

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

PROTEİN KİNAZ RNA (PKR) İNHİBİTÖRLERİN
ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRES GEÇİREN
PANKREAS HÜCRELERİNDE İNSÜLİN SALINIMI
ÜZERİNE ETKİLERİ

Gülçin ŞARKICI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Abdullah YALÇIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-170559 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
.....Anabilim DalıProgramı
çerçevesinde.....tarafından hazırlanan “.....” başlıklı
tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Üye (T.D.) :

Üye :

Üye :

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Abdullah YALÇIN' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezim için vermiş olduğu değerli değerlendirme ve tavsiyelerinden dolayı tez jürilerim Dr. Öğretim Üyesi. Özlem Bozkurt GİRİT ve Dr.Öğretim Üyesi. Ayşegül YILDIZ hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmama ev sahipliği yapan Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne (ADÜ BİLTEM' e) teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında manevi desteğini hissettiğim, bilgilerini paylaşan Arş. Görevlisi. Umut Kerem KOLAÇ' a, Hatice PİLEVNELİ ve Rabia UYARICI' ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen, yoluma ışık tutan, hayattaki en büyük hazinelerim olan, annem Fatma COŞKUN'a, dayım Mesut COŞKUN'a, kardeşim Burakcan ŞARKICI'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enerji Metabolizmasının Kontrolü	3
2.1.1. Glukoz Metabolizması.....	3
2.2. Diyabet	5
2.2.1. Diyabet Tarihçesi.....	5
2.2.2. Diyabet Sınıflandırılması.....	6
2.3. Diyabet Komplikasyonları.....	7
2.4. Diyabetes Mellitusun İnsidansı ve Epîdemiolojisi	7
2.4.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Etiyopatogenez.....	8
2.5. Pankreas Fizyolojisi.....	8
2.5.1. Pankreatik Beta Hücrelerinin Fizyolojisi	9
2.5.2. Diyabet ve Beta Hücre Apoptozisi	11
2.5.3. İnsülin ve Etkisi	12
2.5.4. İnsülin Salınımının Kontrolü	13
2.5.5. İnsülin Sinyal İletimi	14
2.6. Endoplazmik Retikulum	15
2.6.1. Granüllü Endoplazmik Retikulum.....	16
2.6.2. Granülsüz Endoplazmik Retikulum.....	18
2.7. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	19
2.7.1. PKR	21
2.7.2. Metabolizmada PKR'nın Rolü	26
2.8. UPR Sinyal Yolakları	28

2.8.1. Endoplazmik Retikulum Stres Yolları.....	28
2.8.2. IRE1 Sinyal Yolu	30
2.8.3. ATF6 Sinyal Yolu	30
2.8.4. PERK Sinyal Yolağı.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Kullanılan Hücre Dizileri	33
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	33
3.1.2. Kullanılan Antikorlar ve Oligolar.....	34
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	34
3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar	35
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	35
3.2.2. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği	36
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması.....	36
3.2.4. Diyabetik İlaç Stoklarının Hazırlanması	37
3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmalarını ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanması	37
3.2.5.1. PKR inhibitörlerin 24 saat boyunca hücrelere muamele edilmesi.....	38
3.2.5.2. Beta hücrelerinde ER stres tunicamycin indüklediği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı	38
3.2.5.3. 16 saatte glukozsuz medyum ile sonrasında yüksek glukoza maruz bırakılan hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı	38
3.2.2.4. Lizat yönteminin uygulanması	38
3.3. ELİSA Testi.....	39
3.4. Protein İzolasyonu ve Protein Tayini	40
3.5. Protein Tayini	41
3.6. Western Blot analizi	42
3.7. RNA İzolasyonu	45
3.8. cDNA (komplementer) Sentezi	46
3.9. qPCR Aşaması.....	47
4. BULGULAR	49
4.1. P-eIF2- α İfadesinin Beta Hücrelerinde Protein Düzeyinde Belirlenmesi	49
4.2. Beta Hücrelerinde Spliced Xbp-1 (sXbp-1) mRNA İfadeleri	51
4.3. Beta Hücrelerinde İnsülin Konsantrasyonları	53

5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	73



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4E-BP1	: eIF4E (ökaryotik başlama faktörü 4E)-bağlayıcı protein 1
ATF-4	: Aktivatör transkripsiyon faktörü
Bax	: Apoptoz uyarıcı Bcl2 aile üyesi X proteini
Bcl2	: B hücreli lenfoma 2 (pro ve anti apoptotik etkili gen ailesi)
BSA	: Bovin serum albumin
Ca	: Kalsiyum iyonu
cDNA	: Komplamenter DNA
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplazmik retikül ile ilişkili degradasyon
FBS	: Fetal bovin serum
IRE1	: Inositol gerektiren enzim 1
IRS	: İnsulin reseptor substratı
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
mRNA	: Mesajcı RNA
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PERK	: PKR (RNA'ya bağlı protein kinazı) –ER kinaz ile ilişkili
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Ras	: Küçük GTP bağlayıcı protein
RNA	: Ribo nükleik asit
U.V.	: Ultraviyole ışık
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
XBP-1	: X-box bağlayıcı protein-1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enerji metabolizması.....	4
Şekil 2. Glisemi bozukluklarının etyolojik ve klinik açıdan sınıflaması	6
Şekil 3. Beta hücresi.....	10
Şekil 4. İnsülin salınımının kontrolü	14
Şekil 5. İnsülin sinyal iletimi.....	15
Şekil 6. Endoplazmik retikulumun birbiri ile ilişki halinde bulunan kanal ve kese şekilleri	15
Şekil 7. ER 'nın 3 boyutlu yapısı	16
Şekil 8. Granüllü endoplazmik retikulum. Ribozomlar yeşil renkte gösterilmiş olup protein sentezini gerçekleştirmektedir	17
Şekil 9. Granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomları	18
Şekil 10. ER stres etkileri.....	19
Şekil 11. Endoplazmik stres uyaranlar ve endoplazmik retikulumdaki etkisi	21
Şekil 12. PKR özeti	22
Şekil 13. PKR etkisi ve tepkisi.....	24
Şekil 14. PKR etkileşimleri. I ve II, dsRNA bağlanma alanlarıdır. Kırmızı daireler fosforilasyon kalıntılarını temsil etmektedir	24
Şekil 15. UPR yolakları	29
Şekil 16. Gruplardaki protein bant görüntüleri (görüntüleme cihazı).....	49
Şekil 17. Gruplardaki protein bant görüntüleri (film).....	49
Şekil 18. Gruplardaki β -Tubulin ifadesine göre normalize edilmiş p-eIF2- α ifadeleri ve gruplar arası çoklu karşılaştırma (*Kruskal Wallis H Test).....	50
Şekil 19. Gruplara göre p-eIF2- α / β -Tubulin ifadelerinin oranları.	51
Şekil 20. sXbp-1 ifadelerinin aktine göre normalize edilmiş değerleri.....	52
Şekil 21. sXbp-1 ifadelerin aktine göre normalize edilmiş ve kontrol grubuna kıyasla değerleri.....	53
Şekil 22. Standart grafik.....	54
Şekil 23. İnsülin konsantrasyonları.	54
Şekil 24. Standart grafik.....	55
Şekil 25. İnsülin konsantrasyonları.	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan besiyeri ve kimyasalları.....	33
Tablo 2. Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar ve oligoların listesi.	34
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin listesi.....	34
Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazların listesi.	35
Tablo 5. Elisa kit'in malzemeleri, dilute ve volümleri.	39
Tablo 6. Protein tayini için hazırlanan standart değerleri.....	41
Tablo 7. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların dilüsyon oranları.	45
Tablo 8. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların dilüsyon oranları.	45
Tablo 9. cDNA sentez basamakları ile bu basamaklardaki sıcaklık ve bekleme süreleri. .	46
Tablo 10. qPCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve volümleri.....	47
Tablo 11. Spliced Xbp1 qPCr primerleri (fare ve insan).....	47
Tablo 12. Beta actin mRNA Primer pair.	47
Tablo 13. PCR aşamaları ile bu aşamalardaki sıcaklık miktarları ve bekleme süreleri.	47
Tablo 14. sXbp-1 ifadelerinin aktine göre normalize edilmiş değerleri.....	51
Tablo 15. sXbp-1 ifadelerinin kontrol grubuna kıyasla değerleri.....	52
Tablo 16. Hücrelere uygulanan Tunicamycin miktarlarına göre grupların insülin seviyeleri.....	54
Tablo 17. Hücrelere uygulanan Tunicamycin miktarlarına göre grupların insülin seviyeleri.....	55

ÖZET

PROTEİN KİNAZ RNA (PKR) İNHİBATÖRLERİN ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRES GEÇİREN PANKREAS HÜCRELERİNDE İNSÜLİN SALINIMI ÜZERİNE ETKİLERİ

**Şarkıcı G. 2019, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp
Fakültesi Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019**

Tip 2 diyabet dünyada milyonlarca kişiyi olumsuz etkileyen ve vücutta çeşitli mikro ve makro vasküler komplikasyonlara neden olan bir hastalıktır. Son yıllarda tip 2 diyabetin prevalansının gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli ölçüde artması, hastalığı toplum sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerden biri konumuna getirmiştir. Pankreastaki beta hücrelerinin dejenerasyonu ve bunun sonucunda salgılanan insülin miktarının ihtiyacı karşılayamayarak hiperglisemiye neden olması hastalığın ileriki safhalarında sıklıkla görülür. Beta hücrelerinin dejenerasyonunda Endoplazmik retikulum (ER) stresinin katkısı kabul edilen bir durumdur. PKR stres kinazın diyabet gelişimine negatif katkı yapar ve artan PKR aktivitesinin insülin salınmasında azalmasına yol açmaktadır. Bu çalışmanın amacı ER stres koşullarında in vitro olarak kültüre edilmiş pankreatik beta hücrelerinde PKR inhibitörleri kullanılarak insülin salınımı ve ER stres belirteçlerinin gösterilmesidir. PKR benzeri kinaz PERK/elf2 α 'nın insülin salınmasında azalmasında sebep olduğu bilinmektedir. PKR inhibitörlerin ER stresine maruz kalmış P-elf2- α ifadesinin Beta Hücrelerinde Protein Düzeyinde Belirlenmesinde ER belirteçlerini tespit etmek için western blot ve qPCR analizi yapılmıştır. Diğer bir deney ise hücre içi konstrasyonundaki insülin miktarını tespit etmek için ELİSA testi yapılmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında PKR inhibitörleri ve ER stresine maruz kalması sonucu insülin miktarında artışlar olduğu gözlemlenmiştir ve en yüksek artışı gösteren PKR inhibitörü İmoxin (Tunicamycin yok) olmuştur. Aynı zamanda ER strese maruz kalmış beta hücrelerinde insülin salınımı PKR inhibitörlerinden etkilenmemektedir. Buna rağmen insülin salınımında artış gözlemlenmiştir. Bu çalışma tip 2 diyabette ER stresine maruz kalmış hücrelerde insülin salınımının olumsuz yönde etkilendiğini ve ER stresini engelleyen terapilerin insülin salınımına olumlu katkıları olduğunu işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: ER Stres, İnsülin, PERK/ Elf2 α , PKR, PKR İnhibitörü, Tip 2 Diyabet.

ABSTRACT

THE EFFECT OF PROTEIN KINASE RNA (PKR) INHIBITORS ON INSULIN SECRETION FROM PANCREATIC CELLS DURING ENDOPLASMİK RETİCULUM (ER) STRESS

Şarkıcı G. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Medicine Faculty Medical Biology Program Master Thesis, Aydın, 2019

Type 2 diabetes is a chronic malformation that affects millions of people in the world adversely and causes various micro and macro vascular complications in the body. In recent years, prevalence of type 2 diabetes has increased significantly in developed and developing countries, making the disease one of the most important threats negatively affecting general public health. Beta cell degeneration during the late phases of diabetes and abrupt decrease of insulin secretion capacity of the pancreas has been shown. It is commonly accepted that endoplasmic reticulum stress (ER) contributes to the degeneration of beta cells. PKR is a kinase that is also activated during ER stress response and substantial increase of PKR phosphorylation activity is also involved in insulin resistance and contribute to the progress of diabetes. The aim of this study is to demonstrate that the use of PKR inhibitors on in vitro cultured pancreatic beta cells upon ER stress may decrease the ER stress mediated cell death and cellular degeneration of beta cells. Western blot and qPCR analysis were performed to detect ER markers in protein levels of beta-cells. Another experiment is to determine the amount of insulin in the ELISA test in intracellular construction. In this study, it was observed that insulin secretion increased due to exposure of beta cells to PKR inhibitors and ER stress and the highest increase was PKR inhibitor Imoxin. At the same time, insulin secretion in beta cells exposed to ER stress was not affected by PKR inhibitors. Despite this, an increase in insulin secretion was detected. As a result of this study, it was shown that insulin secretion was negatively affected in cells exposed to ER stress under type 2 diabetes conditions and therapies preventing ER stress had positive contribution to insulin secretion.

Key Words: ER Stress, İnsülin, PERK/Elf2 α , PKR, PKR İnhibitör, Tip 2 Diabetes.

1.GİRİŞ

Diyabet, insülin azlığı ve ya insülin yapısındaki bozulmalar sebebiyle canlıların karbonhidrat, protein ve yağlardan yeterince faydalanamadığı ve devamlı tıbbi bakıma ihtiyaç duyan, kronik metabolizma hastalıklarından biridir. Tip 2 diyabet dünyada milyonlarca kişiyi olumsuz etkileyen ve vücutta çeşitli mikro ve makro vasküler komplikasyonlara neden olan bir hastalıktır. Son yıllarda tip 2 diyabetin prevalansının gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli ölçüde artması, hastalığı toplum sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerden biri konumuna getirmiştir. Aşırı kilo alımı ve obezitenin de diyabete benzer ve onu takip eden şekilde artan prevalansı bu iki durumun birbirleriyle kardiyovasküler hastalık, böbrek yetmezliği ve karaciğer hastalıkları gibi birçok metabolik hastalıkları için bir risk faktörü olarak görülmektedir (Drong ve ark, 2012). Diyabetin en yaygın üç tipi: 1. Tip 1 diyabet daha çok çocuklarda görülmekte ve tipik olarak insülin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. 2. Tip 2 diyabet ise 30'lu yaşlardan sonra görülen insülin direnci ile karakterize bir hastalıktır. 3. Gestasyonel diyabet ise hamilelik döneminde görülen diyabet tipidir.

Tip 2 diyabet tedavisi için hastalığın erken safhalarında sıklıkla görülen insülin direncini giderici ilaçlar kullanılmaktadır (Peters, 2011). Bununla birlikte kısa vadede, hiperglisemiye azaltacak ilaçlarında tedavide etkili olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar bu ilaçlar insülin duyarlılığını arttırıp kan şekeri bir süre kontrol altında tutarsa da, hastalığın ileri safhalarında pankreas beta hücrelerinin dejenerasyonu neticesinde tedavi oldukça zorlaşmaktadır. Bu durumda pankreastan salınan insülin hormonunu arttırmaya yönelik, insülin sekretagog tedavilerine başlanır. Pankreasın insülin üretiminin önemli ölçüde azaldığı durumlarda ise tip 1 diyabette olduğu gibi düzenli olarak insülin tedavisi uygulanır (Peters, 2011). İnsülin tedavisi gerek uygulamadaki zorluğu gerekse hastaların yaşam kalitesine yaptığı olumsuz etkilerden dolayı en son başvuru yöntemlerdendir.

Endoplazmik Retikulum (ER) hücrede, protein sentezi katlanması, lipidlerin sentezlenmesi ve hücre içi kalsiyum dengelerini sağlayan çok önemli bir hücre organelidir. Son yıllarda bu organelin hüce ve organizma için önemi, metabolik hastalıklarda ER stresi seviyelerindeki artışın oluşmasıyla daha iyi anlaşılmıştır (Özcan ve ark, 2004). ER stresi, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucunda oluşan hücresel bir durumdur. Bu durumlarda hücre, unfolded protein response (UPR) adı verilen bir tepki mekanizmasını

işleterek, katlanmamış proteinleri ER lümeninden giderilmesine yönelik önlemler alır. Yine de bu tepkinin, obezite benzeri metabolik bozukluklarda olduğu gibi uzun süre devam ettiği durumlarda, hücrelerin ölümüne yol açması kaçınılmazdır. Bu alanda yapılan yeni araştırmalar diyabetin ileriki safhalarında pankreas beta hücrelerindeki dejenerasyonla ve insülin salınımının durdurulmasıyla sıkı bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Engin ve ark, 2014).

PKR kinazı ER stresi durumunda aktive olan enzimlerden biridir. Temel fonksiyonu ER'daki protein sentezini kontrol eden eIF2 α proteinini fosforilize ederek protein sentezini tamamen durdurmak ve bu şekilde ER stresini kontrol altına almaktır. Fakat çok yüksek PKR aktivitesinin insülin direncini arttırdığı ve bu şekilde diyabetin ilerlemesine katkı yaptığı da bilinmektedir (Nakamura ve ark, 2010).

Bu tezin amacı PKR inhibitörlerini kullanarak pankreas hücrelerinde ER stresine bağlı hücre ölümlerini azaltmak ve bu şekilde pankreasın insülin üretme verimliliğini arttırmaktır. Tez PKR inhibitörlerinin, diyabet tedavisinde; pankreas hücrelerini koruyucu bir araç kullanabileceğini göstermeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enerji Metabolizmasının Kontrolü

Yediğimiz gıdalar, solunum sırasında O_2 tarafından parçalara ayrılarak CO_2 , H_2O bir de kimyasal enerjiye çevrilmektedir. Bu yolla enerji ihtiyacı kazanılır ve gıdaların solunum yoluyla parçalanmasıyla kimyasal enerji görev yapamaz. Bu enerji tam görev yapabilmesi için mekanik enerjiye çevrilmesi gerekmektedir. Vücudumuzda bulunan kaslar bu görevi gerçekleştirmektedir. Gıdadaki maddelerden meydana gelen enerji kasta depolanmakta ve ATP' nin yapımını oluşturmaktadır. ATP, organizmaların enerji yapımı ve deposunu meydana getirmektedir. Aynı zamanda fosfat gruplarından ve adenoinden oluşmaktadır. Yüksek enerjili bağ oluşturan fosfat grupları olmakla birlikte 1 mol ATP'nin yıkılmasından sonra yaklaşık olarak 7-12 kcal enerji meydana çıkmaktadır.

Enerji metabolizması beyine gönderilen mesajlarla düzenlenmektedir. Beyin vücuttan gelen sinyallere göre enerji üretme (katabolizma) veya enerji depolama (anabolizma) yollarını harekete geçirmektedir.

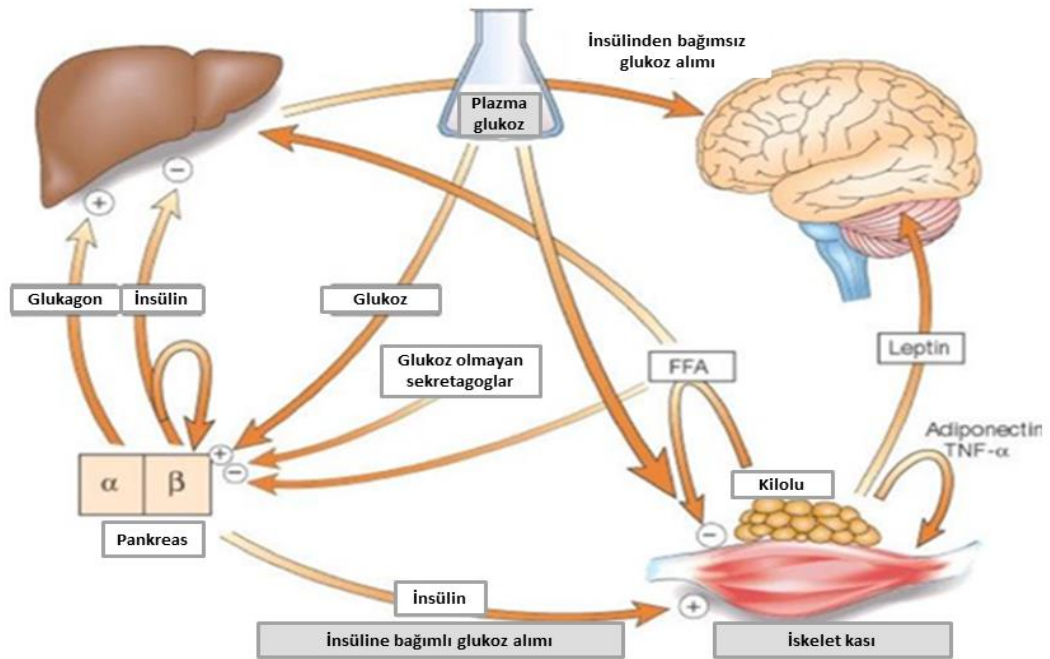
Gıda fazlalığı ve uygun hormonal sinyaller (insülin ve glukagon) sonucunda fazla glukoz adipoz dokularında yağ (trigliserit) olarak depolanır ve yağ dokusu artışı oluşmaktadır.

2.1.1. Glukoz Metabolizması

İnsan vücudu için önemli gereksinimlerden bir tanesi 'Glikoz'dur. Glikoz bir karbonhidrat olup vücudumuzda daha çok ve daha kolay harcanan enerji maddesini oluşturmaktadır. Aynı zamanda vücutta yakılır ve CO_2 , H_2O ve enerjiye dönüşmektedir. Glikozun kandaki yoğun miktarı ise 90-110 mg' dır. Bu miktarın aynı değerler arasında olması gerekmektedir. Artış ve düşmelerde bir takım rahatsız edici durumlara yol açmaktadır. Bu rahatsızlıklardan en çok etkilenen sinir sistemimiz olmaktadır. Örneğin; gözde bulunan retinanın enerjiye olan ihtiyacı glikozla karşılanmaktadır. Glikozun az olması sonucu yani hipoglisemi' ye dayanıklılığı yok denecek kadar az olmaktadır. Kanda bulunan glikozun 70 mg altında olmasıyla sinirli olma hali, zihinsel dikkatsizler, titreme nöbetleri,

huzursuz olma hali gibi bir takım belirtiler meydana gelmektedir. Glikoz yoğunluğu düşerse kasılmalar ve hareketsiz olma hali görülür. Glikozun azalması sonucu ‘Hipoglisemik koma’ adı verilen bir rahatsızlık ortaya çıkar. Bu durumdan glikozun hemen hastaya verilmesi gerekmektedir. Sebebi ise beyindeki sinirler glikozuz olmaya uzun bir zaman dayanıklı olamazlar. Çünkü beyin glikozun azlığına birkaç saat dayanıklı olabilir. Kandaki glikozun düşmesi kadar yükseltmeside tehlikeli olmaktadır. Kandaki glikoz arttığında kanın ozmotik basıncı artmaktadır. Bu da hücrelerde kana doğru sıvının kaybetmesini meydana getirir. Bu durumda yine etkilenen sinir hücreleri olmaktadır. Kandaki glikozun yükselmesi (Hiperglisemi), aynen hipoglisemi de olduğu gibi bilinç kaybına sebep olur. Buna ‘Hiperglisemik koma’ ve ya ‘Diyabetik koma’ denmektedir. Vücutta enerji ihtiyacını karşılayan glikozun fazla olduğu durumda ‘Glikojene’ dönüşür ve bu şekilde depo edilmektedir. Glikojenin karaciğer ve de kaslarda depo edildiği bilinmektedir. İnsülin ise vücutta glikozun kullanılmasıyla ve depolanmasıyla bilinen bir hormondur. Aynı zamanda insülin kandaki glikozun kas ve yağdaki hücrelerin geçişini kolaylaştırmaktadır.

Şekil 1. de enerji metabolizması mekanizması ifade edilmektedir. Figürde açıklanan; Glukoz metabolizmasında bir diğer önemli merkez organ da Pankreas’tır. Pankreas kanda artan (postprandial) glukozu cevap olarak insülin salgılar. İnsülin hedef organlarda (karaciğer, kas ve adipoz doku) anabolik programı başlatır.



Şekil 1. Enerji metabolizması (Xiaozhuo C, 2015 tarafından modifiye edilmiştir).

Karaciğerde insüline bağlı anabolik yanıt yağ asitlerinden glukoz üretimini (glukoneogenez) durdurmak ve glukozu glikojene (ve yağa) çevirmektir. Karaciğere glukoz alımı her zaman aktiftir insüline karşı bir cevap değildir.

Glikozdan üretilen trigliseritler (ve kolesterol) VLDL partikülleri şeklinde adipoz dokusuna gönderilir. Kanda Glukoz değerlerinin düştüğü durumlarda (açlık) merkez organ Pankreasta insülin salgısı düşer ve glukagon hormonu salgılanır ve periferel organlarda katabolik program başlatılır. Glukagon pankreasta β hücreleri tarafından salgılanır. Glukagon hormonunun ana hedefi karaciğerdir. Karaciğerde glukagon insülinin tersine glikojen yıkımını hızlandırır ve yağdan glukoz üretimini artırır (glikoneogenez).

Burada hedef düşen kan şekerini tekrar yükseltmek ve Glikozla beslenen organlara yeterli glikozu sağlamaktır.

2.2. Diyabet

2.2.1. Diyabet Tarihçesi

Eski Yunanca bir kelime olan ‘Diabetes’ sifon manasına gelir ve sık idrar oluşumunu anlatmaktadır. Yunanca bir kelime olan Mellitus ise kısaca mel kelimesi bal anlamına gelmektedir (Sodeman ve ark, 1992). Diyabetin tarihçesi çok eskilere gitmektedir. M.Ö.1500 yılına ait Mısır uygarlığında, Ebers papürislerinde aşırı idrar yapılan, idrar yollarıyla şeker kaybettiğimiz hastalık olarak nitelendirilmiş, milattan 150 sene evvel ise Kapadokya’da ilk kez ‘Diabetes’ terimi Areteus tarafından kullanmaya başlanmıştır (Hatemi, 1996; Robert Ratter). Milattan önce 9.yy’da Razi aynı zamanda 10-11.yy’da İbn-i Sina, bu hastaların susuzluk hissiyatı artı idrarın tatlı olduğundan bahsetmişlerdir. John Rollo 18.yy’da bu rahatsızlık için, Yunancada Latince ‘bal’ manasına oluşturma ‘mellitus’ kelimesi kullanan ilklerdendir. 1815’te Chevreul idrardaki bulunan bu şekerin ‘Glukoz’ olduğunu söylemiştir. 19.yy’da Claude-Bernard glikozun glikojen olarak karaciğer organında depo edildiğinden bahsetmiştir. 1869’da Paul Langerhans pankreasta bulunan adacık hücreleri olduğunu açıklamıştır. 1889 yılında ise Oskar Minkowski yaptığı deneyler ile diyabet hastalığından sorumlusunun pankreas olduğunu ifade etmiştir. 1921 yılında Banting- Best insülini keşfeden bilim insanları oldular. 1955’ de antidiyabetik ajanlar kullanılmaya başlamıştır. Örneğin tolbutamid gibi. 1973 yılında saflaştırılmış olmakla birlikte antikor üretmeyen insülin tipleri oluşturulmuştur. Son zamanlarda tamamen sentez

ürünü olan insan insülini ‘Rekombinant DNA’ teknolojisi ile üretilmiştir (Hatemi ,1996; Watkins ve ark, 1996; Erdoğan, 1993).

2.2.2. Diyabet Sınıflandırılması

Diabetes mellitusun genel olarak tüm tipleri hiperglisemi ile karakterize olmaktadır. Ancak hipergliseminin meydana gelmesiyle patojenetik mekanizmalarda farklılık görülmektedir. Diabetes mellitusun formlarından bir tanesi insülin azlığı ya da insülin salgılanmasında hataya neden olan genetik bir rahatsızlık olmakla birlikte bazı durumlarda insülinde direnç te meydana gelmektedir. 1979 yılında National Diabetes Data Group’ nun yaptığı bir çalışmada tanı kriterlerini belirlemiş ve bu sınıflandırma kategorisi Tip 1 diyabet (insüline bağımlı = IDDM) veya tip 2 diyabet (insüline bağımlı olmayan= NIDDM) olmasıyla iki tip diyabet tanımlanmaya başlanmıştır. 1995 yılında American Diabetes Association sınıflandırmayı etyolojiye göre sınıflandırmayı yapmıştır ve tanısına göre çalışma grubu kurmuştur. 2007 yılında sınıflandırma tekrar gözden geçirilmiştir, insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan terimlerini kaldırmıştır, şimdi sırasıyla tip 1 ve tip 2 diyabet isimleri konmuştur (C.A. Burtis ve ark). Şekil 2’ de 1998 yılında yapılmış diyabet sınıflandırılması ifade edilmektedir.

Tablo 2.1: Glisemi Bozukluklarının Sınıflaması	
1. Tip 1 Diyabet • Immün nedeni • Nedeni bilinmeyen	Tip 2 diyabet genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkan ve en sık görülen (% 90) diyabet türüdür.
2. Tip 2 Diyabet • Periferik insülin direnci ön planda • İnsülin sekresyon yetmezliği ön planda	
3. Diğer tipler • Beta hücre fonksiyonunda genetik bozukluklar • İnsülin fonksiyonunda genetik bozukluklar • Pankreas hastalıkları • Endokrin hastalıkları • İlaç ve kimyasal maddeler • Enfeksiyonlar	
4. Gebelik Diyabeti	

Şekil 2. Glisemi bozukluklarının etyolojik ve klinik açıdan sınıflaması (1998 yılında DSÖ’ den modifiye edilmiştir).

2.3. Diyabet Komplikasyonları

Prediyabetik durumunda kardiyovasküler rahatsızlıklar orta seviyede yükselmektedir. Diyabet ile birlikte bu risk daha da yükselmektedir. Diyabette ortaya çıkan kronik komplikasyonların bu aşamada ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kan basıncı ve lipidlerin olması gereken seviyeye düşürülmesiye sıkı glisemin kontrolün sağlanabileceği yapılan klinik çalışmada ortaya çıkmıştır. Diyabet süreç içerisinde kalp, göz, damar gibi yapılarda değişiklikler meydana getirebilmektedir.

Kardiyovasküler Hastalıklar: Diyabet durumunda inme oranı ve koroner arter rahatsızlığında 2-4 kat yükseltmektedir. Diyabetli insanlar hayatlarının çoğunluğu %60-75 oranında kardiyovasküler rahatsızlıklardan dolayı kaybetmektedir

Diyabetik Ayak Ülserleri: Diyabetli insanlarda hem dokusal nöropati hemde ayak ülserleri görülmektedir. Aynı zamanda ayak amputasyonun %50 si diyabetten dolayı olduğu bilinmektedir. Diyabetik ayak ülserleri sebebiyle hastaların ayaklarının kesildiği de tahmin edilmektedir.

Diyabetik Retinopati: Diyabet körlüğe sebep olan hastalıkların içinde yer almaktadır. Buradaki komplikasyon retinada buluma damarların yüksek glikoza maruz kalması sonucunda oluşmaktadır. Ciddi görme kaybı oranı olduğu bilinmektedir.

Diyabetik Nefropati: Diyabette böbrek yetersizliğide kronik olarak meydana gelmektedir. Diyalizde tedavi olanların % 50' si diyabet kökenlidir. Bunun % 10-20'si hayatını kaybetmektedir.

Diyabetik Nöropati: En çok etkili olan diyabetik komplikasyonlarından biridir. Periferik ve otonom sinirlerde uzun süreli bozukluğa yol açmaktadır. Nöropati diyabetlilerde %50-70 oranında oluşmaktadır. Uyuşma, ağrı gibi belirtileri vardır.

2.4. Diyabetes Mellitusun İnsidansı ve Epîdemiolojisi

Diabetes Mellitus hastlığında, tedavi sürecini saptanması, adının konunması, erken teşhis edilmesi için toplumsal sağlık sorunların programlarını yapabilmek için bu hastalığın epidemiyolojik olarak belirlenmesi gerekmektedir (Yenigün, 2001). Sinsi ve seviyeli şekilde oluşmakta olan diyabetin prevalansını oluşmasında güçlük yaşatmaktadır. Nerdeyse ırka bağlı olarak prevalanstaki farklılıklar görülmektedir. Çin, Eskimolarda, Ginedeki kabile topluluklarında % 1, Pima kızıldilerde, Naurularda aynı zamanda Avustralyanın yerli

kesimlerinde bu oran % 20-45 oranında olabilmektedir (King ve ark, 1993). Günümüzde ise Pima yerlilerinde en fazla prevalansa sahip olduğu bilinmektedir. Alaska ve diğer bölgelerde ise daha düşük oranda prevelansa sahiptir. Son zamanlarda Dünya sağlık örgütünün tespit ettiği bulgular göstermiştir ki, yaklaşık 100 milyon olan diyabetli hastalarının önümüzdeki 10-20 yıl sonrasında bunun iki katına ulaşılacağı beklenmektedir (King ve Rewers, 1993; King ve ark, 1995).

2.4.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Etyopatogenezi

Beta hücresinde oluşan fizyolojik bozukluk, insülin direçli olması, glikozun oluşmasındaki fazlalığın diyabet için metabolik bozuklara yol açmaktadır (Yenigün, 2001; King ve Rewers, 1993). Genelde insülin direnci ya da insülin azlığı sebep olmaktadır (Yenigün, 2001; Foster, 1998).

Primer defekt oluşturan insülin direnci ya da beta hücresinde hasarlar yaşa, obeziteye bağlı olarak Tip 2 diyabet için belirleyici etken olmaktadır (Groop ve ark, 1993). İnsülin direnciyle birlikte insülin salgılanmasındaki bozukluk genetik olarak oluşup oluşmadığı ve hangisinin primer efekt sonucu olduğu bilinmemektedir. Aile hikayesini olmasına karşın tek bir genetik üzerinde olup olmadığı tam olarak tespit edilememiştir.

Tip 2 diyabette çoğu form genetikle ilgilidir. Son zamanlardaki görüş primer efekt olarak nitelendirilen bir başka görüş ise hiperinsülinemi olduğu hipotezi insülin direncine bağlı olduğu ortaya çıkmıştır.

Hiperinsülinenin glikojen sentezini bozması, Tip 2 diyabette insülin direncine sebep olabileceği düşünülmüştür (De Fronzo ve ark, 1997). Glikozdaki açlık miktarı 140 mg/dl ye arttığında insülinde 2-2.5 kat artmaktadır ve 140 mg/dl' yi aştığı zaman artık beta hücresi insülin salgılayamaz hale gelmektedir. Kademeli olarak insülin salgısı azalır buna karşın glikoz üretimi yükselmeye devam eder ve 250-300 mg/dl' ye ulaştıkça insülin salgısında ciddi düşüşler yaşanmaktadır (Yenigün, 2001).

2.5. Pankreas Fizyolojisi

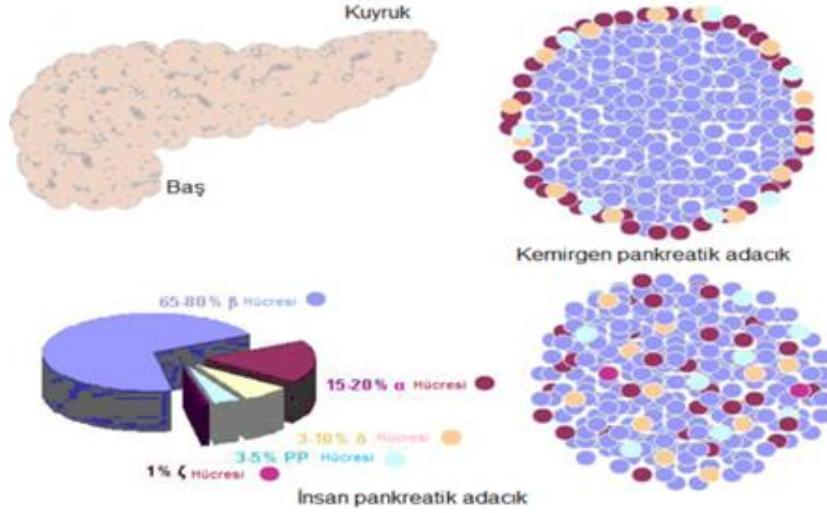
Ekzokrin ve endokrin salgı yapan bir bez yapan pankreas, langerhans adacıklarında üretilip insülin, glikagon ve somatostatin salgılanmasını sağlamaktadır.

Ekzokrin salgı ünitesi asinüste bulunmaktadır günde yaklaşık 1500-2000 ml salgı gerçekleştirir. Bu salgı izotonik ve alkalidir. Birçok sindirim enzimlerinde bulunmaktadır. Ekzokrin salgısında Na ve K katyonları plazmadaki değerleri aynı miktardadır. Anyonlar ise Mg ve Cl olmakla birlikte salgıdaki hız artıkça HCO₃ miktarı yükselirken Cl miktarında düşmeler olmaktadır. Bu salgıdaki bikarbonat iyonlarında nötralize edilmesi için mideden başlayıp duodenuma kadar boşalmakta ve önemli bir rol oynamaktadır.

Ekzokrin salgısında 0.3 mg/ml protein miktarını bazal durumlarda içermektedir. Proenzimler ve sensimlerden meydana gelen bu protein karbonhidrat, yağ ve proteinlerinde sindirim enzimlerini oluşturmaktadır. En fazla bulunan enzimlerden bir tanesinde tripsin enzimidir. Görevi proteinleri peptitlere kadar parçalanamaktır aynı zamanda kimotripsinin görevi de budur. Karboksipolipepsin enzimleri ise amioasitleri parçalara ayırmaktadır. Nükleik asitleri parçalayan bir diğer sindirim enzimi ise nükleazlardır. Amilazda karbonhidratları parçalamakta görevli olan birdiğer sindirim enzimidir. Yağların sindiriminden sorumlu olan lipaz, fosfolipaz gibi enzimlerdir.

2.5.1. Pankreatik Beta Hücrelerinin Fizyolojisi

Langerhans adacıklarında salgılanan pankreatik beta hücreleri endokrin salgı yapan hücreleri oluşturmaktadır. Pankreasın kuyruk bölgesinde bulunan langerhans adacıkları, pankreasın tüm ağırlığının % 1-2' si kadarını oluşturmaktadır (Wackers ve ark, 2004). Beta hücresi içeren adacıklar çoğunlukla damarlardan ve sinirlerden oluşmuştur. Sağlıklı bir insanda normalde bir pankreas yaklaşık 106 adacık bulundurmaktadır, her bir adacıkta ise yaklaşık 2000 beta hücresi bulunduğu bilinmektedir (Reaven, 1998). Şekil 3' de pankreasta bulunan langerhans adacıkları ve beta hücreleri gösterilmiştir.



Şekil 3. Beta hücresi (Köloğlu, 1996 tarafından modifiye edilmiştir).

İnsan pankreasında adacıkta bulunan pankreas hücrelerin büyük çoğunluğu yaklaşık % 65-80 kadar oluşan hücreler beta hücresini kapsamaktadır. Bu hücreler yükselen kan miktarındaki glukozun veya başka gıda maddesine karşılık olarak yanıt olarak insülin salıvermesinden sorumlu olmuştur (Beck-Nielsen, 1992). Bu hücreler aynı zamanda C-peptin ve amilin salgılanmasında da görev almaktadır. C-peptinin tip 2 diyabet komplikasyonları sırasında nefropatinin oluşmasını engellediği için büyük bir önemi vardır. Aynı zaman pro-insülininden çıkarak olgun insüline çevrilmesinde yan ürün olarak meydana gelmektedir. C-peptin hayvan modeinde bakıldığında glamerular filtrasyonda hızını arttırmakta ve fibrozisi düşürmekte olduğu bulunmuştur (Brissova ve ark, 2005).

Aynı zamanda (1:100,amilin/insulin) beraber salgılanmaktadır. Amilin görevi alfa hücresinden glukagonun salgılanmasını engelleyerek glukoz metabolizmasının düzenlenmesini sağlamaktır. Ayrıca amilin, kanda bulunan glikozun sindirimi geciktirmektedir, gıda tüketimini belirli seviyede tutar ve sindirim enzimlerini engellemektedir (Meier ve ark, 2006).

Alfa hücreleri dev pankreastaki adacıkların sadece %15-20 oranını kapsamaktadır. Alfa hücreleri glukagon hormonu salgılamakta, karaciğerde ve iskelet kaslarında glikojenin parçalanarak yıkımını arttırır ve bu hormonun dolaşımında yükselmesini sağlamaktadır. Bu durumda da kandaki glikoz miktarı artmaktadır.

Bir diğer hormon olan somastosinde delta hücrelerinde salgısını gerçekleştirmektedir. Delta hücreleri pankreastaki adacıkların sadece %3-10 kadarını

oluşturmaktadır. Bunların dışında bulunan hücrelerden bir kaçı polipeptin salgılayan hücreleri, epsilon olduğu belirtilmiştir (Beck-Nielsen, 1992).

2.5.2. Diyabet ve Beta Hücre Apoptozisi

Tip 2 diyabet, insülin direnci ve fonsiyonel bozukluğu olan beta hücreleri ile karakterize sahip olmaktadır. Tip 2 diyabetin sebepleri arasında insülin direnci ile birlikte obezite de önemli faktörler oluşturmaktadır. Son zamanda yapılan çalışmalara göre hiperglisemi beta hücrenin hasara uğramasında ve kaybında önemli bir etkiye sahiptir (Duck worth ve ark, 1998). Son zamanlarda biyopsi örnekleri alınan hastalarda beta hücresindeki kaybın %25-30 olduğu görülürken, ileri derecede olan diyabetik hastaların %65 gibi büyük oranda kayıp olduğu bilinmektedir. Geç evrede oluşan diyabetin patogeneğinde beta hücrelerin kaybı büyük bir etkene sahiptir. Otopsi sonuçlarına bakıldığında ise bu kayıptaki mekanizmanın apoptozis olduğu anlaşılmıştır. Apoptozda tam olarak hangi sinyal yolunun aktif olduğu bilinmese de, yüksek glikoz, toksik oligomerler, endoplazmik retikulum stresi gibi faktörlerin sebep olabileceği belirtilmiştir (Duck worth ve ark, 1998).

Düşük miktarda glukoz konsantrasyonlarda kültüre alınan pankreas hücrelerinde salgılanmasında artışlar gözlemlenmişken yüksek dozda glikoza maruz kalmış beta hücrelerinde apoptoza yol açmıştır. Bu durum da apoptozis proliferatif beta hücresinde görülmüş ve bu da apoptozise hassasiyeti göstermiştir. Yüksek miktarda glikoza maruz beta hücrelerinde glukoz metabolizması artar böylelikle oksidatif fosforilasyonu artırmış olur. Aynı zamanda mitokondride fonsiyonel olarak bozukluğa sebep olarak oksijen radikallerin yükselmesine sebep olmaktadır. Bu hücreler reaktif oksijen türlerinin yükselmesiye zayıf bir antioksidan sistemine sahiptir.

Beta hücrelerindeki oksijen radikallerinin artmasıyla NFkB ve JNK gibi strese hassas olan bir çeşit metabolik yollar aktif olmaktadır. Beta hücre proferasyonda düşük doz IL-1 β tarafından aktif olurken, yüksek dozlarda NFkB, JNK gibi strese hassas mekanizmaların aktif olmasına sebep olmaktadır (Beck-Nielsen, 1992). Bunu yanı sıra beta hücrelerinde JNK yolu da endoplazmik retikulum stresinde, aktif eden transkripsiyon faktörü 3 ek olarak B hücresi lenfofa geni 2 apoptozun ilerleyişinde proapoptik üyelerin aktif olmasıyla oluşmaktadır (Chandra ve ark, 2001).

2.5.3. İnsülin ve Etkisi

Langerhans adacıklarındaki beta hücreleri tarafından salgılanan insülin polipeptit yapıda olan 6000 dalton molekül ağırlığına sahip hormondur. Beta hücreleri pankreasın yaklaşık %1 içermektedir ve insülin birbiriyle iki sülfür köprüsü ile bağlıdır artı iki aminoasit zicirinden meydana gelmektedir (Kayaalp, 2000).

İnsülin, yakıtların doular sayesinde kullanımını sağlayan ve enerji dengesini devam ettiren önemli hormonlardan bir tanesidir. Anabolik bir metabolik etkisi bulunmaktadır. Triaçilgliserol, glikojen ve protein sentezini uyardığı gibi bri takım membranda enzimini aktif yada pasif edebilmektedir, mRNA'nın sentezinde ve yıkımında hızını değiştirip hücrenin büyümesinde ve farklılaşmasında etkisilidir (Kayaalp, 2000).

İnsülin iki küçük polipeptid zincirinden oluşan bir peptid hormonudur. A ve B zincirleri birbirlerine kovalent disülfid bağlarıyla bağlıdır.

İnsülinin sentezi birkaç adımda meydana gelmektedir.

1) Nukleusta insülini kodlamakta olan gen mRNA trankrisiyon gerçekleştirip oradan uzaklaşır.

2) Sitoplazmaya giden mRNA granüllü endoplazmik retikuluma uğrayarak translasyon başlatır.

3) Polipeptit sentezi için N-Terminal sinyal polipeptiti oluşmasıyla başlatılır ve granüllü endoplazmik retikuluma penetre halde membranda olur.

4) Granüllü endoplazmik retikulum lümeninde içeriye doğru uzanarak oluşan polipeptit zinciri, preproinsülini meydana getirmektedir.

5) Sisternada proinsülin oluşturmak üzere sinyal peptitinden ayrılır.

6) Oluşan proünsilin granüllü endoplazmik retikulamdan sonra golgi aygıtına gider ve proteazların etkisiyle c- peptit etkisini kaybeder sonuçta insüline dönüşmektedir. Daha sonra depo veziküllerine doğru yoluna devam eder.

7) İnsülin ekzositozla salgılanırken c-peptit te salgılanır. Proinsülin bir kısmı dolaşıma katılır dolaşımdaki insüline benzer immün reaktifin % 20' si kadarına denk gelmektedir. Proünsilin biyolojik etkinliği ise insülinin %10'unu oluşturmaktadır (Kayaalp, 2000).

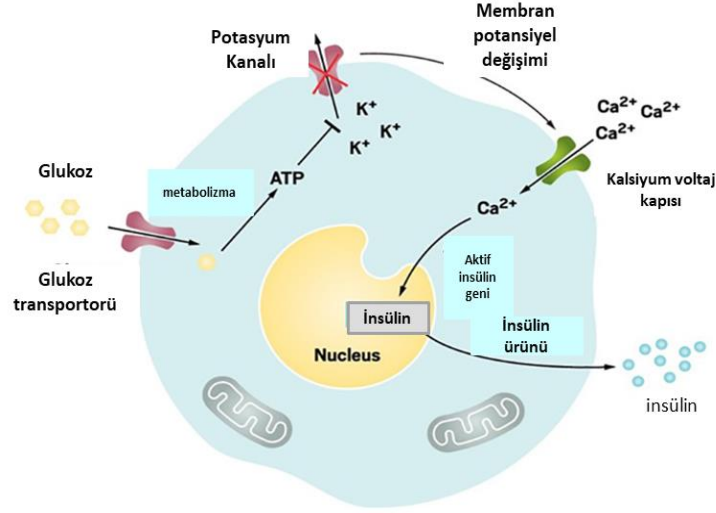
İnsülin sentezinde c-peptit periferik gösterge olmakla birlikte karaciğer tarafından tutulmaz (Wackers ve ark, 2004). İnsülin sentezinde etkili olan maddeler glikoz, aminoasitler. glukagon, gastrointestinal hormonları, büyüme hormonu, glikokortikoidler, prolaktin, plesantal laktojen hormon, cinsiyet hormonları ve parasempatomimetik ajanlar

olmaktadır. İnsülin sentezlenmesini somatostatin ve epinefrin baskılamaktadır. Glikoz metabolizmasında insülinin etkileri üç dokuda gerçekleşmektedir: karaciğer, kaslar ve yağ dokusu. Glikoz oluşumu engelleyen karaciğer, glikoneogenez ve glikojen yıkımı baskılamaktadır. Hücre membranlarında bulunan glikoz alıcıları glikoz alınmasını arttıran kas ve yağ dokusudur. İnsülin salgılanmasından birkaç dakika sonra, yağ salınımında azalmalar görülmektedir. Lipaz aktivitesini baskılayan insülin dir. Protein sentezini, aminoasitlerin hücrede giriş çıkış yapmasını sağlamaktadır (Kayaalp, 2000).

Karaciğer, yağ dokusu ve kas hücresi gibi dokularda insülin, hücre zarında olan reseptörler yüksekafiniteli bağlıdır. Bu insülin reseptörleri tek çeşit polipeptit olarak sentezini gerçekleştirir, glikozillenip alfa-beta subünitlere ayrılmaktadır. Daha sonra disülfid bağıyla tetramer oluşturup bir araya gelirler. Hidrofobik kısımda yer alanlar ise beta subunitlerdir. Alfa subunitin ise hücre dışında insülin bağlanma bölgesini kapsamaktadır. Sitozolik kısımda bulunan beta subunitinin bir tirozin kinazdır ve insülin ile aktif edilmektedir. Alfa subunitlere bağlanan insülin reseptörünün konum olarak değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir. Bu değişiklikler beta subunitine gider ve buradaki özgün bir tirozin birimin otofosforilasyonun hızlanmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda bu reseptör tirozin kinaz insülinin hücre içerisinde bağlantısını sağlamakta bir çok molekül aracı olduğu söylenmiştir (Kayaalp, 2001).

2.5.4. İnsülin Salınımının Kontrolü

1. Kanda yükselen glukoz pankreatik β hücresi tarafından tanınır.
2. Glukoz GLUT-2 transporterlar aracılığı ile sitoplazmaya alınır ve glikoliz ile pruvata parçalanır.
3. Açığa çıkan ATP, ATP' ye bağlı potasyum kanallarını kapanır ve potasyum hücre dışına çıkması durdurulur.
4. Hücrelerin membranlarındaki zar polarizasyonu değişir ve voltaj kontrollü Kalsiyum kanalları açılır ve sitoplazmada kalsiyum artışı gözlemlenmektedir.
5. İnsülin salınımı tetikleyen kalsiyum bir haberci olarak görev alır ve insülin içeren vesiküller membrana bağlanır ve exositoz yoluyla insülin kana salınır. Şekil 4'de insülin salınımı kontrolünün nasıl gerçekleştiği gösterilmiştir.



Şekil 4. İnsülin salınımının kontrolü (inovaktif kimya dergisinden alınmıştır).

2.5.5. İnsülin Sinyal İletimi

İnsülin benzeri büyüme faktörü olan sinyal yolağı hücrelerde çoğalmayı, farklılaşmayı ve apoptozu sağlamaktadır.

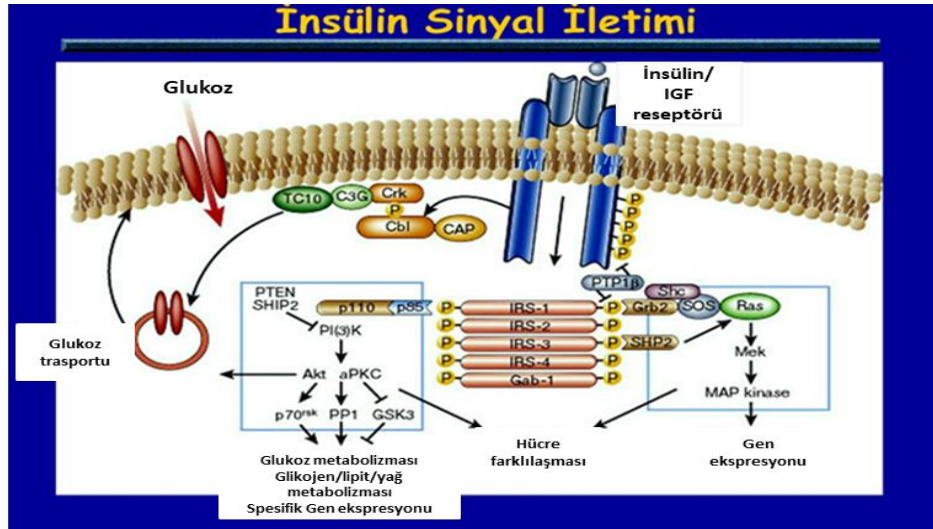
IGF adı verilen bu sinyal yolağı başka sinyal iletim yollarında gerçekleştiği gibi liganda bağlanan proteinlerden, reseptörlerden ve ligand moleküllerinden meydana gelmektedir.

IGF sinyalinde oluşan yolakta;

- IGF1 ve IGF2 olmak üzere isimlendirilen ligand molekülleri
- Ligand moleküllerine bağlı olan proteinler (IGF-BP)
- Ligandlara bağlı iki reseptör (IGF-1R ve IGF-2R) işlevini yapmaktadır.

IGF1 ligandı iki reseptöre bağlantı yapabilir fakat IGF2 sadece IGF-2R'ye bağlanmaktadır. Bu reseptör yani IGF-2R hücre içinde tirozin kinaz bulunmadığı için sinyal iletiminde görevi yoktur

IGF1 veya IGF2 reseptör molekülü olan IGF-1R' ye bağlantı oluşturduğu zaman bu reseptörün hücre içinde bulunan bir takım proteinlerin fosforilasyonu gerçekleştirmektir. Bunlar insülin reseptör substratı, IRS 1 gibi proteinlerdir. Ligandın reseptöre bağlı olmasıyla aktive olan sinyal iletim yolağı, başka yollarında aktive olmasını sağlamıştır. Şekil 5'de sinyal iletimi şematize edilerek ifade edilmiştir. Bunun sonucunda;

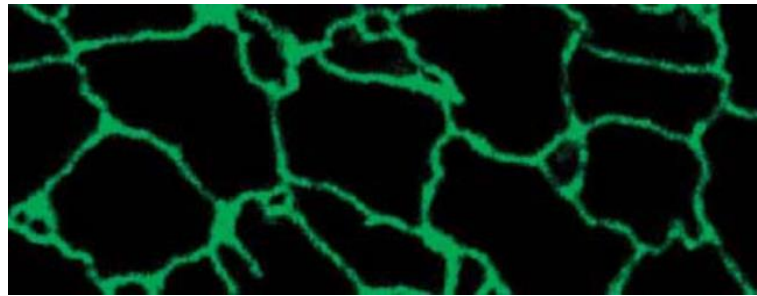


Şekil 5. İnsülin sinyal iletimi (Kahn ve Saltiel, 2001'den modifiye edilmiştir).

- PI3K/AKT yolu aktif edilerek mTOR ve S6 kinaz molekülleri uyarılmış olur.
- RAS ile birlikte mitojen aktifleşir ve protein kinaz (MAPK) yolu aktif edilmiş olur.

2.6. Endoplazmik Retikulum

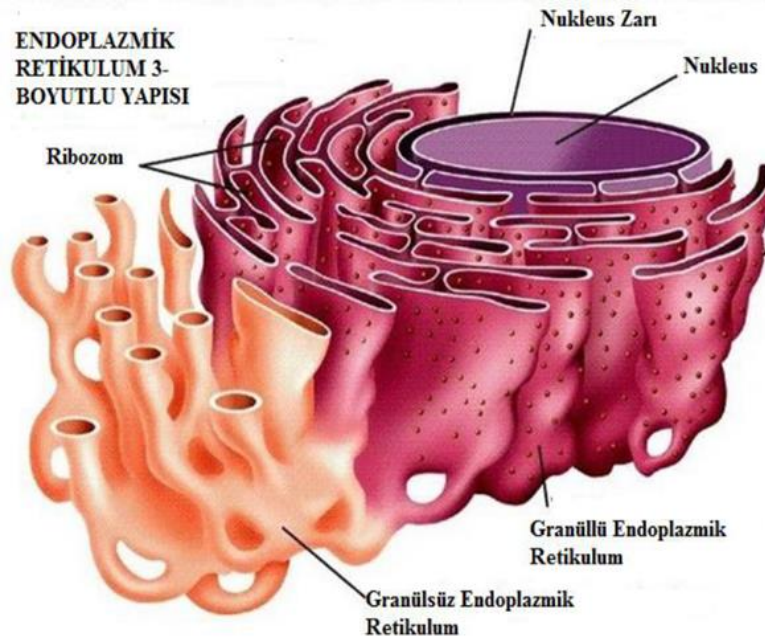
Endoplazmik retikulum, hücre dışına aktarılan salgı, sentezlenen proteinlerin, kalsiyum depolanması ve membranın yapısında bulunan proteinlerin katlanması-sentezini meydana getiren membrandan oluşan bir organel olmakla birlikte kalite kontrol merkezidir (Szegezdi ve ark, 2006). Nukleus'a yakındır. Şekil 6'da Endoplazmik retikulumun elektron mikroskopundaki fotoğrafı gösterilmiştir.



Şekil 6. Endoplazmik retikulumun birbiri ile ilişki halinde bulunan kanal ve kese şekilleri (Albert ve ark, 2008'dan modifiye edilmiştir).

1945’ da Porter, elektron mikroskobu ile yapmış olduğu çalışmada sitoplazma dantele benzeyen bir yapıyı saptamıştır. Bu ağa benzeyen yapı hücrenin ektoplazmasında görölmediği için endoplazmik retikulum ismini vermiştir. Aynı zamanda bir kofulun olduğu zarla çevrildiği bulunmuştur. Er, lizozom ve golgiden oluşan bu vakuol sistemi oluşturmaktadır (Albert ve ark, 2008). ER zarı 50-60 Å kadardır. ER’nin yapısından kaynaklı hücrede birçok görevleri bulunmaktadır. Genelde zar proteinlerin, üç boyutlu olmasında, proteinlerin taşınmasında ve ekzositozlar hücre dışına atılmasında, kalsiyumun depolanmasında, birçok makromoleküllerin depolanmasında rol oynamaktadır (Albert ve ark, 2008). Şekil 7’de Endoplazmik Retikulumun üç boyutlu yapısı gösterilmiştir.

ER, Granüllü ve Granülsüz olmak üzere iki yapısı vardır. Granüllü ER, üzerinde bol miktarda yer alan ribozomlardan dolayı bu ismi almaktadır. Hücre dışına gönderilecek olan ve bazı organellerde görev alan proteinleri sentezler. Granülsüz ER de yapısında az miktarda ribozama sahiptir. Lipit sentezi ve kalsiyum deposu olarak işlev görmektedir.



Şekil 7. ER ‘nın 3 boyutlu yapısı (Randy ve ark, 1998’den modifiye edilmiştir).

2.6.1. Granüllü Endoplazmik Retikulum

Granüllü Endoplazmik Retikulumda ribozomlar bulunur ve protein sentezini gerçekleştirmektedir. Şekil 8’de G.E.R fotoğrafı gösterilmiştir.



Şekil 8. Granüllü endoplazmik retikulum. Ribozomlar yeşil renkte gösterilmiş olup protein sentezini gerçekleştirmektedir (Stolz ve Wolf, 2010’ dan alınarak modifiye edilmiştir).

ER’de sentezlenen proteinler bir takım değişikliklere uğramadan katlanamaz. Bundan dolayı translasyon sonrası değişimlerin bazıları (N-glikozilasyon, disülfid oluşumu gibi) endoplazmik retikulumda görevini yerine getirmektedir (Tu ve ark, 2000).

Endoplazmik retikulumun önemli görevlerinden biri de hücre içinde kalsiyum deposunda yer almasıdır. Hücre içinde kalsiyumun yoğunluğunun sağlanmasında işlevi bulunmaktadır. Gerekli durumlarda sitozole kalsiyum verilir yada geri alınır (Hoseki ve ark 2010).

Glikozilasyon, proteinde hidrofilik özellik kazandırmakla birlikte sudaki çözünürlüğünü arttırmaktadır (Schroder ve Kaufman, 2005). Oligosakkarit yapısı sayesinde protein etrafını çevreleyen proteinleri engellemektedir ve şaperon olarak görev yapmaktadır. Peptit zinciri ile etkileşerek yapının sabit olmasını sağlamaktadır. Lektin mekanizması ile kontrol edilen şeker rezidülerin devamlı olarak eklenmesini sağlar ve protein katlanmasının takip edilmesini sağlamaktadır. Bu da kalite kontrol merkezi olarak kabul edilmektedir. (Ellgaard ve ark, 1999; Stevens ve Argon, 1999; Wormald ve Dwek, 1999).

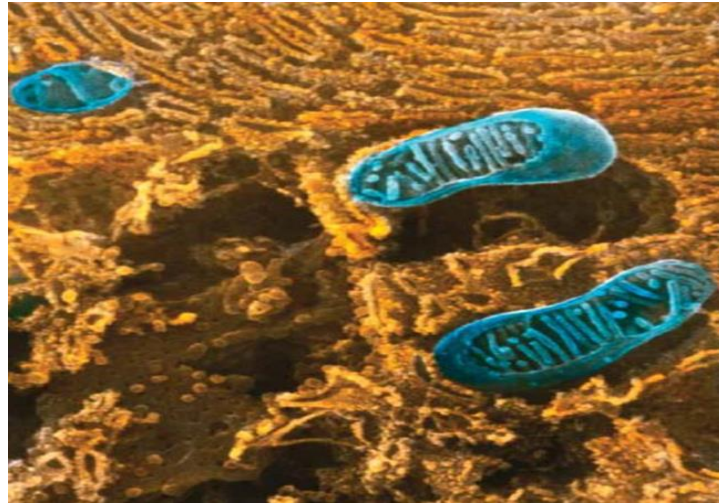
Ca^{2+} deposu olan endoplazmik retikulum, protein katlanması ve transportundaki işlevi sebebiyle aynı zamanda Ca^{2+} bağımlı moleküler şaperonlara (GRP78, GRP94, kalretikülin) sahiptir (Schroder ve Kaufman, 2005a).

ER’de proteinlerin düzgün katlanmasına yardımcı eden moleküler şaperonlar bulunmaktadır. Proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan bu moleküller çok iyi kalsiyumun tamponlayıcı proteinlerdir, kalsiyuma ihtiyaç duyulmaktadır (Buck ve ark, 2007). ER’ nin işlevi protein katlanmasında hatalı olup olmadığı hatalı katlama olduysa

düzeltilmesi gerektiği gibi düzeltilmezse protein yıkıma gönderilmesidir (Schroder ve Kaufman, 2005b). Enfeksiyonlar, ortamın sıcaklığı, oksidatif stres gibi faktörlerin proteinlerin doğru katlanması üzerinde etkisi bulunmaktadır. Hücrede ciddi zararlara yol açan yanlış katlanan hücrelerin birikmesi sonucunda kanser, diyabet, Alzheimer gibi hastalıklara yol açabilmektedir (Stolz ve Wolf, 2010). ER stresi adı verilen bu durum endoplazmik retikulumda proteinin katlanmasındaki kapasiteyi azaltmadır ve bunlar lümende birikmiş olmaktadır. Herhanhi bir yerde yanlış katlanmış proteinlerde yükselme olursa sadece hücrelerin ortamdan uzaklaşması kalmaz aynı zamanda ciddi ek tedbirlerine gerçekleştirmektedir. Bütün bunlar protein biyokimyasında sadece sentezde değil aynı zamanda sentez sonrası süreçte de önemli olduğu vurgulanmıştır (Hoseki ve ark, 2010). Proteinlerin lümende birikimi hücreler için zararlı etkiye yol açar ve hücreye zarar verir.

2.6.2 Granülsüz Endoplazmik Retikulum

ER'nin bu kısmında ribozomlar olmadığı için düz endoplazmik retikulum olarak adlandırılmıştır. Lipidlerin büyük çoğunluğu düz endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir. Sadece lipit sentezini gerçekleştirmekle kalmayıp karaciğer hücrelerinde bazı ilaçların zararsız hale getirmesinde de görev almaktadır.

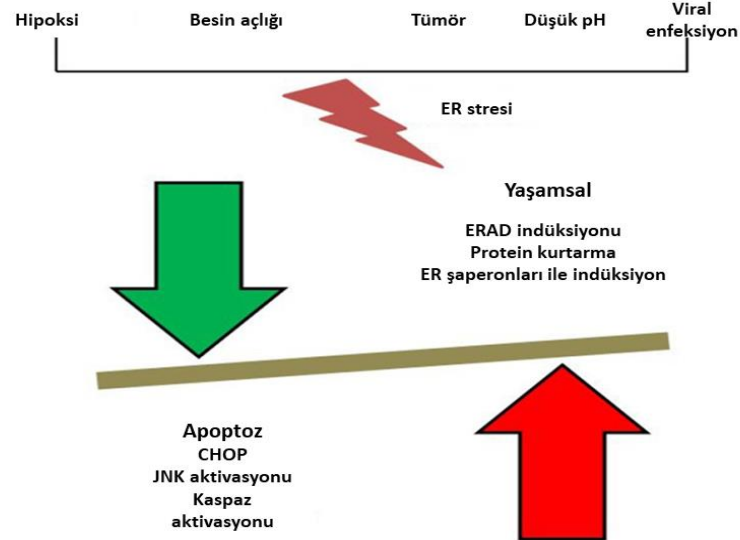


Şekil 9. Granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomları(Stolz ve Wolf, 2010'den modifiye edilmiştir).

Granüllü endoplazmik retikulum (kahverengi), Mitokondri (mavi). Üzerinde çok sayıda ribozomlar bulunmaktadır.

2.7. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), hücresel homeostazı koruyan ve lipid sentezi, protein katlanması ve translasyon sonrası modifikasyonlara katılan hücre organelidir (Kim ve ark, 2008; Hetz ve ark, 2011). Hipoksi, açlık ve pH değişikliği, kalsiyum azalması ve viral enfeksiyonu gibi çeşitli stres faktörleri ER ortamını bozmaktadır (Kim ve ark, 2008). Bu, ER içinde uygun protein katlanmasını engeller ve nihayetinde ER stresine neden olan yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olmaktadır. Hücresel dengeyi yeniden sağlamak için ER'yi çekirdeğe bağlayan hücresel bir homeostaz yanıtı olan “katlanmamış protein yanıtını” (UPR) da aktive etmektedir (Zhang ve ark 2006; Ron ve Walter, 2007) ER-ilişkili bozulma (ERAD) onarmak için, ERD salgı giremez katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerle, apoptozunu ya da parçalanmasını aktive edebilir (Xu ve Reed, 2008). Kanser hücreleri ve virüslerin, ER stres kaynaklı apoptoziyi kontrol etmek için agresif bir şekilde büyümelerine izin veren kendi adaptif mekanizmaları vardır. Şekil 10'da ER stres etkileri gösterilmiştir. Şekil 11'de ER stres simülasyonu gösterilmiştir.



Şekil 10. ER stres etkileri (Xu ve Reed, 2008'den modifiye edilmiştir).

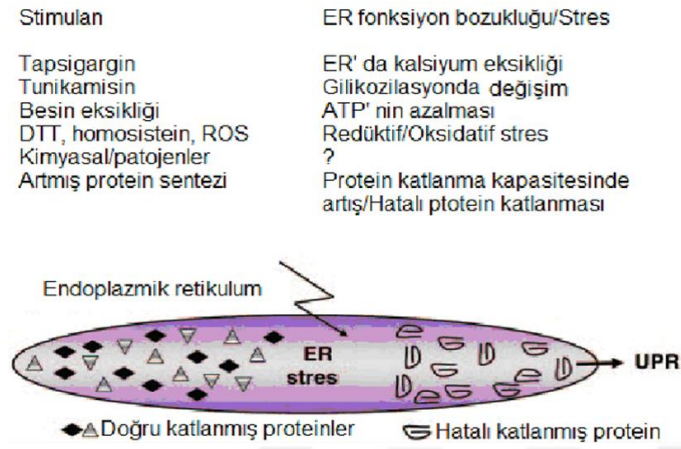
ER stres sebepleri: Metabolit bozukluk, hipoksi, kanser veya viral enfeksiyon gibi hücrel stres, ER'de yanlış katlanmış bir protein yükünün artmasına neden olur ve böylece stres yanıtını tetikler ya ER ile ilişkili protein yıkımı ile birleştirilmiş genler aktive olur ya da proteine dönüşmesi engellenir ve hücre ölür.

Redoks ve kalsiyum dengesizliklerinde düzensizlik, salgı proteinlerinde sentez atışı, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, yükselen glikolizasyon gibi stres faktörleri katlanmasını tamamlayamamış ya da hatalı proteinlerin ER'da birikmesinde sebep olmaktadır ve sıkıntılı bir süreçtir. ER'da sinyal yollarını aktif eden artmış yanlış proteinlerin, transkripsiyon ve translasyonel olarak aktifleşmesine sebep olmaktadır. Bu değişim yanlış yada katlanamamış proteinlere karşı bir cevap oluşturmaktadır (Unfoldprotein response; UPR) (Yoneda ve ark, 2001; Maedler K, 2008). 1990' ların başında *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan çalışmalarda UPR'nın gerçekleşmesinde protein mekanizmasının nasıl olduğu açıklanmıştır. Hücrenin hayatta kalmasında ve UPR sinyalinde etkili olan protein kinaz/ endoribonükleaz (Ire1p/Ern1p) proteini ER membran üzerinde tanımlanmıştır ve UPR sinyali başlatabileceği ortadadır (Prentki ve Nolan,2006; Robertson ve ark, 2006). Daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki bu sinyal yollarının tüm ökaryotlarda korunmuş olduğu belirtilmiş, bununla birlikte UPR nin çalışma mekanizması diğer proteinlerle tanımlanmaya çalışılmıştır.

Metabolik işleyişte fizyolojik düzenlenmenin pankreatik beta hücrelerinde ER stres oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bununla birlikte, ER stresinin ortaya çıkması, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına yol açabilir, bunun sonucunda Ca^{2+} gibi hücre içi iyon seviyelerinde anormal değişiklikler meydana gelmektedir (Kong ve ark 2017). Bu faktörler, PERK, ATF-6 ve IRE1 gibi alt-proteinlerin aktivasyonunu uyarmaktadır (Hetz ve Papa, 2018). ER'nin protein katlama kapasitesi aşırı olduğunda, bu moleküllerin koruyucu etkileri hücrel hasara, hatta apoptoza yol açabilmektedir (Chakrabarti ve ark, 2011). Beta hücrelerinde IRE1a'nın aktive edilmesi, PERK'un baskılanması, yüksek glikozlarda proinsülin sentezi için bir geçiş sürecini oluşturmaktadır. Eğer bu geçiş süreci uzun sürerse hücrelerde fonksiyonel bozukluk yada apoptoz meydana gelmektedir. Ayrıca glikoz uygulamasında beta hücrelerinde IRE1'nin endonükleaz aktivitesini uyarır ve proinsülin parçalanmış olmaktadır (Scheuner ve ark, 2003).

Glikoz uygulaması aynı zamanda pankreas beta hücrelerinde JNK'nın aktif olmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark, 2003). Beta hücrelerinde hiperglisemik ortamın varlığında PERK aktivasyonuna olarak CHOP ve ATF3 düzeylerini artış olduğu

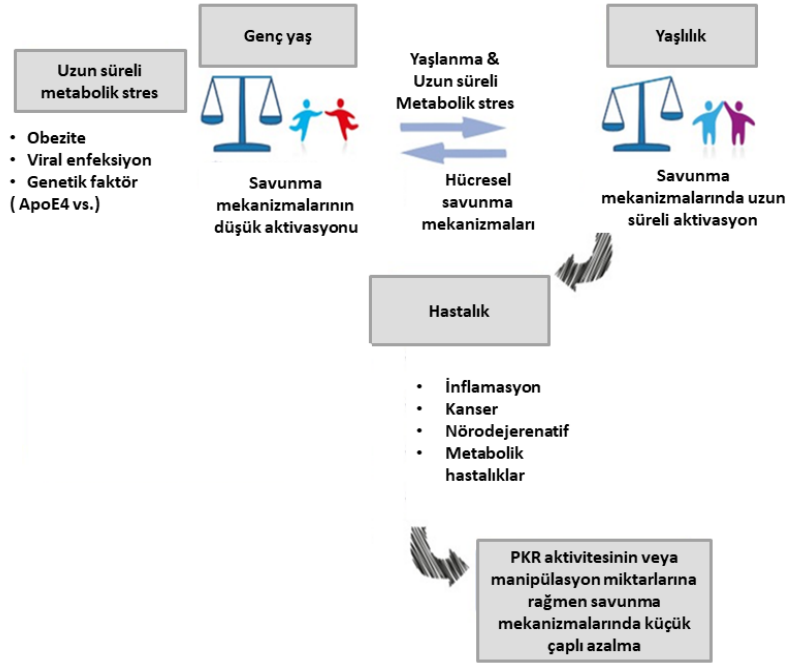
gözlemlenmiştir. Ek olarak tip 2 diyabetlilerde alınan örneklerde histopatolojik çalışmalar aynı belirteçlerinde artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 11. Endoplazmik stresi uyaranlar ve endoplazmik retikulumdaki etkisi (RE ve ark, 2004'den modifiye edilmiştir).

2.7.1. PKR

Protein kinaz R (PKR), insanlarda EIF2AK2 geni tarafından kodlanan bir serin-treonin kinazdır (uzunluğu en fazla 551 amino asittir. Hücrede ana rol oynayan kromozom 2'e oluşmaktadır (Feng ve ark, 1992). mRNA'ya dönüşümü, transkripsiyonel kontrol, apoptozisin düzenlenmesi ve proliferasyon olarak etkili olmaktadır (García ve ark, 2007). Bu baskın rolü, PKR'daki bozukluğunun kanser, nörodejenerasyon, enflamasyon ve metabolik bozukluklara yol açtığı bilinmektedir (Segev ve ark, 2016 ; Garcia-Ortega ve ark, 2017). Omurgalı hücrelerinde yapıcı ve her yerde bulunan bu kinaz bitkilerde, mantarlarda, protistlerde veya omurgasızlarda bulunmaz (Taniuchi ve ark, 2016). PKR ilk olarak 1990 yılında Pasteur Enstitüsünde klonlanmıştır (Meurs ve ark, 1990 ; Watanabe ve ark, 2018) ve ayrıca Protein kinaz RNA-aktifli olarak bilinir; ve interferon ile harekete geçen, çift sarmallı RNA-domini kinazdır (Hugon ve ark, 2009). Şekil 12' de PKR'ı etki edenler ve sonuçları özet olarak verilmiştir.



Şekil 12. PKR özeti (Segev ve ark, 2013, 2015; Stern ve ark, 2013'dan modifiye edilmiştir).

Savunma mekanizmalarında farklı bir denge vardır. Özelliklerde farklılık gösteren yeni PKR inhibitörlerinin geliştirilmesi (örneğin, afinite, tersinirlik), farklı kanser türlerinin, beyin hastalıklarının, enflamatuvar ve metabolik hastalıkların tedavisi için avantajlı olabilmektedir.

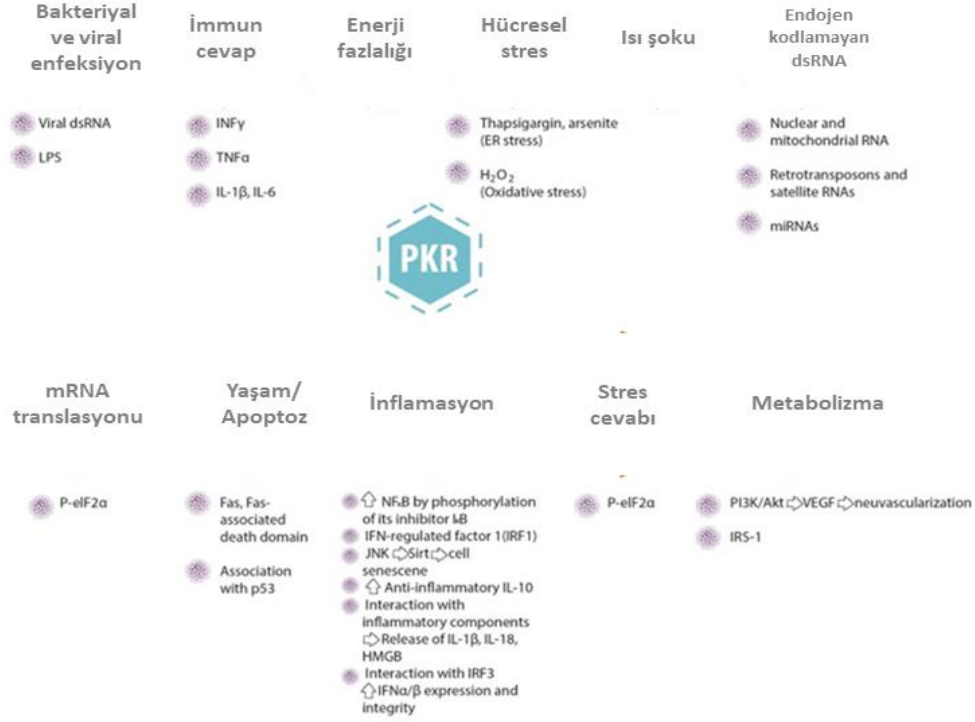
PKR'nin yapısal bileşimi, 23 amino asit birleştiren ile kesen ve ardından esnek bir bağlayıcıyla bağlanan korunmuş bir çift sarmallı RNA bağlanma motifinin (dsRBM1 ve dsRBM2) iki tandem tekrarından oluşan bir N-terminalli çift sarmallı RNA bağlanma bölgesinden oluşmaktadır. Bir C-terminal kinaz alanı bulunmaktadır (Meurs ve ark, 1990). Her iki dsRBM, çift sarmallı RNA (dsRNA) ile yüksek afinite etkileşimi için gereklidir (McKenna ve ark, 2006). Dimerizasyonunun gerçekleştiği PKR'nin katalitik domeni, β -tabaka N-terminal lob ile α -helisel C-terminal lob arasında oluşturulan tipik bir protein kinaza sahiptir (Dzananovic, 2018).). Bununla birlikte, katalitik alan yapısı diğer protein kinazlara benzer olsa da, PKR'nin en iyi karakterize edici substratı olan ökaryotik başlangıç faktörü 2α (eIF2 α) ile etkileşimi, bulunan PKR' özgü kinaz domeninin C-terminal lobunun yüzeyinde olan özel bir sarmalı gerektirmektedir (Dar ve ark, 2005).

PKR promotöründeki en iyi tarif edilen transkripsiyonel motif, IFN ile uyarılmış bir cevap elementi (ISRE) olmasına rağmen, bunun tip I IFN'ye cevap olarak transkripsiyonuna izin verirken (Kuhlen ve Samuel, 1997), birçok transkripsiyon faktörü bağlayıcı olarak

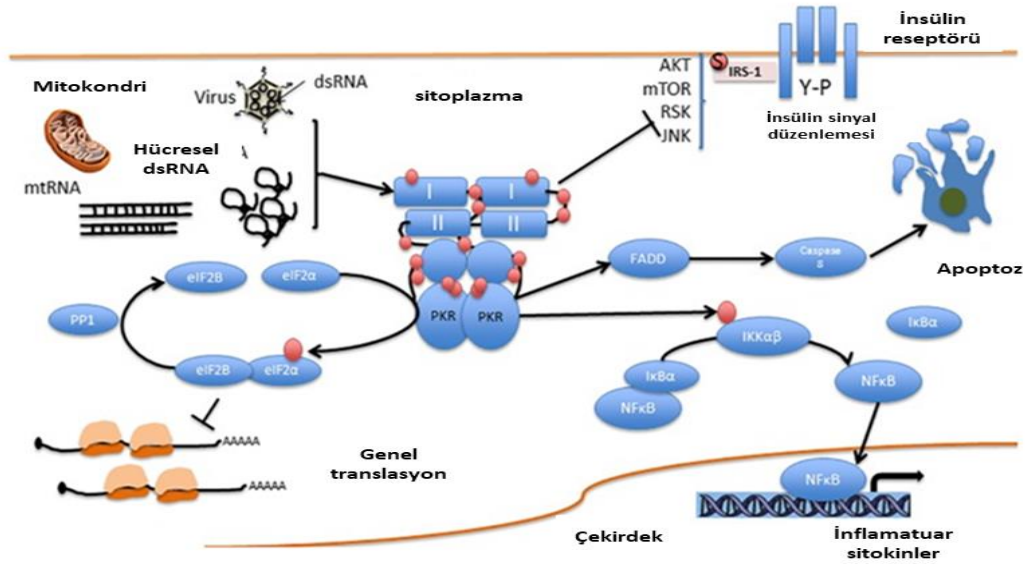
tanımlanmıştır. EIF2AK2 geninin promotör bölgesi (örneğin, CHIP-Seq analizleri tarafından ENCODE projesi kapsamında belirlenen 92 farklı faktördür (Rouillard ve ark, 2016). Bunlar, PKR kavramını interferon ile uyarılmış bir gen (ISG) olarak desteklerken, aynı zamanda farklı transkripsiyon repertuarlarının aktivasyonunu içeren hücrel programlarda PKR ekspresyonunun modüle edilmesine izin verir. PKR'nin aktivasyonu, biyokimyasal ve genetik analizlere dayanan en önemlisi homodimerizasyonu olan bir dizi konformasyonel değişiklikle sonuçlanmaktadır (Dey ve ark, 2005). Homodimerizasyonunun bir sonucu olarak PKR; Ser242, Thr255, Thr258, Ser83, Thr88, Thr89, Thr90, Thr446 ve Thr451 dahil olmak üzere çoklu serin ve treonin bölgelerinde otofosforile edilmektedir (Taylor ve ark, 2001). Son ikisi, yani Thr 446 ve Thr 451 bölgeleri, PKR aktivasyonu sırasında sürekli fosforile edilir, bu, homodimerizasyonunun daha da stabilize edilmesi ve artan katalitik aktivitesi ile sonuçlanmaktadır (Hugon ve ark, 2009; Watanabe ve ark, 2018).

Protein kinaz R, hücrel stres sinyallerinin tespiti ve bunlara tepkisi için merkezi bir merkez görevi görür ve bu nedenle farklı stres-yanıt yollarıyla düzenlenmesi beklenir. Bu görüşe uygun olarak, PKR'nin kanonik aktivatörü, çift sarmallı RNA'dır (RNA virüslerinin çoğaltma işleminin zorunlu bir özelliğidir), PKR'yi hücre fonksiyonu modülatör yeteneklerine sahip bir örüntü tanıma reseptörü olarak verir. PKR'nin anti-viral tepkilere aracılık etmedeki merkezi rolü, karşılaştığı ve mücadele ettiği patojenlere karşı yanıt göstergesi olan kodlama sekansı tarafından sergilenen yüksek derecede pozitif seçim ile de kanıtlanmaktadır (Elde ve ark, 2009 ; Rothenburg ve ark, 2009 ; Carpentier ve ark, 2016). Bununla birlikte PKR, örneğin ısı şok proteinleri, büyüme faktörleri (örneğin PDGF) ve heparin gibi diğer faktörlerle de aktive edilebilmektedir (Li ve ark, 2006). PKR ayrıca viral olmayan patojenler (benzeri reseptör 4 yolunu aktive eden bakteriyel lipopolisakarit, beslenme veya enerji fazlalığı, sitokinler (örneğin, TNF- α , IL-1, IFN- γ) dahil olmak üzere sayısız cevap olarak aktive edilmektedir. Kalsiyum, reaktif oksijen türleri, muhtemelen katlanmamış proteinleri (büyük miktarda DNA hasarı varlığında), mekanik stres ve endoplazmik retikulum stres yaratmadan, ışınlama kaynaklanan, örneğin, tunikamisin, arsenit, tapsigargin PKR aktivatör proteini aktif hale getirmektedir (farelerde RAX)(Gil ve Esteban 2000; García ve ark, 2007 ; Hugon ve ark, 2017 ; Watanabe ve ark, 2018).

Şekil 13 ve Şekil 14 PKR yollarını özetlemektedir Etkileşim ortakları ve PKR'nin substratlar sunmaktadır.



Şekil 13. PKR etkisi ve tepkisi (Gil ve Esteban 2000; García ve ark, 2007; Hugon ve ark, 2017 ; Watanabe ve ark, 2018'den modifiye edilmiştir).



Şekil 14. PKR etkileşimleri. I ve II, dsRNA bağlanma alanlarıdır. Kırmızı daireler fosforilasyon kalıntıları temsil etmektedir (Gil ve Esteban 2000; García ve ark, 2007; Hugon ve ark, 2017; Watanabe ve ark, 2018'den modifiye edilmiştir).

PKR, eIF2 α yolu yoluyla protein sentezini düzenleyen dört kinazdan biridir. Bu kinazlar, PKR dışında, (PKR) benzeri endoplazmik retikulum kinazı (PERK); genel kontrol, basınçsız 2 kinaz (GCN2) ve hem düzenlenmiş eIF2a kinaz (HRI) 'dır. Dört kinazın tümü, protein sentezinin hız sınırlayıcı aşaması olan mRNA translasyonunun başlangıç fazının ana regülatörü olan α alt ünitesinde (eIF2 α) ökaryotik başlangıç faktörü 2'nin fosforilasyonunu düzenlenmektedir. EIF2 α 'nın Ser 51 üzerinde dört kinazın herhangi biri tarafından fosforilasyonu, inhibe edilmesine ve bunun sonucunda, antiviral faktörler için kodlayan ve / veya entegre stresin tepkimesine neden olan mRNA'ların çevrilmesine eşlik eden, tam protein blokajına kadar genel protein sentezinin geçici olarak baskılanmasına neden olmaktadır (Hoang ve ark, 2018). Protein sentezinin bu şekilde blokajı, viral replikasyonun azalması veya önlenmesi ile sonuçlanır ve apoptosis ile sonuçlanabilmektedir (García ve ark, 2007). PKR ayrıca, FADD / kaspaz-8 / kaspaz-3 ve kaspaz-9 APAF yollarının aktive edilmesiyle, eIF2 α fosforilasyonundan bağımsız olarak apoptozu indükleyebilmektedir (Gil ve ark, 2002 ; von Roretz ve Gallouzi, 2010).

Her iki PKR'ye bağlı apoptoz stratejisi, protein sentezi blokajı olsun olmasın, anti-viral tepkiler olarak hizmet etmektedir. Sonuç olarak, birçok virüs PKR yolağının bileşenlerini inhibe ederek bir anti-viral durumun kurulmasını önleyen mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar, PKR'nin doğrudan bağlanmasını önleyen (böylece otofosforilasyonu önleyen; örneğin, Hepatit C virüsü, Herpes simplex 1 ve Kaposi sarkomu vIRF-2), alt hücre lokalizasyonunu değiştiren (örn., İnsan ve Murin Sitomegalovirüs), onu bozulmaya (örneğin, Rift vadisi ateş virüsü) yönlendirmek veya aktivitesini düzenlemektir. PKR aktivitesinin düzenlenmesi, PKR RNA bağlama alanlarını dsRNA sekestrasyonu ile bozan proteinlerin ekspresyonu, (örn., Vaccinia virüsü, Dzananovic ve arkadaşları, 2018) olabilmektedir. Spesifik olarak, adenovirüs ve Epstein-Barr virüsü, dsRNA'ları, dsRBM'leri ve PKR otofosforilasyonunu inhibe eden yapısını bağlamak için gerekli yapısal elemanlarla transkripsiyonu gerçekleştirmektedir (McKenna ve ark, 2006; Wahid ve ark, 2009; Dzananovic ve ark, 2014).

PKR, öncelikle viral kaynaklı algılama yeteneğine ek olarak, endojen RNA'ya cevap olarak PKR de aktive edilir. Bunların çoğu kodlayıcı olmayan RNA'lar ve/veya microRNA'lar (miRNA'lar) gibi düzenleyici RNA'lardır. Örneğin, kodlamayan nc886 miRNA, doğrudan onunla etkileşime girerek PKR'nin bir bastırıcısı olarak işlev görür (Lee ve ark, 2011) ve ekspresyonu bazı malignitelerde artmış ancak diğerlerinde azalmıştır (Lee ve ark, 2016). Buna göre, bastırılması veya epigenetik susturması, apoptozun indüklenmesi

ve belirli kanser modellerinde onkogenlerin ekspresyonunun artması ile sonuçlanır (Lee ve ark, 2014; Hu ve ark, 2017) ve diğer kanser modellerinde in vitro olarak koruyucu bir etki yapmaktadır (Lee ve ark, 2016). Ek olarak, serebellar granüler nöronların geliştirilmesinde miR-29b'nin aşırı ekspresyonu, SP1 / RAX / PKR kaskadıyla apoptoza neden olan etanol nörotoksitesine karşı koruma sağlamaktadır (Qi ve ark, 2014). Başka bir örnek, keratinositlerde aşırı ekspresyonu, PKR'nin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanan ve bunun sonucunda hücre viyabilitesinin azalması, apoptoz seviyelerinin artması ve ultraviyolede inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanan uzun kodlayıcı olmayan RNA HOX antisens intergenik RNA'dır (HOTAIR). B (UVB) ile işlenmiş hücrelerdir (Liu ve Zhang, 2018). Ayrıca, yeni bir çalışma, PKR'nin retrotranspozonlar, uydu RNA'lar ve mitokondriyal RNA'lar (mitokondriyal genomun çift yönlü transkripsiyonuyla intermoleküler dsRNA'lar oluşturabilen) gibi diğer kodlayıcı olmayan RNA'ları bağladığını göstermiştir. Aslında, formaldehit aracılı çapraz bağlanma ve immüno-çökeltme dizilimi kullanılarak yapılan, PKR'yi bağlayan moleküller için mitokondriyal RNA, PKR'yi bağlayan endojen moleküllerin çoğunluğunu oluşturmuştur (Kim ve ark, 2018). Ek olarak, PKR'nin, hücre döngüsünün bu evresinde eIF2 α 'nın fosforilasyonuna yol açan, mitozda nükleer membranın bozulması üzerine, ters Alu tekrarları (IRAlus) tarafından oluşturulan dsRNA'ları bağlaması önerilmiştir (Kim ve ark, 2014)

2.7.2. Metabolizmada PKR'nin Rolü

Kanıtlar, PKR'nin metabolik stres, obezite, diyabet ve iltihap oluşturduğunu göstermektedir, bu literatürde tartışmalıdır. Görünüşe göre PKR vücutta metabolizmaya katılmaktadır ve eIF2 α 'nın fosforilasyonunun artması obezite ve diyabetle ilişkili insülin direncini ifade etmektedir (Nakamura ve ark, 2010, 2014; Carvalho-Filho ve ark, 2012). Ayrıca, PKR, pankreas β -hücresi proliferasyonunu inhibe etmektedir (Song ve ark, 2015), insülin tedavisi tirozin üzerinde PKR fosforilasyonunu arttırırken, treonin üzerinde poli I: C kaynaklı PKR fosforilasyonunu inhibe etmektedir (Swetha ve Ramaiah, 2015). Yüksek glukoz ,PKR'ın aktivasyonu ile insülin sinyalinin bozulmaktadır (Udumula ve ark, 2017).PKR aktivasyonu periferik dokularda insülin direncini harekete geçirmektedir (Nakamura ve ark, 2010, 2014; Carvalho-Filho ve ark, 2012 ; Carvalho ve ark, 2013). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, PKR'nin metabolik stres koşulları altında TAR RNA bağlayıcı proteinle (TRBP) etkileşime girdiği ve TRBP'nin fosforilasyonunun PKR'nin aktifleşmesine yol açtığı

ve dolayısıyla JNK aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Obez farelerde TRBP'nin aşırı ekspresyonu, glukoz metabolizmasıyla sonuçlanırken, karaciğerde TRBP fosforilasyonunun inhibe edilmesi, artan insülin direnci ve glukoz metabolizmasının yanı sıra azaltılmış inflamasyon dahil olmak üzere faydalı etkilere sahiptir (Nakamura ve ark, 2015).

PKR KO farelerinin yüksek yağlı diyetle (HFD) beslendikleri başka bir çalışmada, insülin seviyeleri kontrol diyetinden beslenen PKR KO farelerine veya her iki diyetten beslenen WT farelerine kıyasla belirgin şekilde daha yüksekti. Bununla birlikte, HFD ile beslenen WT ve PKR KO fareleri arasında, vücut ağırlığı veya glukoz seviyeleri gibi ölçülen diğer parametrelerde HFD ile beslenen PKR KO farelerinde bu parametrelerle ilgili önemli bir fark görülmemiştir (Taga ve ark, 2018; Lancaster ve ark, 2016). Bununla birlikte, Lancaster ve meslektaşları, PKR'nin T lenfosit alımında bir rolü olduğunu ve PKR KO farelerinin, iltihaptan korudukları düşünülen yağ dokusu içinde daha az T hücresine sahip olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, durum böyle değil ve yazarlar PKR'nin genetik olarak silinmesinin bu fareleri doymuş yağ asidi kaynaklı iltihaplanma veya iltihaplanma aktivasyonuna karşı korumadığını gösterdi. Ayrıca, yukarıda sunulan çalışmaların aksine, PKR'yi arttırmak için poli I: C enjeksiyonu, bozulmuş glukoz toleransı ile sonuçlanmamıştır (Lancaster ve ark, 2016).

Bu çelişkili bulgular, kullanılan farklı transgenik fare modelleri ile açıklanabilir. Yaygın olarak kullanılan PKR KO fare modelleri, PKR'nin N terminalinde veya C terminalinde bir silinmeye sahiptir ve bu modellerden türetilen hücrelerin , kısmi işlevselliği koruyan kesilmiş PKR formlarını ifade ettiği gösterilmiştir (Baltzis ve ark, 2002). Çalışmalar, farklı fonksiyonlar için farklı PKR bölgelerinin gerekli olduğunu göstermiştir. Aslında, katalitik alan, mRNA translasyon regülasyonunun baskılanması ve aşırı besin ve enerji tüketimine cevap olarak iltihabın indüklenmesi için gerekli olmaktadır (Garcia-Ortega ve ark, 2017). dsRNA bağlanma alanı, PKR'nin snoRNA tarafından metabolik stres koşulları altında aktive edilmesi için gerekli olmaktadır (Youssef ve ark, 2015); ve PKR'nin protein bağlanma alanı (ancak dsRNA bağlanma alanı değil), örneğin bir adaptör proteini olarak, diğer fonksiyonlar için gereklidir. Örneğin, sağlam protein bağlanmasına sahip katalitik olarak aktif olmayan bir PKR'nin, TRAF2 / RIP1 / NF-B / c-Myc yolları yoluyla β -hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Gao ve ark, 2015). Bununla birlikte, bu bulgu Song ve ark. (2015) , burada PKR'nin P53'ün sumilasyona bağlı stabilizasyonu yoluyla β -hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.

Not olarak, PKR inhibitörleri dahil çoğu kinaz inhibitör bileşiği, sadece katalitik domeni hedefler (Garcia-Ortega ve ark, 2017)

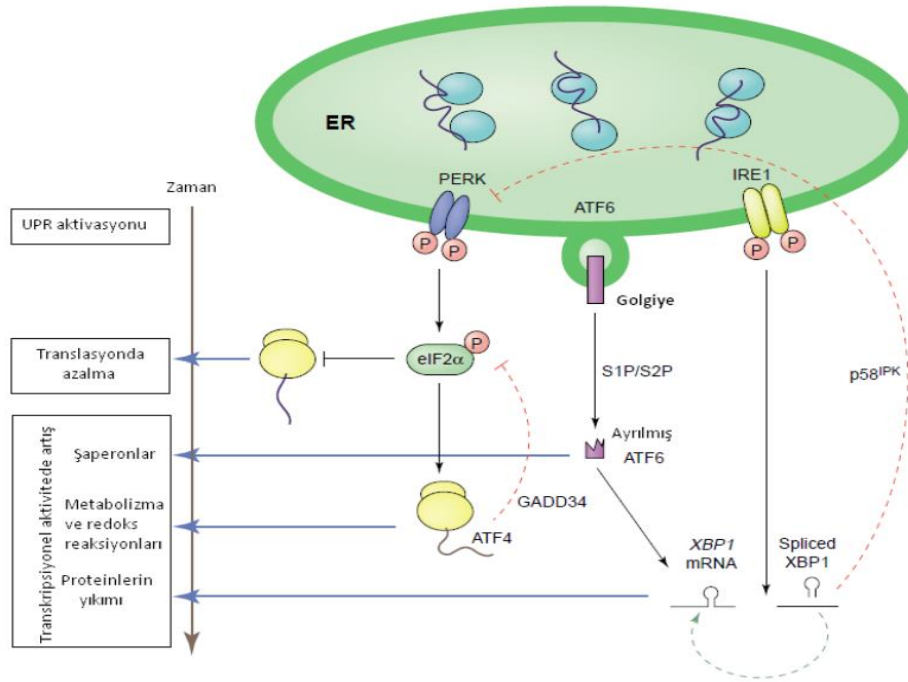
2.8. UPR Sinyal Yolakları

UPR içinde çeşitli stres faktörlerinin uyarılması altında aktif hale getirilen ilk yol PERK aracılı yoldur. ER lümeninin iç ve dış yüzeyi arasındaki basınç farkındaki değişiklikler, eIF2 α 'nın fosforilasyonuna neden olarak etkisizleşmesine yol açmaktadır (Suragani ve ark, 2006). Böylece, protein transkripsiyonunun başlatılması sonlandırılır ve PERK, sentezlenen proteinlerin miktarını azaltarak ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikimini azaltılmaktadır (Scheuner ve ark, 2005). Erken ER stresinde, bu tür PERK ile indüklenen eIF2 α fosforilasyonu ER basıncını geçici olarak hafifletebilir. Bununla birlikte, bu işlem, Ca²⁺ daki değişiklikler gibi konsantrasyon veya hipoglisemide ters uyarılara kronik maruz kalma altında yeterli olmayabilir. ER stresi hücrel apoptoza doğru ilerlemeye neden olmaktadır, böylece özellikle anahtar pro-apoptotik protein C / EBP homolog protein-10'u (CHOP) aktive eden ATF4 proteinini aktive etmektedir (Rozpedek ve ark, 2016). Sayısız araştırma CHOP'un, eIF2 α fosforilasyonuna neden olan DNA'ya zarar veren gen 34'ün (GADD34) aktivasyonunu destekleyeceğini, dolayısıyla transkripsiyon işlemini zayıflatmak için pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturduğunu göstermiştir. Ek olarak, artırılmış CHOP ifadesi, pro-apoptotik BH3 alanını (örneğin; Bim) içeren proteinlerin yukarı regülasyonunu ve anti-apoptotik proteinlerin (örneğin; Bcl-2) aşağı regülasyonunu destekleyebilmektedir (Rozpedek ve ark, 2016). Ayrıca, yüksek CHOP ekspresyonunun diabetes mellitus, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve tümörjenez ile ilişkisine işaret ettiğini gösteren geniş kanıtlar bulunmaktadır (Luoma, 2013; Thevenot ve ark, 2014; Rozpedek ve ark, 2016).

2.8.1. Endoplazmik Retikulum Stres Yolları

Hücre içi Ca²⁺ konsantrasyon veya beslenme yetersizliği, enfeksiyon, pH dengesizlik ve çeşitli faktörler tarafından indüklenen hücre hipoksi koşulları altında, hücrelerin normal protein katlama işlemi sinyalleme olay zincirlerini tetikleyerek UPR oluşturur ki bu rahatsız ile ilişkili hasara karşı hücrel direnci arttırmak için transdüserler (Hetz ve ark, 2013). Memelilerde, UPR esas olarak üç aşağı akış yolu yoluyla pozitif düzenleyici etkilerini uygular: PERK / CHOP / ATF4 yolu, ATF6 yolu ve IRE1 / XBP1 yolu. Bu yolların yanı sıra (Brewer, 2014) , yeni çalışmalar da fazladan proteinleri barındırmak için işleme ve katlama

sırasında proteinlerin otofajisi gereken fazladan proteinleri barındırmak için işleme ve katlama EPD ER lümenin boşluğu artırabilirliği aracılığıyla koruyucu etkileri ortaya koymuştur (Chua ve Tang, 2013). Bu işlem tarafından üretilen uyarıcı faktörler, protein katlama kapasitesinin güçlendirilmesine yardımcı olacak, ısı şoku proteinlerinin oluşumuna neden olabilmektedir. ER'nin kendisi de ER ile ilişkili degradasyon yoluyla yanlış katlanmış proteinleri tanıyabilir ve ubiquitin-proteasome sistemi aracılığıyla tam bozulmasını sağlayabilmektedir (Vembar ve Brodsky, 2008). Çoklu yolların dengeli koordinasyonu, hücre içi ortamın dengesinin yeniden sağlanmasına yardımcı olabilir. Bununla birlikte, ER stresi aynı zamanda ER'nin kendi düzenleyici mekanizmalarının bu fonksiyonlarına müdahale edebilir ve böylece hücreyi yavaş yavaş apoptoza doğru indükleyebilmektedir. Bu nedenle, ER stresi vücuda iki ucu keskin bir kılıcı temsil eder ve farklı zamanlarda zıt etkileri olabilmektedir. Şekil 15’de UPR yolları şematize edilmiştir.



Şekil 15. UPR yolları (Rutkowski ve Kaufman, 2004'ten modifiye edilmiştir).

PKR benzeri ER kinaz (PERK) yolağı, ATF ve IRE 1 aktif olduktan sonra hücre içinde çeşitli aktiflere sebep olmaktadır.

2.8.2. IRE1 Sinyal Yolu

Tip I transmembran proteini olan IRE 1, serin treonin kinaz dominine sahip aynı zamanda endonülease domainine sahip çift aktif olabilen bir enzimdir. İki tip izoform bulunmaktadır: α ve β . Her yerden ifade edilen α , epitelial hücreleri ifade eden ise β oluşturmaktadır (Szegezdi ve ark, 2006). IRE1 yolu, ATF6 yolundan sonra etkinleştirilmektedir (Yoshida ve ark, 2003) ve ER stresinin son bileşenini oluşturur. IRE1 α , ER stres koşullarının duyarlılığını düzenlemeye katılır. IRE1'in iki alt tipi arasında, IRE1 α dokuların çoğunda ifade edilirken, IRE1 β sadece bağırsak ve solunum yollarında seçici olarak eksprese edilir. Aktive edilmiş IRE1 α , dış hasara karşı eklem direnci için çeşitli immünoglobülinlerin üretimini destekleyen nükleer transkripsiyon faktörü X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1) ile hızla bağlanabilir. XBP1, ER proteinlerinin katlanması ve hücre içi taşınmasına, fosfolipidlerin biyosentezi ve ER zarının genişlemesine katılarak hücre transkripsiyonu sürecinde vazgeçilmezdir. XBP1'in iki alt birimi vardır: sinerjik etkileri olan XBP1u ve XBP1'ler. ER stresi sırasında XBP1'ler, BiP / GRP78, ERdj4 ve GRP5 gibi birkaç önemli ER şaperonunu düzenlemektedir (Lee ve ark, 2003). Bununla birlikte, uzun süreli ER stres sırasında IRE1 artık koruyucu alt proteini XBP1 aktive eder ancak, bunun yerine bir fosforilasyonlar bir dizi tetikler ile tümör nekroz faktörü alıcısı (TNFR) ile ilişkilendirilen faktörü-2 (TRAF2) ve apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1 (ASK1) olmaktadır (Nishitoh ve ark, 2002). Sonuçta, c-Jun N-terminal kinazın (JNK) yolunun aktivasyonuna neden olmaktadır (Zhang ve ark, 2001). Bu, c-Jun ve mitojenle aktive olan protein kinazın CHOP üretimini desteklemesine neden olur ve Bcl-2 proteinlerinin fosforilasyonuna yol açar ve sonuçta hücrel hasara yol açan BCL2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin (örn. Bax ve Bak) aktivasyonunu teşvik etmektedir veya hatta apoptosise gitmektedir (Galehdar ve ark, 2010).

2.8.3. ATF6 Sinyal Yolu

ER'de luminal domain içeren sitozolik domainli bir tip II transmembran proteini olan ATF6, bZIP, TAD ve BİP'e bağlanmaktadır. Normal bir durumda Grp78 ise hücrenin ER menranından inaktif olarak yer almaktadır. Grp78 ER strese girdiği zaman lümende katlanmaya yardımcı olabilmesi amacıyla ayrılmaktadır. Ayrıldıktan sonra ATF6 golgiye gider ve orada site 1-site 2'nin proteazlar aracılığıyla kesilir böylelikle aktif hale gelmiş olmaktadır. Aktive olan ATF6 nükleusa taşınıp hedef genlerin aktifleşmesini sağlamaktadır.

Hedef genlerde GRP78, GRP94, CHOP, XBP1, protein disülfid izomeras, Herp ve kalretikulin yer almaktadır (Szegezdi ve ark, 2006; Hussain ve ark, 2007). ER stresinin başlangıcından sonra aktif olan ikinci yol ATF6 yoludur (Yoshida ve ark, 2003; Van ve Braakman, 2005). ATF6, başlıca fonksiyonları lipid biyosentezini düzenleyen ve kaba ER'nin dilatasyonunu teşvik eden ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır (Thuerauf ve ark, 2007). Ayrıca, ATF6 β , ATF6 α 'nın sentezini düzenleyebilir ve ATF6 üretiminin genel dengesini koruyabilmektedir. ER stres başlangıcı sırasında, ATF6 hücrelerinde yanlış katlanmış proteinlerle temizlenmesi yoluyla direkt Golgi Ağına geçişi olabilmektedir. Aktif N-ATF6 α fragmanları, membran proteinlerinin hidrolizini düzenleyen ve örneğin ER stres şaperonları GRP78 ve GRP94'ün aktivasyonunu indükleyerek ER şaperonlarını aktive eden sitoplazmik ATF6 α 'nın N-terminalinden üretilmektedir. Ek olarak, GRP78 transkripsiyonel aktivitesi, ER stresinin başlangıcında, ER'den yanlış katlanmış proteinlerin translokasyonunu kolaylaştıran ve hücrel stres altında protein sentezini koruyan, on katına kadar önemli ölçüde artmaktadır. Bu, protein katlama kapasitesini artırır ve hücrel yapıları hasardan korumaktadır. Benzer şekilde, bu yolun kendi kendini düzenleyen mekanizmaları yetersiz olduğunda, ATF6 sentezi azalır ve uzun vadeli ER stresi daha sonra apoptoza yol açan CHOP'yi aktive etmektedir.

2.8.4. PERK Sinyal Yolu

PERK, eIF2 α ' yi fosforilleyerek translasyonu azaltan kinaz aktiveli sitozolik domainli tip 1 transmembran proteindir (Rosheva ve ark, 2009) . Hatalı proteinlerin birikmesi sonucu PERK yolu aracı UPR yanıt genlere upregulasyona bağlantılı olmaktadır (Colgan ve ark, 2011). IRE-1'e yapı olarak benzer özelliği bulunmaktadır sadece endoribonükleaz aktivitesi yoktur.

ER stresi ile karşılaştıktan sonra GRP78 ile lümene katlanmak için gönderilir ardından sitozolik domaininde trans otofosforilenmesi ve dimerizasyon üzerinde PERK aktive edilmeye başlamaktadır. PERK aktif olduktan sonra eIF2 α 'nın 51. Durumunda bulunan serini fosforlamaktadır. Fosforlanan eIF2 α 'nın translasyonu hücrede durdurulur fakat transkripsiyon faktörünü ifade eden ATF4 translasyona devam etmektedir sayıları ve çoğalır. Böylece ER stresine karşı protein yükü azaltılması PERK aktivasyonu ile katlanmamış proteinler düzeltilmiş olmaktadır (Szegezdi ve ark, 2006; Rosheva ve ark,

2009). ATF4; transkripsiyon faktörünün bZIP ailesinin bir üyesidir (Xu ve ark, 2005). Nukleusa giren ATF4 daha sonra GADD34, CHOP, ATF3, amiasiterlin taşınımında, biyosentez oksidatif strese dirence karşı rol alan genlerin transkripsiyonu aktif etmektedir (Rosheva ve ark, 2009). CHOP ise apoptoza götüren bir sinyaldir ve hücre ölümüne sebebiyet vermektedir (Szegezdi ve ark, 2006; Hussoin ve ark, 2007).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Hücre Dizileri

Çalışma boyunca kullanılan ve ticari olarak üretilmiş olan Beta TC 6 hücre hatları ATCC'den temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Tablo 1. Kullanılan besiyeri ve kimyasalları.

Ürün	Firma (Katalog no)
RIPA Lysis tamponu, 100 ml	VRM Life Science (N653 100 ML)
Fosfataz inhibitör karışımı II (100X, 1ml)	MedChem Express(HY-K0022)
Proteaz inhibitör karışımı II (100X, 1 ml)	MedChem Express (HY-K0010)
Fetal Bovine serum (FBS) 100 ml	Gibco (CP-16-1265)
Penisilin- Streptomisin 100X, 20 Mm, 100 ml	Sigma- Aldrich (P-4333)
Tripsin-EDTA (% 0,25), 1X, 100 ml	Sigma- Aldrich (T-4049)
L-Glutamine, 200 Mm, 100 ml	Sigma- Aldrich (G-7513)
Dulbecco'sModifiedEagleMedium(DMEM), 500 ml	Gibco, Sigma- Aldrich (D-5546)
Tunicamycin	Sigma- Aldrich (T7765-1MG)
2-aminopurin	Sigma- Aldrich (A3509-100MG)
İmidozole oxindale (imoxin)	Sigma- Aldrich (19785-5MG)
Mouse INS(insülin) ELİSA kit	Elabscience (E-EL-M2614 96T)
Dulbecco'sPhosphateBufferSaline(DPBS), 500 ml	Capricorn, Gibco (D-8537)
Kloroform	Isolob
Ethanol absolute for analysis	Milipore
2-Merkaptoethanol for syntheis	Milipore (S7215940 621)
Methanol gradient grade for liqüid chromatoghaphy	Milipore
Glycine, 1000 g	Nyztech (CAS56-40-6)
SDS, 100 g	Bioshop (3F29927)
Trisbase	Nyztech (CAS77-86-1)
Protein Quantitation Kit (Bradford Assay)	Abcam (102535)
RiboEx (Total RNA isolation solution),100 ml	GeneAll (301-902)
5X SDS-PAGE Sample Loading Buffer	Nyztech (MB11701)
Wizscript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) with RNase inhibitör	Wizbiosolutios (W2211)
RealAMP™ SYBR qPCR Master Mix (2X, High ROX)	Lolicato
See Bluen@ Plus 2 (marker)	İnvitrogen (LC5925)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Milipore

3.1.2. Kullanılan Antikorlar ve Oligolar

Tablo 2. Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar ve oligoların listesi.

Ürün	Firma
Anti- Rabbit IgG- HRP	Elabscience (SAEP003)
Phospho-eIF2 α (s51) Poly	Elabscience (ENP0093)
CHOP/ GAD153 Poly Ab	Elabscience (EPP11527)
Tubulin Poly Ab	Elabscience (ENT5051)

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Ürün	Firma
10 cm ² 'lik petri	Corning (431464)
1,5 ml 'lik Steril Eppendorf	AxygenQuality
15 ml'lik Steril Falcon	VMR Life Science
50 ml'lik Steril Falcon	Sigma- Aldrich (31434)
Pipet tek kullanımlık steril, 5 ml	Costar (160510)
Pipet tek kullanımlık, 10 ml	Costar (4488)
2 ml'lik steril hücre dondurma tüpü	VWR Life Science
6 Kuyucuklu Steril Plate	SARSTEDT
96 Kuyucuklu Steril Plate	SARSTEDT

3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazların listesi.

Ürün	Firma
Spektrofotometre	ThermofisherScientific
Western Blot seti (Yürütme, tranfer, güç kaynağı vs)	Bio-Rad
Hot Block (sıcak blok)	
qPCR cihazı	ThermofisherScientific
Invert (ters mikroskop)	
Hücre kültürü kabini (Laminar air flow cabinet)	AirStream
Santrifüj	
Soğutmalı Santrifüj	
Etüv (inkübatör-CO2'li)	NUAİRE
Görüntüleme sistemi	UV-Chemi Dot-2
-80 o C Dondurucu	(Deep Freeze)
Sıvı azot tankı (-196 o C)	Mrc
Transfer cihazı	Bio-Rad
+4 o C ve -20 o C Buzdolabı	
Shaker (Çalkalayıcı)	
Hassas terazi	
Su Banyosu	WiseBath
Otoklav	HIRAYAMA
Distile su cihazı (DD)	
Distile su cihazı (BD)	
Buz Makinesi Cihazı	

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri

Hücrenin Özellikleri

ATCC Kodu; CRL-11506

Büyüme Özelliği; Adherent

Organizma; *Mus musculus*

Hücre Tipi; Beta Hücresi

Doku; Pankreas

Hastalık; Tip 2 Diyabet

Çalışma boyunca kullanılan Jurkat hücre dizileri, canlılıklarını sürdürebilmek amacıyla DMEM besiyeri ortamında kültüre edilmişlerdir. DMEM besi ortamının tamamlanmış içeriği aşağıda verilmiştir.

Tamamlanmış DMEM Büyüme Besi Ortam İçeriği:

% 100 DMEM besiyeri (500 ml)

% 10 Fetal Bovin Serum (FBS)

% 1 Penisilin Streptomisin

%1 piruvat (eğer yoksa)

Beta hücreleri, % 10 FBS ve % 1 penisilin streptomisin içeren DMEM büyüme besiyeri kullanılarak % 5 CO₂ içeren 37°C ısı ortamına sahip inkübatörde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Kültür devamlılığı için 10 cm lik petri kapları kullanılmıştır. Hücre yoğunluğu %70-80 e ulaştığında kültür devamlılığını sağlamak amacıyla pasajlanmışlardır.

3.2.2. Hücrelerin Dondurulup Saklanma İşlemi Dondurma Besiyeri İçeriği

% 70 DMEM

% 20 Fetal Bovin Serum (FBS)

% 10 DMSO

Kültür devamlılığı bir süre devam etmiş ve canlılık oranı % 90 ve üzerinde olan kültürdeki hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Bunun için hücreler ilk önce steril falkon içerisine alınarak 1100 rpm'de, 4°C'de, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelet, dondurma besiyeri ile homojenize edilmiş ve her bir dondurma tüpünün içerisinde 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Tüpler - 80°C'de bir gece muhafaza edildikten sonra sıvı azot tankına alınarak -196°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması

İhtiyaç duyulduğunda, -196°C'de dondurularak stoklanmış olan hücreler sıvı azottan çıkarılmış ve 37 °C'de ki su banyosunda çözdürülmüştür. Çözülmüş olan hücreler bekletilmeden 15 ml' lik steril falkona alınmış, üzerine DMEM besiyeri ilave edilerek 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı hücre peletinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelet üzerine tamamlanmış DMEM büyüme besiyerinden eklenerek pelet besiyeri içerisinde pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiş ve hücreler 10 ml'lik steril petri içerisine alınarak kültür devamlılığı sağlanmıştır. Ya da sıvı azottan çıkardığımız hücreleri

hızlıca su banyosunda çözünmesini bekledikten sonra 10 ml'lik petri kabını aktardıktan sonra üzeri 10 ml yi tamamlamak üzere DMEM besiyeri eklenmiştir.

3.2.4 Diyabetik İlaç Stoklarının Hazırlanması

PKR İnhibitör ve ER Stres Yapan Kimyasalların Stoklarının Hazırlanması

Dmso, Dmso + tunicamycin, 2-aminopurin, 2 amino pürin + tunicamycin, imoxin, imoxin+ tunicamycin şekilde deney düzeneği kurulacaktır.

Normal koşullar altında PKR aktivasyonu sonucunda ER stres varlığında hücreler ya daha az protein salınımına sebep olur yada apoptoza gitmektedir. Kimyasallar kullanarak insülin salınımı gerçekleşmesini hedeflenmiştir. PKR inhibitörleri olan imoxin ve 2-aminopurin, ER stres tunicamycin kullanılmıştır.

İmoxin 1 mM (1000 X) konsantrasyonu olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürerek steril ortamda stok çözeltileri hazırlanmıştır. 2-Aminopurin 250 mM (250 X) olacak şekilde DMSO ile çözündürülerek steril ortamda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Tunicamycin ise 500 x konsantrasyonu olacak şekilde Etanol ile çözündürülerek steril ortamda stokları hazırlanmış ve -20°C'de saklanılmıştır.(DMSO için ise 250x konsantrasyon hazırlanılmıştır)..

3.2.5. Hücre Kültürü Çalışmalarını ve Sonrasında Yapılacak Olan Analizlerin Hazırlanması

Çalışma boyunca pankreas β TC 6 hücre hatlarıyla PKR inhibitörleri ve tunicamycin ile ayrı ayrı muamele edilerek hücre canlılığı, ER stresi cevabı, insülin salımının olup olmaması gibi sinyal yollarının çalışıp çalışmadığını kontrol grubu ile kıyaslanarak test edilmiştir. Öncelikle 10 cm²'lik platelerde 3 tane 10 cm² lik plate elde ettikten sonra 3 tane 6 kuyulu platelere hücreleri aktarılmıştır. Aktardıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. PKR inhibitörlerle 24 saat boyunca hücrelerle muamele edilmesi(Pretreatment), sonra Tunicamycin ile 16 saat hücrelere muamele edilmesi ve en sonunda glukozsuz medyumla 2-3 saatkadar hücreleri muamele ederek akabinde yüksek glikoza maruz bırakılıp ardından 8 saat muamele edilmiş ve hücreler toplanmıştır.

Hücreler lizat edildikten sonra insülin seviyelerini belirlemek ve mRNA düzeyinde yerini tespit etmek için ELİSA testi, qPCR, Western Blot testleri yapılmıştır.

3.2.5.1. PKR inhibitörlerin 24 saat boyunca hücrelere muamele edilmesi

PKR inhibitör olan imoxin ve 2-aminopurinlerin, ER stres öncesi muamele edilerek PKR aktivitesini engellemek, kalsiyumun salınımı sağlamaktır. Çünkü yapılan çalışmalarda PKR'ın sinyal yolağı olan Perk'in eIF2 α 'nın fosforlanarak protein sentezinin azaldığını kısa PKR ile protein arasında bir ilişki olduğu için inhibitörler kullanılarak protein sentezinde bir etkisi olmasını engellemek amacıyla bu kimyasallar kullanılmaktadır. 24 saat muamele edilmiştir.

3.2.5.2. Beta hücrelerinde ER stres tunicamycin indüklediği hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı

PKR inhibitörü ile muamele edilen hücreler ER stresin kimyasal olan tunicamycin eklenip ER strese uğraması sağlanmıştır. Hücreler tunicamycine maruz kaldıktan sonra insülin salınımına bir azalma olması beklenmiştir fakat bir önceki gün PKR inhibitörleri eklendikten sonra böyle bir sonuç almayı beklememiş olduğunu hedefledik.

3.2.5.3. 16 saatte glukozsuz medyum ile sonrasında yüksek glukozu maruz bırakılan hücre kültürü çalışmalarının hazırlanışı

Platedeki hücreler normal koşullarda glukozlu medyumlarda çoğalırken, bu aşamada glukolu medyum atılır glukozsuz medyum hazırlanıp hücreler muamele edilmiştir. 3 saat boyunca inkübasyonda bekletilmiştir. Daha sonra medyum atılıp normal glukozlu DMEM medyum hücrelere eklenip 8 saat inkübasyonda bekletilmiştir. En sonunda medyumlar atılıp plateler lizat yapılması için -80°C 'ye saklanmıştır.

3.2.2.4. Lizat yönteminin uygulanması

-80°C 'ye kaldırılan medyumsuz plateler(dibinde hücreler bulunmakta) onları buz üstünde bekleterek 150 μl PBS eklenmiştir. Hücre kazıyıcı ile kazılıp ve 150 μl kadar

pipetle çekilip ependorflara eklenmiştir (Eklenenler oda sıcaklığında kalmasın diye -20°C’ de bekletilmiştir). Daha sonra 20 dk’da bir 3-4 kez bir -80° C’ de bir buz üstünde şoklama yapılmıştır.

En sonunda 15-20 dk boyunca mini santrifüj yapılır ve supernatant alınır yeni ependorflara eklenir. Pellet atılır. En son deney sonuna kadar -20 c de saklanır. (Elisa testi için kullanıcaktır).

3.3. ELİSA Testi

Enzim bağlantılı bağışıklı testidir. Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir.

Tablo 5. Elisa kit’in malzemeleri, dilute ve volümleri.

Malzemeler	Seyreltme	Volüm
Concentread wash buffer	1:25	30 ml
Substrate Reagent	-	10 ml
Stop solution	-	10 ml
Biotynylated Detection Ab diluent	1:100	14 ml
HRP conjugate diluent	-	14 ml
Refereance standart & sample dil.	-	20 ml
Mouse INS standart (8000 pg)	-	-
Concentrated HRP conjugate	1:100	120 µl
Concentrated Biotynylated detection Ab for Mouse INS	-	120 µl

Protokol

1. Lizat yöntemi uygularak topladığımız örnekler -20 C den çıkartılıp, ependorfa toplanan örnekler buzda çözülür.

2. Wash Buffer hazırlamak için (1:25) oranında 375 ml distile su ve 15 ml contcantrated wash buffer hazırlanır.

3. Standart çözeltisi için 8 ng ‘e 0,8 ml (800 µl) refent standart eklenir. 10, 5, 2,5, 1.25,0.63, 0.31 ve 0 olmak üzere hazırlanır.

Tüplere 150 µl standart çözeltisi ve üstüne 150 µl hazırlanan refent standart eklenir. Toplam 300 µl olur bundan 150 µl alıp 10 dan başlayıp farklı pipetler kullanarak tek tek pipetaj yapılır. 10, 5, 2,5,... Her biri için bir öncekinden 150 µl çekilir.

4. Standart çözeltisi ve örnekler 96 well kuyucuklara 100 µl olacak şekilde A' dan başlayıp aşağıya doğru eklenir. Eklendikten sonra 90 dk 37 c de çalkalayıcı inkübatörde kalır.

5. 90 dk sonra inkübatörden alıp kuyucuktaki örnekler ve standartlar lavaboya dökülür. Önce 12 ml Biotinylated detection Ab diluenti ve 120 µl concentrated biotinylated detection Ab ile karıştırılır pipetaj yapılır. Buzda bekletilir.

Boş olan kuyucuklara 100 µl biotinylated detection Ab solüsyonu eklenir ve 1 saat çalkalayıcı inkübatöre bırakılır.

6. Bir saat inkübe edildikten sonra içindeki sıvı atılır ve 350 µl wash buffer solüsyonu ile 3 kez yıkanır.

7. HRP için concentrated HRP conjugate 120 µl alınıp 12 ml HRP conjugate diluent karıştırılır pipetaj yapılır. Her kuyucuğa HRP antikoru 100 µl eklenir. 30 dk 37 c de çalkalayıcı inkübatöre bırakılır.

8. Sıvılar atıldıktan sonra wash buffer ile 5 kez yıkama yapılır.

9. Her bir kuyucuğa 90 µl substrat reaktifi eklenir. Sızdırmazlık ile etrafı kapatılır. 37 c de 15-20 dk inkübe edilir.(Renk mavileşir)

10. Sıvıyı dökmeden üstüne 50 µl stop solüsyonu eklenir ve renk maviden sarıya döner.

11. 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılır.

3.4. Protein İzolasyonu ve Protein Tayini

İlaçlarla muamele ettiğimiz hücreler (Dmso, Dmso + tunicamycin, 2-aminopurin, 2 amino pürin + tunicamycin, imoxin, imoxin+ tunicamycin) kültür plaklarından alınarak Western Blot (W.B.) analizi için;- 80 C den çıkarılıp buz üstünde tutulup çözülmesi beklenmiştir

RIPA solüsyonu için hazırlanan içerikler 500 µl stok hazırlanmıştır. 6 tane platemiz olduğu için yaklaşık 3.5 ml stok hazırlanmıştır. Bunun % 1 lik kısmı ise 35 µl proteaz ve fosfataz eklenmiştir. Buz üstünde çözülen hücre platelerine hazırlanan solüsyon eklenmiş ve 15 dk beklenip 5 dk da bir çalkalanmıştır. Hücre kazıyıcı ile kazılıp yeni ependüflere aktarılmıştır. Bütün bu işlemler yapıldıktan sonra pipetaj yapılmıştır. -80°C'ye kaldırılıp 20 dk beklenip sonra tekrar 20 dk buz üstünde bekletilmiştir (bu işlem 3 kez tekrarlanılmıştır).

14000xg'de 20 dk'da santrifüjlenmiş, supernatant alınır pellet atılmıştır ve protein izolasyonu yapılmıştır. Protein izolasyonu için kullanılan RİPA lizis buffer içeriği verilmiştir.

Tampon çözelti (RIPA buffer) içeriği (100 ml için):

- 149 Mm sodyum klorür
- 50 Mm Tris pH 7.5
- 0.1% sodyum dioksit sülfat
- 1% Nonidet p-40 substrat
- 0.5 % deoksilat asid sodyum salt

3.5. Protein Tayini

Örneklerden elde edilen protein ekstraktlarının içerisinde bulunan total protein miktarlarını belirlemek amacıyla Protein Quantitation Kit (Bradford Assay) kullanılmıştır. (Abcam discover more ab102532)

Working solüsyon 1:5 oranında hazırlanmıştır.

12 standart (2x)

12 örnek (2x)

1 blank (RIPA)

Toplam 25-30 hazırlarsak 100 µl için yaklaşık 3 ml stok hazırlanır. 0.6 ml WS, 2,4 distile su hazırlanıp toplam 3 ml hazırlanmış ve ve platelere 100 µl'lik eklemek için hazırlanmış olur.

Tablo 6. Protein tayini için hazırlanan standart değerleri.

Standart no	Standart (µl)	Distile su
1	0	50
2	5	45
3	10	40
4	15	35
5	20	30
6	25	25

Tabloda standartlar için ölçümler verilmiştir. Her biri 96'lık well'e 10 ml kadar eklenmiştir.

Örnekler için ise 5 µl kadar eklenir ve üzerine 20 µl distile su eklenir. 96 well'e 10 µl x 2 eklenmiştir (ortalaması alınır).

96 well her kuyucuğa standart ve örnekler ikişer tekrarlanarak 10 µl eklenir. Üzerine 100 µl WS eklenir. Kontrol olarak RIPA solüsyonu eklenmiş. Spektrofotometrede 562 nm'de ölçülmüştür.

3.6. Western Blot analizi

Western blot kısaca; elektroforez kullanılarak poliakrilamid jelde (SDS-PAGE jel) yürütülen proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sonrasında ise jelin destek membrana transferini ve membranda bulunan proteinlerden amaca uygun olanını görüntüleyebilmek adına özgül primer ve seconder antikorların kullanılmasını son olarak da istenilen proteinin görüntüleme işlemini içermektedir.

Western Blot analizleri sırasında kullanılmış olan buffer ve solüsyonların içeriği aşağıda belirtilmiştir.

10X TBS (1L) :

30,2 g Tris-base

43,8 g NaCl

932 mg KCl

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml) :

3.03 g Tris-base

14,4 g Glycin

5 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)

Distile su (pH: 8,1-8,5)

Not: Kullanım önce %20 oranında metanol ilave edilir.

10X Running Buffer (1L) :

30 g Tris-base

144 g Glycin

15 g SDS

Distile su

(pH: 8,6)

Lower Buffer (500 ml) :

91 g Tris-base
20 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)
14 ml HCl (6N)
Distile su
(pH: 8,8)

Upper Buffer (500 ml) :

30,5 g Tris-base
20 ml SDS (%10 luk SDS solüsyonundan)
30 ml HCl (6N)
Distile su
(pH: 6,7)

1X TBS-t (1L) :

100 ml 10X TBS
900 ml Distile su
1 ml Tween 20

%40 Amonyum persülfat:

0,5 g APS
1 ml Distile su
% 6' lık Süt Tozu (Skim Milk) Solüsyonu:

100 ml 1X TBS-t
5 g Skim Milk

10 ml Tris-HCl (0,5M)

% 5'lik Bovin Serum Albümin (BSA) Solüsyonu:

100 ml 1X TBS-t
5 g BSA

-Poliakrilamid jelin (SDS-PAGE Jel) hazırlanması

Hazır Jel kullanılmıştır.

-Jele yüklenecek protein örneklerinin hazırlanması

6X Loading Dye (10 ml) :
3,75 ml 1M Tris-HCl (pH: 6,8)
5 ml Gliserol+H₂O (4 ml Gliserol, 1ml Distile su karışımı)
1 g SDS
900 µl Merkaptetanol

% 0,06 Bromfenol blue

Distile su

Western blot analizi için total protein izolasyonu ve miktar tayini yapılan örnekler kullanılmıştır. Total protein konsantasyonları hesaplanmış deney gruplarından; DMSO 15 ml, DMSO+ Tunicamycin 19 ml , 2-amino pürin 19 ml , 2-amino pürin + Tunicamycin 18 ml, İmoxin 18 ml, İmoxin+Tunicamycin 19 ml alınıp '5 ml loading dye' ile karıştırılarak 1-2 dakika santrifüj yapılmıştır. 95°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir. Böylece örnekler jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

-Elektroforetik yürütme işlemi

SDS-PAGE jel dikey elektroforez tankına yerleştirilerek içerisine '1X Running Buffer' eklenmiş ve taraklar çıkartılmıştır. Taraklar çıkartıldıktan sonra oluşan kuyucuklara, protein ağırlık belirteci (protein marker 5 µl) ve hazırlanmış olan örnekler 25 ml yüklenmiştir. Yükleme sonrası örnekler ayırıcı jele gelinceye kadar (yaklaşık 2 saat) 90 voltta yürütülmüştür.

-Transfer işlemi (yarı ıslak transfer işlemi)

Jelin membrana transfer işlemine geçilmeden önce, transferde kullanılacak olan PVDF membran önce metanolde 5 dakika sonrasında ise 'Towbin Transfer Buffer' içerisinde 5 dakika bekletilerek aktive edilmiştir. Öte yandan 6 adet whatman filtre kağıdı 'Towbin Transfer Buffer' ile tamamen ıslatılmış ve transfer sistemine yerleştirilmiştir. Üzerine aktifleştirilmiş olan PVDF membran onun üzerine ise SDS-PAGE jelin ayrıştırıcı jel tabakası yerleştirilmiştir (Elektroforez sonrası SDS-PAGE jelin paketleyici kısmı uzaklaştırılmıştır). Son olarak tekrar 6 adet whatman filtre kağıdı yine 'Towbin Transfer Buffer' da ıslatılarak jelin üzerine yerleştirilmiş ve transfer modülünün kapağı kapatılarak 1A° akım ve 25V'da 30 dakika transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sırasında whatman filtre kağıtları, membran ve jel arasında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilmiştir.

-Bloklama işlemi

Transferden sonra üzerine kaplayana kadar bir kaba TBS/ TBS+Buffer eklenir. Birkaç dakika sonra sıvı atılır ve bloklama işlemine geçilir. Bu işlem proteinleri bağlamış olan PVDF membranda, spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için protein bağlanmamış kısımların ilgisiz proteinlerle kaplanmasını sağlamak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Transfer işlemini takiben, proteinleri bağlamış olan PVDF membran 6000 µl BSA içerisinde 1 saat boyunca yatay çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

-Primer ve seconder antikor ile inkübasyon işlemleri

Phospho-eIF2 α (1:2000), IgG-HRP (sekonder antibody) (1:5000), tubulin, CHOP (1:2000) dilüsyon oranlarına göre hazırlanır. Sonrasında PVDF membranlar primer antikorlar ile gece boyunca soğuk odada 4°C’ de inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda primer antikor tekrar kullanılmak üzere 4°C’ de bir süre saklanmıştır. Membranlar ise 3 kez 5’er dakika süre ile %1 Tween20+TBS) solüsyonu ile yıkanmıştır. Membran yıkama sonrasında ise; 6000 μ l BSA solüsyonu eklenir. 1:5000 oranında sekonder antibody IgG-HRP eklenir. 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 kez 5 dakika wash buffer ile yıkanmıştır.

Tablo 7. İmmunoblotlamada kullanılan birincil antikorların dilüsyon oranları.

Antikor	Dilüsyon oranı
Phospho-eIF2 α	1:2000
CHOP/ GADD153	1:2000

Tablo 8. İmmunoblotlamada kullanılan ikincil antikorların dilüsyon oranları.

Antikor	Dilüsyon oranı
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:5000
Tubulin Poly Ab	1:5000

-ECL ile görüntüleme işlemi

Yıkama sonrası PVDF membran ECL solüsyonu ile muamele edilerek UV-Chemi Dot-2 cihazında görüntülenmiştir. Elde edilen bant görüntüleri kaydedilerek yazılım programı ile analiz edilmiştir.

3.7. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon işlemlerinde ‘RiboEx™ Total RNA isolation solution (GeneAll)’ kullanılmıştır.

1000 μ l Ribox solüsyonu daha önce stokladığımız 10 cm²’lik platede bulunan örnekler 3 dakika boyunca bekletilir Scraper(hücre kazıyıcı) ile kazılır 1,5 μ l ependurflere eklenip, 5 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. 200 μ l chloroform eklenip 15 saniye çalkalayıp 2 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir.

14000 rpm 15 dakika 4° C’ de santrifüj edilmiştir (üstte kalan kısım RNA, ara faz DNA, altta kalan kısım proteinler vs). 500 µl isopronol eklenip 3-5 kez yavaşça karıştırılıp 14000 rpm 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernant atılmıştır. RNA pellete 1 ml %75’lik alkolle yıkanıp 140000 rpm 5 dakika santrifüj edilmiştir. En son 50 µl RNAz-free water çözölmüştür. 10 dakika 56°C’ de inkübe edilmiştir. Elde edilen RNA hiç bekletilmeden -80 °C de saklanmıştır. Ayrıca RNA miktarını tayin etmek amacı ile Qubit ölçüm cihazı kullanılmıştır.

3.8. cDNA (komplementer) Sentezi

100 ng/ ml’ de RNA stokları hazırlanılmıştır.

cDNA sentezi için WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) kullanılmıştır.

Aşağıda içeriği verilen 2xRT Master Mix (66 µl için) hazırlanmıştır (Miktarlar örnek sayısı ile çarpılarak hazırlanılmıştır).

10X Reaction Buffer	13,2 µl
20X dNTP mix	6,6 µl
Random hexamer	13,5 µl
WizScript™ RTase	6,6 µl
RNase Inhibitor	3,3 µl
RNase free Water	23,1 µl
Total	66 µl

2x Master Mix’ ten 10 µl pcr tüplerine eklenmiştir. RNA izolasyonu ve RNA miktar tayini yapılmış(100 ng/µl) olan örnekler 10 µl volüm içerisinde master mix üzerine eklenmiştir. 3 - 4 kez pipetleyerek karışması sağlanmış ve hava kabarcığı kalmaması için tüpler santrifüj edilmiştir. cDNA’lar dilute edilmiştir (80 µl H₂O ile).

Tablo 9. cDNA sentez basamakları ile bu basamaklardaki sıcaklık ve bekleme süreleri.

	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık(°C)	25	37	35	4
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

Hazırlanan karışım Termal Cyler hazır oluncaya kadar buz üzerinde bekletilmiştir. Tüpler daha sonra Termal Cyler’a yerleştirilmiştir.

3.9. qPCR Aşaması

RealAmp™ SYBR qPCR Master mix (2X, Low ROX or High ROX) kullanılmıştır.

Tablo 10. qPCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler ve volümleri.

Component	Volume
2x SYBR qPCR master mix	10 µl
Primer 1 (forward)	1 µl
Primer 2 (reverse)	1 µl
Rox	1 µl
cDNA (seyreltilmiş)	5 µl
Nükleaz H ₂ O	2 µl
Toplam	20 µl

Actin ve Xbp 1 primerleri kullanılarak (cDNA hariç en son platelere eklenecektir) master mix (26x) hazırlanılmıştır. 96 kuyucuklu platelere 24 well'e actin, diğer 24 well'e Xbp1 15 µl eklenmiştir. Üzerine 5 µl cDNA(dilute edilmiş) eklenmiştir.

Tablo 11. Spliced Xbp1 qPCR primerleri (fare ve insan).

Spliced Xbp1 Qpcr primerleri	
sXBP fw	CTGAGTCCGCAGCAGGTG
sXBP Rv	TCCTTCTGGGTAGACCTCTGG
Ürün	200 bp
Melting sıcaklık	62 ° C

Tablo 12. Beta actin mRNA Primer pair.

Beta actin mRNA Primer pair	
Actb Fw	AACTGGGACGACATGGAGAA
Actb Rv	GAAGGTCTCAAACATGATCTGG
Ürün	150 bp
Melting sıcaklık	60°C

Tablo 13. PCR aşamaları ile bu aşamalarındaki sıcaklık miktarları ve bekleme süreleri.

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95° C	10 dakika	1
Denatürasyon	95° C	15 saniye	35-45
Annealing	A	20 saniye	35-45
Extension	72° C	30 saniye	35-45
Dissociation	65-95° C	-	-

Relatif mRNAs ekspresyon düzeyleri delta CT metoduna uygulanarak elde edilmiştir. Buna göre; $\Delta\Delta CT$: normalize edilmiş CT değerleri arasındaki fark olmak üzere;

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{treatment}} - \Delta CT_{\text{control}}$$

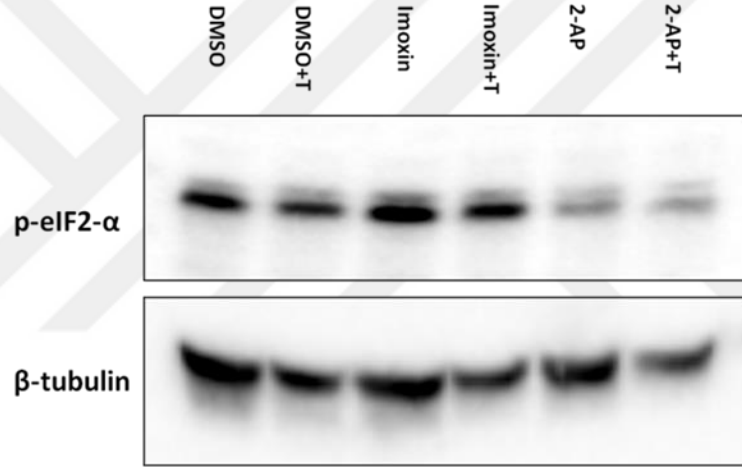
$\Delta\Delta CT$ daha sonra aşağıdaki formülle folkat değişimi olarak çevrilmiştir. Folkat değişimi= $2 - \Delta\Delta CT$



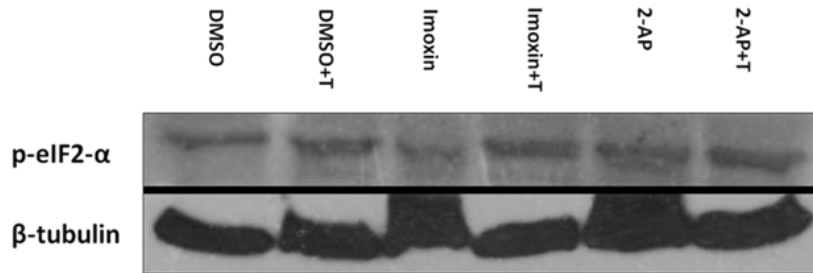
4. BULGULAR

4.1. P-eIF2- α İfadesinin Beta Hücrelerinde Protein Düzeyinde Belirlenmesi

Beta hücrelerinde (β -TC-6) p-eIF2- α 'nın protein düzeyinde ifadesinin belirlenmesi için 'Western Blot' analizleri gerçekleştirilmiştir ve deneyler 2 kez tekrarlanmıştır. Tunicamycin ile ER stresi oluşturulmuş gruplara PKR inhibitörleri uygulanmış (Imoxin ve 2-aminopurin) ve PKR' nin down-stream hedefi olan eIF2- α 'nın fosforilasyonu her grup için tespit edilmiştir. Elde edilen protein bant görüntüleri Şekil 16 ve Şekil 17' de verilmiştir. P-eIF2- α ifadeleri her grupta β -tubulin ifadelerine göre normalize edilmiştir.



Şekil 16. Gruplardaki protein bant görüntüleri (görüntüleme cihazı)



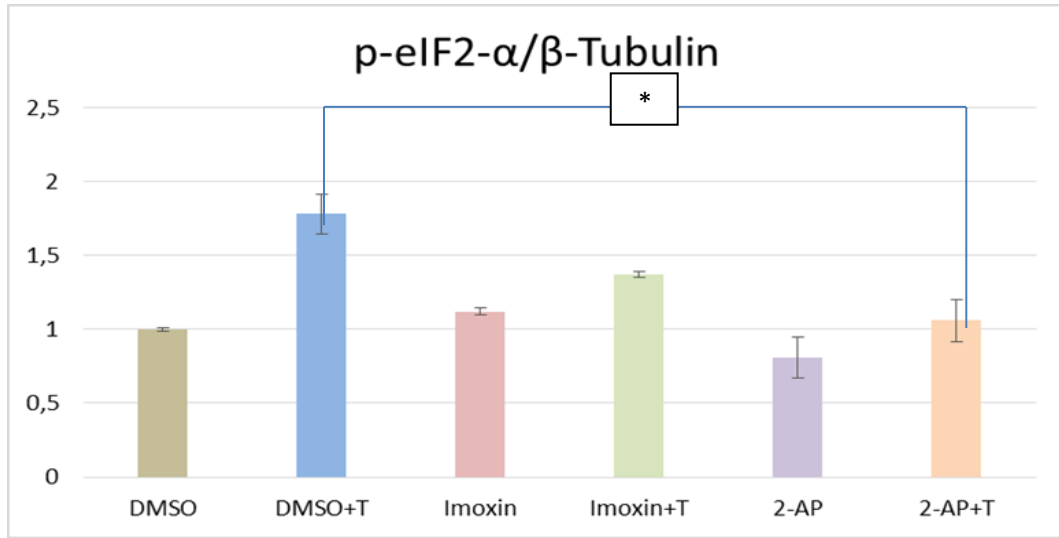
Şekil 17. Gruplardaki protein bant görüntüleri (film)

Protein bant görüntüleri ImageJ programıyla kantitatif değerlere dönüştürülmüş ardından Kruskal Wallis H (Monte Carlo Estimation) testi ile istatistiksel analizleri

gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre her grubun p-eIF2- α ifadeleri Şekil 18 ve Şekil 19’ da gösterilmiştir. Buna göre DMSO+T grubu p-eIF2- α ifadesi DMSO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fark göstermiştir (p=0.011). Bununla birlikte DMSO grubuyla diğer gruplar arasında herhangi bir fark saptanamamıştır. Ayrıca DMSO+T grubunda gözlenen p-eIF2- α ifadesi diğer gruplarla karşılaştırıldığında; sadece AP+T grubundan (p=0.016) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur. Bu da eIF2 α fosforilasyonu baskıladığını ifade etmektedir. Imoxin+T grubu p-eIF2- α ifadesi Imoxin grubuna göre artış göstermiş fakat bu yükseliş anlamlı değildir. Aynı şekilde 2-AP+T grubunda saptanan p-eIF2- α ifadesi 2-AP grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Grup	p-eIF2- α / β -Tubulin Oranı Ortalama $\pm$ Standart Hata Median (Q1 - Q3)	p*	Çoklu Karşılaştırma		
DMSO	1.00 $\pm$ 0.00 1.00 (1.00 - 1.00)	0.096 0.0241	DMSO	DMSO+T	0.011
				Imoxin	0.952
				Imoxin+T	0.217
DMSO+T	1.78 $\pm$ 0.13 1.78 (1.71 - 1.84)			2-AP	0.747
				2-AP+T	0.997
Imoxin	1.12 $\pm$ 0.02 1.12 (1.10 - 1.13)		DMSO+T	Imoxin	0.023
				Imoxin+T	0.164
Imoxin+T	1.37 $\pm$ 0.02 1.37 (1.36 - 1.38)			2-AP	0.004
				2-AP+T	0.016
2-AP	0.810 $\pm$ 0.14 0.810 (0.740 - 0.880)		Imoxin	Imoxin+T	0.513
				2-AP	0.359
2-AP+T	1.06 $\pm$ 0.14 1.06 (0.990 - 1.13)			2-AP+T	0.998
			Imoxin+T	2-AP	0.048
				2-AP+T	0.346
			2-AP	2-AP+T	0.530

Şekil 18. Gruplardaki β -Tubulin ifadesine göre normalize edilmiş p-eIF2- α ifadeleri ve gruplar arası çoklu karşılaştırma (*Kruskal Wallis H Test).



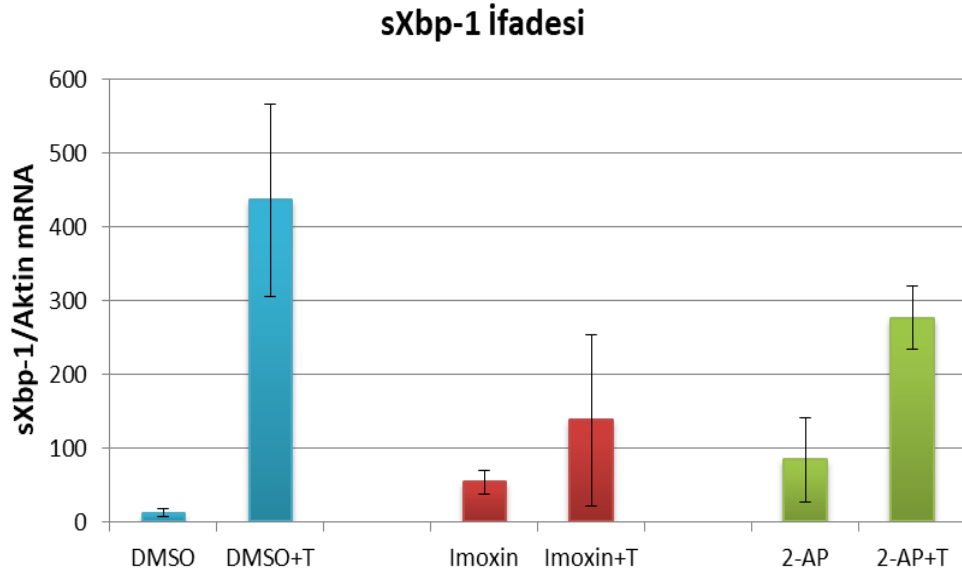
Şekil 19. Gruplara göre p-eIF2-α/β-Tubulin ifadelerinin oranları.

4.2. Beta Hücrelerinde Spliced Xbp-1 (sXbp-1) mRNA İfadeleri

Beta hücrelerinde belirlenen sXbp-1 mRNA ifadelerinin aktine göre normalize edilmiş değerleri ortalama±standart hata şeklinde Tablo 14’de ve Şekil 20’ de verilmiştir. Buna göre DMSO grubunda 12,33±5,9, DMSO+T grubunda 436,03±130,61, Imoxin grubunda 53,58±16,66, Imoxin+T grubunda 137,89±116,23, 2-AP grubunda 83,84±57,51 ve 2-AP+T grubunda 276,22±42,73 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 14. sXbp-1 ifadelerinin aktine göre normalize edilmiş değerleri.

Gruplar	sXbp-1 ifadesi ortalama ± standart hata
DMSO	12,33±5,91
DMSO+T	436,03±130,61
Imoxin	53,58±16,66
Imoxin+T	137,89±116,23
2-AP	83,84±57,51
2-AP+T	276,22±42,73

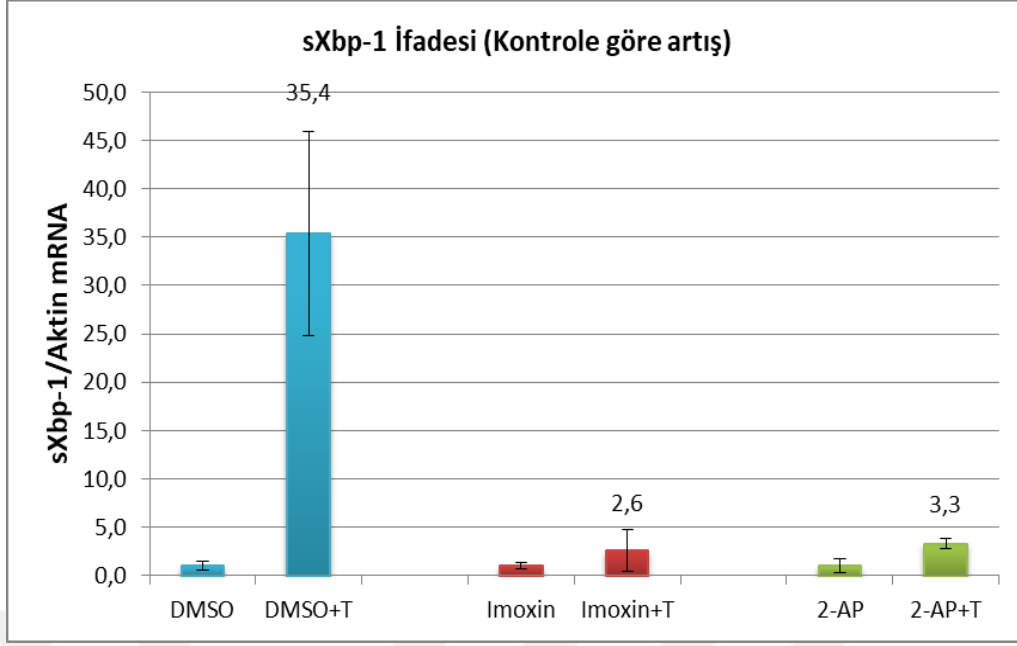


Şekil 20. sXbp-1 ifadelerinin aktine göre normalize edilmiş değerleri.

Saptanan değerlerin kontrol gruplarına oranla belirlenmiş rölatif ifadeleri ortalama±standart hata şeklinde Tablo 15’de ve Şekil 21’de gösterilmiştir. Buna göre DMSO+T grubu sXbp-1 mRNA ifadeleri DMSO grubuna göre 35,4±10,6 kat artmıştır. Imoxin+T grubunda belirlenen sXbp-1 mRNA ifadelerinde Imoxin grubuna oranla 2,6±2,2 katlık bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca 2-AP+T grubunda saptanan sXbp-1 mRNA ifadeleri ise 2-AP grubuna göre 3,3±0,5 katlık bir artış göstermiştir.

Tablo 15. sXbp-1 ifadelerinin kontrol grubuna kıyasla değerleri.

Gruplar	sXbp-1 ortalama ± standart hata
DMSO	1,0±0,5
DMSO+T	35,4±10,6
Imoxin	1,0±0,3
Imoxin+T	2,6±2,2
2-AP	1,0±0,7
2-AP+T	3,3±0,5



Şekil 21. sXbp-1 ifadelerin aktine göre normalize edilmiş ve kontrol grubuna kıyasla değerleri.

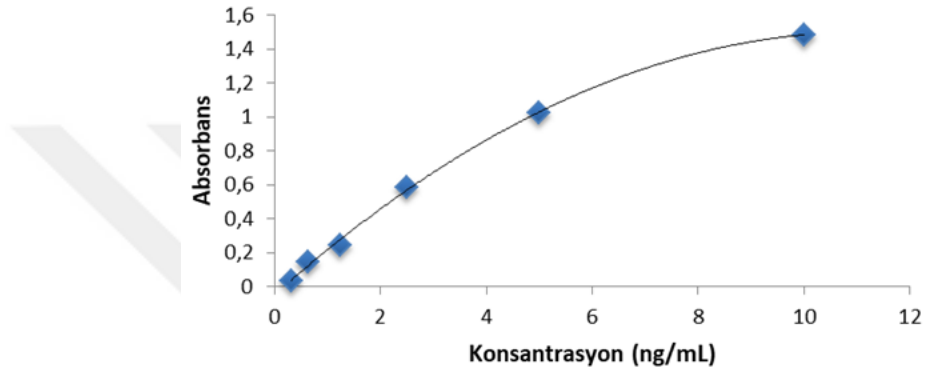
4.3. Beta Hücrelerinde İnsülin Konsantrasyonları

Hücre içi insülin konsantrasyonları, değişik dozda tunicamycin uygulanmış (4µl ve 8µl) ve PKR inhibitörleriyle muamele edilmiş gruplarda ELISA yöntemiyle belirlenmiştir ve karşılaştırılmıştır. Tespit edilen insülin konsantrasyonları Tablo 16'da ve Şekil 22' de verilmiştir. Buna göre DMSO/ - grubunda $1,16 \pm 0,06$ ng/ml, DMSO/ 4 grubunda $1,30 \pm 1,26$ ng/ml ve DMSO/ 8 grubunda $0,47 \pm 0,46$ ng/ml olarak saptanmıştır. Ayrıca İmoxin/ - grubunda $2,71 \pm 1,78$ ng/ml, İmoxin/ 4 grubunda $1,26 \pm 0,60$ ng/ml ve İmoxin/ 8 grubunda ise $0,91 \pm 0,30$ ng/ml olarak belirlenmiştir. Bundan başka 2-AP/- grubunda $1,16 \pm 0,52$ ng/ml, 2-AP/ 4 grubunda $1,06 \pm 0,87$, 2-AP/ 8 grubunda ise $0,67 \pm 0,15$ ng/ml' lık bir insülin konsantrasyonu tespit edilmiştir. Buna göre tunicamycin uygulanan gruplarda insülin miktarında önemli derecede bir düşüş saptanmıştır. Yalnızca DMSO/ 4 grubunda tespit edilen insülin konsantrasyonu tunicamycin uygulanmamış DMSO/ - grubundan fazladır.

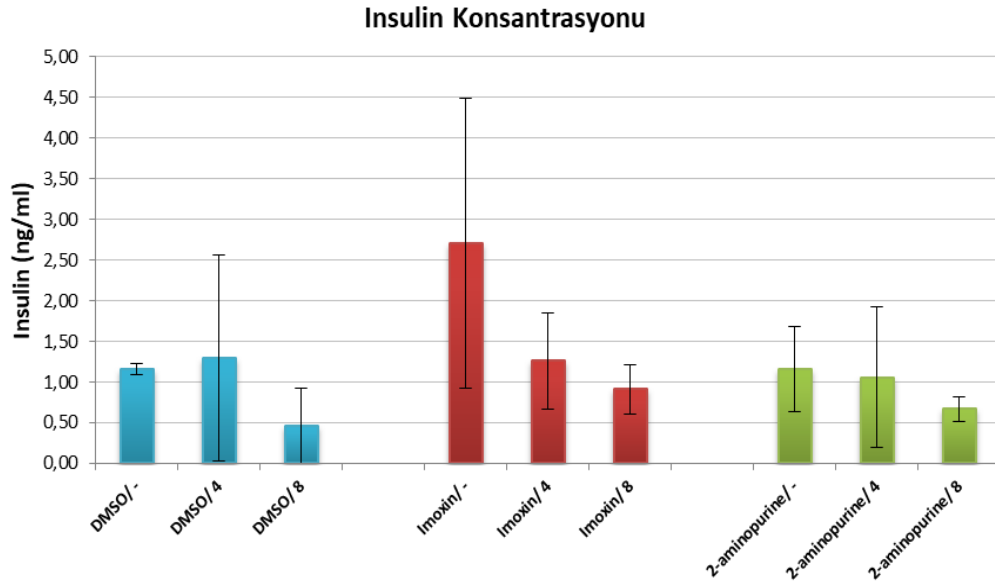
İnsülin konsantrasyonlarını belirlemek için ikinci bir ölçüm alınmış ve gruplar aynı şekilde oluşturulmuştur. Tespit edilen insülin konsantrasyonları Tablo 17' de ve Şekil 25' de verilmiştir. Sonuçlar diğer bulgularla örtüşmektedir.

Tablo 16. Hücrelere uygulanan Tunicamycin miktarlarına göre grupların insülin seviyeleri.

Gruplar / Uygulanan Tunicamycin miktarları (µl)	Ortalama ± Standart hata (ng/ml)
DMSO/ -	1,16±0,06
DMSO/ 4	1,30±1,26
DMSO/ 8	0,47±0,46
Imoxin/ -	2,71±1,78
Imoxin/ 4	1,26±0,60
Imoxin/ 8	0,91±0,30
2-aminopurine / -	1,16±0,52
2-aminopurine/ 4	1,06±0,87
2-aminopurine/ 8	0,67±0,15



Şekil 22. Standart grafik.

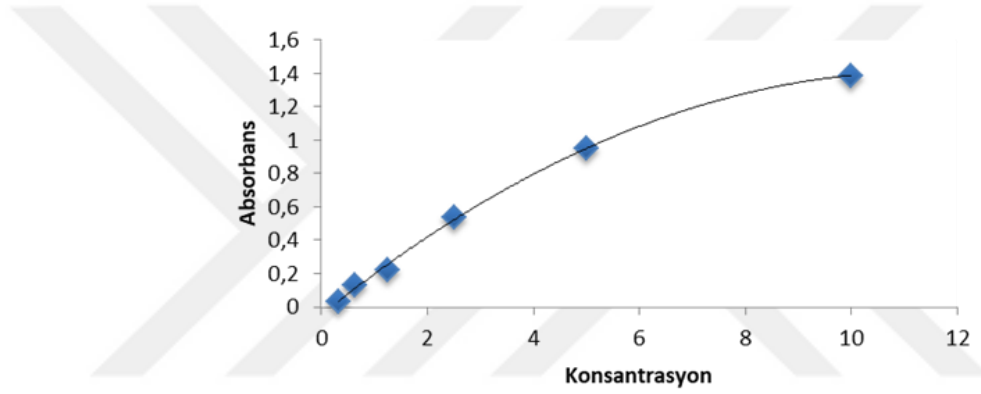


Şekil 23. İnsülin konsantrasyonları.

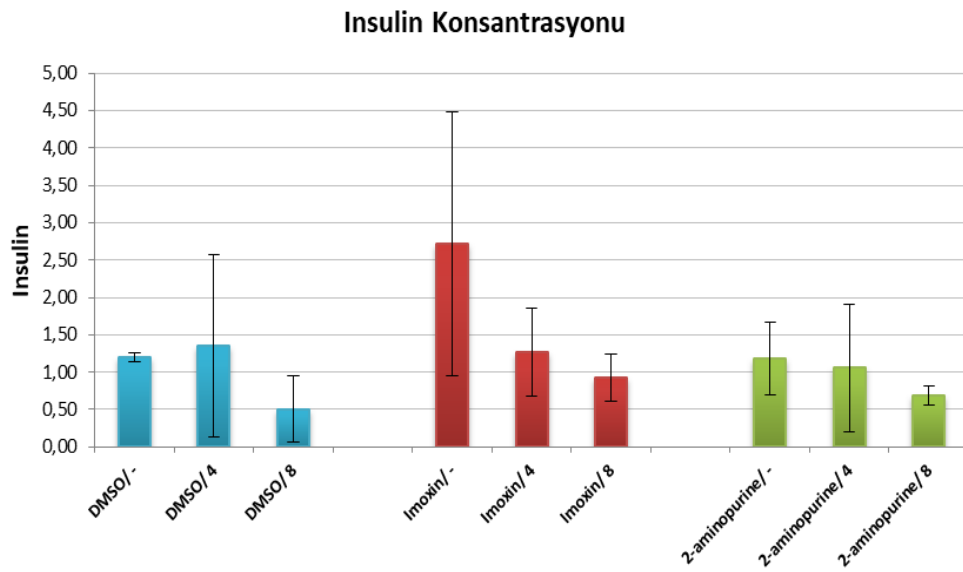
İstatiksel analiz yaptığımızda grupların kendi aralarında anlamsız bir düşüş olduğu saplanmıştır.

Tablo 17. Hücrelere uygulanan Tunicamycin miktarlarına göre grupların insülin seviyeleri.

Gruplar / Uygulanan Tunicamycin miktarları	Ortalama Ortalama $\pm$ Standart hata (ng/ml)
DMSO/ -	1,19 $\pm$ 0,06
DMSO/ 4	1,35 $\pm$ 1,22
DMSO/ 8	0,50 $\pm$ 0,45
Imoxin/ -	2,72 $\pm$,77
Imoxin/ 4	1,27 $\pm$ 0,59
Imoxin/ 8	0,93 $\pm$ 0,32
2-aminopurine/ -	1,19 $\pm$ 0,49
2-aminopurine/ 4	1,06 $\pm$ 0,85
2-aminopurine/ 8	0,69 $\pm$ 0,13



Şekil 24. Standart grafik.



Şekil 25. İnsülin konsantrasyonları.

5. TARTIŞMA

İnsülin salınımına glikoza karşı bir cevap olarak olarak gerçekleşmektedir. Tip 2 diyabet de yüksek glikoza karşı düşük miktarda insülin salındığı bilinmektedir. Bunun altında yatan sebeplerden biri de ER stresidir. Fizyolojik olarak pankreastaki beta hücrelerinde metabolik işleyiş için ER stres büyük bir öneme sahip olmaktadır.

Farklı molekülleri hedef alan yeni terapötiklerin keşfi, son yıllarda diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkların artan prevalansının üstesinden gelmek için çok önemli hale gelmiştir. Metaflamasyon olarak da bilinen metabolik inflamasyon, bu hastalıkların önde gelen komplikasyonudur.

PKR inhibitörü İmidazolo-oksindol (İmoxin)'in daha önce insülini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu amaçla PKR inhibitörü imoxin'in PKR kinaz aktivitesini inhibe ettiğini ve otofosforilasyondaki potansiyeli incelenmiştir (Eley ve ark, 2007; Jammi ve ark, 2003) PKR'nin varlığında imoxin yokluğunda IRS1'i doğrudan fosforile edilmektedir. İmoxin ilavesi ile PKR aktivitesini inhibe etmiştir ve fosforilasyon bastırılmıştır. IRS1 ve eIF2 α PKR ile uyarılan IRS1 ve eIF2 α fosforilasyonu tarafından değiştirilmemiştir, negatif olarak görev yapan inaktif oksindolün bir türevi kontrol olarak kullanılmıştır. Hücrelerdeki imoxin etkisini tespit etmek için fareyi tedavi edilmiştir tümör nekroz faktörü- α ile embriyonik fibroblastlar (MEF'ler) hem PKR aktivasyonunu hem de IRS1'i indükleyen (TNF- α) serin fosforilasyonu gerçekleşmiştir. Bu sistemde imoksin tedavisi TNF- α kaynaklı IRS1 serin fosforilasyonunu etkili bir şekilde azaltmıştır Imoxin tedavisi ile engellenmiştir. ER'ye cevaben thapsigargin PKR'nin stres aktivasyonuna bakılmıştır . PKR'nin kimyasal inhibisyonu JNK aktivasyonunu bastırmıştır. Çünkü imoxin doğrudan değişiklik yapmamaktadır. JNK aktivitesinin, inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır. PKR benzeri ER ile yakından ilişkili kinaz aktivitesinin olup olmadığı kinaz (PERK) ve işlevsel olarak ilgili diğer birkaç imoksin varlığında enzimler değiştirilmiştir. İmoxin tedavisine bağlı olarak PKR'yi azaltmıştır Fosfo-JNK'nın işlevi ve seviyeleri, bu deneyler imoksinin PERK'ye karşı herhangi bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur , bu inhibitörün seçiciliğinin bir başka kanıtıdır en azından bunlara karşı yapısal veya işlevsel olarak ilgili moleküller PKR'de imoxin tedavisinin etkinliğini belirlemek in vivo inhibisyon, genetik olarak obez fare tedavi edilmiştir ve beyaz yağ dokusunda aktivite (WAT) (ob / ob) önleyici ile 30 gün boyunca fareler (0.5 mg / kg / gün s.c.) imoxin tedavisi ile PKR seviyelerini ve PKR'yi

belirgin şekilde düşürmüştür (Nakamura ve ark, 2014). PKR aktivasyonu üzerine ekspresyon indüklenir; Böylece toplam PKR seviyesindeki azalma, imoksinle tedavi edilmiş farelerde enflamasyon ve ayrıca bu kimyasal maddenin PKR'yi hedef aldığını ve azalttığını onun etkinliği sonucuna varılmıştır. Nitekim, bulgulara göre bu farelerin WAT içindeki aktivitesi hücre hatlarında, PKR inhibisyonunun ayrıca JNK'nın azalmasına neden olmuştur. 2-AP, kurulmuş bir PKR inhibitörü imoksinden yapısal olarak bağımsız. Ob / ob farelerinde, 2-AP'nin oral uygulaması (200 mg / kg / gün) geliştirilmiş glukoz toleransı ve insülinle uyarılmış glukoz imhası bakılmıştır. 2-AP'den adipoz dokularda tedavi edilen farelerde , biz de ifadesinde bir azalma gözlenmemiştir bu inhibitörler proinflamatuvar sitokinler ve makrofaj belirteçleri için önemli olmuştur. Ayrıca, serum seviyelerinin Hem ALT hem de AST, 2-AP ile muamele edilerek azaltılmıştır Potansiyel olarak 2-AP tedavisinin de önerildiği Karaciğer fonksiyonunu iyileştirilmiştir.

PKR inhibisyonunun, obezite oluşturulmuş farelerde metabolik yararlar üretebileceği kavramını desteklemektedir

Bu tez çalışması ile PKR inhibitörleri olan imoxin ve 2-aminopürin'in pankreatik beta hücresi B-TC-6 hücre hatlarında ER stresine bağlı olarak insülin salınımının etkisine bakılmıştır. Aynı gruplarda PKR inhibitörleriyle muamele edildikten sonra, 4 ve 8 µl Tunicamycin ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Bizim yaptığımız tez çalışmasında PKR inhibitörü olmayan (DMSO) fakat 4 µl Tunicamycin varlığında kontrol grubuna göre insülin salınımında artış olduğu aynı zamanda PKR İnhibitörü imoxin' in tunicamycine maruz kalmadan artış olduğu tespit edilmiştir. Bu durum literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Yani yüksek glikoza maruz kalmış beta hücreleri PKR inhibitörü ve ER stresini sonucunda insülin salınımı gerçekleştiği görülmüştür. Bu çalışma in vitro ortamında yapıldığı gibi, daha önceki çalışmalarda in vivo ortamın yani hayvan modelinde yapılmıştır ve daha güvenilir bir yöntemdir.

Aynı zamanda hiperglisemik ortamın beta hücrelerde PERK aktifleşmesine bağlı olarak CHOP ve ATF3 düzeylerinde artışlar olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak tip 2 diyabetlilerde alınan pankreas örneklerinde aynı belirteçlerin arttığı görülmüştür. Diyabetik farelerinde yapılan çalışmalarda pankreatik adacık hücrelerinde artmış olan CHOP ekspresyonu, PERK aktivasyonu, artmış eIF2α fosforilasyon düzeylerin gösterilmiştir ve PERK'in sinyal yolunu aktif olduğu diyabetik sürecin meydana gelmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Chakravarthi ve ark, 2006) .

PERK/eIF2 α 'nın fosforilasyonuna karşılık strese cevap vermesinde oldukça büyük öneme sahiptir. ATF4'ün uyarılmasına bağlı olarak artan CHOP seviyeleri GADD34 proteinin aktif olmasında sebep olmaktadır. GADD34; protein fosfataz 1' in kofaktörü ve eIF2 α 'nı defosforilasyonuna sebep olmakla birlikte protein sentezini arttırmaktadır. (Scheuner ve ark, 2008). Yapılan çalışmalar GADD34/PP1 kompleksini ve eIF2 α 'nın fosforlanmasına engel olan selektif inhibitörler ER aracılığıyla apoptozisi engellediği ifade edilmiştir (Sidrauski ve ark, 1990). PERK pankreas hücrelerin çok miktarda ekspre edilmiştir. Farelerde pankreatik fonksiyonun bozulukluğu PERK tarafından rastlanılmıştır ve doğum sonrası diyabet gelişmiştir. PERK geninde oluşan mutasyon, insüline bağımlı diyabet ile karakterize olup Wolcott-Rallison sendromuna sebep olmaktadır (Delepine ve ark, 2000; Lai ve ark, 2007). Bizim yaptığımız diğer çalışmada ise ER stresinin varlığını tespit etmek için 'Western blot' analizi yapılmıştır. Tunicamycin olan gruplarda artış olduğu tespit edilmiştir. ER stresin varlığı belirlenmiştir. CHOP'a bakıldığında ise bunun ile ilgili sonuç ortaya çıkmamıştır

Daha önce yapılan çalışmalar obezite , insülin direci, tip 2 diyabet büyük sağlık sorunlar tedavi seçeneklerin olduğunu belirtmiştir. PKR, inflamasyon, besin / patojen algılamada, insülin duyarlığında, glukozun dengesinde önemli bir anahtar modülatördür. PKR aktivasyonu yapılan çalışmalarda obez olarak gösterilmiş potansiyellerini anlamak için iki yapısal küçük moleküllu PKR inhibitörleri kullanılmıştır ve fare modelinde obezite, insülin direnci ve stres kaynaklı aktivasyonu düşürmüştür. PKR inhibitörü adipoz doku iltihabı azaltmış, insülin duyarlılığı gelişmiştir. PKR'ı etkileyen bir tedavi sürecinin tip 2 diyabet hastağında etkili olduğu tespit edilmiştir (Nakamura ve ark, 2014).

Xbp1, ER stres anında proteinleri birikmesini önlemek amacıyla, ER'da katlanmak üzere mRNA parçalanır. Böylelikle kalsiyumun salınması artırılarak ER stres beta hücrelerinde insülin mRNAlarında azaldığı IRE1 endonükleazın aktif olması sonucu olabileceği vurgulanmıştır ve qPCR analiziyle PKR inhibitörlerin etkisine bakılmıştır. DMSO+ Tunicamycin'in xbp 1 splicing etkisi kontrol grublarına göre en yüksek çıkmıştır.

Insulin salgısına etkisi az görülmüştür. Nedeni ne olabilir? Salgılanan insüline direk bakmak daha iyi olabilir. PKR inhibitörlerinin PKR/ eIF2 α etkisini azalttığı gösterilebilir. Bir dizi dozda denenip PKR enzimi fosforilasyonu nasıl değişiyor bakılabilir. PKR inhibitörler daha yüksek dozlarda etkisinin nasıl olup olmayacağı denenebilir. Tunicamycin ER strese sebep oluyor ama bu dozlarda apoptoza sebep oluyor mu bakılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada PERK/ eIF2 α 'nın pankreatik β hücre dizilerinde ER stres ve PKR inhibitörlerinin insülin salınımı üzerinde etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak;

1) Yüksek glikoza ortamında büyütülen beta hücreleri ER stresine Tunicamycin yoluyla maruz bırakılmış insülin salınımına etkilerini belirlemek için bu hücrelerde PKR inhibitörleri (İmoxin ve 2- Aminopürin) kullanılmıştır. PKR inhibitörleri kullanılan gruplar arasında yapılan kıyaslamada, ER stresine maruz kalmamış kontrol gruplarında PKR inhibitörlerinin, insülin salınımının bazal seviyesinde artışa sebep oldukları saplanmıştır. Bu karşılaştırmada en yüksek artışı PKR inhibitörü İmoxin- göstermiştir.

Tunicamycin'in iki farklı konsantrasyonu kıyaslandığında ise, Tunicamycin'in 4 μ l olduğu gruplarda insülin salınımının daha fazla arttığı gözlemlenmiştir. Bu ER stresine maruz kalmış hücrelerde PKR inhibitörlere rağmen insülin salınımının gerçekleştiğini ve bu etkinin yüksek dozda Tunicamycin gurubunda daha belirgin olduğunu ifade etmektedir. Yani ER strese maruz kalmış beta hücrelerinde insülin salınımı PKR inhibitörlerinden etkilenmemektedir.

2) P-eIF2 α 'nın fosforilasyonunun protein düzeyinde western blot analizi ile belirlenerek Tunicamycin uygulanan hücrelerde ER stresinin varlığı tespit edilmiştir. Tunicamycin olmayanlar gruplarda da belirlenen P-eIF2 α 'nın fosforilasyonunun tubulin ile kuanfikasyonlarına bakıldığında, birbirleriyle anlamlı farklar olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç hücrelerin gerçekten Tunicamycin ile ER strese maruz bırakıldıklarını göstermektedir.

3) Hücrelerde Tunicamycin'in ER stresi indüklediğini başka bir yöntemle de belirlemek için yine ER stres faktörlerinden Xbp1 mRNA splaylanması qPCR tekniği ile incelenmiş ve splaylanmış Xbp1 mRNA'sında Tunicamycin ile önemli bir artış görülmüştür. Splaylanmış Xbp1 mRNA'sı DMSO+Tunicamycin gurubunda DMSO gurubuna göre 35 kat artmıştır. Bu da bize ikinci bulguda olduğu gibi, Tunicamycin'in bata hücrelerde ER s tersi indüklediğini göstermiştir.

Bu çalışma tip 2 diyabette ER stresine maruz kalmış hücrelerde insülin salınımının olumsuz yönde etkilendiğini ve ERs tersi engelleyen terapilerin insülin salınımına olumlu

katkıları olduğunu işaret etmektedir. PKR inhibitörlerine duyarlılığı arttırmak da ilerde kapsamlı araştırmalarla aydınlatılmayı bekleyen konulardan biridir.



KAYNAKLAR

Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell, 5. Basım, Garland Science, Taylor and Francis Group 2008.

Baltzis D, Li S, Koromilas A. E. Functional characterization of pkr gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR. *J Biol Chem* 2002, 277, 38364–38372.

Beck-Nielsen H. Clinical disorders of insulin resistance. In: **Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P.** (eds), International Textbook of Diabetes Mellitus. 1st edition. Chichester, John Wiley&sons 1992, Vol 1, Chap 20, 531-550.

Brewer JW. Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response. *Cell Mol Life Sci* 2014, 71(6), 1067–1079.

Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 2005, 53, 87-97.

Buck TM, Wright CM, Brodsky JL. The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev Biol* 2007, 18, 751-761.

C, Glimcher LH, Hotamisligil GS.(2004) Endoplasmic reticulum stress link obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004, 306(5695), 457-461

CA Burtis, ER Ashwood, DE Bruns. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics. Fourth edition p: 853-855.

Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors* 2011, 37(3), 228–240.

Carpentier KS, Esparo NM, Child SJ, Geballe AP. (2016). A single amino acid dictates protein kinase ϵ susceptibility to unrelated viral antagonists. *PLoS Pathog* 2016, 12, e1005966.

Carvalho BM, Oliveira AG, Ueno M, Araújo TG, Guadagnini D, Carvalho-Filho MA, et al. Modulation of double-stranded RNA-activated protein kinase in insulin sensitive tissues of obese humans 2013.

Carvalho-Filho MA, Carvalho BM, Oliveira AG, Guadagnini D, Ueno M, Dias MM, et al. Double-stranded RNA-activated protein kinase is a key modulator of insulin sensitivity in physiological conditions and in obesity in mice. *Endocrinology* 2012, 153, 5261–5274.

Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 2011, 108(12), 2777–2793.

Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid et al. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* 2006, 7, 271-275.

Chan CM, Huang DY, Huang YP, Hsu SH, Kang LY, Shen CM, Lin WW. Methylglyoxal induces cell death through endoplasmic reticulum stress-associated ROS production and mitochondrial dysfunction. *J Cell Mol Med* 2016, 20(9), 1749–1760.

Chandra J, Zhivotovsky B, Zaitsev S, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Orrenius et al. Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. *Diabetes* 2001; 50, 44-47.

Chua CE, Tang BL. Linking membrane dynamics and trafficking to autophagy and the unfolded protein response. *J Cell Physiol* 2013, 228(8), 1638–1640.

Colgan SM, Hashimi AA, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert Rev Mol Med* 2011, 13, 1-14.

Dar AC, Dever TE, Sicheri F. (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 2005, 122, 887–900.

De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. In: Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H (eds), international Textbook of Diabetes Mellitus. Second edition. *Chichester John Wiley & Sons Ltd* 1997, 81, 635-689.

Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Mark, Lathrop G, Julier J. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- α kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 2000, 25, 406-409.

Dey M, Cao C, Dar AC, Tamura T, Ozato K, Sicheri F, et al. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* 2005, 122, 901–913.

Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther* 2012, 92(6), 707-715.

Duckworth WC, Bennett RG, Hamel et al. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 1998, 19, 608-624.

Dzananovic E, McKenna SA, Patel TR. Viral proteins targeting host protein kinase R to evade an innate immune response: a mini review. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2018, 34, 33–59.

Dzananovic E, Patel TR, Chojnowski G, Boniecki MJ, Deo S, McEleney K, et al. (2014). Solution conformation of adenovirus virus associated RNA-I and its interaction with PKR. *J Struct Biol* 2014, 185, 48–57.

Elde NC, Child SJ, Geballe AP, Malik HS. Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. *Nature* 2009, 457, 485–489.

Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Attenuation of muscle atrophy in a murine model of cachexia by inhibition of the dsRNA-dependent protein kinase. *Br J Cancer* 2007, 96, 1216–1222.

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: Quality control in the secretory pathway. *Science* 1999, 286, 1882-1888.

Engin F, Nguyen T, Yermalovich A, Hotamisligil GS. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. *Sci Rep* 2014, 4, 4054.

Erdoğan G. Diabetes Mellitus 'un Tedavisi. 1. Baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara,1993.

Feng GS, Chong K, Kumar A, Williams BR. Identification of double-stranded RNA-binding domains in the interferon-induced double-stranded RNA-activated p68 kinase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1992, 89, 5447–5451.

Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J Neurosci* 2010, 30(50), 16938–16948.

Gao L, Tang W, Ding Z, Wang D, Qi X, Wu H, et al. Protein-binding function of RNA-dependent protein kinase promotes proliferation through TRAF2/RIP1/NF- κ B/c-Myc pathway in pancreatic β cells. *Mol Med* 2015, 21, 154–166.

García MA, Meurs EF, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 2007, 89 799–811.

Garcia-Ortega MB, Lopez GJ, Jimenez G, Garcia-Garcia JA, Conde V, Boulaiz H, et al. Clinical and therapeutic potential of protein kinase PKR in cancer and metabolism. *Expert Rev. Mol Med* 2017, 19:e9.

Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013, 5(3), a13169.

Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 2000, 5, 107–114.

Gil J, García MA, Esteban M. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* 2002, 529, 249–255.

Groop LC, Widen E, Ferrannini E. insulin resistance and insulin deficiency in pathogenesis of type 2 diabetes: errors of metabolism or of methods. *Diabetologia* 1993, 36, 1326-31

Hatemi H. Diabetes Mellitusun Tarihçesi. *Aktüel Tıp Dergisi* 1996, 7, 497-499.

Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol* 2015, 17(7), 829–838.

Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev* 2011, 91,1219–1243.

Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell* 2018, 69(2), 169–181.

Hoang H, Graber TE, Alain T. Battling for ribosomes: translational control at the forefront of the antiviral response. *J Mol Biol* 2018, 430, 1965–1992.

Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. “Quality Control of the Cellular Protein Systems. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation”, *Journal Of Biochemistry* 2010, 147, s. 19-25.

Hu Z, Zhang H, Tang L, Lou M, Geng Y. Silencing nc886, a non-coding RNA, induces apoptosis of human endometrial cancer cells-1A in vitro. *Med Sci Monit* 2017, 23, 1317–1324.

Hugon J, Mouton-Liger F, Dumurgier J, Paquet C. PKR involvement in Alzheimer’s disease. *Alzheimers Res Ther* 2017, 9, 83.

Hugon J, Paquet C, Chang RC. Could PKR inhibition modulate human neurodegeneration? *Exp Rev Neurother* 2009, 9, 1455–1457.

Hussain SG, Ramaiah KVA. Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis. *Current Sci* 2007, 93, 1684-96.

Jammi NV, Whitby LR, Beal PA. Small molecule inhibitors of the RNAdependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 308, 50–57

Kayaalp SO. İnsülin, oral ve diğer antidiyabetik ilaçlar ve glukagon. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Cilt 2. Ankara 2000, 1252-72.

Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7, 1013–30.

Kim Y, Lee JH, Park J, Cho J, Yi H, Kim VN. PKR is activated by cellular dsRNAs during mitosis and acts as a mitotic regulator. *Genes Dev* 2014, 28, 1310–1322.

Kim Y, Park J, Kim S, Kim M, Kang MG, Kwak C, et al. PKR senses nuclear and mitochondrial signals by interacting with endogenous double-stranded RNAs. *Mol Cell* 2018, 71, 1051.e6–1063.e6 10.

King H, Aubert RF, Herman WH. Global burden of diabetes. 1995-2025. *Diabetes Care* 1998, 21, 1414-31.

King H, Rewers M. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group: Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. *Diabetes Care* 1993, 16, 157-77.

Kong DQ, Liu Y, Li L, Zheng GY. Downregulation of Smac attenuates H₂O₂-induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in human lens epithelial cells. *Medicine (Baltimore)* 2017, 96(27), e7419.

Kuhen KL, Samuel CE. Isolation of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr promoter and identification of a novel DNA element within the 5'-flanking region of human and mouse Pkr genes. *Virology* 1997, 227, 119–130.

Lai ED, Teodoro T, Volchuk A, Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology* 2007, 22, 193-201.

Lancaster GI, Kammoun HL, Kraakman MJ, Kowalski GM, Bruce CR, Febbraio MA. PKR is not obligatory for high-fat diet-induced obesity and its associated metabolic and inflammatory complications. *Nat Commun* 2016, 7, 10626.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003, 23(21), 7448–7459.

Lee EK, Hong S, Shin S, Lee H, Lee J, Park EJ, et al. nc886, a non-coding RNA and suppressor of PKR, exerts an oncogenic function in thyroid cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 75000–75012.

Lee H, Lee K, Jang H, Lee GK, Park J, Kim SY, et al. Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget* 2014, 5, 3472–3481.

Lee K., Kunkeaw N., Jeon S. H., Lee I., Johnson B. H., Kang G., et al. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA* 2011, 17, 1076–1089.

Li S, Peters GA, Ding K, Zhang X, Qin J, Sen GC. Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2006, 103, 10005–10010.

Liu CY, Xu Z, Kaufman et al. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 α . *J Biol Chem* 2003, 278, 17680–7.

Liu G, Zhang W. Long non-coding RNA HOTAIR promotes UVB-induced apoptosis and inflammatory injury by up-regulation of PKR in keratinocytes. *Braz. J Med Biol Res* 2018, 5, e6896.

Luoma PV. Elimination of endoplasmic reticulum stress and cardiovascular, type 2 diabetic, and other metabolic diseases. *Ann Med* 2013, 45(2), 194–202.

Maedler K. Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2008, 1, 408–420.

McKenna SA, Kim I, Liu CW, Puglisi JD. Uncoupling of RNA binding and PKR kinase activation by viral inhibitor RNAs. *J Mol Biol* 2006, 358, 1270–1285.

Meier JJ, Bhushan A, Butler et al. The potential for stem cell therapy in diabetes. *Pediatr Res* 2006, 59, 65–73.

Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 1990, 62, 379–390.

Nakamura T, Arduini A, Baccaro B, Furuhashi M, Hotamisligil GS. Small-molecule inhibitors of PKR improve glucose homeostasis in obese diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 2014, 63, 526–534.

Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 2010, 140(3), 338–48.

Nakamura T, Kunz RC, Zhang C, Kimura T, Yuan CL, Baccaro B, et al. A critical role for PKR complexes with TRBP in immunometabolic regulation and eIF2 α phosphorylation in obesity. *Cell Rep* 2015, 11, 295–307.

Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002, 16(11), 1345–1355.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozleden E, Tuncman G, Görgün Sodeman WA, Sodeman TM: Sodeman Pathologic Physiology Mechanisms of Disease. Çevirenleri: V. Cesur, N. Kemal. 1. Baskı, Hekimler Birliği Vakfı, Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1992 Ankara, Cilt 2.

Peters KR. Intensifying treatment of type 2 diabetes mellitus: adding insülin. *Pharmacotherapy* 2011, 31(12 suppl), 54S-64S.

Prentki M, Nolan et al. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006, 116, 1802-12.

Qi Y, Zhang M, Li H, Frank JA, Dai ., Liu H, et al. MicroRNA-29b regulates ethanol-induced neuronal apoptosis in the developing cerebellum through SP1/RAX/PKR cascade. *J Biol Chem* 2014, 289, 10201–10210.

Randy M, Darrell, Dennis CV. Botany Visual Resource Library 1998.

Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009, 14, 996-1007.

Reaven GM, Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988, 37, 1595-607.

Robert B, Ratter Sail. The History of Diabetes Mellitus In: Textbook of Diabetes, Volume 1. Third Edition. Pickup JC. Williams G. Eds. oxford: Blackwell science: 1.1-1.21.

Robertson RP, Harmon et al. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 2006, 41(2), 177-84.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8, 519–529.

Rothenburg S, Seo EJ, Gibbs JS, Dever TE, Dittmar K. Rapid evolution of protein kinase PKR alters sensitivity to viral inhibitors 2009.

Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database* (Oxford) 2016, 3, 2016.

Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Curr Mol Med* 2016, 16(6), 533–544.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004, 14, 20-28.

Scheuner D, Kaufman et al. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* 2008, 29, 317-333.

Scheuner D, Vander Mierde D, Song B, Flamez D, Creemers JW, Tsukamoto K, Ribick M, Schuit FC, Kaufman RJ. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 2005, 11(7), 757–764.

Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 2005a, 569, 29-63.

Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005b, 74, 739-789.

Segev Y, Livne A, Mints M, Rosenblum K. Concurrence of high fat diet and APOE gene induces allele specific metabolic and mental stress changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Behav. Neurosci* 2016, 10, 170.

Segev Y, Michaelson DM, Rosenblum K. ApoE epsilon4 is associated with eIF2 α phosphorylation and impaired learning in young mice. *Neurobiol Aging* 2013, 34, 863–872.

Sidrauski C, Walter et al. The transmembrane kinase Ire1p is a sitespecific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1990, 90, 1031–1039.

Song Y, Wan X, Gao L, Pan Y, Xie W, Wang H, et al. Activated PKR inhibits pancreatic β -cell proliferation through sumoylation-dependent stabilization of P53. *Mol Immunol* 2015.

Stern E, Chinnakkaruppan A, David O, Sonenberg N, Rosenblum K. Blocking the eIF2 α kinase (PKR) enhances positive and negative forms of cortex-dependent taste memory. *J Neurosci* 2013, 33, 2517–2525.

Stevens FJ, Argon Y. Protein folding in the ER. *Semin. Cell Dev Biol* 1999, 10, 443-454.

Stolz A, Wolf DH. “Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell”, *Biochimica et Biophysica Acta* 2010, 1803, s. 694- 705.

Suragani RN, Ghosh S, Ehtesham NZ, Ramaiah KV. Expression and purification of the subunits of human translational initiation factor 2 (eIF2): phosphorylation of eIF2 α and β . *Protein Expr Purif* 2006, 47(1), 225–233.

Swetha M, Ramaiah KVA. Insulin treatment promotes tyrosine phosphorylation of PKR and inhibits polyIC induced PKR threonine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 2015, 585, 98–108.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006, 7, 880-5.

Taga M, Mouton-Liger F, Sadoune M, Gourmaud S, Norman J, Tible M, et al. PKR modulates abnormal brain signaling in experimental obesity. *PLoS One* 2018, 13, e0196983.

Taniuchi S, Miyake M, Tsugawa K, Oyadomari M, Oyadomari S. Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases. *Sci Rep* 2016, 6, 32886.

Taylor DR, Tian B, Romano PR, Hinnebusch AG, Lai MM, Mathews MB. Hepatitis C virus envelope protein E2 does not inhibit PKR by simple competition with autophosphorylation sites in the RNA-binding domain. *J Virol* 2001, 75, 1265–1273.

Thevenot PT, Sierra RA, Raber PL, Al-Khami AA, Trillo-Tinoco J, Zarreii P, Ochoa AC, Cui Y, Del Valle L, Rodriguez PC. The stress-response sensor chop regulates the function and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in tumors. *Immunity* 2014, 41(3), 389–401.

Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* 2007, 282(31), 22865–22878.

Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 2000, 290, 1571-1574.

Udumula MP, Babu MS, Bhat A, Dhar I, Sriram D, Dhar A. High glucose impairs insulin signaling via activation of PKR pathway in L6 muscle cells. *Biochem Biophys Res. Commun* 2017, 486, 645–651.

Van Anken E, Braakman I. Endoplasmic reticulum stress and the making of a professional secretory cell. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005, 40(5), 269–283.

Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9(12), 944–957.

von Roretz C, Gallouzi I. Protein kinase RNA/FADD/caspase-8 pathway mediates the proapoptotic activity of the RNA-binding protein human antigen R (HuR). *J Biol Chem* 2010, 285, 16806–16813.

Wackers FJ, Young LH, Inzucchi SE, Chyun DA, Davey JA, Barrett EJ, Taillefer R, Wittlin SD, Heller GY, Filipchuk N, Engel S, Ratner RE, Iskandrian AE. Detection of silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic subjects: the 36 DIAD study. *Diabetes Care* 2004, 27, 1954-1961.

Wahid AM, Coventry VK, Conn GL. The PKR-binding domain of adenovirus VA RNAI exists as a mixture of two functionally non-equivalent structures. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 5830–5837.

Watanabe T, Imamura T, Hiasa Y. Roles of protein kinase R in cancer: potential as a therapeutic target. *Cancer Sci* 2018, 109, 919–925.

Watkins PJ, Drury PL, Howell SL. Diabetes and its management ,5th ed. Blackwell Co 1996, p 3.

Wormald MR, Dwek RA. Glycoproteins: Glycan presentation and protein-fold stability. *Structure Fold. Des* 1999, 7, R155-R160.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005, 115, 2656-64.

Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001, 276, 13935-40.

Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 2003, 4(2), 265–271.

Youssef OA, Safran SA, Nakamura T, Nix DA, Hotamisligil GS, Bass BL. Potential role for snoRNAs in PKR activation during metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2015, 112, 5023–5028.

Zhang C, Kawauchi J, Adachi MT, Hashimoto Y, Oshiro S, Aso T, Kitajima S. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 289(3), 718–724.

Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*. 2006.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülçin ŞARKICI
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : İzmir 15.09.1990
Telefon : 0 (543) 883 07 99
E-mail : gulcin_sarkici@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015

BURSLAR ve ÖDÜLLER

xxx

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Unvan

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

2. PROJELER

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Yılı	Görev	Proje Türü
Protein Kinaz RNA (PKR) İnhibitörlerin Endoplazmik Retikulum (ER) Stres Geçiren Pankreas Hücrelerinde İnsülin Salınımı Üzerine Etkileri	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	7.500 ₺	2017	Araştırmacı	BAP

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler