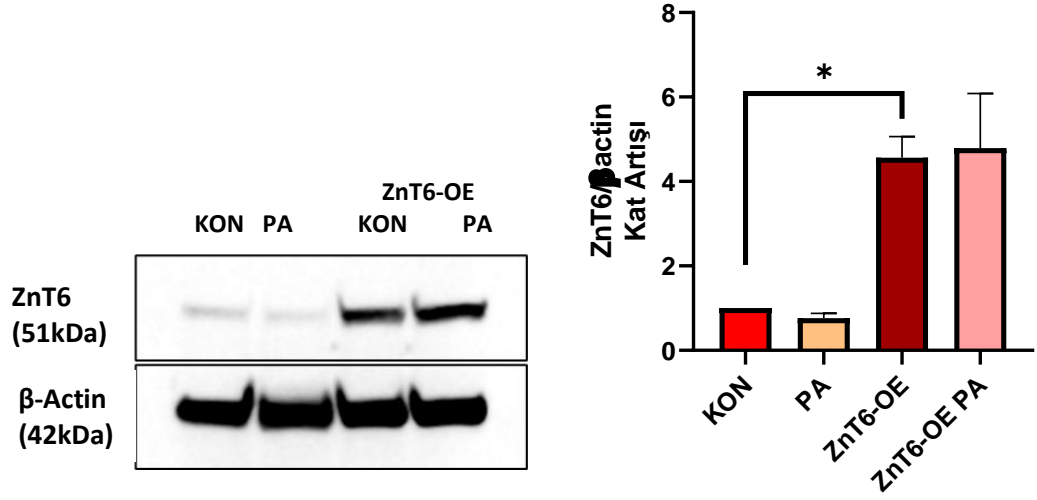
3.2.3. ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadeleri Arttırılmış İnsülin Dirençli Hücrelerdeki mRNA ve Protein Seviyeleri

ZnT6 ve ZnT7 gen ifadelerinin artırılması mRNA ve protein seviyeleri ölçülerek doğrulanmıştır ve insülin direnci durumunda ZnT6 ve ZnT7 gen ifadelerinin artırılmasının etkisi gözlenmek istenmiştir. Şekil 3.5. A’da kontrol hücreleri, insülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında ZnT6 mRNA seviyesi analiz edilmiştir. İnsülin dirençli hücrelerde ZnT6 mRNA seviyesinin anlamlı şekilde düştüğü, ZnT6 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT6 mRNA seviyesinin anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. B’de ise kontrol hücreleri, insülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında ZnT7 mRNA seviyesi analiz edilmiştir. İnsülin dirençli hücrelerde ZnT7 mRNA seviyesinin anlamlı şekilde arttığı, ZnT7 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT7 mRNA seviyesinin anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.



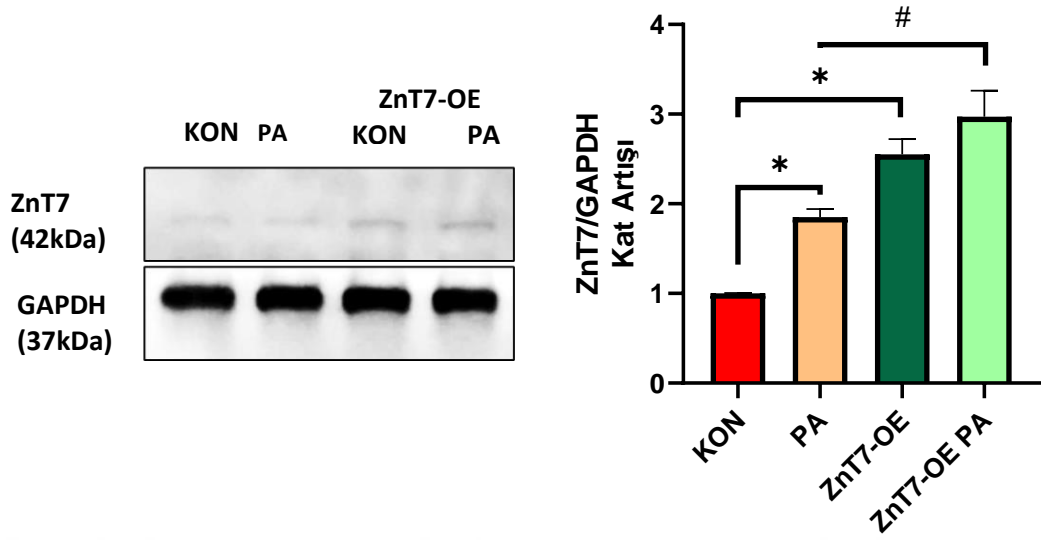
Şekil 3.5: Tüm gruplarda ZnT6 ve ZnT7 mRNA seviyesi sonucu A: Kontrol ve İnsülin dirençli hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ile insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT6 geninin mRNA düzeyinde artışının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçümü sonucu. B; Kontrol ve İnsülin dirençli hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ile insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT7 geninin mRNA düzeyinde artışının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçümü sonucu. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p < 0.05$ Kontrole göre. # $p < 0.05$ PA'ya göre)

Şekil 3.6.'da kontrol hücreleri, insülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında ZnT6 protein seviyesi analiz edilmiştir. İnsülin dirençli hücrelerde kontrol hücrelerine göre, ZnT6 protein seviyesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. ZnT6 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT6 protein seviyesi artmıştır. ZnT6 gen ifadesinin artırıldığı protein seviyesinde gösterilmiştir ve diğer deneylere devam edilmiştir.



Şekil 3.6: ZnT6 Proteini Western Blot Ölçüm Sonucu. Kontrol ve insülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde, ZnT6'nın protein düzeyinde değişiminin SDS-PAGE yöntemi ile ölçümü. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p < 0.05$ Kontrolle göre)

Şekil 3.7.'de kontrol hücreleri, insülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında ZnT7 protein seviyesi analiz edilmiştir. İnsülin dirençli hücrelerde kontrol hücrelerine göre, ZnT7 protein seviyesinde anlamlı bir artış görülmüştür. ZnT7 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ZnT7 protein seviyesi artmıştır. ZnT7 gen ifadesinin artırıldığı protein seviyesinde gösterilmiştir ve diğer deneylere devam edilmiştir.



Şekil 3.7: ZnT7 Proteinini Western Blot Ölçüm Sonucu. Kontrol ve insülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde, ZnT7'nin protein düzeyinde değişiminin SDS-PAGE yöntemi ile ölçümü. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p < 0.05$ Kontrolle göre, # $p < 0.05$ PA'ya göre)

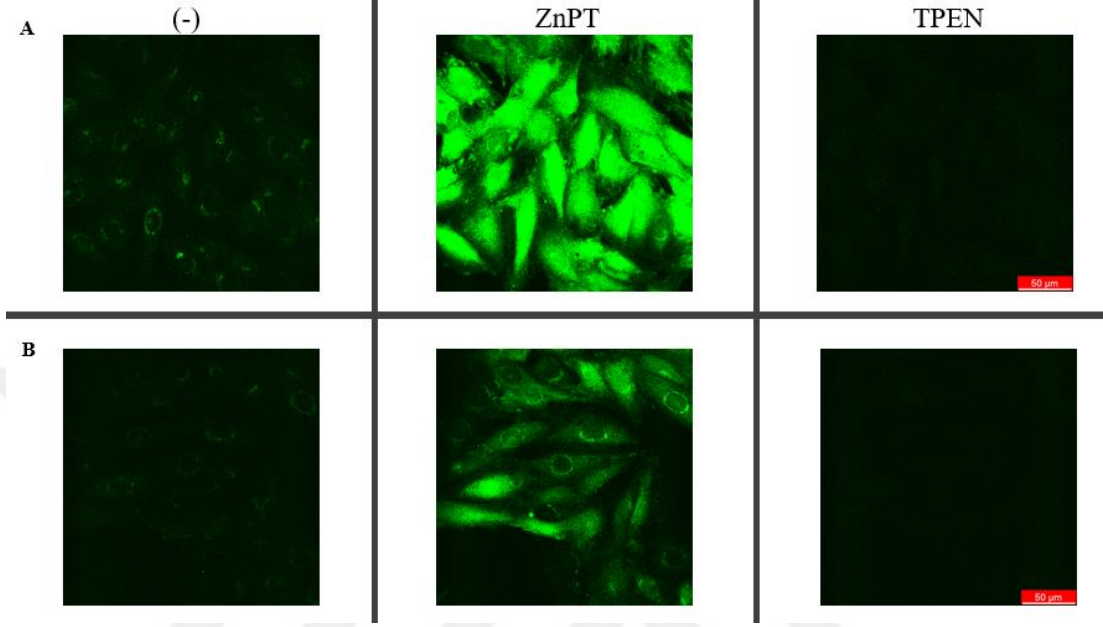
3.3. Elektrofizyolojik Deneyler

3.3.1. İnsülin Dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadesi Artırılmış Hücrelerdeki $[Zn^{+2}]_i$ Değişimlerinin Gösterilmesi

İnsülin direnci geliştirilmiş hücreler ile ZnT6 ve ZnT7 ifadesi artırılmış H9c2 hücre hatlarında $[Zn^{+2}]_i$ miktarı FluoZin-3AM boyası kullanılarak ölçülmüştür (Tuncay ve ark., 2011).

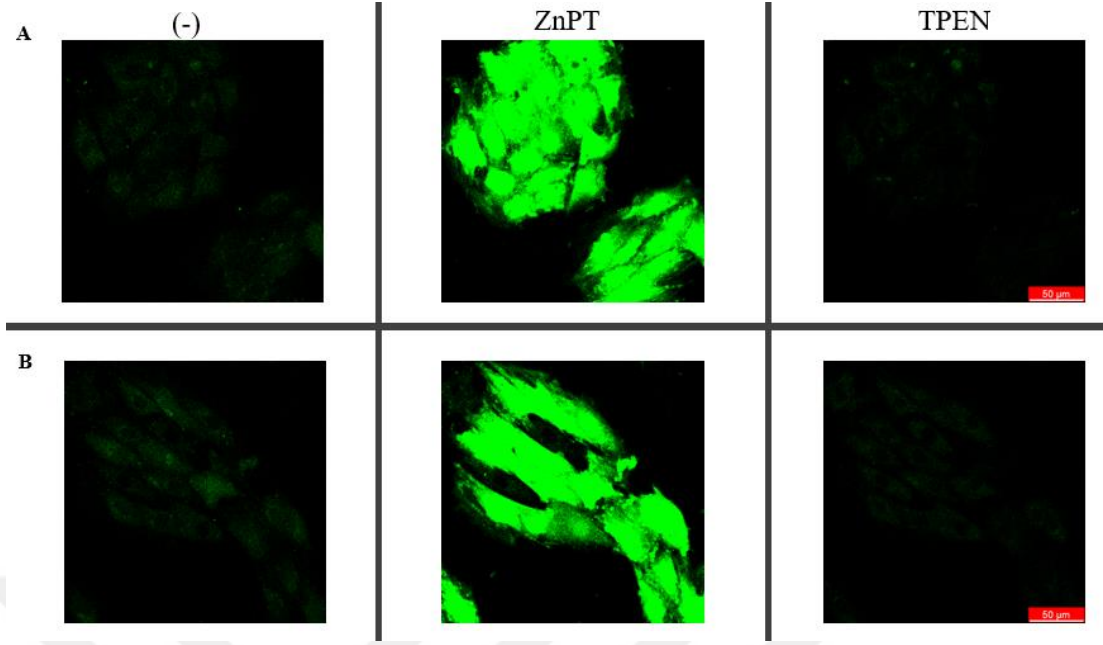
Şekil 3.8'de kontrol (A) ve PA inkübasyonu ile insülin direnci geliştirilmiş (B) hücrelerden $[Zn^{+2}]_i$ 'nin ölçülmesi amacıyla öncesinde hücreler FluoZin-3AM boyası ile boyandıktan sonra bazal bir floresan kaydı alınmıştır. Sonrasında hücrelerin üzerine sırasıyla ZnPT (10 μ M) ve TPEN (50 μ M) verilerek maksimum ve minimum floresan

kayıtları alınmıştır. Tüm gruplarda $[Zn^{+2}]_i$ miktarları $[Zn^{+2}] = Kd * (F_{max} - F) / (F - F_{min})$ formülü kullanılarak değerlendirilmiştir.



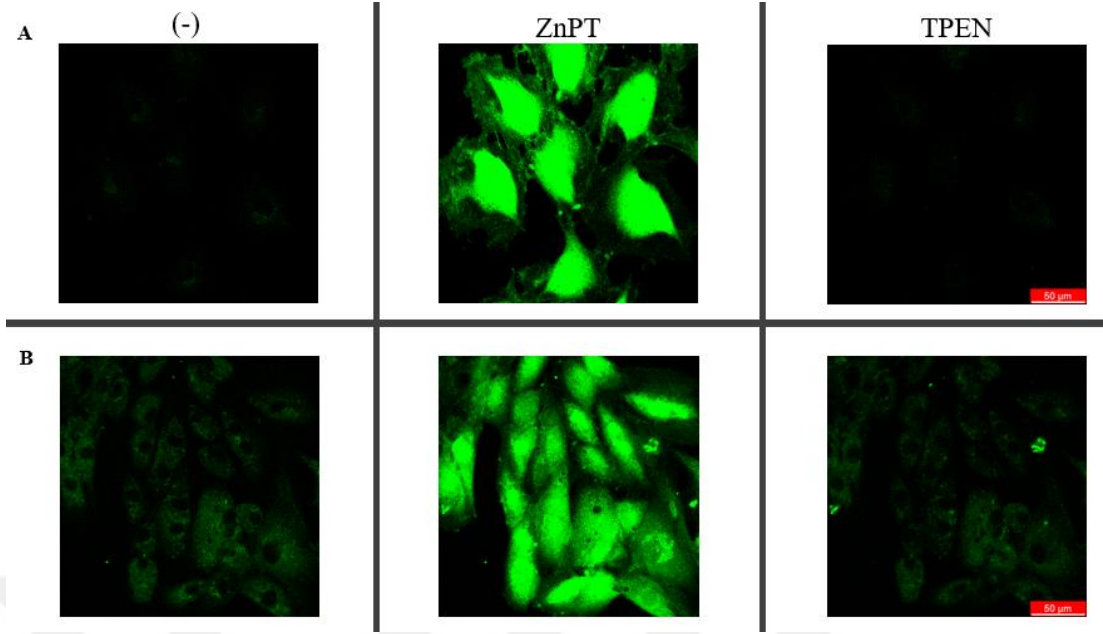
Şekil 3.8: Kontrol ve insülin direnci oluşturulmuş H9c2 hücre hatlarında $[Zn^{+2}]_i$ ölçümü. Kontrol (A) ve insülin direnci (B) geliştirilmiş hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$ ölçümü için alınan örnek konfokal kayıtları gösterilmektedir. Hücrelerden bazal kayıt alındıktan sonra (solda) sırasıyla bir çinko iyonoforu olan ZnPT (ortada) ve bir çinko şelatörü olan TPEN (sağda) verilerek $[Zn^{+2}]_i$ miktarı hesaplanmıştır (Ölçek boyutu 50 μm 'dir).

Şekil 3.9'da ZnT7 ifadesi arttırılmış kontrol (A) ve insülin dirençli (B) hücrelerden aynı protokoller kullanılarak $[Zn^{+2}]_i$ ölçülmüştür.



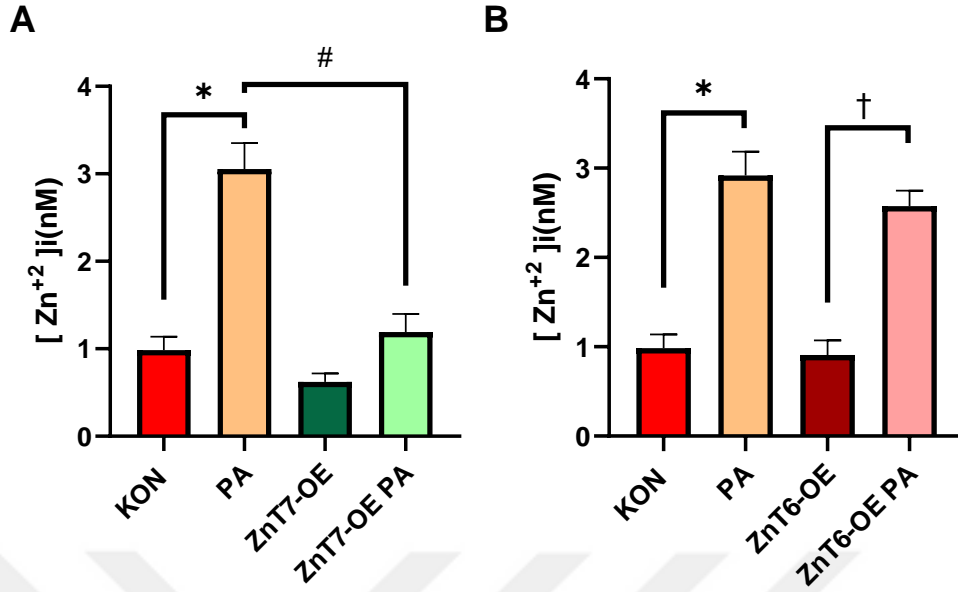
Şekil 3.9: ZnT7 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücre hatlarında $[Zn^{+2}]_i$ ölçümü. Kontrol (A) ve insülin direnci (B) geliştirilmiş hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$ ölçümü için alınan örnek konfokal kayıtları gösterilmektedir. Hücrelerden bazal kayıt alındıktan sonra (solda) sırasıyla bir çinko iyonoforu olan ZnPT (ortada) ve bir çinko şelatörü olan TPEN (sağda) verilerek $[Zn^{+2}]_i$ miktarı hesaplanmıştır (Ölçek boyutu 50 μm 'dir).

Şekil 3.10'da ZnT6 ifadesi artırılmış kontrol (A) ve insülin dirençli (B) hücrelerden aynı protokoller kullanılarak $[Zn^{+2}]_i$ ölçülmüştür.



Şekil 3.10: ZnT6 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücre hatlarında $[Zn^{+2}]_i$ ölçümü. Kontrol (A) ve insülin direnci (B) geliştirilmiş hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$ ölçümü için alınan örnek konfokal kayıtları gösterilmektedir. Hücrelerden bazal kayıt alındıktan sonra (solda) sırasıyla bir çinko iyonoforu olan ZnPT (ortada) ve bir çinko şelatörü olan TPEN (sağda) verilerek $[Zn^{+2}]_i$ miktarı hesaplanmıştır (Ölçek boyutu 50 μm 'dir).

Şekil 3.11'de tüm gruplarda $[Zn^{+2}]_i$ ölçümleri bar grafik şekilleri ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar $[Zn^{+2}]_i = Kd * (F_{max} - F) / (F - F_{min})$ formülü kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda PA verilerek insülin direnci oluşturulan hücrelerde $[Zn^{+2}]_i$ miktarı anlamlı derecede artmıştır (* $p < 0,05$). ZnT6 ve ZnT7 ifadesi arttırılan hücrelerde ise $[Zn^{+2}]_i$ miktarı değişmemiştir. ZnT7 gen ifadesi arttırılan hücrelerde insülin direncinin geliştirilmesi ise $[Zn^{+2}]_i$ miktarını anlamlı derecede değiştirmemiştir. ZnT7 ifadesinin arttırılması $[Zn^{+2}]_i$ miktarını dengede tutarak insülin direncine karşı koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür ($\#p < 0,05$ PA grubu). ZnT6 gen ifadesi arttırılan hücrelerde insülin direncinin geliştirilmesi ise ZnT6 ifadesi arttırılmamış kontrol grubunda olduğu gibi $[Zn^{+2}]_i$ miktarını anlamlı derecede arttırmıştır ($\dagger p < 0,05$ ZnT6 PA'ya göre).

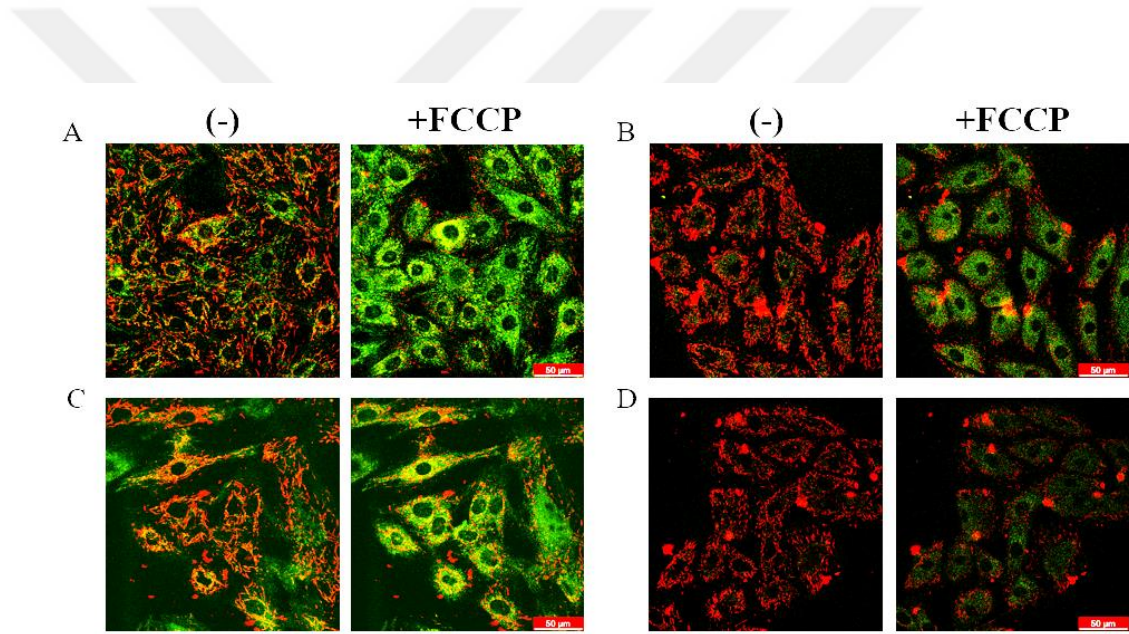


Şekil 3. 11: Hücre İçi Bazal Çinko Ölçüm Sonuçları. A; Kontrol, insülin direnci oluşturulmuş, ZnT7 gen ifadesi artırılmış ve insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücrelerinde [Zn²⁺]_i ölçümü, B; Kontrol, insülin direnci oluşturulmuş, ZnT6 gen ifadesi artırılmış ve insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücrelerinde [Zn²⁺]_i ölçümü. Grafiklerdeki değerler ortalama ±SEM verilerini göstermektedir. (*p<0.05 Kontrol'e göre, # p<0.05 PA'ya göre, †p<0.05 ZnT6-OE PA'ya göre).

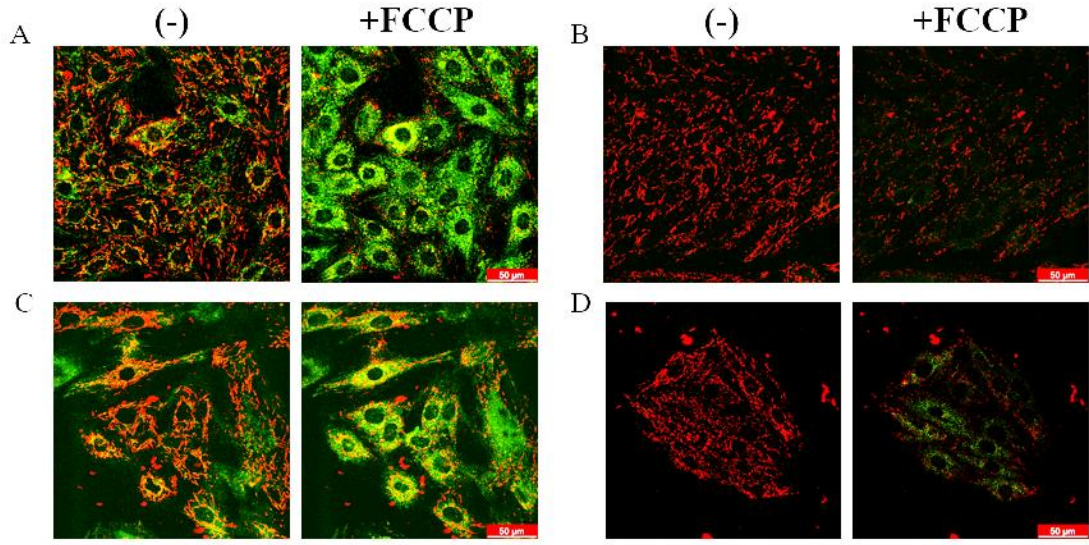
3.3.2. İnsülin Dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadesi Artırılmış Hücrelerde Mitokondri Membran Potansiyeli Değişimleri

Mitokondri membran potansiyeli (MMP) ölçümleri için JC-1 floresan boyası kullanılmıştır. Hücreler 1 µM JC-1 boyası ile 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücrelerden lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak (Leica TCS SP5) MMP ölçülmüştür. Hücrelerden bazal floresan kaydı alındıktan sonra kalibrasyon amacıyla FCCP (1 µM) ilave edilip toplam floresan şiddetindeki değişim kaydedilmiştir. Ölçülen floresan sinyalinden arka plan sinyali çıkarıldıktan sonra MMP, $\Delta F = (F-F_0)/F \times 100$ (F_0 = ölçülen bazal sinyal, F = FCCP sonrası ölçülen maksimum floresans değeri) formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Tuncay ve ark., 2019).

Şekil 3.12 ve 3.13'te insülin dirençli kontrol, ZnT6 ve ZnT7 ifadesi arttırılan H9c2 hücrelerinden konfokal mikroskop kullanılarak kaydedilen örnek MMP ölçümleri gösterilmiştir. JC-1 lipofilik katyonik bir boyadır. Sahip olduğu yükten dolayı çoğunlukla mitokondri içerisinde ve hücre zarında lokalize olur. Mitokondriyonlar çok küçük olduğundan dolayı bu boya agregat halinde bulunmakta ve 488nm dalga boyunda uyarıldığında 585nm dalga boyunda emisyon vermektedir. Sitozolda bulunan boya ise uyarıldığında 535nm dalga boyunda emisyon vermektedir. Sitozolden ölçülen floresan miktarı (585nm), mitokondride ölçülen floresan miktarına (535nm) oranlanarak MMP oransal olarak tespit edilmektedir. Tüm deney gruplarında MMP ölçümleri bir protonofor olan FCCP verilerek kalibre edilmiştir.

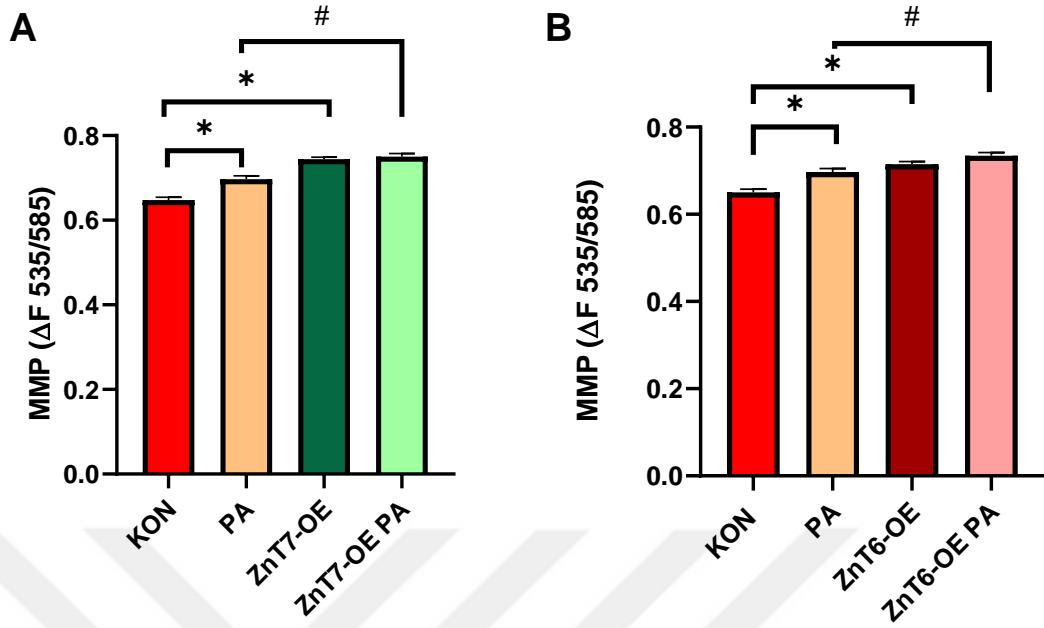


Şekil 3. 12: Mitokondri Membran Potansiyeli Konfokal Mikroskobu Görüntüsü. Sırasıyla A; Kontrol H9c2'ler, B; ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler, C; İnsülin direnci geliştirilmiş H9c2'ler ve D; İnsülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde mitokondri membran potansiyeli ölçümü konfokal mikroskobu görüntüsü. Konfokal mikroskobu kullanılarak verilen gruplarda mitokondri membran potansiyeli ölçülmüştür. Figürde de görüldüğü üzere FCCP verilmeden önce J-agregatlarının birikimine bağlı olarak kırmızı floresanın yoğunlukta olduğu görülmektedir. FCCP verildikten sonra ise hücrelerde biriken JC-1 boyası dışarı çıkar ve yeşil floresan artışı görülür (Ölçek boyutu 50 µm'dir.).



Şekil 3. 13: Mitokondri Membran Potansiyeli Konfokal Mikroskobu Görüntüsü. Sırasıyla A; Kontrol H9c2'ler, B; ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler, C; İnsülin direnci geliştirilmiş H9c2'ler ve D; İnsülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde mitokondri membran potansiyeli ölçümü konfokal mikroskobu görüntüsü. (Ölçek boyutu 50 μm'dir.).

Şekil 3.14'te tüm gruplarda ölçülen MMP değerleri bar grafik olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda insülin direncinin daha önceki sonuçlara benzer olarak MMP'nin depolarizasyonuna neden olduğu bulunmuştur. ZnT6 ve ZnT7 ifadesinin artırılması da aynı şekilde MMP'nin depolarizasyonuna katkıda bulunmuştur. ZnT6 ve ZnT7 ifadesi artırılan H9c2 hücre hatlarının PA ile inkübasyonu ise MMP'de daha fazla bir değişime neden olmamıştır.

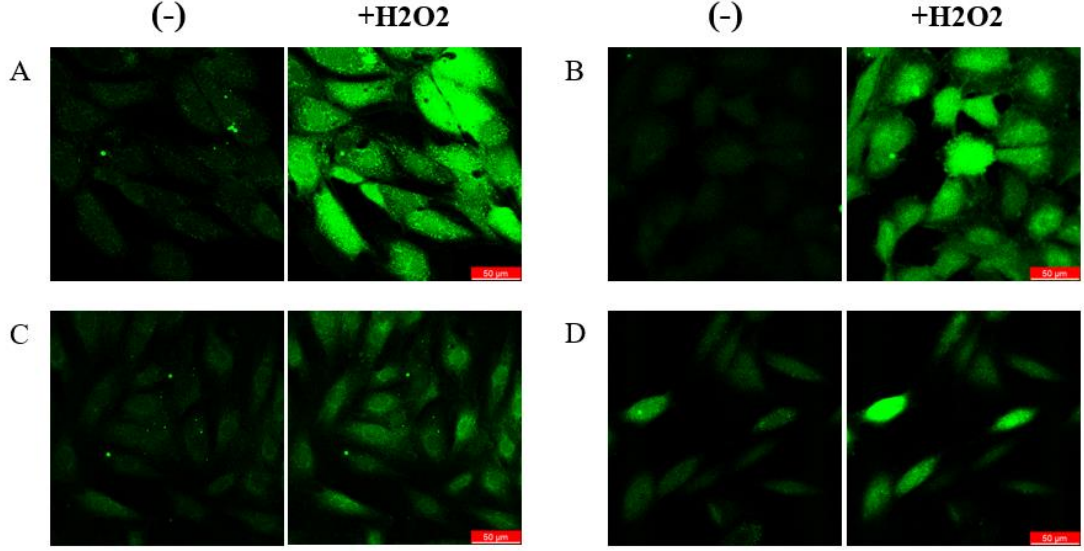


Şekil 3. 14: Mitokondri Membran Potansiyeli Ölçümü Sonuçları. A; Kontrol hücreleri ve insülin direnci oluşturulmuş H9c2'lerde , ZnT7 gen ifadesi artırılmış H9c2'ler ile insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış H9c2 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ölçümü, B; Kontrol hücreleri ve insülin direnci oluşturulmuş H9c2'lerde, ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ile insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde mitokondri membran potansiyeli ölçümü. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p < 0.05$ Kontrolle göre, # $p < 0.05$ PA'ya göre)

3.3.3. İnsülin Dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 Gen İfadesi Artırılmış Hücrelerde ROS Değerleri

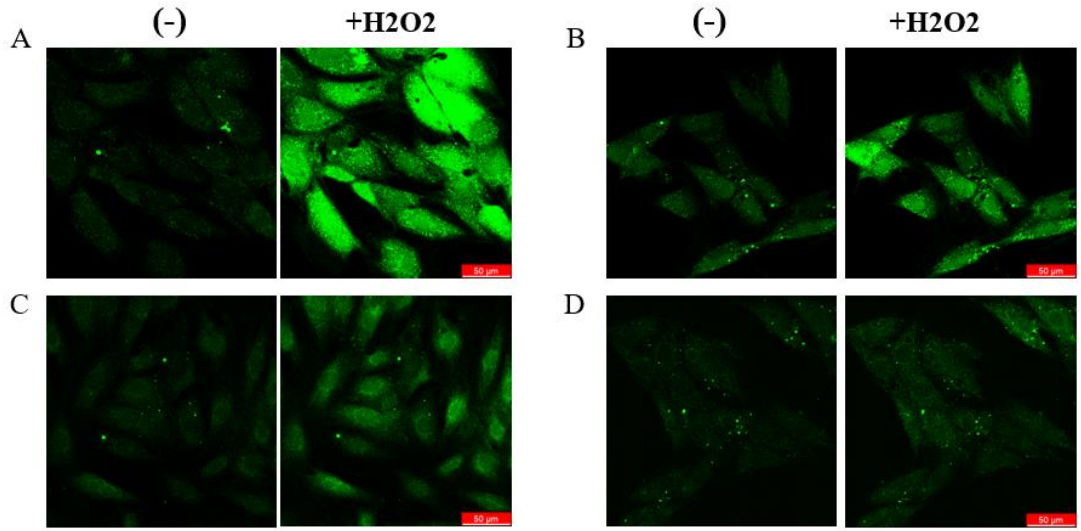
Kontrol hücrelerinde, insülin direnci oluşturulan hücrelerde, ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve bu hücrelerde insülin direnci oluşturulduğunda reaktif oksijen miktarının nasıl değiştiği incelenmiştir. Şekil 3.15A'da kontrol hücrelerinde ve C'de insülin dirençli hücrelerde reaktif oksijen miktarı ölçülmüştür. Tüm gruptaki ROS miktarları konfokal mikroskop kullanılarak kaydedilmiştir. Kalibrasyon amacıyla hücreler H_2O_2 ile inkübe edilerek maksimum floresan değerleri ölçülmüştür. Şekilde de görüldüğü üzere H_2O_2 verildiğinde kontrol hücrelerinde floresan miktarındaki artış ile insülin dirençli hücrelerdeki floresan miktarındaki artış arasında önemli bir fark görülmektedir. Şekil 3.15B'de ZnT6 gen ifadesi artırılmış

hücrelerde ve D’de insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde reaktif oksijen seviyesi ölçümü yapılmıştır ve konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir.



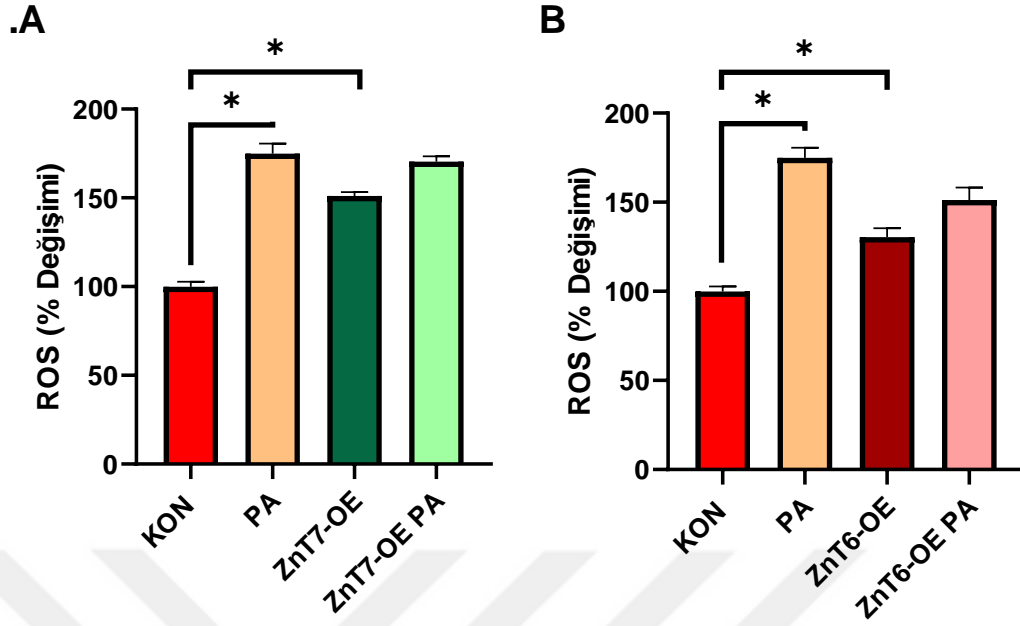
Şekil 3. 15: H9c2 hücre hatlarında reaktif oksijen miktarı (ROS) ölçümü. A: Kontrol, B: ZnT6 gen ifadesi artırılmış, C: İnsülin direnci oluşturulmuş, D: ZnT6 gen ifadesi artırılmış insülin dirençli, H9c2 hücrelerinde ROS ölçümü için kaydedilen örnek konfokal mikroskop görüntüsü. (Ölçek boyutu 50 µm)

Şekil 3.16A’da kontrol hücrelerinde ve C’de insülin dirençli hücrelerde reaktif oksijen miktarı ölçülmüştür, konfokal mikroskobu ile gözlenmiştir ve H₂O₂ verilmeden önceki (soldaki) ve verildikten sonraki (sağdaki) şekiller kaydedilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere H₂O₂ verildiğinde kontrol hücrelerinde floresan miktarındaki artış ile insülin dirençli hücrelerdeki floresan miktarındaki artış arasında anlamlı derecede bir fark görülmektedir. Şekil 3.16B’de ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve D’de insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde reaktif oksijen seviyesi ölçümü yapılmıştır ve konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir. İnsülin dirençli gruplarda ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H₂O₂’ye verilmiş yanıtın azaldığı şekil incelenerek gözlemlenebilmektedir.



Şekil 3. 16: H9c2 hücre hatlarında reaktif oksijen miktarı (ROS) ölçümü. A: Kontrol, B: ZnT7 gen ifadesi artırılmış, C: İnsülin direnci oluşturulmuş, D: ZnT7 gen ifadesi artırılmış insülin dirençli, H9c2 hücrelerinde ROS ölçümü için kaydedilen örnek konfokal mikroskop görüntüsü. (Ölçek boyutu 50 µm)

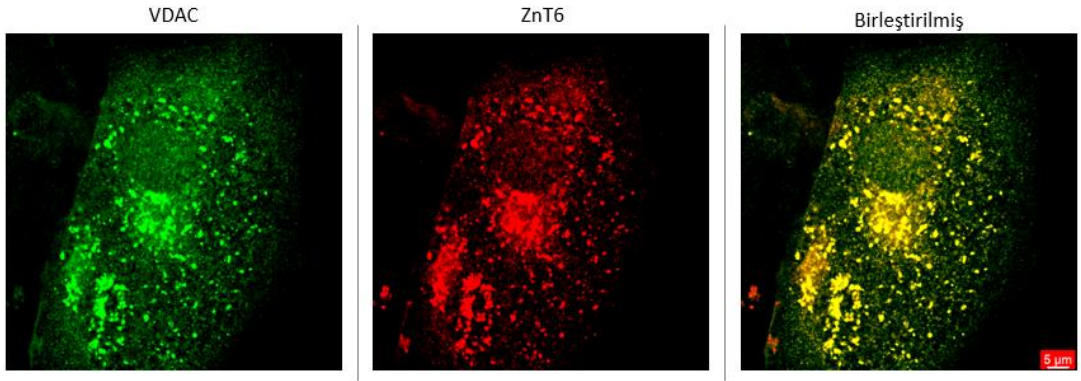
Şekil 3.17’de ROS miktarının ölçümünün analizi gösterilmiştir. Şekil 3.17A’da gösterildiği üzere insülin dirençli hücrelerde kontrol hücrelerine göre toplam ROS miktarı anlamlı şekilde artmıştır. ZnT7 gen ifadesinin artırıldığı hücrelerde ve insülin direnci oluşturulmuş ZnT7 hücrelerinde gözlenen ROS miktarı, kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır. Şekil 3.17B’de ise ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ROS miktarının kontrole göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür.



Şekil 3. 17: Reaktif Oksijen Miktarı (ROS) Ölçümü Sonuçları. A: Kontrol ve insülin dirençli hücrelerde, ZnT7 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci artırılmış ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde reaktif oksijen miktarı ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. B: Kontrol ve insülin dirençli hücrelerde, ZnT6 gen ifadesi artırılmış ve insülin direnci artırılmış ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde reaktif oksijen miktarı ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Grafiklerdeki değerler ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* p <0.05 Kontrolle göre)

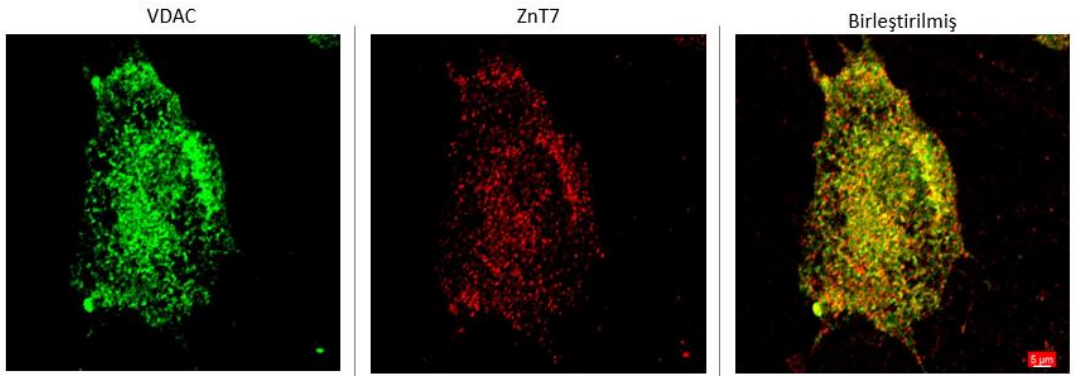
3.4.ZnT6 ve ZnT7 Proteinlerinin Mitokondride Lokalizasyonunun Gösterilmesi

Kontrol (H9c2) hücrelerinde ZnT6 ve ZnT7 çinko taşıyıcı proteinlerinin mitokondrideki lokalizasyonlarına bakılmıştır. Şekil 3.22’de bir mitokondri markeri olan VDAC ve ZnT6 primer antikolar ile ve daha sonra VDAC ve ZnT6 için sırasıyla AlexaFlour488 (yeşil) ve AlexaFlour555 (kırmızı) sekonder antikolar ile inkübe edilerek ZnT6’nin mitokondri üzerindeki lokalizasyonuna bakılmıştır. Birleştirilmiş fotoğrafta ikisinin aynı yerde lokalize olduğunu sarı renk oluşumundan görebilmekteyiz.



Şekil 3. 18: ZnT6'nın mitokondri üzerindeki lokalizasyonu. A: Kontrol hücrelerinde ZnT6 çinko taşıyıcı proteinlerin mitokondride lokalizasyonu, yeşil renk mitokondriyi, kırmızı renk ZnT6'yı ifade etmektedir. (Ölçek boyutu 5 µm)

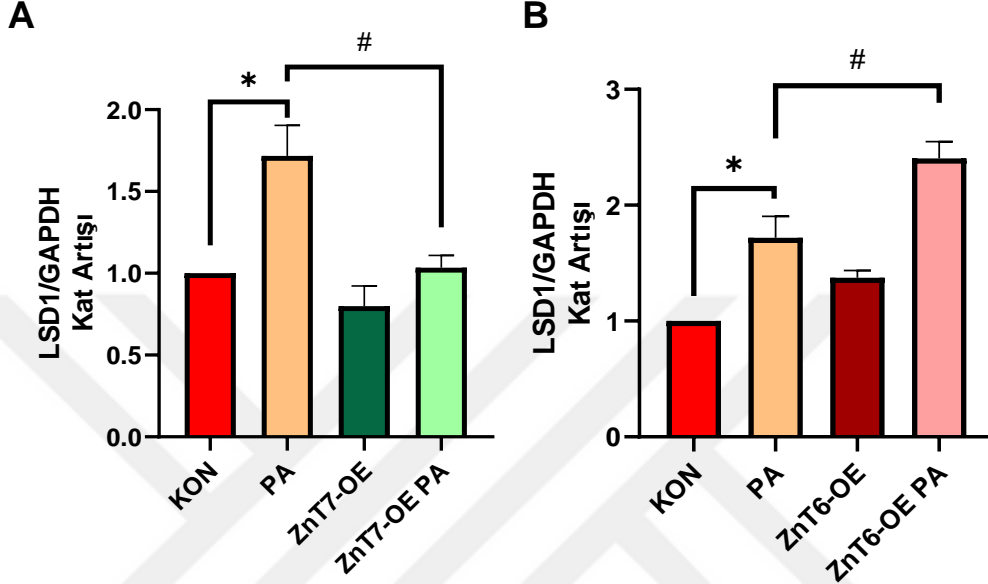
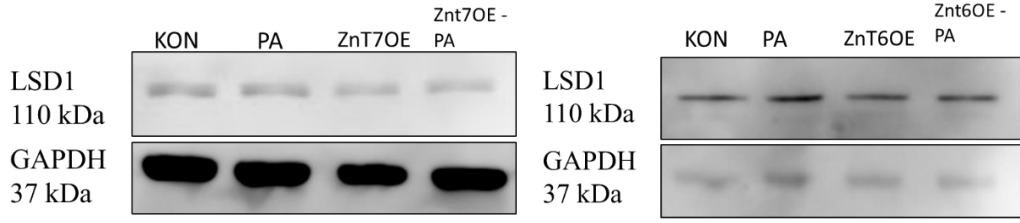
Şekil 3.23'te bir mitokondri markeri olan VDAC ve ZnT7 primer antikorlar ile ve daha sonra VDAC ve ZnT6 için sırasıyla AlexaFlour488 (yeşil) ve AlexaFlour555 (kırmızı) sekonder antikorlar ile inkübe edilerek ZnT7'nin mitokondri üzerindeki lokalizasyonuna bakılmıştır. Birleştirilmiş fotoğrafta ikisinin aynı yerde lokalize olduğunu sarı renk oluşumundan görebilmekteyiz.



Şekil 3. 19: ZnT7'nin mitokondri üzerindeki lokalizasyonu. Kontrol hücrelerinde ZnT7 çinko taşıyıcı proteinlerin mitokondride lokalizasyonu, yeşil renk mitokondriyi, kırmızı renk ZnT7'yı ifade etmektedir. (Ölçek boyutu 5 µm)

3.5.İnsülin Direnci Durumunda ve Gen ifadesi Artırılmış Hücrelerde Epigenetik Proteinlerin Değişimi

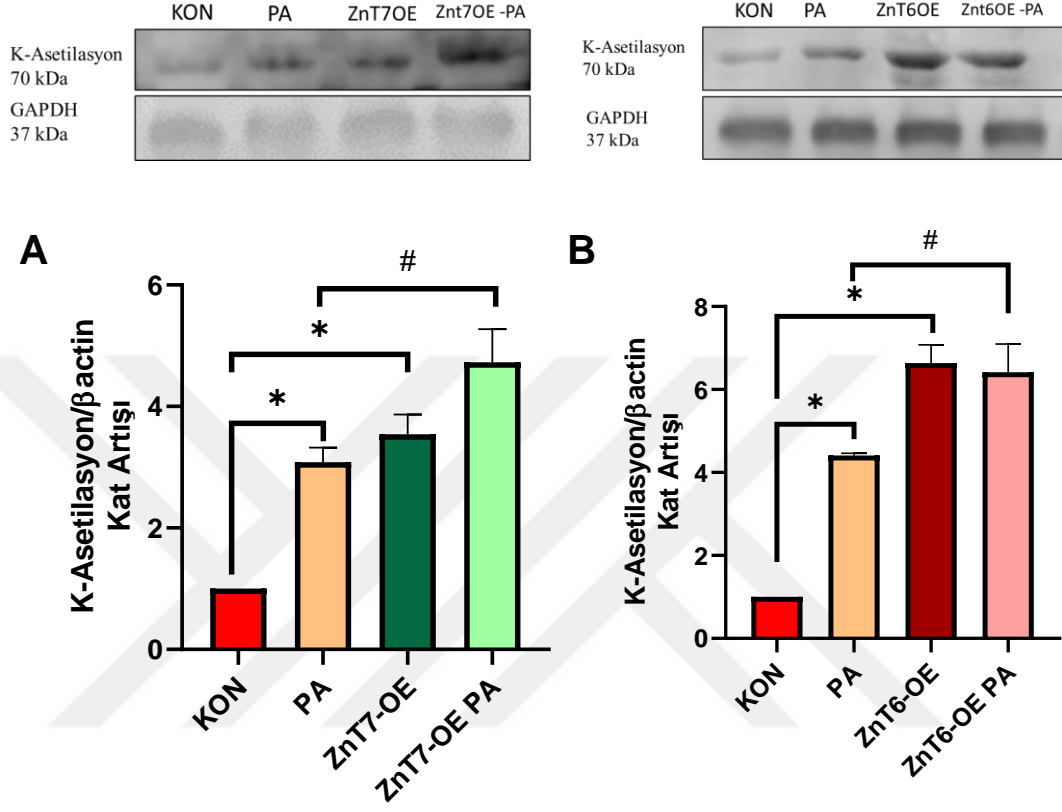
Önemli bir histon demetilaz enzimi olan LSD1 proteininin kontrol, insülin direnci ve ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve insülin dirençli ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde nasıl düzenlendiği gözlemlenmiştir. Şekil 3.18’de de görüldüğü gibi LSD1 proteininin insülin direnci durumunda arttığı görülmüştür (*p<0,05). A’da ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde kontrol hücrelerine göre LSD1 proteininde anlamlı bir değişiklik görülmezken, insülin dirençli hücreler ile insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir (#p<005). B’de ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde kontrol hücrelerine göre LSD1 proteininde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. İnsülin dirençli hücreler ile insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında anlamlı bir değişim gözlemlenmiştir (#p<0,05).



Şekil 3. 20: LSD1 Proteininin Western Blot Sonucu. A’da Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde LSD1 protein seviyesi gösterilmektedir. B’de Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde LSD1 protein seviyesi gösterilmektedir. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p < 0.05$ Kontrolle göre, # $p < 0.05$ PA’ya göre)

Kontrol, insülin direnci ve ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve insülin dirençli ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde lizin asetilasyonunun nasıl düzenlendiği gözlemlenmiştir. Şekil 3.19. A’da insülin dirençli ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış durumlarda kontrole göre lizin asetilasyonunun anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir(* $p < 0.05$). İnsülin dirençli hücreler ile insülin direnci geliştirilmiş ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında da anlamlı bir fark görülmektedir (# $p < 0,05$). B’de insülin dirençli ve ZnT6 gen ifadesi artırılmış durumlarda kontrole göre lizin asetilasyonunun anlamlı bir artış gözlemlenmiştir(* $p < 0,05$). İnsülin dirençli

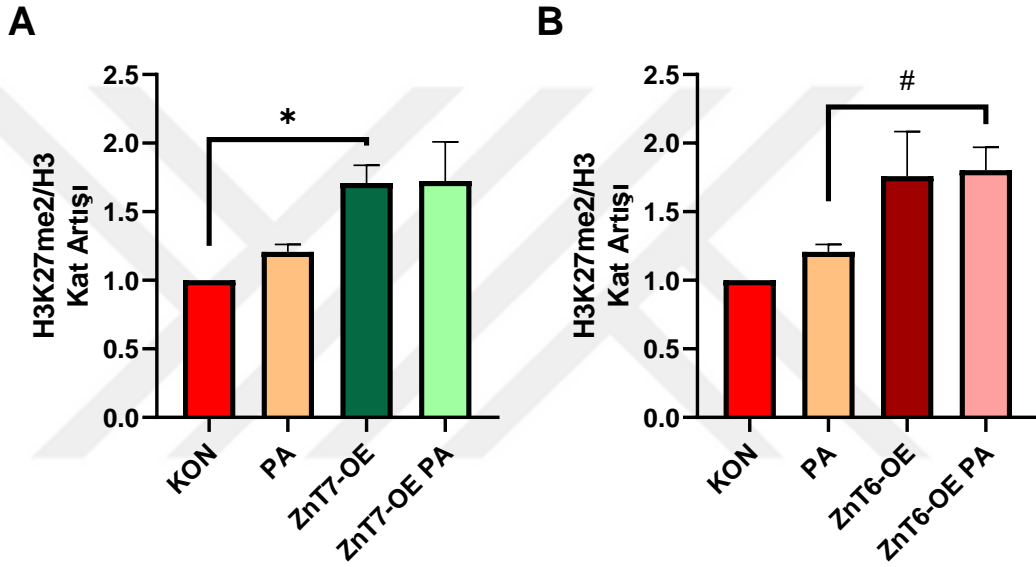
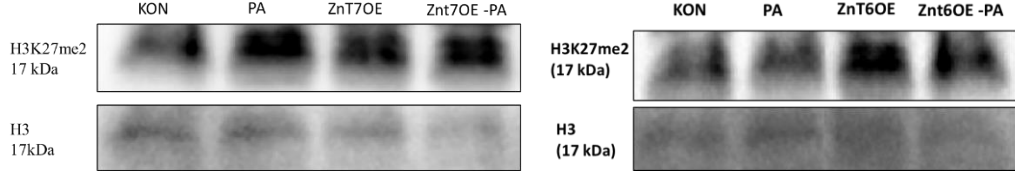
hücreler ile insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında da anlamlı bir fark gösterilmektedir([#]p<0.05).



Şekil 3. 21: K-Asetilasyon Proteininin Western Blot Sonucu. A’da Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde K-Asetilasyon protein seviyesi gösterilmektedir. B’de Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde K-Asetilasyon protein seviyesi gösterilmektedir. Grafiklerdeki çubuklar ortalama ±SEM verilerini göstermektedir. (*p<0.05 Kontrole göre, # p<0.05 PA’ya göre)

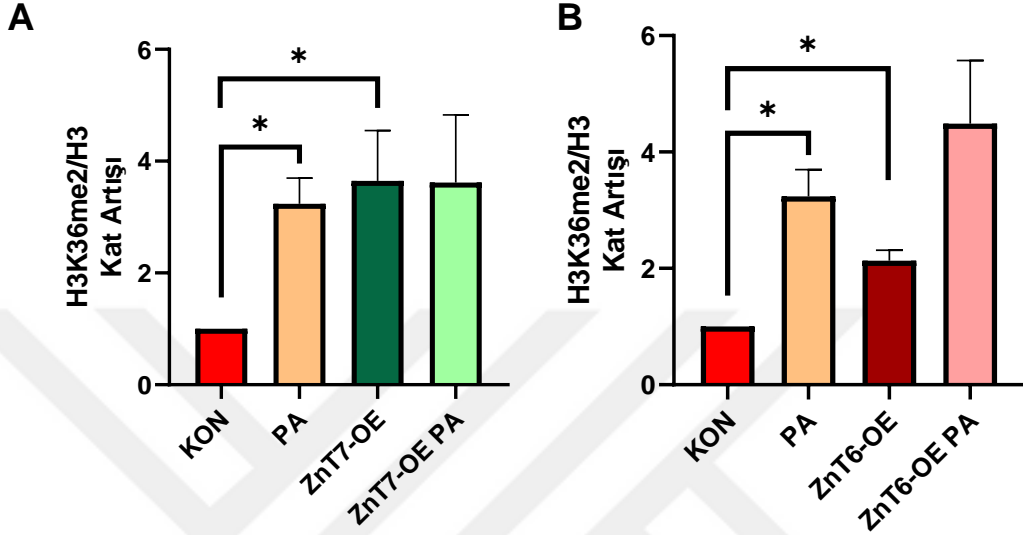
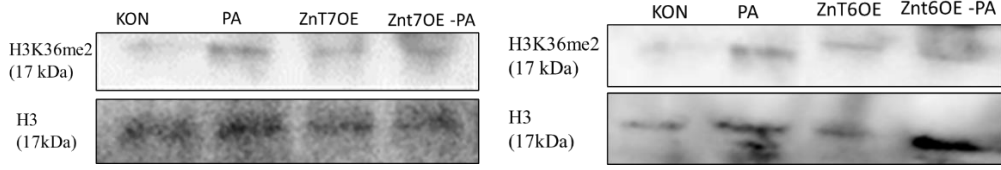
Kontrol, insülin direnci ve ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve insülin dirençli ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H3K27me2 nasıl düzenlendiği gözlemlenmiştir. Şekil 3.20. A’da ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde kontrole göre H3K27me2’nin anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. B’de insülin dirençli hücrelerde ve ZnT6 gen ifadesi artırılmış durumlarda kontrole göre H3K27me2’nin anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. İnsülin dirençli hücreler ile

insülin direnci geliştirilmiş ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler arasında anlamlı bir fark gösterilmektedir ($\#p<0,05$).



Şekil 3. 22: H3K27me2 Proteininin Western Blot Sonucu. A'da Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H3K27me2 protein seviyesi gösterilmektedir. B'de Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H3K27me2 protein seviyesi gösterilmektedir. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p<0.05$ Kontrolle göre, # $p<0.05$ PA'ya göre)

Kontrol, insülin direnci ve ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde ve insülin dirençli ZnT6, ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H3K36me2 nasıl düzenlendiği gözlemlenmiştir. Şekil 3.21. A'da insülin dirençli hücrelerde ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde kontrole göre H3K36me2'nin anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. B'de insülin dirençli ve ZnT6 gen ifadesi artırılmış durumlarda kontrole göre H3K36me2'de anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. (* $p<0.05$)



Şekil 3. 23: H3K36me2 Proteininin Western Blot Sonucu. A'da Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H3K36me2 protein seviyesi gösterilmektedir. B'de Kontrol ve insülin dirençli hücreler ile ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücreler ve insülin dirençli ZnT6 gen ifadesi artırılmış hücrelerde H3K36me2 protein seviyesi gösterilmektedir. Grafiklerdeki çubuklar ortalama \pm SEM verilerini göstermektedir. (* $p < 0.05$ Kontrolle göre)

4. TARTIŞMA

İnsülin direnci, hücrelerin insüline karşı yanıt oluşturamaması ile karakterize, hücre fizyolojisinin ve böylece birden çok organ sisteminde fonksiyonel değişikliklere/bozulmalara neden olan biyolojik bir bozulma olarak bilinmektedir. Uzun süreli gözlenen insülin direncinin çeşitli metabolik bozulmalarla ilişkili hastalıklar yanında kardiyovasküler hastalıklara da neden olduğu bildirilmiştir (Altunoğlu, 2012; Patel ve ark., 2016). Bu çalışmada kullanılan, 24 saatlik palmitik asit inkübasyonunun hücrelerde insülin direnci modeli oluşturmak için kullanılan bir metot olduğu bilinmektedir (Kim ve ark., 2017; Okatan ve ark., 2019). Bu nedenle 24 saatlik süreçte en uygun belirlenen konsantrasyonlarda hücrelere verilerek glikoz alımının azaltılması sağlanabilmiş ve buna bağlı olarak devam eden deneylerde 50 µM konsantrasyondaki hücreler ile devam edilmiştir.

Kardiyomiyositlerde Zn^{+2} 'nin, yapısal ve düzenleyici roller üstlenen önemli bir iyon olduğu ve epigenetik enzimlerin de kofaktörü olduğu için genlerin ifade edilmesinde transkripsiyonel aktivasyonu etkilediği bilinmektedir (Hook ve ark., 2002; Smith ve Denu, 2009). Fizyolojik olarak sıkıca korunan çinko homeostazının, diyabet ve yaşlılık gibi modellerde korunamadığı, bu bağlamda hücre içi aktivitelerde ve hücrenin fizyolojisinde sorunlar olduğu görülmüştür. Uzun süreli çinko homeostazındaki dengesizliğin ciddi patolojik etkilere neden olduğu bilinmektedir (Olgar ve ark., 2019; Tuncay ve ark., 2017). Bu durumda hücrelerdeki çinko homeostazını korumakla görevli, normal şartlar altında hücrenin sitoplazmasındaki Zn^{+2} iyonunu azalttığı bilinen ZnT ailesinden ZnT6 ve ZnT7 çinko taşıyıcı proteinleri gen ifade durumları insülin dirençli ve kontrol hücrelerinde incelenmiştir. ZnT6 çinko taşıyıcı proteini ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilgili literatür taramaları incelendiğinde bir bulgu bulunamadığı gözlemlenmiştir ancak tip 2 diyabetli hastalarda ZnT6 geni (Slc30a6) ifadesinde transkripsiyonel açıdan bir azalma olduğu incelenen mRNA sonuçlarında gözlemlenmiştir (Huang ve ark., 2002;

Kambe ve ark., 2004). Benzer bir sonucu gördüğümüz bu çalışmada ZnT6'nın insülin direnci oluşturulmuş hücrelerde mRNA seviyesinin azaldığı gözlemlenmiştir ancak protein seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir. 24 saat palmitik asit ile inkübasyon gerçekleştirilerek oluşturulan insülin direncinin, inkübasyon süresi artırıldığı takdirde ZnT6 protein seviyesinde bir değişim gözlenip gözlenemeyeceği tartışmaya açıktır ve ilerideki çalışmalar için önem arz etmektedir. Bu çalışmada kullanılan bir diğer ZnT ailesinden olan ZnT7 çinko taşıyıcı proteini hakkında yapılan çalışmalarda ZnT7 proteininin hiperglisemi, diyabet, metabolik sendromu durumlarında hücre içi lokalizasyonlarının değiştiği, hücre içi $[Zn^{+2}]_i$ düzenlemesi ile mitokondri fonksiyonlarının da düzenlenmesinde görevli olduğu gözlemlenmiştir(Olgar ve ark., 2018; Tuncay ve ark., 2019; Tuncay ve ark., 2017). Bu çalışmada, insülin direnci modelinde kontrol hücrelerine göre, ZnT7 mRNA ve protein seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. İnsülin direnci durumunda, kontrol hücrelerine göre, ZnT7 ve ZnT6 gen ifadesinin birbirinden farklı olması, hücrenin hücre içi Zn^{+2} düzenlenmesinin değiştiğini düşündürmüştür.

Kardiyomiyositlerde $[Zn^{+2}]_i$ artışının; hücre içerisindeki ROS dengesini bozduğu, hücrelerde aksiyon potansiyelindeki repolarizasyon süresini artırdığı, Ca^{+2} salınımını etkilediği ve böylece hem mekanik hem de elektriksel aktiviteleri olumsuz etkilediği, papiller kas analizlerinde ise $[Zn^{+2}]_i$ artışının yine aksiyon potansiyelinde repolarizasyon süresini artırdığı ve kasılmayı azalttığı bilinmektedir(Degirmenci ve ark., 2018; Tuncay ve Turan, 2016; Turan ve ark., 1997). İnsülin direnci oluşturulmuş hücrelerde, $[Zn^{+2}]_i$ artışı açıkça gözlemlenmiştir. Bu bağlamda yine alınan sonuçlarda, insülin direnci oluşturulmuş hücrelerde kontrol hücrelerine göre, ROS miktarında ve mitokondri membran potansiyeli depolarizasyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. İncelenen ZnT6 ve ZnT7 gen ifadeleri artırılarak, insülin direnci ve kontrol durumlarında hücre içi Zn^{+2} durumu incelenmek istenmiştir. Alınan bulgulara göre, insülin dirençli hücrelerde ZnT7 gen ifadesi artırılması durumu $[Zn^{+2}]_i$ 'nin, kontrole göre anlamlı değişmemesini sağlamıştır. Bu açıdan ZnT7 gen ifadesinin artırılmasının, hücre içi Zn^{+2} kontrolünde önemli olabileceğini düşündürmüştür. ZnT6

gen ifadesinin artışı ise insülin direnci durumunda $[Zn^{+2}]_i$ durumunun düzenlenmesinde çok katkıda bulunamamıştır. Bu durumda ZnT7'nin hücre içi bazı metabolik mekanizmalarda, ZnT6'dan farklı görevi olduğu düşünülmüştür. Literatürde metallothioneinlerin bir çinko şelatörü olduğu bilinmektedir ve diyabet hayvanlarda metallothioneinlerin miktarının azaldığı gözlemlenmiştir (Ayaz ve Turan, 2006). Bu durum insülin direnci durumunda da metallothionein miktarının değişiklik gösterip göstermediğini düşündürmüştür. Bu bağlamda ZnT7 gen ifadesinin artırılmasının metallothionein miktarı üzerinde etkili olup olmadığı tartışma konusudur ve araştırılmaya ihtiyaç duymaktadır.

Mitokondri organeli, hücreler içerisinde özellikle oksijen kullanımına bağlı olarak enerji üretimini sağlayan önemli bir organeldir. Hücre içerisinde bulunan mitokondri organel miktarı hücrenin enerjiye duyduğu ihtiyaca göre değişmektedir (Zorova ve ark., 2018). Hücre homeostazının korunmasında hücre içi ATP seviyelerinin ve mitokondri membran potansiyelinin korunduğu bilinmektedir (Makrecka-Kuka ve ark., 2020; Zorova ve ark., 2018). Bu iki parametrenin bozulmasına neden olabilecek faktörlerin uzun süreli görüldüğü fizyolojik aktivite bozuklukları, hücrelerin yaşamını tehdit eder (Sivandzade ve ark., 2019; Zorova ve ark., 2018). Hücre zarında ve mitokondride zar potansiyellerinin yönünün katyonların iç kısma, anyonların ise dış kısma taşınması şeklinde gerçekleştiği görülür. Mitokondri organellerinde bu durum, metal katyonların iç kısımda birikmesine izin verecektir. Mitokondri membran potansiyeli mitokondride oksidatif solunumun ve bu bağlamda ATP üretiminin tetikleyicisidir. Mitokondrinin iç membranında gerçekleşebilecek iyon sızıntıları, mitokondri membran potansiyelinin devamlılığını ve sağlıklı davranışını bozabilir. Bozulan mitokondriyal membran potansiyeli nedeniyle reaktif oksijen türlerinin salınımı da artacaktır. Hücre içi homeostazda görülen bozulmalar mitokondri elektrokimyasal gradyanının bozulmasına, zarlarda gözenekler açılmasına neden olabilir ve bu nedenle mitokondri membran potansiyeli değişebilir (Makrecka-Kuka ve ark., 2020; Sivandzade ve ark., 2019). Kalp hücrelerinde değişen metabolik fonksiyonların sonucu olarak

mitokondriyal disfonksiyon sıklıkla görülen bir komplikasyondur. Mitokondride görülen füzyon ve fisyon dinamiklerinin yapısal değişikliklere neden olduğu ve füzyon/fisyon dinamiğindeki sorunun bozulmuş mitofaji ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Mitokondriyal dinamiklerin kontrolünü sağlayan proteinler çalışmadığında yüksek reaktif oksijen üretildiği de görülmüştür(Sivandzade ve ark., 2019; Zorova ve ark., 2018). Hücrelerin insülin dirençli durumda enerji ihtiyacının bir kısmını yağ asitlerini kullanarak karşılama isteği kardiyomiyositlerde mitokondrinin depolarize olmasına neden olur ve ara ürün birikimine ve buna bağlı olarak lipotoksisite oluşumuna neden olmaktadır(Makrecka-Kuka ve ark., 2020). Şekillerden anlaşılacağı üzere insülin direnci oluşturulmuş hücrelerde mitokondrinin membran potansiyeli JC-1 boyası ile incelenmiş ve sonucunda insülin direnci geliştirilmiş hücrelerdeki mitokondri membranının depolarize olduğu, potansiyelinin bozulduğu görülmektedir. Bu durum insülin direnci durumunda hücrenin enerji metabolizmasının etkilendiğinin kanıtıdır. Hücrelerdeki metabolik esneklik değiştiğinde, mitokondri aktivitesinde düşme gözlenmektedir. Hücre bu durumda metabolik süreçleri doğru şekilde yerine getirememektedir. Mitokondri membranında görülen bu depolarizasyon mitokondrinin sağlıksızlığına işaret etmektedir. Mitokondri hücrenin enerji metabolizmasını önemli ölçüde etkileyen organeldir(Sivandzade ve ark., 2019). Yüksek yağ asidi içeren bölgede yüksek yağ asitlerinin hücrenin substratı haline dönüşeceğinden ve fazlasının zararlı olması itibarıyla mitokondri membran potansiyeline zarar verdiği görülmüş(Gremmels ve ark., 2015) ve yorumlanmıştır. Aynı zamanda, insülin dirençli durumda artan hücre içi $[Zn^{+2}]$ seviyesi ile mitokondri membranında görülen depolarizasyon, çinko taşıyıcı proteinlerin hücre içi Zn^{+2} 'nu mitokondriye taşıdığını düşündürmektedir. Mitokondrinin sağlıksız oluşu ile hücredeki oksijenli solunum ve enerji üretimi olumsuz etkilenerek reaktif ürünlerin seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Reaktif ürünlerin birikimi hücrelerdeki lipit yapıda membranlara ve organellere zarar verebilmektedir(Karabulut ve Gülay, 2016; Yang ve Lian, 2020). İnsülin direnci durumunda da Zn^{+2} 'larının mitokondriye taşındığı düşünülmektedir. ZnT6 ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde de mitokondri membran potansiyeli depolarizasyonu ve reaktif oksijen miktarında artış

gözlemlenmiştir ve bu bağlamda ZnT6 ve ZnT7 çinko taşıyıcı proteinlerinin mitokondride lokalize olduğu düşünülmüştür. İmmünofloresan yöntemi ile ZnT6 ve ZnT7 proteinlerinin mitokondride yerleşim gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu sonuç hücre içindeki Zn⁺² dağılımı konusunda fikir sahibi olmamızı sağlamıştır. ZnT6 ve ZnT7 proteinlerinin mitokondride lokalize olması hücrelerdeki Zn⁺²'lerini mitokondriye taşıyarak, reaktif oksijen miktarını artıracak ve hücre içi mekanizmalarda bozulmalara neden olacaktır.

Epigenetik değişimlerin anlaşılması, uzun süreli yaşanan metabolik rahatsızlıkların etkisini biyolojik olarak açıklamayı sağlayabilecektir(Egger ve ark., 2004). Bununla birlikte, memeli hücrelerinde, özellikle kardiyomiyositlerde bu çinko taşıyıcılarının fizyolojik olarak önemi, ileri çalışmalara gerek duymaktadır. Bu çalışmada kullanılan LSD1 proteininin, bir histon demetilaz olarak görev aldığı ve hücrenin gelişim sürecinde önemli rol aldığı, hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu ancak fazla ifade edilmesinin kontrolsüz hücre bölünmelerine ve çoklu gen bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir(Lim ve ark., 2010; Pilotto ve ark., 2016; Wang ve ark., 2022). LSD1'in, gen ifadesini değiştirmek, hormonların düzenlenmesi gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bununla beraber son çalışmalarda LSD1'in hücrelerde mitokondriyal biyogenezde, lipid ve glikoz metabolizmasında etkili olduğu, bunların yanında oksidatif hasara neden olabilecek H₂O₂ üretimine katkı sağlayan bazı enzimlerin oluşumunu tetiklediği görülmüştür(Hu ve ark., 2008; Reddy ve ark., 2008; Wang ve ark., 2022). Literatür araştırmalarında LSD1'in adiposit enerji metabolizmasını etkilediği, mitokondri metabolizma genlerinin ifadesinin baskılanmasına neden olduğu böylece yağ birikimini ve obeziteyi artırdığı gözlemlenmiştir(Hino ve ark., 2012). Bu çalışmada LSD1 miktarının insülin direnci durumunda, ZnT6 ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış durumlarda incelenmiştir. Bulgulara göre, insülin direnci durumunda LSD1 miktarı artış göstermektedir. Bu durum insülin direnci gözlemlendiğinde oluşabilecek mitokondri metabolizması gen ifadesi değişimlerinde ve metabolik düzenlemede LSD1'in de rolü olduğunu düşündürmektedir ve araştırılmaya ihtiyaç duymaktadır. Aynı zamanda insülin direnci

modelinde, ZnT7 gen ifadesinin artışının LSD1 miktarının artışını engellediği de gözlemlenmiştir. ZnT6 gen ifadesinin artışı ile ise LSD1 miktarının birbiri ile ilişkili olmadığı düşünülmüştür. Bu durum hücre içi serbest $[Zn^{+2}]$ i ölçümü sonucu ile korelasyon göstermekte ve LSD1 sonuçlarının hücre içi serbest $[Zn^{+2}]$ i ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Normal şartlar altında korunan lizin asetilasyon mekanizmasının bozulması durumu birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Diyabet ve yaşlanma durumlarında lizin asetilasyonu artışı mitokondri membranını depolarize eden ve reaktif oksijeni artıran bir etkiye neden olmaktadır(Aka ve ark., 2011; Olgar ve ark., 2019). Aynı zamanda kanser ve çoklu gen bozuklukları durumunda lizin asetilasyonunun arttığı gözlemlenmiştir(Fullgrabe ve ark., 2011). İnsülin direnci durumunda lizin asetilasyonunun artış durumu ile reaktif oksijen miktarında ve mitokondri membran potansiyeli depolarizasyonunda artış gözlemlenmiş ve bu durum lizin asetilasyonunun özellikle mitokondri ile ilişkili mekanizmaları etkilediğini düşündürmüştür. ZnT6 ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerdeki lizin asetilasyon artışının insülin direnci durumu ile bağlantısı olmadığı düşünülmüştür.

Literatürde, H3K36me2 artışının, diyabet gelişiminde etkisi olduğu, glukoneogenezin düzenlenmesinde rol alan genlerin promotor bölgesinde görev aldığı ve diyabetik nefropatide arttığı gözlemlenmiştir(Kumar ve ark., 2016; Nie ve ark., 2017; Sharma ve ark., 2020). Sonuçlara göre insülin dirençli ve ZnT6 ve ZnT7 gen ifadeleri artırılmış hücrelerde H3K36 metilasyonlarında artış görülmüştür. İnsülin direnci durumunda H3K36me2'nin artışı ile glukoz metabolizmasının bozulması arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Bu durumun hücre içi Zn^{+2} ile ilişkisi merak edilmiş ve ZnT6 ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerde, insülin dirençli hücrelerdeki H3K36me2 protein seviyesinden farkı olmadığı görülmüştür. İnsülin direnci durumu ile ZnT6 ve ZnT7 gen ifadesi artırılmış hücrelerdeki H3K36 dimetilasyonun birbiri ile bağlantısı olmadığı düşünülmüştür. H3K27

metilasyonlarının DNA üzerindeki bazı bölgelerin transkripsiyonel okunmasını azaltarak bu bölgelerdeki transkripsiyonel aktiviteyi koruduğu bilinmektedir(Aka ve ark., 2011; Li ve ark., 2012; Wiles ve Selker, 2017). Sonuçlara bakıldığında insülin dirençli hücrelerde H3K27 dimetilasyonunda fark görülmemektedir. H3K27 dimetilasyonunun ZnT6 ve ZnT7 proteinleri ve insülin direnci durumu ile bağlantılı olmadığı düşünülmüştür. Uzun süreli görülebilecek insülin direnci durumundaki H3K27me2 durumu araştırılmaya ihtiyaç duymaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsülin direnci durumunun birçok hastalığın öncüsü olarak kabul edildiği, uzun süreli yaşanması durumunda kardiyovasküler sistem de dahil olmak üzere birçok organ sistemlerinin işleyişini bozduğu bilinmektedir. Bu bağlamda hücre içerisinde görülen değişimlerin incelenmesi, insülin direnci durumunda görülen mekanizmaların tespiti amacıyla önem arz etmektedir. Hücrelerde $[Zn^{+2}]$ homeostazının korunması durumunda çinko elementi hücreler için faydalı ve zorunlu bir faktördür ve hücrenin yapısal, fonksiyonel, gelişimsel kaderinde rol oynamaktadır. Hücre içi $[Zn^{+2}]$ 'nin metabolik rahatsızlıklarda arttığı daha önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir. Hücrelerde $[Zn^{+2}]$ 'i artışı ve sonuçları, hücrelerin yaşam fonksiyonları açısından önemlidir. Yine önceki çalışmalarda kardiyomyositlerde ölçülen $[Zn^{+2}]$ 'i miktarının artışı, hücrelerin mekanik ve elektriksel aktivitesini bozduğu görülmüştür. Hücre içi çinko artışını sağlayarak bazı metabolik yolları da aktive eden bazı çinko taşıyıcıları RNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir.

Bu çalışmada, insülin direnci oluşturulmuş hücrelerde ZnT6 ve ZnT7 $[Zn^{+2}]$ düzenleyici taşıyıcıların lokalizasyonu ve etkisi incelenmiştir. Son çalışmalar, insülin direncini ve çinko taşıyıcılarını epigenetik olarak araştırılmaya değer kılmaktadır. Hücre içi $[Zn^{+2}]$ 'i 'nun çinkoyu kofaktör olarak kullanan epigenetik düzenleyicilerin kullanımını açısından önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tüm genomdaki histon metilasyonları ve histon enzimleri incelenmiştir. İlerideki çalışmalarda; hücre içi $[Zn^{+2}]$ 'i, insülin direnci ve epigenetik unsurların birbiri ile ilişkilendirilmesi için daha fazla araştırma yapılabilir, bu çalışmada toplam ölçülen epigenetik düzenleyici proteinlerin söz konusu çinko taşıyıcı proteinler ile kromatinimmünopresipitasyonu tekniği kullanılarak direkt ilişkilendirilmesi yapılabilir. Yine hücre içi $[Zn^{+2}]$ dağılımını görmek amacıyla organel düzeyinde fraksiyonlama yöntemi kullanılarak insülin direnci ve normal koşullarda hücre içi Zn^{+2} 'lerinin dağılımı incelenebilir.

ÖZET

İnsülin Direnci Geliştirilmiş H9c2 Hücre Hatlarında Epigenetik Değişimlerin Çinko Transporterları Üzerindeki Rolü

Uzun yıllardır kardiyovasküler hastalık (KVH), dünya çapında önde gelen ölüm nedeni olmuştur. Bunun en önemli nedenlerinden bazıları, nüfus artışı, yaşlanan toplum ve hastalıklardaki epidemik değişimlerdir. KVH, kalp ve damar bozukluklarının bir bütünü olabildiği gibi ayrı ayrı sistemlerden de kaynaklanmaktadır. İnsülin direnci organizmada metabolik faaliyetlerin; hücrenin yaşamsal fonksiyonlarının insüline karşı doğru olmayan yanıtlar vermesi bunun getirisi olarak organ sistemlerinde görülen bozulmuş biyolojik yanıtlar oluşması durumu olarak görülmektedir. İnsülin direnci, kalp yetmezliği ile yakından bağlantılıdır ve insülin direncinin varlığı kalp yetmezliğinin ilerlemesine olumsuz katkıda bulunmaktadır. Bu çalışmada ilk olarak PA ile insülin direnci oluşturulmuş H9c2 hücre hatlarında glikoz alım deneyleri yapılarak insülin direncinin oluştuğu teyit edildi. Biyokimyasal ve moleküler biyolojik teknikler kullanılarak bu hücrelerden toplanan mRNA ve proteinlerde araştırılan çinko taşıyıcı ZnT6(Slc30a6) ve ZnT7(Slc30a7) seviyeleri incelenmiştir. Daha sonra kontrol ve insülin dirençli gruplarda; floresan görüntüleme teknikleri kullanılarak, hücre içi serbest Zn^{+2} seviyeleri ($[Zn^{+2}]_i$), mitokondri membran potansiyeli (MMP) ve reaktif oksijen türleri (ROS) belirlendi. Bu deneyler sonucunda ilk olarak, insülin direncinin hücre içi iyon mekanizmasına, oksidan duruma ve mitokondri fonksiyonuna olan etkisi incelenmiştir. İkinci olarak ise, insülin direncinin histon modifikasyonlarına bağlı olarak çinko taşıyıcılarına olan etkisi ve aynı zamanda incelenen ZnT6 ve ZnT7 çinko taşıyıcı proteinlerin bu aşamalarda rolleri incelenmiştir. Bu şekilde hücrelerin kardiyovasküler hastalığa neden olan insülin direnci durumunun hücre içi mekanizmaları nasıl etkilediği ve hücre içerisindeki ZnT6 ve ZnT7 çinko taşıyıcı proteinlerin bu süreçteki etkisi ve bu etkinin epigenetik bir nedenden ötürü mü geliştiği öğrenilmek istenmiştir. Sonuç olarak, ZnT6 ve ZnT7'nin mitokondride lokalize olduğu ve gerçekleşen hücre içi mekanizmalar ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Hücrede insülin direnci durumunda, ZnT7 çinko taşıyıcı proteinlerinin $[Zn^{+2}]_i$ ve LSD1 protein miktarının kontrolünde etkili olduğu ve mitokondrideki lokalizasyonları dikkate alınarak hücre içi reaktif ürünlerin salınımı ve enerji metabolizmasının bozulmasında etkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Çinko, Çinko Taşıyıcı Proteinler, H9c2 hücre hattı, insülin direnci, epigenetik

SUMMARY

The Role of Epigenetic Changes on Zinc Transporters in Insulin Resistant Induced H9c2 Cell Lines

For many years, cardiovascular disease (CVD) has been the leading cause of death worldwide. Some of the most important reasons for this are population growth, an aging society, and epidemic changes in diseases. CVD can be a combination of cardiovascular diseases or it can be caused by separate systems. Insulin resistance, metabolic activities in the organism; Incorrect responses of the cell's vital functions to insulin are seen as the result of impaired biological responses seen in organ systems. Insulin resistance is closely linked to heart failure, and the presence of insulin resistance negatively contributes to the progression of heart failure. In this study, glucose uptake experiments were carried out in H9c2 cell lines, in which insulin resistance was created with PA, and it was confirmed that insulin resistance occurred. Zinc transporter ZnT6(Slc30a6) and ZnT7(Slc30a7) levels were investigated in mRNA and proteins collected from these cells using biochemical and molecular biological techniques. Then in the control and insulin resistant groups; Using fluorescent imaging techniques, intracellular free Zn⁺² levels ([Zn⁺²]_i), mitochondrial membrane potential (MMP), and reactive oxygen species (ROS) were determined. As a result of these experiments, firstly, the effect of insulin resistance on intracellular ion mechanism, oxidant status, and mitochondrial function was investigated. Secondly, the impact of insulin resistance on zinc transporters due to histone modifications and the roles of ZnT6 and ZnT7 zinc transporter proteins in these stages were investigated. In this way, it was desired to learn how the insulin resistance state of the cells, which causes cardiovascular disease, affects the intracellular mechanisms, the effect of ZnT6 and ZnT7 zinc carrier proteins in the cell in this process, and whether this effect develops due to an epigenetic reason. As a result, it has been observed that ZnT6 and ZnT7 are localized in mitochondria and are related to the intracellular mechanisms that take place. In the case of insulin resistance in the cell, it is thought that ZnT7 zinc carrier proteins are effective in controlling the amount of [Zn⁺²]_i and LSD1 protein and may be effective in the release of intracellular reactive products and disruption of energy metabolism, considering their localization in mitochondria.

Key Words: Zinc, Zinc Carrier Proteins, H9c2 cell line, insulin resistance, epigenetics

KAYNAKLAR

- AKA J. A., KIM G. W., YANG X. J. (2011). K-acetylation and its enzymes: overview and new developments. *Handb Exp Pharmacol.* **206**: 1-12
- ALTUNOĞLU ESMA GÜLDAL (2012). İnsülin Direnci Insulin Resistance. *İstanbul Tıp Dergisi Istanbul Med J.* **13**: 137-140
- ANCELIN K., SYX L., BORENSZTEIN M., RANISAVLJEVIC N., VASSILEV I., BRISENO-ROA L., LIU T., METZGER E., SERVANT N., BARILLOT E., CHEN C. J., SCHULE R., HEARD E. (2016). Maternal LSD1/KDM1A is an essential regulator of chromatin and transcription landscapes during zygotic genome activation. *Elife.* **5**:
- AYAZ M., TURAN B. (2006). Selenium prevents diabetes-induced alterations in [Zn²⁺] and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **290**: H1071-1080
- BAIDYUK E. V., BITKOVA E. A., BEZBORODKINA N. N., KARPOV A. A., KORSHAK O. V., SAKUTA G. A., KUDRYAVTSEV B. N. (2012). Heterogeneity of left ventricular cardiomyocytes from rat heart. *Bull Exp Biol Med.* **153**: 198-200
- BERK A., KAISER C. A., KRIEGER M., LODISH H., SCOTT M. (2007), *Moleküler Hücre Biyolojisi Molecular Cell Biology* (Vol. **6**), Turkey: Palme Yayıncılık.
- BERTHELET J., MICHAÏL C., BUI L. C., LE COADOU L., SIRRI V., WANG L., DULPHY N., DUPRET J. M., CHOMIENNE C., GUIDEZ F., RODRIGUES-LIMA F. (2021). The Benzene Hematotoxic and Reactive Metabolite 1,4-Benzoquinone Impairs the Activity of the Histone Methyltransferase SET Domain Containing 2 (SETD2) and Causes Aberrant Histone H3 Lysine 36 Trimethylation (H3K36me3). *Mol Pharmacol.* **100**: 283-294
- BEYER N., COULSON D. T., HEGGARTY S., RAVID R., HELLEMANS J., IRVINE G. B., JOHNSTON J. A. (2012). Zinc transporter mRNA levels in Alzheimer's disease postmortem brain. *J Alzheimers Dis.* **29**: 863-873
- BOLDT J. (2001). Cardiovascular system. *Curr Opin Crit Care.* **7**: 313
- BRITO S., LEE M. G., BIN B. H., LEE J. S. (2020). Zinc and Its Transporters in Epigenetics. *Mol Cells.* **43**: 323-330
- COUSINS R. J., BLANCHARD R. K., MOORE J. B., CUI L., GREEN C. L., LIUZZI J. P., CAO J., BOBO J. A. (2003). Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. *J Nutr.* **133**: 1521S-1526S

- DEGIRMENCI S., OLGAR Y., DURAK A., TUNCAY E., TURAN B. (2018). Cytosolic increased labile Zn(2+) contributes to arrhythmogenic action potentials in left ventricular cardiomyocytes through protein thiol oxidation and cellular ATP depletion. *J Trace Elem Med Biol.* **48**: 202-212
- EGGER G., LIANG G., APARICIO A., JONES P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* **429**: 457-463
- FOSTER M., CHU A., PETOCZ P., SAMMAN S. (2014). Zinc transporter gene expression and glycemic control in post-menopausal women with Type 2 diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol.* **28**: 448-452
- FULLGRABE J., KAVANAGH E., JOSEPH B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene.* **30**: 3391-3403
- G İŞILDAK M. ; GÜVEN G. ; GÜRLEK (2004). Metabolik sendrom ve insülin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi.* **35**: 96-99
- GRANGER A., EMAMBOKUS N. (2015). Cell metabolism cardiovascular biology. *Cell Metab.* **21**: 151
- GREMMELS H., BEVERS L. M., FLEDDERUS J. O., BRAAM B., VAN ZONNEVELD A. J., VERHAAR M. C., JOLES J. A. (2015). Oleic acid increases mitochondrial reactive oxygen species production and decreases endothelial nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* **751**: 67-72
- HINO S., SAKAMOTO A., NAGAOKA K., ANAN K., WANG Y., MIMASU S., UMEHARA T., YOKOYAMA S., KOSAI K., NAKAO M. (2012). FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nat Commun.* **3**: 758
- HINTON R. B., YUTZEY K. E. (2011). Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol.* **73**: 29-46
- HOOK S. S., ORIAN A., COWLEY S. M., EISENMAN R. N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 13425-13430
- HU Q., KWON Y. S., NUNEZ E., CARDAMONE M. D., HUTT K. R., OHGI K. A., GARCIA-BASSETS I., ROSE D. W., GLASS C. K., ROSENFELD M. G., FU X. D. (2008). Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 19199-19204
- HUANG L., KIRSCHKE C. P., GITSCHIER J. (2002). Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *J Biol Chem.* **277**: 26389-26395
- HUANG L., KIRSCHKE C. P., LAY Y. A., LEVY L. B., LAMIRANDE D. E., ZHANG P. H. (2012). *Znt7*-null mice are more susceptible to diet-induced glucose intolerance and insulin resistance. *J Biol Chem.* **287**: 33883-33896

- JANSEN J., KARGES W., RINK L. (2009). Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem.* **20**: 399-417
- KAMBE T., YAMAGUCHI-IWAI Y., SASAKI R., NAGAO M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci.* **61**: 49-68
- KARABULUT H., GÜLAY M. (2016). Serbest Radikaller Free Radicals. *MAKÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ.* **4**: 50-59
- KENT A. F. (1893). Researches on the Structure and Function of the Mammalian Heart. *J Physiol.* **14**: i2-254
- KIM J. Y., LEE H. J., LEE S. J., JUNG Y. H., YOO D. Y., HWANG I. K., SEONG J. K., RYU J. M., HAN H. J. (2017). Palmitic Acid-BSA enhances Amyloid-beta production through GPR40-mediated dual pathways in neuronal cells: Involvement of the Akt/mTOR/HIF-1alpha and Akt/NF-kappaB pathways. *Sci Rep.* **7**: 4335
- KIRSCHKE C. P., HUANG L. (2003). ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* **278**: 4096-4102
- KUMAR S., PAMULAPATI H., TIKOO K. (2016). Fatty acid induced metabolic memory involves alterations in renal histone H3K36me2 and H3K27me3. *Mol Cell Endocrinol.* **422**: 233-242
- KUZNETSOV A. V., JAVADOV S., SICKINGER S., FROTSCHNIG S., GRIMM M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim Biophys Acta.* **1853**: 276-284
- LAM U. T. F., TAN B. K. Y., POH J. J. X., CHEN E. S. (2022). Structural and functional specificity of H3K36 methylation. *Epigenetics Chromatin.* **15**: 17
- LETO D., SALTIEL A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**: 383-396
- LI T., DU Y., WANG L., HUANG L., LI W., LU M., ZHANG X., ZHU W. G. (2012). Characterization and prediction of lysine (K)-acetyl-transferase specific acetylation sites. *Mol Cell Proteomics.* **11**: M111 011080
- LIM S., JANZER A., BECKER A., ZIMMER A., SCHULE R., BUETTNER R., KIRFEL J. (2010). Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis.* **31**: 512-520
- MAKRECKA-KUKA M., LIEPINSH E., MURRAY A. J., LEMIEUX H., DAMBROVA M., TEPP K., PUURAND M., KAAMBRE T., HAN W. H., DE GOEDE P., O'BRIEN K. A., TURAN B., TUNCAY E., OLGAR Y., ROLO A. P., PALMEIRA C. M., BOARDMAN N. T., WUST R. C. I., LARSEN T. S. (2020). Altered mitochondrial metabolism in the insulin-resistant heart. *Acta Physiol (Oxf).* **228**: e13430

- MORISCO C., MARRONE C., TRIMARCO V., CRISPO S., MONTI M. G., SADOSHIMA J., TRIMARCO B. (2007). Insulin resistance affects the cytoprotective effect of insulin in cardiomyocytes through an impairment of MAPK phosphatase-1 expression. *Cardiovasc Res.* **76**: 453-464
- MYERS S. A., NIELD A., MYERS M. (2012). Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Metab.* **2012**: 173712
- MYERS S., SHASTRI M. D., ADULCIKAS J., SOHAL S. S., NOROUZI S. (2017). Zinc and Gastrointestinal Disorders: A Role for the Zinc Transporters Zips and ZnTs. *Curr Pharm Des.* **23**: 2328-2332
- NAVIK U., SHETH V. G., KABEER S. W., TIKOO K. (2019). Dietary Supplementation of Methyl Donor L-Methionine Alters Epigenetic Modification in Type 2 Diabetes. *Mol Nutr Food Res.* **63**: e1801401
- NIE L., SHUAI L., ZHU M., LIU P., XIE Z. F., JIANG S., JIANG H. W., LI J., ZHAO Y., LI J. Y., TAN M. (2017). The Landscape of Histone Modifications in a High-Fat Diet-Induced Obese (DIO) Mouse Model. *Mol Cell Proteomics.* **16**: 1324-1334
- NOROUZI S., ADULCIKAS J., SOHAL S. S., MYERS S. (2017). Zinc transporters and insulin resistance: therapeutic implications for type 2 diabetes and metabolic disease. *J Biomed Sci.* **24**: 87
- OKATAN E. N., OLGAR Y., TUNCAY E., TURAN B. (2019). Azoramide improves mitochondrial dysfunction in palmitate-induced insulin resistant H9c2 cells. *Mol Cell Biochem.* **461**: 65-72
- OLESEN R. H., HYDE T. M., KLEINMAN J. E., SMIDT K., RUNGBY J., LARSEN A. (2016). Obesity and age-related alterations in the gene expression of zinc-transporter proteins in the human brain. *Transl Psychiatry.* **6**: e838
- OLGAR Y., DEGIRMENCI S., DURAK A., BILLUR D., CAN B., KAYKI-MUTLU G., ARIOGLU-INAN E. E., TURAN B. (2018). Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Exp Gerontol.* **110**: 172-181
- OLGAR Y., TUNCAY E., TURAN B. (2019). Mitochondria-Targeting Antioxidant Provides Cardioprotection through Regulation of Cytosolic and Mitochondrial Zn(2+) Levels with Re-Distribution of Zn(2+)-Transporters in Aged Rat Cardiomyocytes. *Int J Mol Sci.* **20**:
- ORMAZABAL V., NAIR S., ELFEKY O., AGUAYO C., SALOMON C., ZUNIGA F. A. (2018). Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* **17**: 122
- PATEL T. P., RAWAL K., BAGCHI A. K., AKOLKAR G., BERNARDES N., DIAS D. D. S., GUPTA S., SINGAL P. K. (2016). Insulin resistance: an additional risk factor in

the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev.* **21**: 11-23

- PILOTTO S., SPERANZINI V., MARABELLI C., RUSCONI F., TOFFOLO E., GRILLO B., BATTAGLIOLI E., MATTEVI A. (2016). LSD1/KDM1A mutations associated to a newly described form of intellectual disability impair demethylase activity and binding to transcription factors. *Hum Mol Genet.* **25**: 2578-2587
- REDDY M. A., VILLENEUVE L. M., WANG M., LANTING L., NATARAJAN R. (2008). Role of the lysine-specific demethylase 1 in the proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells of diabetic mice. *Circ Res.* **103**: 615-623
- ROSEN E. D., KAESTNER K. H., NATARAJAN R., PATTI M. E., SALLARI R., SANDER M., SUSZTAK K. (2018). Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. *Diabetes.* **67**: 1923-1931
- SHARMA N., SANKRITYAYAN H., KALE A., GAIKWAD A. B. (2020). Role of SET7/9 in the progression of ischemic renal injury in diabetic and non-diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **528**: 14-20
- SIVANDZADE F., BHALERAO A., CUCULLO L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc.* **9**:
- SMIDT K., LARSEN A., BRONDEN A., SORENSEN K. S., NIELSEN J. V., PRAETORIUS J., MARTENSEN P. M., RUNGBY J. (2016). The zinc transporter ZNT3 co-localizes with insulin in INS-1E pancreatic beta cells and influences cell survival, insulin secretion capacity, and ZNT8 expression. *Biometals.* **29**: 287-298
- SMITH B. C., DENU J. M. (2009). Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta.* **1789**: 45-57
- SOINIO M., MARNIEMI J., LAAKSO M., PYORALA K., LEHTO S., RONNEMAA T. (2007). Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **30**: 523-528
- SUZUKI S., MURAKAMI Y., TAKAHATA S. (2017). H3K36 methylation state and associated silencing mechanisms. *Transcription.* **8**: 26-31
- TUNCAY E., BILGINOGLU A., SOZMEN N. N., ZEYDANLI E. N., UGUR M., VASSORT G., TURAN B. (2011). Intracellular free zinc during cardiac excitation-contraction cycle: calcium and redox dependencies. *Cardiovasc Res.* **89**: 634-642
- TUNCAY E., BITIRIM C. V., OLGAR Y., DURAK A., RUTTER G. A., TURAN B. (2019). Zn(2+)-transporters ZIP7 and ZnT7 play important role in progression of cardiac dysfunction via affecting sarco(endo)plasmic reticulum-mitochondria coupling in hyperglycemic cardiomyocytes. *Mitochondrion.* **44**: 41-52
- TUNCAY E., BITIRIM V. C., DURAK A., CARRAT G. R. J., TAYLOR K. M., RUTTER G. A., TURAN B. (2017). Hyperglycemia-Induced Changes in ZIP7 and ZnT7

- Expression Cause Zn(2+) Release From the Sarco(endo)plasmic Reticulum and Mediate ER Stress in the Heart. *Diabetes*. **66**: 1346-1358
- TUNCAY E., TURAN B. (2016). Intracellular Zn(2+) Increase in Cardiomyocytes Induces both Electrical and Mechanical Dysfunction in Heart via Endogenous Generation of Reactive Nitrogen Species. *Biol Trace Elem Res*. **169**: 294-302
- TURAN B., FLISS H., DESILETS M. (1997). Oxidants increase intracellular free Zn²⁺ concentration in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*. **272**: H2095-2106
- TURAN B., TUNCAY E. (2017). Impact of Labile Zinc on Heart Function: From Physiology to Pathophysiology. *Int J Mol Sci*. **18**:
- TURAN B., TUNCAY E. (2021). The role of labile Zn(2+) and Zn(2+)-transporters in the pathophysiology of mitochondria dysfunction in cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. **476**: 971-989
- ÜNAL H., KARAMAN M., YILMAZ M. (2017). Epigenetik ve Nefroloji , Epigenetics and Nephrology. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi Turkish Nephrology, Dialysis and Transplantation Journal*. **26**: 11-17
- WANG D., KUANG Y., ZHANG G., XIAO K., LIU Y. (2022). Lysine-Specific Demethylase 1 in Energy Metabolism: A Novel Target for Obesity. *J Nutr*. **152(7)**: 1611-1620
- WATKINS S. J., BORTHWICK G. M., ARTHUR H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. **47**: 125-131
- WILES E. T., SELKER E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Curr Opin Genet Dev*. **43**: 31-37
- YANG S., LIAN G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem*. **467**: 1-12
- ZOROVA L. D., POPKOV V. A., PLOTNIKOV E. Y., SILACHEV D. N., PEVZNER I. B., JANKAUSKAS S. S., BABENKO V. A., ZOROV S. D., BALAKIREVA A. V., JUHASZOVA M., SOLLOTT S. J., ZOROV D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. **552**: 50-59