



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**3T3L1 HÜCRELERİNDE FRUKTOTOKSİTE VE MİTOKONDRIYAL
DİSFONKSİYON**

Prof. Dr. Sibel KINIK

DOKTORA TEZİ

ANKARA 2019



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**3T3L1 HÜCRELERİNDE FRUKTOTOKSİTE VE MİTOKONDRIYAL
DİSFONKSİYON**

Prof. Dr. Sibel KINIK

DOKTORA TEZİ

ANKARA 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ



T.C

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji. Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Prof. Dr. Sibel KINIK tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/9/2019

Tez Konusu : “3T3L1 Hücrelerinde Fruktotoksite ve Mitokondriyel Disfonksiyon”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ

Prof. Dr. Erkan Yurtçu

Prof. Dr. Şefik Güran

Doç. Dr. Hasibe Verdi

Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 26. / 09. / 2019 tarih ve 44. n. 6. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü



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

Tarih: 27 / 9 / 2019

Öğrencinin Adı, Soyadı :Sibel Kınık

Öğrencinin Numarası : 21310087

Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji

Programı :Doktora

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

Tez Başlığı: 3T3L1 HÜCRELERİNDE FRUKTOTOKSİTE VE MİTOKONDRIYAL DİSFONKSİYON

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 75 sayfalık kısmına ilişkin, 6 / 9/ 2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNITIN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Öğrenci İmzası: Sibel Kınık

Onay

27 / 9 / 2019

[Blank Signature Box]
Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad,
Prof.Dr. F.Belgin Ataç

TEŞEKKÜR

Tıp doktoru, Çocuk Endokrinoloji Profesörü olarak mesleğimin olgunluk döneminde Tıbbi Biyoloji doktorası yapmak inanılmaz keyifli, heyecanlı, pek de kolay olmayan bir yolculuktu. Bu süreçte her bakımdan yanımda olan desteğini esirgemeyen başta tez hocam Prof. Dr. F. Belgin Ataç olmak üzere, Prof. Dr. Erkan Yurtçu, Doç. Dr. Hasibe Verdi hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Hücrenin derinliklerinde yol almaya çalışırken heyecanını kaybetmeden bize yol gösteren çok sevgili Doç. Dr. Hasibe Verdi hocama teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bana sabırla yöntemleri öğreten, sorularıma cevap veren, ayakaltında dolaşmama sabreden sevgili Yaprak Yılmaz Yalçın (MSc) ve Pınar Baysan Çebi (MSc) ve Yüksel Suer'e de çok teşekkür ederim. Hem tıp fakültesi eğitiminde hem de doktora döneminde sınıf arkadaşım olan, zekasından ilham aldığım sevgili dostum, sonuna kadar güvendiğim Neslihan Başçıl Tütüncü'ye ayrıca teşekkür ederim. Kısacası hücrenin bilinen ve bilinmeyen fonksiyonlarını öğrenmeye çalışırken emeği geçen herkese minnettarım. Doktoram boyunca benimle gurur duyduğunu bildiğim canım anneme, biraz gurur duyup çokça da eğlenen sevgili eşim Hakan ve çocuklarım Aslı ve Can'a da teşekkür ederim. Öğrenmek her yaş ve koşulda güzeldir.

Dr. Sibel Kınık

ÖZET

Sibel Kınık

3T3-L1 Hücrelerinde Fruktotoksite ve Mitokondriyal Disfonksiyon

Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi

Obezite dünyada epidemi düzeyinde problem olan bir enerji dengesi bozukluğudur. Obezitenin artışında mısır şurubundan elde edilen fruktoz tüketimi büyük oranda sorumludur. Mitokondri hücrede enerji dengesini sağlamada çok önemli bir organel olarak obezitedeki metabolik bozukluklarda anahtar rol oynar. Obezitede besin yüklenmesi mitokondride yanlış katlanmış protein birikimine yol açabilir. Mitokondriyal kalite kontrol sistemleri şaperon ve proteazlardan oluşur ve nukleusa geri sinyaller göndererek hatalı proteinleri uzaklaştırarak mitokondriyal dengeyi sağlamaya çalışır.

Preadipositten olgun yağ hücresine farklılaşma bir dizi transkripsiyon faktörlerinin çok iyi işleyişi ile düzenlenir. Yağ hücresi bu sırada artmış enerji gereksinimini mitokondri ile sağlar. Besin, ilaç ve genetik faktörler yağ hücresindeki mitokondriyal fonksiyonu bozabilir. Yüksek dozda işlenmiş fruktoz alımı ile visseral yağlanmanın arttığı ve mitokondriyal fonksiyonunun bozulduğu bilinse de mekanizmalar çok iyi anlaşılamamıştır.

Fruktoz alımı ile obezite arasındaki ilişki nedeniyle, bu çalışmada fruktozun yağ hücre farklılaşmasındaki etkisini inceledik. Aynı zamanda 3T3-L1 preadiposit hücrelerinde fruktozun adipogenez sırasında mitokondri fonksiyonlarına olası zararlı etkisini göstermeyi hedefledik. Adiposit farklılaşması oil red-O boyama ile gösterildi. Tüm deney şartlarında fruktoz uygulanarak ve uygulanmadan mitokondriyal ve adiposit biyogenez genleri (Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gamma (PPAR γ), PPAR γ koaktivator 1 alfa (PGC-1 α), CCAAT enhancer-binding protein alfa (CEBP α), ve beta (CEBP β) ve mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı ile ilgili stres genlerinin (mitokondriyal “heat shock” protein 60 ve 70 (mtHsp60, mtHsp70), Mitochondrial processing peptidase β subunit (MPP β , Pmpcb), Clp-like proteaz (Clpp), Endonükleaz G (Endog) ve “ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1” (Uqcc) ifadenmeleri 2, 4, 6 ve 8. günlerde çalışıldı.

Sonuç olarak, fruktoz uygulanan 3T3L1 hücrelerinde olgun yağ hücresine dönüşümün arttığı görüldü. CEBP α , CEBP β , Pmpcb, Clpp, EndoG, Uqcc genlerinin ifadenmesi fruktoz uygulanan hücrelerde anlamlı olarak yüksekti. Çalışmamız fruktozun yağ hücresindeki mitokodriyal fonksiyonlarda bozucu etkilerini gstermiştir.

Anahtar kelimeler: Adiposit, mitokondriyal disfonksiyon, fruktoz

Bu alıřma

Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (proje no:DA16/31) ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sibel Kınık

Fructotoxicity and Mitochondrial Dysfunction in 3T3-L1 Cells

Başkent University Institute of Health Sciences, Medical Biology Doctorate Thesis

Obesity is an energy balance disorder and a worldwide growing epidemic problem. It has been proposed that increased obesity rates may be due to increased consumption of fructose derived from dietary high-fructose corn syrup. As mitochondria are the primary organelles regulating metabolic and energy homeostasis, mitochondrial dysfunction is thought to play a key role in the pathogenesis of metabolic disorders in obesity. In obesity, nutrient overloading may lead to the accumulation of misfolded proteins in mitochondria. The mitochondrial quality control machinery is mainly composed of chaperones and proteases, which are up-regulated through a retrograde signaling pathway to the nucleus to degrade and remove damaged mitochondrial proteins maintaining mitochondrial homeostasis.

Differentiation of preadipocytes into adipocytes is a highly regulated process whereby a series of transcription factors. During adipogenesis, adipocyte differentiation program requires large amount of energy and biogenesis of mitochondria is stimulated. Nutritional, pharmacological, and genetic impairments of adipose mitochondrial function lead to the dysregulation of homeostasis. Highly refined fructose intake increases visceral adiposity and mitochondrial dysfunction although the mechanism(s) remain unclear

Given the potential connections between fructose intake and obesity, we examined the effects of fructose on adipocyte differentiation. Also we want to show the detrimental impacts of fructose on the mitochondrial dysfunction during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocyte cells. Adipocyte differentiation was shown with oil red-O staining. In all experimental conditions with and without fructose, expression rates of mitochondrial and adipocyte biogenesis genes (peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), PPAR γ coactivator-1 alpha (PGC-1 α), CCAAT-enhancer binding protein alpha (CEBP α), CCAAT-enhancer binding protein beta (CEBP β) and also stress genes related to mitochondrial unfolded protein response (mitochondrial heat shock protein 60 (mtHsp60), mitochondrial heat shock protein 70 (mtHsp70), mitochondrial-processing

peptidase subunit beta (Pmpcb), Clp like protease (ClpP), endonuclease G (Endog), ubiquinol-cytochrome c reductase complex assembly factor 1(Uqcc) were measured on the second, fourth, sixth and eighth days of the experiment.

We demonstrated that, fructose treatment of 3T3-L1cells incubated in standard differentiation medium increases adipogenesis. Expression of CEBP α , CEBP β , Pmpcb, Clpp, Endog, Uqcc genes were significantly higher in fructose applied cells. Our study showed the deleterious effects of fructose on mitochondrial functions in adipocytes.

Key Words: Adipocyte, mitochondrial dysfunction, fructose

This study was approved by Başkent University Institutional Review Board (Project No: DA16/31) and supported by Baskent University research fund

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER VE TABLOLAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mitokondriyon yapısı ve fonksiyonları.....	3
2.2. Elektron Transport Zinciri (ETZ).....	6
2.3.Mitokondriyal Biyogenez, Protein Alımı ve Proteastaz.....	8
2.4. mtKPY'nın Düzenlenmesi.....	12
2.4.1. Mitokondriyon-Nükleer İletişim.....	12
2.5.Yağ Dokusu-Obezite- Mitokondriyal Disfonksiyon.....	15
2.5.1.Adipogenezis.....	16
2.5.2.Adiposit dönüşümünde mitokondriyon	16
2.6. Fruktöz Metabolizması.....	17
2.7. Mitokondriyon ve adiposit.....	19
2.7.1. Mitokondriyon ve Adiposit Biyogenezinde Rol Alan Genler.....	19
2.7.2. Mitokondriyel Katlanmamış Protein Yanıtı İle İlgili Genler	21
2.8. Çalışmanın amacı.....	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışmada kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	24
3.1.1 Hücre Kültürü	24
3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Çoğaltılması.....	25
3.1.2. Preadiposit Adiposit Hücre Dönüşümü	26
3.1.3. Oil red-O Boyama Protokolü.....	26
3.2. RNA İzolasyonu.....	27
3.3. RNA saflık ve sağlamlık tayini.....	28
3.4. cDNA sentezi.....	29
3.5. cDNA Kontrol PZR.....	30

3.6.Gerçek Zamanlı PZR.....	31
3.7. İstatistiksel Analizler.....	32
4. BULGULAR	34
4. 1. Mikroskopik Bulgular.....	34
4.2 Fruktoz (+) / (-) 3T3-L1 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Saflık Sonuçları	36
4.2.1. Fruktoz (+) ve (-) 3T3-L1 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların spektrofotometrik bulguları	36
4.2.2. Fruktoz uygulanan ve uygulanmayan 3T3-L1 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	37
4.3. cDNA Kontrol PZR.....	38
4.4. Mitokondriyal Biyogenez ve Katlanmamış Protein Yanıtı İle İlgili Genlerin Fruktoz (-) ve Fruktoz (-) Ortamdaki Gen İfadeleme Değişimlerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları.....	39
4.4.1.PPAR γ gen ifadenme değişimleri.....	39
4.4.2. PGC-1 α gen ifadenme değişimleri	40
4.4.3. CEBP α gen ifadenme değişimleri.....	41
4.4.4. CEBP β gen ifadenme değişimleri.....	42
4.5.5. Uqc gen ifadenme değişimleri	43
4.5.6. Clpp gen ifadenme değişimleri	44
4.5.7. Endog gen ifadenme değişimleri	45
4.5.8. Pmpcb gen ifadenme değişimleri.....	46
4.5.9. mtHsp60 gen ifadenme değişimleri.....	47
4.5.10. mtHsp70 gen ifadenme değişimleri	48
5.TARTIŞMA.....	50
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
7.KAYNAKLAR.....	58

SİMGE VE KISALTMALAR

PPAR γ : Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gamma

PGC-1: PPAR γ koaktivator 1

Hsp60: Heat shock protein 60

Hsp70: Heat shock protein 70

MPP β , Pmpcb: Mitochondrial processing peptidase β subunit

Clpp: Clp-like proteaz

Endog: Endonükleaz G

CHOP: CCAAT enhancer-binding homologous protein”

PGC-1 α : PPAR γ koaktivator 1 alfa

mtKPY: mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı

ATP: Adenozin trifosfat

$\Delta\Psi$: zar potansiyeli

Mfn: Mitofüsin

TOM: Dış zar translokazı

TIM: İç zar translokazı

ETZ: Elektron Transport Zinciri

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid

FADH₂: Flavın adenin dinükleotid

TCA: Trikarboksilik asit döngüsü

ADP: Adenozin difosfat

UQ, koenzim Q: Ubikinon

F₀F₁ATPaz: ATP sentaz

ROS: Reaktif oksijen türleri

MTS: Mitokondriyal hedef sırası

mtHsp60: Mitokondriyal Hsp60

mtHsp70: Mitokondriyal Hsp70

PERK: double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase

ATF6: Activating transcription factor 6

IRE1: İnositol requiring enzyme 1

ATF4: Activating transcription factor 4

sXBP1: Spliced XBP1

ATFS-1: bZIP transcription factor associated with Stress-1

NLS: nükleer lokalizasyon sinyali

PINK1: Mitochondrial kinase PTEN- induced putative kinase 1

GLUT5: Glukoz transporter 5

GLUT2: Glukoz transporter 2,

CEBP α : CCAAT enhancer-binding protein alpha

CEBP β : CCAAT enhancer-binding protein beta

Endog: Endonükleaz G

Uqcc: Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1

FBS:Fetal dana serumu

TAE: Tris Asetikasit EDTA

cDNA: Komplementer DNA

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

ŞEKİL VE TABLOLAR

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Mitokondriyon yapısı

Şekil 2.2. Mitokondriyal dinamiklerin (fısyon ve füzyon) gösterilmesi

Şekil 2.3. Mitokondriyal ve nükleer genomda kodlanan proteinler

Şekil 2.4. Mitokondriyon metabolizması

Şekil 2.5. Mitokondriyal solunum zincir bileşenleri

Şekil 2.6. Mitokondriyon fonksiyonları

Şekil 2.7. *Caenorhabditis elegans*'da UPR_{mt} in ATFS-1 ile düzenlenmesi

Şekil 2.8. Mitokondriyal stres cevap yolları

Şekil 3.1. İş akış planı

Şekil 4.1. 3T3-L1 hücreleri. (A) 0. gün preadiposit (B) 8.gün adiposit oil red boyama (x20)

Şekil 4.2. Fruktozun adiposit farklılaşmasında lipid birikimine olan etkisinin oil red-O boyama bulguları (x40)

Şekil.4.3. RNA izolasyonu sonucu %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Şekil 4.4. Fare aktin β kontrol PZR

Şekil 4.5. PPAR α geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.6. PGC-1 α geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.7. CEBP α geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.8. CEBP β geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.9. Uqcc geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.10. Clpp geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.11. Endog geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.12. Pmpcb geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.13. Hsp60 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

Şekil 4.14. Hsp70 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

TABLÖLER

Tablo 3.1. Mitokondriyon biyogenezi ve mitokondriyon stresinin regülasyonu ile ilgili ifadenmeleri çalışılan genler

Tablo 3.2. Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

Tablo 3.3. Komplementer DNA (cDNA) karışımı

Tablo 3.4. Kontrol PZR protokol

Tablo 4.1. Örneklere ait RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları

Tablo 4.2: PPAR γ gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.3. PGC-1 α gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.4. CEBP α gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.5. CEBP β gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.6. Uqcrc gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.7. Clpp gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.8. Endog gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.9. Pmpcb gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.10. mtHsp60 gen ifadenme değişimleri

Tablo 4.11. mtHsp70 gen ifadenme değişimleri

1. GİRİŞ

Mitokondriyon hücrenin enerji santrali olarak bilinir ve hücrenin metabolik dengesinde önemli rol oynar. Mitokondriyal aktivite moleküler ve çevresel faktörler (besinler, hormonlar, ısı, egzersiz, hipoksi, yaşlanma gibi) ile değişebilir ve hücrenin büyüme, çoğalma, hayatta kalma gibi çeşitli fonksiyonlarını etkiler.

Obezite, vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması sonucunda, bu enerjinin yağ olarak depolanmasıdır. Obezite sıklığı belirgin şekilde artarken, artan yağ dokusunun gelişim basamaklarını, fonksiyonlarını anlamak giderek önem kazanmaktadır.

Yağ hücresinde mitokondriyon biyogenezi farklı düzeylerde kontrol edilir. Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gamma (PPAR γ), nükleusta kodlanan mitokondriyal genleri kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Mitokondriyon biyogenezi ve respiratuar fonksiyonlarının dinamik kontrolü de PPAR γ koaktivator 1 (PGC-1) ailesi tarafından yapılır. Obezitede, besinin fazla alımı sonucunda endoplazmik retikulumda katlanmamış proteinler birikir ve endoplazmik retikulum stresi oluşur. Böylece endoplazmik retikulumda şaperon aracılı protein katlanması, protein kalite kontrolü ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkılması başlar. Son yıllarda mitokondriyonda da benzer sistemler olduğu gösterilmiştir. Mitokondriyondaki kalite kontrolü esas olarak nükleusa doğru geri sinyalizasyon yollarının aktivasyonu ile uyarılan şaperon ve proteazlarla sağlanır. Isı şoku protein “heat shock protein” (Hsp)60 ve Hsp70 en önemli iki mitokondriyal matriks şaperonudur. Bununla birlikte mitokondriyal işlemci peptidaz β subünite “mitochondrial processing peptidase β subunit”, (MPP β), Clp-like proteaz (Clpp), endonükleaz G (Endog), sitokrom C redüktazın mitokondriyal strese rol aldığı gösterilmiştir.

CCAAT enhanser bağlayıcı homolog protein “CCAAT enhancer-binding homologous protein” (CHOP), bir transkripsiyon faktörüdür ve endoplazmik retikulum stresine bağlı gelişen apoptozda, mitokondriyal katlanmamış protein yanıtında (mtKPY) önemli rol oynar.

PGC-1 alfa (PGC-1 α), mitokondriyal biyogenezde asıl düzenleyicidir ve mtKPY'da önemli rol oynar.

Fruktoz hazır gıda sektöründe en yaygın kullanılan şekerdir. Fruktozun kullanımındaki artış ile obezitenin artışı arasında ilişki vardır. Diğer şekerlerin aksine hücre içinde enerji azalmasına, ürik asit üretimine neden olur. Özellikle mısır şurubundan elde edilen yüksek fruktoz içeren şekerler ucuz ve dayanıklıdır ve hazır gıda sektöründe (hazır meyve suları, gazlı içeceklerde) yaygın olarak kullanılır. Hücre düzeyinde zararlı etkiler de fruktozun fazla alımı sonucunda görülür. Günümüzde fazla fruktoz alımının farelerde metabolik sendromun tüm bulgularına (oksidatif stres, endotelial disfonksiyon, yağlı karaciğer, mikroalbuminüri gibi) neden olduğu gösterilmiştir. Lipotoksite ve glukotoksitede yağ hücresindeki mitokondriyal fonksiyonların bozulduğu bilinmekle birlikte fruktozun özellikle de işlenmiş mısır şurubundaki fruktozun bu sürece etkileri tam olarak bilinmemektedir.

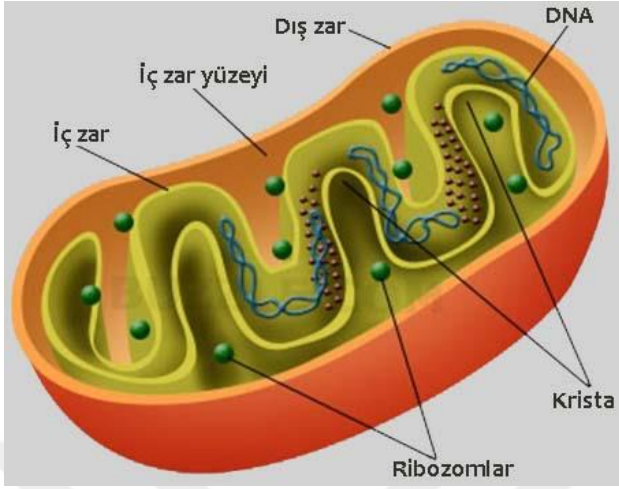
Bu çalışmada, 3T3L1 yağ hücre hattında yüksek doz fruktozun mitokondriyal biyogenezi üzerindeki etkilerini ve fruktotoksisiteye bağlı olarak gelişen mitokondriyal stresinin mekanizmalarını araştırmayı amaçladık.

Protokole uygun olarak 3T3-L1 preadiposit hücre hattından yağ hücresine dönüşüm sağlandı. Bu sırada 0. günden itibaren hücreler fruktoz uygulanan ve uygulanmayanlar olarak iki gruba ayrıldı. 0-2-4-6-8. günlerde oil red-O boyama ile mikroskopik olarak incelendi. Mitokondriyal stres ve mitokondriyal biyogenez ile ilgili genlerin ifadenmeleri çalışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

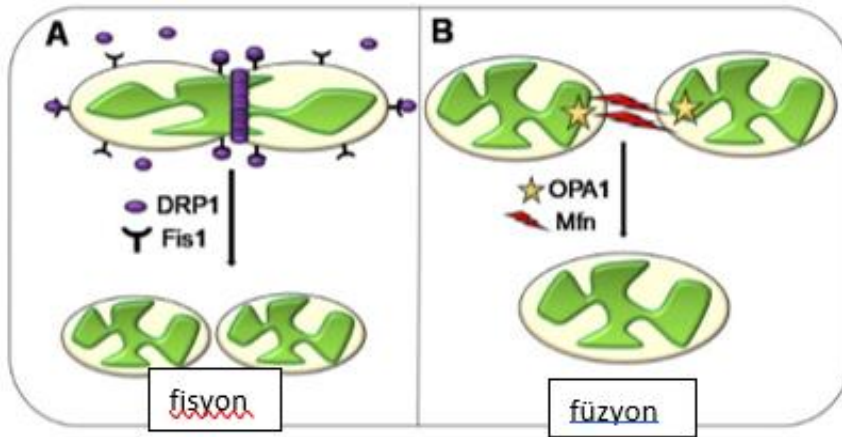
2.1. Mitokondriyon yapısı ve fonksiyonları

Mitokondriyon hücrenin enerji santrali olarak bilinir ve kırmızı kan hücreleri dışında tüm ökaryot hücrelerde bulunur. Besin maddeleri ve oksijenden enerji üreten organellerdir. İlk olarak 19. yüzyıl sonlarında hücre içinde granüllerden oluşmuş iplikcikler şeklinde yapılar olarak tanımlanmıştır. Hücre içindeki miktarları o hücrenin enerji ihtiyacı ile doğru orantılıdır. Bu organellerin büyüklüğü ve şekli de değişkenlik gösterir, birkaç yüz mikron çapında küresel yapılar olabilecekleri gibi, bir mikron çapında ipliksi görünümde de olabilirler (1). Mitokondriyon çift zardan oluşmuştur. İç mitokondriyal zar içeriye doğru kıvrılır ve krista olarak bilinen tübüler yapıyı oluşturur (2). Dış mitokondriyal zar mitokondriyon ile hücre sitozolu arasındadır ve voltaj-bağımlı anyon kanalları, translokazlar, pro ve antiapoptotik proteinleri içerir (3,4). Matriksde genetik sistem, yani mitokondriyal genom, ribozomlar bulunur. Mitokondriyal genomda kodlanan proteinler ko-translasyonel mekanizma ile ribozomların okunması ile iç zarda yerleşirler. Krista respiratuar kompleks I—IV ve F1F0-ATP (adenozin trifosfat) sentaz enziminden oluşan oksidatif fosforilasyon sistemini içerir. Zarlar arası boşluk (pH 7.2–7.4) ile matriks (pH 7.9–8) arasındaki proton gradienti ATP sentaz enzimi ile ATP sentezini sağlar. Mitokondriyal genom oksidatif fosforilasyon komplekslerinin iç kısmını oluşturan hidrofobik iç zar proteinlerini kodlar. Mitokondriyal proteinlerin %99'u nükleer genlerde kodlanır ve bu proteinler sitozolden mitokondriyal yüzey reseptörlerine ve mitokondri subkompartmanlarına yönlendiren spesifik hedef sinyalleri içerir (5,6).



Şekil 2.1. Mitokondriyon yapısı

Mitokondriyon şeklini değiştirebilir; küçük parçalara ayrılabilir (fasyon) ya da diğer mitokondrilerle birleşebilir (füzyon). Mitokondri füzyon ve fasyon yaparak sürekli yeniden modellenir. Füzyon ve fasyon işlemleri metabolik gereksinime göre değişir ve çok iyi düzenlenmiştir. Mitokondriler ve hücrenin enerji dinamikleri mitokondriyon zar potansiyeli ($\Delta\Psi$), oksidatif stres, solunum ve nükleozid trifosfat üretimi parametreleri ile düzenlenir (1,7).

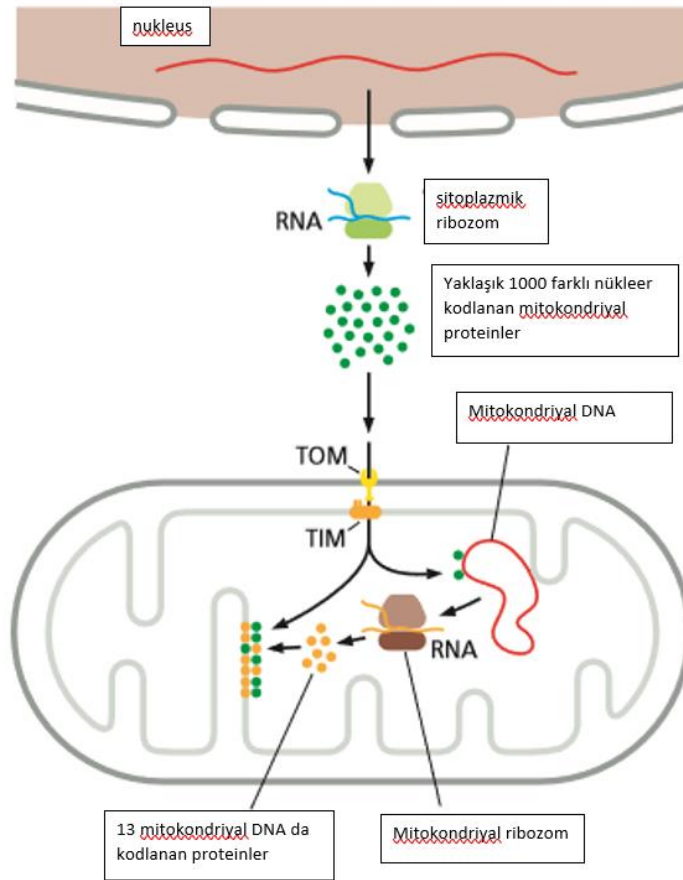


Şekil 2.2: Mitokondriyal dinamiklerin (fasyon ve füzyon) gösterilmesi (7).

A) Filyon mitokondriyal dış zar proteini olan Fis1 ve sitozolik protein olan Drp1 ile gerçekleşir. Filyon sırasında Drp1 Fis1 ile mitokondriyon zarında yüksek moleküler ağırlıklı oligomerler oluşturur ve filyon tamamlanır

B) Füzyonda mitokondriyal dış zar proteini olan Mfn (mitofüsin) ile zarlar arası protein olan Opa1 aracılığı ile iç ve dış zarlar birleşir (1).

Mitokondriyonun kendine ait küçük sirküler DNA'sı vardır. Mitokondriyal DNA, elektron taşıma zincirinde görevli 13 proteini, 22 transfer RNA ve 2 ribozomal RNA'yı kodlar, aynı zamanda ağır ve hafif zincirlerin promotörlerinin bulunduğu kodlamayan bölgeyi de içerir.

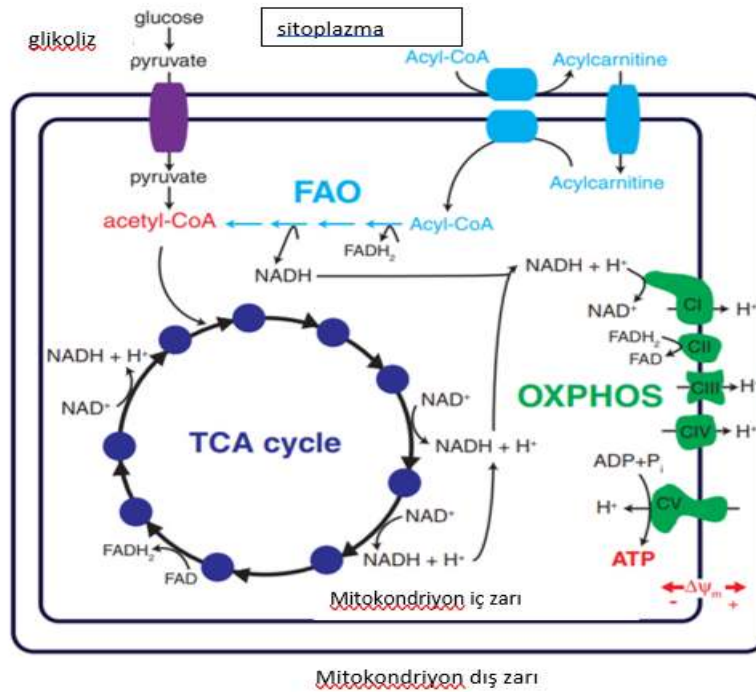


Şekil 2.3. Mitokondriyal ve nükleer genomda kodlanan proteinler (8).

TOM: Dış zar translokazı TIM:İç zar translokazı

2.2. Elektron Transport Zinciri (ETZ)

Organik maddelerin oksidoredüksiyon reaksiyonlarında, bir organik molekül hidrojen vericisi olarak rol alıp yükseltgenirken bir başka molekül ise hidrojen alıcısı olarak rol alıp indirgenmektedir. Oksidasyon (yükseltgenme) biyolojik sistemlerde çoğunlukla dehidrogenaz enzimleri ile gerçekleşir. Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ve diğer metabolik yollardan elde edilen enerjinin büyük kısmı indirgenmiş koenzimler olan nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FADH₂) halinde saklanır. Mitokondriyonda ETZ NADH ve FADH₂'ı okside eder ve elektronları oksijene aktararak suya indirger. Buradan gelen enerji adenosin difosfatın (ADP) ATP sentaz (F₀F₁ATPaz) tarafından ATP'ye çevrilmesinde kullanılır. Mitokondriyal solunum zincirinin protein komponentlerini oluşturan dört kompleks, kendilerine özel bileşime sahip multienzim kompleksleridirler(6–10).



Şekil 2.4. Mitokondriyon metabolizması (10)

Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi), iç mitokondriyal membrana gömülmüştür; NADH bağlayan yeri matriks tarafındadır ki burası, matrikste oluşan NADH ile

etkileşebilir. Kompleks I, elektronların NADH'den ubikinona (UQ, koenzim Q) transferini katalize eder. Ubikinonun tamamen indirgenmiş formu, membranda kompleks I'den kompleks III'e diffüze olur. Elektronların kompleks I yoluyla kompleks III'e akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa hareketiyle eşleşmiştir ki böylece bir proton gradienti oluşur; bu proton gradienti de mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir.

Kompleks II (süksinat dehidrogenaz kompleksi), sitrik asit döngüsünde membrana bağlı enzimdir; FADH_2 yapısındaki elektronlar, kompleks II tarafından koenzim Q'ya aktarılır. Koenzim Q, elektronları kompleks III'e taşır; hareketli elektron taşıyıcılarından birisidir.

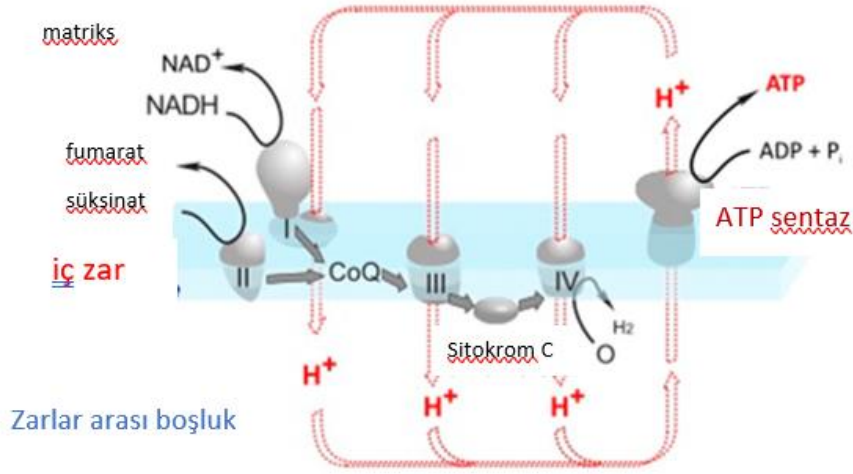
Kompleks III (sitokrom bc_1 kompleksi, ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz), bir proton pompası olarak fonksiyon görür, elektronları ubikinondan sitokrom C'ye transfer eder, böylece bir proton gradienti oluşur ki bu proton gradienti, mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir. Sitokrom C, enzim komplekslerinden birinin bir parçası değildir; kompleks III ve kompleks IV arasında hareketli bir proteindir.

Kompleks IV (sitokrom oksidaz), elektronların sitokrom C'den oksijene transferini ve böylece suya indirgenmesini katalize eder, matriksten membranlar arası boşluğa net proton hareketine neden olarak bir proton pompası olarak fonksiyon görür. Kompleks I, III ve IV içinden elektron akışı, matriksten membranlar arası boşluğa proton akışıyla eşleşmiştir.

ATP sentaz ($\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPaz}$), iç mitokondriyal membranın ATP sentezleyen enzim kompleksidir; elektron transportu ile ATP oluşumunu eşleyen kompleks V olarak da bilinir. ATP sentaz, F_0 (integral protein) ve F_1 (periferal protein) olmak üzere başlıca iki komponente sahiptir. Sonuç olarak, bir NADH molekülü 3 ATP oluşumunu sağlar; bir FADH_2 molekülü ise 2 ATP oluşumunu sağlar (9–11).

Solunum zincirinde elektronların kompleks I, III ve IV üzerinden aktarılması sırasında protonların matriksten membranlar arası boşluğa pompalanması sonucunda iç membranda bir proton gradienti oluşur. Membranlar arası boşlukta hem pH hem de voltaj gradiyenti

oluşur (elektrokimyasal gradiyent). Bu gradiyent ATP sentezinin dışında moleküllerin transferi için de kullanılır.



Şekil 2.5. Mitokondriyal solunum zincir bileşenleri (9).

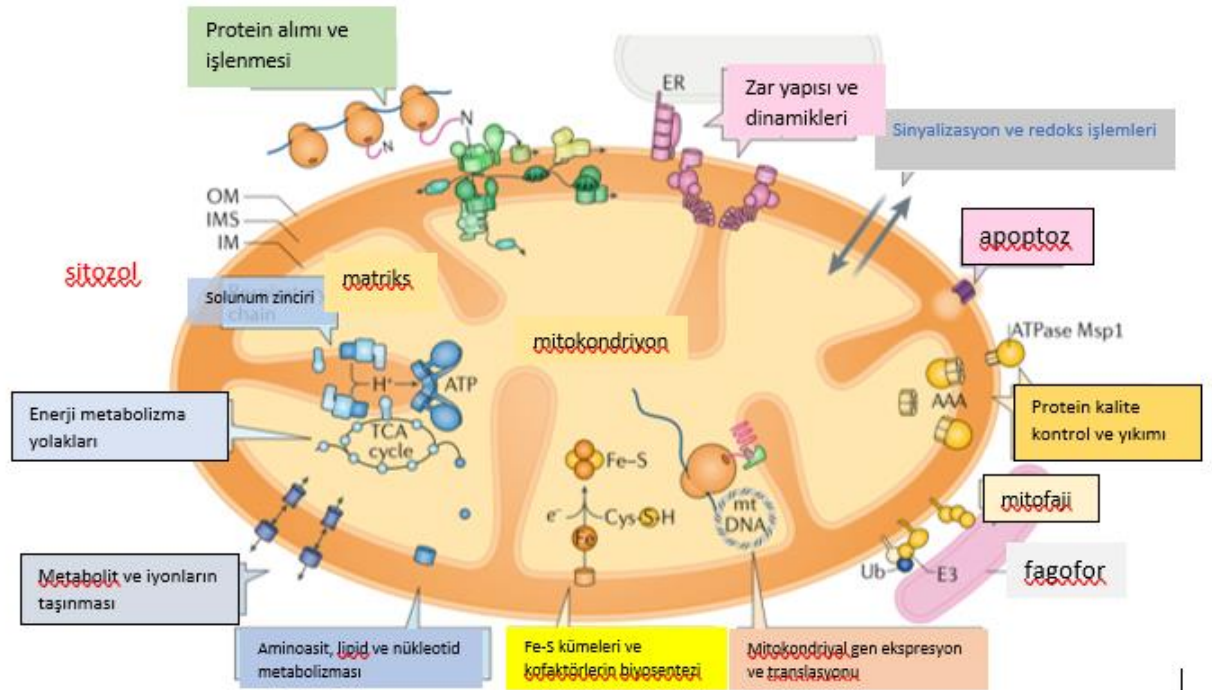
Kahverengi yağ doku mitokondrilerinin iç membranında yer alan bir integral membran proteini olan termogenin doğal bir ayırıcıdır. Termogenin, protonların membranlar arası boşluktan matrikse ATP sentaz kompleksinden geçmeden dönmesi için bir yol sağlar. Protonların bu kısa turunun sonucu olarak oksidasyon enerjisi ATP oluşması suretiyle tutulmaz; ısı olarak dağılır ve bu ısı da vücut sıcaklığını sürdürür. Eşlenmenin bozulduğu fizyolojik durumlar, kış uykusundan uyanan hayvanlar, soğuk havaya uyum sağlamış memeliler ve kahverengi yağ dokusunun mitokondrilerinde görülür.

2.3.Mitokondriyal Biyogenez, Protein Alımı ve Proteastaz

Son 15-20 yıldır çalışmalar, mitokondriyonun enerji üretimi yanında bilinenden daha kompleks ve çok yönlü fonksiyonlarının olduğunu, hücre döngüsü ve büyüme, hücrenin hayatta kalması, oksidatif stresin düzenlenmesi, protein biyosentezi, metabolik yollar,

sinyalizasyon, stres cevapları ve apoptoz ile ilişkisini göstermiştir. Mitokondriyon endosimbiyotik orijinli çift zarlı bir organeldir (12–16).

Mitokondriyonda krista düzenleyici sistemler ve başka protein kompleksleri dış ve iç zardaki temas bölgelerini oluşturur. Bu bölgeler protein, lipid ve metabolitlerin taşınmasını kolaylaştırır. Sitozolik sinyal yolları fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda mitokondriyon ile ilişkilidir. Mitokondriyal stres cevapları, hasarlı organelin otofaji ile seçici yıkımı (mitofaji) ve programlanmış hücre ölümü (otofaji) tanımlanmıştır. Mitokondriyon proteinlerin döngülerini ve kalite kontrollerini sağlayan proteazlar içermektedir. Ek olarak mitokondriyon redoks yolları içerir ve asıl reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağıdır (5).



Şekil 2.6. Mitokondriyon fonksiyonları (5)

Mitokondriyon 1000'den fazla protein içerir ve sadece 13 protein kendi genomunda kodlanır ki bunlar solunum zinciri komponentleri veya ATP sentaz'dır. Diğer proteinler nükleer genomda kodlanır, sitozolik ribozomlarda sentezlenir ve mitokondriyona geçer. Mitokondriyon proteostazında ROS artışı veya mitokondriyal DNA mutasyonlarına bağlı olarak bozulma olması hücrede yaşlanma ve bununla ilişkili hastalıklara yol açar. Bu nedenle mitokondriyon proteostazının anlaşılması hastalıkların nedeninin anlaşılması ve tedavi geliştirilmesinde önemlidir (17–19).

Mitokondriyal biyogenez; zar sentezi, mitokondriyal DNA replikasyonu ve sitozolde sentezlenen proteinlerin mitokondriyal dış zar, iç zar, zarlar arası boşluk ve matrikse taşınmasıdır. Taşınacak protein zinciri amino ucunda pozitif yüklü mitokondriyal hedef sırası taşıyıcı (MTS). Mitokondriyal hedef sırası önce dış zarda bulunan translokaz (TOM) ile etkileşir, TOM dan geçen katlanmamış öncü protein TIM23 kompleksine gelir. Bunun için iç zarın potansiyeli ETZ ile uygun hale gelir. Matrikse gelen preproteinler mitokondriyal MtHsp70 (mtHSP70) adlı şaperonla etkileşir. Bu şaperon TIM 23 kompleksi ile etkileşerek proteinlerin aktif olarak matrikse geçmesini kolaylaştırır bir yandan da pasif olarak tutulan preproteinlerin retrograd difüzyon ile matriksden çıkmasını önler (20–23).

Matriksde MTS, MPP kesilir. Böylece mtMtHsp70 hem proteinin importunda hem de doğru katlanmasında görev yapar. İmport kompleksinde mtMtHsp70 Tim 44 ile birleşir, matriksde ise Mdj1, the DnaJ homolog ile etkileşir. İmporttan sonra matrikste şaperon yardımcı protein katlanması proteostazda çok önemlidir. Mitokondriyal Hsp60 (mtHsp60) şaperonu da protein katlanmasında rol oynar. Hsp10 ile mtHsp60 ATP'ye bağımlı konformasyonel değişikliğe uğrar ve proteinin düzgün katlanmasını sağlar ayrıca diğer proteinlerle temas edip bozulmasını da önler. Mitokondriyondaki kalite kontrolü yapan proteazlar hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri yıkar. AAproteaz LON ve Clpp matriksden hatalı proteinlerin uzaklaştırılmasından sorumludur. Paraplegin ve YMEL1 de solunum zincir kompleks proteinlerinin iç zarda yanlış katlanmasını önler. Oksidatif fosforilasyon aktivitesi, mitokondriyal proteostaza ek olarak hücrenin birçok bölümü de mitokondriyal protein importunun düzenlenmesi ve etkinliğinde önemlidir. Örneğin

MTS'nin sitoplazmada fosforlanması transportunu zorlaştırır veya hem grubu bağlanması veya öncül proteinin önceden katlanması TOM kanalından geçişini güçleştirir (23).

Mitokondriyon fonksiyon ve proteostazı protein importu ile yakından ilişkilidir. Oksidatif fosforilasyon defektlerine bağlı iç zar potansiyeli değişirse protein geçişi baskılanır. Protein geçişinde ağır yetmezlik varsa otofaji (mitofaji), daha hafif yetmezlikte ise düzelmeyi sağlamak için katlanmamış protein yanıtı olur (22–24).

Solunum kompleksi, biyogenez ve kalite kontrol mekanizmaları arasında karşılıklı etkileşim ağı vardır. Mitokondriyal solunum zinciri ROS üretimi için asıl kaynaktır, ROS sinyalizasyonda görevli iken fazlası hücreye zararlı olabilir. ROS ile sitozolik translasyon mekanizması etkilenip azalmış protein sentezine neden olabilir (5).

Mitokondriyon dış zarındaki translokazlar, katlama mekanizmaları, iç zardaki mitokondriyal kontakt bölgeleri ve krista düzenleyici sistem mitokondriyon-endoplazmik retikulum ilişkisinde önemli kısmı oluşturur.

İç veya dış etkenlerle hücrede stres geliştiğinde, çok iyi düzenlenmiş işlemler sonucunda hücre dengesini korur veya ölüme gider. Katlanmamış protein yanıtı, otofaji, hipoksi ve mitokondriyal fonksiyonlar bu süreçte önemli rol oynarlar. Endoplazmik retikulum protein katlanması, kalsiyum depolanması, lipid ve karbohidrat metabolizmasında görev yapan bir organeldir. Katlanmamış protein yanıtı endoplazmik retikulum zarında yerleşmiş olan üç sensör ile düzenlenir. Bunlar; double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6), ve inositol requiring enzyme 1 (IRE1) dir. Bunlar özel transkripsiyonel programları etkileyen maddeleri aktive ederler; sırasıyla activating transcription factor 4 (ATF4), “cleaved” ATF6 ve “spliced” XBP1 (sXBP1). Bu faktörler şaperon transkripsiyonu, redoks dengesi, protein sekresyonu, lipid biyosentezi veya hücre ölüm programlarını aktive ederler. Endoplazmik retikulum ve mitokondriyon arasında temas bölgeleri vardır. Bu bölgeler lipid biyosentezi, endoplazmik retikulum-mitokondria lipid ve kalsiyum transferi, mitokondriyal dinamikler, apoptoz ve otofaji ile ilgili proteinlerden zengindir.

Endoplazmik retikulum-mitokondria tutunması mitokondriyal füzyon, fisyon, önemli bölgelerdir (25).

2.4. mtKPY'nın Düzenlenmesi

mtKPY ilk olarak memeli hücre kültürlerinde mitokondriyal DNA deplesyonu veya mitokondriona gidecek proteinlerde katlanma hatası olduğunda mitokondriyal şaperonların ve proteazların transkripsiyonunda artışın saptanması ile gösterildi (26,27). Daha sonra hücrenin mitokondrideki sorunu nasıl saptadığı ve nükleusun transkripsiyon üzerindeki cevabı ve adaptif mitokondriyal cevapı daha iyi anlaşıldı (27,28).

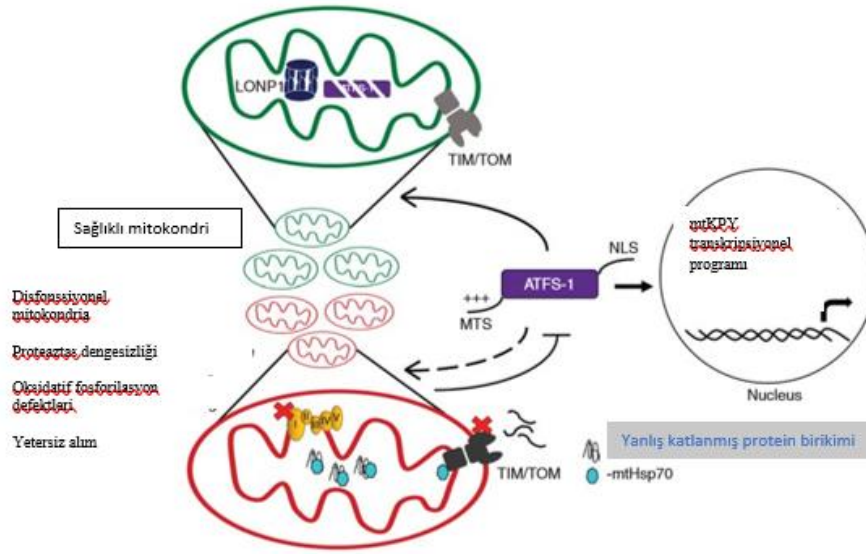
Mitokondriyal şaperonlar ve proteazların dengesinin bozulması en önemli stres faktörüdür. Yanlış katlanmış protein birikimi kapasiteyi geçerse önce mitokondriyal protein girişi azaltılır. Proteazın bozulması yanında mitokondriyal DNA deplesyonu, oksidatif fosforilasyon inhibisyonu da mtKPY'ni aktive eder. Önemli şaperonlardan mtHsp60 ve mtHsp70 sentezi artırılarak agregat oluşumu önlenmeye çalışılır (29). ATP bağımlı m-AAA ve i-AAA proteazlar (paraplegin ve YME1L1) yanlış katlanmış protein birikimini önlemek için artar. ROS birikimini önlemek için de süperoksit dismutaz indüklenir. Ayrıca mitokondriyal biyogenez ve fonksiyonu da aktive etmek için transkripsiyonel cevap olur, demir-sülfür kümeleri, ubiquinon sentezi artar. Mitokondriyal biyogenez ve hatalı mitokondriyal temizlenmesi için fisyon ile ilgili genler uyarılır. Streste mtKPY olduğunda oksidatif fosforilasyon komponentlerinin transkripsiyonu azalır ve glikoliz genleri artar.

Epigenetik düzenleme ile kromatin yeniden modellenme mitokondriyal disfonksiyonlarındaki mtKPY aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Mitokondriyal streste histon demetilazlar veya metil transferaz aktiviteleri değişir (30,31).

2.4.1. Mitokondriyal-Nükleer İletişim

Caenorhabditis elegans'larda yapılan çalışmalar mtKPY aktivasyonu için bZIP transcription factor associated with stress-1 (ATFS-1) adlı faktörün gerektiğini

göstermiştir. ATFS-1 DNA-binding domain dışında MTS ve nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) taşır (31). Mitokondriyon sağlıklı ise ATFS-1 TIM/TOM ile alınır ve matriksde bulunan translokaz LONP1 ile yıkılır. Öncül proteinlerin mitokondriyona geçişi ve etkin katlanması mtMtHsp70 ile olur. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda ATFS-1 nukleusa geçer ve mitokondriyal fonksiyonları düzeltmek için gerekli transkripsiyon programını başlatır (32–36).

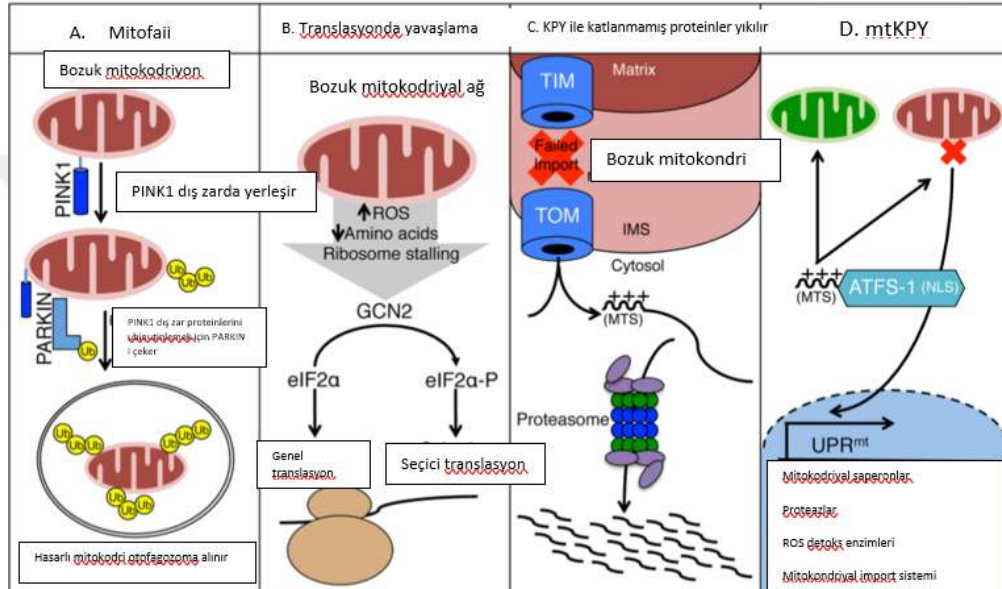


Şekil 2.7. Caenorhabditis elegans’da UPRmt in ATFS-1 ile düzenlenmesi (23)

Memelilerdeki mtKPY transkripsiyonel düzenlenmesi Caenorhabditis elegans ile çok benzerdir ve birçok bZIP transcription faktörü ile olur (36). Memeli hücrelerde mtKPY aktivasyonu için diğer bZIP proteini olan ATF4 ve CHOP da gereklidir. ATF4, ATF5 ve CHOP stres cevabıyla çok ilişkilidir ve kinazlar bu sistemi aktive eder (28).

MtKPY, şiddetine ve süresine bağlı olarak hücreye faydalı veya zararlı olabilir. Faydalı etkileri, yaşam süresini uzatır, enfeksiyona direnci artırır, mitokondriyal iletişimi düzenler, glikolizi indükleyerek metabolik adaptasyon sağlar. Ancak mtKPY uzun sürerse, mitokondriyal DNA hasarlanır. “Mitochondrial kinase PTEN- induced putative kinase 1” (PINK1) sağlıklı mitokondriyona alınır işlenir. Ancak bu yolda sorun olursa PINK1 dış zarda TOM kompleksinde birikir. Burada ubiquitini fosforlar ve hasarlı

mitokondriyon mitofaji ile uzaklaştırılır. Mitokondriyon sitozolde biriken proteinlerin bazılarını alarak yıkar ve koruyucu görevi görür (23,37).



Şekil 2.8. Mitokondriyal stres cevap yolları (37)

A: Hasarlı mitokondrilerin saptanması ve mitofaji ile seçici yıkıma gitmeleri. PINK1 hasarlı mitokondriyonun dış zarında stabilize olur ve ubiquitin ligaz Parkini bağlar. Ubiquitinlenmiş mitokondriler otofagozom ile lizozoma gider ve yıkılırlar.

B: Kinaz aktivitesi olan GCN2, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda aktive olur eIF2α' yı fosforilleyerek proteinlerin mitokondriyona geçişini azaltır.

C: Sitolde biriken hatalı proteinler proteozom aktivitesini uyarır.

D: UPR^{mt} ATFS-1 in mitokondriyona geçmesi ile düzenlenir. ATFS-1 mitokondriyona geçerse yıkılır ancak mitokondriyal fonksiyon bozukluğu nedeniyle nukleusa giderse mitokondriyal stresi ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eder.

2.5.Yağ Dokusu-Obezite-Mitokondriyal Disfonksiyon

Adipositin yani yağ hücresinin esas olarak 3 fonksiyonu vardır. Bunlar:

1. Serbest yağ asitlerini alıp trigliseride çevirmek
2. Enerji ihtiyacı olduğunda trigliseridleri yağ asitleri ve gliserole yıkmak (lipoliz)
3. Leptin, adiponektin, resistin gibi maddeleri salgılayarak endokrin bir organ gibi davranmak.

Adipositler anjiogenez, steroid metabolizması, immün cevap ve homeostasis gibi metabolik işlemlerde de aktif rol oynamaktadır (38,39).

Memelilerde iki tip yağ dokusu vardır:

- I. **Beyaz yağ dokusu:** Enerji fazlasını trigliserid şeklinde depolar aynı zamanda enerji dengesini düzenleyen hormonlar salgılar. Yani metabolik olarak aktif lipid depolama dokusudur. Beyaz yağ dokusu fizyolojisinde mitokondriyal aktivite önemli rol oynamaktadır. Yağ dokusu artarken mitokondriyal biyogenez de artmaktadır. Beyaz yağ dokusunda adipositlerde büyük yağ damlaları vardır ve mitokondriler daha az sayıda ve küçüktür.
- II. **Kahverengi yağ dokusu:** Enerji depolanması ve harcanması arasındaki dengeyi sağlamada önemlidir ve termojenik hücrelerden oluşur. Adipositlerde çok sayıda küçük yağ damlaları vardır. Mitokondriondan zengindir ve özellikle ısı açığa çıkarırlar.

Kahverengi yağ dokusunun yenidoğan döneminde bulunduğu ve zamanla yok olduğu sanılırken, aslında erişkin dönemde de üst boyun ve skapulalar arası bölgede bulunduğu, özellikle soğuk ile arttığı gösterilmiştir. Yaşlanma ve yağlanma kahverengi yağ dokusunu azaltan nedenlerdir. Beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusuna dönüşebildiği de gösterildikten sonra obezitenin önlenmesi, komplikasyonlarının tedavisinde mitokondriyal disfonksiyonlarının tanımlanması ve düzeltilmesinin yollarının araştırılması önem kazanmıştır (38–42).

2.5.1.Adipogenezis

In vitro ve *in vivo* olarak adipogenezis sırasında mitokondriyal sayı ve morfolojisinin değişimi elektron mikroskopisi ile gösterilmiştir (43).

Wilson-Fritch ve ark. (44) 3T3-L1 preadiposit hücre hattında yağ hücresine dönüşüm sırasında mitokondriyal protein konsantrasyonunun 20-30 kat arttığını göstermiştir. Adipogenez sırasındaki mitokondriyal biyogeneze PPAR γ ve koaktivatörü olan PGC-1 α adlı transkripsiyon faktörleri önemli rol oynar (43,44). Adipogenezde mitokondri sayısı ve morfolojisi değişirken oksidatif kapasitesi ve ROS üretimi de artmaktadır (45).

2.5.2.Adiposit dönüşümünde mitokondriyon

Adipogenez ve mitokondriyon biyogenezi birbiriyle yakın ilişkisi olan süreçlerdir. Mitokondriyon bu dönüşümde gereken enerjiyi (ATP) ve lipid yapımı için gereken hammaddeyi (yağ asiti—asetil CoA---trigliserid sentezi) sağlar. Adipogenez sırasında mitokondri sayı ve morfolojisi hızla değişir. Adipogenezis birçok transkripsiyonel faktörünün rol oynadığı olaylar zinciri ile gerçekleşir (41,46,47).

Obezite vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması sonucu artan enerjinin yağ dokusu olarak depolanması sonucu gelişir. Artan yağ dokusu zararlı bir organ gibi davranıp insülin direnci, diyabet, kardiyovasküler hastalık, kanser gibi birçok önemli kronik hastalığa neden olmaktadır. Yağ dokusu arttıkça mitokondriyon fonksiyon bozukluğu olduğu bilinmektedir (48,49). Beyaz yağ dokusu enerji durumuna göre lipid depolanması veya salınmasını sağlayan en değişken organdır. Farelerden elde edilen örneklerde lipid damlalarının etrafındaki makrofajlarda, sitoplazmadakine göre piruvate oksidasyonu, ETZ aktivitesi ve ATP sentez kapasitesi daha fazla bulunmuştur. Ancak beta oksidasyon kapasiteleri düşük ve füzyon-fisyon dinamikleri azalmıştır. Bu durum kas ve karaciğeri lipotoksiteden korumaya çalışan adaptif bir yanıt olabilir yani neden değil sonuçtur (50,51).

2.6.Fruktoz Metabolizması

Fruktoz bir monosakkarittir, meyve ve bal gibi doğal besinlerde bulunur. Fruktozun ana kaynağı sükrozdur (sofra şekeri) ve sükroz %50 glukoz + %50 fruktoz içerir. Doğal meyve kaynaklı fruktoz potasyum, C vitamini, antioksidanlar (resveratrol, quersetin, flavonoller gibi) içerdiği için zararlı etkileri sınırlıdır. Fruktozun diğer önemli kaynağı da yüksek- fruktozlu mısır şurubudur ve %55 fruktoz + %45 glukoz içerir. Fruktoz hazır gıda sektöründe en yaygın kullanılan şekerdir. Özellikle mısır şurubundan elde edilen yüksek fruktoz içeren şekerler ucuz ve dayanıklıdır ve hazır gıda sektöründe (hazır meyve suları, gazlı içeceklerde) yaygın olarak kullanılır. Hücre düzeyinde zararlı etkiler de bu fruktozun fazla alımı sonucunda görülür, diğer şekerlerin aksine hücre içinde ATP azalmasına ve ürik asit üretimine neden olur. İşlenmiş fruktoz tüketimi kilo alımının yanında organ düzeyinde yağlanmayı ve kanda trigliserid düzeyini artırarak, hipertansiyon, koroner arter hastalığı riskini artırarak metabolik dengeyi bozmaktadır (52–57). Fruktolizis sonucu karaciğerden üretilen metabolitleri olan serbest yağ asitleri, ürik asit ve laktat doku ve organ fonksiyonlarını etkiler. İnsülin direnci, ROS artışı, adiponektin, leptin ve endotoksin gibi inflamatuvar sitokin salınımı ile lipid birikimi, endotelial disfonksiyon gerçekleşir (58). Fruktoz direk insülin salınımını uyarmaz ancak fruktozdan zengin beslenme karaciğer, kas ve yağ dokusunda hiperinsülinemi yapar. Fruktozun lezzeti beslenme davranışını etkiler ve iştahı uyarır (58,59).

Hayvan ve insan çalışmaları fruktoz ile kısa süreli beslenmenin bile *de novo* lipogenezi artırdığı, dislipidemi, hepatosteatoz ve insülin direncini kolaylaştırdığını desteklemektedir. Son yıllarda fruktoz ile tetiklenen ürik asit artışının mitokondriyal oksidatif strese yol açarak artmış kalori alımından bağımsız olarak yağ birikimini uyardığı gösterilmiştir (60).

Fruktoz bağırsaktan emilir ve çoğu karaciğerde metabolize edilir. Metabolizmasının başlangıç basamakları insülinin bağımsızdır. Fruktoz direk enterositlerde metabolize edilir ve burada laktat ve glukozla çevrilir. Alınan fruktoz saf veya sukroz formunda olabilir, hızla triozfosfata dönüşerek karaciğerde oksidize edilebilir, glukoz ve laktata

dönüşebilir veya glikojene dönüşebilir. Bazıları da karaciğerde trigliseride dönüşebilir ki, bu dönüşüm fruktozun metabolik yan etkilerinde önemlidir (57).

Alınan fruktoz öncelikle intestinal lümeninden afinitesi fazla olan ($K_m = 6 \text{ mM}$) glukoz transporter 5 (GLUT5) adlı heksoz transporter ile pasif olarak emilir. GLUT5 enterositlerin luminal membranında ve bazolateralde eksprese edilir. Emilemeyen fruktoz distal intestine ve kolondan ozmotik yük oluşturarak atılır. Ayrıca fruktoz bakteriyel fermentasyon için substrat olabilir ve intestinal motiliteyi etkileyip karın ağrısı ve şişkinlik yapabilir. Glukoz transporter 2'nin (GLUT2) fruktoza GLUT5 den daha düşük afinitesi vardır ($K_m = 11 \text{ mM}$). İntestinal fruktoz emilimine katkısı azdır ancak hepatik fruktoz alımında çok etkindir. Fruktoz ketoheksokinaz diğer adıyla fruktokinaz enzimi ile hızla fosforile ederek fruktoz 1-fosfat'a dönüştürür, ve glikolitik/glukoneogenik metabolit havuzlarına girer (61).

Fruktozun hücre içi metabolizması farklı taşıyıcı sistem ve enzimatik basamaklarla olur. Fruktokinaz, fruktozu metabolize eden asıl enzimdir ve ATP kullanır. Fazla fruktoz alındığında hücrede ATP azalır ve AMP deaminaz aktive olur ürik asit artar. Yağ hücresinde fruktokinaz yoktur ve fruktoz heksokinaz ile fruktoz 6- fosfata metabolize olur ve bu da glukoz 6- fosfata çevrilir. Böylece 11β -HSD1 aktivitesi artarak glukokortikoid üretimi artar (59). Glukokortikoid adiposit farklılaşması ve hücrel metabolizmada önemli rol oynar. Legeza ve ark (59), yağ hücre hattında fruktozun glukozu göre adipogenezi artırdığını, 11β -HSD1 aktivitesini artırdığını göstermişlerdir.

Fruktozdan oluşan metabolitler trioz fosfat havuzuna fosfofruktokinazdan sonra girer ve bu enzimin sınırlayıcı etkisinde kaçır. Fruktoz yükü de heksoz ve triozfosfat havuzlarını genişletir ve bütün santral karbon metalik yollar, glikoliz-glikogenez, glikoneogenez, lipogenez ve oksidatif fosforilasyon için subsrat sağlar. Fruktozdan gelen karbonun metabolik yollara gidişi beslenme ve endokrin duruma bağlıdır. Alınan fruktozun kaderinde beraberinde alınan besinlerin de rolü vardır. Fruktoz yalnız alındığında hepatik glikojen birikimini etkilemeden serum glukoz ve laktat düzeyini artırır. Glukoz ile alındığında insülin salınımını uyarak glikojeni artırır. Kronik fruktoz alımı metabolik gen ekspresyon programlarını etkileyerek fruktozun metabolizmasını etkiler.

Akut fruktoz alımı direk insülin salınımını etkilemese de kronik fruktoz alımı hiperinsülinemiye neden olur, endoplazmik retikulum stresini de tetikler ve bu da lipogenezi artırabilir (60). Kronik fruktoz alımı ile lipid metabolizması artar ve endoplazmik retikulum zar proteinleri fruktozillenir, lipidler burada birikebilir (61).

Lipotoksite ve glukotoksitede yağ hücresindeki mitokondrial fonksiyonların bozulduğu bilinmekle birlikte fruktozun özellikle de işlenmiş mısır şurubundaki fruktozun etkileri tam olarak bilinmemektedir (62). Cioffi ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada, fruktoz ile beslenen grupta karaciğerde inflamasyon, mitokondriyal DNA'da oksidatif hasarın arttığını, kopya sayısının azaldığını ve DNA tamir ve replikasyondan sorumlu polimeraz G mRNA ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Mitokondriyal biyogeneze önemli olan PGC-1 α , NRF1, TFAM ifadenmelerinin azaldığı saptanmıştır (63).

2.7.Mitokondriyon ve Adiposit

2.7.1.Mitokondriyon ve adiposit biyogenezinde rol alan genler

PPAR γ : Nükleusta kodlanan mitokondriyal genleri kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Adiposit gelişiminde de rol oynar.

PGC-1 α : PPAR γ 'nın koaktivatörüdür, birçok nükleer ve nükleer olmayan reseptörlere bağlanarak hücre metabolizması ile ilgili özel genlerin (mitokondriyal DNA replikasyonu ve hücresel oksidatif metabolizmayı kontrol eden mitokondriyal genler) ekspresyonlarını etkiler. Yağ hücresinde mitokondrion biyogenezi farklı düzeylerde kontrol edilir. Adipogeneze mitokondri sayı ve morfolojisi hızla değişir ve erken dönemde oksijen tüketimi ve ATP sentezi fazla iken, yağ dokusu matürleştikçe azalır. Adipogenez sırasında lipid birikimi olur ve bu durum PPAR γ nin aktivasyonuna bağlıdır. Yağ hücresine olan farklılaşmada mitokondriyal proteinler artar, mitokondriyon sayısı ve biyokimyasal yapısı değişir. 3T3L1 hücre hattı fibroblastları adipogenik farklılaşmada model olarak yaygın kullanılır (43).

PGC-1 ailesinin ilk bulunan üyesi fare çalışmalarında kahverengi yağ dokusunda tanımlanan 91 kDA ağırlığındaki bir nükleer protein olan PGC-1 α dır. PGC-1 α , TCA döngüsü ve mitokondriyal yağ asidi oksidasyon yolağındaki bazı gen ekspresyonlarını

etkiler. Ayrıca PGC-1 α mitokondriyal DNA replikasyonu ve hücresel oksidatif metabolizmayı kontrol eden mitokondriyal genlerin ifadenmesini düzenler (64).

PPAR γ ve PGC-1 α mitokondriyal biyogeneizde önemli genlerin ifadenmesini etkileyerek, yağ dokusu, iskelet kası, kalp, karaciğer ve böbrek gibi hayati organlarda metabolik düzenlemede önemli rol oynar. PGC-1 α mitokondriyal biyogeneizde asıl düzenleyicidir, ATF6 ile yakın ilişki halindedir ve mtKPY'da da önemli rol oynar.

CEBP α : *CEBPA* geni "CCAAT enhancer-binding protein alpha" adlı proteinin sentezinden,

CEBP β : *CEBPB* geni "CCAAT enhancer-binding protein beta" adlı proteinin sentezinden sorumludur. Bu proteinler yağ hücre farklılaşması ve olgunlaşması ile ilgili gen ekspresyonlarını kontrol eden transkripsiyon faktörleridir.

CEBP β , adiposit farklılaşmasında erken dönemde aktive olur ve son evre farklılaşmada önemli olan iki transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu uyarır. Bu iki faktör C/EBP α ve PPAR γ 'dır (65).

Yağ hücresinin farklılaşmasında 3T3-L1 hücre hattı en iyi çalışılan modeldir. Farklılaşmayı uyarmak için 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone, and insülin kullanılır. Büyümesi durmuş olan 3T3-L1 preadipositleri tekrar hücre siklusuna girer ve bu döneme mitotik klonal genişleme denir, adipositlerin hiperplazisi gerçekleşir. Adipogenezis birçok transkripsiyonel faktörünün rol oynadığı olaylar zinciri ile gerçekleşir. CEBP β burada en önemlilerinden biridir ve adiposit farklılaşmasında erken dönemde aktive olur. 3T3-L1 preadipositlerde CEBP β geni "knockdown" olursa adipogenezis durur, aksine overeksprese olursa da normalde gerekli olan başka hormonal uyarılar olmaksızın da adiposit dönüşümü tamamlanır.

2.7.2.Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı ile ilgili genler

Mitokondriyon lümenindeki proteinlerdeki katlanma değişiklikleri nükleusta kodlanan mitokondriyal şaperon ve proteazların gen ekspresyonlarını seçici olarak artırır. Bu duruma mitokondriyal geri sinyalizasyon denir. Obezitede mitokondriyal stres gelişince mtKPY ortaya çıkar ve geriye doğru stres sinyal yolağı uyarılır. Bunlarda defekt olduğunda mitokondriyonun denge ve bütünlüğü bozulur. Bu noktada stresi azaltmak için mitokondriyon kapasitesini artırmak obezite ile ilişkili bozukluklar örneğin insülin direnci ve tip 2 diyabeti önlemede etkili olabilir (25,29,66,67).

Ökaryotik mitokondrion 1000'den fazla protein içerir ve bunların %98 i nükleer genler tarafından kodlanır, sitoplazmadan mitokondriyal matrikse translokazlar ile ATP ve membran potansiyeli enerji kaynağı olarak kullanılarak taşınır. Mitokondriyal matrikste şaperonlar ve yardımcı faktörler ile katlanma gerçekleşir. Hücresel stres durumlarında katlanmamış veya yanlış katlanmış protein varlığında şaperonların gen ekspresyonları artar. Mitokondriyal proteomun sağlanması için şaperonların, proteazların düzgün ve birbirleri ile sıkı iletişimde çalışmaları önemlidir. Mitokondriyal proteastazda dengesizlik hatalı polipeptidlerin birikmesine neden olur. Mitokondriyona taşınan proteinler katlanmamış öncül şeklindedir ve dış zardaki TOM kompleksinden geçer. İç zardaki TIM23 kompleksi bu proteini Tim50 subuniti ile tanır, zar kanalına yönlendirir. İç zarın matriks tarafında bulunan mtHsp70 adlı şaperon, öncül proteini matrikse çeker. Bu protein zincirinin matriksde katlanması önemli diğer şaperon proteinleri olan mtHsp60/10 ile sağlanır (5–7,20–23,29).

mtHsp70: 70 kDa ağırlığında, N-terminal ATPaz domaini ve C-terminal substrat bağlayıcı bölüm içerir. Polipeptid olarak yeni taşınmış proteinin başlangıç katlanmasına yardım eder. Protein sentezi, katlanması ve yanlış katlanmış proteinlerin matriksteki proteolitik enzimlere gönderilmesinden sorumludur.

mtHsp60: 60 kDa ağırlığında, ortasında boşluk olan büyük ikili halka kompleksinden oluşur ve Hsp10 kofaktörü ile ilişki halindedir. HSP 70'den gelen kısmi katlanmış polipeptidlerin tam katlanmasına yardım eder.

Pmpcb (MPP β): Mitokondriyon matriksinde yer alır ve öncül protein dizisini uzaklaştırarak, kalan polipeptidin katlanması ve fonksiyonel bir protein haline gelmesini sağlar. *Pmpcb* geni PMPCB proteinini kodlar (68–70).

Clpp: Mitokondriyonda hatalı proteinleri temizleyen üç sistem vardır. Bunlar iç zarda bulunan AAA proteaz ve matrixde bulunan Clpp ve Lon proteazdır (9,71).

Endog: DNA polimerazı'nın mitokondriyal DNA replikasyonunu başlatması için gereken RNA primerlerinin üretilmesinden sorumludur. Mitokondriyal zarlar arası boşluk, iç zar ve matriksde bulunur. Mitokondriyal DNA ile yakın temas halindedir, oksidatif olarak hasarlanmış mitokondriyal DNA moleküllerinin uzaklaştırılmasında da rol oynar. *Endog* geni, Endog proteinini kodlar (72).

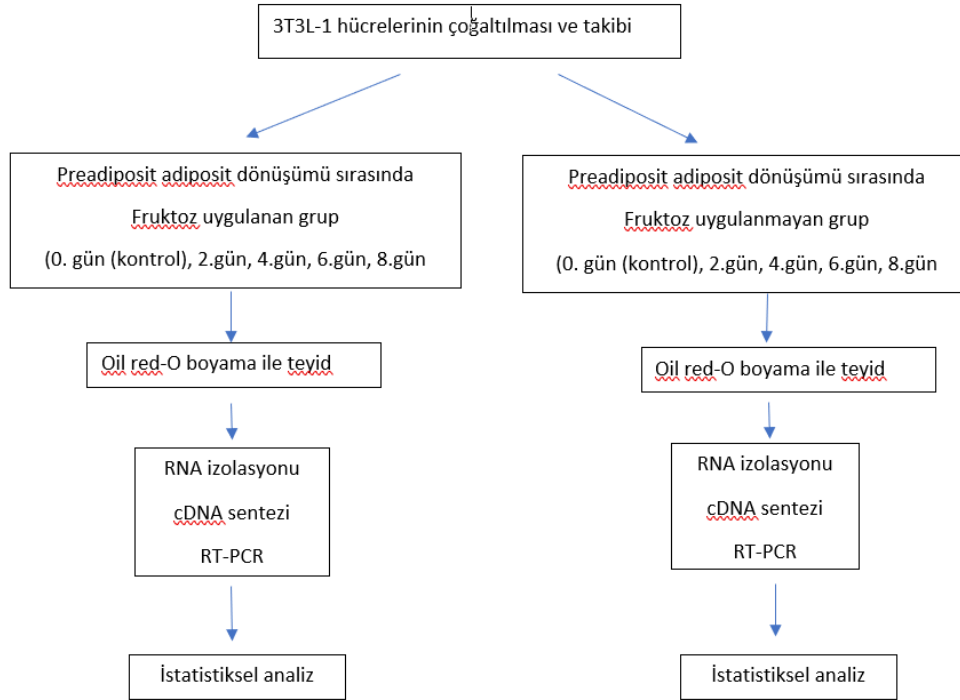
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 1 (Uqcc): Bu protein mitokondriyal solunum zincir kompleksi III veya sitokrom b-c1 kompleksinin çalışması için gereklidir. *Uqcc* geni, mitokondriyal solunum zincir kompleksi III veya sitokrom b-c1 kompleksinin çalışması için gerekli olan Uqcc proteinini kodlar (73).

2.8. Çalışmanın Amacı

Obezitede artan yağ dokusu hücre düzeyinde de stres yaratmaktadır. İşlenmiş gıdalardaki fruktoz kullanımı da hem obezitenin artması hem de organel stresinin artmasında önemli rol oynamaktadır. Obezitede mtKPY olduğu bilinmekle beraber mekanizmalar tam anlaşılamamıştır. Bu tezde amacımız yüksek doz fruktozun 3T3L1 yağ hücre hattında mitokondriyon biyogenezi üzerindeki etkilerini ve fruktotoksositeye bağlı olarak gelişen mitokondriyon stresinin regülasyonunu araştırmaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Fibroblastların adiposite dönüşme potansiyeli nedeniyle yaygın olarak kullanılan 3T3-L1 (ATCC®CL-173TM) hücre hattında çalışılmıştır (74). Yüksek doz fruktozun 3T3L1 yağ hücre hattında mitokondriyon biyogenezi ve mitokondriyon stresinin regülasyonu ile ilgili genlerin ifadenmelerine bakılmıştır.



Şekil 3.1. İş akış planı

Tablo 3.1. Mitokondriyon biyogenezi ve mitokondriyon stresinin regülasyonu ile ilgili ifadenmeleri çalışılan genler

Mitokondriyon ve Adiposit Biyogenezinde Rol Alan Genler	Mitokondriyal Katlanmamış Protein Yanıtı ile İlgili Genler
PPAR γ	mtHsp60
PGC-1 α	mtHsp70
CEBP α	Pmpcb
CEBP β	Clpp
	Endog
	Uqc

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1 Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan 3T3-L1 (ATCC®CL-173TM) hücre serisi soğuk zincirde teslim alınmıştır. Hücreler 37°C su banyosunda 1 dakika bekletilerek çözüldükten sonra 7 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı atılmıştır. Pelet taze bezi yeriyle çözdürölüp çoğaltılmış ve çalışmanın malzemeleri tamamlanana kadar azot tankı içinde %10 DMSO içeren besi yerinde dondurularak (-195° C) de saklanmıştır.

Besi yeri: Capricorn, DMEM High Glucose, DMEM-HA

Fetal Dana Serum (FBS): Capricorn, FBS-11A

Penisilin-Streptomisin: Capricorn, PS-B

Tripsin-EDTA (%0,25): Multicell, 325-043-CL

Dimetilsülfoksit (DMSO): Sigma, D9170

Fosfat Tuz Tamponu (PBS: Sigma, D1408

2-Mercaptoethanol: Merck, ES-007-E

Fruktoz: F3510 Sigma

İnsülin (sığır pankreasından elde edilmiş): Sigma, I6634

3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX): Sigma, I5879

Hidroklorik asit (HCl): Sigma, 320331

Potasyum hidroksit (KOH): Sigma, P5958

Etil alkol: Sigma, 32205

25cm² TC Flask: Orange scientific 4420100N

Hücre Dondurma tüpleri: Greiner bio-one, 2ml

6 kuyulu kültür kabı: Greiner, 657160

Deney tüpü (15ml): Greiner, 188261

3.1.1. Hücrelerin çözülmesi ve çoğaltılması

Azot tankından %10 DMSO içeren DMEM besi yerinde (%10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren) dondurulmuş olan vialler çıkarılarak, önceden 37°C ayarlanmış su banyosu içinde 1 dakika bekletildi. Vial çözülmeye başladıktan sonra steril bir falkon tüp içine 6 ml besiyeri ile birlikte hücre karışımı falkon tüpe aktarıldı. 1200 rpm’de 7 dakika santrifuj sonrası tüpün üstündeki supernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine yeni besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve hücre ve besiyeri karışımı 25ml’lik flaska ekildi, 37°C, %5 CO₂ inkübatörüne (Heraus- HERACELL) kaldırıldı. Her gün inverted mikroskop ile hücreler gözlenerek çoğalmaları izlendi.

Hücreler konfluent olduktan sonra Tripsin EDTA (0.25’lik) ile kaldırılarak pasajlanmalarına devam edildi. Yeterince preadiposit hücresi elde edilince preadiposit adiposit dönüşümü protokolüne geçildi.

3.1.2. Preadiposit adiposit hücre dönüşümü

Çalışma için yeterli hücre sayısına ulaşıldığında tüm hücreler Tripsin EDTA (0.25 lik) ile kaldırıldı. Hücreler 6 kuyuluk hücre plaklarına ekildi. Bu plaklar %100 konfluent olana kadar inkübatörde bekletildi. Konfluens sağlandıktan sonra ek olarak 48 saat daha inkübatörde bekletilmeye devam edildi. Bu 48 saat sonunda besi yeri uzaklaştırılıp hücrelere ilk farklılaşma kokteyli uygulandı (MDI1).

Bu farklılaşma 0. gün kabul edildi

0.gün MDI:

DMEM + fetal sığır serumu (FBS)+ IBMX 0.5 mM+ insülin 10 µg/mL + 1µM deksametazon (DEX)

Fruktoz uygulanacak gruba ek olarak 550 µM fruktoz eklendi (74). Besi yerine fruktoz eklenen ve eklenmeyen hücreler inkübatöre kaldırıldı ve 48 saat beklemeye alındı. Bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki besi yerleri çekildi ve 2. farklılaşma kokteyline alındı.

2. farklılaşma kokteyli: DMEM + FBS + insülin 10 µg/mL (MDI2)

48 saat sonunda yine besi yeri uzaklaştırıldı ve DMEM + FBS besi yerine geçildi. Bundan sonra her 48 saatte bir (4-6-8. günlerde) aynı besi yeri yani DMEM + FBS kullanıldı. 8. gün sonunda çalışma sonlandırıldı (75). Fruktoz uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin farklılaşmaları 0-2-4-6-8. günlerde oil Red-O boyama ile mikroskopik olarak (IM: OLYMPUS IX73) incelendi.

3.1.3. Oil red-O boyama protokolü

Oil red-O stok hazırlama (76): 0.2 g Oil red-O ve 40 ml 2 propanol (%0.5 lik) karıştırılır. Bu solüsyon çalışma yapılacağı zaman 2:3 oranında sulandırılır ve filtreden geçirilir.

6 kuyuluk kültür plaklarından besi yeri uzaklaştırılır. Hücreler PBS ile yıkanır ve %4 lük paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika oda sıcaklığında sabitlenir. PFA ortamdan uzaklaştırılır ve oil red- O boyama solüsyonu plaklara koyulur. 30 dakika oda sıcaklığında

inkübe edilir, ardından iki kez PBS ile yıkanır ve ışık mikroskopunda (IM: OLYMPUS IX73) görüntülenir.

3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyon kiti: Qiagen, RNeasy mini kit,74104

Dietil piro karbonat (DEPC): Sigma, D5758

%0,1'lik DEPC'li H₂O: 1000 ml steril distile su (dH₂O)'ya 1ml DEPC eklenip iyice karıştırılır. Ardından 12 saat boyunca 37°C etüvde inkübe edilip otoklavlanır (100 °C'de 15 dakika) soğutularak kullanılır.

Etil Alkol: Sigma, E7023

Farklılaşma süresince 0-2-4-6-8. günlerde fruktoz uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin RNA izolasyonları yapıldı.

Kuyulardan TE (Tripsin EDTA) kaldırılan hücrelere aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Hücrelerin üzerinden besi yeri çekildi (DMEM + FBS)
2. PBS ile yıkama yapıldı
3. Her bir kuyuya 500µl TE eklendi, kuyuların her tarafına yayılması sağlandı ve 37°C inkübatör içinde birkaç dakika bekletildi
4. Hücrelerin kalkması mikroskop altında gözlendikten sonra TE hacminin iki katı kadar besi yeri eklenerek 15ml'lik vidalı kapaklı falkon tüpe aktarıldı
5. 1000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi sonra üst faz döküldü
6. Pellet üzerine 350µl Buffer RLT koyuldu ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı (Qiagen kiti içinden çıkan solüsyon. RNA izolasyonun başlatan ilk aşama)
7. RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C'de saklandı

Çalışmaya başlanacağı zaman:

1. -80'den hücreler çıkarılıp çözünmesi beklendi

2. Çözülen hücrelerin hacmi kadar üzerine %70'lik dietilpirokarbonat (DEPC)lı etil alkol eklendi
3. 700µl lizat kolonlu tüpe transfer edilerek izolasyona başlandı

3.3. RNA saflık ve sağlamlık tayini

Saflık tayini için spektrofotometre, sağlamlık için ise agaroz jel metodu kullanılmıştır. Agaroz jel protokolü için kullanılan malzemeler;

Agaroz:Sigma, A9539

TAE çözeltisi;

Tris baz: Sigma, T7527

Borik Asit: Sigma, B6768

EDTA : Sigma, E5134

Yükleme Tamponu;

Gliserol: Sigma, G5516

Orange G: Sigma, O3756

15 ml gliserol, 100mg orange G ve 35 ml 1X TAE içinde hazırlanmıştır.

Etidyum Bromür: Invitrogen, 15585-011

DNA markır (50bç): Thermo scientific, SMO373

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

İzole edilen RNA'ların saflığını kontrolü 260/280nm'deki absorbans oranı ile saptandı. Spektrofotometre cihazı olarak Epoch Gen5 2.0 ve all-in-one Reader software programı kullanıldı. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenen 260/280nm absorbans oranı 1,8-2,1'dir. 2µl izole edilen RNA, 2µl steril distile su ile karıştırıldı, her kuyuya 2µl örnek koyuldu ve okuma yapıldı. Elde edilen

RNA'ların 260/280nm absorbands oranı 2,0-2,1 olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrası elde edilen veriler 2 ile çarpılarak izole edilen RNA'ların miktarları saptanmıştır.

İzole edilen RNA'lar hazırlanan %1,5'lik agaroz jel de kontrol edildi. 100ml 0,5X TAE (Tris Asetikasit EDTA) tamponu içinde çözülen 1,5 gram agaroz kaynatıldı. İçine 2,5µl (10mg/ml) etidyum bromür eklendi. Polimerleşme tamamlandıktan sonra 5µl jel yükleme tamponu ile karıştırılan 4µl RNA örneği 90V'da 45 dakika yürütüldü. Yürütme sonrası 28S, 18S ve 5S RNA net bir biçimde gözlenmiştir.

3.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi için ticari kit olan Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit Roche, 5081955001 kullanılmıştır. Uygulama için sarf malzemesi olarak 0,2 ml'lik PZR tüpleri ve steril filtreli pipet uçları kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

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

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

Tablo 3.3. Komplementer DNA (cDNA) karışımı

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

29°C’de 10 dakika, 50°C’de 60 dakika ve enzim inaktivasyonu için 85°C’de 5 dakika bekletildi. Tüpler buz üstüne alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Elde edilen cDNA -20°C’de saklanır.

3.5. cDNA Kontrol PZR

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

dNTP (10mM X 4): Roche, 11581295001

MgCl₂ (25mM): Sigma, M8787

Fare beta aktin primer F: 5’CCTAAGGCCAACCGTGAAAA3’

Fare beta aktin primer R: 5’AGGCATACAGGGACAGCACA3’

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

Tablo 3.4. Kontrol PZR protokol

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

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

PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri (100 baz çifti) Kodak EDAS 290 UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

Bu basamakların ardından gen ifadenme basamağı olan Eş Zamanlı PZR (RT-PCR) ekspresyon ifadenme protokolüne geçilmiştir.

3.6. Gerçek Zamanlı PZR

Kantitatif eş zamanlı PZR için Roche firmasına ait Light Cycler 480 II cihazı kullanılmıştır. Genlerinin ifadenmeleri saptamak amacı ile her bir gene ait real time ready prob ile birlikte LightCycler480 Probes Master kiti kullanıldı. LightCycler480 Probes Master karışımı kit protokolüne uygun olarak hazırlandı

Referans gen olarak Roche marka Actb *M. musculus* (300236) (NM_007393) kullanılmıştır. Diğer genler sırasıyla;

RealTime ready Catalog Assay ID:300236 Actb *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:314109 Endog *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:318460 Hsp1a *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:315118 Hspd1 *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:318461 Pmpcb *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:313428 Ppargc1a *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:318457 Uqcc *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:313061 Clpp *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:313571 Cebpb *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:313484 Cebpa *M. musculus*

RealTime ready Catalog Assay ID:317705 Pparg *M. musculus*

LC 480 Multiwell plate Roche 4729692001

LightCycler 480 probes master Roche 4887301001

Çalışmada kullanılan tüm pipet uçları filtreli sterildir. 0,2ml, 1,5ml, 15ml ve 50ml'lik deney tüplerinin hepsi steril, otoklavlanmıştır.

3.7. İstatistiksel Analizler

Yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar, “GraphPad Prism 8” istatistiksel yazılım programı kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. Verilere ait ortalama $\pm$ standart hata (SEM) sonuçları kullanılarak gruplanmış genlere ait aralıklı bar grafikleri verilmiştir. Verilere ait normallik varsayımının sağlanmamasından ötürü, iki bağımsız grup karşılaştırılırken Student's t testinin non-parametrik karşılığı olan “Mann-Whitney testi” kullanılmıştır. Benzer şekilde, ikiden fazla bağımsız grup karşılaştırılması için ise tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testinin non-parametrik karşılığı olan “Friedman testi” kullanılmıştır. Bu testlerin sonucunda önemlilik derecesi 0.05'in altında elde edilen p değerlerine ait sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Friedman testi sonucunda aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilen gruplara ilişkin, farkı yaratan grubu tespit etmek için çoklu karşılaştırma (Post-Hoc) testlerinden “Dunn çoklu

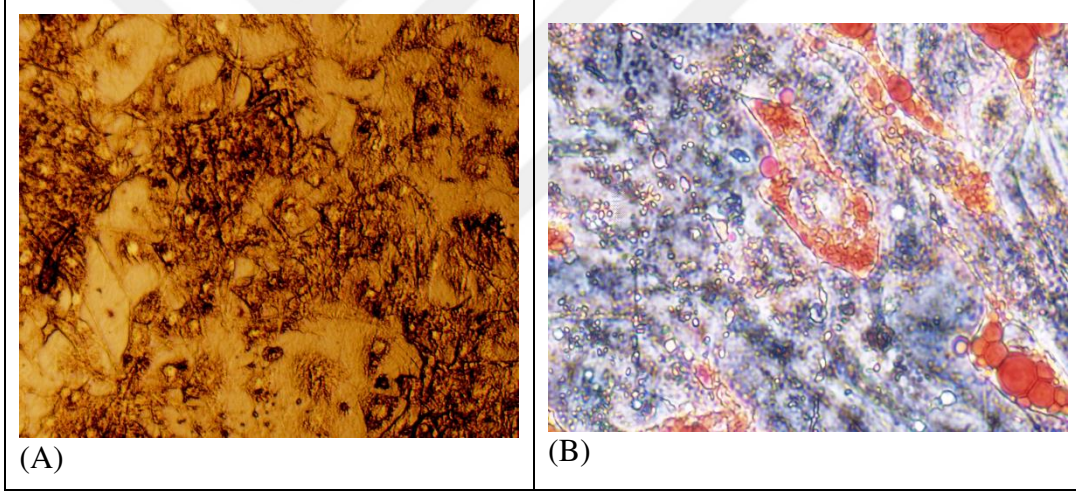
karşılaştırma testi” kullanılmış ve ikili karşılaştırmalar sonucunda p değeri 0.05’in altında kalan grupların, fark yaratan değişkenler olduğu raporlanmıştır.



4. BULGULAR

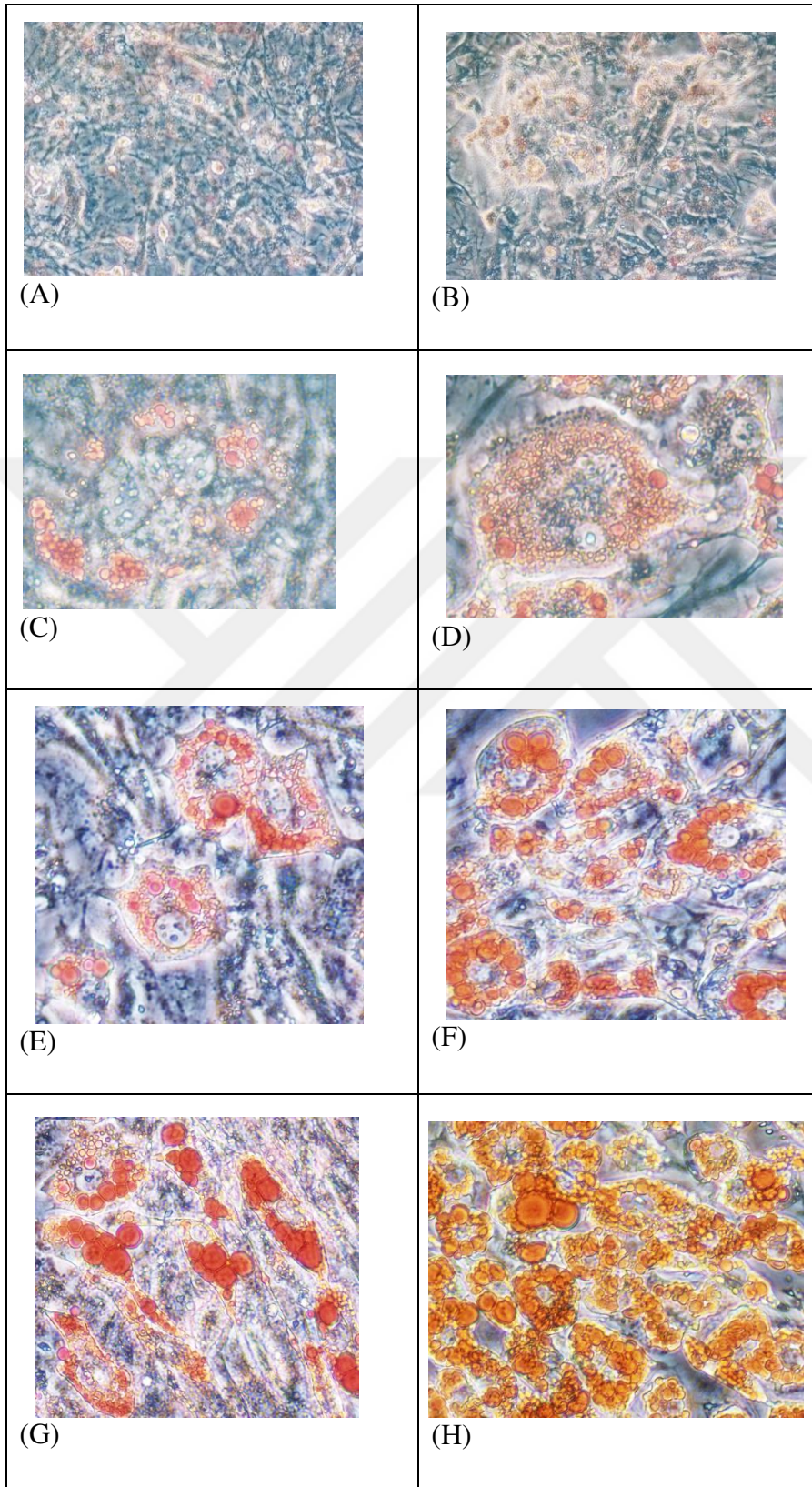
4. 1. Mikroskopik Bulgular

İn vitro ortamda azot saklama tankından dondurulmuş olarak çıkarılan 3T3-L1 hücreleri uygun besi ortamında çözüldükten sonra çoğaltıldı. 3T3-L1 hücreleri, besiyerine IBMX, insülin ve deksametazon eklenmeden önce fibroblast görüntüsü inverted mikroskopta görüntülendi (şekil 4. 1.A). Diferansiyasyon medyumuna IBMX, insülin ve deksametazon eklendikten sonra 8. günde matür adipositken oil Red O boyasıyla boyanarak inverted mikroskopta görüntü alındı (şekil 4. 1. B). Şekilde fibroblastlar ve oil red-O ile boyanan lipid damlacıkları görünmektedir.



Şekil 4. 1. 3T3-L1 hücreleri. (A) 0. gün preadiposit (B) 8.gün adiposit oil red boyama (x20)

Fruktozun adiposit diferansiyasyonu sırasında lipid birikimi üzerindeki etkisini incelediğimiz çalışmamızda post-konfluent hücrelere fruktoz uygulandı. 8. gün sonunda çalışma sonlandırıldı. Fruktozun lipid birikimi üzerine olan etkisi oil red O boyama tekniği ile değerlendirildi. 8.gün sonunda fruktoz uygulanan hücrelerde (fruktoz (+)) fruktoz uygulanmayan (fruktoz (-)) hücrelere oranla adiposit diferansiyasyonu sırasında lipid oluşumunu oldukça arttırdığı gözlemlendi.



Şekil 4. 2 Fruktozun adiposit farklılaşmasında lipid birikimine olan etkisinin oil red O boyama bulguları (x40)

(A) 2.gün fruktoz (-),
 (B) 2.gün fruktoz (+),
 (C) 4.gün fruktoz (-),
 (D) 4.gün fruktoz (+),
 (E) 6.gün fruktoz (-),
 (F) 6.gün fruktoz (+),
 (G) 8.gün fruktoz (-),
 (H) 8.gün fruktoz (+)

4.2 Fruktoz (+) / (-) 3T3-L1 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Saflık Sonuçları

4.2.1. Fruktoz (+) ve (-) 3T3-L1 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların spektrofotometrik bulguları

Uygulama sonrasında 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan ölçümlerin sonuçları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

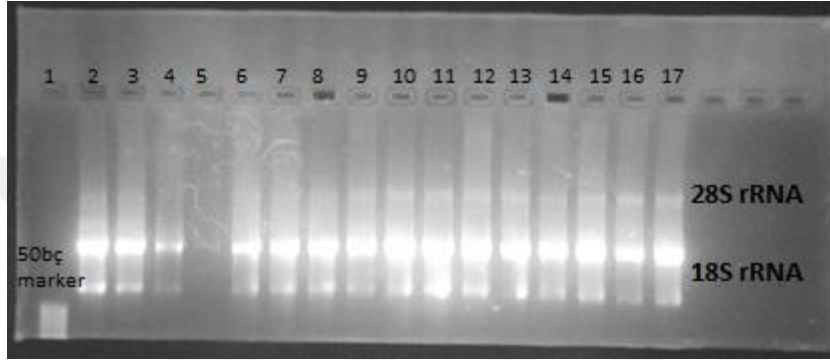
		2	3	
0. gün RNA	A	0,494	0,47	260
		0,233	0,221	280
		2,123	2,123	260/280
		395,354	375,895	ng/μL
2. gün RNA	B	0,486	0,505	260
Fruktoz +		0,23	0,237	280
		2,115	2,133	260/280
		388,927	404,216	ng/μL
2. gün RNA	C	0,417	0,409	260
Fruktoz -		0,2	0,198	280
		2,08	2,068	260/280
		333,402	327,56	ng/μL
4. gün RNA	D	0,874	0,865	260
Fruktoz +		0,417	0,411	280
		2,097	2,106	260/280
		699,24	691,841	ng/μL
4. gün RNA	E	0,664	0,642	260
Fruktoz -		0,314	0,303	280
		2,117	2,12	260/280
		531,136	513,534	ng/μL

6. gün RNA	F	0,968	0,929	260
Fruktoz-		0,463	0,435	280
		2,09	2,137	260/280
		774,793	742,857	ng/μL
6. gün RNA	G	0,694	0,653	260
Fruktoz +		0,331	0,313	280
		2,095	2,088	260/280
		555,26	522,145	ng/μL
8. gün RNA	H	0,528	0,584	260
Fruktoz -		0,269	0,277	280
		1,965	2,113	260/280
		422,473	467,569	ng/μL
8. gün RNA	I	0,578	0,592	260
Fruktoz +		0,273	0,281	280
		2,112	2,106	260/280
		462,126	473,384	ng/μL

Tablo 4.1. Örneklere ait RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları

4.2.2. Fruktoz uygulanan ve uygulanmayan 3T3-L1 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü

Elde edilen RNA örneklerinin %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.3de gösterilmiştir

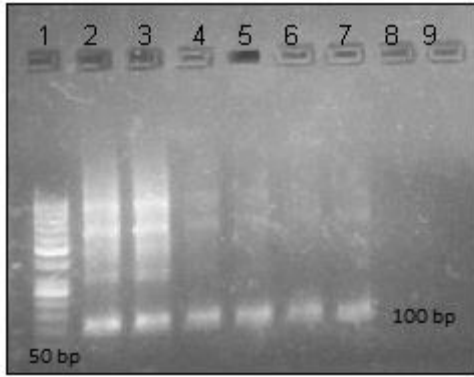


Şekil.4.3 RNA izolasyonu sonucu %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

1. 50 bp marker
2. 0. Gün RNA
3. 0. Gün RNA
4. 0. Gün RNA
5. 0. Gün RNA
6. 2. Gün Fruktoz - RNA
7. 2. Gün Fruktoz + RNA
8. 4. Gün Fruktoz - RNA
9. 4. Gün Fruktoz + RNA
10. 6. Gün Fruktoz - RNA
11. 6. Gün Fruktoz + RNA
12. 8. Gün Fruktoz - RNA
13. 8. Gün Fruktoz + RNA

4.3. cDNA Kontrol PZR

3T3-L1 hücrelerinden elde edilen RNA'lar ticari kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmeleri için uygun protokol uygulanmıştır. Protokol sonunda cDNA'ların elde edilip edilemediği kontrol (referans) primerleri ile teyit edilmiştir. Burada yapılan klasik PZR'de fare aktin β primerleri kullanılmıştır. 99 baz çifti uzunluğundaki bant görüntüsü şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bir sonraki aşama olan gerçek zamanlı PZR'de elde edilen bu cDNA'lar kullanılmıştır.



Şekil 4. 4. Fare aktin β kontrol PZR

1. 50bp marker
2. 0. gün
3. 2. Gün Fruktoz +
4. 4. Gün Fruktoz +
5. 6. Gün Fruktoz +
6. 8. Gün Fruktoz+
7. 2 gün Fruktoz -
8. Negatif Kontrol

4.4. Mitokondriyal Biyogenez ve Katlanmamış Protein Yanıtı İle İlgili Genlerin Fruktoz (-) ve Fruktoz (-) Ortamdaki Gen İfadelenme Değişimlerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 100 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Her bir hedef gen ve β aktin (referans gen) genleri için ticari olarak tasarlanmış gene özgü primerlerden ve bir kilitli nükleik asit (LNA) ile kısa FAM işaretli hidroliz probu kullanılmış olsa da çalışmaya başlamadan önce optimizasyon amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Florsan işaretli olan problemlerin çalıştığı kontrol edildikten sonra elde edilen cDNA'lar ile kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir.

4.4.1.PPAR γ gen ifadenme değişimleri

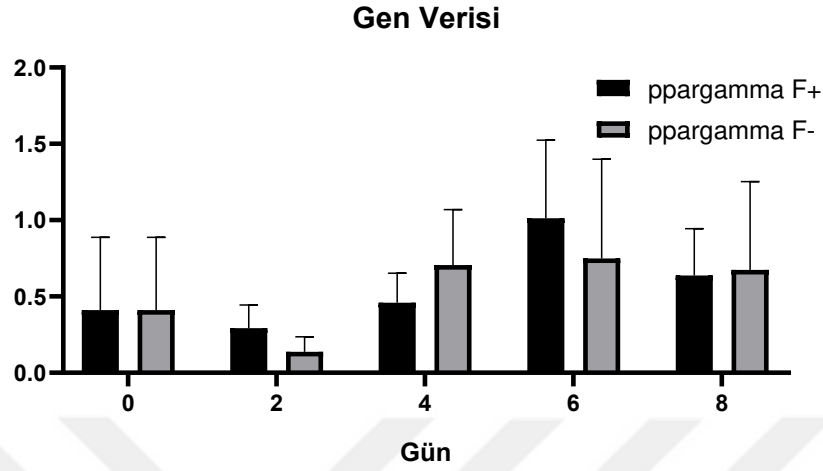
PPAR γ genindeki kat artışı fruktoz (+) ve fruktoz (-) hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (tablo 4.1). Fruktoz (+) ve fruktoz (-) hücre grupları karşılaştırıldığında (2, 4, 6, 8. günlerde) de PPAR γ gen ifadenme değişimleri anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tablo 4.2. PPAR γ gen ifadenme değişimleri

PPAR gama	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	0.29	0.14	>0.05
4. gün	0.45	0.71	>0.05
6. gün	1.01	0.75	>0.05
8. gün	0.63	0.68	>0.05
	>0.05	>0.05	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

**: Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4. 5. PPAR γ geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değışimleri

4.4.2. PGC-1 α gen ifadenme değışimleri

PGC-1A α gen ifadenme değışimi fruktoz (+) hücrelerde 6. günde (p: 0.04), fruktoz (-) hücrelerde 4. günde anlamlı derecede (p: 0.01) yüksek bulundu. Fruktoz (-) / fruktoz (+) grupların 4. günleri karşılaştırıldığında PGC-1 α gen ifadenmesi fruktoz (-) grupta anlamlı derecede yüksek iken (p:0,02) 6. günleri karşılaştırıldığında fruktoz (+) grupta ki artış anlamlı bulunmuştur.

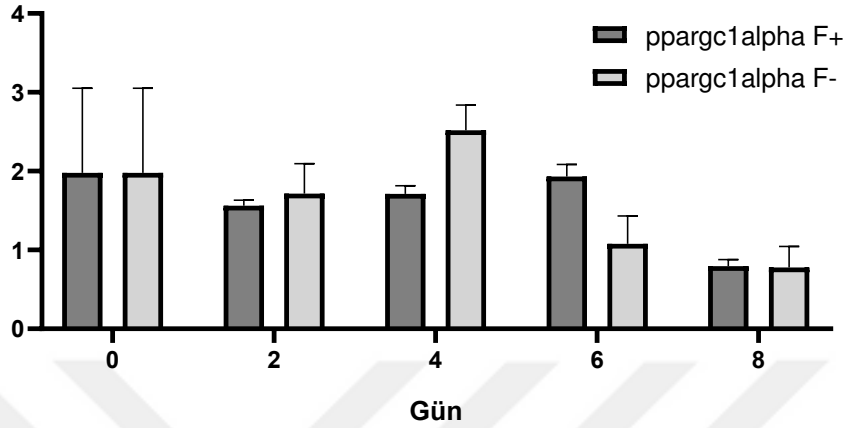
Tablo 4.3. PGC-1 α gen ifadenme değışimleri

PGC-1 α	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.56	1.71	>0.05
4. gün	1.71	2.52**	0.01*
6. gün	1.93**	1.08	0.02*
8. gün	0.80	0.78	>0.05
	p: 0.04**	p: 0.01**	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

**: Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması

Gen Verisi



Şekil 4. 6. PGC-1α geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

4.4.3. CEBPα gen ifadenme değişimleri

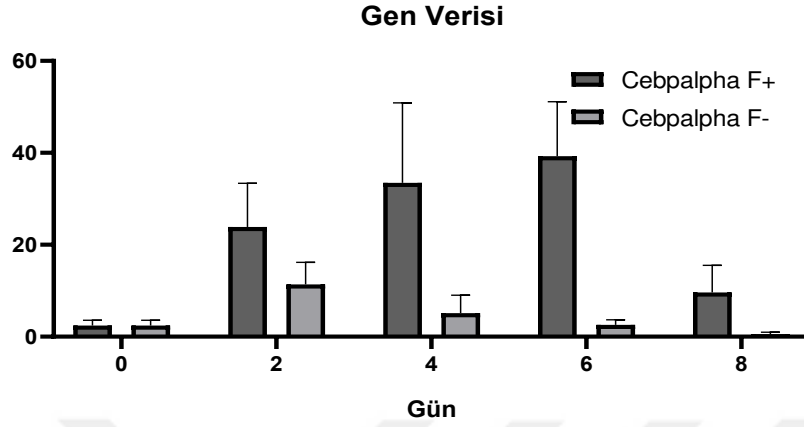
CEBPα geninin ifadenmesi fruktoz (+) hücrelerde en anlamlı artış 6. günde saptanırken (p: <0.0001) fruktoz (-) hücrelerde en yüksek artış 2. günde bulundu. (p< 0.001). Fruktoz (-) / fruktoz (+) veriler karşılaştırıldığında, fruktoz (+) hücrelerde CEBPα gen ifadenmesi fruktoz (-) gruba göre hergün daha yüksek iken bu artış istatistiksel olarak 4 ve 6. günlerde anlamlıydı.

Tablo 4.4. CEBPα gen ifadenme değişimleri

CEBP α	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	23.89	11.36**	>0.05
4. gün	33.47	5.12	0.04*
6. gün	39.25**	2.58	<0.01*
8. gün	9.60	0.59	0.05
	p <0.0001**	p: 0.0009**	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

**: Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4.7. CEBPα gen i zamana ve uygulanan maddeye bağı gen ifadenme değışimleri

4.4.4. CEBPβ gen ifadenme değışimleri

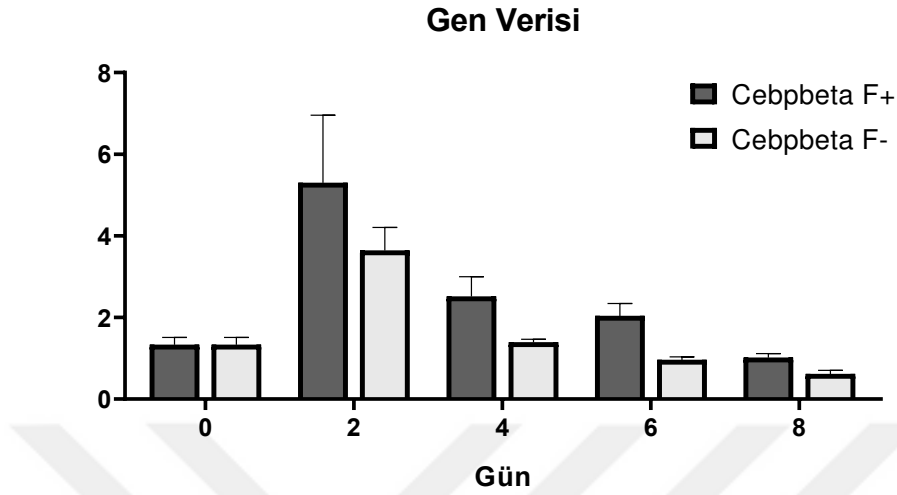
CEBPβ geninin ifadenmesi fruktoz (+) ve fruktoz (-) hücrelerin ikisinde de 2. günde anlamlı derecede yüksekti (p: <0.0001). Fruktoz (+) ve fruktoz (-) hücrelerin CEBPβ gen i ifadenme verileri karşılaştırıldığında, fruktoz uygulanan hücrelerde CEBPβ gen kat artışı her gün anlamlı olarak yüksek iken bu fark istatistiksel olarak 4, 6 ve 8. günlerde anlamlıydı (sırasıyla p:0.01, p<0.01 ve <0.01).

Tablo 4.5 CEBPβ gen ifadenme değışimleri

CEBPβ	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	5.30**	3.64**	>0.05
4. gün	2.51	1.40	0.01*
6. gün	2.04	0.96	<0.01*
8. gün	1.01	0.62	<0.01*
	p: <0.0001**	p<0.0001**	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

** : Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4. 8. CEBPβ geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

4.5.5. Uqcc gen ifadenme değişimleri

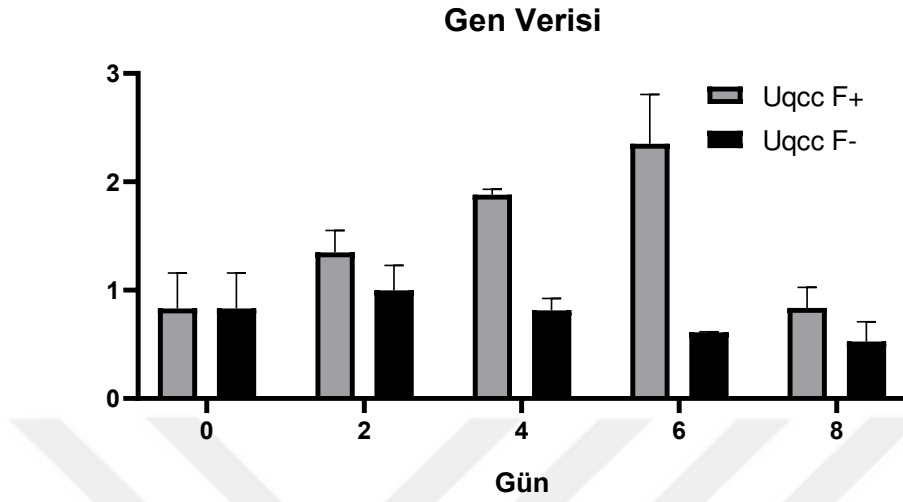
Uqcc gen ifadenme değişimi fruktoz (+) hücrelerde 6. günde anlamlı olarak yüksekken ($p < 0,01$) fruktoz (-) hücrelerde 2. günde anlamlı yüksekti ($p: 0,04$). Fruktoz (+) / fruktoz (-) hücre grupları karşılaştırıldığında, fruktoz (+) hücrelerde Uqcc gen ifadenmesi 2-6. günler içerisinde artış gösterirken bu artışlar istatistiksel olarak 4 ve 6. (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,01$) günlerde anlamlıydı.

Tablo 4.6. Uqcc gen ifadenme değişimleri

Uqcc	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.35	0.99**	>0.05
4. gün	1.88	0.81	<0.001*
6. gün	2.35**	0.61	<0.01*
8. gün	0.84	0.53	>0.05
	P<0.01**	P:0.04**	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

** : Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4.9. Uqcc geni zamana ve uygulanan maddeye bağı gen ifadenme değışimleri

4.5.6. Clpp gen ifadenme değışimleri

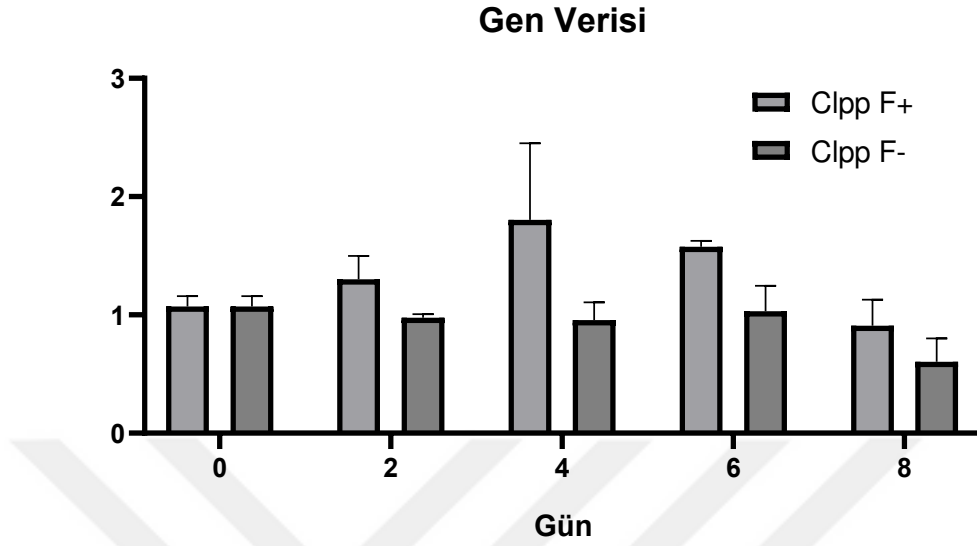
Clpp gen ifadenme değışimi fruktoz (+) hücrelerde 6. günde anlamlı olarak yüksekken ($p < 0.001$), fruktoz (-) hücrelerde 8. günde anlamlı derecede düşüktü ($p: 0.045$). Fruktoz (+) /fruktoz (-) gruplar karşılaştırıldığında, fruktoz (+) hücrelerde Clpp gen ifadenmesi artışı her gün yüksek iken bu artış istatistiksel olarak 2 ve 6. günlerde anlamlıydı sırasıyla ($p: 0.047$, $p: 0.01$)

Tablo 4.7. Clpp gen ifadenme değışimleri

Clpp	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.30	0.98	0.047
4. gün	1.80	0.96	>0.05
6. gün	1.58**	1.03	0.01
8. gün	0.91	0.60**	>0.05
	P< 0.001	p: 0.045	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

**: Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4.10. Clpp geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

4.5.7. Endog gen ifadenme değişimleri

Endog gen ifadenme değişimi fruktoz (+) hücrelerde 6. Günde (p: 0.003), fruktoz (-) hücrelerde 2. günde anlamlı yüksek bulundu (p< 0.001). Fruktoz (+) / fruktoz (-) grupları karşılaştırıldığında Clpp gen ifadenmesindeki artış fruktoz (+) hücrelerde her gün anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; p: 0.02, p: 0.01, p<0.01, p: 0.02).

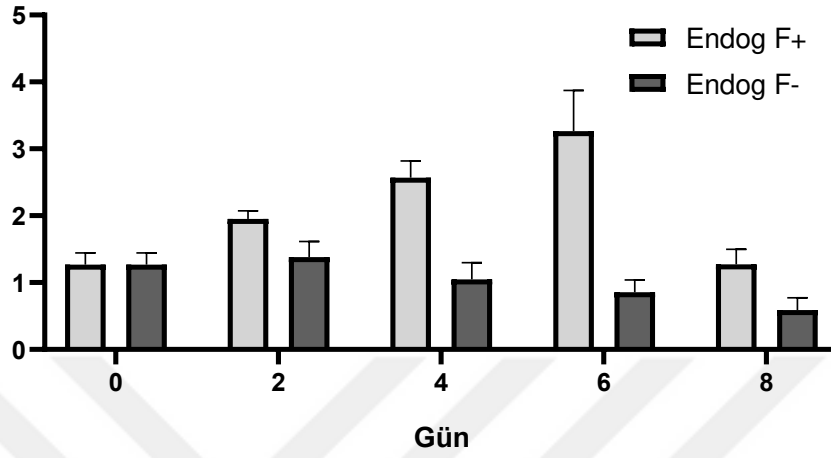
Tablo 4.8. Endog gen ifadenme değişimleri

Endog	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.95	1.38**	0.02*
4. gün	2.57	1.05	0.01*
6. gün	3.26**	0.86	<0.01*
8. gün	1.27	0.59	0.02*
	p: 0.003**	P< 0.001**	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

** : Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması

Gen Verisi



Şekil 4.11. Endog geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

4.5.8. Pmpcb gen ifadenme değişimleri

Pmpcb gen ifadenme değişimi fruktoz (+) hücrelerde 6. günde anlamlı olarak yüksekken ($p < 0.001$), fruktoz (-) hücrelerde 8. günde anlamlı derecede düşük saptandı ($p < 0.01$). Fruktoz (+) / fruktoz (-) grupları karşılaştırıldığında, Pmpcb gen ifadenmelerindeki artış fruktoz (+) hücrelerde 4, 6, 8. günlerde anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$).

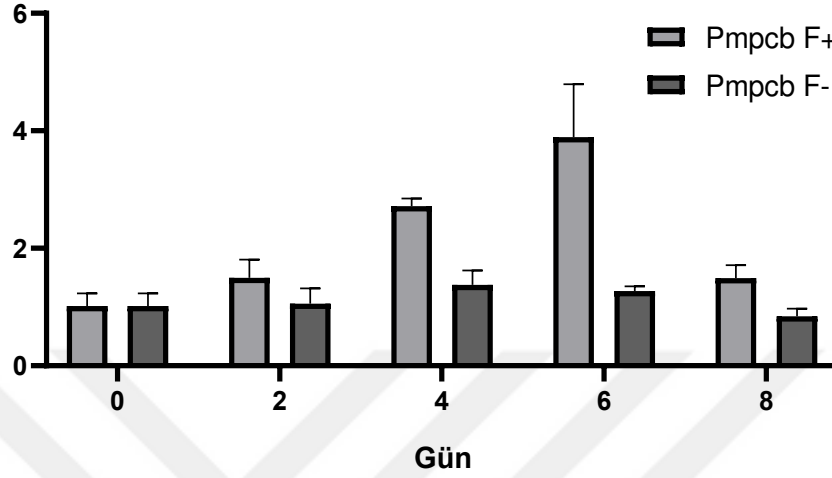
Tablo 4.9. Pmpcb gen ifadenme değişimleri

Pmpcb	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.95	1.38	>0.05
4. gün	2.57	1.05	$<0.01^*$
6. gün	3.26**	0.86	$<0.01^*$
8. gün	1.27	0.59**	0.01^*
	$P < 0.001^{**}$	$P < 0.01^{**}$	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

** : Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması

Gen Verisi



Şekil 4.12. Pmpcb geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

4.5.9. mtHsp60 gen ifadenme değişimleri

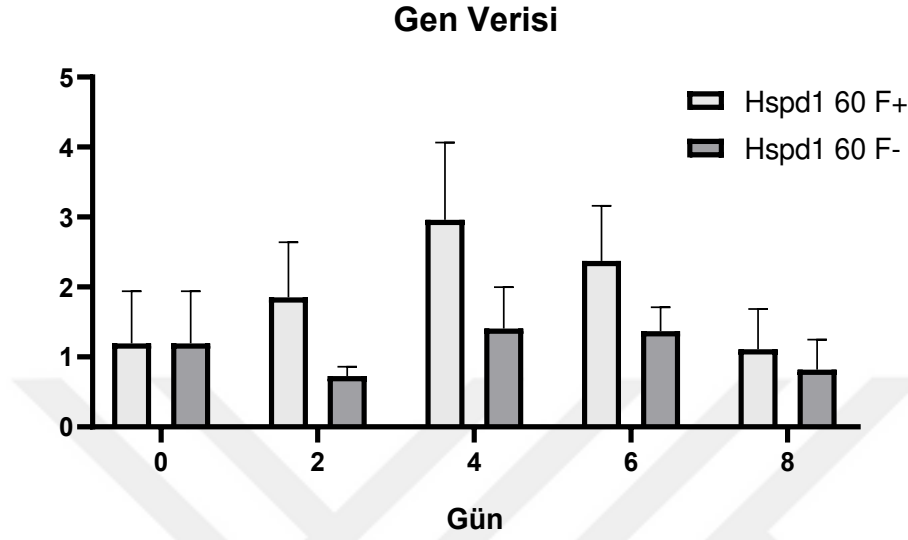
mtHsp60 gen ifadenme değişimi fruktoz (+) hücrelerde 4. günde anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0.001$) fruktoz (-) hücrelerde farklılık saptanmadı. Fruktoz (+)/fruktoz (-) hücre grupları karşılaştırıldığında, mtHsp60 gen ifadenme değişiklikleri fruktoz (+)/fruktoz (-) hücre gruplarında farklılık göstermedi.

Tablo 4.10 mtHsp60 gen ifadenme değişimleri

mtHsp60	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.85	0.73	>0.05
4. gün	2.96**	1.41	>0.05
6. gün	2.37	1.37	>0.05
8. gün	1.11	0.82	>0.05
	P< 0.001**	>0.05	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

** : Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4.13. mtHsp60 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

4.5.10. mtHsp70 gen ifadenme değişimleri

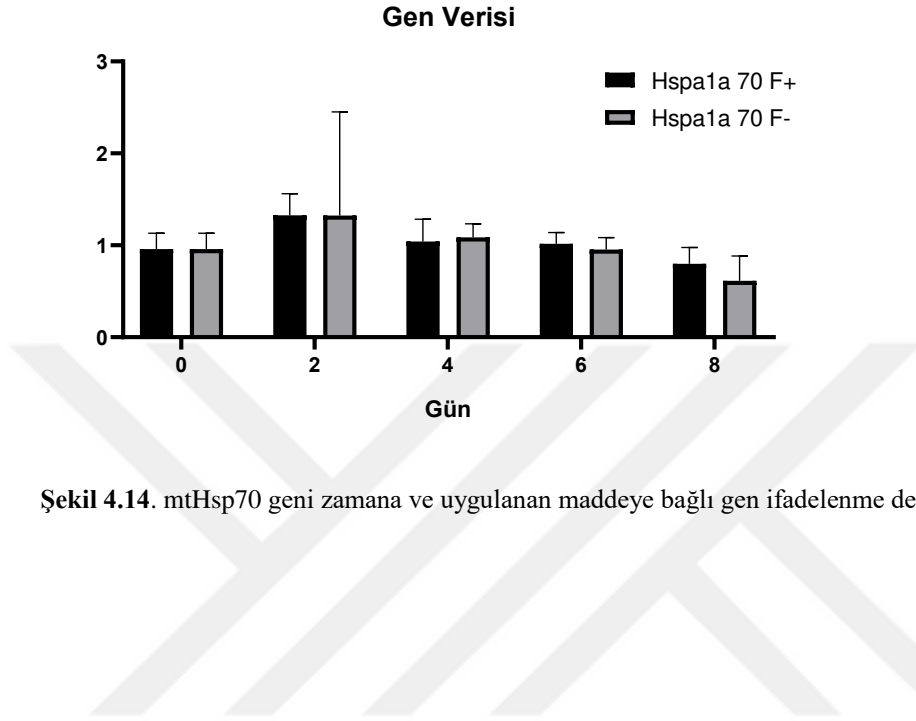
mtHsp70 gen ifadenme değişimi fruktoz (+) hücrelerde 4. günde anlamlı olarak yüksekken ($p < 0.001$) fruktoz (-) hücrelerde farklılık göstermedi. Fruktoz (+)/ fruktoz (-) hücre grupları karşılaştırıldığında, mtHsp70 gen ifadenmesindeki artış gruplar arasında fark göstermediği saptandı.

Tablo 4.11 mtHsp70 gen ifadenme değişimleri

MtHsp70	Fruktoz (+)	Fruktoz (-)	p
2. gün	1.33**	1.32	>0.05
4. gün	1.04	1.09	>0.05
6. gün	1.02	0.95	>0.05
8. gün	0.80	0.61	>0.05
	P < 0.001**	>0.05	

*: Fruktoz (-) / fruktoz (+) ve uygulanmayan hücrelerin karşılaştırılması

** : Grupların kendi içindeki kat artışlarının karşılaştırılması



Şekil 4.14. mtHsp70 geni zamana ve uygulanan maddeye bağlı gen ifadenme değişimleri

5.TARTIŞMA

Mitokondriyon hücrenin enerji santrali olup, hücrenin metabolik dengesinde çok önemlidir. Mitokondriyal aktivite moleküler ve çevresel faktörler (besinler, hormonlar, ısı, egzersiz, hipoksi, yaşlanma gibi) ile değişebilir ve hücrenin büyüme, çoğalma, hayatta kalma gibi çeşitli fonksiyonlarını etkiler.

Mitokondri hücrede enerji üretimi, demir-sülfür kümelerinin biyogenezi, nükleotid ve aminoasit biyosentezi ve apoptoz gibi önemli işlevlerde oldukça fonksiyonel olan organelldir. Biyogenezinin ve düzenli fonksiyonlarının devamını sağlayabilmek için proteinlerin düzgün katlanmasını sağlayan şaperonlara ve düzgün katlanmamış proteinleri temizlemek için kalite kontrolü yapan proteazlara sahiptir. Karmaşık organel yapısı, ETZ'den gelen ROS'un zararlı etkileri ve genomunun mutasyonlara duyarlı olması nedeniyle mitokondriyal protein katlanmasının doğru olması bir tür meydan okumadır. Çevresel faktörler, toksinler vb. de önemlidir. Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin organel şaperon kapasitesini aşması mtKPY'na yol açar. Bu yanıt mitokondriden nukleusa sinyal iletimine neden olarak mitokondriyonu koruyacak olan şaperon ve proteaz genlerinin sentezini artırmaya çalışır (7,18,23,29,30,36).

Obezite vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması sonucu yağ dokusundaki anormal artış ile gelişen bir enerji dengesi bozukluğudur. Günümüzde beslenme şeklinin değişmesi, özellikle mısır şurubundan elde edilen fruktoz dan zengin hazır paketli yiyecek tüketiminin artması ve günlük aktivitenin azalması ile obezite çağımızın giderek artan sorunu olmaktadır. Enerji alımı arttığında obezite ve metabolik sendrom gelişirken mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna da yol açar. Lipotoksite ve glukotoksitede yağ hücresindeki mitokondrial fonksiyonların bozulduğu bilinmekle birlikte fruktozun özellikle de işlenmiş mısır şurubundaki fruktozun etkileri tam olarak bilinmemektedir (46,50).

Adipogenez ve mitokondriyon biyogenezi birbiriyle yakın ilişkisi olan süreçlerdir. Mitokondriyon bu dönüşümde gereken enerjiyi (ATP) ve lipid yapımı için gereken hammaddeleri (yağ asiti—asetil CoA---trigliserid sentezi) sağlar. Adipogenez sırasında

mitokondri sayı ve morfolojisi hızla değişir. Adipogenezis birçok transkripsiyonel faktörünün rol oynadığı olaylar zinciri ile gerçekleşir. 3T3-L1 preadiposit hücre hattı yağ hücresi ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. *İn vitro* / *in vivo* olarak adipogenezis sırasında mitokondriyal sayı ve morfolojisinin değişimi elektron mikroskopisi ile gösterilmiştir. Fruktozun yağ hücre hattında dönüşümü hızlandırdığı bilinmektedir (44,59,75).

Bu çalışmada yağ hücre hattında fruktoz uygulandığında adipogenez ve mitokondriyal biyogenez ile ilgili genlerin özellikler de mtKPY ile ilişkili genlerin değişiminin incelenmesi planlanmıştır.

Preadipositden adiposite dönüşüm protokolunda 2. günden itibaren hücre hattının bir kısmına fruktoz uygulandığında oil red-O boyama sonucunda fruktoz uygulanan hücrelerde yağ hücrelerine dönüşüm daha erken başladı ve yağ damlaları belirgin olarak fazlaydı.

Yağ hücresinde mitokondriyon biyogenezi farklı düzeylerde kontrol edilir. Nükleusta kodlanan PPAR γ , mitokondriyal genleri kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Mitokondriyon biyogenez ve respiratuar fonksiyonlarının dinamik kontrolü de PGC-1 α ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir.

Adiposit farklılaşmasında CEBP β erken dönemde aktive olur ve son evre farklılaşmada önemli olan iki transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu uyarır. Bu iki faktör CEBP α ve PPAR γ 'dır. Bu proteinler transkripsiyon faktörüdür yani DNA'ya bağlanır ve gen ekspresyonlarını kontrol ederler. Çalışmalar CEBP α VE CEBP β 'nin yağ hücre farklılaşması ve olgunlaşmasında, mitotik klonal genişleme, epigenetik düzenleme, katlanmamış protein yanıtı ve otofajide de rol oynadığını göstermektedir (62). Bu çalışmada fruktoz uygulanan hücrelerde hem CEBP α hem de CEBP β anlamlı olarak fazla ifadelendi. CEBP β her iki grup hücrede de ikinci gün en yüksek ifadelenirken, fruktoz uygulanan hücrelerde 4,6,8. günlerde anlamlı olarak daha da yüksekti. CEBP α ve PGC-1 α gen artışı da fruktoz uygulanan hücrelerde fazla olup azalmanın daha geç olduğu görüldü. Tüm bu sonuçlar, fruktozun yağ hücre hattında adipogenezi erken dönemde

uyarırken etkisinin geç döneme kadar da devam ettiğini düşündürmektedir (64,65). Legeza ve ark. (75) bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, fruktozun başlangıçta CEBP β ekspresyonunu artırarak adipogenezi başlattığı ve sonrasında CEBP α 'yı artırarak uzun süre devam ettirdiğini göstermişlerdir.

Mitokondriyon çift zarlıdır ve iç zar, dış zar, zarlar arası boşluk, matriks bölümlerinden oluşur Her bölüm protein katlanması için farklı bir çevredir. Mitokondriyal proteom iki genomda kodlanan 1000'den fazla protein içerir. Mitokondriyal genom matriksde bulunur ve ETZ nin 13 komponenti, ATP sentaz ve mitokondriye özel tRNA'ları kodlar. Kalan proteom nükleer genomda kodlanır, sitozolde okunur ve mitokondriyona geçer. ETZ komponentlerinden I, III, IV ve ATP sentaz bileşenleri her iki genomda da kodlandığı için, iki genomun uyum içinde ekspresyonu çok önemlidir. Özellikle kompleks I ve III den kaynaklanan artmış ROS üretimi çevreyi değiştirerek mitokondriyal protein katlanmasında bozulmaya neden olur. *Uqcc* geni, "Ubiquinol-cytochrome c reductase kompleksi" diğer adlarıyla mitokondriyal solunum zincir kompleksi III veya sitokrom b-c1 kompleksinin çalışması için gerekli olan ve kompleks III'ün montajında önemli rol oynayan Uqcc proteinini kodlar (73). Çalışmamızda fruktoz uygulanmayan hücrelerde Uqcc gen artışı başta yüksek olup giderek düşerken, fruktoz eklenen hücrelerde 4 ve 6. günlerde anlamlı olarak yükselip 8. günde düşme gösterdi. Bu sonuç fruktozun kompleks III yapımını etkileyerek mitokondriyonda ROS'u artırdığını ve mitokondriyal stres yarattığını düşündürmektedir.

Mitokondriyal DNA, ROS'a maruz kaldığı için ve onu koruyacak histonları olmadığı için mutasyona açıktır. *Endog* geni, Endonükleaz G proteinini kodlar. Bu protein DNA polimerazın mitokondriyal DNA replikasyonunu başlatması için gereken RNA primerlerinin üretilmesinden sorumludur (72). Endog mitokondriyal zarlar arası boşluk, iç zar ve matriksde bulunur. Mitokondriyal DNA replikasyonu ve metabolizmasında önemli görevleri vardır ve oksidatif olarak hasarlanmış mitokondriyal DNA moleküllerinin uzaklaştırılmasında rol oynar. Pardo ve ark. (77) Endog "knockout" fare modellerinde termogenik genlerin ekspresyonunda artış olduğunu, beyaz yağ dokusunun kahverengileşmesinin kolaylaştığını ve glukoz toleransının artıp yağ kitlesinin azaldığını

göstermişlerdir. Çalışmamızda fruktoz uygulanan hücrelerde Endog ifadenmesi anlamlı olarak yüksekti. Fruktoz uygulanmayan hücrelerde başlangıçta yüksek olup azalırken, fruktoz uygulanan hücrelerde anlamlı olarak hep yüksekti. Endog ve Uqcc gen ifadenmelerindeki benzerlik, fruktozun kompleks III artışı ile oksidatif stres yarattığı ve Endog gen ekspresyonunun da artışı ile mitokondriyal DNA hasarı olduğunu destekler niteliktedir.

Mitokondriyal protein katlanmasının düzgün olmasını sağlayacak şaperonlar iç zar ve matrikste yerleşmiştir. Mitokondriyondaki kalite kontrolü esas olarak nukleusa doğru geri sinyalizasyon yollarının aktivasyonu ile uyarılan şaperon ve proteazlarla sağlanır. Mitokondriyondaki önemli iki şaperon proteini mtHsp60 ve 70'dir. mtHsp60 matriksde bulunur ve mtHsp60 ve Hsp10 subunitlerinden oluşur. Kanal yapıda bir proteindir ve küçük proteinlerin katlanmasını sağlar. mtHsp70 de matrikste bulunur, polipeptidlerin import kanalından matrikse geçişinde ve demir-sülfür küme biyosentezinde rol alır. Ayrıca, mtHsp70 protein katlanmasını sağlayarak agregasyonu önler. Şaperonların yanında Pmbcb, Clpp, Endog, Uqcc'nin de mitokondriyal strete rol aldığı gösterilmiştir.

Bir proteaz olan Pmbcb, mitokondriyon matriksinde yer alır ve öncül protein dizisini uzaklaştırarak katlanması ve olgun fonksiyonel protein haline gelmesini sağlar. Mitokondriyonda hatalı proteinleri temizleyen üç sistem vardır. Bunlar iç zarda bulunan AAA proteaz ve matrixde bulunan Clpp ve Lon proteazdır (9,68–71).

Memeli hücrelerinde mitokondriyal strete mitokondriyal DNA depleyonu olur ve MtHsp60 ve MtHsp70 şaperonları artar. Peptidaz (Pmbcb), proteaz (ClpP), diğer proteinlerin (CHOP, Endog, Uqcc) ifadenmeleri artar. Transkripsiyon faktörü olan CHOP da mtKPY da önemli rol oynar. CHOP/CEBP β heterodimeri oluşturarak şaperon ve proteaz genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar (23,24,66).

Aldridge ve ark da (78) mtKPY da mitokondriyal proteazlar, CEBP β , Clpp ve Endog ekspresyonunun arttığını ve genlerinde CHOP ile benzer promotor bölge elementi içerdiğini göstermişlerdir.

Bir transkripsiyon faktörü olan CHOP, endoplazmik retikulum stresine bağılı gelişen apoptoziste rol oynar, PERK-eIF α ile indüklenen ATF4 ile CHOP uyarılır. CHOP mtKPY'da da önemlidir ve mtHsp60 ve 10 ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler. Zhao ve ark. mitokodriyal streste CHOP ile birlikte CEBP β 'nin arttığını, aynı zamanda mtHsp60, 10, Clpp'nin de nükleer ekspresyonunun arttığını göstermişler. Onların çalışmalarında MtHsp70 de artış saptanamamıştır (27). Bu çalışmada da bu sonuçlara benzer şekilde, fruktoz eklenen hücrelerde CEBP β , Clpp, Pmbcb ve Endog ifadenmeleri daha fazlaydı. İstatistiksel olarak mtHsp60 ve mtHsp70 de fark olmamasına rağmen, mtHsp60 fruktoz uygulanan grupta daha yüksek ancak mtHsp70 de belirgin fark yoktu. Sonuç olarak, çalışmamız fruktozun yağ hücre dönüşümünü artırdığını gösterdi. Yağ hücresinde dönüşüm erken dönemde ve hızlı başlayıp geç döneme kadar da etkin devam etti. Fruktozun mitokondriyal biyogenez ve stres genlerinin ifadenmesini etkileyerek mitokodriyal stres yarattığını özellikle proteaz, peptidaz enzimlerinin arttığını gösterdik. Sonuçlarımız mitokodriyal streste özellikle oksidatif stres ve mitokondriyal DNA hasarının önemli patofizyolojik mekanizmalar olabileceğini destekler niteliktedir. Çalışmamızın gen ifadenmelerindeki kat artışlarının protein düzeyinde de gösterilmesinin sonuçlarımızı destekleyeceğini düşünmekteyiz. Obezite bir enerji dengesizliği hastalığı olarak mitokodriyon üzerinde de stres yaratmaktadır. Obezitede gelişen metabolik bozukluklarda mitokondriyal stres hem neden hem de sonuç olmaktadır. Obezite ile mücadelede özellikle beslenme düzenlenmesinde mısır şurubundan elde edilen fruktoz içeren yiyecek ve içeceklerin kaldırılması önemlidir. Çalışmamızın sonuçlarının obezite ile ilgili sağlık politikalarında yol gösterici olabileceğini umuyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, 3T3-L1 preadiposit yağ hücrelerinde fruktoz uygulamasının adiposit dönüşümüne olan etkileri araştırıldı. 3T3-L1 hücrelerinin bir kısmına standart dönüşüm protokolü uygulanırken, hücrelerin diğer kısmına ek olarak 550 μ M fruktoz eklenmiştir. Böylece fruktotoksite oluşturulmuş ve oluşturulmamış hücreler hem adiposit hücresine dönüşüm hem de mitokondriyal biyogenez ve stres ile ilgili genlerin ifadenmeleri yönünden karşılaştırılmıştır.

Oil red-O boyama ile hücrelerin dönüşümü ve yağ damlacıklarının birikimi izlenmiştir. Hücrelerin inverted mikroskop ile görüntüleri değerlendirildiğinde, fruktoz uygulanan preadiposit hücrelerde adiposit dönüşümünün hızlı olduğu ve yağ damlacıklarının daha erken ve daha yoğun olarak belirdiği gözlemlendi.

PPAR γ ve PGC-1 α hem adipogenez hem de mitokondriyal biyogenezinde önemli role sahiptir. Fruktoz uygulanan ve uygulanmayan hücrelerde PPAR γ ifadenmesi farklılık göstermedi.

CEBP β yağ hücresinin dönüşümünde en önemli olan transkripsiyon faktörlerinden biridir. Yağ hücresinin olgunlaşmasında önce CEBP β etkinken daha sonra CEBP α ve PGC-1 α transkripsiyon faktörlerini uyararak yağ hücresinin dönüşümünü devam ettirir. Çalışmamızda da CEBP β fruktoz uygulanan ve uygulanmayan hücrelerde benzer ifadenme seyri göstererek 2. günde en yüksek iken giderek azaldı. Fruktoz uygulanan hücrelerde ise CEBP β geninin ifadenmesi her günde anlamlı olarak fazlaydı.

CEBP α ve PGC-1 α genlerinin ifadenmesi fruktoz uygulanmayan hücrelerde 2. gün en yüksek iken giderek azaldı ancak fruktoz uygulanan hücrelerde 2, 4, 6. günlerde yükselme devam etti. Bu iki gen çok benzer ifadenme paterni gösterdiği saptandı.

Uqcc ve Endog mitokondriyon stresi ile yakından ilgilidir. Çalışmamızda bu iki genin ifadenmesi benzerlik gösterdi. Uqcc ve Endog genleri fruktoz uygulanmayan hücrelerde 2. günde en yüksek ifadenmeyi gösterirken, ifadenmeleri sonraki günlerde giderek azaldı. Fruktoz uygulanan hücrelerde ise 2,4 ve 6. günlerde giderek yükselme gösterirken ve 6. gündeki ifadenme artışları anlamlı iken 8. günde düştüğü gözlemlendi.

mtKPY'nda önemli görevleri olan proteaz ve peptidaz enzimleri ile ilişkili olan Clpp ve Pmpbc genlerinin ifadenmeleri de benzerlik gösterdi. Bu iki genin ifadenmesi fruktoz uygulanan hücrelerde önce 2, 4, 6. günlerde artış göstermiştir. Fruktoz uygulanmayan hücrelerde ise bu iki genin ifadenmesi 2. günde yüksek olup giderek azalmıştır.

Önemli iki şaperon proteini olan mtHsp60 ve mtHsp70 mitokondriyonun en önemli koruyucularıdır. Çalışmamızda fruktoz uygulanan ve uygulanmayan hücrelerde mtHsp60 ve mtHsp70 genlerinin ifadenmeleri farklılık göstermedi.

Sonuç olarak çalışmamızda fruktoz uygulanan 3T3-L1 preadiposit hücrelerde hem biyogenez hem de mitokondriyal stresle ilgili genlerin daha fazla ifadelendiğini gözledik. Biyogenez genlerindeki ifadenme artışının 2. günden itibaren belirgin olması ve daha uzun devam etmesi fruktozun yağlanmayı erken dönemde uyarıp uzun süreli etkisinin devam ettiğini desteklemektedir. Fruktoz oksidatif hasar (Uqcc), mitokodriyal DNA hasarı (Endog) ve mtKPY ile ilgili genlerde (Clpp ve Pmpbc) ifadenmeyi belirgin olarak artırdı. Bu sonuç fruktozun mitokondriyon üzerinde yarattığı stresi tanımlamada önemlidir. Günümüzde mtKPY aktiflenme mekanizmaları hakkında halen yeterli bilgi bulunmamaktadır. mtHsp60 ve mtHsp70 şaperon proteinlerinin gen ifadenmelerinde belirgin fark olmaması, bu iki şaperonun strese çok daha erken dönemde veya aksine daha geç dönemde yanıt veriyor olması olabilir. Bu konuda daha ileri çalışmalar ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın fruktozun mitokodriyal biyogenez ve stres üzerine etkilerinin tanımlanmasında yararlı olduğunu düşünüyoruz. Sonuçlarımız obezite ve ilişkili metabolik bozukluklarda mitokondriyon fonksiyonlarının iyileştirilmesinin tedavide önemli olabileceğini desteklemektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Panchal K, Tiwari AK. Mitochondrial dynamics, a key executioner in neurodegenerative diseases. *Mitochondrion* 47:1–23, 2019.
2. Mannella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1762:140–147, 2006.
3. Walther DM, Rapaport D. *Biochimica et Biophysica Acta* Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Mol Cell Res* 1793(1):42–51, 2009.
4. Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:657–663, 2005.
5. Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:267–284, 2019
6. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13:1–11, 2015.
7. Dorn GW. Evolving concepts of mitochondrial dynamics. *Annu Rev Physiol* 81:1–17, 2019.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts* (chapter 14). *Molecular Biology of the Cell* sixth edition, Newyork, Garland Science 753–811, 2015.
9. Van Der Blik AM, Sedensky MM, Morgan PG. Cell biology of the mitochondrion. *Genetics* 207:843–871, 2017.
10. Nsiah-Sefaa A, McKenzie M. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in Mitochondrial disease. *Biosci Rep* 36(2): e00313, 2016.
11. Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: The higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol* 24:800–808, 2017.
12. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476–1481, 1999.

13. Vandecasteele G, Szabadkai G, Rizzuto R. Mitochondrial calcium homeostasis: Mechanisms and molecules. *IUBMB Life* 52:213–219, 2002.
14. Wang C, Youle RJ. The Role of Mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* 43:95-118, 2009.
15. Stehling O, Lill R. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:1–17, 2013.
16. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity* 42:406–417, 2015.
17. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG. Sequence and organisation of the mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465, 1981.
18. Moehle EA, Shen K, Dillin A. Mitochondrial proteostasis in the context of cellular and organismal health and aging. *J Biol Chem* 294:5396–5407, 2019.
19. Gaume B. Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J* 1998;17:6497–6507, 1998.
20. Voisine C, Craig EA, Zufall N. The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix mtHsp70. *Cell* 97:565–74, 1999.
21. D'Silva PD, Schilke B, Walter W. J protein cochaperone of the mitochondrial inner membrane required for protein import into the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13839–13844, 2003.
22. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* 28:170–185, 2018.
23. Naresh NU, Haynes CM. Signaling and Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11(6):1–18, 2019.
24. Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:109–20, 2018.

25. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* 40:141–148, 2015.
26. Martinus RD, Garth GP, Webster TL, Cartwright P, Naylor DJ, Høj PB, et al. Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *Eur J Biochem* 240:98–103, 1996.
27. Zhao Q, Wang J, Levichkin I V. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* 21:4411–4419, 2002.
28. Fiorese CJ, Schulz AM, Lin YF. The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Curr Biol* 26:2037–1043, 2016.
29. Jebara F, Weiss C, Azem A. Hsp60 and Hsp70 Chaperones: Guardians of Mitochondrial Proteostasis. *eLS*. (September):1–9, 2017.
30. Münch C, Harper JW. Mitochondrial unfolded protein response controls matrix pre-RNA processing and translation. *Nature* 534:710–713, 2016.
31. Tian Y, Garcia G, Bian Q. Mitochondrial Stress Induces Chromatin Reorganization to Promote Longevity and UPRmt. *Cell* 165:1197–1208, 2016.
32. Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. Histone methyl transferases and demethylases; Can they link metabolism and transcription? *Cell Metab* 12:321–327, 2010.
33. Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ. Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* 337:587–590, 2012.
34. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: Master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:780–788, 2012.
35. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 111:1198–1207, 2012.
36. Münch C. The different axes of the mammalian mitochondrial unfolded protein response. *BMC Biol*. 16:1–9, 2018.
37. Melber A, Haynes CM. UPR mt regulation and output: A stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res* 28:281–295, 2018.
38. Medina-Gómez G. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26(6):791–804, 2012.

39. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 148(6):1145–1159, 2012.
40. Strappazzon F, Cecconi F. The multifaceted mitochondrion: An attractive candidate for therapeutic strategies. *Pharmacol Res* 99:425–433, 2015.
41. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17(4):491–506, 2013.
42. Boudina S, Graham TE. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue. *Exp Physiol* 99:1168–1178, 2014.
43. Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol* 87:180–196, 1980.
44. Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G. Mitochondrial Biogenesis and Remodeling during Adipogenesis and in Response to the Insulin Sensitizer Rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 23:1085–1094, 2001.
45. De Pauw A, Tejerina S, Raes M. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol* 175:927–939, 2009.
46. Ducluzeau PH, Priou M, Weitheimer M. Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation. *J Physiol Biochem* 67:285–296, 2011.
47. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1147:37–52, 2008.
48. Roy MJ, Vom A, Czabotar PE. Cell death and the mitochondria: Therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br J Pharmacol* 171:1973–1987, 2014.
49. Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31:364–395, 2010.
50. Kusminski CM, Scherer PE. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 23:435–443, 2012.

51. Benador IY, Veliova M, Mahdavian K. Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab* 27(4):869-885, 2018.
52. Malik VS, Popkin BM, Bray GA. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care* 33:2477–2483, 2010.
53. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose Consumption: Considerations for Future Research on Its Effects on Adipose Distribution, Lipid Metabolism, and Insulin Sensitivity in Humans. *J Nutr* 139:1236-1241, 2009.
54. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High dietary fructose: Direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. *Nutrients* 9:335-360, 2017.
55. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest* 128:545–555, 2018.
56. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:469-475, 2006.
57. Tappy L, Lê KA, Tran C. Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions. *Nutrition* 26:1044–1049, 2010.
58. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119:1322–1334, 2009.
59. Legeza B, Marcolongo P, Gamberucci A. Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Nutrients* 9:1–19, 2017.
60. Iizuka K. The role of carbohydrate response element binding protein in intestinal and hepatic fructose metabolism. *Nutrients* 9:1–12, 2017.
61. Jegatheesan P, De Bandt JP. Fructose and NAFLD: The multifaceted aspects of fructose metabolism. *Nutrients* 9:1–13, 2017.
62. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes* 62:3307–3315, 2013.

63. Cioffi F, Senese R, Lasala P. Fructose-rich diet affects mitochondrial DNA damage and repair in rats. *Nutrients* 9:1–14, 2017.
64. Cheng CF, Ku HC, Lin H. Pgc-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int J Mol Sci* 19:1–21, 2018.
65. Guo L, Li X, Tang QQ. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: A central role for CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP) β . *J Biol Chem* 290(2):755–761, 2015.
66. Hu F, Liu F. Mitochondrial stress: A bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell Signal* 23:1528–1533, 2011.
67. Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev* 131:536–543, 2010.
68. Vögtle FN, Brändl B, Larson A. Mutations in PMPCB Encoding the Catalytic Subunit of the Mitochondrial Presequence Protease Cause Neurodegeneration in Early Childhood. *Am J Hum Genet* 102:557–573, 2018.
69. Gakh O, Cavadini P, Isaya G. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1592:63–77, 2002.
70. Poveda-Huertes D, Mulica P, Vögtle FN. The versatility of the mitochondrial presequence processing machinery: cleavage, quality control and turnover. *Cell Tissue Res* 367:73–81, 2017.
71. Szczepanowska K, Maiti P, Kukat A. CLPP coordinates mitoribosomal assembly through the regulation of ERAL 1 levels . *EMBO J* 35:2566–2583, 2016.
72. Wiehe RS, Gole B, Chatre L Endonuclease G promotes mitochondrial genome cleavage and replication. *Oncotarget* 9:18309–18326, 2018.
73. Tucker EJ, Wanschers BFJ, Szklarczyk R. Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *PLoS Genet* 9: e1004034, 2013.
74. Du L, Heaney AP. Regulation of adipose differentiation by fructose and GluT5. *Mol Endocrinol* 26:1773–1782, 2012.

75. Legeza B, Balázs Z, Odermatt A. Fructose promotes the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and accelerates lipid metabolism. *FEBS Lett* 588:490–496, 2014.
76. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte* 5:351-358, 2016.
77. Pardo R, Blasco N, Vilà M. EndoG knockout mice show increased Brown adipocyte recruitment in white adipose tissue and improved glucose homeostasis. *Endocrinology* 157:3873–3887, 2016.
78. Aldridge JE, Horibe T, Hoogenraad NJ. Discovery of genes activated by the mitochondrial Unfolded Protein Response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One* 2:e875, 2007.