

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

SIÇAN PANKREATİK BETA HÜCRE HATTINDA (INS-1E) LİPOTOKSİSİTEYE
VERİLEN CEVAPTA FONKSİYON GÖSTEREN PARKİN PROTEİNİNİN
REGÜLASYONUNDA ROL ALAN MİKRORNA'LARIN SAPTANMASI

Hatice Pınar Baysan Çebi

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Ocak

2023

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Hatice Pınar Baysan Çebi

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU danışmanlığında Hatice Pınar BAYSAN ÇEBİ tarafından hazırlanan bu çalışma 19 Ocak 2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hasibe VERDİ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Pelin MUTLU

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

ÖZET

Doktora Tezi

Sıçan Pankreatik Beta Hücre Hattında (INS-1E) Lipotoksisiteye Verilen Cevapta Fonksiyon Gösteren Parkin Proteininin Regülasyonunda Rol Alan mikroRNA'ların Saptanması

Hatice Pınar Baysan Çebi

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Tip 2 diyabet (T2D); hiperglisemiye neden olan, periferik insülin direnci ve pankreatik beta (β) hücrelerinden bozulmuş insülin salınımı ile karakterize endokrin ve metabolik bir bozukluktur. Endoplazmik Retikulum (ER) ve Mitokondriyon'da (Mt) oluşan problemler sonucu bozulan lipid ve kalsiyum homeostazi, ER stresi, Mt fonksiyon bozukluğu, ER ve Mt arası iletişim bozuklukları, otofaji mekanizmasının bozulması ve T2D sürecinde; insülin direnci ve pankreatik β hücre fonksiyon kaybı olarak kendini göstermektedir. *Park2* geninin ürünü ve bir E3 ubiquitin protein ligaz olan Parkin proteini otofaji ve mitofajiye aracılık eden aynı zamanda sahip olduğu ubiquitinasyon yeteneği sayesinde; DNA onarımı, transkripsiyon, translasyon, organel trafiği, proliferasyon, inflamasyon ve hücre ölüm/sağkalım yollarında aktif rol almaktadır. İnsülin direnci ve T2D'in en temel nedenlerinden olan lipotoksisiteye karşı Parkin proteininin hücre sağkalımını otofaji üzerinden desteklediği, Parkin proteininin yokluğunda ise hücrenin apoptoza yönelim gösterdiği bilinmektedir.

Minimal lipotoksisite farklılıklarında *Park2* geni ifade düzeyi ve proteinin fonksiyonunda hızlı değişimler meydana gelmektedir. Bu durum Parkin protein regülasyonunun hızlı hareket eden RNA interferans (RNAi) mekanizması üyesi mikroRNA'lar (miRNA) ile düzenlenebileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır. Buradan yola çıkarak bu tez çalışmasında biyoinformatik yaklaşımlar ve deneysel analizler bir arada kullanılarak ER ve Mt'de organel stresine neden olan palmitik asitle (PA) oluşturulan lipotoksik koşullarda Parkin proteini varlığında ve siRNA aracılı olarak *Park2* geninin sessizleştirildiği koşullarda pankreatik beta hücrelerinde meydana gelen miRNA ifade farklılıkları incelenmiştir.

Gerçekleştirilen miRNA profillemesi ve yapılan ileri biyoinformatik analizler ile validasyon çalışmaları sonunda hücre sağkalımında rolü olan Parkin proteininin regülasyonunda görev aldığı düşünülen rno-miR- 96-5p, rno-miR-153-3p, rno-miR-30e-3p ve rno-miR-344a-5p miRNA'ları öne çıkmıştır. Bu miRNA'ların özellikle, hücre sağkalım, otofaji, apoptoz, T2D ve insülin sinyalizasyon yollarında etkin olduğu gösterilmiştir. Aday miRNA'ların hedeflediği genlerin ifadelerinin validasyonları için gerçekleştirilen Gerçek Zamanlı PZR çalışmaları da seçilen miRNA'ların bu süreçteki düzenleyici rollerini destekler niteliktedir.

2023, 143 sayfa

Anahtar kelimeler: Parkin proteini, MikroRNA (miRNA), Pankreatik beta (β) Hücresi, INS-1E, Lipotoksisite, Tip 2 Diyabet (T2D), Mitokondri İlişkili Membran (MİM), Otofaji, ER Stresi, Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)

ABSTRACT

PhD Thesis

Detection of microRNAs in the Regulation of Parkin Protein Functioning in the Response to Lipotoxicity in Rat Pancreatic Beta Cell Line (INS-1E)

Hatice Pınar Baysan Çebi

Ankara University Biotechnology Institute

Asoc. Prof. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Type 2 diabetes (T2D); It is an endocrine and metabolic disorder characterized by peripheral insulin resistance and impaired insulin secretion from pancreatic beta (β) cells, causing hyperglycemia. Lipid and calcium homeostasis deteriorated as a result of problems in the Endoplasmic Reticulum (ER) and Mitochondrion (Mt), ER stress, Mt dysfunction, communication disorders between ER and Mt, disruption of autophagy mechanism and in the T2D process; It manifests itself as insulin resistance and loss of pancreatic β -cell function. The product of the *Park2* gene and the Parkin protein, which is an E3 ubiquitin protein ligase, mediates autophagy and mitophagy, and at the same time, thanks to its ubiquitination ability; It plays an active role in DNA repair, transcription, translation, organelle traffic, proliferation, inflammation and cell death/survival pathways. It is known that Parkin protein supports cell survival through autophagy against lipotoxicity, which is one of the main causes of insulin resistance and T2D, and in the absence of Parkin protein, the cell tends to apoptosis.

In minimal lipotoxicity differences, rapid changes occur in the expression level of the *Park2* gene and the function of the protein. This has led to the hypothesis that Parkin protein regulation may be regulated by microRNAs (miRNAs) that are members of the fast-acting RNA interference (RNAi) mechanism. Based on this, in this thesis study, bioinformatics approaches and experimental analyzes were used together and miRNA expression differences in pancreatic β cells in the presence of Parkin protein in lipotoxic conditions induced by palmitic acid (PA), has been studied which causes organelle stress in ER and Mt, and in conditions where the *Park2* gene was silenced by siRNA.

As a result of miRNA profiling and further bioinformatic analyzes and validation studies, miRNAs thought to be involved in the regulation of Parkin protein, which has a role in cell survival, are rno-miR-344a-5p, rno-miR-96-5p, rno-miR-153-3p and rno-miR-30e-3p. These miRNAs have been shown to be particularly active in cell survival, autophagy, apoptosis, T2D and insulin signaling pathways. qRT-PCR studies for the validation of the expressions of the genes targeted by the candidate miRNAs also support the regulatory roles of the selected miRNAs in this process.

2023, 143 pages

Keywords: Parkin protein, MicroRNA (miRNA), Pancreatic beta (β) Cell, INS-1E, Lipotoxicity, Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Mitochondria associated membranes (MAM), Autophagy, ER Stress, Unfolded Protein Response (UPR)

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını mümkün kılan, kendilerinden çok şey öğrendiğim, gelecek hayatımda da bilgi, fikir, destek ve dostluklarına her zaman ihtiyaç duyacağım, Saygıdeğer danışman hocalarım Doç. Dr. Hasibe VERDİ ve Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na,

Çalışma sürecindeki bilimsel katkı ve değerli destekleri için Sayın hocalarım Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ, Prof. Dr. Erkan YILMAZ ve Doç. Dr. Pelin MUTLU'ya,

Deneysel çalışmalarım boyunca en büyük destekçim olan, birlikte çalışmaktan ve kendisini tanıtmaktan mutluluk duyduğum, canım arkadaşım, kardeşim Öğr. Gör. Dr. Yaprak YALÇIN'a,

Bana ekip olmanın keyfini yaşatan, iyi ve kötü gündeki dostluğu ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Yüksel SUER'e,

Tüm Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Ailesine,

Tüm Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Ailesine,

Tüm BGD Laboratuvarı Ailesine,

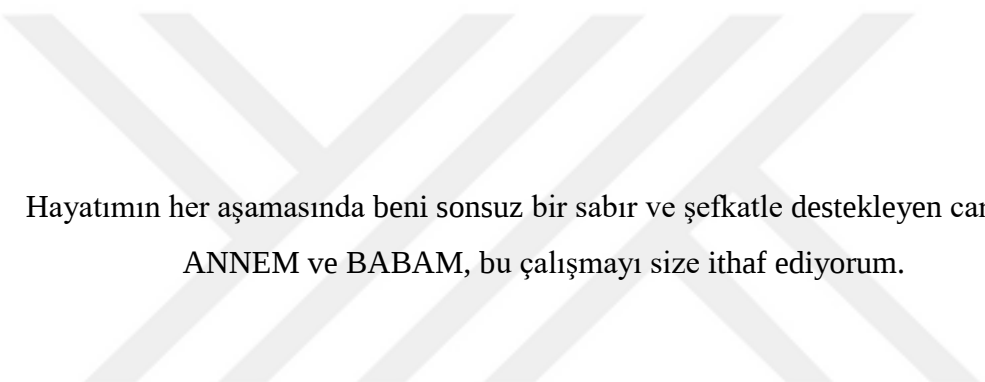
Bu sürecin tamamını benimle birlikte yaşayan acısı ve tatlısı ile her anında yanımda olan CANİM EŞİM Şükrü Okyar ÇEBİ'ye CANİM AİLEM'e,

Son olarak, tez çalışmalarımın en yoğun döneminde hayatımın ışığı olarak gelen ve yaşından büyük bir olgunlukla bu yoğunluk içerisinde her daim tatlı gülüşü ile günümü güzelleştiren, bana yaşam kaynağı, sevinci olan CANİM OĞLUM GÜNEŞ'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hatice Pınar BAYSAN ÇEBİ

OCAK, 2023



Hayatımın her aşamasında beni sonsuz bir sabır ve şefkatle destekleyen canlarım
ANNEM ve BABAM, bu çalışmayı size ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. TİP 2 DİYABET (T2D), BOZULAN GLUKOZ HOMEOSTAZI VE ORGANEL STRESİ.....	3
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM, STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITI.....	4
2.3. MİTOKONDİRİYON, MİTOKONDİRİYAL STRES VE MİTOKONDİRİYAL KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITI.....	7
2.4. HÜCRE İÇİ PROTEİN DEGRADASYON YOLAKLARI.....	9
2.4.1. UBİKUITİN-PROTEAZOM SİSTEMİ (UPS).....	10
2.4.2. OTOFAJİ	11
2.5. MİTOKONDİRİ İLİŞKİLİ MEMBRAN (MİM)	13
2.6. APOPTOZ	15
2.6.1. İÇSEL (İNTRİNSİK) APOPTOZ YOLAĞI.....	15

2.6.2. DIŞSAL (EKSTRİNSİK) APOPTOZ YOLAĞI.....	16
2.7. OTOFAJİ VE HÜCRE ÖLÜMÜ	17
2.8. PARKİN PROTEİNİ	19
2.8.1. PARKİN PROTEİNİNİN DİĞER FONKSİYONLARI	21
2.9. LİPOTOKSİSİTE AJANI OLARAK PALMİTİK ASİT (PA)	24
2.10. MİKRO RNA (miRNA)	25
2.10.1. LİPOTOKSİSİTE VE miRNA	26
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	<u>27</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>29</u>
4.1. MATERYAL	29
4.1.1. KULLANILACAK HÜCRE HATTI.....	29
4.1.2. KULLANILACAK LABORATUVAR, CİHAZ, TECHİZAT, KİMYASAL VE KİTLER.....	29
4.2. YÖNTEM.....	32
4.2.1. HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ	32
4.2.2. HÜCRELERİN ÇOĞALTILMASI VE İDAMESİ.....	32
4.2.3. PALMİTİK ASİT (PA) HAZIRLANMASI.....	33
4.2.4. ETKİN SİRNA TRANSFEKSİYON DOZUNUN BELİRLENMESİ VE PARK2 GEN İFADESİNİN BASKILANMASI.....	33
4.2.5. HÜCRE CANLILIK VE SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ (MTT)	34
4.2.6. RNA İZOLASYONU	35
4.2.6.1. RNA Saflık ve Sağlamlık Tayini	37
4.2.6.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	37
4.2.6.3. cDNA Kontrol PZR	39

4.2.7. GERÇEK ZAMANLI PZR	40
4.2.8. GERÇEK ZAMANLI PZR MİRNA DİZİN ÇALIŞMASI.....	41
4.2.9. PROTEİN ELDESİ VE WESTERN BLOT ANALİZİ	44
4.2.10. ELISA TABANLI APOPTOZ ANALİZİ	45
4.2.11. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	47
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
5.1. PARKİN PROTEİNİNİN REGÜLASYONUNDA ROL ALAN MİRNA’LARIN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ	48
5.2. LİPOTOKSİK KOŞULLAR ALTINDA PARKİN PROTEİNİ VARLIĞININ INS1-E HÜCRE CANLILIĞINA OLAN ETKİSİ	50
5.3. PARKİN PROTEİNİ VARLIĞINDA VE PARK2 GENİNİN SİRNA ARACILI SESSİZLEŞTİRİLMESİ ARDINDAN PA İLE OLUŞTURULAN LİPOTOKSİK KOŞULLAR ALTINDA ER STRES, OTOFAJİ, APOPTOZ GRUBU GENLERİ VE PARK2 GEN İFADE SEVİYELERİNDE OLUŞAN DEĞİŞİMLER.....	52
5.3.1. FARKLI PA DOZLARI VE PARK2 SİRNA KOŞULUNUN PARK2 GEN İFADE SEVİYESİNE ETKİSİ.....	54
5.3.2. LİPOTOKSİK KOŞULLAR ALTINDA PARK2 GENİNİN ARTIŞ VE AZALIŞININ ER STRES, OTOFAJİ VE APOPTOZ GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNE OLAN ETKİSİ	55
5.3.2.1. ER Stres Genleri	55
5.3.2.2. Otofaji Genleri	57
5.3.2.3. Apoptoz Genleri.....	58
5.3.2.4. Bcl-2/Bcl-Xl Oranı ile Hücrenin Apoptoza Yöneliminin İncelenmesi	61
5.4. LİPOTOKSİK KOŞULLARDA PARK2 GENİNİN HÜCREDEKİ APOPTOZ YÖNELİMİNE ETKİSİNİN ELİZA YÖNTEMİ İLE TEST EDİLMESİ	61

5.5. LİPOTOKSİK KOŞULLAR VE PARK2 SİRNA UYGULAMASININ PARKİN VE LC3A PROTEİN İFADE SEVİYELERİNE OLAN ETKİSİ	62
5.6. PARKİN PROTEİNİ VARLIĞINDA VE SİRNA ARACILI OLARAK İFADESİNİN BASKILANDIĞI LİPOTOKSİK KOŞULLARDA INS-1E HÜCRELERİNDE DEĞİŞEN MİRNA PROFİLİNİN İNCELENMESİ.....	64
5.6.1. PA VE SİRNA UYGULAMALARINA BAĞLI OLARAK İNCELENEN MİRNALARIN ZENGİNLEŞTİKLERİ YOLAKLAR VE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI	72
5.6.1.1. miR-344a-5p	72
5.6.1.2. miR-30e-3p	74
5.6.1.3. miR-96-5p.....	75
5.6.1.4. miR-153-3p.....	76
5.6.2. MİRNA HEDEF GENLERİNDEN ATG5 VE IP3R'NİN UYGULAMALARA BAĞLI GEN İFADE DEĞİŞİMLERİNİN GERÇEK ZAMANLI PZRİLE DOĞRULANMASI.....	77
5.7. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER İLE BELİRLENEN MİRNALAR İLE GERÇEK ZAMANLI PZR MİRNA DİZİN ÇALIŞMASINDAN ELDE EDİLEN MİRNA'LARIN KARŞILAŞTIRILMASI.....	79
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	82
6.1. TARTIŞMA.....	82
6.1.1. PARKİN PROTEİNİNİN PANKREATİK B HÜCRELERİNDE OTOFAJİ VE APOPTOZ ARASINDA BİR DENGİ FAKTÖRÜ OLARAK LİPOTOKSİK STRESTE HÜCRE SAĞKALIMINI DÜZENLEDİĞİ DÜŞÜNÜLMEKTEDİR	82
6.1.2. PANKREATİK B HÜCRELERİNDE LİPOTOKSİK STRES KOŞULLARINDA miR-96-5p, miR-153-3p, miR-30e-3p VE miR-344a-5p MİRNA'LARININ PARKİN PROTEİNİNE BAĞLI OLARAK DÜZENLENDİĞİ DÜŞÜNÜLMEKTEDİR	85

6.1.2.1. Otofaji Yolağı	86
6.1.2.2. Apoptoz Yolağı.....	88
6.1.2.3. Hücre Sağkalım Yolağı.....	90
6.1.2.4. T2D Yolağı	92
6.2. SONUÇ.....	93
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>95</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. T2D' ye etki eden faktörler.....	4
Şekil 2.2. ER yapısı	5
Şekil 2.3. KPY elemanları	7
Şekil 2.4. Mt yapısı.....	8
Şekil 2.5. Mitokondriyal kalite kontrol mekanizmaları.....	9
Şekil 2.6. Ubikuitin-proteazom sistemi	11
Şekil 2.7. Otofaji yolağı.....	12
Şekil 2.8. MİM ve fonksiyonları	14
Şekil 2.9. Apoptoz yolakları	17
Şekil 2.10. Mitofaji yolakları.....	20
Şekil 2.11. (A) Parkin'in katalize ettiği farklı ubikuitin bağlanma modelleri, (B) Parkin'in düzenlenmesinde rol aldığı düşünülen çeşitli hücresel süreçler	22
Şekil 2.12. Pankreatik β hücrelerinde lipotoksisite gelişimi	24
Şekil 2.13. miRNA biyogenezi.....	25
Şekil 4.1. Tez iş-akış şeması.....	32
Şekil 4.2. Hücre canlılık (MTT) testi hücre ekimi için kuyu planlama şablonu	35
Şekil 4.3. Roche-Cell Death Detection Elisa hesaplama formülü.....	47
Şekil 5.1. Ön-Biyoinformatik analizi yapılan genler için oluşturulmuş miRNA havuzu....	49
Şekil 5.2. Ön-Biyoinformatik Analizde gen gruplarını ortak hedefleyen miRNA'lar	49
Şekil 5.3. MTT analizi sonrası hücre canlılığı yüzde grafikleri	51

Şekil 5.4. Örnek total RNA agaroz jel görüntüsü.....	53
Şekil 5.5. cDNA kontrolü için yapılmış sıçan Aktin-Beta PZR agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 5.6. Park2 geni ifadenme grafiği	54
Şekil 5.7. Atf6 geni ifadenme grafiği	55
Şekil 5.8. Chop geni ifadenme grafiği.....	56
Şekil 5.9. Grp78 ifadenme grafiği	56
Şekil 5.10. Lc3a geni ifadenme grafiği.....	57
Şekil 5.11. p62'nin ifadenme grafiği	58
Şekil 5.12. Beclin1'in ifadenme grafiği.....	58
Şekil 5.13. Bak geninin ifadenme grafiği	59
Şekil 5.14. Bax geninin ifadenme grafiği	59
Şekil 5.15. Bcl-2 geninin ifadenme grafiği.....	60
Şekil 5.16. BclXl geninin ifadenme grafiği	60
Şekil 5.17. Apoptoz Eliza analiz sonuçları.....	62
Şekil 5.18. Parkin proteininin Western Blot sonucu	63
Şekil 5.19. Lc3a proteininin Western Blot sonucu.....	63
Şekil 5.20. İnsana ait bir miRNA'nın sıçan karşılığının Qiagen-GeneGlobe üzerinden kontrolü.....	66
Şekil 5.21. miRNA'nın miRBase üzerinden kontrol edilmesi	66
Şekil 5.22. Her iki mikrodizin çalışmasında ortak bulunan miRNA'lar ($p<0,05$).....	68
Şekil 5.23. Belirlenen miRNA'ların uygulamalara göre ifade değişimi	70

Şekil 5.24. miR-344a-5p'nin Otofaji Yolağında hedeflediği genler.....	73
Şekil 5.25. miR-30e-3p'nin Sağkalım Yolağında hedeflediği genler	74
Şekil 5.26. miR-96-5p'nin Apoptoz Yolağında hedeflediği genler.....	76
Şekil 5.27. miR-153-3p'nin T2D yolağında hedeflediği genler.....	77
Şekil 5.28. Atg5 geninin uygulamalara göre ifade seviyeleri.	78
Şekil 5.29. Ip3r geninin uygulamalara göre ifade seviyeleri.	79
Şekil 5.30. Ön biyoinformatik analiz otofaji miRNA grubu ile PA uygulaması miRNA kesişimi.....	80
Şekil 5.31. Ön biyoinformatik analiz apoptoz miRNA grubu ile siRNA uygulaması miRNA kesişimi.....	81
Şekil 5.32. Ön biyoinformatik analiz ortak miRNA'ları ile seçilen 4 miRNA'nın kesişimi	81
Şekil 6.1. KEGG figüründen adapte otofaji sinyal yolağı (rno04140).....	88
Şekil 6.2. KEGG figüründen adapte apoptoz sinyal yolağı (rno04210).....	90
Şekil 6.3. KEGG figüründen adapte hücre sağkalım sinyal yolağı (rno04211).....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. cDNA sentezi için kalıp-primer karışım miktarları (1 reaksiyon için)	38
Çizelge 4.2. cDNA karışımı (1 tüp için).....	38
Çizelge 4.3. PZR protokolü	39
Çizelge 4.4. Gerçek Zamanlı PZR için kullanılan prob bilgileri.....	40
Çizelge 4.5. Ters transkripsiyon reaksiyonu için gereken bileşen miktarları.....	41
Çizelge 4.6. PZR süre sıcaklık tablosu	42
Çizelge 4.7. Rat&Mouse PZR Panel I+II karışım protokolü	43
Çizelge 4.8. miRCURY LNA SYBR® Green PZR koşulları	43
Çizelge 5.1.Ön-Biyoinformatik analizi yapılan genler.....	48
Çizelge 5.2. Otofaji, Apoptoz ve Park2 genlerini hedefleyen ortak miRNA listesi.....	50
Çizelge 5.3. Örnek total RNA ölçüm tablosu.....	52
Çizelge 5.4. Uygulamalara bağlı değişen Bax/Bcl2 oranları.....	61
Çizelge 5.5. Gerçek Zamanlı PZR miRNA Dizin çalışması için kullanılan PA ve siRNA uygulama grupları ve bu grupların kontrolleri	64
Çizelge 5.6. Biyoinformatik analiz için izlenen yolun iş-akış şeması.....	65
Çizelge 5.7. 0,3mM PA uygulamasının dizin çalışması sonucunda elde edilmiş sıçana özgü ve istatistiki olarak anlamlı değişen ($p<0,05$) miRNA listesi.....	67
Çizelge 5.8. <i>Park2</i> siRNA + 0,3mM PA uygulamasının dizin çalışması sonucunda elde edilmiş sıçana özgü ve istatistiki olarak anlamlı değişen ($p<0,05$) miRNA listesi	67
Çizelge 5.9. Dizin çalışmasından detaylı biyoinformatik araştırmalar için filtrelenmiş 33 miRNA	69

Çizelge 5.10. Belirlenen miRNA'lar ve yer aldıkları yollar	71
--	----



SİMGELER DİZİNİ

6-OHDA	6-hidroksidopamin hidrobromid
°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
a1/Bfl1	<i>The Bcl-2-related protein A1</i> (Bcl-2 ile ilişkili protein A1)
ADCD	<i>Autophagy Dependent Cell Death</i> (Otofaji bağımlı hücre ölümü)
AGO	Argonat
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i> (Apoptoz indükleyici faktör)
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (AMP ile aktifleştirilen protein kinaz)
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i> (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1)
ASK-1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i> (Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1)
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i> (Aktive edici transkripsiyon faktörü)
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i> (Aktive edici transkripsiyon faktörü 4)
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i> (Aktive edici transkripsiyon faktör 6)
ATFS-1	<i>Activating Transcription Factor Associated With Stress-1</i> (Stres-1 ile ilişkili aktive edici transkripsiyon faktörü)
ATG	<i>Autophagy related genes</i> (Otofaji ilişkili genler)
ATG 1	Otofaji ilişkili gen 1
ATG 10	Otofaji ilişkili gen 10
ATG12	Otofaji ilişkili gen 12

ATG13	Otofaji ilişkili gen 13
ATG14	Otofaji ilişkili gen 14
ATG16L1	<i>Autophagy Related Gene 16 like 1</i> (Otofaji ile ilişkili gen 16 benzeri 1)
ATG3	Otofaji ilişkili gen 3
ATG4	Otofaji ilişkili gen 4
ATG5	Otofaji ilişkili gen 5
ATG7	Otofaji ilişkili gen 7
ATP	Adenozin trifosfat
Bad	<i>BCL2 Associated Agonist Of Cell Death</i> (BCL2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti)
Bak	<i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i> (BCL2 antagonisti/katil 1)
Bax	<i>BCL2 Associated X protein</i> (BCL2 ile ilişkili X proteini)
BCA	Bikinkoninik asit
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (B-hücreli lenfoma 2)
Bcl-w	<i>Bcl-2 like protein 2</i> (Bcl-2 benzeri protein 2)
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> (B-hücreli lenfoma-ekstra büyük)
bç	Baz çifti
BH3	Bcl-2 homoloji 3
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i> (BH3 etkileşen alan ölüm agonisti)
Bik	<i>BCL2 Interacting Killer</i> (BCL2 Etkileşimli Katil)
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i> (Bcl-2 benzeri protein 11)
Bmf	<i>Bcl2 Modifying Factor</i> (Bcl-2 değiştirici faktör)
BNIP3	<i>BCL2 Interacting Protein 3</i> (BCL2 etkileşimli protein 3)
BSA	Bovin serum albumin
Ca ⁺²	Kalsiyum

CCCP	<i>Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone</i> (Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (Komplementer DNA)
CHOP	C/EBP Homolog Protein
CO ₂	Karbondioksit
Cp	<i>Crossing point</i> (Geçiş noktası)
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i> (cAMP-yanıt elemanı bağlayıcı protein)
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Döngü eşiği)
DAG	Diaçilgliserol
DD	<i>Death Domain</i> (Ölüm domeni)
DEPC	Dietil pirokarbonat
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dk
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> (Ölümü indükleyen sinyal kompleksi)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksirübonükleozid trifosfat
DR	<i>Death Receptor</i> (Ölüm reseptörü)
DUB	Deubikuitinasyon
DVE-1	<i>DVE (Defective proVentriculus in Drosophila) homolog</i> (DVE (Drosophila'da Arızalı proVentriculus) homoloğu)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
eiF2 α	<i>eukaryotic initiation Factor 2 alpha</i> (ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 alfa)
ELISA	<i>Enzyme-Linked immunosorbent assay</i> (Enzim bağlı immüno sorbent deneyi)

EndoG	Endonükleaz G
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	<i>ER Associated Degradation</i> (ER ilişkili Degradasyon)
ErpQC	<i>ER stress-induced pre-emptive quality control</i> (ER stres indüklü pre-emptiv kalite kontrol)
ERSC	ER Stres Cevabı
ERSE I	<i>ER Stres Element-I</i> (ER stres elemanı-I)
ERSE II	<i>ER Stres Element-II</i> (ER stres elemanı-II)
EtBr	Etidyum bromür
EtOH	Etil alkol
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i> (Fas ilişkili ölüm bölgesi)
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal bovin serum
FFA	<i>Free fatty acid</i> (Serbest yağ asiti)
FIP200	<i>Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD</i> (Fokal adhezyon kinaz ailesi etkileşimli protein 200kD)
FLIP	<i>Flice-like inhibitory protein</i> (Flice-benzeri inhibitör protein)
FUNDC1	<i>FUN14 domain-containing protein 1</i> (FUN14 alanı içeren protein 1)
gr	Gram
GER	Granüllü ER
GRP75	Glikoz regüle protein 75
GRP78	Glikoz regüle protein 78
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
Hrk	<i>Harakiri (Death protein 5)</i> (Harakiri (Ölüm proteini 5))
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (yabancurpu peroksidaz)
HtrA2	<i>HtrA Serine Peptidase 2</i> (HtrA serin peptidaz 2)

IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> (Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon)
Ig	İmmunoglobulin
IP3R	<i>Inositol trisphosphate receptor</i> (İnositol trifosfat reseptör)
IRE-1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i> (İnositol gerektiren enzim 1)
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi)
KPY	Katlanmamış Protein Yanıtı
LC3	<i>Microtubule associated protein 1A/1B light chain 3</i> (Mikrotübüle bağlı protein 1A/1B-hafif zincir 3)
LIR	<i>LC3 interaction site</i> (LC3 etkileşim bölgesi)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Mitojenle etkinleşen protein kinaz)
MCL1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> (İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşması proteini)
MDV	<i>Mitochondrial derived vesicles</i> (Mitokondriyal kökenli veziküller)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MİM	Mitokondri ilişkili Membran
miRNA	Mikro RNA
ml	mili litre
mM	mili molar
mRNA	Mesajcı RNA
Mt	Mitokondriyon
Mt-DNA	Mitokondriyal DNA
Mt-KPY	Mitokondriyal Katlanmamış Protein Yanıtı
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (Rapamisinin memeli hedefi)

MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş form)
NF-Kb	Nükleer Faktör Kappa B
NIX (BNIP3L)	<i>BCL2 Interacting Protein 3 Like</i> (BCL2 etkileşimli protein 3 benzeri)
ng	nanogram
Noxa	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1</i> (Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1)
nm	nanometre
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i> (p38 mitojenle aktive olan protein kinazlar)
PA	Palmitik asit
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PE	Fosfatidiletanolamin
PERK	<i>Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase</i> (Protein kinaz R (PKR)- benzeri endoplazmik retikulum kinaz)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PINK1	PTEN ile indüklenen kinaz 1
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat
pmol	Pikomol
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> (p53 ile upregüle olan apoptoz modülatör)
PVDF	Poliviniliden florür
qRT-PCR	<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> (Gerçek Zamanlı Kantitatif Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (bağıl merkezkaç kuvveti)
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> <i>buffer</i> (Radyoimmünopresipitasyon deney tamponu)
RISC	RNA tarafından tetiklenen susturulmuş kompleks

RNA	Ribon�kleik asit
RNAi	RNA interferans
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktif Oksijen T�rleri)
rpm	Dkdaki devir sayısı
rRNA	ribozomal RNA
SDS	Sodyum dodesil s�lfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil s�lfat–poliakrilamid jel elektroforez
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Ortalamanın Standart Hatası)
SER	<i>Smooth ER</i> (D�z ER)
Sig-1R	<i>Sigma-1 receptor</i> (Sigma-1 reseptör)
siRNA	<i>Small interfering RNA /short interfering RNA /silencing RNA</i> (Susturucu RNA)
SMAC/DIABLO	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with Low PI</i> (D���k PI ile İkinci Mitokondri T�revli Kaspaz/Doğrudan IAP Bağlayıcı Protein Aktivat�r�)
sn	Sn
SQSTM1 (p62)	<i>Sequestosome-1</i> (Sekestozom)
T2D	Tip 2 Diyabet
TAE	Tris asetik asit EDTA
TBS	Tris tamponlu tuz ��zeltisi
TBS-T	Tween-20 içeren tris tamponlu tuz ��zeltisi
TNF-�	T�m�r nekroz faktör alfa
TNRF1/2	T�m�r nekroz faktör reseptör 1/2
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain</i> (T�m�r nekroz faktör reseptör tip 1 ilişkili ölüm domeni)
TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i> (TNF aracılı apoptoz indükleyici ligand)

TWEAK	<i>The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i> (TNF ile ilişkili zayıf apoptoz indükleyicisi olarak da bilinen tümör nekroz faktörü ligandı üst aile üyesi 12)
Ub	Ubikuitinasyon
UBL-5	<i>Ubiquitin-like protein 5</i> (Ubiquitin benzeri protein 5)
ULK1	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i> (Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1)
UPS	Ubikuitin Proteazom Sistemi
UV	Ultraviyole
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
UVRAG	<i>UV radiation resistance-associated gene protein</i> (UV radyasyon direnci ile ilişkili gen proteini)
V	Volt
VDAC1	<i>Voltage-dependent anion-selective channel 1</i> (Voltaj bağımlı anyon seçici kanal 1)
Vps15	<i>PI3K Regulatory Subunit 4</i> (PI3K düzenleyici alt ünite 4)
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i> (X-kutusu bağlayıcı protein 1)
XBP1-s	<i>XBP1-splice</i> (XBP1-splays)
β	Beta

1. GİRİŞ

Tip 2 Diyabet (T2D); pankreatik beta (β) hücrelerinden insülin salınımının bozulması, periferik insülin direnci ve hiperglisemi ile karakterize bir sağlık sorunudur. İnsülin direncinin bir süre devam etmesi sonrasında β hücreleri periferik insülin direncinin üstesinden gelecek kadar insülin üretememesine bağlı olarak T2D patolojisi ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle insülin fonksiyon ve salınım mekanizmasının iyi bir şekilde ortaya çıkarılması bu tarz patolojilerin anlaşılması ve tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için oldukça önemlidir (1,2).

Endoplazmik Retikulum (ER) ve Mitokondriyon (Mt), pek çok metabolik yolda ve hücrel homeostaz regülasyonunda önemli role sahip iki organeldir. ER ve Mt arası sinyalizasyon ile organel fonksiyonları düzenlenip, hücrel homeostaz kontrol edilmektedir (3). ER ve Mt'de oluşan problemler sonucu lipid ve kalsiyum (Ca^{+2}) homeostazı bozulur. Bu durum pankreas ve periferik dokulardaki fonksiyon bozukluklarıyla yakından ilişkilendirilmektedir ve hepsi birlikte metabolik problemlerdeki organel stres etkisini aydınlatmaktadır. Periferik dokularda oluşan metabolik strese; lipid birikimi, ER stres, Mt fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres ve inflamasyona neden olmaktadır (4–7).

ER ve Mt etkileşiminin gerçekleştiği Mitokondri İlişkili Membran (MİM) bölgesi lipid ve Ca^{+2} alış verişinin sağlandığı bölge olması nedeni ile, bu iki organel arasındaki iletişim bozukluğunun pek çok metabolik hastalık altında yatan bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir (8).

Otofaji, ER stresini takip eden hayatta kalma mekanizması olarak bilinse de, stresin süre ve derecesine bağlı olarak hücre ölüm mekanizması haline de dönüşebilmektedir (9). ER'de stresin süresi uzadıkça apoptoz yolları aktifleşmektedir (10). Pankreatik β hücrelerinde serbest radikallerdeki artış veya antioksidanlardaki azalma nedeniyle meydana gelen oksidatif strese bağlı oluşan hiperglisemi sürecinde ubiquitinlenmiş protein agregatlarının otofaji ile uzaklaştırıldıkları gösterilmiştir (11). Otofaji iç veya dış hücrel stresler ile indüklenmektedir. Bu nedenle otofaji mekanizmasında meydana gelecek bozukluklar T2D, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların da dahil olduğu pek çok hastalığın patogeneğinde önemli role sahiptir (12).

Parkin proteini, mitokondriyal kalite kontrol sisteminde de işlevsel olan siztozolik E3 ubiquitin ligaz ailesi üyesidir. Erken Başlangıçlı Parkinson Hastalığı fenotipi ile ilişkilendirilen PTEN ile indüklenen kinaz 1 (PINK1 ya da PARK7) geninin Parkin ile beraber otofajik degradasyon için Mt'yi hazırladığı gösterilmiştir (13). Çeşitli hücre hatlarında (SH-SY5Y, Neuro2a, goto-P3 ve IMR32) farklı ER stres uyaranları kullanılarak yapılan çalışmalarda *PARK2* geninin ifadenin farklılıkları gösterilmiş, Parkin proteininin ER stresi ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin hücre tipi ve stres stimulanına bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır (14).

Günümüzde mikro RNA (miRNA)'ların serbest yağ asitlerinin (*Free Fatty Acid*-FFA) neden olduğu lipotoksisite sonucu pankreatik β hücre fonksiyon kaybı ile ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Mevcut veriler obeziteye ve T2D'ye yol açan glukotoksik, lipotoksik ya da her ikisinin bir arada olduğu glukolipotoksik yaşam tarzı faktörlerinin pankreatik adacıklardaki β hücrelerinde miRNA ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir. Güncel veriler, β hücre kimliği (sayı ve büyüklük), ve insülin sekresyonunun da dahil olduğu fizyolojisinin düzenlenmesinde miRNA'ların ön plana çıktığını göstermektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda T2D donörleri veya diyabetik hayvan modellerinden elde edilen pankreatik β adacıklardaki değişen miRNA ekspresyonu da bunu desteklemektedir (15,16).

2. KURAMSAL TEMELLER

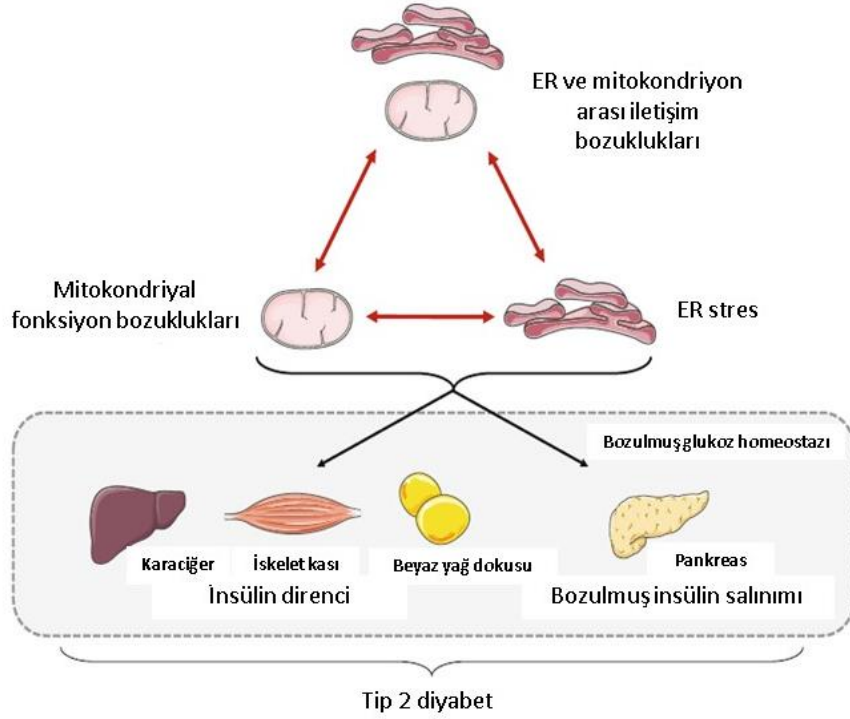
2.1. TİP 2 DİYABET (T2D), BOZULAN GLUKOZ HOMEOSTAZI VE ORGANEL STRESİ

T2D; periferik insülin direnci ve pankreatik β hücrelerinden bozulmuş insülin salınımı nedeniyle hücrenin ortamdaki insülini kullanamaması ile karakterize kompleks bir endokrin ve metabolik bozukluktur.

Beslenme sürecini takiben, pankreatik β hücrelerinden insülin salınımı indüklenir. Daha sonra insülin hormonu hepatik glukoz üretimini, iskelet kası ve beyaz yağ dokusu tarafından glukoz kullanımını stimüle ederek glukoz homeostazını kontrol eder. Hiperglisemi durumu T2D'de; hem insülin direncine hem de pankreatik β hücrelerinden bozulmuş insülin salınımına neden olmaktadır. Karaciğerde bozulmuş insülin sinyalizasyonu kandaki glukoz düzeyinin artmasına sebep olmaktadır (17). Periferik insülin direncini kompanse etmek için β hücreleri gittikçe daha fazla insülin salınımı yapmakta ve bu da zamanla pankreasın aşırı yüklenmeden yorulmasına ve periferik dokulardaki insülin işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Periferik dokularda oluşan bu tarz metabolik stresler; lipit birikimi, ER stres, Mt işlev bozukluğu, oksidatif stres ve inflamasyona neden olmaktadır (18).

İnsülin salınım ve işlev sorunları hem Mt fonksiyon bozukluğu hem de ER stres meydana getirmesi nedeniyle T2D ile ilişki içerisinde (4,19,20). Mt fonksiyon bozukluğu insülin salınımını ve aktivitesini olumsuz yönde etkiler, bunu takiben oksidatif stres ve/veya lipit birikimi meydana gelir. Oluşan ER stres ise bu durumla Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY) aktivasyonu ile başa çıkmaya çalışmaktadır. Aynı zamanda her iki organel inflamatuvar yolları da aktive edebilir. İnflamatuvar yanıtlar üzerinden insülin salınım ve faaliyet düzenlemesi yapılmaktadır (21,22).

T2D ve organel stresi arasındaki ilişkinin; ER-Mt'deki iletişim bozukluğu; Mt fonksiyon bozukluğu, ER stres, bozulmuş lipit ve Ca^{+2} homeostazına bağlı olarak bozulmuş insülin mekanizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.1.) (23).



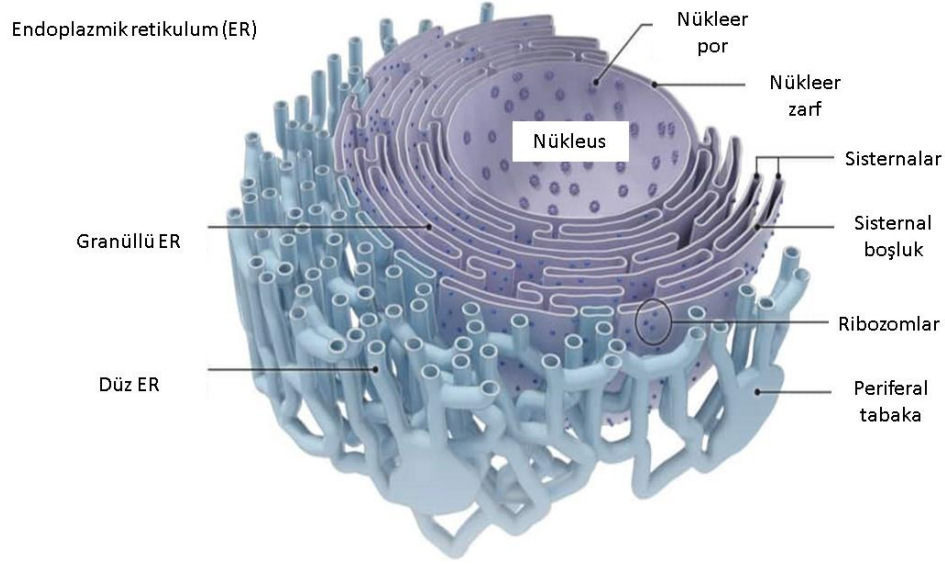
Şekil 2.1. T2D' ye etki eden faktörler
Rieusset ve ark.' dan adapte edilmiştir (23)

T2D durumunda hem pankreatik β hücre kaybı hem de anormal insülin salınımı glukoz homeostazının bozulmasına etki eder. β hücresi işlev ve hücre kütle kaybının altında ER stres, oksidatif stres, inflamatuvar stres, amiloid stres ve islet hücre bütünlüğü kaybı gibi nedenler yatmaktadır (24).

2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM, STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITI

Tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ER, mikroçevresine karşı yüksek derecede hassasiyet gösteren ve hücre gereksinimine göre işlevsel kapasitesini hızla değiştirebilen oldukça adaptif bir organeldir (25). ER, nükleer membrandan başlayarak tüm hücre sitoplazması boyunca geniş bir ağ oluşturan birbirine bağlı ve bitişik olan çeşitli bölgelerden meydana gelmektedir. Bu yapısal alanlar sisterna ve tübüller olarak ifade edilmektedir. ER ve nükleer membran, ER lümeni veya ER sisterna alanı olarak adlandırılan tek bir iç alanı çevreleyen sürekli bir tabaka oluşturmaktadır (Şekil 2.2.). Çekirdeğe yakın ve ribozomla kaplı ER bölgelerine Granüllü ER (GER) adı verilirken, ribozomdan yoksun sitozole yayılmış dallanmalar gösteren tübüller ER bölgelerine ise Düz ER (*Smooth ER-SER*) denilmektedir

(26). Organizmaya, hücre tipine ya da fizyolojik duruma bağı olarak ER yapısal ve fonksiyonel olarak değişiklikler gösterebilir.



Şekil 2.2. ER yapısı
Blackstone ve ark.' dan adapte edilmiştir (27)

Hücre dışına salgılanacak tüm proteinler ile ER, Golgi aygıtı, Lizozom gibi organellere hedeflenen proteinlerin ilk uğrak yeri ER'dir. ER'nin temel işlevleri arasında; fosfolipit, kolesterol ve steroid metabolizmasının düzenlenmesi, hücre içi Ca^{+2} depolanması ve Ca^{+2} homeostazının sağlanması, proteinlerin katlanması, maturasyonu, kalite kontrolü ve protein trafiğinin kontrol edilmesi ile detoksifikasyon reaksiyonlarının düzenlenmesi bulunmaktadır (28).

Sıcaklık değişimleri, besin eksikliği veya redoks koşullarındaki düzensizlikler gibi çevresel faktörler, hücrenin iyon ve protein homeostazında dengesizliğe neden olur. Bozulan Ca^{+2} dengesi, redoks dengesizliği, protein glikozilasyon veya katlanma bozuklukları gibi bu değişik hücresel stresler de ER lümeninde katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine bağı olarak ER stresinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (29).

İçsel veya dışsal nedenler ile oluşan bu hücresel stres, hücresel homeostazı yeniden sağlayan veya hücre ölümünü tetikleyen çok iyi organize olmuş yolları aktive eder. Endoplazmik Retikulum Stres Cevabı (ERSC) olarak adlandırılan sürece katılan mekanizmalar; KPY, ER

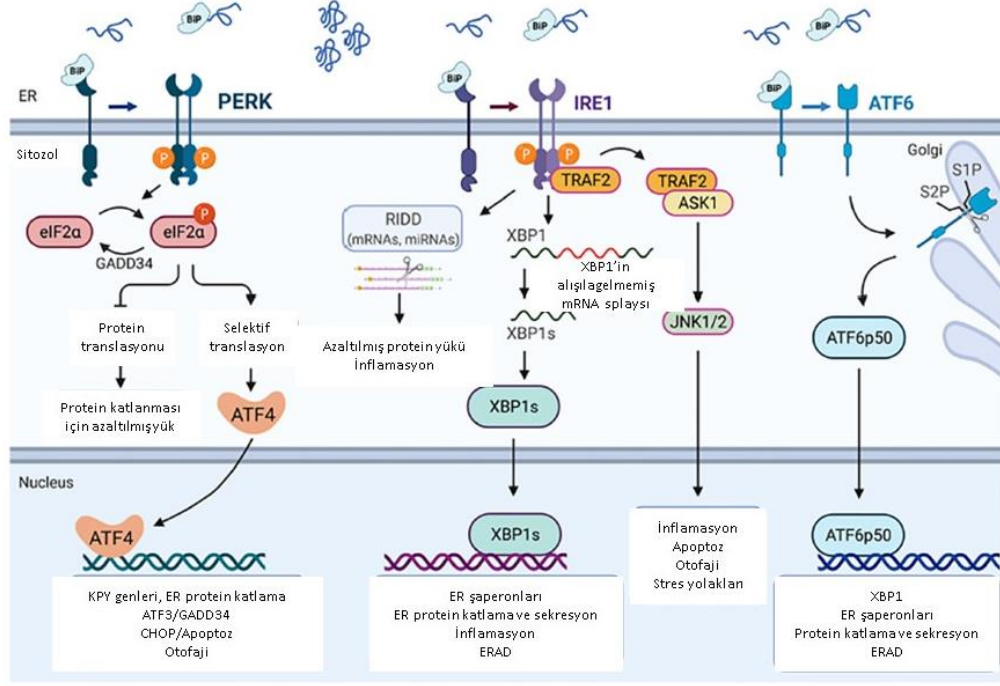
İlişkili Degredasyon (*ER Associated Degradation-ERAD*), ER Stres İndüklü Önleyici Kalite Kontrolü (*ER stress-induced pre-emptive quality control-ERpQC*), otofaji ve mitokondriyal işlevlerdeki (ATP üretimi, Ca^{+2}) değişiklikler olarak sıralanabilmektedir (30). Patolojik koşullarda ERSC'lerden bir tanesi bile bozulduğunda tüm hücrel homeostaz etkilenmektedir. KPY'nin aktiflenmesi ile tetiklenen yollar arası konuşmalar, mitokondriyal fonksiyonlarda ve otofaji yolağında değişikliklere neden olmaktadır (31).

KPY, ER membranında bulunan Protein kinaz RNA-benzeri endoplazmik retikulum kinaz (*Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase-PERK*), İnozitol Gerektiren 1 (*Inositol-requiring enzyme 1-IRE-1*) ve Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 6 (*Activating Transcription Factor 6-ATF6*) adlı 3 protein ile kontrol edilen bir süreçtir. Bu proteinler ER membranına Glikoz Regüle Protein 78 (Grp78) adlı şaperon aracılığı ile bağlı halde bulunmaktadır. KPY'de stres sonucu Grp78'in hücre membranından ayrılmasıyla serbest kalan PERK, IRE-1 ve ATF6 adlı transkripsiyon faktörleri sitoplazmaya geçerek çekirdekte ER stres cevap elemanları ile ilişkili genlerin transkripsiyonlarının artışına ek olarak lipid biyosentezi, karbohidrat metabolizması ve hücre ölüm yollarında rol alan diğer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını da kontrol etmektedir (32–34).

KPY elemanlarından PERK; ökaryotik translasyon başlatıcı faktör alfa'yı (*eukaryotic initiation Factor 2 alpha-eIF2 α*) fosforile ederek genel protein translasyonunu durdurucu yönde çalışırken Aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (*Activating Transcription Factor 4-ATF4*)'ün de ekspresyonunu artırıcı yönde görev yapmaktadır. ATF4; otofaji (Otofaji ilişkili genler (*Autophagy related genes-ATG*)) ve apoptoz (C/EBP homolog protein (CHOP)) ile ilgili bazı genlerin ifadelenmelerini kontrol etmektedir. Diğer bir KPY elemanı olan IRE-1, KPY'yi kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan X-kutusu bağlayıcı protein 1 (*X-box binding protein 1-XBP1*)'in aktif formu olan XBP1-splays (*XBP1-splice-XBP1s*) hale dönüşmesini sağlamaktadır. XBP1-s; ER'de protein sentezi ve katlanması, glukozilasyon, ER ilişkili yıkım, redoks metabolizması, otofaji, lipid biyogenezi ve veziküler trafikte görevli genlerin transkripsiyonunda etkin olmaktadır (35). ATF6 ise, golgide proteolitik kesime uğrayarak aktif hale gelir ve Grp78 başta olmak üzere XBP1 ve ER stres genleri (CHOP, ER Stres Elemanı I (ERSE I), ER Stres Elemanı II (ERSE II)) ile kalite kontrol genlerinin transkripsiyonunu sağlamaktadır (36). Özetle PERK, IRE-1 (XBP1s) ve ATF6 doğrudan ve

dolaylı olarak otofajide, apoptozda, lipid biyosentezinde ve redoks homeostazında görevli protein ve şaperonların transkripsiyonunu aktive etmektedir (Şekil 2.3.) (37,38).

Hücre stresle baş etmeye çalışırken hücrenin tipi, stresin yoğunluğu ve süresi verilen cevaplarda belirleyici rol oynamaktadır. Stresin çeşidi ve derecesine bağlı olarak kullanılan sinyal yolları da değişmektedir (31).

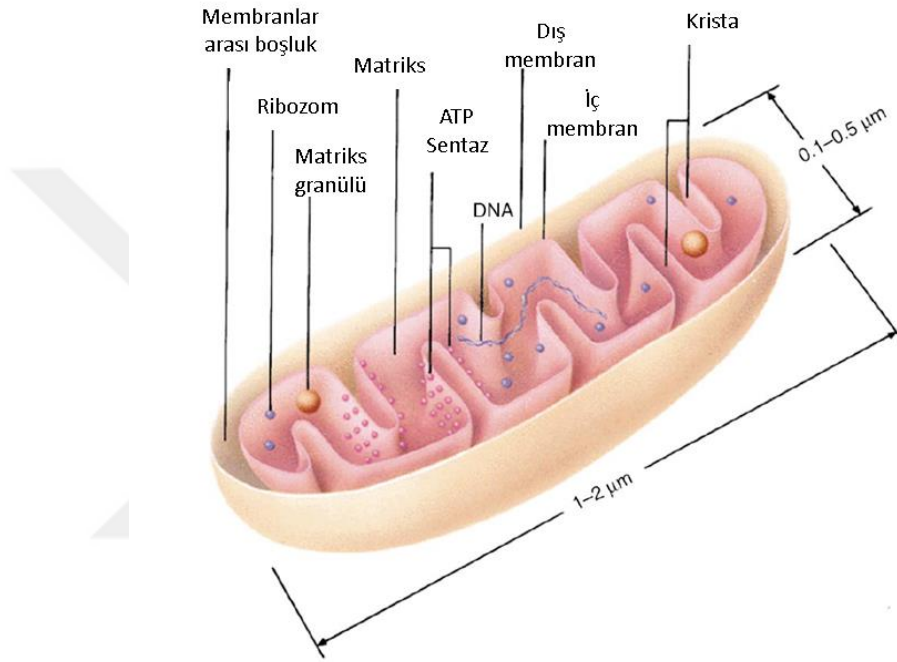


Şekil 2.3. KPY elemanları
Kny ve ark.' dan adapte edilmiştir (38)

2.3. MİTOKONDİRİYON, MİTOKONDİRİYAL STRES VE MİTOKONDİRİYAL KATLANMAMIŞ PROTEİN YANITI

Endosimbioz hipoteze göre Mt, 1 milyar yıldan daha uzun süre önce bir α -proteobakteriyumun, pre-ökaryotik bir hücre tarafından yutulması sonucu orijinlenmiştir. Hipotez Mt'nin kimeraya daha fazla enerji kaynağı sunmasının bir rekabet avantajı sağladığını öne sürmektedir (39). Mt, hücre içerisinde besin moleküllerini oksidatif fosforilasyon ile parçalayarak ATP molekülü oluşturmaktadır. Hücre tipi ve sayısına göre şekil ve sayıca farklılık gösteren hücre içi enerji kaynaklarıdır. Bakteri ataları gibi, Mt de bir dış zara ve zarlar arası boşluğu matriksten ayıran bir iç zara sahiptir aynı zamanda kendine ait genomu da bulunmaktadır (Şekil 2.4.). Elektron transport zinciri proteinlerinin 13 tanesi

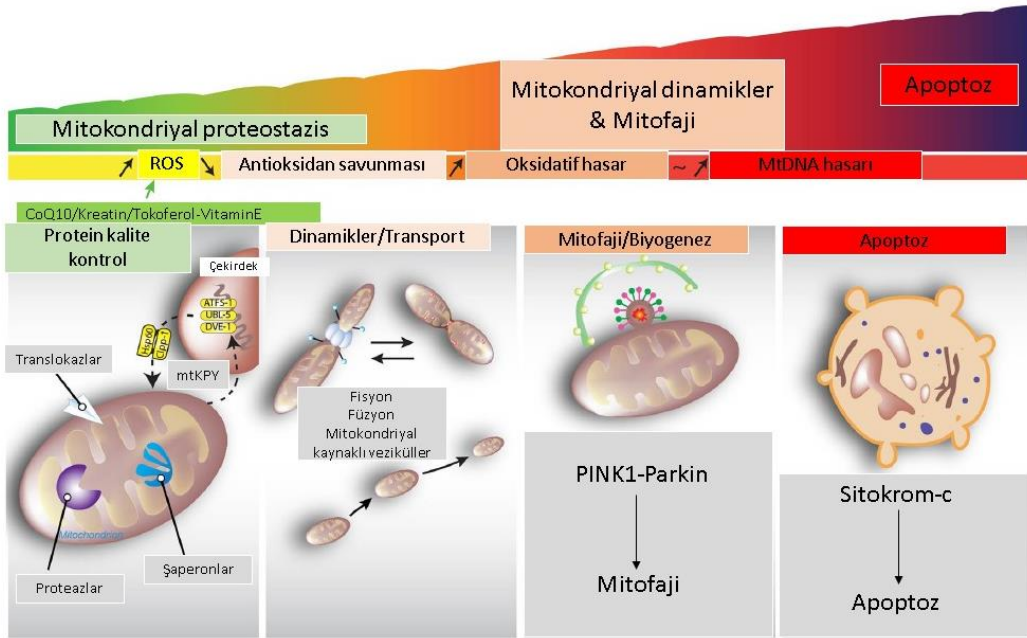
Mt genomdan sentezlenir ve bunun dışında kalan tüm mitokondriyal proteinler hücre çekirdeği tarafından kodlanmaktadır (40). Mt; hücredeki temel oksidatif fosforilasyon merkezidir. Karbohidrat ve yağ asitlerinin kimyasal bağ enerjisine dönüşümü (ATP üretimi) burada gerçekleşmektedir. Hücrede Ca^{+2} konsantrasyon kontrolünde ER ile yakın çalışır; sitozolde az miktarda bulunan Ca^{+2} ER üzerinden Mt'ye aktarılmaktadır. Hücre döngüsü kontrolü, hücre büyümesi, sinyalizasyon, hücre farklılaşması ve hücre ölümü süreçlerinde de görevleri bulunmaktadır (41,42).



Şekil 2.4. Mt yapısı
Frey ve ark.'dan adapte edilmiştir (43)

ER'deki KPY'ye benzer şekilde Mt'de de Mitokondriyal Katlanmamış Protein Yanıtı'nın (Mt-KPY) olduğu gücel literatürle desteklenmektedir (44). Mitokondriyal DNA (Mt-DNA)'daki mutasyonlar, fiziksel ajanlar (ısı, Etidyum Bromür (EtBr)), serbest oksijen radikalleri Mt membran potansiyelinin bozulmasına veya hatalı/hasarlı proteinlerin birikmesine neden olmaktadır (45). Reaktif oksijen türleri (*Reactive oxygen species*-ROS), hücrelerde *in-vivo* olarak sürekli olarak oluşturulmaktadır. Mt'de artan hasar, sıralı cevapların gelişimine sebep olur. Mitokondriyal matriks ve zarlar arası boşluk içinde bulunan mitokondriyal translokazlar, şaperonlar ve proteazlar, katlanmamış ve oksitlenmiş çözünür proteinlere karşı ilk savunma hattı görevini görmektedir (46). Mt-KPY, aktif hale gelen ilk yanıttır ve mtKPY'nin sitozolik transkripsiyon faktörleri (ATFS-1, UBL-5, DVE-

1) çekirdeğe girdikten sonra, mitokondriyal proteostazda yer alan ve nükleer genomdan kodlanan translokazlar, proteazlar ve şaperonlar gibi koruyucu genlerin upregülasyonunu sağlamaktadır. İkinci sırada aktive olan füzyon ve fisyon sistemidir. Füzyonda hasarlı Mt sağlıklı olan Mt ile birleşerek hasarı telafi etmeye çalışır. Fisyonunda ise hasarlı kısım mitofaji ile çıkarılarak uzaklaştırılmaktadır. Mitokondriyal hata ve hasar birikimi belli bir eşiği aştığında, mitokondriyal parçalar, lizozoma geçen mitokondriyal kökenli veziküllerin (*Mitochondrial derived vesicles*-MDV) üretimi yoluyla çıkarılabilmektedir. Tam bir mitokondriyal işlev bozukluğu söz konusu olduğunda ise tüm organel, mitofaji adı verilen yolla otofagozoma hedeflenebilmektedir. Kurtarma stratejilerinin hiçbirisi işe yaramaz ise apoptoz indüklenerek hücre ölümü gerçekleşmektedir (Şekil 2.5.) (44–47).



Şekil 2.5. Mitokondriyal kalite kontrol mekanizmaları
Franco-Iborra ve ark.' dan adapte edilmiştir (47).

2.4. HÜCRE İÇİ PROTEİN DEGRADASYON YOLAKLARI

Ubikuitin-Proteazom Sistemi (UPS) ve otofaji, ökaryotlarda hücrel homeostazdan sorumlu iki önemli hücre içi kalite kontrol ve geri dönüşüm mekanizmasıdır.

UPS, kısa ömürlü, yanlış katlanmış ve çözünür proteinlerin degradasyonundan sorumluyken, otofaji, uzun ömürlü, kümelenmiş, çözünmeyen proteinlerin ya da hücre içi parazitlerin

(örneğin, bakteriler) ve hatta bütün haldeki organellerin (örneğin; Mt ve peroksizom) ortadan kaldırmasını sağlayan bir sistemdir (13).

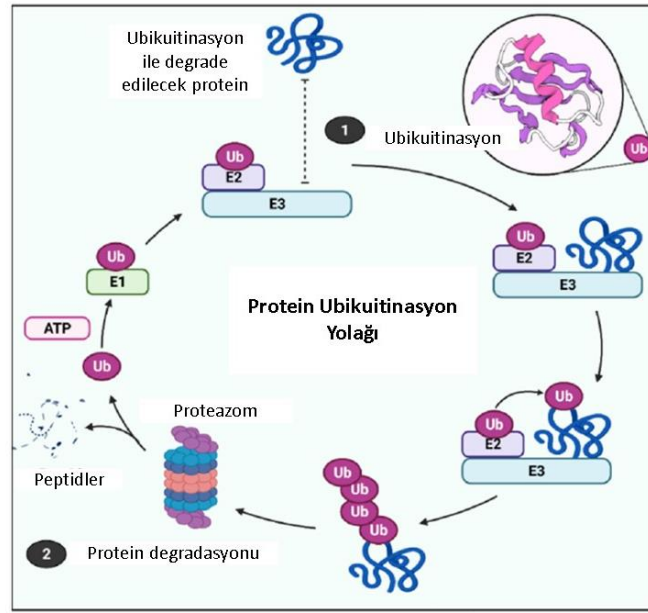
2.4.1. UBİKÜİTİN-PROTEAZOM SİSTEMİ (UPS)

Lizozomal olmayan yıkım yolu olup kısa ömürlü, hatalı sentezlenmiş veya hasarlı proteinlerin ubiküitin ile işaretlenerek proteazomlarda yıkılma sürecidir. Kısa ömürlü proteinlerin UPS yoluyla ayrışması, hedef proteinlere ubiküitin zincirlerinin ardışık ilavesiyle başlamaktadır. Çoklu-ubiküitinlenmiş proteinler proteazom adı verilen katalitik proteaz komplekslerinin 19S'lik bölgesi tarafından tanınarak, 20S'lik katalitik bölgede etkili şekilde parçalanmaktadır. Bu degradasyon yöntemi; protein kalite kontrolü, transkripsiyon, hücre döngüsü ilerleyişi, DNA onarımı, bağışıklık, hücre stres yanıtı ve apoptoz gibi pek çok hücresel süreç içinde yer almaktadır (48–52).

UPS temel olarak hücre içi proteinlerin lizozomal olmayan proteolizinden sorumludur. Ubiküitin, normal ya da patolojik hücre içi proteinlerin >%80'ini yok eden UPS'nin temel bileşenidir. Ubiküitin moleküllerinin, ubiküitin enzimleri tarafından hedeflenen proteinlere bağlanması ubiküitinasyon adlı bir post-translasyonel modifikasyondur. Ubiküitinlenen proteinlerin proteazom sistemi tarafından tanınarak proteazomal yıkımı ile parçalanır. Ama ubiküitinasyon sadece bunu sağlamaz bazen de hücre içi protein döngüsü veya bağışıklık sinyalizasyonu gibi diğer hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. 26S proteazomu, 2.5 MDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip dinamik, çok-alt birimli ve belirli proteinlere kovalent olarak bağlı ubiküitini tanıyan ve onları bozunma için hedefleyen ATP bağımlı bir proteazdır. Hasarlı, oksitlenmiş veya yanlış katlanmış proteinlerin yanı sıra birçok temel hücresel işlevi yöneten düzenleyici proteinler bu bozunma yolu ile uzaklaştırılmaktadır (53–55).

UPS kaskatı, ubiküitin yok edilecek protein substratına bağlamasını sağlamak için birlikte çalışan üç temel enzimle katalize edilir. Bu enzimler sırası ile: Ubiküitin aktive edici E1 enzimleri, ubiküitin-konjuge edici E2 enzimleri ve ubiküitin-ligaz E3 enzimleridir. İlk adımda, bir E1 enzimi, ATP varlığında ubiküitini aktive ederek, ubiküitin C-terminal glisinini ile E1'in sistein sülfidril grubu arasında bir tiyoester bağı kurar. Aktif ubiküitin daha sonra, ubiküitinasyon için substrat türünü belirleyen bir E2'nin aktif bölgesindeki sistein rezidüsüne transport edilir. Son aşamada ubiküitin, belirli bir E3 ligaz enzimi tarafından

özgül substratına kovalent olarak bağlanır. Üç aşamalı bu süreç, hedef substratların hızlı ve verimli bir şekilde her yerde bulunmasını sağlayarak hücrelerin değişikliklere dklar içinde uyum sağlamasına olanak tanımaktadır. Daha sonra sistem, ubiquitin (Ub) etiketli proteini parçalayan 26S proteazom aşaması ile devam eder ve etiketli protein tanındıktan sonra, proteazomla ilişkili deubikuitinazlar (DUB), ubiquitin zincirlerini geri dönüştürür, daha sonra substrat, iç proteolitik boşluğa taşınır ve kısa peptitler halinde sindirilir veya serbest amino asitlere parçalanır (Şekil 2.6.) (53,56–58).



Şekil 2.6. Ubikuitin-proteazom sistemi
Yadav ve ark.' dan adapte edilmiştir (56).

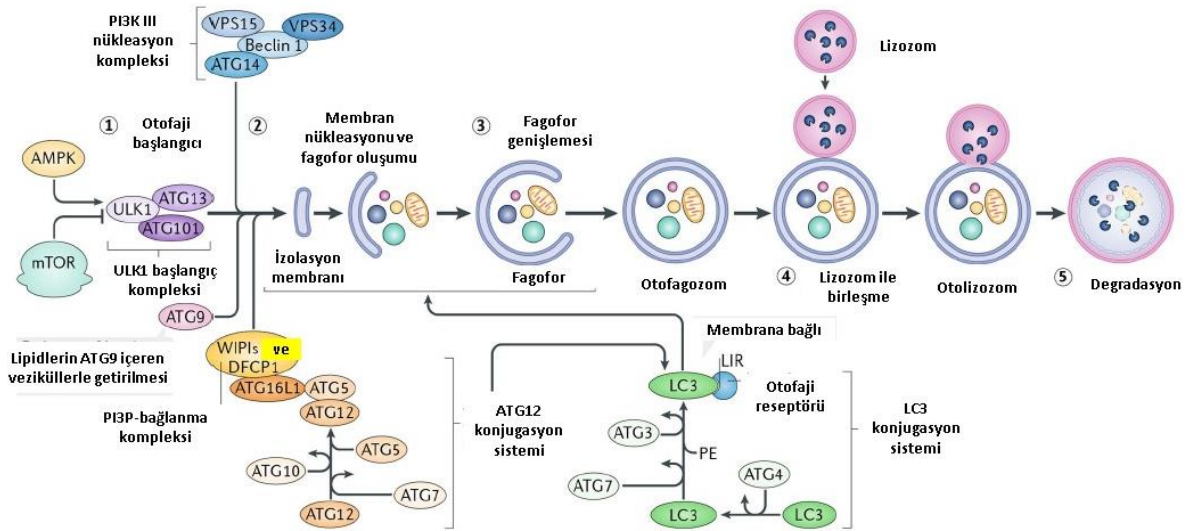
2.4.2. OTOFAJİ

Otofaji, işlevsiz makromoleküllerin veya organellerin temizlenmesi için gerekli olan evrensel bir hücresel homeostatik süreçtir. Amino asit gibi yapı taşlarının yeni hücresel bileşenler oluşturmak üzere kullanılabilmesi için; sitoplazmik içeriği, anormal protein kümelerini, fazla veya hasarlı organelleri parçalayan dinamik bir hücresel geri dönüşüm sistemidir.

Otofajide, yıkılacak protein, organel veya sitoplazmik içerik, izolasyon membranı ya da fagofor adı verilen çift katlı hücre membranı tarafından çevrelenerek otofagozom adı verilen yapıyı oluşturur. Bu oluşum sonrası otofagozom lizozomla kaynaşarak otofagozom

içeriğinin yıkıldığı ‘otolizozomları’ oluşturur ve daha sonra lizozomal enzimler yoluyla bu yapı içindeki hücresel bileşenler bozunarak parçalanır (Şekil 2.7.) (13). Otofaji genellikle besin yokluğu sonucu aktive olur, ancak aynı zamanda gelişim, farklılaşma, nörodejeneratif hastalıklar, stres, enfeksiyon, obezite ve kanser gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerle de ilişkilendirilmektedir (59,60).

Otofaji, ya doğrudan hücre ölümü oyuncularını hedefleyerek ya da dolaylı olarak hücresel dengeyi ve biyoenerjiyi koruyarak hücrenin hayatta kalmasını modüle etmektedir. Bununla birlikte, akut veya birikmiş stres altında, otofaji, yüksek düzeyde düzenlenmiş bir sinyalizasyon ile ya da daha kontrolsüz bir yol olan inflamasyon şeklinde, farklı hücre ölüm yollarının aktivasyonuna neden olabilmektedir. Benzer şekilde apoptotik veya nekroptotik faktörler de otofajinin düzenlenmesinde yer alırken, özgün faktörler ile de her iki süreç düzenlenmektedir (61,62).



Şekil 2.7. Otofaji yolağı
Hansen ve ark.’ dan adapte edilmiştir (63).

Otofajinin moleküler mekanizması, büyük oranda mayalarda (*C.elegans*) keşfedilmiştir. Süreci düzenleyen genlere de otofaji ilişkili genler (*Autophagy Related Gene-Atg*) olarak isimlendirilmiştir. Memelilerde bir serin/treonin kinaz enzimi olan Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1 (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1-ULK1*), otofaji indüksiyonunda önemli rol oynamaktadır. Rapamisinin memeli hedefi (*Mammalian target*

of rapamycin-mTOR)'un Akt serin-treonin kinaz veya Mitojenle etkinleşen protein kinaz (Mitogen-activated protein kinase-MAPK) enzimleri aracılı aktivasyonu, ULK1'in inhibisyonuna ve otofajinin baskılanmasına sebep olurken, mTOR'un p53 ve AMPK aracılı negatif düzenlenmesi ise bu inhibisyonu hafifleterek otofajinin gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca, AMPK, ULK1'i doğrudan fosforile ederek aktive edebilmektedir. ULK1, Atg13 ve iskele proteini FIP200 ile bir kompleks oluşturur (62–64).

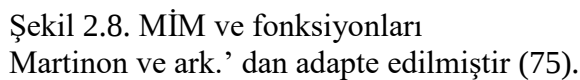
ULK1 üzerinden başlayan sinyalizasyon, fosfoinositid 3-kinaz sınıf III'ü (PI3K sınıf III veya hVps34) aktive eder, bu lipit kinaz fosfatidilinositol-3-fosfat (PIP3)'ı oluşturur ve p105/Vps15, Beclin-1, UVRAG, Atg14 ve Rubicon ile büyük bir kompleks meydana gelir. Otofaji sinyali uyarıldığında, sitoplazmik veziküllerden gelen zarlar toplanır ve kaynaşarak fagofor oluşturur. PI3K sınıf III kompleksi, fagofor lipitleri üzerine etki ederek otofajik proteinler için bağlanma bölgeleri yaratır ve otofagozomların oluşumunu başlatır (62,65,66).

Otofagozomun oluşumu için ubikuitin-benzeri konjugasyon sistemi, Atg12-Atg5 ve LC3-fosfatidiletanolamin (LC3-PE) gerekmektedir. İlk konjugasyon reaksiyonunda, Atg12, ubikuitin E1 benzeri enzim Atg7 ve E2 benzeri enzim Atg10 tarafından Atg5'e kovalent olarak bağlanır. Atg12-Atg5 konjugatı daha sonra Atg16L1 ile bir kompleks oluşturularak fagofor membranına yerleşir. İkinci konjugasyon adımı Atg4 aracılığıyla, LC3, lipitasyon için ilk adım olan C-terminalinden kesime uğrar ve LC3-I'e dönüşür. LC3-I daha sonra Atg7 ve Atg3 (sırasıyla E1- ve E2 benzeri enzimler) yardımı ile PE'ye konjuge edilir. Lipitasyon ardından LC3-II olarak adlandırılan LC3 formu, otofagozom zarına bağlanır. Bu süreç boyunca fagofor zarı genişlemeye ve bozunma için belirlenen sitoplazmik bileşenleri içine almaya devam etmektedir. LC3'e bağlanan bir ubikuitin bağlayıcı protein olan Sekestozom (*Sequestosome 1*-SQSTM1 (p62)), yıkım için otofagozoma SQSTM1 içeren protein agregatları aktararak yıkım için sinyal oluşturur (65,67–69).

2.5. MİTOKONDİRİ İLİŞKİLİ MEMBRAN (MİM)

ER ve Mt'nin birbirleriyle fiziksel temas halinde oldukları bölge MİM olarak adlandırılır. Dijital 3D dekonvolüsyon mikroskop ile yapılan gözlemlerde MİM bölgesi incelenmiş ve yaklaşık % 20 mitokondriyon yüzeyinin dolaylı olarak ER ile temas halinde olduğu görülmüştür (70,71). Temas bölgeleri 10-30 nm olarak ölçülmüştür (72). MİM bölgesi lipit ve Ca^{+2} alış verişinin sağlandığı bölge olduğundan, bu iki organel arasındaki iletişim

MİM bölgesi organizasyonunda iki organelde iletişim/etkileşime giren çok sayıda protein mevcuttur. MİM bölgesindeki proteinler pek çok farklı fonksiyona sahiptir ve kurdukları komplekslerle hücre içerisinde; lipid biyosentezi ve transportu, Ca^{+2} sinyalizasyonu ve transferi, Mt fonksiyonları (Mt fisyon/füzyon ve Mt dinamikler), hücre sağkalımı (otofaji, apoptoz gibi), inflamatuvar fonksiyonlar ve metabolik homeostaz fonksiyonları gibi önemli roller üstlenmektedir (Şekil 2.8.) (75–77).



14

Mt'de oluşan KPY birbirlerini etkileyerek ortak hücrel yanıtın verilmesini de sağlayabilmektedir (78).

Mt'de bulunan Voltaj Bağımlı Anyon Kanalı 1 (*Voltage Dependent Anion Channel 1-VDAC1*), ER üzerindeki IP3R ve bu iki yapının temasını sağlayan moleküler şaperon GRP75, MİM yapısında bulunmaktadır. Sigma 1 Reseptörü (*Sigma 1 receptor-Sig-1R*) ise; iki organel arasındaki ilişkiyi düzenleyen bir diğer önemli proteindir (79). ER üzerindeki IP3R'den bazal şartlarda Ca^{+2} salınması mitokondriyal biyoenerjetik kontrol etmektedir. IP3R'nin susturulması ATP üretimini azaltarak mitokondriyal fonksiyonu bozmakta ve otofajiyi tetiklemektedir (80).

2.6. APOPTOZ

Apoptoz, nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi, hücre membran kabarcıklaşması, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu ile karakterize olan ve sıkı bir şekilde kontrol edilen programlı bir hücre ölüm sürecidir. Apoptozun temel düzenleyicileri, iki geniş kategoriye ayrılan bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlardır.

'Başlatıcı'(initiator) kaspazlar (Kaspaz-2, -8, -9, -10 ve -12) akış yukarı yöndeki (upstream), proapoptotik sinyallerle yakından ilişkilidir ve akış aşağı yönde çalışan (downstream) 'tamamlayıcı'(executioner) kaspazları (Kaspaz-3, -6 ve -7) parçalayarak ve etkinleştirerek programlanmış hücre ölümünden nihai olarak sorumlu olan proteinleri değiştirirler (81–83).

Kaspaz aktivasyonu içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) olarak iki ana apoptotik yola ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.9.).

2.6.1. İÇSEL (İNTRİNSİK) APOPTOZ YOLAĞI

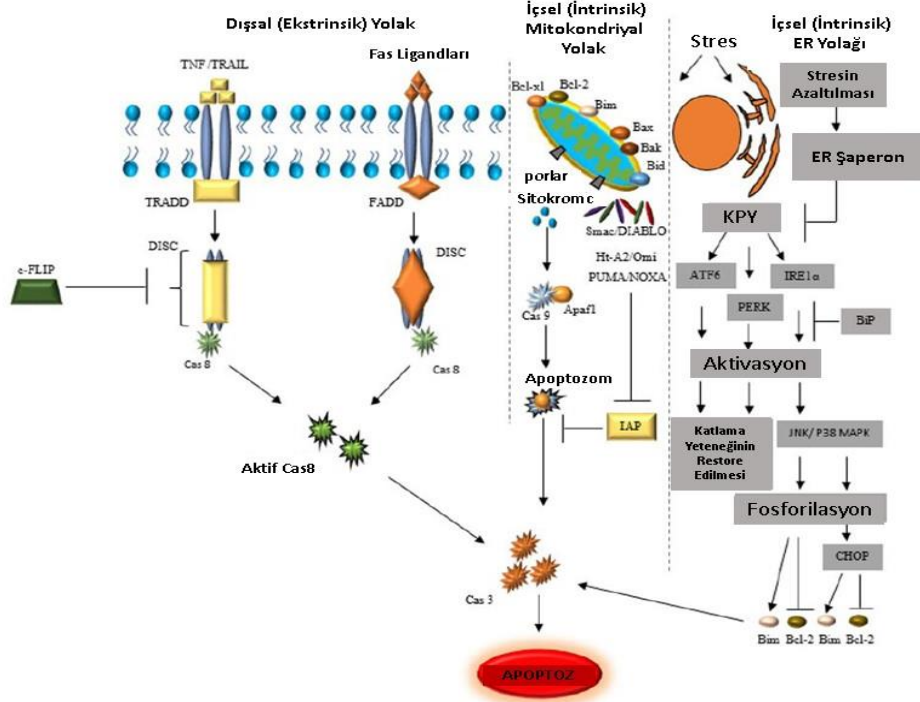
İçsel (intrinsik) apoptoz yolağı, hücrel stres, DNA hasarı, gelişim basamakları veya sağkalım faktörlerinde oluşan problemlerle aktive olmaktadır. Bu yolağı, 3 sınıfa ayrılmış Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Bunlar: pro-apoptotik efektörler (Bax ve Bak); sadece pro-apoptotik BH3 sınıfı proteinleri (Bad, Bid, Puma, Bim, Noxa, Bmf, Hrk ve Bik); ve anti-apoptotik proteinlerden (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1, a1/Bfl1) oluşmaktadır. Pro-apoptotik efektörler mitokondriyal membrana yerleşik halde bulunmakla beraber mitokondriyal geçirgenliği ve sitokrom c, AIF, Smac/Diablo, HtrA2, Endo G ve diğerlerinin

salınımını kontrol etmektedirler. Pro-apoptotik efektörler, sadece BH3 sınıfı proteinleri tarafından anti-apoptotik proteinlerin doğrudan etkileşimi veya antagonizmi yoluyla aktive edilmektedir. Sadece BH3 sınıfı üyeleri, apoptotik uyaranlar tarafından; transkripsiyon düzeyinde fosforilasyonla ya da farklı post-transkripsiyonel modifikasyonlar aracılığı ile düzenlenmektedir. Bcl-2 proteini etkisi ile salınan sitokrom c nin Apaf-1'e bağlanması ile çiçek benzeri bir yapıya sahip multiprotein kompleksi apoptozom oluşur, çiçek benzeri yapı kaspaz-9'a bağlanarak onu aktive etmekte ve bu yapılanma kaspaz-3'ün bölünerek apoptozun devamı ile sonuçlanmaktadır (84–86).

KPY başarısızlığı da içsel veya dışsal yollar üzerinden apoptozun ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Örneğin; bir KPY elemanı olan IRE1 α 'nın aktivasyonu, Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*-ASK-1)'in aktive olması ile c-Jun-N-Terminal Kinaz (JNK)'ı ve p38 Mitojenle Aktif Olan Protein Kinaz (*p38 mitogen-activated protein kinase*-p38MAPK)'nın uyarılmasına neden olmaktadır. Bim'in fosforilasyonu ve Bcl-2'nin inhibisyonu, apoptotik süreci olanaklı kılar. CHOP'un P38MAPK tarafından fosforilasyonu, sırası ile Bim protein ekspresyonunu arttırmak ve Bcl-2 proteinini inhibe etmek için CHOP'u aktive etmektedir (87). Sonuç olarak içsel (intrinsik) apoptoz yolağı Mt ya da ER üzerinden 2 ayrı şekilde ilerleyebilmektedir.

2.6.2. DIŞSAL (EKSTRİNSİK) APOPTOZ YOLAĞI

Kaspazlar ayrıca dışsal (ekstrinsik) veya ölüm reseptörü yolları ile de aktive olmaktadır. Ölüm reseptörleri, TNFR ailesinin üyelerinden (TNFR1/2, Fas ve DR3/4/5/6) ve bunlarla ilişkili ligandlardan (TNF- α , FasL, TRAIL, TWEAK) oluşmaktadır. Ligand bağlanması, reseptör aktivasyonunu ve FADD veya TRADD adaptör proteinlerinin ölüm domeni (Death Domain-DD) ile bağlanmasını indükler. Liganda bağlı reseptör, adaptör protein ve procaspaz-8, kaspaz-8'i aktive eden ve aşağı akış apoptotik sinyalizasyonu başlatan multiprotein kompleksi Ölümü-indükleyen sinyal kompleksi (*Death-inducing signaling complex*-DISC)'i oluşturur. TNF-ailesi sitokinlerin sinyalizasyonu ya DISC yoluyla apoptoza ya da Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) aktivasyonu ile Bcl-2 ve Fokal adhezyon kinaz ailesi etkileşimli protein 200kD (*Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD*-FLIP) 'nin aktivasyonu ile hücre sağkalımına yönelmektedir (81,85,87).



Şekil 2.9. Apoptoz yolları
Obeng' den adapte edilmiştir (87).

2.7. OTOFAJİ VE HÜCRE ÖLÜMÜ

Hücresel geri dönüşüm, hem hücre sağ kalımı hem de organizmanın homeostazının korunması için gerekli bir süreçtir. Bu temizlik mekanizmaları, hücre ölüm yolları aracılığı ile ya yok olmayı önlemek ya da fazla hasar birikimi nedeniyle hücre yıkımını teşvik etmek için çift yönlü olarak çalışmaktadır.

Otofaji ilk etapta genel bir yıkım yolağı olarak düşünülmüş ancak daha sonra makromolekülleri ve organelleri litik organel lizozom aracılığı ile sindiren oldukça seçici ve çok basamaklı bir katabolik mekanizma olarak kabul edilmiştir. Otofaji normal koşullarda bazal düzeyde sürekli gerçekleşirken, aynı zamanda besinsel, oksidatif, hipoksik stresler veya DNA hasarı gibi sorunlar sonucu da indüklenebilmektedir (61).

Temel otofaji makinası bileşenlerinde veya selektif otofaji reseptörlerinde meydana gelecek işlev bozuklukları çok sayıda hastalığa, hücrede transformasyona veya nörodejenerasyona sebep olmaktadır (88).

Hücre ölümü, fizyolojik olarak kusurlu veya gereksiz hücrelerin ortadan kaldırılması veya hastalık durumunda kontrolsüz ilerleyen hücre döngüsünün önüne geçilebilmesi için meydana gelmektedir otofajiye oranla apoptotik hücre ölümü hakkında daha fazla bilgi mevcuttur ve sınırları daha iyi karakterize edilebilmiştir. Buna karşın otofajik hücre ölümü son dönemlerde dikkat çekmeye başlamıştır (89).

Apoptoz, klasik bir programlı hücre ölüm yolağıdır. Gelişim ve doku homeostazı için gereklidir. Enerji gerektiren bu süreçte, DNA fragmente olur ve çekirdek küçülerek apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptoz içsel (intrinsik) yolak ve dışsal (ekstrinsik) yolak olarak ikiye ayrılmıştır. Hücreler uygun boyutunu korumak ve proliferasyonu dengeleyerek doku bütünlüğünü kontrol altına almak için apoptoza uğramaktadır (90).

ULK1 gibi özgün otofaji bileşenleri, otofaji-bağımlı hücre ölümünde (*Autophagy Dependent Cell Death*-ADCD), rol almaktadır ve hücre yıkım sürecinin ilerlemesinden de sorumludur. Ek olarak diğer hücre ölüm tiplerinde de otofajinin gerçekleştirdiği roller mevcuttur (91).

Otofaji temel bileşenleri olan Atg genlerinin inhibisyonunun hücre ölümünü hızlandırması, otofajinin hücre sağkalımı rolünü ön plana çıkarmaktadır (92–95). Stres altında otofajinin, stres kaynaklı hasarı hafifletmek ve metabolik homeostazı korumak için adaptif bir yanıt mekanizması olarak çalıştığı genel olarak kabul edilmektedir (96–101). Bu hayatta kalma yanlısı etkiler, diğerlerinin yanı sıra, esas olarak, hücresel biyoenerjetiklerin restorasyonunu ve ayrıca toksik protein agregatlarının veya hasarlı organellerin ortadan kaldırılmasını içerir, aksi takdirde apoptotik veya nekroptotik mekanizmaların aktivasyonu tetiklenebilmektedir (102–105). Bununla birlikte, otofaji, farklı hücresel koşullarda hücre ölümüne hizmet eden proteinlerin aktivitesini azaltan seçici mekanizmalar aracılığı ile de hücre ölümünü doğrudan engelleyebilmektedir (106–108).

Ancak otofaji her zaman hücre sağkalımı doğrultusunda hizmet etmeyebilir. Bazı koşullarda otofaji hücre ölümünü indükleyen ve/veya hücre ölümünün ön koşulu olarak rol alan bir mekanizma olmaktadır. Genellikle stres halindeki hücrenin sağ kalımı için devreye giren bir yanıt mekanizması olarak ilk sırada gelmekte olan otofaji, stres kritik bir sınırı aştığında ve ortaya çıkan hasar giderilemediğinde 'intihar' programlarını devreye sokarak ve hücre ölümüne götürmektedir. Yapılan çalışmalarda ölüme giden hücrelerde sıklıkla görülen gelişmiş otofajik karakteristikler, hücre ölümünde otofajinin öncü rolünü desteklemektedir. Bununla

birlikte, yine yapılan çalışmalarda, otofajik akıştaki başarısızlığın hücre ölümünü tetikleyip tetiklemediği veya otofajik faktörlerin hücre ölümü aktif olarak düzenleyip düzenlemediği henüz netlik kazanmamıştır. Otofajinin hücre ölümüne hizmet ettiği 'otofaji aracılı hücre ölümü' ve 'otofaji-bağımlı hücre ölümü' olmak üzere iki alt kategori tanımlanmıştır (109,110).

Özetle, otofajinin hem hücre sağkalımına hem de hücre ölümüne hizmet eden görevleri vardır. Hücreleri canlı ve metabolik olarak stabil tutmak için, otofaji, stres veya hasara yanıt olarak anabolik süreçleri kapatmak üzere uyarılmakta hücre onarımı ile daha fazla hasar oluşumunu engellemektedir. Hücre ölümü belli bir eşiğin üzerine çıktığı zaman ise doku homeostazı sürdürmek üzere onarılamaz hücreleri ortadan kaldırmak için hücre ölüm yollarını devreye sokmaktadır. Kusurlu apoptozlu hücrelerde, otofaji, hücre ölümü için bir yedekleme stratejisi veya nekroz gibi diğer hücre ölümü biçimlerini de teşvik eden mekanizma olarak hizmet etmektedir (86).

Otofaji ve hücre ölüm yolları arasında karmaşık ve karşılıklı bir iletişim mevcuttur. Hücrenin akibetine verilecek kararı kontrol eden mekanizma ve bu süreç içindeki etkileşimler henüz tam olarak açıklanamamıştır. Otofajinin sitoprotektif veya sitosidal rolünü destekleyen çalışmaların çoğu, genetik ve farmasötik manipülasyonlar üzerine hücre hatlarında *in-vitro* olarak gerçekleştirilmektedir. Bu konuda henüz yeterince *in-vivo* çalışma bulunmamaktadır.

2.8. PARKİN PROTEİNİ

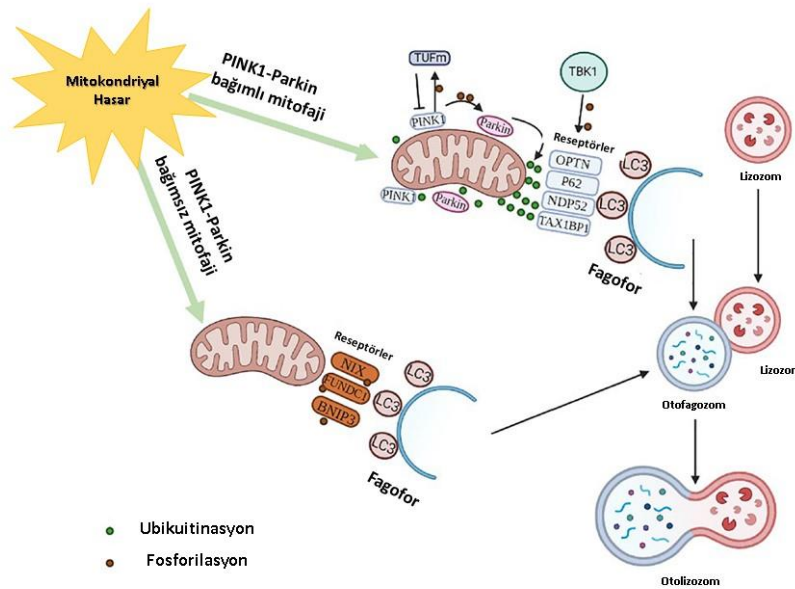
Parkin proteini, pek çok hücre tipinde mitokondriyal otofajiye veya mitofajiye aracılık eden bir E3 ubiquitin ligazdır aynı zamanda UPS'nin de önemli bir bileşenidir. Ubikuitinasyon, ubiquitin hedef proteinlere kovalent olarak bağlanmasını içeren bir post-translasyonel modifikasyondur ve ubiquitinasyon süreci, sırasıyla E1, E2 ve E3 enzimleri tarafından katalize edilen ubiquitin aktivasyonu, konjugasyonu ve ligasyonu dahil olmak üzere bir dizi olayı gerektirmektedir (111).

Mitokondriyal serin/treonin-protein kinaz ailesi üyesi olan PINK1 ve Parkin mitokondriyal kalite kontrol sisteminde birlikte hareket etmektedir. Fonksiyonu bozulan Mt dış membranında biriken PINK1, sitozolik Parkin'i Mt'ye çeken sinyali oluşturmaktadır. Parkin

Mt dış membranında bulunan bazı proteinleri (Mitofusin 1 ve 2) ubiquitinleyerek fragmentasyona uğrayan hasarlı Mt'nin sağlıklı bölgeden ayrılıp mitofaji ile yıkıma gitmesini sağlamaktadır (112).

Mitofaji, bazen normal fizyolojik koşullar gereği gerçekleşen bazen de bir hücreden hasarlı veya gereksiz mitokondriyonun çıkarılması için özel olarak tasarlanmış seçici bir otofaji tipidir. PINK1-Parkin bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki farklı mitofaji tipi vardır (Şekil 2.10.).

PINK1-Parkin bağımlı mitofajide, PINK1, mitokondriyal sağlığın moleküler bir sensörü olarak hizmet eder, Parkini ortama çekip etkinleştirmek için gereken sinyalleri algılar. Daha sonra ortama gelen Parkinin mitokondriyal membran proteinlerini çoklu-ubikuitinlemesi ile otofaji adaptör proteinleri LC3-etkileşim bölgesine (*LC3 interaction site-LIR*) yerleşir ve otofagozom oluşumu sağlanır. Ubikuitinden bağımsız olan ikinci yolda ise kendi LIR bölgelerine sahip olan mitokondriyal membran proteinleri aracılığıyla diğer yoldan farklı olarak doğrudan otofagozom oluşumunu indüklemektedir. Bu sürece, ubikuitinden bağımsız olarak işlenmiş LC3 ile etkileşime girebilen NIX, FUNDC1, BNIP3 gibi mitofaji reseptör proteinleri aracılık etmektedir (66,113–116).



Şekil 2.10. Mitofaji yolları
Zhu ve ark.' dan adapte edilmiştir (116).

2.8.1. PARKİN PROTEİNİNİN DİĞER FONKSİYONLARI

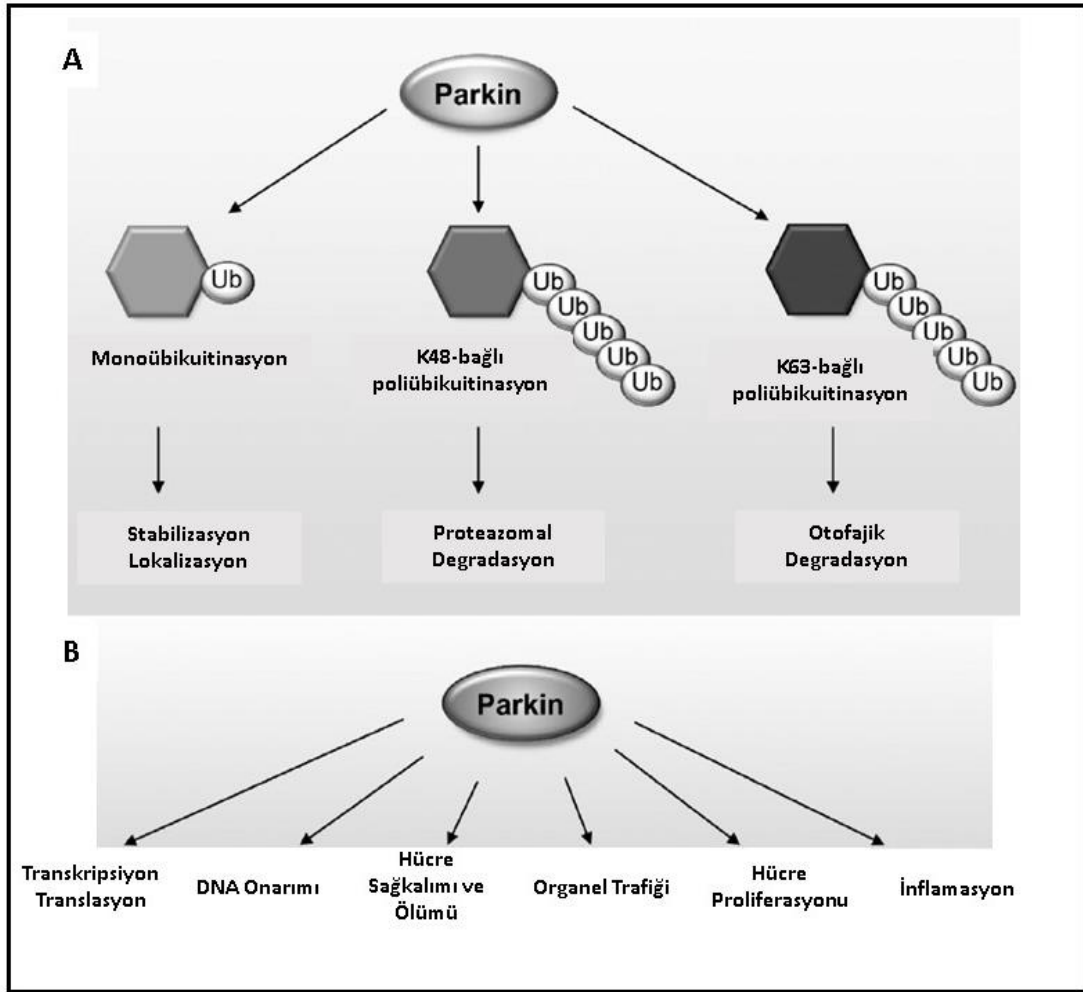
Erken Başlangıçlı Parkinson Hastalığı'nın fenotipi ile ilişkili protein Parkin ile ilgili çalışmaların çoğu Parkin'in mitofajideki rolüne odaklanırken, güncel olarak biriken kanıtlar Parkin'in hücre fizyolojisi ve işlevini de etkileyebileceğini göstermektedir (117).

Yapılan çalışmalar sonucunda, Parkin'in hücre fizyolojisi etkilediğini ve mitofajiyle ilgili olmayan diğer yollarla da işlev gördüğünü gösterilmiştir. Genellikle Parkinin bu süreçlerdeki görevlerinde E3 ubiquitin ligaz aktivitesi gereklilik göstermektedir, çünkü Parkinin ubiquitinasyon özelliği sayısız hücre fizyolojisi süreci düzenlemede rol almaktadır. Proteinlerin otofaji veya proteazom yoluyla parçalanması, bir proteinin hücre içerisindeki konumunun değişmesi ya da protein-protein etkileşimlerinin değişimi ubiquitinasyona bağlı süreçlerdir (Şekil 2.11.(A)) (111,117).

Parkin, mitokondriyal kalite kontrole ek olarak çok sayıda hücre fizyolojisi süreci etkileme potansiyeline sahiptir (Şekil 2.11.(B)). Transkripsiyon, translasyon, DNA onarımı, organel trafiği, hücre sağkalım/ölüm olayları, hücre proliferasyonu ve inflamasyon dahil olmak üzere pek çok yolda Parkin proteininin önemli rolü olduğu raporlanmıştır (118–123).

Parkin proteinini kodlayan *Park2* geninde oluşan mutasyonların özellikle Erken Başlangıçlı Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu bilinmekle birlikte, son yıllarda kanser, otizm, Alzheimer ve Tip 2 diyabet ile de ilişkisi gösterilmiştir (124).

SH-SY5Y (H), Neuro2a, Goto-P3, SH-SY5Y (J) ve IMR32 gibi farklı nöroblastoma hücre hatlarında 2-merkaptetanol veya tunicamisin gibi farklı ER stres ajanları uygulandığında *Park2* geninin ifadenmesindeki farklılıklar raporlanmış ve Parkinin ER stres ve oksidatif strese karşı olan koruyucu etkisinin hücre tipi ve stres uyaranlarına bağlı olduğu da gösterilmiştir (14).



Şekil 2.11. (A) Parkin'in katalize ettiği farklı ubiquitin bağlanma modelleri, (B) Parkin'in düzenlenmesinde rol aldığı düşünülen çeşitli hücresel süreçler Shires ve ark.' dan adapte edilmiştir (117).

HeLa ve SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda, ER-Mt arası konuşmada Parkin proteininin varlık/yokluk durumu ve miktarındaki değişimlerin Ca^{+2} homeostazı ve ATP üretimi açısından değerlendirilmesi ile Parkin'in mitokondriyal homeostazının düzenlenmesinde, Ca^{+2} 'nin sinyalizasyonunda, hücre sağkalımında ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde etkin rolü olduğu gösterilmiştir (125).

Primer fare kortikal nöronlarında ve SH-SY5Y nöroblastoma hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada kullanılan kompleks I inhibitörü Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon (*Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazon-CCCP*) ile yaratılan mitokondriyal stresin Parkin protein miktarını artırdığı ve bu artışın Parkin promotörü üzerindeki özgün bağlanma bölgesi cAMP-yanıt elemanı bağlayıcı protein (*cAMP-response element binding protein-*

CREB)/ATF'ye bağlanan ve ER-KPY üyesi olan ATF4 tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada mitokondriyal stresin ER stresini tetikleyerek KPY'nin aktifleşmesine neden olduğu saptanmıştır. Stres koşullarında ifadelenmesi artan Parkin'in stresin indüklediği hücre ölümüne karşı hücreleri koruduğu da gösterilmiştir (126).

İnsan hepatositlerinde yapılan bir çalışmada 24 saat 250 μ M PA'ya maruz kalan hücrelerde Mt ve ER'nin büyüdüğü, lipid dropletlerin ve organellerin otofagozomlar içine alındığı gösterilmiştir. PA ile oluşan lipotoksisitenin; apoptoz, otofaji ve ER stres ile ilişkili protein miktarını artırdığı ve sonuç olarak hücre canlılığının ve ATP üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda otofajinin bloklanmasının, PA'nın neden olduğu sitotoksisiteyi şiddetlendirip hücresel bileşenlerin kaybolmasına neden olduğu belirtilmiştir (127).

İzole sıçan kardiyak miyositlerinde Parkin overekspresyonunun, hipoksi ile indüklenmiş apoptoza karşı koruyucu özelliği olduğu gösterilmiştir, glial hücrelerdeki Parkin proteininin eksikliğinin ise hem apoptoza hem de nekroza yatkınlık oluşturduğu gözlenmiştir (107,128).

Mt dış membranından iyon ve küçük moleküllerin transportunu sağlayan Voltaj bağımlı iyon kanalı VDAC1'in Parkin tarafından mono ya da poli-ubikuitinasyonunun mitofaji ve apoptoz arasında bir karar mekanizması olduğu, dış mitokondriyal membran proteinini VDAC1 Parkine bağlı mono-ubikuitinasyonunun mitokondriyal Ca^{+2} alımını negatif olarak düzenleyerek hücreyi apoptoza karşı koruduğu gösterilmiştir (129).

Nöroblastom hücre hattı N2a hücrelerinde Parkin proteininin transfeksiyon aracılı olarak overeksprese edilmesi ile otofajinin artıp, apoptozun azaldığı gözlenmiş ve bu iki hücre ölüm yoluğu arasında Parkin proteininin düzenleyici rolü bildirilmiştir (130).

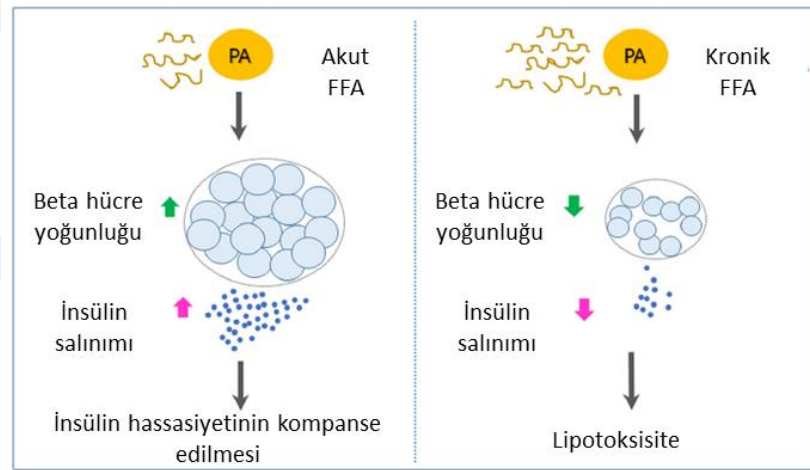
TSM1 nöron hücre hattında yapılmış bir çalışmada Parkin'in, ubikuitin ligaz aktivitesinden bağımsız olarak, transkripsiyonel baskılayıcı şekilde hareket edip proapoptotik p53 geninin ekspresyonunu azalttığı da gösterilmiştir (131,132).

Sıçan pankreatik islet hücre hattı olan INS-1E hücrelerinde ifadelenen *Park2* geninin siRNA ile susturulması sonucu glukozun stimüle ettiği insülin salınımında, hücre içi insülin ifadelenmesinde ve hücre içi ATP seviyesinde önemli bir düşüşe neden olduğu, β hücrelerinde ROS üretiminin ve mitokondriyal fragmentasyonun arttığı ve buna ek olarak membran potansiyelinin azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışma, *Park2* geninin β hücrelerinin

fonksiyonunun korunmasında ve hücre sağkalımında önemli olduğunu gösteren ilk çalışma olmuştur (133).

2.9. LİPOTOKSİSİTE AJANI OLARAK PALMİTİK ASİT (PA)

T2D gibi prevelansı gittikçe artan bazı hastalıklar ile ilişkili metabolik faktörler arasında FFA ön plana çıkmaktadır. T2D için majör bir risk faktörü olan ve obezite sırasında, visceral yağ dokusundan salınan FFA, portal ven yoluyla doğrudan karaciğere taşınır ve hepatik insülin direncine yol açar. İnsülin direnci ile ilişkili en iyi karakterize edilmiş FFA'lardan biri olan PA'nın kültür koşullarındaki hücre hatlarında lipotoksisteye neden olduğu gösterilmiştir. Pankreatik β hücrelerinde gereğinden fazla süre ve miktarda maruz kalındığı takdirde lipotoksiste ve apoptoza neden olan en yaygın serbest yağ asiti de PA'dır (134–136).



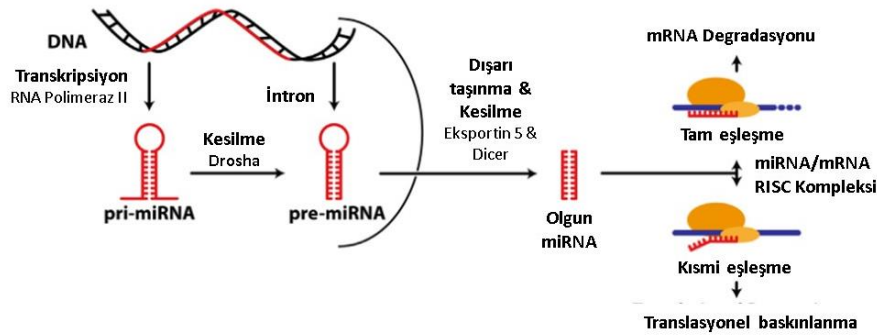
Şekil 2.12. Pankreatik β hücrelerinde lipotoksiste gelişimi
Yoon ve ark.' dan adapte edilmiştir (136).

FFA'lar kimyasal olarak doymuş ve doymamış FFA'lar olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Diyet ve serumda en fazla bulunan doymuş FFA PA olup; 16 karbonlu uzun zicirli bir yağ asitidir. Yapılan çalışmalar doymuş yağların lipotoksik etkisinin doymamış olanlara göre daha fazla olduğunu göstermiştir (137). Hücre içi artmış seviyede PA, Mt'de oksidasyona uğrayarak zararlı kompleks lipidler olan diaçilgliserole (DAG) ve seramide dönüşür. Hücre içinde artmış DAG ve seramid ise birçok yolağı etkilemektedir. Artmış seramid sentezi çeşitli yollar üzerinden insülin direncine neden olurken, organeller üzerinde de etkisi bulunmaktadır. ER stresine sebep olurken; Mt'de de yağ asitlerinin β oksidasyonunun inhibisyonu, ROS artışı ve mitokondriyal strese de sebep olmaktadır (138).

2.10. MİKRO RNA (miRNA)

MikroRNA (miRNA), 20-25 nt uzunluğunda kodlamayan RNA molekülüdür. Çalışma mekanizması protein kodlayan genlerin mRNA'sına bağlanarak gen ifadesini kısmen ya da tamamen baskılamasına dayanmaktadır (139). miRNA'lar genlerin intron-ekzon bölgeleri ya da genler arası bölgelerden oluşturulmaktadır. miRNA'lar pek çok organizmada evrimsel olarak korunmuş diziler olup; hedef genleri baskılayarak hücresel süreçlerde (farklılaşma, çoğalma, sağ kalım/ölüm süreçleri) önemli rol oynamaktadırlar. miRNA'ların çoğu tek başına birden fazla hedef geni de baskılayabilmektedir (115,139,140).

miRNA'lar, RNA tarafından tetiklenen susturulmuş kompleks (RISC)'e entegre olup, ya argonat (AGO) proteini yardımıyla mRNA'nın yıkımına neden olmakta ya da protein translasyonunun baskılanmasını sağlamaktadır. miRNA'lar çekirdek bölge adı verilen ve yüksek oranda korunmuş 6-8 nükleotitik bir kısım ile hedef mRNA ile etkileşime girmektedir (141). miRNA ve hedef mRNA arasındaki komplementerlik seviyesine göre hedef gen miRNA tarafından iki yolla negatif olarak regüle edilmektedir (142). Komplementerliğin çok yüksek olduğu durumlarda hedef mRNA RISC kompleksi tarafından degrade edilmekteyken, diğer yolda ise RISC kompleksindeki miRNA'lar aracılığı ile mRNA'ların poli-A kuyruğu ve 5'-cap yapıları yok edilmektedir. Bu şekilde her iki yolla da mRNA işlevsiz hale gelmektedir (Şekil 2.12.) (143,144).



Şekil 2.13. miRNA biyogenezi
Latreille ve ark.' dan adapte edilmiştir (144).

2.10.1. LİPOTOKSİSİTE ve miRNA

miRNA'lar; hücre proliferasyonu, hücre döngüsü basamakları, hücre apoptozu, hücre farklılaşması ve daha pek çok hücreyel yolakta hayati öneme sahiptir (145). Günümüzde miRNA'ların FFA'nın neden olduğu lipotoksiste sonucu pankreatik β hücre fonksiyon kayıpları ile ilişkili olduğunu gösteren çok fazla sayıda çalışma yayınlanmıştır. Mevcut veriler obeziteye ve T2D'ye yol açan glukotoksik, lipotoksik ya da her ikisinin bir arada olduğu glukolipotoksik yaşam tarzı faktörlerinin pankreatik adacıklardaki β hücrelerinde miRNA ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir (146). Güncel verilerle, β hücrelerinin kimliği (sayı ve büyüklük), ve bu hücrelerden salınan insülin de dahil olmak üzere β hücre fizyolojisinin temel düzenleyicileri olarak miRNA'lar ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda T2D donörleri veya diyabetik hayvan modellerinden elde edilen pankreatik β adacıklarda değişen miRNA ekspresyonu da bunu desteklemektedir (147,148).

Yapılan çalışmalarda yağdan zengin diyetle beslenen kemirgenlerde hiperglisemi gelişimi gözlenmiş bununla birlikte miRNA ekspresyonlarında değişimler saptanmıştır. Aynı şekilde sıçan islet kültüründe de glukolipotoksik koşullarda hiperglisemi ve değişen miRNA ifadenme seviyeleri gösterilmiştir (149–151). Belli bir süre boyunca ketojenik diyetle beslenen farelerdeki değişen miRNA ekspresyonunun beslenme düzeni normale döndüğünde tekrar eski seviyelerine döndüğü gösterilmiştir (152). Hiperlipitemi durumunda, β hücrelerindeki lipotoksik etkiyi hafifletici ve adaptatif bir mekanizma olarak spesifik bir miRNA'nın ekspresyonunda yükselme gözlenmiştir (153). miRNA'ların PA'ya bağlı lipoapoptozdaki etkisinin incelendiği bir çalışmada, INS-1 hücrelerine PA uygulaması ardından miRNA seviyesindeki artış ve azalışın PA'ya bağlı apoptozu desteklemesi ya da PA'nın neden olduğu sitotoksisteyi hafifletici etkisinin olduğu bildirilmiştir (154).

INS-1 hücrelerinde palmitat ile lipotoksistenin indüklendiği başka bir çalışmada ise belli bir miRNA ekspresyonunda artış ve hücre canlılığında azalma saptanırken, ilgili miRNA inhibitörleri ile muamele sonrası hücre canlılığında artış ile palmitat indüklü apoptozda azalma bildirilmiştir (155).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Çeşitli uyaranlarla oluşan veya hücre akışında meydana gelen kusurlar sonucu ortaya çıkan organel stresi, Ca^{+2} homeostazındaki bozulma ve bununla ilişkili ortaya çıkan metabolik sorunların; insülin direnci, T2D, nörodejeneratif bozukluklar, viral enfeksiyonlar ve bazı kanser türlerini ortaya çıkaran alt yapıyı oluşturduğu düşünülmektedir. Otofaji ve apoptoz gibi ölüm yolları da bu patolojilerin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Laboratuvarımızda daha önce tamamlanmış olan ‘Parkin Proteininin Sıçan Pankreatik Beta Hücre Hattında (INS-1E) Endoplazmik Retikulum - Mitokondriyon Stresi ve Otofaji Yolağındaki Rolü’ başlıklı ve 115S554 numaralı TUBİTAK 3501 Kariyer Geliştirme Projesinde, sıçan pankreatik β hücre serisinde (INS-1E) lipotoksik ajan PA ile farklı dozlarda (0,5 ve 0,3 mM PA) lipotoksik stres oluşturularak ER ve mitokondriyal stres cevapları otofaji yönünden incelenmiş ve organel stresine bağlı ER-Mt arası konuşmada Parkin proteininin rolü araştırılmıştır.

Sitotoksitite düzeyi (IC50) olarak ilk etapta 0,5mM PA dozu denenmiş ancak bu doz uygulama sonrası *Park2* geninde ve otofaji belirteçlerinde mRNA düzeyinde beklenen değişimler görülmemiş bunun yanı sıra hücrelerde apoptoza doğru bir yönelim gözlenmiştir. Yapılan literatür taraması ardından Wu vd.’nin 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada (156) aynı sorunu yaşadıkları ve PA’nın Parkin üzerinde bifazik etkisini bildirdikleri saptanmıştır. Bunun üzerine araştırmacıların otofaji belirteçlerini en yüksek seviyede gözlemledikleri doz olan 0,3mM PA alternatif doz olarak belirlenip farklı saat aralıklarında uygulanmış (0, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat) ve beklenen değerler hem *Park2* geni için hem de diğer otofaji belirteçlerinde 24 saat uygulaması ile gösterilmiştir. Buradan elde edilen verilerle Parkin proteininin ER-Mt arası konuşmayı ‘belirli stres koşullarında’ düzenleyebileceği, Parkin proteininin ER-KPY ve Mt-KPY ile ilişkili olduğu ve farklı doz lipotoksisteye farklı tepkiler verdiği gösterilmiştir. Aynı projede, *Park2* geninin siRNA aracılı olarak susturulması ardından belirli dozdaki lipotoksistede hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı da gözlenmiştir. Bu nedenle de Parkin proteininin INS-1E hücrelerinde lipotoksik etkiye karşı koruyucu bir rolü olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır (TUBİTAK 3501-115S554 No’lu proje raporu).

PA'ya bağlı lipotoksitede Parkin proteininin bifazik tepki verip, lipotoksisite düzeyi değiştikçe hücredeki fonksiyonun da değişmesi Parkin proteininin regülasyonunda hızlı hareket eden bir mekanizma olabileceğine işaret etmektedir. RNAi mekanizması  yesi miRNA' ların bu tarz bir etki yaratabileceğine ek olarak literatür bilgileri (156) Parkin proteininin regülasyonunda miRNA'ların işlevsel olabileceği ve hücre sağkalımındaki düzenlemede Parkin proteininin önem arz edebileceği hipotezini ortaya çıkarmış ve bu tezin ana çalışma konusu olmuştur.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. KULLANILACAK HÜCRE HATTI

Çalışmada, İsviçre Genova Üniversitesi'nden Prof. Dr. Pierre Maehler tarafından bağışlanmış sıçan pankreatik β hücre hattı (INS-1E) kullanılmıştır (157). İnsülinoma hücre hattından (INS-1) oluşturulmuş olan bu hücre hattı *Rattus norvegicus* türüne ait pankreas dokusu β hücresidir.

4.1.2. KULLANILACAK LABORATUVAR, CİHAZ, TECHİZAT, KİMYASAL VE KİTLER

Tez 'ıslak laboratuvar' çalışmalarının tamamı Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

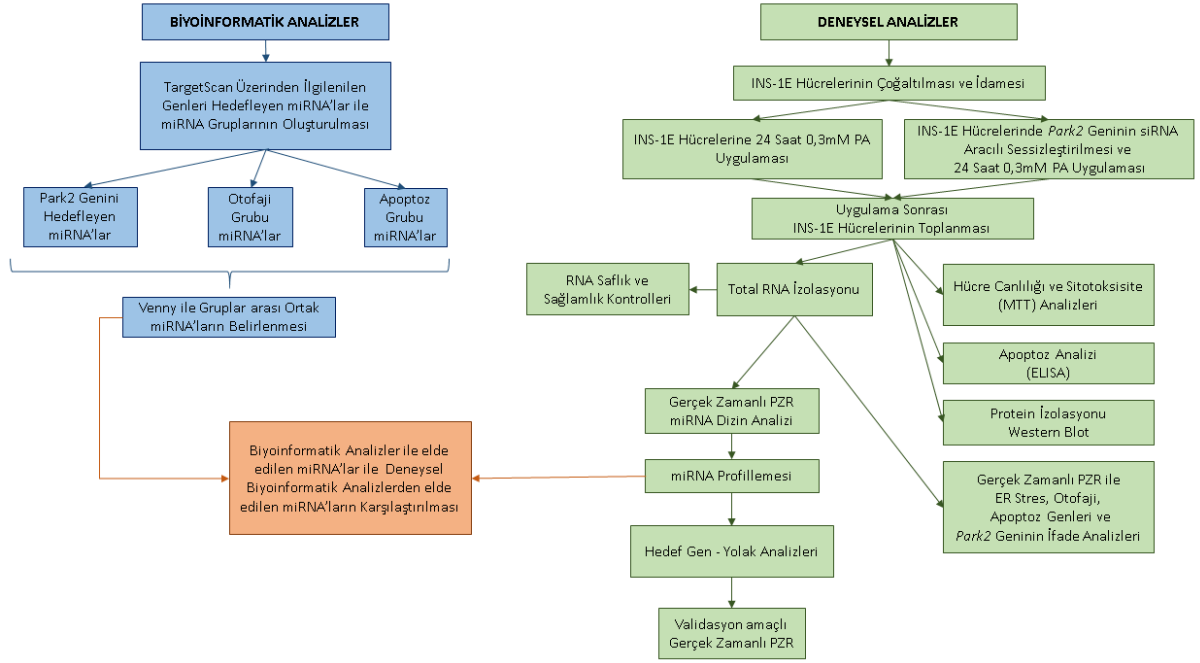
- Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR) için Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'de bulunan LightCycler® 480 II (Roche, 05015243001) cihazı kullanılmıştır.
- Western Blot çalışmalarında Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'de bulunan, Bio-rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell jel Yürütme sistemi, Bio-rad Trans-Blot Turbo ve Bio-rad Wet Transfer Sistemi ve Bio-rad ChemiDoc™ Imaging Systems Görüntüleme Sistemi kullanılmıştır.
- Spektrofotometrik ölçümler için Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'de bulunan Epoch Gen5 2.0 cihazı kullanılmıştır.
- Lipotoksisite ve ER stres ajanı olarak doymuş yağ asidi olan PA'nın ticari formu (Sigma, P0500) 0,3mM ve 0,5mM konsantrasyonlarında hazırlanarak kullanılmıştır.
- RNAi yöntemi ile gen sessizleştirmeyi sağlamak ve siRNA dağılımının optimize edilmesi için sentetik siRNA molekülleri kültür hücrelerine verilirken, kimyasal transfeksiyon ajanı olarak XFECT (Takara, Cat. No: 631450) kullanılmıştır.
- RNA sağlamlık ve cDNA kontrol PZR jel görüntüleme çalışmaları için ticari Agaroza (Sigma, A9539) kullanılmıştır.
- TAE çözeltisi için; Tris baz (Sigma, T7527), Borik Asit (Sigma, B6768) EDTA (Sigma, E5134) kullanılmıştır.

- Jel Yükleme Tamponu için; Gliserol (Sigma, G5516), Orange G (Sigma, O3756) kullanılmıştır.
- DNA marker olarak 50 bç büyüklükteki ticari DNA marker (Thermo scientific, SMO373) kullanılmıştır.
- Hücre canlılığı ve sitotoksosite testi için ticari kit, Roche Cell Proliferation Kit I (MTT) (Cat.No: 11 465 007 001) kullanılmıştır.
- RNA İzolasyonu için ticari kit, QIAGEN-miRNeasy Mini Kit (50) (Cat. No: 217004) kullanılmıştır.
- RNA izolasyonunda; Dietil piro karbonat, DEPC (Sigma, D5758) ile hazırlanan %0,1'lik DEPC'li su (ddH₂O) kullanılmıştır.
- Ticari EtOH (Sigma, E7023) kullanılmıştır.
- Komplementer DNA (cDNA) sentezi için ticari kit Roche-Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. No: 04897030001) ve QIAGEN-miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (4000) (Cat. No: 339347) kullanılmıştır.
- Kontrol PZR (Beta Aktin PZR) için;
 - Taq DNA polimeraz (5U/μl)(Roche, 11146173001)enzimi
 - dNTP (10mM X 4)(Roche, 11581295001)
- Ticari MgCl₂ (25mM)(Sigma, M8787) kullanılmıştır.
- Gerçek Zamanlı PZRçalışmaları için Light Cyclers 480 Multiwell Plate 384 (Roche 04729749001), LightCycler 480 Probes Master (Roche 4887301001) kullanılmıştır.
- Gerçek Zamanlı PZRile genlerinin ifadelenmelerinde her gene özgü Thermo Fisher Scientific marka Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Assay prob kullanılmıştır (Çizelge 4.1).
- Gerçek Zamanlı PZR miRNA Dizin çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için ticari kit;
 - QIAGEN-MiRCURY LNA miRNA PCR SİSTEMİ (Qiagen Mouse&Rat Panel I+II,V5)
 - miRCURY LNA miRNA miRNome PCR panel (Cat. No:339322 YAMR-312YG-8)) kullanılmıştır.
- Apoptoz tayin analizi için ticari kit Roche – Cell Death Detection ELISA (Cat.No: 11 544 675 001) kullanılmıştır.
- Protein izolasyonu için;

- Thermo Scientific™ RIPA Lysis and Extraction Tampon (Cat. No: 89900-89901)
- Thermo Scientific™ Halt Protease Inhibitor Coctail (Cat. No: 78430) kullanılmıştır.
- Elde edilen proteinlerin konsantrasyonu ticari kit; Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Cat. No. 23227) kullanılmıştır.
- Proteinlerin jelde yürütülmesi için; Advansta Avant™ Tampon, Tris-Glisin-SDS (Cat. No: R-01036-020) kullanılmıştır.
- Proteinlerin jelden membrana aktarılma aşamasında; Advansta FlashBlot™ Transfer Tampon (Cat. No:R-03090-D25) kullanılmıştır.
- Protein belirteci olarak Thermo Scientific Spectra Multicolor Protein Marker (Cat. No: 26634) ve New England Biolabs Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245kDa) (Cat.No: P7712S) kullanılmıştır.
- Kemiluminesans deteksiyonu için HRP substrat reaktif bileşenleri olarak ticari kit WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection Kit (Advansta, Cat. No: K-12043-D10) kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM

Çalışmada izlenen yöntemsel süreçler Şekil 4.1.'de şematize edilmiştir.



Şekil 4.1. Tez iş-akış şeması

4.2.1. HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ

Azot tankında bekletilen, %10 DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş olan hücreler çıkarılarak, önceden 37°C'ye ayarlanmış su banyosu içinde 1 dk bekletilmiştir. Başka bir tüp içine 9 ml besiyeri konulup, dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı bu tüpe aktarılmıştır. 1000 rpm 7 dk santrifüj sonrası tüpün üstündeki süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan pelet üzerine besiyeri eklenmiştir. Eklenen besiyeri ile pipetaj sonrası, tüpte oluşan hücre ve besiyeri karışımı 25cm²'lik flaska ekilmiştir. İnverted mikroskopta hücrelerin incelenmesi sonrası hücreler CO₂ inkübatörüne kaldırılmıştır.

4.2.2. HÜCRELERİN ÇOĞALTILMASI VE İDAMESİ

INS-1E hücreleri için rutin olarak, 1mM sodyum piruvat, 50µM 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 kullanılmıştır. Haftada 2 defa bu besiyeri değiştirilerek 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde büyümeleri sağlanmıştır. Ayrıca

flasklar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından değerlendirilmiştir. Hücreler ekildikleri flaskları kapladıklarında (%90 konfluensiye ulaştıktan sonra) %0.25 Trypsin-EDTA ile pasajlanmış, pasaj sonrası hücrelerin 25 cm²'lik yeni flasklara 4X10⁴ hücre/cm² olacak şekilde ekilip çoğalmaları sağlanmıştır. Çalışma için yeterli sayıda hücre elde edildiğinde hücreler gerekli 6'lık, 96'lık plaka ve flasklara ekilmiştir.

4.2.3. PALMİTİK ASİT (PA) HAZIRLANMASI

512mg PA tartılıp 10ml %100 EtOH ile karıştırılmış ve 60°C su banyosu içinde çözündürülerek 200mM PA stok solüsyon elde edilmiştir. 3gr BSA, 30ml DMEM FBS içermeyen besi yerinde çözündürülerek %10'luk BSA çözeltisi elde edilmiştir. 200mM PA'dan hesaplamalarla gereken miktar alınıp %10'luk BSA'da çözündürüldüğünde 4mM stok PA elde edilmiştir. PA'nın BSA'da iyice çözünmesi için 2 saat çalkalayıcı platformda karıştırılmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra 4mM PA karışımı filtreden geçirilerek ve uygulama dozlarına besiyeri ile dilüe edilerek (0,3 ve 0,5mM) hazır hale getirilmiştir.

4.2.4. ETKİN SİRNA TRANSFEKSİYON DOZUNUN BELİRLENMESİ VE *PARK2* GEN İFADESİNİN BASKILANMASI

RNAi yöntemi ile gen sessizleştirme ve siRNA dağılımının optimizasyonu için sentetik siRNA molekülleri kültür hücrelerine verilirken, kimyasal transfeksiyon ajanı olarak Xfect (Takara, Cat. No: 631450) kullanılmıştır.

0,3mM PA uygulanan INS-1E hücrelerinde *Park2* geninin diğer saatlere göre en yüksek ifadelene gösterdiği saat olan 24.saatte *Park2* genini sessizleştirmek için 3 farklı siRNA molekülünden oluşan siRNA havuzu kullanılmıştır (Qiagen, FlexiTube siRNA, SI1957627 *Park2_1*, SI01957634 *Park2_2*, SI01957648 *Park2_4*). Tüm *Park2* siRNA'lara BLAST analizi yapılmıştır. Kontrol için Negatif Kontrol siRNA (Qiagen, Allstars Neg. Control siRNA 1027281, scrambled siRNA) kullanılmıştır. Negatif kontrol siRNA diziye özel susturmayı spesifik olmayan susturmalarından ayırt etmek için önemlidir. Bu nedenle kontrol olarak seçilmiştir.

Park2 geninin siRNA aracılı sessizleştirilebilmesi için kullanılacak transfeksiyon ajanı, Xfect, protokolde verilen aralıklar olan 50, 100 ve 150 pmol *Park2* siRNA dozları bu

miktarlara karşılık gelen transfeksiyon polimeri ve reaksiyon solüsyonu ile birlikte 6 kuyulu kültür plakaları ve 25 cm²'lik flasklardaki hücrelere uygulanıp optimal susturma koşulları belirlenmiştir.

Transfeksiyon işlemi ardından 24 saat sonra *Park2* geni sessizleştirmesinin belirlenmesi için 6 kuyucuklu plakalardan veya 25cm²'lik flasklardan toplanan hücreler Kısım 4.2.6 'RNA İZOLASYONU' ve Kısım 4.2.7 'GERÇEK ZAMANLI PZR(RT-PZR)' bölümlerinde detaylı olarak anlatıldığı şekilde RNA izolasyonu yapılmış ve *Park2*, *Grp78* ve *Atf6* genlerinin ifade düzeylerine bakılarak en efektif siRNA miktarı belirlenmiş ve deneylerdeki sessizleştirme işlemi buna göre yapılmıştır.

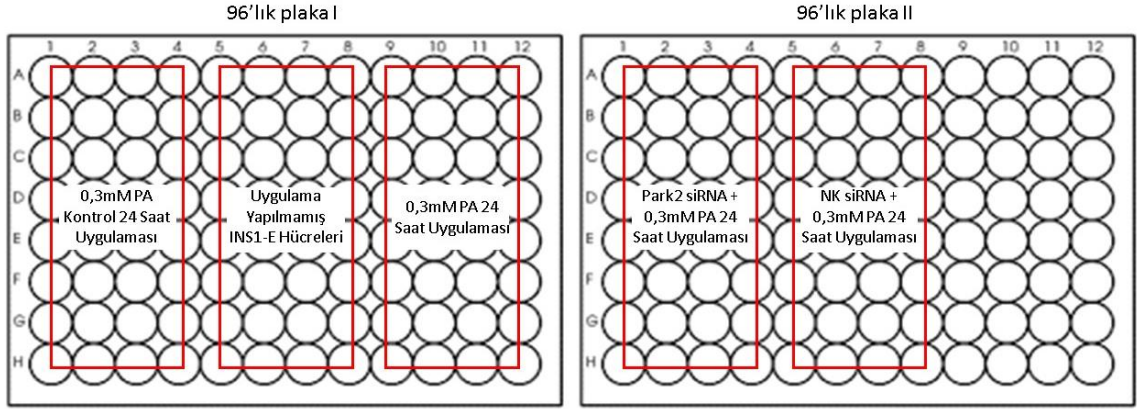
4.2.5. HÜCRE CANLILIK VE SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ (MTT)

Hücre canlılık analizi için Roche - Cell Proliferation Kit I (MTT) (Cat.No:1145007001) kullanılmıştır.

3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), kararlı bir tetrazolium tuzudur. Hücrelerde gerçekleştirdiği kompleks bir mekanizma sonrası kararlı halinden çözülebilir haldeki formazan formuna dönüştürmektedir. Bu reaksiyon canlı hücrelerde NAD(P)H'nin glikolitik olarak üretimine bağlıdır ve oluşan formazan miktarı hücre kültür ortamında metabolik anlamda aktif hücreleri belirtmektedir. Kullanılan MTT kitinin hücre canlılığını belirlemedeki temel prensibi de buna dayanmaktadır.

Kit protokolü aşağıda basamaklar halinde verilmiştir:

1. Toma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyulu plakaların belirlenen kuyularına (Şekil 4.2.) 40.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.
2. Kuyulara 100µl besiyeri eklenmiş ve hücrelerin kuyulara tutunması için 48 saat %5 CO₂ ve 37°C koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyuya gereken deneysel uygulama yapılmıştır.
4. Uygulama süresi sonunda kuyulardan 150µl besiyeri çekilmiştir.
5. Kuyulara 10 µl MTT solüsyonu eklenmiştir.
6. 4 saat %5 CO₂ ve 37°C koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.
7. Süre sonunda her bir kuyuya MTT solubilizasyon solüsyonu eklenmiştir ve bir gece %5 CO₂ ve 37°C koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.2. Hücre canlılık (MTT) testi hücre ekimi için kuyu planlama şablonu

Süre sonunda 96 kuyulu plakaların Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D’de bulunan Epoch Gen5 2.0 Spektrofotometre cihazı ile 550 ve 690nm dalga boyu absorbanslarına bakılmış, 550nm değerinden 690nm değeri çıkarılarak ve bu değerlerin her bir uygulama grubunun tekrarları için ortalamaları alınarak canlılık % analizi tamamlanmıştır.

4.2.6. RNA İZOLASYONU

INS-1E hücrelerine siRNA ve PA ile gereken uygulama yapılmış ve inkübasyon süresi olan 24 saat sonunda hücreler toplanmıştır.

Toplanan hücrelerden Qiagen, miRNeasy Mini(50) (Cat no:217004) ticari kit yardımı ile miRNA ve mRNA içeren total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Kit protokolü aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirilmiştir.

1. Hücreler tripsin ile kaldırılıp pellet toplanmıştır (1×10^7 den fazla hücre olmamasına dikkat edilmiştir).
2. Hücrelere Qiazol eklenerek parçalanmaları sağlanmıştır. Pellet haldeki hücrelerin üzerine 700µl Qiazol eklenip vortex veya pipetaj yapılmıştır. Homojenize lizat birkaç ay -80°C ’de saklanabilmektedir.
3. Homojenat içeren tüp oda sıcaklığında 5 dakika (dk) bekletilip nükleoprotein komplekslerinin ayrışması sağlanmıştır.
4. Homojenat içeren tüpe 140 µl kloroform eklenip kapağı sıkıca kapatılmış faz ayrımı için tüp 15 saniye (sn) boyunca kuvvetlice sallanmıştır.
5. Homojenat içeren tüp oda sıcaklığında tezgah üzerinde 2-3 dk bekletilmiştir.

6. Tüp içeriği 4°C'de 12.000 X g'de 15 dk santrifüj edilmiştir
7. Santrifüj ardından yaklaşık 350 µl hacimdeki üstte kalan şeffaf faz, total RNA dikkatlice çekilerek beyaz ara faz ve daha altta kalan kırmızı organik fazdan uzaklaştırılmıştır.
8. Kit ile verilmiş olan koleksiyon tüpüne şeffaf faz aktarılmış ve üzerine 1,5 hacim (yaklaşık 525 µl) saf etanol (%100'lük EtOH) eklenip pipetajla iyice karıştırılmıştır.
9. Oluşabilecek herhangi bir çökelti de dahil olmak üzere örnekten 700 µl çekilip kit ile verilen Rneasy Mini Spin kolona aktarılmıştır. Kapak yavaşça kapatılıp oda sıcaklığında 15 sn boyunca 8000 X g'de (10.000 rpm) santrifüj edilmiştir. Altta kalan kısım atılıp aynı toplama tüpü ile devam edilmiştir.
10. Örneğin geri kalanını da kolona aktarılıp bir önceki adım tekrarlanmıştır (8000 X g'de (10.000 rpm) 15 sn). Altta kalan kısım atılıp aynı toplama tüpü ile devam edilmiştir.
11. 700 µl RWT tamponu kolon üzerine eklenip kapak yavaşça kapatılıp 15 sn 8000Xg'de (10.000 rpm) santrifüj edilmiş altta kalan kısım atılıp aynı toplama tüpü ile devam edilmiştir.
12. 500 µl RPE tamponu çekilip kolon üzerine eklenip kapak yavaşça kapatılıp 15 sn 8000Xg'de (10.000 rpm) santrifüj edilmiş altta kalan kısım atılıp aynı toplama tüpü ile devam edilmiştir.
13. Tekrar 500 µl RPE tamponu kolona eklenip, kapağı nazikçe kapatılıp 2 dk 8000Xg'de (10.000 rpm) santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitince kolon, toplama tüpüne ve etanolü atığa değıdirmemeye dikkat ederek çıkarılmıştır.
14. Opsiyonel olarak yeni bir toplama tüpüne kolon aktarılıp (kit içerisinde bulunmamaktadır) maksimum santrifüj hızında 1 dk ekstra santrifüj edilmiştir.
15. Kolon kit içerisinde bulunan 1,5ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. 30-50 µl Rnaz içermeyen dH₂O çekilip doğrudan kolon membranına eklenmiştir. Kapağı nazikçe kapatılıp 1 dk 8000Xg'de (10.000 rpm) santrifüj edilip altta toplanan kısım alınmıştır.
16. Opsiyonel olarak daha fazla RNA eldesi için altta toplanan sıvı yeniden doğrudan membrana gelecek şekilde konularak tekrar 1 dk 8000Xg (10.000 rpm) santrifüj edilip altta toplanan kısım alınabilmektedir.

Elde edilen 45 µl hacmindeki RNA'nın 10 µl'si bir başka steril PZR tüpüne aktarılıp, diğer kısım ise 2-3 ayrı steril tüpe bölüştürülmüştür. Bu işlem ile ana stoğun sürekli dondurma-çözme sürecine maruziyeti ortadan kaldırılıp RNA'nın olası degradasyonu engellenmeye çalışılmıştır. Ayrılan 10 µl RNA, saflık ve sağlamlık değerlendirmeleri için kullanılırken, stok RNA'lar ise izolasyon sonunda -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.2.6.1. RNA Saflık ve Sağlamlık Tayini

Toplam RNA izolasyonu yapılmış olan RNA'ların saflık kontrolü Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D'de bulunan Epoch Gen5 2.0 Spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. RNA miktarı 1 µl'deki nanogram (ng) cinsinden elde edilmektedir. Nükleik asitler (DNA ve RNA) 260nm dalga boyunda, proteinler 280nm dalga boyunda, fenol tarzı organik bileşikler ise 230nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Bu nedenle RNA saflığı için A260/A280 ve A260/A230 oranları dikkate alınmaktadır. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenen absorbans oranı 1,8-2,1'dir. Spektrofotometre mikro plakasının her bir kuyusu için 2µl izole edilen RNA, 2µl steril distile su (dH₂O) ile karıştırılarak, her kuyuya 2µl örnek konularak 2 tekrarlı okuma yapılmıştır. Ölçüm sonrası elde edilen veriler sulandırma faktörü olan 2 ile çarpılarak izole edilen RNA miktarı hesaplanmıştır.

İzole edilen RNA'lar hazırlanan %1,5'lik agaroz jelde yürütülerek sağlamlığı kontrol edilmiştir. Bunun için, 100ml 0,5X TAE (Tris Asetik asit EDTA) tampona 1,5 gram agaroz eklenip kaynatılmış, içine 2,5µl (10mg/ml) Etidyum bromür (EtBr) eklenip, polimerleşme tamamlandıktan sonra 4µl RNA örnek, 5µl jel yükleme tamponu (OrangeG) ile karıştırılarak jel kuyularına yüklenmiş ve 90V'da 45 dk elektroforeze tabii tutulmuştur. Yürütme sonrası UV altında 28S ve 18S rRNA'lar görüntülenmiştir.

4.2.6.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için ROCHE Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Kit protokolüne uygun olarak elde edilen RNA'lardan komplementer DNA sentezi yapılmıştır.

Steril PZR tüpleri kullanılarak buz üzerinde çalışılmıştır. Her tüpe konulan kalıp-primer ve cDNA sentez karışımları Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.'ye göre hazırlanmıştır.

Çizelge 4.1. cDNA sentezi için kalıp-primer karışım miktarları (1 reaksiyon için)

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Toplam RNA	Değişken	1000ng/μl
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/μl (vial 5)	1 μl	
Random Hexamer Primer, 600 pmol/μl (vial 6)	1 μl	
PZR için dH ₂ O	Değişken (Son hacim 11,4 μl olacak şekilde ayarlanır)	
Toplam Hacim	11,4 μl	

Kalıp-primer karışımı XP Cycler cihazında 65°C’de 10 dk bekletilerek denatüre olması sağlanmıştır. Bu işlem ile RNA’nın sekonder yapılarını uzaklaştırılmıştır. İşlem sonunda tüpler tekrar buz üzerine alınmış, ters transkriptaz (reverse transcriptase, RT) karışımı aşağıdaki protokole göre hazırlanmış ve kalıp-primer karışımına transfer edilmiştir.

Çizelge 4.2. cDNA karışımı (1 tüp için)

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5X conc. (Vial2)	4 μl	1X (8mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor, 40 U/μl (Vial3)	0,5 μl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10mM each (Vial 4)	2 μl	1mM each
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/ μl (Vial 1)	0,5 μl	10 U
Toplam Hacim	7 μl	

25°C’de 10 dk, 50°C’de 60 dk ve enzim inaktivasyonu için 85°C’de 5 dk bekletilmiştir. Tüm ısı uygulama işlemleri XP Cyclor cihazında yapılmıştır. İşlem sonrası elde edilen cDNA’lar 200ng/µl’ye dilüe edilip 3-4 steril PZR tüpüne dağıtılarak -20°C’de saklanmıştır.

4.2.6.3. cDNA Kontrol PZR

Elde edilen cDNA’lardan sıçan Aktin-β primerleri (F:5’-CGTCTTCCCCTCCATCG-3’ ve R:5’-CTCGTTAATGTCACGCAC-3’) ile PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri (178bp) , agaroz jelde yürütülerek daha sonra Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D. laboratuvarında bulunan Kodak EDAS 290 UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. UV ışık altında baz büyüklükleri kontrol edilmiştir. PZR Çizelge 4.3.’teki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. PZR protokolü

İçerik	Stok Konsantrasyon	Hacim
Taq DNA Polimeraz	5U/µl	0,25 µl
Taq DNA Polimeraz Tampon	5X	5 µl
dNTP	10mM her biri	1,6 µl
Primer F	100pmol	1 µl
Primer R	100pmol	1 µl
MgCl ₂	25mM	2,5 µl
dH ₂ O		15 µl
DMSO		2,5
Kalıp DNA(cDNA)		2,5 µl
Toplam Hacim		31,35µl

XP Cyclus cihazında 94 °C’de 5 dk denatürasyon sonunda 94°C’ de 30 sn, 60°C’ de 45 sn, 72°C’ de 30 sn 35 döngü yapıldıktan sonra 72 °C’ de 5 dk ve +4°C’ de 5dk ile PZR reaksiyonu tamamlanmıştır. Sonuçta da 178bp’lik ürün gözlenmiştir.

4.2.7. GERÇEK ZAMANLI PZR

Gerçek Zamanlı PZR için Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D. laboratuvarında bulunan Roche marka Light Cycler 480 II cihazı kullanılmıştır. Gen ifadenmelerini saptamak amacı ile her bir gene ait Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems™, TaqMan™ Gene Expression Assay kullanılmıştır. Problar için karışım tamponu olarak LightCycler 480 Probes Master kullanılıp, protokollerde belirtilen uygun program koşullarında gen ifadenmelerindeki değişimler analiz edilmiştir. Gen artış ve azalışlarının normalizasyonu için sıçan *Gapdh* geni referans gen olarak kullanılmıştır. Analiz yöntemi olarak, yaklaşım yöntemi olarak da adlandırılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu (158) kullanılmıştır. Kullanılan problara dair bilgiler Çizelge 4.4.’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Gerçek Zamanlı PZR için kullanılan prob bilgileri

Gen Adı	Kullanılan prob marka ve katalog numarası
<i>Atf6</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Atf6</i> ID: Rn01490844_m1
<i>Hspa5</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Hspa5</i> ID: Rn00565250_m1
<i>Park2</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Park2</i> ID: Rn00571787_m1
<i>Map1lc3a</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Map1lc3a</i> ID: Rn00458724_g1
<i>Sqstm1</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Sqstm1</i> ID: Rn00709977_m1
<i>Ddit3</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Ddit3</i> ID: Rn00492098_g1
<i>Becn1</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Becn1</i> ID: Rn00586976_m1
<i>Gapdh</i>	Taqman Gene Ex Assays Mto, Xs 75 Rxn Assay <i>Gapdh</i> ID: Rn01775763_g1
<i>Bax</i>	Roche RealTime ready Catalog Assay 96 Rxn <i>Bax</i> ID: 500244
<i>Bcl2</i>	Roche RealTime ready Catalog Assay 96 Rxn <i>Bcl2</i> ID: 502821
<i>Bak</i>	Roche RealTime ready Catalog Assay 96 Rxn <i>Bak</i> ID: 500182
<i>BclXl</i>	Roche RealTime ready Catalog Assay 96 Rxn <i>BclXl</i> ID: 500245
<i>Ip3r</i>	Roche RealTime ready Catalog Assay 96 Rxn <i>Ip3r</i> ID: 500259
<i>Atg5</i>	Roche RealTime ready Catalog Assay 96 Rxn <i>Atg5</i> ID: 505470

4.2.8. GERÇEK ZAMANLI PZR MİRNA DİZİN ÇALIŞMASI

Eş zamanlı miRNA dizin çalışmasında Qiagen miRCURY LNA miRNA SYBR Green PZR (10/2019) el kitabındaki protokollerden yararlanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. miRNA'ları da içeren total RNA havuzundan yararlanılarak önce Qiagen miRCURY LNA RT Kit (Cat No: 339340) ile cDNA sentezlenmiş Qiagen miRCURY LNA SYBR Green PZR Kit (Cat No: 339346 ve 339347) ile Qiagen miRCURY LNA miRNome Mouse&Rat PZR Panels I + II (Cat No:YAMR-312Y) dizin panellerine örnek grupları protokole uygun olarak yüklenmiş ve eş zamanlı miRNA dizin çalışması gerçekleştirilmiştir.

RT Kit protokolünde belirtildiği şekilde her bir kalıp RNA örneği 5ng/μl olacak şekilde nükleaz içermeyen dH₂O ile dilüe edilmiş, buz üzerinde ters transkripsiyon reaksiyonu için Çizelge 4.5.'teki ölçülere göre hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. Ters transkripsiyon reaksiyonu için gereken bileşen miktarları

Bileşen	miRNome Panelleri(Human,Rat&Mouse)(Panel I&II)
5X miRCURY SYBR® Green RT Reaksiyon Tamponu	8 μl
Rnaz içermeyen dH ₂ O	18 μl
10X miRCURY RT Enzim Mix	4 μl
UniSp6 RNA spike-in (optional)	2 μl
Kalıp RNA (5 ng/ μl)	8 μl
Son Hacim	40 μl*

* Tüm hacimler 10 μl'lik reaksiyon hacmi için verilmiştir.

Daha sonra karışım gereken süre ve sıcaklıkta (Çizelge 4.6.) cDNA sentezi için PZR'ye tabii tutulmuştur.

Çizelge 4.6. PZR süre sıcaklık tablosu

Basamak	Süre	Sıcaklık
Revers-transkripsiyon	60 dk	42 °C
Reaksiyon inaktivasyonu	5 dk	95 °C
Saklama	Daima	4 °C

Ters transkripsiyon reaksiyonu sonrası cDNA'lar Gerçek Zamanlı PZR için kullanılacaksa hemen buz üzerine alınarak gereken dilüsyonlar sağlanmış kullanılmayacaksa da dilüe edilmemiş halde 2-8 °C' de 4 gün ya da -30/-15 °C' de 5 haftaya kadar saklanmıştır. Sentezlenen cDNA düşük nükleik asit bağlayıcı tüplerde saklanmıştır.

cDNA eldesi ardından Qiagen miRCURY LNA SYBR® Green PZR kiti ile devam edilmiş panellere yüklemek üzere gereken karışım hazırlanmıştır.

2X miRCURY SYBR® Green Master Mix, oda sıcaklığında inaktif QuantiNova DNA Polimeraz içerir. Bu nedenle QuantiNova DNA polimerazını etkinleştirmek için PZR protokolü 95 °C'de 2 dk'lık bir ilk inkübasyon adımıyla başlamalıdır. 2X miRCURY SYBR® Green Master Mixi, kalıp cDNA, miRNA PZR panelleri, nükleazsız dH₂O çözülüp, gereken kimyasallar vortekslenip kısaca santrifüj edilmiştir.

384 kuyuluk panel I ve II'ye yüklenmek üzere hazırlanacak karışım gereken bileşenlerle (Çizelge 4.7.) hazırlanmıştır.

PZR reaksiyonunun 95°C'lik sıcak başlangıç aşamasından dolayı buz üzerinde çalışmaya gerek olmamıştır. Oda sıcaklığında çalışma tamamlanmıştır.

Çizelge 4.7. Rat&Mouse PZR Panel I+II karışım protokolü

Bileşen	Human, Rat&Mouse PZR Panel I+II
2X miRCURY SYBR® Green Master Mix	4000 µl
ROX Reference Dye (ABI cihazlarda sadece)	400 µl/40 µl
cDNA Kalıbı (dilüe edilmemiş)	40 µl
Rnaz içermeyen dH ₂ O	3960 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	8000 µl

Reaksiyon karışımı iyice vortekslenip miRNome PZR Panellerine kuyu başına 10 µl karışım gelecek şekilde dağıtılmıştır. Panel kit içerisinde çıkan jelatin ile kaplanmış ve oda sıcaklığında kısa süre santrifüjlenmiştir. Primerlerin reaksiyon karışımında tamamen çözülebilmesi için 5 dk oda ısısında bekletilmiştir. Çizelge 4.8.'de verilen koşullarda paneller eş zamanlı PZR'ye tabii tutulmuştur.

Çizelge 4.8. miRCURY LNA SYBR® Green PZR koşulları

Adım	Zaman	Sıcaklık	Ramp Rate
PZR sıcak başlangıç aşaması	2 dk	95°C	Maximal/fast mode
2-adımlı döngü			
Denatürasyon	10 sn	95°C	Maximal/fast mode
Kombine annealing/extension	60sn	56°C	Maximal/fast mode
Döngü sayısı	45 döngü		
Melting Curve analizi		60-95°C	

Ham Cq değerlerini (Cp veya Ct) elde etmek için gerçek zamanlı PZR cihazı ile birlikte verilen yazılım kullanılarak ilk veri analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Ct değerleri ile Qiagen'in internet sayfası GeneGlobe (159) üzerinden verilere uygun analiz programı ile miRNA kat artış/azalış ve istatistiki anlamlılık ($p < 0,05$) bilgileri elde edimiş site tarafından verilen rapor ile biyoinformatik araştırma kısmı olan miRNA profillem ve yolak analiz çalışmalarına geçilmiştir.

4.2.9. PROTEİN ELDESİ VE WESTERN BLOT ANALİZİ

Western Blot çalışmalarında Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD’de bulunan, Bio-rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell jel Yürütme sistemi, Bio-rad Trans-Blot Turbo ve Bio-rad Wet Transfer Sistemi ve Bio-rad ChemiDoc™ Imaging Systems Görüntüleme Sistemi kullanılmıştır.

Protein izolasyonu için Thermo Scientific™ RIPA Lysis and Extraction Tampon (Cat. No: 89900-89901) ve Thermo Scientific™ Halt Protease Inhibitor Coctail (Cat. No: 78430) kullanılmıştır. Elde edilen proteinlerin konsantrasyonu Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Cat. No. 23227) ile belirlenmiştir. Proteinlerin ölçüm sonrası elde edilen konsantrasyonlara göre jele 5-30 µg protein yüklenerek %12’lik SDS-PAGE jelde yürütülmüştür. Proteinlerin jelde yürütülmesi için Advansta Avant™ Tampon, Tris-Glisin-SDS (Cat. No: R-01036-020) kullanılmıştır. Protein belirteci olarak Thermo scientific Spectra multicolor protein marker (Cat. No: 26634) ve New England Biolabs Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245kDa) (Cat. No: P7712S) kullanılmıştır. Proteinler daha sonra ıslak transfer ile 70V’da 90dk +4°C’de jelden PVDF membrana transfer edilmiştir. Proteinlerin jelden membrana aktarılma aşamasında ise Advansta FLASHBlot™ Transfer Tampon (Cat.No: R-03090-D25) kullanılmıştır. Transfer ardından membran 1 saat süreyle çalkalayıcıda bloklama solüsyonu (1X TBS-Tween20 + %5 yağsız süt tozu) içerisinde bekletilmiş ardından 1X TBS-Tween 20 yıkama solüsyonu ile 3 defa 5’er dk yıkanmıştır. Membran bloklama solüsyonuyla yıkandıktan sonra primer antikor uygulaması yapılmıştır. Gereken inkübasyon süresini takiben primer antikor 1X TBS-Tween20 yıkama solüsyonu ile 3 defa 5’er dk yıkama ile uzaklaştırılmış sonra uygun sekonder antikor (HRP Donkey anti-rabbit IgG, HRP Goat anti-mouse IgG) ile 20-60 dk inkübe edilmiştir. Membran 1X TBS-Tween20 yıkama solüsyonu ile 3 defa 5’er dk yıkandıktan sonra kemiluminesans deteksiyonu için HRP substrat reaktif bileşenleri (Advansta, Cat. No: K-12043-D10) ile 2dk inkübe edilip Bio-rad ChemiDoc™ Imaging Systems Görüntüleme Sistemi ile membran görüntüsü alınmıştır. Normalizasyon için Anti-Actin-β antikor kullanılmıştır. Protein değişim düzeyleri Image J programı (160) ile analiz edilmiştir.

4.2.10. ELISA TABANLI APOPTOZ ANALİZİ

Elisa tabanlı apoptoz analiz çalışmalarında Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD'de bulunan Epoch Gen5 2.0 Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Uygulama için ticari kit Roche – Cell Death Detection ELISA (Cat. No: 11 544 675 001) kullanılmış olup kit protokolüne uygun olarak çalışma tamamlanmıştır.

Kit çalışma prensibi, indüklenmiş hücre ölümünün ardından sitoplazmik histon-ilişkili DNA parçalarının (mono- ve oligonükleozomlar) kalitatif ve kantitatif *in-vitro* tespiti için fotometrik enzim immün analizine dayanmaktadır ve Elisa tabanlı bir sistemdir. Cell Death Detection ELISA ile apoptoz geçiren hücrelerin sitoplazmasında mevcut olduğu bilinen histonla ilişkili DNA fragmanları (mono ve oligonükleozomlar) ile hücrelerin apoptoz düzeyi analiz edilmiştir.

Kit protokolüne göre çalışma esnasında bir negatif kontrol hazırlanmıştır. Hücre kültürü koşullarına bağlı olarak, katlanarak büyüyen her kalıcı hücre kültürü, yaklaşık olarak %3 ila %8 gibi belirli bir miktarda ölü hücre içermektedir. Flaskta besiyeri üzerinde yüzen ölü hücreler toplanıp santrifüj edilip sayılarak negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Uygulanan protokol basamakları aşağıda verilmiştir;

Örnek Hazırlanması

Uygun bir hücre konsantrasyonu elde etmek için hücreler besiyeri yardımıyla seyreltilmiştir. Hücre tipine ve hücre ölümünü indükleyen ajana göre hücre sayısı belirlenip optimize hale getirilmiştir.

1. Hücreler sayılarak, 1mL besiyerinde 1×10^5 olacak şekilde dilüe edilmiştir. Tüpten $500 \mu\text{l}/\text{tüp} = 5 \times 10^4$ hücre/tüp olacak şekilde tüpe aktarılmıştır. Bu şekilde nihai hücre sayısına erişilmiştir.
2. $1500 \times g$ 'de (ref) 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst kısım (süpernatant) atılmıştır.
3. Hücre pelleti $500 \mu\text{l}$ inkübasyon buffer ile açılıp iyice karıştırılmıştır.
4. 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona tabii tutulmuştur (lizis basamağı).
5. Lizat $20.000 \times g$ 'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
6. Çok yavaş ve dikkatlice aşağıdaki pellet hareket ettirilmeden $400 \mu\text{l}$ süpernatant çekilerek yeni bir tüpe aktarılmıştır.

7. Daha sonra süpernatanttan Elisa testinde kullanılacak numune 1:10 inkübasyon buffer ile dilüe edilmiştir.
8. Eğer analiz o gün ya da ertesi gün yapılmayacaksa örnekler -20°C dondurucuya kaldırılmıştır.

NOT: Her örnekten 2 kuyu çalışılacağı ve kuyu başına 100 µl ekleneceği için 25 µl süpernatant ile 225 µl inkübasyon buffer karıştırarak örnek solüsyonlar hazırlanmıştır.

ELISA Protokolü

1. Kit toplamda 96 kuyudan meydana gelirken 8'li modüller ile bağımsızdır. Gereken kuyu sayısı kadar modül plate aparatına takılarak Elisa çalışmalarına başlanır.
2. Kullanılacak her bir kuyuya 100 µl coating solüsyon eklenip üzeri kit içinden çıkan folyo ile kapatılmıştır.
3. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (overnight olarak 2-8°C'de alternatif olarak bekletilebilir).
4. Süre sonunda vurarak ya da pipet yardımı ile buffer çekilmiştir.
5. 200 µl inkübasyon buffer eklenmiştir. Yine folyo ile kapatılmıştır.
6. 30 dk 15-25°C'de inkübe edilmiştir.
7. Süre sonunda vurarak ya da pipet yardımı ile buffer çekilmiştir. Sonrasında kuyular 2-3 defa 250-300 µl washing buffer ile yıkanmıştır.
8. En başta hazırlanan 250 µl'lik örnek solüsyonundan her kuyuya 100 µl eklenmiş üzeri folyo ile kapatılmıştır.

NOT: Arkaplan bakmak için 2 kuyuya örnek solüsyonu değil sadece 100 µl inkübasyon buffer eklenmiştir.

9. 90 dk 15-25°C'de inkübe edilmiştir.
10. Süre sonunda vurarak ya da pipet yardımı ile buffer çekilmiştir. Sonrasında kuyular 2-3 defa 250-300 µl washing buffer ile yıkanmıştır.
11. 100 µl konjugat solüsyonu arka plan kuyuları hariç tüm kuyulara eklenmiştir ve plate folyo ile sıkıca kapatılmıştır.
12. 90 dk 15-25°C'de inkübe edilmiştir.
13. Süre sonunda vurarak ya da pipet yardımı ile buffer çekilmiş sonrasında kuyular 2-3 defa 250-300 µl washing buffer ile yıkanmıştır.
14. Her bir kuyuya 100 µl substrat solüsyonu eklenmiştir.

15. Plate 250rpm'de çalkalayıcıya bırakılıp 10-20dk arası renk değişimi takip edilerek beklenmiştir. Renk değişimi sonrası fotometrik okutma işlemine geçilmiştir.
16. Elisa okuması yapmadan önce substrat solüsyonunun iyice dağılması için plate kenarına vurulmuştur.
17. 405 ve 490nm'de ölçümler yapılmıştır. 405nm ana absorbans 490nm ise referans dalga boyudur. Sonrasında 405nm değerinden 490nm değeri çıkarılmıştır.

Elisa analizi sonrası mU değerleri absorbans farkını (405nm-490nm) 10^{-3} ile çarparak bulunmuştur ($mU = \text{Absorbans} \times 10^{-3}$). Sonrasında apoptoz değerini belirten Zenginleştirme Faktörü (Enrichment Factor) değeri verilen formüle göre hesaplanmıştır (Şekil 4.3.).

$$\text{Zenginleştirme Faktörü (Enrichment Factor)} = \frac{\text{Örnek mU değeri (ölen/ölmüş hücreler)}}{\text{Kontrol mU değeri (canlı hücreler)}}$$

Şekil 4.3. Roche-Cell Death Detection Elisa hesaplama formülü

4.2.11. BİYOİNFORMATİK VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İlgilenilen genleri hedefleyen miRNA'ları ya da miRNA'ların hedefledikleri genleri tespit etmek için miRWalk (161,162) ve TargetScan (163) sitelerinden yararlanılmıştır. Elde edilen miRNA ve hedefledikleri genler ile yolak zenginleştirme analizleri Webgestalt (164,165) internet sitesi aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler arasındaki gruplandırma ve daha anlaşılır görsel veri sunabilmek için Venny (166) biyoinformatik programı kullanılmıştır.

Tüm deneyler en az iki biyolojik ve iki teknik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olduğu düşünülen iki örnek arası farklılıkları test etmek için Student's t-test uygulanmıştır ve anlamlılık derecesi olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. PARKİN PROTEİNİNİN REGÜLASYONUNDA ROL ALAN MİRNA'LARIN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ

Gerçek zamanlı PZR miRNA dizin çalışması öncesinde *Park2* geni ve ilgilenilen temel yollar otofaji ve apoptozda rol alan genlerin ön biyoinformatik incelemesi yapılmıştır. Mt stres geni *Park2* tek başına bir grup olarak kabul edilmiş, otofaji genlerinden; *Bcn1*, *Map1lc3a*, *Sqstm1* ve *Ulk1* ayrı bir grup olarak oluşturulmuş ve apoptozdan ise pro ve anti apoptotik genlerden *Bak*, *Bax*, *Bcl2* ve *BclXL* diğer bir grubu oluşturmuştur (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1.Ön-Biyoinformatik analizi yapılan genler

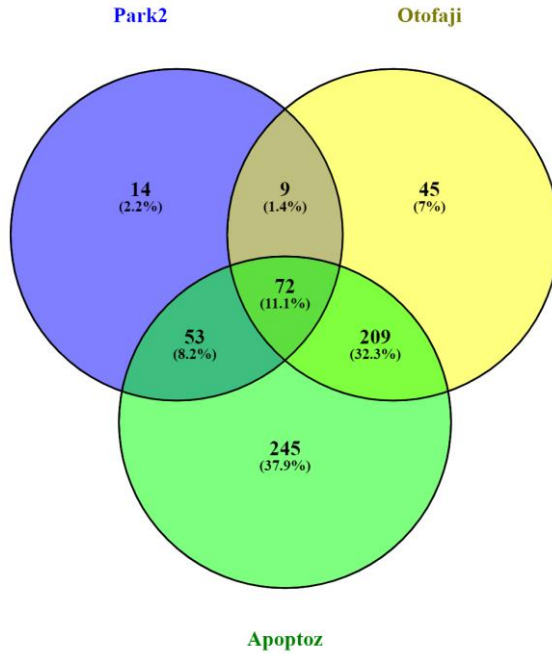
Hedef Gen Grupları	Hedef Gen Adları	Genleri Hedefleyen miRNA Sayıları	
Mitokondriyal Stres Geni	– <i>Park2</i>	176	
Otofaji Genleri	– <i>Becn1 (Beclin1)</i>	81	Toplam 335
	– <i>Map1lc3a (Lc3a)</i>	39	
	– <i>Sqstm1 (p62)</i>	129	
	– <i>Ulk1</i>	172	
Apoptotik Genler	– <i>Bax</i>	93	Toplam 579
	– <i>Bak1</i>	192	
	– <i>Bcl2</i>	426	
	– <i>Bcl2l1 (BclxL)</i>	141	

Gruplanmış genleri hedefleyen miRNA'lar TargetScan (163) üzerinden çekilerek miRNA'lara ait genel bir liste hazırlanmıştır (Şekil 5.1.).

pınar tez biyoinformatik ön analiz - Microsoft Excel										
DOSYA	GİRİŞ	EKLE	SAVFA DÜZENİ	FORMÜLLER	VERİ	GÖZDEN GEÇİR	GÖRÜNÜM			
Yapıştır	Calibri	11	A		Metni Kaydır	Genel	Koşullu Biçimlendirme	Tablo Olarak	Biçimlendir	Stiller
Pano	K	T	A		Birleştir ve Ortala	Hızlama	Sayı			
Yazı Tipi										
Q23										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
1	Becn1 (Becn1)	Map1lc3a (Lc3a)	Sqstm1 (p62)	Ulk1						
2	1 rno-miR-28-5p	rno-miR-764-3p	rno-miR-134-3p	rno-miR-320-3p						
3	2 rno-miR-708-5p	rno-miR-21-5p	rno-miR-1896	rno-miR-291a-3p						
4	3 rno-miR-193b-5p	rno-miR-128-2-5p	rno-miR-708-3p	rno-miR-105						
5	4 rno-miR-759	rno-miR-128-1-5p	rno-miR-349	rno-miR-17-5p						
6	5 rno-miR-339-3p	rno-miR-3566	rno-miR-329-3p	rno-miR-20b-5p						
7	6 rno-miR-3583-5p	rno-miR-874-5p	rno-miR-362-3p	rno-miR-93-5p						
8	7 rno-miR-449c-3p	rno-miR-138-5p	rno-miR-342-5p	rno-miR-106b-5p						
9	8 rno-miR-2985	rno-miR-664-2-5p	rno-miR-10b-5p	rno-miR-20a-5p						
10	9 rno-miR-224-5p	rno-miR-664-1-5p	rno-miR-1224	rno-miR-142-5p						
11	10 rno-miR-125b-2-3p	rno-miR-1956-3p	rno-miR-802-3p	rno-miR-26b-5p						
12	11 rno-miR-30e-5p	rno-miR-3085	rno-miR-883-3p	rno-miR-26a-5p						
13	12 rno-miR-384-5p	rno-miR-1839-3p	rno-miR-24-3p	rno-miR-128-3p						
14	13 rno-miR-30b-5p	rno-miR-193a-3p	rno-miR-27a-5p	rno-miR-10a-5p						
15	14 rno-miR-30a-5p	rno-miR-193b-3p	rno-miR-92a-2-5p	rno-miR-3084b-3p						
16	15 rno-miR-30d-5p	rno-miR-871-3p	rno-miR-483-3p	rno-miR-3084a-3p						
17	16 rno-miR-30c-5p	rno-miR-7a-2-3p	rno-miR-7b	rno-miR-3084d						
18	17 rno-miR-142-5p	rno-miR-3065-3p	rno-miR-7a-5p	rno-miR-346						
19	18 rno-miR-293-5p	rno-miR-150-5p	rno-miR-504	rno-miR-3569						
20	19 rno-miR-290	rno-miR-6332	rno-miR-547-5p	rno-miR-1224						
21	20 rno-miR-292-5p	rno-miR-743b-3p	rno-miR-509-5p	rno-miR-3592						
22	21 rno-miR-497-3p	rno-miR-140-3p	rno-miR-327	rno-miR-465-3p						
23	22 rno-miR-9a-3p	rno-miR-326-5p	rno-miR-365-5p	rno-miR-383-5p						

Şekil 5.1. Ön-Biyoinformatik analizi yapılan genler için oluşturulmuş miRNA havuzu

Venny (166,167) biyoinformatik programı yardımıyla elde edilen miRNA’lardan öncelikle apoptoz ve otofaji genlerini kendi grupları içerisinde ortak hedefleyen miRNA sayıları elde edilmiş, ardından bu iki grup miRNA *Park2* genini hedefleyen miRNA’lar ile kesiştirilmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Ön-Biyoinformatik Analizde gen gruplarını ortak hedefleyen miRNA’lar

Herhangi bir deney çalışması yapılmaksızın sadece bilgisayar üzerinden biyoinformatik site ve program desteği ile ön biyoinformatik analiz sonucu olarak *Park2*, otofaji grubu genler ve apoptotik genleri hedefleyen 72 adet ortak miRNA saptanmıştır.

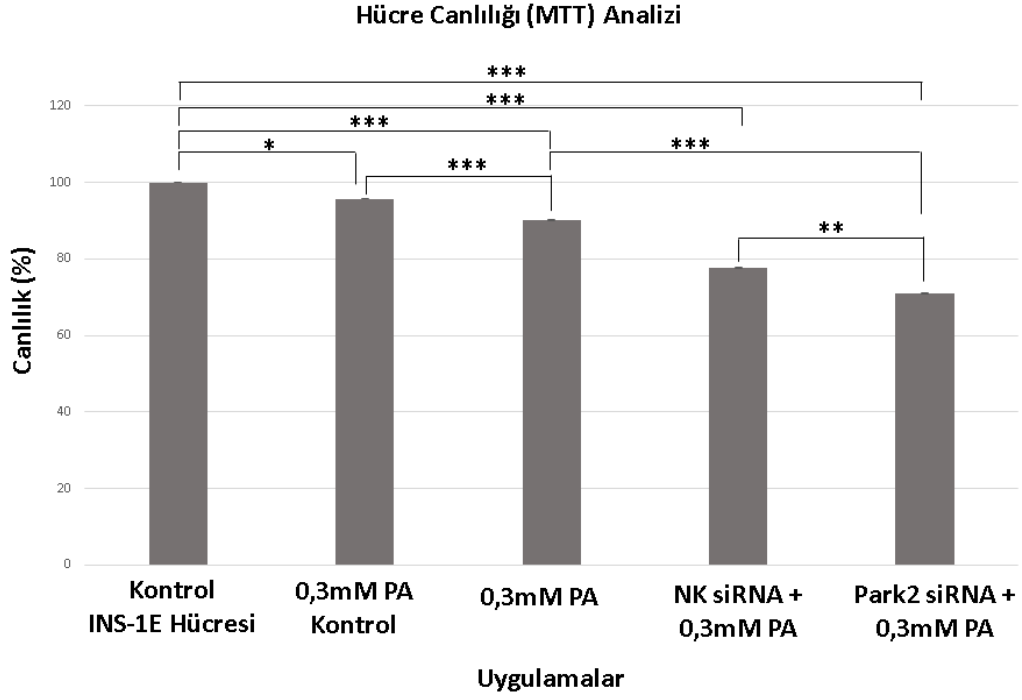
Elde edilen 72 tane ortak miRNA'nın listesi Gerçek Zamanlı PZR miRNA dizin çalışması ile karşılaştırmak üzere kaydedilmiştir (Çizelge 5.2.). Gerçek zamanlı PZR miRNA dizin çalışması sonrası PA uygulaması sonucu elde edilen miRNA'lar otofaji ön biyoinformatik analiz miRNA'larıyla, siRNA grubu dizin sonucu elde edilen miRNA'lar ise ön biyoinformatik analiz apoptoz grubu miRNA'lar ile karşılaştırılarak bulunan miRNA'ların bu listeye ortaklığının bulunup bulunmadığına bakılmıştır. Aynı zamanda *Park2*, otofaji, apoptoz ortak miRNA'ları ile deneysel dizin çalışmasından elde edilen aday miRNA'lar kıyaslanmıştır.

Çizelge 5.2. Otofaji, Apoptoz ve *Park2* genlerini hedefleyen ortak miRNA listesi

miRNA No	miRNA Adı	miRNA No	miRNA Adı	miRNA No	miRNA Adı	miRNA No	miRNA Adı
1	rno-miR-122-5p	19	rno-miR-3553	37	rno-miR-30d-3p	55	rno-miR-215
2	rno-miR-466d	20	rno-miR-199a-5p	38	rno-miR-30e-3p	56	rno-miR-221-3p
3	rno-miR-466b-5p	21	rno-miR-21-3p	39	rno-miR-30a-3p	57	rno-miR-222-3p
4	rno-miR-10a-5p	22	rno-miR-204-3p	40	rno-miR-148b-5p	58	rno-miR-221-5p
5	rno-miR-17-1-3p	23	rno-miR-330-5p	41	rno-miR-148a-5p	59	rno-miR-3120
6	rno-miR-20b-3p	24	rno-miR-326-3p	42	rno-miR-365-3p	60	rno-miR-211-5p
7	rno-miR-667-5p	25	rno-miR-29b-3p	43	rno-miR-504	61	rno-miR-204-5p
8	rno-miR-3562	26	rno-miR-29a-3p	44	rno-miR-543-3p	62	rno-miR-300-3p
9	rno-miR-93-5p	27	rno-miR-29c-3p	45	rno-miR-30e-5p	63	rno-miR-128-3p
10	rno-miR-20a-5p	28	rno-miR-3065-3p	46	rno-miR-384-5p	64	rno-miR-672-3p
11	rno-miR-106b-5p	29	rno-miR-216b-5p	47	rno-miR-30d-5p	65	rno-miR-342-3p
12	rno-miR-17-5p	30	rno-miR-27a-5p	48	rno-miR-30a-5p	66	rno-miR-27b-3p
13	rno-miR-20b-5p	31	rno-miR-216a-3p	49	rno-miR-30c-5p	67	rno-miR-27a-3p
14	rno-miR-3583-5p	32	rno-miR-7f-2-3p	50	rno-miR-30b-5p	68	rno-miR-140-3p
15	rno-miR-301b-5p	33	rno-miR-664-2-5p	51	rno-miR-344b-5p	69	rno-miR-3075
16	rno-miR-301a-5p	34	rno-miR-664-1-5p	52	rno-miR-344g	70	rno-miR-290
17	rno-miR-146b-5p	35	rno-miR-384-3p	53	rno-miR-298-5p	71	rno-miR-293-5p
18	rno-miR-146a-5p	36	rno-miR-3564	54	rno-miR-192-5p	72	rno-miR-292-5p

5.2. LİPOTOKSİK KOŞULLAR ALTINDA PARKİN PROTEİNİ VARLIĞININ INS1-E HÜCRE CANLILIĞINA OLAN ETKİSİ

Yapılan tüm uygulamaların hücre canlılığına etkilerinin gözlemlendiği MTT testi sonucu Şekil 5.3.'te grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5.3. MTT analizi sonrası hücre canlılığı yüzde grafikleri
Uygulamalar 24 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.
(* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

Yapılan MTT çalışmasında *Park2* geninin sessizleştirilmesinin (*Park2* siRNA + 0,3mM PA 24 Saat Uygulaması) %71 sağkalım oranı ile hücre canlılığına en olumsuz etki eden koşul olduğu gözlemlenmiş bunu Negatif Kontrol siRNA + 0,3mM PA (%78) uygulaması ve onu da 0,3mM PA uygulaması (% 90) takip etmiştir.

Negatif kontrol siRNA uygulanan hücrelerde beklenenden fazla canlılık azalmasının gen sessizleştirme protokolünde kullanılan transfeksiyon ajanının hücreye siRNA'nın ulaştırılması sürecinde vermiş olduğu hasarın sebep olabileceği düşünülmüştür.

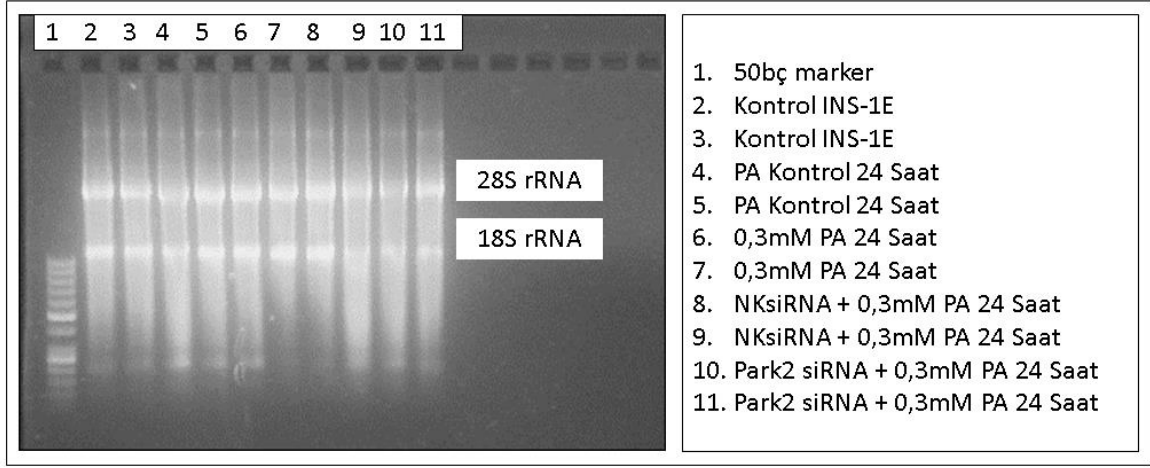
0,3mM PA ve *Park2* siRNA + 0,3mM PA 24 Saat uygulamalarının hücre canlılığına etkileri karşılaştırıldığında; *Park2* geninin sessizleştirilmesine bağlı hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır.

5.3. PARKİN PROTEİNİ VARLIĞINDA VE PARK2 GENİNİN SİRNA ARACILI SESSİZLEŞTİRİLMESİ ARDINDAN PA İLE OLUŞTURULAN LİPOTOKSİK KOŞULLAR ALTINDA ER STRES, OTOFAJİ, APOPTOZ GRUBU GENLERİ VE PARK2 GEN İFADE SEVİYELERİNDE OLUŞAN DEĞİŞİMLER

Park2 geni varlığında ve siRNA aracılı olarak *Park2* geninin sessizleştirilmesi ardından PA uygulamaları sonrası toplanan INS-1E hücrelerinden elde edilmiş total RNA'nın miktar ve sağlamlık kontrol sonuçları olan örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans ölçümleri ile μL 'deki ng cinsinden RNA miktarları yani konsantrasyonları Çizelge 5.3.'te ve RNA örneklerinin sağlamlık tayini için % 1,5 yoğunlukta agaroz jelde, 90V'da 45 dk jel elektroforezi sonrası beklenen 18S rRNA ile 28S rRNA bantlarının UV altındaki görüntüsü Şekil 5.4.'te gösterilmiştir.

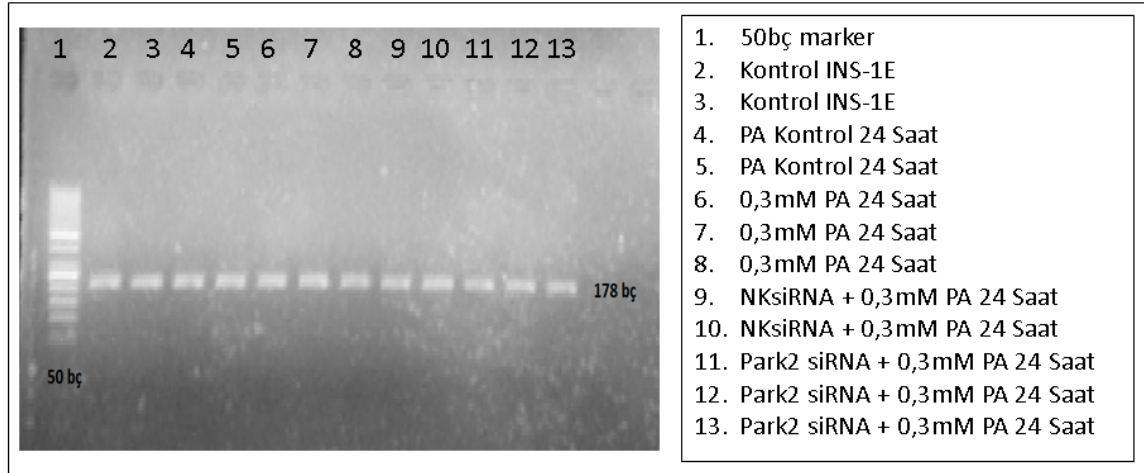
Çizelge 5.3. Örnek total RNA ölçüm tablosu

Uygulama Grubu	1.ölçüm	2.ölçüm	
0,3mM PA 24 Saat	0.18	0.18	260
	0.085	0.084	280
	2.118	2.144	260/280
	144.222	144.225	ng/ μL
PA Kontrol 24 Saat	0.185	0.19	260
	0.087	0.09	280
	2.113	2.114	260/280
	147.899	151.764	ng/ μL
<i>Park2</i> siRNA+0,3mM PA 24 Saat	0.094	0.097	260
	0.047	0.046	280
	2.003	2.095	260/280
	75.365	77.507	ng/ μL
NKsiRNA+0,3mM PA 24 Saat	0.088	0.089	260
	0.041	0.042	280
	2.134	2.129	260/280
	70.084	70.808	ng/ μL
Uygulama Yapılmamış INS1-E Hücresi	0.184	0.184	260
	0.087	0.087	280
	2.12	2.109	260/280
	147.261	147.247	ng/ μL



Şekil 5.4. Örnek total RNA agaroz jel görüntüsü

Total RNA'nın saflık ve sağlamlık kontrolleri ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiş, cDNA'nın kullanılabilirliğini test için sıçan β -Aktin kontrol PZR'si gerçekleştirilmiştir. Beklenen 178bç'lik PZR ürünü UV jel görüntüsü Şekil 5.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 5.5. cDNA kontrolü için yapılmış sıçan Aktin-Beta PZR agaroz jel görüntüsü

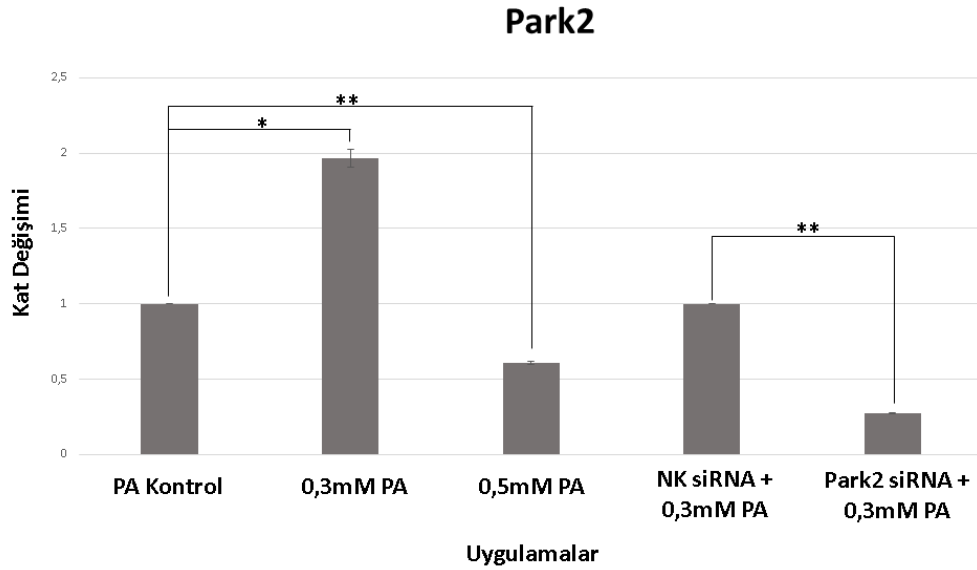
Tüm kontrol basamakları ardından yöntemlerde detaylı olarak bahsedilen 'Kısım 4.2.7. GERÇEK ZAMANLI PZR' deki protokole uygun olarak gen ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiştir.

5.3.1. FARKLI PA DOZLARI VE *PARK2* SİRNA KOŞULUNUN *PARK2* GEN İFADE SEVİYESİNE ETKİSİ

0,3mM PA'nın 24 saat uygulama dozuna ek olarak *Park2* genindeki minimal doz değişimlerine karşı ifade düzey değişimini teyit etmek için sadece *Park2* geni için 0,5mM PA 24 saat dozu da uygulama grubuna eklenmiştir. *Park2* geni ifade düzey farklılıkları Şekil 5.6.'da gösterilmiştir.

Park2 gen ifade seviyesi 0,3mM PA 24 saat uygulamasında beklenildiği gibi 0,5mM PA 24 saat uygulamasına göre daha yüksek gözlenmiş ve aradaki kat farkı da istatistiki olarak anlamlı çıkmıştır.

siRNA uygulaması sonrası *Park2* geni kat değişim seviyesi kontrole göre %80 düzeyinde azalma göstererek beklenen sessizleşme koşulu sağlanmıştır.



Şekil 5.6. *Park2* geni ifadenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(*p<0,05 ** p<0,001, hata çubukları SEM değeridir)

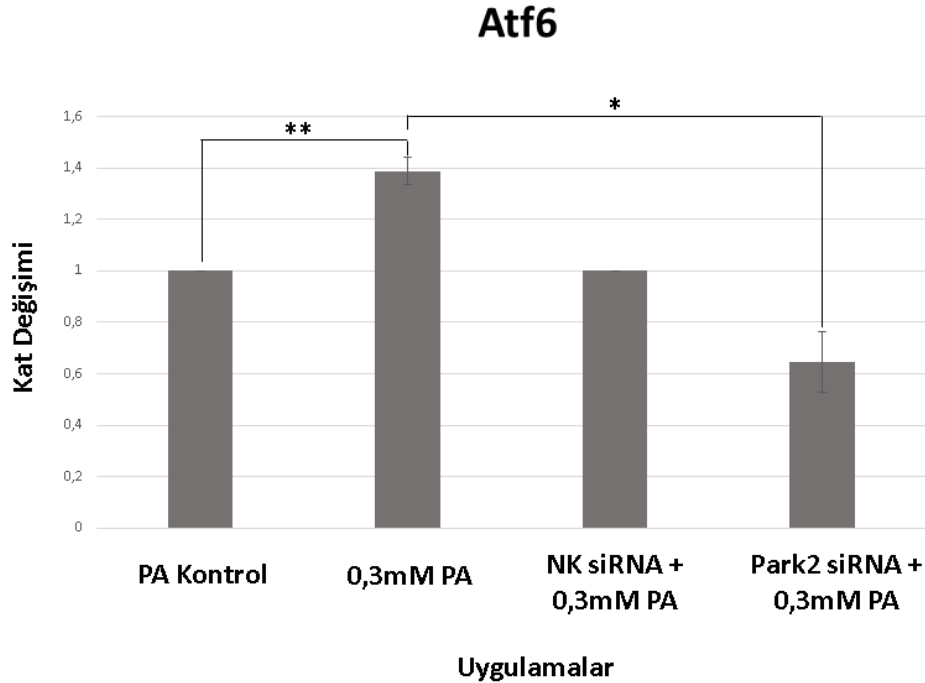
5.3.2. LİPOTOKSİK KOŞULLAR ALTINDA *PARK2* GENİNİN ARTIŞ VE AZALIŞININ ER STRES, OTOFAJİ VE APOPTOZ GENLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNE OLAN ETKİSİ

PA ile oluşturulan lipotoksik koşullar altında Parkin proteininin ER stres, otofaji ve apoptoz yollarına etkilerinin mRNA düzeyinde gözlenebilmesi için 0,3mM PA 24 saat lipotoksik koşullar altında *Park2* gen varlığında ve *Park2* geni sessizleştirilerek her grup için belirlenen genlerle Gerçek Zamanlı PZR çalışması yapılmıştır.

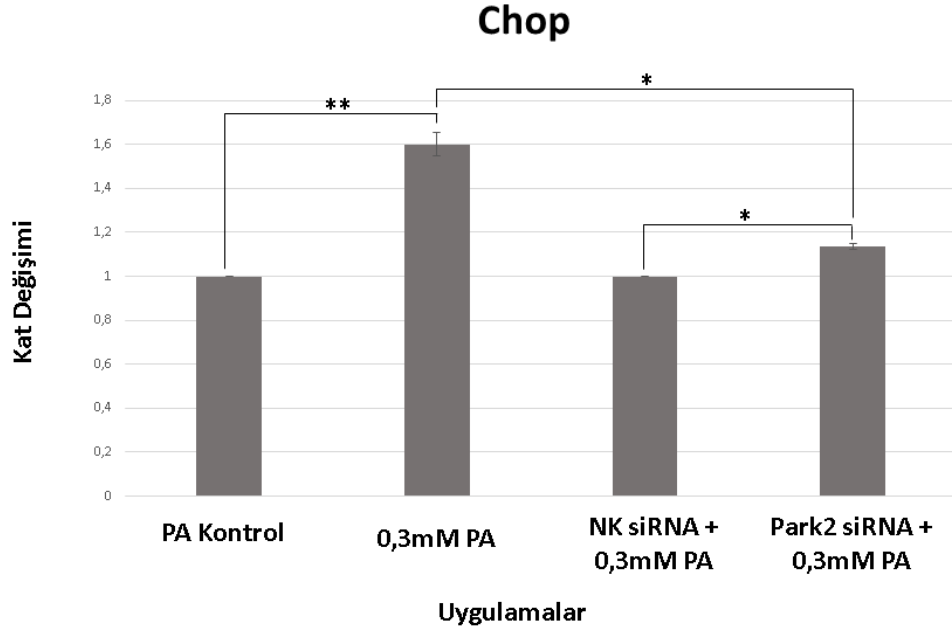
5.3.2.1. ER Stres Genleri

ER Stres gen markerları olarak *Atf6*, *Grp78 (Bip)* ve *Chop (Ddit3)* genlerinin ifade düzey değişimlerine bakılmıştır. Lipotoksik koşullar altında *Park2* geni varlığında üç genin de ifade seviyelerinde artış gözlenirken siRNA aracılı olarak *Park2* geni sessizleştğinde bu ifadenin azalışa geçtiği saptanmıştır.

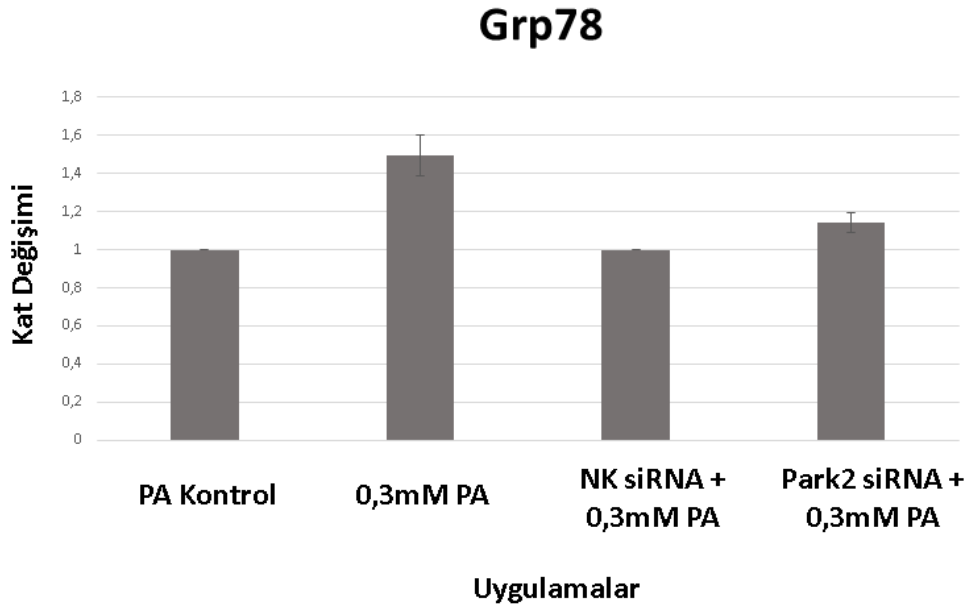
Atf6, *Grp78* ve *Chop* genlerinin uygulamalara bağlı ifade değişim grafikleri Şekil 5.7., 5.8. ve 5.9.'da verilmiştir.



Şekil 5.7. *Atf6* geni ifadelenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, hata çubukları SEM değeridir)



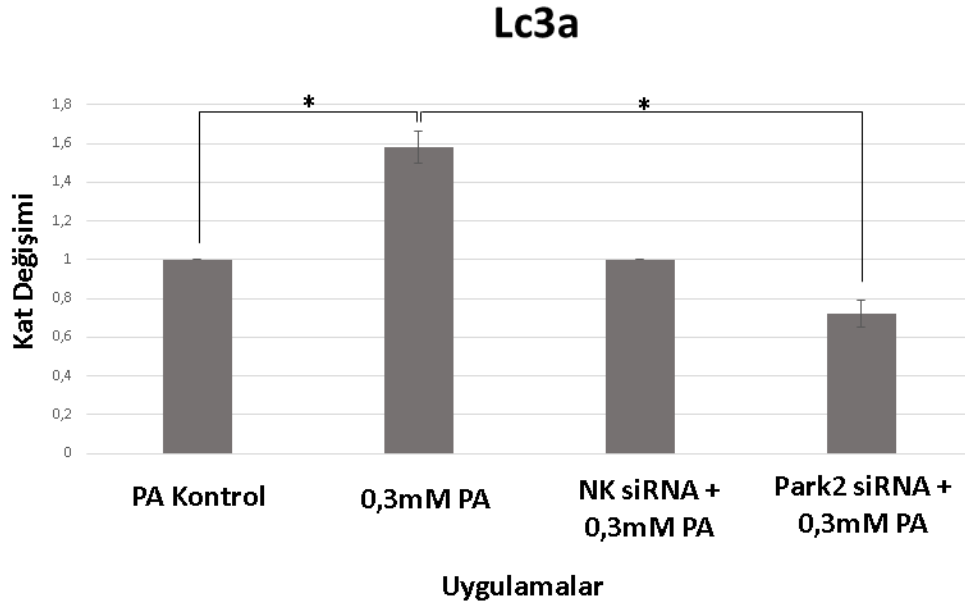
Şekil 5.8. *Chop* geni ifadelenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p<0,05$, ** $p<0,01$, hata çubukları SEM değeridir)



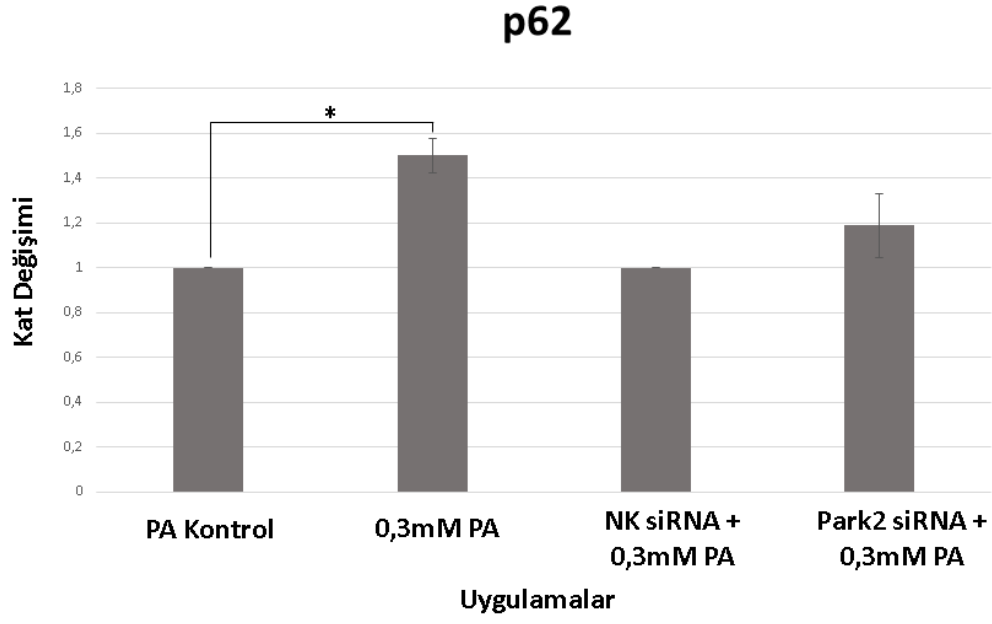
Şekil 5.9. *Grp78* geni ifadelenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(hata çubukları SEM değeridir)

5.3.2.2. Otofaji Genleri

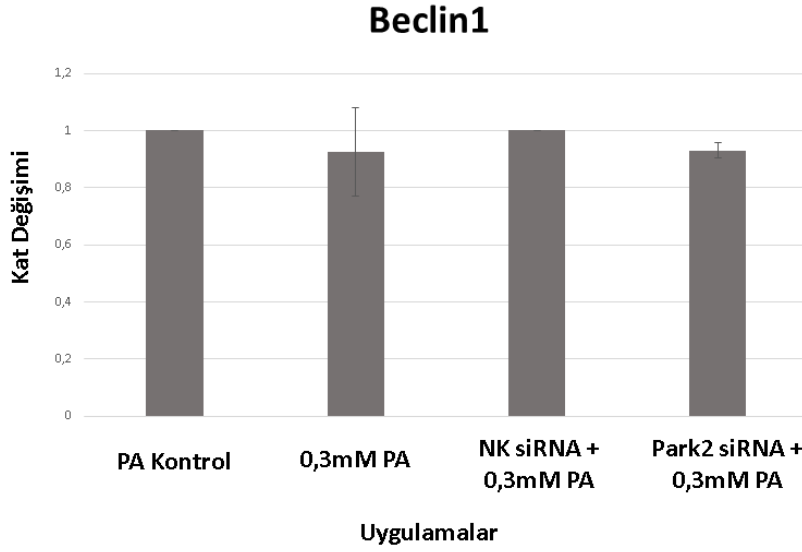
Otofaji markerları olarak belirlenen *Lc3a* (*Map1lc3a*), *p62*(*Sqstm1*) ve *Beclin1*(*Bcn1*) genlerinin lipotoksik koşullarda *Park2* genine bağlı gen ifade seviye farklılıkları Şekil 5.10, 5.11., 5.12.'de gösterilmiştir. *Lc3a* ve *p62* için gen ifade seviyeleri PA uygulamasında, *Park2* geni varlığında siRNA uygulamasına kıyasla daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı değişimlerdir. Her iki koşul için de *Beclin1* geni ifade düzeyi için bariz bir kat farkı olmamasının yanı sıra istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanamamıştır.



Şekil 5.10. *Lc3a* geni ifadelenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p < 0,05$, Hata çubukları SEM değeridir)



Şekil 5.11. *p62* geni ifadenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p < 0,05$, Hata çubukları SEM değeridir)

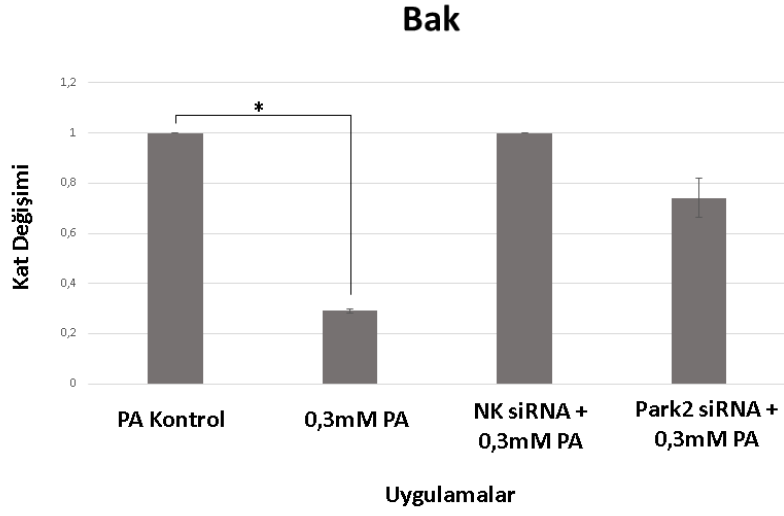


Şekil 5.12. *Beclin1*'in ifadenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(Hata çubukları SEM değeridir)

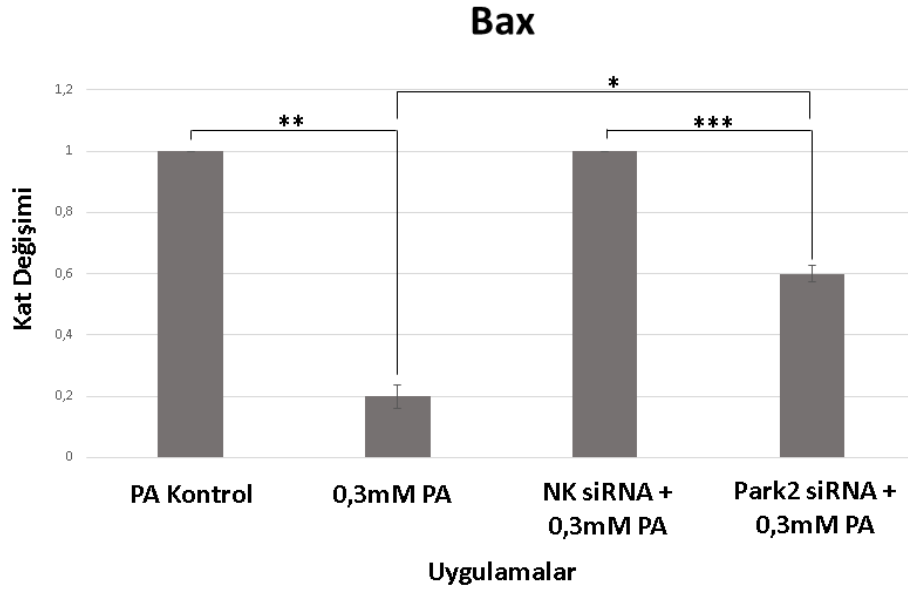
5.3.2.3. Apoptoz Genleri

Lipotoksik koşullar altında Parkin proteininin hücre sağkalımına etkisinin apoptoz yönünden incelenebilmesi için pro-apoptotik genler *Bak* ve *Bax*, anti-apoptotik genler *Bcl-2* ve *Bcl-XL*

gen ifade düzeylerine bakılmıştır. Pro-apoptotik genlerin *Park2* geninin sessizleştiği koşullarda ifade artışı gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 5.13. ve Şekil 5.14.).

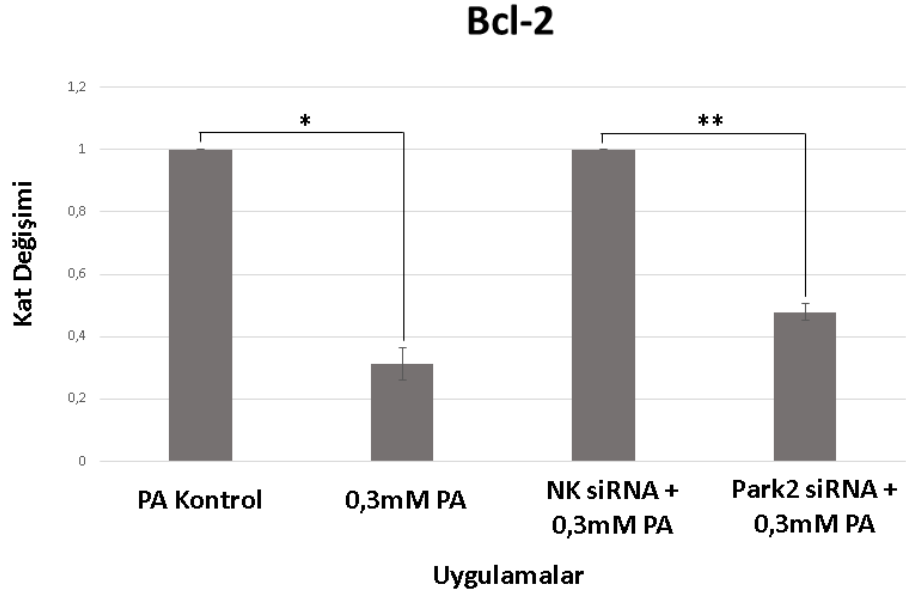


Şekil 5.13. *Bak* geni ifadelene grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p < 0,001$, Hata çubukları SEM değeridir)

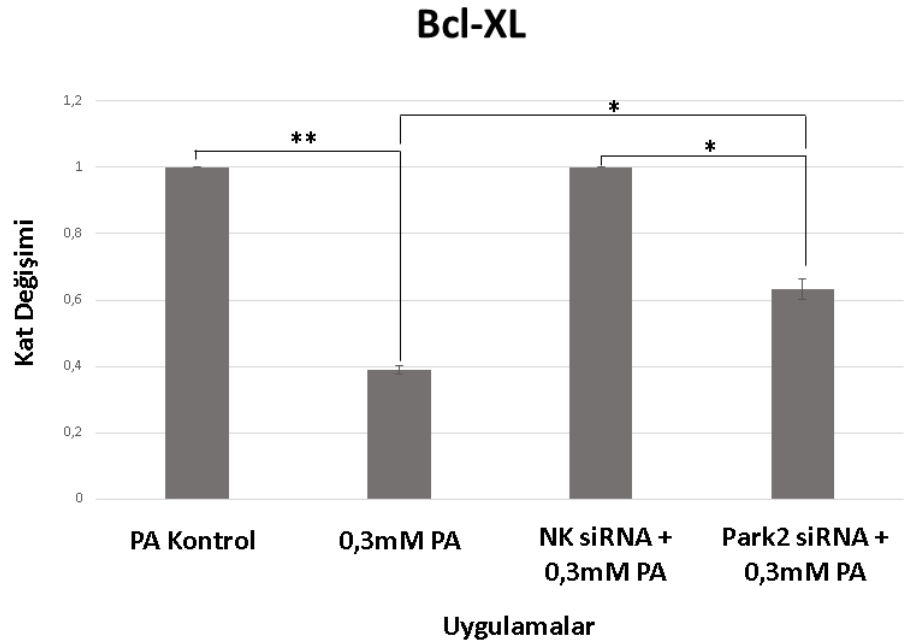


Şekil 5.14. *Bax* geni ifadelene grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, Hata çubukları SEM değeridir)

Anti-apoptotik genler *Bcl-2* ve *Bcl-XL* *Park2* geni varlığında ve PA uygulamasında siRNA uygulamasına göre daha düşük ifade seviyeleri göstermiştir (Şekil 5.15. ve Şekil 5.16.). mRNA düzeyinde anti-apoptotik genlerden beklenen değişim gözlenememiştir.



Şekil 5.15. *Bcl-2* geni ifadenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p<0,01$ ** $p<0,001$, Hata çubukları SEM değeridir)



Şekil 5.16. *BclXL* geni ifadenme grafiği
Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
(* $p<0,05$ ** $p<0,001$, hata çubukları SEM değeridir)

5.3.2.4. Bcl-2/Bcl-Xl Oranı ile Hücrenin Apoptoza Yöneliminin İncelenmesi

Apoptotik genlerin mRNA ifadenme bulgularının yanı sıra *Bax* ve *Bcl2* genlerinin mRNA düzeyinde ifadenme değerlerinin oranı (*Bax/Bcl2* oranı) bir apoptoz belirteci olarak kullanılmakta ve literatürde de yer almaktadır (168–171).

Bax/Bcl2 oranının 1'den yüksek olması hücrede apoptoza yönelim olduğunu belirtmektedir. *Bax* ne kadar fazla ise hücre apoptoza gitmekte, *Bcl2* ne kadar fazla ise hücrede apoptoz o derece inhibe olmaktadır. *Bax* ve *Bcl2* genlerinin ifadenme düzeyleri bu noktadan hareketle incelendiğinde lipotoksik koşullarda *Park2* geni varlığında 0,7 olan *Bax/Bcl2* oranı *Park2* geni siRNA aracılı olarak susturulduğunda 1,2'ye yükselmektedir. Hücrelerin siRNA uygulaması sonrası apoptoza yöneldiğini göstermektedir (Çizelge 5.4.).

Çizelge 5.4. Uygulamalara bağlı değişen *Bax/Bcl2* oranları

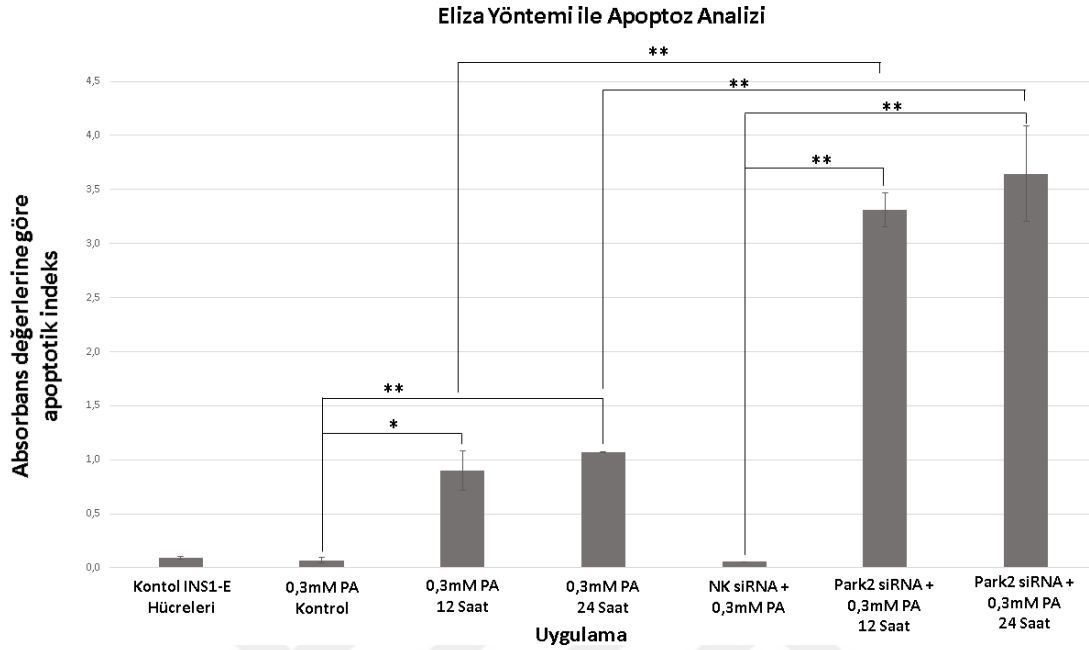
Uygulama	<i>Bax/Bcl2</i> oranları
0,3mM PA 24 Saat (Parkin proteini varlığında)	0,2/0,3= 0,7
Park2 siRNA + 0,3mM PA 24 Saat (Parkin proteini yokluğunda)	0,6/0,5= 1,2 (>1) Apoptoza yönelim

5.4. LİPOTOKSİK KOŞULLARDA PARK2 GENİNİN HÜCREDEKİ APOPTOZ YÖNELİMİNE ETKİSİNİN ELİZA YÖNTEMİ İLE TEST EDİLMESİ

Park2 geni varlığında ve siRNA aracılı sessizleştirildiği lipotoksik koşullar ile indüklenen hücre ölümü ardından sitoplazmik histon-ilişkili DNA parçalarının (mono- ve oligonükleozomlar) fotometrik enzim immün analizinin *in-vitro* tespitini sağlayan Eliza tabanlı sistemde (Roche-Cell Death Detection Elisa Cat. No: 11 544 675 001) apoptoz geçiren hücrelerin sitoplazmasında mevcut olduğu bilinen histonla ilişkili DNA fragmanları aracılığı ile hücrelerin apoptoz düzeyi analiz edilmiştir (Şekil 5.17.).

Her gruptan eşit sayıda hücre ile yapılan analizde uygulama grupları kontrollerine göre çok daha yüksek düzeyde apoptotik değer vermiştir. Uygulama grupları içerisinde de en fazla

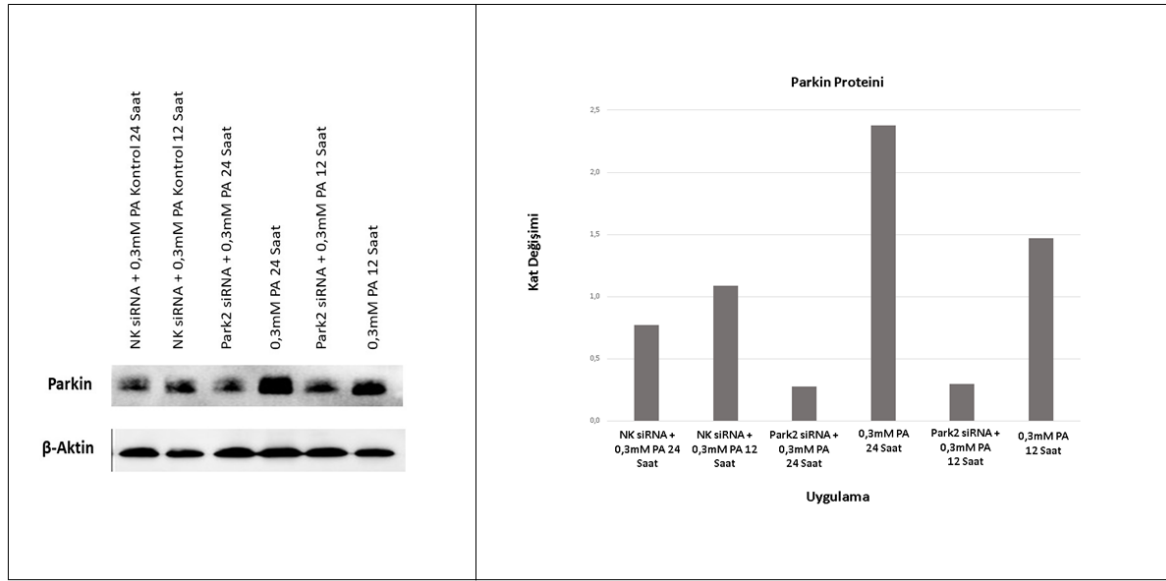
apoptoza yönelen grup 24 saat siRNA grubu olurken onu 12 saat siRNA grubu ve PA uygulama grupları 24. ve 12. saat takip etmiştir.



Şekil 5.17. Apoptoz Eliza analiz sonuçları
(*p<0,01 **p<0,001)

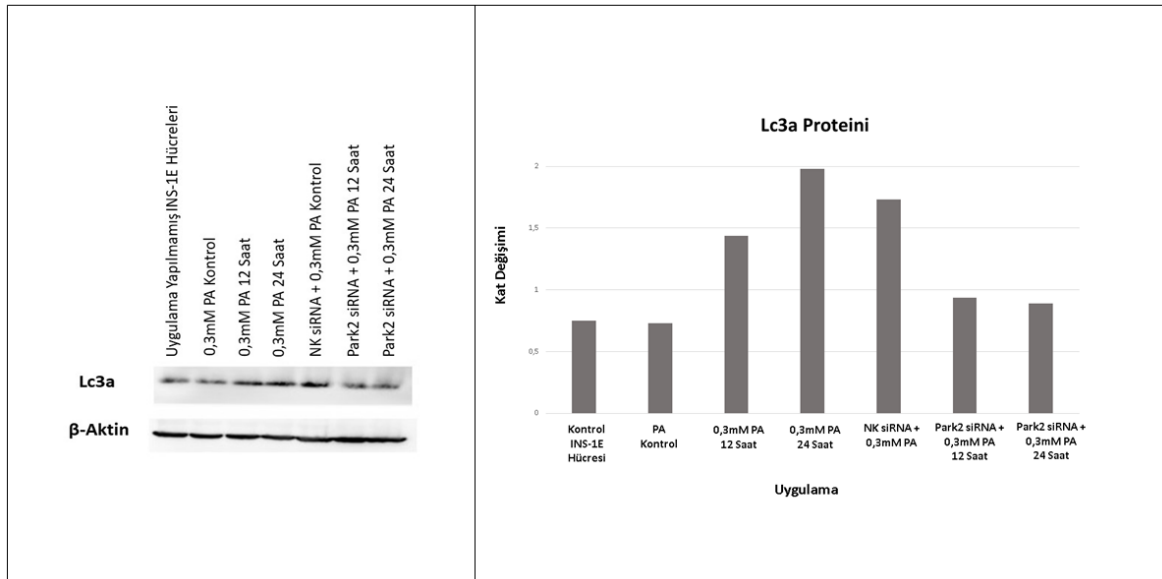
5.5. LİPOTOKSİK KOŞULLAR VE PARK2 SİRNA UYGULAMASININ PARKİN VE LC3A PROTEİN İFADE SEVİYELERİNE OLAN ETKİSİ

Parkin proteini Western Blot çalışması sonucunda Gerçek Zamanlı PZR çalışmalarında mRNA düzeyinde elde edilen sonuçlara paralel sonuçlar vermiştir (Şekil 5.18.). PA uygulamasında 24 saatteki protein ifade düzeyi 12 saatten daha fazla saptanmıştır. siRNA uygulamalarında da *Park2* geninin sessizleşmesine bağlı Parkin proteini ifadesinin oldukça azalmış olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.18. Parkin proteininin Western Blot sonucu

Otofaji markerı Lc3a proteinini, 12 ve 24 saatlik 0,3mM PA uygulaması sonrasında kontrole ve siRNA uygulamalarına göre daha yüksek ifade göstermiştir (Şekil 5.19.).



Şekil 5.19. Lc3a proteininin Western Blot sonucu

5.6. PARKİN PROTEİNİ VARLIĞINDA VE SİRNA ARACILI OLARAK İFADESİNİN BASKILANDIĞI LİPOTOKSİK KOŞULLARDA INS-1E HÜCRELERİNDE DEĞİŞEN MİRNA PROFİLİNİN İNCELENMESİ

Lipotoksik koşulların *Park2* geni varlığına bağlı miRNA düzeyinde etkisini görebilmek için 0,3mM PA ve *Park2* siRNA + 0,3mM PA uygulamaları total RNA'sı ile Gerçek Zamanlı PZR miRNA dizin çalışması gerçekleştirilmiştir. Uygulamada Kısım 4.2.8'de detaylı şekilde anlatılmış olan Qiagen miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR protokolü uygulanmıştır. Fare ve sıçan türüne özgü PCR panellerine (Qiagen-Cat No: YAMR-312Y) örnek grupları Çizelge 5.5.'teki şekilde yüklenip her bir örnek 3 tekrarlı çalışılmıştır. Roche LightCycler 480 cihazında gerçekleştirilen analizlerde 35'in üzerinde Ct değeri veren örnekler analizden dışlanmıştır.

Çizelge 5.5. Gerçek Zamanlı PZR miRNA Dizin çalışması için kullanılan PA ve siRNA uygulama grupları ve bu grupların kontrolleri

Örnek No	Örnek Adı	Grup	Örnek No	Örnek Adı	Grup
1	0,3mM PA Kontrol 24 Saat	Kontrol	1	NK siRNA + 0,3mM PA 24 Saat	Kontrol
2	0,3mM PA Kontrol 24 Saat (1)	Kontrol	2	NK siRNA + 0,3mM PA 24 Saat (1)	Kontrol
3	0,3mM PA Kontrol 24 Saat (2)	Kontrol	3	NK siRNA + 0,3mM PA 24 Saat (2)	Kontrol
4	0,3mM PA 24 Saat	Grup1	4	<i>Park2</i> siRNA + 0,3mM PA 24 Saat	Grup1
5	0,3mM PA 24 Saat (1)	Grup1	5	<i>Park2</i> siRNA + 0,3mM PA 24 Saat (1)	Grup1
6	0,3mM PA 24 Saat (2)	Grup1	6	<i>Park2</i> siRNA + 0,3mM PA 24 Saat (2)	Grup1

Elde edilen miRNA C_t değerleri Qiagen'in GeneGlobe (159) sitesine yüklenerek miRNA analizleri gerçekleştirilmiştir. Paneldeki tüm miRNA'ların istatistiksel analizi ($p < 0,05$) ve kat değişim oranları site tarafından raporlanmıştır. Bu veriler ile Çizelge 5.6.'daki akış izlenerek miRNA profillemeye çalışmasının biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.6. Biyoinformatik analiz için izlenen yolun iş-akış şeması

1	PZR miRNA Dizin çalışması sonucu her iki uygulama için istatistiksel olarak anlamlı değişen ($p < 0,05$) miRNA'lar seçilmiştir.
2	Seçilen miRNA'ların sıçanlardaki karşılığı Qiagen 'Gene Globe' ve MirBase sitelerinden kontrol edilmiştir.
3	Venny programı ile her iki uygulama için ortak miRNA'lar belirlenmiştir.
4	Seçilen miRNA'lara ek olarak en az bir uygulama sonucu istatistiksel olarak anlamlı değişmiş ve uygulamalar arası kat farkı dramatik olan miRNA'lar da incelenecek miRNA listesine eklenmiştir.
5	Listelenmiş miRNA'ların TargetScan ile hedefledikleri genler belirlenmiştir.
6	Hedeflenen gen listeleri ile Webgestalt üzerinden yolak analizi yapılmıştır. FDR değeri 0,05' ten küçük olan yolaklar listelenmiş ve incelenmiştir.
7	Filtrelenen miRNA'lar hedefledikleri genler ve etkiledikleri yolaklar açısından daha detaylı incelenerek, araştırılan hipotezi destekleyen yolak mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

PA ve siRNA uygulama örnekleri ile yapılmış dizin çalışması raporundan elde edilen istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren ($p < 0,05$) miRNA'lar çekilerek listelenmiştir. Farklı canlı isimleri (hsa-miR, mmu-miR ve rno-miR şeklinde) ile adlandırılmış miRNA'lardan oluşan karışık listelerin sıçanlarda karşılıkları Qiagen-GeneGlobe sitesinden (172) kontrol edilerek, sıçanlarda ifade olan miRNA'ların dizi ve MIMAT ID bilgisi kaydedilmiştir (Şekil 5.25.). miRNA'lar filtrelenerek sıçana özgü miRNA adlandırmasıyla yeniden listelenmiştir. Bu filtreleme işlemi ardından MIMAT numarası ile miRBase (173) üzerinden miRNA'nın ikinci bir kontrolü daha yapılmıştır (Şekil 5.26.).

GeneGlobe | Applications | Customize | Analyze | Knowledge | Tools

Search in product family

All Species [Help](#)

BUY PRODUCTS | **PRODUCT DETAILS** | **PRODUCT RESOURCES**

Available Products: 2

hsa-miR-130a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay

Wet-lab validated for qPCR and dPCR.

targets mature miRNA: hsa-miR-130a-3p, bta-miR-130a, ccr-miR-130a, cfa-miR-130a, cgr-miR-130a-3p, cli-miR-130a-3p, cpo-miR-130a-3p, dno-miR-130a-3p, dre-miR-130a, eca-miR-130a, gga-miR-130c-3p, mdo-miR-130c-3p, mmu-miR-130a-3p, oan-miR-130b-3p, oga-miR-130a, oha-miR-130b-3p, pal-miR-130-3p, pbv-miR-130d-3p, ppy-miR-130a, ptr-miR-130a, rno-miR-130a-3p, ssc-miR-130a, tch-miR-130a-3p, tgu-miR-130c-3p, xtr-miR-130a

MIMAT0000425: 5'CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU

Şekil 5.20. İnsana ait bir miRNA'nın sıçan karşılığının Qiagen-GeneGlobe üzerinden kontrolü

miRBase MANCHESTER

Home | Search | Browse | Help | Download | Blog | Submit

miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed mir in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed miR). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about the naming service.

To receive email notification of data updates and feature changes please subscribe to the [miRBase announcements mailing list](#). Any queries about the website or naming service should be directed at mirbase@manchester.ac.uk.

miRBase is managed by the [Griffiths-Jones lab](#) at the [Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester](#) with funding from the [BBSRC](#). miRBase was previously hosted and supported by the [Wellcome Trust Sanger Institute](#).

References

If you make use of the data presented here, please cite the following articles in addition to the primary data sources:

[miRBase: from microRNA sequences to function](#).
Kozomara A, Birgaonu M, Griffiths-Jones S.
Nucleic Acids Res 2019 47:D155-D162

Mature sequence rno-miR-130a-3p

Accession	MIMAT0000836
Previous IDs	rno-miR-130a
Sequence	55 - c.agugrcaauguuaaaggcau - 76 Get sequence
Deep sequencing	514348 reads, 507 experiments
Evidence	experimental; cloned [1-4], Northern [1,3], SOLiD [5]
Predicted targets	TargetScanVert: rno-miR-130a-3p miRDB: rno-miR-130a-3p microrna.org: rno-miR-130a-3p

Şekil 5.21. miRNA'nın miRBase üzerinden kontrol edilmesi

Fitreleme ardından, PA uygulaması için başlangıçta anlamlı olarak değişen 144 adet miRNA sadece sıçana özgü ve istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği ($p < 0,05$) takdirde 110'a düşmüştür (Çizelge 5.7.).

Çizelge 5.7. 0,3mM PA uygulamasının dizin çalışması sonucunda elde edilmiş sıçana özgü ve istatistiki olarak anlamlı değişen ($p<0,05$) miRNA listesi

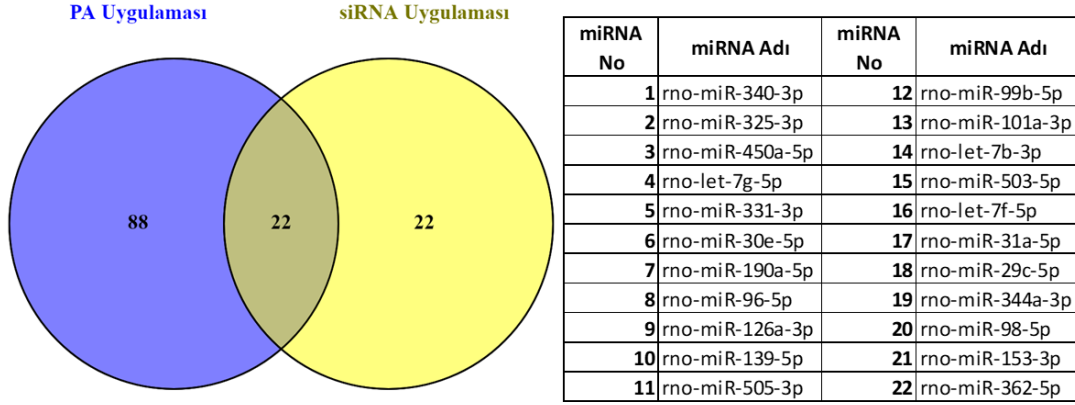
miRNA No	miRNA Adı	p Değeri	Kat Değişimi	miRNA No	miRNA Adı	p Değeri	Kat Değişimi	miRNA No	miRNA Adı	p Değeri	Kat Değişimi	miRNA No	miRNA Adı	p Değeri	Kat Değişimi
1	rno-miR-16-5p	0.000014	2,53	31	rno-miR-101a-5p	0.003657	1,29	61	rno-miR-20a-5p	0.012421	2,17	91	rno-miR-346	0.034060	2,02
2	rno-miR-219a-5p	0.000113	3,34	32	rno-let-7b-5p	0.003930	2,29	62	rno-let-7e-5p	0.012584	2,41	92	rno-miR-187-3p	0.035573	2,87
3	rno-miR-9a-3p	0.000138	4,21	33	rno-miR-378a-3p	0.004796	3,81	63	rno-miR-19a-3p	0.013464	1,96	93	rno-miR-181a-5p	0.035666	2,45
4	rno-miR-27a-3p	0.000147	2,31	34	rno-miR-374-5p	0.004876	3,9	64	rno-miR-149-5p	0.013755	2,19	94	rno-miR-150-5p	0.037175	1,25
5	rno-miR-28-5p	0.000158	3,83	35	rno-miR-340-5p	0.005054	2,96	65	rno-miR-322-5p	0.014033	2,54	95	rno-miR-92a-3p	0.038578	1,74
6	rno-miR-340-3p	0.000433	3,01	36	rno-miR-30e-5p	0.005254	3,69	66	rno-miR-191-5p	0.014072	2,29	96	rno-miR-153-3p	0.042777	2,27
7	rno-miR-484	0.000466	2,57	37	rno-miR-383-5p	0.005810	3,09	67	rno-miR-34b-3p	0.014463	1,38	97	rno-miR-744-5p	0.043100	2,68
8	rno-miR-425-5p	0.000539	2,37	38	rno-miR-674-3p	0.006080	2,15	68	rno-miR-152-3p	0.014652	3,06	98	rno-miR-488-3p	0.044012	3,64
9	rno-miR-212-3p	0.000550	5,41	39	rno-miR-182	0.006184	3,34	69	rno-miR-500-3p	0.014716	3,29	99	rno-miR-103a-3p	0.044351	2,18
10	rno-miR-598-3p	0.000668	3,21	40	rno-miR-19b-3p	0.006203	3,61	70	rno-miR-101a-3p	0.016062	2,71	100	rno-miR-362-5p	0.045501	3,3
11	rno-miR-30a-5p	0.000695	2,91	41	rno-miR-542-5p	0.006263	2,66	71	rno-miR-34c-5p	0.017088	3,12	101	rno-miR-24-3p	0.046124	2,02
12	rno-miR-31a-3p	0.000697	-1,44	42	rno-miR-190a-5p	0.006548	3,16	72	rno-miR-449a-5p	0.018639	3,48	102	rno-miR-142-3p	0.047336	3
13	rno-miR-708-5p	0.000736	2,19	43	rno-miR-128-3p	0.007135	2,27	73	rno-let-7b-3p	0.019044	1,9	103	rno-miR-328a-3p	0.049106	1,83
14	rno-miR-195-5p	0.000838	2,75	44	rno-miR-342-3p	0.007239	2,65	74	rno-miR-582-5p	0.019165	3,1	104	rno-miR-186-5p	0.049991	1,85
15	rno-miR-24-1-5p	0.000861	2,46	45	rno-miR-30a-3p	0.007639	1,68	75	rno-miR-503-5p	0.019234	3,13	105	rno-miR-29a-3p	0.050874	2,38
16	rno-miR-325-3p	0.000938	2,51	46	rno-miR-29c-3p	0.007787	3,86	76	rno-miR-29a-5p	0.019695	1,74	106	rno-miR-9a-5p	0.053741	2,7
17	rno-miR-92b-3p	0.000981	3,29	47	rno-miR-384-5p	0.007807	3,74	77	rno-miR-421-5p	0.021307	2,09	107	rno-miR-375-3p	0.055281	2,44
18	rno-miR-872-3p	0.001156	1,48	48	rno-let-7c-5p	0.008124	2,65	78	rno-let-7f-5p	0.021823	4,54	108	rno-miR-873-5p	0.057494	1,83
19	rno-miR-132-3p	0.001280	4,79	49	rno-miR-107-3p	0.008397	2,95	79	rno-miR-200c-3p	0.023032	3,24	109	rno-miR-125a-5p	0.058071	2,37
20	rno-miR-125b-5p	0.001489	4,1	50	rno-miR-96-5p	0.008638	2,81	80	rno-miR-31a-5p	0.023830	2,29	110	rno-miR-497-5p	0.059089	2,15
21	rno-miR-450a-5p	0.001701	2,51	51	rno-miR-126a-3p	0.008778	3,37	81	rno-miR-192-5p	0.024081	2,56				
22	rno-let-7g-5p	0.001994	3,85	52	rno-miR-203a-3p	0.009574	3,27	82	rno-miR-29c-5p	0.024164	2,06				
23	rno-miR-99b-3p	0.002663	3,64	53	rno-miR-139-5p	0.010130	2,73	83	rno-miR-339-5p	0.026708	2,95				
24	rno-miR-15b-5p	0.002780	2,35	54	rno-miR-93-5p	0.010640	2,21	84	rno-miR-501-5p	0.026908	2,49				
25	rno-miR-151-3p	0.002956	3,74	55	rno-miR-129-2-3p	0.010997	3,86	85	rno-miR-130a-3p	0.028881	2,87				
26	rno-miR-378a-5p	0.003369	3,57	56	rno-miR-505-3p	0.011217	3,35	86	rno-miR-130b-3p	0.029231	1,76				
27	rno-miR-196a-5p	0.003371	2,87	57	rno-miR-99b-5p	0.011424	2,92	87	rno-miR-344a-3p	0.031100	3,77				
28	rno-miR-21-5p	0.003504	3,1	58	rno-miR-466c-5p	0.012041	1,54	88	rno-miR-338-5p	0.031282	1,88				
29	rno-miR-141-3p	0.003520	2,44	59	rno-miR-194-5p	0.012144	2,98	89	rno-miR-146b-5p	0.032387	3,19				
30	rno-miR-331-3p	0.003571	3,7	60	rno-let-7d-5p	0.012192	2,92	90	rno-miR-98-5p	0.032714	2,48				

Aynı şekilde başlangıçta anlamlı değişen miRNA sayısı 62 olan siRNA uygulaması miRNA'ları ise 44'e inmiştir (Çizelge 5.8.).

Çizelge 5.8. *Park2* siRNA + 0,3mM PA uygulamasının dizin çalışması sonucunda elde edilmiş sıçana özgü ve istatistiki olarak anlamlı değişen ($p<0,05$) miRNA listesi

miRNA No	miRNA Adı	p Değeri	Kat Değişimi	miRNA No	miRNA Adı	p Değeri	Kat Değişimi
1	rno-miR-30d-3p	0.001210	1,42	23	rno-miR-101a-3p	0.025350	1,84
2	rno-miR-99b-5p	0.001619	1,68	24	rno-miR-32-5p	0.025758	2,59
3	rno-miR-204-3p	0.002403	1,55	25	rno-miR-96-5p	0.026888	1,64
4	rno-miR-505-3p	0.002435	1,87	26	rno-miR-139-3p	0.026990	2,56
5	rno-miR-503-5p	0.003466	3,65	27	rno-miR-455-5p	0.027756	1,65
6	rno-miR-214-3p	0.003649	1,98	28	rno-miR-362-5p	0.031316	1,97
7	rno-miR-344a-5p	0.003820	3,88	29	rno-miR-301a-3p	0.032521	2,75
8	rno-miR-542-3p	0.005234	1,64	30	rno-miR-339-3p	0.033293	1,42
9	rno-let-7f-5p	0.005602	2,21	31	rno-let-7g-5p	0.034301	1,22
10	rno-miR-30e-3p	0.006656	2,86	32	rno-let-7a-5p	0.036192	1,56
11	rno-miR-347	0.009099	2,83	33	rno-miR-135b-5p	0.039172	2,14
12	rno-let-7b-3p	0.009254	1,52	34	rno-miR-483-3p	0.039227	-1,98
13	rno-miR-450a-5p	0.012804	2,1	35	rno-miR-29c-5p	0.039756	2,54
14	rno-let-7f-1-3p	0.013464	1,55	36	rno-miR-344a-3p	0.043035	2,59
15	rno-miR-331-3p	0.013504	1,88	37	rno-miR-140-5p	0.043934	1,8
16	rno-miR-296-5p	0.013733	-1,61	38	rno-miR-153-3p	0.044151	2,47
17	rno-miR-340-3p	0.014431	1,59	39	rno-miR-30e-5p	0.045678	1,67
18	rno-miR-325-3p	0.014954	1,2	40	rno-miR-126a-3p	0.047194	1,69
19	rno-miR-98-5p	0.016410	1,79	41	rno-miR-193a-3p	0.049996	2,42
20	rno-miR-190a-5p	0.020800	-1,63	42	rno-miR-183-5p	0.052703	1,56
21	rno-miR-139-5p	0.023873	1,51	43	rno-miR-31a-5p	0.054366	1,4
22	rno-miR-431	0.024813	1,93	44	rno-miR-22-3p	0.055486	1,05

Elde edilen iki listedeki miRNA'lar Venny Programı yardımı ile kesiştirilerek her iki uygulama için de anlamlı değişime uğramış ($p<0,05$) 22 adet ortak miRNA saptanmıştır (Şekil 5.22.).



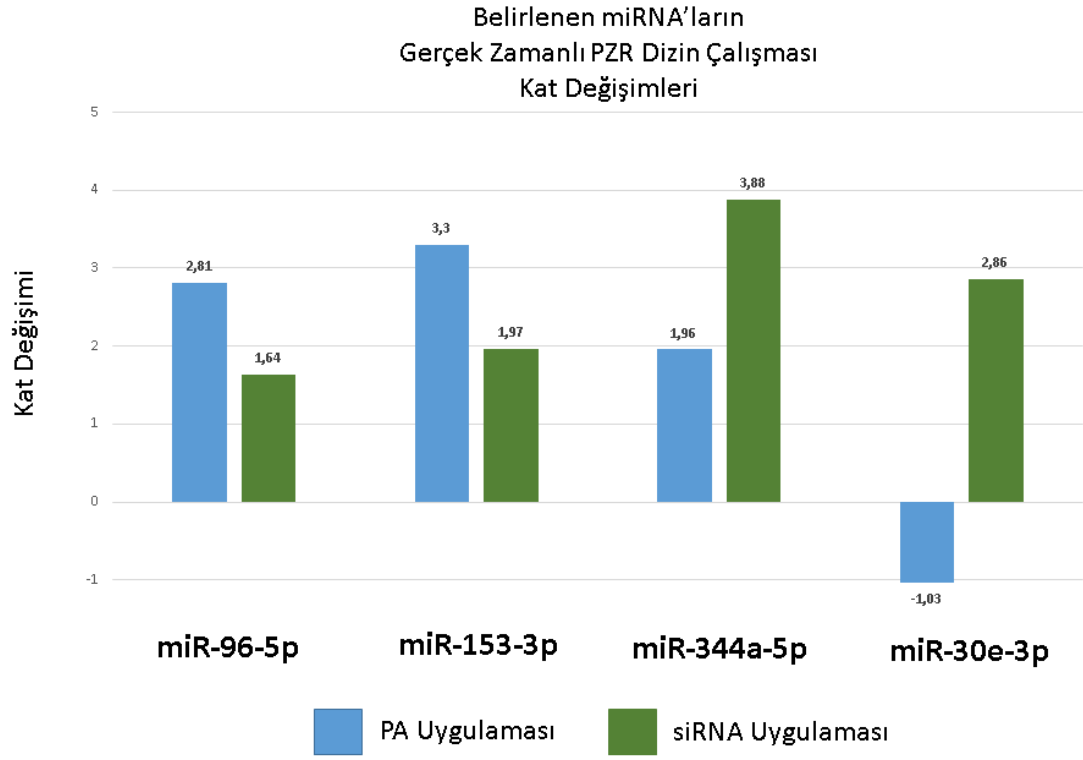
Şekil 5.22. Her iki mikrodizin çalışmasında ortak bulunan miRNA'lar ($p<0,05$)

Bu listeye ek olarak, uygulamalar arası miRNA ifade düzeyleri belirgin farklılık gösteren ve en az bir uygulama grubu istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) değişmiş 11 miRNA daha listeye eklenmiştir. Toplamda detaylı biyoinformatik incelemesi yapılacak 33 miRNA saptanmıştır (Çizelge 5.9.).

Çizelge 5.9. Dizin çalışmasından detaylı biyoinformatik araştırmalar için filtrelenmiş 33 miRNA

miRNA No	miRNA Adı	PA Uygulaması		siRNA Uygulaması	
		p değeri	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi
1	rno-miR-340-3p	0,000433	3,01	0,014431	1,59
2	rno-miR-325-3p	0,000938	2,51	0,014954	1,2
3	rno-miR-450a-5p	0,001701	2,51	0,012804	2,1
4	rno-let-7g-5p	0,001994	3,85	0,034301	1,22
5	rno-miR-331-3p	0,003571	3,7	0,013504	1,88
6	rno-miR-30e-5p	0,005254	3,69	0,045678	1,67
7	rno-miR-190a-5p	0,006548	3,16	0,0208	-1,63
8	rno-miR-96-5p	0,008638	2,81	0,026888	1,64
9	rno-miR-126a-3p	0,008778	3,37	0,047194	1,69
10	rno-miR-139-5p	0,01013	2,73	0,023873	1,51
11	rno-miR-505-3p	0,011217	3,35	0,002435	1,87
12	rno-miR-99b-5p	0,011424	2,92	0,001619	1,68
13	rno-miR-101a-3p	0,016062	2,71	0,02535	1,84
14	rno-let-7b-3p	0,019044	1,9	0,009254	1,52
15	rno-miR-503-5p	0,019234	3,13	0,003466	3,65
16	rno-let-7f-5p	0,021823	4,54	0,005602	2,21
17	rno-miR-31a-5p	0,02383	2,29	0,054366	1,4
18	rno-miR-29c-5p	0,024164	2,06	0,039756	2,54
19	rno-miR-344a-3p	0,0311	3,77	0,043035	2,59
20	rno-miR-98-5p	0,032714	2,48	0,01641	1,79
21	rno-miR-153-3p	0,042777	2,27	0,044151	2,47
22	rno-miR-362-5p	0,045501	3,3	0,031316	1,97
23	rno-miR-212-3p	0,00055	5,41	>0,05	-1,59
24	rno-miR-132-3p	0,00128	4,79	>0,05	-1,01
25	rno-miR-31a-3p	0,000697	-1,44	>0,05	1,46
26	rno-miR-449a-5p	0,018639	3,48	>0,05	-1,04
27	rno-miR-182	0,006184	3,34	>0,05	-1,1
28	rno-miR-501-5p	0,026908	2,49	>0,05	-1,2
29	rno-miR-30e-3p	>0,05	-1,03	0,006656	2,86
30	rno-miR-347	>0,05	-1,05	0,009099	2,83
31	rno-miR-296-5p	>0,05	2,54	0,013733	-1,61
32	rno-miR-483-3p	>0,05	1,33	0,039227	-1,98
33	rno-miR-344a-5p	>0,05	1,96	0,00382	3,88

TargetScan (163) programı kullanılarak 33 miRNA'nın tahmini hedef genleri belirlenmiştir. Hedef gen listeleri ile peşi sıra Webgestalt (164,165) yolak analiz programı aracılığı ile miRNA'ların yer aldığı yolaklar listelenmiştir. Yolaklar FDR değerine ($FDR < 0,05$) göre sıralanmıştır. Lipotoksisitenin yaratacağı organel stresi ile tetiklenen insülin direnci ve insülin sinyalizasyonunun bozulması ve peşi sıra gelişen diyabet patogenezi sürecinde pankreatik β hücrelerinin akıbetini belirleyen otofaji, apoptoz ve hücre sağkalım yolaklarında değişim gösteren ve *Park2* geni varlık/yokluk durumu ile daha fazla değişim gösteren daha spesifik bir miRNA grubuna ulaşılmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak bahsedilen yolaklarda görev alan ve Parkin proteinine bağlı ifadesi değişen 4 adet miRNA belirlenmiştir. Bu miRNA'lar rno-miR-96-5p, rno-miR-153-3p, rno-miR-30e-3p ve rno-miR-344a-5p'dir (Şekil 5.23. ve Çizelge 5.10.).



Şekil 5.23. Belirlenen miRNA'ların uygulamalara göre ifade değişimi

Çizelge 5.10. Belirlenen miRNA'lar ve yer aldıkları yollar

rno-miR-96-5p PA uygulaması: 2,81 kat ifade değişimi ↑ siRNA uygulaması: 1,64 kat ifade değişimi ↓			
Yolak No	Yolak Adı	FDR Değeri	p Değeri
rno04931(KEGG)	İnsülin Direnci	0,015219	0,002655
rno04930(KEGG)	Tip 2 Diyabet	0,026683	0,005507
rno04211(KEGG)	Hücre Sağkalım Regülasyonu	4,27E+10	2,64E+11
rno04140(KEGG)	Otofaji	4,00E+11	1,19E+10
rno04210(KEGG)	Apoptoz	0,007719	0,001166
rno-miR-153-3p PA uygulaması: 3,30 kat ifade değişimi ↑ siRNA uygulaması: 1,97 kat ifade değişimi ↓			
Yolak No	Yolak Adı	FDR Değeri	p Değeri
rno04931(KEGG)	İnsülin Direnci	0,012044	2,21E+10
rno04930(KEGG)	Tip 2 Diyabet	0,039877	0,001993
rno04211(KEGG)	Hücre Sağkalım Regülasyonu	3,51E+11	3,74E+09
rno04140(KEGG)	Otofaji	0,002837	2,64E+06
rno-miR-344a-5p PA uygulaması: 1,96 kat ifade değişimi ↓ siRNA uygulaması: 3,88 kat ifade değişimi ↑			
Yolak No	Yolak Adı	FDR Değeri	p Değeri
rno04931(KEGG)	İnsülin Direnci	3,73E+11	2,30E+10
rno04930(KEGG)	Tip 2 Diyabet	0,012687	0,002456
rno04211(KEGG)	Hücre Sağkalım Regülasyonu	1,76E+11	4,12E+08
rno04140(KEGG)	Otofaji	3,33E+11	8,50E+08
rno04210(KEGG)	Apoptoz	0,04697	0,013291
rno-miR-30e-3p PA uygulaması: -1,03 kat ifade değişimi ↓ siRNA uygulaması: 2,86 kat ifade değişimi ↑			
Yolak No	Yolak Adı	FDR Değeri	p Değeri
rno04930(KEGG)	Tip 2 Diyabet	0,011497	0,002214
rno04211(KEGG)	Hücre Sağkalım Regülasyonu	0,006123	0,001012
WP1290(Wikipathway)	Apoptoz	0,020183	0,004509

miRNA'ların ifadenme düzeylerine bakıldığı zaman kat değişim aralığı; -1,03 ile 3,88 arasında değişiklik göstermektedir. İncelenen 4 miRNA'nın 2 tanesi (miR-96-5p ve miR-

153-3p) PA uygulamasında artış gösterirken siRNA uygulamasında düşüşe geçmiştir. Diğer 2 miRNA (miR-344a-5p ve miR-30e-3p) ise tam tersine PA uygulamasında az ifadelenirken siRNA uygulaması ardından ifade artışı göstermiştir (Şekil 5.23.). 4 miRNA'nın hemen hepsinin İnsülin Direnci, Tip 2 Diyabet, Hücre Sağkalım Regülasyonu, Otofaji ve Apoptoz gibi ortak yollaklarda yer aldıkları gözlenmiştir. Webgestalt sitesinden elde edilmiş KEGG (174–176) yolak haritaları aracılığı ile Parkin proteinine bağlı olarak ifadesi değişen miRNA'ların hedefledikleri genlerdeki değişimlerin yolaklar üzerine etkileri incelenerek araştırılmıştır.

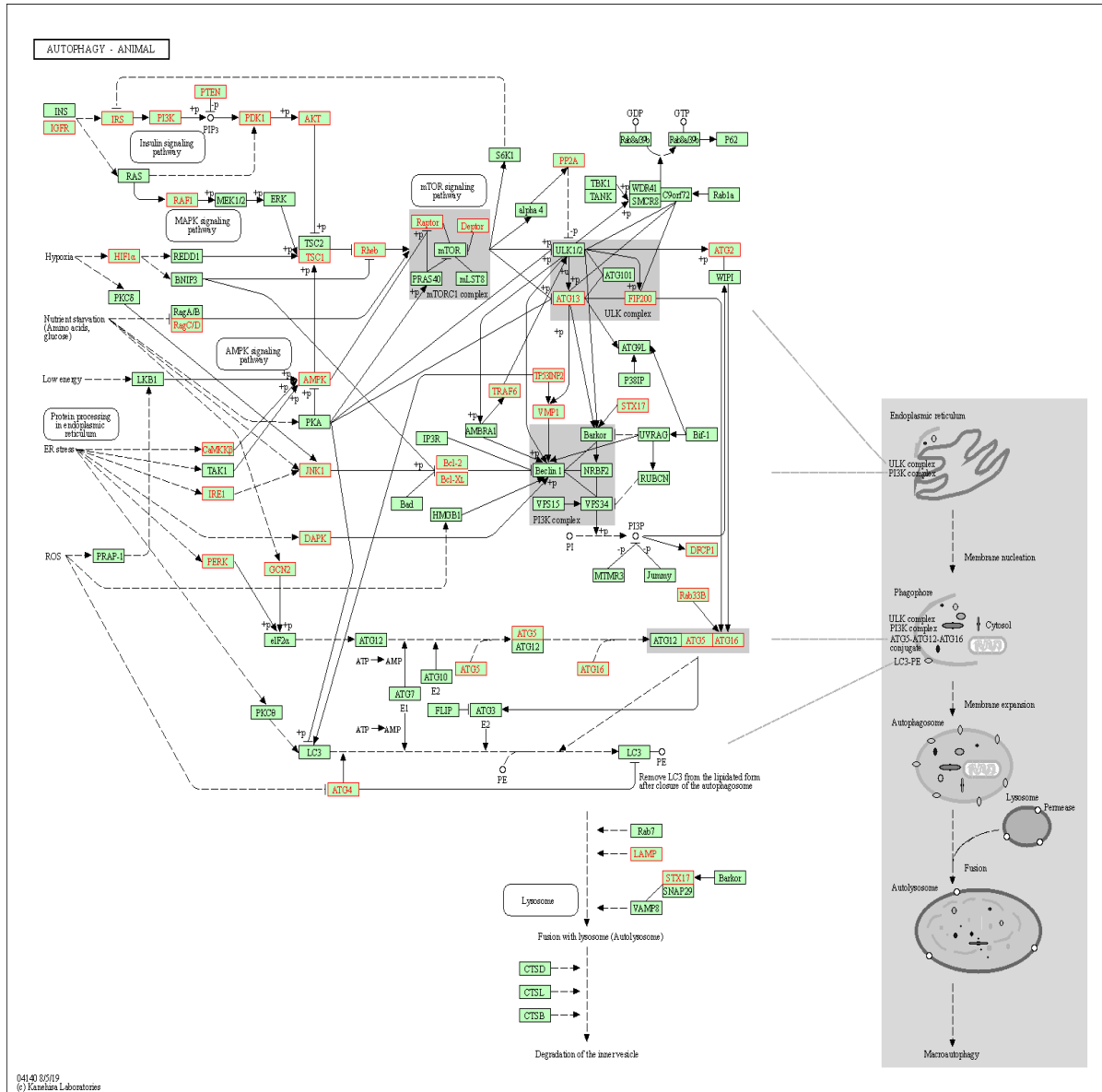
5.6.1. PA VE SİRNA UYGULAMALARINA BAĞLI OLARAK İNCELENEN MİRNALARIN ZENGİNLEŞTİKLERİ YOLAKLAR VE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

5.6.1.1. miR-344a-5p

PA uygulamasında 1,96 kat artış, siRNA uygulamasında 3,88 kat artış gösteren miR-344a-5p'nin hedeflediği genler, INS-1E hücrelerinde lipotoksisteye karşı verilen cevapta aktif olan yolakların çoğunda zenginleşmiştir. miR-344a-5p, otofaji, apoptoz, hücre sağkalımı, T2D ve insülin sinyalizasyonu yolaklarında oldukça fazla sayıda geni hedeflemektedir.

siRNA uygulaması sonucu ifadesinde artış gözlenen miR-344a-5p'nin, hücre sağkalım yolağında *Atg5*, *Atg13* ve *FIP200* genlerini hedefleyerek otofaji yolağındaki akışın inhibe edilip hücrenin strese karşı oluşturduğu otofaji aracılı iyileşme ve sağkalım mekanizmasını bloklayabileceği düşünülmektedir.

miR-344a-5p otofaji yolağında oldukça aktif olup pekçok otofaji genini hedeflemektedir. *Park2* geni sessizleştğinde miR-344a-5p'nin bu gen grubunu baskılayarak hücrede otofajinin ilerlemesi sürecine engel olabileceği düşünülmektedir (Şekil 5.24.). Otofajinin ER stres üzerinden ilerleyen kolunda hem ER stres cevap elemanları *IRE1* ve *PERK*'i hem de otofaji yolağının birçok noktasında aktif rol alan otofaji geni *Atg5*'i hedefleyen miRNA'nın bu şekilde otofajiyi bloklayabileceği düşünülmektedir. siRNA uygulamasında miR-344a-5p'nin otofaji yolağında anti-apoptotik genler olan *Bcl-2* ve *Bcl-XL*'nin ifadesini baskılaması, hücrenin apoptoza yönelimini kolaylaştırıcı bir etki olarak düşünülmüştür.



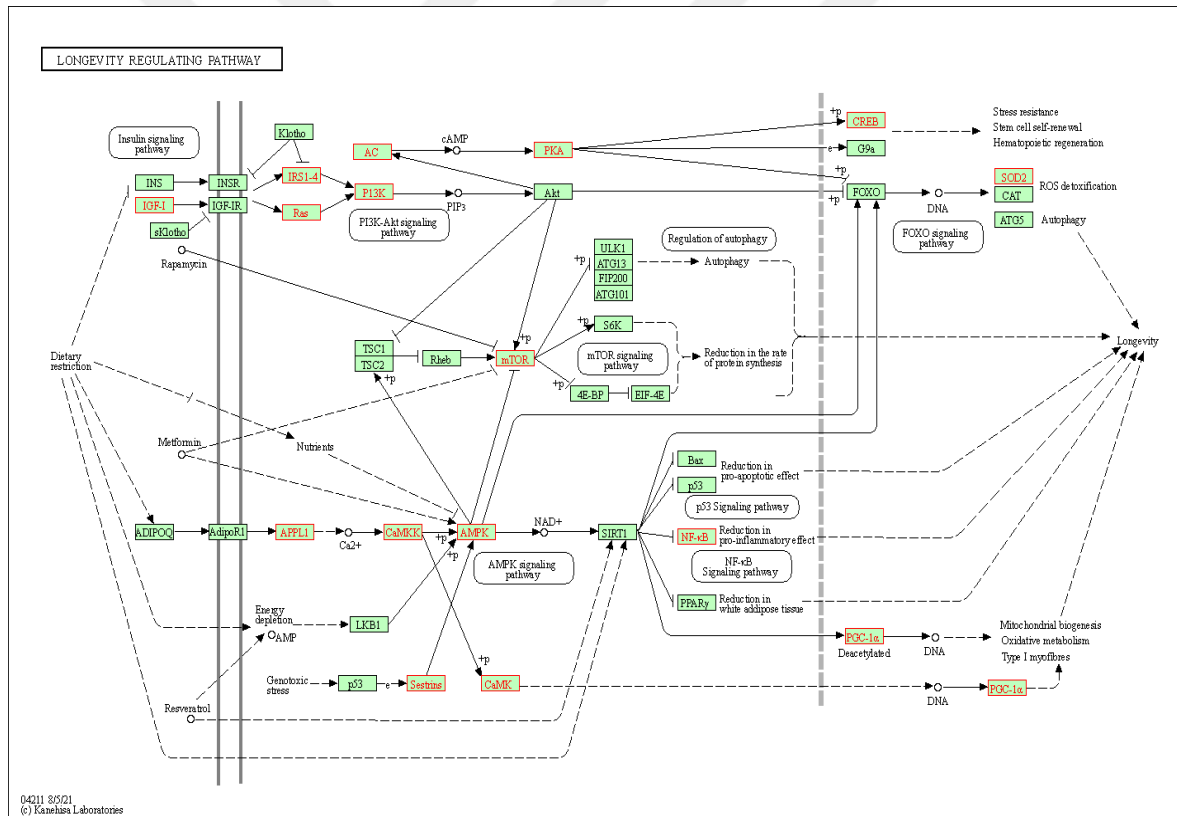
Şekil 5.24. miR-344a-5p'nin Otofaji Yolağında hedeflediği genler

siRNA koşullarında miR-344a-5p'nin apoptoz yolağında, ER stres elemanları *Ire1-α* ve *PERK*'i baskılayarak hücrenin ER stres cevabını zayıflatıp bu yolla hücre sağkalım mekanizmasını olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür. Aynı yolakta *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerini hedefleyerek bu iki genin *Bak* geni üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırarak pro-apoptotik *Bak* geni üzerinden apoptozom oluşumunu sağlayarak hücrelerin apoptoza yönelimine sebep olacağı düşünülmektedir.

5.6.1.2. miR-30e-3p

PA uygulamasında ifadesi en fazla düşüş gösteren tek miRNA olan mir-30e-3p, siRNA uygulamasında yaklaşık 3 kat artışa geçmiştir. miR-30e-3p hücre sağkalım ve apoptoz yollarında rol alarak bu yollardaki önemli genleri hedeflemektedir.

PA uygulamasında hücre sağkalım yolağında, *AMPK* geni miR-30e-3p'nin hedeflerinden birisidir. Bu yolakta ifadesi artan *AMPK* geninin *mTOR* genini inhibe ederek otofajiyi serbest hale getirdiği düşünülmektedir. Bu şekilde *mTOR*'un *ULK1-ATG13-FIP200-ATG101* kompleksi üzerindeki inhibisyonunun kalkarak hücrenin otofaji aracılı olarak sağkalım sürecine girdiği öngörülmektedir. Aynı yolak üzerinde siRNA uygulamasında ise *AMPK*'nın ifadesinin baskılanması ve *mTOR* ifadesinin artması sonucunda hücrenin sağkalımı için gerçekleşecek otofaji sürecinin engelleneceği düşünülmektedir (Şekil 5.25.).



Şekil 5.25. miR-30e-3p'nin Sağkalım Yolağında hedeflediği genler

Apoptoz yolağında siRNA uygulamasında, miR-30e-3p'nin başka hedeflerinden olan anti-apoptotik genler *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerinin ifadelerinin baskılanması sonucu lipotoksisite altında hücrenin apoptoza yatkınlığının artacağı düşünülmüştür.

5.6.1.3. miR-96-5p

Otofaji, apoptoz, T2D, sağkalım yolaklarında pek çok geni hedefleyen miR-96-5p'nin lipotoksik koşullar altında Parkin proteini varlığında ifadesi artarken *Park2* geninin siRNA aracılı sessizleştirilmesi ardından ifadesi azalmaktadır.

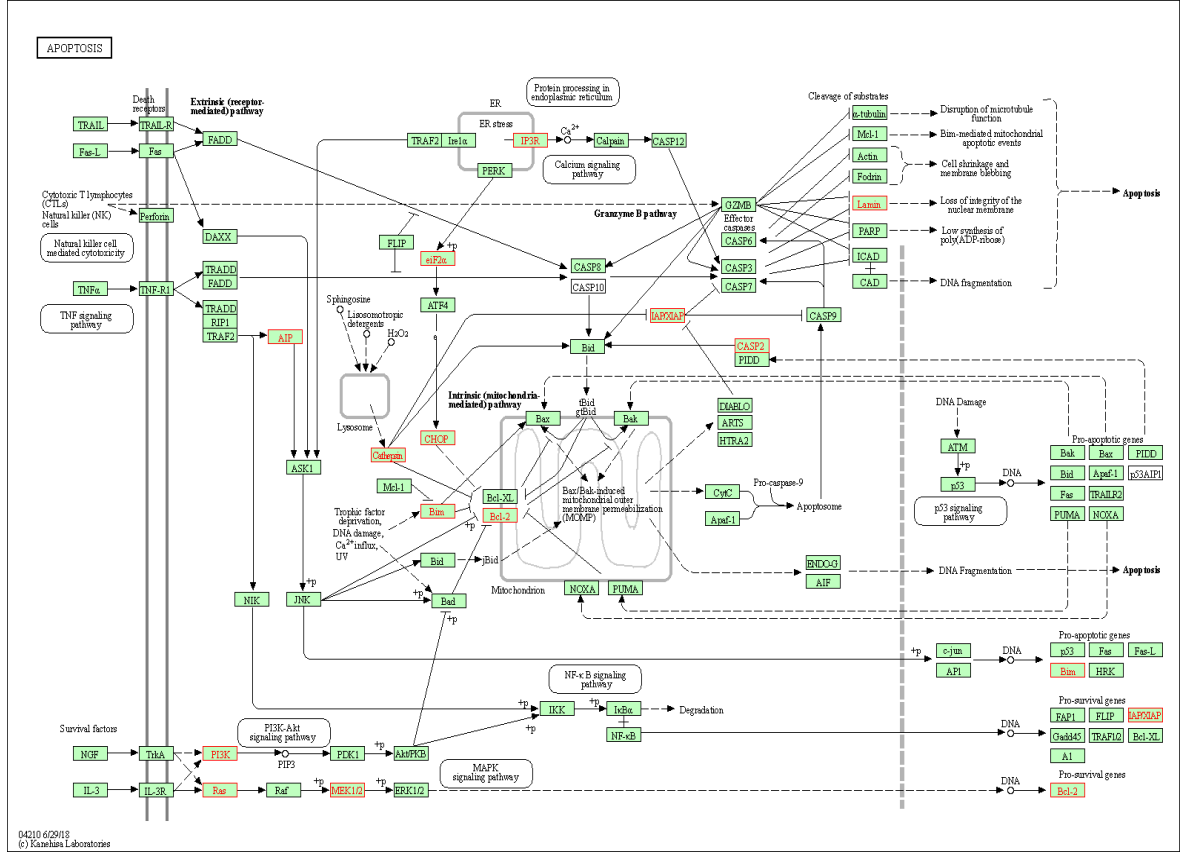
PA uygulamasında miR-96-5p'nin otofaji yolağında otofajinin temel blokörlerinden *mTOR*'u hedefleyerek ifadesini baskıladığı ve bu şekilde otofaji sürecinin ilerlediği düşünülmektedir. Aynı koşullar altında yine otofaji yolağında ER'den Mt'ye Ca^{+2} taşıyan önemli bir MİM elemanı *IP3R*'yi hedefleyip Mt'ye Ca^{+2} akışını engelleyerek hücrenin apoptoza yönelimini de baskıladığı öngörülmektedir. siRNA uygulamasında ifadesi azalan miR-96-5p'nin *mTOR* üzerindeki etkisi hafifleyeceğinden ötürü *mTOR* geninin otofaji üzerindeki bloklayıcı etkisinin artacağı ve otofajinin inhibe olacağı düşünülmektedir. Yine serbest hale gelen *IP3R* geni üzerinden Mt'ye Ca^{+2} akışı ile hücreye apoptotik mesajın ulaşacağı düşünülmektedir. siRNA uygulamasında miR-96-5p'nin *BNIP3* geni üzerindeki baskısının kalkması ile *BNIP3* geninin *Bcl-XL* genini inhibe ederek anti-apoptotik *Bcl-XL* genini bloklayacağı düşünülmektedir.

T2D yolağında PA uygulamasında, miR-96-5p bozulan insülin mekanizmasının sebep olduğu insülin direnci oluşumunu regüle eden *PI3K* genini hedeflemektedir. PA koşullarında ifadesi artan miR-96-5p'nin *PI3K*'nin ifadesini baskılayarak hücrenin insülin direncine girmesine engel olduğu düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise ifadesi azalan miR-96-5p'nin *PI3K* üzerindeki etkisinin kalkarak hücrenin insülin direncine girip stresi kompanse edemediği noktada strese bağlı apoptoz gibi ölüm yolaklarını devreye sokmasına neden oluşturabileceği düşünülmektedir.

PA uygulamasında hücre sağkalım yolağında *mTOR* genini hedefleyen miR-96-5p'nin *mTOR*'un *ULK1*, *Atg13*, *FIP200* ve *ATG101* genleri üzerindeki inhibisyonun kalkmasına neden olarak otofajinin gerçekleşmesini sağladığı düşünülmektedir.

PA uygulamasında apoptoz yolağına miR-96-5p'nin, ER stres kolu üzerindeki apoptotik Ca^{+2} sinyalini ileten *IP3R*'yi hedefleyerek Ca^{+2} sinyalinin *Kalpsin* üzerinden *Kaspaz12*'ye iletilmesini engelleyerek apoptozu durdurduğu düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise *IP3R* aracılığı ile Ca^{+2} sinyalinin kaspazlara ulaşması ile apoptotik kaskatın ilerleyeceği

düşünülmüştür. Aynı yolla PA uygulamasında miR-96-5p'nin hem *Bcl-XL*'yi inhibe eden *CHOP*'u doğrudan hedeflemesi hem de *CHOP*'un aktivasyonunda rol alan *eiF2α*'yı hedefleyerek *Bcl-XL*'nin üzerindeki inhibisyonun ortadan kalkarak apoptozun gelişimini baskılıyor olabileceği düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise miR-96-5p'nin *Bcl-2* ve *Bcl-XL* anti-apoptotik genlerini baskılayarak yolağın apoptotik doğrultuda ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir (Şekil 5.26.).



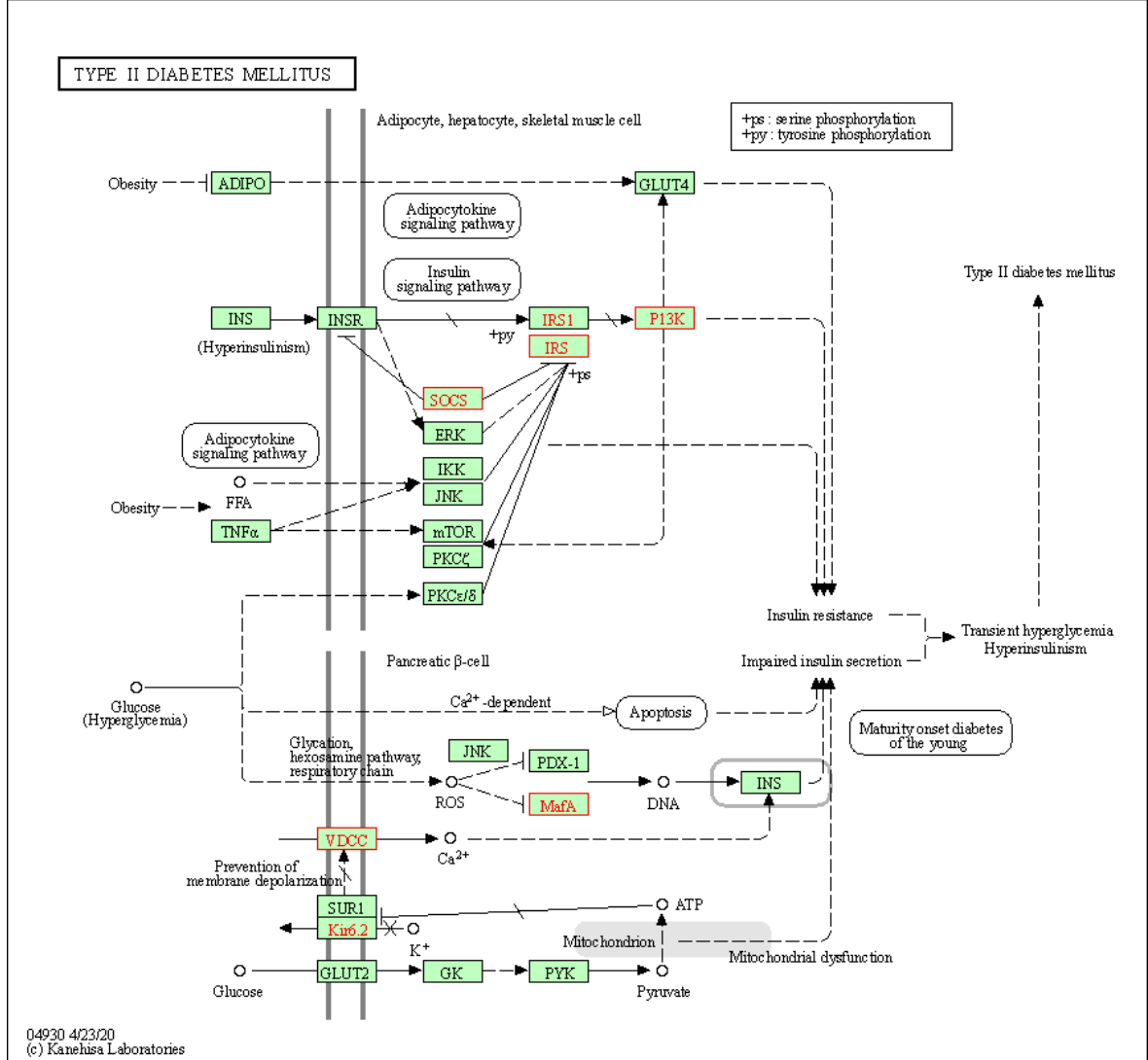
Şekil 5.26. miR-96-5p'nin Apoptoz Yolağında hedeflediği genler

5.6.1.4. miR-153-3p

PA uygulamasında ifadesi artan ve siRNA uygulamasında ifadesi azalış gösteren miR-153-3p özellikle otofaji ve T2D yollarında rol almaktadır.

miR-153-3p'nin PA uygulamasında otofaji yolağında, *IP3R* genini hedefleyerek, *IP3R*'nin *Beclin1* üzerindeki inhibisyonunun kalkmasına ve hücrenin otofaji sürecinde ilerlemesine yardımcı olduğu düşünülmektedir.

miR-153-3p'nin rol aldığı T2D yolağında, PA uygulamasında hedeflediği *PI3K* geninin ifadesini baskılayarak insülin direnci oluşum mekanizmasını blokladığı düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise miR-153-3p'nin *PI3K* geni üzerindeki baskısı kalkınca hücrede insülin direnci ve buna bağlı stres gelişimi ve aşırı stres durumunda ise insülin mekanizmasının bozulması ve T2D gelişimi olacağı düşünülmektedir (Şekil 5.27.).



Şekil 5.27. miR-153-3p'nin T2D yolağında hedeflediği genler

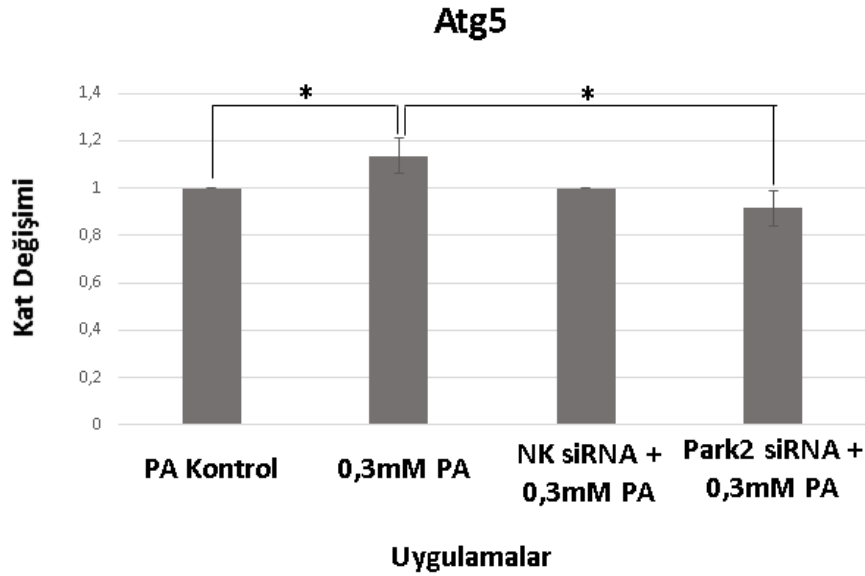
5.6.2. MİRNA HEDEF GENLERİNDEN ATG5 VE IP3R'NİN UYGULAMALARA BAĞLI GEN İFADE DEĞİŞİMLERİNİN GERÇEK ZAMANLI PZRİLE DOĞRULANMASI

miRNA'ların hedeflerini mRNA ya da protein seviyesinde baskılama sürecini 3' UTR bölgelerine bağlanarak gerçekleştirdiği bilinmektedir. Çoğunlukla ifadesi artan

miRNA'ların hedeflerinin ifadesinde azalma beklenmektedir. Tersi şekilde ifadesi azalan miRNA'ların hedeflerinin ifadesinde de artış beklenmektedir. Bununla birlikte söz konusu miRNA ifadelenmesi olduğu takdirde çok küçük farklılıklar bile büyük önem taşımaktadır (173).

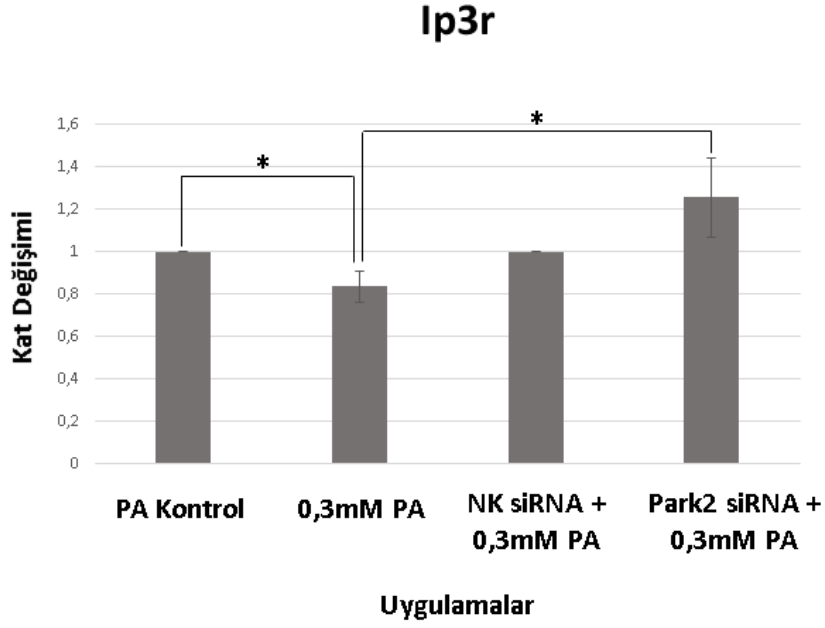
İncelenen miRNA'ların görev aldıkları yollardaki hedef genlerinin ifade değişimlerinin doğruluğunu test etmek amacıyla yapılan Gerçek Zamanlı PZR çalışması için otofaji geni *Atg5* ile ER ve Mt arasında Ca^{+2} sinyalizasyonunda rol alan ER Stres geni *Ip3r* belirlenmiş ve uygulama gruplarındaki ifade değişimleri incelenmiştir.

miR-344a-5p'nin hedef genlerinden olan *Atg5*, miRNA ifadesi ile ters orantılı bir ifade düzeyi göstermiştir. PA uygulamasında düşüş gösteren miR-344a-5p ifadesine karşılık *Atg5* gen ifade seviyesi yükselmiştir. siRNA uygulamasında ise tam tersi bir durum söz konusu olmuştur (Şekil 5.28).



Şekil 5.28. *Atg5* geninin uygulamalara göre ifade seviyeleri. Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. (* $p < 0,05$)

miR-96-5p ve miR-153-3p hedef genlerinden *Ip3r* geni PA uygulamasında azalma gösterirken, siRNA uygulamasında ve hücrenin apoptotik sürece yöneldiği düşünülen süreçte ifadesinde artış göstermiştir. Bu şekilde her iki miRNA ile de ters orantılı bir değişim göstermiştir (Şekil 5.29.).



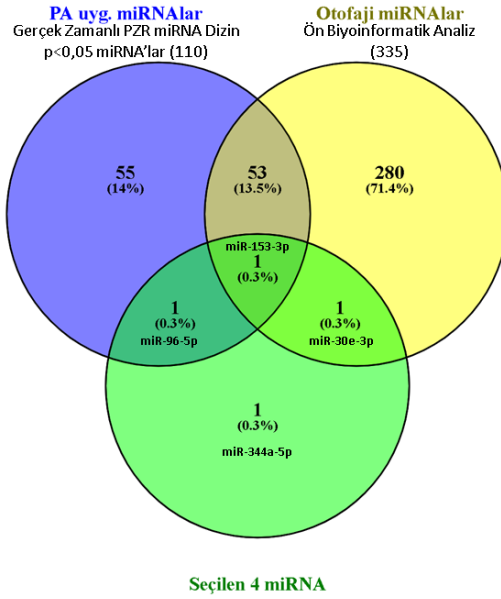
Şekil 5.29. *Ip3r* geninin uygulamalara göre ifade seviyeleri. Uygulamalar 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. (* $p < 0,05$)

Sonuç olarak *Atg5* ve *Ip3r* genlerindeki uygulamalara bağlı değişimler yolak analizleri ve miRNA'ların ifade düzeyleri ile uyumlu bulunmuştur.

5.7. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER İLE BELİRLENEN MİRNALAR İLE GERÇEK ZAMANLI PZR MİRNA DİZİN ÇALIŞMASINDAN ELDE EDİLEN MİRNA'LARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Tez çalışmasının deneysel basamaklarına geçilmeden önce yapılmış olan biyoinformatik analizden elde edilen miRNA'lar ile Gerçek Zamanlı PZR miRNA dizin çalışması sonucu elde edilen istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermiş miRNA'lar arasındaki ortaklık incelemesi yapılmıştır.

PA uygulama grubu dizin çalışmasından elde edilen anlamlı ($p < 0,05$) değişim göstermiş 110 miRNA ile biyoinformatik analizlerde otofaji grubu genlerle oluşturulmuş ortak miRNA havuzu kesiştirildiğinde 54 tane miRNA'nın ortak olduğu ve seçilen 4 miRNA'dan miR-153-3p'nin bu grupta yer aldığı görülmüştür (Şekil 5.30.).

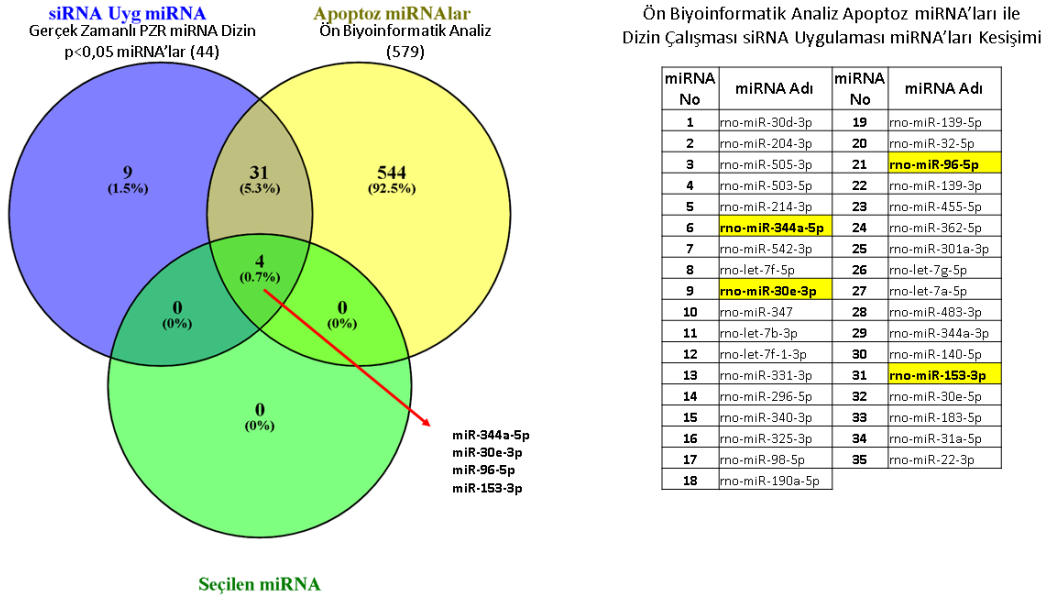


Ön Biyoinformatik Analiz Otofaji miRNA'ları ile Dizin Çalışması PA Uygulaması miRNA'ları Kesişimi

miRNA No	miRNA Adı	miRNA No	miRNA Adı
1	mo-miR-16-5p	28	mo-miR-107-3p
2	mo-miR-9a-3p	29	mo-miR-139-5p
3	mo-miR-27a-3p	30	mo-miR-93-5p
4	mo-miR-28-5p	31	mo-miR-129-2-3p
5	mo-miR-425-5p	32	mo-miR-505-3p
6	mo-miR-212-3p	33	mo-miR-466c-5p
7	mo-miR-30a-5p	34	mo-let-7d-5p
8	mo-miR-708-5p	35	mo-miR-20a-5p
9	mo-miR-195-5p	36	mo-let-7e-5p
10	mo-miR-92b-3p	37	mo-miR-322-5p
11	mo-miR-132-3p	38	mo-let-7b-3p
12	mo-let-7g-5p	39	mo-miR-503-5p
13	mo-miR-15b-5p	40	mo-let-7f-5p
14	mo-miR-196a-5p	41	mo-miR-31a-5p
15	mo-miR-21-5p	42	mo-miR-192-5p
16	mo-miR-141-3p	43	mo-miR-501-5p
17	mo-let-7b-5p	44	mo-miR-146b-5p
18	mo-miR-30e-5p	45	mo-miR-98-5p
19	mo-miR-383-5p	46	mo-miR-346
20	mo-miR-674-3p	47	mo-miR-150-5p
21	mo-miR-190a-5p	48	mo-miR-92a-3p
22	mo-miR-128-3p	49	mo-miR-153-3p
23	mo-miR-342-3p	50	mo-miR-24-3p
24	mo-miR-30a-3p	51	mo-miR-186-5p
25	mo-miR-29c-3p	52	mo-miR-29a-3p
26	mo-miR-384-5p	53	mo-miR-873-5p
27	mo-let-7c-5p	54	mo-miR-497-5p

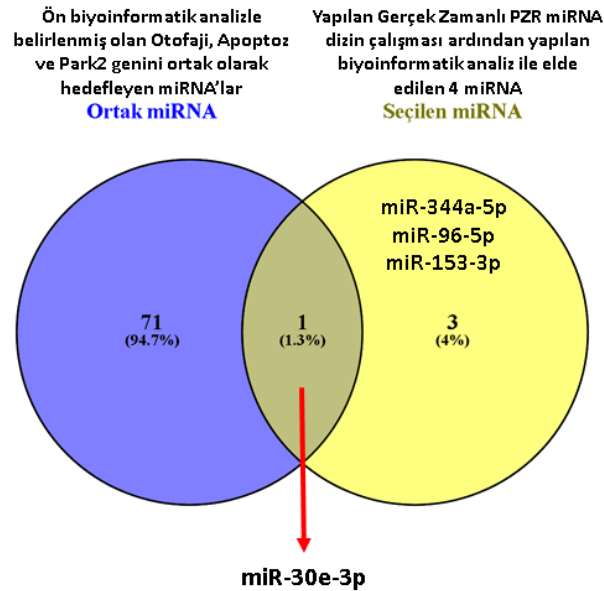
Şekil 5.30. Ön biyoinformatik analiz otofaji miRNA grubu ile PA uygulaması miRNA kesişimi

siRNA uygulaması dizin çalışması miRNA'ları (44 adet) ile biyoinformatik analizlerden elde edilen apoptotik miRNA havuzu (579 adet) kesiştirildiğinde 35 miRNA'nın ortak olduğu ve detaylı incelenen 4 miRNA; miR-344a-5p, miR-30e-3p, miR-96-5p ve miR-153-3p'nin de bu grup içinde yer aldığı saptanmıştır (Şekil 5.31.).



Şekil 5.31. Ön biyoinformatik analiz apoptoz miRNA grubu ile siRNA uygulaması miRNA kesişimi

Son olarak biyoinformatik analizlerde otofaji, apoptoz ve *Park2* genlerini ortak olarak hedefleyen 72 miRNA'nın dizin çalışmasından seçilen 4 miRNA'yı kapsayıp kapsamadığı incelenmiş ve sadece miR-30e-3p'nin bu grupta yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 5.31.).



Şekil 5.32. Ön biyoinformatik analiz ortak miRNA'ları ile seçilen 4 miRNA'nın kesişimi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

6.1.1. Parkin Proteininin Pankreatik β Hücrelerinde Otofaji ve Apoptoz Arasında Bir Denge Faktörü Olarak Lipotoksik Streste Hücre Sağkalımını Düzenlediği Düşünülmektedir

Parkin proteini, pek çok hücrede otofaji ve mitofajiye aracılık eden E3 ubiquitin ligaz ve önemli bir UPS bileşenidir. Ubikuitin zincirinin substrata bağlanma pozisyonu hücrenin kaderini belirlemede önem taşımaktadır. Parkin, bazı proteinleri K48 poli-ubikuitinasyon ile UPS'ye, bazı proteinleri K63 poli-ubikuitinasyonun ile otofajiye yönlendirmektedir. Parkin proteininin sahip olduğu bu ubiquitinasyon yeteneği ile DNA onarımı, transkripsiyon, translasyon, organel trafiği, proliferasyon, inflamasyon, hücre ölüm/sağkalımı gibi çok sayıda hücresel sürece katılan önemli bir protein konumuna getirmektedir (125,177,178).

Parkin proteininin nöron hücrelerinde otofaji ve apoptoz arasında bir anahtar görevi gördüğü ve hücre sağkalımına olan etkisi literatürde mevcuttur (130). Çoğunlukla nörodejeneratif hastalık modelleri olan nöron hücre hatlarına uygulanan stres ajanlarına karşı Parkin proteininin hücre sağkalımına etkisinin araştırıldığı ve hücre koruyucu etkilerinin gösterildiği çalışmalar yoğunlukta (120,179–182) sıçan pankreas islet hücrelerinde ifadelendiği bilinen *Park2* geninin (133) günümüzde prevalansı oldukça artan T2D gibi lipotoksitenin sebep olduğu pankreatik β hücrelerindeki işlev kaybı ve ölüm ile oluşan metabolik bozukluklarda hücre sağkalımına olan etkisi üzerine yeterli çalışma yoktur.

INS-1E pankreatik β hücre hattında 0,3mM PA ile oluşturulan lipotoksik stres koşulunun 24 saatlik uygulaması ardından *Park2* gen ifade seviyesi 2 kat artış göstermiştir, siRNA uygulaması ardından ise yaklaşık 0,2 ifade seviyesine kadar düşerek beklenen gen sessizleşmesi sağlanmıştır. Parkin protein seviyesinde elde edilen bulgular da mRNA bulgularını destekler nitelikte gözlenmiştir. Bu veriler Parkin proteininin stres koşullarında hücrede artışa geçtiğini göstermektedir ve literatürle uyumludur. Genellikle literatürde yer alan genin aşırı ifadesinin sağlandığı overekspresyon çalışmalarından farklı olarak hücre ortamına eklenen bir FFA ile yaratılan lipotoksisteye bağlı oluşan gen ifade artışı ile

metabolik bir durumun *in-vitro* olarak mimik edilmesi amaçlanmıştır. Bu da çalışmayı özgün kılan noktalardan biri olmaktadır.

Lipotoksik koşulların Pankreatik β hücre canlılığına etkisinin Parkin proteinine bağlı değişimini araştırmak için yapılan MTT analizi sonucunda, PA uygulaması ardından Parkin proteini varlığında %90 olan hücre canlılığı seviyesine karşılık siRNA uygulaması ardından bu seviyenin %71'e gerilediği gözlenmiştir. Lipotoksik ortamda *Park2* geninin siRNA ile sessizleştirilmesi sonucu hücre canlılığında görülen bu istatistiksel olarak anlamlı azalış Parkin proteininin INS-1E hücrelerini strese karşı koruduğunu göstermektedir. Bu da Parkin proteininin INS-1E hücrelerinde de hücre koruyucu özelliğinin olduğunu literatürle uyumlu olarak doğrulamaktadır.

T2D, pankreatik β hücrelerinin glukoz ve yağ asitlerine toksik düzeyde maruziyeti sonrası gelişen hücre fonksiyon kaybı ve ardından gelen hücre ölümü ile insülin metabolizmasının bozulduğu metabolik bir sorundur (183). Süre ve doz ile hücre hasarı doğru orantılı değişmekle birlikte *in-vitro* pankreatik β hücre hatlarında ya da *in-vivo* pankreas dokusundan izole edilen islet hücrelerinde yapılan çalışmalar, maruziyet süresi uzadıkça hücre sağkalım oranının azalarak apoptoza yönelimin arttığı ve T2D'de görülen β hücre kaybının da bu şekilde gerçekleştiğini açıklamaktadır (184).

INS-1E hücrelerini koruyucu özelliği olduğu düşünülmekte olan *Park2* geninin ifade seviyesi 0,3mM PA stres faktörünün 24 saatlik uygulaması ardından 2 kata kadar yükselirken, 0,5mM PA'nın 24 saatlik uygulamasında ise yaklaşık 0,5 seviyesine kadar düşüş göstermiştir. *Park2* gen ifadesindeki azalış ile ters orantılı şekilde artışa geçen Bak ve Bax pro-apoptotik gen ifade seviyeleri lipotoksik dozun artışı ile hücredeki stres düzeyinin belli bir kırılma noktası ardından hücre sağkalımı için uyarıcı bir faktör olmaktan çıkıp hücre sağkalımını olumsuz etkileyen bir ölüm sinyaline dönüştüğüne ve apoptozu tetiklediğine literatürle uyumlu bir destek niteliğindedir. Aynı zamanda görece minimal düzeydeki bu lipotoksik doz artışının bile hücre için çok dramatik olmakla beraber Parkin proteininin etkisini de tamamen değiştirdiğini ve Parkin proteininin hücrede hassas bir sensör gibi çalıştığını düşündürmektedir.

Periferik dokularda insüline olan hassasiyetin kaybı, kanda sürekli artan FFA kaynaklı lipotoksisite ve hatalı protein agregasyonunun ER yükünü artırarak pankreatik β hücresinin

işlevini bozup, hücrede ER stresine neden olduğu ve KPY sisteminin aşırı aktif hale geldiği bilinmektedir (185).

Literatürle uyumlu şekilde uygulanan lipotoksik koşullar altında incelenen ER Stres genleri olan *Atf6* ve *Chop*' un ifade seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. siRNA uygulaması ardından bu iki genin ifade seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı düşüş ise *Park2* geninin pankreatik β hücrelerindeki ER stres cevabına da etki edip hücrenin stresle başa çıkma süreci olan KPY gibi savunma mekanizmalarını da dolaylı yoldan etkilediğini düşündürmektedir.

Glukotoksik ve lipotoksik metabolik stresin otofaji ile yakından ilişkili olup, otofajinin bu süreçte pankreatik β hücrelerinin işlev ve sağkalımının sürdürülebilirliğini sağlamada önemli bir rol oynadığı literatürde mevcuttur (9,186).

Pankreatik β hücrelerinde lipotoksik ajan PA ile oluşturulan stres ortamında otofaji genleri *Lc3a* ve *p62*' nin gen ifade seviyelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gerçekleşmiştir. *Lc3a*'nın protein düzeyindeki sonuçları da mRNA sonuçlarını destekler niteliktedir. Bu sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir. Bununla beraber siRNA uygulaması ardından otofaji gen ve protein ifade seviyelerinde görülen azalma da Parkin proteininin bu hücre sağkalım mekanizmasındaki önemli rolünü bir defa daha doğrulamaktadır. *Park2* geninin sessizleştiği lipotoksik koşullarda otofaji belirteçleri azalıp hücre sağkalımı kötüye gitmektedir. Bu durumu MTT sonuçları da desteklemektedir. Pankreatik β hücrelerinde otofajinin hücre sağkalımında önemli bir mekanizma olabileceği ve bu süreçte Parkin proteinin de aktif rolü olduğu düşünülmektedir.

MİM bölgesinin organizasyon ve işlevini kontrol eden proteinler, önemli bir mesajcı iyon olan Ca^{+2} ' nin ER ve Mt arası kontrollü geçişini ve buna bağlı olarak hücrenin sağkalım ya da ölüm kararı arasındaki dengeyi kurmasına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle MİM; Ca^{+2} homeostazı, lipit metabolizması, mitokondriyal morfolojinin korunması, hücresel stresin yönetimi, otofaji ve apoptoz gibi hücre için hayati önem taşıyan tüm süreçlerde aktif rol oynamaktadır. Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların yanısıra diyabet, obezite ve kanser gibi patolojilerde de MİM ve ER-Mt arası iletişimin önemi vurgulanmaktadır. Parkin proteininin de pekçok metabolik bozuklukta rol alan MİM bölgesinde aktif bir protein olduğu bilinmektedir. *Ip3r* geni, ER'den Mt'ye Ca^{+2}

taşınmasında aktif rolü olan bir MİM bölgesi üyesidir. Çok hassas bir dengede tutulan Ca^{+2} iyonunun Mt'ye aşırı seviyede transferi bir ölüm sinyali görevi görmekte ve hücrenin apoptoza yönelimine sebep olmaktadır. (187–190).

Tez çalışmasında yapılan Gerçek Zamanlı PZR bulgularında lipotoksik koşullar altında oluşan hücresel strese *Ip3r* geninin ifade seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük seviyede iken, *Park2* geninin sessizleştirilmesi ardından ifadesinde anlamlı bir artış saptanması literatürle uyumludur ve MİM bölgesinde aktif çalışan Parkin proteininin Er-Mt arasındaki Ca^{+2} dengesinin sağlanmasında ve dolaylı olarak hücre sağkalımında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Lipotoksik koşullar altında pro-apoptotik genler *Bax* ve *Bak*'ın gen ifade seviyeleri, *Park2* geni yokluğunda hücrenin apoptoza yönelimini destekler niteliktedir. Her iki gen de PA uygulamasında kontrole göre düşük seviyede ifade olukça, siRNA uygulaması ardından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ifade seviyeleri göstermiştir. Apoptotik bir parametre olarak kabul edilen *Bax/Bcl2* değerinin siRNA koşullarındaki oranın 1'den büyük olması hücrenin apoptoza yöneldiğini ifade etmektedir. Yapılan eliza tabanlı apoptoz analizi sonucunda en yüksek apoptotik indeks siRNA uygulaması yapılan lipotoksik koşul olmuştur. Literatürle uyumlu olarak tüm bu veriler pankreatik β hücrelerinde lipotoksik koşullar altında Parkin proteininin stresle başa çıkmasında önemli bir faktör olduğunu pankreatik- β hücrelerindeki koruyucu rolünü ve apoptoza yönelimdeki anahtar rolünü bir defa daha doğrulamakta ve Parkin proteininin ortamda bulunmadığı uzamış hücresel stres koşullarında ise hücrede apoptotik sürece yönelimin arttığını düşündürmektedir.

6.1.2. Pankreatik β Hücrelerinde Lipotoksik Stres Koşullarında miR-96-5p, miR-153-3p, miR-30e-3p ve miR-344a-5p miRNA'larının Parkin Proteinine Bağlı Olarak Düzenlendiği Düşünülmektedir

Park2 gen ifade seviyesinin 24 saatlik 0,3mM PA uygulamasında 0,5mM PA uygulamasına göre daha yüksek gözlenmesi ve eş zamanlı olarak 0,3mM PA uygulamasında hücrenin otofajiye 0,5mM PA uygulamasında apoptoza yöneliminin tespit edilmesi pankreatik β hücrelerinde lipotoksisite düzeyindeki minimal değişimlerde Parkin proteininin bifazik davranıp, hücredeki fonksiyonunu değiştirerek, hücre sağkalımında dramatik farklılıklar meydana getirdiğini

göstermiştir. Bu düzenlenmenin ardında hızlı hareket eden bir mekanizma olabileceği görüşünden hareketle ve lipotoksisiteye verilen cevapta miRNA'ların rolünün literatürde yer alması üzerine (156) RNA interferans mekanizması üyesi miRNA'ların lipotoksik koşullardaki pankreatik β hücrelerinde Parkin proteininin regülasyonunda işlevsel olabileceği düşünülerek lipotoksisiteye karşı oluşan hücresel cevapta hangi miRNA'ların bu düzenlemeye katıldığını araştırmak için yapılan dizin çalışması ile lipotoksik koşullarda Parkin proteini varlığına bağlı değişen miRNA profili incelenmiştir.

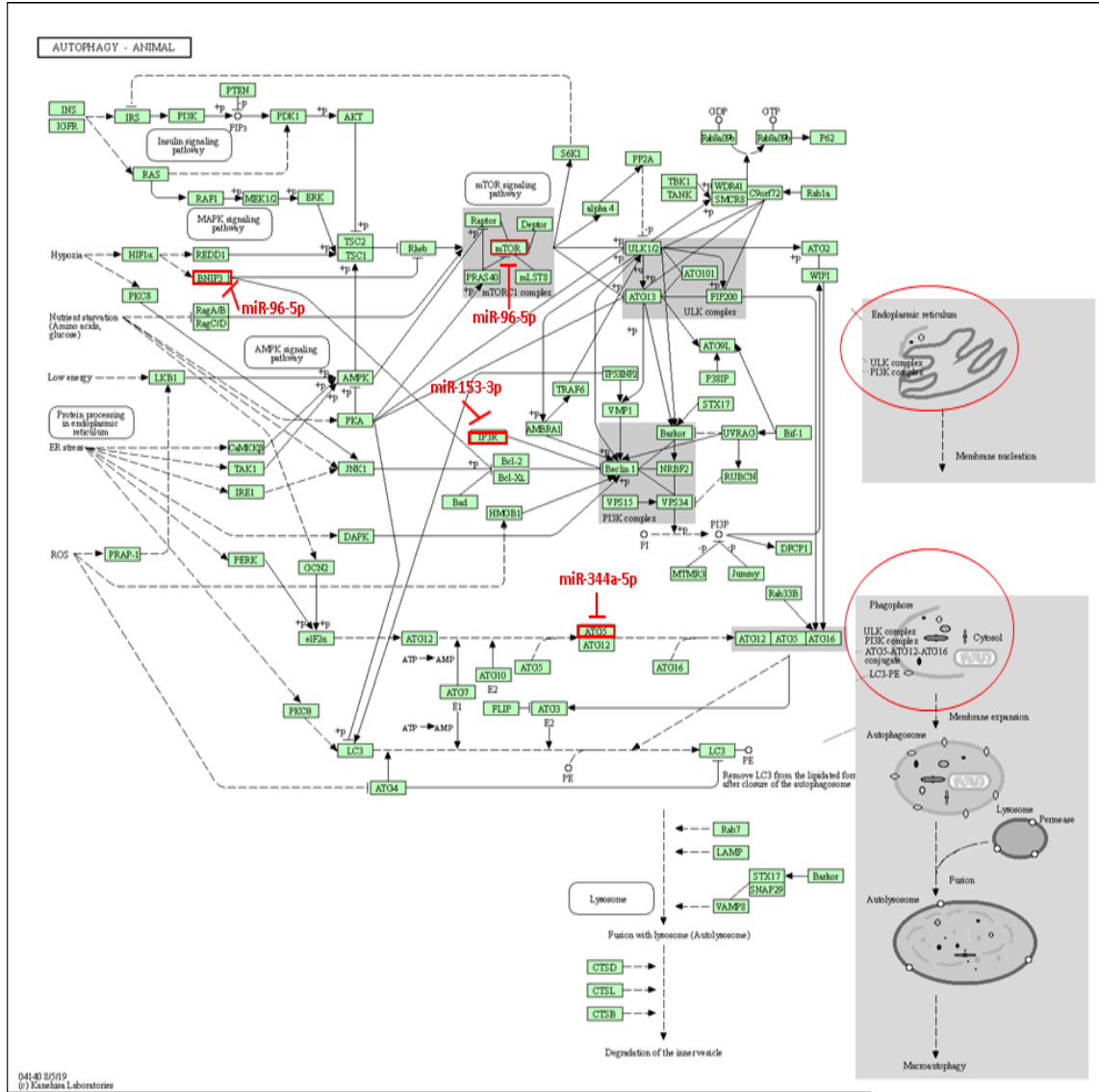
Yapılan inceleme sonunda *Park2* geni varlığına bağlı olarak anlamlı değişim gösteren ve tez çalışmasında araştırılan yolaklar olan; otofaji, apoptoz, hücre sağkalım ve T2D yolaklarında hemen hepsinin hedefledikleri genler ortak olarak zenginleşen miR-96-5p, miR-153-3p, miR-30e-3p ve miR-344a-5p miRNA'ları ön plana çıkmıştır. Bu miRNA'ların tespit edilen etkilerinin doğrulanması için miRNA'ların hedefledikleri iki gen (*Atg5* ve *Ip3r*) ile gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR bulguları da miRNA'ların ifade seviyelerini doğrulamaktadır.

6.1.2.1. Otofaji Yolağı

Otofaji yolağında miR-96-5p, miR-153-3p ve miR-344a-5p miRNA'larının *Park2* genine bağlı lipotoksik koşullarda aktif rol oynadıkları düşünülmektedir (Şekil 6.1.). Bu miRNA'lardan miR-96-5p ve miR-153-3p PA uygulamasında artıp, siRNA uygulamasında azalış gösterirken, miR-344a-5p ise tam tersi bir ifadenme göstermiştir. miR-344a-5p bu yolda oldukça aktif olan otofaji geni *Atg5*'i hedefleyerek bu şekilde otofajiyi bloklayabileceği düşünülmektedir. PA uygulamasında miR-96-5p'nin otofaji yolağında otofajinin temel blokörlerinden *mTOR*'u hedefleyerek ifadesini baskıladığı ve bu şekilde otofaji sürecinin ilerlediği düşünülmektedir. Aynı koşullar altında yine otofaji yolağında ER'den Mt'ye Ca^{+2} taşıyan önemli bir MİM elemanı *IP3R*'yi hedefleyip Mt'ye Ca^{+2} akışını engelleyerek hücrenin apoptoza yönelimini de baskıladığı öngörülmektedir. siRNA uygulamasında ifadesi azalan miR-96-5p'nin *mTOR* üzerindeki etkisi hafifleyeceğinden ötürü *mTOR* geninin otofaji üzerindeki bloklayıcı etkisinin artacağı ve otofajinin inhibe olacağı düşünülmektedir. Yine serbest hale gelen *IP3R* geni üzerinden Mt'ye Ca^{+2} akışı ile hücreye apoptotik mesajın ulaşacağı düşünülmektedir. siRNA uygulamasında miR-96-5p'nin *BNIP3* geni üzerindeki baskısının kalkması ile *BNIP3* geninin *Bcl-XL* genini inhibe ederek anti-apoptotik *Bcl-XL* genini bloklayacağı düşünülmektedir. miR-153-3p'nin PA

uygulamasında otofaji yolağında, *IP3R* genini hedefleyerek, *IP3R*'nin *Beclin1* üzerindeki inhibisyonunun kalkmasına ve hücrenin otofaji sürecinde ilerlemesine yardımcı olduğu düşünülmektedir.

Literatürde de bu miRNA'ların otofaji yolağında aktif rol aldığını vurgulayan çalışmalar mevcuttur. Kardiyomiyositlerle yapılmış bazı çalışmalarda miR-30e-3p'nin otofaji üzerinden hücrelerin sağkalımına etkisi gösterilmiştir (191,192). Kondrositler üzerinde yapılmış farklı bir çalışmada miR-153-3p'in aşırı ekspresyonunun *Bcl-2*'yi hedefleyerek (inhibe ederek) *Bcl-2* ve *Beclin1* arasındaki etkileşimi bozduğu ve iskemi reperfüzyon hasarına cevaben kondrositlerdeki otofajiyi kolaylaştırarak hücre sağkalımını desteklediği gösterilmiştir (193). Kanser hücre hatlarında da yoğun bir şekilde çalışılan miR-153-3p'nin melanomlarda tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğu ve melanom hücre hatlarında miR-153-3p'nin down-regüle olduğu tespit edilmiş, *Atg5*'i hedefleyerek melanom hücrelerinde otofajiyi artırdığı gösterilmiştir (194).



Şekil 6.1. KEGG figüründen adapte otofaji sinyal yolağı (rno04140). Yolakta miRNA'lar ve olası gen hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

6.1.2.2. Apoptoz Yolağı

Apoptoz yolağında rol alarak tahmini hedef genlerinin zenginleştiği düşünülen miRNA'lar miR-96-5p, miR-30e-3p ve miR-344a-5p olarak belirlenmiştir (Şekil 6.2.). Bu miRNA'lardan miR-30e-3p ve miR-344a-5p PA uygulamasında azalırken siRNA uygulamasında artışa geçmiştir, miR-96-5p ise tam tersi şekilde bir ifade seviyesi göstermiştir. Apoptoz yolağında, miR-344a-5p'nin *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerini hedefleyerek bu iki genin *Bak* geni üzerindeki inhibisyonunu ortadan kaldırarak pro-apoptotik *Bak* geni üzerinden apoptozom oluşumunu sağladığı ve hücrenin apoptoza yönelimine sebep olabileceği

düşünülmüştür. Apoptoz yolağında siRNA uygulamasında, miR-30e-3p'nin başka hedeflerinden olan anti-apoptotik genler *Bcl-2* ve *Bcl-XL* genlerinin ifadelerinin baskılanması sonucu lipotoksisite altında hücrenin apoptoza yatkınlığının artacağı düşünülmüştür. PA uygulamasında apoptoz yolağına miR-96-5p'nin, ER stres kolu üzerindeki apoptotik Ca^{+2} sinyalini ileten *IP3R*'yi hedefleyerek Ca^{+2} sinyalinin *Kalpsin* üzerinden *Kaspaz12*'ye iletilmesini engelleyerek apoptozu durdurduğu düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise *IP3R* aracılığı ile Ca^{+2} sinyalinin kaspazlara ulaşması ile apoptotik kaskatın ilerleyeceği düşünülmüştür. Aynı yolakta PA uygulamasında miR-96-5p'nin hem *Bcl-XL*'yi inhibe eden *CHOP*'u doğrudan hedeflemesi hem de *CHOP*'un aktivasyonunda rol alan *eiF2 α* 'yı hedefleyerek *Bcl-XL*'nin üzerindeki inhibisyonun ortadan kalkarak apoptozun gelişimini baskılıyor olabileceği düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise miR-96-5p'nin *Bcl-2* ve *Bcl-XL* anti-apoptotik genlerini baskılayarak yolağın apoptotik doğrultuda ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir

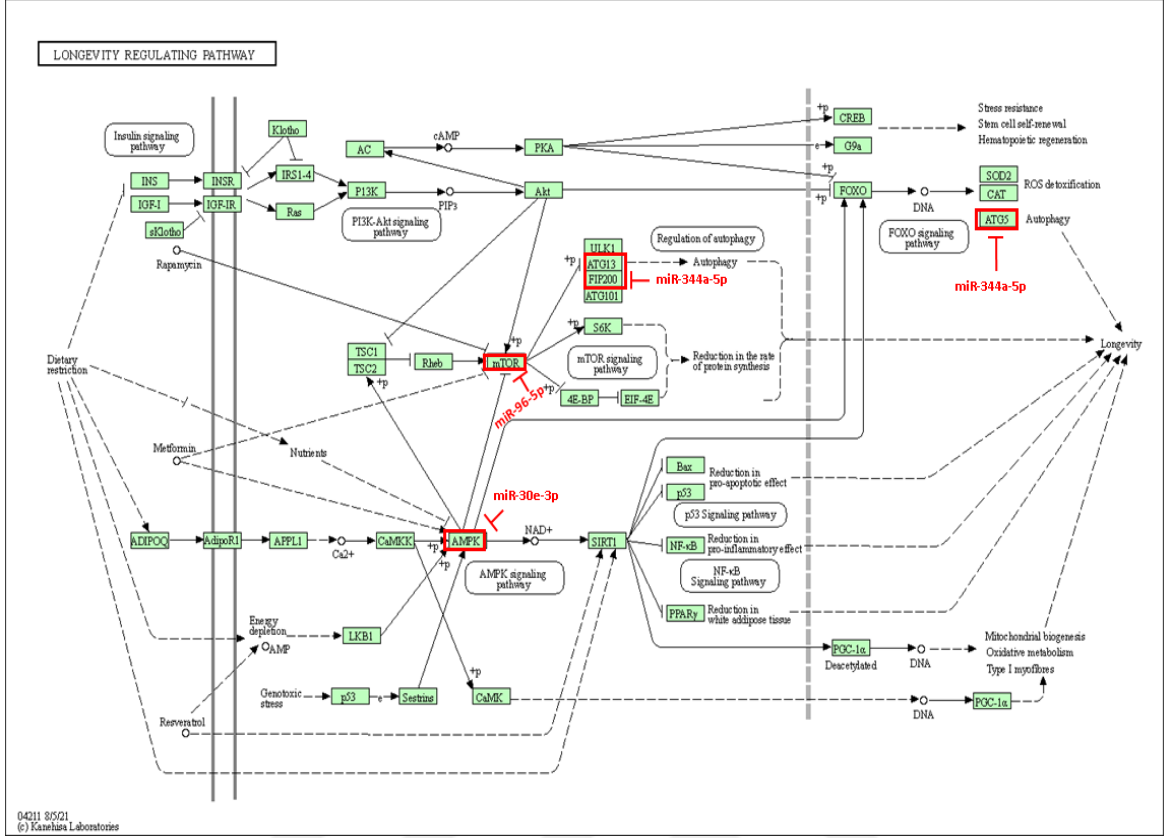
Literatürde doymuş serbest yağ asitlerinin yarattığı lipotoksisiteye bağlı pankreatik beta hücrelerinde oluşan apoptotik süreçte miR-344-5p'nin rolünün bulunduğu gösterilmiştir (195). İnsan glioma hücrelerinde yapılmış bir çalışmada miR-153-3p'nin BCL2/Kaspaz-3 yoluyla glioma hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (196). miR-96-5p inhibisyonunun gastrik adenokarsinom hücrelerinde apoptozu artırdığı bildirilmiştir (197) İnsan böbrek hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise miR-96-5p'nin *Chop*'u hedefleyerek hücrede apoptozu indüklediği gösterilmiştir (198)

kompleksi üzerindeki inhibisyonunun kalkarak hücrenin otofaji aracılı olarak sağkalım sürecine girdiği öngörülmektedir. Aynı yolak üzerinde siRNA uygulamasında ise *AMPK*'nın ifadesinin baskılanması ve *mTOR* ifadesinin artması sonucunda hücrenin sağkalımı için gerçekleşecek otofaji sürecinin engelleneceği düşünülmektedir (Şekil 5.25.).

PA uygulamasında hücre sağkalım yolağında *mTOR* genini hedefleyen miR-96-5p'nin *mTOR*'un *ULK1*, *Atg13*, *FIP200* ve *ATG101* genleri üzerindeki inhibisyonun kalkmasına neden olarak otofajinin gerçekleşmesini sağladığı düşünülmektedir.

Literatürde miR-96-5p'nin hücre sağkalımına olan etkisine dair yapılmış pekçok çalışma mevcuttur(197,199–201).





Şekil 6.3. KEGG figüründen adapte hücre sağkalım sinyal yolağı (rno04211). Yolakta miRNA'lar ve olası gen hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

6.1.2.4. T2D Yolağı

Yaptığımız PA uygulamasında ifadesi artan ve siRNA uygulamasında ifadesi azalış gösteren miR-153-3p ve miR-96-5p T2D yolağında aktif rol alan iki miRNA olmuştur.

PA uygulamasında, miR-96-5p bozulan insülin mekanizmasının sebep olduğu insülin direnci oluşumunu düzenleyen *PI3K* genini hedeflemektedir. PA koşullarında ifadesi artan miR-96-5p'nin *PI3K*'nın ifadesini baskılayarak hücrenin insülin direncine girmesine engel olduğu düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise ifadesi azalan miR-96-5p'nin *PI3K* üzerindeki etkisinin kalkarak hücrenin insülin direncine girip stresi kompanse edemediği noktada strese bağlı apoptoz gibi ölüm yollarını devreye sokmasına neden oluşturabileceği düşünülmektedir. miR-153-3p'nin, PA uygulamasında hedeflediği *PI3K* geninin ifadesini baskılayarak insülin direnci oluşum mekanizmasını blokladığı düşünülmektedir. siRNA uygulamasında ise miR-153-3p'nin *PI3K* geni üzerindeki baskısı kalkınca hücrede insülin direnci ve buna bağlı stres gelişimi ve aşırı stres durumunda ise insülin mekanizmasının bozulması ve T2D gelişimi olacağı düşünülmektedir.

Literatürde de özellikle diyabet ve obezite ile ilişkilendirilen miR-30e-3p'nin ifadesinin lipotoksik koşullarda ve daha yoğun olarak insülin metabolizmasının bozulması ile artışa geçtiği gösterilmiştir bu miRNA'nın daha çok insülin metabolizması yolağında aktif olduğu gösterilmiş, insülin direnci, yağ asitleri metabolizması ile ilişkili genlerin aktivitesinin düzenlenmesine potansiyel katkılarının olduğu belirtilmiştir (202). Yapılan çalışmalar miR-30e-3p'nin prediyabet ile ilişkili olduğunu ve bu tarz miRNA'ların ölçülmesinin potansiyel olarak diyabet risk tarama stratejilerine katkıda bulunabileceği önerilmiştir (203). Diyabet gibi metabolik sendromla ilişkili miRNA'ların obez deneklerde incelendiği bir çalışmada miR-153-3p'nin patofizyolojik bir role sahip olabileceği ve diyabet gibi çeşitli metabolik hastalıklara yatkınlığı olan obez bireyler için belirteç görevi görebileceği bildirilmiştir (204).

6.2. SONUÇ

Son yıllarda hızla gelişen yüksek işlem hacimli dizin tekniklerinin pek çok metabolik sorunun moleküler boyutta incelenebilmesine olanak sağladığı bilgisi ışığında gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR miRNA dizin çalışması ve hipotezi destekleyici doğrulama basamakları ile sıçan pankreas dokusunda bulunan ve insülin salınımından sorumlu hücre grubu pankreatik β hücre hattında (INS-1E) lipotoksik etki yaratan PA ile oluşturulan 0,3mM PA dozu ve *Park2* geninin en yüksek ifadenme gösterdiği saat olan 24 saatlik uygulaması ile *Park2* geni varlığında ve siRNA aracılı olarak *Park2* geni susturulduğu koşullarda değişen miRNA profiline bakılmış ve her iki koşulda da anlamlı olarak değişen 4 adet miRNA (rno-miR-96-5p, miR-344a-5p, miR-153-3p ve rno-miR-30e-3p) saptanmıştır. Bu miRNA'ların yer aldıkları yolaklardaki tahmini hedef genlerine olan etkileri incelenerek Parkin proteininin bu yollara olan etkileri saptanmaya çalışılmıştır. İnceleme sonunda ise seçilen diğer miRNA'lara oranla rno-miR-96-5p, miR-344a-5p, miR-153-3p ve rno-miR-30e-3p miRNA'larının lipotoksik stres koşullarında *Park2* geni varlığına ya da yokluğuna bağlı olarak hücrenin sağkalımında daha aktif bir regülasyon potansiyeline sahip olabilecekleri görüşüne varılmıştır.

Saptanan miRNA'lar ile yapılacak fonksiyonel çalışmalar ile hipotezin sağlamlaştırılması çalışmanın gelecek hedefidir.

Yapılan tüm araştırma ve analiz sonuçları Parkin proteininin pankreatik β hücreleri için lipotoksik stres koşulları altında koruyucu bir etkisinin olduğunu ve hücrel stres koşullarında pankreatik β hücresinin kaderinin belirlenmesinde rol oynadığını ve Parkin proteininin oldukça hızlı gerçekleşen düzenlenmesinde miRNA'ların aktif rol alabileceği görüşünü destekler nitelikte olmuştur.

Literatürde benzer bir çalışma olmaması nedeniyle bu çalışma, INS-1E hücre hattında *in-vitro* koşullarda metabolik düzeyde oluşturulmaya çalışılmış lipotoksisitenin sebep olduğu hücrel stres cevabına Parkin proteininin etkisini miRNA ifade değişim düzeyi üzerinden araştırılması yönüyle diğer çalışmalardan daha özgün olmaktadır.

İleride yapılması düşünülen çalışmalar aşağıda sıralanmıştır;

- Seçilecek olan ek miRNA hedef genleri Gerçek Zamanlı PZR ile doğrulanacaktır.
- Seçilecek olan hedef proteinler Western Blot tekniği ile doğrulanacaktır.
- Tespit edilmiş olan rno-miR-96-5p, miR-344a-5p, miR-153-3p ve rno-miR-30e-3p miRNA'ları ile fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilecektir.

KAYNAKLAR

1. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840–6.
2. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2.
3. van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2014;1843(10):2253–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.009>
4. Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(8):438–48.
5. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect* [Internet]. 2014;4(1):R1–15. Available from: <http://www.endocrineconnections.com/cgi/doi/10.1530/EC-14-0092>
6. Stinkens R, Goossens GH, Jocken JWE, Blaak EE. Targeting fatty acid metabolism to improve glucose metabolism. *Obes Rev*. 2015;16(9):715–57.
7. Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med*. 2014;20(12):1427–35.
8. Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszyński J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiopathological Implications. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2015;22(12):995–1019. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2014.6223>
9. Quan W, Lim YM, Lee MS. Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β -cells. *Exp Mol Med*. 2012;44(2):81–8.

10. Hetz C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(2):89–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3270>
11. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH. Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic β -cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes*. 2007;56(4):930–9.
12. Rieusset J. The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: An update. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):1–12.
13. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6(October):1–27.
14. Wang H-Q, Imai Y, Kataoka A, Takahashi R. Cell type-specific upregulation of Parkin in response to ER stress. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2007 May;9(5):533–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465879>
15. LaPierre MP, Stoffel M. MicroRNAs as stress regulators in pancreatic beta cells and diabetes. *Mol Metab*. 2017;6(9):1010–23.
16. Wendt A, Esguerra JL, Eliasson L. Islet microRNAs in health and type-2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2018;43:46–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.003>
17. Roden M, Bernroider E. Hepatic glucose metabolism in humans - Its role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003;17(3):365–83.
18. V.T. S, G.I. S. The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* [Internet]. 2016;126(1):12–22. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L608074012%0Ahttp://dx.doi.org/10.1172/JCI77812>
19. Wang CH, Tsai TF, Wei YH. Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca^{2+} -homeostasis in insulin insensitivity of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1350(1):66–76.

20. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(2):R33–54.
21. Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res*. 2010;107(5):579–91.
22. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre dâ€™Hellencourt C, Ravanani P. A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014;8(July):1–15. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00213/abstract>
23. Rieusset J. Role of Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication in Type 2 Diabetes. In 2017. p. 171–86. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-4567-7_13
24. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. β -Cell failure in type 2 diabetes: Postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):1983–92.
25. Engin F, Nguyen T, Yermalovich A, Hotamisligil GS. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. Available from: www.nature.com/scientificreports
26. Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, Bartelt A. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Mol Metab* [Internet]. 2021;47(January):101169. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101169>
27. Blackstone C, Prinz WA. Keeping in shape. *Elife* [Internet]. 2016 Sep 13;5. Available from: <https://elifesciences.org/articles/20468>
28. Jäger R, Bertrand MJM, Gorman AM, Vandenabeele P, Samali A. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell* [Internet]. 2012;104(5):259–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/boc.201100055>
29. Daverkausen-Fischer L, Draga M, Pröls F. Regulation of Translation, Translocation,

- and Degradation of Proteins at the Membrane of the Endoplasmic Reticulum. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5576.
30. Kadowaki H, Satrimafitrah P, Takami Y, Nishitoh H. Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–11.
 31. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci [Internet].* 2015;40(3):141–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.01.002>
 32. Biden TJ, Boslem E, Chu KY, Sue N. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(8):389–98.
 33. Lee JH, Lee J. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Its Role in Pancreatic β -Cell Dysfunction and Senescence in Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9).
 34. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Aug 1;21(8):421–38.
 35. Ma JH, Wang JJ, Zhang SX. The Unfolded Protein Response and Diabetic Retinopathy. *J Diabetes Res.* 2014;2014:1–14.
 36. Teodoro T, Odisho T, Sidorova E, Volchuk A. Pancreatic β -cells depend on basal expression of active ATF6 α -p50 for cell survival even under nonstress conditions. *Am J Physiol Physiol.* 2011;302(7):C992–1003.
 37. Wang M, Kaufman RJ. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(9):581–97.
 38. Kny M, Fielitz J. Hidden Agenda - The Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Inflammation-Induced Muscle Wasting. *Front Immunol.* 2022;13(May):1–26.
 39. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018;28(4):R170–85.

40. Bohovych I, Chan SSL, Khalimonchuk O. Mitochondrial Protein Quality Control: The Mechanisms Guarding Mitochondrial Health. *Antioxidants Redox Signal*. 2015;22(12):977–94.
41. Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(2):109–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.110>
42. Muñoz-Carvajal F, Sanhueza M. The Mitochondrial Unfolded Protein Response: A Hinge Between Healthy and Pathological Aging. *Front Aging Neurosci*. 2020;12(September).
43. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2000 Jul;25(7):319–24.
44. Runkel ED, Baumeister R, Schulze E. Mitochondrial stress: Balancing friend and foe. *Exp Gerontol* [Internet]. 2014;56:194–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.02.013>
45. Hu F, Liu F. Mitochondrial stress: A bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell Signal*. 2011;23(10):1528–33.
46. Rath E, Moschetta A, Haller D. Mitochondrial function — gatekeeper of intestinal epithelial cell homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2018;15(8):497–516. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-018-0021-x>
47. Franco-Iborra S, Vila M, Perier C. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson’s disease and Huntington’s disease. *Front Neurosci*. 2018;12(MAY):1–25.
48. Hershko A. Ubiquitin: Roles in protein modification and breakdown. *Cell*. 1983;34(1):11–2.
49. Finley D. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome Finley, D. (2012). Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome, 477–513.

- doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607.Recognition. 2012;477–513.
50. Avram Hershko and Aaron Ciechanover. The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci.* 1998;67:425–79.
 51. Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting Proteins for Destruction by the Ubiquitin System: Implications for Human Pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49(1):73–96.
 52. Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF RR. © 1991 Nature Publishing Group 그라첼꺼. *Nature.* 1991;
 53. Shin JY, Muniyappan S, Tran NN, Park H, Lee SB, Lee BH. Deubiquitination reactions on the proteasome for proteasome versatility. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1–16.
 54. Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol [Internet].* 2006 Aug;3(4):255–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978533>
 55. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem [Internet].* 1999;68:1015–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872471>
 56. Yadav D, Lee JY, Puranik N, Chauhan PS, Chavda V, Jin JO, et al. Modulating the Ubiquitin–Proteasome System: A Therapeutic Strategy for Autoimmune Diseases. *Cells.* 2022;11(7):1–13.
 57. Lee D, Hong JH. Physiological Overview of the Potential Link between the UPS and Ca²⁺ Signaling. *Antioxidants.* 2022;11(5):997.
 58. Yuan L, Li P, Zheng Q, Wang H, Xiao H. The Ubiquitin-Proteasome System in Apoptosis and Apoptotic Cell Clearance. 2022;10(July):1–10.
 59. Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(5):606–16.

60. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Nov;8(11):931–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm2245>
61. Ploumi C, Papandreou ME, Tavernarakis N. The complex interplay between autophagy and cell death pathways. *Biochem J*. 2022;479(1):75–90.
62. Gómez-Virgilio L, Silva-Lucero M-D-C, Flores-Morelos D-S, Gallardo-Nieto J, Lopez-Toledo G, Abarca-Fernandez A-M, et al. Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells* [Internet]. 2022 Jul 22;11(15). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35892559>
63. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(9):579–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30006559>
64. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* [Internet]. 2010 May;221(1):3–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225336>
65. Jin M, Klionsky DJ. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett* [Internet]. 2014 Aug 1;588(15):2457–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24928445>
66. Pearson GL, Gingerich MA, Walker EM, Biden TJ, Soleimanpour SA. A Selective Look at Autophagy in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*. 2021;70(6):1229–41.
67. Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, Wilhelm L, Barnes CA, Maiolica A, et al. Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol Cell* [Internet]. 2014 Feb 6;53(3):471–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440502>
68. Thorburn A. Crosstalk between autophagy and apoptosis: Mechanisms and therapeutic implications [Internet]. 1st ed. Vol. 172, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2020. 55–65 p. Available from:

69. Narendra DP, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*. 2010;6(8):1090–106.
70. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science* (80-). 1998;280(5370):1763–6.
71. Friedman JR, Lackner LL, West M, Dibenedetto JR. NIH Public Access. 2012;334(6054):358–62.
72. Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*. 2006;174(7):915–21.
73. Mandl J, Mészáros T, Bánhegyi G, Hunyady L, Csala M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(4):194–201.
74. Gao AW, Cantó C, Houtkooper RH. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol Med*. 2014;6(5):580–9.
75. Martinon F. The endoplasmic reticulum: A sensor of cellular stress that modulates immune responses. *Microbes Infect* [Internet]. 2012;14(14):1293–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.005>
76. Li YE, Sowers JR, Hetz C, Ren J. Cell death regulation by MAMs: from molecular mechanisms to therapeutic implications in cardiovascular diseases. *Cell Death Dis*. 2022;13(5).
77. Degechisa ST, Dabi YT, Gizaw ST. The mitochondrial associated endoplasmic reticulum membranes: A platform for the pathogenesis of inflammation-mediated metabolic diseases. *Immunity, Inflamm Dis*. 2022;10(7):1–12.

78. Rieusset J. Mitochondria and endoplasmic reticulum: Mitochondria-endoplasmic reticulum interplay in type 2 diabetes pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(9):1257–62.
79. Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, Gatica D, Rodriguez AE, Pedrozo Z, et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(1):16–20.
80. Ivanova H, Vervliet T, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843(10):2164–83.
81. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol [Internet].* 2007 Jun;35(4):495–516. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>
82. Sorice M, Thorburn A, Zhou F, Yang Y, Xing D, Noguchi M, et al. Crosstalk of Autophagy and Apoptosis. *Oncotarget [Internet].* 1st ed. 2022;11(9):10–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35857637>
83. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet].* 2013 Apr 1;5(4):a008656. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545416>
84. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY) [Internet].* 2012 May;4(5):330–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683550>
85. Fairlie WD, Tran S, Lee EF. Crosstalk between apoptosis and autophagy signaling pathways [Internet]. 1st ed. Vol. 352, *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier Inc.; 2020. 115–158 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.01.003>
86. Fan Y, Ullman E, Zong WX. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Beyond Apoptosis Cell Outcomes Cancer Ther.* 2008;127–41.

87. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol* [Internet]. 81(4):1133–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33111928>
88. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010 Sep;12(9):823–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811354>
89. Kist M, Vucic D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J* [Internet]. 2021;40(5):e106700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33439509>
90. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research* [Internet]. 2020;9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32148779>
91. Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, Wei Y, Ginet V, Zhang L, et al. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Dec 17;110(51):20364–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277826>
92. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* [Internet]. 2006 Jun 15;441(7095):885–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625204>
93. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* [Internet]. 2006 Jun 15;441(7095):880–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625205>
94. Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He Y-W. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Jan 22;204(1):25–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190837>

95. Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, et al. Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr Biol* [Internet]. 2005 Aug 23;15(16):1513–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16111945>
96. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* [Internet]. 2005 Jan 28;120(2):237–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15680329>
97. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* [Internet]. 2006 Jul;10(1):51–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843265>
98. Mathew R, White E. Why sick cells produce tumors: the protective role of autophagy. *Autophagy* [Internet]. 3(5):502–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611387>
99. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2010 Apr;22(2):206–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045304>
100. Li XN, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, et al. Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes*. 2009;58(10):2246–57.
101. Shen S, Codogno P. The Role of Autophagy in Cell Death. In: M.A. Hayat, editor. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* [Internet]. Elsevier; 2016. p. 139–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802937-4.00007-7>.
102. Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Feb;25(3):1025–40. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657430>

103. He L, Zhang J, Zhao J, Ma N, Kim SW, Qiao S, et al. Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Adv Nutr* [Internet]. 2018 Jul 1;9(4):493–504. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/9/4/493/5055944>
104. Monaco A, Fraldi A. Protein Aggregation and Dysfunction of Autophagy-Lysosomal Pathway: A Vicious Cycle in Lysosomal Storage Diseases. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2020;13:37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32218723>
105. Li W, He P, Huang Y, Li Y-F, Lu J, Li M, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. *Theranostics* [Internet]. 2021;11(1):222–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33391472>
106. Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* [Internet]. 2010 Oct;6(7):891–900. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724831>
107. Kubli DA, Zhang X, Lee Y, Hanna RA, Quinsay MN, Nguyen CK, et al. Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Jan 11;288(2):915–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152496>
108. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, et al. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Jan 11;288(2):1099–113. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209295>
109. Jung S, Jeong H, Yu S-W. Autophagy as a decisive process for cell death. *Exp Mol Med* [Internet]. 2020;52(6):921–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32591647>
110. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* [Internet]. 2019 Apr 19;26(4):605–16. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41418->

111. Yau R, Rape M. The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2016 Jun 27;18(6):579–86. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb3358>
112. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol*. 2014;56:182–8.
113. Feng D, Liu L, Zhu Y, Chen Q. Molecular signaling toward mitophagy and its physiological significance. *Exp Cell Res* [Internet]. 2013 Jul 15;319(12):1697–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603281>
114. Abdrakhmanov A, Gogvadze V, Zhivotovsky B. To Eat or to Die: Deciphering Selective Forms of Autophagy. *Trends Biochem Sci*. 2020;45(4):347–64.
115. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58–63.
116. Zhu CL, Yao RQ, Li LX, Li P, Xie J, Wang JF, et al. Mechanism of Mitophagy and Its Role in Sepsis Induced Organ Dysfunction: A Review. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(June):1–13.
117. Shires SE, Kitsis RN, Gustafsson ÅB. Beyond Mitophagy: The Diversity and Complexity of Parkin Function. *Circ Res* [Internet]. 2017;120(8):1234–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28408450>
118. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* [Internet]. 2008 Dec 1;183(5):795–803. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/183/5/795/35265/Parkin-is-recruited-selectively-to-impaired>
119. Kim K-Y, Stevens M V., Akter MH, Rusk SE, Huang RJ, Cohen A, et al. Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells. *J Clin Invest*

- [Internet]. 2011 Sep 1;121(9):3701–12. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/44736>
120. Johnson BN, Berger AK, Cortese GP, LaVoie MJ. The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(16):6283–8.
 121. Carroll RG, Hollville E, Martin SJ. Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Nov 20;9(4):1538–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25456142>
 122. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, et al. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 18;496(7445):372–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503661>
 123. Xu L, Lin D, Yin D, Koeffler HP. An emerging role of PARK2 in cancer. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2014 Jan;92(1):31–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297497>
 124. Scuderi S, Cognata V La, Drago F, Cavallaro S, Agata VD. Alternative Splicing Generates Different Parkin Protein Isoforms : Evidences in Human , Rat , and Mouse Brain. 2014;2014.
 125. Cali T, Ottolini D, Negro A, Brini M. Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca²⁺ transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2013;1832(4):495–508.
 126. Bouman L, Schlierf A, Lutz AK, Shan J, Deinlein A, Kast J, et al. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: Evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ*. 2011;18(5):769–82.
 127. Park E, Young A, Park S, Kim J, Cho M. Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. *FOOD Chem Toxicol*. 2014;67:26–34.

128. MacCormac LP, Muqit MMK, Faulkes DJ, Wood NW, Latchman DS. Reduction in endogenous parkin levels renders glial cells sensitive to both caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2004 Oct;20(8):2038–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450083>
129. Ham SJ, Lee D, Yoo H, Jun K, Shin H, Chung J. Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020;117(8):4281–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32047033>
130. Khan SH, Zhao D, Shah SZA, Hassan MF, Zhu T, Song Z, et al. Parkin Overexpression Ameliorates PrP106–126-Induced Neurotoxicity via Enhanced Autophagy in N2a Cells. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 May 18;37(4):717–28. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-016-0407-7>
131. da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, et al. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 Nov;11(11):1370–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801972>
132. Alves Da Costa C, Checler F. Parkin: Much more than a simple ubiquitin ligase. *Neurodegener Dis*. 2012;10(1–4):49–51.
133. Jin HS, Kim J, Lee SJ, Kim K, Go MJ, Lee JY, et al. The PARK2 gene is involved in the maintenance of pancreatic β -cell functions related to insulin production and secretion. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):178–89.
134. Shinjo S, Jiang S, Nameta M, Suzuki T, Kanai M, Nomura Y, et al. Disruption of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) plays a central role in palmitic acid-induced insulin resistance. *Exp Cell Res* [Internet]. 2017;359(1):86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.006>
135. Yu G, Luo H, Zhang N, Wang Y, Li Y, Huang H, et al. Loss of p53 Sensitizes Cells to Palmitic Acid-Induced Apoptosis by Reactive Oxygen Species Accumulation. *Int*

- J Mol Sci [Internet]. 2019 Dec 12;20(24). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31842349>
136. Oh YS, Bae GD, Baek DJ, Park E-Y, Jun H-S. Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018 Jul 16;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00384/full>
 137. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2018;29(3):178–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>
 138. Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications. *Front Physiol*. 2017;8(NOV):1–14.
 139. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Steven P, Bartel DP. The impact of miRNA on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64–71.
 140. Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One*. 2008;3(7).
 141. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293–6.
 142. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259–69.
 143. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(11):4034–9.
 144. Ryan B, Joilin G, Williams JM. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2015 Feb 23;8. Available from:

<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnmol.2015.00004/abstract>

145. Mattick JS, Makunin I V. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2005 Apr 15;14(suppl_1):R121–32. Available from: http://academic.oup.com/hmg/article/14/suppl_1/R121/560813/Small-regulatory-RNAs-in-mammals
146. Plaisance V, Waeber G, Regazzi R, Abderrahmani A. Role of MicroRNAs in Islet Beta-Cell Compensation and Failure during Diabetes. *J Diabetes Res* [Internet]. 2014;2014:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2014/618652/>
147. Latreille M, Rorsman P, Stoffel M, Latreille M, Hausser J, Stützer I, et al. MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2722–35.
148. Mishra S, Bahinipati J, Sarangi R, Mohapatra SR, Das S, Mishra A. A comprehensive overview on Micro RNA signature in type 2 diabetes Mellitus and its complications. *Indian J Clin Biochem* [Internet]. 2022 Sep 5;1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36090301>
149. Nesca V, Guay C, Jacovetti C, Menoud V, Peyot ML, Laybutt DR, et al. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2013;56(10):2203–12.
150. Tattikota SG, Rathjen T, McAnulty SJ, Wessels HH, Akerman I, Van De Bunt M, et al. Argonaute2 mediates compensatory expansion of the pancreatic β cell. *Cell Metab*. 2014;19(1):122–34.
151. Salunkhe VA, Mollet IG, Ofori JK, Malm HA, Esguerra JLS, Reinbothe TM, et al. Dual Effect of Rosuvastatin on Glucose Homeostasis Through Improved Insulin Sensitivity and Reduced Insulin Secretion. *EBioMedicine* [Internet]. 2016;10:185–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.07.007>
152. Tattikota SG, Rathjen T, Hausser J, Khedkar A, Kabra UD, Pandey V, et al. miR-184 regulates pancreatic β -cell function according to glucose metabolism. *J Biol Chem*. 2015;290(33):20284–94.

153. Zhu M, Wei Y, Geißler C, Abschlag K, Campos JC, Hristov M, et al. Hyperlipidemia-induced MicroRNA-155-5p improves β -cell function by targeting Mafk. *Diabetes*. 2017;66(12):3072–84.
154. Han YB, Wang MN, Li Q, Guo L, Yang YM, Li PJ, et al. MicroRNA-34a contributes to the protective effects of glucagon-like peptide-1 against lipotoxicity in INS-1 cells. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(23):4202–8.
155. Liu Y, Dong J, Ren BO. MicroRNA-182-5p contributes to the protective effects of thrombospondin 1 against lipotoxicity in INS-1 cells. *Exp Ther Med*. 2018;16(6):5272–9.
156. Wu W, Xu H, Wang Z, Mao Y, Yuan Y, Luo W, et al. PINK1-parkin-mediated mitophagy protects mitochondrial integrity and prevents metabolic stress-induced endothelial injury. *PLoS One*. 2015;10(7):1–14.
157. Casimir M, Chaffard G, Maechler P. Resveratrol long-term treatment differentiates INS-1E beta-cell towards improved glucose response and insulin secretion. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2019;471(2):337–45.
158. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods [Internet]*. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
159. Qiagen. GeneGlobe [Internet]. Available from: <https://geneglobe.qiagen.com/tr/analyze>
160. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods [Internet]*. 2012 Jul;9(7):671–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>
161. Mirwalk [Internet]. Available from: <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>
162. miRWalk [Internet]. Available from: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>

163. Targetscan [Internet]. Available from: http://www.targetscan.org/vert_80/
164. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W741-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980575>
165. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jul 2;47(W1):W199–205. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/W1/W199/5494758>
166. Venny [Internet]. Available from: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>
167. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. 2007; Available from: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
168. Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS J*. 2011;278(3):403–13.
169. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2001;117(2):333–40.
170. Zhu L, Han MB, Gao Y, Wang H, Dai L, Wen Y, et al. Curcumin triggers apoptosis via upregulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in SW872 human adipocytes. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):1151–6.
171. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, et al. Increased bax/bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with Myasthenia gravis. *In Vivo (Brooklyn)*. 2007;21(1):123–32.
172. GeneGlobe-Qiagen [Internet]. Available from: <https://geneglobe.qiagen.com/us/product-groups/mircury-lna-mirna-pcr-assays>
173. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences

- to function. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8;47(D1):D155–62. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D155/5179337>
174. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci* [Internet]. 2019 Nov;28(11):1947–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31441146>
 175. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1;28(1):27–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592173>
 176. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2022 Oct 27; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36300620>
 177. Zungu M, Schisler JC, Essop MF, McCudden C, Patterson C, Willis MS. Regulation of AMPK by the Ubiquitin Proteasome System. *Am J Pathol* [Internet]. 2011 Jan;178(1):4–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010000775>
 178. Rodolfo C, Campello S, Cecconi F. Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* [Internet]. 2018 Jul;117:156–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018617300876>
 179. Chan NC, Salazar AM, Pham AH, Sweredoski MJ, Kolawa NJ, Graham RLJ, et al. Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 May 1;20(9):1726–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296869>
 180. Chen D, Gao F, Li B, Wang H, Xu Y, Zhu C, et al. Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285(49):38214–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.101469>
 181. Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2004 Aug 15;13(16):1745–54. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15198987>

182. Sandebring A, Dehvari N, Perez-Manso M, Thomas KJ, Karpilovski E, Cookson MR, et al. Parkin deficiency disrupts calcium homeostasis by modulating phospholipase C signalling. *FEBS J* [Internet]. 2009 Sep;276(18):5041–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19663908>
183. Martino L, Masini M, Novelli M, Beffy P, Bugliani M, Marselli L, et al. Palmitate activates autophagy in INS-1E β -cells and in isolated rat and human pancreatic islets. *PLoS One*. 2012;7(5).
184. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2010;1801(3):289–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.08.006>
185. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* [Internet]. 2012 Jan;18(1):59–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889406>
186. Kaushik S, Singh R, Cuervo AM. Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2010 Oct;12 Suppl 2(0 2):4–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029294>
187. Mao H, Chen W, Chen L, Li L. Potential role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane proteins in diseases. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2022 May;199:115011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35314166>
188. Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* [Internet]. 2017;62:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.003>
189. Rodríguez-Arribas M, Yakhine-Diop SMS, Pedro JMB-S, Gómez-Suaga P, Gómez-Sánchez R, Martínez-Chacón G, et al. Mitochondria-Associated Membranes (MAMs): Overview and Its Role in Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 Oct 6;54(8):6287–303. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-0140-8>

190. Sunanda T, Ray B, Mahalakshmi AM, Bhat A, Rashan L, Rungratanawanich W, et al. Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Crosstalk in Parkinson's Disease: The Role of Brain Renin Angiotensin System Components. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Nov 10;11(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34827667>
191. Su B, Wang X, Sun Y, Long M, Zheng J, Wu W, et al. miR-30e-3p Promotes Cardiomyocyte Autophagy and Inhibits Apoptosis via Regulating Egr-1 during Ischemia/Hypoxia. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020 Aug 17;2020:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/7231243/>
192. Wang X-T, Wu X-D, Lu Y-X, Sun Y-H, Zhu H-H, Liang J-B, et al. Potential Involvement of MiR-30e-3p in Myocardial Injury Induced by Coronary Microembolization via Autophagy Activation. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2017;44(5):1995–2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29237156>
193. Qiu S, Liu B, Mo Y, Wang X, Zhong L, Han X, et al. MicroRNA-153-3p increases autophagy in sevoflurane-preconditioned mice to protect against ischaemic/reperfusion injury after knee arthroplasty. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2020 May 2;24(9):5330–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.15188>
194. Hou S, Guo M, Xi H, Zhang L, Zhao A, Hou H, et al. MicroRNA-153-3p sensitizes melanoma cells to dacarbazine by suppressing ATG5-mediated autophagy and apoptosis. *Transl Cancer Res* [Internet]. 2020 Sep;9(9):5626–36. Available from: <http://tcr.amegroups.com/article/view/44201/html>
195. Sun X, Ji G, Li P, Li W, Li J, Zhu L. miR-344-5p Modulates Cholesterol-Induced β -Cell Apoptosis and Dysfunction Through Regulating Caveolin-1 Expression. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2021 Jul 28;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.695164/full>
196. Sun D, Mu Y, Piao H. MicroRNA-153-3p enhances cell radiosensitivity by targeting

- BCL2 in human glioma. *Biol Res* [Internet]. 2018 Dec 11;51(1):56. Available from: <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-018-0203-6>
197. Zhou H-Y, Wu C-Q, Bi E-X. MiR-96-5p inhibition induces cell apoptosis in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2019 Dec 21;25(47):6823–34. Available from: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v25/i47/6823.htm>
 198. Li S, Yang Y, Shi MH, Wang JF, Ran XQ. miR-96-5p attenuates malathion-induced apoptosis of human kidney cells by targeting the ER stress marker DDIT3. *J Environ Sci Health B* [Internet]. 2020;55(12):1080–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32897819>
 199. Eroglu S, Isik AF, Oguzkan Balci S. miR-96-5p regulates autophagy through targeting ATG9A in lung cancer. *Eur J Ther* [Internet]. 2020 Dec 1;26(4):332–6. Available from: <https://eurjther.com/en/mir-96-5p-regulates-autophagy-through-targeting-atg9a-in-lung-cancer-131157>
 200. Yu X, Liu Z, Fang J, Qi H. miR-96-5p. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2021 May 28;100(21):e25808. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/MD.00000000000025808>
 201. Nguyen MT, Min K-H, Lee W. MiR-96-5p Induced by Palmitic Acid Suppresses the Myogenic Differentiation of C2C12 Myoblasts by Targeting FHL1. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Dec 11;21(24). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33322515>
 202. Góralska J, Rażny U, Polus A, Dziewońska A, Gruca A, Zdzienicka A, et al. Enhanced GIP Secretion in Obesity Is Associated with Biochemical Alteration and miRNA Contribution to the Development of Liver Steatosis. *Nutrients*. 2020 Feb;12(2).
 203. Weale CJ, Matshazi DM, Davids SFG, Raghubeer S, Erasmus RT, Kengne AP, et al. MicroRNAs-1299, -126-3p and -30e-3p as Potential Diagnostic Biomarkers for Prediabetes. *Diagnostics*. 2021 May;11(6):949.
 204. Mir FA, Mall R, Iskandarani A, Ullah E, Samra TA, Cyprian F, et al. Characteristic

MicroRNAs Linked to Dysregulated Metabolic Pathways in Qatari Adult Subjects With Obesity and Metabolic Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2022;13:937089. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35937842>

