

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARACİĞER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ İLE VİSFATİN EKSPRESYONU
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Dr. Merve Sibel DURAK

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2011

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARACİĞER HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİ İLE VİSFATİN EKSPRESYONU
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Dr. Merve Sibel DURAK

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE

ANKARA

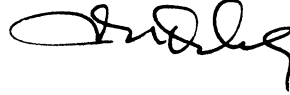
2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

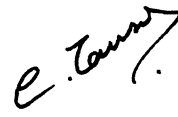
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Kamer Kılınc

(Hacettepe Üniversitesi)



Danışman: Prof. Dr. Ediz Demirpençe

(Hacettepe Üniversitesi)



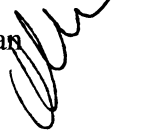
Üye: Prof. Dr. Gülberk Uçar

(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Ayşe Bilgihan

(Gazi Üniversitesi)



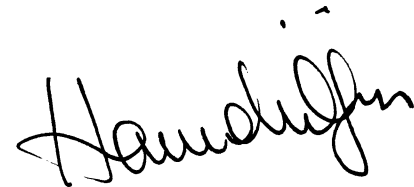
Üye: Doç. Dr. Filiz Akbıyık

(Hacettepe Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Kendisiyle tanışıp çalışma isteğimi belirttiğim günden – yaşamımda önemli bir dönüm noktası – bu yana beni hem bilimsel hem de düşünsel olarak yönlendiren ve biçimlendiren, eğiticiliğiyle yaşamımın tüm yönlerini olumlu yönde etkileyen ve sabırla dinleyen sevgili hocam Prof. Dr. Ediz Demirpençe'ye, çalışmalarım sırasında bana çeşitli yardımlarda bulunan ve olanak sunan Prof. Dr. Kamer Kılınç'a, Prof. Dr. Nur Çakar'a, Prof. Dr. Asuman Özkaya'ya, Doç. Dr. Filiz Akbıyık'a, Doç. Dr. Lale Doğan'a ve Yrd. Doç. Dr. Dilara Altay Zeybek'e, Dr. Ebru Bodur'a ve Dr. Tülin Bayrak'a teşekkürlerimi sunarım.

MD-PhD programına başvurduğum ilk günden itibaren beni destekleyen her aşamada kararlarımın saygı duyan anneme ve babama, deneyler ve tez yazımı aşamasında benden esirgemediği sonsuz sevgi, sabır ve anlayışı için eşim Bora Güngören'e teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

ÖZET

Durak, M. S. Karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi ile visfatin ekspresyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2011. Bu çalışmanın amacı, insülin direncinin gelişmesinde rolü olan endoplazmik retikulum (ER) stresi ile NAD sentezinde yer alan visfatin enziminin ekspresyonu arasındaki karşılıklı ilişkinin ve visfatinin insülin direncini azaltıcı etkisinin olası moleküler mekanizmasının incelenmesidir. HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinde ER stres belirteçlerinden GRP78 ve GADD153 ekspresyonu izlenmiştir. ER stresi tunikamisin ve palmitik asit ile uyarıldığında GRP78, GADD153 ve visfatin ekspresyonu artmaktadır. Transfeksiyon ile hücredeki visfatin miktarının artırılması ve linoleik asit uygulaması ER stresinden koruyucu bir etki göstermektedir. ER stresi ve transfeksiyon uygulaması hücrelerdeki NAD-bağımlı sirtuin-1 (SIRT1)'in aktivitesini artırmaktadır. SIRT1 ekspresyonu RNA interferansı ile susturulduğunda, visfatinin tunikamisin ile uyarılan ER stresini azaltıcı etkisi ortadan kalkmaktadır. Linoleik asit tunikamisinin ER stresini uyarıcı etkisini azaltmakta, ayrıca siRNA uygulaması ile kaybedilen visfatinin koruyucu etkisini de telafi etmektedir. Tunikamisin uygulaması hücrelerdeki oksidatif stresi ve inflamasyon belirteci olan NFκB ekspresyonunu artırmakta, visfatin ise koruyucu bir etki göstermektedir. Linoleik asit hem tunikamisin, hem de palmitik asit tarafından artırılan oksidatif stres ve NFκB ekspresyonunu azaltmaktadır. SIRT1 ekspresyonunun susturulması visfatinin ER stresi ile artan oksidatif stresi azaltıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır ve linoleik asit yine siRNA uygulaması ile kaybedilen etkiyi telafi etmektedir. Sonuç olarak bu çalışma ER stresi durumunda karaciğer hücresinde visfatin ekspresyonunun arttığını ve artan visfatinin ER stresini azalttığını ortaya koymuştur. Visfatin koruyucu etkisini SIRT1 aktivitesini artırarak göstermektedir. Hücrelerin PPAR agonisti olan linoleik asit ile uyarılması da ER stresinden koruyucu etki göstermekte ve visfatinin etki mekanizmasında sirtuinlerle uyarılan PPAR sinyal yolunun rolü olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Endoplazmik retikulum stresi, visfatin, sirtuin-1, PPAR.

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK Proje No: 108S039

ABSTRACT

Durak, M. S. Investigation of the relationship between endoplasmic reticulum stress and the expression of visfatin in hepatocytes. Hacettepe University Institute of Health Sciences Biochemistry Program PhD Thesis, Ankara, 2011.

The aim of this study was to investigate the reciprocal relation between endoplasmic reticulum (ER) stress, the leading cause of insulin resistance, and the expression of NAD-cycle enzyme visfatin (Nampt/PBEF) and the possible molecular mechanism of insulin resistance-lowering effect of visfatin. Expression of ER stress markers GRP78 and GADD153 was assessed in HepG2 cells. ER stress induced by tunicamycin and palmitic acid increased the expression of GRP78, GADD153 and visfatin. Increasing intracellular visfatin by transfection and linoleic acid treatment showed protective effects against ER stress. ER stress and transfection increased the activity of NAD-dependent enzyme sirtuin-1 (SIRT1) in the cells. ER stress-lowering effect of visfatin has abolished by silencing SIRT1 expression with RNA interference. Linoleic acid also decreased the ER stress-inducing effect of tunicamycin and restored the protective effect of visfatin which was abolished by siRNA application. Treatment with either tunicamycin or palmitic acid increased the expression of the inflammatory marker NF κ B. Increasing the expression of visfatin by transfection suppressed the proinflammatory effect of palmitic acid, while treatment with linoleic acid decreased the expression of NF κ B and oxidative stress induced by either palmitic acid or tunicamycin. In conclusion, this study showed that visfatin expression increases under ER stress condition and increased level of visfatin in return suppresses ER stress in liver cells. Visfatin exerts its protective effect against ER stress by increasing the activity of SIRT1. PPAR γ agonist linoleic acid also shows protective effect against ER stress, referring to the role of sirtuin-induced PPAR signaling pathway in the mechanism of action of visfatin.

Keywords: Endoplasmic reticulum stress, visfatin, sirtuin-1, PPAR

Supported by TÜBİTAK Project No: 108S039

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Endoplazmik Retikulum Stresi	2
2.1.1. Katlanmamış protein yanıtı (UPR)	3
2.1.2. Katlanmamış protein yanıtında moleküler mekanizmalar	4
2.1.3. ER stresine bağlı apoptozis mekanizmaları	8
2.2. ER Stresinin İlişkili Olduğu Patolojik Durumlar	8
2.2.1. Metabolik sendrom	9
2.2.2. Obezite ve yağ dokusu	11
2.2.3. İnsülin direnci	16
2.2.4. Glukotoksisite ve lipotoksisite	20
2.2.5. Tip 2 Diabetes Mellitus	21
2.3. Visfatin	22
2.3.1. Visfatin/PBEF/Nampt proteininin özellikleri	23
2.3.2. NAD ve NAD-bağımlı sirtuin enzimleri	27
2.4. Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive Olan Reseptörler (PPAR)	29
3. YÖNTEMLER	32
3.1. Visfatin Ekspresyon Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması	32
3.1.1. Plazmidin transformasyon için hazırlanması	32
3.1.2. Kompetan bakterilerin hazırlanması	33
3.1.3. Kompetan bakterilerin transformasyonu	34
3.1.4. Miniprep ile plazmid DNA'sının saflaştırılması	34

3.1.5. Restriksiyon enzimi ile plazmidin kesilmesi	34
3.2. Hücre Kültürü	35
3.2.1. Hücrelerin çözülmesi ve ekimi	35
3.2.2. Tripsinizasyon ve pasajlama	35
3.2.3. Hücrelerin dondurulması	36
3.3. MTT Yöntemiyle Sitotoksisite Çalışmaları	37
3.3.1. Tunikamisin ile sitotoksisite çalışması	38
3.3.2. Palmitik asit ve linoleik asit ile sitotoksisite çalışması	39
3.4. Hücrelerde Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi	40
3.5. Gen Ekspresyonu Tayini	42
3.5.1. Artan doz ve sürelerde tunikamisin uygulaması	42
3.5.2. Visfatin ekspresyon plazmidinin HepG2 hücrelerine geçici transfeksiyonu	42
3.5.3. Kontrol ve transfekte hücre gruplarında tunikamisin uygulaması	43
3.5.4. Tunikamisin ve linoleik asit uygulaması	43
3.5.5. Hücre örneklerinden protein izolasyonu ve Western Blot	44
3.5.6. RNA izolasyonu	44
3.5.7. cDNA sentezi (RT-PCR)	45
3.5.8. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Real Time-PCR)	46
3.6. Hücrelerde SIRT1 Enzim Aktivitesinin Ölçümü	47
3.7. Hücre İçi Total Oksidan Düzeyinin Ölçümü	48
4. BULGULAR	50
4.1. Visfatin Ekspresyon Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması	50
4.2. HepG2 Hücrelerinde Geçici Transfeksiyon Sonrası Visfatin Ekspresyonu	50
4.3. HepG2 Hücrelerinde PPARγ Ekspresyonu	53
4.4. HepG2 Hücrelerinde Sitotoksisite Çalışmaları	53
4.4.1. HepG2 hücrelerinde tunikamisin ile sitotoksisite çalışmaları	53
4.4.2. HepG2 hücrelerinde palmitik asit ve linoleik asit ile sitotoksisite çalışmaları	54
4.5. HepG2 Hücrelerinde ER Stresi Oluşturulması ve Gen Ekspresyonu Değişiklikleri	55
4.5.1. Tunikamisinin doz bağımlı olarak ER stresini uyarması	55
4.5.2. Tunikamisinin visfatin ekspresyonuna etkisi	57
4.6. Plazmid Transfeksiyonu ile Visfatin Ekspresyonu Artırılan HepG2	

Hücrelerinde Gen Ekspresyonu Değişiklikleri	58
4.6.1. Visfatin ekspresyon artışının ER stresine etkisi	58
4.6.2. HepG2 hücrelerinde linoleik asitin ER stresine etkisi	59
4.7. HepG2 Hücrelerinde ER Stresinin SIRT1 Enzim Aktivitesine Etkisi	60
4.7.1. ER stresinin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	60
4.7.2. Visfatin ekspresyonu artışı ve linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	61
4.8. HepG2 Hücrelerinde ER Stresinin Oksidatif Stres ve İnflamasyona Etkisi	61
4.8.1. Visfatin ekspresyon artışı ve linoleik asitin hücre içi oksidatif stres ve inflamasyona etkisi	63
4.9. SIRT1 Ekspresyonu Susturulan HepG2 Hücrelerinde ER Stresine Bağlı Değişiklikler	64
4.9.1. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde ER stresine bağlı değişiklikler	64
4.9.2. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde linoleik asitin ER stresine etkisi	66
4.9.3. SIRT1 ekspresyonu susturulan HepG2 hücrelerinde ER stresinin hücre içi oksidatif stres ve inflamasyona etkisi	66
4.9.4. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde linoleik asitin hücre içi oksidatif strese ve inflamasyona etkisi	68
4.9.5. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde ER stresinin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	69
4.9.6. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	70
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
AP-1	Aktivatör protein-1
ATF-4	Activating transcription factor-4
ATF-6	Activating transcription factor-6
BCA	Bicinchoninic acid
BiP	Binding protein
BKİ	Beden kitle indeksi
BSA	Bovine serum albumin (sığır serum albümini)
cADPR	<i>Cyclic adenosine diphosphate ribose</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribo nucleic acid</i>
CRP	C-reaktif protein
DDIT3	<i>DNA damage-inducible transcript 3</i>
DEPC	Dietilpirokarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asid
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EcoRI	Escherichia coli Restriksiyon enzimi I
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
eIF2 α	<i>Eukaryotic initiation factor 2 alpha</i>
eIF2 β	<i>Eukaryotic initiation factor 2 beta</i>
eNamp2	Ekstraselüler nikotinamid fosforibozil transferaz
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ETZ	Elektron transport zinciri
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FOXO1	Forkhead box protein O1
GADD153	<i>Growth arrest and DNA damage-induced gene-153</i>
GLS1	Golgi lokalizasyon sinyali 1
GLS2	Golgi lokalizasyon sinyali 2
GLUT-4	<i>Glucose transporter-4</i>
GRP78	<i>Glucose-regulated protein-78</i>
H1	Histon proteini 1
H3	Histon proteini 3
H4	Histone protein-4
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (yüksek yoğunluklu lipoprotein)
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinom hücreleri

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRP	Horseradish peroxidase (Bayır turpu proksidazı)
HSP70	Heat shock protein 70
HSPA5	Heat shock 70 kDa protein 5
IgG	İmmunoglobulin G
IL-1	İnterlökin-1
IL-1 β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-7	İnterlökin-7
IL-8	İnterlökin-8
I κ K	İnhibitör κ B kinaz
iNampt	İntraselüler nikotinamid fosforibozil transferaz
IRE-1	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
IRS-1	İnsülin reseptör substratı-1
IRS-2	İnsülin reseptör substratı-2
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
LB	Lysogeny broth
LB-amp	Lysogeny broth-ampicillin
LPL	Lipoprotein lipaz
MAP kinaz	Mitojen ile aktive protein kinaz
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	(3-(4,5dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür
NAADP	Nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat
NAD ⁺	Nikotinamid edenin dinükleotit (yükseltgenmiş)
NADH	Nikotinamid edenin dinükleotit (indirgenmiş)
Nampt	Nikotinamid fosforibozil transferaz
NF κ B	Nükleer faktör κ B
NMN	Nikotinamid mononükleotit
NO	Nitrik oksit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBEF	<i>Pre-B-cell enhancing factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (polimeraz zincir reaksiyonu)
PERK	<i>Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase</i>
PGC-1 α	PPAR gama koaktivatör-1 alfa
PI 3- kinaz	<i>Phosphoinositide 3-kinaz</i>
PKC	Protein kinaz C
PPAR	Peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptörler
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

PVDF	Poliviniliden florür
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sir2	<i>Silent information regulator-2</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIRT1	Sirtuin 1
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TAG	Triaçilgliserol
TBS	Tris-buffered saline (Trisle fosfatlanmış tuz çözeltisi)
TE	Tris-EDTA
TNF α	Tümör nekroz faktörü alfa
TOS	<i>Total oxidant status</i> (toplam oksidan düzey)
TZD	Tiazolidindion
UCP-1	<i>Uncoupling protein</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i> (katlanmamış protein yanıtı)
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> (Çok düşük yoğunluklu lipoprotein)
XBP-1	X-box-binding protein-1

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İnsülin direncinin moleküler mekanizması ve ER stresi ile ilişkisi	18
Şekil 2.2. Memelilerde NAD sentezinde Visfatin/Nampt'ın yeri	25
Şekil 2.3. PPAR izoformları ve etki mekanizması	31
Şekil 3.1. Visfatin ekspresyon vektörünün haritası	32
Şekil 3.2. SIRT1 aktivite tayin kitinin standard grafiği	48
Şekil 4.1. Miniprep ile hazırlanan plazmid DNA'larının jel görüntüsü	50
Şekil 4.2. Miniprep ile hazırlanan plazmid DNA'sının EcoRI restriksiyon enzimi ile kesildikten sonraki jel görüntüsü	51
Şekil 4.3. HepG2 hücrelerine visfatin plazmidinin transfeksiyonu sonrasında visfatin protein ekspresyonunun Western Blot ile gösterilmesi	52
Şekil 4.4. Transfeksiyon sonrası hücrelerde visfatin gen ekspresyonunun artışı	52
Şekil 4.5. HepG2 hücre lizatlarında PPAR γ protein ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	53
Şekil 4.6. HepG2 hücrelerinde farklı hücre miktarı ve tunikamisın dozlarında hücre canlılığının % olarak ifadesi	54
Şekil 4.7. Farklı hücre miktarlarında ve 0-250 μ g/mL doz aralığında tunikamisinin sitotoksik etkisi	54
Şekil 4.8. Palmitik asit ve linoleik asitin farklı dozlarında hücre canlılığının % olarak ifadesi	55
Şekil 4.9. Tunikamisinin HSPA5 gen ekspresyonuna doz-bağımlı etkisi	56
Şekil 4.10. Tunikamisinin DDIT3 gen ekspresyonuna doz-bağımlı etkisi	56
Şekil 4.11. Tunikamisinin visfatin protein ekspresyonuna etkisinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi	57
Şekil 4.12. Western Blot yöntemi ile gösterilen visfatin protein ekspresyonundaki değişikliklerin grafik olarak ifadesi	57
Şekil 4.13. Visfatin ekspresyon artışının HSPA5 ekspresyonuna etkisi	58
Şekil 4.14. Visfatin ekspresyon artışının DDIT3 ekspresyonuna etkisi	59
Şekil 4.15. Linoleik asitin tunikamisın ve palmitik asit ile uyarılmış HSPA5 ekspresyonuna etkisi	59

Şekil 4.16. Linoleik asitin tunikamisin ve palmitik asit ile uyarılmış DDIT3 ekspresyonuna etkisi	60
Şekil 4.17. Visfatin ekspresyon artışının ve ER stresinin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	60
Şekil 4.18. ER stresi oluşturulmuş hücrelerde linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	61
Şekil 4.19. Visfatin ekspresyon artışının ve ER stresinin hücre içi oksidatif strese etkisi	62
Şekil 4.20. Visfatin ekspresyon artışının ve ER stresinin NFκB ekspresyonuna etkisi	62
Şekil 4.21. ER stresi oluşturulmuş hücrelerde linoleik asitin hücre içi oksidatif strese etkisi	63
Şekil 4.22. ER stresi oluşturulmuş hücrelerde linoleik asitin NFκB ekspresyonuna etkisi	64
Şekil 4.23. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının HSPA5 ekspresyonuna etkisi	65
Şekil 4.24. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının DDIT3 ekspresyonuna etkisi	65
Şekil 4.25. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin HSPA5 ekspresyonuna etkisi	66
Şekil 4.26. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin DDIT3 ekspresyonuna etkisi	67
Şekil 4.27. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının hücre içi oksidatif strese etkisi	67
Şekil 4.28. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının NFκB ekspresyonuna etkisi	68
Şekil 4.29. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin hücre içi oksidatif strese etkisi	69
Şekil 4.30. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin NFκB ekspresyonuna etkisi	69
Şekil 4.31. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	70

Şekil 4.32. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi	71
Şekil 5.1. Visfatinin ER stresini ve muhtemel insülin direncini azaltıcı etkisinin moleküler mekanizması	82

TABLULAR

Tablo 2.1. ER stresini uyaran etkenler	3
Tablo 2.2. Katlanmamış proteini yanıtının hedefleri	4
Tablo 3.1. Western blot için lizis tamponu hazırlama tablosu	40

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Obezite, dünyada olduğu gibi ülkemizde de giderek yaygınlaşan ve başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere yol açtığı komplikasyonlar bakımından önemli toplumsal sağlık sorunları oluşturan bir durumdur (1). Obezitede hücre içi aşırı lipit birikiminin yarattığı stres, metabolizma için bir tehdit oluşturur. Bu durumdan en çok etkilenen organeller mitokondri ve endoplazmik retikulumdur (2). Ortaya çıkan oksidatif stres ve endoplazmik retikulum (ER) stresi inflamasyonu aktive eder (3,4). ER stresinin, insülin direnci ve tip 2 diabetes mellitus ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5).

Visfatin, visceral yağ dokusunda yüksek oranlarda yapıldığı gösterilmiş olan ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) sentezi yolağında hız kısıtlayıcı basamakta yer alan bir enzimdir (nikotinamid fosforibozil transferaz) (6). Obez kişilerin serumlarında visfatin düzeyleri artmış olarak bulunmuş ve yapılan in vivo çalışmalarda insülin direncini azaltarak kan şekerini düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bu araştırmanın hipotezi, visfatinin ER stresinde sentezinin artabileceği ve artmış visfatinin NAD-bağımlı sirtuinler (ör. SIRT1) ve PPAR γ üzerinden olumlu etkilerini gösterebileceği yönündedir. Bu çalışmada glukoz metabolizmasında, özellikle de insülin direncinin gelişmesinde önemli rolü olan ER stresi ile visfatin ekspresyonu arasındaki karşılıklı ilişkinin (birbirlerine etkilerinin) incelenmesi ve visfatin etki yolunda rol alması olası moleküller (sirtuin 1, PPAR γ gibi) üzerinden insülin direncini azaltan etkinin moleküler mekanizmasının tanımlanması amaçlanmaktadır.

Çalışmamız kapsamında insan kaynaklı hepatoselüler karsinom hücrelerinin (HepG2) kültürü yapıp, kültürdeki hücrelerde ER stresi deneysel olarak uyarılmış, ER stresinin visfatin ekspresyonuna, SIRT1 aktivitesine ve bazı oksidatif stres ve inflamasyon parametrelerine etkisi araştırılmıştır. Visfatinin ER stresine etkisini araştırmak amacıyla hücrelere visfatin ekspresyon vektörü transfekte edilerek visfatin ekspresyonu artırılmış, PPAR γ 'nın visfatin etki yolundaki rolünü araştırmak amacıyla hücrelere PPAR γ ligandları eklendikten sonra hücrelerde ER stresi uyarılıp ER stresinin visfatin ekspresyonuna, SIRT1 aktivitesine ve bazı oksidatif stres ve inflamasyon parametrelerine etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

Özelleşmiş bir protein katlanma bölümü olan endoplazmik retikulum, ökaryotlarda salgısal yolağın ilk kompartmanıdır. Membranla çevrili olan ER'nin lümeni topolojik olarak hücre dışı boşluğa denktir ve post-translasyonel modifikasyonlar ile salgılanan ve transmembran proteinlerin katlanması için uygun, özelleşmiş bir ortam sunar. ER'de protein, lipid, karbonhidrat ve steroid sentezi yapılabilir (7). İki alt tipi bulunur: Granüllü endoplazmik retikulum ve düz endoplazmik retikulum. İnsan hücresinde nükleus porları granüllü ER, granüllü ER ise golgi aparatı tarafından takip edilir ve golgi hücre membranı ile ilişkilidir (8). Düz ER, karakteristik olarak üç tip hücrede bulunur: i) Adrenal korteks gibi steroid hormon sentezleyen hücrelerde, ii) Karaciğerde (oksidasyon, konjugasyon ve metilasyonda rol alarak toksik maddelerin detoksifikasyon veya nötralizasyonu sağlanır), iii) Kas hücrelerinde (sarkoplazmik retikulum adını alarak) kontraksiyonu düzenleyen Ca^{+2} iyonlarının salınımını düzenler (9).

ER, lipid ve sterol sentezi, hücre içi serbest Ca^{+2} depolanması, protein katlanması, protein maturasyonu, salgısal ve membran proteinlerinin yönlendirilmesinden sorumlu ana organeldir. ER içerdiği sitokrom P450 enzimleri nedeniyle ilaç metabolizmasında önemli rol oynar. Protein sentezinin fazla olduğu dokularda (egzokrin salgı bezleri, endokrin salgı bezleri – pankreas, böbreküstü bezleri, tiroid bezi vb.), lipid sentezinin fazla olduğu dokularda (karaciğer, yağ dokusu) ve metabolik hızın yüksek olduğu veya yükseldiği tüm dokularda oldukça aktiftir (10). Hatalı proteinleri tanıyan, hatalarının düzeltilmesi veya yıkılması konusunda yönlendiren bir kalite kontrol sistemi ile birlikte çalışmaktadır (11). Bu kalite kontrol sisteminin kapasitesi aşıldığında ER stresi oluşur (12). ER'nin işlevlerini bozan ya da yavaşlatan her koşul ER stresine sebep olur (Tablo 2.1). ER'de bulunan düzenleyici mekanizma, stres yaratan durumu ortadan kaldırmaya yönelik çalışır. Buna katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response, UPR) adı verilir (13). Bazen sadece katlanma hatasından değil, yük artışından da benzer bir yanıt ortaya çıktığından ER aşırı yük yanıtı (ER overload response, EOR) olarak da adlandırılır (14).

Tablo 2.1. ER stresini uyarıcı etkenler

Hipoksi, iskemi, reperfüzyon
Reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması, oksidatif stres
Metabolik değişiklikler
Glukoz eksikliği veya hiperglisemi
Besin ve metabolit artışı
Hücre içi kolesterolün artışı
Doymuş yağ asidi artışı
Hücre içi fosfolipitlerin azalması
Kolesterol/fosfolipit oranının artması
Metabolik hız artışı
ATP'nin azalması
Hiperhomosisteinemi
Viral enfeksiyonlar
Hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyon değişiklikleri
ER kalsiyum deposunun boşalması
Protein sentezi ile ilgili değişiklikler
Protein sentezinin artışı
Mutant ve/veya yanlış katlanmış protein yükünün artışı
Posttranslasyonel modifikasyon bozuklukları (Protein glukozilasyonunun veya disülfid bağı oluşumunun bozulması)
Mitokondri hasarı
Hücre içi demir iyonu yükünün artışı
Diğer metal intoksikasyonları (kadmiyum, civa, nikel, kobalt, lantan)
Deneysel (Tunikamisin, tapsigargin, doymuş yağ asitleri, glukoz, DTT, merkaptotanol, BSA, H ₂ O ₂ .)

2.1.1. Katlanmamış protein yanıtı (UPR)

Fizyolojik olarak koruyucu ve homeostazisi korumaya yönelik bir sinyal iletim yolağı olan UPR, yeni sentezlenen proteinlerin yükü ile ER'nin protein maturasyonu kapasitesini dengelemek üzere gelişmiştir ve hücredeki yükün hücre içi işlevleri geri dönüşsüz olarak bozmasına baştan engel olmak amacıyla ortaya çıkar (15). UPR ile

hücre, maruz kaldığı stres uyarısını ortadan kaldırmaya çalışır (Tablo 2.2). UPR sırasında genel protein translasyonu durur, yalnızca stres yanıtında yer alan elemanların sentezi sürer (16). Translasyon başlama hızı eIF2 α 'nın blokajı ile azalır. Şaperon proteinlerin ve protein foldazların ekspresyonu artar (11). ER-ilişkili protein degradasyonu artar (17). UPR esnasında aynı anda hem sağkalıma, hem de apoptozise yönelik sinyaller etkinleştirilir (18). Uyarı bertaraf edildiğinde süreç sağkalım ile sonuçlanır (15). Uzun süren UPR sonucunda stres ortadan kaldırılamadığında hücre apoptozise yönlendirilir. Uyarının şiddeti çok yüksekse veya uzayan stres durumu söz konusu ise UPR önce işlev bozukluğuna, daha sonra apoptozise yol açar (19). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kronik ER stresi yaratan koşulların ve ER stresine verilen yanıtta bozuklukların bazı hastalıkların patogenezinde yer aldığı gösterilmiştir (20). Kronik ER stresi uyarılarına maruz kalınması, uzun süren UPR ve UPR yolağında yer alan elemanlarda mutasyonlar, ER stresi sonucu hücre ölümünü artıran faktörlerdir (21).

Tablo 2.2. Katlanmamış protein yanıtının hedefleri

Hücre içi biyosentez yükünü azaltmak
Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimini önlemek
Enfekte veya sağlıklı hücreyi elimine etmek
Kontrollü olarak büyüme, gelişme ve farklılaşmayı sağlamak
ER'nin protein katlama kapasitesini artırmak
İşlenmemiş protein birikimini engellemek
Hücre içi işlevlerin sürekliliğini sağlamak

2.1.2. Katlanmamış protein yanıtında moleküler mekanizmalar

UPR sırasında üç ER yerleşimli transmembran protein (IRE-1, inositol-requiring enzyme-1; PERK, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; ATF-6, activating transcription factor 6) aktive edilir. Bu proteinler aracılığıyla stres sinyalleri iletilerek değişik transkripsiyon faktörlerinin yapımı, moleküler şaperonların indüksiyonu, ER-ilişkili protein degradasyonunun artışı, fosfolipit sentezi ve apoptozis uyarılmış olur (22). Stres uyarısı olmadığı durumda, GRP78 (glucose-regulated protein 78) şaperon proteini, ER stresini algılayan transmembran

kinazların luminal bölgelerine bağlı konumdadır. GRP78 artan protein trafiği, mutant proteinlerin sentezi, viral enfeksiyonlar ve glukoz açlığı gibi stres durumlarında ER stresini algılayan transmembran protein kinazlardan ayrılır, katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgelerine bağlanır ve katlanmayan proteinleri ERAD (ER-associated protein degradation)'a gönderir (23). GRP78'in ayrılması ile aktive olan PERK, ökaryotik translasyon başlama faktörlerinden eIF2 α 'yı fosforilleyerek translasyonu durdurur; ATF-6 golgiye geç eder, orada aktive olur, nükleusa gider ve protein katlanması ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive ederek ER'nin katlama kapasitesini artırır (24).

ER stresi durumunda GRP78'in dimerizasyon bölgesinden ayrılması ile IRE-1 dimerize olur ve otofosforilasyona uğrayarak aktifleşir (25). IRE-1'in memelilerde iki izoformu vardır. IRE-1 α , bütün dokularda bulunurken, IRE-1 β sadece bağırsak epitelinde görülmektedir. UPR'nin IRE-1 kolu, evrim süresince en iyi korunmuştur. IRE-1, Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive ettiğinden pro-apoptotik kabul edilir (26). JNK'nın tümör nekroz edici faktör α (TNF α) reseptörü aktivasyonu ile hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (27). JNK büyüme faktörlerinin uyardığı sinyal yollarını baskılayarak protein sentezi yönündeki talepleri engeller (28). Aktive olan JNK insülin sinyalinde yer alan insülin reseptörü, IRS-1 ve IRS-2'yi serin rezidülerini fosforilleyerek insülinin hücre içine sinyal ilemesini inhibe eder ve böylece insülin direnci oluşur (29). Bu yol ile IRE-1, ER üzerine binecek insülin uyarımlı protein sentezi ve modifikasyonu yükünü engellemiş olur (30).

IRE-1 enzimi, sitozolik kinaz ve endoribonükleaz bölgeleri içeren tip I ER transmembran proteindir (31). Memelilerde tüm hücrelerde bulunur. ER stresi ortaya çıktığında ER membran düzleminde oligomerize olup sitozol tarafındaki kinaz ve endoribonükleaz işlevlerini aktive eder (32). IRE-1 endoribonükleaz bölgesi ile XBP-1 mRNA'sını kesip yeniden düzenler ve aktif transkripsiyon faktörü XBP-1s oluşur (33,34). Bu transkripsiyon faktörünün hedefleri fizyolojik koşullarda bazal olarak ekspresyonu olan genlerdir (35). XBP-1s, ER stresi uyarıldığında ER'nin protein katlama kapasitesini artıran ve serbest kalsiyum iyonunu ER lümenine tekrar bağlayan proteinlerin ekspresyonunu artırır. ER stresinin salgı yapan hücrelerin büyümesi, gelişmesi ve salgı işlevleri için gerekli olduğu gösterilmiştir. XBP-1s şaperonların, ERAD elemanlarının ve ER genişlemesini sağlayan proteinlerin

genlerinin transkripsiyonunu aktive ederek ER işlev kapasitesini artırır ve ER stresinin azalmasını sağlar (28). Böylece ER üzerine binen yük azalır ve ER homeostazisi korunmuş olur (30).

UPR sırasında genel protein translasyonu durur, yalnızca stres yanıtında yer alan elemanların sentezi sürer. Translasyon başlama hızı eIF2 α 'nın blokajı ile azalır (36). Şaperon proteinlerin ve protein foldazların ekspresyonu artar. ER-ilişkili protein degradasyonu artar (37). UPR esnasında aynı anda hem sağkalıma, hem de apoptozise yönelik sinyaller etkinleştirilir. Uyarı ortadan kaldırıldığında süreç sağkalım ile sonuçlanır. Uzun süren UPR sonucunda stres ortadan kaldırılamıyorsa hücre apoptozise yönlendirilir. Uyarının şiddeti çok yüksekse veya uzayan stres durumu söz konusu ise UPR önce işlev bozukluğuna, daha sonra apoptozise yol açar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kronik ER stresi yaratan koşulların ve ER stresine verilen yanıtta bozuklukların bazı hastalıkların patogeneğinde yer aldığı gösterilmiştir. Kronik ER stresi uyaranlarına maruziyet, uzun süren UPR ve UPR yolağında yer alan elemanlarda mutasyonlar, ER stresi sonucu hücre ölümünü artıran faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda metabolik koşulların hücre ve ER'nin yükünü artırdığı ve kronik ER stresine yol açtığı gösterilmiştir. Kronik hastalıkların patogeneğinde yer aldığı gösterilen ER, hücrel stres takip eden ve hücreyi tehdit eder düzeyde stres uyarılarına karşılık gelen yanıtı inflamatuvar sinyallere dönüştüren bir organel olarak yeniden tanımlanmıştır (12).

ER içinde proteinlerin hatasız katlanması, katlanmış haldeki proteinlerin konformasyonlarının korunması ve katlanma sırasında oluşan ara yapıların kümeleşip kalmamasını sağlayan moleküler şaperonlar bulunmaktadır (10). ER şaperon proteinlerinin şu ana dek en ayrıntılı incelenmiş olanlarından biri GRP78'dir. GRP78, ilk olarak içinde glukoz bulunmayan besiyerinde büyütülen hücrelerde sentezi artmış bir protein olarak keşfedilmiştir, bu nedenle glukoz ile regüle protein adını almıştır (38). Sonrasında ER'de bulunan bir protein olduğu ve sentezinin ER işlevlerini ve ER homeostazisini bozan bir grup çevresel ve fizyolojik stres koşulunda arttığı anlaşılmıştır (25). GRP78, HSP70 (Heat Shock Protein-70) ile %60 benzerlik taşır, fakat bir ısı şok proteini değildir (39). ER stresini uyaran koşullar ortaya çıktığında, ER membranında bağlı olarak bulunan GRP78 serbestleşir (40). GRP78, kaspaz aktivitesine müdahale ederek apoptotik süreci bloke eder (41).

Koruyucu etkinin GRP78 sayesinde UPR'nin ilk etkinleştigi dönemde ağır bastığı, fakat bir süre sonra uyarıya karşı yanıt yetersiz kalınca apoptotik sürecin öne çıktığı öngörülmektedir (42). Bertaraf edilemeyen ER stresi uyarısının bir süre sonra IRE-1 sinyal yolağını baskılayıp IRE-1 aktivitesini sonlandırdığı gözlemlenmiştir (9,43).

ER transmembran proteini olan PERK, memelilerde tüm hücrelerde bulunur. PERK luminal bölgesinden, protein katlanma döngüsünde rol oynayan bir şaperon olan GRP78/BiP proteinine bağlıdır (44). Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin lümende birikmesi GRP78'in PERK'ten ayrılmasına ve PERK'in oligomerize olmasına neden olur. Oligomerizasyon sonucunda PERK otofosforile olur ve kendini aktive eder (45). Aktive olan PERK, translasyon başlama faktörü eIF2 α 'yı fosforile eder. eIF2 α fosforile iken eIF2 β 'ya bağlı kaldığından translasyon başlama kompleksi oluşamaz ve translasyon durdurulur (36). eIF2 α 'nın fosforilasyonu sonucu genel protein translasyonunu azaltırken, UPR için gerekli belirli mRNA'ların translasyonunu uyarmaktadır (16). ER stresi durumunda ökaryotik translasyon başlama faktörü eIF2 α 'nın fosforilasyonu artar. eIF2 α 'nın altbirimi fosforillendiğinde genel protein translasyonunu durdurur. Bu sırada sadece ATF4 (activating transcription factor-4) translasyonu artar. ATF4, amino asit sentezini artırır ve hücre içi redoks homeostazisini indirgeyici faktörleri artırarak sağlamaya çalışır (46).

ATF-6, sitozolik bölgesi transkripsiyon faktörü olarak görev yapan tip II ER transmembran proteindir (47). ATF-6'nın luminal bölgesinde GLS1 (Golgi Localization Signal 1) ve GLS2 (Golgi Localization Signal 2) olarak adlandırılan golgiye lokalizasyon sinyalleri bulunur. GRP78, GLS1'e bağlı durumda ATF-6'yı ER membranında tutar. ER lumeninde katlanmamış proteinlerin varlığı GRP78'in GLS1'den ayrılmasına neden olur ve GLS2 aktive olarak ATF-6'nın golgiye göçünü uyarır. Bir serin proteaz olan S1P luminal bölgesini, bir metalloproteaz olan S2P ise transmembran bölgesini keserek ATF-6'nın sitozolik bölgesini serbestleştirir, serbest haldeki ATF-6 nükleusa giderek transkripsiyonu başlatır (47). ATF-6, UPR'nin önemli elemanlarından XBP-1'in transkripsiyonunu uyarır (48).

ER stresine karşılık ortaya çıkan UPR yanıtında yer alan moleküllerin büyük çoğunluğu ikili etkiye sahiptir (49). Aynı molekül, aynı anda hem sağkalıma yönelik hem de hücre ölümüne yönelik yolları etkinleştirebilir (50). UPR yanıtında yer

alan tüm moleküllerin yaptığı işin toplamı ER’de son kararın verilmesini sağlar: Koruyucu etki baskınsa hücre yaşamını sürdürür, pro-apoptotik etki baskınsa hücre ölür. Tek bir hücre düzeyinde ve fizyolojik koşullarda bakıldığında, sağ kalamayacak ve sağlıklı işlev göremeyecek bir hücrenin programlı hücre ölümüne gitmesi, hatalı işlemler yapmasını ve çoğalmasını engellediğinden organizma açısından olumludur. Kronik ER stres uyarısına maruz kalan bir dokuda bu durum doku/organ disfonksiyonu ya da hasarına yol açtığından olumsuz sonuçları olan bir durumdur (20).

2.1.3. ER stresine bağlı apoptozis mekanizmaları

ER stresi yaratan koşulların uzaması, proteaz ve kinazların doğrudan aktivasyonu ve hücre içi kalsiyumun artışıyla mitokondrial yolu aktive eden bir etki oluşturur. ER ile mitokondri arasında yer değiştirerek hücre içinde çok düşük bir derişimde tutulan kalsiyumun da önemli bir apoptotik düzenleyici olduğunu gösteren bulgular vardır (51). Hücre içinde ER depolarında kalsiyum düzeyi düşüğe seramid, oksidatif stres gibi apoptotik uyarılar ölüme yol açmamaktadır. Çalışmalar ER’den salınan kalsiyumun mitokondride düzeyinin arttığını ve bunun da mitokondrial apoptotik yolu uyardığını düşündürmektedir (50). ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (52). Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Kalsiyum seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktive olur (53). Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (54). Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12’nin kaspaz-9’u aktive ettiğini göstermiştir.

2.2. ER Stresinin İlişkili Olduğu Patolojik Durumlar

ER’nin işlevini düzgün olarak yerine getirememesi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Birçok nedene bağlı olabilir. ER’den beklenen iş yükünün artması, viral enfeksiyonlar, inflamatuvar sinyal yollarının aktive edilmesi ve salgı veya membran proteinleri gibi translasyon sonrası modifikasyona uğrayan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan hastalıklarda ER’nin bünyesindeki bir bozukluktan daha çok, ER dışındaki etmenler rol oynar (48). ER dışı etmenlerden

başka, ER'nin işlevini yerine getirmesini sağlayan proteinlerde ve UPR sinyal yolu proteinlerindeki genetik defektler de ER depo hastalıklarına neden olabilirler (7). Birçok genetik geçişli hastalık ER stresi ile ilişkilidir.

Artmış protein sentezi nedeniyle artmış protein katlanma talebi, artmış yük nedeniyle protein katlanma hatalarının artması, artmış protein sentezi nedeniyle mutant protein sayısının artması ve posttranslasyonel modifikasyonların aksaması, ER'nin protein katlama kapasitesinin azalması, ER membran bütünlüğünün ve akışkanlığının bozulması, hatalı katlanmış proteinlerin tanınmaması, UPR'nin uygunsuz aktivasyonu, aktive olmaması, uzaması veya yetersiz kalması (hipoplazi, büyüme geriliği, apoptozis, stres faktörlerine aşırı duyarlılık) gibi sorunlar ER stres yanıtının patolojik durumlarla sonuçlanmasına neden olur (55).

UPR'nin aktif olduğu patolojilerde etkilenen dokular/organlar arasında yağ dokusu, pankreas Langerhans adacıkları, karaciğerdeki hepatositler ve stellate hücreler, iskelet kası, kalp kası, nöronlar ve glia hücreleri sayılabilir.

Bu dokularla bağlantılı olarak UPR'nin aktif olduğu patolojik durumlar ise non-alkolik steatohepatit (NASH) (56) , alkolik steatohepatit, insülin direnci, tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), obezite (57) , kronik inflamasyon (2) , viral enfeksiyonlar (58) , koroner arter hastalığı (59) ve nörodejeneratif hastalıklardır (Alzheimer, Parkinson, otoimmün demyelinizan hastalıklar vb) (60).

2.2.1. Metabolik sendrom

Kardiyovasküler hastalıklar, tüm dünyada ölüm nedenlerinin %30'unu oluşturduğunun anlaşılmasından bu yana koruyucu hekimliğin en önemli hedefi haline gelmiştir (61). Önceleri hiperkolesterolemi, ateroskleroz için en önemli risk faktörü olarak kabul edilmekteydi ve kolesterol düşürücü tedavi kardiyovasküler hastalıklardan koruyucu önlemlerin en başında geliyordu. Yapılan çalışmalar sonucunda kardiyovasküler risk taşıyan insanların bir kısmında hiperkolesterolemi olmadığına saptanması bu yaklaşımın değişmesi gerektiği anlaşılmıştır. Hiperkolesterolemiden bağımsız olarak, bazı yüksek aterojenik risk/durumdaki hastalarda aynı zamanda T2DM, hiperlipitemi ve hipertansiyon gibi hastalıkların birlikte bulunduğu gözlemlenmesi, bu hastalıkların rastlantısal olarak bir araya gelmediğinin, tüm bu hastalıkların eşzamanlı ortaya çıkmasına yol açan önemli bir etkenin olabileceğinin öngörülmesine neden olmuştur (62). 1980'li yılların sonunda

obezite, T2DM, hipertansiyon, hiperlipitemi ve aterosklerotik kalp hastalığı aynı hastalarda gözlemlenerek bunların aynı metabolik bozukluktan kaynaklandığı ileri sürülmüş; obezite, hiperglisemi, glukoz tolerans bozukluğu, hipertriglisiderolemi, azalmış HDL düzeyi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı bileşenlerinden oluşan sorun “sendrom X” olarak adlandırılmıştır (63,64). Daha sonra “metabolik sendrom” olarak adlandırılan bu sendromda, birden çok risk faktörünün bir araya toplanarak yüksek aterojenik durum/risk oluşturduğu ortaya atılmıştır (65). Metabolik sendromlu bireylerde kardiyovasküler hastalıkların (koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği) daha yaygın görüldüğü saptanmış, fakat tüm bu hastalıkların birlikteliğine neden olan anahtar mekanizma sendromun tanımlandığı yıllarda açıklanamamıştır. İnsülin direncinin metabolik hastalıklarda önemli rol oynadığı uzun yıllardır düşünüldüğü halde ilk tanımlandığı yıllarda metabolik sendrom bileşenleri arasında yer alan hastalıklardan hiperglisemi dışında hiçbiri ile insülin direnci arasında doğrudan bir ilişki kurulmamıştır. Uluslararası T2DM Federasyonu’nun (International Diabetes Federation, IDF) açıkladığı metabolik sendrom tanımında intraabdominal, visceral yağ dokusu hacminin artışının kardiyovasküler hastalıkların oluşumu yönünde riskler ortaya koyduğu ilk kez belirtilmiştir (66).

Metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık riskinin artışıyla ilişkili metabolik bozuklukların birlikte görüldüğü bir hastalık topluluğudur (67). Tanı için IDF 2005 kriterleri kullanılır. Metabolik sendromun santral obezite (bel çevresinin erkeklerde 102 cm, kadınlarda 88 cm’den geniş olması veya beden kitle indeksi, BKİ>30), serum triaçilgliserol değerinin 150 mg/dL’den yüksek olması, HDL’nin erkeklerde 40, kadınlarda 50 mg/dL’den az olması, kan basıncı yüksekliği (sistolik>130 mmHg, diastolik>85 mmHg), yüksek açlık kan glukoz değeri (>110 mg/dL) olmak üzere 5 kriteri tanımlanmıştır; metabolik sendrom tanısı için 5 kriterden en az 3’ünün birlikte bulunması gereklidir.

Metabolik sendromun etyolojisi üç kategoride incelenebilir: Obezite ve yağ dokusu bozuklukları, insülin direnci ve bağımsız faktörler (vasküler, hepatik, inflamatuvar, vb).

2.2.2. Obezite ve yağ dokusu

Obezite, kronik aşırı besin alımı sonucunda yağ dokusu hacminin ve vücut ağırlığının artışı olarak tanımlanmaktadır. Obezitenin tüm dünyada gittikçe daha yaygın görülmesi ve obeziteye bağlı hastalıkların morbidite ve mortalite oranlarının yükselmesi, araştırmaları obezite ve komplikasyonlarının patogenezi anlamaya yöneltmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, obezite sonucunda ortaya çıkan metabolik sorunların diyetle aşırı yüklenilen yağ dokusunun işlevlerini dinamik olarak düzenleyen sistemlerdeki aksaklıklardan kaynaklandığı öne sürülmüş ve bu yönde bazı bilgilere ulaşılmıştır (68). Bu nedenle, yağ dokusu artışının obezite komplikasyonlarındaki etkisini anlamak ve sonuçlarıyla ilişkilendirmek için önce fizyolojik ve patolojik şartlarda yağ dokusunun işlevlerini anlamak gereklidir.

Yağ dokusu vücutta en büyük enerji deposudur ve enerjinin yağ hücresinde depolanması ve salgılanması hormonal sinyallerle (insülin, katekolaminler, glukokortikoidler gibi) kontrol edilir (69). Yağ dokusunun hücre sayısı ve hacmi, enerji gereksinimi ve besin alımına bağlı olarak yaşam boyu değişebilir (70). Puberteye kadar yağ hücresi artışı sürerken, sonrasında yağ hücresinde mitoz görülmez (71) ; puberte öncesi obezitede yağ dokusu hiperplazik, yetişkinlerde obezitede hipertrofikdir (72,73). Yağ hücrelerinde enerji depolama ve salgılama işlevleri karmaşık sistemler tarafından yönetilir. Yağ hücresi, hücre dışı sıvıya sitokinler, hormonlar salgılayan aktif bir hücredir (74). Bu salgı ürünleri ile endokrin, parakrin ve otokrin yolla diğer hücrelerle iletişim halindedir; ayrıca doğamda bulunan hormonlar ve sitokinlere membran reseptörleri aracılığı ile, yağ asitlerini kana vererek veya hücre içine alarak, depolayarak ve hormon/sitokin salgılayarak yanıt verir (75,76).

Yağ dokusu kahverengi ve beyaz yağ dokusu olarak ikiye ayrılır. Kahverengi yağ dokusu hücrelerinde çok sayıda “uncoupling protein-1” (UCP-1) içeren mitokondrileri olması, erişkinde çok az bulunması ve termoregülasyonda görev alması ile beyaz yağ dokusundan ayrı incelenir (78,79). Beyaz yağ dokusu, viseral yağ (karın boşluğunda iç organlar etrafında yerleşmiş olan yağ, omental yağ) ve deri altı yağ olmak üzere iki kısımda incelenir. Viseral yağ total vücut yağının %10 ila 20’sini oluşturur. Deri altı ve viseral yağ arasında hücre büyüklüğü, kapiller ağı, membran reseptörleri, yağ asidi salgılama depolama yönlerinden farklar bulunur (80)

Yağ dokusu ve yağ hücreleri kan damarları ile yakın ilişkilidir ve iyi gelişmiş bir kapiller ağa sahiptir. Yağ dokusu kapillerleri iskelet kası kapillerlerine göre daha geçirgen ve lipoprotein lipaz (LPL) bakımından zengindir (81).

Obezite, insülin direnci ve metabolik sendrom gelişiminde iyi bilinen bir risk faktörüdür (82). Toplam yağ miktarına ek olarak, viseral yağ dağılımı insülin direnci gelişimine daha fazla katkıda bulunduğundan yağ dokusu dağılımında önem taşımaktadır (83,84). Viseral yağ dokusu, metabolik işlevlerde önemli bazı faktörler sentezleyip salgıladığı ortaya çıkarılmıştır. Bu faktörler içinde glukoz metabolizmasında fizyolojik ve patofizyolojik etkileri iyi tanımlanmış olan serbest yağ asitleri ve çeşitli metabolik fonksiyonları kontrol eden otokrin, parakrin ve endokrin etkilere sahip adipositokinler olarak adlandırılan proteinler vardır (85). Bu adipositokinlerden bazılarının insülin direnci gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (86,87). Adipositokinler kas, karaciğer gibi insülin hedef organlarında insülin direncini lokal ya da distal etkileriyle artırabilir ya da etkilerini nöroendokrin, otonomik veya immun yollar aracılığıyla gösterebilirler (88).

Yağ dokusu, fizyolojik koşullarda işlevlerini yürütürken çeşitli sinyaller olarak ve göndererek aktif olarak metabolik değişikliklerden haberdar edilir (89). Adipositlerden sentezlenen bu adipokinlerin homeostaziste, immün yanıtta, vazoregülasyonda ve steroid metabolizmasında rol aldığı bilinmektedir (85). Bu proteinlerin birçoğu yağ kitlesi artışıyla birlikte artmaktadır ve bir kısmı obezitenin birçok morbiditesinden sorumluyken, bir kısmı da koruyucu etkiye sahiptir. Bilinen adipokinler arasında $TNF\alpha$, leptin, interlökin-6, adiponektin, rezistin, adipsin ve visfatin sayılabilir (90).

Endokrin etkilerinin olduğunun keşfedilmesi, yağ dokusunu durağan bir enerji deposundan dinamik bir metabolik düzenleyici konumuna getirmiştir (91). Yağ dokusu işlev ve vücuttaki dağılımına göre kahverengi-beyaz ve viseral-cilt altı olarak iki ayrı biçimde sınıflandırılır. Kahverengi yağ dokusu, lipidlerin oksidasyonu sonucu ısı üretimini (termogenez) sağlar (92). Beyaz yağ dokusu metabolik düzenlemelerde görev alır. Beyaz yağ dokusunda beslenme durumu, çevresel değişiklikler, hamilelik, emzirme dönemi, ilaç kullanımı, hastalık durumu ve hücrelerin büyüklüğü gibi etkenler adiposit-preadiposit oranını etkiler. Metabolizmanın talebine göre diferansiyasyon, dediferansiyasyon,

transdiferansiyasyon, apoptozis veya nekrozla bu oran dinamik bir dengede tutulur (70). Adipositlerin temel işlevi, yağ asitlerini triaçilgliserol formunda depolamak ve gerektiğinde dolaşıma vermektir (93). Adipositler, fizyolojik koşullarda yağ depolamayan dokuları yağ asitlerinin lipotoksik etkilerinden koruyarak sağlıklı bir glukoz ve lipit metabolizmasının sürdürülmesinde önemli rol oynar (81). Son yıllarda, özellikle viseral adipozitenin insülin direnci ve T2DM gelişimi ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (94). Aşırı veya orantısız yağ dokusu artışının lipit ve karbonhidrat metabolizmasında bozukluklara yol açtığı, bu durumu ortaya çıkaran etkenin de inflamasyon olduğu artık bilinmektedir (95). Obezitede, yağ dokusunda JNK ve NFκB sinyal iletim yolları etkinleştirilir ve TNFα, IL-6, MCP-1 gibi moleküllerin ekspresyonu artar (96). Yağ dokusunda kronik inflamasyon, hipoksi, oksidatif stres ve hipertrofiye bağlı mekanik stres oluşur (12). Tüm bu etkilerin sonucunda hücrede özellikle mitokondri ve endoplazmik retikulum etkilenmekte ve organel disfonksiyonu ortaya çıkmaktadır. Obezitede disfonksiyonel yağ dokusu, lipit yükünü diğer organlara aktararak rahatlamaya çalışır (97).

Obezite oluşum sürecinde yağ dokusunun yağ depolama kapasitesini aşacak düzeyde besin alımı sonucunda, yağ dokusu dışında özellikle viseral organların çevresinde, omentumda, pankreasta, karaciğerde, kalp ve iskelet kasında lipit birikimi artar. Yağ dokusu dışında lipit birikimi, ektopik lipit birikimi olarak adlandırılır (98). Yapılan çalışmalarda obezite kaynaklı komplikasyonların patogeneğinde ektopik lipit birikimi sonucu ortaya çıkan doku ve organ düzeyindeki işlev bozukluklarının önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (97). Ektopik lipit birikimi, lipotoksisite olarak tanımlanan bir grup hasara yol açarak hücre düzeyinde işlev bozuklukları ve hücre ölümüne yol açarak enerji metabolizmasını olumsuz etkiler (99). Yağ dokusu, salgıladığı sitokinler/adipokinler, hormonlar ve yağ asitleri ile obezitede görülen insülin direnci, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres ve kronik, düşük düzeyli inflamasyondan sorumludur (100). Obeziteye bağlı komplikasyonların patogeneğinde sorunun kaynağı lipit yükünün dokularda ve dolaşımda artmasıdır (12). Obezitede hücre içi aşırı lipit birikiminin yarattığı stres, metabolizma için bir tehdit oluşturur. Obezite sürecinde yağ hücresi içinde oluşan bu aşırı yük, sitoplazmanın yanı sıra diğer organellerde de birikime yol açar ve işlev bozukluğuna sebep olur (101). Bu durumdan en çok etkilenen organeller mitokondri

ve endoplazmik retikulumdur (2). İnsülin direncinin adipositte gelişmesine neden olan metabolik durumlardan en önemlileri inflamasyon ve oksidatif strestir (102). Bu iki patolojik süreç, birbirleriyle oldukça iç içe geçmiş durumda olup kısır döngü yaratmakta, hücrenin kronik metabolik yükü başa çıkmasını ve bu durumdan kurtulmasını olanaksız hale getirmektedir (103).

Obezlerde plazma serbest yağ asitleri ve karaciğer serbest yağ asitleri düzeyleri yüksektir (104). Aynı zamanda insülinin adiposit ve myositlerde glukoz reseptörlerinin translokasyonunu kolaylaştırıcı etkisine direnç vardır. Obezlerde insülin direnci, glukoz düzeylerinde yükselmeye yol açarak pankreas β hücrelerinden insülin salgısında dengeleyici bir artışa neden olur. Bu kompensatuar artış, bir süre sonra yetersiz kalır ve sonuçta T2DM ortaya çıkar. Normal koşullarda adipositler yemek sonrası yağları depolar ve daha sonra açlıkta serbest yağ asitlerini salgılar. Obezlerde ise, yüksek insülin düzeylerine rağmen adipositler yemek sonrası dönemde serbest yağ asitleri salgılamaya devam edebilir. Uzun süreli serbest yağ asitlerinin sekresyonu, plazma serbest yağ asitlerini yükseltir ve karaciğere serbest yağ asitleri alımı artar (105). Aynı zamanda insülin direncine bağlı olarak yüksek insülin ve glukoz düzeyleri karaciğerde glukozdan serbest yağ asitleri sentezini artırabilir. Karaciğerde serbest yağ asitlerinin artması mitokondrial β -oksidasyonun artmasına neden olur. Zayıf insanlarda β -oksidasyonun hem insülin hem de malonil-KoA ile inhibisyona duyarlılığı da belirgin bir şekilde azalmıştır. Benzer etkiler insülin direnci olan obez insanlarda meydana geldiğinde yüksek insülin ve malonil KoA düzeylerine rağmen mitokondrilere aşırı serbest yağ asitleri transportuna ve β -oksidasyona neden olabilir. Obezlerde mitokondrial β -oksidasyon artmış olmasına rağmen karaciğerin serbest yağ asitleri yükünü azaltmaya yetmez. Karaciğerde serbest yağ asitleri triaçilgliserollere (TAG) dönüşür. TAG'ların bir kısmı intrasitoplazmik olarak birikip steatoza neden olurken bir kısmı da VLDL olarak salgılanıp hipertriacilgliserolemiye neden olur. İnsülin normal bireylerde karaciğer VLDL sekresyonunu azaltma eğiliminde olmasına rağmen direnç nedeniyle obezlerde, T2DM'lilerde bu etki olmaz.

Kronik besin yükünün artışı, yağ depolarının artmasına neden olur. Yağ dokusunun genişleme imkanı kısıtlıdır. Preadipositler adipositlere dönüşebilir (adipogenez), ya da adipositler hipertrofiye uğrayabilir. Adiposit hipertrofisi, ER için

stres yaratan bir durum olup insülin direnci, makrofajlardan kemoatraktan moleküllerin salınması, kronik inflamasyon ve hipertrofik adipositin ölümüyle sonuçlanır. Yağ dokusuna infiltre olan makrofajlar, inflamatuvar proteinler salgılayarak dokuya daha fazla makrofaj çekerler. İnsülin direnci gelişmiş adipositler düşük lipit sentezi ve yüksek lipoliz kapasitesine sahiptir, bu durumda dolaşımdaki serbest yağ asidi düzeyi artar. Serbest yağ asitleri yağ dokusundaki insülin direnci, lipoliz ve inflamasyonu daha da artırır (çeşitli sitokin reseptörleri aracılığı ile). Yağ dokusunda ortaya çıkan bu işlev bozuklukları lipodistrofi olarak adlandırılır. Obezite, edinilmiş lipodistrofi olarak da tanımlanabilir. Serbest yağ asitlerinin artması adiponektinin azalması, adiponektin ve leptin dirençlerinin gelişmesi ile yağ dokusu dışındaki dokularda lipit oksidasyonunun azalmasına neden olur. Fazla yağ asitleri enerji için kullanılmak yerine depolanır (ektopik lipit birikimi). Aşırı besin alımı sonucunda vücuttaki yağ rezervi, depolama kapasitesini sonuna kadar kullanmak zorunda kalır. Yağların fazlası, portal sistemle karaciğere, pankreasa, iskelet kaslarına gider. Ektopik lipit birikimi, insüline dirençli dokularda yağlanma (steatozis), lipodistrofi, yaşlanma sürecinin hızlanması olarak tezahür edebilir. Dokulardaki yaşlanma hücrede diaçilgliserolü artırıp protein kinaz C'yi aktive ederek hiperglisemiye neden olan değişiklikleri (IRS-1 tirozin fosforilasyonunun azalması, IRS-1 serin fosforilasyonunun artması, PI3 kinazın inaktivasyonu ve GLUT4 ekspresyonunun azalması) ortaya çıkarır. Ortaya çıkan oksidatif stres ve ER stresi, inflamasyonu aktive eder (106,107).

Oksidatif stres, artan reaktif oksijen türleri üretimi ile endojen antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizliğin yarattığı bir durumdur. Oksidatif hasar ile hücre fenotipinde özgül değişikliklere yol açabilir. Hücresel düzeyde ciddi miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin yol açtığı toksik etkiler vücuttaki antioksidan savunma sistemiyle yok edilmeye çalışılır. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stresin yaşlanma, endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp yetmezliği ve reperfüzyon hasarı gibi birçok önemli süreci tetikleyerek kardiyovasküler hastalığın oluşumu ve ilerlemesinde rol aldığı bilinmektedir (108).

Obezitenin hücre içinde lipit birikimi ve büyüme, enerji akışında bozulma, dokuda genişleme ve yapı bozukluğuna neden olarak ER stresi meydana getirdiği

gösterilmiştir (95). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, viseral obezitede artmış lipit yükünün yarattığı ER stresinin insülin direnci ve T2DM oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (109). Uzun zincirli, doymuş yağ asitleri (örneğin, palmitat) ER stresini uyarır ve apoptozisi artırır (110). Mitokondri membranında kardiyolipin oranını azaltarak mitokondride işlev bozukluğu yaratır (111,112). ER membran akışkanlığını olumsuz etkileyen etkenlerden biri olan seramid sentezini artırarak ER stresini uyarır. Reaktif oksijen türlerini artırarak oksidatif strese yol açar. Reaktif oksijen türleri ve seramid, ER'den mitokondriye serbest kalsiyum iyonu geçişini artırarak ER stresine neden olur. Uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin in vivo ve in vitro pankreas β hücrelerinde, hepatositlerde ve kardiyomiyositlerde ER stresini uyardığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Lipitlerin açıl zincirlerinin membrandaki birleşme/ayırma olaylarını direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Doymuş yağ açıl zincirlerinin membran fosfolipitlerini hareketsiz hale getirip hücre için olumsuz sonuçlar doğurduğu gösterilmiştir.

2.2.3. İnsülin direnci

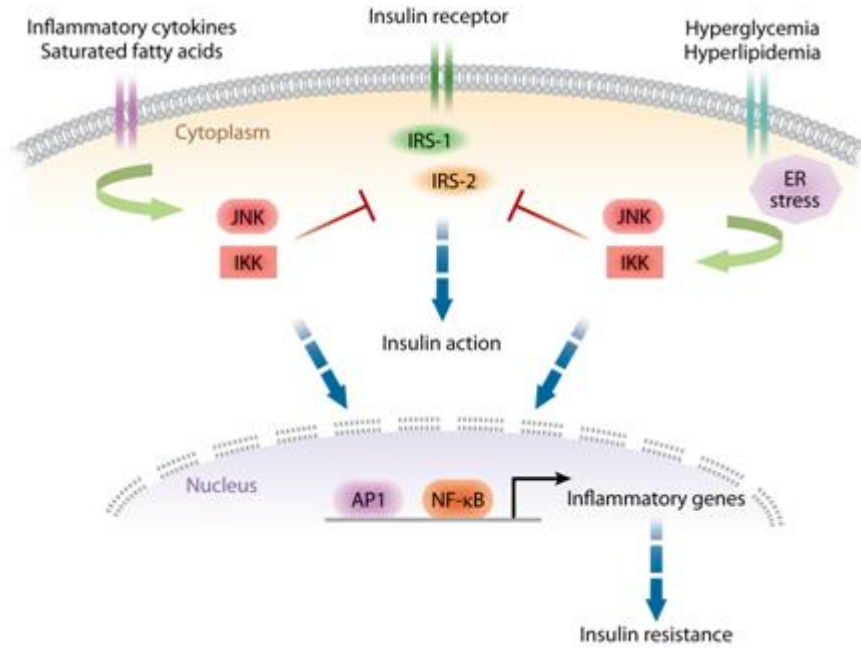
İnsülin direnci, belirli bir konsantrasyondaki insüline normalin altında bir biyolojik yanıt alınması veya insülinin beklenen etkisinin bozulması sonucu insüline verilen yanıtta eksiklik olarak tanımlanabilir (113). İnsülin direncinin, insülinin biyolojik etkilerinin hem iskelet kasında beklenenden daha az glukoz işlenmesiyle hem de primer olarak karaciğerde endojen glukoz üretiminin baskılandığı durumlarda ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Açlık durumunda, glukoz kullanımının az bir kısmı kaslardadır; öte yandan endojen glukoz üretimi plazmaya giren glukozun tamamından sorumludur. T2DM'li hastalarda ya da bozulmuş açlık glukozu mevcut olan hastalarda endojen glukoz üretimi artmıştır. Bu artış hiperinsülinemi varlığında olduğu için en azından hastalığın erken ve ara evrelerinde, T2DM için hepatik insülin direnci hiperglisemiye yol açan ana unsurdur.

Diabetes mellitus, düşük insülin aktivitesine bağlı sürekli veya değişken/aralıklı hiperglisemi ile karakterize multifaktöriyel, metabolik bir hastalıktır. Altta yatan sorun, azalmış insülin salgısı ya da bozulmuş insülin sinyal iletimi (insülin direnci) veya ikisi birdendir.

Kronik ER stresinin patogeneğinde rol oynadığı hastalıklara en önemli örnek T2DM'dir (114). Yapılan çalışmalarda T2DM'nin patogeneğinde kronik ER stresinin

rol oynadığı gösterilmiştir. ER stresi JNK gibi inflamatuvar kinazların aktivasyonuna neden olarak, insülin sinyal iletiminde bozukluğa neden olmaktadır (115). İnsülin karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi çoğu dokuda, hücre zarlarında bulunan yüksek afiniteli özgün reseptörlerine bağlanır. İnsülin reseptörü, tek bir polipeptit olarak sentezlenir, glukozillenir ve altbirimlerine ayrılır. Bunlar daha sonra disülfid bağlarıyla, bir tetramer oluşturmak üzere bir araya gelirler. Her β altbiriminin hidrofobik bölümü plazma membranı içinde yer alır. Hücre dışında bulunan α altbirimi insülin bağlanma bölgesi içerir. β altbiriminin sitozolik bölümü tirozin kinaz etkinliğine sahiptir ve insülin ile etkin duruma geçer. İnsülinin kendi reseptörünün α altbirimlerine bağlanması konformasyonel değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, β altbirimlerine iletilir ve β altbiriminin otoposforilasyonuna neden olur (116). İnsülin reseptörü, reseptör tirozin kinaz ailesindedir. İnsülinin bağlanmasıyla önce otoposforilasyona uğrar, daha sonra insülin reseptör substratı 1 (IRS-1) proteinini tirozinler üzerinden fosforiller. Bu yolla aktifleşen IRS-1 insüline özgü sinyal yollarını (MAP kinaz ve PI3 kinaz/Protein kinaz B yolları) uyararak hücrel yanıtın ortaya çıkmasını sağlar (117). İnsülin aktivitesinin bir kısmının, hedef proteinlerin serin veya treonin birimlerinin fosforilasyonu veya defosforilasyonu ile olduğu bilinmektedir (118). İnsan ve hayvan modellerinde sistemik insülin direncinde bu işlevlerde defekt olduğu gösterilmiştir. Obezitede, yağ dokusunda artmış miktarda üretilen serbest yağ asitleri, $TNF\alpha$ ve IL-6 hedef dokularda inflamatuvar kinazları aktifleştirir. Bunlardan JNK, IRS-1'in serin fosforilasyonuna neden olarak tirozin fosforilasyonunu engeller ve sinyal iletimini baskılar (119). Obezitede JNK aktivitesinin karaciğer, yağ dokusu ve hipotalamusta artış gösterdiği ve $TNF\alpha$ gibi sitokinlerin, serbest yağ asitlerinin ve ER stresinin bu enzimin aktivitesini artırdığı bilinmektedir. JNK-1 eksikliğinin sıçanlarda obezite ile indüklenen IRS-1 serin fosforilasyonunu, insülin direncini, yağlı karaciğer ve T2DM gelişimini engellediği gösterilmiştir. Bu nedenle JNK inhibisyonunun T2DM tedavisinde önemli bir hedef olabileceği ileri sürülmüştür (120). İnsülin direnci ve metabolik fonksiyon bozukluğunda önemli olan diğer inflamatuvar kinazlar inhibitör κB kinaz (I κ K) ve Protein Kinaz C (PKC)'dir. Bu kinazların deneysel aktivasyonları da JNK'ye benzer şekilde sistemik insülin direncine neden olmaktadır. İnflamasyonda önemli rolleri olan transkripsiyon faktörlerinden NF κ B, IKK

tarafından; AP-1 de PKC tarafından fosforilasyon ile aktifleştirilmekte, aynı zamanda IRS-1 sinyal yolu da bu kinazlar tarafından fosforilasyonu ile baskılanmaktadır (Şekil 2.1) (121). Ayrıca, yağ asitleri ve metabolitlerinin insülin direncine neden olmasında, hem kasta hem de karaciğerde PKC'yi aktifleştirmeleri rol oynamaktadır (122).



Şekil 2.1. İnsülin direncinin moleküler mekanizması ve ER stresi ile ilişkisi
(Odegaard JI, Chawla A, 2011 Annu Rev Pathol Mech Dis 6:275-97).

Obezite sürecinde yağ dokusu aşırı derecede büyüdüğünde yağ depolama kapasitesi doygunluğa ulaşır, bunun sonucunda yağ dokusu daha fazla yağ biriktirme özelliğini yitirir (123). Bu evrede dolaşımda bulunan serbest yağ asitleri karaciğer, pankreas, iskelet kası veya kalp kası gibi yağ dokusu dışındaki diğer organ ve dokularda birikmeye başlar. Bu organlarda lipit birikimi toksik olabilir, bu durum lipotoksisite olarak adlandırılır (124). Lipotoksisitenin obezite sürecinde ortaya çıkan insülin direncine neden olduğu öne sürülmüştür.

Yağ dokusundaki hormon sensitif lipaz, triaçilgliserolleri serbest yağ asidi ve gliserole parçalar. Bu işlem normalde insülin tarafından inhibe edilir. Bu yüzden yağ dokusundaki lipoliz insüline çok hassastır. T2DM ve şişmanlıkta ise insülinin bu

antipolitik etkisine karşı direnç gelişmektedir (125). Bundan dolayı insülin direnci veya insülin eksikliği hormon sensitif lipazın aktivitesinde artışa yol açarak serbest yağ asidi salınmasını artırır.

İnsülin direnci, T2DM oluşumunun temel nedenlerinden biridir. Periferik insülin direncine, pankreatik β hücreleri vücudun insülin ihtiyacını kapatmaya çalışırken insülin salınımında meydana gelen bozuklukların eklenmesi ile T2DM oluşur. Obezite, T2DM gibi insülin direnci ile ilişkili metabolik hastalıklar, çevresel nedenlerin yanında genetik nedenler de barındırırlar. Örneğin leptin genindeki mutasyonlar obeziteye, leptin reseptöründe meydana gelen mutasyonlar T2DM'ye neden olur (126). Bu iki mutasyonu taşıyan bireylerde insülin direnci oluşumu görülür. İnsülin sinyal yolağı, ER homeostazisi ve hücrel redoks durumundaki değişimlere karşı çok hassastır (5). Obezitede artan serbest yağ asitleri ve TNF α gibi inflamatuvar sitokinler JNK stres kinazları aktive ederek karaciğer ve yağ hücrelerinde insülin direncine neden olur (119). Obezitede inflamatuvar sitokin salınımının artması adipositlerde hücre içi stres olduğunu işaret eder. Hücre içi stresin önemli merkezlerinden biri ER'dir. Yapılan bir çalışma, obezitede hücre içi stresin kaynaklandığı yerin ER olduğunu göstermiştir. ER stresinde JNK aktive olur. JNK'nın IRS-1'i fosforillemesi, tirozinden fosforillenmesini azaltmaktadır (29). İnsülin sinyal yolunun hücre içi birinci basamağında gerçekleşen bu inhibisyon hücreyi insüline karşı tam olarak dirençli yapar. İnsülin direnci ve T2DM'nin düzelmesi için, karaciğerden çıkan glukoz miktarının azalması, perifer dokularda glukoz kullanımının artması, insülin talebinin azalması ve glukoz düzeyinin düşmesiyle pankreasta ER stresinin azalması gerekmektedir.

Açlık durumunda insülin direncinin primer yeri karaciğerdir. Hepatik glukoz üretimindeki artış açlık kan şekerinin artmasına yol açar. Hatta açlık hiperglisemisinin tamamının karaciğer glukoz yapımındaki artışa bağlı olduğu kabul edilmektedir. Karaciğerden glukoz yapımı glikojenoliz veya glukoneogenez yolu iledir. Hepatik glukoneogenezdeki artışın kesin mekanizması bilinmemekle beraber hiperglukagonemi ve laktat, alanin ve gliserol gibi glukoneojenik öncüllerin artışı söz konusudur. Yapılan çalışmalarda, hepatik glukoz çıkışının T2DM'li olmayanlara göre 2-3 kat daha yüksek olduğu ve açlık plazma glukoz konsantrasyonunu doğrudan

artırdığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmalar T2DM'li hastalarda, hiperglisemi patogenezinde karaciğerin rolünü ortaya koymaktadır (127).

2.2.4. Glukotoksisite ve lipotoksisite

Memelilerde karaciğer, lipit ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyerek enerji metabolizmasında homeostazisin sağlanmasında önemli rol oynar. Plazmada yüksek glukozun ER stres yanıtını tetikleyici olduğu düşünülmüş ve bu yönde çalışmalar yapılmıştır. Diyetle karbonhidrat oranı çok arttığında, UPR'nin IRE-1 α /XBP-1 kolunun aktive olduğu gösterilmiştir. IRE-1 α , yağ asidi ve kolesterol senteziyle ilgili genlerin ekspresyonunda kontrol basamağında yer alır. UPR hepatik lipogenezi düzenler (56). Diyetle karbohidratın artmasıyla plazmada glukoz artar, β hücrelerinden insülin salgılanır, glikoliz artar, de novo lipit sentezi artar, triaçilgliserol artar ve karaciğerden yağ dokusuna VLDL ile taşınır. Genetik steatozis modellerinde, VLDL salgısı olmayıp triaçilgliserol biriktiğinde, ER stresi belirteçleri yükselmekte ve insülin direnci ortaya çıkmamaktadır. ER stresi hepatik insülin direnci için (hepatik steatoziste) yeterli değildir, steatohepatit ortamı gereklidir (128)

Hipergliseminin başlı başına insülini azaltan bir durum olması, glukotoksisite kavramının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Glukotoksisite, uzun süreli hipergliseminin insülin üretimi ve salgısıyla ilgili hücresel bileşenlere zamanla geri dönüşsüz hasar vermesidir. Hiperglisemi, hücrelerde büyük miktarda reaktif oksijen türünün oluşmasına yol açar. Reaktif oksijen türleri, hücreye doğrudan ve aracı moleküller ile zarar vererek işlev bozukluğuna neden olur (129).

Son yıllarda yapılan araştırmalar hipertrigliseridemilerde, özellikle de serbest yağ asitlerinin arttığı durumlarda IRS-1 fosforilasyonunun bozulduğunu ve buna bağlı olarak insülin etkisinde azalma oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle T2DM'li bireylerin kan şekerinin düzenlenmesinde, metabolik sendromun tedavi ve önlenmesinde hipertrigliseridemi tedavisi çok önemlidir. Yükselmiş plazma serbest yağ asidi düzeyleri, tipik olarak T2DM gibi insüline dirençli durumlarla ilişkilidir (130). Plazmada serbest yağ asitlerinin yüksek düzeyde olması, kas dokusunda glukoz transportunun inhibisyonu yoluyla insülin direncine katkıda bulunmaktadır (105). İnsülin, serbest yağ asitlerinin normal düzeylerinin sürdürülmesini sağlamaktadır. İnsülin direncinde insülinle yönlendirilen baskılanma olmadan, plazma serbest yağ asidi düzeyleri yükselir ve karaciğer glukoz üretiminin

uyarılmasına neden olur (131). Serbest yağ asidi düzeylerinin kronik olarak yüksekliğinin β hücresi fonksiyonu üzerinde, “lipotoksisite” olarak bilinen ve hiperglisemiyi daha fazla alevlendiren zararlı etkileri tanımlanmıştır (132).

İnsülinin glukoz metabolizması üzerine etkileri, en belirgin olarak üç dokuda gözlenir: karaciğer, kas ve yağ dokusu. Karaciğerde glukoneogenez ve glikojen yıkımını inhibe ederek, glukoz üretimini azaltır. Kas ve karaciğerde, glikojen sentezini artırır. Kas ve yağ dokusunda, hücre membranlarındaki glukoz taşıyıcılarını artırarak glukoz alımını artırır. İnsülin verilmesinden birkaç dakika sonra, yağ dokusundan yağ asidi salınmasında belirgin düşme görülür (133). İnsülin, yağ dokusunda hormona duyarlı lipazın aktivitesini inhibe ederek dolaşımdaki yağ asitlerini azaltır. Dokularda aminoasitlerin hücre içine girişini ve protein sentezini uyarır. Birçok dokuda insülin varlığında glukoz taşınımı artmaktadır. İnsülin glukoz taşıyıcılarının (glukoz transport molekülleri, GLUT) hücre içi vezikül havuzundan hücre yüzeyine devamlı hareketini sağlamaktadır (134). Çizgili kas ve yağ dokusunda insülin GLUT-4 yardımıyla transloke olur. İnsülin bağlandıktan sonra, hormon reseptör kompleksi hücre içine alınır. Hücre içinde lizozomlarda yıkılır.

2.2.5. Tip 2 Diabetes Mellitus

T2DM obezite ile çok yakın ilişkilidir. Obezite insülin direncini artırarak hiperglisemiyi ağırlaştırmasına rağmen obezite olmadan da T2DM gelişir. Bu yüzden obez ve obez olmayan T2DM ayrımı etyolojik bir farklılık oluşturur. Buna göre obez T2DM’de insülin direnci daha önemli iken, obez olmayan T2DM’de insülin sekresyon bozukluğu ön plana geçer. İnsülin direnci sendromundaki primer bozukluk, periferik insülin direncidir ve diğer bulgulardan önce ortaya çıkar (135). Hiperinsülinizm özellikle ileri derecede olduğunda insülinin bir büyüme faktörü gibi rol oynayıp arteriel duvardaki proliferasyonu stimüle ederek makrovasküler hastalığı başlatabileceği, sodyumun renal tübüler reabsorbsiyonunu hızlandırarak ve sempatik sinir sistemi aktivitesini artırarak hipertansiyonun gelişmesine katkıda bulunabileceği ve son olarak karaciğerden çok düşük dansiteli lipoproteinlerin sentezini hızlandırıp ortamdaki uzaklaştırılmalarını yavaşlatabileceği varsayılmaktadır. Karaciğer serbest yağ asitlerinin üç kaynağı vardır: Hepatosit içerisinde doğal sentez, yağ dokusunda sentezlenen plazma serbest yağ asitlerinin karaciğer tarafından alımı ve portal kanla gelen şilomikronların (diyetle alınan serbest yağ asitleri) hidrolizi. (136). Serbest yağ

asitleri TAG halinde yağ dokusunda depolanır ya da β -oksidasyona katılmak üzere mitokondrilere gönderilir. Uzun zincirli serbest yağ asitlerinin mitokondriye alınmasında görevli karnitin açıl transferaz-I (CPT-I), malonil KoA ile inhibe olur. Asetil KoA karboksilaz enzimi varlığında malonil KoA sentezi, asetil KoA'dan yağ asidi sentezinde ilk basamaktır. Karbonhidratlı yemek sonrası, yüksek glukoz ve insülin düzeyleri karaciğer yağ asidi sentezine neden olur. Malonil KoA düzeylerinde yükselme CPT-I' i inhibe eder ve böylece serbest yağ asitleri mitokondriye ve β oksidasyona dahil olurlar. Serbest yağ asitleri yıkılmaz ve VLDL olarak salgılanan TAG'lara dönüşür. Buna karşın açlıkta, karaciğerin yağ asidi gereksinimi, katekolaminler, glukagon ve büyüme hormonunun uyardığı hormona duyarlı lipaz tarafından yağ dokusunda lipolizle karşılanır (137).

Lipit oksidasyonunda, mitokondri matriksinde yer alan PGC-1 (PPAR γ koaktivatörü 1) kilit rolü üstlenir. Yapılan çalışmalarda, T2DM hastalarında PGC-1 ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre daha düşük ve iskelet kaslarında mitokondrilerin ETZ (elektron transport zinciri) işlev kapasitesinin azalmış olduğu saptanmış, mitokondrial işlev bozukluklarına yapısal değişikliklerin de eşlik ettiği izlenmiştir (138). Obezlerde ve T2DM'li bireylerde iskelet kası hücrelerinin hacmi sağlıklı bireylerdekine göre daha küçüktür. Mitokondri hasarı, insülin direnci gelişimi ile doğrudan ilişkili değildir. Artan serbest yağ asidi girişine karşın, hücrede mitokondrinin oksidasyon kapasitesinin azalmış olması, hücrelerde lipit birikimine neden olur, biriken lipitin sitotoksik etkileri insülin direnci gelişimine yol açar. Lipotoksiste, lipit birikiminin hücrelerde yarattığı işlev bozukluğu durumuna verilen genel addır (139). Serbest yağ asitleri, diğer lipitlere göre hücre düzeyinde daha toksiktir. Kaslarda yağ asidi oksidasyonu kapasitesinin azalması, iskelet kasında insülin direnci yaratır, iskelet kasında insülin direnci, T2DM'in karakteristik özelliğidir.

2.3. Visfatin

Adipoz doku, adiposit, preadiposit ve makrofajları da içeren pek çok hücreden oluşmuştur. Aynı zamanda adipoz doku adipokin olarak da bilinen ve metabolik olarak önemli olan çok sayıda proteini salgılayan aktif bir metabolik dokudur. Bazı adipokinler özellikle santral veya visceral obezite olmak üzere obezite

ile ilişkili kardiyovasküler komplikasyonlar ve insülin direncinde önemli rol oynarlar.

Yağ dokusu normal ağırlıktaki bir insanda, vücut ağırlığının ortalama %20'sini oluşturmaktadır. Viseral ve deri altı olarak yerleşim yerine göre sınıflanan yağ dokusu, organizmadaki en büyük enerji deposudur. Yağ dokusunun enerji ve yağda çözünen vitaminleri depolama, fiziksel koruma sağlama ve termogenez fonksiyonlarına ek olarak, günümüzde adipositlerden ve adipoz doku stromal hücrelerinden üretilen proteinlerin otokrin, parakrin ve endokrin etkilerinin olduğu gösterilmiştir (140). Adipositlerden sentezlenen bu adipokinlerin homeostaziste, immün yanıtta, vazoregülasyonda ve steroid metabolizmasında rol aldığı bilinmektedir. Bu proteinlerin birçoğu yağ kitlesi artışıyla birlikte artmaktadır ve bir kısmı obezitenin birçok morbiditesinden sorumluyken, bir kısmı da koruyucu etkiye sahiptir. Bilinen adipokinler arasında TNF α , leptin, IL-6, adiponektin, rezistin, adipisin ve visfatin sayılabilir (140).

Obezitede adipokinlerin üretim düzeyi ve salgılanma düzeni değişir. Bazı adipokinler fizyolojik olarak koruyucu, ancak patolojik koşullarda ve miktarlarda zararlı olabilir. Obezite ile artan adipokinler, ortaya çıkan ER stresi, oksidatif stres ve glukolipotoksisite kronik olarak ve düşük düzeyde inflamasyonun uyarılmasına neden olur. Adipokinlerin bir kısmı ise, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda koruyucu etki gösterir (126).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda adipokin moleküllerinin lipit ve glukoz metabolizmasını etkilediği, aterosklerozdaki inflamatuvar süreçleri düzenlediği gösterilmiştir (85). Aterosklerotik plaklarda adipokin eksprese edildiğinin bulunmasından sonra, aterosklerotik lezyonların seyrinde adipokinlerin lokal ve endokrin etkilerinin olabileceği düşünülmeye başlanmıştır (141).

2.3.1. Visfatin/PBEF/Nampt proteininin özellikleri

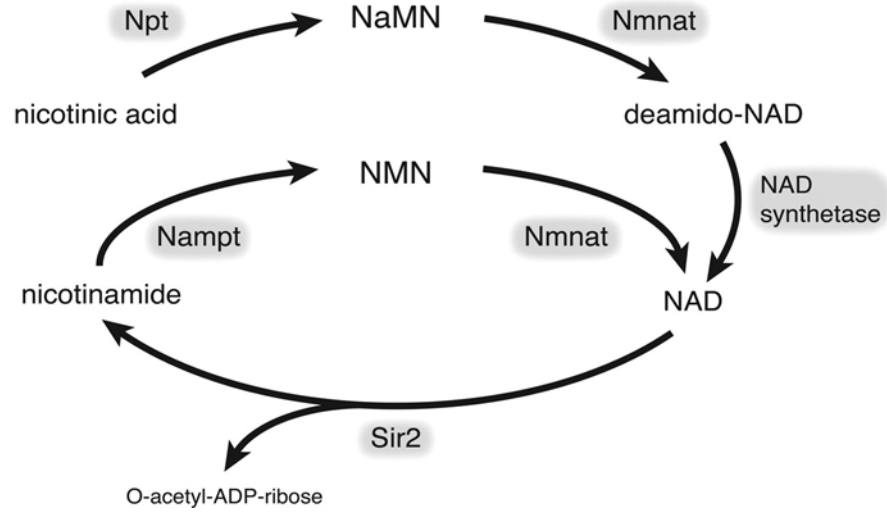
Viseral yağ dokusunda daha fazla bulunduğu iddia edilerek visfatin (visceral fat protein) adı verilen proteinin daha önce bulunmuş ve tanımlanmış olan “pre-B cell enhancing factor (PBEF)” ve nikotinamid fosforiboziltransferaz (Nampt) ile aynı olduğu anlaşılmıştır (142-144).

Visfatin geni insanda periferik kandaki lenfositlerden elde edilmiştir (144). Yapılan çalışmalarda visfatin protein ve mRNA'sına kalp kasında, böbrekte,

karaciğerde ve iskelet kasında yüksek düzeylerde rastlanmıştır (145). Visfatin bakteriler, omurgasızlar, balıklar, kuşlar ve insanlar gibi çok farklı canlı organizmalarda bulunan 52 kDa ağırlığında dimer olarak bulunan bir proteindir (146). İnsanlarda visfatin ilk kez 1994 yılında kemik iliği stromal hücrelerinde aktive lenfositlerden salınan ve erken evre B hücre oluşumunu stimüle etmek üzere IL-7 ve kök hücre faktörü ile sinerjik etki gösteren bir protein olarak keşfedilmiş ve PBEF olarak tanımlanmıştır (144).

Daha sonra visceral yağ dokusunda yüksek düzeyde ekspresyonunun saptanmasıyla visfatin olarak yeniden adlandırılmıştır (142). Visfatinin hücre içinde NAD biyosentezinde hız sınırlayıcı basamakta yer alan Nampt enzimi olduğu ortaya konmuştur (146). Nampt, NAD biyosentez yolağında nikotinamid ve fosforibozil pirofosfatın nikotinamid mononükleotid ve pirofosfata dönüştüğü reaksiyonu katalizler (Şekil 2.2) (67). Nampt ekspresyonu monosit, makrofaj, dendritik hücreler, T lenfositler, B lenfositler ve amniyotik epitel hücreleri aktive olduğunda artar (147). Ayrıca aktive nötrofillerde sentezinin arttığı ve kültür ortamına eklendiğinde nötrofil apoptozisini inhibe ettiği gösterilmiş ve böylece bir sitokin olduğu kanıtlanmıştır. Son olarak visfatinin insüline benzer etkileri olan ve visceral yağ doku hücreleri tarafından eksprese edilen bir adipositokin olduğu gösterilmiştir (142). Son yıllarda yapılan çalışmalarda visfatinin TNF α , IL-1 β , IL-6 ve CRP gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu indüklediği ve IL-8 artışına sebep olarak nötrofil infiltrasyonunu hızlandırabildiği gösterilmiştir. Ayrıca nötrofillerin visfatin ve IL-8 üretimini artırdığı ve böylece visfatinin bir döngü şeklinde inflamatuvar olaya katıldığı bildirilmiştir (148). Romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, sepsis, akut akciğer hasarı, miyokardiyal infarkt gibi bazı akut ve kronik inflamatuvar hastalıklarda, bazı tümörlerde visfatin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Visfatinin T hücre aktivasyonunda rol oynayan CD54 (ICAM1), CD40 ve CD80 gibi kostimülatör moleküllerin monositlerde hücre yüzey ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu etkilerinden dolayı visfatinin T hücre aktivasyonunda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda psoriasisste proinflamatuvar mediatörlerin aktivasyonunda NF κ B'nin rol oynadığı gösterilmiştir. Visfatin geni üzerinde NF κ B gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgelerinin varlığı visfatinin doğal ve adaptif immünyetede rolü olabileceğini

göstermektedir. Yapılan çalışmalarda birçok kronik inflamatuvar hastalıkta visfatin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (149).



Şekil 2.2. Memelilerde NAD sentezinde Visfatin/Nampt'ın yeri (67).

Obez ve/veya T2DM'li kişilerde plazma visfatin düzeyiyle ilgili yapılan çalışmalar tartışma yaratmıştır. Bazı çalışmalarda obezitede visfatin düzeyinde artış olduğu öne sürülmüştür. Bu durumun obezitenin/yağ dokusu artışının bir sonucu mu yoksa obezitedeki kronik inflamasyonun bir nedeni mi olduğu konusunda halen bir tartışma sürmektedir (150). Visfatinin yağ hücrelerinin ölümü ile salgılanan bir faktör olması da mümkündür. Bunu destekleyebilecek çalışmada obez farelerin beyaz yağ dokusunda ölen adipositlerin miktarı ile birlikte visfatin düzeyinin arttığı gösterilmiştir (151). Eğer bu protein ölen adipositlerden salgılanmaktaysa visfatinin plazma düzeyinin obezite ile artması daha iyi açıklanabilecektir.

Memelilerde nikotinamid ile başlayan NAD biyosentezinin hız kısıtlayıcı basamağı Nampt tarafından katalizlenir. Nampt, nikotinamide bir fosforibozil grubu transfer ederek nikotinamid mononükleotid (NMN) sentezler. Nampt hücre içi NAD düzeylerinin düzenleyicisi ve NAD kullanan enzimlerin aktivitesi üzerinde etkilidir (6).

Nampt, hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki halde bulunur: eNampt (hücre dışı) ve iNampt (hücre içi) (152). eNampt'ın insülin-benzeri etkileri tartışmalıdır.

Visfatinin otokrin etkileri (iNampt) ile ilgili fazla bir bilgi yoktur. Visfatinin karaciğer hücresinde NAD biyosentezi ile ilişkili insülin üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir (153).

NAD, tüm hücrelerde bulunan, hücre içi redoks tepkimelerinde önemli rol oynayan bir koenzim olup, NAD-bağımlı enzimlerin kofaktörü olarak da görev yapar (154). TNF α ve diğer proinflamatuvar uyarıların NAD metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. Doğuştan gelen bağışıklığın (*innate immunity*) güçlü bir uyarıcısı olan endotoksin, Nampt ekspresyonunda dramatik bir artışa neden olur. Nampt ekspresyonu monosit, makrofaj, dendritik hücreler, T lenfositler, B lenfositler ve amniyotik epitel hücreleri aktive olduğunda artar. NAD, hücredeki hemen her metabolik yolda rol alan bir koenzimdir. Bunun yanı sıra, kovalent protein modifikasyonları (ADP ribozilasyonlar) için ve sirtuinler gibi NAD kullanan pek çok enzim için substrattır ve çeşitli düzenleyici moleküllerin sentezinde başlangıç molekülüdür (155).

Visfatinin plazma seviyesi abdominal yağ dokusu ile korelasyon gösterirken subkutan yağ dokusu ile korelasyon göstermez. Plazma visfatin seviyesi vücut yağ oranı, beden-kitle indeksi ile orantılıdır ve obezitede artar. Kilo verme sonucunda visfatinin plazma seviyesinin düştüğü gösterilmiştir. T2DM'de visfatin seviyesi yüksek, gestasyonel DM'de ise visfatin seviyesi düşük tespit edilmiştir (156). Plazma visfatin seviyesi yemekten sonra insülinin aksine değişmez. İnfüzyonu kan şekerini akut olarak düşürür, fakat serum insülin seviyesini değiştirmez. Bu durum visfatinin direkt hipoglisemik etkisi olduğunu, insülin sekresyonunu etkilemediğini gösterir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda insülin direncini azaltarak kan şekerini düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Visfatinin hipoglisemik etkisi 3T3-L1 adipositlerde glukoz alımı ve hepatositlerde glukoz salınmasının azalması ile de gösterilmiştir. Visfatinin, insülin reseptörü ile -insülin bağlanma bölgesi dışında bir bölge üzerinden- etkileştiği ve insülin reseptörünün sinyal yolağını harekete geçirerek etkisini gösterdiği ileri sürülmüştür (142). Ancak, hücre içinde etkili olan ve normal koşullarda salgılanmayan bir proteinin bu tip bir etki göstermesi tartışmalara sebep olmuştur.

Visfatin hücre içi bir enzimdir ve pek çok metabolik yoldaki koenzimlerin yapısına giren NAD sentezinde önemli bir basamağı katalizlemektedir (6). Visfatinin viseral yağ dokusunda sentezlendiğinin ve glukoz metabolizmasına etki ederek

insülin direncini azaltıcı (dolayısıyla kan şekerini düşürücü) etki gösterdiğinin ortaya çıkması, bir yandan yeni bir adipokin olarak tanımlanmasına, öte yandan da etki mekanizmasına yönelik çalışmaların yapılmasına yol açmıştır. Ancak visfatinin adipokin olduğu savından yola çıkılarak yapılan çalışmalar, hücre içi bir enzim olan visfatinin hücre içi hedefleri olması gerektiği gerçeğini ihmal etmişlerdir. Bizim bu çalışmadaki hipotezimiz visfatinin hücre içi hedefleri olduğu, insülin direncine etkili olduğuna göre de bu hedeflerden birinin endoplazmik retikulum stresi olabileceği yönündedir.

2.3.2. NAD ve NAD-bağımlı sirtuin enzimleri

NAD, redoks reaksiyonunda elektron alarak indirgenmiş türevi olan NADH'ye dönüşür. NADH'de depolanan indirgeyici potansiyel direkt enerji olarak kullanılabilir ya da ATP'ye dönüştürülür. Hücreler, NAD ve türevlerini enerji transferiyle yürüten işlemler için (karbonhidrat ve yağ asidi metabolizması, solunum, fotosentez) kullanır. Neredeyse her biyokimyasal yolak enerji transferi veya redoks reaksiyonları gerektirdiğinden, temel hücrel metabolizma için NAD yaşamsal önem taşımaktadır. Redoks tepkimelerindeki önemli rolünün yanısıra, NAD'nin proteinlerin post-translasyonel modifikasyonu, Ca^{+2} sinyal iletim yolağı ve sirtuin (silent information regulator) regülasyonu ile ilgili görevlerinin de olduğu ortaya çıkmıştır. NAD, translasyon sonrası proteinlerin ADP-ribozilasyon denilen bir işlemle modifiye edilmesinde kullanılabilir. Bu tür post-translasyonel modifikasyonun iki formu vardır: Mono-ADP ribozilasyonda, NAD ADP-riboziltransferazlarca bir ADP-riboz birimini hedef proteine bağlamak üzere görevlendirilir, yan ürün olarak nikotinamid ortaya çıkar (157). Mono-ADP ribozilasyonun birçok prokaryotta, ökaryotta ve virüste olduğu belirtilmiştir, fakat asıl bu tepkimenin işlevleri bakteriyel enfeksiyonlarda daha fazla çalışılmıştır. Memelilerde ise (patolojik olmayan etki) endojen enzimlerin aktivitesi üzerine etki eder. Poli-ADP ribozilasyonda, poli-ADP ribozil polimerazlar (PARP) olarak bilinen enzimler NAD'yi nikotinamid ve ADP-riboz olarak ikiye ayırır. ADP-riboz polimerize olur ve kovalent olarak ya kendine (otomodifikasyon) ya da hedef proteine bağlanır (heteromodifikasyon). Poli-ADP ribozilasyon bitkiler ve bazı tek hücreli ökaryotlarda bulunur, fakat prokaryotlarda ve mayalarda yoktur (6).

Post-translasyonel protein modifikasyonuna ek olarak NAD, Ca^{+2} sinyal

yolağında rol alan küçük moleküllerin üretilmesinde kullanılır. Bu moleküllerden siklik ADP-riboz (cADPR) ve nikotinik asit adenin dinükleotid fosfat (NAADP) en bilinenleridir. cADPR, hücre içi kalsiyum depolarını endoplazmik retikulumdaki tip 2 ve tip 3 ryanodin reseptörleri üzerinden mobilize eder. Bu mekanizma, iskelet ve kalp kasında, hematopoietik hücrelerde, asinar hücrelerde ve oositlerde yer alır. Memelilerde, transmembran CD38 ve CD157 proteinleri cADPR sentezleyen enzimler olarak adlandırılır, fakat katalitik bölgeleri hücre dışında bulunduğundan tam işlevleri henüz aydınlatılamamıştır.

Nikotinamid, NAD'nin öncülüdür. Nampt tarafından NMN'ye dönüştürülür. Nikotinamid, hem ADP-ribozil transferazların, hem de NAD-bağımlı deasetilazların güçlü bir inhibitörüdür. Nikotinamidin NO ve bazı proinflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Nikotinamid, niasin eksikliğinde görülen ve kontrolsüz inflamatuvar yanıtla giden pellegra hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Tüm bu gözlemler, NAD metabolizması ve inflamatuvar yanıtın kontrolü arasında işlevsel bir bağlantı olabileceği yönündedir (158).

NAD'nin diğer bir rolü sirtuin protein ailesinin düzenlenmesidir. Sirtuinler ilk olarak mayalarda bulunmuştur (159). Fajlardan insana birçok canlıda bulunan sirtuinler, NAD-bağımlı protein deasetilazlardır. İlk kez mayada bulunan Sir2 (Silent information regulator 2) telomerlerde, suskun “mating-type” bölgelerde ve ribozomal DNA tekrarlarında transkripsiyonel susturmanın düzenlenmesinde görevli olarak tanımlanmıştır (160). Sir2 proteininin fazla ekspresyonunun histonların global deasetilasyonuna yol açtığı bildirilmiştir.

Sirtuinler, asetillizin içeren modifiye proteinleri deasetilleyen ve bu yolla hedef proteinlerinin biyolojik işlevlerini düzenleyen enzimlerdir (67). Sirtuinlerin çeşitli organizmalarda doku ve organizma sağkalımını artırdığı gösterilmiştir (161). Elde edilen kanıtlar NAD metabolizması ve sirtuinlerin stres ve toksisite koşullarında hücre sağkalımı ve onarımına etkili mekanizmalara katkı sağladığını göstermektedir (162,163). Daha önce kalori kısıtlaması ile ilgili *Saccharomyces cerevisiae*'da yapılan çalışmalarda bulunan Sir2 proteininin memelilerdeki homologları olan SIRT1-7 protein ailesinden SIRT1'in en etkili sirtuin olduğu bulunmuştur. SIRT1, mayadaki Sir2 proteininin homoloğu olan klas III histon deasetilazdır (164). SIRT1'in işlevini

düzenlediği çok sayıdaki protein arasında PPAR γ ve PPAR γ koaktivatörü olan PGC-1 de bulunmaktadır (163,165).

SIRT1, lizine bağlı asetil grubunu uzaklaştırırken NAD'yi hidrolize eder, işlem sonunda asetil-ADPR ve nikotinamid oluşur (166). SIRT1 enzim aktivitesi, enerji alımının kısıtlandığı durumlarda, hücre içi stres koşullarında ve Nampt enzimi aktivitesi (hücre içi NAD artışı) ile artarak hücrede sağ kalımı artırır, glukoz homeostazisini düzenler ve lipolizi tetikleyerek yağ kaybına yol açar (167). Hücrede enerji/besin kısıtlılığı durumunda NAD/NADH oranı yükseldiğinden SIRT1 aktivitesi artar. SIRT1, fizyolojik etkilerini histon proteinleri H1, H3 ve H4, PPAR γ , PGC-1, p53, NF κ B ve FOXO1 proteinlerini deasetile ederek gösterir (168). SIRT1 tarafından deasetile edilerek aktive olan PGC-1, hücrede mitokondri işlevlerinin ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Deasetilasyon ile p53'ün inaktive edilmesi, besin kısıtlılığı ya da hücre içi stres durumunda hücreleri apoptozisten korur (169).

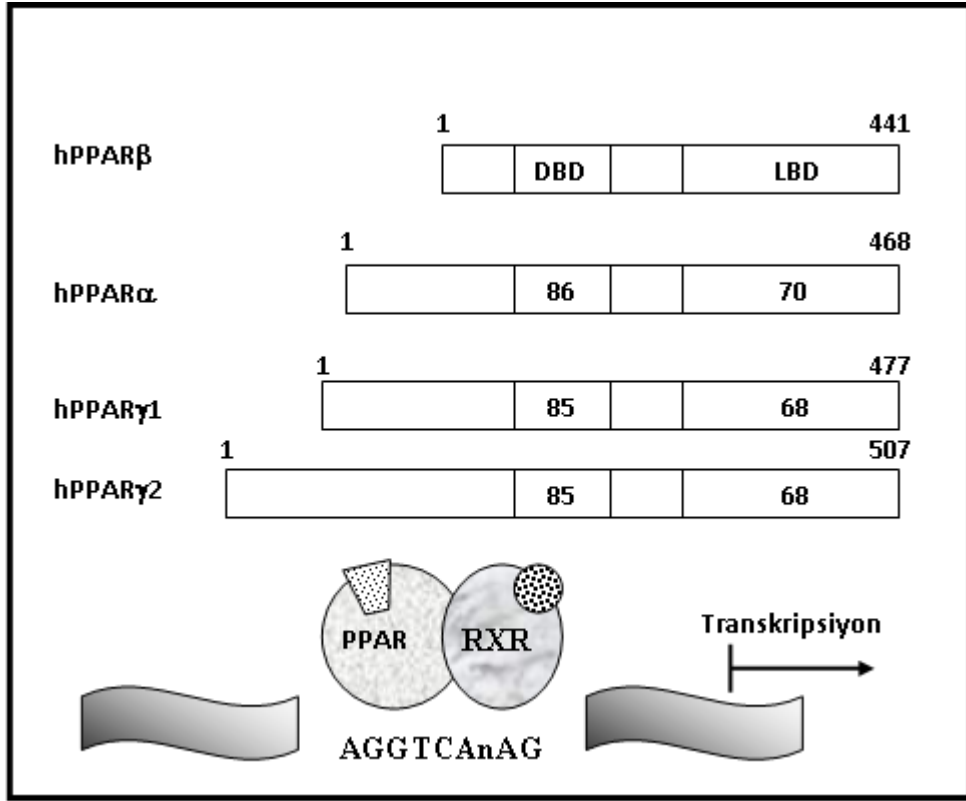
2.4. Peroksizom Proliferatörleri ile Aktive Olan Reseptörler (PPAR)

Peroksizom proliferatörleri, karaciğerde lipit metabolizmasında önemli rolleri olan bir organel olan peroksizomları artıran küçük moleküller olarak tanımlanmıştır. Bugüne kadar incelticiler, ayrık otu imha eden kimyasallar, bazı doymamış yağ asitleri, eikozanoidler, fibratlar ve tiazolidindion (TZD) grubu ilaçların peroksizom proliferatörleri olduğu gösterilmiştir. Peroksizom proliferatörleri, peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptörlere (PPAR) bağlanır; başka bir deyişle PPAR'ların ligandıdır. PPAR'lar, nükleer reseptör ailesinin bir alt grubudur, ligandlarının bağlanması yoluyla aktive olurlar ve transkripsiyon faktörü olarak birçok metabolik etkiye neden olan genlerin ekspresyonunu düzenler. PPAR ailesinin PPAR α , PPAR β ve PPAR γ olmak üzere üç alt tipi vardır (Şekil 2.3). Bu grup reseptörler lipit metabolizması üzerine olan etkilerinin yanı sıra, inflamasyon, adipogenez ve farklılaşma gibi çeşitli hücrel olaylarda rol alırlar (170). Özellikle PPAR γ 'nın periferik dokularda insülin duyarlılığını artırıcı ve trombozisi azaltıcı etkileri, obeziteyle bağlantılı T2DM ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir hedef olduğunu düşündürmektedir. Lipit türevi olan bazı fizyolojik ligandlara ek olarak rosiglitazon gibi tiazolidindion grubu klofibrin asitten türetilmiş antidiyabetik ilaçlar PPAR γ 'nın ligandıdır (170).

PPAR α , geni 22. kromozomda yer alan, 468 amino asitten oluşan bir proteindir. PPAR α , en yüksek düzeyde kahverengi yağ dokusu ve karaciğerde eksprese olur; kalp, böbrek ve ince bağırsaklarda da ekspresyonu vardır. PPAR α , lipit oksidasyonu ve glukoneogenezde yer alan birçok faktörün transkripsiyonunu artırır. Organizmada yağ asidi metabolizmasını sistemik düzeyde düzenleyen nükleer reseptör ailesi PPAR'ların karaciğerde lipit metabolizmasıyla ilişkili bir üyesi olarak bilinen PPAR α , açlık durumunda metabolizmanın adaptif yanıtlarını yağ asidi oksidasyonunda yer alan önemli genlerin transkripsiyonunu aktive ederek düzenler. PPAR α 'ya yanıt veren 48 gen tanımlanmıştır ve bunların büyük çoğunluğunun karaciğerde keton cisimlerinin sentezi, yağ asitlerinin bağlanması, transportu, aktivasyonu ve oksidasyonu ile ilgili olduğu belirlenmiştir (171).

Açlık durumunda ve uyku esnasında, yağ asitleri adipositlerden karaciğere yönlendirilir. Karaciğerde artan yağ asidi düzeyleri PPAR α 'yı aktifleştirerek yağ asidi oksidasyonunun artmasına neden olur. Artan PPAR α aktivitesi, karaciğerde TAG sentezini azaltarak kanda TAG düzeyini azaltır. PPAR α ligandları, hipertrigliserolemi tedavisinde kullanılır. Fenofibrat ve gemfibrozil, bilinen ve klinikte kullanılan PPAR α ligandlarından bazılarıdır. PPAR α , anti-inflamatuvar etkilere de sahiptir (172).

PPAR γ , en çok adipositlerde eksprese edilir. PPAR γ 'nın etkinleştirilmesi, adiposit farklılaşması yönünden önemlidir. PPAR γ ekspresyonu henüz farklılaşmamış bir mezenkimal hücrede artarsa, hücre adipozite dönüşür; bu olaya adipogenez denir. Adipogenezin artması, yağ dokusunun serbest yağ asitlerinin metabolizmaya zararlı etkilerinden koruyan bir özelliği olan yağ depolama kapasitesini artırır. Yağ dokusunda artan yağ depolama kapasitesi, ektopik –yağ dokusu dışında karaciğer, iskelet kası, kalp kası, pankreasta– lipit birikimini azaltır ve kandaki TAG düzeyini düşürür. Bütün bu metabolik gelişmeler, insülin direncinin azalmasına neden olur. PPAR γ , yağ depolamak için gerekli gliserol kinaz, lipoprotein lipaz ve yağ asidi taşıyıcıları genlerinin transkripsiyonunu artırır (173).



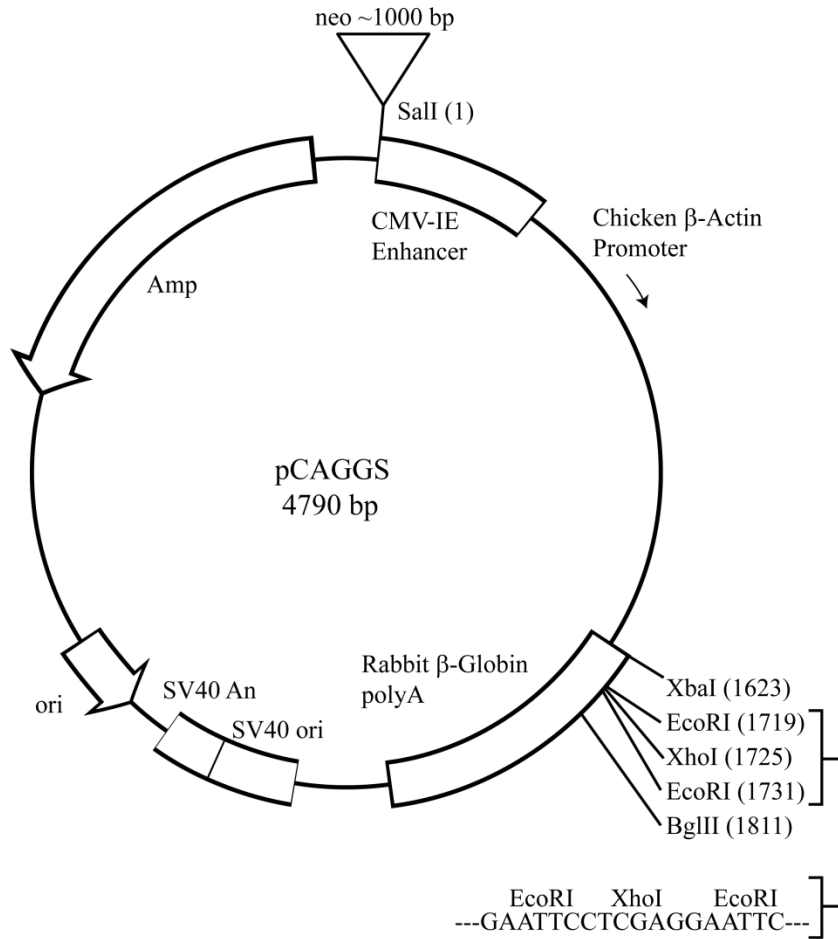
Şekil 2.3. PPAR izoformları ve etki mekanizması. PPARβ'daki DNA bağlama (DBD) ve ligand bağlama (LBD) bölgeleri ile diğer reseptörlerin aynı işleve sahip bölgelerinin homoloji oranı kutular içinde % olarak verilmiştir. Altta PPAR-RXR heterodimerinin DNA dizisine bağlanması gösterilmiştir.

PPAR γ , yağ dokusunda, monosit makrofajlarda ve kolonda yüksek miktarlarda oluşurken az da olsa diğer birçok dokuda eksprese edilen nükleer hormon reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Preadipositlerin matür adipositlere dönüşümünde kritik rol oynar. PPAR γ 'ya yüksek afiniteyle bağlanan, insülin duyarlılığını artırıcı özellikteki tiazolidindionlar nedeniyle bu konuda yoğun ilgi görmektedir. PPAR γ , insanlarda yağ dokusu kitesinin dağılımı ve işlevlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (174).

3. YÖNTEMLER

3.1 Visfatin Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması

Şekil 3.1’de Dr. Shin-ichiro Imai’den (Department of Molecular Biology and Pharmacology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, ABD) alınan visfatin ekspresyon plazmidinin haritası görülmektedir. Başlangıç vektörü 4790 baz çiftlik pCAGGS plazmididir. Bu vektöre yaklaşık 1000 baz çiftlik neomisine direnç geni (neo, plazmidin kalıcı transfeksiyon amacıyla kullanılmasına olanak sağlar) ve EcoRI kesim bölgesinden 1584 baz çiftlik visfatin geni klonlanmıştır. Visfatin geninin klonlandığı bölgenin nükleotid dizisi, şeklin sağ alt kısmında verilmiştir.



Şekil 3.1. Visfatin ekspresyon vektörünün haritası.

3.1.1. Plazmidin transformasyon için hazırlanması

Plazmid filtre kağıdına emdirilmiş olarak gönderilmiştir. Öncelikle bu plazmidin filtre kağıdından elde edilmesi için kağıt parçası steril olarak kesilip

polipropilen tüpe konulmuştur. Üzerine 30 µL TE tamponu (10 mM Tris pH:7.4, 1 mM EDTA pH:8.0) eklenip pipet ucuyla kağıt parçasının TE ile tamamen ıslanması sağlanmıştır. Daha sonra vortekslenip 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bunun bir kısmı kompetan bakterilerin transformasyonu için kullanılıp kalanı -20°C'de bekletilmiştir.

3.1.2. Kompetan bakterilerin hazırlanması

Kompetan bakterilerin hazırlanması için üç ayrı protokol denenmiştir. Burada verilen protokol en yüksek verim elde edilmiş olan protokoldür. Kompetan bakterilerin hazırlanması için laboratuvarımızda bulunan E.coli DH5-α suşu kullanılmıştır.

Öncelikle bakterilerin agarlı LB plaklarda üç nesil kültürü yapılmış ve tek koloni halinde elde edilmişlerdir. Agarlı LB plak hazırlanmak için 10 g Tripton, 5 g maya ekstresi ve 10 g NaCl 800 mL suda çözülür, çözelti pH'sı NaOH ile pH 7'ye ayarlanır, hacim 1 L'ye tamamlanır. Daha sonra 15 g agar eklenir ve otoklavlanır. Oda sıcaklığına gelince 9-10 mm çapında Petri kaplarına dökülür ve donmaya bırakılır. Agar plaklarının yanları parafilmle kapatılarak 4°C'de saklanır.

Agarlı plaktaki tek kolonilerden bir adet alınıp 5 mL (15 mL'lik Falcon tüpte) LB besiyeri içinde 16 saat 37°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün 100 mL (250 mL'lik erlenmayerde) LB besiyerine aktarılarak $A_{550} = 0,5$ oluncaya kadar (yaklaşık 2 saat) 37°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kültür ortamı 50 mL'lik steril Falcon tüplere alınıp 15 dakika buz içinde tutulmuştur. Daha sonra klinik santrifüjde 4°C'de, 2000-2500 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Pellet 25 mL soğuk $MgCl_2$ (100 mM) ile süspansiyon edilip (bu işlem vorteksle yapılmamış, ucu kesilmiş mavi pipet ucu ile çekilip bırakılmıştır) 4°C'de, 1800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet 25 mL soğuk $CaCl_2$ (100 mM) ile süspansiyon edilip (bu işlem de vorteksle yapılmamış, ucu kesilmiş mavi pipet ucu ile çekilip bırakılmıştır) 20 dakika buz içinde bekletildikten sonra 4°C'de, 1800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kompetan bakteri pelleti, %14 gliserol içeren 4 mL soğuk $CaCl_2$ (100 mM) ile süspansiyon edildikten sonra buz içindeki polipropilen tüplere 100-200 µL'lik örnekler halinde ayrılmış ve -80 C'de saklanmıştır.

3.1.3. Kompetan bakterilerin transformasyonu

Önceden hazırlanmış plazmid DNA'sından 1, 5 ve 10 μL alınıp her biri 100 μL kompetan hücre ile karıştırılmıştır. Tüpler 30 dakika buz içinde bekletildikten sonra 42°C 'de, 45 saniye sıcaklık şoku yapılmış ve ardından 1-2 dakika buz içinde bekletilmiştir. Daha sonra tüpe 800 μL ampisilinsiz LB besiyeri eklenip 60 dakika 37°C 'de çalkalayarak inkübe edilmiştir. 100 μL transforme bakteri LB-ampisilin (son konsantrasyonu 0,1 mg/ mL olacak şekilde ampisilin eklenmiş) içeren agar plakların ortasına pipetlenip bütün plağa yayılarak 37°C 'de 16 saat inkübe edilmiştir.

3.1.4. Miniprep ile plazmid DNA'sının saflaştırılması

Plazmid ampisiline direnç geni içerdiğinden, transforme edilen bakterilerden plazmidi içine almış olanlar ampisilinli agarda büyüebilmektedir. Bu şekilde 5 ve 10 μL ile transforme edilen bakterilerden az sayıda koloni elde edilmiştir. Her bir koloni alınıp 15 mL ampisilinli LB içine eklenip 16 saat 37°C 'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün her birinden 3 mL kültür alınarak miniprep yapılmıştır. Artan kültürlerden daha sonra kullanmak üzere gliserol stok hazırlanmıştır.

Miniprep için Qiaprep Spin miniprep kiti (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerilerine göre uygulanan prosedür alkali lizis yöntemini esas almakta, son basamakta ise kolon kromatografisi yöntemiyle plazmid DNA'sı saflaştırılmaktadır (175,176). Bu şekilde elde edilen DNA eluatu izopropanol eklenip çöktürülmüştür. Pellete %70 etanol eklenip yıkandıktan ve kurutulduktan sonra 30-40 μL TE eklenerek DNA çözülmüştür.

3.1.5. Restriksiyon enzimi ile plazmidin kesilmesi

Elde edilen plazmid DNA'sının istediğimiz plazmid olduğunu göstermek amacı ile restriksiyon enzimi ile kesilerek beklenen DNA fragmanlarının oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Kullanılan plazmid vektörü (pCXN2) yaklaşık 6200 kb büyüklüğünde, buna eklenen Nampt geni ise 1584 kb büyüklüğündedir. Nampt geni plazmidin EcoRI restriksiyon enzimi kesim bölgesine yerleştirildiği için bu enzimle kesilmesine karar verilmiştir. DNA'lardan en yoğun görünen ikisi seçilerek 260 ve 280 nanometrede absorbanları ölçülmüştür. A_{260}/A_{280} oranı DNA'nın saflığının ölçüsüdür ve 1,5-2 arasında olması beklenir. 3 ve 4 no'lu örneklerimizde bu oran sırasıyla 1,89 ve 1,94 bulunmuştur. 4 no'lu örnekte DNA miktarı da daha yüksek (0,732 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) olduğu için bu örnek seçilmiştir. Yaklaşık 3 μg DNA (4 μL), 2

μ L 10x restriksiyon enzim tamponu, 2 μ L 10x BSA, 11 μ L su ve 1 μ L enzim (EcoRI) eklenerek 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tepkime ortamından 5 ve 10 μ l'lik örnek alınarak %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. Hücrelerin çözülmesi ve ekimi

Bu aşamada öncelikle bir beher içine distile su konup 37-40°C'ye kadar ısınması sağlanmıştır. Besiyeri de kültür kabına konarak inkübatörde iki saat önceden ısıtılmıştır. İçinde dondurulmuş HepG2 hücreleri bulunan tüp azot tankından çıkarılıp hemen buz üzerine konulmuştur. Dondurulmuş hücre tüpü buz üzerinde, ısınan su banyosu yanına taşınmış ve tüp su banyosunun içine konulmuştur. Tüp 1-2 dakika şok ile ısıtıldıktan sonra su banyosundan alınıp temiz havlu kağıt ile kurulanmış, çevresi %70 etanol ile temizlenmiştir. Daha sonraki işlemlerin tamamı dikey laminar hava akımlı kabinde steril koşullarda yapılmıştır. Bir tüp içine %20 oranında FBS (fötal sığır serumu) içeren 7-9 mL besiyeri konulduktan sonra, tüpün içindeki hücre karışımı çekilip besiyerine eklenmiştir. Hücreler birkaç kez pipetlenerek resüspanse edildikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatant pipetle çekilerek atılmıştır. Tüpün dibinde kalan pelet üzerine besiyeri eklenip, pipetlenerek yeniden süspanse edilmiştir. Tüpte oluşan hücre-besiyeri karışımı pipetle çekilerek kültür kabına ekilmiştir. Mikroskopta hücreler kontrol edildikten sonra kültür kabı kapağı gevşetilerek inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler kültür kabına yapıştıktan sonra (yaklaşık 24 saat) besiyeri değiştirilmiştir. Daha sonra üç günde bir besiyeri tazelenerek pasajlamaya uygun sayıya erişmeleri beklenmiştir.

3.2.2. Tripsinizasyon ve pasajlama

Öncelikle tripsinizasyonda kullanılacak malzemeler hazır hale getirilmiştir. PBS oda sıcaklığına gelene kadar beklenmiştir. Tam besiyeri (%10 FBS ve %1 antibiyotik ilaveli DMEM) 37°C su banyosunda ısıtılmıştır. Steril tripsin/EDTA – 20°C'den çıkarılıp dışarıda bekletilmiştir. İşlemlerin tamamı dikey laminar hava akımlı kabinde steril şartlar altında yapılmıştır. Kültür kabı içindeki besiyeri pipetle çekilerek steril bir kaba (otoklavlanmış erlenmayer ya da falkon tüp) döküldükten sonra, kabın içine 10 mL PBS konulup, çalkalanmış ve dökülmüştür. Bu işlem ile hücreler yıkanıp, kabın içinde kalan besiyeri artığı uzaklaştırılmıştır. Kültür kabının içine pastör pipeti ile 1 mL tripsin/EDTA konulup, kültür kabının kapağı kapatılıp,

inkübatöre kaldırılmıştır. Yaklaşık 3-4 dakika beklemeden sonra kültür kabı dışarı alınmıştır. Bu sürede hücreler flaskın tabanından sökülüştür. *Inverted* mikroskopta bakılıp, yerinden sökülen hücrelerin yuvarlak hücre kümeleri halinde hareket ettikleri görülmüştür. Hücrelerin tripsin ile muamele edildiği süreyi olabildiğince kısa tutmak ve oyalanmamak gerektiğinden (5 dakikadan fazla beklenirse tripsin hücrelere zarar verir) kültür kabının yan duvarlarına hafifçe vurularak sökülme işlemi hızlandırılmıştır. Kültür kabının içindeki hücreler 50 mL falkon tüp içine alınıp, 10 mL daha besiyeri eklenip santrifüjlenmiştir. Besiyeri ile hem tripsin dilue edilmiş olur, hem de besiyerinde bulunan FBS tripsin aktivitesini baskılar. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak tüpün dibinde kalan hücre peleti üzerine yeni besiyeri eklenmiş (5 mL) ve nazik pipetleme yapılarak hücreler süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra yeni kültür kaplarına 1:3 oranında (üç kültür kabına) ekilmiştir. Mikroskop altında hücrelerin durumu kontrol edildikten sonra inkübatöre kaldırılmıştır. Daha sonra üç günde bir besiyeri tazelenerek bir sonraki pasajlama için uygun sayıya erişmeleri beklenmiştir.

3.2.3. Hücrelerin dondurulması

Hücreler bol miktarda üretildikten sonra, daha sonraki aşamalarda gerek duyulduğunda tekrar üretilebilmeleri için yedekleme amacıyla bir kısmı dondurulmuştur. İnkübatördeki hücreler (T25 flask, yaklaşık 3 milyon hücre) dışarı alınmış ve canlılıkları mikroskopta değerlendirilmiştir. Hücre kabının hücre olmayan köşesine biriktirilen besiyeri pipetle çekilip başka bir pipet ile 1 mL tripsin/EDTA kültür kabı üzerine eklenmiştir. 37°C'de inkübatörde 5 dakika bekletildikten sonra hücrelerin flasktan ayrılıp ayrılmadığı mikroskopta değerlendirilmiş ve pipet ile hücreler bir tüpe alınarak üzerine bir miktar besiyeri eklenip 1200 xg'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Dondurma tüpü üzerine hücre tipi, işlemin tarihi, kaç kez pasajlandığı (T1/P1) ve kullanılan besiyeri yazıldıktan sonra içine 700 µL besiyeri, 200 µL FBS, 100 µL dimetilsulfoksit (DMSO) eklenip buz üzerinde bekletilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre peletinin üstündeki süpernatant pipetle çekilerek atılmış ve dondurma tüpünde hazırlanan çözeltiyle hücre peleti 1-2 kez pipetlenmiştir. Hücrelere zarar vermeden hepsi çekilip tüpe alınmıştır. Hücreleri içeren dondurma tüpü +4°C'de 3-4 saat, -20°C'de bir gece (8-10 saat) ve bir süre -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

3.3. MTT Yöntemiyle Sitotoksosite Çalışmaları

Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla MTT testi yapılmıştır. Bu yöntemde, mitokondrileri aktif olan canlı hücrelerde ortama konan tetrazolyum tuzu süperoksit radikali ile indirgenerek renkli formazan bileşiğine çevirilmekte, oluşan formazan miktarı spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir. Ortama eklenen ilacın sitotoksik olması durumunda hücreler canlılıklarını yitirecekleri için formazan oluşmayacaktır. Dolayısıyla bu yöntemde yüksek absorbans canlılığı, düşük absorbans ise sitotoksisiteyi işaret etmektedir (177). Deney protokolü şu şekildedir:

Ön hazırlık: Steril PBS oda sıcaklığına gelene kadar beklenir. Tam besiyeri (%10 FBS ve %1 antibiyotik ilaveli DMEM) 37°C su banyosunda ısıtılır. Steril Tripsin/EDTA -20°C'den çıkarılır, dışarıda bekletilir. 5 mg/mL konsantrasyonda MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), PBS ile hazırlanır, %23 SDS (sodyum dodesil sülfat) + %45 dimetil formamid (DMF) çözeltisi hazırlanır. İşlemlerin tamamı laminar hava akımlı kabinde steril şartlar altında yapılır.

İnkübatördeki hücreler çıkarılır ve canlılık yönünden değerlendirilir. Olağan tripsinizasyon işleminden sonra hücreler süspansiyon haline getirilir. Süspansiyondan 250 veya 500 µL örnek alınıp hacmi iki katına çıkarılarak hücre sayımı yapılır. Elde edilen hücre sayısı not edilerek ekilmek istenen hücre sayısına göre alınacak hacim hesaplanır. Ekim yapılacak kuyucuk sayısı (96'lık plak kullanılır) fireler de hesaba katılacak yaklaşık %133 fazla hesaplanmaktadır. Kuyucuklara bir sırası kontrol olmak üzere denenecek doz sayısına ve her dozun deneneceği kuyucuk sayısına göre (ikili veya üçlü) hücreler 50'şer µL hacimlerde ekilir. Bir gece bekleyip hücrelerin yapıştığından emin olduktan sonra istenen ilaç uygulamasına geçilir. Belirlenen dozlarda hazırlanan ilaç, her konsantrasyondan belli sayıda kuyucuğa 50'şer µL eklenir. Böylece, kültür ortamındaki son konsantrasyonlar tüpteki konsantrasyonların yarısı olur. Kontrol kuyucuklarına da 50 µL ilaçsız besiyeri eklenir. Hücreler ilaçla 48 saatliğine inkübe edilir. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 25'er µL 5 mg/mL MTT eklenir ve 4 saatliğine inkübe edilir. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 80'er µL %23 SDS + %45 DMF çözeltisi eklenir. Boş bir kuyucuğa da 205 µL çözelti eklenir ve kör olarak belirlenir. Formazan oluşumu mikroskopta kontrol edilir ve formazanın çözünüp homojenize olması için bir gece

de bu çözeltiyle inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 570 nm'de plak okuyuculu spektrofotometrede okutulur. Kontrol kuyucuğundaki absorbens değerinin 0,5-0,6 civarı veya daha büyük olması yeterli hücre ekildiği anlamına gelir. Ayrıca kuyucuklar arasındaki nonspesifik absorbens farkını elimine etmek amacıyla 630 nm'de de okuma yapılarak A630 absorbens değerleri A570 değerlerinden çıkarılır ve aradaki fark grafikleme amacıyla kullanılır.

Çalışmamızda HepG2 hücreleri kuyucuklara 5000-20000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmişlerdir. 10000 hücre ile daha iyi sonuç alındığı görülmüştür. 10000'in üzerinde hücre ekildiğinde hücre sayısı çok fazla gelmekte ve absorbensler güvenilemeyecek derecede yükselmektedir. Tüm çalışmalar en az iki kez tekrarlanmış ve her seferinde her koşul en az ikili olarak çalışılmıştır.

3.3.1 Tunikamisin ile sitotoksite çalışması

Tunikamisin, 1 mg'lık şişede 2,5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanır (üzerine 400 µL DMSO ekleyerek). Daha sonra bu stok çözelti, DMEM eklenerek sulandırılır. Çalışmada Tunikamisin'in 1-2,5-5-10-25 ve 250 µg/mL dozları kullanılmıştır. Hücreler, MTT yöntemi için yukarıda 3.3 başlığında anlatıldığı biçimde hazırlanır. Belirlenen dozlarda hazırlanan ilaç, her konsantrasyondan belli sayıda kuyucuğa 50'şer µL eklenir. Böylece, kültür ortamındaki son konsantrasyonlar tüpteki konsantrasyonların yarısı olur. Kontrol kuyucuklarına da 50 µL ilaçsız besiyeri eklenir. Hücreler ilaçla 24 saatliğine inkübe edilir. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 25'er µL 5 mg/mL MTT eklenir ve 4 saatliğine inkübe edilir. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 80'er µL %23 SDS + %45 DMF çözeltisi eklenir. Boş bir kuyucuğa da 205 µL çözelti eklenir ve kör olarak belirlenir. Formazan oluşumu mikroskopta kontrol edilir ve formazanın çözünüp homojenize olması için bir gece de bu çözeltiyle inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 570 nm'de plak okuyuculu spektrofotometrede okutulur. Kontrol kuyucuğundaki absorbens değerinin 0,5-0,6 civarı veya daha büyük olması yeterli hücre ekildiği anlamına gelir. Ayrıca kuyucuklar arasındaki nonspesifik absorbens farkını elimine etmek amacıyla 630 nm'de de okuma yapılarak A630 absorbens değerleri A570 değerlerinden çıkarılır ve aradaki fark grafikleme amacıyla kullanılır.

Çalışmamızda HepG2 hücreleri kuyucuklara 5000-20000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmişlerdir. 5000 ve 10000 hücre ile daha iyi sonuç alındığı görülmüştür.

10000'in üzerinde hücre ekildiğinde hücre sayısı çok fazla gelmekte ve absorbanslar güvenilemeyecek derecede yükselmektedir. Tüm çalışmalar en az iki kez tekrarlanmış ve her seferinde her koşul en az ikili olarak çalışılmıştır.

3.3.2. Palmitik asit ve linoleik asit ile sitotoksosite çalışması

Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde PPAR γ agonistlerinin ER stresi koşullarında etkisini göstermek amacıyla hücrelere endojen bir PPAR γ ligandı olan linoleik asit, ER stresini uyarmak amacıyla da doymuş yağ asidi olan palmitik asit uygulanmıştır. Palmitik asit, in vivo koşullarda doymuş yağ asitleriyle oluşan ER stresini deneysel olarak göstermekte uygun bir yağ asidi olması nedeniyle çalışmamızda tunikamisin ile birlikte ER stresi oluşturmak üzere kullanılmıştır. Linoleik asit ise koruyucu etkileri olan bir doymamış yağ asidi olduğundan, visfatin ekspresyon artışı ile koruyucu etkilerinin karşılaştırılması amacıyla seçilmiştir. Palmitik asitin ER stresi oluştururken, linoleik asitin ise koruyucu etkilerini gösterirken hücre canlılığını anlamlı düzeyde etkilemeyen dozlarını seçmek amacıyla doz-bağımlı bir sitotoksosite çalışması yapılmıştır. Literatürde yağ asitleri ile yapılan çalışmalarda seçilen doz aralığının 50-1000 μ M olduğu saptanmış ve sitotoksosite çalışmaları için daha geniş bir aralık olan 50-2500 μ M, inkübasyon süresi olarak 24 saat seçilmiştir. Linoleik asit ve palmitik asit, DMSO ile dilue edilmiş ve stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hücreler belirlenen dozlarda 50 μ L olarak kuyucuklara eklenen palmitik asit ve linoleik asitle 24 saatliğine inkübe edilir. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 25'er μ L 5 mg/mL MTT eklenir ve 4 saatliğine inkübe edilir. İnkübasyon bitiminde her kuyucuğa 80'er μ L %23 SDS + %45 DMF çözeltisi eklenir. Boş bir kuyucuğa da 205 μ L çözelti eklenir ve kör olarak belirlenir. Formazan oluşumu mikroskopta kontrol edilir ve formazanın çözünüp homojenize olması için bir gece de bu çözeltiyle inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 570 nm'de plak okuyuculu spektrofotometrede okutulur. Kontrol kuyucuğundaki absorbans değerinin 0,5-0,6 civarı veya daha büyük olması yeterli hücre ekildiği anlamına gelir. Ayrıca kuyucuklar arasındaki nonspesifik absorbans farkını elimine etmek amacıyla 630 nm'de de okuma yapılarak A630 absorbans değerleri A570 değerlerinden çıkarılır ve aradaki fark grafikleme amacıyla kullanılır.

3.4. Hücrelerde Protein Ekspresyonlarının Gösterilmesi

Protein ekspresyonları Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir. Bu yöntemin esası, aranan proteinin elektroforezle ayrıldıktan sonra bir membrana aktarılıp spesifik antikolarla tanınarak gösterilmesidir (178). Yöntemde öncelikle hücresel proteinlerin ekstraksiyonları yapılır, daha sonra proteinler poliakrilamid jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrılır, jelde bulunan ayrılmış proteinler proteinleri tutan bir membrana (poliviniliden florür-PVDF) aktarılır ve daha sonra membran proteine özgü antikora inkübe edilir. Bu antikoru tanıyan ve enzimle konjuge edilmiş ikinci bir antikora inkübasyondan sonra, ortama enzimin substratının eklenmesiyle istenilen protein bandı görünür hale getirilir. Kullandığımız sistemde kemilüminesans ile görüntü alınmaktadır.

Bu deney için hücreler 10 cm'lik Petri kaplarına ekilmiştir. Hücreler çoğalıp kabı doldurduktan sonra inkübatörden alınarak buzun üstüne konmuştur. İki kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra PBS iyice aspire edilmiştir. Yıkamış hücrelerin üzerine lizis tamponu (Tablo 3.1) eklendikten sonra hücreler kazınarak toplanıp önceden soğutulmuş polipropilen tüpe konmuştur.

Tablo 3.1. Western blot için lizis tamponu hazırlama tablosu

	Stok konsantrasyonu	Final konsantrasyonu	
Tris-HCl pH 7,4	2M	40 mM	2 mL
EDTA	0,5M	1 mM	200 µL
Gliserol	%99	%10	10 mL
Triton X100	%10	%1	10 mL
Na-deoksikolat	%5	%0,5	10 mL
SDS	%10	%0,08	800 µL
			qsp 100 mL

Lizis yapılacağı zaman, 450 µl tampona 50 µl proteaz inhibitör kokteyli eklenir. 15 saniye vortekslenip 13000 xg'de, 4°C'de, 10 dak santrifüjlenmiştir. Süpernatant soğutulmuş bir başka tüpe aktarılmış ve -70°C'de saklanmıştır. Elde edilen lizattan BCA (bisinkoninik asit) kiti ile protein tayini yapılmıştır. BCA protein tayin yöntemi triptofan, tirozin, sistein, sistin amino asitleri ve peptit bağı varlığında Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve alkali ortamda mavi-mor renkte kompleks

oluşturması prensibine dayanmaktadır (179). Bilinmeyen protein miktarı içeren örnek, bilinen bir standart protein çözeltisi (BSA–bovine serum albumin) ile karşılaştırılır. Poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) yürütmek için yaklaşık 40 µg protein gerekmektedir. İstenen miktarda protein içeren örnek hacmi bir başka tüpe alındıktan sonra gerektiğinde hacmi örnek tamponu ile artırılmış ve 95°C'de 4 dakika (ısıtıcı blokta) bekletilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi için %5'lik yükleme (stacking) ve %10'luk ayırma (resolving) jeli hazırlanmıştır (180). Daha sonra örnekler jellere yüklenerek önce 40 V, daha sonra 100 V'da yaklaşık 3 saat yürütülmüştür. Transfer için alınan jellerin, sünger ve kurutma kağıdının üstünde membranlarla temasları sağlanmıştır. Düzeneğin transfer tankına yerleştirilmesinden sonra 2 saat, 80 V'da proteinler jelden membrana transfer edilmiştir. Transfer sonrası alınan membranlar, 10 cm'lik petri kaplarına jelle temas eden yüzleri üstte olacak şekilde yerleştirilip bir gece boyunca protein çözeltisi olan blottoda bekletilmiştir. Bir sonraki gün blottodan alınan membranlar, 10 mL blotto içinde 20 µL primer antikor ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBS (Tris-buffered saline) ile 10'ar dakikalık 3 yıkama yapılmıştır. Daha sonra 10 mL blotto içinde 4 µL sekonder antikor ile 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBS ile 10'ar dakikalık 3 yıkama yapılmıştır. Yıkamadan alınan membranlara 2 mL kemilüminesans (Enhanced Chemiluminescence, ECL; Amersham) çözeltisi uygulanıp 2 dakika beklenmiştir. Bu çözelti, ikinci antikora konjüge olan enzimin (horse radish peroxidase, HRP) substratını (luminol) içermektedir (181). Daha sonra üzerine otoradyografi filmi (ECL Hyperfilm, Amersham) yerleştirilen membran kasette yaklaşık 1 saat bekletilip, film banyo edilmiştir. β-aktin ile inkübasyon öncesi membranlar TBS ile 10'ar dakikadan 3 kez yıkanıp tekrar blottoda bekletilmiştir. Daha sonra 10 mL blotto içinde 5 µL primer antikor (fare kaynaklı monoklonal anti-β-aktin, Sigma) ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBS ile 10'ar dakikalık 3 yıkama yapılmıştır. Daha sonra 10 mL blotto içinde 3 µL sekonder antikor (peroksidaz ile konjüge anti-fare IgG, Amersham) ile 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBS ile 10'ar dakikalık 3 yıkama yapılmıştır. Yıkamadan alınan membranlara 2 mL ECL çözeltisi uygulanıp 2 dakika beklenmiştir. Daha sonra üzerine film yerleştirilen membran kasette yaklaşık 1 saat bekletilip, film banyo edilmiştir.

3.5. Gen Ekspresyonu Tayini

3.5.1. Artan doz ve sürelerde tunikamisin uygulaması

Bu çalışma için hücreler altı kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Altılı plaklara, her kuyucuğa yaklaşık 2.000.000 hücre düşecek biçimde (3 mL besiyerinde) ekim yapılmıştır. Bir geceliğine inkübe edilen hücrelerin plaklara yapışması sağlanmış, ertesi gün ilaç uygulaması yapılmıştır. Tunikamisin 24 ve 48 saat olarak üç farklı inkübasyon süresinde ve üç farklı konsantrasyonda (10 µg/mL ve 25 µg/mL) uygulanmıştır: 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar için 3'er kuyucuk kontrol olarak bırakılmış, 3'er kuyucuğa 10 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonda tunikamisin uygulanmıştır. Bunun için önce tunikamisin dilüsyonları (serum ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri ile) hazırlanmış, daha sonra kuyucuklardaki besiyerleri aspire edilip ilaçlı besiyerleri hücrelere eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına da 3'er mL ilaçsız besiyeri eklenir. Hücreler ilaçla 24 ve 48 saatliğine inkübe edilmişlerdir.

3.5.2. Visfatin ekspresyon plazmidinin HepG2 hücrelerine geçici transfeksiyonu

Nükleik asitlerin ökaryotik hücrelerin içine viral olmayan yöntemlerle girmesi işlemine transfeksiyon adı verilir. Tercih ettiğimiz yöntem göre, önce plazmid DNA'nın lipozomal yapıların içine girmesi sağlanır. Daha sonra hücrelerin bulunduğu ortama verilen plazmid taşıyan lipozomlar hücre membranlarıyla birleşerek hücre içine girer. Ön transfeksiyon deneyleri için yaklaşık 4 milyon hücre 100 mm'lik petri kabına ekilerek 24 saatliğine inkübe edilmiştir. Daha önce izole edilen plazmid DNA'sının miktarı spektrofotometre ile ölçülmüştür. 5 µL DNA, 395 µL TE tamponu ile seyreltilerek 260 nm'de absorbans değeri 0,178 olarak ölçülmüş ve DNA konsantrasyonu 0,712 µg/µL olarak hesaplanmıştır. 10 µg DNA için 14 µL DNA çözeltisi iki ayrı polipropilen tüpe pipetlenmiştir. 3 adet petri kabından biri kontrol olarak seçilmiş ve diğer ikisi ile iki ayrı transfeksiyon kiti (Qiagen Superfect ve Roche Fugene) kullanılarak transfeksiyon yapılmıştır. Superfect kiti kullanılacak örneğin hacmi 300 µL'ye, Fugene kiti kullanılacak örneğin hacmi 500 µL'ye serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile tamamlanmıştır. Daha sonra tüplere 60 µL Superfect ve 40 µL Fugene reaktifleri eklenip karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra kaplardaki besiyerleri uzaklaştırılıp hücreler 4'er mL PBS ile yıkanmıştır. DNA karışımına 3'er mL serum ve antibiyotik içeren besiyeri eklenip

karıştırılmış ve hücrelere eklenerek 3 saatliğine inkübe edilmiştir. Daha sonra bu besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 4 ml PBS ile yıkanmış ve besiyeri yenilenmiştir. 72 saatlik inkübasyonun sonunda, hücrelerden Western Blot için protein ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.5.3. Kontrol ve transfekte hücre gruplarında tunikamisin uygulaması

Daha önceki çalışmamızda Tunikamisin etkisi için 10 µg/mL doz ve 24 saatlik uygulamanın yeterli olduğu görüldüğü için çalışmalara bu koşullarda devam edilmiştir.

ER stresi yaratmak için 24 saatlik inkübasyon süresi ve 10 µg/mL konsantrasyonda tunikamisin uygulamaları altı kuyucuklu plaklarda yapılmıştır. Kuyucuklar kontrol, tunikamisin, transfeksiyon ve tunikamisin + transfeksiyon olmak üzere toplam 4 grup olarak düzenlenmiş, her gruptan 3 örnek çalışılmıştır. Bu çalışmalar için altı kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa yaklaşık 2.000.000 hücre düşecek biçimde ekim yapılmıştır. Bir geceliğine inkübe edilen hücrelerin plaklara yapışması sağlanmış, ertesi gün yukarıda anlatıldığı şekilde transfeksiyon yapılmıştır.

Transfeksiyonun ertesi günü hücrelere tunikamisin uygulaması yapılmıştır. Tunikamisin 24 saat, 10 µg/mL olarak uygulanmıştır. Bunun için önce tunikamisin dilüsyonları hazırlanmış, daha sonra kuyucuklardaki besiyerleri aspire edilip ilaçlı besiyerleri hücrelere eklenmiştir. Hücreler ilaçla 24 saatliğine inkübe edilmişlerdir. Hücrelerden RNA ve protein izole edilmiş; RNA ekspresyon çalışmaları için, protein ise Western Blot için kullanılmıştır.

3.5.4. Tunikamisin ve linoleik asit uygulaması

Çalışma kapsamında HepG2 hücrelerinde PPAR agonistlerinin ER stresi koşullarında etkisini göstermek amacıyla hücrelere endojen bir PPAR ligandı olan linoleik asit uygulaması yapılmıştır. ER stresi uyarısı olarak 24 saatlik, 10 µg/mL tunikamisin kullanılmıştır. Çalışma, altı kuyucuklu plaklarda yapılmıştır. Kuyucuklar kontrol, tunikamisin, linoleik asit, linoleik asit + tunikamisin olmak üzere toplam 4 grup olarak düzenlenmiş, her gruptan 3 örnek çalışılmıştır. Bu çalışmalar için hücreler altı kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa yaklaşık 2.000.000 hücre düşecek biçimde ekim yapılmıştır. Bir geceliğine inkübe edilen hücrelerin plaklara yapışması sağlanmış, ertesi gün uygulamaya başlanmıştır. Hücrelerde tunikamisine karşı

koruyucu etkisini görmek için linoleik asit tunikamisinden 24 saat önce uygulanmıştır. Linoleik asit, son konsantrasyonu 500 μ M olacak şekilde besiyeri ile dilüe edilmiştir. Kuyucuklara 3'er mL besiyeri ile eklenen ilaç hücrelerle 48 saatliğine inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24. saatinin bitiminde 10 μ g/mL tunikamisini uygulanmış ve 24 saatliğine inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler ekspresyon çalışmasında kullanılmıştır.

3.5.5. Hücre örneklerinden protein izolasyonu ve Western Blot

Bu deney için hücreler deneyin gerektirdiği örnek miktarına göre uygun büyüklükte kültür kaplarına ekilmiştir. İlaç veya transfeksiyon uygulaması yapıldıktan sonra doğrudan protein ekspresyonu yönünden incelenecekse inkübatörden alınarak buzun üstüne konmuştur. İki kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra PBS iyice aspire edilmiştir. Yıkamış hücrelerin üzerine lizis tamponu eklenmiş ve hücreler kazınarak toplanıp önceden soğutulmuş polipropilen tüpe konmuştur. 15 saniye vortekslenip 13000 xg'de, 4°C'de 10 dak santrifüjlenmiştir. Süpernatant soğutulmuş bir başka tüpe aktarılıp -70°C'de saklanmıştır.

Tripure izolasyon kiti ile hazırlanan, RNA izolasyonundan kalan kısım da protein izolasyonu için kullanılır. Kalan kısma 0,2 mL %100 etanol eklenip karıştırılıp, 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Daha sonra 2000 xg'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant alınır. Süpernatana 1 mL izopropanol eklenip karıştırılıp, proteinlerin çökmesi için 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. 12000 xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır. Pellet, %95 etanol içinde çözülmüş 1,6 mL 0,3 M guanidin hidroklorür ile resüspanse edilip oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir, sonrasında 7500 xg'de 5 dakika santrifüj edilir. Bu işlem toplam 3 kez tekrarlandıktan sonra pelletlere 2 mL %100 etanol eklenip 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir, 7500 xg'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır. %1'lik SDS eklenerek pelletin çözünmesi sağlanır.

Her iki izolasyon yönteminden de sonra, elde edilen lizattan protein tayini için BCA (bisikoninik asit) kiti kullanılır. Uygun miktarda protein içeren örnekler Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.5.6. RNA izolasyonu

Plaklardaki besiyeri aspire edilip hücreler 2'şer mL PBS ile yıkamış ve RNA izolasyonu için önceden hazırlanmış alana taşınmıştır. RNA izolasyonu için trizol

yöntemine dayanan Tripure izolasyon reaktifi (Roche Applied Science) kullanılmıştır (182). Tripure izolasyon reaktifinden her kuyucuğa 750 µL konulmuş ve hücreler insülin enjektörü ile çekilip bırakılarak lizis yapılmış, lizat polipropilen tüplere alınmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 0,15'er mL kloroform eklenmiştir. Homojenizasyon sırasında Tripure izolasyon reaktifi hücreleri patlatmakta ve endojen nükleazları denatüre etmektedir. Kloroform eklendikten sonra lizat santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası çözeltinin üç faza ayrıldığı görülmüştür: Saydam, sulu üst faz; beyaz ara faz ve altta pembe organik faz. Saydam, sulu faz başka tüpe ayrılarak bu kısımdan RNA izole edilmiştir. Tekrar kloroform eklendikten sonra elde hızlıca sallanan tüpler 4°C'de, 12000 xg 'de, 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında üstteki saydam kısım başka tüplere alınarak her tüpe 0,375 mL izopropanol eklenmiştir. Elde sallanan tüpler, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15 dakika 12000 xg 'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atılıp pelletlerin üzerine 0,75'er mL %75 etanol eklenip vortekslenmiştir. 12000 xg 'de 10 dakika santrifüj edilip etanol atılmıştır. Pellet, yaklaşık 30 µL DEPC ile muamele edilmiş su ile çözülmüştür. Daha sonra spektrofotometre ile RNA miktarı ölçülmüştür. Ölçüm için 10 µL RNA, 390 µL su ile seyreltilmiştir.

3.5.7. cDNA sentezi (RT-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), genomik DNA'da dizisi bilinen bir bölgenin çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. RT-PCR ise RNA'dan revers transkriptaz enzimi sayesinde komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleştiği yöntemdir (183). Bu çalışma için RNA'dan cDNA sentezi için yaklaşık 1 µg RNA gereklidir. Eldeki RNA'lardan 1'er µg alınıp daha sonra hacmi su ile 11 µL'ye tamamlanmıştır. Her örnekten 11 µL RNA alınıp 2 µL rastgele (random) heksamer primer eklenmiştir. 65°C'de 10 dakika inkübe edilen karışıma daha sonra 7 µL master mix eklenmiştir ve buzda bekletilmiştir. Master mix, revers transkriptaz tamponu, RNaz inhibitörü, deoksिनükleotid karışımı ve revers transkriptaz enzimi bulunan bir karışımdır. Daha sonra "thermocycler" programı ayarlanmıştır: 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 60 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 4°C'de bekleme. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra program başlatılmıştır. Program sonunda elde edilen cDNA real-time PCR yapılana kadar -20 C'de bekletilmiştir.

3.5.8. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Real Time-PCR)

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, gen ekspresyonu düzeyini değerlendirmek amacıyla mRNA'dan yapılan cDNA miktarlarının ölçülmesinde kullanılan bir yöntemdir. Spesifik cDNA'ların bir indikatör eklenerek çoğaltılması ve daha sonra bu indikatör üzerinden miktarın kantitatif olarak tayin edilmesine dayanır (184). Kantitatif gerçek zamanlı PCR, oluşan ürüne bağlanan ve floresans yayımlayan bir raportöre gereksinim duyar. Raportör oluşan ürün miktarını yansıtan bir floresan sinyal oluşturur. PCR döngüleri sonucunda oluşan kısa sekanslara ampikon adı verilir. Başlangıç PCR döngülerinde kantitatif gerçek zamanlı PCR'da sinyal zayıftır. Sinyalin güçlenmesi ampikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik seviyeye ulaşması için gereken döngü sayısına CT (cycle of threshold = eşik değer döngüsü) değeri adı verilir. Amplifikasyon yanıt eğrileri CT değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak artar.

Gerçek zamanlı PCR'da floresan raportörler kullanılmaktadır. Hedef bölgenin çok sayıda kopyası oluştuğunda, floresan raportörlerden alınan sinyal miktarının arttığı gözlenir. Kullanılan raportörler Taqman probu, hibridizasyon probu ya da diziye özgü olmayan boyalar (SYBR Green/BOXTO) olabilir.

TaqMan prob yöntemi, çift işaretli hidroliz probu olarak da anılır. Bu yöntemde bir çift primer ve prob kullanılır. İleri ve geri primerler her bir DNA zinciri üzerinde uygun kısma bağlanır ve replikasyonun başlamasını sağlar. Prob 5' ucunda floresan raportör (R), 3' ucunda floresan *quencher* (Q) halinde modifiye edilmiş bazlar içerir. Bu konumda 3' ucundaki Q, 5' ucundaki R'yi baskılar ve floresans yaymaz. Prob hedef bölgenin içinde spesifik bir yere bağlanır. DNA zinciri replikasyon ile 1. primer yönünde uzarsa, probun 5' ucu zincirden ayrılır ve polimerazın ekzonükleaz aktivitesi raportör molekülünü Q'dan ayırır. Bu ayrılma, raportörü Q baskılamasından kurtarır ve raportör molekülü floresan ışımaya yapar. Her bir PCR döngüsünde yayılan floresan ışımının başlangıç miktarına oranı ölçülerek gen ekspresyonu düzeyi ifade edilir. Son olarak ölçülen ekspresyon düzeyi, kontrol olarak seçilen bir genin (genellikle *housekeeping* genlerinden biri) ekspresyonuna oranlanır. Çalışmamızda bu yöntemle HSPA5, DDIT3, NAMPT ve NFκB ekspresyonları ölçülmüştür. Kontrol geni olarak HPRT (Hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz) seçilmiştir. Primer olarak *Roche Real Time Ready*

ürünlerinden HPRT1 (assay ID: 102079), NKAP (assay ID: 115788), HSPA5 (assay ID: 110805), DDIT3 (assay ID: 100355), NAMPT (assay ID: 112938) kullanılmıştır.

LightCycler cihazı, kullanılan yöntemlere bağlı kalmaksızın, her amplifikasyon döngüsünün sonundaki ilerlemeleri kaydeder. Başlangıçta, reaksiyon karışımında az miktarda kalıp molekül bulunuyorsa, buna bağlı olarak daha fazla amplifikasyon döngüsü sonrası bir sinyal elde edilecektir. LightCycler cihazı, amplifikasyon aşamasından sonra oluşan PCR ürünlerinin ayrıntılı erime eğrisi analizini yürütebilmektedir. LightCycler sisteminin bir başka özelliği de bir örnekte aynı anda iki farklı hedef diziyi saptayabilmesidir (185). LightCycler cihazı kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemi şu basamakları içermektedir:

LightCycler cihazının programlanması

Pre-inkübasyon: 95°C'de 10 dakika

Kantifikasyon: Denatürasyon 95°C'de 10 saniye, birleşme 60 °C'de 30 saniye, uzama 72°C'de 1 saniye.

Asıl karışım (master mix, LightCycler 480 probe master) hazır olarak bulunmaktadır. 1,5 mL'lik reaksiyon tüpleri buza yerleştirilir. Örnek başına 4 µL PCR için hazırlanmış su, 1µL primer ve prob karışımı, 10 µL asıl karışım eklenir. Karışım 96'lık plağa pipetlenir. 5 µL cDNA eklenir. Plak, 3000 xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra LightCycler cihazına yerleştirilir. Önceden programlanan cihaz çalıştırılır.

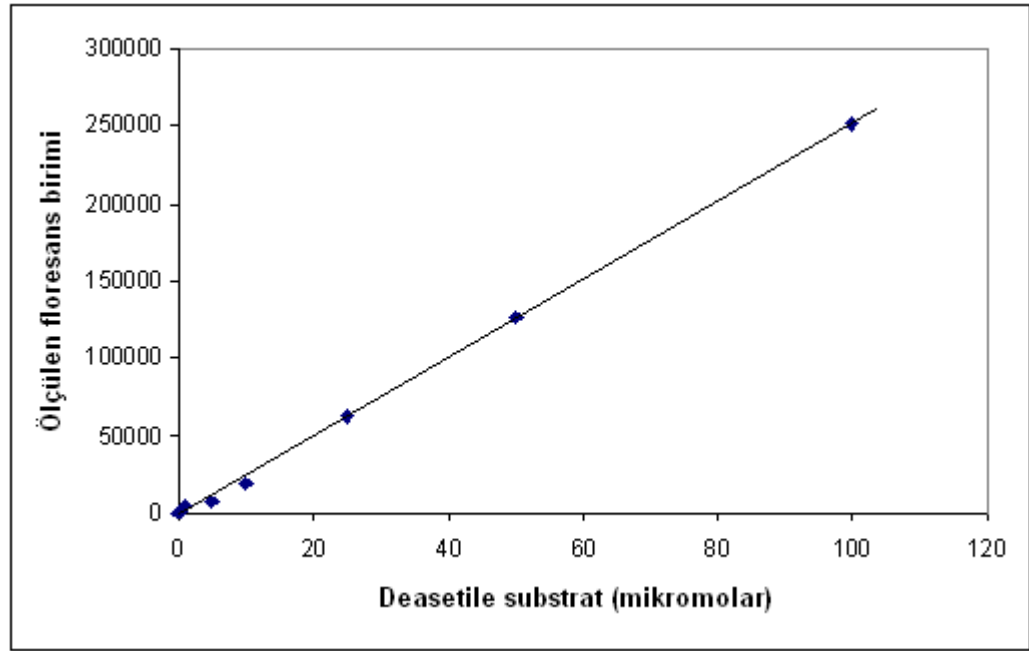
3.6. Hücrelerde SIRT1 Enzim Aktivitesinin Ölçümü

SIRT1 enzim aktivitesi tayin yönteminin prensibi histon deasetilaz ailesinden olan SIRT1'in lizil deasetilaz aktivitesinin ölçümüne dayanır. Asetile substrat, SIRT1 ile deasetile hale geldiğinde floresans verir ve bu sinyal SIRT1 aktivitesi ile doğru orantılıdır.

SIRT1 aktivite tayini için *Fluor de Lys SIRT1 fluorescent activity assay/drug discovery kit* (Biomol) kullanılmıştır. Altılı plaklara ekilmiş hücre örnekleri en az bir gün -80°C'de bekletildikten sonra reaksiyon tamponu ile toplanmış ve 96'lık opak plakta ölçümler yapılmıştır. Kontrol amaçlı rekombinan SIRT1 enzimi kullanılmıştır. Örnek veya rekombinan enzim, NAD, substrat ve reaksiyon tamponu karıştırılıp 37°C'de en az 60 dakika beklenmiştir. İnkübasyonun sonunda "developer"-inhibitör karışımı eklenmiştir. 45 dakika beklendikten sonra önce 360 nm'de eksitasyon,

ardından 460 nm’de ölçüm yapılmıştır. Bu yöntemle aktivite tayini için kullanılan standart grafiği Şekil 3.2’de görülmektedir.

Deneyler için hazırlanan örneklerin protein miktarı BCA yöntemi ile ölçülüp sonuçlar ölçülen floresans miktarı toplam protein miktarına bölünerek “floresans birimi/mikrogram protein” olarak ifade edilmiştir. Sonuç grafiklerinde kontrol grubu için elde edilen ölçüm değeri 1 olarak alınıp diğer grupların sonuçları kontrol grubuna oranlanarak verilmiştir.



Şekil 3.2. SIRT1 aktivite tayin kitinin standart grafiği.

3.7. Hücre İçi Toplam Oksidan Düzeyinin Ölçümü

Toplam oksidan düzey tayini, ksilol turuncusu ve gliserol içeren asidik ortamda ferröz demir iyonu-diyazidinin kompleksinin örnekte bulunan oksidan maddeler tarafından ferrik demir iyonuna yükseltgenerek, ksilol turuncusunun ferrik demir iyonuyla renkli bir kompleks oluşturmasına dayanan kolorimetrik bir yöntemdir (186). Renkli kompleks oluşumu ile değişen renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek, örnekteki toplam oksidan madde miktarı hesaplanır. Yöntemin ölçüm standardı hidrojen peroksit olarak seçilmiş ve çalışmada kullanılan konsantrasyonları mikromol/L düzeyinde belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen toplam oksidan düzey, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L olarak ifade edilir.

Hücre içi oksidan kapasitenin ölçümü için “Total Oxidant Status” (TOS, Rel Assay Diagnostics) kiti kullanılmıştır. Hücreler deney sonunda PBS ile yıkanıp -80°C’de en az bir gün saklanır. Örnek hazırlığı için bütün işlemler buz üstünde gerçekleşir. Hücre lizati eldesi için, TOS kitinin sonuçlarını etkilemediği görülen Western Blot örnek tamponu seçilmiştir. Altılı plaktaki bir kuyucuktan yaklaşık 2.000.000 hücre, 150 µL örnek tamponu ile toplanır. 12.000xg’de, 4°C’de, 5 dakika santrifüjlendikten sonra kullanıma hazırdır. Standart ile örnekler aynı anda çalışılır. Çalışma sonucu absorbans farkına dayandığından kör/boş örnek çalışılmasına gerek yoktur.

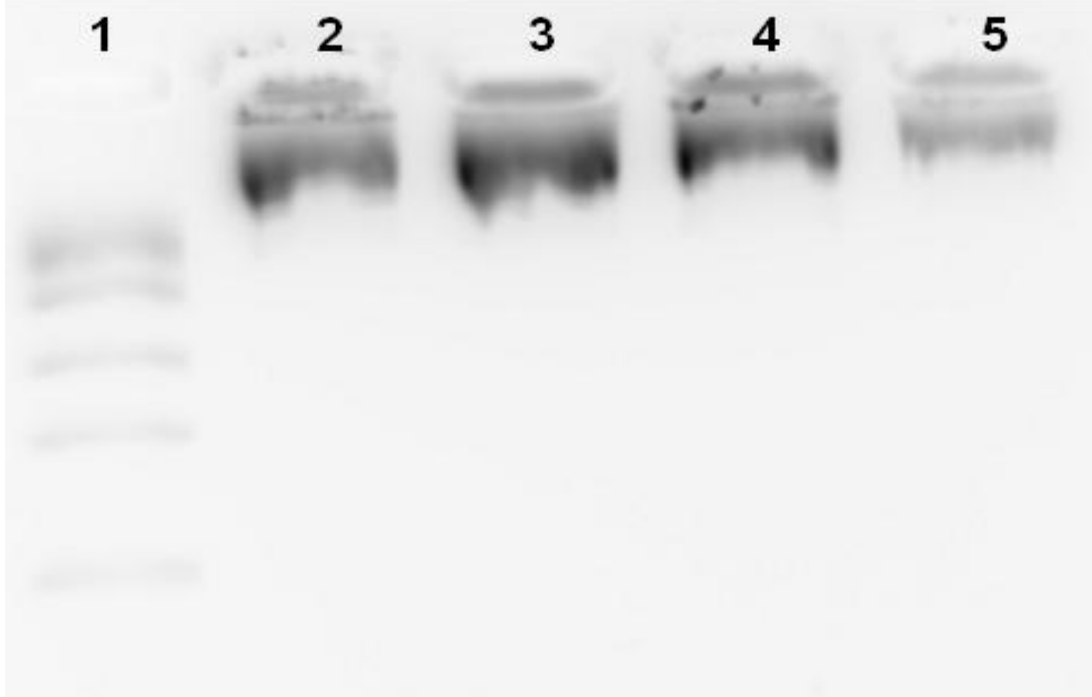
Protokolde önerilen hacimler ve örnek sayısı nedeniyle 24’lü plakta çalışılma yapılmıştır. Her kuyucuğa 1 mL reaktif 1 (reaksiyon tamponu) eklenmiştir. Standart kuyucuklarına 150 µL standart 2 (konsantrasyonu 20 mikromol/L olacak şekilde seyreltilmiş), örnek kuyucuklarına 150 µL örnek eklenmiştir. 530 nm’de ilk absorbans değerleri ölçüldükten sonra tüm kuyucuklara 50 µL prokromojen reaktif 2 eklenerek 5 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 530 nm’de ikinci absorbans değerleri ölçüldükten sonra ikinci absorbans değerleri ile birinci absorbans değerleri arasındaki fark hesaplanmıştır. Daha sonra her bir örneğin absorbans farkı, standart 2’nin absorbans farkına oranlanıp seçilen standart konsantrasyonu olan 20 µmol/L ile çarpılmış, elde edilen sonuç µmol H₂O₂ eşdeğeri/L olarak kaydedilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Visfatin Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması ve Kontrolü

Plazmid vektörü Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmış, kompetan bakterilere yerleştirilmiş ve çoğaltıldıktan sonra miniprep yöntemi ile izole edilmiştir. Minipreple elde edilen ve henüz restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş plazmid DNA'larının %1'lik agaroz jelindeki elektroforetik görüntüsü Şekil 4.1'de izlenmektedir.

Elde edilen plazmid DNA'ları daha sonra EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilerek Şekil 4.2'de görüldüğü gibi yaklaşık 6000 ve 1500 baz çiftlik bantlar oluşturduğu görülmüş ve saflaştırdığımız DNA'nın elde etmek istediğimiz plazmide ait olduğu gösterilmiştir.

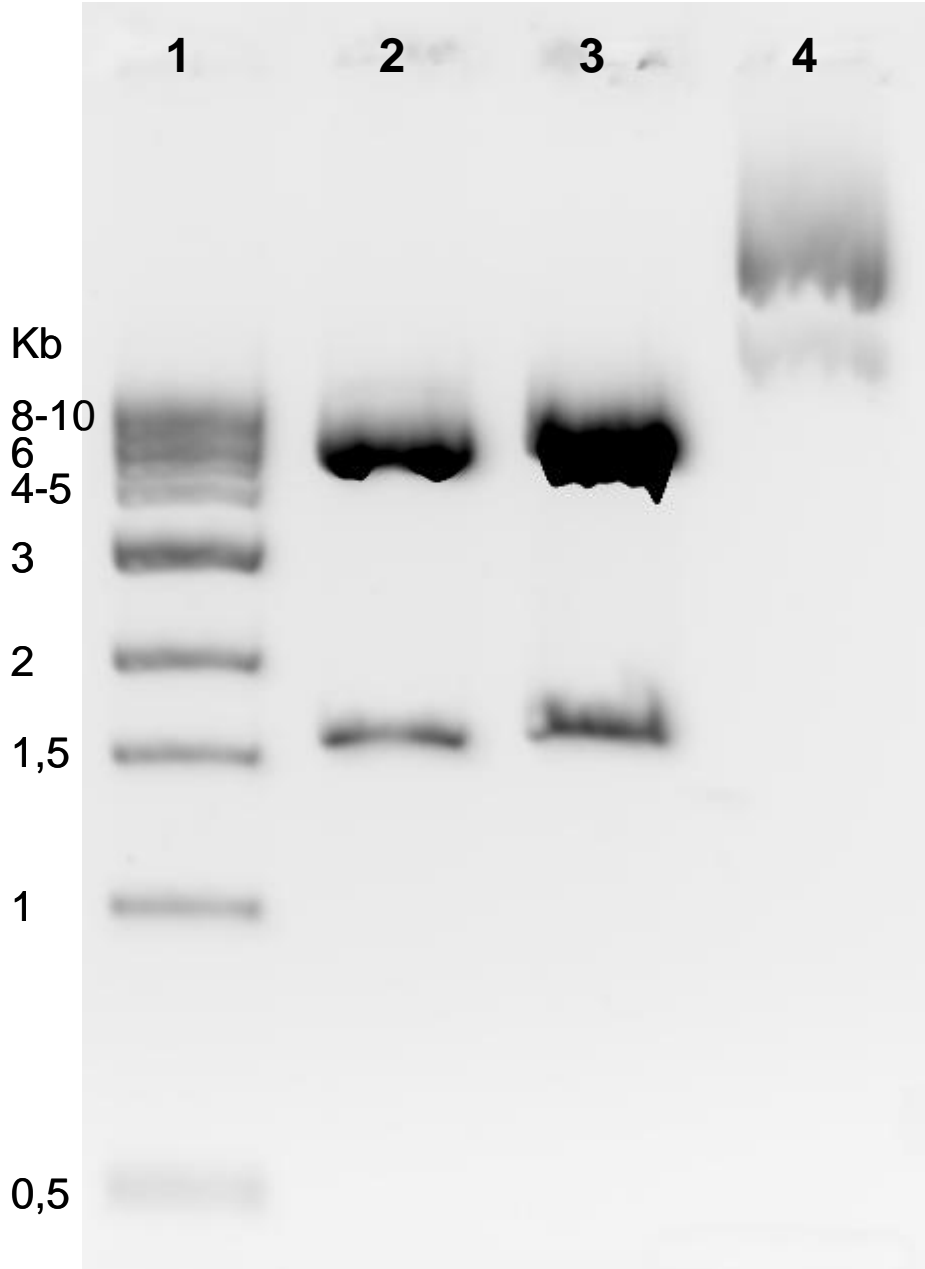


Şekil 4.1. Miniprep ile hazırlanan plazmid DNA'larının jel görüntüsü. 1. 0,5-10 kilobazlık DNA merdiveni; 2-5. 2'şer µl restriksiyon enzimleriyle kesilmemiş plazmid DNA'sı.

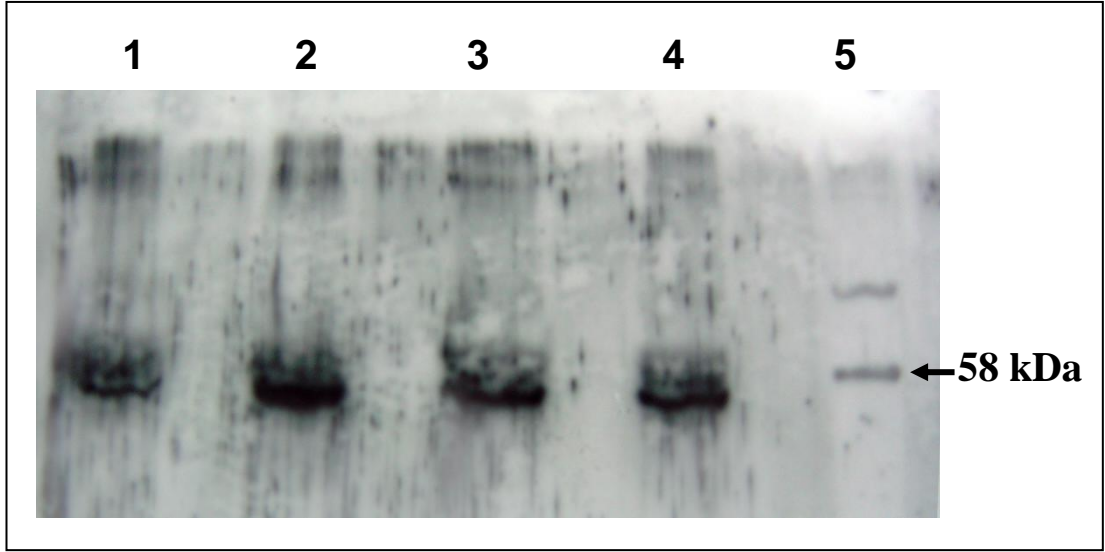
4.2. HepG2 Hücrelerinde Geçici Transfeksiyon Sonrası Visfatin Ekspresyonu

Visfatin ekspresyon plazmidi HepG2 hücrelerine iki ayrı transfeksiyon kiti (Qiagen Superfect ve Roche Fugene HD) kullanılarak transfekte edilmiştir. Şekil

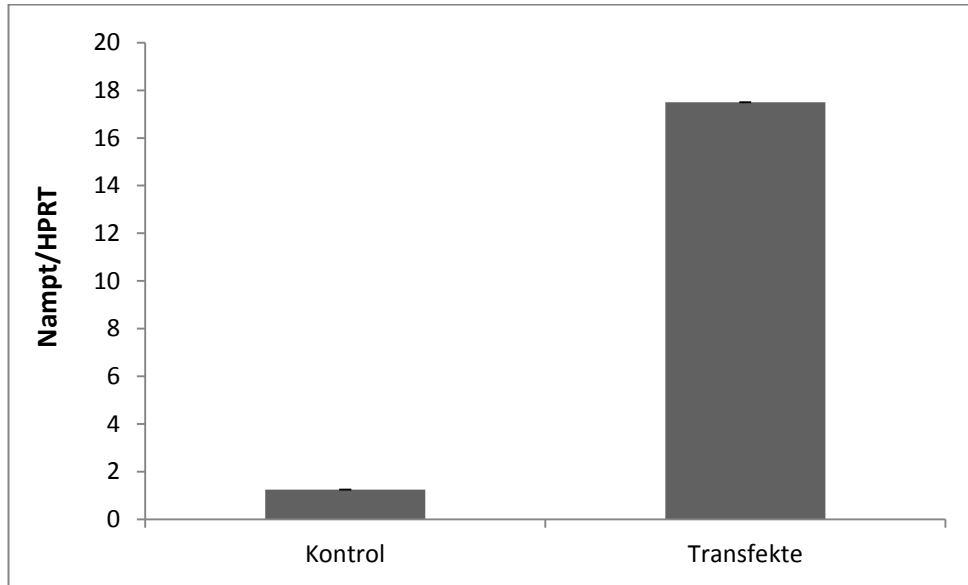
4.3’de görüldüğü gibi her iki kitle yapılan transfeksiyon başarılı olmuş ve hücrelerde visfatin ekspresyonu artmıştır. Visfatin, literatür ile uyumlu olarak yaklaşık 55 kDa ağırlığında bir bant olarak görülmektedir. Superfect ile yapılan transfeksiyon daha başarılı olmuş, bu hücrelerdeki ekspresyon daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir (Sıra 2). Transfekte edilen HepG2 hücrelerinde gerçek zamanlı PCR yöntemi ile de visfatin ekspresyonunun yaklaşık 14,5 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.2. Miniprep ile hazırlanan plazmid DNA’sının EcoRI restriksiyon enzimi ile kesildikten sonraki jel görüntüsü. 1. 0,5-10 kilobazlık DNA merdiveni; 2. 5 µl kesim ortamı; 3. 10 µl kesim ortamı; 4. 1 µl (0,7 µg) kesilmemiş plazmid.



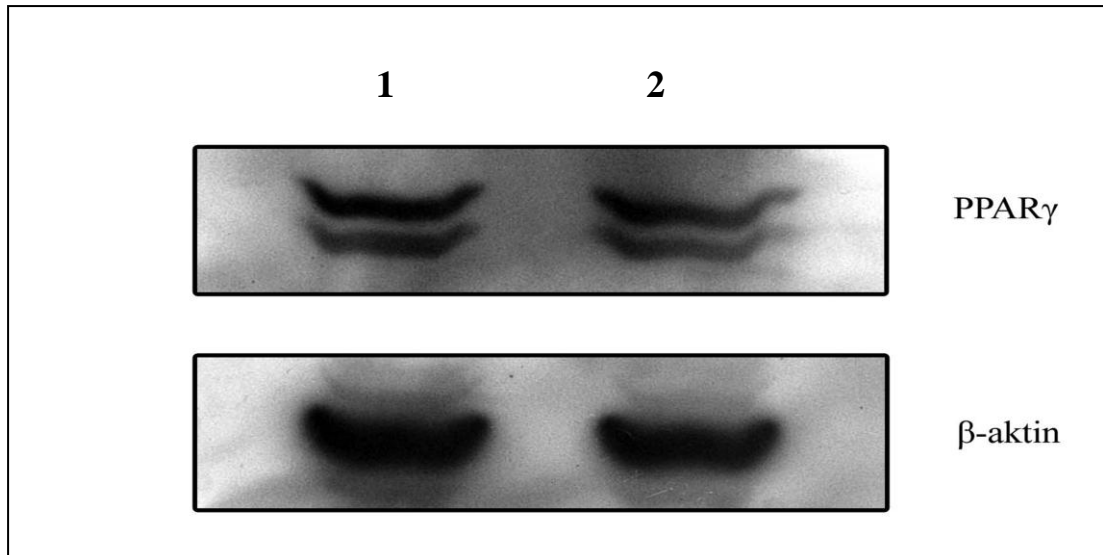
Şekil 4.3. HepG2 hücrelerine visfatin plazmidinin transfeksiyonu sonrasında visfatin protein ekspresyonunun Western Blot ile gösterilmesi. 1. Transfekte edilmemiş kontrol hücreleri, 2. Superfect ile transfekte edilmiş hücreler, 3 ve 4. Fugene HD ile transfekte edilmiş hücreler, 5. Molekül ağırlığı belirteci.



Şekil 4.4. Transfeksiyon sonrası hücrelerde visfatin gen ekspresyonunun artışı.

4.3. HepG2 Hücrelerinde PPAR γ Ekspresyonu

Bu deneyde HepG2 hücrelerine herhangi bir işlem uygulanmadan PPAR γ ekspresyon düzeyine bakılmıştır. Şekil 4.5'te iki ayrı hücre örneği ile yapılan Western Blot sonuçları görülmektedir. PPAR γ 'nın molekül ağırlığı 57,6 kDa, β -aktin'in ise 41,7 kDa'dır. Her iki örnekte de PPAR γ ve β -aktin bantları gösterilmiştir.

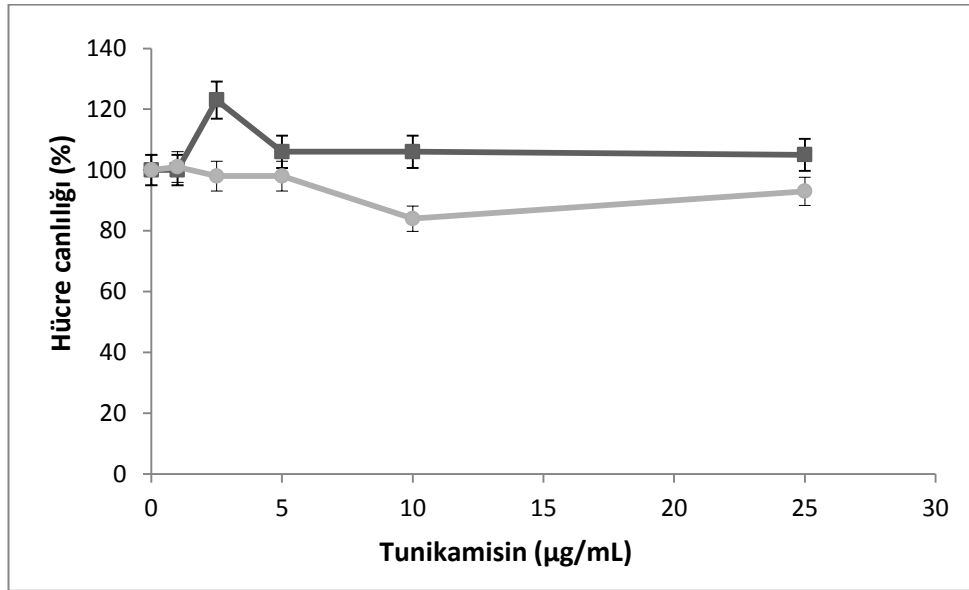


Şekil 4.5. HepG2 hücre lizatlarında PPAR γ protein ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi.

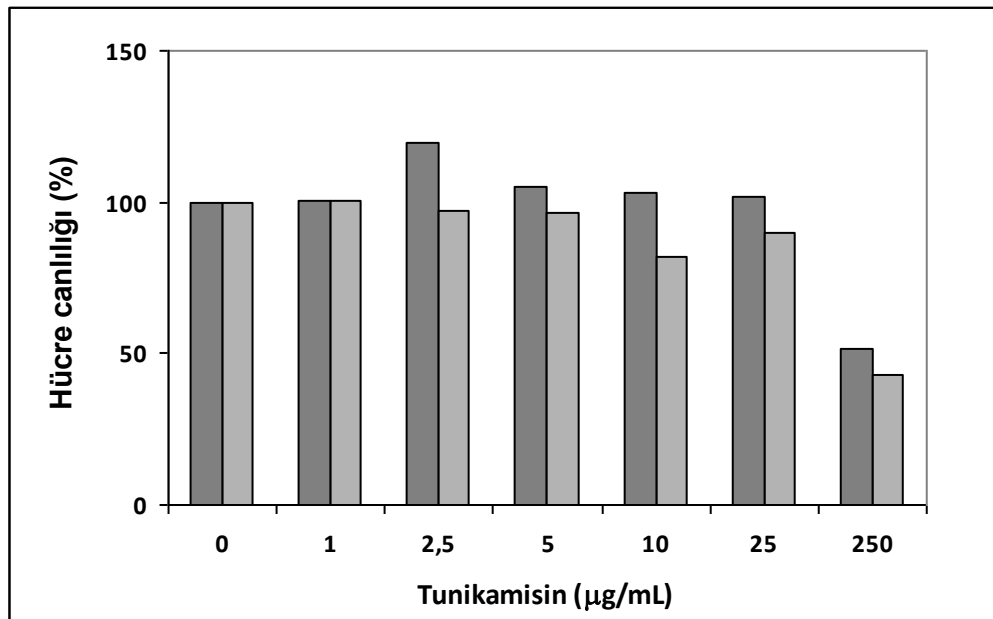
4.4. HepG2 Hücrelerinde Sitotoksisite Çalışmaları

4.4.1. HepG2 hücrelerinde tunikamisın ile sitotoksisite çalışmaları

Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde tunikamisın kullanılarak ER stresi oluşturulması amaçlanmıştır. Bu nedenle tunikamisının ER stresi oluşturan ancak hücre canlılığını etkilemeyen bir dozunun kullanılması önemlidir ve bunun belirlenebilmesi için doz-bağımlı bir sitotoksisite çalışması gerçekleştirilmiştir. Literatürde tunikamisın 1-10 μ g/ml dozlarda kullanıldığı için çalışmaya öncelikle bu doz aralığında başlanmış, ancak bu dozlarda sitotoksisite görülmemesi nedeniyle emin olmak için daha yüksek dozlar da denenmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi 2,5-25 μ g/ml doz aralığında önemli bir sitotoksisite söz konusu değildir. Tunikamisının potansiyel sitotoksik etkisini görmek amacıyla doz 250 μ g/mL'ye çıkarıldığında ise hücrelerin yaklaşık %50 oranında canlılıklarını yitirdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. HepG2 hücrelerinde, farklı hücre miktarı ve Tunikamisine dozlarında hücre canlılığının % olarak ifadesi. -□- 5000 hücre, -○- 10000 hücre.

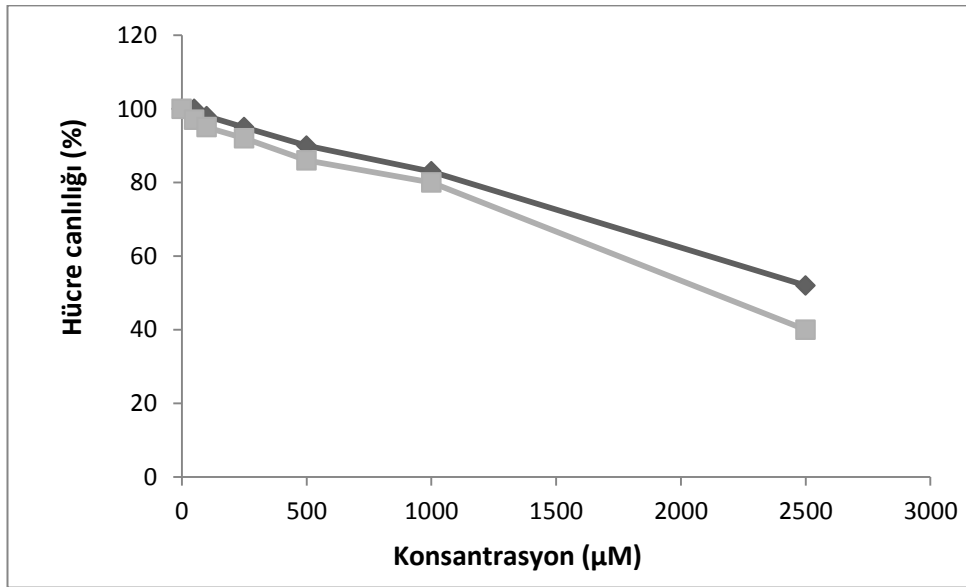


Şekil 4.7. Farklı hücre miktarlarında ve 0-250 µg/mL doz aralığında tunikamisinin sitotoksik etkisi. Koyu renkli sütunlar 5000, açık renkli olanlar 10000 hücre ile yapılan çalışmayı göstermektedir.

4.4.2. HepG2 hücrelerinde palmitik asit ve linoleik asit ile sitotoksikite çalışmaları

Palmitik asit, in vivo koşullarda doymuş yağ asitleriyle oluşan ER stresini deneysel olarak göstermekte uygun bir yağ asidi olması nedeniyle çalışmamızda Tunikamisine ile birlikte ER stresi oluşturmak üzere kullanılmıştır. Linoleik asit ise

koruyucu etkileri olan bir doymamış yağ asidi olduğundan, visfatin ekspresyon artışı ile koruyucu etkilerinin karşılaştırılması amacıyla seçilmiştir. Palmitik asitin ER stresi oluştururken, linoleik asitin ise koruyucu etkilerini gösterirken hücre canlılığını anlamlı düzeyde etkilemeyen dozlarını seçmek amacıyla doz-bağımlı bir sitotoksosite çalışması yapılmıştır. Literatürde yağ asitleri ile yapılan çalışmalarda seçilen doz aralığının 50-1000 μM olduğu saptanmış ve sitotoksosite çalışmaları için daha geniş bir aralık olan 50-2500 μM , inkübasyon süresi olarak da 24 saat seçilmiştir. Şekil 4.8'de palmitik asit ve linoleik asitin 1000 μM konsantrasyona kadar çok yüksek bir sitotoksosite göstermediği, ancak 1000 μM 'dan yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerinin hızla arttığı ve seçilen en yüksek doz olan 2500 μM 'ın hücrelerin yarısından fazlasının yitirilmesine neden olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, linoleik asit ve palmitik asitin 1000 μM konsantrasyonları çalışma için uygun doz olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Palmitik asit ve linoleik asitin farklı dozlarında hücre canlılığının % olarak ifadesi. - \diamond - Linoleik asit, - \square - Palmitik asit.

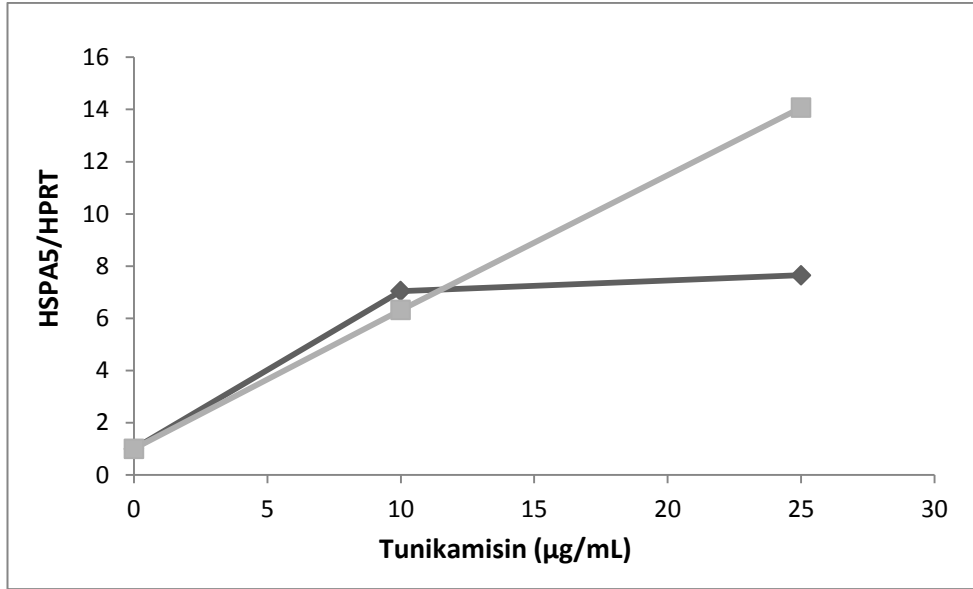
4.5. HepG2 Hücrelerinde ER Stresi Oluşturulması ve Gen Ekspresyonu Değişiklikleri

4.5.1. Tunikamisin doz bağımlı olarak ER stresini uyarması

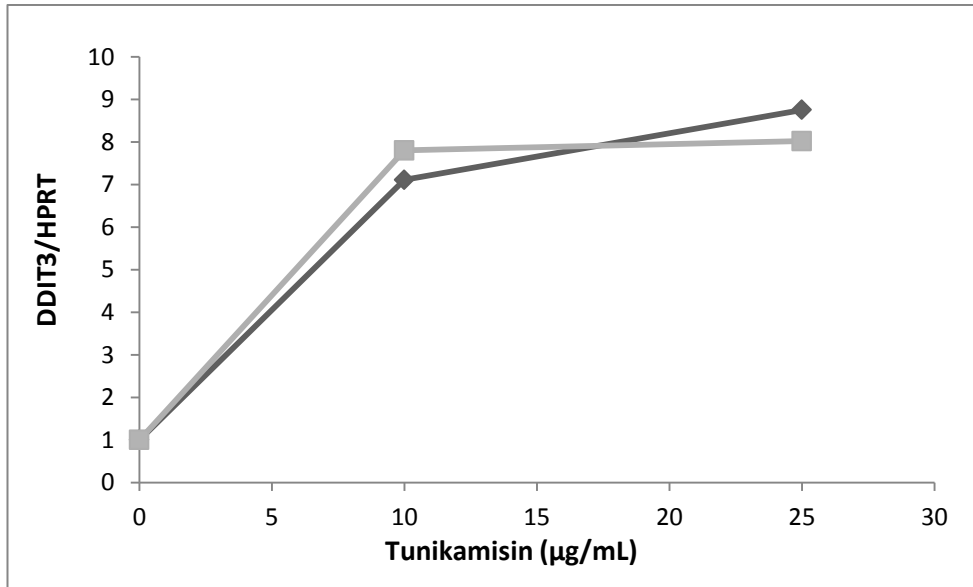
Hücrede ER stresi sırasında moleküler şaperonlardan GRP78 (HSPA5) ve GADD153 (DDIT3) ekspresyonunun artması beklenmektedir. Hücrelerimizde ER

stresi oluşturulduğunun gösterilmesi bakımından bu genlerin ekspresyonu ölçülmüş ve bir kontrol (housekeeping) geninin ekspresyonuna oranlanarak ifade edilmiştir.

Bu çalışmamızın sonucunda 24 ve 48 saatlik uygulamalarda tunikamisinin her iki dozunun da ER stresi belirteci olan genlerin ekspresyonunu artırdığı görülmüştür (Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9. Tunikamisinin HSPA5 gen ekspresyonuna doz-bağımlı etkisi. - \diamond - 24 saat, - \square - 48 saat.

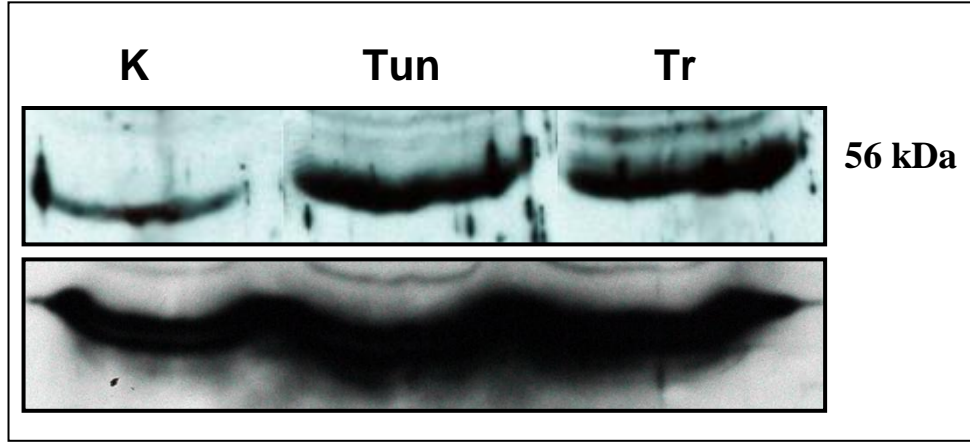


Şekil 4.10. Tunikamisinin DDIT3 gen ekspresyonuna doz-bağımlı etkisi. - \diamond - 24 saat, - \square - 48 saat.

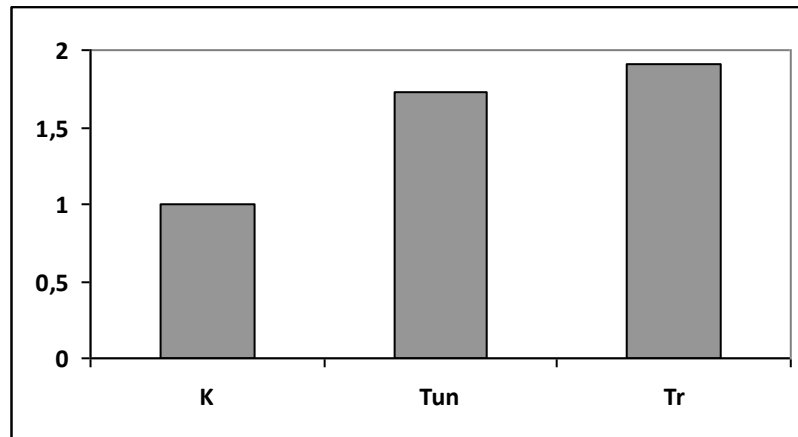
Elde edilen ekspresyon değerlerine bakıldığında 10 µg/mL tunikamisin dozunda, hem 24 hem de 48 saatlik uygulamada kontrole oranla yeterli düzeyde ekspresyon artışı sağlandığı tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulamada yüksek dozda ekspresyon düzeyinde sapma görülmüştür, bu sonucun uzun inkübasyon süresinin toksik etkisine bağlı olduğu düşünülmüştür.

4.5.2 Tunikamisinin visfatin ekspresyonuna etkisi

Tunikamisin uygulamasının hücrelerde visfatin ekspresyonuna etkisini göstermek için Western Blot yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada gruplar kontrol (K), tunikamisin (Tun, 10 µg/mL) ve transfeksiyon (Tr) olarak belirlenmiştir. Şekil 4.11'de üstte visfatin (56 kDa), alta β-aktin (42 kDa) bantları görülmektedir.



Şekil 4.11. Tunikamisinin visfatin protein ekspresyonuna etkisinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi. Visfatin 56 kDa, β-aktin 42 kDa olarak izlenmektedir.



Şekil 4.12. Western Blot yöntemi ile gösterilen visfatin protein ekspresyonundaki değişikliklerin grafik olarak ifadesi. Visfatin/aktin oranı kontrole oranlanmıştır.

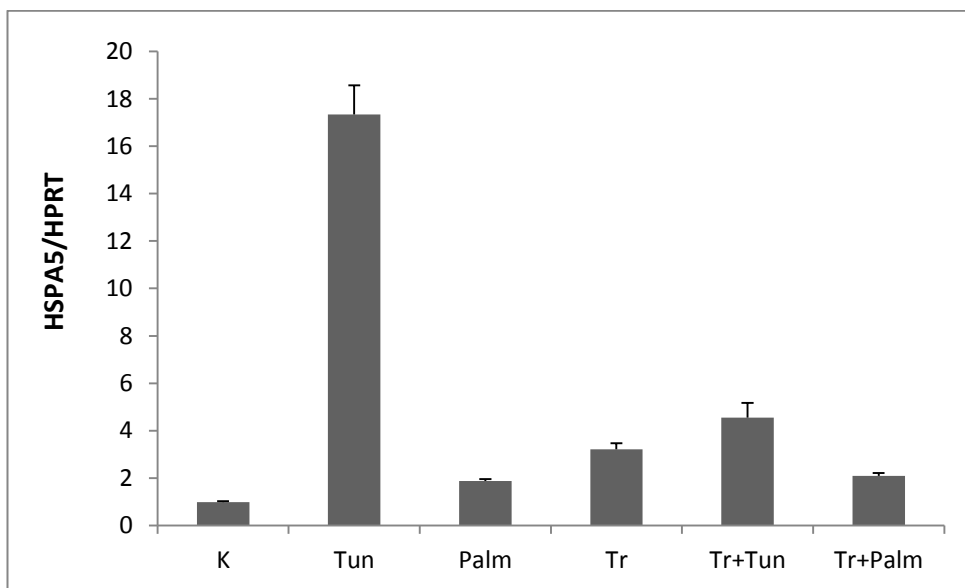
Tunikamisin uygulanan ve visfatin ekspresyon plazmidi transfekte edilen hücrelerde visfatin ekspresyonu kontrole oranla artmıştır.

4.6. Plazmid Transfeksiyonu ile Visfatin Ekspresyonu Artırılan HepG2 Hücrelerinde Gen Ekspresyonu Değişiklikleri

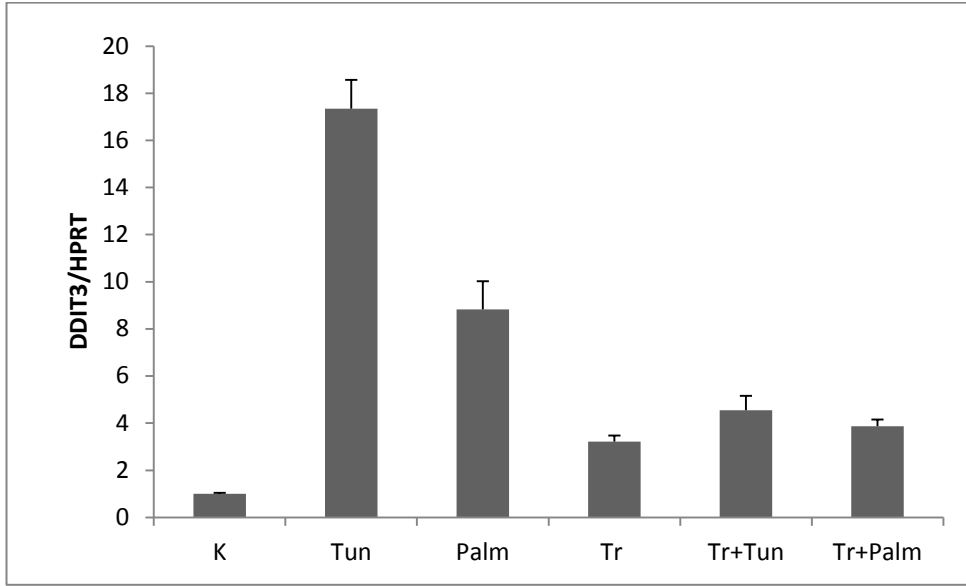
4.6.1. Visfatin ekspresyon artışının ER stresine etkisi

Visfatin geni taşıyan plazmid transfekte edilen hücrelerde ER stresi belirteci olan DDIT3 ve HSPA5 genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Transfeksiyon ile birlikte, ER stresini uyarmak üzere tunikamisin (10 µg/mL) ve palmitik asit (1000 µM) uygulaması da yapılarak transfeksiyonun ER stres belirteçlerinin ekspresyonuna bir etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

Transfeksiyon yoluyla visfatin ekspresyonu artırılmamış olan hücrelerde tunikamisin ER stresi belirteci olan hem HSPA5, hem de DDIT3 genlerinin ekspresyonlarını yaklaşık 17 kat artırmıştır (Şekil 4.13 ve 4.14). Yüksek dozlarda ER stresini artırdığı bilinen doymuş yağ asidi palmitik asit HSPA5 ekspresyonunu düşük düzeyde (yaklaşık iki kat) artırmış, ancak DDIT3 ekspresyonuna etkisi daha belirgin olmuştur (yaklaşık 8 kat). Transfeksiyon ile hücredeki visfatin miktarının artırılması ER stresinden koruyucu bir etki göstermiştir. Tunikamisin ile artmış olan HSPA5 ve DDIT3 genlerinin ekspresyonları transfekte edilen hücrelerde azalmıştır. Palmitik asit ile daha belirgin olarak uyarılmış olan DDIT3 ekspresyonu da transfeksiyon sonrasında azalmıştır.



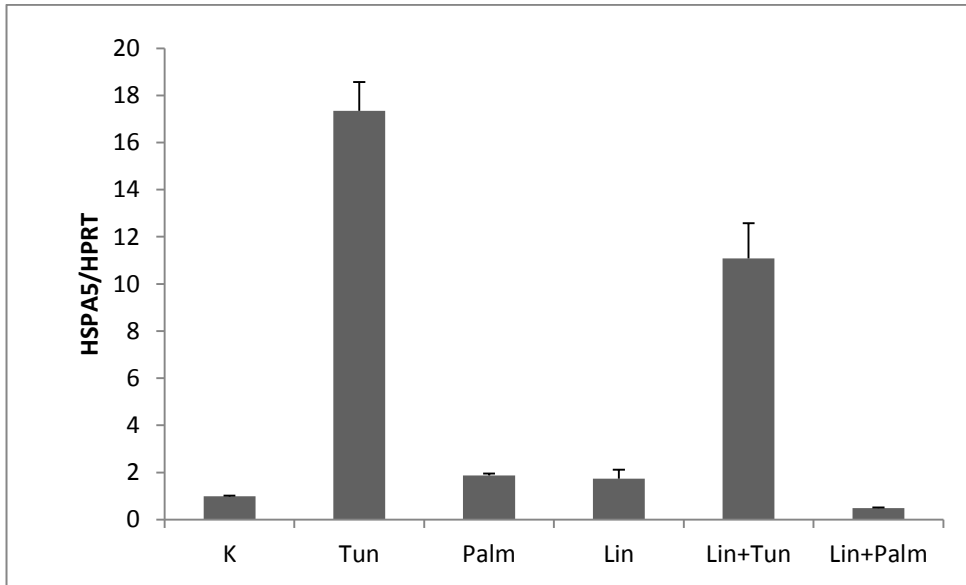
Şekil 4.13. Visfatin ekspresyon artışının HSPA5 ekspresyonuna etkisi.



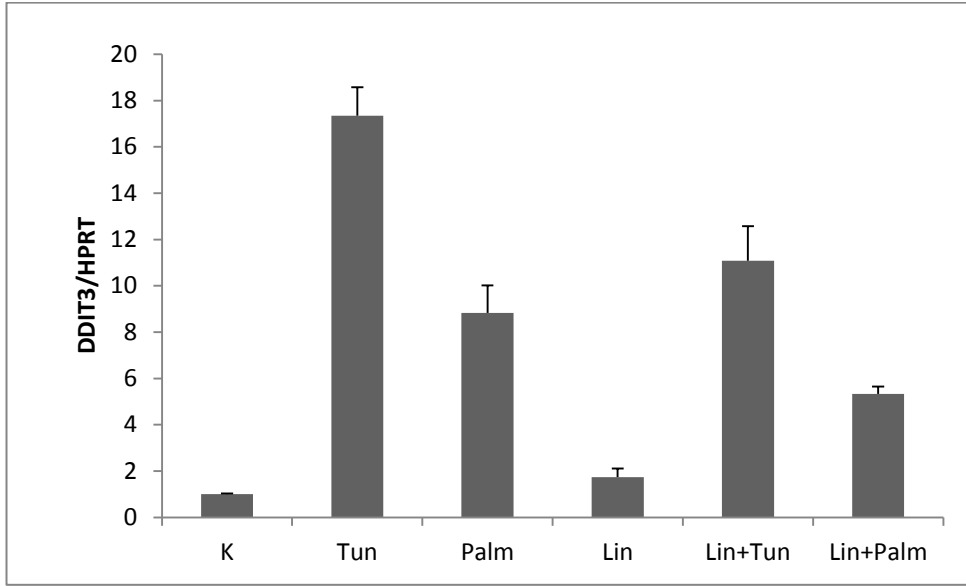
Şekil 4.14. Visfatin ekspresyon artışının DDIT3 ekspresyonuna etkisi.

4.6.2. HepG2 hücrelerinde linoleik asitin ER stresine etkisi

Transfeksiyon yoluyla visfatin ekspresyonunun artırılmasının ER stresine karşı koruyucu olduğu gösterildikten sonra, literatürde bu etkisi daha iyi tanımlanmış olan linoleik asitin deney sistemimizde koruyucu etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'de görülebileceği gibi hücrelerimizde 1000 μ M linoleik asit uygulaması, 24 saatlik tunikamisin uygulamasının ortaya çıkardığı ER stresini azaltmıştır.



Şekil 4.15. Linoleik asitin tunikamisin ve palmitik asit ile uyarılmış HSPA5 ekspresyonuna etkisi.

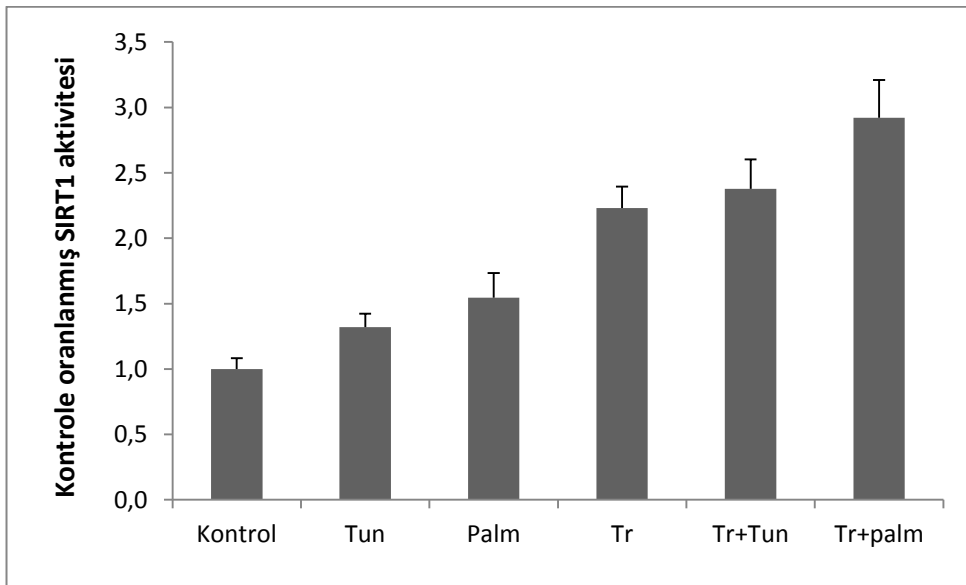


Şekil 4.16. Linoleik asitin tunikamisin ve palmitik asit ile uyarılmış DDIT3 ekspresyonuna etkisi.

4.7. HepG2 Hücrelerinde ER Stresinin SIRT1 Aktivitesine Etkisi

4.7.1. ER stresinin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.17 transfekte edilen, 10 µg/mL tunikamisin ve 1000 µM palmitik asit uygulanan hücrelerdeki SIRT1 enziminin aktivitesini göstermektedir.

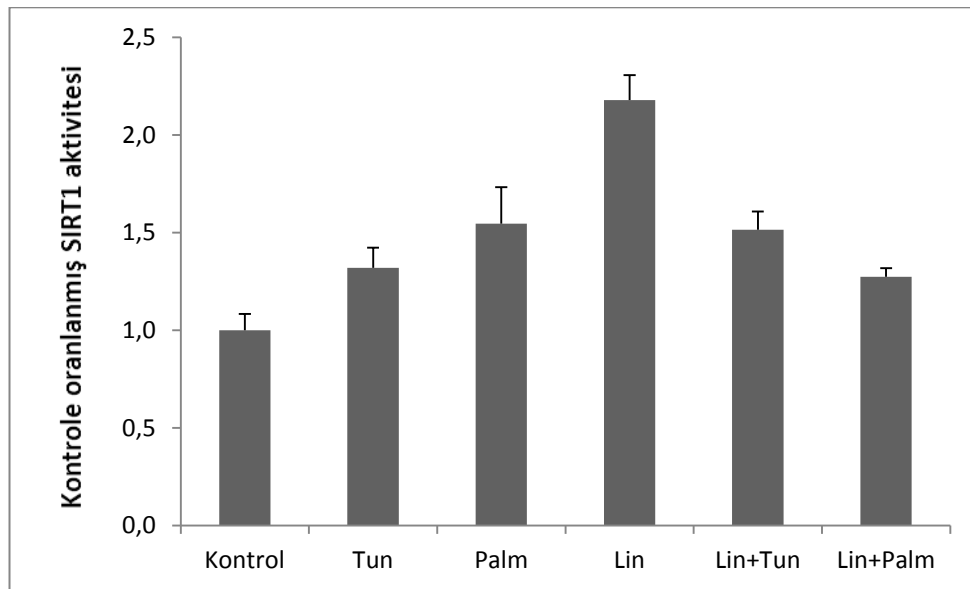


Şekil 4.17. Visfatin ekspresyon artışının ve ER stresinin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi.

Transfeksiyon uygulaması hücrelerdeki SIRT1 aktivitesini artırmaktadır. Tunikamisin ve palmitik asit de muhtemelen visfatin artışına sebep olarak SIRT1 enziminin aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Transfekte edilen hücrelere tunikamisin veya palmitik asit uygulaması yapıldığında ise SIRT1 aktivitesinin daha da arttığı gözlenmiştir

4.7.2 Visfatin ekspresyonu artışı ve linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi

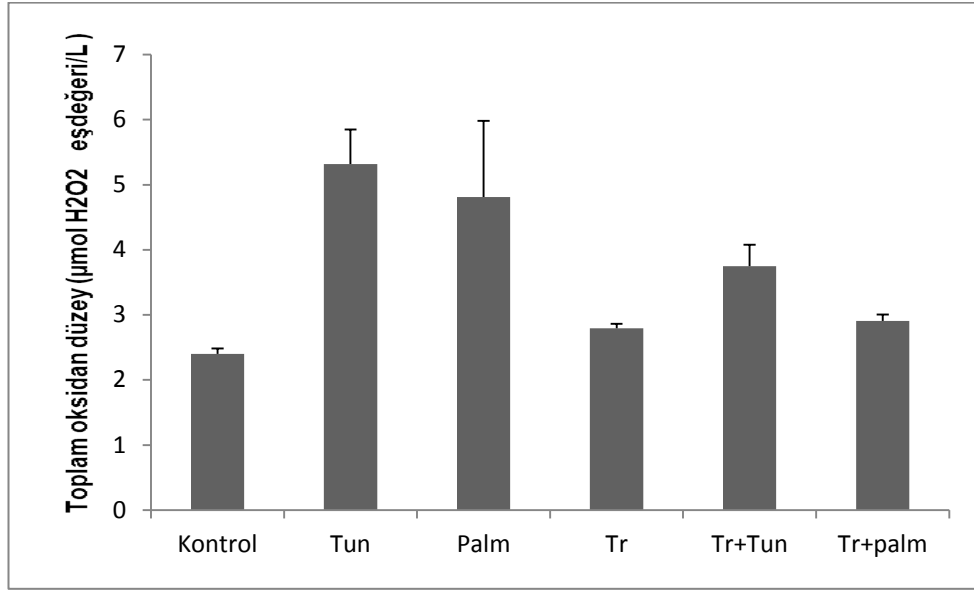
Şekil 4.18’de görülebileceği gibi linoleik asit tek başına SIRT1 aktivitesinde artışa sebep olmaktadır. Ancak linoleik asitin bu etkisi tunikamisin veya palmitik asitin SIRT1 aktivitesini artırıcı etkilerini değiştirmemekte, herhangi bir aditif etki de gözlenmemektedir.



Şekil 4.18. ER stresi oluşturulmuş hücrelerde linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi.

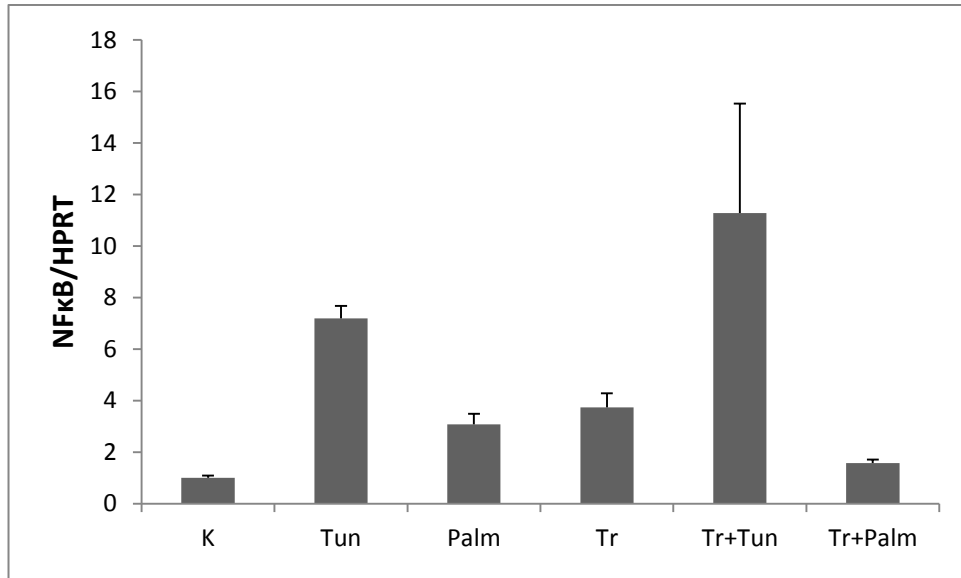
4.8. HepG2 Hücrelerinde ER Stresinin Oksidatif Stres ve İnflamasyona Etkisi

Şekil 4.19 10 µg/mL tunikamisin ve 1000 µM palmitik asit uygulanan hücrelerdeki oksidatif stres düzeyini ve transfeksiyonun etkisini göstermektedir. Tunikamisin uygulaması hücrelerdeki oksidatif stresi artırmaktadır. Visfatin ekspresyonunun artırılması ise oksidatif stresi azaltıcı bir etki göstermektedir.



Şekil 4.19. Visfatin ekspresyon artışının ve ER stresinin hücre içi oksidatif strese etkisi.

ER stresi arttığında oksidatif stres artışının yanı sıra inflamatuvar süreçlerde de bir artış olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda inflamasyon belirteci olarak NFκB ekspresyonu incelenmiştir. Ancak NFκB ekspresyon düzeylerinin diğer genlerle karşılaştırıldığında çok düşük düzeyde kaldığı ve aynı koşul için yapılan ölçümler arasında büyük farklar olabildiği görülmüştür. O nedenle bazı sonuçlarda tutarsızlıklar ortaya çıkmıştır.

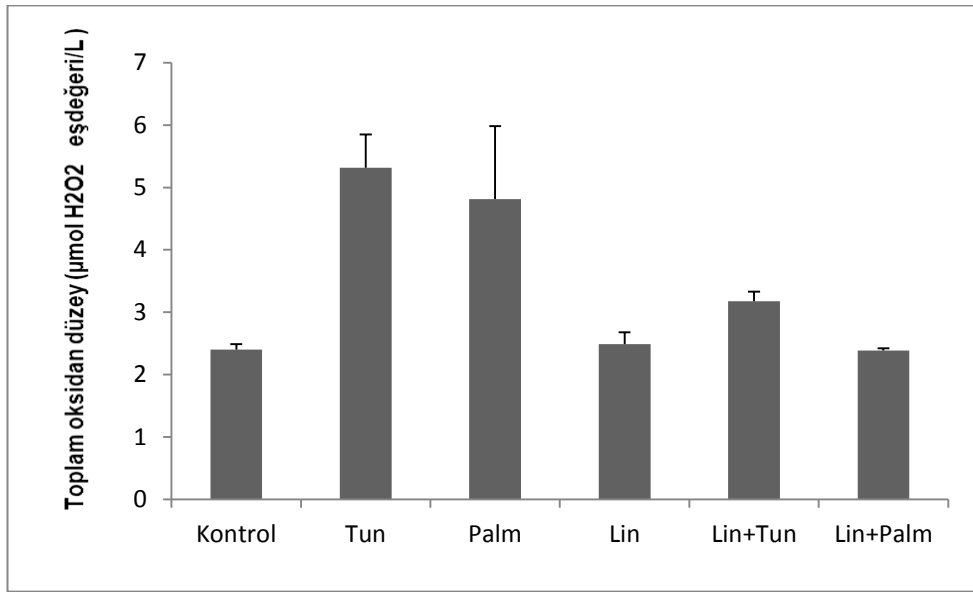


Şekil 4.20. Visfatin ekspresyon artışının ve ER stresinin NFκB ekspresyonuna etkisi.

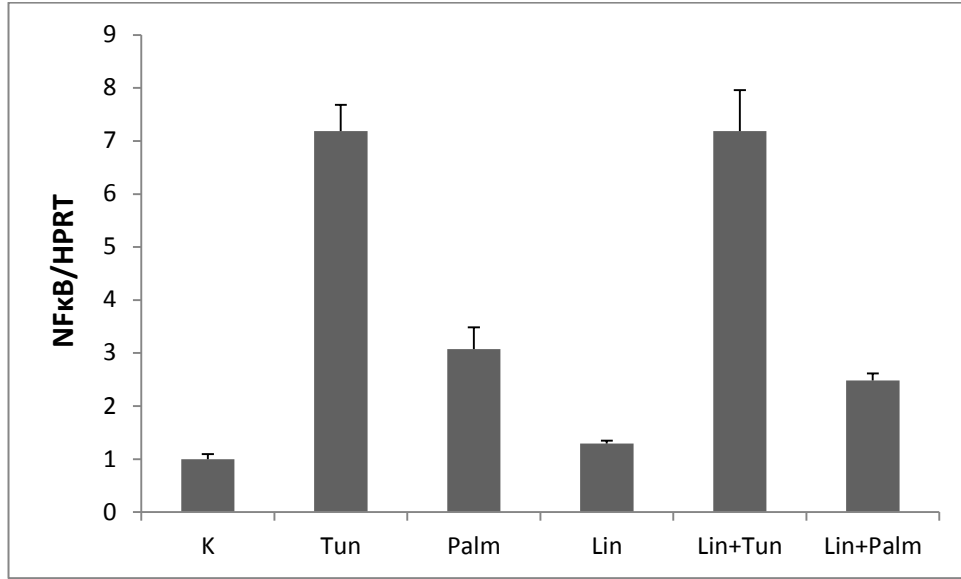
Şekil 4.20’de görülebileceği gibi tunikamisin, palmitik asit ve transfeksiyon uygulamaları NFκB ekspresyonunu artırmaktadır. Transfeksiyon ile hücredeki visfatin düzeyinin artırılması palmitik asitin inflamasyonu artırıcı etkisini azaltmıştır. Ancak tunikamisinin etkisini ne yönde etkilediği belirgin değildir çünkü farklı sonuçlar elde edilmiş, o nedenle de standart sapması yüksek çıkmıştır.

4.8.1 Visfatin ekspresyon artışı ve linoleik asitin hücre içi oksidatif stres ve inflamasyona etkisi

Daha önce Şekil 4.19’da tunikamisin ve palmitik asit uygulamalarının hücrelerdeki oksidatif stres düzeyini artırdıkları gösterilmişti. Linoleik asit uygulaması ile hem tunikamisin, hem de palmitik asit tarafından artırılan oksidatif stres azalmıştır (Şekil 4.21). Linoleik asit ayrıca, palmitik asitte daha belirgin olmak üzere ER stresi ile artan NFκB ekspresyonunu da azaltmaktadır (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. ER stresi oluşturulmuş hücrelerde linoleik asitin hücre içi oksidatif strese etkisi.

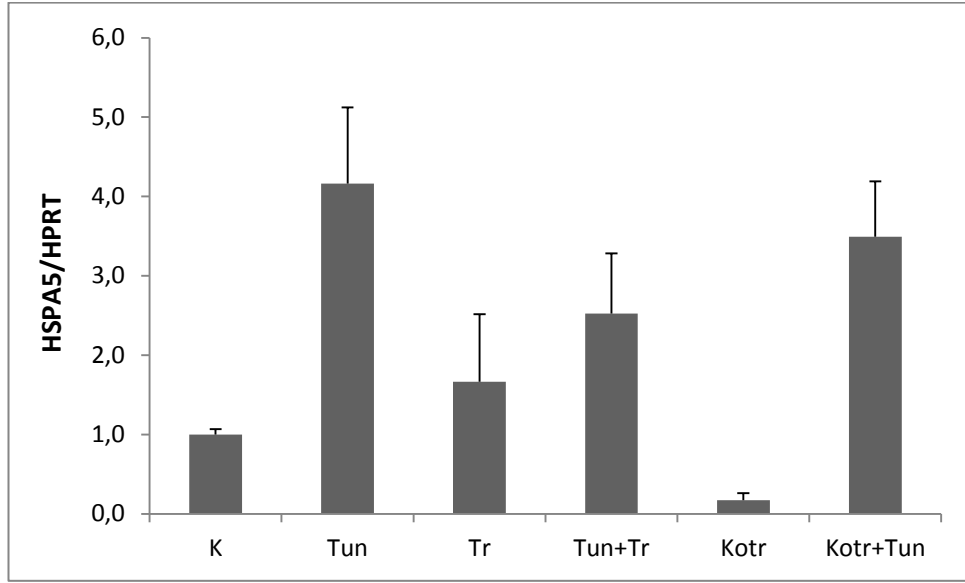


Şekil 4.22. ER stresi oluşturulmuş hücrelerde linoleik asitin NFκB ekspresyonuna etkisi.

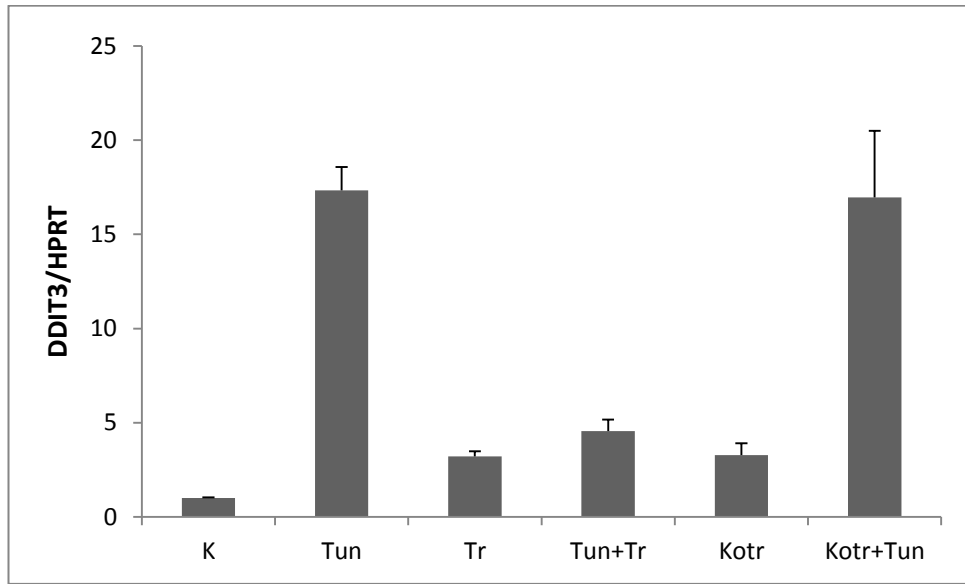
4.9. SIRT1 Ekspresyonu Susturulan HepG2 Hücrelerinde ER Stresine Bağlı Değişiklikler

4.9.1. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde ER stresine bağlı değişiklikler

HepG2 hücrelerinde SIRT1 ekspresyonu RNA interferansı yöntemi ile (SIRT1'e özgü siRNA kullanılarak) susturulmuştur. Çalışmamızın hipotezinde visfatinin ER stresini SIRT1 aktivitesini artırıcı etkisi ile azalttığı yer almaktadır. Bunu sınamak amacı ile SIRT1 ekspresyonu susturularak visfatinin koruyucu etkisinin ortadan kalkıp kalkmadığı incelenmiştir. Şekil 4.23 ve 4.24'de görülebileceği gibi visfatin transfeksiyonu tunikamisin uygulaması ile artan HSPA5 ve DDDIT3 ekspresyonlarını azaltmakta, yani ER stresine karşı koruyucu etki göstermektedir.



Şekil 4.23. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının HSPA5 ekspresyonuna etkisi.



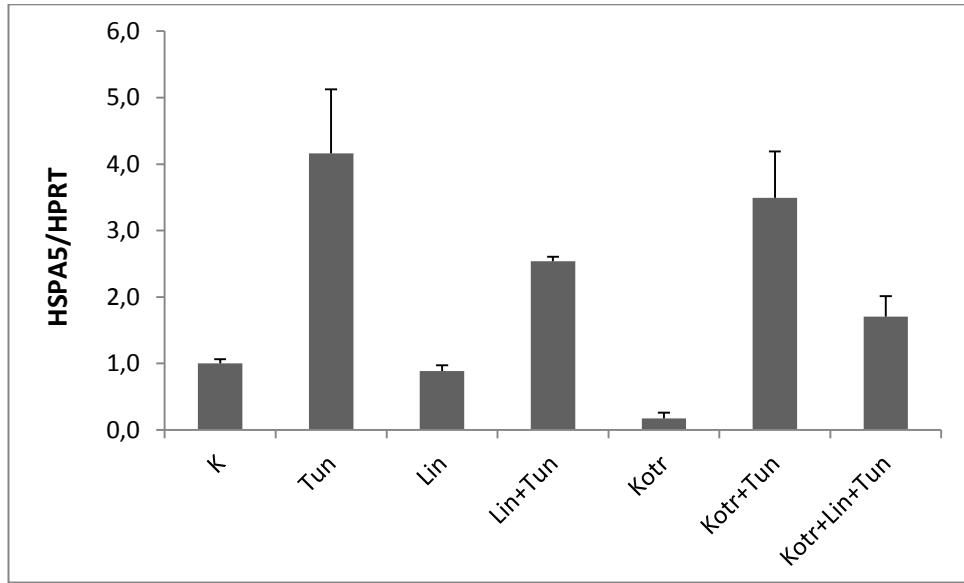
Şekil 4.24. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının DDIT3 ekspresyonuna etkisi.

Daha önce de göstermiş olduğumuz bu sonuca ek olarak siRNA uygulaması yapıldığında (Kotr+Tun: Kotransfeksiyon+tunikamisin, kotransfeksiyon visfatin plazmidi ve SIRT-1 siRNA'sının birlikte transfekte edildikleri koşulu tanımlamaktadır) visfatinin tunikamisin ile uyarılan ER stresini azaltıcı etkisi ortadan

kalkmakta, yani SIRT1 ekspresyonunun susturulması visfatinin koruyucu etkisini olumsuz etkilemektedir.

4.9.2. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde linoleik asitin ER stresine etkisi

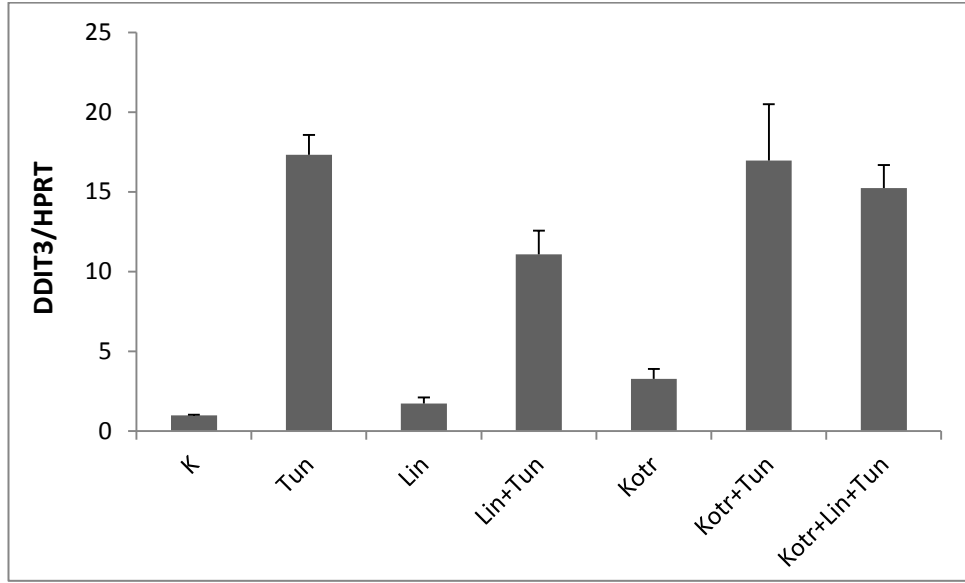
Linoleik asit tunikamisinin ER stresini uyarıcı etkisini azaltmakla kalmamakta, ayrıca siRNA uygulaması ile kaybedilen visfatin transfeksiyonunun koruyucu etkisini de telafi etmektedir (Şekil 4.25 ve 4.26, Kotr+Lin+Tun).



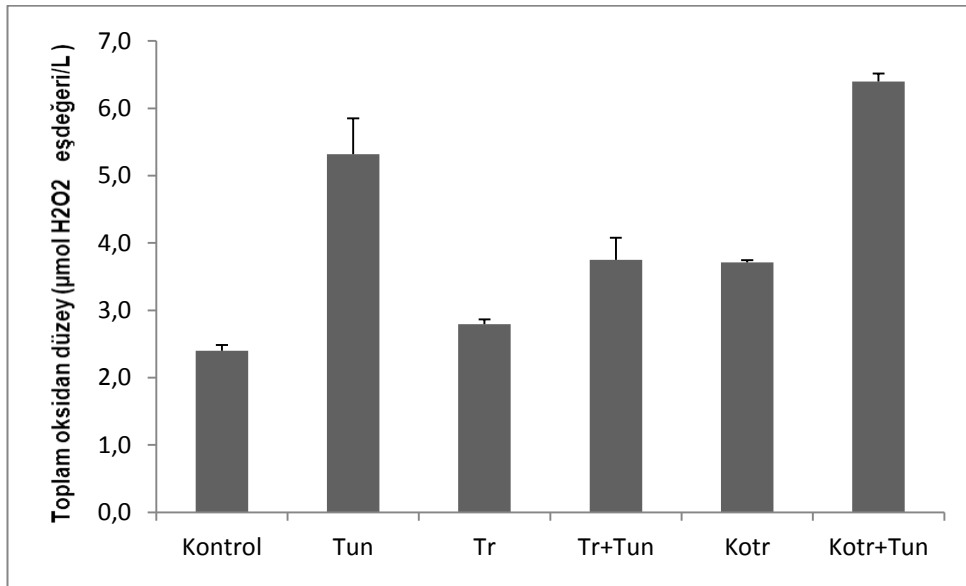
Şekil 4.25 SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin HSPA5 ekspresyonuna etkisi.

4.9.3. SIRT1 ekspresyonu susturulan HepG2 hücrelerinde ER stresinin hücre içi oksidatif stres ve inflamasyona etkisi

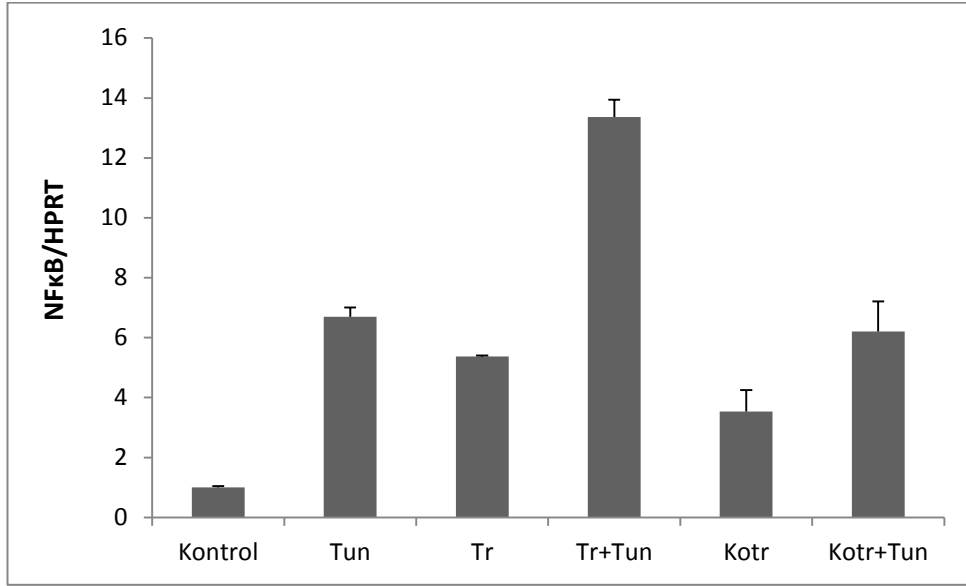
SIRT1 ekspresyonunun susturulması visfatinin ER stresi ile artan oksidatif stresi azaltıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır (Şekil 4.27, Kotr+Tun). Ancak NFκB ekspresyonuna etkisi yoktur (Şekil 4.28).



Şekil 4.26. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatın ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin DDIT3 ekspresyonuna etkisi.



Şekil 4.27. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatın ekspresyonunun artırılmasının hücre içi oksidatif strese etkisi.

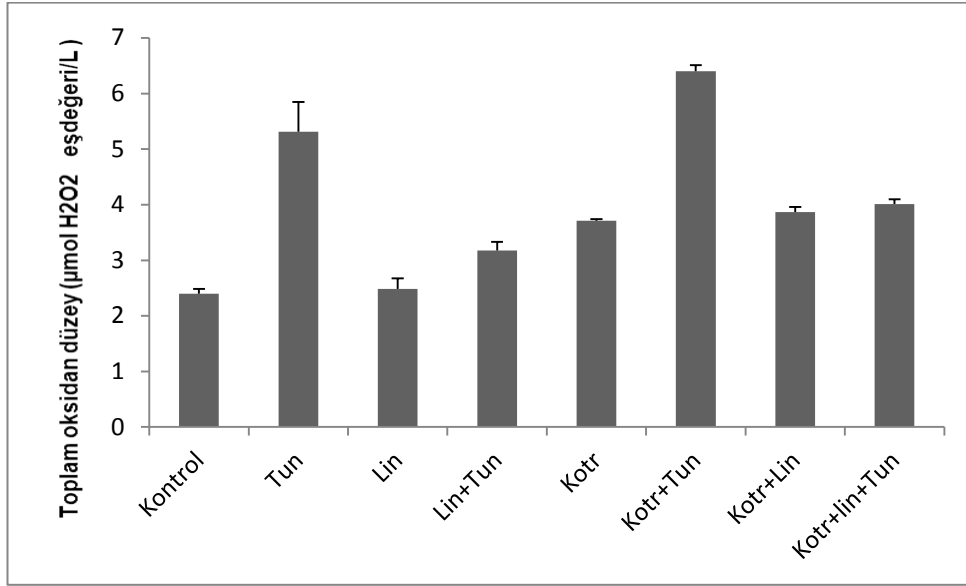


Şekil 4.28. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının NFκB ekspresyonuna etkisi.

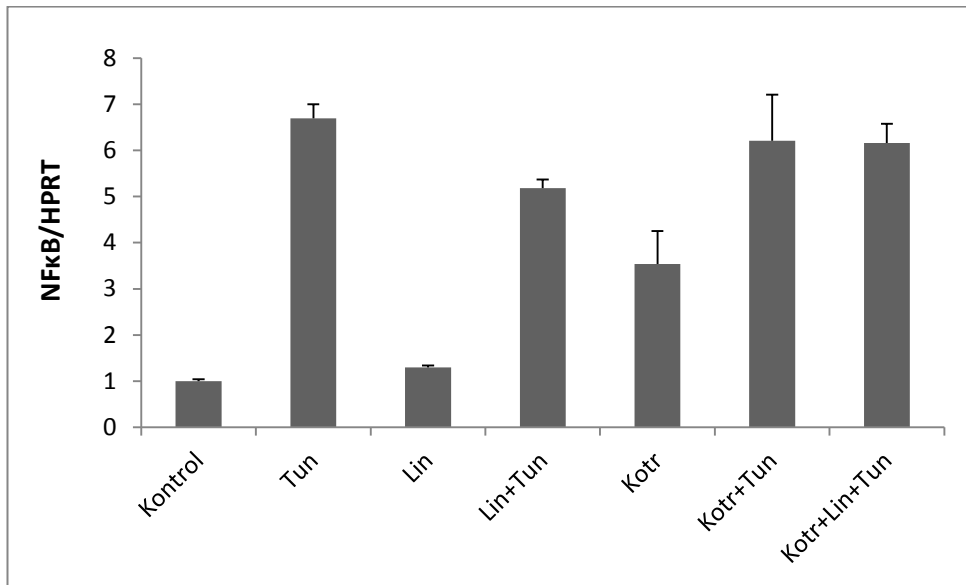
4.9.4. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde linoleik asitin hücre içi oksidatif strese ve inflamasyona etkisi

Linoleik asit tunikamisinin oksidatif stresi artırıcı etkisini azaltmakta ve siRNA uygulaması ile kaybedilen visfatin transfeksiyonunun koruyucu etkisini de telafi etmektedir (Şekil 4.29, Kotr+Lin+Tun).

SIRT1'in susturulmasının NFκB ekspresyonuna bir etkisi olmadığı için linoleik asite özgü bir etki de gözlenmemiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.29. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin hücre içi oksidatif strese etkisi.



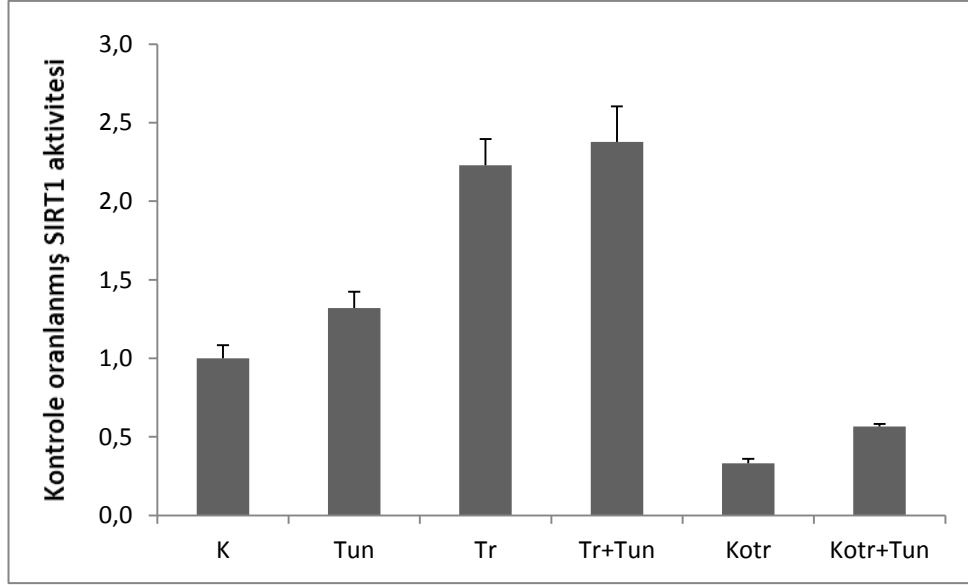
Şekil 4.30. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin NFκB ekspresyonuna etkisi.

4.9.5. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan

HepG2 hücrelerinde ER stresinin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.31’de görüldüğü gibi siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde (kotransfeksiyon, Kotr) kontrol ile karşılaştırıldığında SIRT1 aktivitesi önemli

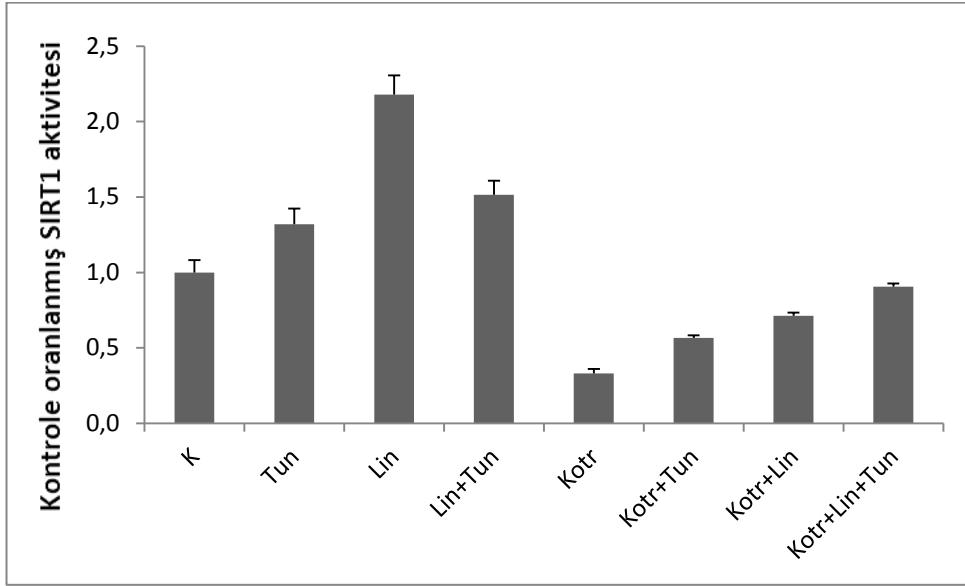
oranda azalmıştır. Bu sonuç siRNA uygulamasının başarılı olduğunu ve SIRT1 ekspresyonunun susturulduğunu göstermektedir. Tunikamisin ve transfeksiyon uygulamaları SIRT1 aktivitesini artırdıkları halde, kotransfeksiyon yapılan hücrelerde siRNA uygulamasına bağlı olarak SIRT1 protein düzeyi çok azaldığı için tunikamisinin aktiviteyi artırıcı etkisi de izlenmemektedir (Şekil 4.31, Kotr+Tun).



Şekil 4.31. SIRT1 ekspresyonunun susturulması ve visfatin ekspresyonunun artırılmasının SIRT1 enzim aktivitesine etkisi.

4.9.6. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan HepG2 hücrelerinde linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi

Linoleik asit tek başına SIRT1 aktivitesinde önemli bir artışa sebep olmaktadır. Ancak SIRT1 ekspresyonunun susturulduğu hücrelerde linoleik asit SIRT1 aktivitesinde bir miktar iyileşme sağlasa bile aktiviteyi kontrol hücrelerinin düzeyine çıkaramamaktadır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. SIRT1 ekspresyonu susturulan ve visfatin ekspresyonu artırılan hücrelerde linoleik asitin SIRT1 enzim aktivitesine etkisi.

5. TARTIŞMA

Obezite, son yıllarda dünyada olduğu gibi ülkemizde de giderek yaygınlaşan ve başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere yol açtığı komplikasyonlarla sağlık sistemimize morbidite-mortalite ve maddi kaynak yönünden getirdiği yükler bakımından önemli olan toplumsal bir sağlık sorunudur. Metabolik sendromun en önemli bileşeni olan obezite, diğer bileşenlere zemin hazırlayıcı nitelik taşımaktadır. Bu nedenle yağ dokusunun kardiyovasküler risk faktörleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda büyük artış olmuştur.

Obezite, en genel anlamıyla enerji metabolizmasında ve yağ dokusunda metabolik aksaklıklara yol açar. Obeziteye bağlı komplikasyonların nedeni, diyetle alınan gıda miktarının günlük enerji gereksiniminin çok üzerinde olmasıdır. Aşırı beslenmenin sorunlara neden olabilmesi için sürekli olması gerekir.

Obeziteye bağlı patolojik durumlar, önce yağ dokusunda izlenir. Yağ dokusunda ortaya çıkan insülin direnci, adipositlerin dolaşımında serbest bulunan yağ asitlerini hücre içine alıp triaçilgliserol olarak depolama kapasitelerini azaltır (187). Dolaşımında artan serbest yağ asitleri, enerji metabolizması için önem taşıyan dokularda ER stresi ve oksidatif stres yaratır. Lipitlerin bu süreçte yarattığı hasar genel olarak lipotoksisite olarak adlandırılır (99). Yağ dokusunda işlev bozukluğu geliştiğinde aşırı gıda alımı sürdükçe, karaciğerden yağ dokusuna lipit transportu tam olarak yapılamadığından karaciğer ve portal sistemin lipit yükü daha da artar. Bu durum, hepatositlerde hücre içinde ve omental yağ dokusunda lipit depolanmasına yol açar. Omental yağ dokusunun büyümesi viseral adipozite olarak tanımlanır. Viseral adipozite, viseral adipositlerin karaciğer ile aktif ilişki içinde olması ve metabolik etkinliğinin subkutan adipositlerden daha fazla olması nedeniyle obezite komplikasyonlarını anlamak adına subkutan adipoziteden daha önemli ve izlenmeye değerdir.

Obezitede adipokinlerin üretim düzeyi ve salgılanma düzeni değişir. Bazı adipokinler fizyolojik olarak koruyucu, ancak patolojik koşullarda ve miktarlarda zararlı olabilir. Obezite ile artan adipokinler, ortaya çıkan ER stresi, oksidatif stres ve glukolipotoksisite kronik olarak ve düşük düzeyde inflamasyonun uyarılmasına neden olur (12). Adipokinlerin bir kısmı ise, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda koruyucu etki gösterir.

Visfatin, deri altı ve viseral yağ dokularındaki gen ekspresyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, viseral yağ dokusunda çok daha yüksek oranlarda yapıldığı gösterilmiş ve o nedenle de visfatin adı verilmiş olan bir proteindir (142). Visfatin daha önce, erken B hücreleri için -kök hücre faktörü ve IL-7 ile sinerjik çalışan- bir büyüme faktörü olarak tanımlanmış ve PBEF adı verilmiştir (144). Aslında işlevsel açıdan visfatin, NAD sentezi yolağında rol alan enzimlerden biridir (nikotinamid fosforibozil transferaz) (143). Daha önceleri memelilerde NAD metabolizması tam olarak bilinmezken, artık visfatinin NAD metabolizmasında hız kısıtlayıcı basamakta yer alan enzim olduğu bilinmektedir (6,67). NAD ise, hücredeki hemen her metabolik yolda rol alan bir koenzimdir. Bunun yanı sıra NAD, kovalent protein modifikasyonları (ADP ribozilasyonlar) için ve sirtuinler gibi NAD kullanan pek çok enzim için substrattır ve çeşitli düzenleyici moleküllerin sentezinde başlangıç molekülüdür (154,188). Visfatin ekspresyonunun viseral yağ dokusunda yüksek olmasına ek olarak, obez kişilerin serumlarında visfatin düzeyleri artmış olarak bulunmuş ve yapılan in vivo çalışmalarda insülin direncini azaltarak kan şekerini düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir (142,189,190). Ancak, hücre içinde etkili olan ve normal koşullarda salgılanmayan bir proteinin bu tip bir etki göstermesi tartışmalara sebep olmuştur (6,191,192). Bu sebeple adipokin olarak nitelendirilen visfatinin, insülin reseptörü ile -insülin bağlanma bölgesi dışında bir bölge üzerinden- etkileştiği ve insülin reseptörünün sinyal yolağını harekete geçirerek etkisini gösterdiği ileri sürülmüştür (142,189).

Visfatin hücre içi bir enzimdir ve pek çok metabolik yoldaki koenzimlerin yapısına giren NAD sentezinde önemli bir basamağı katalizlemektedir. Visfatinin viseral yağ dokusunda sentezlendiğinin ve glukoz metabolizmasına etki ederek insülin direncini azaltıcı, yani kan şekerini düşürücü etki gösterdiğinin ortaya çıkması, bir yandan yeni bir adipokin olarak tanımlanmasına, öte yandan da etki mekanizmasına yönelik çalışmaların yapılmasına yol açmıştır. Ancak visfatinin adipokin olduğu savından yola çıkılarak yapılan çalışmalar, hücre içi bir enzim olan visfatinin, yine hücre içi hedefleri olması gerektiği gerçeğini ihmal etmişlerdir. Bizim bu çalışmadaki hipotezimiz visfatinin hücre içi hedefleri olduğu ve insülin direncine etkili olduğuna göre de bu hedeflerden birinin endoplazmik retikulum stresi olabileceği yönündeydi. Bu durumda ER stresinde visfatin sentezinin

artabileceği ve visfatinin de NAD-bağımlı sirtuinler ve PPAR γ üzerinden olumlu etkilerini gösterebileceği düşünöldü. Dolayısıyla bu çalışmada; glukoz metabolizmasında, özellikle de insölin direncinin gelişmesinde önemli rolü olan ER stresi ile visfatin ekspresyonu arasındaki karşılıklı ilişkinin incelenmesi ve visfatin etki yolunda rol alması olası moleköller (sirtuin 1, PPAR γ gibi) üzerinden insölin direncini azaltan etkinin moleköler mekanizmasının tanımlanması amaçlandı.

Çalışmamızda insan kaynaklı karaciğer hücrelerinin (HepG2) költürü yapılmıştır. Karaciğer hücrelerinin seçilmiş olmasının nedeni, karaciğerin metabolik olarak çok aktif bir organ olması, karaciğer hücrelerinin glukoz metabolizmasında önemli role sahip olması ve karaciğerin metabolik sendromdan en çok etkilenen organ olmasıdır. HepG2 hücreleri normal karaciğer hücreleri ile benzerliklerinin olması ve literatürde benzer çalışmalarda sıklıkla kullanılmaları nedeniyle çalışmamızda tercih edilmişlerdir. Bu hücreler iyi farklılaşmış bir insan hepatoselöler karsinomunun biyopsi örneğinden elde edilmiştir (193). Plazma proteinlerini, safra asitlerini, lipoprotein ve apolipoproteinleri sentezleyebildikleri gösterilmiştir (194-196). Çoğalma özellikleri ve salgıladıkları proteinler nedeniyle özellikle lipit metabolizması ile ilgili işlevlerin incelenmesi amacıyla kullanılacakları belirtilmiştir (197).

Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde tunikamisin kullanılarak ER stresi oluşturulması amaçlanmıştır. Tunikamisin, ökaryotik hücrelerde proteinlerin asparajin üzerinden N-glikolizasyonunu inhibe ederek posttranslasyonel modifikasyonunu bozan ve hatalı protein konsantrasyonunu artırarak ER stresini uyaran bir nükleotid antibiyotik grubudur (198,199). Tunikamisinin hem hücre içi glutasyon düzeyini düşürerek, hem de neden olduğu ER stresi ile reaktif oksijen türlerini artırarak oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (200). Reaktif oksijen türleri, inflamatuvar sürecin erken evrelerinde NF κ B'yi aktive ederek inflamasyonu uyandır. Bu nedenle tunikamisinin ER stresi oluşturan ancak hücre canlılığını etkilemeyen bir dozunun kullanılması önemlidir ve bunun belirlenebilmesi için doz-bağımlı bir sitotoksisite çalışması gerçekleştirilmiştir. Literatürde tunikamisin 1-10 μ g/ml dozlarda kullanıldığı için çalışmaya öncelikle bu doz aralığında başlanmış, ancak bu dozlarda sitotoksisite görülmemesi nedeniyle emin olmak için daha yüksek dozlar da denenmiştir. 2,5-25 μ g/ml doz aralığında önemli bir sitotoksisite söz

konusu değildir. Tunikamisinin potansiyel sitotoksik etkisini görmek amacıyla doz 250 µg/mL'ye çıkarıldığında ise hücrelerin yaklaşık %50 oranında canlılıklarını yitirdikleri gözlenmiştir.

Obezitede, dolaşımdaki serbest yağ asidi düzeylerinin ve yağ dokusu dışı dokularda, özellikle karaciğerde lipit birikiminin arttığı bilinmektedir. Fazla lipitin metabolik strese neden olduğu, obezitede insülin direncine yol açtığı saptanmıştır (109). İnsülin direnci ortaya çıktığında, hiperlipiteminin karaciğer hücrelerinde ER stresini uyardığı, JNK fosforilasyonunu artırarak inflamasyon ve apoptozise yol açtığı görülmüştür (29). Bu ilişki, son yıllarda palmitik asit gibi uzun zincirli, doymuş yağ asitleriyle hepatositlerde yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (110). Bütün bu bilgiler ışığında, doymuş bir yağ asidi olan palmitik asitin in vivo koşullarda doymuş yağ asitleriyle oluşan ER stresini deneysel olarak göstermekte uygun olması nedeniyle çalışmamızda Tunikamisin ile birlikte ER stresini oluşturmak üzere kullanılmıştır. Linoleik asit ise koruyucu etkileri olan bir doymamış yağ asidi olduğundan, visfatin ekspresyon artışı ile koruyucu etkilerinin karşılaştırılması amacıyla seçilmiştir. Öncelikle, doz-bağımlı sitotoksikite çalışması ile linoleik asit ve palmitik asitin 1000 µM konsantrasyonları çalışma için uygun doz olarak belirlenmiştir.

Hücrede ER stresini sırasında moleküler şaperonlardan GRP78 (HSPA5) ve GADD153 (DDIT3) ekspresyonunun artması beklenmektedir (16,41). Tunikamisin HepG2 hücrelerinde ER stresini belirteci olan bu genlerin ekspresyonunu yaklaşık 17 kat artırmıştır. Çalışmamızda, yüksek dozlarda ER stresini artırdığı bilinen doymuş yağ asidi palmitik asit de HSPA5 ekspresyonunu düşük düzeyde (yaklaşık iki kat) artırmış, ancak DDIT3 ekspresyonuna etkisi daha belirgin olmuştur (yaklaşık 8 kat). ER stresini ayrıca hücrelerde visfatin ekspresyonunu da artırmıştır. Transfeksiyon ile hücredeki visfatin miktarının artırılması ise ER stresinden koruyucu bir etki göstermiş, HSPA5 ve DDIT3 genlerinin ekspresyonları transfekte edilen hücrelerde azalmıştır. Bu sonuçlarla çalışmamız karaciğer hücrelerinde ER stresini ile visfatin ekspresyonu arasında karşılıklı bir etkileşim olduğunu göstermiştir. Bir proteinin ekspresyonu ER stresini uyaran bir koşul ile artmakta ise, bu proteinin görevi ER stres yanıtını artırmak ya da stres durumunu ortadan kaldırmak ve hücrenin sağkalımını artırmak olabilir. Dolayısıyla visfatinin, hücrenin ER stresinden

korunması amacıyla üretilen bir faktör olabileceği düşünülmüştür. Daha önce visfatin ile ER stresi arasındaki ilişki, sadece makrofajlarda ve hücre dışına salgılanan eNampt ile yapılan bir çalışmada incelenmiş ve eNampt'ın makrofajlarda ER stresi ile uyarılan apoptozisi baskılayarak koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (201). Bu etki farklı bir hücrede gösterilmiş olsa da visfatinin olumlu etkisi bakımından çalışmamızı destekler niteliktedir. Ancak, makrofajların obezitede yağ dokusunda inflamasyona ve insülin direncine neden olduğu ve ateroskleroz patogenezinde dönüştükleri köpük hücre formunda lezyon gelişimini ilerlettiği bilinmektedir (202,203). O nedenle makrofajların sağkalımını artıran visfatinin obezite sürecinde inflamasyonun sürdürülmesine ve kronikleşmesine yardımcı olarak metabolik açıdan olumsuz bir faktör olabileceği de öne sürülmüştür. Yapılan klinik bir çalışmada ise karaciğer yağlanması durumunda karaciğer visfatin ekspresyonu sağlıklı bireylere göre daha düşük olarak bulunmuştur (204). Karaciğer yağlanmasıyla birlikte görülen steatohepatit durumunda artan hepatosit apoptozisi, azalan visfatin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiş ve visfatinin hepatositlerde apoptozise karşı koruyucu etkilere sahip olduğu önerilmiştir.

Çalışmamızda ER stresinin oksidatif strese ve inflamasyona etkisi de araştırılmıştır. Artan reaktif oksijen türleri üretimi ile endojen antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizliğin yarattığı bir durum olan oksidatif stres, hücre fenotipinde hasar yapar. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stresin obeziteye bağlı olarak metabolik sendromun gelişmesinde önemli rolü vardır (205). Çalışmamızda, tunikamisın uygulaması HepG2 hücrelerindeki oksidatif stresi artırmış, visfatin ise koruyucu bir etki göstermiştir. Bu sonuç da ER stresi ile oksidatif stres arasındaki ilişki göz önüne alındığında beklenen bir sonuçtur çünkü visfatin ER stresini azaltmaktadır. Ancak literatürde visfatinin oksidatif stres ve inflamasyon açısından olumsuz etkilerine de rastlanmaktadır. Alzheimer hastalığında visfatinin rolünü açıklamak üzere yapılan çalışmalarda visfatinin oksidatif stresi uyardığı, kan-beyin bariyerine hasar verdiği ve monosit, nötrofil ve diğer lökositlerin kemotaksis ile lezyon alanına çekilmesini artırdığı bulunmuştur (206). Başka bir çalışmada ise CC12 myotüplerinde NFκB aracılığıyla oksidatif stresi uyardığı gösterilmiştir (207). Ancak bu çalışmalarda oksidatif stres ve

inflamasyon ER stresi ile ilişkilendirilmediği için çalışmamızdaki koşullarla karşılaştırılmasının çok doğru olmadığı düşünülmüştür.

Sirtuin-1 enzimi NAD-bağımlı bir enzim olduğu için, NAD sentezinde rol alan visfatinin hücrede artmasının SIRT1 aktivitesini artırması beklenir (166). Çalışmamızda hem visfatin transfekte edilen, hem de tunikamisin veya palmitik asit uygulanan hücrelerde SIRT1 enziminin aktivitesi artmıştır. ER stresi oluşturulan hücrelerde de SIRT1 enziminin aktivitesinde artış olmasının visfatin artışına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Transfekte edilen hücrelere tunikamisin veya palmitik asit uygulaması yapıldığında ise SIRT1 aktivitesinin daha da arttığı gözlenmiş ve karaciğer hücrelerinde NAD-aracılı visfatin etkisinin eklenebilir (aditif) olabileceği düşünülmüştür. SIRT1'in karaciğerdeki etkileri ile ilişkili yapılan bir çalışmada sonuçlarımızı destekleyen bir bulgu ortaya çıkmıştır. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde karaciğerde SIRT1 ekspresyonunun susturulmasının karaciğerde inflamasyonu ve ER stresini artırdığı, karaciğer yağlanmasının oluşumunu ve vücut ağırlığı artışını hızlandırdığı gösterilmiştir (208). SIRT1'in visfatin etki yolundaki rolünü daha iyi anlamak amacıyla çalışmamızda da benzer bir yaklaşım kullanılmış, visfatin ekspresyonu artırılmış hücrelerde SIRT1 ekspresyonu RNA interferansı yöntemi ile (SIRT1'e özgü siRNA kullanılarak) durdurularak ER stresi, oksidatif stres ve inflamasyonun nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Deneysel olarak protein ekspresyonu RNA interferansı yöntemi ile baskılandığında, söz konusu proteinin siRNA uygulanan hücrelerde kontrollere göre azaldığını göstermek gerekir ve bu genellikle Western blot yöntemi kullanılarak yapılır. Çalışmamız kapsamında iki ayrı firmadan (Sigma Prestige ve Cell Signaling) temin edilen güçlü antikorlarla SIRT-1 proteinindeki azalma gösterilmeye çalışılmış ancak normal hücrelerdeki protein ekspresyonunu dahi göstermek mümkün olmamıştır. Alınan ikinci antikor ile oldukça zayıf bantlar elde edilmiş ve siRNA uygulaması ile ekspresyonun azaldığı görülmüştür, ancak görüntü kalitesinin iyi olmaması nedeniyle bu sonuç çalışmamıza konmamıştır. Çalışmamızda SIRT1 aktivitesinin de izleniyor olması, ekspresyondaki baskılanmayı aktivite üzerinden izlememizi sağlamıştır. SIRT-1 ekspresyonunu baskılamak amacıyla siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde enzim aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında önemli oranda azalmaktadır. Bu sonuç siRNA uygulamasının başarılı olduğunu ve

SIRT1 ekspresyonunun susturulduğunu göstermektedir. Daha önceki deneylerimizde tunikamisin ve transfeksiyon uygulamaları SIRT1 aktivitesini artırdıkları halde, kotransfeksiyon yapılan hücrelerde siRNA uygulamasına bağlı olarak SIRT1 protein düzeyi çok azaldığı için aktiviteyi artırıcı etki de izlenmemekte ve bu da uygulamanın başarılı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın hipotezinde, visfatinin etki mekanizmasında SIRT1'in yer alması gerektiği bulunmaktadır. Visfatin transfeksiyonu tunikamisin uygulaması ile artan HSPA5 ve DDDIT3 ekspresyonlarını azaltırken (ER stresine karşı koruyucu etki) aynı zamanda SIRT-1 aktivitesini de artırmaktadır. Eğer bu artış ER stresinin azalmasıyla ilişkiyse, SIRT-1 ekspresyonu baskılandığında visfatinin ER stresinden koruyucu etkisinin ortadan kalkması beklenir. Gerçekten de siRNA uygulaması yapıldığında visfatinin ER stresini azaltıcı etkisinin ortadan kalktığı görülmüş ve SIRT1 ekspresyonunun susturulmasının visfatinin koruyucu etkisini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç, SIRT1'in visfatinin ER stresini azaltıcı etkisine aracılık ettiğini kanıtlamaktadır.

Sirtuin-1'in hedef substratlarından biri PPAR koaktivatörü olan PGC-1'dir (163,165). O nedenle çalışmamızın hipotezinde ayrıca SIRT1'in (ve dolayısıyla visfatinin) etkisine PPAR γ 'nın aracılık ettiği ve PPAR γ agonisti ligandların hücrelerde benzer etkilere yol açacağı da yer almaktadır. Linoleik asit PPAR grubu reseptörlerin agonistidir (209). Transfeksiyon yoluyla visfatin ekspresyonunun artırılmasının ER stresine karşı koruyucu olduğu gösterildikten sonra, literatürde bu etkisi daha iyi tanımlanmış olan linoleik asitin deney sistemimizde koruyucu etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Visfatin ekspresyonunun artırılmasının karaciğerde ve yağ dokusunda PPAR γ ekspresyonunu ve IRS-1'in tirozin fosforilasyonunu artırdığı yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (210). Visfatin geninin makrofajlarda PPAR γ 'nın hedef genlerinden biri olduğu ve PPAR γ aktivasyonu ile visfatin ekspresyonunun arttığı da literatürde yer almaktadır (211). Sonuçlarımız endojen bir PPAR γ ligandı olan linoleik asitin tunikamisin ve palmitik asit uygulamalarının ortaya çıkardığı ER stresini azalttığını göstermiştir.

Çalışmamızda ayrıca SIRT1'in susturulduğu koşullarda linoleik asitin ER stresine olan etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla, visfatin ekspresyonu artırılmış ve SIRT1 susturulmuş hücrelere linoleik asit eklendikten sonra ER stresi, oksidatif stres ve

inflamasyonun nasıl etkilendiği incelenmiştir. Linoleik asit tunikamisinin ER stresini uyarıcı etkisini azaltmakla kalmamakta, ayrıca siRNA uygulaması ile kaybedilen visfatin transfeksiyonunun koruyucu etkisini de telafi etmektedir. Bu sonuç SIRT1'in etkisine PPAR α 'nın aracılık edebileceğini işaret etmektedir. Aslında PPAR'lar arasında karaciğer hücrelerinde en fazla bulunan PPAR α 'dır ve linoleik asit PPAR α için PPAR γ 'dan daha güçlü bir agonisttir (209). Visfatinin hem PPAR γ ekspresyonunu artırması (210) hem de SIRT1'i aktive etmesi (166) nedeniyle, etkisine PPAR γ 'nın aracılık etmesi beklenebilir, ancak linoleik asitle elde edilen etkide PPAR α 'nın rolünün de önemli olabileceği unutulmamalıdır. PPAR α karaciğer hücrelerinde ekspresyonu en yüksek olan PPAR'dır ve transkripsiyonu düzenleyici etkisinde PGC-1'in katkısı vardır. SIRT1 geni susturulmuş farelerde PPAR α koaktivatörü PGC-1 α 'nın ekspresyonunun azaldığı (Vega, 2000) ve SIRT1'in karaciğer yağlanması ve yetmezliğinden koruyucu etkisinde PPAR α 'nın PGC-1 α aracılı aktivasyonunun rolü olduğu gösterilmiştir (208). Çalışmamızda linoleik asit endojen bir PPAR ligandı olduğu için tercih edilmiştir. Endojen olmayan özgül PPAR ligandlarının kullanılması, her reseptöre özgü farklı etkilerin tanımlanmasında yararlı olabilir.

Linoleik asit tek başına SIRT1 aktivitesinde önemli bir artışa sebep olmaktadır. Ancak linoleik asitin bu etkisi tunikamisin veya palmitik asitin SIRT1 aktivitesini artırıcı etkilerini değiştirmemekte, herhangi bir aditif etki gözlenmemektedir. SIRT1 ekspresyonunun susturulduğu hücrelerde ise linoleik asit SIRT1 aktivitesinde bir miktar iyileşme sağlasa bile kontrol hücrelerinin düzeyine çıkaramamaktadır. Bunun nedeni SIRT1 protein düzeyinin siRNA uygulanan hücrelerde çok düşük olmasıdır.

ER stresi arttığında oksidatif stres artışının yanı sıra inflamatuvar süreçlerde de bir artış olduğu bilinmektedir (106). Çalışmamızda inflamasyon belirteci olarak NF κ B ekspresyonu incelenmiştir. Ancak NF κ B ekspresyon düzeylerinin diğer genlerle karşılaştırıldığında çok düşük düzeyde kaldığı ve aynı koşul için yapılan ölçümler arasında büyük farklar olabildiği görülmüştür. O nedenle bazı sonuçlarda tutarsızlıklar ortaya çıkmıştır. Tunikamisin, palmitik asit ve transfeksiyon uygulamaları NF κ B ekspresyonunu artırmaktadır. Transfeksiyon ile hücredeki visfatin düzeyinin artırılması palmitik asitin inflamasyonu artırıcı etkisini

azaltmaktadır. Ancak standart sapmaların çok yüksek olması nedeniyle tunikamisinin etkisini değerlendirmek mümkün olmamıştır. Linoleik asit uygulaması ile hem tunikamisin, hem de palmitik asit tarafından artırılan oksidatif stres azalmıştır. Linoleik asit ayrıca, palmitik asitte daha belirgin olmak üzere ER stresi ile artan NFκB ekspresyonunu da azaltmaktadır. SIRT1 ekspresyonunun susturulması visfatinin ER stresi ile artan oksidatif stresi azaltıcı etkisini ortadan kaldırmaktadır, ancak NFκB ekspresyonuna etkisi yoktur. Linoleik asit tunikamisinin oksidatif stresi artırıcı etkisini azaltmakta ve siRNA uygulaması ile kaybedilen visfatin transfeksiyonunun koruyucu etkisini de telafi etmektedir. SIRT1'in susturulmasının NFκB ekspresyonuna bir etkisi olmadığı için linoleik asite özgü bir etki de gözlenmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlarımız şu şekilde özetlenebilir:

1. Kültürdeki insan kaynaklı hepatoselüler karsinom hücrelerinde ER stresi ile visfatin ekspresyonu arasında karşılıklı bir ilişki vardır: ER stresi tunikamisin ve palmitik asit ile uyarıldığında visfatin ekspresyonu artmakta ve artan visfatin ER stresini azaltmaktadır.

2. ER stresi hem tunikamisin, hem de palmitik asit ile uyarılabilmekte ve her iki durumda oksidatif stres ve inflamasyon da artmaktadır.

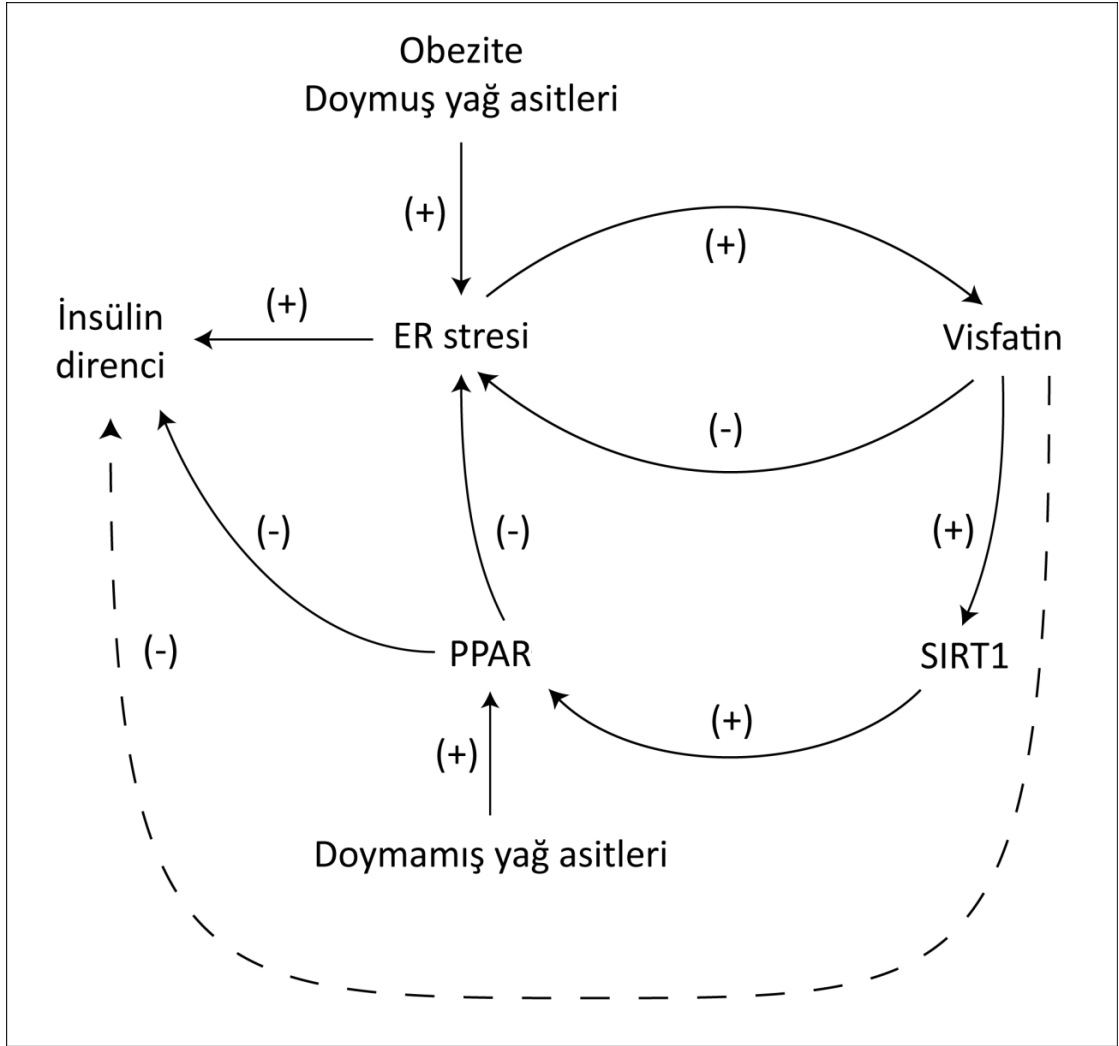
3. Transfeksiyon ile hücrelerdeki visfatin miktarının artırılması hem tunikamisin, hem de palmitik asit ile uyarılan ER stresine ve buna bağlı olarak artan oksidatif strese karşı koruyucu etki oluşturmaktadır.

4. Hem ER stresinin uyarılması hem de transfeksiyon ile visfatin miktarının artırılması SIRT1 aktivitesini artırmaktadır.

5. Visfatinin ER stresi ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisi, SIRT1 ekspresyonunun susturulmasıyla ortadan kalkar: Visfatin koruyucu etkisini SIRT1 aracılığıyla göstermektedir.

6. PPAR grubu nükleer reseptörlerin agonisti olan linoleik asit, ER stresi ve buna bağlı olarak artan oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruyucu etki göstermekte, visfatinin -SIRT1 ekspresyonu susturulduğunda kaybolan- koruyucu etkisini telafi etmektedir: SIRT1 koruyucu etkisini PPAR γ aracılığıyla gösteriyor olabilir.

Sonuçlarımızın ışığında visfatin ile ER stresi arasındaki karşılıklı etkileşimi ve visfatinin etki mekanizmasını açıklayan bir şema hazırlanmıştır (Şekil 6.1). Bu çalışma karaciğer hücrelerinde visfatinin ER stresini (ve büyük olasılıkla insülin direncini) azaltıcı etkisini etki mekanizmasında yer alan moleküllerle birlikte gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Ancak elde edilen sonuçların kültürdeki insan kaynaklı hepatoselüler karsinom hücreleri ile alındığı unutulmamalıdır. Çıkan sonuçların klinik yarara dönük, insülin direncini azaltıcı bulgularla desteklenebilmesi için *in vivo* çalışmalarla tekrar edilmeleri gerekmektedir.



Şekil 6.1. Visfatinin ER stresini ve muhtemel insülin direncini azaltıcı etkisinin moleküler mekanizması.

KAYNAKLAR

1. Onat, A., Ceyhan, K., Basar, O., Erer, B., Toprak, S., Sansoy, V. (2002) Metabolic syndrome: major impact on coronary risk in a population with low cholesterol levels--a prospective and cross-sectional evaluation. *Atherosclerosis*, 165 (2), 285-292.
2. Hotamisligil, G.S. (2008) Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 7, S52-54.
3. Lai, E., Bikopoulos, G., Wheeler, M.B., Rozakis-Adcock, M., Volchuk, A. (2008) Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (3), E540-550.
4. Subauste, A.R., Burant, C.F. (2007) Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293 (1), E159-164.
5. Kaneto, H., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuoka, T.A., Matsuhisa, M. ve diğ erleri. (2005) Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (8), 1595-1608.
6. Revollo, J.R., Grimm, A.A., Imai, S. (2007) The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr Opin Gastroenterol*, 23 (2), 164-170.
7. Schroder, M., Kaufman, R. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569 (1-2), 29-63.
8. Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., Lippincott-Schwartz, J. (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*, 273 (5276), 797-801.
9. Baumann, O., Walz, B. (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol*, 205, 149-214.
10. Wu, J., Kaufman, R.J. (2006) From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death and Differentiation*, 13 (3), 374-384.

11. Shen, X. (2004) The unfolded protein response? a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*.
12. Gregor, M.G., Hotamisligil, G.S. (2007) Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*.
13. Ron, D., Walter, P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8 (7), 519-529.
14. Pahl, H.L., Baeuerle, P.A. (1997) The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci*, 22 (2), 63-67.
15. Mollica, M.P., Lionetti, L., Putti, R., Cavaliere, G., Gaita, M., Barletta, A. (2011) From chronic overfeeding to hepatic injury: Role of endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21 (3), 222-230.
16. Brostrom, M.A., Prostko, C.R., Gmitter, D., Brostrom, C.O. (1995) Independent signaling of grp78 gene transcription and phosphorylation of eukaryotic initiator factor 2 alpha by the stressed endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 270 (8), 4127-4132.
17. Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101 (3), 249-258.
18. Rutkowski, D. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends in Cell Biology*, 14 (1), 20-28.
19. Rutkowski, D.T., Hegde, R.S. (2010) Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol*, 189 (5), 783-794.
20. Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., Shore, G.C. (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22 (53), 8608-8618.
21. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., Hayashi, H. (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J*, 24 (6), 1243-1255.

- 22.Mori, K. (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 101 (5), 451-454.
- 23.Yoshida, H. (2007) ER stress and diseases. *FEBS J*, 274 (3), 630-658.
- 24.Malhotra, J.,Kaufman, R. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18 (6), 716-731.
- 25.Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P.,Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2 (6), 326-332.
- 26.Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Okamura, M., Du, S., Kasai, A. ve diğ erleri. (2008) Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem*, 283 (7), 4252-4260.
- 27.Herr, I.,Debatin, K.M. (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98 (9), 2603-2614.
- 28.Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. ve diğ erleri. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287 (5453), 664-666.
- 29.Hotamisligil, G.S. (2005) Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2, S73-78.
- 30.Patil, C.,Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, 13 (3), 349-355.
- 31.Mori, K. (2009) Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *Journal of Biochemistry*, 146 (6), 743-750.
- 32.Cox, J.S., Shamu, C.E.,Walter, P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 73 (6), 1197-1206.

- 33.Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P. ve diğçerleri. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415 (6867), 92-96.
- 34.Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T. ve diğçerleri. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*, 16 (4), 452-466.
- 35.Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T.,Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*, 273 (50), 33741-33749.
- 36.Schroder, M.,Kaufman, R.J. (2006) Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. *Curr Mol Med*, 6 (1), 5-36.
- 37.Harding, H.P., Calfon, M., Urano, F., Novoa, I.,Ron, D. (2002) Transcriptional Andtranslationalcontrol in Themammalianunfoldedproteinresponse. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18 (1), 575-599.
- 38.Shiu, R.P., Pouyssegur, J.,Pastan, I. (1977) Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteinsin Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (9), 3840-3844.
- 39.Wooden, S.K.,Lee, A.S. (1992) Comparison of the genomic organizations of the rat grp78 and hsc73 gene and their evolutionary implications. *DNA Seq*, 3 (1), 41-48.
- 40.Kaplowitz, N., Than, T.A., Shinohara, M.,Ji, C. (2007) Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury. *Seminars in Liver Disease*, 27 (4), 367-377.
- 41.Lee, A.S. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35 (4), 373-381.
- 42.Oakes, S.A., Opferman, J.T., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J.,Scorrano, L. (2003) Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Pharmacol*, 66 (8), 1335-1340.

43. Urano, F., Bertolotti, A., Ron, D. (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 113 Pt 21, 3697-3702.
44. Todd, D.J., Lee, A.H., Glimcher, L.H. (2008) The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8 (9), 663-674.
45. Kohno, K. (2010) Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J Biochem*, 147 (1), 27-33.
46. Kapoor, A., Sanyal, A.J. (2009) Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *Clinics in Liver Disease*, 13 (4), 581-590.
47. Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. ve diğerleri. (2001) Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J*, 355 (Pt 1), 19-28.
48. Kaufman, R.J. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110 (10), 1389-1398.
49. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 7 (9), 880-885.
50. Fribley, A., Zhang, K., Kaufman, R.J. (2009) Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*, 559, 191-204.
51. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S. (2006) Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*, 11 (1), 5-13.
52. Ji, C. (2008) Dissection of endoplasmic reticulum stress signaling in alcoholic and non-alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*, 23 Suppl 1, S16-24.
53. Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T. ve diğerleri. (2001) 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*, 276 (17), 13935-13940.
54. Martinez, J.A., Zhang, Z., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K., Larner, S.F. (2010) Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER

- stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis*, 15 (12), 1480-1493.
- 55.Lin, J.H., Walter, P.,Yen, T.S. (2008) Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 3, 399-425.
- 56.Gentile, C., Frye, M.,Pagliassotti, M. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal*.
- 57.Ozcan, U. (2004) Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*, 306 (5695), 457-461.
- 58.Su, H.L., Liao, C.L.,Lin, Y.L. (2002) Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J Virol*, 76 (9), 4162-4171.
- 59.Hotamisligil, G.S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*, 16 (4), 396-399.
- 60.Salminen, A., Kauppinen, A., Suuronen, T., Kaarniranta, K.,Ojala, J. (2009) ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*, 6, 41.
- 61.Mottillo, S., Filion, K.B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P. ve diğeri. (2010) The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 56 (14), 1113-1132.
- 62.Reaven, G.M. (1991) Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipitemia, and coronary heart disease. *Am Heart J*, 121 (4 Pt 2), 1283-1288.
- 63.Reaven, G.M. (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37 (12), 1595-1607.
- 64.Reaven, G.M. (1992) Syndrome X. *Blood Press Suppl*, 4, 13-16.
- 65.Reaven, G. (2002) Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*, 106 (3), 286-288.
- 66.Holt, R.I. (2005) International Diabetes Federation re-defines the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*, 7 (5), 618-620.

- 67.Revollo, J.R. (2004) The NAD Biosynthesis Pathway Mediated by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Regulates Sir2 Activity in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (49), 50754-50763.
- 68.Van Gaal, L. (2010) Metabolic syndrome--from controversies to ectopic fat syndrome. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 165 (3-4), 159-160.
- 69.Vazquezvela, M., Torres, N.,Tovar, A. (2008) White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*, 39 (8), 715-728.
- 70.Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P.,Spiegelman, B.M. (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14 (11), 1293-1307.
- 71.Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L. ve diğ erleri. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 377 (6549), 530-532.
- 72.DiGirolamo, M., Fine, J.B., Tagra, K.,Rossmann, R. (1998) Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol*, 274 (5 Pt 2), R1460-1467.
- 73.Hauner, H., Skurk, T.,Wabitsch, M. (2001) Cultures of human adipose precursor cells. *Methods Mol Biol*, 155, 239-247.
- 74.Sethi, J.K. (2007) Is PBEF/visfatin/Nampt an authentic adipokine relevant to the metabolic syndrome? *Curr Hypertens Rep*, 9 (1), 33-38.
- 75.Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J.,Burrell, M.A. (2001) The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280 (6), E827-847.
- 76.Galic, S., Oakhill, J.S.,Steinberg, G.R. (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, 316 (2), 129-139.
- 77.Cahill, G.F., Jr. (1976) Starvation in man. *Clin Endocrinol Metab*, 5 (2), 397-415.
- 78.Himms-Hagen, J. (1990) Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J*, 4 (11), 2890-2898.
- 79.Ricquier, D.,Bouillaud, F. (2000) Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*, 529 Pt 1, 3-10.

- 80.Langin, D. (2010) Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: Strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 (3), 372-376.
- 81.Wang, P., Mariman, E., Renes, J.,Keijer, J. (2008) The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *Journal of Cellular Physiology*, 216 (1), 3-13.
- 82.Hevener, A.L.,Febbraio, M.A. (2010) The 2009 stock conference report: inflammation, obesity and metabolic disease. *Obes Rev*, 11 (9), 635-644.
- 83.Kim, L.J., Nalls, M.A., Eiriksdottir, G., Sigurdsson, S., Launer, L.J., Koster, A. ve diğ erleri. (2010) Associations of Visceral and Liver Fat With the Metabolic Syndrome Across the Spectrum of Obesity: The AGES-Reykjavik Study. *Obesity (Silver Spring)*.
- 84.Virtanen, S.S., Vaananen, H.K., Harkonen, P.L.,Lakkakorpi, P.T. (2002) Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer Res*, 62 (9), 2708-2714.
- 85.Guerre-Millo, M. (2004) Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab*, 30 (1), 13-19.
- 86.Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K.,Tobe, K. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 116 (7), 1784-1792.
- 87.Trujillo, M.E.,Scherer, P.E. (2005) Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*, 257 (2), 167-175.
- 88.Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D.,Fasshauer, M. (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 17 (1), 26-32.
- 89.Goossens, G. (2008) The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & Behavior*, 94 (2), 206-218.
- 90.Fantuzzi, G. (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115 (5), 911-919.

- 91.Scherer, P.E. (2006) Adipose Tissue: From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes*, 55 (6), 1537-1545.
- 92.Cinti, S. (2006) The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 16 (8), 569-574.
- 93.Lafontan, M. (2005) Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 119-146.
- 94.Despres, J.P. (2006) Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann Med*, 38 (1), 52-63.
- 95.Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444 (7121), 860-867.
- 96.Liu, G.,Rondinone, C.M. (2005) JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway. *Curr Opin Investig Drugs*, 6 (10), 979-987.
- 97.Lewis, G.F. (2002) Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, 23 (2), 201-229.
- 98.Rasouli, N., Molavi, B., Elbein, S.C.,Kern, P.A. (2007) Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*, 9 (1), 1-10.
- 99.Vanherpen, N.,Schrauwenhinderling, V. (2008) Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiology & Behavior*, 94 (2), 231-241.
- 100.Balistreri, C.R., Caruso, C.,Candore, G. (2010) The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-20.
- 101.Wellen, K.E. (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112 (12), 1785-1788.
- 102.Zhang, K. (2010) Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med*, 3 (1), 33-40.
- 103.Gregor, M.F.,Hotamisligil, G.S. (2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*, 48 (9), 1905-1914.
- 104.Fisher, R.M., Hoffstedt, J., Hotamisligil, G.S., Thorne, A.,Ryden, M. (2002) Effects of obesity and weight loss on the expression of proteins involved in

- fatty acid metabolism in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26 (10), 1379-1385.
105. Boden, G. (2008) Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37 (3), 635-646, viii-ix.
106. Boden, G. (2008) Endoplasmic Reticulum Stress: Another Link Between Obesity and Insulin Resistance/Inflammation? *Diabetes*, 58 (3), 518-519.
107. Zhang, K., Kaufman, R.J. (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454 (7203), 455-462.
108. Otani, H. (2010) Oxidative Stress as Pathogenesis of Cardiovascular Risk Associated with Metabolic Syndrome. *Antioxid Redox Signal*.
109. Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., Boden, G. (2002) Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes*, 51 (7), 2005-2011.
110. Borradaile, N.M., Han, X., Harp, J.D., Gale, S.E., Ory, D.S., Schaffer, J.E. (2006) Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *The Journal of Lipid Research*, 47 (12), 2726-2737.
111. Ostrander, D.B., Sparagna, G.C., Amoscato, A.A., McMillin, J.B., Dowhan, W. (2001) Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 276 (41), 38061-38067.
112. Bray, G.A. (2004) Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (6), 2583-2589.
113. Saltiel, A.R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, 104 (4), 517-529.
114. Kaneto, H., Matsuoka, T.-a., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuhisa, M. ve diğ erleri. (2005) Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *Journal of Molecular Medicine*, 83 (6), 429-439.
115. Kaneto, H. (2005) The JNK pathway as a therapeutic target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets*, 9 (3), 581-592.
116. Saltiel, A.R., Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414 (6865), 799-806.

117. Pirola, L., Johnston, A.M., Van Obberghen, E. (2004) Modulation of insulin action. *Diabetologia*, 47 (2), 170-184.
118. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F. (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, 275 (12), 9047-9054.
119. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K. ve diğ erleri. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420 (6913), 333-336.
120. Vallerie, S.N., Hotamisligil, G.S. (2010) The role of JNK proteins in metabolism. *Sci Transl Med*, 2 (60), 60rv65.
121. Tilg, H., Moschen, A.R. (2008) Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*, 14 (3-4), 222-231.
122. Farese, R.V., Sajan, M.P., Standaert, M.L. (2005) Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230 (9), 593-605.
123. Lionetti, L., Mollica, M.P., Lombardi, A., Cavaliere, G., Gifuni, G., Barletta, A. (2009) From chronic overnutrition to insulin resistance: The role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19 (2), 146-152.
124. Poitout, V. (2002) Minireview: Secondary β -Cell Failure in Type 2 Diabetes--A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology*, 143 (2), 339-342.
125. Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W. ve diğ erleri. (1996) Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*, 97 (12), 2859-2865.
126. Ahima, R.S., Osei, S.Y. (2008) Adipokines in obesity. *Front Horm Res*, 36, 182-197.
127. Taylor, R. (2008) Pathogenesis of type 2 diabetes: tracing the reverse route from cure to cause. *Diabetologia*, 51 (10), 1781-1789.

128. Tilg, H., Moschen, A.R. (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52 (5), 1836-1846.
129. Del Prato, S. (2009) Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic Medicine*, 26 (12), 1185-1192.
130. Blaak, E.E. (2003) Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc*, 62 (3), 753-760.
131. Boden, G. (2006) Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep*, 6 (3), 177-181.
132. Cunha, D.A., Hekerman, P., Ladriere, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M.C. ve diğeri. (2008) Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. *Journal of Cell Science*, 121 (14), 2308-2318.
133. Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444 (7121), 840-846.
134. Meshkani, R., Adeli, K. (2009) Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*, 42 (13-14), 1331-1346.
135. Wellen, K.E. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (5), 1111-1119.
136. Szendroedi, J., Roden, M. (2009) Ectopic lipids and organ function. *Current Opinion in Lipidology*, 20 (1), 50-56.
137. Holm, C., Osterlund, T., Laurell, H., Contreras, J.A. (2000) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr*, 20, 365-393.
138. Pagel-Langenickel, I., Bao, J., Joseph, J.J., Schwartz, D.R., Mantell, B.S., Xu, X. ve diğeri. (2008) PGC-1 Integrates Insulin Signaling, Mitochondrial Regulation, and Bioenergetic Function in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (33), 22464-22472.
139. Lelliott, C., Vidal-Puig, A.J. (2004) Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *International Journal of Obesity*, 28, S22-S28.

140. Tilg, H., Moschen, A.R. (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6 (10), 772-783.
141. Sethi, J., Vidalpuig, A. (2005) Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends in Molecular Medicine*, 11 (8), 344-347.
142. Fukuhara, A. (2005) Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin. *Science*, 307 (5708), 426-430.
143. Rongvaux, A., Shea, R.J., Mulks, M.H., Gigot, D., Urbain, J., Leo, O. ve diğeri. (2002) Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*, 32 (11), 3225-3234.
144. Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie, C., Suggs, S., McNiece, I. (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*, 14 (2), 1431-1437.
145. Kitani, T., Okuno, S., Fujisawa, H. (2003) Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor1. *FEBS Letters*, 544 (1-3), 74-78.
146. Wang, T., Zhang, X., Bheda, P., Revollo, J.R., Imai, S., Wolberger, C. (2006) Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nat Struct Mol Biol*, 13 (7), 661-662.
147. Busso, N., Karababa, M., Nobile, M., Rolaz, A., Van Gool, F., Galli, M. ve diğeri. (2008) Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS ONE*, 3 (5), e2267.
148. Ognjanovic, S., Bao, S., Yamamoto, S.Y., Garibay-Tupas, J., Samal, B., Bryant-Greenwood, G.D. (2001) Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*, 26 (2), 107-117.
149. Lee, W.J., Wu, C.S., Lin, H., Lee, I.T., Wu, C.M., Tseng, J.J. ve diğeri. (2009) Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human

- endothelial cells through the NF- κ B pathway. *International Journal of Obesity*, 33 (4), 465-472.
- 150.Moschen, A.R., Kaser, A., Enrich, B., Mosheimer, B., Theurl, M., Niederegger, H. ve diğeri. (2007) Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol*, 178 (3), 1748-1758.
- 151.Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E. ve diğeri. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46 (11), 2347-2355.
- 152.Garten, A., Petzold, S., Barnikol-Oettler, A., Korner, A., Thasler, W.E., Kratzsch, J. ve diğeri. (2010) Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 391 (1), 376-381.
- 153.Skop, V., Kontrova, K., Zidek, V., Pravenec, M., Kazdova, L., Mikulik, K. ve diğeri. (2010) Autocrine effects of visfatin on hepatocyte sensitivity to insulin action. *Physiol Res*, 59 (4), 615-618.
- 154.Belenky, P., Bogan, K., Brenner, C. (2007) NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 32 (1), 12-19.
- 155.Bogan, K.L., Brenner, C. (2008) Nicotinic Acid, Nicotinamide, and Nicotinamide Riboside: A Molecular Evaluation of NAD⁺ Precursor Vitamins in Human Nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 28 (1), 115-130.
- 156.Sommer, G., Garten, A., Petzold, S., Beck-Sickinger, A.G., Bluher, M., Stumvoll, M. ve diğeri. (2008) Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clin Sci (Lond)*, 115 (1), 13-23.
- 157.Garten, A., Petzold, S., Körner, A., Imai, S.-i., Kiess, W. (2009) Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20 (3), 130-138.
- 158.Galli, M., Van Gool, F., Rongvaux, A., Andris, F., Leo, O. (2009) The Nicotinamide Phosphoribosyltransferase: A Molecular Link between Metabolism, Inflammation, and Cancer. *Cancer Research*, 70 (1), 8-11.
- 159.Guarente, L. (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*, 14 (9), 1021-1026.

160. North, B.J., Verdin, E. (2004) Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol*, 5 (5), 224.
161. van der Veer, E., Ho, C., O'Neil, C., Barbosa, N., Scott, R., Cregan, S.P. ve diğerleri. (2007) Extension of Human Cell Lifespan by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (15), 10841-10845.
162. Haigis, M.C., Guarente, L.P. (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes & Development*, 20 (21), 2913-2921.
163. Yamamoto, H., Schoonjans, K., Auwerx, J. (2007) Sirtuin Functions in Health and Disease. *Molecular Endocrinology*, 21 (8), 1745-1755.
164. Guarente, L. (2005) Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev*, 126 (9), 923-928.
165. Yang, T., Sauve, A.A. (2006) NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J*, 8 (4), E632-643.
166. Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403 (6771), 795-800.
167. Chen, D., Guarente, L. (2007) SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. *Trends Mol Med*, 13 (2), 64-71.
168. Finkel, T., Deng, C.X., Mostoslavsky, R. (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460 (7255), 587-591.
169. Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S. ve diğerleri. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*, 21 (10), 2383-2396.
170. Kersten, S. (2002) Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol*, 440 (2-3), 223-234.
171. Rakhshandehroo, M., Sanderson, L.M., Matilainen, M., Stienstra, R., Carlberg, C., de Groot, P.J. ve diğerleri. (2007) Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR Res*, 2007, 26839.

172. Hostetler, H.A., Petrescu, A.D., Kier, A.B., Schroeder, F. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem*, 280 (19), 18667-18682.
173. Chinetti-Gbaguidi, G., Fruchart, J.C., Staels, B. (2005) Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. *Curr Opin Pharmacol*, 5 (2), 177-183.
174. Berger, J., Moller, D.E. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53, 409-435.
175. Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7 (6), 1513-1523.
176. Serghini, M.A., Ritzenthaler, C., Pinck, L. (1989) A rapid and efficient 'miniprep' for isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 17 (9), 3604.
177. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2), 55-63.
178. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
179. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D. ve diğeri. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150 (1), 76-85.
180. Schagger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166 (2), 368-379.
181. Akhavan-Tafti, H., Schaap, A.P., Arghavani, Z., DeSilva, R., Eickholt, R.A., Handley, R.S. ve diğeri. (1994) CCD camera imaging for the chemiluminescent detection of enzymes using new ultrasensitive reagents. *J Biolumin Chemilumin*, 9 (3), 155-164.
182. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1), 156-159.

183. Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25 (2), 169-193.
184. Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6 (10), 995-1001.
185. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K. ve diğ erleri. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3), 95-125.
186. Erel, O. (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38 (12), 1103-1111.
187. Murdolo, G., Smith, U. (2006) The dysregulated adipose tissue: A connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16, S35-S38.
188. Hara, N., Yamada, K., Shibata, T., Osago, H., Hashimoto, T., Tsuchiya, M. (2007) Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. *J Biol Chem*, 282 (34), 24574-24582.
189. Berndt, J., Kloting, N., Kralisch, S., Kovacs, P., Fasshauer, M., Schon, M.R. ve diğ erleri. (2005) Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*, 54 (10), 2911-2916.
190. Stephens, J.M., Vidal-Puig, A.J. (2006) An update on visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. *Curr Opin Lipitol*, 17 (2), 128-131.
191. Pagano, C. (2006) Reduced Plasma Visfatin/Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor in Obesity Is Not Related to Insulin Resistance in Humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91 (8), 3165-3170.
192. Revollo, J.R., Körner, A., Mills, K.F., Satoh, A., Wang, T., Garten, A. ve diğ erleri. (2007) Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in β Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. *Cell Metabolism*, 6 (5), 363-375.
193. Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282 (5739), 615-616.

194. Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209 (4455), 497-499.
195. Rash, J.M., Rothblat, G.H., Sparks, C.E. (1981) Lipoprotein apolipoprotein synthesis by human hepatoma cells in culture. *Biochim Biophys Acta*, 666 (2), 294-298.
196. Javitt, N.B., Budai, K. (1989) Cholesterol and bile acid synthesis in Hep G2 cells. Metabolic effects of 26- and 7 alpha-hydroxycholesterol. *Biochem J*, 262 (3), 989-992.
197. Wang, S.R., Pessah, M., Infante, J., Catala, D., Salvat, C., Infante, R. (1988) Lipid and lipoprotein metabolism in Hep G2 cells. *Biochim Biophys Acta*, 961 (3), 351-363.
198. Matherly, L.H., Angeles, S.M. (1994) Role of N-glycosylation in the structure and function of the methotrexate membrane transporter from CCRF-CEM human lymphoblastic leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 47 (6), 1094-1098.
199. Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G. (1971) Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)*, 24 (4), 215-223.
200. Hsieh, C.L., Ogura, Y., Obara, H., Ali, U.A., Rodriguez, G.M., Nepomuceno, R.R. ve diğeri. (2004) Identification, cloning, and characterization of a novel rat natural killer receptor, RNKP30: a molecule expressed in liver allografts. *Transplantation*, 77 (1), 121-128.
201. Li, Y., Zhang, Y., Dorweiler, B., Cui, D., Wang, T., Woo, C.W. ve diğeri. (2008) Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem*, 283 (50), 34833-34843.
202. Curat, C.A., Wegner, V., Sengenès, C., Miranville, A., Tonus, C., Busse, R. ve diğeri. (2006) Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*, 49 (4), 744-747.

- 203.Dahl, T.B., Yndestad, A., Skjelland, M., Oie, E., Dahl, A., Michelsen, A. ve diğerleri. (2007) Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation*, 115 (8), 972-980.
- 204.Dahl, T.B., Haukeland, J.W., Yndestad, A., Ranheim, T., Gladhaug, I.P., Damas, J.K. ve diğerleri. (2010) Intracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against hepatocyte apoptosis and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (6), 3039-3047.
- 205.Furukawa, S. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114 (12), 1752-1761.
- 206.Adams, J.D., Jr. (2008) Alzheimer's disease, ceramide, visfatin and NAD. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7 (6), 492-498.
- 207.Oita, R.C., Ferdinando, D., Wilson, S., Bunce, C.,Mazzatti, D.J. (2010) Visfatin induces oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes in an Akt- and MAPK-independent, NFkB-dependent manner. *Pflugers Arch*, 459 (4), 619-630.
- 208.Purushotham, A., Schug, T.T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X.,Li, X. (2009) Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*, 9 (4), 327-338.
- 209.Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J. ve diğerleri. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (15), 7355-7359.
- 210.Sun, Q., Li, L., Li, R., Yang, M., Liu, H., Nowicki, M.J. ve diğerleri. (2009) Overexpression of visfatin/PBEF/Nampt alters whole-body insulin sensitivity and lipit profile in rats. *Ann Med*, 41 (4), 311-320.
- 211.Mayi, T.H., Duhem, C., Copin, C., Bouhleb, M.A., Rigamonti, E., Pattou, F. ve diğerleri. (2010) Visfatin is induced by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human macrophages. *FEBS J*, 277 (16), 3308-3320.