



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

**İN VİTRO NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER MODELİNDE
MİTOKONDRIYAL KÖKENLİ MOTs-c PEPTİDİNİN
HASTALIK ETYOPATOGENEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

TUBA GÖÇMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. FATİH EREN

2018-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : TUBA GÖÇMEN
Tez Başlığı : İN VİTRO NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER
MODELİNDE MİTOKONDRIYAL KÖKENLİ MOTS-C PEPTİDİNİN
HASTALIK ETYOPATOGENEZİ ÜZERİNE ETKİLERİ
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD
Sınav Tarihi : 25/09/2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman(Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Doç. Dr. Fatih EREN

M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Fatih Eren

M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

Prof. Dr. Ayşe Özer

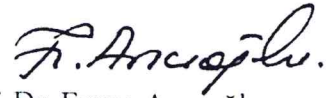
M.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD

Prof. Dr. Mehmet Güven

Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 0.3.2018... tarih ve 90 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



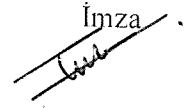
Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

TUBA GÖÇMEN

İmza .


I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen ve tez çalışmamda bilimsel ve mesleki tecrübeleri ile yardımda bulunan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fatih Eren'e,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince akademik bilgisi, güler yüzü ve anlayışıyla yanımda olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Yüksek lisans eğitimime değerli bilgileri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Mustafa Akkiprik, Yrd. Doç. Dr. Can Erzik, Doç. Dr. İlter Güney'e,

Güler yüzleriyle yardımlarını esirgemeyen başta İrem Peker Eyüboğlu ve Gökçe Güllü Amuran olmak üzere tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik ailesine,

Tüm yardımlarından dolayı Öğretim Görevlisi Dr. Ayşe Mine Yılmaz ve Sema Arslan'a,

Birlikte çalıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Demet Yılmaz ve Ayça Önal'a,

Desteklerini hep yanımda hissettiğim babam Sabri Toker'e, annem Leyla Toker'e ve kardeşim Eda Toker'e,

Bu uzun yolculukta ve hayatımın her anında bana her türlü desteği ile yardımcı olan değerli eşim Mehmet Fatih Göçmen'e,

SONSUZ TEŞEKKÜLERİMİ SUNARIM.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından, "SAG-C-YLP 150218-0042" numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ	IV
IV. KISALTMA ve SİMGELER	VI
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1 NASH	4
4.1.1 NASH Etyopatogenezi	4
4.2 AMP-aktive Protein Kinaz (AMPK) Yolağı	8
4.3 Mitokondriyal Türevli Peptid: MOTS-c	9
4.4 AMPK Yolağı, MOTS-c ve NASH Etyopatogenezi Arasındaki İlişki	11
5. GEREÇ ve YÖNTEM	14
5.1 Araştırmada Kullanılacak Materyal ve Yöntemler	14
5.1.1 Solüsyon ve Çözeltiler	14
5.1.2 HepG2 Hücre Kültürü	16
5.1.3 Serbest Yağ Asitleri Uygulanması	17
5.1.4 Oil Red O Boyama	17
5.1.5 MOTS-c Uygulanması	18
5.1.6 Hücre Sayımı	18

5.1.7 Western Blot	18
5.2 Sonuçların Analizi	20
6. BULGULAR	21
6.1 Hücre Canlılık ve Sayım Analizleri	21
6.2 Mikroskopik Analizler	21
6.3 Hücre İçi Lipit Analizleri ve ORO Analizleri	25
6.4 Yağlanma Sonrası MOTS-c Uygulanması	26
6.5 Pierce BCA Protein Assay Sonuçları	26
6.6. Western Blot Sonuçları	27
7. TARTIŞMA	30
8. KAYNAKLAR	34
9. ÖZGEÇMİŞ	37

III. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

Resim 1: Büyüme fazındaki HepG2 hücreleri. 20X Oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 2: Kültür ortamındaki Kontrol HepG2 hücreleri. 20X Oküler kullanılarak çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 3: 24 saatlik açlığa maruz bırakılan HepG2 hücreleri. (Low Glucose DMEM ortamında bekletildiler.) 20X Oküler kullanılarak çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 4: 24 saat FFAs uygulanan HepG2 hücrelerinin mikroskopi görüntüsü. 20X oküler kullanılarak çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 5: Kontrol grubu HepG2 hücrelerinin fiksasyon sonrası ORO ile boyanmasının mikroskopi görüntüsü. 20X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 6: 24 saat FFA uygulanmış HepG2 hücrelerinin fiksasyon sonrası ORO ile boyanmasının mikroskopi görüntüsü. 10X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 7: 24 saat boyunca 10 μ M MOTS-c uygulanan kontrol grubu hücreleri. 20X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 8: 24 saat boyunca 10 μ M MOTS-c uygulanan önceden FFAs ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri. 20X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

Resim 9: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 20 μ g olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %10'luk jel kullanılarak AMPK bakılmıştır. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, ImageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)

Resim 10: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 20 μ g olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %10'luk jel kullanılarak AMPK bakılmış olan membranın

üzerine tekrar β -aktin bağlanarak elde edilmiştir. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, İmageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)

Resim 11: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 15 μ g olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %7,5'luk jel kullanılarak ACC bakılmıştır. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, İmageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)

Resim 12: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 15 μ g olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %7,5'luk jel kullanılarak ACC bakılmış olan membran üzerine tekrar β -aktin bağlanarak elde edilmiştir. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, İmageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)

Şekil 1: İnsülin direnci varlığında metabolik değişimlerin karaciğer steatozuna etkisi

Şekil 2: NASH'in etyopatogenezinde oksidatif stresin fibroz oluşumuna etkisi

Şekil 3: İskelet kasındaki mitokondriyal düzenleme ve AMPK yolağının katkısı

Şekil 4: Humaninin açık okuma çerçevesi

Şekil 5: MOTS-c'nin açık okuma çerçevesi

Şekil 6: MOTS-c'nin metiyonin-folat döngüsü ve de nova pürin biyosentezi üzerindeki etkileri

Şekil 7: MOTS-c'in metabolik homeostaza etkisi

Şekil 8: Kontrol grubu canlılık ve sayım analizi (Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir).

Tablo 1: Western Blot jel komponentleri ve miktarları

Tablo 2: Kontrol grubu hücreleri ve FFAs uygulaması yapılan hücrelerin ORO boyama sonucunda 540 nm dalga boyunda ölçülen değerleri.

Tablo 3: Tablo 2'nin istatistiksel analiz sonucu gruplar arasındaki p değerleri ve anlamlılık düzeyleri.

Tablo 4: Kontrol grubu hücreleri, 24 saat FFAs uygulanan HepG2 hücreleri, 24 saat 10 μ M MOTS-c uygulanan kontrol grubu hücreleri ve 24 saat 10 μ M MOTS-c uygulanan yağlı grup hücrelerine ait BCA Protein Assay'ın 562 nm dalga boyunda ölçülen değerlerinin μ g/mL olarak hesaplanmış sonuçları.



IV. KISALTMA ve SİMGELER

ACC: Asetil-CoA Karboksilaz

AICAR: S-aminoimidazol-4-karboksamitribonükleotit

AMP: Adenozin monofosfat

AMPK: AMP-aktive protein kinaz

ANOVA: Varyans analizi

ATP: Adenozin trifosfat

5Me-THF: 5metil-tetrahidrofolat

ChREBP: Karbonhidrat-duyarlı element bağlayıcı protein

CPT-1: Karnitin Palmitol Transferaz-1

ddH₂O: Didistile su

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNL: de novo lipogenezi

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ETS: Elektron taşıma sistemi

FADH₂: Flavin adenin dinükleotit

FBS: Fetal Sığır Serum

FFA: Serbest yağ asidi

GLUT-4: Glikoz taşıyıcı-4

HepG2: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı

H₂O: Su

HSL: Hormon-duyarlı lipaz

IL-8: İnterlökin-8

IR: İnsülin reseptör

IRS: İnsülin reseptör substratı

JNK: Jun N terminal kinaz

kDa: Kilodalton

L: Litre

LCFA: Uzun zincirli yağlı asit

mg: Miligram

mM: Milimolar

ml: Mililitre

MOTS-c: 12S rRNA type-c'nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi

mtDNA: Mitokondriyal DNA

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NAFLD: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı

NASH: Non-alkolik steatohepatit

nm: Nanometre

OA: Oleik asit

ORO: Oil red O

PA: Palmitik asit

p-ACC: Fosfo-ACC

p-AMPK: Fosfo-AMPK

PBS: Fosfat tuzlu tamponu

PI3K: Fosfotidil inozitol 3-kinaz

PKB: Protein kinaz B

PPAR α : Peroksizom proliferatör-aktive reseptör

PVDF: Polivinilidenflorit

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türevleri

SDH: Süksinat dehidrojenaz

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

sORF: Kısa açık okuma çerçevesi

SREBP1-c: Sterol düzenleyici eleman bağlama proteini 1c

TCA: Trikarboksilik asit

TGF- β : Transforman büyüme faktörü beta

TNF- α : Tümör nekrozis faktör- α

tRNA: Taşıyıcı RNA

T-75 Flask: 75 cm² yüzey alanına sahip kültür kabı

UV: Ultraviyole

V: Voltaj

μ M: Mikromolar

μ l: Mikrolitre

İn Vitro Nonalkolik Yağlı Karaciğer Modelinde Mitokondriyal Kökenli MOTS-c Peptidinin Hastalık Etyopatogenezi Üzerine Etkileri

Öğrencinin Adı: TUBA GÖÇMEN

Danışmanı: Doç. Dr. Fatih Eren

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

1. ÖZET

Amaç: 2015 yılında mitokondriyal DNA'ya ait yeni bir gen keşfedilmiştir. Bu genin fonksiyonel ürünü olan 16 amino asitlik 12S rRNA tip-c mitokondriyal açık okuma çerçevesi (MOTS-c) peptidinin deneysel hayvan modellerinde AMPK yolağı üzerinden insülin direnci ve obeziteyi azalttığı bildirilmiştir. Ancak bu peptidin NAFLD üzerine etkisi ile ilişkili olarak literatürde bilgimiz dahilinde herhangi bir çalışma yoktur. Bu araştırmadaki amacımız in vitro NAFLD modelinde, MOTS-c peptidinin yağlanmayı azaltan bir etkisinin olup olmadığını tespit etmektir. **Yöntem:** Çalışmamızda, öncelikle 75 cm²'lik flasklara ekimi yapılan HepG2 hücreleri 24 saatlik düşük glikoz ortamında aç bırakılmıştır. Ardından 1mM konsantrasyonunda palmitik ve oleik asit uygulanarak in vitro NAFLD modeli oluşturulmuştur. Yağlanma Oil Red O (ORO) yöntemi ile kantifiye edilmiştir. Hücre canlılığı Cell Count and Viability Kit (MUSE) ile tespit edilmiştir. Hücrelere 10 µM MOTS-c peptidi 24 saat süre ile uygulanmıştır. **Bulgular:** Yağlanma modeli oluşturulan HepG2 hücrelerinde yapılan duplike çalışmalar sonucu kontrol gruba göre anlamlı bir yağ birikimi görülmüş ve model oluşturulmuştur (p<0,05). MOTS-c peptidinin hücreler üzerine herhangi bir toksik etkisi olmadığı hücre canlılığı analizi ile saptanmıştır. MOTS-c peptidinin yağlanmayı azalttığı tespit edilmiştir (p<0,05). **Sonuçlar:** MOTS-c peptidinin yağlanmayı azaltıcı etkisi ile NAFLD etyopatogenezi ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkiyi gerçekten AMPK yolağını hedef alarak gerçekleştirdiğini göstermek amacıyla AMPK yolağında bulunan AMPK ve ACC proteinlerine ve aktif formları olan p-AMPK ve p-ACC proteinlerine Western Blot yöntemi ile bakılmasını planlamaktayız. Bu çalışma ile NAFLD tedavisi için MOTS-c peptidinin tedavi adaylarından biri olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: HepG2, Hücre Kültürü, Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı, Mitokondriyal DNA, Mitokondriyal MOTS-c Peptidi

Effects of Mitochondrially Originated MOTS-c Peptide on Disease Etiopathogenesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in vitro Model

Researcher: TUBA GÖÇMEN

Advisor: Doç. Dr. Fatih Eren

Department: Medical Biology and Genetics

2. SUMMARY

Aim: In 2015, a novel gene belonging to mitochondrial genome was discovered. It has been identified in studies on cell lines and animal models that this gene's functional product which is a 16-amino-acid peptide named mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c (MOTS-c) regulates insulin sensitivity and metabolic homeostasis by AMPK pathway. However, according to our literature search, there are not any studies investigating MOTS-c effects on NAFLD etiopathogenesis. For this reason, we aim to examine MOTS-c effects on the pathogenesis of the disease in in vitro NAFLD model. **Methods:** In our study, first of all, HepG2 cells cultured in T75 flasks were starved in low glucose medium. After that, palmitic and oleic acid mix in 1 mM concentration was given to cells in order to generate in vitro NAFLD model. Lipid droplets were confirmed by using Oil Red O method. Cell viability was confirmed by using Cell Count and Viability Kit (MUSE). Then, MOTS-c in 10 µM concentration was applied to cells in the time with 24 hours. **Results:** As a result of duplicate experiments on fatty HepG2 cells, compared to control group cells, it has been considered to be very statistically significant and in vitro NAFLD model was created ($p<0,05$). According to cell viability analysis, the MOTS-c peptid is not toxic on cells. Finally, the MOTS-c peptide decreases the lipid droplets ($p<0,05$). **Conclusion:** The MOTS-c peptide is associated with NAFLD etiopathogenesis via a reducing effect of lipid droplets. With the aim of showing that MOTS-c targets AMPK pathway, we have planned to examine AMPK and ACC and also active forms p-AMPK and p-ACC by Western Blot. With this study, we think that MOTS-c could be a treatment candidate for NAFLD.

Keywords: HepG2, Cell Culture, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Mitochondrial DNA, Mitochondrial MOTS-c Peptide

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) alkol kullanmaksızın karaciğerde meydana gelen basit yağlanma ile karakterize olan bir hastalık grubudur. Karaciğerdeki yağlanmayı takiben inflamasyon ve hatta bazı durumlarda fibrozis geliştiğinde ise bu hastalık basit yağlanmadan ayrılarak nonalkolik steatohepatit (NASH) olarak adlandırılmaktadır. NASH'in gelişmesinde insülin direnci, obezite, tip 2 diyabet ve mitokondriyal fonksiyon bozuklukları önemli bir yere sahiptir.

Mitokondrinin sinyal mekanizmasındaki henüz aydınlatılamamış bazı fonksiyonları, mitokondrideki olası kısa açık okuma çerçevelerinin (sORF) araştırılmasına sebep olmuş ve ilk araştırmaların sonucunda humanin adlı bir polipeptid bulunmuştur. Humaninin bulunmasıyla yeni sORF'ların da olabileceği üzerine yapılan çalışmalarda ise 12S rRNA bölgesinde kodlanan, 51 baz çiftlik, 16 amino asitlik MOTS-c (12S rRNA tip-c'nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi) peptidi keşfedilmiştir.

Hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmalarında MOTS-c peptidinin glikoz ve yağ asidi metabolizmasını düzenlendiği tespit edilmiştir. MOTS-c peptidinin obezite ve insülin direncini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur; fakat yapmış olduğumuz literatür taramasına göre MOTS-c peptidinin NAFLD etyopatogenezi üzerine etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma yoktur. MOTS-c peptidi ile NAFLD arasındaki ilişkinin açıklanması ve kültür ortamında gösterilmesinin NAFLD etyopatogenezinde açıklanamayan bazı eksik noktaları aydınlatmada önemli olabileceği düşünülmüştür.

Bu sebeple, in vitro NAFLD modelinde MOTS-c peptidinin hastalığın patogenezi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 NASH

Alkol kullanımı dışındaki sebeplerden dolayı karaciğerde meydana gelen yağlanmalar nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) olarak tanımlanmaktadır. Yağlanmadan bahsedebilmek için ışık mikroskobu altında karaciğerdeki yağ damlacıklarından zengin hepatositlerin %5'ten daha fazla gözlemlenmesi ya da yağ miktarının karaciğerin ağırlığının %5'inden fazla olması gerekmektedir. Nonalkolik steatohepatit (NASH), NAFLD'nin bir kolu olup bahsedilen karaciğer yağlanmasını takiben Mallory cisimcikleri, iltihabi filtrasyon, hepatositlerde balonlaşma, megamitokondri ve fibrozis gibi bulguların da görüldüğü hastalık grubudur (Reccia ve ark., 2017).

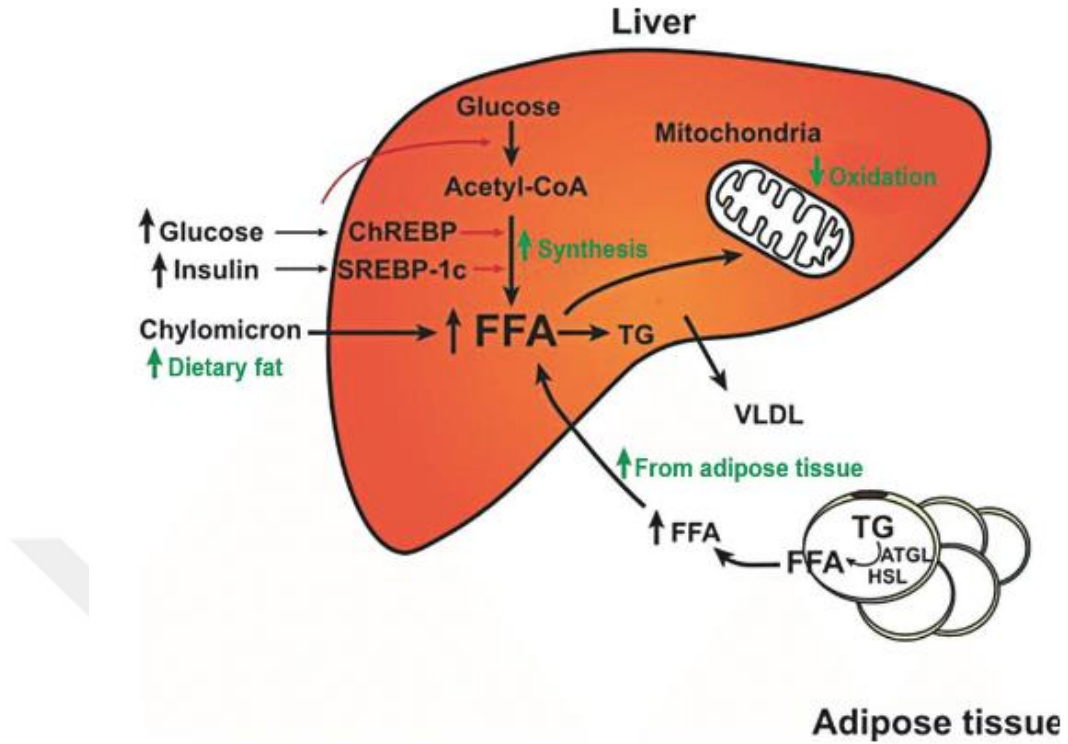
NAFLD'nin görülme sıklığı tüm dünyada giderek artma eğiliminde olup son verilere göre genel nüfusun NAFLD sıklığı yaklaşık olarak %25'lerde iken NASH sıklığı yaklaşık olarak %3,5'lardadır. Ayrıca NAFLD prevalansı, tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon veya hiperlipidemi hastalıklarına sahip kişilerde anlamlı olarak daha fazladır. Obez bireylerde NASH, zayıf bireylere göre daha sık görülmektedir (Hazlehurst ve ark., 2016).

4.1.1 NASH Etyopatogenezi

NASH'in patogenezi çift vuruş (two hits) hipotezine dayandırılmaktadır. Çift vuruş hipotezine göre ilk vuruş insülin direncidir ve karaciğerde yağ birikiminin asıl sebebidir. İkinci vuruştan ise inflamasyon ve fibrozise neden olan bazı sitokinler (tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi), mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve bazı hormonlar (adiponektin, leptin gibi) sorumlu tutulmaktadır (James ve Day, 1998).

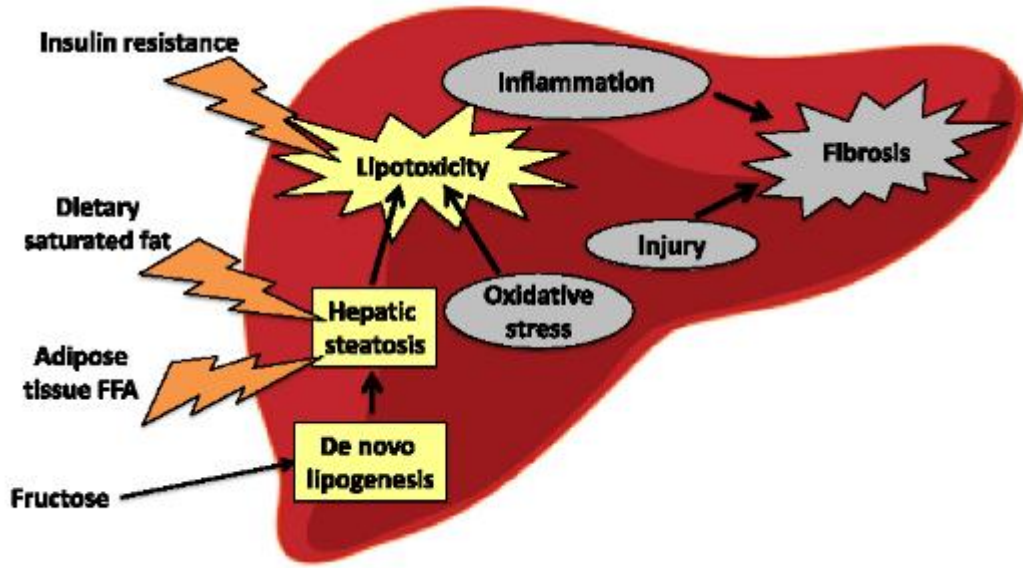
NASH'in ilk vuruşundan sorumlu olan insülin direnci ilk olarak iskelet kasında meydana gelir, ardından adipositlerde de insülin direnci gözlenir (Hazlehurst ve ark.,

2016). Normalde, insülin, insülin reseptör substratının (IRS) hücre zarında bulunan insülin reseptörü (IR)'ünü kullanarak aktive edilmesini sağlar. Ardından, fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B'yi (PKB) sırası ile aktive ederek glikoz transportları yardımıyla glikozun hücre içine alınımı sağlanır. Günümüzde hareketsiz yaşamın artması ve beslenmedeki artmış yağ ve karbonhidrat kullanımına ek olarak mitokondriyal bozuklukların da eklenmesiyle birlikte insülin direnci gelişmektedir. İnsülin direnci, insülin varlığına rağmen IRS'in, Jun N terminal kinaz (JNK) tarafından fosforilasyona uğratarak baskılanmasıyla oluşur. IRS'in inhibe olması hücre içine glikoz alımını azaltır. Azalan glikoz alımı serumdaki glikoz seviyesinin yüksek kalmasına sebep olur. Normal şartlarda adipositlerdeki hormon-duyarlı lipaz (HSL) insülin tarafından inhibe edilir. Bu inhibisyon sayesinde adipoz dokudaki yağ yıkımı (lipoliz) önlenmiş olur. İnsüline dirençli adipositlerde ise insülin seviyeleri yüksek olmasına rağmen adipositlerdeki hormon-duyarlı lipaz dirençten dolayı inhibe edilemez ve lipoliz gerçekleşir. Lipoliz sonucu oluşan serbest yağ asitlerinin (FFAs) plazmaya salınımı artar. Aynı zamanda plazmada miktarı artan FFAs'ların hepatositlere girişi de artar. Bununla birlikte insülin dirençli miyositler sebebiyle plazmadaki glikoz ve insülin seviyeleri yüksek kaldığı için bu glikoz ve insülin de hepatositler tarafından alınır. Glikoz, karbonhidrat-duyarlı element bağlayıcı proteinin (ChREBP) transkripsiyonunu artırırken insülin, sterol düzenleyici eleman bağlama proteini 1-c'nin (SREBP1-c) transkripsiyonunu artırır. ChREBP ve SREBP1-c birlikte lipojenik enzimleri aktive ederek de novo lipogenezi (DNL) yani FFAs sentezini artırır (Şekil 1). SREBP-1c aynı zamanda malonil-CoA'nın çok fazla sentezlenmesine neden olarak FFA sentezini artırırken diğer taraftan β oksidasyonun bozulmasına neden olur. Bunun sebebi peroksizom proliferatör-aktive reseptör alfa (PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha) aktivasyonunun artmasıdır. Bununla birlikte karnitin palmitoil transferaz-I (CPT-I, carnitine palmitoyltransferase 1) miktarı da artar ve inhibitörü olan malonil-CoA'ya karşı bağlanma isteğini kaybeder. Böylece β oksidasyon da artmış olur. Sonuç olarak, insülin direnci sonucu oluşan karbonhidratın fazlası serbest yağ asitlerine çevrilerek karaciğerde yağ birikimine yani steatoza sebep olur. Steatoz oluşuktan sonra karaciğer oksidatif strese de duyarlı hale gelir (Pessayre ve Fromenty, 2005).



Şekil 1: İnsülin direnci varlığında metabolik değişimlerin karaciğer steatozuna etkisi (Moon, 2017).

NASH'in ikinci vuruşu steatohepatit gelişimi olarak bilinmekte olup oksidatif stres, steatozun steatohepatite ilerlemesinin nedenidir (Şekil 2). Hepatositlerde biriken uzun zincirli yağ asitleri (LCFA) mitokondrilerdeki β oksidasyonunu artırır. β oksidasyonu sonucu oluşan asetil-CoA, trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılarak NADH ve FADH_2 oluşumunu artırır. NADH ve FADH_2 , mitokondride gerçekleşen elektron taşıma sisteminde (ETS) elektron iletimini sağlayan moleküllerdir. Elektronlar kompleks I, II, III ve IV (sitokrom c) boyunca taşınarak moleküler oksijene aktarılır ve H_2O oluşturulur (Reccia ve ark., 2017). Ancak mitokondride meydana gelen fonksiyonel bir bozukluk, solunum zinciri komplekslerinin aktivitesindeki azalma ile sonuçlanır ve elektron akışı kısmen engellenirse bozulan akış sebebiyle oksijene dört elektron (oksijenin tamamen indirgenebilmesi için gerekli olan elektron sayısı) ulaştırılamaz ve reaktif oksijen türevleri (ROS) meydana gelir.



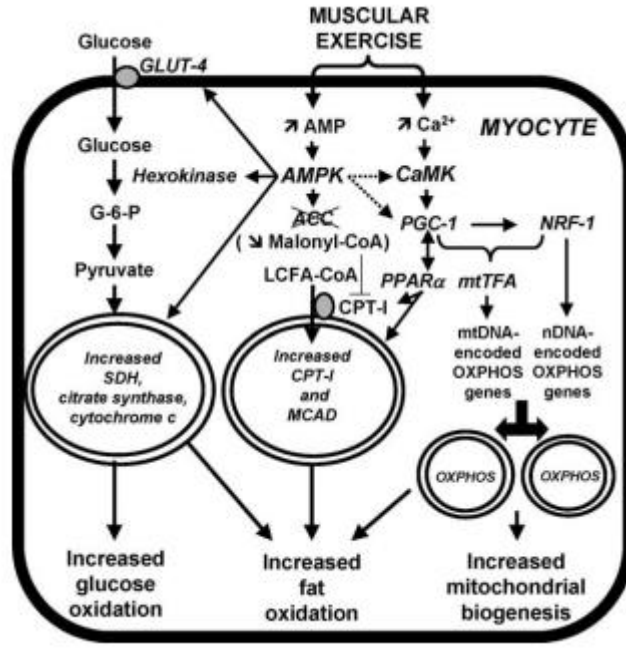
Şekil 2: NASH'in etyopatogenezinde oksidatif stresin fibroz oluşumuna etkisi (Paglialunga1 ve Dehn, 2016).

ROS herhangi bir atomla kolayca reaksiyona girip biyolojik sistemlere zarar verebilen bir yapıdadır. Bu sayede lipid peroksidasyonunu artırır ve reaktif lipid peroksidasyon ürünleri ile birlikte mitokondriyal DNA'ya saldırır. Bu hareketi ile daha fazla ROS oluşumuna sebep olur. İyice artan ROS, bir yandan TNF- α ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ekspresyonlarının artışı ile hepatosit ölümlerine, diğer yandan da lipid peroksidasyonu yoluyla hepatosit nekrozuna ve kolajen sentezinde artışa neden olur. Ayrıca TGF- β , Mallory cisimciklerinin yapısında yer almaktadır. ROS sonucu artan interlökin-8 (IL-8), iltihabi infiltrasyona neden olurken yine ROS kaynaklı ekspresyonu artan fas ligand, hepatositleri apoptoza sürükler. Apoptoza sürüklenen hepatositler, Kupffer ve yıldız hücreleri tarafından fagositozla hücre içine alınır. Kupffer ve yıldız hücreleri, TGF- β salgılanmasına sebep olur. Aynı zamanda leptin hormonu da Kupffer ve yıldız hücrelerine etki ederek TGF- β salınımını artırır. Bu da kolajen oluşumunun artmasına etki eden bir diğer faktördür. Karaciğer artan apoptozu dengelemek, karaciğerin normal büyüklüğünde kalmasını sağlamak için hücre bölünmesini artırır. Hem hücre bölünmesindeki artış hem de ROS'un lipid peroksidasyon ürünleri ile

birlikte DNA’da uğrattığı hasar, yıllar içerisinde birikerek kanserli hücrelerin oluşmasına yani hepatik karsinomaya kadar gidebilen bir duruma dönüşebilir (Taanman, 1999).

4.2 AMP-aktive Protein Kinaz (AMPK) Yolağı

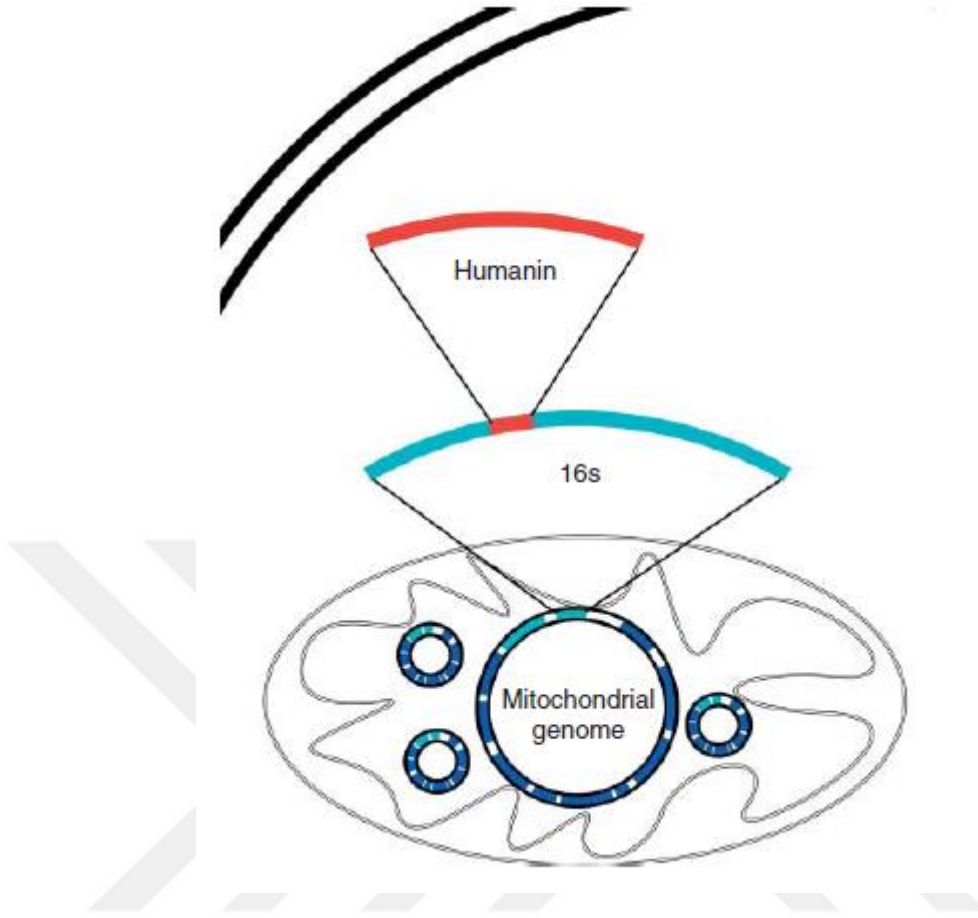
Dolaşımdaki glikozun normal seviyelerde tutulmasını sağlayan en önemli organ iskelet kaslarıdır. Miyositler fiziksel aktivite sırasında gerekebilecek yüksek enerji ihtiyacı ihtimaline karşın çok fazla sayıda mitokondri içermektedir (Lee ve ark., 2016). Kas hücrelerindeki mitokondriler sayıca fazla olmalarına rağmen uzun süren egzersizlerde ADP’yi ATP’ye dönüştürmede yeterli olamayabilirler ve bu durum kaslarda ADP birikimine sebep olabilir. ADP’nin yüksek, ATP’nin düşük seviyelerde olduğu bu uzun egzersiz durumlarında kaslarda artan enerji ihtiyacını karşılamak için adenilat kinaz enzimi sitoplazmada iki ADP molekülünü bir ATP ve bir AMP molekülüne çevirir. Yükselen AMP seviyeleri AMP-aktive protein kinaz (AMPK) yolağının devreye girmesini sağlar. AMPK yolağı ATP üretimini artırmak için ATP üreten birçok yolağın aktive olmasına, ATP tüketen birçok yolağın ise inhibe olmasına sebep olur. AMPK, kas hücrelerine glikoz alımını sağlayan glikoz taşıyıcı-4’lerin (GLUT4) ekspresyonunu artırır (Kim ve ark., 2016). Bununla birlikte heksokinaz enzimini aktive eder ki bu enzim, glikolizi başlatan enzimdir. Ardından TCA döngüsünde görevli olan süksinat dehidrojenaz (SDH) ve sitrat sentaz ile oksidatif fosforilasyonda görevli sitokrom c’nin sentezini artırarak glikoz ve yağ oksidasyonunu artırıp ATP üretimini artırır. AMPK yolağı aynı zamanda asetil-CoA karboksilazı (ACC) fosforlayarak inhibe eder. Bu inhibisyon sonucu malonil-CoA oluşumu engellenir. Normalde malonil-CoA CPT-1’in inhibitörüdür. Malonil-CoA oluşmadığı için CPT-1 (yağların mitokondriden içeri alımını sağlayarak oksidasyonu başlatan molekül) inhibe olmaz ve β oksidasyonunu başlatır (Smith ve ark., 2016) (Şekil 3).



Şekil 3: İskelet kasındaki mitokondriyal düzenleme ve AMPK yolağının katkısı (Peysarre ve Fromenty, 2005).

4.3 Mitokondriyal Türevli Peptid: MOTS-c

Mitokondrilerin solunum mekanizmasındaki genleri kodlayabilmesi için nükleer genomdan ayrı, kendilerine özgü bir DNA'ları vardır ve mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak adlandırılmaktadır (Lee ve ark., 2016). İnsan mitokondriyal genomu 16.543 kilobazdır ve solunum zincirini oluşturan yaklaşık 80 proteinin 13'ü mitokondriyal genom tarafından diğerleri ise nükleer genom ile kodlanmaktadır. Bunun yanı sıra, mtDNA, 12S ve 16S rRNA'lar ile 22 adet tRNA kodlamaktadır. Toplamda 37 tane gen kodladığı bilinen mitokondrinin, sinyal mekanizmasındaki henüz aydınlatılamamış bazı fonksiyonları sebebiyle son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda başka genleri de kodladığı görülmüştür. Bu da mitokondrideki kısa açık okuma çerçevelerinin (sORF) araştırılmasına sebep olmuştur. İlk araştırma sonuçları 16S rRNA bölgesinde bir sinyal peptidi olarak kodlanan, 75 baz çiftlik, 24 amino asitlik humanin polipeptidini buldurtmuştur (Kim ve ark., 2016) (Şekil 4).



Şekil 4: Humaninin açık okuma çerçevesi (Yen ve ark., 2013).

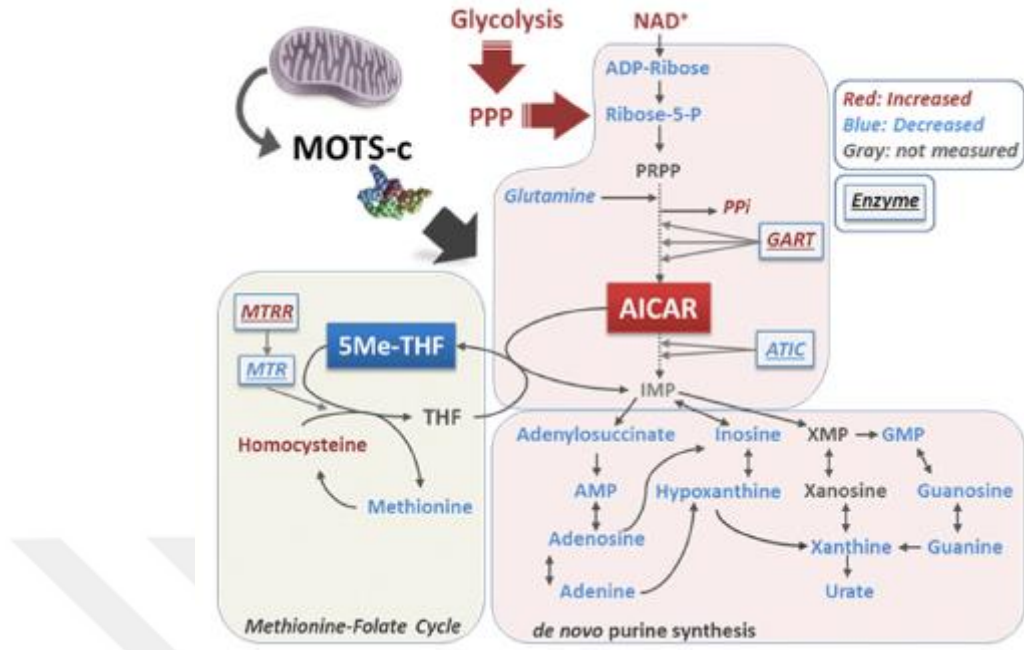
Humaninin bulunmasıyla yeni sORF'ların da olabileceği üzerine yapılan çalışmalarda ise 12S rRNA bölgesinde kodlanan, 51 baz çiftlik, 16 amino asitlik MOTS-c (12S rRNA tip-c'nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi) peptidi keşfedilmiştir (Smith ve ark., 2016; Lee ve ark., 2015). Yapılan in silico çalışmalarda MOTS-c peptidinin nükleer genom tarafından sitoplazmada transle edilmesi gerektiği görülmüştür (Şekil 5). Bunun sebebi, mitokondriyal genomda nükleer genomdan farklı olarak peş peşe sıralı başlama ve stop kodonlarının bulunmasından kaynaklı translasyon mtDNA tarafından gerçekleştiği durumda 16 amino asitlik bir MOTS-c peptidin elde edilemeyecek olmasıdır (Thevis ve Schänzer, 2016; Cobb ve ark., 2016).



Şekil 5: MOTS-c'nin açık okuma çerçevesi (Lee ve ark., 2015).

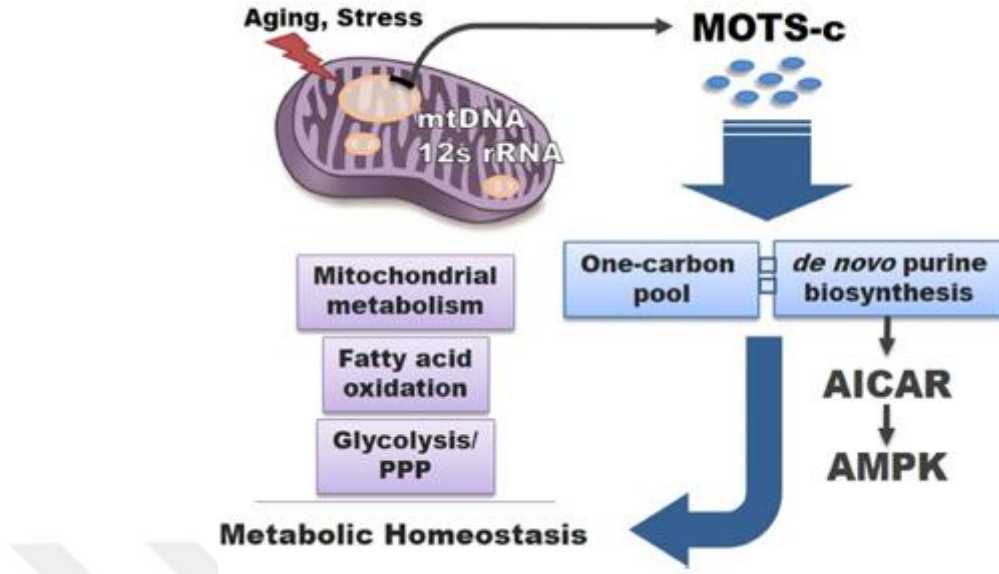
4.4 AMPK Yolağı, MOTS-c ve NASH Etiyopatogenezi Arasındaki İlişki

İlk vuruşa konu olan NASH'li hastalardaki insülin direncinin sebebi, iskelet kası hücrelerinin yüksek insülin varlığına rağmen dolaşımdaki yüksek glikozu hücre içine alamamasıdır (Greuter ve ark., 2017). Egzersiz eksikliği ve karbonhidrat ile yağdan zengin diyet sonucu oluşan obezite ise insülin direncinin gelişmesindeki temel etkindir. Egzersizin olmadığı durumlarda, azalan enerji ihtiyacı ile birlikte aktive olamayan AMPK yolağı, oksidatif fosforilasyon ve yağ yıkımının da azalmasına sebep olur (Ming ve ark., 2016). Bu aşamada MOTS-c, düşük AMP ve yüksek ATP seviyelerine rağmen iskelet kası hücrelerinde AMPK yolağını aktive eder ve kan glikoz seviyelerini ayarlar (Santulli, 2015). Yapılan hücre kültürü ve deneysel hayvan çalışmalarında, MOTS-c'nin iskelet kaslarında insülin direnci ve obeziteye karşı koruyucu görev yaptığı gösterilmiştir. MOTS-c peptidinin insülin direnci ve obezite üzerine etkilerinin hangi yolaklar aracılığıyla olduğunu anlamak için yapılan çalışmalar, MOTS-c'nin ilk olarak metiyonin-folat döngüsünü hedef aldığını göstermiştir (Zarse ve Ristow, 2015). Metiyonin-folat döngüsü ve bu döngüye bağlı de nova pürin biyosentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunun MOTS-c tarafından değiştirildiği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2017) (Şekil 6). Metiyonin-folat siklüsünde önemli bir yeri olan 5-metil-tetrahidrofolat (5Me-THF) ve metiyonin seviyelerindeki azalışla birlikte homosistein seviyesinde artışa sebep olan MOTS-c, de nova pürin biyosentezinin inhibe olmasına sebep olur (Zarse ve Ristow, 2015; Kim ve ark., 2017). Bu inhibisyon 5-aminoimidazol-4-karboksamitribonükleotidin (AICAR) birikimiyle sonuçlanır. AICAR'ın birikmesi ile pürinlerde önemli bir azalış görülür.



Şekil 6: MOTS-c'nin metiyonin-folat döngüsü ve de nova pürin biyosentezi üzerindeki etkileri (Lee ve ark., 2015).

AICAR'ın görevi, AMPK yolağını aktive etmek ve bu sayede yağ asidi oksidasyonunu uyarmak, kasların glikoz alımını arttırmak ve ayrıca oksidatif fosforilasyonu artırmaktır (Zhai ve ark., 2017) (Şekil 7). Fakat de nova pürin biyosentezinin inhibe olması bu sentezin öncül metabolitlerinin birikimiyle sonuçlanır. Biriken öncül metabolitler fıdbek mekanizması ile de nova pürin biyosentezini uyarır ve yeniden pürin biyosentezi aktive olur. Aktive olan pürin biyosentezi AICAR'ın azalması ile sonuçlanır (Qin ve ark., 2017). Böylelikle MOTS-c'nin AMPK yolağı aracılığı ile mekanizma üzerinde dengeleyici bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 7: MOTS-c'in metabolik homeostaza etkisi (Lee ve ark., 2015).

MOTS-c'nin insülin direnci üzerindeki bu azaltıcı etkisi ve metabolik dengeleyici özelliğiyle NAFLD'ın iyileşmesinde önemli bir etki yaratabileceğini düşünmekteyiz. AMPK ve fosforlanmış ACC (p-ACC), AMPK yolağının aktive olduğu gösteren en önemli belirteçlerdir. Bu sebeple, MOTS-c'nin etkilerinin görülebilmesi için AMPK ve p-ACC ilk olarak bakılacak moleküllerdir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1 Araştırmada Kullanılan Materyal ve Yöntemler

Öncelikle, HepG2 hücrelerinin kültür ortamında palmitik ve oleik asit uygulayarak hücre içi yağ birikimini artırma yöntemi ile NAFLD'lı hücrelere dönüşmesi sağlanmıştır. NAFLD'lı hücrelere kültür ortamında MOTS-c peptidi ilave edilerek MOTS-c'nin tetiklediği AMPK yolağına AMPK, p-AMPK, ACC ve p-ACC proteinleri aracılığıyla bakılmıştır. Deney düzeneğinde kullanılan tüm kimyasallar ve kitler üretici firmaların talimatlarına göre kullanılmıştır. Tüm çalışmalar 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve uygun ortam koşullarında gerçekleştirilmiştir.

5.1.1 Solüsyon ve Çözeltiler

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 41966-052 Life Technologies, USA):

High Glucose, L-Glutamine ve Pyruvate'tan oluşan besi yeri kontaminasyonun önlenmesi ve ısıtma-soğutma stresine karşı korumak için kullanılmadan önce 50 ml'lik falkon tüplerine 45'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri +4°C'de saklanmıştır.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 31885-049 Life Technologies, USA):

Low Glucose, L-Glutamine ve Pyruvate'tan oluşan besi yeri kontaminasyonun önlenmesi ve ısıtma-soğutma stresine karşı korumak için kullanılmadan önce 50 ml'lik falkon tüplerine 45'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri +4°C'de saklanmıştır.

FBS (Fetal Bovine Serum 10500-056 Life Technologies, USA): Hücrelerin büyümesini kolaylaştırmak için kullandığımız serumu kontaminasyonun önlenmesi ve dondurma-çözme stresine karşı korumak için kullanılmadan önce 50 ml'lik falkon tüplerine 45'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri -20°C'de saklanmıştır.

MOTS-c (Mitochondrial Open reading frame of the 12S rRNA-c PEP95UNMOD Thermo Fisher, USA): 5 mg olarak satın alınan MOTS-c peptidi, 1 mM stok solüsyonu elde edebilmek için 2,3 ml ddH₂O ile sulandırıldıktan sonra kontaminasyonun önlenmesi ve dondurma-çözme stresine karşı korumak için 100 µl olacak şekilde eppendorf tüplere bölüştürülmüştür. Stok ve çalışma çözeltileri -20°C’de saklanmıştır.

Oleik Asit (200797 Santa Cruz Biotechnology USA): 1 gr OA, izopropanol ile son hacim 2 ml olacak şekilde çözülerek 1770 mM stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltilerden 56,5 µl alınarak izopropanol ile 2 ml’ye tamamlanmıştır ve 50 mM konsantrasyonunda çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri -20°C’de saklanmıştır.

ORO (Oil Red O 203749 Santa Cruz Biotechnology, USA): Oil Red O stok solüsyonunu hazırlamak için 300 mg Oil Red O son hacim 100 ml olacak şekilde izopropanol içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 40°C’de 4 saat süre ile çözdürülmüştür ve ardından oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Çalışma çözeltisi hazırlamak için 15ml’lik tüpe 9 ml ORO stok çözeltisinden konularak üzerine 6 ml ddH₂O konulmuş ve oda sıcaklığında 10 dk beklenildikten sonra 20 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek kullanılmıştır. Çalışma çözeltisi her uygulamada taze olarak hazırlanmıştır.

Palmitik Asit (203175 Santa Cruz Biotechnology USA): 1 gr PA, izopropanol ile son hacim 5,45 ml olacak şekilde 60°C’de manyetik karıştırıcı üzerinde çözdürülerek 715,6 mM konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanmıştır. 715,6 mM konsantrasyonundaki stok çözeltilerden 699 µl alınarak izopropanol ile 2 ml’ye tamamlanmıştır. Böylece 250 mM konsantrasyonunda 2. stok çözelti hazırlanmıştır. 250 mM konsantrasyonundaki 2. stok çözeltilerden 400 µl alınarak izopropanol ile 2 ml’ye tamamlanmış ve 50 mM konsantrasyonundaki çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri +4°C’de muhafaza edilmişlerdir.

Paraformaldehit (253236B, Santa Cruz Biotechnology, USA): Fiksasyon aşamasında kullanılan %4 Paraformaldehit-PBS çözeltisi için 4 gr paraformaldehit son hacim 100 ml olacak şekilde 1X PBS ile çözdürülmüştür. Çözelti manyetik

karıştırıcı üzerinde 50°C’de paraformaldehit tamamen çözülene kadar karıştırılmıştır. Karışım 50 ml’lik falkon tüplere paylaştırılarak +4°C’de 1 yıl süre ile muhafaza edilmiştir.

PBS (Phosphate Buffered Saline, Life Technologies, USA): 10X konsantrasyonunda ticari olarak satın alınan PBS, hücreleri atık ve ölü hücrelerden temizlemek için 1X konsantrasyonda ddH₂O ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan PBS, kontaminasyonun önlenmesi ve ısıtma-soğutma stresine karşı korumak için kullanılmadan önce 50 ml’lik falkon tüplerine 45’er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri +4°C’de saklanmıştır.

Pen-Strep Antibiotic (Life Technologies, USA): Hücrelerin büyümesini sırasında bakteri kontaminasyonunu önlemek için kullandığımız antibiyotik karışımını kontaminasyonun önlenmesi ve dondurma-çözme stresine karşı korumak için kullanılmadan önce 15 ml’lik falkon tüplerine 10’ar ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri -20°C’de saklanmıştır.

Taze DMEM hazırlanışı: Kültürde kullanılan tüm besi yerleri, 50 ml’lik tüplere paylaştırılmış 45 ml DMEM üzerine 5 ml FBS ve 500 µl Pen-Strep Antibiotic eklenmesiyle hazırlanmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri +4°C’de saklanmıştır.

Trypsin-EDTA (25200-056 Life Technologies, USA): %0,25 konsantrasyonunda ticari olarak alınan Trypsin-EDTA içerisinde, indikatör olarak phenol red bulunmaktadır. Kontaminasyonun önlenmesi ve dondurma-çözme stresine karşı korumak için kullanılmadan önce 15 ml’lik falkon tüplerine 10’ar ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Stok ve çalışma çözeltileri -20°C’de saklanmıştır.

5.1.2 HepG2 Hücre Kültürü

Kültüre alınmış hücreler üzerine yapılan tüm uygulamalarda sıcaklık stresinin olumsuz etkisinin ortadan kaldırılması için tüm malzemeler etüvde 37°C’ye getirilerek kullanılmıştır. Etüvden ve diğer ortamlardan kabin içine getirilen tüm solüsyon, malzeme, ekipman ve kültür kapları %70’lik etil alkol ile temizlenerek öncesinde 15 dk UV ışığa maruz bırakılıp %70’lik etil alkol ile temizlenmiş kabin içerisine alınmışlardır. Aseptik teknikler tamamen uygulanmıştır. Kabin içi ve kültür

odası gerekli görüldüğü her zaman UV lamba ile ve %70'lik etil alkol uygulaması ile dezenfekte edilmiştir.

Ticari olarak alınan HepG2 hücreleri 100 mg/ml penisilin, 100 U/ml streptomisin, 2,5 mM L-glutamin, 3,7 g/L NaHCO₃, 1% zorunlu olmayan aminoasit ve %10 fetal bovine serum (FBS) içeren DMEM (25 mM glikoz) ortamında 37°C ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Gün aşırı olarak taze medyum eklenerek hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması beklenmiş ve %80 yoğunluğa ulaşan HepG2 hücreleri 24 kuyulu platelere ekilmiştir. Hücrelerin pasajlanması yoğunlukları yeterli seviyeye ulaşınca yapılmıştır. Pasajlama işlemi HepG2 hücrelerinin PBS ile 3 kere yıkanması ve sonrasında tripsin muamelesi ile yapılmıştır. Tripsin sayesinde kolajenle kaplı yüzeyden ayrılan hücreler iki ayrı platee ekilmiştir.

5.1.3 Serbest Yağ Asitleri Uygulanması

Hücreler öncelikle düşük glikoz içeren DMEM ortamına tabii tutulmuştur. 24 saat düşük glikoz içeren DMEM ortamındaki açlığın ardından hücrelere palmitik asit (PA) ve oleik asit (OA) uygulaması 1:2 oranında yapılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca serbest yağ asitleri ile 1 mM (0,66mM OA + 0,33mM PA) muamele edilmiştir. Bu sayede HepG2 hücrelerinde hücre içi yağ birikimi artmış ve yağ damlacıkları oluşmuştur.

5.1.4 Oil Red O Boyama

HepG2 hücrelerinin NAFLD'lı hücrelere dönüşümünün belirlenmesi için hücreler Oil Red O (ORO) ile boyanarak incelenmiştir. Hücreler 3 kere PBS ile yıkandıktan sonra 30 dk %4'lük paraformaldehit ile fiks edilmiştir. Fiksasyondan sonra Oil Red-O ile 20 dk boyanarak distile su ile yıkanmışlardır. Boyamanın öncesinde ve sonrasında mikroskopi ile gözlemlenen hücreler, lipid birikiminin kantitatif analizi için kültür kaplarına 1 ml izopropanol eklenerek 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüşlerdir.

5.1.5 MOTS-c Uygulanması

MOTS-c peptidinin AMPK yolağını etkileyip etkilemeyeceğini gözlemlemek için FFAs uygulanmış ve hücre içi yağ damlacıkları mikroskop altında gözlemlenmiş HepG2 hücrelerine ve kontrol HepG2 hücrelerine 10 μ M konsantrasyonunda MOTS-c peptidi 24 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulama için iki ayrı medium hazırlanmıştır. Öncelikle ticari olarak satın alınan MOTS-c peptidi ultrapure ve otoklavlanmış ddH₂O ile sulandırıldıktan sonra kontrol grubu hücreleri için complete DMEM'in içerisine 10 μ M olacak şekilde hazırlanırken FFAs uygulanmış hücrelere verilirken 1 mM konsantrasyonunda OA ve PA karışımı içeren complete DMEM'e yine 10 μ M olacak şekilde ilave edilerek hazırlanmıştır. Kontrol hücreleri için 24,75 ml hazırlanmış DMEM üzerine 250 μ l MOTS-c ilave edilmiştir. Yağlı hücreler için ise 24,75 ml hazırlanmış serbest yağ asitleri içeren DMEM üzere 250 μ l MOTS-c ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan DMEM'ler hücreler PBS ile 3'er kez yıkandıktan sonra uygun hücre tiplerine göre kuyulara 1'er ml eklenmiş ve 1 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

5.1.6 Hücre Sayımı

"Muse™ Count & Viability Kit" kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. Tüm ön hazırlık ve uygulama prosedürü sağlayıcı firmanın talimatlarına göre yapılmış ve elde edilen sonuç diğer çalışmaların zeminini oluşturmuştur.

5.1.7 Western Blot

HepG2 hücrelerinden proteinler "RIPA Lysis and Extraction Buffer" kitinin prosedürüne göre izole edilmiş ve "PIERCE BCA Protein Assay" kitinde belirtilen analiz yöntemi ile proteinlerin miktar tayini yapılmıştır. Proteinlerin hazırlanması için kullanılan "4X Laemmli Buffer"a 1:10 oranında β -merkaptoetanol ilavesi yapılmıştır. Proteinler hazırlanan bufferdan 1:4 oranında kullanılarak kaynayan suda 5 dakika denatüre edilmiştir. Ardından buza alınmıştır. Bu sayede proteinlerin kuaterner yapısının bozulması ve jelde tek bir hizada yürümleri sağlanmıştır.

Tablo 1: Western Blot jel komponentleri ve miktarları

	%10'luk Ayırma Jeli	%5'lik Yığma Jeli
dH2O	3.96 ml	2.7 ml
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2.5 ml	-
1 M Tris (pH: 6.8)	-	500 µl
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	3.34 ml	670 µl
%10 SDS	100 µl	40 µl
%10 APS	100 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Eşit miktarda protein Tablo 1’de gösterildiği şekilde hazırlanan %10’luk ve %7,5’luk SDS-PAGE’lere her bir kuyuya maksimum 20 µl gelecek şekilde yüklenerek 120 V’ta 10 dakika ardından 100 V’ta 100 dakika yürütülmüştür. Jellerin yürütülmesi sırasında “Tris-Glycine SDS Running Buffer” solüsyonu tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

Yürümenin bitmesine 1 saat kala 40 ml “Tris-Glycine Transfer Buffer”, 200 ml metanol ile 1 L suya tamamlanarak hazırlanmış, +4°C’de bekletilmiştir. Aynı zamanda filter pedler ve süngerler hazırlanan transfer buffer ile ıslatılarak +4°C’de inkübasyona bırakılmıştır. “PVDF Transfer Membran”ların aktive edilmesi için membranlar transferden önce 10 dk %100’lük metanol içerisinde bekletilmiştir. Yürütülen jeller ıslak transfer yöntemiyle “PVDF Transfer Membran”lara “Tris-Glycine Transfer Buffer” kullanılarak aktarılmıştır.

%10’luk jelde bakılacak olan β-aktin, AMPK ve p-AMPK için ıslak transfer 90 V’ta 100 dk olarak gerçekleştirilmiştir. %7,5’luk jelde bakılacak olan ACC ve p-ACC için ise 30 V’ta +4°C’de gece boyu transfer yapılmıştır. Transferlerin ardından membranlar “Ponceau s” solüsyonu ile boyanarak aktarımın gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Aktarımın gerçekleştiği görüldükten sonra “WesternBreeze Kit” kullanılarak geri kalan adımlar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak membranların bloklanması için kitin içindeki talimata uygun olarak hazırlanan blocking solüsyonu ile membran 1 saat shakerda çalkalanmıştır. 1 saatin ardından

blocking solüyon döküldü ve membranlar 20 ml distile su ile 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkama adımı sonrası kitin talimatına uygun olarak primer antikor solüsyonu hazırlanıp 1:1000 dilüsyon olacak şekilde membranlar shakerda +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün primer antikor solüsyonu dökülüp membranlar kit içerisinde bulunan 16X'lik yıkama solüsyonu 1X'e seyreltilerek oluşturulan çalışma solüsyonu ile 3 kere 5'er dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkamaların ardından membranlar kit içerisinde bulunan sekonder antikor solüsyonundan 10 ml ile 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir önceki adımdaki yıkama sekonder antikor uygulaması sonrasında da aynı şekilde uygulanmıştır. Ardından membranlar distile su ile 2 kez 2'şer dakika daha yıkanmıştır. Yıkamalar bitince membranlar kitin içerisindeki kemilüminisans substrattan 2,5 ml kullanılarak 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra "ChemiDoc" cihazı ile görüntüleme yapılmıştır.

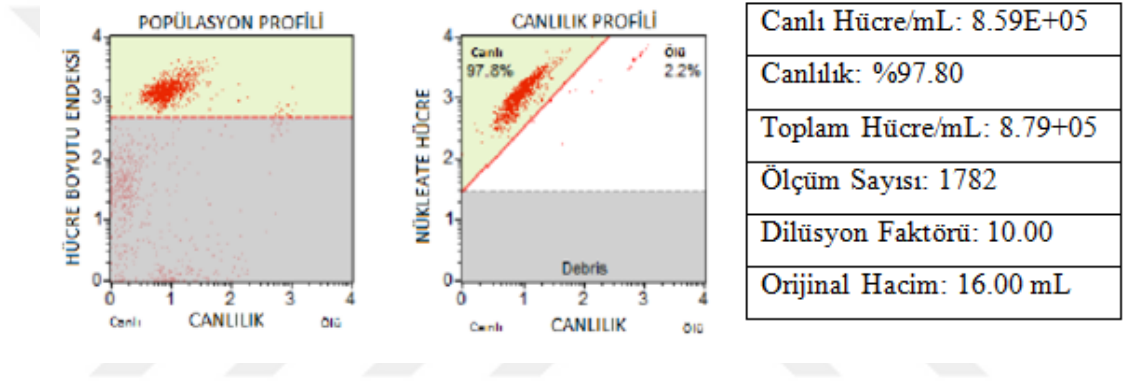
5.2 Sonuçların Analizi

İkiden fazla grubun sürekli değişkenlerine ait verilerin karşılaştırılmasında parametrik dağılım gösterenler "One Way ANOVA" testi, ikiden az olanlarında ise "Independent Sample t" testi kullanıldı. Tüm bu istatistiksel çalışmalar için p değerinin <0.05 olması durumunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

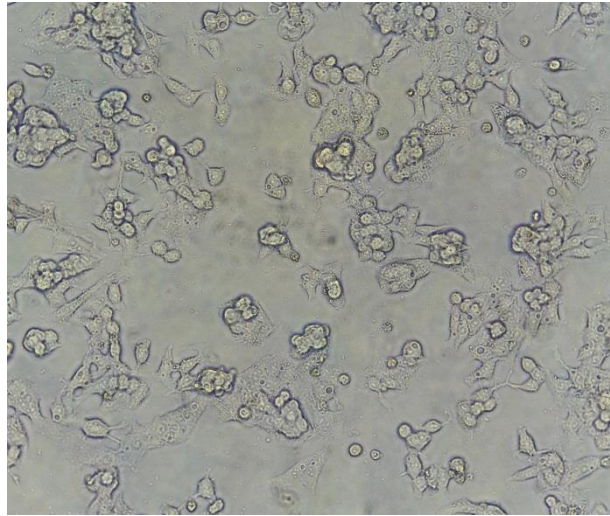
6.1 Hücre Canlılık ve Sayım Analizleri

Hücre Canlılık Analizleri Muse® Count & Viability Assay Kit kullanılarak yapılmıştır. Sayısal ve grafiksel veriler Muse Cell Analyzer cihazının yazılımı olan Muse 1.4 Analysis yazılımı ile elde edilmiştir.

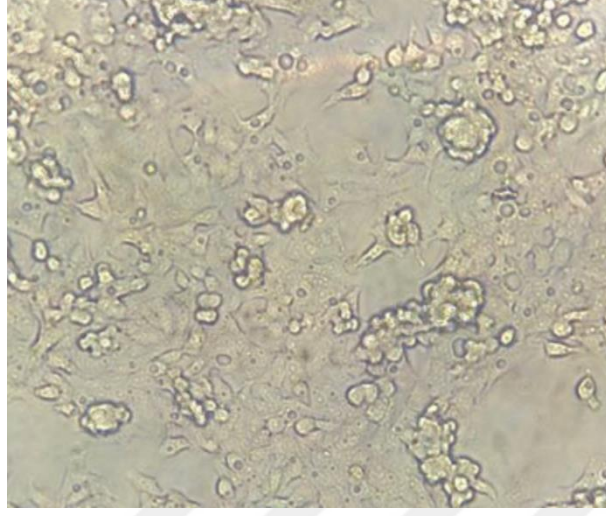


Şekil 8: Kontrol grubu canlılık ve sayım analizi (Şekil yazıları Türkçeleştirilmiştir).

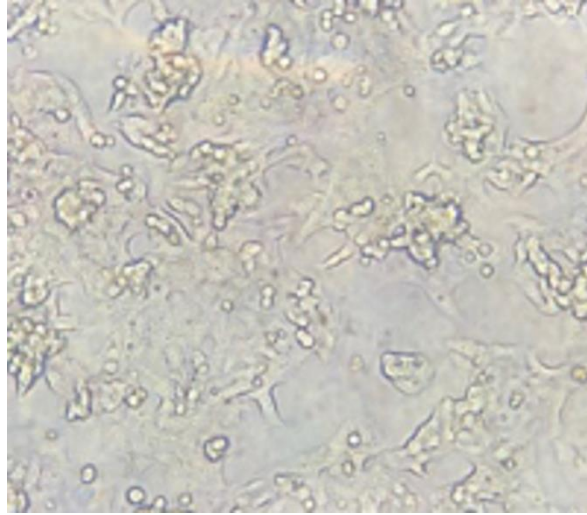
6.2 Mikroskopik Analizler



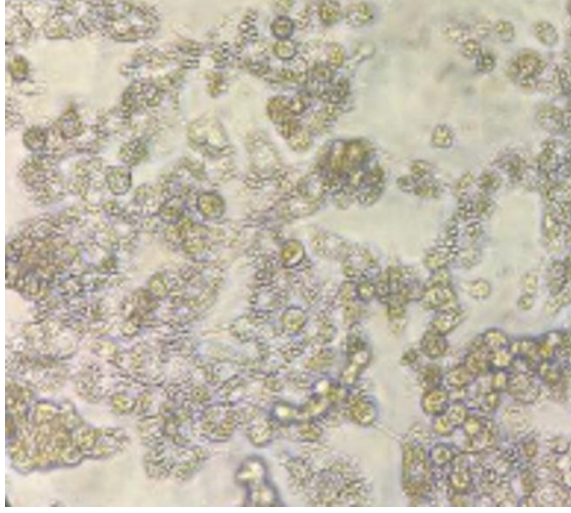
Resim 1: Büyüme fazındaki HepG2 hücreleri. 20X Oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



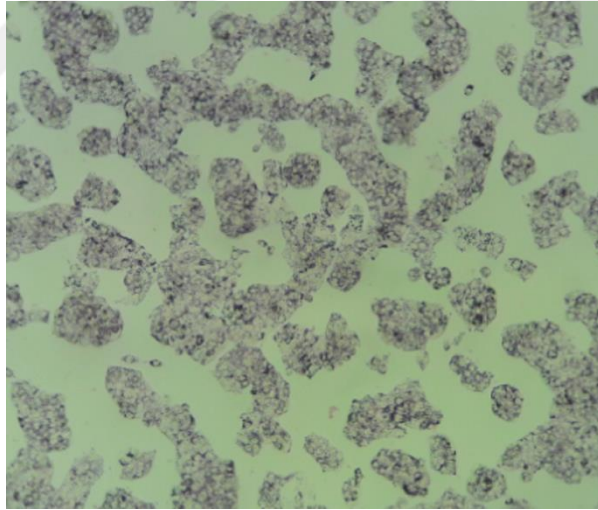
Resim 2: Kültür ortamındaki Kontrol HepG2 hücreleri. 20X Oküler kullanarak çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



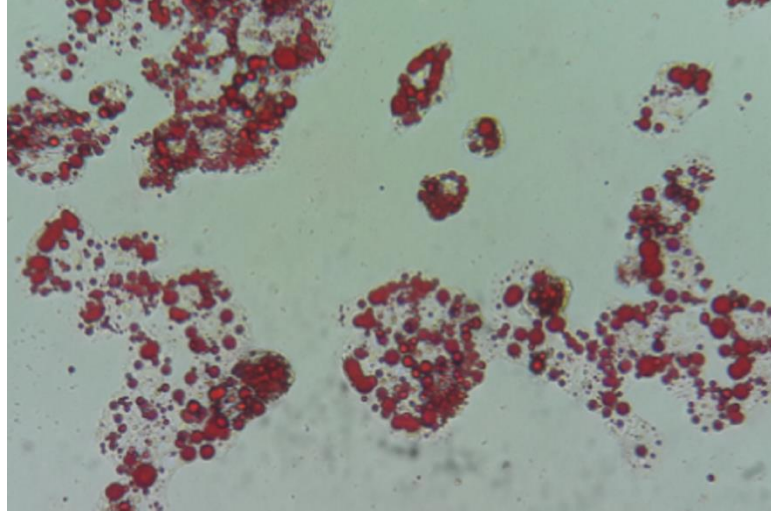
Resim 3: 24 saatlik açlığa maruz bırakılan HepG2 hücreleri. (Low Glucose DMEM ortamında bekletildiler.) 20X Oküler kullanarak çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



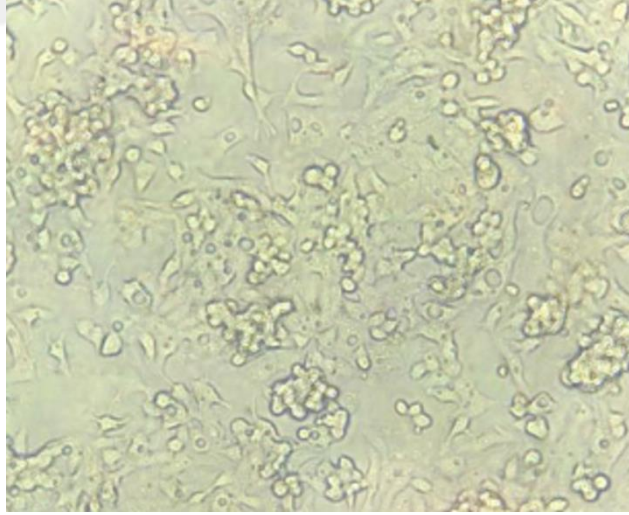
Resim 4: 24 saat FFAs uygulanan HepG2 hücrelerinin mikroskopi görüntüsü. 20X oküler kullanılarak çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



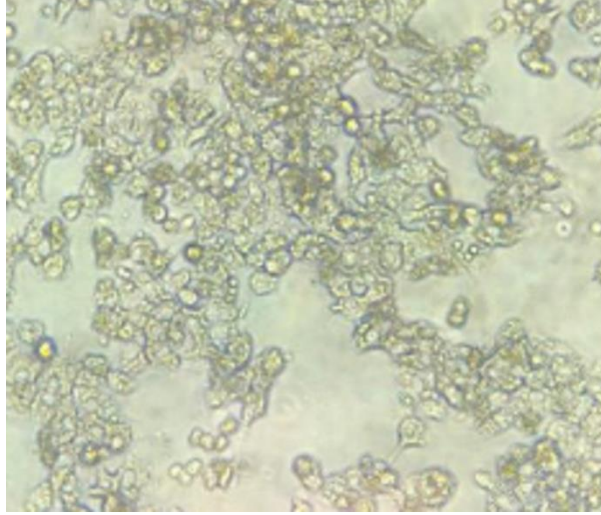
Resim 5: Kontrol grubu HepG2 hücrelerinin fiksasyon sonrası ORO ile boyanmasının mikroskopi görüntüsü. 20X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



Resim 6: 24 saat FFA uygulanmış HepG2 hücrelerinin fiksasyon sonrası ORO ile boyanmasının mikroskopi görüntüsü. 10X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



Resim 7: 24 saat boyunca 10 μ M MOTS-c uygulanan kontrol grubu hücreleri. 20X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.



Resim 8: 24 saat boyunca 10 μ M MOTS-c uygulanan önceden FFAs ile muamele edilmiş HepG2 hücreleri. 20X oküler ile çekilmiştir, fotoğraf dijital olarak büyütülmüştür.

6.3 Hücre İçi Lipit Analizleri ve ORO Analizleri

Hücreler farklı uygulamalar yapıldıktan sonra fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben ORO boyama yapılmış, 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik analiz yapılmıştır.

Tablo 2: Kontrol grubu hücreleri ve FFAs uygulaması yapılan hücrelerin ORO boyama sonucunda 540 nm dalga boyunda ölçülen değerleri.

	Kontrol	FFAs		Kontrol	FFAs
1. örnek	0,389	0,633	5. örnek	0,425	0,596
2. örnek	0,440	0,607	6. örnek	0,467	0,641
3. örnek	0,400	0,606	7. örnek	0,412	0,646
4. örnek	0,372	0,618	8. örnek	0,402	0,574
Ortalama	Kontrol	0,413375	Ortalama	FFAs	0,615125

Tablo 3: Tablo 2'nin istatistiksel analiz sonucu gruplar arasındaki p değerleri ve anlamlılık düzeyleri.

Karşılaştırılan Gruplar	p Değeri	Anlamlılık
Kontrol Grubu-FFAs	0.0059	Çok Yüksek

6.4 Yağlanma Sonrası MOTS-c Uygulaması

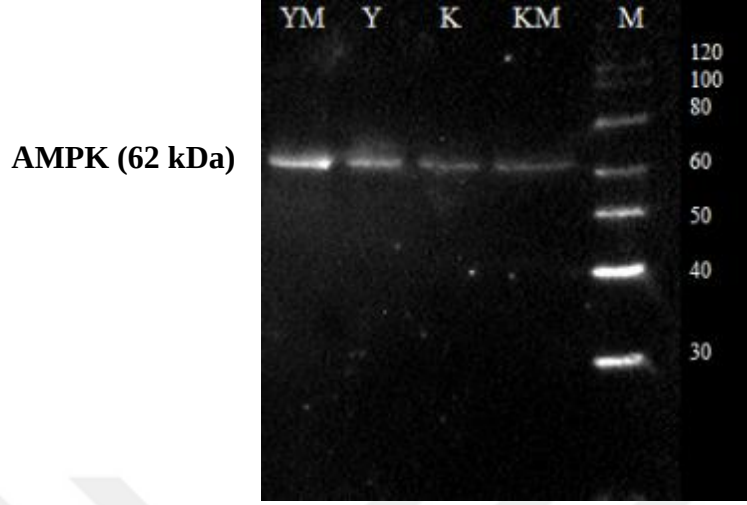
Kontrol grubu hücreleri direkt olarak 10 μ M MOTS-c ile 24 saat muameleye maruz bırakılırken serbest yağ asitleri uygulanan hücreler öncelikle ORO boyama ile yağlanmaları teyit edildikten sonra MOTS-c muamelesine tabi tutulmuşlardır. 24 saatlik MOTS-c uygulaması ardından mikroskopik olarak incelenen hücrelerde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. MOTS-c muamelesinin ardından kontrol grubu ve yağlı grup hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere MOTS-c ile muamele edilmemiş bir grup kontrol ve bir grup yağlı hücre hattından da protein izolasyonu yapılmıştır.

6.5 Pierce BCA Protein Assay Sonuçları

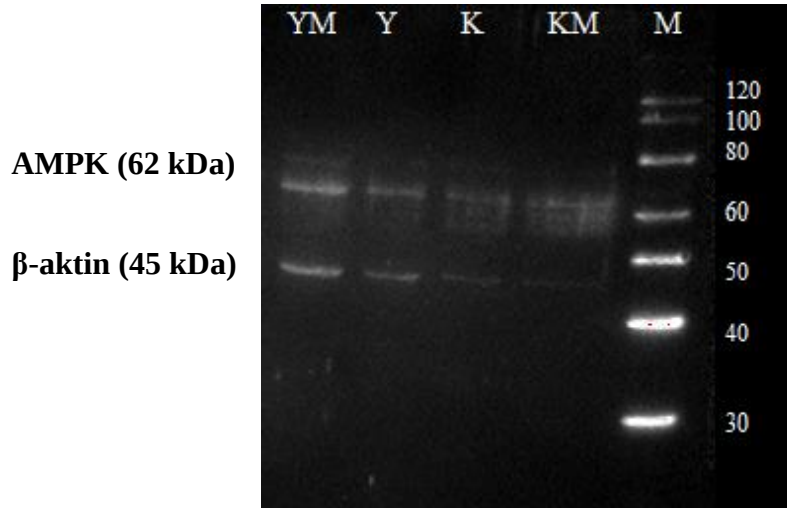
Tablo 4: Kontrol grubu hücreleri, 24 saat FFAs uygulanan HepG2 hücreleri, 24 saat 10 μ M MOTS-c uygulanan kontrol grubu hücreleri ve 24 saat 10 μ M MOTS-c uygulanan yağlı grup hücrelerine ait BCA Protein Assay'ın 562 nm dalga boyunda ölçülen değerlerinin μ g/mL olarak hesaplanmış sonuçları.

	μ g/mL
Kontrol HepG2	1004,767238
FFAs uygulanan HepG2	776,33909
Kontrol HepG2 + 10 μ M MOTS-c	1559,93848
FFAs uygulanan HepG2 + 10 μ M MOTS-c	1418,5985

6.6. Western Blot Sonuçları

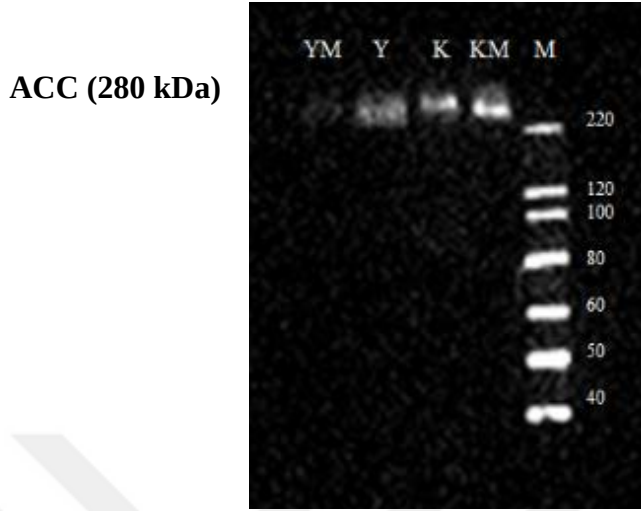


Resim 9: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 20 µg olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %10'luk jel kullanılarak AMPK bakılmıştır. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, ImageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)

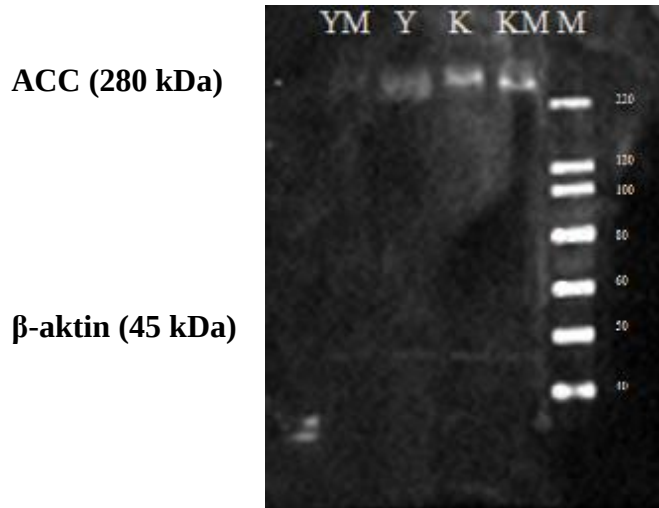


Resim 10: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 20 µg olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %10'luk jel kullanılarak AMPK bakılmış olan membranın

üzerine tekrar β -aktin bağlanarak elde edilmiştir. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, İmageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)



Resim 11: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 15 μ g olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot membran görüntüsü. %7,5'luk jel kullanılarak ACC bakılmıştır. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, İmageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)



Resim 12: Kontrol grubu (K), FFAs uygulanan grup (Y), MOTS-c uygulanan kontrol grubu (KM) ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup (YM) hücrelerinden elde edilen 15 μ g olarak yüklenen proteinlerle yapılan Western Blot

membran görüntüsü. %7,5'luk jel kullanılarak ACC bakılmış olan membranın üzerine tekrar β -aktin bağlanarak elde edilmiştir. Görüntü ChemiDoc cihazı ile alındı, İmageJ ile yüklendi. (M: Protein Standart)



7. TARTIŞMA

NASH, daha önce de belirtildiği üzere gelişiminden önemli oranda insülin direnci ve obezitenin sorumlu olduğu bir hastalıktır (Reccia ve ark., 2017). Öte yandan, NASH etiyopatogenezi henüz tam anlamıyla aydınlatılabilmiş değildir. Bu sebeple, NASH'in gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülen mekanizmaları araştırmaya yönelik çalışmalar hastalığın patogenezinin açığa kavuşturulması için önemlidir. Bu mekanizmaların en önemlilerinden biri de AMPK yolağıdır (Smith ve ark., 2016).

AMPK yolağı ATP üreten birçok yolağın aktive olmasına, ATP tüketen birçok yolağın ise inhibe olmasına sebep olur. ATP üretimini artırmak için kas hücrelerine glikoz alımını artırır; yani karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinden sorumludur. AMPK yolağı aynı zamanda asetil-CoA karboksilazı (ACC) fosforlayarak inhibe eder ve böylelikle yağların mitokondrilerden içeri alımını sağlayarak β oksidasyonun başlamasına sebep olur. Bu özelliği ile de yağ metabolizmasını düzenlemektedir (Kim ve ark., 2016). Tüm bunlar NASH hastalığının patogenezinde AMPK yolağının etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Son yıllarda mitokondrilerin sinyal mekanizmalarının aydınlatılması için yapılan çalışmalarda, kısa açık okuma çerçevelerinin (sORF) araştırılması, mtDNA'nın 12S rRNA bölgesinde kodlanan, 51 baz çiftlik, 16 amino asitlik MOTS-c (12S rRNA tip-c'nin mitokondriyal açık okuma çerçevesi) peptidinin keşfedilmesine sebep olmuştur (Lee ve ark., 2015). Yeni bulunan bu peptidin iskelet kaslarını hedef alarak insülin direnci ve obeziteye karşı koruyucu görev yaptığı yapılan hücre kültürü ve hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir. MOTS-c peptidinin düşük AMP ve yüksek ATP seviyelerine rağmen iskelet kası hücrelerinde AMPK yolağını aktive ederek kan glikoz seviyelerini düzenlediğini söyleyebiliriz.

MOTS-c'nin insülin direnci üzerindeki bu azaltıcı etkisi ve metabolik dengeleyici özelliğiyle NAFLD'ın iyileşmesinde önemli bir etki yaratabileceğini düşünerek in vitro NAFLD modelinde, MOTS-c peptidinin yağlanmayı azaltan bir

etkisinin olup olmadığını tespit etmeyi amaçladık. Bu sayede, literatürde ilk kez MOTS-c peptidinin NAFLD üzerine etkisi ile ilişkili bir çalışma düzeneği kurmuş olduk.

İlk olarak, ticari olarak satın alınan HepG2 hücrelerinden in vitro NAFLD modeli oluşturulmuştur. Bunun için öncelikle hücre içerisine yağ alımını kolaylaştırabilmek amacıyla hücreler, düşük glikoz içeren ortamda 24 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. Ardından kültür ortamındaki HepG2 hücrelerine 1:2 oranında palmitik ve oleik asit karışımı toplamda 1 mM (0,33 PA; 0,66 OA) FFAs olacak şekilde 24 saat boyunca uygulanmıştır. 24 saatlik uygulamanın ardından hücrelerdeki yağ birikimi mikroskopik incelemeler ve ORO boyama ile gösterilmiştir (Resim 4, Resim 6). Kontrol grubu ve FFAs uygulanmış hücrelerde yapılan ORO boyama sonucunda 540 nm dalga boyunda ölçülen değerler (Tablo 2) karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak çok yüksek anlamlılık bulunmuştur (Tablo 3). NASH'in bir diğer belirteci hücre içi yağ damlacıklarının ve balonlaşmanın gözlenmesidir ve bu durum Resim 4'te görülebilmektedir. Bu sayede HepG2 hücrelerinde 1 mM'lık palmitik ve oleik asit karışımı ile başarılı bir şekilde in vitro NAFLD modeli oluşturulmuştur ($p=0,0059$). NASH'in diğer belirteçlerinin (Mallory cisimcikleri, iltihabi infiltrasyon, mega-mitokondri ve fibrozis) 2 boyutlu kültür ortamında gösterilmesi mümkün olmamaktadır. Yeni gelişen 3D kültür ortamlarında bu belirteçlerin de gözlemlenebilmesinin hastalığın etiyopatogenezinin aydınlatılması için çok daha fazla katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

İn vitro NAFLD modeli oluşturulduktan sonra hem kontrol grubu hem de FFAs uygulanan hücrelere 10 μ M konsantrasyonunda MOTS-c peptidi uygulanmıştır. Buradaki amacımız, zaten insülin direnci ve obeziteye karşı koruyucu görev yaptığı bilinen MOTS-c peptidinin, yağlanma oluştuktan sonra yağlanmaya herhangi bir etkisi olup olmadığını gözlemlemektir. MOTS-c peptidi uygulanmasının ardından iki hücre grubu da mikroskopik olarak incelenmiş (Resim 7, Resim 8), MOTS-c peptidinin hücre canlılığı üzerine herhangi bir toksik etkisi olmadığı yapılan hücre canlılığı analizi ile gösterilmiştir ($p<0,05$).

MOTS-c peptidinin insülin direnci ve obeziteye karşı koruyucu etkisini AMPK yolağı aracılığı ile gösterdiği düşünülmektedir. Aynı sebeple “MOTS-c peptidi, yağlanmayı AMPK yolağını kullanarak mı azaltıyor?” sorusunun cevabını bulabilmek için HepG2 hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin miktar tayini yapıldığında 562 nm dalga boyunda ölçülen değerler $\mu\text{g/mL}$ olarak Tablo 4’te verilmiştir. Buradaki değerler kullanılarak her bir grup hücreden (kontrol grubu, FFAs uygulanan grup, MOTS-c uygulanan kontrol grubu ve MOTS-c uygulanan FFAs uygulanmış grup) eşit miktarda protein olacak şekilde kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda karşılaştırma yapabilmek için proteinlerin eşit miktarlarda yüklenmesi gerekmektedir. Proteinlerin yükleneceği iki ayrı konsantrasyonda jel hazırlanmıştır. Bunlardan biri %10’luk iken diğeri %7,5’luktur. Bunun sebebi; AMPK, p-AMPK ve β -aktin proteinlerinin boyut olarak ACC ve p-ACC proteinlerine göre daha küçük olmasıdır (sırasıyla; 62 kDa, 62 kDa, 45 kDa, 280 kDa ve 280 kDa). Bu yüzden AMPK, p-AMPK ve β -aktin %10’luk (Resim 9, Resim 10), ACC ve p-ACC ise %7,5’luk (Resim 11, Resim 12) jeller kullanılarak elde edilmeye çalışılmıştır. Yine aynı sebeple AMPK, p-AMPK ve β -aktin için ıslak transfer 90 V’ta 100 dk olarak gerçekleştirilirken ACC ve p-ACC için 30 V’ta +4°C’de gece boyu transfer yapılmıştır. Bu sayede büyük proteinlerin jelden membrana aktarımı sağlanmıştır. β -aktin bir housekeeping proteindir, her hücrede salgılanmaktadır. Bu sebeple proteinlerin eşit miktarda kullanılıp kullanılmadığını teyit amaçlı kullanılmıştır. AMPK ve ACC proteinlerine bakıldıktan sonra aynı membran üzerine β -aktin bağlanarak karşılaştırılma yapılmıştır (Resim 10, Resim 11). Yapılan tüm Western Blot sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuca rastlanmamıştır. Eşit miktarlarda protein yüklenmesine rağmen β -aktin seviyelerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu durum yapılan BCA Protein Assay’in yağdan veya MOTS-c’den kaynaklı background vermesinden kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda Western Blot analizlerinin yorumlanamamasının bir diğer sebebi de AMPK ve ACC proteinlerinin aktif formları olan p-AMPK ve p-ACC proteinlerinin gözlemlenememiş olmasıdır. Bu proteinlerin gözlemlenememesinin ilk sebebi yüklenen protein miktarlarının az olması olabilir. Proteinlerin aktif formları hücre içerisinde az miktarda bulunmaktadır. Deney esnasında da az protein yüklenmesi membranda proteinlerin görülememesine sebep olmuş olabilir.

Sonuç olarak, MOTS-c peptidinin yağlanmayı azaltıcı etkisi yaptığımız çalışmalarda gösterilmiştir; ancak MOTS-c'nin AMPK yolağını kullanarak mı yoksa başka yollar aracılığı ile mi bu etkiyi gerçekleştirdiği gözlemlenememiştir. MOTS-c'nin bu etkiyi gerçekten AMPK yolağını hedef alarak gerçekleştirdiğini göstermek amacıyla AMPK yolağında bulunan AMPK ve ACC proteinlerine ve aktif formları olan p-AMPK ve p-ACC proteinlerine Western Blot yöntemi ile tekrar bakılmasının uygun olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca AMPK yolağını direkt olarak etkileyen AICAR ve aktif formu olan p-AICAR da ilerleyen çalışmalarda MOTS-c'nin yolağa etkisini anlamak adına kullanılabilir. Aynı zamanda uygun dozun tespiti için farklı dozlarda MOTS-c uygulanarak deney düzeneği tekrarlanabilir. Biz deney düzeneğimizde yağlanma sonrası MOTS-c peptidi uygulaması yapmıştık. Bu uygulama, yağlanma öncesi ve yağlanma sırasında da MOTS-c uygulanarak 3 farklı fazda gerçekleştirilebilir. Bu sayede MOTS-c'nin koruyucu mu yoksa tedavi edici mi olduğu anlaşılabilir. İlerleyen çalışmalarda, in vivo NAFLD modeli oluşturulan deney hayvanlarında MOTS-c uygulaması yapılabilir.

8. KAYNAKLAR

1. Cobb LJ, Lee C, Xiao J, Yen K, Wong RG, Nakamura HK, Mehta HH, Gao Q, Ashur C, Huffman DM, Wan J, Muzumdar R, Barzilai N, Cohen P. Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are agedependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging* (Albany NY). 2016;8: 796-809.
2. Greuter T, Malhi H, Gores GJ, Shah VH. Therapeutic opportunities for alcoholic steatohepatitis and nonalcoholic steatohepatitis: exploiting similarities and differences in pathogenesis. *JCI Insight*. 2017;2: 95354.
3. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism*. 2016;65: 1096-1108.
4. James OF, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol*. 1998;29: 495-501.
5. Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med*. 2016;48: e224.
6. Kim SJ, Xiao J, Cohen P, Yen K. Subcellular Fractionation for ERK Activation Upon Mitochondrial-derived Peptide Treatment. *J Vis Exp*. 2017;127: 1-5.
7. Kim SJ, Xiao J, Wan J, Cohen P, Yen K. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *J Physiol*. 2017;595: 6613-6621.

8. Lee C, Kim KH, Cohen P. MOTS-c: A novel mitochondrial-derived peptide regulating muscle and fat metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2016;100: 182-187.
9. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim SJ, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R, Cohen P. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* 2015;21: 443-54.
10. Ming W, Lu G, Xin S, Huanyu L, Yinghao J, Xiaoying L, Chengming X, Banjun R, Li W, Zifan L. Mitochondria related peptide MOTS-c suppresses ovariectomy-induced bone loss via AMPK activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;476: 412-419.
11. Moon YA. The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. *Endocrinol Metab.* 2017;32: 6-10.
12. Pagliarunga S, Dehn C.A. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease.* 2016;15: 159.
13. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol.* 2005;42: 928-40.
14. Qin Q, Delrio S, Wan J, Jay Widmer R, Cohen P, Lerman LO, Lerman A. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol.* 2017;17: 34791-5.17.

15. Reccia I, Kumar J, Akladios C, Viridis F, Pai M, Habib N, Spalding D. Non-alcoholic fatty liver disease: A sign of systemic disease. *Metabolism*. 2017;72: 94-108.
16. Santulli G. A Fleeting Glimpse Inside microRNA, Epigenetics, and Micropeptidomics. *Adv Exp Med Biol*. 2015;887: 1-14.
17. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, Steinberg GR. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311: E730-E740.
18. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1410: 103-23.
19. Thevis M, Schänzer W. Emerging drugs affecting skeletal muscle function and mitochondrial biogenesis - Potential implications for sports drug testing programs. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2016;30: 635-51.
20. Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2013;50: R11-R19.
21. Zarse K, Ristow M. A mitochondrially encoded hormone ameliorates obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. 2015;21: 355-6.
22. Zhai D, Ye Z, Jiang Y, Xu C, Ruan B, Yang Y, Lei X, Xiang A, Lu H, Zhu Z, Yan Z, Wei D, Li Q, Wang L, Lu Z. MOTS-c peptide increases survival and decreases bacterial load in mice infected with MRSA. *Mol Immunol*. 2017;92: 151-160.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	TUBA	Soyadı	GÖÇMEN
Doğum Yeri	TURGUTLU	Doğum Tarihi	21.03.1992
Uyruğu	TC	Tel	0539 418 74 90
E-mail	tuuba.toker@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ	2015
Lise	TURGUTLU ANADOLU LİSESİ	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
76,25	86,25							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,60927	82,97719	73,37090
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

EK :