



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **OBEZİTEDE RAN GENİ ANLATIMININ ADIPOGENEZ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

---

SİNEM BANU DEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

İSTANBUL, 2017

---



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **OBEZİTEDE RAN GENİ ANLATIMININ ADİPOGENEZ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

---

SİNEM BANU DEMİR

(520114009)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

**DANIŞMAN**

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

İSTANBUL, 2017

---

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Sinem Banu DEMİR'in "Obesitede RAN Geni Anlatımının Adipogenez İle İlişkisinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması, 15 Ocak 2017 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ (Danışman)

Marmara Üniversitesi ..... (İMZA) 

Prof. Dr. Melik ÖZTÜRK (Üye)

İstanbul Üniversitesi ..... (İMZA) 

Yrd. Doç. Dr. Güler DARTAN (Üye)

Marmara Üniversitesi ..... (İMZA) 

**ONAY**

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16/01/2017 tarih ve 2017/06-02 sayılı kararı ile Sinem Banu DEMİR'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Prof. Dr. Uğur YAHSI



## **TEŞEKKÜR**

Lisansüstü eğitimim süresince üst düzey akademik bilgi birikimi ile bilimsel yol göstericim olan, akademik olarak sunduğu fırsatlar ve açtığı kapılarla bana ışık olan, üstün bilimsel yetkinliği ile tüm sorunların çözümünü sağlayan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, profesyonel fedakarlıklarının yanında samimiyeti ve duygusal desteğiyle de her daim elini üzerimde hissettiğim, tez danışmanım, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Belgin Süsleyici Duman'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneyselerimde ve tez sürecimde her türlü yardımı ve işbirliğini sağlayan, bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Bio. Mehtap Çevik ve Dr. Meliha Koldemir Gündüz'e teşekkür ederim.

Yıllardır birlikte çalışmaktan onur duyduğum, gelişmeme ve ilerlememe her türlü desteği sağlayan ve örnek teşkil eden değerli hocam Prof. Dr. İbrahim Öztekin'e teşekkürü borç bilirim.

Bana benden daha çok inanan, yanımda olan ve destekleyen çok sevgili arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Son olarak hayatın getirdiği her türlü zorluğa karşı nasıl dik durulacağını öğreten, her ne olursa olsun arkamda olduğunu bildiğim, fedakarlıklarının karşılığını ödeyemeyeceğim canım annem Zernişan Yılmaz'a tüm yaptıklarının yanında sadece varlığı için çok teşekkür ederim.

**Ocak 2017**

**Sinem Banu DEMİR**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	viii
SEMBOLLER.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ .....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1. 1. Genel Bilgiler .....	1
1. 1. 1. Obezite.....	1
1. 1. 2. Yağ doku.....	2
1. 1. 3. Ras-İlişkili Nükleer Protein (Ran).....	2
1. 1. 3. 1. Ran proteininin görevleri .....	3
1. 1. 3. 2. Ran proteini ve kanser ilişkisi .....	5
1. 2. Amaç ve Önem .....	5
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>7</b>
2. 1. 3T3-L1 Fibroblast Hücre kültürü .....	7
2. 2. 3T3-L1 Fibroblast Hücrelerinin Adiposit Hücrelerine Dönüşümü .....	8
2. 3. Yaşlanmış Adiposit Hücrelerinin $\beta$ -Galaktozidaz ile Tespiti.....	9
2. 4. Adipositlerin Oil Red O Boyama ile Tespiti .....	10
2. 5. Gerçek Zamanlı Hücre Monitorizasyon Sistemi: iCELLigence .....	11
2. 5. 1. iCelligence sistemi ile 3T3-L1 adiposit hücre sayısının optimizasyonu .....	12

2. 5. 1. iCELLigence sisteminde 3T3-L1 adiposit hücrelerine madde uygulanması .....	13
2. 6. Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi .....	13
2. 6. 1. Total RNA izolasyonu .....	13
2. 6. 2. Total RNA'dan cDNA sentezi .....	14
2. 6. 3. Kantitatif Polimeraz Zincir (qPZR) Analizi .....	14
2. 7. İstatistiksel Analizler .....	15
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>17</b>
3. 1. Bulgular .....	17
3. 1. 1. Hidrojen Peroksitin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri .....	17
3. 1. 2. Linoleik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri .....	19
3. 1. 3. Stearik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri.....	20
3. 1. 4. Etanolün 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri .....	21
3. 1. 5. Olgun Adipositlerde Farklı Koşullar Altında RAN Gen Anlatım Seviyeleri.....	23
3. 1. 5. 1. Farklı Gelişim Evrelerindeki Adipositlerin RAN Gen Anlatım Seviyeleri .....	23
3. 1. 5. 2. Olgun Adipositlere H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri .....	24
3. 1. 5. 3. Olgun Adipositlere Linoleik Asit Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri .....	25
3. 1. 5. 4. Olgun Adipositlere Stearik Asit Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri .....	25
3. 1. 5. 5. Olgun Adipositlere Etanol Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri .....	25
3. 2. Tartışma .....	26
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>31</b>

<b>KAYNAKLAR</b> .....	33
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	39

## ÖZET

### **Obezitede RAN Geni Anlatımının Adipogenez ile İlişkisinin Araştırılması**

Çalışmamızda preadiposit, olgun adiposit ve yaşlandırılmış adipositler olmak üzere farklı gelişim evrelerindeki adipositlerde Ras ile ilişkili nüklear proteine (Ran) ait gen anlatımının, olgun adipositlerin değişik dozlarda oksidatif stres faktörlerine (stearik asit, linoleik asit, etanol ve hidrojen peroksit) maruz bırakılmasına karşı yanıt olarak hücre proliferasyonlarının ve bu olgun adipositlerdeki RAN gen anlatımının ne yönde değişim gösterdiği araştırıldı.

Çalışmamız, literatür taramalarımıza göre adipogenik süreçte RAN geninin obezite ile bağlantısını ortaya koyan ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır.

Çalışmamızda RAN geninin obezitedeki rolünü belirlemek amacıyla fare kökenli 3T3-L1 fibroblast hücreleri, iCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak gözlemlenerek, preadiposit, olgun adiposit ve yaşlandırılmış adipositlere farklılaştırıldı. Olgun adipositler farklı konsantrasyonlarda sitotoksik ajanlara maruz bırakılarak hücre proliferasyonları gerçek zamanlı hücre izleme sistemi (iCELLigence) ile izlendi. Elde edilen hücrelerden haberci RNA izolasyonu, haberci RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi ve elde edilen genetik materyalde sitotoksik ajanlara yanıt olarak, RAN geninin anlatımındaki değişimler TaqMan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edildi.

Oksidatif stres ajanlarının çeşitli konsantrasyonlarının uygulama süreleri, iCELLigence sistemi ile IC50 değeri elde edilerek saptandı. 24 saat hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) uygulaması sonucu IC50 değeri 807 µM olarak saptandı. 24 saat 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması 3T3-L1 olgun adiposit hücrelerinde letal etkiye sahipken, 50-250 µM konsantrasyon aralığındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının olgun adiposit proliferasyonu üzerine istatistiksel anlamlı bir etkisi olmadığı belirlendi.

Olgun adipositlerde RAN gen anlatımı, oksidatif stres faktörü uygulanmayan kontrol adipositlere kıyasla, dört ve beş saatlik 600 ve 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonrası artarken; 24 saat 50 µM stearik asit, 24 saat 90 mM etanol ve 4 saat 400 µM ve 24 saat'lik 600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması sonrası azaldığı tespit edildi. Linoleik asit uygulaması sonrasında ise RAN geni anlatımının ortadan kalktığı gözlemlendi.

600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e dört saat maruz bırakılan olgun adipositlerde RAN geni anlatımı kontrol hücrelere kıyasla iki kat artarken, aynı dozda beş saat muamele edilen hücrelerde gen anlatımının altı kata yakın arttırdığının gözlenmesi, farklılaşmış adiposit hücrelerinde glikoz homeostazının bozulduğunu düşünmemize neden oldu. 90 mM/24 saat'lik etanol uygulaması neticesinde RAN gen anlatımında saptanan azalmanın, insülin direncinin artmasına katkıda bulunabileceği düşüncesindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** RAN; obezite; adiposit; gen ekspresyonu; iCELLigence.

## **ABSTRACT**

### **Investigation of RAN gene expression in Obesity relation with Adipogenesis**

In our study the Ras-related nuclear protein (Ran) gene expression levels were evaluated in the adipocytes of different developmental stages such as; preadipocytes, mature adipocytes and senescent adipocytes. Also the RAN gene expression change together with cell proliferation activities as a response to, oxidative stress markers (stearic acid, linoleic acid, ethanol and hydrogen peroxide) were searched in mature adipocytes.

Our study is the first study, according to literature review, about RAN gene expression in adipogenic process.

In our study, to determine the role of the RAN gene in obesity, we differentiated Mouse derived 3T3-L1 fibroblast cells into preadipocytes, mature adipocytes and adipocytes under senescence by observing with real-time cell observation system (iCELLigence). These cells were exposed to cytotoxic markers at different concentrations and cell proliferations were monitored with iCELLigence system. The messenger RNA isolation from the obtained cells, complementary DNA synthesis from messenger RNA and the changes of RAN gene expression in response to cytotoxic markers obtained from the genetic material were identified by TaqMan real-time polymerase chain reaction.

The implementation periods of oxidative stress markers were determined by iCELLigence after applying their various concentrations by obtaining IC50 value. After 24 hours application of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), IC50 value was found as 807 μM. 24 hours application of 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was found to have lethal effect on mature 3T3-L1 cells. We did not observe any significant effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applications in the concentration range of 50-250.

The RAN gene expression in mature adipocytes were determined to increase in 4hr and 5 hr 600 and 800 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> administration; and to decrease in 24 hr 50 μM stearic acid, 24 hr 90 mM ethanol and 4 hr 400 μM as well as 24 hr 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applications compared to no oxidative stress factor applied control adipocytes. As a result of linoleic acid administration, we did not observe any RAN gene expression.

The observation of RAN gene expression to increase two fold in 4 hr 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> applied mature adipocyttest compared to control cells, while five hours of exposure to the same dose to increase nearly six fold may suggest the deterioration of glucose homeostasis in differentiated adipocyte cells. We think the fact of ethanol decreasing RAN gene expression contributes to the increase of insulin resistance.

**Keywords:** RAN; obesity; adipocytes; gene expression; iCELLigence.

## SEMBOLLER

$\alpha$ : Alfa

$\beta$ : Beta

%: Yüzde

$^{\circ}\text{C}$  :Santigrat Derece

$\mu\text{g}$ : Mikrogram

$\mu\text{M}$ : MikroMolar

$\mu\text{l}$ : Mikrolitre

$\beta$ : Beta

$\alpha$ :Alfa

$\text{cm}^2$ : Santimetrekaire

$\text{H}_2\text{O}_2$ : Hidrojen Peroksit

kDa: Kilo Dalton

L: Litre

mM : Mili Molar

mmol: Mili Mol

ml : Mili Litre

rpm: Dakikada dönme hızı

$R_n$  : Kuyucuklarda hücre varlığındaki hücre-elektrot empedansı

$R_b$  :Kuyucuklarda hücre olmadığında medyuma ait arka plan empedansı

S: Sedimentasyon Katsayısı

## KISALTMALAR

3T3-L1: Mus musculus embriyolarından elde edilen fibroblast hücre soyu

AR: Androjen reseptörü

ATCC: American Type Culture Collection

cDNA: Tamamlayıcı DNA

Cq: Crossing point

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

ER: Endoplazmik reticulum

FBS: Fetal Bovin Serum

GTP: Guanozin trifosfat

GDP: Guanozin difosfat

IGF-7: İnsülin benzeri büyüme hormonu

KLA: Konjuge Lineloik Asit

NF- $\kappa$  $\beta$ : Nuclear Factor kappa  $\beta$

NLS: Nüklear lokalizasyon sinyali

NuMA: Nüklear Mitotik Aparat

PBS: Phosphate-buffered saline

qPZR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Ran: Ras-İlişkili Nüklear Protein

RanBP1 ve RanBP2: Ran bağlayıcı proteinler

RanGAP: RanGTPaz aktive proteini

RanGTPaz: RanGTP parçalayıcı enzim

RCC1: Ran Guanin nükleotid değişim faktörü

RNA: Ribonükleik asit

SWAT: Subcutaneous white adipose tissue

TNF: Tümör nekroz faktörü

UV: Ultraviyole

VKI: Vücut Kitle İndeksi

VWAT: Visceral white adipose tissue

WAT: White adipose tissue

WHO: Dünya Sağlık rgt

## ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa No

1. **Şekil 1.1.:** RAN geni insanda 12. kromozom üzerinde bulunur[14]. İnsan hücrelerinde RAN'ın sadece bir geni vardır[15]. 2
2. **Şekil 1.2.:** Ran proteininin sitosol-nukleus arasında madde transport mekanizması [28] 3
3. **Şekil 2.1.:** Adiposit besi yeri hazırlanışı. 7
4. **Şekil 2.2.:** Adiposit hücrelerinin pasajlanması. 7
5. **Şekil 2.3.:** 3T3-L1 fibroblastlarının pre-adipositlere dönüşümü. A) Dönüşüm öncesi fibroblastlar (10X), B-C) Dönüşüm sırasında fibroblast-preadiposit hücreleri (10X), D) Olgun adipositler (40X). 8
6. **Şekil 2.4.:** Yaşlandırılmış adiposit hücreleri (40X) 9
7. **Şekil 2. 5.:**  $\beta$ -Galaktozidaz işaretleyicisi ile yaşlandırılmış hücrelerin mavi renkli izlenmesi. 10
8. **Şekil 2.6.:** 3T3-L1 adiposit hücrelerinin red oil o ile boyanması 11
9. **Şekil 2.7.:** 3T3-L1 adiposit hücrelerindeki yağ damlacıklarının red oil o boyanmış mikroskop (x40) görüntüsü 11
10. **Şekil 2.8.:** A) Hücre kültüründe iCELLigence sistemi B) iCELLigence sisteminde e-plakalarda çoğalan adipositler 12
11. **Şekil 3.1.:** A) Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 250, 1000  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. B) 300, 400, 600, 800  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. C) 24 saat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması için IC50 değeri. 17-18

- 12. Şekil 3.2.:** A) Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 200, 400, 600 µM linoleik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. B) 48 saat linoleik asit uygulaması için IC50 değeri. **19-20**
- 13. Şekil 3.3.:** A) Olgun adipositlerdeki yağ damlacıklarının Red Oil O ile izlenmesi. B) Linoleik asit ile muamele sonrası olgun adipositlerdeki yağ damlacıklarının Red Oil O ile azalmış olarak izlenmesi. **20**
- 14. Şekil 3.4.:** Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 500, 750, 1000, 1500 µM stearik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. **21**
- 15. Şekil 3.5.:** A) Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 150, 250 mM etanol uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. B) 48 saat etanol uygulaması için IC50 değeri. **22**
- 16. Şekil 3.6.:** Preadiposit hücrelerde RAN gen anlatım seviyesi kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında 0.41 kat, senesense uğratılmış adiposit hücrelerinde ise 0.057 kat azaldığı tespit edildi. **23**
- 17. Şekil 3.7.:** Olgun adipositlere farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması sonucu RAN gen anlatımları **24**
- 18. Şekil 3.8.:** Olgun adipositlerde, 24 saatlik 50 µM stearik asit muamelesi sonrası RAN gen ekspresyon seviyesi **25**
- 19. Şekil 3.9.:** Olgun adipositlerde, 24 saat 90 mM etanol ile muamele sonrası RAN gen ifadesi. **26**

**20. Şekil 3.10.:** Farklı gelişim evrelerindeki ve farklı oksidatif stres faktörleri uygulanmış olan olgun adipositlerdeki, qPZR ile saptanan RAN gen anlatım seviyeleri.

**27**

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>1. Tablo 1. 1.:</b> WHO (World Health Organization) kriterlerine göre VKİ tabanlı obezitenin sınıflandırılması [7]	<b>1</b>

## 1. GİRİŞ

### 1. 1. Genel Bilgiler

#### 1. 1. 1. Obezite

Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin (VKİ), yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize olan kronik bir hastalıktır. VKİ 30 veya daha fazla olan hastalar obez olarak nitelendirilirken 25 veya üzeri olan hastalar fazla kilolu olarak sınıflandırılmaktadır(Tablo 1.1.). Obezite, başta kardiovasküler ve endokrin sistem olmak üzere vücudun tüm organ ve sistemlerini etkileyerek çeşitli bozukluklara ve hatta ölümlere yol açabilen önemli bir sağlık problemidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilen obezitenin, yine aynı örgüt tarafından yürütülen son araştırmalarda kanserle yakın ilgisi olduğu da belirlenmiştir[1].

**Tablo 1. 1.:** WHO (World Health Organization) kriterlerine göre VKİ tabanlı obezitenin sınıflandırılması [7]

<b>Sınıflandırma</b>	<b>VKİ (kg/m<sup>2</sup>)</b>
	<b>Sınır Aralığı</b>
<b>Zayıf</b>	<b>&lt; 18.50</b>
İleri Derece Zayıf	< 16.00
Orta Zayıf	16.00-16.99
Hafif Zayıf	17.00-18.49
<b>Normal Aralık</b>	<b>18.50-24.99</b>
<b>Fazla Kilolu</b>	<b>25.00-29.99</b>
<b>Şişman</b>	<b>≥ 30.00</b>
Şişman Sınıf I	30.00-34.99
Şişman Sınıf II	35.00-39.99
Şişman Sınıf III	≥ 40.00

Obezite; beyaz yağ dokusunun (WAT) aşırı derecede artması ile tanımlanan bir hastalıktır. Obezite, beyaz yağ dokudaki adipositlerin hipertrofisi ve hiperplazisi ile

gelişir. Beyaz yağ dokunun vücutta geliştiği lokasyon ve hücrel mekanizması obezite patolojisini büyük ölçüde etkiler. Beyaz yağ dokusu (WAT) vücutta farklı alanlarda bulunabileceği gibi çoğunlukla derialtı dokularda (subkutan) SWAT ve iç organların çevresinde (visseral) VWAT olarak konumlanır [2]. İnsanlarda VWAT birikimi ve abdominal, derin SWAT yerleşimi ile diyabet, kardiyovaküler hastalıklar ve ölüm oranı artar [3].

Obeziteye neden olarak görülen patolojik nedenler; regülasyon bozukluğu, psikojenik kaynaklı obezite, nörojenik bozukluklara bağlı obezite ve genetik kaynaklı obezite olarak tanımlanmıştır [4].

Obezitenin genetiği ile ilgili çalışmalar genellikle ikizler üzerinde yapılmış olup; vücut - kitle indeksinin (VKİ) genetik geçişle aktarıldığı bilinmektedir [5,6].

### 1. 1. 2. Yağ doku

Yağ doku, adiposit adı verilen ve %95'i yağ damlacığıyla kaplı hücreler tarafından oluşturulan bir dokudur. Diğer organlardan farklı olarak, tüm vücutta dağılım gösteren yağ doku oldukça dinamikdir. Vücut yerleşimlerine göre adipoz doku hücrelerindeki gen ifadenme kalıplarında küçük farklılıklar görülebilir. Yağ dokusu sadece yağ depolamadan sorumlu olmayıp aynı zamanda polipeptidik sitokinler ve hormon benzeri moleküller salgılama yeteneğine sahip hücrelerden oluşan organize bir endokrin dokudur [8].

Yağ dokunun sitokinleri arasında leptin, ddiponektin, rezistin, visfatin, IGF-7, NF- $\kappa$ B ve vb pekçok biyomolekül vardır [9-11].

### 1. 1. 3. Ras-İlişkili Nüklear Protein (Ran)

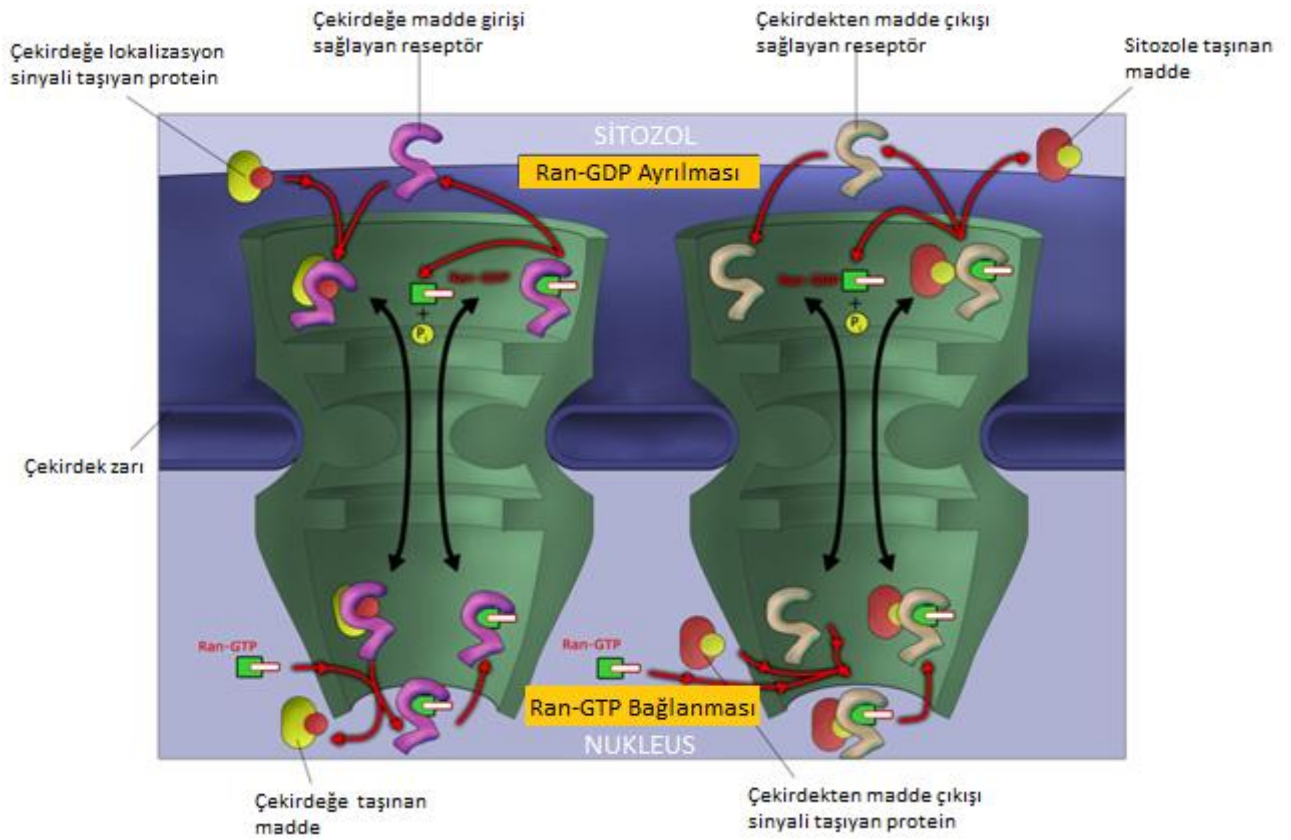
Ran (Ras-related Nuclear protein) veya GTP-bağlayıcı nüklear protein olarak bilinen protein RAN geni tarafından kodlanır. Ras üst familyasının bir üyesi olan bu protein 25 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir (Şekil 1.1.) [12, 13].



**Şekil 1.1.:** RAN geni insanda 12. kromozom üzerinde bulunur[14]. İnsan hücrelerinde RAN'ın sadece bir geni vardır[15].

### 1. 1. 3. 1. Ran proteininin görevleri

Ran proteini RNA ve proteinlerin translokasyonunda bu moleküllerin, nüklear porlardan geçirilmesinde büyük rol oynar. Nükleus-sitosol arasında makromoleküllerin geçişinde rol alan mikrotübül ağının organizasyonunu ve formasyonunu ayarlar [16, 17]. GTP veya GDP'ye bağlanarak nükleus zarından molekül geçişine aracılık eder (Şekil 1.2.).



**Şekil 1. 2.:** Ran proteininin sitosol-nükleus arasında madde transport mekanizması [28].

İnterfaz safhasında nükleus ve sitoplazma arasındaki orantısız Ran-GTP ve Ran-GDP dağılımını nüklear RCC1 (Ran-GEF) (Ran Guanin nükleotid değişim faktörü) [18] ve sitoplazmik RanGTPaz aktive proteininin (RanGAP) [22] Ran-bağlayıcı proteinlere (RanBP1 ve RanBP2) bağlanmasıyla düzenler [23, 24].

Ran proteini aynı zamanda DNA sentezinin kontrolünde ve mitotik hücre döngüsünün işleyişinde görev görür [23].

Ran mitoz esnasında, mikrotübül polimerizasyonunda moleküllerin düzenlenmesi sinyalizasyonunun anahtarı olabilir. RCC1 kromatin etrafında yüksek konsantrasyonlu Ran-GTP üretir. Bu da nukleusun mikrotübüllerini uyarır [23].

İmportin  $\alpha/\beta$  heterodimeri ve GTPaz Ran nuklear protein taşınımında anahtar rol oynar. İmportin, nuklear lokalizasyon sinyaline (NLS) bağlanır. Digitonin permeabiliteli hücrelerin (in vitro koşullarda çalışılan, digitonin muamelesi ile işaretlenmiş hücreler) nukleuslarına sitosol veya sitosolik fraksiyonların eklenmesiyle yapılan çalışmada protein taşınımıyla ilişkili dört adet gen (GTPaz Ran/TC4, importin- $\alpha$ , importin- $\beta$  ve pp1) tanımlanmıştır [24,25].

Ran'ın birçok işlevinin yanında diğer proteinlerle etkileşime giriyor olması sebebiyle RAN geni üzerinde oluşacak bir mutasyon DNA sentezini sekteye uğratar. Ran mitoz esnasında hücre döngüsüne katılır ve kromozomlar ayrıldıktan sonra tekrar nukleus yapılanmasında rol alır. Profaz safhasında nuklear porlardaki Ran-GDP ve Ran-GTP oranı azalarak nuklear zar, akıcı ve kararsız bir hale dönüşür. Ran-GTP konsantrasyonu kromozomların etrafında RCC1 indüklenmiş halde yüksek oranda bulunur. RanBP2 (Nup358) ve RanGAP kromozomların iç iplikleri ile bağlanmalarını kolaylaştırmak için kinetokorlara giderler. Ayrıca Ran-GTP; NuMA ve TPX2 gibi inhibe edilmiş faktörlerin importinlere bağlanmasına aracılık eder. İmportinlerin salınmasıyla Ran-GTP bu faktörleri aktive eder ve mitotik döngüye katılan moleküllere tutunmalarını sağlar. Telofazda ise Ran-GTP hidrolizi ve nukleotid değişimi yeni oluşan hücre tarafından hücre gelişiminde kullanılır [26].

Ran çeşitli uzunluklardaki poliglutamini androjen reseptörüne (AR) bağlayan androjen reseptörü koaktivatörüdür (ARA24). Poliglutaminin AR'de yayılma tekrarı (poliglutaminin AR'ne art arda eklenmesi ile reseptör üzerinde gösterdiği yayılma), Bulber-Spinal Kas Atrofisi (Kennedy hastalığı) ile ilişkilendirilmiştir. Ran'ın androjen reseptörüne koaktivasyonun, poliglutaminin AR'de yayılımını azaltır. Bu durumda zayıf koaktivasyon, spinal ve bulbar kas gelişimi atrofisi ile kısmi androjen hassasiyetine sebep olabilir [27].

### **1. 1. 3. 2. Ran proteini ve kanser ilişkisi**

Doherty KJ ve arkadaşlarına göre Ran-GTPaz (Ran) sinyalizasyonunun ve yolaklarının tanımlanması, kanser terapötiklerine yeni bir yaklaşım olarak ifade edilmektedir. Ran ifadesi ile kanser oluşumu ve ilerlemesi arasındaki önemli ilişkinin aydınlatılmasını sağlayan son araştırmalarla, hücredeki Ran'ın endojen düzeylerini düşürecek, mitotik karşıtı etkilere sahip olacak küçük moleküllü bir bileşiğin yeni kanser terapötik türleri gelişiminde önemli etkisi olabileceği tartışılmaktadır. Ran bağlayıcı proteinlerin yokluğunda, Ran'ın, importinler ile üretken olmayan komplekslerde kilitlendiği ve sistemden etkili bir şekilde çıkarılacağı öngörülmektedir. Böylece, Ran bağlanma proteinleri, kanser hücresindeki Ran sinyalinin engellenmesi için bir moleküler hedef olarak algılanmaktadır. Ran protein ailesinin hücre içinde anti-neoplastikt işlevleri olduğu gösterilmiştir [29].

### **1. 2. Amaç ve Önem**

Metabolik sendromun birçok komponenti özellikle obezite ve diyabet bazı kanser tiplerinin gelişiminde rol alır. Obezitenin endoplazmik retikulum (ER) stresini uyardığı ve ER stresinde özellikle obezite, tip 2 diyabet ve insülin direnci arasında anahtar rol oynadığı bilinse de [30] çalışmamızda araştırdığımız yağ dokuda obezitenin uyardığı ER stresine cevap olarak RAN gen anlatımının ne şekilde gerçekleştiği ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlamadık.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

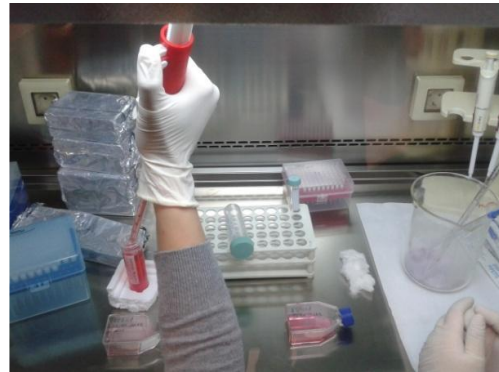
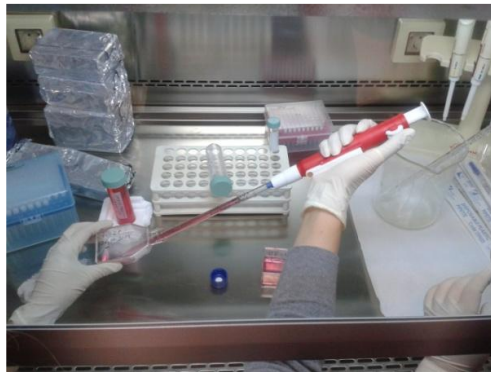
### 2. 1. 3T3-L1 Fibroblast Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan 3T3L-1 fibroblast hücre soyu American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, USA) ticari olarak temin edilmiş olup  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmasına başlamadan önce DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) medyumu+%10 FetalBovin Serum (FBS)+ penisilin (100 unit/ml) ve streptomisin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) içeren besi yeri steril şartlarda UV kabin içerisinde hazırlandı (Şekil 2.1.).



Şekil 2. 1.: Adiposit besi yeri hazırlanışı.

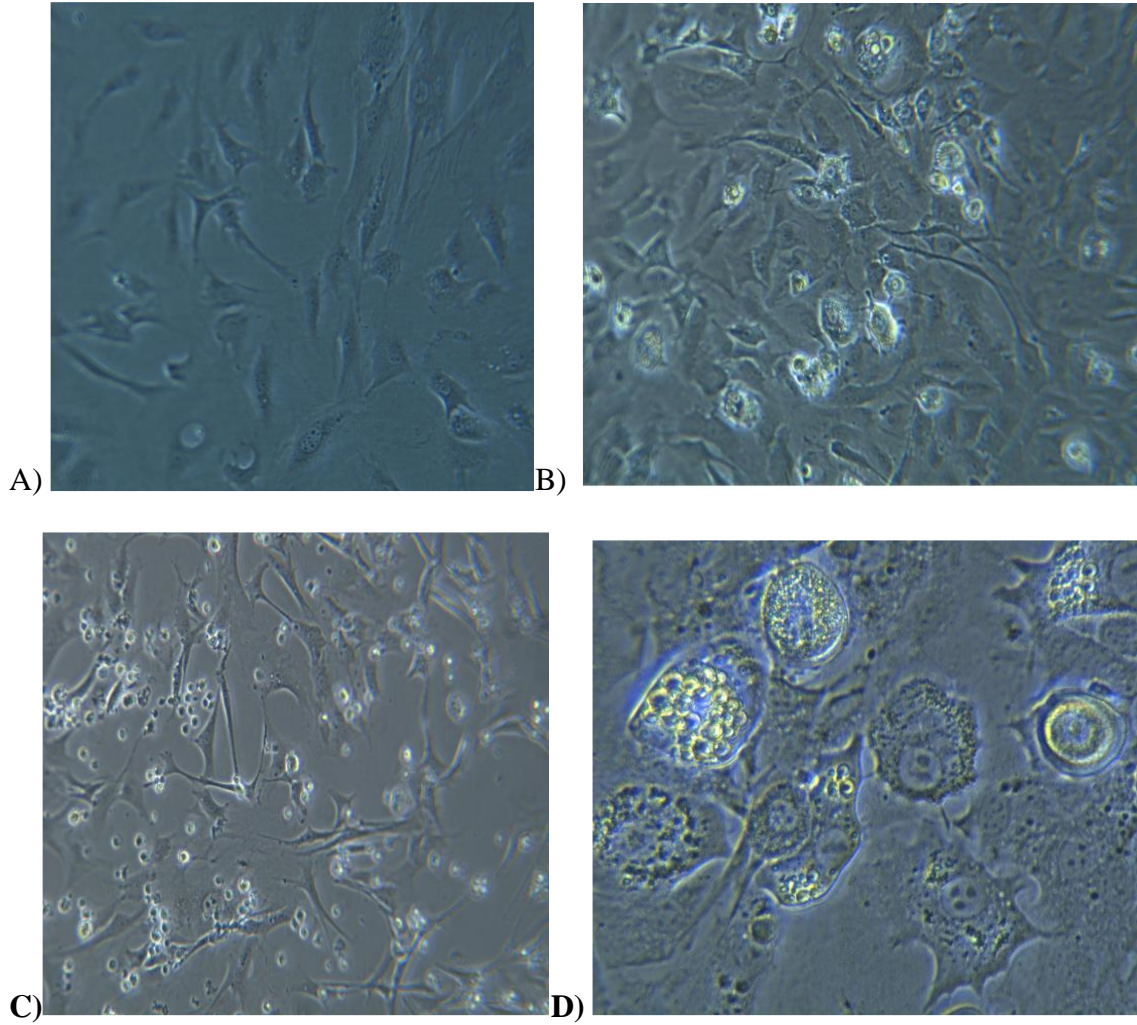
Hücre kültürü içerisindeki besi yeri 2-3 gün arayla değiştirildi. Flask yüzeyinin %90'lık bölümü hücre ile dolunca hücreler klasik tripsinojen yöntemi ile pasajlandı (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2.: Adiposit hücrelerinin pasajlanması.

## 2. 2. 3T3-L1 Fibroblast Hücrelerinin Adiposit Hücrelerine Dönüşümü

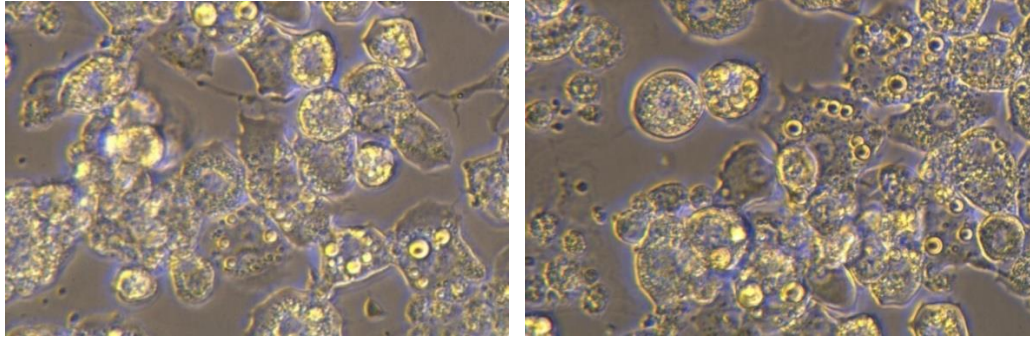
3T3-L1 fibroblast hücrelerinin farklılaşması Miard et al. [31] protokolüne göre yapılmıştır. 3T3-L1 fibroblast hücreleri DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) medyumu+%10 Fetal sığır Serum (FBS) içinde %5'lik karbondioksit etüvde 37°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Flaskların %75'inin hücreler tarafından doldurulması ile hücelere DMEM-FBS içine 10µg/ml insülin + 1µM dexametazone + 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine eklenmiş besi yeri ilave edildi. Farklılaşmanın başlatılması amacıyla inkübasyon 3 gün sürdürüldü. Daha sonra 2'şer gün aralıklarla DMEM-FBS +10µ/ml insülin içeren besi yeri ile hücrelerin 3 kez besi yeri yenilemesi yapıldı. Adiposit farklılaşması hücre içi lipid damlacıklarının birikimi ile saptandı (Şekil 2.3., Şekil 2.4.).



**Şekil 2. 3.:** 3T3-L1 fibroblastlarının pre-adipositlere dönüşümü. A) Dönüşüm öncesi fibroblastlar (10X), B-C) Dönüşüm sırasında fibroblast-preadiposit hücreleri (10X), D) Olgun adipositler (40X).

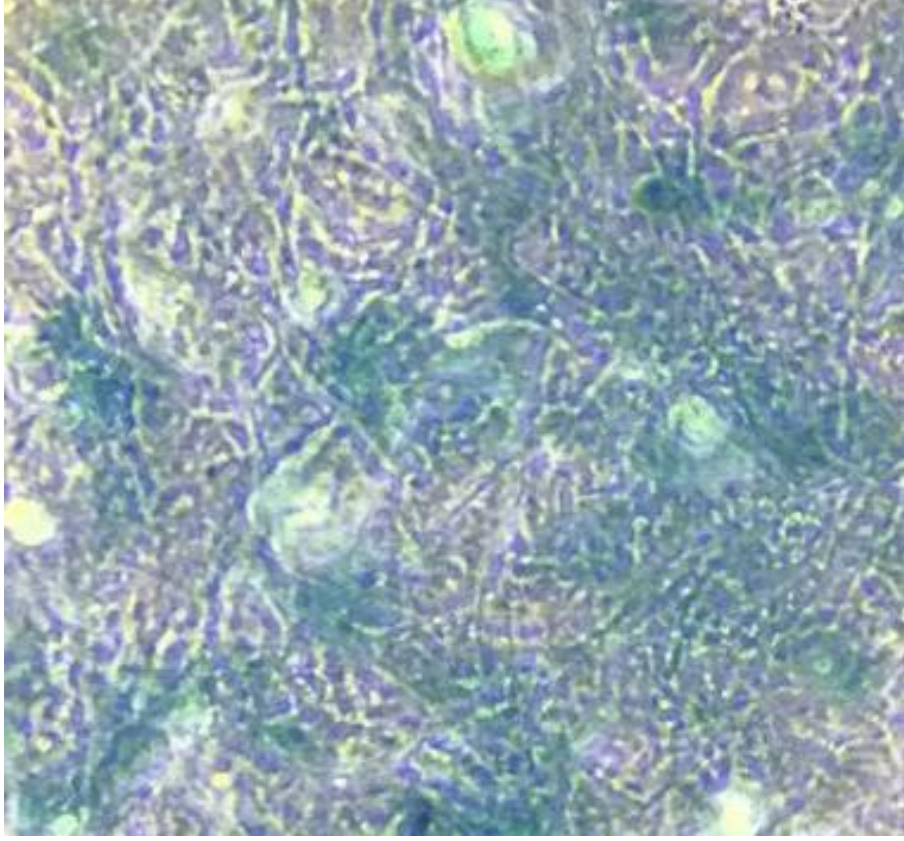
### 2. 3. Yaşlanmış Adiposit Hücrelerinin $\beta$ -Galaktozidaz ile Tespiti

Morfolojik olarak yaşlandığı izlenen adipositlerin  $\beta$ -Galaktozidaz işaretleyicisi ile yaşlandırılmış oldukları saptandı.



**Şekil 2. 4. :** Yaşlandırılmış adiposit hücreleri (40X)

Yaşlandırılmış hücrelerin bulunduğu tabaka PBS solüsyonu ile durulandı. Tabakadaki her 35 mm/kuyu için 1 mL olmak üzere Fiksatif Solüsyonu eklenerek 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plakalar PBS solüsyonu ile iki kez durulandı. Tabakadaki her 35 mm/kuyu için 1 mL  $\beta$ -Galactosidase Staining Solution ( $\beta$ -Galaktozidaz Boyayıcı Solüsyon) eklendi. Plakalar 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.  $\beta$ -Galaktozidaz hala tabakada iken mikroskop altında hücrelerdeki mavi rengin oluşumu izlendi (Şekil 2.5.).



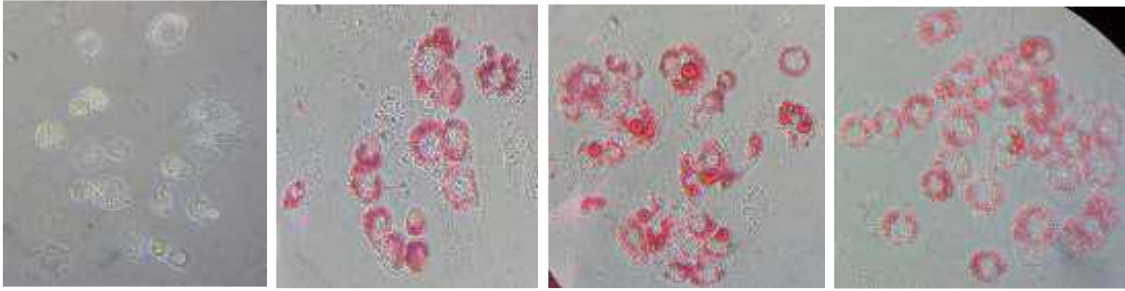
**Şekil 2. 5.:**  $\beta$ -Galaktozidaz işaretleyicisi ile yaşlandırılmış hücrelerin mavi renkli izlenmesi.

#### **2. 4. Adipositlerin Oil Red O Boyama ile Tespiti**

3T3-L1 fibroblast hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine dönüştüğü Oil Red O boyama yöntemi ile tespit edildi. Hücreler %10luk formalin solüsyonunda bir saat bekletildi. Oil Red O stok çözeltisinden % 60'lık Oil Red O çalışma çözeltisi hazırlandı(Şekil 2.6.). Hücreler 5 dakika oda sıcaklığında Oilred O çalışma çözeltisi ile inkübasyona bırakıldı. Yağ damlacıkları kırmızı renkle boyandıktan sonra inverted mikroskopta gözlemlendi (Şekil 2.7.).



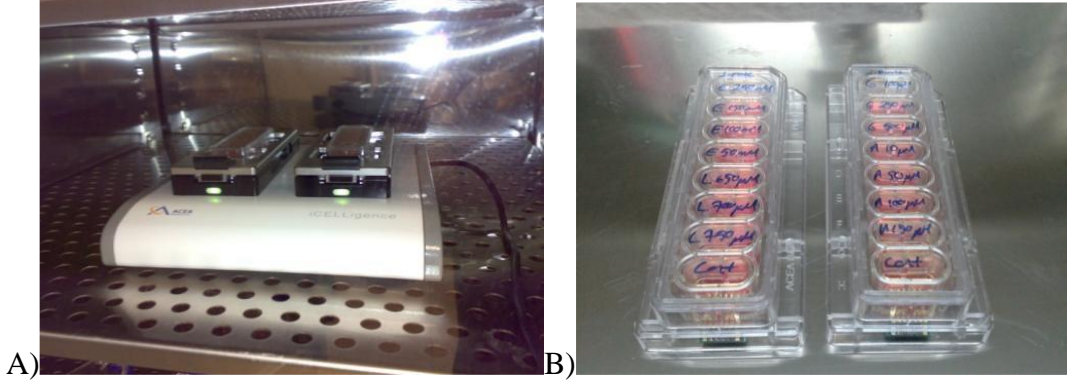
**Şekil 2.6.:** 3T3-L1 adiposit hücrelerinin red oil o ile boyanması



**Şekil 2.7.:** 3T3-L1 adiposit hücrelerindeki yağ damlacıklarının red oil o boyanmış mikroskop (x40) görüntüsü

## **2. 5. Gerçek Zamanlı Hücre Monitorizasyon Sistemi: iCELLigence**

iCELLigence, hücre kültürü ortamında hücrelerin sayıları, morfolojileri ve canlılıkları ile ilişkili olan elektriksel empedansı gerçek zamanlı ölçerek hücresel olayların incelenmesine olanak tanıyan ve oldukça yüksek duyarlılığa sahip bir monitorizasyon sistemidir (Şekil 2.8.) [32, 33].



**Şekil 2.8.:** A) Hücre kültüründe iCELLigence sistemi B) iCELLigence sisteminde e-plakalarda çoğalan adipositler

### 2. 5. 1. iCelligence sistemi ile 3T3-L1 adiposit hücre sayısının optimizasyonu

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 3T3-L1 adiposit hücre sayısı iCELLigence sistemi kullanılarak tespit edildi. Hücre sayısının belirlenmesinin ardından, hücrelerin ekiminden sonra etanol, stearik asit, hidrojen peroksit, linoleik asitin moleküler ve kimyasal etkilerini araştırdığımız madde için muamele saati ve en uygun cevap alınacak hücre indeksi zamanı belirlenmiştir.

3T3-L1 adipositleri flask içinde kültüre edildi. Flask yüzeyinin %75'i kaplayınca hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsinize edilerek zeminden kaldırıldı. Hemositometre ile hücreler sayıldı. Sayılan hücreler sırasıyla kuyucuklarda 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6.300, 3.100 ve 1.600 hücre/mL olacak şekilde besi yeri ile süspanse edilerek ve hücre ekimi gerçekleştirildi. Sistem çalıştırıldıktan sonra 15 dk'lık ölçüm alındı ve çalışma için en uygun hücre sayısına ve madde uygulama saatine karar verildi. Deneyde kullanılan hücrelerin sayısı optimizasyon deneyi sonucunda yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50, *half maximum inhibitory concentration*) değerleri sigmoidal doz cevabı (*Variableslope, Sigmoidal dose-response*) formülü ile hesaplandı.

### 2. 5. 2. iCELLigence sisteminde 3T3-L1 adiposit hücrelerine madde uygulanması

Hücreler iCELLigence plakalarına ekilerek ortama farklı konsantrasyonlarda etanol, hidrojen peroksit, linoleik asit ve stearik asit eklendi. Farklı dozlarda ajanlara

maruz bırakılan hücrelerin yaşam döngüleri belirlenerek maddelerin hangi konsantrasyonda, kaçınıcı saatten itibaren, hangi zaman aralığında etkili olduğu tespit edildi.

## **2. 6. Gen Anlatım Düzeylerinin Belirlenmesi**

3T3-L1 fibroblastları (preadipositler), adiposit hücre soylarının yer aldığı hücre kültürlerindeki hücrelerden total RNA izole edilerek, izolasyonu yapılan total RNA'dan cDNA sentez edilerek RAN gen anlatımı kantitatif olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile (qPZR) LightCycler nano (Roche Diagnostik, Almanya) cihazında belirlendi. Analiz edilen her bir örnek için 2 ayrı deney yapıldı.

### **2. 6. 1. Total RNA izolasyonu**

Total RNA hücrelerden High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Germany) protokolüne uygun izole edildi.

1. Hücreler PBS ile süspanse edildi.
2. Üzerine 200 µl lizis-bağlayıcı tampon (Lysis/-Binding Buffer) eklendi.
3. İyice karıştırıldı.
4. Filtreli tüp, toplatıcı tüpün üzerine konuldu.
5. Eppendorf tüpteki sıvı, filtreli tüpe aktarıldı.
6. 8000 x g' de 15 saniye santrifüj edildi.
7. Toplayıcı tüp sıvı ile birlikte atıldı. Filtreli tüp temiz bir toplayıcı tüpün içine konularak üzerine 90 µl DNase incubation buffer ve 10 µl DNase I eklendi.
8. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. Üzerine 500 µl yıkama tamponu I (*Wash Buffer I*) eklendi ve 8000 x g' de 15 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı. Filtreli tüp toplayıcı tüp ile birleştirildi.
10. Filtreli tüpün içine 500 µl yıkama tamponu II (*Wash Buffer II*) eklendi ve 8000 x g' de 15 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı. Filtreli tüp toplayıcı tüp ile birleştirildi.
11. Filtreli tüpün içine 300 µl yıkama tamponu II (*Wash Buffer II*) eklendi ve 13000 x g' de 2 dakika santrifüj edildi. Toplayıcı tüp sıvı ile birlikte atıldı.

12. RNA içeren filtrelili tüp, 1.5 ml'lik eppendorf tüpün içine konuldu. Önceden ısıtılmış 100 µl süzme tamponu (*Elution Buffer*) filtrelili tüpe eklendi ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. İzole edilen total RNA'lar kullanılana kadar -80°C de saklandı.

### **2. 6. 2. Total RNA'dan cDNA sentezi**

Total RNA'dan cDNA transcriptor HiFi cDNA synthesis kit (Roche) kullanılarak

sentezlendi.

1. 1µg total RNA, 2µl random hexamer primer ve 9µl PCR grade water ile karıştırıldı.
2. Toplam hacim 13 µl olan karışım 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.
3. Üzerine 4 µl transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 0.5 µl protector RNase inhibitor, 2µl deoksinükleotid karışımı ve 0.5 µl transcriptor reverse transcriptase eklenerek toplam hacmi 20 µl olan yeni bir karışım elde edildi.
4. Yeni karışım 250°C'de 10 dakika, 500°C'de 60 dakika ve 850°C'de 5 dakika inkübe edildi.
5. Sentezlenen cDNA'lar -200°C'de analiz yapılana kadar saklandı.

### **2. 6. 3. Kantitatif Polimeraz Zincir (qPZR) Analizi**

Farklı gelişim evrelerindeki adipositlerdeki RAN gen anlatımları kantitatif olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile (qPZR) LightCycler nano (Roche Diagnostik, Almanya) cihazında belirlendi. RAN mRNA'sı, GAPDH mRNA düzeylerine göre normalize edildi. RAN genlerine ait anlatım oranları referans gen olarak kullanılan GAPDH ile oranlanarak hesaplandı. Spesifik gen ürünlerinin varlığı relative quantification analizi ile doğrulandı. Cq değeri 40'ın üzerinde olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi.

## 2. 7. İstatistiksel Analizler

iCELLigence sisteminden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için, istatistiksel analizler iCELLigence sistemi yazılımı kullanılarak yapıldı. iCELLigence sistemi ile yapılan analizlerinde hesaplanan logaritmik yarım maksimum inhibisyon konsantrasyon (IC50) değerleri Sigmoidal dose-response (Variable slope) formülü ile hesaplandı.



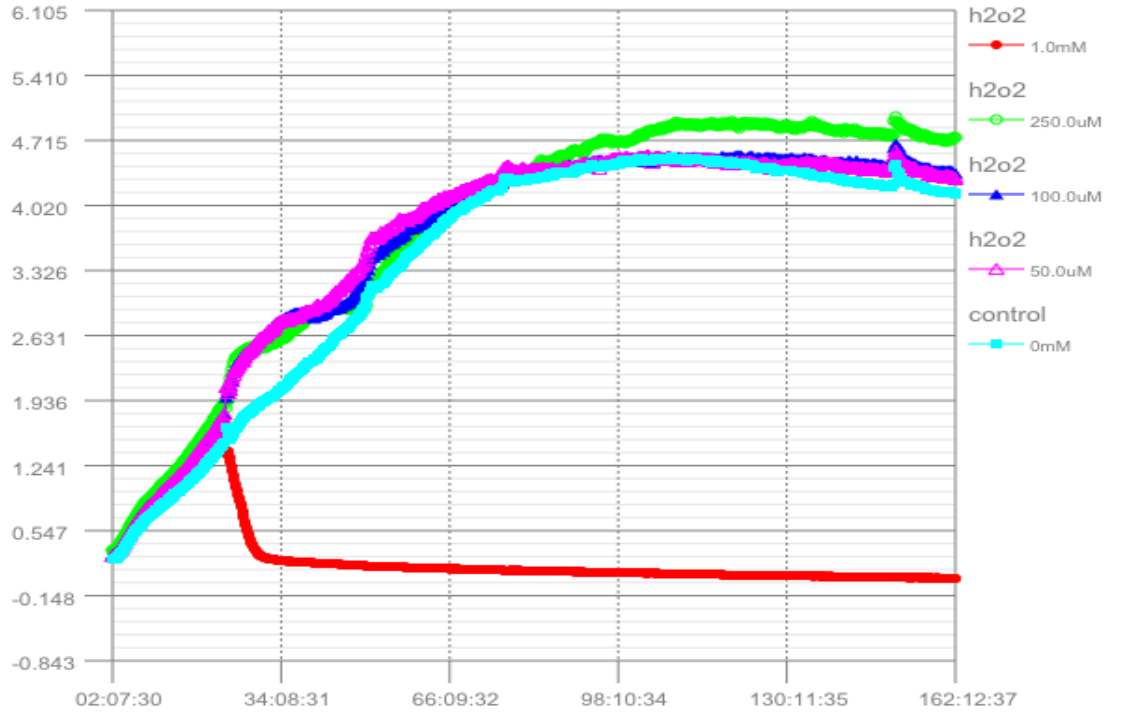
### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

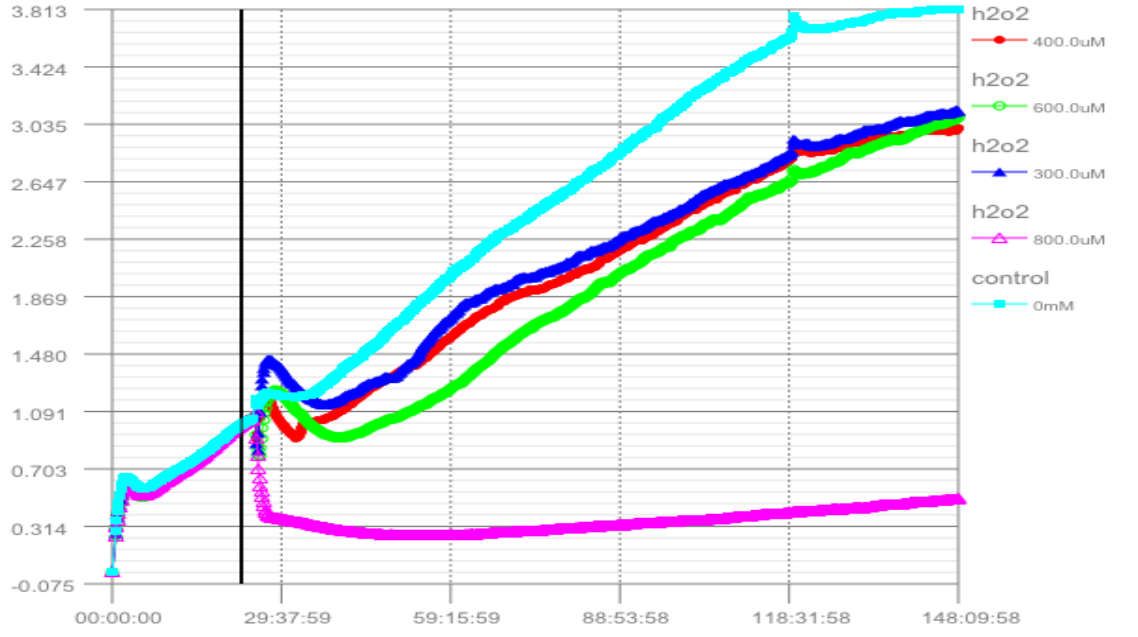
#### 3. 1. Bulgular

##### 3. 1. 1. Hidrojen Peroksitin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

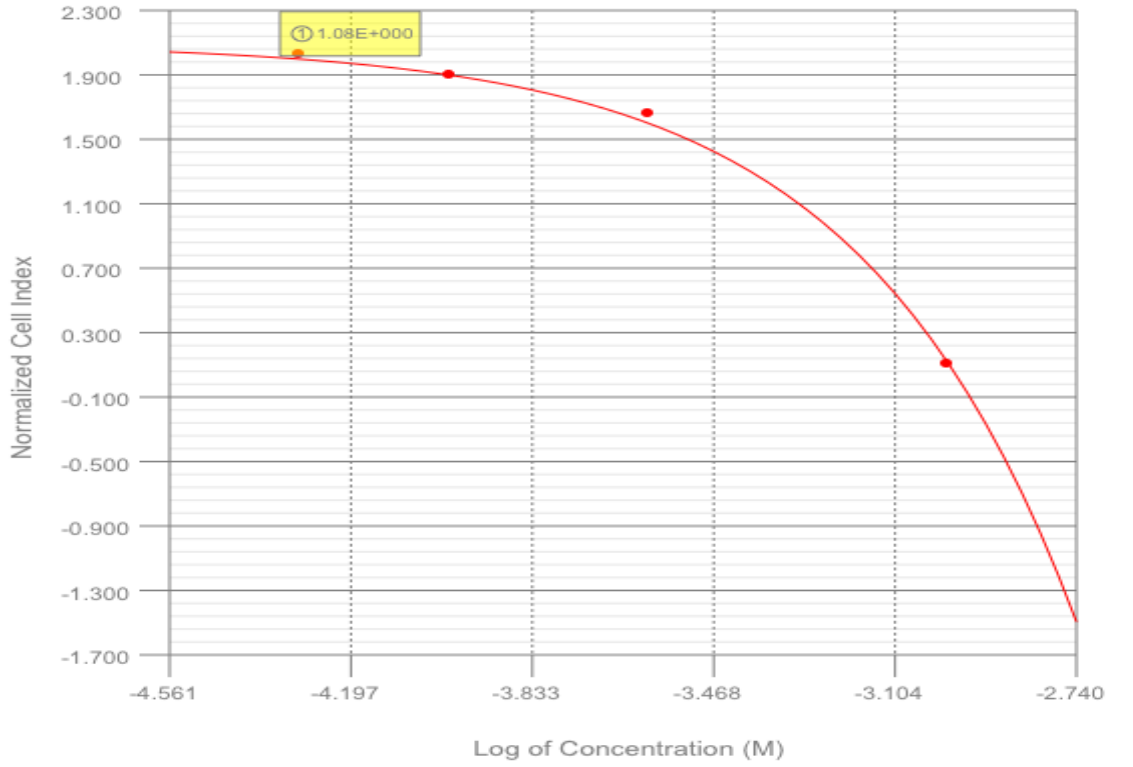
3T3-L1 adipositlerine hidrojen peroksit uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 50, 100, 250, 1.000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eklendi ve 24 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.1.A.). 1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulamasının olgun adipositler üzerinde letal etkisi olduğu tespit edildi. Diğer  $\text{H}_2\text{O}_2$  dozları olgun adiposit çoğalması üzerinde hiç bir etki göstermedi (Şekil 3.1.A.). Sitotoksosite sınır değerlerini tespit etmek amacıyla 300, 400, 600 ve 800  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  hücrelere verildi (Şekil 3.1.B.). 24 saat boyunca 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  muamele edilen hücrelerde hücre çoğalmasının inhibe edildiği saptandı (Şekil 3.1.B.). Hidrojen peroksit için IC50 değeri Şekil 3.1.A.'daki konsantrasyonlar temel alınarak hesaplandı (Şekil 3.1.C.).

A)





B)

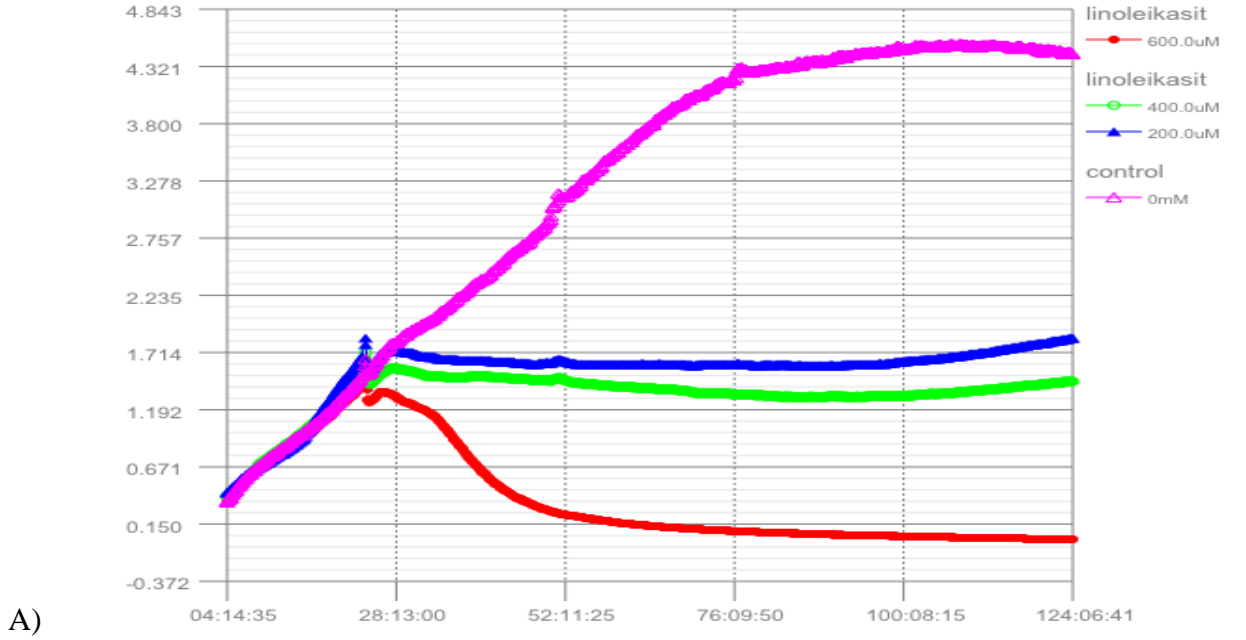


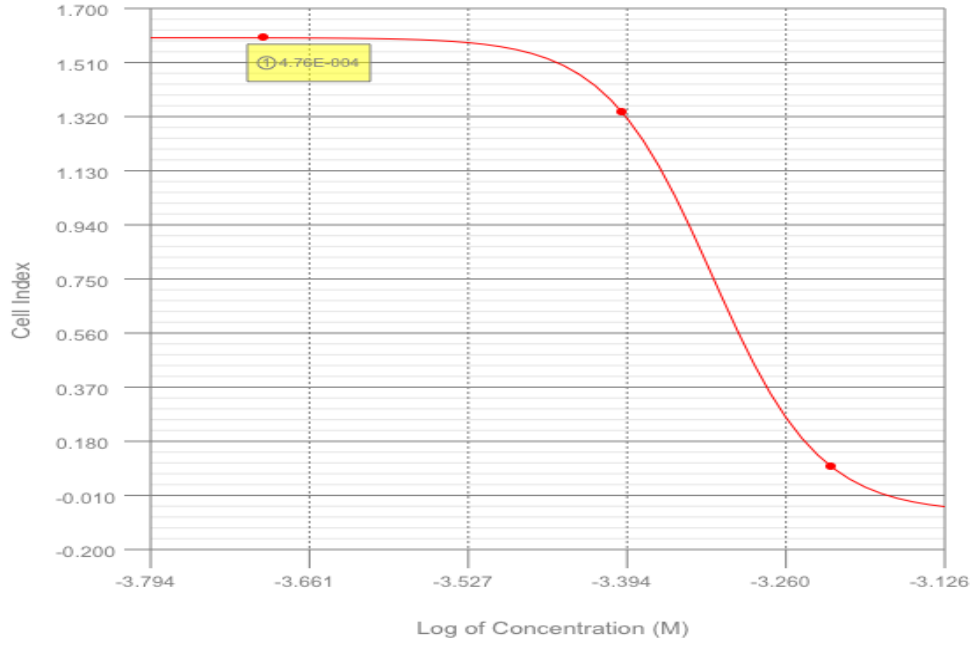
C)

**Şekil 3.1.:** A) Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 250, 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. B) 300, 400, 600, 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. C) 24 saat  $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulaması için  $\text{IC}_{50}$  değeri.

### 3. 1. 2. Linoleik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

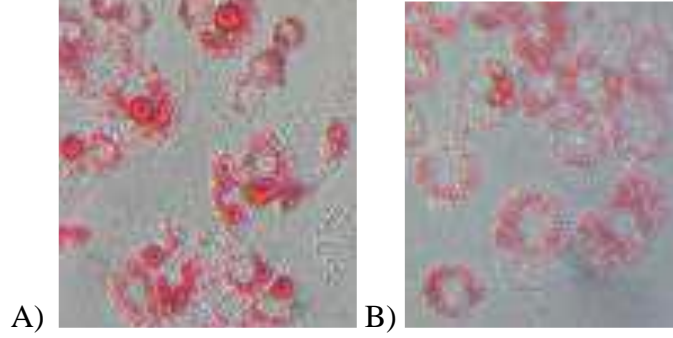
3T3-L1 adipositlerine linoleik asit uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 200, 400, 600  $\mu$ M linoleik asit eklendi ve 24 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.2.A.). 600  $\mu$ M linoleik asidin adipositler üzerinde öldürücü etkisi olduğu tespit edildi. 200 ve 400  $\mu$ M linoleik asidin 3T3-L1 adipositler üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu tespit ettik (Şekil 3.2.A.). 24 saat linoleik asit uygulaması sonucunda IC50 değeri 480  $\mu$ M olarak tespit edildi. (Şekil 3.2.B.).





B)

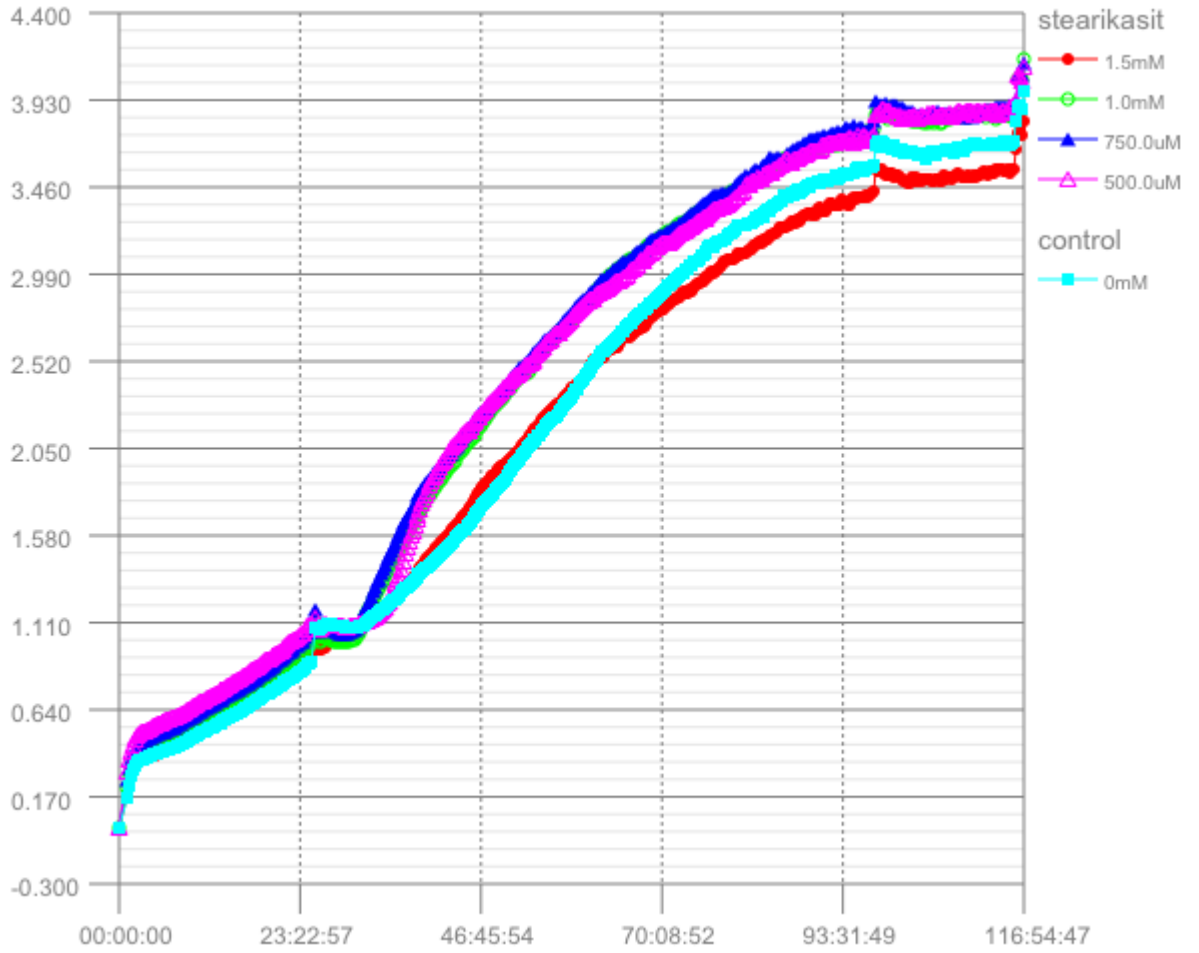
**Şekil 3.2.:** A) Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 200, 400, 600  $\mu$ M linoleik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. B) 48 saat linoleik asit uygulaması için IC50 değeri.



**Şekil 3.3.:** A) Olgun adipositlerdeki yağ damlacıklarının Red Oil O ile izlenmesi. B) Linoleik asit ile muamele sonrası olgun adipositlerdeki yağ damlacıklarının Red Oil O ile azalmış olarak izlenmesi.

### 3. 1. 3. Stearik Asidin 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

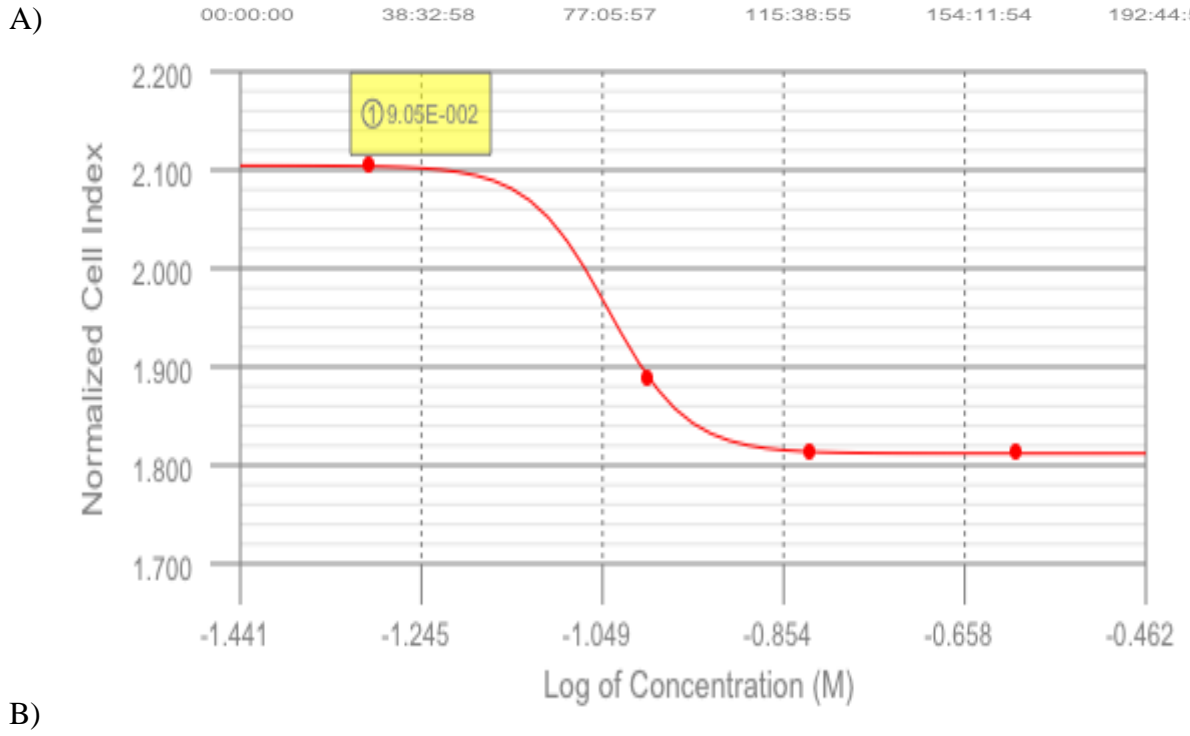
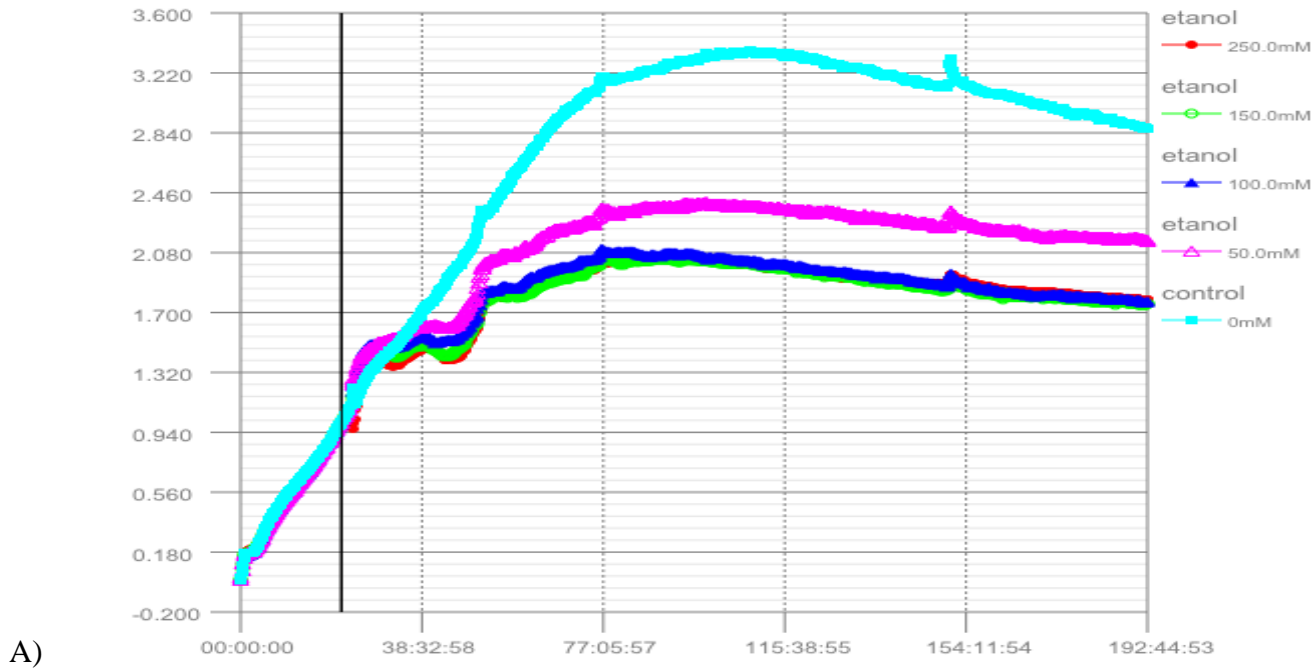
3T3-L1 adipositlerine stearik asit uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 500, 750, 1000, 1500  $\mu$ M stearik asit eklendi ve 24 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.4.). Çalışmada uygulanan bu dozlarda hücrelerin çoğalması üzerine hiç bir etki tespit edilmedi.



**Şekil 3.4.:** Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 500, 750, 1000, 1500  $\mu$ M stearik asit uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması.

### 3. 1. 4. Etanolün 3T3-L1 Adiposit Çoğalması Üzerine Etkileri

3T3-L1 adipositlerine etanol uygulamadan önce hücreler 24 saat standart besi yeri içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü ortamına 250, 150, 100, 50 mM etanol eklendi ve 24 saat boyunca gözlemlendi (Şekil 3.5.A.). Çalışmada uygulanan normalize edilmiş şekli ile dozların proliferasyonu inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.5.A.). 24 saat etanol uygulaması sonucunda IC50 değeri 90 mM olarak tespit edildi (Şekil 3.5.B.).



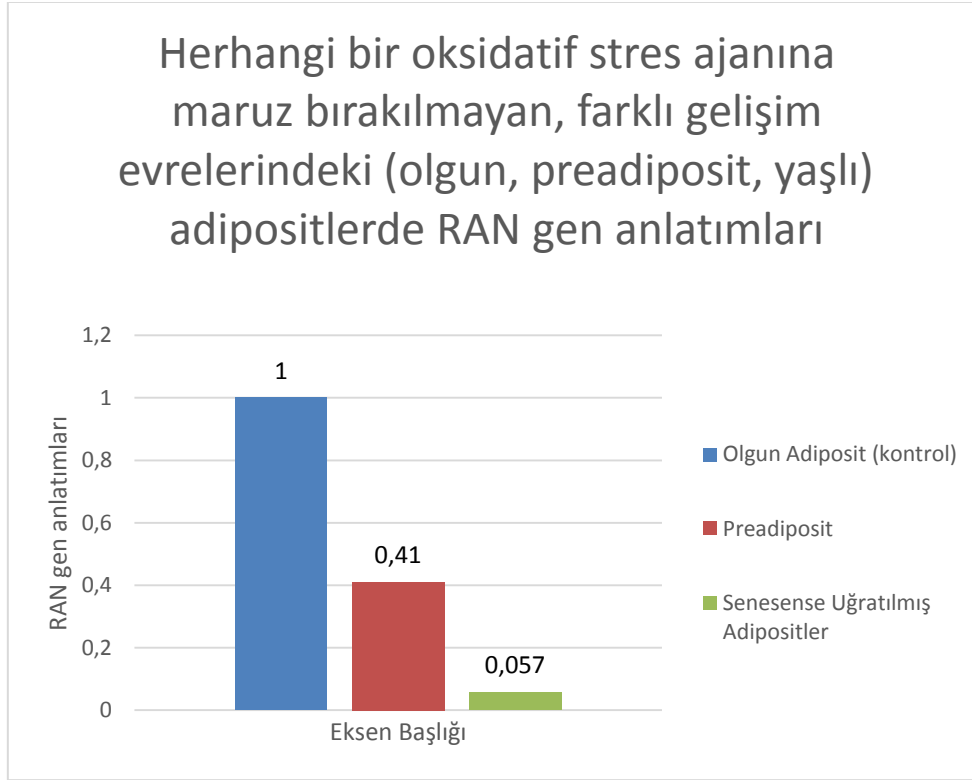
**Şekil 3.5.:** A) Zaman eğrileri normalleştirilmiş hücre indeksi. 50, 100, 150, 250 mM etanol uygulanması sonucunda 3T3-L1 adiposit çoğalmasının karşılaştırılması. B) 48 saat etanol uygulaması için IC50 değeri.

### 3. 1. 5. Olgun Adipositlerde Farklı Koşullar Altında RAN Gen Anlatım Seviyeleri

3T3-L1 adipositlerine etanol, stearik asit, linoleik asit ve farklı konsantrasyonlarda 4, 5 ve 24 saat uygulanan hidrojen peroksitin RAN gen anlatım düzeyleri, herhangi bir oksidatif stres ajanına maruz bırakılmamış adipositlerle kıyaslanarak karşılaştırıldı.

#### 3. 1. 5. 1. Farklı Gelişim Evrelerindeki Adipositlerin RAN Gen Anlatım Seviyeleri

Preadiposit, adiposit ve yaşlandırılmış adipositlerin RAN gen ifadeleri ölçüldü (Şekil 3.6.).

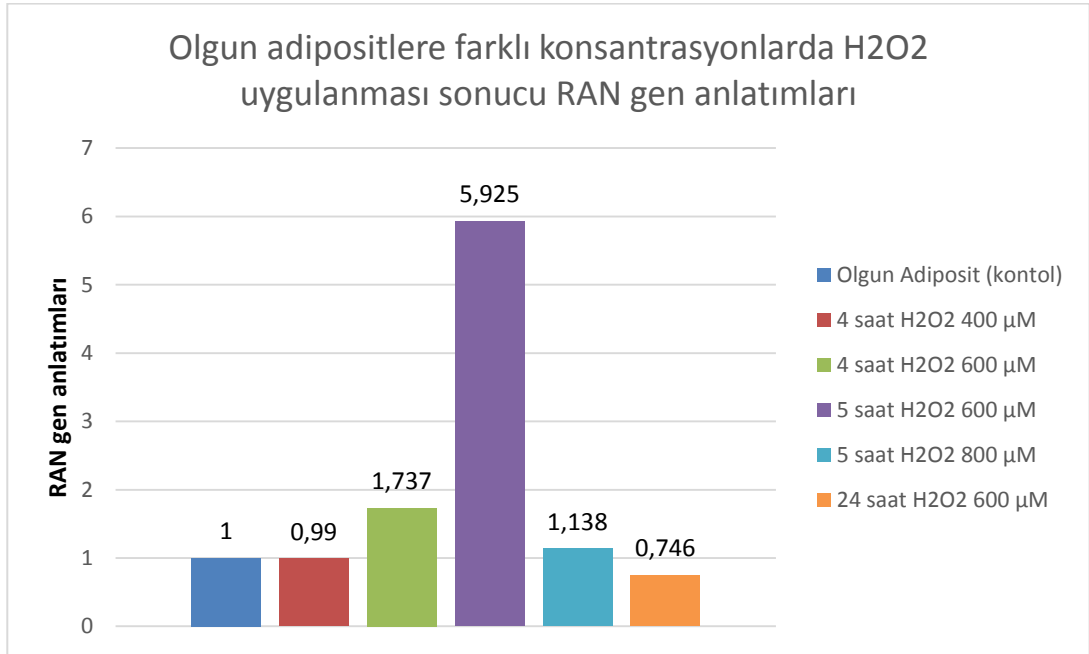


**Şekil 3.6.:** Preadiposit hücrelerde RAN gen anlatım seviyesi kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında 0.41 kat, senesense uğratılmış adiposit hücrelerinde ise 0.057 kat azaldığı tespit edildi.

### 3. 1. 5. 2. Olgun Adipositlere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri

Olgun adipositlere farklı konsantrasyonlarda ve 4, 5, 24 saat sürelerinde uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in, hücrelerdeki RAN gen anlatım seviyeleri belirlendi.

4 saat 400 µM hidrojen peroksit uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında madde uygulanan hücrelerde RAN gen anlatım seviyesinin hemen hemen aynı kaldığı; 600 µM hidrojen peroksit uygulanan hücrelerde 1.737 kat arttığı tespit edildi (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7.: Olgun adipositlere farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması sonucu RAN gen anlatımları

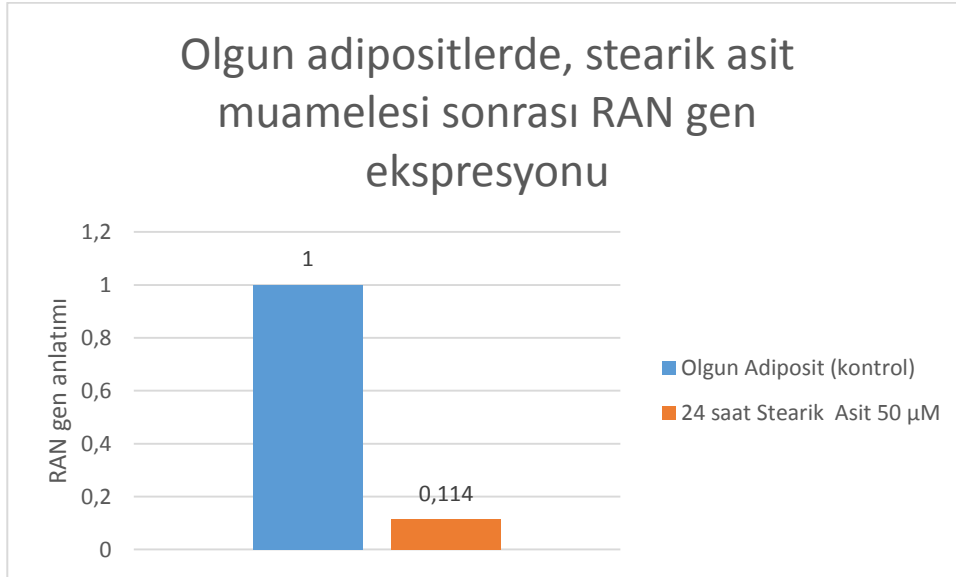
24 saat 600 µM hidrojen peroksit uygulanan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında madde uygulanan hücrelerde RAN gen anlatım seviyesinin 0.746 kat azaldığı tespit edildi (Şekil 3.7.).

### 3. 1. 5. 3. Olgun Adipositlere Linoleik Asit Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri

24 saatlik 480  $\mu$ M linolik asit uygulanan olgun adipositlerde RAN gen anlatımı izlenmedi. Üç kez tekrar edilen çalışma sonucunda olgun adipositlere 24 saatlik 480  $\mu$ M linolik asit muamelesinin RAN gen anlatımını susturduğu düşünüldü.

### 3. 1. 5. 4. Olgun Adipositlere Stearik Asit Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri

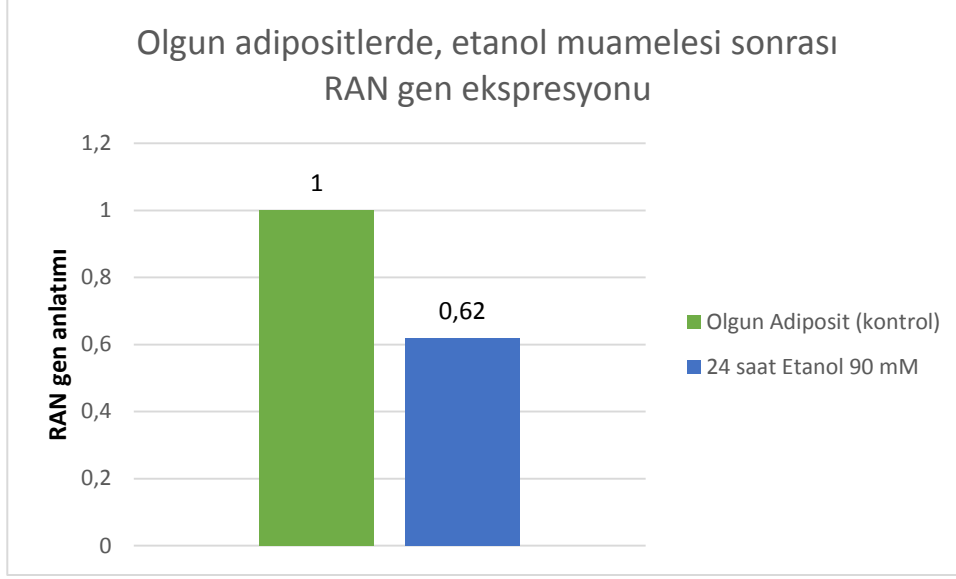
24 saat 500  $\mu$ M stearik asite maruz bırakılan olgun adipositlerde RAN gen anlatımının, kontrol grubuna kıyasla 0.114 kat azaldığı saptandı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8.: Olgun adipositlerde, 24 saatlik 50  $\mu$ M stearik asit muamelesi sonrası RAN gen ekspresyon seviyesi

### 3. 1. 5. 5. Olgun Adipositlere Etanol Uygulanması Sonucu RAN Gen Anlatım Seviyeleri

24 saat 90 mM etanol ile muamele edilen olgun adipositlerde RAN gen ifadesinin 0.62 oranında azaldığı izlendi (Şekil 3.9.).

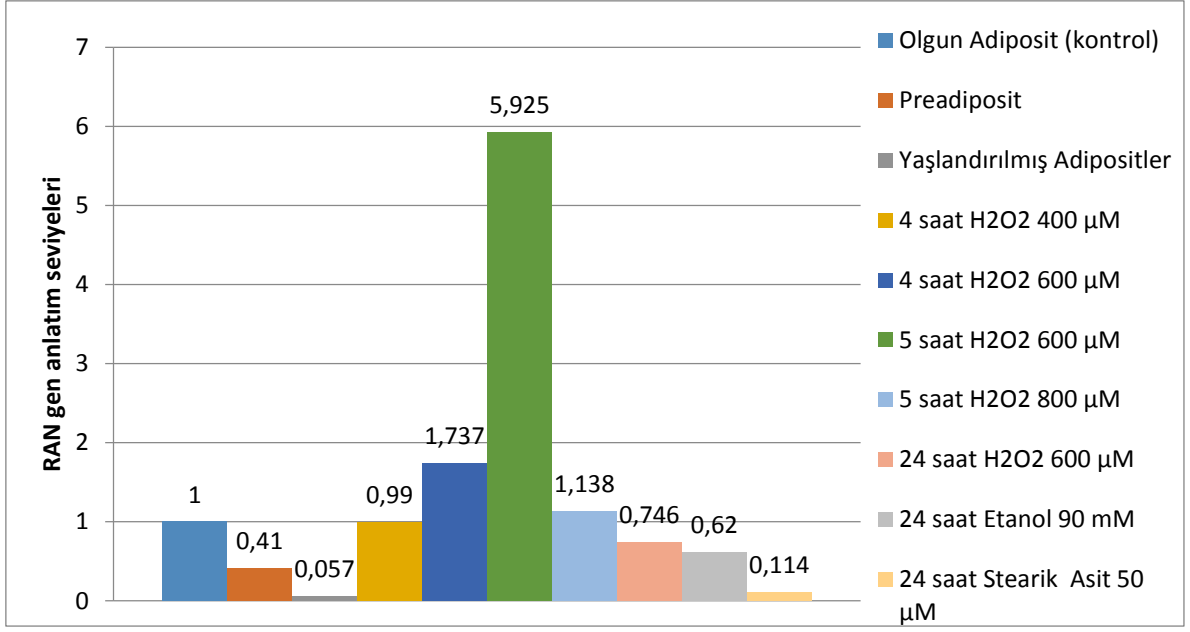


**Şekil 3.9.:** Olgun adipositlerde, 24 saat 90 mM etanol ile muamele sonrası RAN gen ifadesi.

### 3. 2. Tartışma

Farklı gelişim evrelerindeki adipositlerde (preadiposit, olgun adiposit ve yaşlandırılmış adiposit) RAN gen anlatımları farklı oranlarda izlendi. Preadiposit RAN gen ifadesi kontrol grubuna kıyasla da yaklaşık yarı seviyesinde daha düşük saptanırken, yaşlandırılmış adipositlerde bu ifade yok denecek kadar az olarak saptandı (Şekil 3.10.).

RAN gen anlatımı 4 ve 5 saat hidrojen peroksit uygulaması sonrası artarken; stearik asit, etanol ve 24 saat hidrojen peroksit uygulaması sonrası azalmıştır. Linoleik asit deneylerinde 3 kez tekrarlanan çalışmalarda RAN geni anlatımının izlenmemiş olması sonucu Linoleik asitin RAN gen anlatımı üzerinde susturucu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e 4 saat maruz kalan adipositlerde RAN geni anlatımı kontrol hücrelere kıyasla 2 kat artarken, aynı dozda 5 saat muamelenin gen anlatımını 6 kata yakın arttırdığı gözlenmiştir; etanolün ise olgun adiposit hücrelerinde RAN geni ifadesini azalttığı izlenmiştir (Şekil 3.10.).



**Şekil 3.10.:** Farklı gelişim evrelerindeki ve farklı oksidatif stres faktörleri uygulanmış olan olgun adipositlerdeki, qPZR ile saptanan RAN gen anlatım seviyeleri.

Hidrojen peroksit oksidatif stres ajanlarının arasında sulu ve lipid ortamların varlığında çözünürlüğü ve yarı ömrünün uzun olması gibi biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bu nedenle eksojen oksidatif stres modeli tasarlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [34, 35]. Gardner A. ve ark. L929 fibroblastları ve CAL-27 insan skuamöz hücreleri ile yaptıkları çalışmalarında geniş konsantrasyon aralıklarında hidrojen peroksit uygulamasının sitotoksikite üzerine etkilerini araştırmışlardır [36]. Bu araştırmacılar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 10 mM'ın üzerindeki yüksek konsantrasyonlarda nekroz yoluya hücre ölümüne, 10 ve 5 mM hidrojen peroksit uygulamalarının endonükleozomal DNA parçalanmaları ile eş zamanlı olarak sitotoksikite ve apoptoza sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Hidrojen peroksitin 24 ve 48 saat 0,5 ve 0,1 mM'lık uygulamalarının sitotoksik etki gösterdiğini ancak apoptoz ya da nekroza sebep olmadığını rapor etmişlerdir. Hidrojen peroksitin 0,1 mM altında olan konsantrasyonlarda ise 48 saatlik uygulama sonrasında herhangi bir etkisini kaydetmemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışma sonucu elde ettikleri verilere dayanarak, hidrojen peroksit kaynaklı sitotoksik etkilerin konsantrasyona bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini rapor etmişlerdir [37]. Bizde çalışmamızda 3T3-L1 adipositlerinde 50, 100 ve 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in geniş zaman aralığında hücre proliferasyonuna herhangi bir etkisi olmadığını;

300, 400 ve 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulamasında dozlarla paralel olarak antiproliferatif, 800 ve 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulamasında ise letal etkisi olduğunu saptadık.

Esansiyel yağ asitlerinden biri olan linoleik asit [38] ile yapılan çalışmalar daha çok konjuge linoleik asitin (KLA) adipositlerdeki proliferatif ve apoptoz üzerindeki etkileri üzerine olmuştur. Konjuge linoleik asit, çalışmada kullandığımız linoleik asitin (cis-9,cis-12 oktadekadienoik asit) pozisyonel ve geometrik izomerleri için verilen genel addır. Beyaz adipoz doku, KLA izomerlerin depolanmasında tercih edilen bir depo organ olduğundan çalışmalarda kullanılması tercih edilmektedir [39]. Yapılan birçok çalışmada KLA'nın vücut kütle oranını (BMR) ya da termogenezi azaltması yoluyla enerji harcanımını artırarak yağlanmayı azalttığını rapor etmektedir [40-43]. Hayvan, [44] insan [45] ve in vitro [46] çalışmalardan elde edilen verilerde KLA'nın vücutta olan etkilerinin izomer spesifik olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde West D.B ve ark. farelerde KLA'nın enerji alımı üzerinde etkili olabileceğini [47], ancak insanla yaptıkları çalışmalarında belirgin bir etkisini saptamadıklarını rapor etmişlerdir [48, 49]. Park Y. ve ark.'ları linoleik asidin C9T11 KLA izomerinin farelerin gelişimi sırasında kilo alımını artırdığını ancak vücuttaki yağ miktarı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. [44]. Park Y. ve ark.'ları söz konusu linoleik asit izomeri T10c12 olduğunda ise, büyüme üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını ve vücut yağ kütlelerini azalttığını rapor edilmiştir [44]. Benzer olarak linoleik asidin 10,12 KLA izomeri uygulamasının lipogenezi ve adipogenezi azalttığına dair birçok çalışma mevcuttur [50-55]. Churrua I. ve ark. [56] farklı KLA izomerlerinin kanser, yağlanma, ateroskleroz, insülin direnci ve immün sistem üzerine olan etkilerinin birbirinden farklı olduğunu saptamışlardır. Riserus U. ve ark. [57] yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri bulgulara göre diyetle alınan KLA'nın vücut yağlanmasını azalttığını tespit etmişler ve 4 hafta boyunca KLA uygulamasına maruz bırakılan metabolik sendromlu obez erkeklerde abdominal yağlanmada azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar KLA kullanımı ile yağ kütlelerindeki hızlı azalmanın, beklenmedik bir şekilde lipodistrofi ile ilişkili olan insülin direnci ve hepatomegaliye sebep olduğunu göstermektedir [58,59]. Aynı zamanda Delany J.P. ve ark.'nın farelerle yaptıkları bir çalışmada KLA'nın vücut yağlanmasını azalttığını ancak hiperinsülinemi ve karaciğerde genişlemeye sebep olduğunu belirtmişlerdir [60]. Kasaoka N.T. ve ark. yaptıkları çalışmada düşük yağlı bir diyetle KLA alımının lipodistrofiyi uyardığını rapor

etmişlerdir [61]. Aynı araştırmacılar KLA kaynaklı adiposit apoptozunun TNF'nin belirgin artışı aracılığıyla gerçekleştiğini ve beyaz ile kahverengi adipoz dokularda azalma, karaciğerde yağ birikimi ve insulin direnci gibi etkilerin lipodistrofinin fenotipik karakteristikleri olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir [62]. Shen W. ve ark. alışmalarında KLA'nın 10,12 ve 9,11 izomerlerinin yüksek seviyelerinin büyümekte olan farelerde adipoziteyi güçlü bir şekilde azalttığını ve bu azalmanın besin azlığından kaynaklanmadığını rapor etmişlerdir [62]. Ancak aynı araştırmacılar linoleik asidin 10,12 KLA izomerinin yüksek dozlarının steatoza sebep olduğunu, KLA alımının serumdaki insulin seviyelerini azalttığını ya da insulin direncine yol açtığını bildirmişlerdir [62]. Ayrıca insulin direnci de dahil olmak üzere metabolik hastalıklara karşı koruyucu etkileri bulunan M2 makrofajları belirteçlerinin yüksek doz KLA uygulamasına cevap olarak gen anlatım seviyelerini de yüksek bulmuşlardır [62]. Akter S.H. ve ark. süt ineklerinde yaptıkları çalışmalarında KLA uygulaması sonucu adipoz dokudaki adiposit çapındaki küçülmenin KLA'nın lipolitik, antilipogenik ya da her iki etkiye işaret edebileceğini rapor etmişlerdir [63]. Parra P. ve ark. [64] farelerle yaptıkları çalışma sonucunda KLA izomerlerinin (cis-9, trans-11 ve trans-10, cis-12, yarı yarıya karışım halinde verilmiş) yağlanmayı azalttığını rapor etmişlerdir [63].

Schaffler A. ve ark. [65] yaptıkları çalışmada 3T3-L1 adipositlerine 24 saat 10  $\mu\text{M}$ 'lık stearik asit uygulaması adipositlerden adiponektin salımını yaklaşık 2 kat arttırken, 24 saat 100  $\mu\text{M}$  stearik asit uygulamasında bu artışın yaklaşık 3 kat olduğunu saptamıştır. Adiponektinin vücut yağ oranı ile negatif korelasyon içinde olduğu, yağların oksidasyonuna sebep olduğu, apoptotik süreçlerde önemli rol alan TNF'yi baskılayıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir [66]. Furukawa S. ve ark. [67] hücre kültürü çalışmalarında oksidatif stres gibi stres koşullarının adiponektin salımını baskıladığını rapor etmişlerdir. Dolayısıyla yağlanma sonucu ortaya çıkabilen stres koşulları ile adiponektin salımını arasında negatif bir korelasyon olduğu açıktır.

Etanol mitojenik büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunun baskılanması, glutatyon azalması, DNA hasarı ve endoplazmik retikulum stresi yoluyla apoptozu uyarır [68-72]. Kronik alkol alımı sitokinler, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi hücrelerde çeşitli stres koşullarını tetiklediği bilinen inflamatuvar moleküllerin artışı ile karakterizedir [73]. Etanol uygulaması reaktif oksijen türlerinin üretimini ve apoptozu uyardığına dair birçok çalışma bulunmaktadır [74-76]. Chen X. ve ark.'nın [73]

sıçanlarda diyetle kronik olarak etanol alımının adiponektin gen anlatımları ve salınımları üzerine olan etkileri araştırdıkları çalışmalarında, 4 hafta boyunca kronik etanol alımının subkutan adipoz dokuda adiponektin mRNA sentezinde azalmaya sebep olduğunu ancak adiponektin protein seviyeleri üzerine etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Aynı zamanda izole edilmiş retroperitoneal ve subkütanoz adipositlerde adiponektin salınımında da azalma kaydetmişlerdir. Sonuç olarak kronik etanol alımı sonucu subkütanoz ve retroperitoneal adipositlerden adiponektin salınımı bozulduğunu ve bu bozulma sonucu adiponektin konsantrasyonlarında azalmaya sebep olabileceğini vurgulamışlardır [73]. Higuchi H. ve ark. sıçan hepatositleriyle yaptıkları kültür çalışmalarında besiyerine ekledikleri 4 saat 50 mmol/L uygulamasının birçok hepatosit hücresinde DNA fragmentasyonuna sebep olduğunu rapor etmişlerdir [77].

#### 4. SONUÇLAR

Yaptığımız literatür taramalarına göre, hücrede glikoz homeostazının bozulması sonucu gelişen insülin direncinin, adiposit hücrelerinde yağ metabolizmasının bozulmasına sebep olduğunu biliyoruz[78].

Preadiposit, olgun adiposit ve yaşlandırılmış adipositlerdeki RAN gen anlatımlarının ölçülmesinde; preadipositlerde RAN gen anlatım seviyesinin, oksidatif stres faktörlerine maruz bırakılmamış olgun adipositlerden oluşan kontrol grubuna kıyasla yaklaşık yarı seviyesinde saptanması glikoz homeostazına bağlı insülin direncinin daha az izleneceğini düşündürdü. Bu düşünce de preadipositlerde insülin direncine bağlı yağlanmaya olgun adipositlere kıyasla daha az rastlanacağını düşündürdü. Yaşlandırılmış adipositlerde ise kontrol grubuna kıyasla RAN gen anlatımının yok denecek kadar az izlenmesi, bize bu hücrelerde glikoz homeostazına bağlı insülin direnci gelişmesinin daha az olabileceğini veya insülin direncine karşı hücrenin savunma mekanizmasının yeterince işleyemediğini düşündürdü.

Çalışmamızda 5 saat 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulamasının hücrede glikoz homeostazını bozarak insülin direncini arttırdığı ve hücrenin yükselen insülin direncine karşın RAN gen anlatımını yaklaşık altı katına kadar yükselttiğini ve bu sayede durumu dengelediği düşünüldü.

4 saat 600  $\mu\text{M}$  ve 5 saat 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulanmış hücrelerde RAN geni anlatımının artmış olması glikoz homeostazının düzenlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

24 saat 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 90 mM etanol ve 50  $\mu\text{M}$  stearik asit uygulanması hücrelerde glikoz homeostazını dengeleyici olarak etki ederek RAN gen anlatımının azalmasına sebep olmuştur.

Yaptığımız literatür taramalarında karşımıza çıkan çalışmaların çoğunda linoleik asit uygulanmış hücrelerde yağlanmanın azaldığı izlenmiş olup, çalışmamızda hücre kültüründe linoleik asit ile muamele edilen hücrelerdeki yağ asitlerinin herhangi bir ajana maruz kalmayan adipositlere oranla, azalmış olarak izlenmesi ve linoleik asit uygulanmış hücrelerde RAN gen ifadesinin gözlenmemiş olması, linoleik asidin insülin

direncini baskıladığı ve hücresele boyutta yağlanmanın azalmasına sebep olduğunu düşündürdü. Farklı deneylerle bu sitotoksik ajanın hangi evrede ve hangi nedenlerle gen anlatımını susturduğunun ortaya konması gerekliliğini oluşturmuştur.

## KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Erişim tarihi: 04.01.2016. Erişim adresi: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>
2. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*; 313(5790): 1137-1140.
3. Cinti S, Cigolini M, Bosello O, and Björntorp P. (1984) A morphological study of the adipocyte precursor. *J. Submicrosc. Cytol.* 16, 243–251.
4. Guyton A C, Hall J E. (2001) *Textbook of Medical Physiology*. İstanbul, Nobel Kitapevi, 797-800.
5. Sengier A. (2005) Multifactorial etiology of obesity: nutritional and central aspects. *Rev Med Brux*, 26: 211-214.
6. Wangensteen T, Undlien D, Tonstad S, Retterstol L. (2005) Genetic causes of obesity. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 125: 3090-3093.
7. [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)
8. Irigaray P., Newby J.A., Lacomme S., et al (2007) Overweight/Obesity And Cancer Genesis: More Than A Biological Link, *Biomed. Pharmacother*, 61, 665-678.
9. Koerner A., Kratzsch J., Kiess W., (2005) Adipocytokines: Leptin—The Classical, Resistin—The Controversial, Adiponectin—The Promising, And More To Come, *Best Pract Res Clin Endocrin Met*, 19(4), 525-546.
10. Harvey A.E., Lashinger L.M., Hursting S.D., (2011) The Growing Challenge Of ObesityAndCancer: An İnflammatory Issue, *Ann N Y Acad Sci.*, 1229, 45-52.
11. Trujillo M.E., Scherer P.E., (2006) Adipose Tissue-Derived Factors: Impact On HealthAndDisease, *Endocrine Reviews*, 27(7), 762-778.
12. Drivas G T, Shih A, Coutavas E, Rush M G, D'Eustachio P. (1990) Characterization of four novel Ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line, *Mol. Cell. Biol.*, 10 1793–1798.
13. Ren M, Drivas G, D'Eustachio P, Rush M G. (1993) Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis, *J. Cell Biol.*, 120 313–323.
14. [http://v4.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAN#genomic\\_location](http://v4.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RAN#genomic_location)
15. <http://www.ahmetgnc.com/wp-content/uploads/2012/03/ras-semineri.pdf>
16. Clarke P R, Zhang C. (2008) Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9 464–477.
17. Nagai M, Yoneda Y. (2012) The small GTPase Ran and Ran-binding proteins, *Biomol. Concepts*, 3 307–318.

18. Bischoff F R, Ponstingl H. (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1, *Nature*, 354 80–82.
19. Bischoff F R, Krebber H, Kempf T, Hermes I, Ponstingl H. (1995) Human RanGTPaseactivating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 1749–1753.
20. Coutavas E, Ren M, Oppenheim J D, D'Eustachio P, Rush M G. (1993) Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4, *Nature*, 366 585–587.
21. Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Panté N, Ohba T, Nishii K, Kuma K, Hayashida T, Miyata T, Aebi U, Fukui M, Nishimoto T. (1993) A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4, *Nature*, 376 184–188.
22. Sazer S, Dasso M. April (2000) "The ran decathlon: multiple roles of Ran". *J. Cell. Sci.* 113 (7), 1111–8. [PMID 10704362](#)
23. Nemergut, Michael E; Lindsay Mark E; Brownawell Amy M; Macara Ian G. (May 2002) "Ran-binding protein 3 links Crm1 to the Ran guanine nucleotide exchange factor". *J. Biol. Chem. (United States)* 277 (20): 17385–8. [doi: 10.1074/jbc.C100620200](#). [ISSN 0021-9258](#). [PMID 11932251](#).
24. Moore M S, and Blobel G. (1992) The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell*, 69, 939-950.
25. Moore M S, and Blobel G. (1993) The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365, 661-663.
26. Feng Y, Huoming Z, Yi-Xuan Y, et al. (2011) “Comparative Proteome Analysis of 3T3-L1 Adipocyte. Differentiation Using iTRAQ-Coupled 2D LC-MS/MS, *Journal of Cellular Biochemistry*, 112 3002–3014.
27. [Kanno Y](#), [Miyazaki Y](#), [Inouye Y](#). August (2010) The nuclear import of the constitutive androstane receptor by importin/Ran-GTP systems. [Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\) - Molecular Cell Research](#), [Volume 1803](#), [Issue 8](#), Pages 968–974.
28. [https://en.wikipedia.org/wiki/Ran\\_\(gene\)#/media/File:RanGTPcycle.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Ran_(gene)#/media/File:RanGTPcycle.png)
29. [Doherty KJ](#), [McKay C](#), [Chan KK](#), [El-Tanani MK](#). (2011) RAN GTPase as a target for cancer therapy: Ran binding proteins. [Curr Mol Med.](#) ;11(8):686-95.
30. Back SU, Kaufman RJ, (2012) US Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes, [US National Library of Medicine National Institutes of Health](#)
31. Miard, S., Dombrowski, L., Carter, S., Boivin, L., Picard, F. (2009) Aging alters PPARgamma in rodent and human adipose tissue by modulating the balance in steroid receptor coactivator-1. *Aging Cell*, 8(4), 449-459.

32. Nicola, F., Federica, P., Chiara R., Giuseppe, M., and Alberto, C., (2015) Aliskiren inhibits prorenin-induced human aortic smooth muscle cell migration. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*, 16(2), 284–291.
33. Pan,T., Huang, B., Zhang, W., Gabos, S., Huang, D.Y., Devendran, V. (2013) Cytotoxicity assessment based on the AUC50 using multi-concentration timedependent cellular response curves. *Analytica Chimica Acta*, 764: 44-52.
34. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47–95.
35. Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A.M. (2007) Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 49–89.
36. Gardner, A.M., Xu F.H., Fady, C., Jacoby, F.J., Duffey, D.C., Tu, Y., Lichtenstein, A. (1997) Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 73–83.
37. Agnes M. Gardner, Feng-hao Xu, Catherine Fady, Fred J. Jacoby, DianneC. Duffey, Yiping Tu, Alan Lichtenstein. (1997) *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 73–83.
38. The Merck Index, 12th ed., Entry# 5529.
39. Andreoli, M.F, Illesca P.G., Gonzalez, M.A., Bernal, C.A. (2010) Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis and restores liver triacylglycerol secretion and the fatty acid profile during protein repletion in rats. *Lipids*. 45, 1035 – 1045.
40. West, D.B., Blohm, F., Truett, A., DeLany, J. (2000). Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *Journal of Nutrition*, 130, 2471 – 2477.
41. Terpstra, A.H., Beynen, A., Everts, H., Kocsis, S., Katan, M., Zock, P. (2002). The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *Journal of Nutrition*, 132, 940 – 945.
42. Terpstra, A.H., Javadi, M., Beynen, A., Kocsis,S., Lankhorst, A., Lemmens, A., Mohede, I. (2003) Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. *Journal of Nutrition*, 133, 3181 – 3186.
43. Ohnuki, K., Haramizu, S., Oki, K., Ishihara, K., Fushiki, T. (2001). A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids*. 36, 583 – 587.
44. Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W. (1999). Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34:235–41.

45. Malpuech-Brugère, C., Verboeket-van de Venne, W.P., Mensink, R.P., Arnal, M.A., Morio, B., Brandolini, M., Saebo, A., Lassel, T.S., Chardigny, J.M., Sébédio, J.L., Beaufrère, B. (2004) Effects of two conjugated linoleic Acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obesity Research*, 12(4), 591-8.
46. Brown, J.M., Halvorsen, Y.D., Lea-Currie, Y.R., Geigerman, C., McIntosh, M. (2001) Trans-10,cis-12, but not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *Journal of Nutrition*, 131:2316–21.
47. West, D.B., Delany, J.P., Camet, P.M., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J (1998) Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *American Journal of Physiology*, 275(3), 667–72.
48. Zambell, K.L., Keim, N.L., Van Loan, M.D., Gale, B., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids*, 35, 777–82.
49. Medina, E.A., Horn, W.F., Keim, N.L., Havel, P.J., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J., Erickson, K.L. (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids*, 35, 783–8.
50. House, R.L., Cassady, J.P., Eisen, E.J., Eling, T.E., Collins, J.B., Grissom, S.F., Odle, J. (2005) Functional genomic characterization of delipidation elicited by trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice. *Physiological Genomics*, 21, 351–61.
51. Kang, K., Liu, W., Albright, K.J., Park, Y., Pariza, M.W. (2003) Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303,795–9.
52. Brown J. M., Boysen, M.S., Jensen, S.S., Morrison, R.F., Storkson, J., Lea-Currie, R., Pariza, M., Mandrup, S., McIntosh, M.K. (2003) Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  by conjugated linoleic acid (CLA) in human preadipocytes. *The Journal of Lipid Research*, 44(7), 1287–300.
53. Brown J. M., Boysen, M.S., Chung, S., Fabiyi, O., Ron, F.M., Mandrup, S., McIntosh, M.K. (2004) Conjugated linoleic acid (CLA) induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 26735–47.
54. Granlund, L., Pedersen, J.I., Nebb, H.I. (2005) Impaired lipid accumulation by trans10,cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1687, 11–22.
55. LaRosa, P.C., Riethoven, J.M., Chen, H., Xia, Y., Zhou, Y., Chen, M., Miner, J., Fromm, M.E. (2007) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid activates the

- integrated stress response pathway in adipocytes. *Physiological Genomics*, 31, 544–53.
56. Churrua, I., Ferná'ndez-Quintela, A., Portillo, M.P. (2009) Conjugated linoleic acid isomers: Differences in metabolism and biological effects. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 105–111.
  57. Riserus, U., Berglund, L., Vessby, B. (2001) Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 25 (8), 1129-1135.
  58. Lawrence, R.D. (1946) Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances. *Lancet* 1:724–731.
  59. Seip, M., Trygstad, O. (1996) Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). *Acta Paediatrica*. 413:2–28.
  60. Delany, J.P., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.A., West, D.B. (1999) Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *American Journal of Physiology*, 276, 1172–1179.
  61. Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tange, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S., Ezaki, O. (2000) Conjugated Linoleic Acid Supplementation Reduces Adipose Tissue by Apoptosis and Develops. *Diabetes*, 49, 1534-1542.
  62. Shen, Wan., Chuang, C.C., Martinez, K, Reid, T., Brown, J. M., Xi, L., Hixson, L., Hopkins, R., Starnes, J., McIntosh, M. (2013) Conjugated linoleic acid reduces adiposity and increases markers of browning and inflammation in white adipose tissue of mice. *Journal of Lipid Research*, 54(4): 909–922.
  63. Akter, S.H., Häussler, S., Dänicke, S., Müller, U., Soosten, D., Rehage, J., Sauerwein, H. (2011) Physiological and conjugated linoleic acid-induced changes of adipocyte size in different fat depots of dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2871–2882.
  64. Parra, P., Palou, A., Serra, F. (2010) Moderate doses of conjugated linoleic acid reduce fat gain, maintain insulin sensitivity without impairing inflammatory adipose tissue status in mice fed a high-fat diet. *Nutrition & Metabolism*, 7, 5.
  65. Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich, J., Falk, W. (2009) Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- $\kappa$ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*, 126(2), 233–245.
  66. Goldstein, B.J., Scalia, R. (2004) Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2563-8.
  67. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004)

- Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1752–1761.
68. Luo, J., Miller, M.W. (1996) Ethanol inhibits basic fibroblast growth factor-mediated proliferation of C6 astrocytoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 67, 1448–1456.
  69. McVicker, B.L., Tuma, P.L., Kharbanda, K.K., Lee, S.M., Tuma, D.J. (2009) Relationship between oxidative stress and hepatic glutathione levels in ethanol-mediated apoptosis of polarized hepatic cells. *World Journal of Gastroenterology*, 15, 2609–2616.
  70. Cherian, P.P., Schenker, S., Henderson, G.I. (2008) Ethanol-mediated DNA damage and PARP-1 apoptotic responses in cultured fetal cortical neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32, 1884–1892.
  71. Hoek, J.B., Cahill, A., Pastorino, J.G. (2002) Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology*, 122, 2049–2063.
  72. Chen, G., Ma, C., Bower, K.A., Shi, X., Ke, Z., Luo, J. (2008) Ethanol promotes endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death: involvement of oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 937–946.
  73. Chen, Xi., Sebastian, B.M., Nagy, L.E. (2007) Chronic Ethanol Feeding to Rats Decreases Adiponectin Secretion by Subcutaneous Adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292(2), E621–E628.
  74. Flora, S.J., Gautam, P., Kushwaha, P. (2012) Lead and ethanol coexposure lead to blood oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis in rats. *Alcohol*, 47, 92–101.
  75. Das, S.K., Vasudevan, D.M. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences*, 81, 177–187.
  76. Olney, J.W., Ishimaru, M.J., Bittigau, P., Ikonomidou, C. (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis*, 5, 515–521.
  77. Higuchi, H., Kurose, I., Kato, S., Miura, S., Ishii, H. (1996) Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20, 340–6.
  78. Süsleyici Duman, B. Zengin, K. Kayhan, F.E. Koldemir, M. Çağatay, P. Taşkın, M., (2010) “The relation of FTO gene expression with drug and disease in fat tissues” *Turkish Journal of Endoscopic-Laparoscopic & Minimally Invasive Surgery*, 17(1), 8-14.

## ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı-Soyadı:** Sinem Banu Demir
- 2. T.C. Kimlik No:** 18109345854
- 3. Doğum Tarihi:** 1990
- 4. Unvanı:** Biyolog
- 5. Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen –Edebiyat Fakültesi	2007-2012
Yüksek Lisans	Biyoloji Bölümü	Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (Danışman: Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ)	2014-2017

### 6. Staj Bilgileri (Lisans Eğitimi Sirasında)

- Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji A.B.D., Temmuz 2012, İstanbul.
- Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji A.B.D., Ekim 2012, Afyon.
- Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik A.B.D., Mart 2013, Afyon.

### 7. Görevler

Temmuz 2011’den itibaren Moleküler Morfolojik Patoloji Laboratuvarı’nda tam zamanlı biyolog, 2012’den itibaren laboratuvar sorumlusu.

### 8. Bilimsel Çalışmalar

#### 8.1. Yüksek Lisans Tezi

“Obezitede Ran Geni Anlatımının Adipogenez İle İlişkisinin Araştırılması” Biyoloji, Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ

## **8.2. Bilimsel Makaleler (ULUSAL)**

### **8.2.1. Türkçe Makaleler**

#### **8.2.1.a. Hakemli Ulusal Dergilerde Yayımlanmış Türkçe Makaleler**

1. “Obezitede Ras ile ilişkili nükleer protein geni anlatımının adipogenez ile ilişkisinin araştırılması” **Sinem Banu Demir**, Meliha Koldemir Gündüz, Mehtap Çevik, Çavlan Çiftçi, Belgin Süsleyici. FNG & Bilim Tıp Dergisi 2016;2(3):201-207 doi: 10.5606/fng.btd.2016.036

## **8.3. Ulusal Kongre (Sempozyum) Etkinlikleri**

### **8.3.1. Özet Bildiri**

1. “Oksidatif stres ajanlarının farklı gelişim evrelerindeki 3T3-L1 adipositlerindeki proliferasyon ve RAN geni ekspresyonuna etkileri”, **Demir SB**, Koldemir-Gündüz M, Süsleyici Duman B. 4. Ulusal ve 1. Akdeniz Metabolik Hastalıklar ve Morbid Obezite Cerrahisi Kongresi, 1-4 Ekim 2015. Endoskopik Laparoskopik & Minimal İnvaziv Cerrahi Dergisi, S.48, OP:027. (Sözlü Bildiri)

## **9. Üyesi Olduğu Dernekler**

Farmakogenomik ve Bireyselleştirilmiş Tedavi Derneği

## **10. Bildiği Laboratuvar Teknikleri**

- \* iCELLigence hücre kültürü sistemi
- \* Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR)
- \* RNA izolasyon yöntemleri
- \* Histopatoloji teknikleri (makroskopi, doku takip, bloklama, kesit alma vs.)
- \* Sitopatoloji teknikleri (tespit, santrifüj, hücre bloğu, yayma vs.)
- \* Histokimyasal tetkikler (histokimyasal boyama teknikleri)
- \* Frozen Section hazırlama teknikleri
- \* Mikrobiyolojide bakteri kültürü
- \* Spermogram
- \* Kromozom sayımı ve tayini