



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**β -HÜCRE GOLGİ CİSİMCİĞİNİN GLUKOLİPOTOKSİSİTEYE STRES
YANITI**

Prof. Dr. Neslihan BAŞÇIL TÜTÜNCÜ
DOKTORA TEZİ

ANKARA- 2019



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**β -HÜCRE GOLGİ CİSİMCİĞİNİN GLUKOLİPOTOKSİSİTEYE STRES
YANITI**

Prof. Dr. Neslihan BAŞÇIL TÜTÜNCÜ
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. F. BELGİN ATAÇ

ANKARA- 2019



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde. Neslihan Başçıl Tütüncü tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/09/2019

Tez Konusu : “ β -hücre golgi cisimciğinin glukolipotoksisteye stres yanıtı”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. F.Belgin ATAÇ

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Erkan YURTCU

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Şefik GÜRAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Doç. Dr. Hasibe VERDİ

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Ankara Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 26./09./2019 tarih ve 44-5. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: ...08 / 10... / 2019...

Öğrencinin Adı, Soyadı : Neslihan Başçıl Tütüncü

Öğrencinin Numarası : 21310086

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji

Programı : Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Fatma Belgin Ataç

Tez Başlığı : β -hücre golgi cisimciğinin glukolipotoksisiteye stres yanıtı

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam ...69..... sayfalık kısmına ilişkin, ...20.. / ..09... / 2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafındanacikarsiv.ankara.edu.tr..... adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % ...9.....'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

Onay

08.... / 10... / 2019...

Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,

TEŞEKKÜR

Tip2 Diabetes Mellitus tüm dünyada son 3-4 dekada görülme sıklığı en çok artan bulaşıcı olmayan hastalıkların başında gelmektedir. Etyopatogeneizde çevresel faktörler çok önemlidir. En çok üzerinde durulan etyolojik neden kalorisi yüksek besinler ile beslenme alışkanlığı ve obezitedir. Metabolik yük oluşturan bu yaşam tarzı, pankreas β -hücrelerde glukolipotoksisiteye ve buna bağlı endoplazmik retikulum stresine yol açarak diabetes mellitus kliniğinin ortaya çıkmasına neden olduğu bilinmektedir. Biz bu tez çalışmamızda β -hücre için metabolik yüke neden olan glukotoksisite/lipotoksisite/glukolipotoksisitenin endoplazmik retikulum üzerinde gösterilmiş etkileri dışında, Golgi cisimciğinde de adaptif ve/veya maladaptif moleküler olaylar zincirini başlatabileceğini göstermek istedik.

Bu tez çalışmamı planlar ve gerçekleştirirken, Tıbbi Biyoloji doktora eğitimim süresince bana her zaman destek olan, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, paha biçilmez tecrübesi ve emeği ile bilimsel hayatımda ufkumu açan tez danışmanım, değerli hocam ve dostum, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. F.Belgin Ataç'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji doktora tezimin her aşamasında tüm detaylarda ve her konuda yardımını asla esirgemeyen, her türlü sorunu çözmek için elinden geleni yapan, sabrı, sonsuz tecrübe ve bitmez tükenmez enerjisi ile yorulmayı bilmeyen çok değerli hocam, arkadaşım Doç. Dr. Hasibe Verdi'ye çok teşekkür ederim.

Doktora eğitim sürem boyunca bilgisini ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Erkan Yurtçu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda büyük sabır ve özveri ile laboratuvar çalışmalarımıza yardımcı olan, engin deneyimlerini bizle paylaşan arkadaşlarım Uzm. Bio.Yaprak Yalçın ve Pınar Baysan'a özellikle çok teşekkür ederim.

Hayatımın bu son öğrencilik döneminde karşıma çıkan, doktora eğitimime başlamama vesile olan, temiz kalpli, gerçek dostum, kader arkadaşım Prof. Dr. Sibel Kınık'a her zaman yanımda olduğu için teşekkür ediyorum.

Bize doktora yapma imkanı sunan, vizyonu, tecrübesi ve hep hoşgörüsü ile yolumuza ışık tutan rektörümüz Prof. Dr. Ali Haberal, iyi ki varsınız.

Hayallerimi gerçekleştirirken her zaman benimle birlikte olan, en büyük desteğim, kalbim ve beynim, eşim Dr Tanju Tütüncü'ye, canımın parçası olan güzel kızlarım Damla ve Duru Tütüncü'ye, kardeşlerim Sibel ve Aslı Başçıl'a, canım annem Solmaz Başçıl'a hep yanımda oldukları ve beni her zaman destekledikleri için çok teşekkür ederim. Sizler benim yaşam kaynağımsınız...

ÖZET

Neslihan Başçıl Tütüncü

‘ β -hücre golgi cisimciğinin glukolipotoksisiteye stres yanıtı’

Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, 2019

Tip 2 Diabetes Mellitus (Tip2DM) etyopatogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı önemli bir hastalıktır. Tip2DM ortaya çıkması için pankreas β -hücre sayısında ve/veya fonksiyonunda yetersizlik gelişmesi gerekmektedir. β -hücre kaybına neden olan önemli faktör glukolipotoksisite ve buna bağlı gelişen endoplazmik retikulum stresidir. β -hücre gibi sekretuar hücrelerde, endoplazmik retikuluma yansıyan her stresin Golgi cisimciğinde de hissedilmesi beklenmektedir. Endoplazmik retikuluma gelen sekretuar proteinlerin ileri modifikasyonu, veziküler transportu ve sekresyonunu sürdürebilmek için Golgi cisimciğinde de adaptif veya maladaptif moleküler değişikliklerin gerçekleşmesi tahmin edilmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, Golgi cisimciğinde fonksiyon kaybına neden olan toksik kimyasalların (Brefeldin A, Golgicide A, vb) bu organeli strese sokarak bir takım adaptif stres cevabı başlattıkları ve bu süreçte spesifik birtakım proteinlerin (ARF4, CREB3/TFE ve HSP 47 gibi) ifadenmesinin ve/veya aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bu kapsamda bu çalışmada INS-1E rat β -hücre hattı kullanarak hücrelerde palmitat, glukoz ve glukoz +palmitat ile lipotoksisite/glukotoksisite/glukolipotoksisite oluşturarak Golgi stresi yaratıldı. MTT testi ile hücrelerin canlılık oranları bakıldı. Daha sonra metabolik stres altındaki hücrelerde literatürde tanımlanmış stres proteinlerinin transkript düzeyinde ifadenmesi incelendi. Her koşulda 8.,16., 24. ve 48. saatlerde Golgi cisimciği yapısal genlerinin, glikozilasyon genlerinin, ARF1, HSP47, CREB3 ve ARF4 genlerinin ifadenme kat artışı değerlendirildi. Sonuç olarak bu çalışmada INS-1E rat β -hücrelerinde lipotoksisite/glukotoksisite/glukolipotoksisite sonrası ilk saatlerde Golgi cisimciği glikozilasyon enzimlerinden st3gal1 ifadenmesinin ve golcisidlere cevapta önemli rol aldığı bilinen HSP47 (Serpin1)’in ifadenmesinin arttığı tesbit edilmiştir. Metabolik toksik ortam uygulamasının 48.saatinde yani hücre canlılığının azaldığı geç saatlerde, CREB3 ifadenmesinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Bu çalışma literatürde β -hücrelerinde glukolipotoksisitenin golgi cisimciğine etkilerini irdeleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızın daha ileri çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Golgi Aparatı, CREB3/Luman, ARF4, HSP47, ARF1

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje No: DA16/30) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Neslihan Başçıl Tütüncü

' β -cell golgi body stress response to glucolipototoxicity'

Başkent University Institute of Health Sciences, Medical Biology Doctorate Thesis, 2019

Type 2 Diabetes Mellitus is an important disease with diverse polygenetic and environmental factors in etiopathogenesis. Over the past decades, the central role of pancreatic β -cell dysfunction and loss have become increasingly appreciated. Glucolipototoxicity and its contribution to endoplasmic reticulum stress has been postulated to the worsening β -cell function and survival. In cells with high capacity of secretory function, work load on ER is assumed to be reflected to Golgi apparatus. Factors leading to ER stress is expected to converge adaptive and/or maladaptive changes in Golgi structural proteins, enzymes and secretory function. In this regard, there are documented Golgi stress proteins (TFE , HSP 47 CREB3/Luman, and ARF4,) of which genetic expression and/or activity have been increased after derangement of Golgi function with golcicides like Brefeldin A, Golcicide A etc.

We hypothesized that glucolipototoxicity in diabetes can trigger a Golgi stress response in pancreatic β -cells. In order to test a Golgi stress response in β -cells of a diabetic metabolic millue, we tried to create lipotoxicity/glucotoxicity/glucolipototoxicity in INS-1E rat β -cells with palmitic acid, glucose and both together and investigated the expression of the genes documented as Golgi stress proteins before in the literature.

In this context palmitic acid, glucose and both together were applied to INS-1E rat β -cells and analysed at 8th, 16th, 24th and 48th hours. MTT assay was used for cell viability analysis. Expression rates of Golgi structural proteins, Golgi glycosylation enzymes, ARF1, HSP47, CREB3 ve ARF4 proteins were measured in all experimental conditions. In our study we determined an increase in expression levels of Golgi glycosylation enzyme stgal1 and HSP47 in the 8th hour of all experimental conditions. In the 48th hour, when the viability of most cells were lost, expression rate of CREB3 was found to be increased.

Our study is the first one in English literature which investigated Golgi stress response in β -cells under lipotoxicity/glucotoxicity/glucolipototoxicity. HSP47 and CREB3 were found to be

important mediators of Golgi stress response in β -cells under metabolic stress. In this regard, this study will form basis for further studies dealing with Golgi stress in diabetes mellitus.

Key Words: Golgi Apparatus, CREB3/Luman, ARF4, HSP47, ARF1

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project No: DA16/30) and supported by Başkent University Faculty Research Fund.

İÇİNDEKİLER:

ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE TABLOLAR.....	xi
MALZEMELER.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Pankreas β -hücreleri özellikleri.....	2
2.2. Diabetes Mellitus, β -hücreleri ve Endoplazmik Retikulum.....	3
2.3. Diabetes Mellitus, β -hücreleri ve Golgi Cisimciği.....	6
2.3.1 . Sağlıklı bireyde Golgi Cisimciği.....	6
2.3.2.Özel durumlarda Golgi Cisimciği.....	9
2.4. Glukolipotoksisite ve β -hücre:.....	15
2.5. Çalışmanın Amacı.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Çalışmada kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar.....	21
3.1.1.Hücre Kültürü.....	22
3.1.2. MTT Sitotoksite Testi.....	22
3.1.3. RNA İzolasyonu.....	22
3.1.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	22
3.1.5. .cDNA sentezi.....	22
3.1.6. cDNA Kontrol PCR.....	22
3.1.7. Gerçek Zamanlı PZR (RT-ZR).....	22
3.2. Araştırma planı ve yöntemler.....	23
3.2.1. INS-1E Hücreleri Çözülmesi.....	23
3.2.2. INS-1E Hücreleri Çoğaltılması ve İdamesi.....	23
3.2.3. Palmitik Asit Solüsyonu Hazırlanması.....	23
3.2.4. Hücre Canlılığı ve Sitotoksite Testi.....	24

3.2.5. Hücre Kültürü Materyalinden RNA İzolasyonu.....	25
3.2.6. RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi.....	26
3.2.7. RNA Saflığının ve Miktarının Tayini.....	27
3.2.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	28
3.2.9. cDNA Kontrol PZR.....	29
3.2.10. RT-PCR ekspresyon protokolü.....	30
3.3. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	62
7. KAYNAKLAR.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

ARF 4: Adenosil ribozilasyon faktörü 4

ARF1: Adenosil ribozilasyon faktörü 1

ARF GEF: ADP-ribosylation factor-GTP değişim faktörü

ATF6: Activating Transcription factor 6

ACeramidase: Asid Seramidaz

bHLH: basik heliks-loop-heliks

CREB3/Luman: basic leucine zipper-taşıyan transkripsiyon faktörü

CERT: Ceramide transfer protein

CerK1, Seramid Kinaz1 ER: Endoplazmik Retikulum

Cers: Seramid sentaz

CPT-1: Carnitine-Palmitoyl Transferaz -1

ERGIC: ER-Golgi intermediate kompartmanı

FUT1: fukoziltransferaz 1

G: Glukoz

GASE: Golgi apparatus stress response element

GCA: Golgisid A

GBF1: GTP bağlayan faktör 1

GLUT2: Glukoz transporter 2

HSP 47 (Serpin1): Heat-shock protein 47 (Serpin family H member 1)

IRE-1: Inositol requiring enzyme 1

MafA: bazik bölge lösün fermuar

MTT: [3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotokstite Testi

NFATc : aktive T lenfosit-sitoplazmik nükleer faktörü

N-SMase: N-sfingomyelinaz

OASİS: old astrocyte specifically induced substance

OSBP: oksisterol-bağlayan proteinler

PA: Palmitik asit

PERK: PKR-like eucaryotic initiaiton factor 2 α kinaz

PI4K: Fosfotidil Inositol 4 Kinaz

PI4P: Fosfotidil-inositol-4-phosphate
PI3K: Fosfotidil-inositol-3-kinaz
PDX-1:Pankreas-Duodenum homeobox-1
Serpın: Serin proteaz inhibitörü
SP: Sinyal peptidi
SIAT4A : Sialiltransferaz 4A
SIAT10: Sialiltransferaz 10
SMS1 & 2: sfıngomyelin sentaz 1 & 2;
smpd1: Asid Sfıngomyelinaz,
smpd2: Nötral sfıngomyelinaz1,
smpd3: Nötral sfıngomyelinaz 2
SK: Sfıngosin kinaz,
SPP1: sfıngosine 1-fosfat fosfohidrolaz-1
SR: Serine repeat motif
SPT: Serin Palmitoyltransferaz;
Tip2 DM: Tip 2 Diabetes Mellitus
TFE: basic-helix-loop-helix tipi bir transkripsiyon faktörü
UAP1L1: UDP-N-asetilheksozamin fosforilaz-like 1
VAP: vesicle-associated membrane protein-associated proteins

ŞEKİLLER

Şekil 1: Katlanmamış Protein Cevabının üç efektör proteini PERK, ATF6, IRE1, sayfa 6

Şekil 2: TFE gen bölgesi, sayfa 10

Şekil 3: Golgi aygıtı stres yönetimi, sayfa 11

Şekil 4: CREB3 aktivasyonu, sayfa 13

Şekil 5: Seramid sentez ve hücre içi biyokimyasal yolları, sayfa 18

Şekil 6: Glukolipotoksisite ile seramid birikimi, sayfa 20

Şekil 7: RNA izolasyonu sonucu %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü, sayfa 41

Şekil 8: Rat actin β primeri ile cDNA PZR örnekleri, sayfa 44

GRAFİKLER:

Grafik 1: INS-1E hücreleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asit + glukoz ile muamele edilerek toksik süre ve doz MTT testi, sayfa 32

Grafik 2: ER stres genlerinden grp 78 gen kat değişimleri, sayfa 48

Grafik 3: Golgi cisimciği yapısal genlerinden GCP60 (ACBD3) gen kat değişimleri, sayfa 49

Grafik 4 : Golgi cisimciği yapısal genlerinden GM130 (golga2) gen kat değişimleri, sayfa 49

Grafik 5: Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden Sialiltransferaz4A (st3gal1) gen kat değişimleri, sayfa 49

Grafik 6: Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden Sialiltransferaz10 (st3gal6) gen kat değişimleri, sayfa 50

Grafik 7: Golgi cisimciği stres genlerinden ARF1 gen kat değişimleri, sayfa 51

Grafik 8: Golgi cisimciği stres genlerinden CREB3 gen kat değişimleri, sayfa 51

Grafik 9: Golgi cisimciği stres genlerinden ARF4 gen kat değişimleri, sayfa 52

Grafik 10: 8. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması, sayfa 53

Grafik 11: 16. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması, sayfa 54

Grafik 12: 24. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması, sayfa 55

Grafik 13: . 48. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması, sayfa 56

TABLolar:

Tablo 1 : INS-1E hücreleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asit + glukoz ile muamele edilerek toksik süre ve doz MTT testi sonrası optik dansite değerleri (canlılık yüzdeleri), sayfa 33

Tablo 2: 0,5Mm Palmitik asid ile muamele edilmiş INS-1 hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 34

Tablo 3: 5 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 35

Tablo 4: 5Mm Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 36

Tablo 5: 16,7 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 37

Tablo 6: 16,7 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 38

Tablo 7: 33 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 39

Tablo 8: 33 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri, sayfa 40

Tablo 9: Örneklere ait 24.saat ve sonrası RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları, sayfa 42

Tablo 10: Genlerin ifadenme düzeyleri, sayfa 45

MALZEMELER

Hücre Kültürü:

Besi yeri: Sigma, RPMI Medium R0883, Amerika

BSA: Sigma A6003 , Amerika

Deney tüpü (15ml): Greiner, 188261, Avusturya

Dimetilsülfoksit (DMSO):Sigma,D9170, Amerika

Flask (96 kuyu): Starlab, CytoOne 96 well plate, CC7682-7596, İngiltere

Flask (25cm²): Falcon, 353108, İngiltere

Fosfat Tuz Tamponu: Sigma, D1408, Amerika

Föetal Dana Serumu (FBS): Sigma, F7524, Amerika

Hepes: Sigma, H3784, Amerika

Hücre Dondurma tüpleri: Greiner bio-one, 2ml, Avusturya

L-Glutamin: Sigma, G6392 (200mM, 50ml) , Amerika

NaOH: Sigma, S2770, Amerika

2-Merkaptoetanol:Merck, ES-007-E, Amerika

Sodyum Pirüvat (100mM): Sigma, S8636, Amerika

Palmitik asit: Sigma, P0500, Amerika

Penisilin-Streptomisin: Sigma, P4333, Amerika

Tripsin-EDTA (%0,25): Sigma, T3924, Amerika

[3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotokstite Testi:

MTT tozu: Roche, 11465007001, İsviçre

RNA İzolasyonu

RNA izolasyon kiti: Qiagen, RNeasy mini kit,74104, Amerika

Dietil piro karbonat, DEPC: Sigma, D5758, Amerika

Etil Alkol: Sigma, E7023, Amerika

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz: AppliChem, A 2114, Almanya

TAE çözeltisi:

Borik Asit: Sigma, B6768, Amerika

EDTA: Sigma, E5134, Amerika

Tris baz: Sigma, T7527, Amerika

Yükleme Tamponu:

Gliserol: Sigma, G5516, Amerika

Orange G: Sigma, O3756, Amerika

Etidyum Bromür: Invitrogen, 15585-011, Amerika

DNA markır (50bç): Thermo scientific, SMO373, Amerika

cDNA sentezi

Transcriptor High Fidelity : Roche, 05081963001, İsviçre

cDNA Kontrol PCR

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

dNTP (10mM X 4): Roche, 11581295001, İsviçre

Rat beta aktin primer F: 5'CGTCTTCCCCTCCATCG3'

Rat beta aktin primer R: 5' CTCGTTAATGTCACGCAC 3'

MgCl₂ (25mM): Sigma, M8787, Amerika

Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)

LC Kapiller: Roche, 04929292001, İsviçre

LightCycler TaqMan Master: Roche, 04 735 536 001, İsviçre

1. GİRİŞ:

Tip 2 Diabetes Mellitus (Tip2DM) etyopatogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek önemli bir hastalıktır. Tip2DM tüm dünyada son 3-4 dekada görülme sıklığı en çok artan bulaşıcı olmayan hastalıkların başında gelir. Ülkemizde TURDEP I ve TURDEP II çalışmaları ile yaklaşık 10 yıl kadar bir süre içinde Tip2DM prevalansında %90 civarında artış olduğu tesbit edilmiştir (1,2).

Yetersiz β -hücre insülin salgısı ile karakterize Tip2DM patogenezinin poligenetik olduğu bilinmektedir. Tip2DM prevalansında hızlı artış olması, etyopatogenezde çevresel faktörlerin ağır bastığı görüşünü desteklemektedir. Bu faktörlerden en çok üzerinde durulan gene son dekadlarda hızla artan obezite sorunudur. Ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada obezite görülme sıklığı yılda % 2-4 artış gösterirken, Tip2DM sıklığı da yılda yaklaşık %2-3 artış göstermektedir (1-7).

Tip2DM ortaya çıkması için pankreas β -hücre sayısında ve /veya fonksiyonunda yetersizlik gelişmesi gerekmektedir. Sağlıklı bir erişkin, erken erişkin yaşta yaklaşık ortalama 1-2 g β -hücresine sahiptir. Genetik ve çevresel faktörler bu miktarı belirler. Pankreas β -hücre sayısında farklı çevresel faktörlerin etkisi ile apoptoz veya nekroz sonucu progresif azalma gerçekleşir. β -hücre kaybına neden olan en önemli çevresel faktörlerin başında metabolik toksik ortam oluşturan hiperglisemi ve hiperlipidemi gelir. Bu metabolik toksik ortam glukolipotoksisite olarak adlandırılır (8).

Genetik yatkınlığın varlığı β -hücresinin çevresel olumsuz koşullara adaptasyonunu belirler. Tip2DM görülme sıklığının öngörülenin çok üzerinde hızla artışının en önemli sebebinin çevresel faktörlerin beta hücre fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkileri olduğu kabul edilmektedir. Gene son yıllarda hızla artan obezitenin en önemli çevresel faktör olduğu düşünülmektedir. Obezite yağ kütlelerinin artmasıdır. Yağ kütlelerinin artışı sonucu insülin direnci gelişir. İnsülin direnci geliştikten sonra dokularda glukozun metabolize edilememesi söz konusu olur.

İnsülin direnci nedeni ile adipositlerde lipoliz artar, karaciğer ve kas dokusu başta olmak üzere farklı organlarda ektopik yağlanma gelişebilir. Tüm bu metabolik olayların sonucunda ise hiperglisemi ve hiperlipidemi ortaya çıkar. Obezite ile ortaya çıkan insülin direnci sonucu β -hücresi öglisemiyi sağlayabilmek için daha fazla insülini sentez ve sekresyon yapar (5-7).

Obeziteye ikincil ortaya çıkan Tip2DM vakalarında glukolipotoksisiteye bağlı olarak β - hücrelerinde önce fonksiyonel sonra da yapısal değişikliklerin gerçekleştiği birçok hayvan ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Bunlar içinde en iyi bilineni β -hücresinde endoplazmik retikulum (ER) stresidir (9,11) . Glukolipotoksisitenin özellikle pankreas β -hücrelerde ER stresine neden olduğu gösterilmiştir. Endoplazmik retikulum stresi gelişmesi ile insülin sentez ve salgısında azalma ile β -hücrede fonksiyon kaybı gelişir. Daha sonraki süreçte ise β -hücre apoptozisi gerçekleşir. Eksojen insülin tedavisinin gerektiği bu aşama artık geri dönüşümü olmayan safhadır (9-13).

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Pankreas β -hücresi Özellikleri:

Pankreas bilindiği üzere endokrin ve ekzokrin pankreas olarak iki ayrı işlev gören fonksiyonel kısımlardan oluşur. Pankreasın %95'i sindirim sistemi ile ilgili enzimleri salgılayan ekzokrin pankreas hücrelerinden oluşur. Endokrin pankreas olarak adlandırılan kısım ise pankreasın %5'ini oluşturur. Pankreas içinde yerleşmiş endokrin hücre topluluklarını ifade eden Langerhans adacıkları 1969 yılında Paul Langerhans tarafından bulunmuştur. Bu adacıkların çapı $200 \mu m$ 'dir (8). Tüm pankreasta dağınık bulunurlar. β -hücrelerin toplam hacmi ise tüm pankreas doku hacminin %1-2 sini oluşturur. Pankreas dokusu içinde ekzokrin ve endokrin pankreas dansite ve eksojeniteleri farklılık göstermez, bu nedenle görüntüleme yöntemleri ile tanınmaları zordur. Nadir otopsi çalışmalarından elde edilen β -hücre kitlesi ile ilgili veriler fonksiyonel beta hücre kitlesini gösteremez (glisemi, insülinemi, β -hücre fonksiyonu değerlendirilmediğinden). İnsanda ortalama tahmini pankreas adacık sayısı: 3,2-14,8 milyon ve adacık hacmi $0,5-2,0 \text{ cm}^3$ 'dür. Pankreas adacıklarında mevcut hücre topluluğunun % 60'ını insülin salgılayan β -hücreleri oluşturmaktadır. Glukagon salgılayan α - hücreler yaklaşık %30'unu ve kalan yaklaşık %10 kadar

hücre topluluğunu somatostatin salgılayan delta hücreleri, pankreatik polipeptid salgılayan gamma hücreleri ve Ghrelin salgılayan epsilon hücreler oluşturmaktadır (8).

β -hücresinin başlıca görevi glukoza bağlı olarak uygun miktarda insülin salgılamaktır. Bu sayede plazma glukoz seviyesi normal limitler içinde tutulabilir. β -hücresi plazma membranında bulunan ve ancak yüksek plazma glukoz seviyelerinde (Km yüksek olan) aktif hale geçen glukoz taşıyıcıları aracılığı ile (GLUT2), plazma glukozunu sitoplazmaya taşır. Sitoplazmada glikoliz ve daha sonra mitokondride oksidatif fosforilasyona giren glukoz sayesinde β -hücresinde ATP üretimi artar. Plazma glukoz seviyelerinin yükselmesine ikincil β -hücresi sitoplazmasına aktarılan glukozun metabolizması sonucu ATP artışı, daha sonra hücre membranındaki ATP-bağımlı potasyum kanallarının kapanmasına ve dolayısı ile potasyumun hücre dışına çıkışının engellenmesine neden olur. Hücre içi elektrokimyasal dengenin pozitif yük oluşturacak şekilde bozulması, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücre içine kalsiyum girişine neden olur. Sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun artışı ise, insülin taşıyan matür sekretuar veziküllerin hücre membranına taşınması ve salgılanmasını sağlar. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışı ayrıca kalsiyum-bağımlı serin threonin fosfataz olan kalsineurinin aktif hale geçmesine neden olur. Bu fosfotaz aktif hale geçince, NFATc (aktive T lenfosit-sitoplazmik nükleer faktörü) isimli transkripsiyon faktöründen bir fosfat koparır ve bu transkripsiyon faktörünün nükleusa geçişini sağlar. NFAT birtakım genlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu genler insülin sentez ve sekresyonu, β -hücresi proliferasyon ve matürasyonu ile ilgili işlevsel proteinleri kodlayan genlerdir (14).

2.2.Diabetes Mellitus, Pankreas β -hücresi ve Endoplazmik Retikulum:

ER bilindiği üzere proteinlerin post-translasyonel modifikasyonu, katlanması ve yeni sentezlenen sekretuar proteinlerin olgunlaşmasını sağlayan çok önemli bir organeldir. Bu fonksiyonları gerçekleştirebilmesi için ER içinde organelle özgü birçok şaperon protein ve katlanmayı katalizleyen enzimler vardır. Sadece doğru katlanmış proteinler Golgi cisimciğine gönderilir ve orada daha ileri

modifikasyonlara uğrayarak olgun protein haline geldikten sonra veziküllere aktarılır. Normal fizyolojik şartlar altında β -hücresinde ER içinde protein miktarı 100 mg/ml'ye ulaşabilir. Bu miktarın ise %50'den fazlası proinsülin molekülüdür. Daha az oranda ise proinsülin ile birlikte ve proinsülüne göre 1:10 oranında sentezlenen düşük moleküler ağırlıklı protein proamylin'dir (15,16).

Günlük insülin sekresyonunun yaklaşık yarısı öğünler arasındaki sürede salgılanan ve vücutta anabolik etkilerden sorumlu bazal insülin sekresyonudur. Kalan yarısı ise öğünle birlikte salgılanan insülin'dir. Açlıkta salgılanan bazal insülin miktarı az da olsa, β -hücresi proteomunun büyük bir kısmını gene proinsülin biyosentezi oluşturur. İnsülin biyosentezi INS geninin transkripsiyonu ve preproinsüline translasyonu ile başlar (6). N-ucundan C-ucuna bu prekürsor peptid sırası ile sinyal peptidi (SP, rezidü 1-24), insülin B-zinciri (rezidü 1-30), C-peptid (rezidü 1-31) ve bunun 2 adet dibazik kesim bölgesi ve insülin A-zinciri (rezidü 1-21). Yeni oluşan preproinsülinin sinyal peptidi ER membranına yönelmesini sağlar ve burada ko-translasyonel translokasyon ile ER lümenine girer (17).

Proinsülin monomerlerinin katlanması ve dimerizasyonu ER de gerçekleşir. ER lümende proinsülin disülfid bağlarının oluşması ER lümende bulunan birkaç oksidoredüktaz enziminin redüksiyonu sayesinde gerçekleşir. Proinsülinin A ve B zincirleri arasındaki disülfid bağlar, proinsülinin üç boyutlu hale gelmesini ve stabilleşmesini sağlar. Ancak bu halde stabil proinsülin molekülünün, Golgiye doğru ilerleyebilmesi mümkün olur. Stabil haldeki üç boyutlu proinsülin molekülünde hidrofobik ko-rezidüleri molekülün iç kısmında saklıdır. Bunun yanısıra C(B19)-C(A20) disülfid bağı iç kısımda tam olarak gizlenememiştir. Benzer şekilde C(b7)-C(A7) bağı hemen hemen tamamen dış yüzeyde açık bulunur. Bu kısım thiol saldırısına hedef olarak proinsülinin üç boyutlu yapısının destabil hale gelmesine neden olabilir (9,12, 13, 18,19, 20).

Tüm hücrelerde olduğu gibi hücrelerin yeni sentezlediği proteinlerin hemen üçte biri doğru katlanamaz ve bunlar ya tekrar doğru katlanmaya zorlanır ya da elimine edilir. Proinsülin için ise ER de doğru katlanamamış olan proinsülinlerde, hidrofobik kordaki yapışkan (başka moleküllerle ile hızlı reaksiyona girebilen) rezidüleri molekülün dış kısmında teşhir edilebilir, veya gene bu doğru katlanmamış bazı proinsülinlerin dış yüzeyindeki eşleşmemiş veya yanlış eşleşmiş sistein thioller

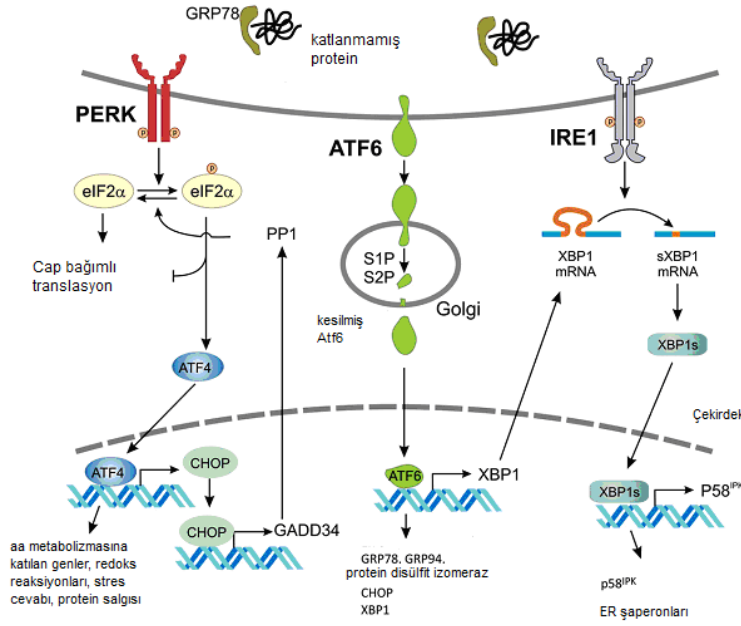
farklı intermoleküler interaksiyonlar açısından tehlike oluşturur. Bu hatalı katlanan proinsülinler, doğru katlanmış proinsülinlerle reaksiyona girerek insülin sekresyon miktarını azaltabilir (9, 11,12, 20)

Stabil haldeki doğru katlanmış proinsülinler daha sonra Golgi cisimciğine taşınır. Golgi cisimciğinde olgunlaşmamış sekretuvar veziküllere aktarılır ve orada çinko aracılığı ile insülin dimerleri daha fazla birleşerek stabil insülin hegzamerleri haline gelir. Gene bu sekretuvar veziküllerde proteaz ile C-peptid kesilip ayrılır. Daha sonra ise aradaki dibazik rezidüleri karboksipeptidaz E ile kesilir. İnsülinin bu son hali, matür sekretuvar veziküllerde depolanır (19).

Metabolik yükün arttığı ve kronik hiperglisemi varlığında proinsülin ve proamylin sentezi artar. Bu durumlarda endoplazmik retikulumda bu proteinlerin fazlalığı, organellerde bu duruma adaptif mekanizmaların gelişimi için gereken uyarıları hareketlendirir (9, 21). Bu mekanizmalar yetersiz olur ise endoplazmik retikulum stresi ortaya çıkar ve insülin sekresyon fonksiyonu ve daha ileri aşamada apoptozis söz konusu olur (10, 12, 13).

Endoplazmik retikulumda artan yük, katlanmamış protein cevabının tetikler. Bu mekanizma ile endoplazmik retikulumda artan protein yükünün yarattığı stresin hücreye zarar vermeden başedilebilmesi hedeflenir. Endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinlerin tetiklediği cevaplar endoplazmik retikulum membranına bağlı birtakım sensör proteinlerin aktive edilmesi ile başlar. Bu ER membranına bağlı transmembran proteinler IRE1, PERK (PKR-benzeri ER kinaz), ATF6 dır (13, 14, 15, 22-24) .

Bu sensör proteinler aktive olduktan sonra β -hücre si nükleusuna ilettikleri sinyaller aracılığı ile ER'ye özgü proteinlerin sentezinde artış, şaperon protein sentezinde artış, ER membran lipid sentezinde artış, translasyonun regülasyonu, proteinlerin doğru katlanabilmesi için gereken yardımcı proteinlerin sentezinde artış sağlar (Şekil 1). Sonuç olarak artan yükü karşılayabilmesi için ER'de genişleme, hipertrofi söz konusu olur. Metabolik stres ile ER üzerindeki stres bu yol ile bertaraf edilemez ise gene IRE1, PERK, ATF6 aracılığı ile β -hücresinde apoptozis başlatılır (22-25).



Şekil1: Katlanmamış Protein Cevabının üç efektör proteini PERK, ATF6, IRE1. Ref 25

Literatürde Tip2 DM sürecinde β -hücre fonksiyon ve kitlesindeki kaybı aydınlatmaya ve etyopatogeneze yönelik ER stresi ile oldukça fazla çalışma mevcuttur. Moleküler düzeyde glukolipotoksisitenin β -hücre ER stresine ve ileri aşamalarda katlanmamış protein yanıtının hücrenin kaybına yol açtığı bilinmektedir (26,27).

Bu patolojik süreçte β -hücresi Golgi cisimciğinde neler olduğu ile ilgili literatürde belirsizlik söz konusudur.

2.3. Diabetes Mellitus, Pankreas β -hücresi ve Golgi Cisimciği:

2.3.1. Sağlıklı bireyde Golgi cisimciği:

Golgi cisimciği (Golgi aygıtı: Golgi kompleksi) ilk defa olarak 1897 yılında İtalyan fizikçi Camilio Golgi tarafından bulunmuştur. Membranla çevrili ve endomembran sisteminin bir parçası olan bu organel Golgi cisimciği olarak adlandırılmıştır (28). Golgi, ER den gelen proteinlerin daha ileri işlendiği ve endozom, lizozom, plazma zarı ve salgı gibi nihai hedef bölgelerine gitmek üzere sınıflandırıldıkları bir fabrika gibi işlev görür. Golgi cisimciği bunlara ek olarak glikolipidler ve sfingomyelin gibi lipid moleküllerinin sentezlendiği organeldir.

Hücrelerde Golgi, zarla çevrili, yassılaşımiş keselerden (sarnıçlar:cisternae) ve bunlarla ilişkili veziküllerden oluşmuştur (28).

Golgi cisimciğinin dikkat çeken bir özelliği, işlevsel ve yapısal olarak bariz bir polaritesinin bulunmasıdır. ER'den gelen proteinler dışbükey yapıda ve genellikle nükleusa bakan tarafta yerleşik, cis yüzünden (giriş yüzü) giriş yaparlar. Sonra Golgi'nin içinden geçerek trans yüzünden (çıkış yüzü) çıkarlar. Proteinler Golgi içinden geçtikleri sırada modifiye edilirler ve hücre içindeki son hedeflerine taşınmak üzere tasnif edilirler. Genel olarak Golgi'nin yapısal ve işlevsel olarak beş bölmeden oluştuğu kabul edilir (Cis Golgi ağı, cis, medyal ve trans alt bölmeler ve trans Golgi ağı). Belirli protein işleme ve sınıflama olaylarının, Golgi cisimciğinin farklı bölgelerinde sıralı işlemler dizisi olarak gerçekleştiği izlenmektedir. ER-Golgi ara kompartmanından gelen proteinler, protein- lipid ve polisakkarid modifikasyonlarının başladığı cis Golgi ağına geçerler. Buradan daha ileri modifikasyonların gerçekleştiği Golgi katmanları, medyal ve trans bölmelerinde ilerlerler. Modifiye protein, lipid ve polisakkaridler, endozom, lizozom, plazma zarı ve hücre dışına gidecek şekilde sınıflandırılarak dağıtım merkezi olarak işlev gören trans Golgi ağına geçerler.

Proteinlerin hangi mekanizma ile Golgi içinde hareket ettiği konusunda iki genel model üzerinde durulmaktadır:

- Kararlı sarnıç (stabil cisternae) modelinde, proteinler, Golgi sarnıçları arasında veziküller aracılığı ile taşınmaktadırlar. Veziküler transport söz konusudur. Buna göre Golgi sarnıçları kararlı yapılardır. Bu kararlı Golgi sarnıçlarında, yani bu özel suborganel içinde burada görev alan farklı proteinler yerleşmiştir. Kendi içlerinde görev yapan aktif enzimler ya burada tutulmakta ya da bir geri dönüşüm döngüsüyle tekrar kullanıma sunulmaktadır. Kargo proteinleri bir sarnıçtan diğerine anterograd COPII vezikülleri içinde taşınırlar. Golgi proteinleri ise COPI veziküllerinden dışarı atılır ve görev yerleri olan sarnıçta kalır. Kargo proteinleri trans-Golgi ağına ulaşır ve oradan clathrin-kaplı veziküller veya diğer taşıyıcılar ile sitoplazmaya atılır.

- Olgunlaşan sarnıçlar (cisternal maturation) modelinde ise, proteinlerin buldukları yapı içerisinde Golgi bölmelerinden sırasıyla taşındığı ve her aşamada bu yapının olgunlaşarak Golgi sarnıçları içerisinde, cis'den transa doğru hareket ettiği bir modeldir. Bu modelde taşıma veziküllerinin proteinleri cis'den transa doğru taşımak yerine, Golgi'de işlev gören proteinleri işlev yerlerine geri taşımakla görevli oldukları kabul edilmektedir. Olgunlaşan sarnıç modelinde, Golgi sarnıçlarının kendileri kargo taşıyıcıları olarak görev yapar. Bu sarnıçlar geçici bölmelerdir. COPII veziküllerinin homotipik füzyonu ile oluşurlar ve cis'den trans'a ilerlerler. Golgi proteinleri ise retrograd COPI vezikülleri içinde geri bir önceki sarnıçta işlev yerlerine dönerler. Bu durumda sarnıçın yapısı progresif işlemler süresince değişime uğrar.

Her iki modelde Golgi'deki protein trafiğinin bazı yönlerini açıklamakla beraber, tüm özelliklerini açıklayamadığından, daha bilinmeyen yönleri vardır (28).

Golgi içindeki proteinlerin işlenmesi, glikoproteinlerin karbohidrat kısımlarının kapsamlı modifikasyonunu içerir. Memelilerde Golgi aygıtı içerisinde, glikoproteinlere farklı şeker birimlerinin eklenmesini sağlayan 250'den fazla enzim bulunur. Bu enzimler farklı kompartmanlarda yerleşik olduğundan glikoproteinlerde karbohidrat işlenmesi, Golgi aygıtında taşınırken sıralı bir şekilde gerçekleşir.

İşlenmenin başlıca öğelerinden biri, ER'de proteinlere eklenen N-bağlı oligosakkaridlerin modifikasyonudur. Bilindiği gibi proteinler ER içinde 14 şeker biriminden oluşan bir oligosakkaridin eklenmesi ile modifiye edilirler. Daha sonra, polipeptidler henüz ER içinde iken 3 glukoz birimi uzaklaştırılır. Golgi aygıtına taşınma sonrasında, bu glikoproteinlerin N-bağlı oligosakkaridleri daha ileri işlenmeye tabi tutulur .

Cis golgi kompartmanında, mannoz birimleri kopartılırken, N-asetilglukozamin birimi eklenir. Medyal Golgi'de birkaç mannoz birimi daha ayrılırken, fukoz ve N-asetilglukozamin birimleri eklenir. Bunu da trans Golgi kompartmanı ve trans Golgi ağında galaktoz ve sialik asid birimlerinin eklenmesi takip eder. Önemli olan, farklı glikoproteinlerin, farklı hücrelerde, Golgi komplekslerinde bulunan enzim miktarlarına ve protein yapısına bağlı olarak, farklı düzeylerde modifiye edilmeleridir. Buna bağlı olarak Golgi aygıtında çok değişik N-

bağlı oligosakkaridlere sahip proteinler salınır. Proteinler ayrıca, spesifik amino asit dizileri içerisinde bulunan alıcı serin ve treonin kalıntılarının yan zincirlerine karbonhidratların eklenmesiyle de modifiye edilebilir (O-bağlı glikozillenme). Bu değişimler Golgi aygıtında, tekli şeker kalıntılarının sırayla eklenmesiyle gerçekleşir. Kimi O-bağlı oligosakkaridler sadece birkaç şeker kalıntısından, kimisi de uzun şeker zincirlerinden oluşmuştur (28,29).

2.3.2.Özel durumlarda Golgi cisimciği:

Golgi cisimciği de tıpkı ER ve mitokondri gibi hücrel ihtiyaca göre gereken proteinlerin işlenebilmesi ve hücrel sağ kalımı sağlamak adına adaptif mekanizmalar geliştirir. Protein sekresyon ihtiyacının arttığı laktasyon gibi fizyolojik durumlarda, laktotrofların prolaktin sekresyonunu gerçekleştirebilmek için golgi cisimciklerini genişlettiği bilinmektedir. Bunun gibi emzirme dönemindeki kadınlarda meme süt bezlerinde de golgi cisimciği genişler ve kapasitesini artırır. İntestinal mukus salgılayan goblet hücrelerinde ve Brunner bez hücrelerinde Golgi cisimciği artan ihtiyacı karşılamak için yani musin-tip O-glikan içeren proteinlerini salgılayabilmek için gerekli enzimatik sistemi arttırarak genişler. Bu olaylar zinciri golgi stres cevabı olarak tanımlanır. Son yıllarda farklı golgisidler ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, golgi stres cevabını tetikleyen birtakım hücre içi sensör proteinler tanımlanmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları TFE3, CREB3/Luman ve HSP47'dir (30,31).

İn vitro ve in vivo çalışmalarda Golgi içinde glikozilasyonun azaltmak için genetik mutasyon modelleri, siRNA ile gen susturması veya glikozilasyon enzimlerinin kimyasal inhibitörleri ile golgi stres yaratılabilmektedir (30,31).

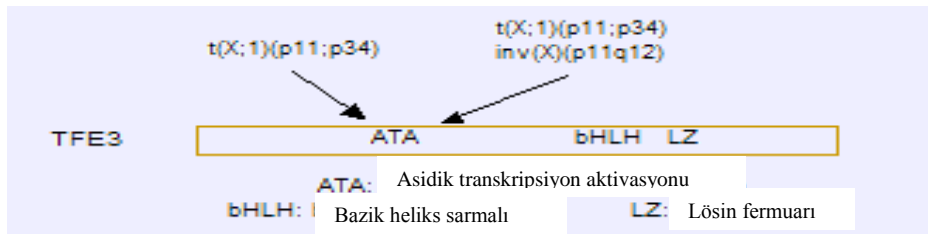
Bunlardan bazıları:

1. **Brefeldin A:** ARF GEF'leri (ADP-ribosylation factor-GTP değişim faktörü) inhibe eder. Golgi aparat enzimlerinin ER'ye geri dönmesine neden olur. Anterograd akışı engeller. ER-Golgi transportu engelenmiş olur, dolayısı ile protein sentezi inhibe olur. Brefeldin A ile Golgi parçalanır. Antiviral, antifungal, antibakteriyel ve antikanserojen olarak kullanım alanları vardır.

2. **Golgisid A (GCA):** ARF1-GBF1'i (GTP bağlayan faktör) inhibe eder. Diğer ARFleri de inhibe edebilir. Dolayısı ile COPI vezikülün golgi membranından disosiyasyonuna neden olur.
3. **Exo 1:** GTP'yi hidroliz eder ve ARF aktivitesini azaltır.
4. **Monensin:** Katyonik iyonofordur. H/Na değişimini artırır. Golgi lümeninin alkalizasyonuna neden olur. Özellikle geç Golgi, post-Golgi ve endozomlarda da şişme meydana gelir. Anterograde ve retrograde transport engellenir. Enzimler alkali ortamda çalışamaz. Selektif Golgi inhibitörüdür. Protein transportu ve şeker zincir modifikasyonlarını engeller.
5. **Nigerisin:** İyonofordur. pH değişimine neden olur. Golgide ozmotik stres yaratır.
6. **O-glikolizasyonun inhibisyonu:** (benzyl 2-acetamido-2-deoksi- α -D-galactopyranoside:GalNAc-bn, xyloside:4-methylumbelliferyl-beta-D-xyloside)
7. **Isı değişimi**

TFE3 (TFEB, TFEC) basic-helix-loop-helix tipi bir transkripsiyon faktörüdür. Memelilerde MITF familyasına ait bHLH-ZIP transkripsiyon ailesindedir. Hepsisi de organel otoregülasyonunda rol alırlar (Şekil 2) (32,33).

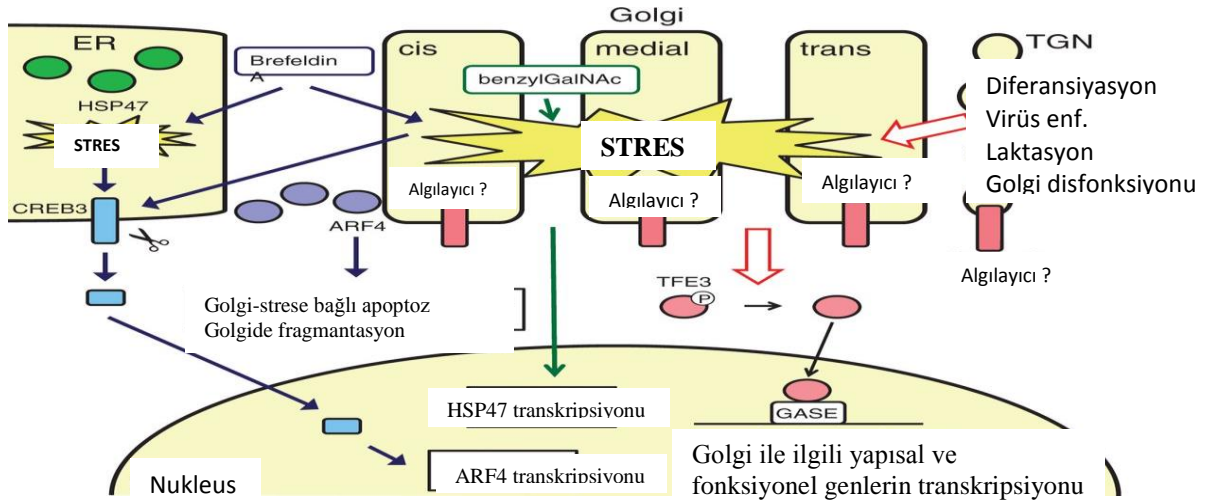
Normal fizyolojik koşullarda sitoplazmada fosforlanmış bir şekilde inaktif olarak durur. İnsanlarda, TFE3'ün özellikle 108. pozisyonundaki serin, proteinin fosforlanabilmesi ve sitoplazmada kalabilmesi için çok önemlidir. Defosforilize hali çok instabildir ve hemen proteolize uğrar (32,33).



Şekil 2: TFE gen bölgesi (Ref.32 Taniguchi M ve ark. TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian golgi stress response. Cell Structure and Function, 40:13-30, 2015)

Golgi cisimciğinde protein glikolizasyon veya modifikasyonları ile ilgili ihtiyaç arttığı durumlarda TFE3 defosforile olur ve nukleusa transport olarak cis-acting enhancer elemente bağlanır (Golgi apparatus stress response element; GASE; ACGTGGC sekansı). Defosforile TFE3, golgi yapısal proteinlerinden GCP60, GM130 (cis-golgi), giantin, golgin 245(TGN); glikolizasyon enzimlerinden Sialiltransferaz 4A (SIAT4A), Sialiltransferaz 10 (SIAT10), fukoziltransferaz 1 (FUT1), UDP-N-asetilheksozamin fosforilaz-like 1 (UAP1L1); veziküler transport komponentlerinden Syntaxin 3A, RAB20, WIPI49, Giantin, GM130 (CİS-Golgi); ve transferin reseptörünün (endozomlar) transkripsiyonunun gerçekleşmesini sağlar (33).

Golgi cisimciğinde stresi algılayarak TFE3'ün defosforilasyonuna neden olan sensör moleküller henüz tanımlanmamıştır (Şekil 3) .



Şekil 3. Golgi aygıtı stres yönetimi

Ref 30. Sasaki K et al. Organelle autoregulation-stress responses in ER, Golgi, Mitochondria and lysosome. J Biochemistry , 2015

Golgisidler ile yapılan çalışmalarda sitoplazmada fosforlanmış olarak inaktif halde bulunan TFE3'ün Golgi içindeki stresin varlığını ileten bilinmeyen bir faktör

sayesinde defosforile edilerek Golgi ile ilgili yapısal ve işlevsel proteinlerin ifadenmesinin arttığı gösterilmiştir. Böylece Golgi hücrenin ihtiyacını karşılayabilecek protein modifikasyonlarını, tasnifini ve sekresyonunu gerçekleştirebilir. Aslında ilk aşamalarda hücrede değişen durum defosofrilize TFE3 miktarındaki artıştır. Dolayısı ile TFE3 mRNA da artış beklenmez. Bizde çalışmamızda TFE3 aktivitesini gösterebilmek için Golgi yapısal genlerin ve Golgi enzimlerinin bazılarının ifadenmesine baktık.

HSP47 (Heat-shock protein 47); (Serpın H1; CBP1; CBP2; OI10; gp46; AsTP3; PIG14; PPR0M; RA-A47; SERPINH2)

HSP47 (Serpın 1) aslında bir ER şaperonudur. Serpın H1 geni (serpın family H member 1) kromozom 11q13.5 da lokalizedir. Sekiz ekzondan oluşur. Serin proteaz inhibitörü serpın süperailesi üyesidir. İfadelediği protein serpın H1, ER’de lokalizedir. ER şaperonu olan HSP47 (Serpın H1) bilinen en önemli fonksiyonu kollajen sentezi sırasında pro-kollajene bağlanmasıdır. Kollajen biosentezinde, kollajen-spesifik şaperon olarak görev alır. Pro-kollajenin ER den Golgi cisimciğine taşınmasını sağlar. HSP47 pro-kollajenden cis Golgi veya ER-Golgi intermediate kompartmanda (ERIC) ayrılır ve Golgi cisimciğine girer. HSP47 üzerinde ER retansiyon sinyali vardır ve pro-kollajenden ayrılan HSP47 tekrar COPI ile ER’ ye döner (30,31).

O-glikozilasyonun yoğun olduğu hücre serilerinde (Colo 205,NIH3T3) *in vitro* yapılan çalışmalarda benzyl GalNAc veya Monensin ile O-glikozilasyon inhibisyonunun HSP47 ifadenmesini arttırdığı gösterilmiştir (34).

Gene siRNA, anti-HSP47 monoklonal Ab ile HSP47 ifadenmesi susturulmuş hücrelerin BenzylGalNAc ile O-glikozilasyonun inhibisyonu sonucu Golgi cisimciğinde dağılma, fragmantasyon, özellikle Golgiye yakın yerlerde sitoplazmada büyük vaküollerin görülmesi, nükleusun parçalanması, kromatinin yoğunlaşması ve apoptozis geliştiği gösterilmiştir (34,35).

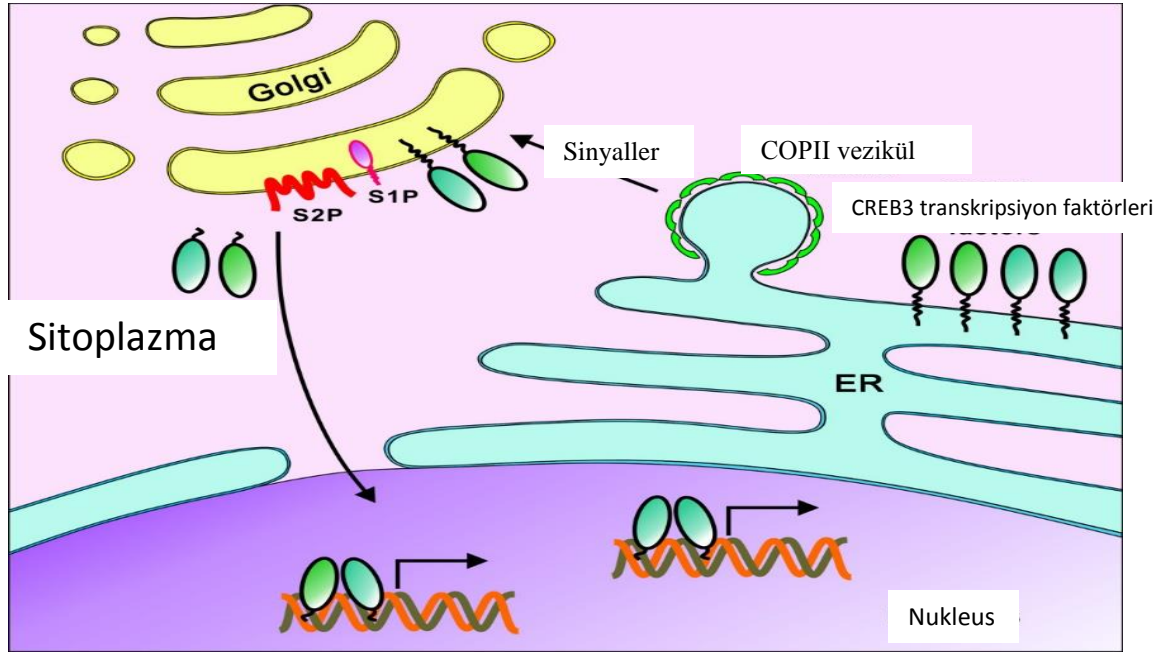
Bu çalışmalar sonucunda ER proteini olan HSP47 (Serpın H1)’nin ifadenmesinin golgi cisimciğindeki strese cevap olarak arttığı düşünülmektedir. HSP47’nin Golgi strese girdiği durumlarda artmakta ve Golgi cisimciğini fragmantasyondan ve hücreyi de apoptozisten korumaktadır.

HSP47 ve Golgi stresi ile ilgili moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır.

CREB3/Luman:

CREB3/Luman ER membranında lokalize basic leucine zipper-taşıyan transkripsiyon faktörüdür. OASİS ailesi (TF6) üyesidir (old astrocyte specifically induced substance). Bu ailenin 5 üyesi vardır ve hepsi ER membranında bulunur (30, 31, 37, 38).

Hüresel stres durumlarında Golgiye taşınarak orada bulunan Site 1 ve Site 2 proteazlar tarafından transmembran kısımları kesilir. N-terminali transkripsiyon faktörüdür (Şekil 4).



Şekil 4. CREB3 aktivasyonu (Ref37:Reiling JH et al. A luman/CREB3-ADP-ribosylation factor 4(ARF4) signaling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. Nat Cell Biol 2013.)

Brefeldin A, Golgiden ER'ye COPII aracılı veziküler transportta rol alan ve golgi cisimciği membranında bulunan ARF leri (küçük G-protein ADP-ribozilasyon faktörü) inhibe eden bir Golgisiddir. Brefeldin A etkisi ile hücre içinde oluşan Golgi stresi endoplazmik retikulum membranında bulunan CREB3'ün proteolizise

uğramasını sağlar. CREB3'ün sitoplazmik domaini membrandan ayrılır ve nukleusa transport olarak ARF4'ün ifadenmesini sağlar (30, 37,38).

ARF4 küçük GTPaz ailesi üyesidir. Golgi membrabında lokalize durumdadırlar. ARF4, Golgiden ER ye COPI aracılı veziküler transportun regülasyonunda görev alır (37-39).

ARF4 ifadenmesinin susturulduğu (ARF4'ü hedef alan shRNA hairpins, ARF4 knockdown hücre serisi, RNAi çalışmaları) çalışmalarda, Brefeldin A gibi golgisidlere rezistans söz konusu olmuştur. Buna benzer olarak ARF4 ifadenmesinin susturulduğu diğer in vitro çalışmalarda da farklı golgisidler (GCA, Exo 1) ile muamele edilen hücrelerin apoptozise gidişi engellenebilmiştir. Bu hücrelerde ER stresine neden olan toksinlere (Tunicamycin, Thapsigargin veya A23187) hassasiyet devam etmiştir ve stres cevabı oluşmuştur (37-39).

ARF4 depleyonu sağlanan hücrelerde Brefeldin A maruziyetinde bile Golgi morfolojisini ve protein trafiğini korur. CREB3 aşırı ifadelendiği durumlarda ise ARF4 ifadenmesi artar. Bu hücrelerin immunofloresans görüntülemesinde Golgi aygıtının dağılmasının göstergesi olan Giantin, GM130 ve GBF1 gibi golgi yapısal proteinlerinin sitoplazmada difüz yayılım gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ARF4'ün Golgi cisimciğinin fragmentasyonunda önemli rol oynadığı ve apoptozisi başlattığı düşünülmektedir (37-39).

ARF1:

ARF'ler evrimsel süreçte korunmuş ve sürekli ifadelenen küçük G proteinlerine ait Ras süper ailesinin bir üyesi olan GTPazlardır. ER-golgi arası, farklı golgi sarnıçları arası ve endositik sistem içindeki sekretuar yollarda kargo transportunda hayati görevleri vardır. Dış yüzey proteinlerinin membrana taşınması, lipid-modifiye eden enzimlerin aktivasyonu ve hücre iskelet yapısının dinamiğinde görev alırlar. Anterograd ve retrograd transportta çok önemlidirler (39).

Brefeldin A, ARF-GEF (küçük G protein-guanin nükleotid-değişim faktörü) kompleksini inhibe ederek golgi kargo transportunu bozar. İnsanlarda ARF G proteinlerine göre 3 sınıf ARF mevcuttur. Sınıf I ARF, ARF1 ve ARF3 den oluşur. Sınıf II ARF, ARF 4 ve ARF 5 den oluşur. ARF6 ise sınıf III ARF'nin tek üyesidir. Hepsi farklı subselüler lokalizasyonda yerleşirler ve görev yaparlar. ARF6 plazma membranı ve endozomlar üzerinde yerleşiktir. ARF1, ARF 4 ve ARF 5 genellikle

erken golgi ve ERGIC (ER-golgi intermediate compartment) da bulunur. ARF3 ise trans golgi ve trans-golgi ağında yerleşiktir. Genellikle ARF1 ve ARF3 hücrede ARF6 ya göre 3-10 kat daha fazla ifadelenir (37-39).

Reiling ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* farklı hücre kültür (A549, HeLa, MCF7, PC3, HEK293T ve PANC1 hücreler) çalışmalarında ARF1'in Brefeldin A gibi golgisidler ile yaratılan golgi stres durumlarında, hücrenin hayatta kalabilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (37).

ARF1 ve ARF5'in ifadelenmesinin susturulduğu (Lentoviral hairpinler, RNA interferans) çalışmalarda ARF1 ve ARF5 eksikliğinin hücreyi Brefeldin A'ya hassas hale getirdiği ve hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. ARF4 'ün susturulması ile ise Brefeldin A toksisitesine direnç geliştiiği ve hücre kaybının azaldığı tesbit edilmiştir. Gene bu çalışmada ARF4 ifadelenmesini arttıran durumlarda ARF1 ve ARF5 ifadelenmesinin azaldığı, bunu tersi durumda da yani, ARF1 ve ARF5 in ifadelemesinin arttığı durumda ise ARF4 ifadelenmesinin azaldığı gösterilmiştir (37-39).

2.4. Glukolipotoksisite ve β -hücreleri:

Tüm dünyada Tip2 DM prevalansının artışında en önemli faktör obezitenin sıklığındaki artıştır. Yağ ve karbohidrattan zengin beslenme kültürünün yaygınlaşması, sedanter yaşam ve stres obeziteye neden olur. Obezite vücutta adiposit hacminin artması ile karakterizedir. Obezitenin yani artmış yağ dokusunun insülin direncine yol açtığı vakalarda plazma serbest yağ asidlerinde artış, karaciğer, iskelet kası, kalp ve pankreas gibi organlarda ektopik yağlanma söz konusu olur. Organlarda görülen ektopik yağlanma ve insülin direnci genetik ve epigenetik nedenlere bağlı olarak bireysel farklılıklar gösterir (1-7). İnsülin direnci nedeni ile artan lipoliz sonucu ve yağdan zengin beslenmeye bağlı olarak plazmada serbest yağ asidleri artar. Bu durumda lipotoksisite denilen birtakım biyokimyasal sorunlar baş göstermeye başlar. β -hücrelerde lipotoksisiteden etkilenen hücrelerdendir (27).

Plazmada artan serbest yağ asidi genellikle adipositlerde artan lipoliz sonucu ortaya çıkan palmitik asit veya diyet ile aldığımız yağlardır. Bu serbest yağ asidleri ve kolesterol β -hücre içerisine CD36 gibi serbest yağ asidi transporterları aracılığı ile girer (40-42).

Lipotoksisite ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda yağ asidlerinin β - hücrelerine akut ve kronik farklı etkileri olduğu tesbit edilmiştir. β -hücrelerinin yağ asidlerine kısa dönem maruziyetinde β -hücre insülin salgısı artarken, uzun dönemde inhibitör etki göstermektedir. Yani yağ asidlerinin akut ve kronik maruziyette β - hücrelerine dual etkisi vardır. Ayrıca bu çalışmalardan elde edilen önemli bir bilgi de yağ asidlerinin toksik etkisi özellikle ortamda glukoz fazlalığı var ise belirgin hale gelmektedir (40-42).

Glukoz fazlalığında, intraselüler glukoz metabolizması ile ortaya çıkan sitrat gibi ara ürünler, sitozolde malonyl-CoA'nın birikimine neden olur. Çünkü β - hücrelerinde sitozolde acetyl-karboksilaz enzimi, yağ-asid sentaz enzimine göre daha aktiftir. Sitozolde biriken malonyl-CoA, mitokondri dış membranında bulunan Carnitine-Palmitoyl Transferaz -1 (CPT-1) aktivitesini inhibe eder. Dolayısı ile hücre sitozolündeki yağ asidleri mitokondriye giremez ve β -oksidasyona uğrayamaz. Uzun zincirli açıl-CoA esterleri mitokondride okside olamadığı için sitozolde birikir. (26).

Hücre içinde trigliserid olarak depolandığı takdirde, yağ asidleri hücrede daha az lipotoksik etki gösterir. Dolayısı ile yağ asidlerinin trigliseride dönüştürülebilmesi hücre için koruyucu mekanizmalardan birisidir. Tekli-doymamış yağ asidleri çok daha çabuk trigliseride esterifiye olabildiğinden lipotoksik etkileri azdır. Doymuş yağ asidleri ise daha zor esterifiye olabildiğinden lipotoksiktir. Stearoyl Co-A desaturaz-1 (SCD-1) hücre içinde doymamış yağ asid miktarını arttırdığı için hücreyi lipotoksisiteden korur (40- 42).

Kato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, palmitik asidin SREBP1c (sterol regulatory element binding protein 1c) transkripsiyon faktörünün ifadenmesini arttırdığı ve buna bağlı olarak küçük GTP-bağlayan protein Rab27'nin efektörü granulophilin adlı proteinin ifadenmesini arttırdığı tesbit edilmiştir. Bu durumda insülin sekretuar granüllerinin plazma membranına bağlanması etkilenir. Sonuç olarak bazı çalışmalarda hücre içinde artan yağ asidlerinin insülin sekresyon basamaklarını da etkileyebileceği gösterilmiştir (44).

Palmitik asid, β -hücrelerin glukozla bağlı insülin gen ifadenmesini etkiler. İnsülin geninin transkripsiyon başlama bölgesinden yaklaşık 340 baz-çifti öncesinde (upstream) bulunan promoter/enhancer bölgesi evrimsel süreçte oldukça korunmuş bir bölgedir. Bu bölgedeki A3, C1 ve E1 gibi belli başlı bölgeler oldukça önemlidir.

A3, C1 ve E1'e sırası ile homeodomain protein pankreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1), bazik bölge lösün fermuar MafA ve heterodimerik kompleks bazik heliks-loop-heliks (bHLH) proteinleri (beta hücre için spesifik olan Beta2/NeuroD) bağlanır (15). Rat Langerhans adacıklarında yapılan çalışmalarda, palmitik asid varlığında (0,5mM) PDX-1'in nükleusa translokasyonunda sorun olduğu ve nükleer konsantrasyonunun azaldığı tesbit edilmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında ise (16,7mM) PDX-1 özellikle nukleusta lokalize olarak tesbit edilir. Bununla birlikte yüksek doz palmitik asid (0,5mM) MafA'nın hem sitozolik, hem de nükleer fraksiyonunu azalttığı tesbit edilmiştir. Dolayısı ile palmitik asidin bu proteininin ifadelenmesini azalttığı sonucuna varılmıştır (45).

Palmitik asid, hücre içinde de novo seramid sentezine yol açar. Seramid, protein kinaz B ile etkileşime girer ve phoshatidylinositol-3-kinaz yolağını etkiler. Bu nedenle PDX-1'in nükleusa translokasyonunu engellemiş olur. Palmitik asidin MafA'yı ifadelenmesini nasıl etkilediği ise henüz net değildir (45,46).

Hücre içinde seramid sentezi palmitik asid varlığında endoplazmik retikulumda başlar. ER'de palmitoyl-coA sentezlenir. Serine palmitoyl transfraz enziminin özellikle palmitatın-CoA-tiol ester grubuna afinitesi yüksektir. Bu nedenle ER içerisinde serine palmitoyl transferaz enzimi aracılığı ile seramid sentezi başlar (27,47,48).

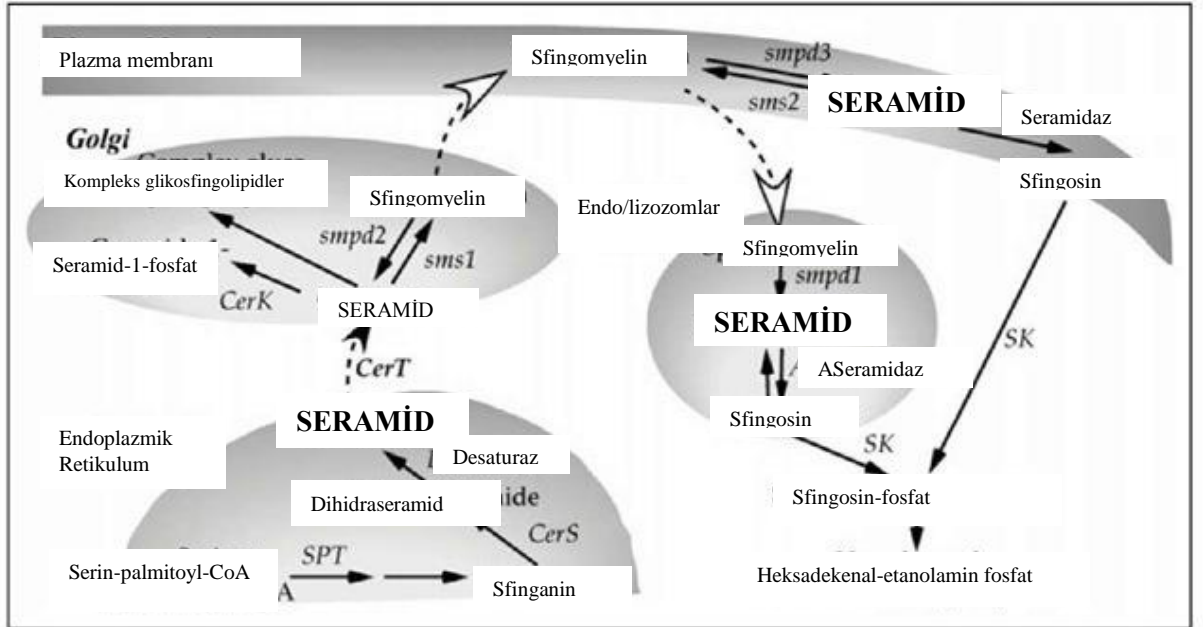
Seramid, Golgi aygıtına hem veziküler hemde nonveziküler yol ile taşınır. Veziküler yol ile Golgi cisimciğine seramid ile birlikte yüzlerce lipid molekülü Golgi'ye taşınabilir. Giussani P ve ark. ile Gjoni E ve ark.yaptıkları çalışmalarda, seramidin ER'den Golgi cisimciğine veziküller içinde taşınabilmesi fosfotidil-inositol-3-kinaz (PI3K)/Akt yolu aracılığı ile gerçekleştiğini ortaya koymuştur (27, 46).

Nonveziküler yol ise seramid transfer protein (CERT) aracılığı ile gerçekleşir. CERT protein üzerinde PH domaini, Golgi cisimciği membranında fosfotidil-inositol-4-fosfat (PI-4P)'ı tanır ve bağlanır. CERT üzerindeki PH domainin hiperfosforilasyonu, CERT'in Golgi cisimciği membranında PI-4P'a (fosfotidilinositol-4 fosfat) bağlanmasını engeller. Nonveziküler seramid transferi, ER ve Golgi aygıtının yaklaştığı membran kontakt alanlarında gerçekleşir. Bu yaklaşılan membran bölgelerinde seramid transfer protein ve diğer lipid transfer

proteinleri oldukça fazla bulunur. Bu taşıma proteinleri çok kısa mesafe kat ederek ER ve Golgi aygıtı arasında hareket eder (48,49).

Memelilerde ER ile Golgi aygıtının yakınlaştığı membran temas bölgeleri uzun yıllardır bilinmektedir ve en çok ER ile trans-Golgi arasında tesbit edilmiştir. Yamaji ve ark ile Olkkonen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda bu bölgelerde ER ve Golgi aygıtının membranlarını yakınlaştıran bağlayıcı proteinler oksisterol-bağlayan proteinler olduğu gösterilmiştir (OSBP). Kolesterol ve seramid ER'den trans-golgiye taşınır. OSBPlar hem ER membranı üzerinde bulunan VAP (vesicle-associated membrane protein-associated proteins) proteinlerine, hem de trans-golgi membranı üzerindeki PI4P'a bağlanabilir. OSBPlar, PI4p ile kolesterolü yer değiştirerek transport eder. Seramid transfer proteini (CERT) ise seramid ile PI4P yer değişikliği yaparak organeller arası transportu sağlar. OSBP ve CERT fiziksel ve fonksiyonel olarak birbiri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. CERT ve OSBP'ler üzerlerindeki START, FFAT ve PH domainleri aracılığı ile ER üzerinde VAP'lara, golgi membranında PI4P'a ve kolesterol ve seramide bağlanabilmektedir (49).

Golgi aygıtına taşınan seramid, orada glukozil seramid, sfingomyelin ve diğer kompleks glikosfingolipidlerin sentezinde kullanılır (Şekil 5)



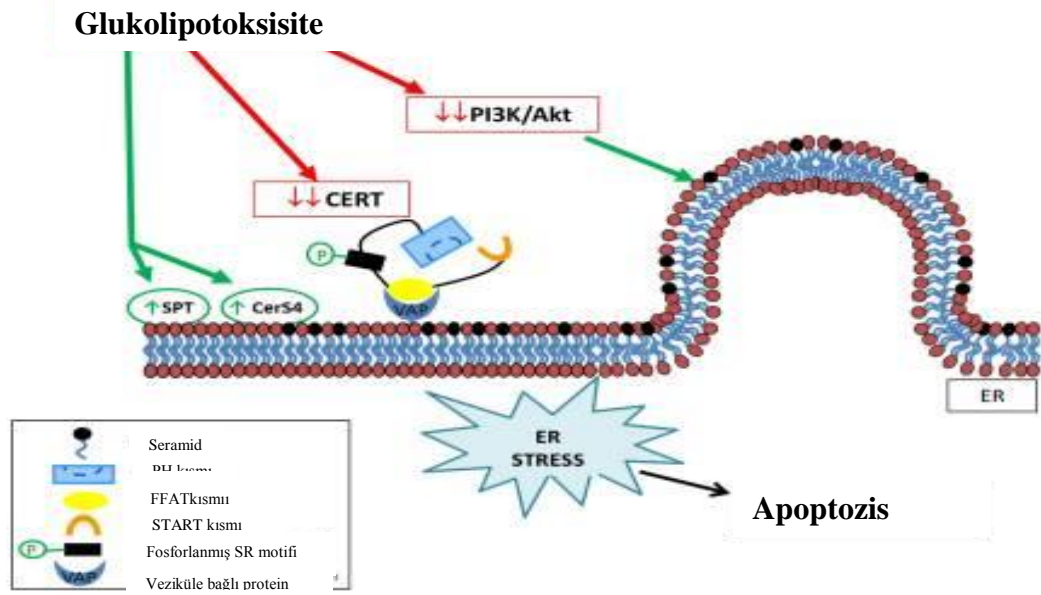
Şekil 5. Seramid sentez ve hücre içi biyokimyasal yolları. SPT: Serin Palmitoyltransferaz; Cers: Seramid sentaz; CerT: Seramid transfer protein. SMS1 &

2: sfingomyelin sentaz 1 & 2; smpd1: Asid Sfingomyelinaz, smpd2: Nötral sfingomyelinaz1, smpd3: Nötral sfingomyelinaz 2. CerK1, Seramid Kinaz1; SK: Sfingosin kinaz, ACeramidase: Asid Seramidaz;
Ref 47: Lin Yee-Shin, Lin Chiou-Feng. Ceramide in apoptotic signalling and anticancer therapy. Current Medicinal Chemistry, 2006.

Hiperlipidemi ve glukolipotoksik durumunda hücre içinde seramid birikimi söz konusu olur. Gjoni E. Ve arkadaşlarının INS-1 β -hücre hattında yaptıkları çalışmada literatürde ilk defa olarak glukolipotoksisite ile hücrelerde seramid birikimi gerçekleşirken, sfingomyelin miktarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Sfingolipid türevlerinden glikozilseramid miktarları glukolipotoksisiteden etkilenmemiştir. Glukolipotoksiste hücre içinde seramid birikimine yol açarken sfingomyelin miktarını azaltmaktadır. Bunun mekanizması çok net açıklanamamış olsa da glukolipotoksisitenin seramid transfer protein CERT üzerindeki SR (serin repeat motif) motifinin fosforilasyonun etkileyerek, CERT'in Golgi cisimciği ve ER membranına lokalize olmasını azalttığı tesbit edilmiştir. CERT'in membrana bağlanmasının engellenmesi seramidin ER'den Golgi cisimciğine geçişini azaltır ve seramid ER'de birikir. Nitrik oksid veya sfingosine 1-fosfat fosfohidrolaz-1 (SPP1) ifadelenmesinin arttığı durumlarda seramid veziküler trafiği aksar ve seramid Golgi'ye taşınmayarak ER'de kalır. Glukolipotoksisitenin seramid trafiğine etkisi ile ilgili veriler çok azdır.

Gjoni ve arkadaşlarının INS-1E hücre hattında yaptıkları deneylerde, palmitat tek başına ve 5 mMol glukoz ile birlikte (glukolipotoksisite oluşturularak), β -hücresinde PI3K/Akt yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bunun sonucunda ise seramidin ER'den Golgi cisimciğine veziküler transportu engellenmiştir (Şekil.6) (27).

Aynı çalışmada yazarlar, yüksek konsantrasyonda glukozun (30mMol Glukoz) N-sfingomyelinaz (N-SMase) aktivitesini arttırdığını ve sfingomyelin biyosentezini azalttığı göstermiştir.



Şekil 6. Glukolipotoksisite ile seramid birikimi CerS4:seramid sentaz 4; SPT: Serin palmitoyl transferaz

Ref 27. Gjoni E, Brioschi L, Cinque A, Coant N, Islam NM, Ng CKY, Verderio C, Magnan C, Riboni L, Viani P, Stunff HL, Giussani P. Glucolipotoxicity impairs ceramide flow from the endoplasmic reticulum to the Golgi Apparatus in INS-1 β -cells. Plos One 9(10), e110875.

Seramid hücre içinde biriktiği takdirde ciddi toksik etkiye sahip lipid metabolitidir. Seramidin organel içinde toksik birikiminin önlenmesi için seramidaz enzimleri önemlidir. Seramidaz enzimleri seramidi parçalayarak uzun-zincirli bazlar ve yağ asitleri oluşturur. Bununla birlikte seramidin Golgi aygıtına taşınarak farklı lipidlerin sentezlenmesinde kullanılması da seramid toksisitesini önlemek açısından oldukça önemlidir. Bu lipidler sfingomyelin olabileceği gibi sfingomyelin analogları da olabilir (27,47).

Dolayısı ile hücre içinde seramid birikimini tetikleyen lipotoksik ve glukolipotoksik durumlarda, seramid toksisitesini önlemek için Golgi cisimciği sfingolipid sentezini arttırmak zorunda kalabilmektedir. Bu nedenle Golgi cisimciği hacminde, yapısında, sentezle ilgili enzimlerde ve transportu ile ilgili protein ve enzimlerinde adaptif artışlar söz konusu olması beklenmektedir.

Tip2DM gibi hiperglisemi ve hiperlipidemisinin birlikte artışı ile karakterize hastalıklarda, hücre içine giren glukoz artışı da lipidlerin toksik etkisini potansiyalize eder. Glukoz ve lipidlerin hücre içinde birlikte arttığı metabolik stres durumlarında, lipidlerin mitokondriyel β -oksidasyonu yavaşlayacağı için seramid birikimi daha belirgin hale gelir. Glukolipotoksisite denilen bu toksik metabolik durum pankreas β -hücre fonksiyonlarında duraksamaya daha sonra ise apoptozis ile hücre kaybına neden olduğu bilinmektedir (50-51).

2.5. Çalışmanın Amacı:

Daha önce farklı kimyasallar, genetik susturma modelleri ve monoklonal antikolar kullanılarak Golgi cisimciği fonksiyonlarını bozan golgisidler ile yapılan çalışmalarda Golgi aygıtının tıpkı ER stresinde olduğu gibi adaptif ve/veya maladaptif mekanizmalar ile hücre içinde yaşanan strese bir şekilde yanıt verdiği tesbit edilmiştir. Biz bu çalışmamızda Tip2DM vakalarında β -hücrelerinin maruz kaldığı glukolipotoksisitenin, ER stresinde olduğu gibi Golgi cisimciğinde de stres yaratabileceği hipotezi ile invitro koşullarda β -hücrelerinde metabolik stres yaratmayı ve literatürde tanımlanmış Golgi stres proteinlerinin ifadenmelerindeki değişimleri araştırmayı hedefledik.

Golgi stresle ilgili olarak çok sınırlı sayıdaki mevcut literatür bilgilerimiz dahilinde beklediğimiz glukolipotoksisitenin ilk aşamalarında, hücre hayatta kalmak adına bilmediğimiz sensörler aracılığı ile Golgi cisimciğinin kapasitesini artıracak adaptif mekanizmaları devreye sokmasıdır. Gene çok az sayıdaki in vitro çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında bu aşamada β -hücrelerde HSP47 (Serpin H1) ve aktif TFE3 seviyelerinde artış beklemekteyiz. Stresin uzaması veya artması halinde ise bu proteinlerde azalma ve hücrede Golgi fragmentasyonunu ve apoptozisi tetikleyen CREB3 ve bu transkripsiyon faktörünün ifadenmesini arttırdığı ARF4 seviyelerinde artış öngörülmektedir.

3.GEREÇ ve YÖNTEM:

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar:

3.1.1.Hücre kültürü:

Hücre Hattı: Çalışmada kullanılan INS-1E hücreleri İsviçre Genova Üniversitesi Prof. Dr. Pierre Maehler tarafından bağışlanmıştır. Yurt dışından soğuk zincirde gelen hücreler oda ısısında çözülerek uygun besi yerinde çoğaltıldıktan sonra çalışmanın malzemeleri tamamlanana kadar dondurularak sıvı nitrojen (-180° C) de saklanmıştır.

3.1.2. [3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium Bromid] (MTT) sitotokstite testi:

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

3.1.3. RNA izolasyonu

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

3.1.4. Agaroz jel elektroforezi

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

3.1.5. .cDNA sentezi

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

3.1.6. cDNA kontrol PCR

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

3.1.7. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR)

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

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

3.2. Araştırma Planı ve Yöntemler:

Bu çalışmada INS-1E hücre hattı (rat insülinoma hücre hattı) kullanılacaktır. INS-1E hücreleri İsviçre Genova Üniversitesi Prof. Dr. Pierre Maehler tarafından bağışlanmıştır.

3.2.1. INS-1E hücrelerin çözülmesi:

Azot tankından içinde, %10 DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş (-180⁰ C) olan hücreler çıkarılarak, önceden 37°C ayarlanmış su banyosu içinde 1 dakika bekletildi. Başka bir tüp içine 9 ml besiyeri konuldu ve dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı bu tüpe aktarıldı. 1000 devirde 3 dakika santrifuj sonrası tüpün üstündeki supernatan atıldı. Tüpün dibinde kalan çökelti (pelet) üzerine besiyeri eklendi. Eklenen besiyeri ile pipetaj sonrası, tüpte oluşan hücre+besiyeri karışımı 25ml'lik 2 flaska ekildi. Inverted mikroskopta hücrelerin incelenmesi sonrasında hücreler CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.2.2. INS-1E hücrelerin çoğaltılması ve idamesi:

INS-1E hücreler için, 1mM sodyum piruvat, 50 µM 2-merkaptöetanol, 2mM glutamin, 10mM HEPES, 100 units/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal dana serum eklenen RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Yedi günde bir bu besiyeri değiştirilerek 37°Cde %5 CO₂'li inkübatörde büyümeleri sağlandı. Ayrıca flasklar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma ve infeksiyon açısından değerlendirildi. Hücreler ekildikleri flaskları kapladıklarında (%90 konfluensiye ulaştıktan sonra) %0.25 Trypsin-EDTA ile pasajlandı. Pasaj sonrası hücrelerin 25 cm²'lik yeni flasklara 4X10⁴ hücre / cm² olacak şekilde ekilip üremeleri sağlandı. Çalışma için yeterli sayıda hücre elde edildiğinde hücreler 96 kuyulu plaklara ve lamlara ekildi. Her bir kuyuya 40 bin hücre ekimi yapıldı.

3.2.3. Palmitik asit solüsyonu hazırlanması:

Bu çalışmada golgi stres yaratmak amacı ile endoplazmik retikulumda stres yarattığı gösterilmiş doymuş yağ asidi palmitik asit literatürdeki bilgiler ışığında (Martino, Masini ve ark., 2012) 70°C'de 0,1 M sodyum hidroksit kullanılarak

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

3.2.5. Hücre canlılığı ve sitotoksosite testi:

INS-1E hücreleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asit + glukoz ile muamele edilerek toksik süre ve doz MTT testi ile belirlendi. MTT testi ile palmitik asit ve glukozun hücreler üzerindeki sitotoksosite düzeylerini (IC50=İnhibitör doz) saptadık.

Bunun için ilk önce toma lamında sayım yapıldı. Daha sonra INS-1E hücreleri 4×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekim yapıldı. Kuyucuklara 100µl besiyeri eklenerek, tutunmaları için 48 saat 37 °C' de %5CO₂'li etüvde beklendi.

Hücreler 0,5mM palmitik asit varlığında 0, 16, 24 ve 48 saat inkübe edildi. Palmitik asitin (PA) INS-1E hücrelerinde ER stresi yaratacak konsantrasyonu, bilim dalımızda daha önce yaptığımız çalışma (Verdi H ve ark. , henüz yayınlanmadı) ve literatürdeki bilgiler ışığında (Martino, Masini ve ark., 2012, Merglen ve ark, 2013) 0,5mM olarak yeniden belirlendi.

Glukoz için ise hücreler 5 mMol, 16,7 mMol ve 33 mMol Glukoz varlığında 0, 16, 24, ve 48 saat inkübe edildi. Bu çalışmada Golgi cisimciğinde stres yarattığını düşündüğümüz glukoz konsantrasyonu da, doymuş yağ asidi palmitik asit gibi literatürdeki bilgiler ışığında (Martino, Masini ve ark., 2012, Merglen ve ark, 2013) hazırlandı.

Her bir saat için ayrı bir 96 kuyuluk plak kullanıldı. İnkübasyon süresi dolan plak etüvden alındı ve üzerindeki besiyeri çekilerek daha önceden hazırlanan MTT (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)

solüsyonu toplamda 100 µl besiyeri içinde 5mg/ml olacak şekilde eklendi (hücrelerin bulunduğu kuyulara yaklaşık 10µl MTT sol.). Bir saat 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre canlılığı ve sitotoksitesisi kolorimetrik MTT kit ile belirlendi. Bir saat sonra 550nm - 690 nm dalga boyunda mikro ELISA okuyucuda (EPOCH Gen 5 2.0) okundu ve sonuçlar all-in-one microplate reader programında analiz edildi.

Kararlı (dayanıklı) tetrazolium tuzu olan MTT hücrelerde gerçekleşen kompleks hücresel mekanizma ile çözülebilir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerde NAD(P)H'nın glukolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir.

Toksik doz ve sürenin saptanmasının ardından INS-1E hücrelerine uygun doz ve sürede palmitik asit, glukoz ve palmitik asit+ glukoz uygulandı.

3.2.6. Hücre kültürü materyalinden RNA izolasyonu

Doksanaltı kuyulu plaklara ekilmiş olan INS-1E hücreleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asit ve glukoz ile gerekli inkübasyon süreleri sonunda (0, 8, 16, 24 ve 48. saat sonunda) bu kuyulardan toplandı. Toplanan hücreler RNA izolasyonu yapılacağı tarihe kadar -80°C de saklandı.

Uygulamanın ardından INS-1E hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Bunun için çok iyi sterilize edilmiş laboratuvar ortamında çalışıldı. Total RNA izolasyon işlemi için hücre kültür uygulamasından sonra RNA için ayrılan flasklardan (1,5 ml'lik steril deney tüpleri) hücreler toplandı. Bu hücrelerin üzerine QIAGEN-RNeasy Mini Kit içerisindeki RLT buffer eklendi (optimizasyon için 350 µl eklendi). RNA'yı RNAaz'lardan pürifiye edebilmek için her 1 ml RLT buffer içerisine 10µl beta-merkaptotanol konuldu.

Uyguladığımız protokolda, palmitik asit, glukoz ve palmitik asit ve glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinden aşağıdaki sistem takip edilerek RNA izolasyonları yapıldı.

1. -80°C'den RLT buffer içerisindeki RNA örnekleri çıkarıldı ve çözünmeye bırakıldı. Bu esnada izolasyon için tüpler hazırlandı.

2. RLT buffer içeren örneğe 1 volüm 350 µl DEPC'li su ile hazırlanmış olan %70'lik etil-alkol (EtOH) eklendi. Bu çalışmada 350 µl RLT buffer eklendiği için 350 µl %70'lik EtOH eklendi ve pipetaj yapıldı.
 3. Total hacmi 750 µl olan karışım spin kolonlara aktarıldı.
 4. 8000g'de 15 saniye santrifüj yapıldı ve kolon altında kalan kısım atıldı.
 5. Spin kolona 700 µl (buffer) RW1 tamponu eklendi.
 6. 8000g'de 15 saniye santrifüj yapıldı ve kolon altında kalan kısım atıldı.
 7. Spin kolona 500 µl (buffer) RPE tamponu eklendi.
 8. 8000g'de 15 saniye santrifüj yapıldı ve kolon altında kalan kısım atıldı.
 9. Spin kolona tekrar 500 µl (buffer) RPE tamponu eklendi.
 10. 8000g'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve kolon altında kalan kısım atıldı.
 11. Bu basamaktan sonra spin kolon yeni bir tüpe yerleştirilerek full speed 1 dakika daha santrifüj edilip membran iyice kurutuldu.
 12. Kolon temiz bir tüpe aktarıldı. Karışmaması için 1,5ml'lik kapağı kesilen eppendorf tüpün üzeri etiketlendi.
 13. Kolon üzerine kit içerisinde hazır çıkan 30-50 µl'lik (bu çalışmada 45 µl koyuldu) RNase free dH₂O eklendi.
 14. 8000g'de 1-2 dakika santrifüj yapıldı ve kolon altında kalan kısım alındı. Total RNA bu şekilde elde edildi.
 15. RNA'nın 35 µl'si temiz tüpe aktarıldı. Kalan 10 µl'lik kısım RNA ölçümü ve RNA jel elektroforezi için ayrıldı. Bu işlem ile ana stoğun sürekli dondurma-çözme süreçlerine maruz kalması engellenmiş oldu. Ayrılan bu RNA'nın 2-3 µl'si agaroz jelde RNA kalitesinin değerlendirilmesi, 2-3 µl'si RNA kantitasyonu için, 2-3 µl ise cDNA sentezinde kullanılmıştır.
- İşlem yapılan kadar tüpler -80°C de saklandı.

3.2.7. RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi:

Ayrılmış olduğumuz RNA'nın sağlamlığını kontrol etmek için agaroz jel elektroforez yöntemi uyguladık.

İzole edilen RNA'lar hazırlanan %1,5'lük agaroz jelde kontrol edildi. RNA ürünümüzü yükleme bufferı Orange G ile karıştırarak (her örnek için yaklaşık 5 µl) 70 ml %0,5lik TAE (Tris Asetik asit EDTA) tamponu içinde çözülen 1,4 gram

agaroz mikrodalgada jel şeffaflaşmaya kadar kaynatıldı. İçine 2-2,5 µl (10mg/ml) etidyum bromür eklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra 2 µl jel yükleme tamponu ile karıştırılan 2 µl RNA örneği yavaşça kasete döküldü. 90V'da 60 dakikayı aşkın sürede yürütüldü. Daha sonra görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntü alındı.

Total RNA'nın yaklaşık %80'inini oluşturan 28S ve 18S RNA belirgin bant kat olarak gözlenmiş ve 28S:18S oranı yaklaşık 2:1 bulunmuştur. Dolayısı ile bu çalışmamızda jel elektroforez ile yürütme sonrası 28S, 18S ve 5S RNA net bir biçimde gözlenmiştir.

3.2.8. RNA saflığının ve miktarının tayini

Bu aşamadan sonra elde ettiğimiz RNA'nın kalite ve kantitesini değerlendirdik. İzole edilen RNA'ların saflığını kontrolü 260/280 nm dalga boyundaki absorbans oranı ile saptandı. Nükleik asitler (DNA, RNA, nükleotidler) ışığı 260nm dalga boyunda emerler. Proteinler ışığı 280 nm dalga boyunda emerler. A260/A280 oranı DNA ve RNA'nın ne kadar saf olduğunu gösterir. Absorbans değeri nükleik asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. RNA için A260/A280 oranı yaklaşık 2 olması beklenir. 1,7'nin altındaki değerler genellikle protein kontaminasyonunu gösterir.

RNA'nın spektrofotometrik ölçümü EPOCH cihazı ile yapıldı. Cihazın bağlı olduğu bilgisayardaki Gen5 programı aracılığı ile nükleik asid saflığının 260nm ve 280nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri yapıldı. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenen 260/280nm absorbans oranı 1,8-2,1'dir. Cihaz örnek yükleme plate'i küçük bir parça gazlı bezle dH₂O dökülerek silindi ve yine bir parça gazlı bez yardımı ile kurulandı. Daha sonra sistemin blind kuyuları seçilip 2µl dH₂O distile su konularak kalibre edildi. Örnekler 1:1 dH₂O ile dilüe edildi. Bunun için küçük PCR tüplerine 2µl dH₂O, 2µl RNA örneği konularak karıştırıldı. Daha sonra plate'e ürünler yüklendi ve gereken nanometrelerde okutuldu ve µl'deki RNA miktarı bulundu. Bu veri cihaz tablosundan bir excell tablosu halinde çıktı.

Elde edilen RNA'ların 260/280 nm absorbands oranı 2,0-2,1 olarak ölçülmüştür. 2 kat dilüsyon yapıldığı için, ölçüm sonrası elde edilen veriler 2 ile çarpılarak izole edilen RNA'ların miktarları saptanmıştır.

3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) sentezi :

INS-1E hücreleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asid ve glukoz ile gerekli inkübasyonu sonrası hücrelerden elde ettiğimiz, saflığından ve sağlamlığından emin olduğumuz RNA havuzumuzu elde ettikten sonra bu havuz içindeki mRNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirilmiştir.

cDNA çift zincirlidir ve tek zincirli RNA ya göre daha dayanıklıdır. Bu çalışmada da elde edilen mRNA'larımız çift zincirli cDNA'ya dönüştürülerek daha kolay ve ayrıntılı inceleme yapmak mümkün olabilmektedir.

cDNA sentezi için ticari bir kit olan ROCHE marka Transcriptor High Fidelity DNA Synthesis Kit kullanıldı. Steril, nükleaz uzaklaştırılmış PZR tüpleri buz üzerine koyuldu ve kalıp- primer karışımı aşağıdaki miktarlara göre hazırlandı.

Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için):

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

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

Komplementer DNA (cDNA) karışımı:

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

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

Bu aşamada cDNA hazırlanmış oldu. Elimizde yaklaşık 20 µl ve 500 ng/µl konsantrasyonunda cDNA mevcut oldu. RT-PCR için genellikle cDNA konsantrasyonu 200 ng/µl olarak kullanılmaktadır. Bunun için konsantrasyon hesabı ile gereken dilüsyon yapılır.

3.2.10. cDNA kontrol PZR

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

Kontrol PZR protokol:

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

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

3.2.11. RT-PCR ekspresyon protokolü:

ER stres sensör geni GRP78, Golgi cisimciği yapısal genlerinden GCP60 (ACDB3), GM130 (Golga2), ARF1, Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden sialiltransferaz 4A (st3gal1), sialiltransferaz 10 (st3gal6) ile golgi cisimciği stres genleri HSP47 (serpin H1), CREB3 ve ARF4 genlerinin ifadelenmeleri saptamak amacı ile her bir rat genine ait real time ready prob ile birlikte LightCycler TaqMan Master kiti kullanıldı. LightCycler TaqMan Master karışımı kit protokolüne uygun olarak hazırlandı. Bunun için ilkönce kit içinde bulunan ve 1a ile işaretlenmiş olan enzimden 10 μ l alınarak 1b ile işaretli olan reaksiyon karışımına ilave edildi. Böylelikle elde edilen karışımda fast start Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımı (dTTP yerine UTP olacak şekilde) bulunması sağlandı.

Ekspansiyonel faza girdiği nokta o genin ifadelenmesini gösterir. Bir genin ifadelenmesi ne kadar yüksekse ekspansiyonel faza o kadar çabuk girer. Az ise o kadar geç girer. Ama plato fazında birbirlerini yakalarlar.

Gen ifade değişikliği oranlarının hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünü temel alan amplifikasyon etkinliği değeri olan E değerini 2 olarak reaksiyon etkinliğinin %100 olduğunu kabul eden program kullanıldı. Formülün açık hali aşağıdaki gibidir:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(\Delta Ct_{Hedef\ Gen\ (Kontrol-\u00d6rnek)})-[\Delta Ct_{Housekeeping\ (Kontrol-\u00d6rnek)}]]}$$

3.3. İstatistiksel Analiz:

İstatistik incelemede, MTT testi iki fakt\u00f6rl\u00fc, fakt\u00f6rlerden biri tekrarlanan ‘‘Tekrarlanan \u00d6l\u00e7\u00fcmeler Varyans Analizi’’ (Repeated Measures Analysis) testiyle değerlendirilmiştir ($P < 0,05$). Gen ifadelerinin analizinde ise genel doğrusal model olarak tekrarlı \u00d6l\u00e7\u00fcmelerde varyans analizi (repeated measures analysis of variance) uygulanmıştır. Tip 1 hata (α) =0,05 alınarak \u00f6nemlilik değerleri (significant-p değeri) karşılaştırılacaktır. P (significant) $\leq\alpha=0,05$ farklılık istatistiksel olarak \u00f6nemli kabul edilmiştir.

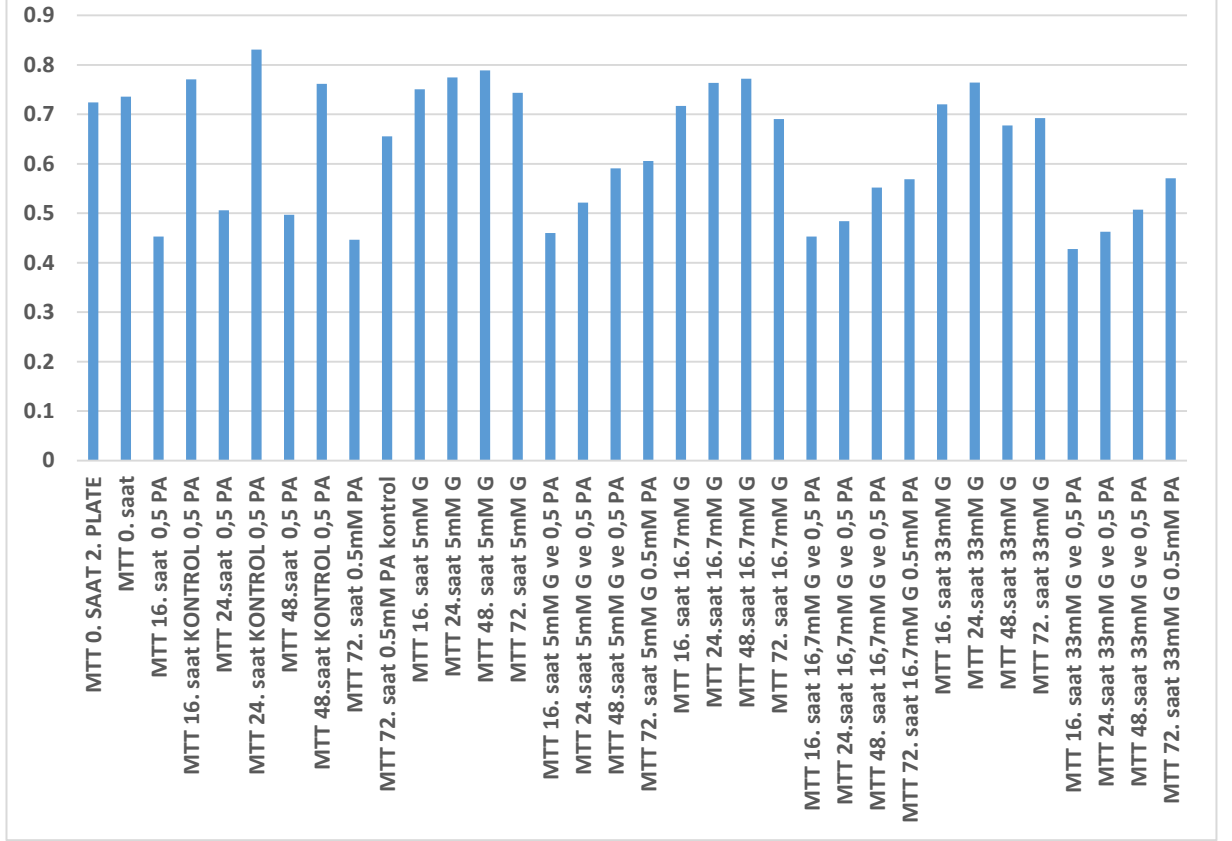
4. BULGULAR:

Palmitik Asit ve Glukozun INS-1E H\u00fcreslerinde Zamana ve Doza Bağlı Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi ile Değerlendirme Bulguları:

Palmitik asit (0,5mMol) ve Glukozun (5mMol,16,7 ve 33 mMOL) INS-1E h\u00fcreslerine zamana ve doza bağlı olarak ortaya \u00e7ıkan sitotoksik etkilerinin MTT testi ile değerlendirme sonu\u00e7ları Grafik 1 ve Tablo 1 de verilmiştir.

Grafik 1: INS-1E h\u00fcresleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asit + glukoz ile muamele edilerek toksik s\u00fcres ve doz MTT testi:

TÜM SAAT VE UYGULAMALAR GRAFİĞİ % CANLILIK ORANLARI



PA0,5 = 0,5mMol Palmitik asit; G5= 5 mM Glukoz; G16,7= 16,7 mM Glukoz;
 G33= 33 mM Glukoz; G5PA0,5= 5mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit;
 G16,7PA0,5= 16,7mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit; G33PA0,5= 33 mM
 Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit; MTT 0. saat: Kontrol.

Tablo 1 : INS-1E hücreleri palmitik asit, glukoz ve palmitik asit + glukoz ile muamele edilerek toksik süre ve doz MTT testi sonrası optik dansite değerleri (canlılık yüzdeleri):

NO	UYGULAMA	OD DEĞERİ
1	0. saat kontrol/Boş	0,59384 ± 0,034056
2	8. saat 0.5 mM PA	0,27208 ± 0,021637
3	16. saat 0,5 mM PA	0,35248 ± 0,024518
4	24. saat 0,5 mM PA	0,36517 ± 0,029584
5	48. saat 0,5 mM PA	0,38499 ± 0,092642
7	8. saat 5mM G	0,33473 ± 0,016533
8	16. saat 5mM G	0,57417 ± 0,014630
9	24. saat 5mM G	0,52799 ± 0,135195
10	48. saat 5mM G	0,82983 ± 0,511901
12	8. saat 5mM G ve 0,5 mM PA	0,27358 ± 0,012673
13	16. saat 5mMG ve 0,5 mM PA	0,33149 ± 0,016100
14	24. saat 5mM G ve 0,5 mM PA	0,36163 ± 0,017669
15	48. saat 5mM G ve 0,5 mM PA	0,55501 ± 0,311620
17	8. saat 16,7 mM G	0,30784 ± 0,014067
18	16. saat 16,7 mM G	0,52963 ± 0,022201
19	24. saat 16,7 mM G	0,67708 ± 0,137947
20	48. saat 16,7 mM G	1,19354 ± 0,523346
22	8. saat 16,7 mM G ve 0,5 mM PA	0,29679 ± 0,014311
23	16. saat 16,7 mM G ve 0,5 mM PA	0,32808 ± 0,014371
23	24. saat 16,7 mM G ve 0,5 mM PA	0,33133 ± 0,018726
25	48. saat 16,7 mM G ve 0,5 mM PA	0,44689 ± 0,276497
27	8. saat 33mM G	0,26953 ± 0,022629
28	16. saat 33mM G	0,48509 ± 0,045298
29	24. saat 33mM G	0,49905 ± 0,069086
30	48. saat 33mM G	0,76163 ± 0,568482
32	8. saat 33mM G ve 0,5 PA	0,25068 ± 0,011278
33	16. saat 33mM G ve 0,5 PA	0,31012 ± 0,017372
34	24. saat 33mM G ve 0,5 PA	0,35011 ± 0,035244
35	48. saat 33mM G ve 0,5 PA	0,88287 ± 0,474749

0,5mM Palmitik asid (PA0,5) ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2: 0,5mM Palmitik asid ile muamele edilmiş INS-1 hücrelerin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analiz (1=0.saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. saat)

Measure:MEASURE_1						
(I) PA0.5	(J) PA0.5	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,322 [*]	,006	,000	,303	,340
	3	,241 [*]	,003	,000	,232	,251
	4	,229 [*]	,004	,000	,217	,241
	5	,209 [*]	,012	,000	,173	,245
2	1	-,322 [*]	,006	,000	-,340	-,303
	3	-,080 [*]	,005	,000	-,095	-,066
	4	-,093 [*]	,005	,000	-,109	-,077
	5	-,113 [*]	,012	,000	-,149	-,077
3	1	-,241 [*]	,003	,000	-,251	-,232
	2	,080 [*]	,005	,000	,066	,095
	4	-,013 [*]	,002	,000	-,019	-,007
	5	-,033 [*]	,012	,070	-,066	,001
4	1	-,229 [*]	,004	,000	-,241	-,217
	2	,093 [*]	,005	,000	,077	,109
	3	,013 [*]	,002	,000	,007	,019
	5	-,020 [*]	,011	,804	-,052	,013
5	1	-,209 [*]	,012	,000	-,245	-,173
	2	,113 [*]	,012	,000	,077	,149
	3	,033 [*]	,012	,070	-,001	,066
	4	,020 [*]	,011	,804	-,013	,052

PA0,5 = 0,5mMol Palmitik asit

Kontrol gruba göre palmitik asid uygulanan hücrelerde canlılıkta 8. Saatten itibaren belirgin azalma olmuştur (p=0,000). 16. saat sonunda PA uygulaması yapılan hücrelerin büyük bir kısmının kaybedildiği saptanmıştır. PA (0,5mM) ile uygulanan hücrelerde 24. saatten itibaren, canlı kalan hücre miktarındaki azalmada belirgin değişiklik olmamıştır.

5 mM Glukoz (G5) ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3: 5 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analiz (1=0.saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. saat)

Measure:MEASURE_1						
(I) G5	(J) G5	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,259	,004	,000	,246	,272
	3	,020	,004	,000	,009	,031
	4	,066	,017	,004	,015	,117
	5	-,236	,066	,007	-,428	-,044
2	1	-,259	,004	,000	-,272	-,246
	3	-,239	,003	,000	-,247	-,232
	4	-,193	,018	,000	-,245	-,142
	5	-,495	,067	,000	-,689	-,301
3	1	-,020	,004	,000	-,031	-,009
	2	,239	,003	,000	,232	,247
	4	,046	,018	,111	-,005	,098
	5	-,256	,066	,003	-,447	-,064
4	1	-,066	,017	,004	-,117	-,015
	2	,193	,018	,000	,142	,245
	3	-,046	,018	,111	-,098	,005
	5	-,302	,064	,000	-,489	-,115
5	1	,236	,066	,007	,044	,428
	2	,495	,067	,000	,301	,689
	3	,256	,066	,003	,064	,447
	4	,302	,064	,000	,115	,489

G5= 5 mM Glukoz

Kontrol gruba göre 5,0mM Glukoz uygulanan hücrelerde canlılıkta 8. saatten itibaren belirgin azalma olmuştur (p=0,004).

5Mm Glukoz (G5) ve 0,5mM PA (PA0,5) ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 4 de verilmiştir.

Measure: MEASURE_1						
(I) G5PA0.5	(J) G5PA0.5	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,320	,005	,000	,306	,334
	3	,262	,003	,000	,253	,272
	4	,232	,003	,000	,222	,242
	5	,039	,040	1,000	-,078	,156
2	1	-,320	,005	,000	-,334	-,306
	3	-,058	,003	,000	-,066	-,050
	4	-,088	,003	,000	-,096	-,080
	5	-,281	,040	,000	-,399	-,164
3	1	-,262	,003	,000	-,272	-,253
	2	,058	,003	,000	,050	,066
	4	-,030	,002	,000	-,035	-,025
	5	-,224	,040	,000	-,340	-,107
4	1	-,232	,003	,000	-,242	-,222
	2	,088	,003	,000	,080	,096
	3	,030	,002	,000	,025	,035
	5	-,193	,040	,000	-,309	-,078
5	1	-,039	,040	1,000	-,156	,078
	2	,281	,040	,000	,164	,399
	3	,224	,040	,000	,107	,340
	4	,193	,040	,000	,078	,309

Tablo 4: 5Mm Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analiz (1=0.saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. saat); G5PA0,5= 5mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit

Kontrol gruba göre 5,0mM G ve 0,5mM PA birlikte uygulanan hücrelerde canlılıkta 8. saatten itibaren belirgin azalma olmuştur ($p=0,000$). 48. saatte ise kontrole göre hücre canlılığı arasındaki anlamlı fark kaybolmuştur.

16,7 mM Glukoz (G16,7) ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 2 de verilmiştir.

Measure: MEASURE_1						
(I) G16.7	(J) G16.7	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,286 [†]	,004	,000	,274	,298
	3	,064 [†]	,004	,000	,053	,075
	4	-,083 [†]	,016	,000	-,129	-,038
	5	-,600 [†]	,066	,000	-,791	-,408
2	1	-,286 [†]	,004	,000	-,298	-,274
	3	-,222 [†]	,003	,000	-,231	-,213
	4	-,369 [†]	,017	,000	-,420	-,318
	5	-,886 [†]	,067	,000	-,1,081	-,690
3	1	-,064 [†]	,004	,000	-,075	-,053
	2	,222 [†]	,003	,000	,213	,231
	4	-,147 [†]	,018	,000	-,200	-,095
	5	-,664 [†]	,067	,000	-,859	-,469
4	1	,083 [†]	,016	,000	,038	,129
	2	,369 [†]	,017	,000	,318	,420
	3	,147 [†]	,018	,000	,095	,200
	5	-,516 [†]	,062	,000	-,696	-,337
5	1	,600 [†]	,066	,000	,408	,791
	2	,886 [†]	,067	,000	,690	1,081
	3	,664 [†]	,067	,000	,469	,859
	4	,516 [†]	,062	,000	,337	,696

Tablo 5: 16,7 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri (1=0. saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. saat); G16,7= 16,7 mM Glukoz

Kontrol gruba göre 16,7 mM G uygulanan hücrelerde canlılıkta 8. saatten itibaren belirgin azalma olmuştur (p=0,000). Tüm saatlerde bu fark istatistiksel anlamlı olarak korunmuştur.

16,7 mM Glukoz (G16,7) ve 0,5mM PA (PA0,5) ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 6'da verilmiştir.

Measure: MEASURE_1						
(I) G16.7PA0.5	(J) G16.7PA0.5	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,297 [*]	,005	,000	,281	,313
	3	,266 [*]	,003	,000	,256	,276
	4	,263 [*]	,004	,000	,250	,275
	5	,147 [*]	,035	,001	,045	,249
2	1	-,297 [*]	,005	,000	-,313	-,281
	3	-,031 [*]	,003	,000	-,040	-,023
	4	-,035 [*]	,003	,000	-,044	-,025
	5	-,150 [*]	,036	,001	-,255	-,046
3	1	-,266 [*]	,003	,000	-,276	-,256
	2	,031 [*]	,003	,000	,023	,040
	4	-,003 [*]	,003	1,000	-,011	,004
	5	-,119 [*]	,035	,014	-,222	-,016
4	1	-,263 [*]	,004	,000	-,275	-,250
	2	,035 [*]	,003	,000	,025	,044
	3	,003 [*]	,003	1,000	-,004	,011
	5	-,116 [*]	,035	,016	-,218	-,013
5	1	-,147 [*]	,035	,001	-,249	-,045
	2	,150 [*]	,036	,001	,046	,255
	3	,119 [*]	,035	,014	,016	,222
	4	,116 [*]	,035	,016	,013	,218

Tablo 6: 16,7 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi (1=0.saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. Saat) G16,7PA0,5= 16,7mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asid

Kontrolle kıyasla 16,7 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin canlılığında 8. saatten itibaren belirgin azalma olmuştur (p=0,000).

33 mM Glukoz (G33) ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 7'de verilmiştir.

Measure: MEASURE_1						
(I) G33	(J) G33	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,324 [*]	,005	,000	,309	,340
	3	,109 [*]	,007	,000	,089	,128
	4	,095 [*]	,007	,000	,073	,116
	5	-,168	,071	,208	-,374	,038
2	1	-,324 [*]	,005	,000	-,340	-,309
	3	-,216 [*]	,007	,000	-,235	-,196
	4	-,230 [*]	,009	,000	-,256	-,203
	5	-,492 [*]	,073	,000	-,706	-,278
3	1	-,109 [*]	,007	,000	-,128	-,089
	2	,216 [*]	,007	,000	,196	,235
	4	-,014	,010	1,000	-,043	,015
	5	-,277 [*]	,073	,003	-,488	-,065
4	1	-,095 [*]	,007	,000	-,116	-,073
	2	,230 [*]	,009	,000	,203	,256
	3	,014	,010	1,000	-,015	,043
	5	-,263 [*]	,069	,004	-,465	-,060
5	1	,168	,071	,208	-,038	,374
	2	,492 [*]	,073	,000	,278	,706
	3	,277 [*]	,073	,003	,065	,488
	4	,263 [*]	,069	,004	,060	,465

Tablo 7: 33 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi (1=0.saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. saat); G33= 33 mM Glukoz

Kontrole kıyasla 33 mM Glukoz ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin canlılığında 8. saatten itibaren belirgin azalma olmuştur ($p=0,000$). Bu fark 48.saatte kaybolmuştur.

33 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi Tablo 8'de verilmiştir.

Measure:MEASURE_1						
(I) G33PA0.5	(J) G33PA0.5	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	,343 [*]	,005	,000	,329	,357
	3	,284 [*]	,003	,000	,275	,292
	4	,244 [*]	,005	,000	,230	,258
	5	-,289 [*]	,061	,000	-,467	-,111
2	1	-,343 [*]	,005	,000	-,357	-,329
	3	-,059 [*]	,003	,000	-,067	-,051
	4	-,099 [*]	,005	,000	-,113	-,086
	5	-,632 [*]	,061	,000	-,810	-,455
3	1	-,284 [*]	,003	,000	-,292	-,275
	2	,059 [*]	,003	,000	,051	,067
	4	-,040 [*]	,004	,000	-,052	-,028
	5	-,573 [*]	,061	,000	-,751	-,394
4	1	-,244 [*]	,005	,000	-,258	-,230
	2	,099 [*]	,005	,000	,086	,113
	3	,040 [*]	,004	,000	,028	,052
	5	-,533 [*]	,060	,000	-,708	-,358
5	1	,289 [*]	,061	,000	,111	,467
	2	,632 [*]	,061	,000	,455	,810
	3	,573 [*]	,061	,000	,394	,751
	4	,533 [*]	,060	,000	,358	,708

Tablo 8: 33 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerin zaman içinde MTT değerleri istatistiksel analizi (1=0.saat; 2= 8. Saat; 3= 16. Saat; 4= 24. saat; 5= 48. saat); G33PA0,5= 33 mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit.

Kontrolle kıyasla 33 mM Glukoz ve 0,5mM PA ile muamele edilmiş INS-1E hücrelerinin canlılığında 8. saatten itibaren belirgin azalma olmuştur (p=0,000).

MTT testi sonucunda palmitik asidin INS-1E hücrelerinde erken ve Glukoza göre daha belirgin stres faktörü olduğu çünkü INS-1E hücrelerde özellikle palmitik asid uygulamasından 8 saat sonra canlılık oranında en çarpıcı düşüşün görüldüğü, Glukoz içinde gene 8.saatten sonra canlılıkta azalma başlamakla birlikte daha az oranda olduğu saptanmıştır.

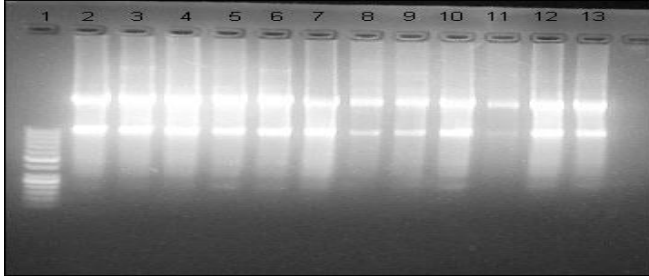
Palmitik Asit, Glukoz ve Palmitik asit + Glukoz Uygulanan INS-1E Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon sonuçları

Farklı saatlerde uygulanan palmitik asit ve glukoz ile palmitik asit + glukoz sonrasında INS-1E hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan ölçümlerin sonuçları aşağıdaki görüntü ve tabloda gösterilmiştir.

Ayrılmış olduğumuz RNA'nın sağlamlığını kontrol etmek için agaroz jel elektroferez yöntemi uyguladık.

Total RNA'nın yaklaşık %80'inini oluşturan 28S ve 18S RNA belirgin bant kat olarak gözlenmiş ve 28S:18S oranı yaklaşık 2:1 bulunmuştur. Dolayısı ile bu çalışmamızda jel elektroferez ile yürütme sonrası 28S, 18S ve 5S RNA net bir biçimde gözlenmiştir.

Elde edilen RNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü şekil 13'.de gösterilmiştir.



Şekil 7 : RNA izolasyonu sonucu %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.; 1.50 bp Marker; 2. 16,7mM G+0,5mM PA 16. Saat; 3. 33mM G 16. Saat ; 4. 16,7mM G 16. Saat; 5. 33mM G+ 0,5mM PA 16. Saat; 6. 0,5mM PA 16. Saat; 7. 5mM G 16. Saat; 8. 5mM G+0,5mM PA 16. Saat

Farklı saatlerde uygulanan palmitik asit ve glukoz sonrasında INS-1E hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan ölçümlerin 24.saaten itibaren sonuçları aşağıdaki tabloda (Tablo 9) gösterilmiştir.

Tablo 9: Örneklere ait 24.saat ve sonrası RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları:

Örnek	Pozisyon	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/µL
24.saat G5	B2	0,727	0,373	0,043	0,679	0,327	2,077	542,943
24.saat G5	B3	0,748	0,381	0,046	0,687	0,327	2,1	549,665
24.saat P0,5 kontrol	C2	0,805	0,409	0,045	0,759	0,364	2,087	607,317
24.saat P0,5 kontrol	C3	0,659	0,352	0,073	0,579	0,275	2,103	463,105
24.saat PA0,5	D2	0,471	0,244	0,043	0,427	0,2	2,135	341,951
24.saat PA0,5	D3	0,537	0,298	0,067	0,468	0,23	2,037	374,205
24.saat G16,7P0,5	E2	0,451	0,243	0,052	0,4	0,19	2,1	320,008
24.saat G16,7P0,5	E3	0,455	0,241	0,044	0,412	0,197	2,095	329,639
48.saat G5	F2	0,5	0,265	0,048	0,456	0,219	2,086	364,821
48.saat G5	F3	0,507	0,265	0,044	0,469	0,223	2,099	375,153
48.saat P0,5	G2	0,533	0,278	0,045	0,496	0,237	2,095	396,842
48.saat P0,5	G3	0,535	0,28	0,047	0,495	0,236	2,097	396,351
48.saat G5P0,5	B2	0,569	0,295	0,042	0,521	0,249	2,091	416,913
48.saat G5P0,5	B3	0,58	0,3	0,045	0,522	0,248	2,106	417,462
48.saat G16,7	C2	0,355	0,196	0,045	0,307	0,149	2,056	245,508
48.saat G16,7	C3	0,363	0,203	0,049	0,308	0,15	2,055	246,721
48.saat P0,5 kontrol	D2	0,626	0,323	0,043	0,584	0,279	2,092	466,855
48.saat P0,5 kontrol	D3	0,634	0,328	0,045	0,588	0,282	2,086	470,141
48.saat G16,7P0,5	E2	0,46	0,249	0,052	0,408	0,196	2,083	326,502

48.saat G16,7P0,5	E3	0,451	0,239	0,044	0,408	0,195	2,094	326,147
48.saat G33	B2*	0,536	0,276	0,044	0,486	0,23	2,114	388,844
48.saat G33	B3*	0,586	0,405	0,237	0,339	0,164	2,065	270,832
48.saat G33P0,5	H2	0,365	0,197	0,045	0,324	0,153	2,121	258,802
48.saat G33P0,5	H3	0,375	0,204	0,047	0,331	0,158	2,093	264,929
72. saat G5	C2*	0,361	0,196	0,046	0,311	0,148	2,099	248,884
72 saat G5	C3*	0,303	0,195	0,093	0,204	0,1	2,039	163,484
72..saat P0,5	D2*	0,829	0,605	0,347	0,481	0,259	1,857	384,852
72. saat P0,5	D3*	0,477	0,293	0,116	0,358	0,177	2,023	286,157
72.saat G5P0,5	B2**	0,459	0,25	0,064	0,389	0,184	2,114	311,275
72.saat G5P0,5	B3**	0,438	0,264	0,107	0,321	0,153	2,096	256,642
72.saat G16,7P0,5	H2*	0,298	0,166	0,045	0,254	0,121	2,09	202,831
72.saat G16,7P0,5	H3*	0,3	0,167	0,047	0,254	0,122	2,088	203,365
72.saat G33	F2*	0,305	0,169	0,048	0,257	0,122	2,112	205,312
72. saat G33	F3*	0,297	0,164	0,044	0,254	0,121	2,092	203,234
72. saat G33P0,5	C2*	0,431	0,322	0,225	0,201	0,096	2,109	161,166
72. saat G33P0,5	C3*	0,298	0,167	0,049	0,243	0,116	2,096	194,1
0.saat RNA	F2	0,311	0,175	0,048	0,264	0,127	2,078	211,277
0.saat RNA	F3	0,307	0,171	0,043	0,265	0,128	2,077	212,075

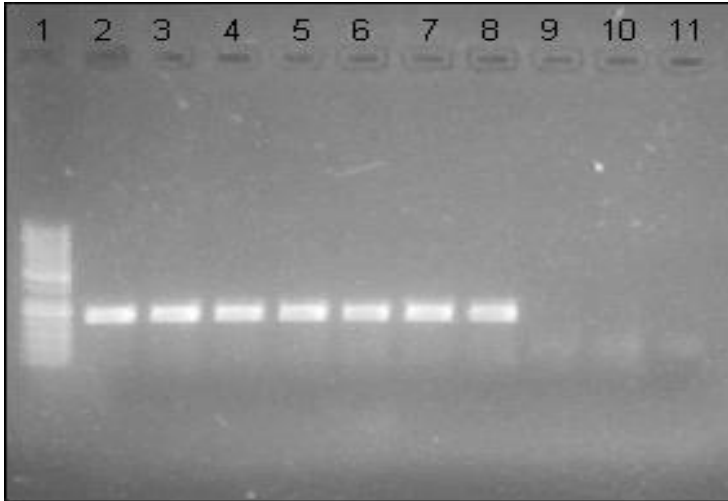
PA0,5 = 0,5mMol Palmitik asit; G5= 5 mM Glukoz; G16,7= 16,7 mM Glukoz; G33= 33 mM Glukoz; G5PA0,5= 5mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit; G16,7PA0,5= 16,7mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit; G33PA0,5= 33 mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit.

Elde ettiğimiz RNA'ların saflığının kontrolü 260/280 nm dalga boyundaki absorbans oranı ile saptanmıştır. Elde edilen RNA'ların 260/280 nm absorbans oranı 2,0-2,1 olarak ölçülmüştür. Absorbans

değeri nükleik asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. RNA için A260/A280 oranı yaklaşık 2 olması beklenir. Bizim örneklerimizde protein kontaminasyonu olmadığını teyid ettik. Gene aynı cihaz ile RNA miktarlarının konsantrasyon ölçümünü yapılmıştır (Tablo 9).

cDNA Kontrol PZR

INS-1E hücreleri palmitik asit, glikoz ve palmitik asit ve glikoz ile gerekli inkübasyonu sonrası hücrelerden elde ettiğimiz, saflığından ve sağlamlığından emin olduğumuz RNA havuzumuz içindeki mRNA'lerden komplementer DNA (cDNA) sentezini ticari kit kullanarak uygun protokolde gerçekleştirdik. Protokol sonunda cDNA'ların elde edilip edilemediği kontrol (house-keeping) primerleri ile kontrol edilmiştir. Burada yapılan klasik PZR'de rat aktin β kontrol primerleri kullanılmıştır. 99 baz çifti uzunluğundaki bant görüntüsü şekil 14 'de gösterilmiştir.



Şekil 8: Rat actin β primeri ile cDNA PZR örnekleri

Bir sonraki aşama olan gerçek zamanlı PZR’de elde edilen bu cDNA’lar kullanılmıştır.

ER stres sensör geni GRP78, Golgi cisimciği yapısal genlerinden GCP60 (ACDB3), GM130 (Golga2), ARF1, Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden sialiltransferaz 4A (st3gal1), sialiltransferaz 10 (st3gal6) ile golgi cisimciği stres genleri HSP47 (serpin), CREB3 ve ARF4 genlerinin ifadenmeleri saptamak amacı ile her bir rat genine ait real time ready prob ile birlikte LightCycler TaqMan Master kiti kullanıldı.

Tablo 10’da zaman içinde farklı PA ve Glukoz ksnantrasyonlarda genlerin ifadenme düzeyleri verilmiştir.

Tablo 10: Genlerin ifadenme düzeyleri

Acdb3 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	0,347 ± 0,196	0,725 ± 0,276	0,35 ± 0,137	0,825 ± 0,34	0,576 ± 0,317
16,7mM Glukoz	0,423 ± 0,2	0,91 ± 0,332	0,815 ± 0,294	0,96 ± 0,39	0,801 ± 0,349
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	0,393 ± 0,14	0,833 ± 0,371	0,545 ± 0,2	0,778 ± 0,346	0,653 ± 0,313
33mM Glukoz	0,67 ± 0,128	0,943 ± 0,347	0,485 ± 0,233	0,978 ± 0,405	0,775 ± 0,348
33mM Glukoz+0,5mM PA	0,703 ± 0,284	0,953 ± 0,357	0,77 ± 0,263	0,918 ± 0,368	0,845 ± 0,306
5mM Glukoz	0,38 ± 0,145	0,915 ± 0,379	0,865 ± 0,701	0,968 ± 0,395	0,809 ± 0,473
5mM Glukoz+0,5mMPA	0,5 ± 0,09	0,763 ± 0,304	0,385 ± 0,136	1,075 ± 0,547	0,693 ± 0,409
Toplam	0,488 ± 0,203	0,863 ± 0,312	0,602 ± 0,356	0,929 ± 0,368	0,736 ± 0,364
Arf1 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	1,025 ± 0,883	1,07 ± 0,553	0,82 ± 0,417	1,01 ± 0,603	0,979 ± 0,576
16,7mM Glukoz	0,828 ± 0,628	1,353 ± 0,66	1,265 ± 0,582	1,227 ± 0,77	1,164 ± 0,618
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	0,915 ± 0,657	1,05 ± 0,479	0,83 ± 0,367	0,997 ± 0,736	0,945 ± 0,506
33mM Glukoz	1,258 ± 0,779	1,353 ± 0,603	0,805 ± 0,34	1,62 ± 1,078	1,235 ± 0,698
33mM Glukoz+0,5mM PA	1,488 ± 0,738	1,125 ± 0,556	0,89 ± 0,374	0,937 ± 0,583	1,121 ± 0,568
5mM Glukoz	1,15 ± 0,874	1,545 ± 0,863	1,135 ± 0,533	1,483 ± 0,895	1,318 ± 0,733
5mM Glukoz+0,5mMPA	0,975 ± 0,555	0,93 ± 0,497	0,56 ± 0,247	1,183 ± 0,978	0,894 ± 0,566
Toplam	1,091 ± 0,686	1,204 ± 0,579	0,901 ± 0,432	1,208 ± 0,732	1,094 ± 0,614

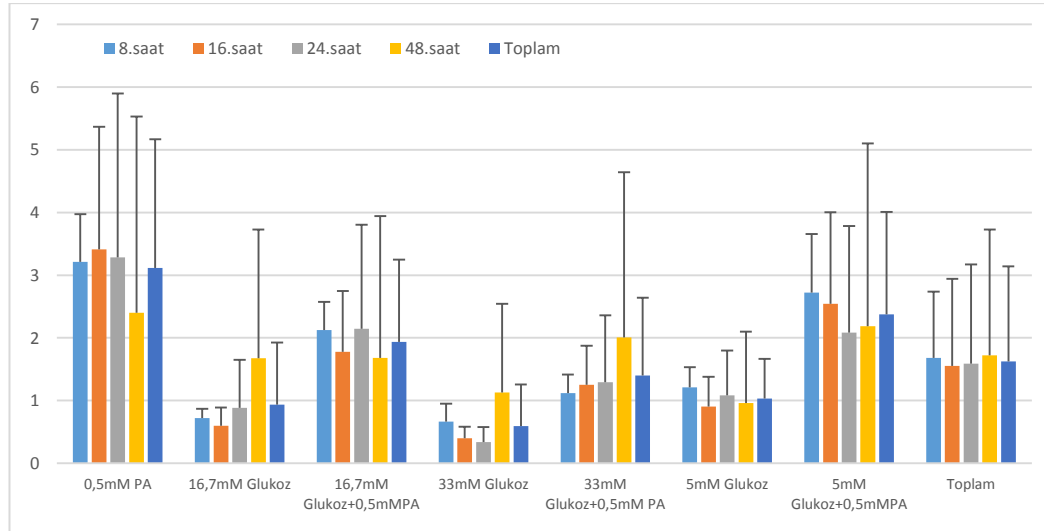
Arf4 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	1,413 ± 0,343	1,5 ± 0,53	1,753 ± 0,624	1,1 ± 0,551	1,421 ± 0,511
16,7mM Glukoz	1,038 ± 0,129	1,01 ± 0,392	1,27 ± 0,449	1,065 ± 0,503	1,084 ± 0,359
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	1,288 ± 0,208	1,343 ± 0,588	1,507 ± 0,537	0,988 ± 0,402	1,266 ± 0,442
33mM Glukoz	1,113 ± 0,181	1,178 ± 0,504	1,65 ± 0,584	1,303 ± 0,626	1,288 ± 0,484
33mM Glukoz+0,5mM PA	1,595 ± 0,383	1,51 ± 0,588	2,05 ± 0,728	1,48 ± 0,757	1,633 ± 0,594
5mM Glukoz	1,125 ± 0,153	1,263 ± 0,547	1,343 ± 0,48	1,15 ± 0,509	1,212 ± 0,407
5mM Glukoz+0,5mMPA	1,293 ± 0,356	1,383 ± 0,461	1,4 ± 0,495	0,945 ± 0,345	1,245 ± 0,412
Toplam	1,266 ± 0,3	1,312 ± 0,489	1,568 ± 0,538	1,147 ± 0,51	1,307 ± 0,479
Creb3 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	3,127 ± 3,424	2,14 ± 0,821	2,237 ± 0,695	1,643 ± 1,877	2,287 ± 1,815
16,7mM Glukoz	2,317 ± 2,403	1,23 ± 0,419	1,137 ± 0,398	1,2 ± 1,386	1,471 ± 1,312
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	2,973 ± 3,193	1,133 ± 0,274	1,48 ± 0,05	1,447 ± 1,515	1,758 ± 1,686
33mM Glukoz	2,583 ± 3,06	1,263 ± 0,512	1,07 ± 0,202	1,133 ± 1,196	1,513 ± 1,562
33mM Glukoz+0,5mM PA	3,333 ± 3,873	1,283 ± 0,258	1,75 ± 0,988	1,5 ± 1,606	1,967 ± 2,023
5mM Glukoz	2,387 ± 2,456	1,45 ± 0,459	1,413 ± 0,055	1,273 ± 1,487	1,631 ± 1,323
5mM Glukoz+0,5mMPA	3,137 ± 3,432	1,793 ± 0,457	1,397 ± 0,186	1,293 ± 1,106	1,905 ± 1,732
Toplam	2,837 ± 2,671	1,47 ± 0,536	1,498 ± 0,558	1,356 ± 1,244	1,79 ± 1,615
Golga2 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	1,013 ± 0,359	0,888 ± 0,112	0,583 ± 0,175	0,95 ± 0,046	0,852 ± 0,26
16,7mM Glukoz	0,993 ± 0,211	0,863 ± 0,176	0,573 ± 0,173	0,907 ± 0,157	0,829 ± 0,233
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	0,963 ± 0,129	0,94 ± 0,127	0,635 ± 0,191	0,85 ± 0,142	0,847 ± 0,192
33mM Glukoz	0,913 ± 0,079	1,298 ± 0,342	0,493 ± 0,154	0,767 ± 0,104	0,874 ± 0,359
33mM Glukoz+0,5mM PA	0,86 ± 0,071	1,075 ± 0,151	0,783 ± 0,237	0,933 ± 0,042	0,911 ± 0,177
5mM Glukoz	0,988 ± 0,209	1,045 ± 0,228	0,77 ± 0,254	0,867 ± 0,097	0,921 ± 0,22
5mM Glukoz+0,5mMPA	1,068 ± 0,088	0,953 ± 0,12	0,565 ± 0,173	0,9 ± 0,108	0,869 ± 0,23
Toplam	0,971 ± 0,179	1,009 ± 0,222	0,629 ± 0,202	0,882 ± 0,107	0,872 ± 0,24
Grp78 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam

0,5mM PA	3,21 ± 0,762	3,41 ± 1,958	3,285 ± 2,613	2,403 ± 3,124	3,116 ± 2,051
16,7mM Glukoz	0,72 ± 0,147	0,6 ± 0,29	0,885 ± 0,763	1,677 ± 2,049	0,938 ± 0,988
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	2,127 ± 0,446	1,778 ± 0,969	2,145 ± 1,661	1,68 ± 2,261	1,936 ± 1,31
33mM Glukoz	0,663 ± 0,29	0,4 ± 0,185	0,34 ± 0,238	1,13 ± 1,413	0,596 ± 0,663
33mM Glukoz+0,5mM PA	1,12 ± 0,297	1,253 ± 0,624	1,293 ± 1,068	2,01 ± 2,633	1,398 ± 1,244
5mM Glukoz	1,21 ± 0,324	0,903 ± 0,479	1,085 ± 0,712	0,96 ± 1,138	1,033 ± 0,632
5mM Glukoz+0,5mMPA	2,723 ± 0,935	2,545 ± 1,46	2,083 ± 1,701	2,187 ± 2,913	2,374 ± 1,634
Toplam	1,682 ± 1,055	1,555 ± 1,386	1,588 ± 1,582	1,721 ± 2,008	1,627 ± 1,516
St3gal1 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	2,023 ± 1,272	2,823 ± 1,869	1,69 ± 1,028	1,308 ± 0,997	1,961 ± 1,329
16,7mM Glukoz	0,825 ± 0,578	0,813 ± 0,443	0,545 ± 0,264	1,475 ± 1,16	0,914 ± 0,717
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	1,615 ± 1,035	2,163 ± 1,314	0,993 ± 0,563	1,008 ± 0,825	1,444 ± 1,005
33mM Glukoz	0,703 ± 0,476	0,855 ± 0,45	0,543 ± 0,339	1,285 ± 1,029	0,846 ± 0,634
33mM Glukoz+0,5mM PA	1,343 ± 0,874	2,438 ± 2,073	1,138 ± 0,797	0,69 ± 0,589	1,402 ± 1,284
5mM Glukoz	1,23 ± 0,873	1,525 ± 1,001	1,018 ± 0,562	1,545 ± 1,179	1,329 ± 0,863
5mM Glukoz+0,5mMPA	1,923 ± 1,328	1,853 ± 1,322	0,743 ± 0,374	1,298 ± 1,11	1,454 ± 1,104
Toplam	1,38 ± 0,978	1,781 ± 1,389	0,953 ± 0,661	1,23 ± 0,927	1,336 ± 1,053
St3gal6 Geni	8.saat	16.saat	24.saat	48.saat	Toplam
0,5mM PA	0,793 ± 0,339	0,705 ± 0,291	0,35 ± 0,12	0,763 ± 0,427	0,653 ± 0,336
16,7mM Glukoz	0,705 ± 0,323	0,815 ± 0,44	0,41 ± 0,199	0,665 ± 0,405	0,649 ± 0,352
16,7mM Glukoz+0,5mMPA	0,85 ± 0,415	0,815 ± 0,276	0,405 ± 0,158	0,718 ± 0,409	0,697 ± 0,348
33mM Glukoz	0,793 ± 0,335	0,85 ± 0,343	0,425 ± 0,317	0,88 ± 0,428	0,737 ± 0,372
33mM Glukoz+0,5mM PA	1,04 ± 0,429	0,93 ± 0,354	0,535 ± 0,213	0,625 ± 0,425	0,783 ± 0,392
5mM Glukoz	0,703 ± 0,364	0,898 ± 0,527	0,6 ± 0,197	0,655 ± 0,318	0,714 ± 0,351
5mM Glukoz+0,5mMPA	0,753 ± 0,325	0,71 ± 0,292	0,273 ± 0,089	0,865 ± 0,506	0,65 ± 0,381
Toplam	0,805 ± 0,339	0,818 ± 0,337	0,428 ± 0,202	0,739 ± 0,382	0,697 ± 0,355

PA0,5 = 0,5mMol Palmitik asit; G5= 5 mM Glukoz; G16,7= 16,7 mM Glukoz; G33= 33 mM Glukoz; G5PA0,5= 5mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit; G16,7PA0,5= 16,7mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit; G33PA0,5= 33 mM Glukoz ve 0,5mMol Palmitik asit.

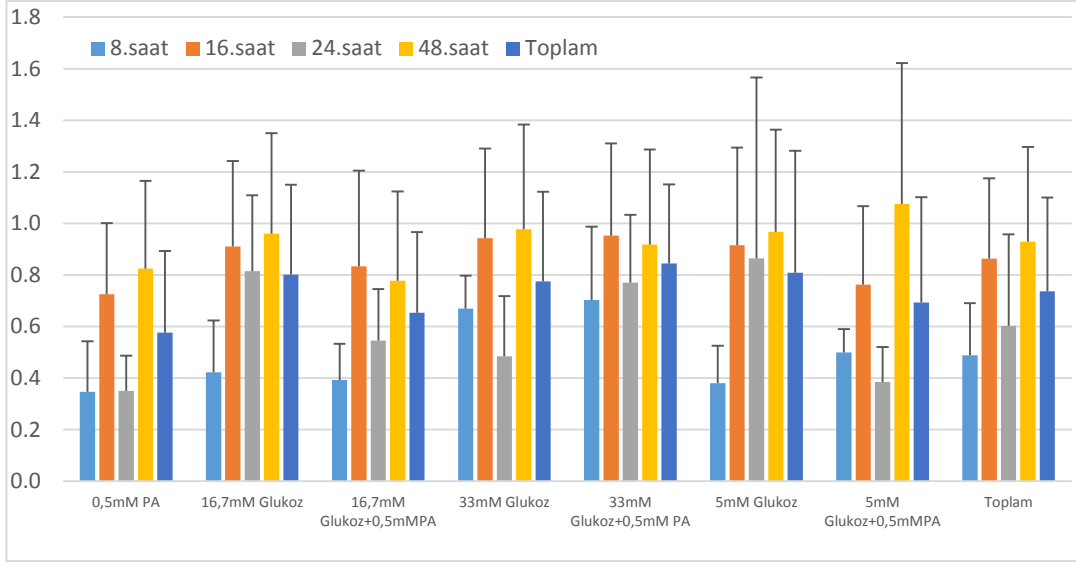
Genlerin zaman içinde palmitik asid ve glukoz uygulamaları ile gen ifadelenme kat değışimleri grafik şeklinde aşağıda verilmiştir.

Grafik 2: ER stres genlerinden **grp 78** gen kat değışimleri:



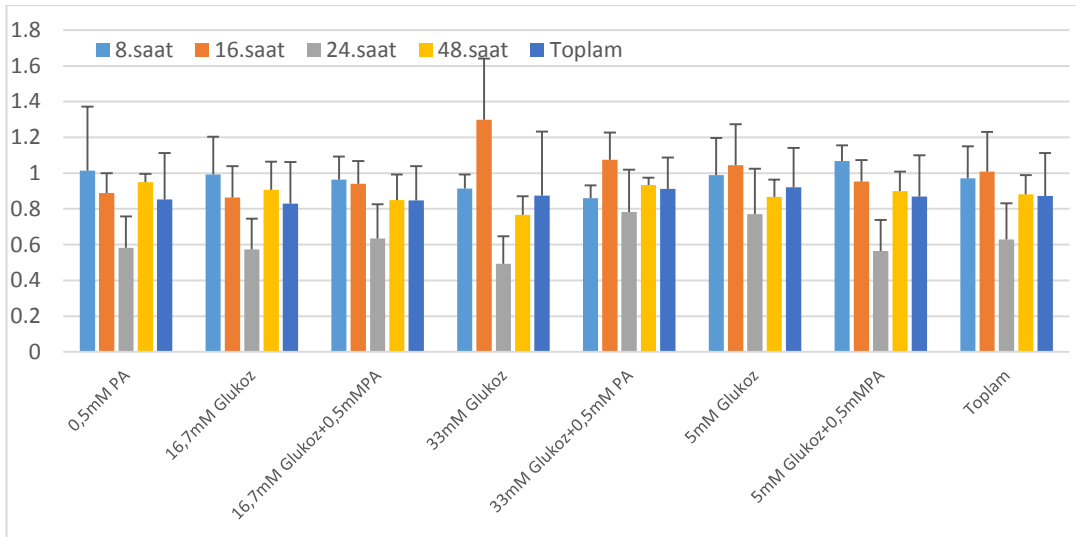
Grp78 gen kat değışimi uygulama içinde anlamlı farklılık göstermezken, palmitik asid uygulamalarında, tek başına glukoz uygulamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tesbit edilmiştir ($p < 0,05$).

Grafik 3: Golgi cisimciğı yapısal genlerinden **GCP60 (ACBD3)** gen kat değışimleri :



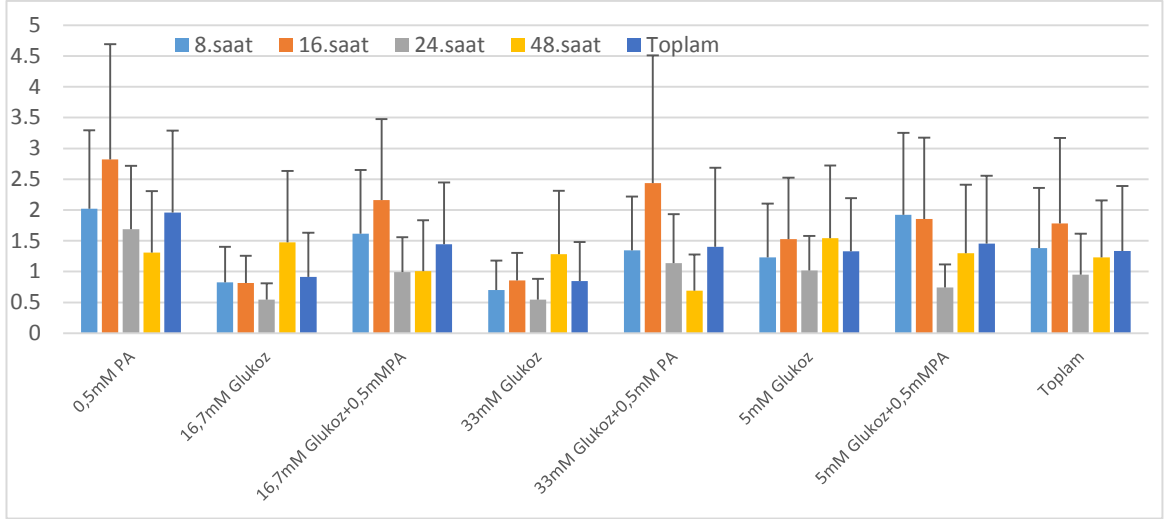
Gcp60(abcd3) gen kat değişimi uygulama ile artış eğilimindedir fakat istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Grafik 4 : Golgi cisimciği yapısıl genlerinden **GM130 (golga2)** gen kat değişimleri:



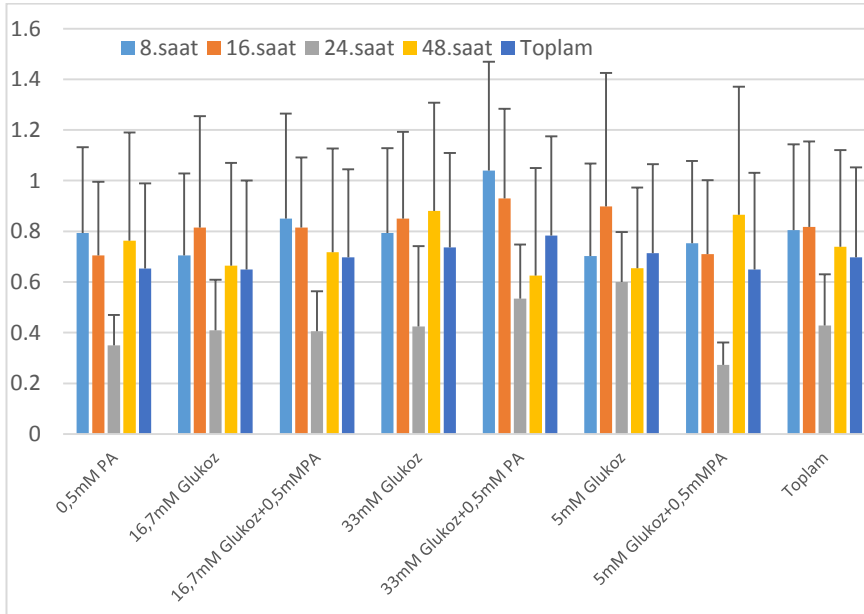
GM130 (golga2) gen kat değişimi tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Grafik 5: Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden Sialiltransferaz4A (st3gal1) gen kat değişimleri:



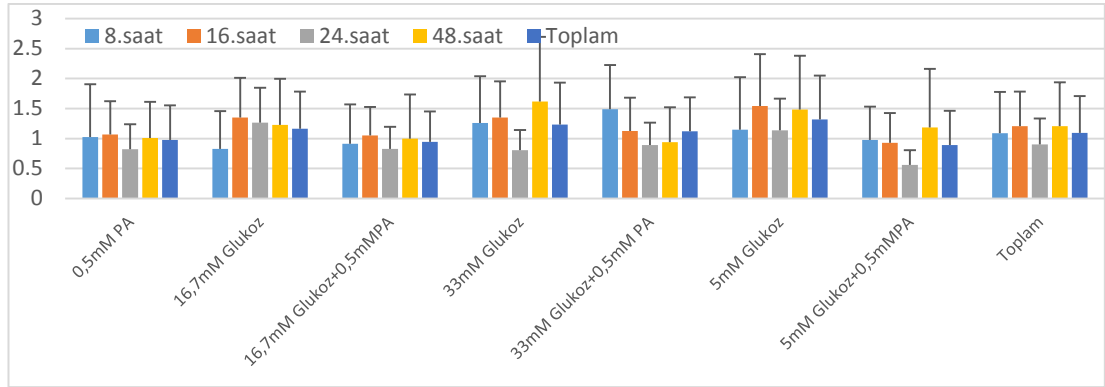
Sialiltransferaz4A (st3gal1) gen kat değişimi uygulama içinde anlamlı farklılık göstermezken, palmitik asid uygulamalarında, tek başına glukoz uygulamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış tesbit edilmiştir ($p < 0,05$).

Grafik 6: Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden **Sialiltransferaz10 (st3gal6)** gen kat değişimleri:



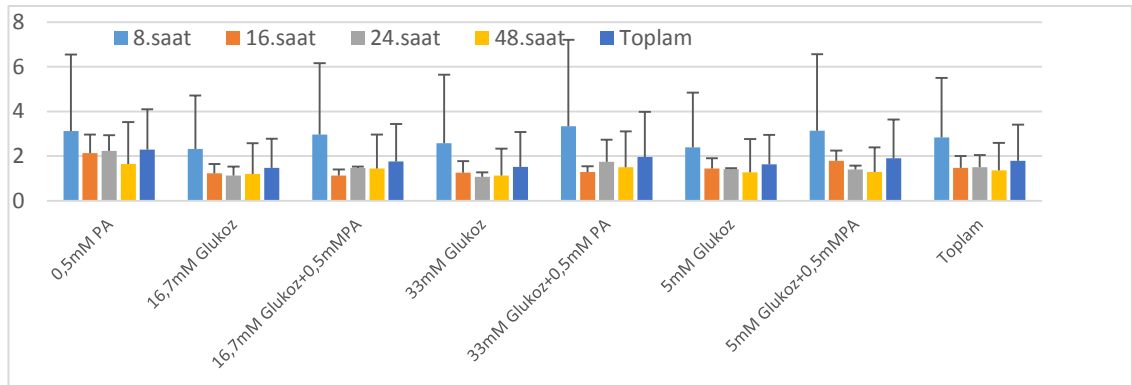
Sialiltransferaz10 (st3gal6) gen kat değişimi tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Grafik 7: Golgi cisimciği stres genlerinden ARF1 gen kat değişimleri:



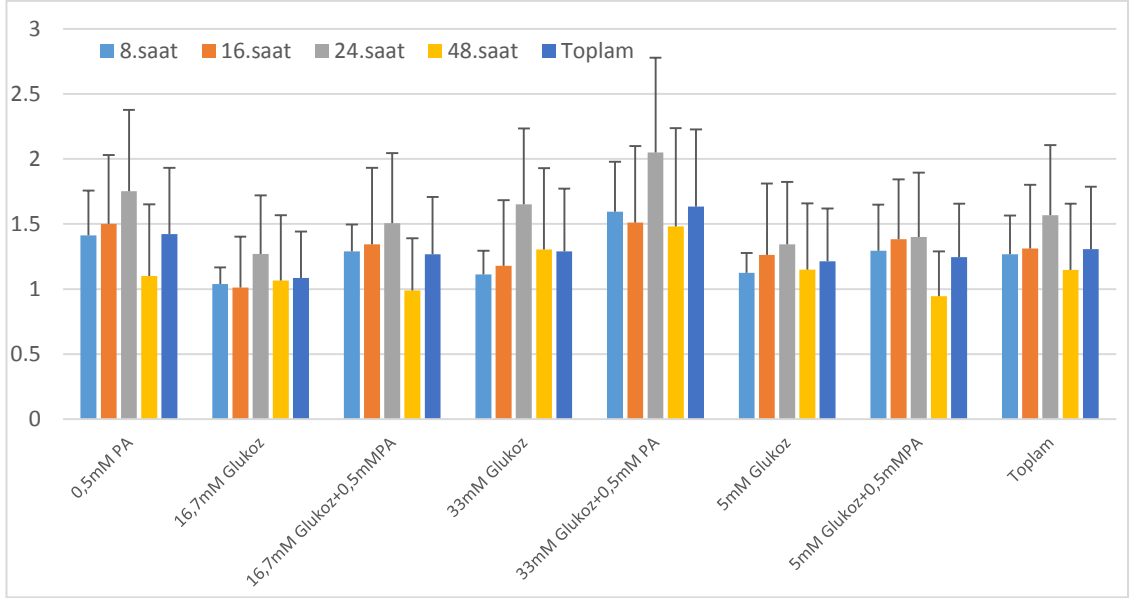
ARF1 gen kat değişimi tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Grafik 8: Golgi cisimciği stres genlerinden CREB3 gen kat değişimleri:



CREB3 gen kat değişimi tüm uygulamalarda ilk 8 saatte artış eğilimdedir. Tek başına palmitik asit uygulamasına göre ise özellikle 33mMolGlukoz ve 0,5mMol Palmitik asid birlikte uygulanan grupta CREB3 kat artışı ilk 8 saatte istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,013$).

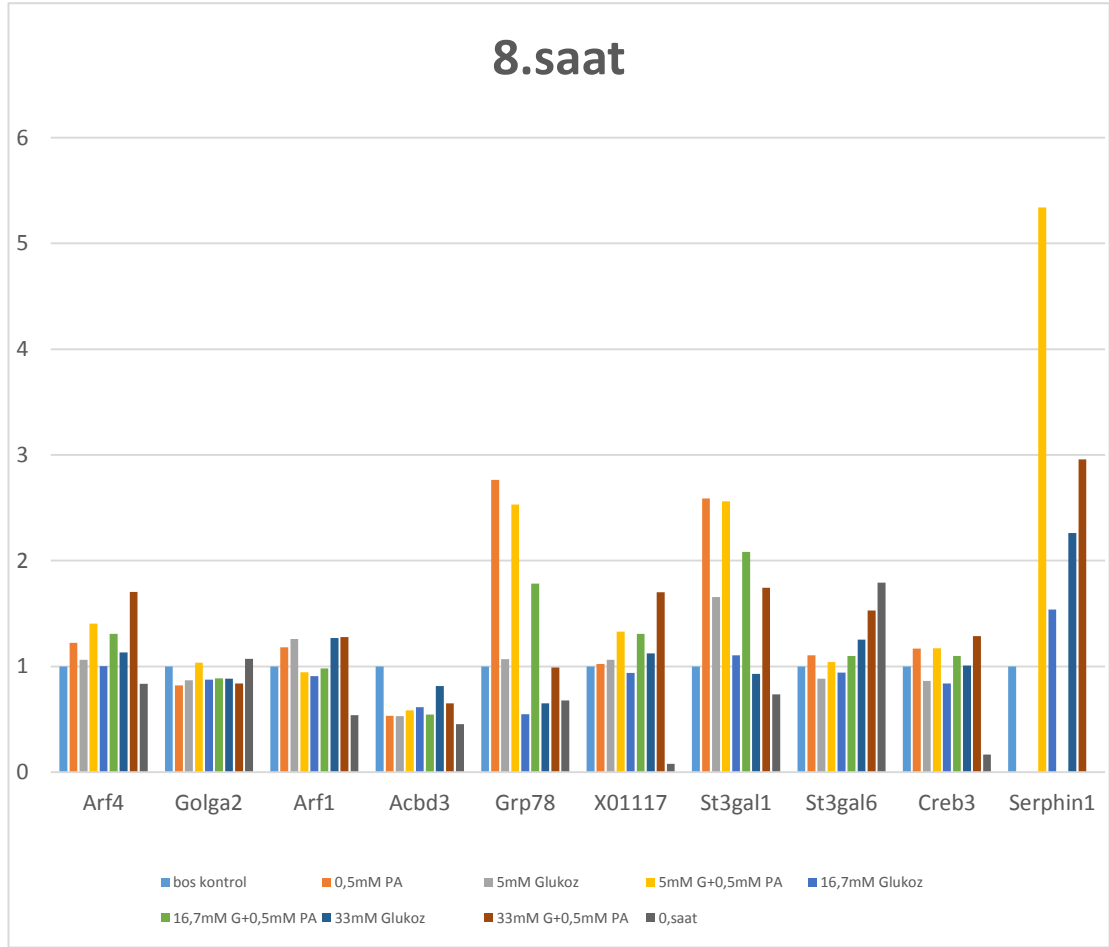
Grafik 9: Golgi cisimciği stres genlerinden ARF4 gen kat değişimleri:



ARF4 gen kat değişimi tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

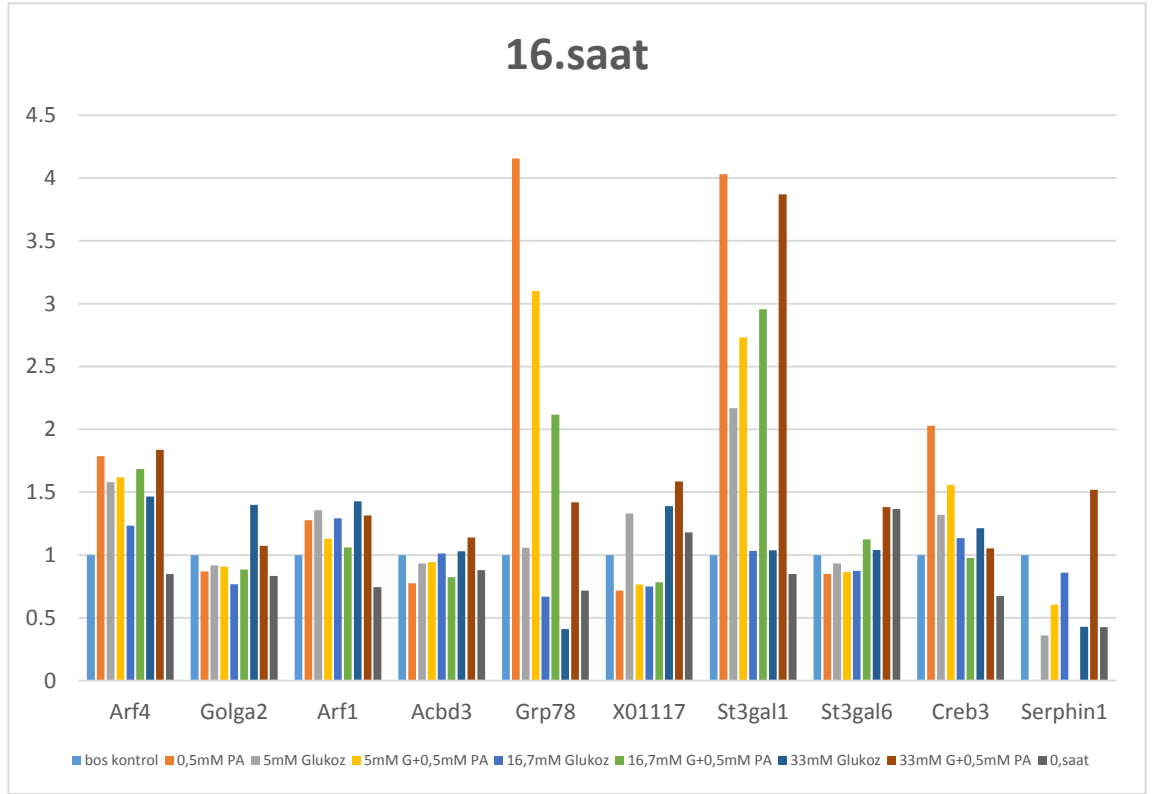
Gen kat artışlarının zaman içinde artışlarını özetleyen grafikler aşağıda belirtilmiştir.

Grafik 10: 8. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması



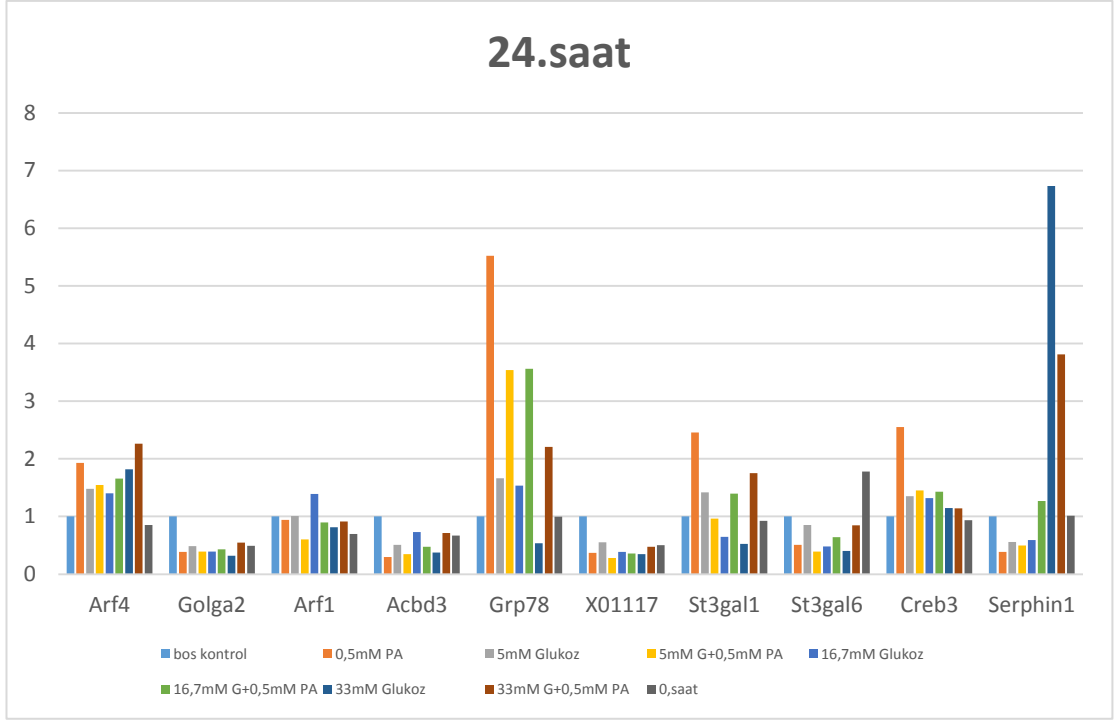
Grp78 gen ifadenme kat artışında, palmitik asit varlığında (0,5mMol PA, 5mMolG ve 0,5mMol PA, 16,7mMol G ve 0,5mMol PA) belirgin kat artışı olmuştur ($p < 0,05$). St3gal1 gen ifadenme kat artışında, palmitik asit varlığında (0,5mMol PA, 5mMolG ve 0,5mMol PA, 16,7mMol G ve 0,5mMol PA, 33mMol G ve 0,5mMol PA) ifadenmesinde belirgin kat artışı olmuştur ($p < 0,05$). Serpin1 gen ifadenme kat artışı da 0,5mMol PA ile 5mMolG varlığında 5 kat kadar artmıştır. Bu gen ifadenme artışı 8. saatte 33mMol G ile 0,5mMol PA varlığında 3 kat kadar olmuştur.

Grafik 11: 16. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması

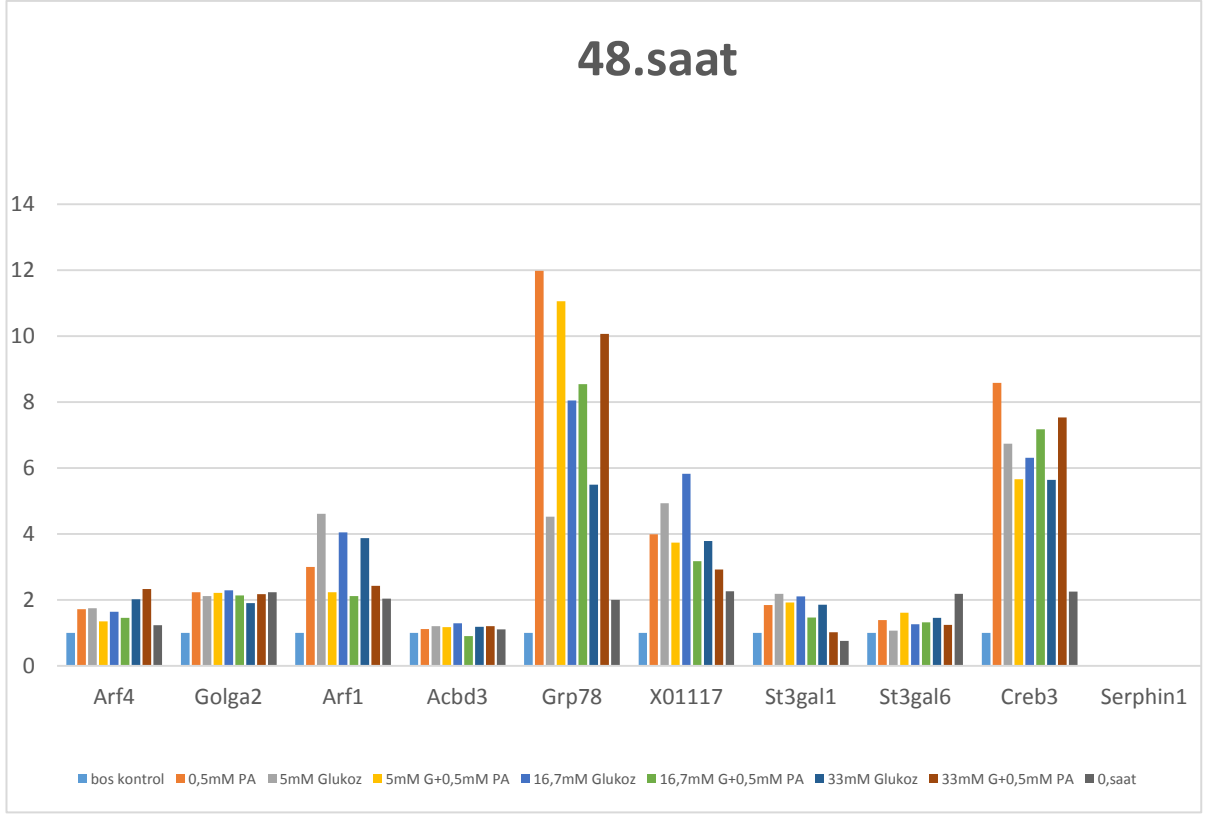


Grp78 ve St3gal1 gen ifadenme kat artışında, palmitik asit varlığında (0,5mMol PA, 5mMolG ve 0,5mMol PA, 16,7mMol G ve 0,5mMol PA, 33mMol G ve 0,5mMol PA) belirgin kat artışı olmuştur ($p < 0,05$).

Grafik 12: 24. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması



24.satte Grp78 gen ifadenmesi, palmitik asit varlığında (0,5mMol PA, 5mMolG ve 0,5mMol PA, 16,7mMol G ve 0,5mMol PA, 33mMol G ve 0,5mMol PA) diğer genlerin ifadenme düzeyine göre belirgin fazladır ($p < 0,05$). 24.saatte özellikle 33mMol glukoz ve 33mMol glukoz ve 0,5mMol palmitik asit uygulaması ile serpinH1 gen ifadenmesinde diğer genlerin ifadenme düzeylerine kıyasla artış tesbit edilmiştir ($p < 0,05$).



Grafik 13: . 48. saat uygulamalarında gen ifadenmelerinin birbiri ile karşılaştırması

48.saatte Grp78 gen ifadenmesi, tüm uygulamalarda palmitik asit varlığında diğer genlerin ifadenmesine kıyasla yüksek seyretmektedir ($p < 0,05$). Gen ifadenme seviyeleri diğer genlere kıyasla özellikle 0,5mMol PA, 5mMolG ve 0,5mMol PA, 16,7mMol G ve 0,5mMol PA, 33mMol G ve 0,5mMol PA uygulamalarında 10-12 kata kadar ulaşmıştır. 48.saatte tüm uygulamalarda CREB3 gen ifade kat artışı diğer genlere göre yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). Serpin1 bu saatteki analizlerde teknik/biyolojik sorun olabileceği düşünülen bir nedenden dolayı ölçülemedi.

5. TARTIŞMA:

Golgi cisimciği, endoplazmik retikulumdan çok daha karmaşık bir organeldir. Bu organelin fonksiyonu ile detaylar, karmaşık glikolizasyon ve ileri işleme olaylarının yönetimi, hücresel stres durumunda davranışı, stresi algılayan molekülleri, şaperonları, stresle baş edebilme mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Bu bilinmeyenler arasında, özellikle oldukça önemli bir sekretuar hücre olan

pankreas β -hücrelerinde, Golgi cisimciğinin davranışı, diyabetik bireylerde hastalık sürecinde golgide gelişen adaptif veya maladaptif mekanizmalar ve önemi hiç araştırılmamıştır. Patogenezin aydınlatılması ve hastalığın tedavisinde yol katedebilme açısından bilinmeyenlere ışık tutmak ve ileri çalışmalara zemin hazırlamak için bu çalışmayı planladık.

İnsülin sentez ve sekresyon ihtiyacının arttığı Tip2DM vakalarında olumsuz metabolik çevrenin oluşturduğu glukolipotoksisitenin β -hücre fonksiyon kaybında ve daha sonra kütlelerinde azalmada önemli rol oynadığı bilinmektedir. Lipotoksisitenin özellikle ER stresine neden olduğu bir çok çalışmada tesbit edilmiştir. Cunha, Hekerman ve arkadaşlarının 2008 yılında INS-1E hücrelerinde serbest yağ asitlerinin indüklediği ER stresi ve apoptotik ölümün mekanizmasını ortaya çıkartmak adına yaptıkları çalışmada doymuş ve doymamış yağ asitlerinin farklı ER stres sinyallerini aktive ettikleri gösterilmiştir (40). Biz de bu çalışmamızda INS-1E rat pankreatik β -hücreleri için doymuş yağ asidi olan palmitik asidin glukozaya göre daha belirgin stres faktörü olduğunu, INS-1E hücrelerinde özellikle palmitik asid uygulamasının erken saatlerinde ciddi hücre kaybı meydana geldiğini birkez daha göstermiş olduk. Glukoz ise düşük dozlardan (5mMol) yüksek dozlara (33mMol) çıktıkça ve zaman ilerledikçe artan hücre kaybına neden olmuştur. Bu çalışmada, literatürde diğer çalışmaları destekler nitelikte, INS-1E rat pankreatik β -hücreleri için bu seviyede lipotoksisitenin, tek başına glukotoksisiteye kıyasla daha toksik olduğu gösterilmiştir.

Palmitik asid ile yapılan çalışmalarda, doymuş yağ asidi olan palmitik asidin özellikle insülin ifadenmesi ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin (PDX-1) nükleusa transportunu ve bazılarının ise (MafA) ifadenmesini etkileyerek glukozaya bağlı insülin salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir (45). Bunun gibi palmitik asidin, transkripsiyon faktörü olan SREB1c'in ifadenmesini arttırarak küçük GTP-bağlayan Rab27'nin efektörü olan granülophilin adlı proteinin ifadenmesini arttırdığı gösterilmiş ve bu yol ile insülin ekzositozunu etkileyebildiği tesbit edilmiştir (44).

Aslında lipotoksisite ile ilgili yapılan birçok çalışmada palmitik aside bağlı toksisitenin en önemli sebebinin, hücre içinde seramid birikimine neden olması yönündedir. Glukolipotoksisite ve/veya lipotoksisite varlığında seramid sentezinin

artması ve ER'den Golgiye seramid transferinin yapılamaması nedeni ile özellikle ER membranında seramid birikir. ER'de biriken seramid, ER strese neden olarak propaptotik etki gösterir (46-49).

Seramid- ER stres ilişkisini irdeleyen birçok çalışma vardır (40-43,46-48). Fakat seramid fazlalığının Golgi cisimciğine etkisi bilinmemektedir. Seramid birikimine neden olan lipotoksik/glukolipotoksik ortam aynı zamanda Golgi cisimciğinin seramidi detoksifye etmek amacı ile adaptif mekanizmalarını, yani ileri sfingolipid sentez mekanizmalarını arttırmasını tetiklemesi beklenir. Bu adaptif cevabı oluşturabilmek için Golgi, genişleyebilmek adına yapısal proteinlerini, sfingolipidleri sentezleyebilmek adına ilgili lipid sentez enzimlerini, lipidlerin veziküler ve nonveziküler transportunu gerçekleştirebilmek adına ise ilgili proteinleri arttırmalıdır.

Literatürde bu vakalarda β -hücre Golgi cisimciğinde görülen etkiler ve Golgi stres cevabının nasıl olduğu konusunda bugüne kadar bir araştırma ve dolayısı ile bilgi yoktur. Golgi stresinin β -hücre fonksiyon kaybı ve apoptozisindeki rolü daha önce araştırılmamıştır.

Golgi cisimciği stresi, endoplazmik retikulum stresini tetikleyen mekanizmalar ile paralel gidebileceği gibi, Golgi cisimciğinde oluşan stres, endoplazmik retikulumda oluşan stresten ayrı olabilir. Biz bu çalışmamızda literatür bilgileri ile uyumlu olarak tek başına palmitik asidin 0,5 mM konsantrasyonda ER stresi yarattığı, ER stres genlerinden grp78 ifadelenmesini palmitik asid uygulamasından sonra 8. saatten itibaren 3 kat arttığını tesbit ettik. Glukoz tek başına ER stres geninde artış yapmazken, glukozu palmitik asid eklendiğinde yani glukolipotoksisite yaratıldığında bu gende anlamlı artış olmuştur.

Glukoliptoksisitenin ER de yarattığı bu stresin Golgi cisimciğinde nasıl bir değişime neden olduğunu tesbit edebilmek için Golgi cisimciğine özel proteinlerdeki ifadelenme değişimlerini inceledik. Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden sialiltransferaz 4A (st3gal1) ifadelenmesi, gerçekten de, palmitik asid tek başına uygulanan ve glukoz ile palmitik asidin birlikte verilerek glukolipotoksisite yaratılan tüm hücrelerde ER stres geni Grp78'in ifadelenmesinden biraz daha geç, 16. saatten itibaren en az 3 kat artmıştır. Bu gendeki ifadelenme artışı 24. saatten sonra azalmaya başlamıştır. Bu çalışmada literatürde ilk defa olarak INS-1E rat β -

hücrelerinde lipotoksisite/glukolipotoksisite sonrası ER stresi takiben, Golgi cisimciği glikozilasyon enzimlerinden birisinin ifadenmesinin arttığı gösterilmiş oldu.

Golgi cisimciği stresi nasıl algıladı ve adaptif mekanizmaları devreye sokmak için nükleusa nasıl sinyal gönderdi bilinmemektedir. Çalışmamızda inceleme yaptığımız GCP60 (ACDB3) ve GM130 (golga2) gibi Golgi yapısal proteinlerin ifadenme miktarında herhangi bir değişim tesbit edemedik. Aslında stres altındaki bu organelin, hücrenin hayatta kalabilmesi adına iş yükünü karşılayabilmek için yapısını genişletmesini beklemekte idik.

Bilindiği üzere Golgi oldukça karmaşık, hareketli, yüzey alanı çok geniş kompleks bir organeldir (52). Stres ile ilişkili olarak sadece adaptif genişleme gereken bölme ile ilgili (ER-Golgi arası, cis, medial veya trans golgi kompartmanı ile trans golgi ağı) yapısal genlerde artış söz konusu olmuş olabilir ve bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz proteinlerden farklı olabilir. Sfingomyelin sentezi ile ilgili bölgede yapısal protein seramid transporter gen ifadenmesine veya sfingomyelin sentezi ile ilişkili bir enzimin ifadenmesine bakma imkanımız olsa idi, adaptif bir artış tesbit edebilirdik. Liu ve ark, Olkkohen ve ark, Yamaji ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada belirtildiği üzere ER ile golginin birbirine yaklaştığı ve seramidin golgiye transfer edildiği ER-Golgi membran temas bölgeleri en çok ER-Trans Golgi arasındadır. Golgi aygıtına taşınan seramid, orada glukozil seramid, sfingomyelin ve diğer kompleks glikosfingolipidlerin sentezinde kullanılır (48, 49,53) . Bizim çalışmamız lipid yükünün arttığı durumlarda bu bölgelerde işlevsel proteinlerin ifadenmesi araştırmak açısından ileri çalışmalara ışık tutacaktır.

ARF'ler evrimsel süreçte korunmuş ve sürekli ifadelenen küçük GTPazlardır. ER-golgi arası, farklı golgi sarnıçları arası ve endositik sistem içindeki sekretuar yollarda kargo transportunda hayati görevleri vardır. Anterograd ve retrograd transportta çok önemlidirler. Reiling ve arkadaşlarının yaptığı invitro farklı hücre kültür (A549, HeLa, MCF7, PC3, HEK293T ve PANC1 hücreler) çalışmalarında ARF1'in Brefeldin A gibi golgisidler ile yaratılan golgi stres durumlarında, hücrenin hayatta kalabilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. ARF1 ve ARF5'in ifadenmesinin susturulduğu (Lentoviral hairpinler, RNA interferans) çalışmalarda

ARF1 ve ARF5 eksikliğinin hücreyi Brefeldin A'ya hassas hale getirdiği ve hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. ARF4'ün susturulması ile ise Brefeldin A toksisitesine direnç geliştiği ve hücre kaybının azaldığı tesbit edilmiştir. Gene aynı çalışmada ARF4 ifadenmesini arttıran durumlarda ARF1 ve ARF5 ifadenmesinin azaldığı, bunu tersi durumda da yani, ARF1 ve ARF5 in ifadelemesinin arttığı durumda ise ARF4 ifadenmesinin azaldığı gösterilmiştir (35-39). Bizim çalışmamızda beklediğimiz, palmitik asid ve/veya glukoz ile metabolik stres yarattığımız INS-1E rat β -hücrelerinde özellikle insülin sentez ve sekresyonunu arttıran glukoz uyarısı sonrası golgi kargo trafiğini yönetebilmek için ARF1 ifadenmesinde artış olması idi. Benzer olarak lipid yükünün artması ile golgi lipid sentez ve modifikasyon işlevlerinin yürütülmesi için ARF1 lerde artış olması bekleniyor idi. Hücre ölümünün tetiklendiği aşamada ise ARF1 ifadenmesinde azalma ve ARF4 ifadenmesinde artma olacağı düşünülüyor idi.

Fakat çalışmamızın sonucunda Golgi cisimciği veziküler transport ile ilgili genlerden ARF1 gen ifadenmesinde zaman içinde glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisite ile değişim olmamıştır. Daha sonraki çalışmalarda bu bölgelerde farklı işlevsel proteinlerin ifadenmesi araştırmayı planlamaktayız.

HSP47 (SerpinH1) aslında ER de lokalize bir şaperondur. Fakat golgisidlerle yapılan çalışmalarda (O-glikozilasyon inhibisyonu) ve/veya bu şaperonun ifadenmesinin susturulduğu çalışmalarda, golgi stres proteini olarak ifadenmesinin arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, HSP47 Golgi strese girdiği durumlarda artmakta ve Golgi cisimciğini fragmentasyondan ve hücreyi de apoptozisten korumaktadır (34).

Biz çalışmamızda bu bilgilerle örtüşecek şekilde, glukolipotoksiste (0,5mMol PA ile 5mMolG varlığında) oluşturulduğunda HSP47 (serpin H1) gen ifadenmesinde 8. saatte 5 kat kadar artış olduğunu tesbit ettik. Daha yüksek doz glukoz ile glukolipotoksisite oluşturulduğunda da (33mMol G ile 0,5mMol PA) gene 8. saatte HSP47 (Serpin H1) gen ifadenmesinde başlangıca göre 3 kat artış tesbit edilmiştir. HSP47 (Serpin 1) gen ifadenmesinde tek başına yüksek konsantrasyon glukoz (33 mMol Glukoz) ile oluşturulan glukotoksisite ile 24. saatte başlangıca göre 6 kattan daha fazla artış olmuştur. HSP47 (Serpin H1) palmitik asit ile oluşturulan metabolik stres durumunda ise ifadenmesi erken dönemde artan

proteinlerden olduğunu düşünmekteyiz. Glukotoksisite ile oluşturulan metabolik stres yüksek konsantrasyonlarda glukoz varlığında ER de lokalize HSP47'nin ifadenmesini tetikliyor gibi gözükmektedir.

Golgi cisimciği stres genlerinden CREB3 geninin ifadenmesi 48 saat toksik ortama maruz kalan INS-1E rat β -hücrelerinde glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisitenin tüm doz uygulamalarında belirgin artış göstermiştir (p <0,05). Bu bulgu, CREB3'ün metabolik toksik ortamda geç dönemde ifadelendiğinin ve hücrede bu aşamada artık apoptozise giden sürecin tetiklendiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Bilindiği üzere golgisisidlerle oluşturulan golgi stres modellerinde ER membranında lokalize olan CREB3, Golgiye taşınarak proteazlar tarafından kesimi sonrası transkripsiyon faktörü olarak görev alarak tetiklediği bir dizi sinyaller sonrası hücrenin apoptozisini başlattığı düşünülen Golgi stres proteini (30, 31, 37). Biz de çalışmamızda bu bilgiler ile paralellik gösterecek şekilde hücre canlılığının en az olduğu tüm metabolik toksik ortam uygulamalarının 48. saatinde, bu proteinin ifadenmesinde artış tesbit ettik. Bu çalışma INS-1E rat β -hücrelerinde glukoz ve lipid ile oluşturulan metabolik stres durumunda CREB3 ifadenmesinin gösterildiği ilk çalışmadır.

CREB3 ifadenmesindeki artışın Golgi cisimciği stres genlerinden ARF4 geninin ifadenmesi CREB3 ile paralellik göstereceği beklenmekte iken, 48 saatlik süre zarfında glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisitenin tüm dozlarında hafif ama anlamlı olmayan ifadenme artışı göstermiştir. Bu çalışmada ARF4 mRNA düzeyinde herhangi bir değişikliği işaret edecek bir sonuç elde edilememiştir. Literatürde golgisisidler ile yapılan çalışmalarda CREB3 transkripsiyon faktörünün akış yolunda ARF4'ün ifadenmesinin artışı tesbit edilmiş ve golgi fragmantasyonu ile apoptozis sürecinden sorumlu tutulmuştur (37-39). CREB3 ile ilgili olarak apoptozise giden sinyaller dizisinde ARF4 dışında başka aracı proteinlerin çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz. ARF4'ün western blot yöntemi ile hücre içi miktarındaki değişimlerin gösterildiği çalışmaların da bu konuya ışık tutacağı aşikârdır.

Sonuç olarak bu çalışmada literatürde ilk defa olarak INS-1E rat β - hücrelerinde lipotoksisite/glukolipotoksisite sonrası ER stresi takiben, ilk saatlerde Golgi cisimciği glikozilasyon enzimlerinden st3gal1 ifadenmesinin, ER de lokalize

fakat golgicidlere cevapta önemli rol aldığı bilinen HSP47 (Serpin H1)'in ifadelenmesinin ve daha sonra çalışmanın 48. saatinde, hücre canlılığının azaldığı geç saatlerde ise gene golgicidlerle oluşturulan golgi streste hücre apoptozisinden sorumlu tutulan CREB3 ifadelenmesindeki artışın gösterildiği ilk çalışmadır.

Tüm dünyada görülme sıklığı öngörülenin çok üzerinde hızla artan Tip 2 diabetes mellitusun, çevresel faktörlerin etkisi sonucu pankreas β -hücrelerinde önce insülin sekresyonunun azalması ve daha sonraki evrelerde β -hücre kütlelerinde azalma ile ortaya çıktığı bilinmektedir. β -hücre kaybı ile ilgili olarak bugüne kadar ortaya konmuş mekanizmalar içinde en iyi çalışılmış olanı β -hücre endoplazmik retikulum stresinin sonucunda insülin salgısında azalma ve apoptozistir. Endoplazmik retikulum işlevleri ile yakından ilişkili ve insülinin ileri modifikasyonlarını ve sekretuar veziküller içinde depolanmasını sağlayan Golgi cisimciğinin bu toksik metabolik ortama nasıl adaptasyon mekanizmaları geliştirdiği hiç çalışılmamıştır. Literatürde ilk defa biz bu çalışma ile β -hücre Golgi cisimciğinin glukolipotoksisiteye stres cevabı oluşturduğunu gösterdik. Bu çalışmamızın hastalığın etyopatogenezini aydınlatmaya yönelik daha ileri çalışmalarda ışık tutacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, PA ve Glukoz ile INS-1E rat pankreatik β -hücrelerinde oluşturulan stres ile ilk defa olarak Golgi cisimciği ile ilgili proteinlerin RNA düzeyinde ifadelenmesindeki değişim ve hücrenin stres yanıtındaki rolü tanımlanmaya çalışılmıştır. INS-1E rat pankreatik β -hücrelerine 8, 16, 24 ve 48. saatlerde 0,5mMol PA, 5mMol Glukoz, 16,7mMol Glukoz, 33mMol Glukoz ve 5 mMol Glukoz ile 0,5mMol PA birlikte, 16,7mMol Glukoz ile 0,5mMol PA birlikte, 33mMol Glukoz ile 0,5mMol PA birlikte uygulanmıştır. Bu durumda hücrelerde glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisite yaratılmaya çalışılmıştır. Bu hücrelerde golgi cisimciği yapısal proteinlerinin ifadelenmesi, golgi cisimciği glikolizasyon enzimlerinin ifadelenmesi, HSP47, CREB 3 ve ARF4 gibi daha önce tanımlanmış golgi stres genlerinin ifadelenmesi kıyaslanarak tartışılmıştır.

- MTT testi sonucunda INS-1E rat pankreatik β -hücreleri için palmitik asidin erken dönemde ve glukozu göre daha belirgin stres faktörü olduğu, INS-1E hücrelerinde özellikle palmitik asit uygulamasından 8 saat sonra canlılık oranında en çarpıcı düşüşün görüldüğü (%50), glukoz için ise de gene 8.saatten sonra canlılıkta azalma (%30) başlamakla birlikte daha az oranda olduğu saptanmıştır. Palmitik asidin eklenmesinin glukozun tüm konsantrasyonlarında çok daha fazla hücre kaybına neden olduğu tesbit edilmiştir. Sonuç olarak INS-1E rat pankreatik β -hücreleri için lipotoksisitenin glukotoksisiteye kıyasla çok daha toksik olduğu gösterilmiştir.
- Literatür bilgileri ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da glukoz olmaksızın tek başına palmitik asidin 0,5mM konsantrasyonda ER stresi yarattığı, ER stres genlerinden grp 78 ifadenmesini PA uygulamasından sonra 8. saatten itibaren 3 kat arttırdığı tesbit edilmiştir. Glukoz tek başına ER stres geninde artış yapmazken, glukozu PA eklenmesi, yani glukolipotoksisite yaratılması bu gende anlamlı artışa neden olmuştur.
- Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden sialiltransferaz 4A (st3gal1) ifadenmesi, PA uygulamasından sonra ve glukoz ile birlikte PA verilen tüm uygulamalarda 16. saatten itibaren en az 3 kat arttığı tesbit edilmiştir. Bu gendeki ifadenme artış miktarı 24. saatten sonra azalmıştır.
- Golgi cisimciği glikolizasyon genlerinden sialiltransferaz 10 (st3gal6) geninin ifadenmesinde zaman içinde tüm uygulamalarda glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisite ile değişim olmamıştır.
- Golgi cisimciği yapısal genlerinden GCP60 (ACDB3), GM130 (Golga2) genlerinin ifadenmesinde zaman içinde tüm uygulamalarda glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisite ile değişim olmamıştır.

- Golgi cisimciği veziküler transport ile ilgili genlerden ARF1 gen ifadelenmesinde zaman içinde tüm uygulamalarda glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisite ile değişim olmamıştır.
- Golgi cisimciği stres genlerinden HSP47 (serpin H1) gen ifadelenme kat artışı 8. saatte 0,5mMol PA ile 5mMolG varlığında (glukolipotoksisite) 5 kat kadar olmuştur. Bu gen ifadelenme artışı 8. Saatte 33mMol G ile 0,5mMol PA varlığında da 3 kat kadar olmuştur. Serpin H1 geni ancak yüksek glukotoksiste varlığında 33 mMol Glukoz ortamında 24. saatte ifadelenmesi 6 katın üzerine çıkmıştır. SerpinH1 palmitik asit varlığında metabolik stres ile ifadelenmesi erken dönemde artan proteinlerdendir. Glukotoksisite ise ancak yüksek seviyelerde ise, bu proteininin ifadelenmesini tetikliyor gibidir.
- Golgi cisimciği stres genlerinden CREB3 geninin ifadelenmesi uzun süre toksik ortama maruz kalan INS-1E rat β -hücrelerinde glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisitenin tüm doz uygulamalarında 48.saatte belirgin artış göstermiştir ($p < 0,05$). CREB3'ün metabolik toksik ortamda geç dönemde ifadelenmesini göstermektedir ve hücrede bu aşamada artık apoptozise giden sürecin tetiklendiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu çalışma beta hücrelerinde glukoz ve lipid ile oluşturulan metabolik toksik ortamın CREB3 ifadelenmesini etkilediğinin gösterildiği ilk çalışmadır.
- Golgi cisimciği stres genlerinden ARF4 geninin ifadelenmesi CREB3 ile paralellik göstereceği beklenmekte iken, 48 saatlik süre zarfında glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisitenin tüm dozlarında hafif ama anlamlı olmayan ifadelenme artışı göstermiştir. Bu çalışmada ARF4 mRNA düzeyinde beklenen sonuç elde edilememiştir.
- Gen ifadelenmesinde anlamlı artış gözlenen ve/veya değişim beklediğimiz genlerin western uygulanarak protein düzeyinde incelenmeleri planlanmaktadır.

- Golgisidler ile yapılan çalışmalarda sitoplazmada fosforlanmış olarak inaktif halde bulunan TFE3'ün Golgi içindeki stresin varlığını ileten bilinmeyen bir faktör sayesinde defosforile edilerek Golgi ile ilgili yapısal ve işlevsel proteinlerin ifadenmesini arttırdığı gösterilmiştir. Böylece Golgi hücrenin ihtiyacını karşılayabilecek protein modifikasyonlarını, tasnifini ve sekresyonunu gerçekleştirebilmektedir. Aslında ilk aşamalarda hücrede değişen durum defosforilize TFE3 miktarındaki artıştır. Dolayısı ile TFE3 mRNA da artış beklenmez. Bizde çalışmamızda TFE3 aktivitesini gösterebilmek için Golgi yapısal genlerin ve Golgi enzimlerinin bazılarının ifadenmesine baktık. Bundan sonraki çalışmalarımızda ise pankreas β - hücrelerinde lipotoksiste/glukotoksiste/glukolipotoksiste durumlarında hücre içi defosforilize TFE3 miktarını ölçerek, metabolik streste bu proteinin önemini araştırmayı planlamaktayız.
- Literatürde ilk defa biz bu çalışma ile β -hücre Golgi cisimciğinin glukolipotoksisiteye stres cevabı oluşturduğunu gösterdik. Bu çalışmamızın hastalığın etyopatogenezini aydınlatmaya yönelik daha ileri çalışmalarda ışık tutacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR:

1. Satman I, Omer B, Tutuncu Y. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. TURDEP-II Study Group. *Eur J Epidemiol.* 28(2):169-80, 2013.
2. Sonmez A, Haymana C, Bayram F. TEMD Study. Turkish nationwide survEy of glycemc and other Metabolic parameters of patients with Diabetes mellitus (TEMD study). *Diabetes Res Clin Pract.* 146:138-147, 2018.
3. Golden SH, Yajnik C, Phatak S. Racialðnic differences in the burden of type 2 diabetes over the life course:a focus on the USA and India. Review. *Diabetologia.* 2019 doi: 10.1007/s00125-019-4968-0. [Epub ahead of print]
4. Cuschieri S. The genetic side of type 2 diabetes- A review. *Diabetes Metab Syndr.* 13(4):2503-2506. 2019.
5. Tabatabaiefar MA, Sajjadi RS, Narrei S. Epigenetics and common non communicable disease. *Adv Exp Med Biol.* 1121:7-20, 2019.
6. Ahmad S, Ahluwalia TS. Editorial: The role of genetic and lifestyle factors in metabolic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*10:475, 2019.
7. Carbone S, Del Buono MG, Ozemek C. Obesity, risk of diabetes and role of physical activity, exercise training and cardiorespiratory fitness. *Prog Cardiovasc Dis.* (19)30107-0. doi: 10.1016/j.pcad.2019.
8. Gittes GK. Developmental biology of the pancreas. *Dev Biol* 326: 4-35, 2009
9. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes:a review. *Diabetes* 51:S455-S461, 2002.
10. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic β -cell. *Apoptosis* 7:335-345, 2002.
11. Alarcon C, Boland BB, Uchizono Y. Pancreatic β -cell adaptive plasticity in obesity increases insülin production but adversely affects secretory function. *Diabetes* 65:438-450, 2016.
12. Despa F. Endoplasmic reticulum overcrowding as a mechanism of β -cell dysfunction in diabetes. *Biophysical J* 98:1641-1648, 2010.
13. Kim MK, Kim HS, Lee IK. Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review. *Exp Diabetes Res* 2012: 509437, 2012.
14. Bryan M. O'Sullivan-Murphy. Contribution of WFS1 to Pancreatic Beta Cell Survival and Adaptive Alterations in WFS1 Deficiency: A Dissertation. Graduate School of Biomedical Sciences and Theses, 2012.
15. Hasnain SZ, Pirns JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. *Molecular Endocrinology* 56(2):R33-R54, 2016.
16. Costes S, Langen R, Gurlo T. β -Cell failure in type 2 diabetes: a case of asking too much of too few? *Diabetes* 62(2): 327-335, 2013.
17. Brunton LL. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12. Baskı.

18. Merglen A, Theander S, Rubi B. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*, 142(2):667-678, 2004.
19. Liu M, Wright J, Guo H. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. *Vitam Horm*, 2014;95:35-62., 2014.
20. Shalev A. Minireview: Thioredoxin-Interacting Protein: Regulation and Function in the Pancreatic β -Cell *Molecular Endocrinology* 28 (8): 1211–1220, 2014.
21. Suga K, Saito A, Mishima T. Data for the effects of ER and Golgi stresses on the ER-Golgi SNARE syntaxin5 expression and on the β APP processing in cultered hippocampal neurons. *Data in Brief* 5:114-123, 2015.
22. Oikawa DM, Tokuda A, Hosoda A. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. *Nucleic Acids Res* 38(18): 6265-6273, 2010.
23. Osowski CM, Urano F. A switch from life to death in endoplasmic reticulum stressed beta-cells. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 58-65, 2010.
24. Osowski CM, Urano F. The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed beta cells." *Curr Opin Cell Biol* 23(2): 207-215, 2011.
25. Gorman AM, Healy SJ, Jager R. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* 134(3): 306-316, 2012.
26. Poitout V, Amyot J, Semache M. Glucolipototoxicity of the pancreatic β -cell. *Biochimica Biophysica Acta* 1801(3); 289-298, 2010.
27. Gjoni E, Brioschi L, Cinque A. Glucolipototoxicity impairs ceramide flow from the endoplasmic reticulum to the Golgi Apparatus in INS-1 β -cells. *Plos One* 9(10), e110875.
28. Ito Y, Uemoro T, Nakano A. Formation and maintenance of the Golgi Apparatus in plant cells. *International review of cell and molecular biology*. 310:221-287, 2014
29. *Molecular Biology of the cell*, 4. Baskı
30. Sasaki K, Yoshida H. Organelle autoregulation-stress responses in ER, Golgi, Mitochondria and lysosome. *J Biochem* 157:185-195, 2015.
31. Taniguchi Mai, Yoshida Hiderou. TFE3, HSP47, and CREB3 Pathways of the Mammalian Golgi Stress Response. *Cell structure and function*, 42: 27-36, 2017.
32. Taniguchi M, Nadanaka S, Tanakura S, TFE3 is a bHLH-ZIP-type transcription factor that regulates the mammalian golgi stress response. *Cell Structure and Function*, 40:13-30, 2015.
33. Oku M, Tanakura S, Uemura A. Novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. *Cell Struct Funct* 36:1-12, 2011.
34. Miyata S, Mizuno T, Koyama Y. The endoplasmic reticulum-resident chaperone heat shock protein 47 protects the Golgi aparatus from the effects of O-glycosylation inhibition. *Plos One*, 8 (7): e69732, 2013.
35. ArvanP et al. Secretory Pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic*, 2002.

36. Ramos Castaneda J . Deficiency of ATP2C1, a Golgi ion pump, induces secretory pathway defects in ER-associated degradation sensitivity to ER stress. *J Biol Chem* . Sasaki K et al.
37. Reiling JH, Olive AJ, Sanyal S. A human/CREB3-ADP-ribosylation factor 4 (ARF4) signaling pathway mediates the response to Golgi stress and susceptibility to pathogens. *Nat Cell Biol* ,15: 1473-1485, 2013.
38. Asada R, Kanemoto S, Kondo S. The signalling from endoplasmic reticulum resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *J Biochem* 149(5): 507-518, 2011.
39. Nakai W, Kondo Y, Saitoh A. ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 24:2570-2581, 2013.
40. Cunha D. A. Hekerman P, Ladriere L. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 121(Pt 14): 2308-2318, 2008.
41. Green CD, Olson LK. Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic beta-cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(4): E640-649, 2011.
42. Morgan NG, Dhayal S. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic beta-cell. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(4-6): 231-236, 2010.
43. Karaskov E, Scott C, Zhang L. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 147(7): 3398-3407, 2006.
44. Kato T, Shimano H, Yamamoto T. Granulophilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice. *Cell Metab* 4:143-154, 2006.
45. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem*. 280:32413-8, 2005.
46. Giussani P, Brioschi L, Bassi R. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway regulates the endoplasmic reticulum to golgi traffic of ceramide in glioma cells: a link between lipid signalling pathways involved in the control of cell survival. *J Biol Chem* 284: 5088-5096, 2009.
47. Lin Yee-Shin, Lin Chiou-Feng. Ceramide in apoptotic signalling and anticancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 2006.
48. Liu L-K, Choudhary V, Toulmay A. An inducible ER-Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity. *J Cell Biol* 216 (1): 131-147, 2016.
49. Olkkonen VM. OSBP-related protein family in lipid transport over membrane contact sites. *Lipid Insights* 8:1-9, 2015.
50. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M. Fatty acid-induced β cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:2498-502, 1998.
51. Briaud I, Kelpe CL, Johnson LM, Tran PO, Poitout V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 51:662-8, 2002.

52. Sasaki K, Yoshida H. Organelle Zones. Mini-Review. Cell Structure and Function. 2019, epub.
53. Yamaji T, Hamada K. Establishment of HeLa cell mutants deficient in sphingolipid-related genes using TALENs. Plos One 9:e88124, 2014.



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu



Sayı : 94603339-604.01.02/ 25142
Konu : Proje Onayı

29/07/2016

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı öğrencisi Prof. Dr. Neslihan Başcıl Tütüncü tarafından yürütülecek olan DA16/30 nolu "β-Hücre golgi cisimciğinin glukolipotoksisiteye stres yanıtı" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.